Regulation der Zuckerverwertung

in *Corynebacterium glutamicum*

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Tobias Georgi

aus Sigmaringen

Juni 2006

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie I der Forschungszentrum Jülich GmbH unter Anleitung von Prof. Dr. Volker F. Wendisch durchgeführt.

Referent: **Prof. Dr. H. Sahm**
Institut für Biotechnologie I
Forschungszentrum Jülich GmbH

Korreferent: **Prof. Dr. V. Wendisch**
Institut für Molekulare Biotechnologie und Mikrobiologie
Universität Münster

Tag der mündlichen Prüfung: 29.06.2006

I Zusammenfassung **1**

II Einleitung **2**

1 Der Aminosäureproduzent *Corynebacterium glutamicum* 2

2 Kohlenstoffverwertung von *C. glutamicum* 2

3 Regulation des Zentralstoffwechsels in *C. glutamicum* 3

4 L-Lysinproduktion mit *C. glutamicum* 6

5 Ziele der Arbeit 9

III Material und Methoden **10**

1 Bakterienstämme und Plasmide 10

2 Chemikalien, Nährmedien und Kultivierungsbedingungen 12

2.1 Chemikalien 12

2.2 Nährmedien und Medienzusätze 12

2.3 Kultivierung der Bakterien 13

2.4 Stammhaltung 14

3 Molekulargenetische Methoden 14

3.1 Isolation genomischer DNA 14

3.2 Isolation von Plasmid-DNA 14

3.3 Isolation von RNA 15

3.4 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration 15

3.5 Restriktion, Modifikation und Rekombination von DNA 16

3.6 Agarose-Gelelektrophorese 16

3.7 Polymerasekettenreaktion 17

3.7 Transformation von *E. coli* und *C. glutamicum* 18

3.9 Konstruktion von Deletionsmutanten von *C. glutamicum* ATCC13032 19

3.10 DNA-Sequenzierung und computergestützte Analyse 20

4 Biochemische Methoden 20

4.1 Quantifizierung von Zuckern und organischen Säuren im Medium 20

4.2 Quantifizierung von intrazellulären Metaboliten 23

4.3 Herstellung von Proteinrohextrakten 25

4.4 Messung von Enzymaktivitäten 26

4.4.1 Bestimmung der Quinon-abhängigen L-Lactat-Dehydrogenase-Aktivität (EC 1.1.2.3) 26
4.4.2 Bestimmung der Fruktose-1,6-Bisphosphatase-Aktivität 26
4.4.3 Bestimmung der Malic Enzyme-Aktivität (EC 1.1.1.9) 27
4.5 Affinitätsaufreinigung von DNA-bindenden Proteinen mittels Dynabeads® Streptavidin 28
4.6 Proteinaufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose 29
4.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese 30
4.8 Identifizierung von Proteinen mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie und Datenbankvergleich 30
4.9 Gelretardierungsexperimente 31
5 DNA-Chip-Technologie 31
5.1 Herstellung von *C. glutamicum*-DNA-Chips 32
5.2 Nachbehandlung von DNA-Chips 33
5.3 Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden 33
5.4 DNA-Chip-Hybridisierung 34
5.5 Messung und Quantifizierung von Hybridisierungssignalen 34
5.6 Normierung und statistische Analyse von DNA-Chip-Daten 34
5.7 Archivierung von DNA-Chip-Daten 35
5.8 Hierarchische Clusteranalyse 35
IV Ergebnisse 36
1 Charakterisierung der Wachstumsparameter von *C. glutamicum* Wildtyp auf Glukose, Fruktose und Saccharose 36
2 Ethambutol-induzierte Glutamatproduktion mit *C. glutamicum* ATCC13032 auf Glukose, Fruktose und Saccharose 38
3 Lysinproduktion mit verschiedenen *C. glutamicum*-Stämmen 38
4 Identifizierung von Zielgenen zur Optimierung der Lysinproduktion mit *C. glutamicum* DM1730 41
4.1 Auswirkungen der Überexpression des Gens *malE* auf die Lysinproduktion 41
4.2 Auswirkungen der Überexpression des Gens *fbp* auf die Lysinproduktion 43

4.3 Auswirkungen der *fbp*-Überexpression auf intrazelluläre Fruktose- 6- ..... Phosphat- und Fruktose-1,6-Bisphosphat-Konzentrationen 45
4.4 Auswirkungen der heterologen Überexpression der ..... Transhydrogenase *pntAB* aus *E. coli* in DM1730 46

5 Identifizierung zuckerspezifischer Stimulons mittels ..... Transkriptomanalysen..... 48
5.1 Transkriptomanalysen von *C. glutamicumin* bei Wachstum auf ..... Minimalmedium mit verschiedenen PTS-Zuckern..... 48
5.2 Transkriptomanalysen im Komplexmedium mit bzw. ohne PTS-Zucker..51

6 Substratverwertung bei *C. glutamicum* 57
6.1 Kultivierung von *C. glutamicum* WT auf Minimalmedium mit..... Glukose/Saccharose + Acetat/Pyruvat/L-Lactat 57
6.2 Kultivierung *C. glutamicum* WT auf Minimalmedium mit Fruktose + ... Acetat/Pyruvat/L-Lactat 60

7 Identifizierung von Regulatoren der Gene für Enzyme der ..... L-Lactatverwertung 61
7.1 Heterologe Expression und Aufreinigung von NCgl2814..... 63
7.2 Untersuchungen zur Bindung von NCgl2814 an den NCgl2816-*lldD*- ..... Promotor..... 64
7.3 Bestimmung der Bindestelle von NCgl2814 an den *NCgl2816-lldD*- ..... Promotor..... 66
7.4 Suche nach einem Effektor von NCgl2814 67

8 Einfluss der *NCgl2814*-Deletion und *NCgl2814*-Überexpression in ..... *C. glutamicum*..... 70
8.1 Einfluss von NCgl2814 auf die globale Genexpression in ..... *C. glutamicum* 73
8.2 Einfluss der Deletion von *NCgl2814* auf die sequentielle ..... Verstoffwechslung von Fruktose vor L-Lactat..... 74

9 Einfluss von RamA auf die L-Lactatverwertung in *C. glutamicum*..... 75

V Diskussion **77**

1 Glutamat- und Lysinproduktion mit *C. glutamicum* auf verschiedenen PTS ..... Zuckern 77

2 Bedeutung von Malic enzyme, Fruktose-1,6-Bisphosphatase und *E.coli* ..... PntAB für die Lysinproduktion 79

3 Regulation durch PTS-Zucker in *C. glutamicum* 83

4 Regulation der Gene der L-Lactatverwertenden Enzyme in *C. glutamicum* ..... durch NCgl2814 86

5 Funktion von RamA bei der Regulation des *NCgl2816-lldD*- Operons 90

6 Engpässe bei der Lysinproduktion auf Fruktose und Saccharose 91

VI Literatur **94**

VII Anhang **107**

1 Oligonukleotidsequenzen 107

2 Plasmidkarten 109

Abkürzungen

Acc	Acyl-CoA Carboxylase
ATCC	Stammsammlung (*American Type Culture Collection)*
ATP	Adenosin Triphosphat
bp	Basenpaare
BHI	Boviner Hirn Herz Extrakt
Bis/Tris	(Bis-2-(Hydroxyethyl)-Imino-Tris-(Hydroxymethyl)-Methan-HCl)
BSA	Bovines Serumalbumin
C-/N-Terminus	Carboxy-/Amino-Terminus
CoA	Coenzym A
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
DW	"dry weight", Trockengewicht
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F	Farad
Fruktose-6-P	Fruktose-6-Phosphat
Fruktose-1,6-P_2	Fruktose-1,6-Bisphosphat
FBPase	Fruktose-1,6-Bisphosphatase
g	Gramm / Erdbeschleunigung
G6P	Glukose-6-Phosphat
G6P-DH	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunden
HEPPS	3-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]propansulfonsäure
HPLC	*High Performance Liquid Chromatography*
IPTG	Isopropyl-Thio-β-D-Galactopyranosid
Kan	Kanamycin
l	Liter
LB	Luria Bertani
m	Meter
M	Molarität (mol/l)
MALDI-TOF-MS	*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight – Mass Spectromerty*
MCS	Multiple Klonierungsstelle

min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
OD	Optische Dichte
ori	Replikationsursprung
Orf	Offenes Leseraster
PCR	Polymerasekettenreaktion
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEP	Phosphoenolpyruvat
PGI	Phosphoglukoseisomerase
pH	Potentia Hydrogenii
RBS	Ribosomenbindestelle
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
t	Zeit
TAE	Tris/Acetat Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris/EDTA Puffer
TEA	Triethanolamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymatische Einheit (µmol/mg/min)
üN	über Nacht
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenprozent
V	Volt
Wt	Wildtyp
w/v	Gewichtsprozent
Ω	Ohm
λ	Wellenlänge

I Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Zucker Glukose, Fruktose und Saccharose auf das Wachstum sowie die Lysin- und Glutamatproduktion von *C. glutamicum* untersucht.

Die Wachstumsraten und Biomasseerträge sowie die durch Ethambutol induzierte Glutamatproduktion von *C. glutamicum* Wildtyp wiesen auf Glukose, Fruktose und Saccharose keine signifikanten Unterschiede auf. Die Lysinausbeute war bei dem Stamm *C. glutamicum* DM1730 jedoch auf Glukose mehr als doppelt so hoch wie auf Fruktose, Saccharose oder Glukose + Fruktose. Die Überexpression des Gens für das Malic enzyme zur Verbesserung der NADPH-Bereitstellung hatte keinen Einfluss auf die Lysinproduktion während die Überexpression des Gens für die Fruktose-1,6-Bisphosphatase auf Saccharose fast zu einer Verdopplung der Lysinausbeute führte. Dabei wurde nur auf Saccharose die intrazelluläre Konzentration von Fruktose-1,6-Bisphosphat, einem kompetitiven Inhibitor von Enzymen des Pentosephosphatweges signifikant gesenkt. Dies führte vermutlich zu einem höheren Kohlenstoffffluss über den Pentosephosphatweg und damit zu einer besseren NADPH-Versorgung. Eine direkte Erhöhung der NADPH-Bereitstellung durch heterologe Überexpression der Transhydrogenase *pntAB* aus *E. coli* führte zu erhöhten Lysinausbeuten auf allen getesteten Zuckern.

Zur Identifizierung der Glukose-, Fruktose- und Saccharosestimulons wurden DNA-Chip-Untersuchungen zur globalen Genexpression bei Wachstum von *C. glutamicum* auf diesen verschiedenen Zuckern durchgeführt. Diese ergaben, dass auf LB-Medium in Anwesenheit aller getesteten Zucker die Expression von 53 Genen, die unter anderem für Transporter und Enzyme zur Aufnahme oder Verwertung alternativer C-Quellen kodieren, reprimiert wurde. Darüber hinaus wurde in LB-Medium durch Anwesenheit von Fruktose und Saccharose die Expression von Genen zur Adaption an Stickstoffmangel induziert. Dies war mit einer reduzierten Expression von Genen für Enzyme zur Oligopeptidverwertung verbunden. Daraus ging hervor, dass in LB-Medium die Stickstoffverfügbarkeit in Anwesenheit von Fruktose und Saccharose limitierend war.

Um regulatorische Effekte durch PTS-Zucker auf die Verwertung alternativer Kohlenstoffquellen zu untersuchen, wurde *C. glutamicum* auf Substratgemischen, bestehend aus einem PTS-Zucker und einer organischen Säure, kultiviert und der Verbrauch der Kohlenstoffquellen bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Glukoseverwertung in *C. glutamicum* durch Acetat, Pyruvat und L-Lactat ca. vierfach reduziert wurde, während die Fruktose- und Saccharoseaufnahme nicht beeinflusst waren. Beim Wachstum auf Fruktose und L-Lactat zeigte sich ein diauxisches Wachstum unter Bevorzugung von Fruktose.

Zur Aufklärung des Mechanismus der Fruktose/L-Lactat-Diauxie wurde die Regulation der Gene für die Enzyme der L-Lactatverwertung untersucht. Dabei wurde der bis dahin unbekannte Regulator NCgl2814 als Repressor des für die L-Lactatverwertung essentiellen Operons *NCgl2816-lldD* identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Repressor in der Region -89 bis -35 bp stromaufwärts vom Translationsstart des *NCgl2816-lldD*-Operons bindet und dass die Bindung mit zunehmenden Konzentrationen von L-Lactat ab 10 mM inhibiert wird. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde ein Modell zur Regulation der zur L-Lactatverwertung essentiellen Gene erstellt. In diesem Modell bindet NCgl2814 in Abwesenheit von L-Lactat an den *NCgl2816-lldD*-Promotor und reprimiert dessen Expression, während NCgl2814 in Anwesenheit von L-Lactat vom Promotor dissoziiert, was zur Erhöhung der Expression der Gene für die Enzyme der L-Lactatverwertung führt.

II Einleitung

1 Der Aminosäureproduzent *Corynebacterium glutamicum*

Corynebacterium glutamicum ist ein biotechnologisch bedeutendes Bakterium, welches weltweit zur industriellen Produktion von Aminosäuren verwendet wird. *C. glutamicum* wurde 1957 aus Bodenproben isoliert (Kinoshita *et al.*, 1957) und zeichnet sich durch eine positive Gram-Färbung, Biotinbedürftigkeit, Unbeweglichkeit, keine Sporenbildung, eine keulenförmige Morphologie (coryne = griech. Keule) sowie die Produktion von L-Glutamat unter Biotinmangel aus (Abe *et al.*, 1967). *C. glutamicum* gehört als Bakterium mit einem GC-reichen Genom zur Klasse der *Actinobacteria*, in welcher es der Ordnung *Actinomycetales*, der Unterordnung *Corynebacterineae* und letztlich der Familie der *Corynebacterianeae* zugeordnet wird (Liebl, 1991; Stackebrandt *et al.*, 1997). Obwohl zu der Unterordnung der *Corynebacterineae* auch äußerst pathogene Arten wie *C. diphteriae, Mycobacterium tuberculosis* und *M. leprae* gehören, zählt *C. glutamicum* zu den sogenannten "GRAS"-Organismen ("generally regarded as safe"), was es für biotechnologische Zwecke besonders geeignet macht. Aufgrund der großen industriellen Bedeutung von *C. glutamicum* wurde die Forschung an diesem Bakterium in den letzten Jahren stark vorangetrieben, so dass umfangreiches Wissen zur Biochemie, Physiologie, Genetik und zum zentralen Aminosäurestoffwechsel von *C. glutamicum* vorhanden ist (Eggeling und Bott, 2005).

2 Kohlenstoffverwertung von *C. glutamicum*

C. glutamicum kann auf einer Reihe von Zuckern, aber auch auf Zuckeralkoholen und organischen Säuren als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen (Krämer *et al.*, 1990; Dominguez *et al.*, 1998; Kiefer *et al.*, 2002; Gerstmeir *et al.*, 2003; Wendisch, 2003; Eikmanns, 2005; Moon *et al.*, 2005). Die Aufnahme erfolgt dabei im Fall von Glukose, Fruktose und Saccharose über das Phosphoenolpyruvat-abhängige Phosphotransferase (PTS)-System (Dominguez und Lindley, 1996; Dominguez *et al.*, 1998; Parche *et al.*, 2001; Yokota und Lindley, 2005). Dabei wird

Glukose zu Glukose-6-Phosphat (Pons *et al.*, 1996), Fruktose zu Fruktose-1-Phosphat und Saccharose zu Saccharose-Phosphat umgesetzt (Sugimoto und Shiio, 1989; Pons *et al.*, 1996; Dominguez *et al.*, 1998). Saccharose-Phosphat wird intrazellulär in Glukose-6-Phosphat und Fruktose gespalten, wobei die dabei freigewordene Fruktose dann über einen noch unbekannten Exporter ausgeschleust und anschließend über das fruktosespezifische PTS-System wieder in die Zelle aufgenommen wird (Dominguez und Lindley, 1996; Moon *et al.*, 2005). Bislang gibt es keine Hinweise darauf, dass *C. glutamicum* intrazellulär unphosphorylierte Fruktose verwerten kann, da keine Fruktokinase-Aktivität nachgewiesen werden konnte (Shiio *et al.*, 1990). Die Aufnahme von PTS-Zuckern ist auch mit der Umsetzung von Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Pyruvat verbunden, weshalb der Aufnahme von Zuckern über das PTS-System im Vergleich zu ABC-Transportern eine besondere Rolle zukommt. In Abwesenheit der Pyruvatkinase, die PEP in Pyruvat umsetzt, ist die Aufnahme von Zuckern über das PTS-System und die damit verbundene Pyruvatbildung essentiell für das Wachstum von *C. glutamicum* (Gubler *et al.*, 1994; Netzer *et al.*, 2004).

In Anwesenheit von mehr als einer Kohlenstoffquelle zeichnet sich *C. glutamicum* dadurch aus, dass es unter anderem Glukose mit Acetat, Lactat oder Fruktose coverstoffwechselt (Cocaign und et al., 1993; Dominguez *et al.*, 1997; Dominguez *et al.*, 1998; Wendisch *et al.*, 2000). Die Coverstoffwechslung von Acetat und Glukose führt zu einer Reduktion der Glukoseaufnahme (Wendisch *et al.*, 2000). Daraus wird ersichtlich, dass die Glukoseaufnahme und/oder die initiale Verstoffwechslung reguliert wird. Die einzigen bekannten Beispiele für ein diauxisches Wachstum von *C. glutamicum* sind die sequentielle Verstoffwechslung von Glukose vor Glutamat (Kronemeyer *et al.*, 1995) und Glukose vor Ethanol (Arndt, unveröffentlicht).

3 Regulation des Zentralstoffwechsels in *C. glutamicum*

In vielen Gram-positiven Bakterien findet eine sogenannte Katabolitrepression statt, die über das PTS-System bewerkstelligt wird. Dabei wird die Aufnahme oder der Verbrauch alternativer Kohlenstoffquellen unterdrückt, wenn eine präferierte Kohlenstoffquelle zur Verfügung steht (Stülke und Hillen, 1999). Die Aufnahme von PTS-Substraten ist mit einer Phosphorylierungskaskade verbunden, bei der eine Phosphatgruppe von PEP über die allgemeinen PTS-Komponenten Enzym I (EI;

ptsI) und das Protein HPr (*ptsH*) an die substratspezifischen Enzym II-Permeasen (EII) und schließlich an das aufgenommene Substrat weitergegeben wird (Lengeler *et al.*, 1994).

In *B. subtilis* findet eine PTS-spezifische Regulation über den Phosphorylierungszustand von HPr statt. In Anwesenheit von Glukose wird HPr am konservierten Serinrest Ser46 phosphoryliert (Blencke *et al.*, 2003). In diesem Zustand agiert HPr-Ser-P als Cofaktor für das "Catabolite control protein A" CcpA (Stülke und Hillen, 1999), welches durch Bindung an "catabolite-responsive elements" (*cre*) an der Aktivierung oder Repression einer Vielzahl von Genen beteiligt ist (Brückner und Titgemeyer, 2002).

In *C. glutamicum* konnten die allgemeinen PTS-Komponenten EI und HPr (Kotrba *et al.*, 2001) und die zuckerspezifischen Komponenten für Glukose, Fruktose und Saccharose (EII^{Glu}, EII^{Fru} und EII^{Suc}) funktionell charakterisiert werden (Moon *et al.*, 2005). EI und HPr sind essentiell für das Wachstum auf PTS-Zuckern (Kotrba *et al.*, 2001), während für einen spezifischen Zucker EII-Komponenten nur für das Wachstum auf diesem Zucker als einziger Kohlenstoffquelle essentiell sind (Moon *et al.*, 2005). Dabei konnte allerdings gezeigt werden, dass Fruktose in Abwesenheit von EII^{Fru} auch mit einer geringen Aufnahmerate über das EII^{Glu} aufgenommen werden kann (Moon *et al.*, 2005). Neben den 3 funktionell charakterisierten EII-Komponenten gibt es noch ein viertes Enzym II (NCgl2934), dessen Funktion jedoch bislang unbekannt ist (Moon *et al.*, 2005). Bei der Lokalisation der PTS-Komponenten im Genom des *C. glutamicum* Wildtyps (Kalinowski *et al.*, 2003) ist auffällig, dass die allgemeinen PTS-Komponenten EI und HPr sowie das fruktosespezifische Enzym II in einem Cluster im Genom liegen und somit möglicherweise der gleichen genetischen Regulation unterliegen. In direkter Nachbarschaft zu EII^{Fru} ist auch die 1-Phosphofruktokinase (*fruK*; *NCgl1860*) lokalisiert sowie die putativen Transkriptionsregulatoren NCgl1856 und NCgl1859 (Kalinowski *et al.*, 2003). Die Enzym II-Komponenten für Glukose und Saccharose sind an jeweils anderen Orten im Genom lokalisiert. Während in direkter Nachbarschaft zum EII^{Suc} eine putative Saccharose-Phosphat-Hydrolase (*NCgl2554*) kodiert ist, befindet sich in der Nachbarschaft von EII^{Glu} kein Gen, das an der initialen Verstoffwechslung von Glukose beteiligt sein könnte.

Untersuchungen zur Aufklärung einer Funktion des PTS-Systems in *C. glutamicum* bei der Genregulation ergaben, dass anhand von Homologievergleichen der konser-

vierte Serinrest an Aminosäurepostition 46 des HPr-Proteins in *C. glutamicum* nicht vorhanden ist (Parche *et al.*, 2001). Des Weiteren konnte in *C. glutamicum* weder ein Gen gefunden werden, das für eine HPr-Kinase kodiert noch konnte HPr-Kinase-Aktivität nachgewiesen werden (Parche *et al.*, 2001), ebenso ist kein Protein bekannt, das eine CcpA-ähnliche Funktion in *C. glutamicum* zeigt (Eikmanns, persönliche Mitteilung). Es ist folglich nicht bekannt, wie eine Katabolitrepression über das PTS-System in *C. glutamicum* erfolgt und ob diese überhaupt vorhanden ist.

Die genetische Regulation von Genen für Enzyme des Zentralstoffwechsels und zur Aufnahme von Kohlenstoffquellen ist in *C. glutamicum* größtenteils unbekannt. Bislang konnten nur wenige Transkriptionsregulatoren in *C. glutamicum* charakterisiert werden. Darunter fallen RamB (Gerstmeir *et al.*, 2004), RamA (Cramer *et al.*, 2006), AcnR (Krug *et al.*, 2005), LysG (Bellmann *et al.*, 2001), ClgR (Engels *et al.*, 2005) und GlxR (Kim *et al.*, 2004; Letek *et al.*, 2006). Von diesen Regulatoren sind RamB und GlxR an der Regulation der Verwertung von Zuckern oder Zuckeralkoholen beteiligt.

RamB ("Regulator of acetate metabolsim B") wurde als transkriptioneller Repressor des Operons der Gene für die Enzyme der Acetataktivierung Acetatkinase (*ack*) und Phosphotransacetylase (*pta*) und als Repressor der Gene der Glyoxylatzyklus-Enzyme Isocitratlyse (*aceA*) und Malatsynthase (*aceB*) beschrieben (Gerstmeir *et al.*, 2004). Die Promotorregionen dieser Gene weisen eine 13 bp umfassende Sequenz auf, die als spezifische Bindestelle für RamB identifiziert wurde. Sequenzanalysen ergaben, dass putative RamB-Bindestellen in den Promotorbereichen von zahlreichen Genen von Enzymen des Zentralstoffwechsels vorhanden sind, darunter EII^{Glu} und EII^{Suc} des PTS-Systems. Somit ist es wahrscheinlich, dass RamB an der Regulation dieser Gene beteiligt ist (Gerstmeir *et al.*, 2004).

GlxR ist ein weiterer Transkriptionsregulator, der die Acetatverwertung beeinflusst (Kim *et al.*, 2004). GlxR weist eine cAMP-Bindedomäne im N-Terminus auf und wurde als cAMP-abhängiger Repressor des Gens der Malatsynthase (*aceB*) identifiziert. Es konnte auch gezeigt werden, dass GlxR bei Zugabe von cAMP an der Regulation der Glukonatverwertung beteiligt ist, da es im Promotorbereich der Gene für die Glukonatpermease (*gntP*) und Glukonatkinase (*gntk*) binden kann und damit deren Expression reprimiert (Letek *et al.*, 2006). GlxR weist 27% Aminosäureidentität zu *E. coli* CRP auf und kann *E. coli* CRP-Mutanten komplementieren (Kim *et al.*,

2004), weshalb es auch als hypothetisches CRP in *C. glutamicum* bezeichnet wird (Letek *et al.*, 2006). In *Streptomyces coelicolor* (Derouaux *et al.*, 2004) und *Mycobacterium tuberculosis* (Gazdik und McDonough, 2005) konnten ebenfalls cAMP-abhängige CRP-Homologe gefunden werden.

4 L-Lysinproduktion mit *C. glutamicum*

Derzeit werden mit *C. glutamicum* jährlich >1.200.000 Tonnen L-Glutamat und >550.000 Tonnen L-Lysin pro Jahr hergestellt (Hermann, 2003). L-Lysin wird hauptsächlich in der Futtermittelindustrie verwendet.

Im Gegensatz zu L-Glutamat, welches bei entsprechender Induktion auch der *C. glutamicum* Wildtyp ausscheiden kann, wird L-Lysin nur von genetisch modifizierten Stämmen ausgeschieden. Es konnten eine Reihe von Genen identifiziert werden, die für eine effektive Produktion von L-Lysin essentiell sind (Eggeling, 1994; Sahm *et al.*, 2000; Hermann, 2003; Pfefferle *et al.*, 2003). Das Enzym Aspartatkinase (*lysC*) ist das Schlüsselenzym der verzweigten Lysinbiosynthese (Abbildung 1). Die Überexpression von *lysC (*Cremer *et al., 1991)*, insbesondere von Allelen, die eine Resistenz gegenüber der Feedback-Inhibition durch L-Lysin und L-Threonin verleihen, stellt ein wichtiges Instrument zur Verbesserung der Lysinproduktion dar (Shiio und Miyajima, 1969; Kalinowski *et al.*, 1991). Zur Verringerung der Nebenproduktbildung in Form von L-Threonin wurden *hom*-Allele eingebracht, die zu einer verringerten Homoserin-Dehydrogenaseaktivität führen. Dies erhöht den Fluss zur Lysinbiosynthese und verringert gleichzeitig die Feedback-Inhibition durch L-Threonin (Follettie *et al.*, 1988; Eikmanns *et al.*, 1991). Zur Verbesserung der Synthese von Vorläufermolekülen wurde das Gen für die Pyruvat-Carboxylase (*pyc*) identifiziert (Peters-Wendisch *et al.*, 2001). Die Überexpression von *pyc* verbessert die Bereitstellung von Oxalacetat und führt zu erhöhten Lysinausbeuten (Peters-Wendisch *et al.*, 2001).

Die Biosynthese von L-Lysin benötigt eine große Menge an Reduktionskraft in Form des Cofaktors NADPH, wobei pro Mol Lysin vier Mol NADPH benötigt werden (Marx *et al.*, 1997). Kohlenstoffflussanalysen konnten zeigen, dass der Fluss über den Pentosephosphatweg, der Hauptstoffwechselweg zur Regeneration von NADPH, von enormer Wichtigkeit bei der Lysinproduktion auf Glukose ist (Marx *et al.*, 1996; Marx *et al.*, 1997; Marx *et al.*, 1999). Durch Einbringung veränderter Allele des Glukose-6-

Phosphat-Dehydrogenase-Gens *zwf* (Ando *et al.*, 2002) und des 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase-Gens *gnd* (Ohnishi *et al.*, 2005) konnte der Stoffffluss über den Pentosephosphatweg gesteigert werden, was zu einer Erhöhung der Lysinproduktion führte.

Basierend auf den so gewonnen Erkenntnissen wurde ein Stamm konstruiert, in den Punktmutationen im Aspartatkinase-Gen *lysC*, im Homoserin-Dehydrogenase-Gen *hom* und im Pyruvat-Carboxylase-Gen *pyc* in den Wildtyp eingebracht wurden. Diese Punktmutationen wurden in Lysinproduktionsstämmen identifiziert, die auf klassische Art durch ungerichtete Mutagenese entstanden sind (Ohnishi *et al.*, 2002). Der durch Einführung der Punktmutationen vom Wildtyp abgeleitete Stamm erwies sich als sehr effizienter Lysinproduzent (Ohnishi *et al.*, 2002). Neben den drei genannten Punktmutationen wurde noch eine Punktmutation im *zwf*-Gen eingebracht. Daraus entstand der Stamm DM1730 (Degussa), der als lysinproduzierender Modellstamm verwendet wird, da er im Gegensatz zu Stämmen, die durch ungerichtete Mutagenese entstanden sind, einen bekannten Genotyp hat.

Obwohl bei der Lysinproduktion neben glukose- auch saccharose- und invertzuckerhaltige Medien verwendet werden, war die Suche nach Zielgenen zur Stammverbesserung bislang auf Glukose als Kohlenstoffquelle fokussiert (Dominguez *et al.*, 1998; Kiefer *et al.*, 2002). Bei Verwendung von Fruktose und Saccharose zur Lysinproduktion zeigte sich, dass die Lysinausbeute in einem durch ungerichtete Mutagenese entstandenen Produktionsstamm auf Glukose 8 % höher ist als auf Saccharose und 30% höher als auf Fruktose (Kiefer *et al.*, 2002). Dagegen werden auf fruktosehaltigen Medien neben einer erhöhten CO_2-Bildung auch mehr Nebenprodukte in Form von L-Lactat, Glycerin und Dihydroxyaceton gebildet (Kiefer *et al.*, 2002). Kohlenstoffflussanalysen haben gezeigt, dass der Fluss über den Pentosephosphatweg auf Glukose 62,3% beträgt, während er sich auf Fruktose nur auf 7,7% beläuft (Marx *et al.*, 1996; Dominguez *et al.*, 1998). Mit einem anderen Stamm wurde auf Saccharose ein Fluss von 55,7% über den Pentosephosphatweg gemessen (Wittmann *et al.*, 2004). Es wird vermutet, dass ein geringerer Fluss über den Pentosephosphatweg auf fruktosehaltigen Medien zu einem Engpass in der NADPH-Versorgung für die Lysinproduktion führen kann (Pons *et al.*, 1996; Kiefer *et al.*, 2004). Glukose, Fruktose und Saccharose werden in Form von unterschiedlichen

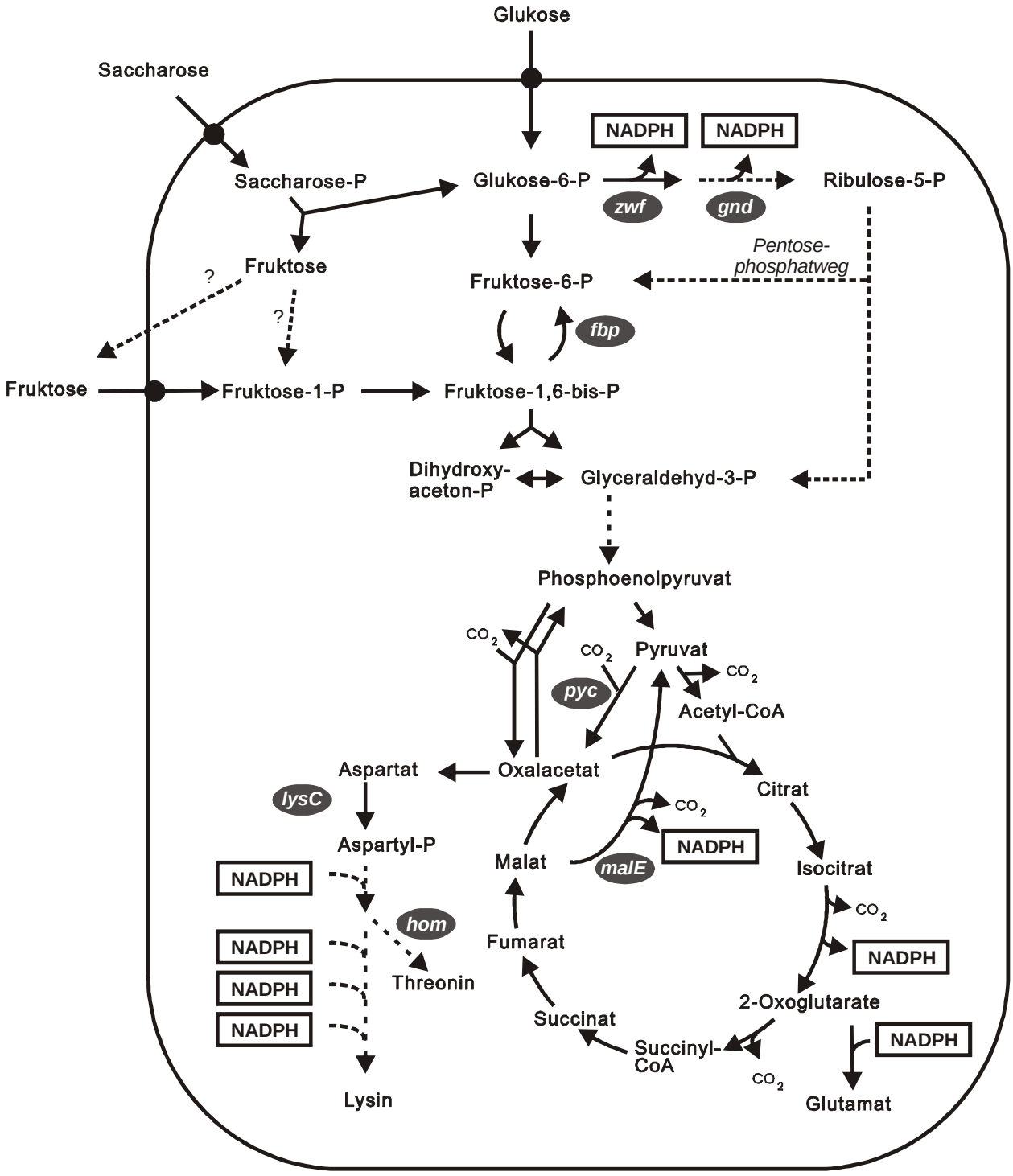

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Zentralstoffwechsels in *C. glutamicum*. Die enzymatischen Reaktionen/Stoffwechselwege zur Aufnahme und Aktivierung von Glukose, Fruktose und Saccharose, für die Glykolyse, den Pentosephosphatweg, den Citratzyklus und für die Glutamat- und Lysinbiosynthese sind dargestellt. Die Gennamen sind neben den entsprechenden Reaktionen für die Glukose-6-P-Dehydrogenase (*zwf*), die 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase (*gnd*), Fruktose-1,6-Bisphosphatase (*fbp*), Pyruvat-Carboxylase (*pyc*), malic enzyme (*malE*) Aspartatkinase (*lysC*) und Homoserindehydrogenase (*hom*) angegeben.

Metaboliten in die Glykolyse eingebracht. Während Glukose in Form von Glukose-6-Phosphat in den Zentralstoffwechsel eintritt (Pons *et al.*, 1996), wird Fruktose bei der Aufnahme zu Fruktose-1-Phosphat phosphoryliert und wird komplett in Form von Fruktose-1,6-Bisphosphat in die Glykolyse eingebracht (Sugimoto und Shiio, 1989). Im Fall von Saccharose wird der Glukoseanteil als Glukose-6-Phosphat und der Fruktoseanteil als Fruktose-1,6-Bisphosphat in den Zentralstoffwechsel eingebracht (Dominguez und Lindley, 1996; Moon *et al.*, 2005). Ausgehend von Fruktose-1,6-Bisphosphat wird die Reaktion der Fruktose-1,6-bisphosphatase zum Eintritt in den Pentosephosphatweg benötigt. Es wurde vermutet, dass Überexpression des Gens für die Fruktose-1,6-bisphosphatase (*fbp*) (Rittmann *et al.*, 2003) den Fluss über den Pentosephosphatweg insbesondere auf fruktosehaltigen Medien erhöht, was die NADPH-Bereitstellung und damit die Lysinproduktion verbessern könnte (Pons *et al.*, 1996; Kiefer *et al.*, 2004). Diese Theorie ist aber bislang nicht experimentell bestätigt. Als anderer limitierender Faktor der NADPH-Bereitstellung wurde Malic enzyme vorgeschlagen (Dominguez *et al.*, 1998; Ohnishi *et al.*, 2003), welches Malat unter NADPH-Bildung zu Pyruvat umsetzt (Gourdon *et al.*, 2000; Netzer *et al.*, 2004). Auch hierzu gibt es jedoch bislang keine experimentellen Daten.

5 Ziele der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung der PTS-Zucker Glukose, Fruktose und Saccharose bei *C. glutamicum* für das Wachstum sowie die Lysin- und Glutamatproduktion zu charakterisieren. Mit Hilfe der DNA-Chip-Technik sollte der Einfluss von Glukose, Fruktose und Saccharose auf die globale Genexpression in *C. glutamicum* sowohl in Minimalmedium als auch in Komplexmedium analysiert werden. Dabei war es von Interesse, für einzelne PTS-Zucker spezifische von generellen Regulationsmechanismen zu differenzieren.

Des Weiteren sollte beim Wachstum von *C. glutamicum* auf Mischsubstraten untersucht werden, ob die Anwesenheit von PTS-Zuckern die Verwertung der organischen Säuren Acetat, Pyruvat und L-Lactat beeinflusst. Dabei sollten Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die PTS-zuckerspezifisch an der Regulation von Genen zur Verwertung von Kohlenstoffquellen beteiligt sind.

III Material und Methoden

1 Bakterienstämme und Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide sind in Tabelle 1 und Tabelle 2 aufgeführt. Plasmidkarten von neu konstruierten Vektoren sowie die Sequenzen verwendeter PCR-Primer sind im Anhang dargestellt.

Tabelle 1: Verwendete *E. coli* und *C. glutamicum* Stämme und ihre relevanten Eigenschaften

Stamm	Phänotyp/Genotyp	Referenz
Escherichia coli		
DH5α	DH5α F*thi*-1 *endA*1 *hsdr*17(r-, m-) *pE*44 Δ*lacU*169(φ80*lacZ*.M15) *recA*1 *rA*96 *relA*1	Hanahan,1983
BL21(DE3)	F-, V-, *lon*$^{-}$, *rif* S, λ-lysogen mit T7 Gen 1 (Polymerase)	F. Wood,1966
Corynebacterium glutamicum		
WT	Wildtyp, ATCC13032	Abe *et al*., 1967
DM1727	WT *pyc*^{P458S}	B. Bathe, Degussa
DM1728	WT *pyc*^{P458S} *hom*^{V59A}	B. Bathe, Degussa
DM1729	WT *pyc*^{P458S} *hom*^{V59A} *lysC*^{T311I}	B. Bathe, Degussa
DM1730	WT *pyc*^{P458S} *hom*^{V59A} *lysC*^{T311I} *zwf*^{A243T}	B. Bathe, Degussa
DM1797	WT *lysC*^{T311I}	B. Bathe, Degussa
DM1800	WT *lysC*^{T311I} *pyc*^{P458S}	B. Bathe, Degussa
WTΔ*NCgl2814*	WT mit chromosomaler Deletion von *NCgl2814* (Biomax 310)	Diese Arbeit
RG2	WT mit chromosomaler Deletion von *ramA* (Biomax 2892)	Cramer *et al.*, 2006

Tabelle 2: Verwendete Plasmide und ihre relevanten Eigenschaften

Plasmid	Marker/Eigenschaft	Referenz
pK19*mobsacB*	Integrationsvektor, Kan^R, *sacB*, *oriV*$_{E.c.}$, *oriT*	Schäfer *et al.*, 1994
pK19*mobsacB* del*2814*	pK19*mobsacB* mit *NCgl2814*-Sequenz; deletiert ist ein internes 638bp Fragment	Diese Arbeit
pET-16b	Amp^R, Überproduktion von Proteinen mit N-terminalen Decahistidin-Tag in *E. coli* (pBR322 *oriV*$_{E.c.}$, *PT7*, *lacI*)	Novagen
pET-16b-*NCgl2814*	Amp^R, pET-16b mit einem 707 bp Fragment mit dem *NCgl2814*-Gen	Diese Arbeit
pVWEx1	Kan^R, P_{tac}, $lacI^q$	Peters-Wendisch *et al.*, 2001
pVWEx1-*fbp*	Kan^R, pVWEx1 mit einem 1075 bp Fragment mit dem *fbp*-Gen und einer artifiziellen RBS	Diese Arbeit
pVWEx1-*malE*	Kan^R, pVWEx1 mit einem 1269 bp Fragment mit dem *malE*-Gen und einer artifiziellen RBS	Diese Arbeit
pVWEx1-*NCgl2814*	Kan^R, pVWEx1 mit einem 761 bp Fragment mit dem *NCgl2814*-Gen und einer artifiziellen RBS	Diese Arbeit
pEKEx2	Kan^R, P_{trc}, $lacI^q$	Eikmanns *et al.* 1991
pEKEx2-*pntAB*	Kan^R, pEKEx2 mit einem 2968 bp *PstI/SalI* geschnittenen Fragment mit dem *E.coli pntAB*-Gen	Kabus, 2006

2 Chemikalien, 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 und Medienzusätze

Nährmedien und Medienzusätze 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. Die Stammhaltung erfolgte ebenfalls in LB-Medium. Zur Selektion rekombinanter Stämme wurden dem Medium gegebenenfalls Ampicillin oder Kanamycin mit einer Endkonzentration von jeweils 50 µg/ml zugegeben.

Nährmedien und Medienzusätze für *C. glutamicum*

Zur Stammhaltung, DNA-Isolierung und für Vorkulturen wurde LB-Medium oder BHI-Komplexmedium (Difco Laboratories, Detroit, USA) verwendet. Für Hauptkulturen wurde, wenn nicht anderes angegeben, das Minimalmedium CgXII (Keilhauer *et al.*, 1993) mit jeweils angegebener Kohlenstoffquelle und 30 mg/l Protokatechusäure sowie 0,2 mg/l Biotin 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 Kanamycin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml bzw. 25 µg/ml nach Elektroporation.

2.3 Kultivierung der Bakterien

Kultivierung von *E. coli* und *C. glutamicum*

Die Kultivierung von *E. coli* und *C. glutamicum* erfolgte in 500 ml Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen. Diese enthielten entweder 60 ml CgXII-Medium, 60 ml BHI-Medium oder 70 ml LB-Medium. Für Kultivierungen zur Isolierung von Plasmid-DNA im kleineren Maßstab wurden 5 ml Vollmedium im Reagenzglas eingesetzt. Kulturen in Reagenzgläsern wurden bei 170 rpm, alle übrigen Kulturen bei 120 rpm (Rotationsdurchmesser 50 mm) inkubiert. Die Kultivierungstemperatur betrug 37℃ für *E. coli* und 30℃ für *C. glutamicum*.

Kultivierung von Expressionskulturen

500 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin in einem 2 l Erlenmeyerkolben wurde mit 5 ml einer ÜN-Kultur des *E. coli*-Stammes BL21(DE3)(pET-16b-*NCgl2814*) angeimpft. Die Kulturen wurden zunächst bei 37℃ und 120 rpm inkubiert, bis sie eine OD_{600} von ca. 0,6 erreicht hatten. Die Expression des Zielgens wurde durch Zusatz von 1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert. Danach wurden die Zellen bei RT und 130 rpm 4 Stunden weiter inkubiert bis zur Zellernte durch Zentrifugation (10 min, 5300 x *g*, 4℃). Die abzentrifugierten Zellen wurden einmal in 50 ml TNI5 (20 mM Tris, 300 mM NaCl, 5% (v/v) Glycerin, 5 mM Imidazol, pH 7,9) gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei –20℃ gelagert.

Vor- und Hauptkulturen zur Lysinproduktion mit *C. glutamicum*

Zur Lysinproduktion wurden 60 ml BHI-Medium in einem 500 ml Erlenmeyerkolben von einer frisch angelegten LB-Platte angeimpft. Falls die Sämme Plasmide mit einer Kanamycinresistenzkassette enthielten wurde 50 µg/ml Kanamycin zugegeben. Nach

14 stündiger Inkubation bei 30℃ und 120 rpm wurden die Zellen gewaschen und in 500 ml Kolben mit 60 ml CgXII-Medium und 10% (w/v) Glukose, Fruktose oder Saccharose zu einer OD_{600} von 1,0 überführt. Falls Gene überexprimiert werden sollten, erfolgte die Induktion 3h nach Animpfen der Hauptkultur mit IPTG (Endkonzentration 1 mM) in Anwesenheit von 50 µg/ml Kanamycin. Nach 72 h Inkubation bei 30℃ und 120 rpm wurden Proben zur Aminosäureanalytik entnommen.

2.4 Stammhaltung

Zur Stammhaltung wurden Dauerkulturen angelegt, die aus 70% (v/v) einer Komplexmedium-Übernachtkultur und 30% (v/v) sterilem Glycerin bestanden. Diese Dauerkulturen wurden bei -70℃ gelagert und zum Beimpfen von Agarplatten verwendet. Im Fall von *E. coli* wurden die Agarplatten für 18 h bei 37℃ bzw. im Fall von *C. glutamicum* für 48 h bei 30℃ inkubiert, dann bei 4℃ gelagert und nach spätestens 14 Tagen erneuert.

3 Molekulargenetische Methoden

3.1 Isolation genomischer DNA

Genomische DNA von *C. glutamicum* wurde wie beschrieben isoliert (Eikmanns *et al.*, 1994). Nach Aufschluss der Zellen (Lysozym- und SDS-Behandlung) und enzymatischer Proteolyse wurden die Peptide sowie die Proteinase K mit NaCl gefällt. Nach Zentrifugation (30 min, 5000 x *g*, 4℃) wurde die genomische DNA durch Ethanolfällung aus dem Überstand isoliert, an der Luft getrocknet und in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 1 mM EDTA) gelöst.

3.2 Isolation von Plasmid-DNA

Die Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte durch alkalische Lyse (Birnboim und 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. 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 (Birnboim und Doly, 1979).

3.3 Isolation von RNA

Die Isolation von RNA für globale Genexpressionsanalysen bei *C. glutamicum* erfolgte nach einem mechanischen Zellaufschluss mit Hilfe des *RNeasy Mini Kits* (Qiagen, Hilden) (Lange *et al.*, 2003), welche auf der Bindung von RNA an eine Silikatmatrix beruht. Dazu wurden 20 ml der Kultur zusammen mit 20 g Eis (vorgekühlt auf -20℃) abzentrifugiert (5 min, 2000 x *g*, 4℃). Die Zellen wurden in 700 µl RLT-Puffer (Qiagen) resuspendiert, auf zwei Eppendorfgefässe mit je 0,25 g Zirkonium-/Silica-Perlen (0,1 mm, Roth, Karlsruhe) aufgeteilt und für 30 sec in einem Silamat S5 (Vivadent, Ellwangen) aufgeschlossen. Nach Zentrifugation (2 min, 16000 x *g*) wurde der Überstand jedes Eppendorfgefässes 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 Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde spektralphotometrisch (NanoDrop ND-1000, Peqlab, Erlangen) durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm nach Angaben des Herstellers gemessen. Die Reinheit wurde mittels der Quotienten E_{260}/E_{280} (Protein-Verunreinigung) und E_{260}/E_{230} (Kohlenhydrat-Verunreinigungen) kontrolliert. Die Werte dieser Quotienten sollte 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 Restriktionsenzyms für eine vollständige Restriktion eingesetzt. Bei einer Restriktion im präparativen Maßstab umfasste der Ansatz 100 µl. Es wurden 1 - 5 µg DNA und 10 - 50 U Restriktionsenzym eingesetzt. Soweit nicht anders angegeben erfolgten alle Restriktionsverdaus bei 37°C. Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in Abhängigkeit ihrer Größe in 0,8 - 1,8%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 *QIAEX II 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 DNA-Enden wurden diese mit Hilfe des großen Fragments der *E. coli* DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) (Amersham Pharamcia Biotech Inc., Freiburg) zu glatten Enden aufgefüllt (im Falle von überhängenden 5'-Enden) bzw. abgebaut (im Falle von überhängenden 3'-Enden) (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) entweder für 10 - 20 min bei Raumtemperatur oder für 4h bei 4°C durchgeführt.

3.6 Agarose-Gelelektrophorese

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 *Hin*dIII-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.

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 ddH_2O, 4,25 ml Formaldehyd) verwendet. Der 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 (λ = 312 nm) fotografiert.

3.7 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) diente sowohl der *in vitro*-Vervielfältigung von DNA-Fragmenten (Tindall und Kunkel, 1988), als auch der analytischen Überprüfung von 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 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) wurde mittels des *Oligo Analysis and plotting tools* der Firma Operon (Huntsville) ermittelt. Die Polymerisation der DNA erfolgte bei 72°C, soweit nicht anders angegeben, wurden 30 Zyklen durchgeführt. Die Überprüfung von Deletionsmutanten erfolgte mit Hilfe der *Taq*-Polymerase (QIAGEN, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Zur Vervielfältigung fehlerfreier Gensequenzen, die für weitere Klonierungsschritte benötigt wurden, wurde die *KOD Hot Start DNA-Polymerase* (Novagen, Darmstadt) eingesetzt. 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 Transformation von *E. coli* und *C. glutamicum*

Transformation von *E. coli*

Zur Transformation von *E. coli* wurde eine modifizierte Methode eingesetzt (Hanahan, 1983). Dabei wurden die nach Hanahan (1985) erstellten kompetenten Zellen durch einen Hitzeschock transformiert.

Transformation von *C. glutamicum*

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 OD_{600} von 1,50 - 1,75 inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten Zelldichte wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (20 min, 6000 x *g*, 4℃). 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% (v/v) Glycerin gewaschen, anschließend in 1 ml eiskaltem 10% (v/v) Glycerin resuspendiert, in Aliquote von 100 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -70 ℃ 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% (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℃ 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 1h bei 30℃ unter Schütteln inkubiert, bevor die Zellsuspension auf antibiotikahaltigem BHIS-Medium ausplattiert wurde.

3.9 Konstruktion von Deletionsmutanten von *C. glutamicum* ATCC13032

Die Herstellung von Deletionsmutanten in *C. glutamicum* erfolgte nach der von Schäfer *et al.* (1994) etablierten Metode mit dem Plasmid pK19*mobsacB*. Dazu wurden mittels *cross-over* PCR (Link *et al.*, 1997) Deletionskonstrukte hergestellt (Primersequenzen siehe Anhang), die ein DNA-Fragment mit der gewünschten Deletion und dessen homologen Nachbarbereiche enthielten Das Fusionsprodukt wurde in pK19*mobsacB (Schäfer et al., 1994)* ligiert und anschließend in *E. coli* DH5α transformiert. 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 Integranten auf

LB-Platten, die 10% (w/v) Saccharose enthielten, überführt. Durch die von *sacB* kodierte Levan-Sucrase wird Saccharose zum toxischen Levan polymerisiert, das für *C. glutamicum* letal ist (Schwarzer und Pühler, 1991; Bramucci und Nagarajan, 1996). 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 Saccharose-resistent als auch Kanamycin-sensitiv waren, wurden mittels Kolonie-PCR überprüft, bei der Primer eingesetzt wurden, die im Chromosom außerhalb des deletierten Bereichs binden.

3.10 DNA-Sequenzierung und computergestützte Analyse

Alle DNA Sequenzierungen wurden nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) bei der Firma AGOWA (Berlin) durchgeführt. Die so erhaltenen DNA Sequenzen wurden mit dem Programm *Clone Manager 6 for Windows* (Version 6.02; Scientific & Educational Software) analysiert, wodurch auch Restriktionsschnittstellen und offene Leseraster identifiziert werden konnten. Zudem wurden mit diesem Programm Plasmidkarten der konstruierten Vektoren erstellt (siehe Anhang). Datenbanken zur Suche nach DNA- und Proteinsequenzen mit Ähnlichkeiten zu den in dieser Arbeit untersuchten Sequenzen wurden sowohl am *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, Washington, USA) mit den Programmen *BLASTN, BLASTX* und *BLASTP* (Altschul *et al.*, 1997) als auch mit Hilfe von *ERGO* (Integrated Genomics, Chicago, USA) durchgeführt.

4 Biochemische Methoden

4.1 Quantifizierung von Zuckern und organischen Säuren im Medium

Zur Bestimmung der Konzentrationen von Zuckern und organischen Säuren wurden von der jeweiligen Kultur zum gewünschten Zeitpunkt Proben entnommen, die darin enthaltenen Zellen abzentrifugiert (5 min, 12000 x *g*, RT) und der Kulturüberstand

nach Filtration (Porendurchmesser 0,2 µm) in verschiedenen Verdünnungen zur Analyse eingesetzt.

Bestimmung von Saccharose und Acetat

Saccharose und Acetat wurden mittels *Saccharose UVTest* (Best. Nr. 10 261 035, R-BIOPHARM AG, Darmstadt) bzw. *Essigsäure UVTest* (Best. Nr.10 139 041, R-BIOPHARM AG, Darmstadt) nach Angaben des Herstellers mit der Abweichung bestimmt, dass nur 1/10 von jedem Volumen in einer *96 Well Flat Bottom Assay Plate* (Corning Incorporated Lifew Sciences, Acton, USA) statt einer 2 ml Küvette eingesetzt wurde. Die Messung der Extinktion bei 340 nm erfolgte in einem Plattenlesegerät (Spectra Max Plus, Molecular Devices, München). Die Konzentrationen in den jeweiligen Proben wurden durch Vergleich mit externen Standards berechnet.

Bestimmung von Pyruvat

Die Pyruvat-Konzentration wurde enzymatisch mit L-Lactat Dehydrogenase (*L-LDH*; EC 1.1.1.27; *Kaninchenmuskel*; Roche, Mannheim) durch Abnahme der NADH-Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 340 nm in einer *96 Well Flat Bottom Assay Plate* (Corning Incorporated Life Sciences, Acton, USA) bestimmt.

$$Pyruvat + NADH + H^+ \xrightarrow{\text{L-LDH}} L\text{-}Lactat + NAD^+$$

Der Ansatz enthielt 235 mM Triethanolamin, pH 7,6; 2,4 mM EDTA, 0,9 mM NADH und 1,8 U L-LDH. Der Reaktionsansatz wurde 100 min inkubiert und dann im Plattenlesegerät (Spectra Max Plus, Molecular Devices, München) gemessen. Die Berechnung der Pyruvatkonzentrationen erfolgte mit Hilfe von externen Standards von 0,025 - 1 mM Na-Pyruvat.

Bestimmung von Glukose und Fruktose

D-Glucose und D-Fruktose wurden mittels HPLC mit einer Biorad HPX-87C 300 x 7,8 mM Säule bei 70°C und isokratischer Elution mit H_2O bei einer Flussrate

von 0,6 ml/min aufgetrennt. Die Substanzen wurden mittels Refraktionsindex (LaChrom RI Detektor L-7490, Merck, Darmstadt) detektiert. Die Konzentration der analysierten Probe wurde über einen Vergleich mit einem externen Standard berechnet.

Bestimmung von L-Lactat

L-Lactat wurden mittels HPLC mit einer Biorad HPX-87H 300 x 7,8 mM Säule bei 60℃ und isokratischer Elution mit 6 mM H_2SO_4 bei einer Flussrate von 0,6 ml/min gemessen. Die Substanzen wurden mittels UV-Detektion bei 215 nm (LaChrom UV Detektor L-7400, Merck, Darmstadt) detektiert. Die L-Lactatkonzentration der analysierten Probe wurde über einen Vergleich mit einem externen Standard berechnet. Bei der Probenvorberetigung wurden Handschuhe getragen.

Bestimmung von Aminosäuren

Die quantitative Bestimmung der Aminosäurekonzentrationen von L-Lysin, L-Alanin, L-Valin und L-Glutamat wurde mittels *reversed phase* HPLC nach Derivatisierung mit *ortho*-Phthaldialdehyd durchgeführt (Lindroth und Mopper, 1979). Die Derivatisierung erfolgte dabei in einer automatischen Vorsäulenderivatisierung, indem 1 µl der zu analysierenden Aminosäurelösung mit 20 µl *ortho*-Phthaldialdehyd / 2-Mercapto-ethanol-Fertigreagenz (Pierce, Rockford, USA) gemischt und eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Die so entstehenden fluoreszierenden, thiosubstituierten Isoindole (Jones und 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℃ 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.

4.2 Quantifizierung von intrazellulären Metaboliten

Zur Bestimmung von intrazellulären Metaboliten wurden die Kulturen zum gewünschten Zeitpunkt in flüssigen Stickstoff schockgefroren und anschließend die Metabolite der Zellen bei pH 1 (Zugabe von 8 M HCl) und 50℃ extrahiert (Dominguez *et al.*, 1998).

Bestimmung von Fruktose-1,6-Bisphosphat

Die Messung von Fruktose-1,6-Bisphosphat (Fruktose-1,6-P_2) erfolgte in einem gekoppelten enzymatischen Ansatz (Michal und Beutler, 1974) mit Aldolase (EC 4.1.2.13;), Triosephosphatisomerase (TIM; EC 1.1.1.8;) und Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (GDH; EC 5.3.1.1,) (alle Enzyme von Roche, Mannheim). Aldolase katalysiert die Gleichgewichtsreaktion von Fruktose-1,6-P_2 zu Dihydroxy-acetonphosphat (DHAP) und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) (1). GDH katalysiert die Umsetzung von DAP zu L-(-)-Glycerin-3-P (3), wobei die Abnahme der NADH Fluoreszenz bei 340 nm in einer *96 Well Flat Bottom Assay Plate* (Corning Incorporated Life Sciences, Acton, USA) detektierbar ist (Spectra Max Plus, Molecular Devices, München). Zur Verdopplung der Sensitivität wurde TIM dazugegeben, was das GAP in DHAP umsetzt (2). Zur Umsetzung des intrazellulären GAP und DAP wurde das Zellextrakt mit TIM und GDH für 20 min inkubiert. Die nach dieser Zeit gemessene Absorption bei 340 nm galt als Nullwert für die Endpunktbestimmung der folgenden 30-minütigen Inkubation mit Aldolase.

1) $\textit{Fruktose-1,6-P}_2 \overset{\text{Aldolase}}{\rightleftharpoons} \textit{DHAP} + \textit{GAP}$

2) $\textit{GAP} \overset{\text{TIM}}{\rightleftharpoons} \textit{DHAP}$

3) $\textit{DHAP} + \textit{NADH} + H^+ \overset{\text{GDH}}{\rightleftharpoons} \textit{L-(-)-Glycerin-3-P} + \textit{NAD}^+$

Der Reaktionsansatz enthielt 190 mM Triethanolamin pH 7,0; 0,24 mM NADH, Aldolase (0,8 U/ml), TIM (450 U/ml) und GDH (15 U/ml). Die Berechnung der intrazellulären Fruktose-1,6-P_2-Konzentrationen erfolgte anhand externen Fruktose-1,6-P_2-Standards von 0,025 - 0,2 mM, die wie die Zellextrakte bei 50°C und pH 1 inkubiert wurden und der Differenz der Messungen vor und nach GDH-Zugabe der Extinktion bei 340 nm. Es wurde zur Berechnung der intrazellulären Konzentrationen ein Zellvolumen von 1,8 µl/mg Trockenzellmasse (Hoischen und Krämer, 1989) verwendet.

Bestimmung von Fruktose-6-Phosphat

Die Messung von Fruktose-6-Phosphat (Fruktose-6-P) erfolgte in einem gekoppelten enzymatischen Test (Michael & Beutler, 1974) mit Phosphoglukose Isomerase (PGI; EC 5.3.1.9, *Hefe*) und Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase (G6P-DH; EC 1.1.1.49; *Hefe*) (beide Enzmye von Roche, Mannheim). PGI katalysiert die Gleichgewichtsreaktion von Fruktose-6-P zu Glukose-6-Phosphat (Glukose-6-P) (1), welches mittels G6P-DH zu 6-Phosphogluconolacton umgesetzt wird (2). Das dabei gebildetete NADPH konnte mittels der Zunahme der Extinktion bei 340 nm in einer *96 Well Flat Bottom Assay Plate* (Corning Incorporated Life Sciences, Acton, USA) (Spectra Max Plus, Molecular Devices, München) detektiert werden.

1) $\textit{Fruktose-6-P} \overset{\text{PGI}}{\rightleftharpoons} \textit{Glukose-6-P}$

2) $\textit{Glucose-6-P} + \textit{NADP}^+ \overset{\text{G6P-DH}}{\rightleftharpoons} \textit{6-Phosphoglukonolacton} + \textit{NADPH} + \textit{H}^+$

Zur Umsetzung des im Zellextraktes enthaltenen Glukose-6-P wurde zunächst G6P-DH zugegeben und nach 20 min der Nullwert gemessen, dann erfolgte die Zugabe von PGI. Die Endkonzentrationen im Reaktionsansatz waren 200 mM Triethanolamin pH 7,0; 2,5 mM EDTA, 2 mM $NADP^+$, PGI (35 U/ml) und G6P-DH (35 U/ml). Nach erneuter Messung der Extinktion der Proben bei 340 nm wurden die Fruktose-6-P-Konzentrationen anhand externer Fruktose-6-P-Standards von 0,025 - 0,2 mM, die wie die Zellextrakte bei 50°C und pH 1 inkubiert wurden (Zugabe von 8M HCl), und der Differenz der beiden Messungen der Extinktion bei 340 nm bestimmt.

Es wurde zur Berechnung ein Zellvolumen von 1,8 µl/mg Trockenzellmasse (Hoischen und Krämer, 1989) verwendet.

4.3 Herstellung von Proteinrohextrakten

Proteinrohextrakte zur Bestimmung von Enzymaktivitäten

Zur Bestimmung von Enzymaktivitäten wurde *C. glutamicum* wie beschrieben kultiviert, 25 ml der Zellen in der frühen bis mittleren exponentiellen Phase (OD_{600} ca. 6-10) entnommen und abzentrifugiert (5 min, 2500 x *g*, 4℃). Sofern nicht anders angegeben wurden die Zellen zweimal mit 50 mM Kalium-Phosphat-Puffer (pH 7,0) gewaschen und anschließend in 1 ml Puffer resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte in einem Eppendorfgefäß, 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 x *g*, 4℃) abgetrennt und der Überstand als Enzymrohextrakt eingesetzt.

Proteinrohextrakte zur Proteinaufreinigung und zur Affinitätschromatographie

Für die Gewinnung der Rohextrakte wurden *C. glutamicum* Kulturen (1l) auf Minimalmedium kultiviert, bei einer OD_{600} von 6-8 geerntet, mit TN-Puffer (50 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.6) gewaschen und in 6 ml TGED-Puffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 mM Dithiothreitol, 10 mM MgCl2, 1 mM EDTA, 10% (v/v) Glycerin, 10 µM Phenylmethylsulfonylfluorid) resuspendiert. Die resuspendierten Zellen (ca. 10 ml) wurde in 5 Zyklen durch eine FrenchPress (SIM-Aminc Spectronic Instrument, Rochester, USA) bei 1200 Psi aufgeschlossen. Zelltrümmer und intakte Zellen wurden durch Zentrifugationschritte entfernt, erst für 10 min bei 8000 x *g* und 4℃, anschließend für 60 min bei 18000 x *g* und 4℃.

Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen im 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.

4.4 Messung von Enzymaktivitäten

4.4.1 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) erfolte nach Stansen *et al.* (2005). Als künstlicher Elektronenakzeptor diente 2,6-Dichlorphenolindophenol (DCPIP), ein Redoxfarbstoff, welcher in seiner oxidierten Form blau und im reduzierten Zustand farblos ist (Molinari und Lara, 1960). Der Enzymtest beruhte auf der Reduktion des Farbstoffes durch die L-LDH, wobei die Extinktionsabnahme bei 600 nm und 30°C verfolgt wurde. Der Reaktionsansatz enhielt 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0; 0,05 mM DCPIP und Rohextrakt. Der Start der Reaktion erfolgte bei 30°C durch Zugabe von L-Lactat (Endkonzentration 20 mM). Zur Berechnung der spezifischen Aktivität der Quinon-abhängigen L-Lactat-Dehydrogenase wurde der Extinktionskoeffizient für DCPIP bei 600 nm von 20 $cm^2/\mu mol$ verwendet (Data for Biochemical Research, 1986).

4.4.2 Bestimmung der Fruktose-1,6-Bisphosphatase-Aktivität

Die Bestimmung der FBPase-Aktivität (EC 3.1.3.11) erfolgte nach Rittmann *et al.* (2003) in einem gekoppelten optischen Test, bei dem die Bildung von NADPH bei 340 nm verfolgt werden konnte. Die Zellen wurden in Aufschlusspuffer (20 mM Tricin, 50 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 0,5 mM EDTA, pH 7,7) wie in III.4.3 beschrieben disruptiert. FBPase setzt Fruktose-1,6-P_2 zu Fruktose-6-P um (1),

welches durch PGI zu G6P umgesetzt wird (2). Unter Bildung von NADPH wird die Reaktion von G6P zu 6-Phosphoglucolacton durch G6P-DH katalysiert.

1) *Fruktose-1,6-P_2* $\xrightarrow{\text{FBPase}}$ *Fruktose-6-P*

2) *Fruktose-6-P* $\overset{\text{PGI}}{\rightleftharpoons}$ *Glukose-6-P*

3) *Glukose-6-P* + *$NADP^+$* $\overset{\text{G6P-DH}}{\rightleftharpoons}$ 6-Phosphoglukonolacton + NADPH + H^+

Der Reaktionsansatz enthielt 2 mM $MnCl_2$, 100 mM KCl, 20 mM Tricin pH 7,7; 0,25 mM $NADP^+$, G6P-DH (7 U/ml) und PGI (7 U/ml) und Rohextrakt. Der Start der Reaktion erfolgte bei 30℃ durch Zugabe von Fruktose-1,6-P_2 zu einer Endkonzentration von 0,75 mM. Zur Berechnung der spezifischen FBPase-Aktivität wurde ein Extinktionskoeffizient für NADPH bei 340 nm von 6,22 cm^2/µmol verwendet (Data for Biochemical Research, 1986).

4.4.3 Bestimmung der Malic Enzyme-Aktivität (EC 1.1.1.9)

Die Bestimmung der Malat Enzym (MalE)-Aktivität erfolgte nach Netzer *et al.* (2004) in einem optischen Test, bei dem die Bildung von NADPH durch die Zunahme der Extinktion bei 340 nm verfolgt wurde. Malic Enzyme katalysiert die Umsetzung von Malat zu Pyruvat unter Bildung von NADPH (1).

1) *Malat* + *$NADP^+$* $\xrightarrow{\text{MalE}}$ *Pyruvat* + *NADPH* + *H^+* + *CO_2*

Der Reaktionsansatz enthielt 100 mM HEPPS pH 7,8; 5 mM $MgCl_2$, 1mM $NADP^+$ und Rohextrakt. Der Start der Reaktion erfolgte bei 30°C durch Zugabe von Dinatrium-D,L-Malat in einer Endkonzentration von 40 mM. Zur Berechnung der spezifischen MalE-Aktivität wurde ein Extinktionskoeffizient von NADPH bei 340 nm von 6,22 cm^2/µmol verwendet (Data for Biochemical Research, 1986).

4.5 Affinitätsaufreinigung von DNA-bindenden Proteinen mittels Dynabeads® Streptavidin

DNA-bindende Proteinen, die mit der Promotorregion des *NCgl2816-lldD* Operons interagieren, wurden mittels DNA-Affinitätschromatographie aufgereinigt (Engels *et al.*, 2004) Dafür wurde ein 331 bp Promotorfragment mit Primern, von denen einer am 5'-Ende biotinyliert ist (Operon, Köln), amplifiziert und an Streptavidin-beschichtete paramagnetische Beads (Dynal A.S., Oslo) gebunden.

Die Bindekapazität der Dynabeads® M-280 liegt bei ca. 55 pmol eines 200 bp langen DNA-Fragment pro mg Dynabeads. Zur Kopplung an die Dynabeads wurden 36,4 µg biotinyliertes PCR Fragment einer Länge von 331 bp (entspricht 33,3 pmol) und 0,5 ml beads (10 mg/ml) eingesetzt. Vor der Kopplung wurden die Dynabeads zunächst mit 500 µl B+W-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 2 M NaCl) gewaschen. Die Sedimentation der Dynabeads erfolgte in einem Dynal MPC-1 Magnethalter wobei der Waschpuffer mit einer Pipette abgenommen wurde, bevor die Beads im gleichen Puffer resuspendiert wurden. Nach zweimaligem Waschen wurden die Dynabeads in 500 µl B+W-Puffer resuspendiert, mit dem gleichen Volumen biotinylierten DNA-Fragment (36,4 µg in 500 µl B+W-Puffer) versetzt und 1 h in einem 50 ml Falcon so geschüttelt, dass die Dynabeads nicht sedimentieren. Anschließend wurde der Ansatz schrittweise in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, gefolgt von drei Waschschritten mit 500 µl B+W-Puffer. Anhand einer Konzentrationsbestimmung der DNA im B+W-Puffer nach Sedimentation der Beads vor dem ersten Waschschritt kann die Kopplungseffizienz berechnet werden, die bei ca. 60-70% lag.

Zur Lagerung und bei Verwendung zur Affinitätsaufreinigung wurden die mit den DNA-Fragmenten beladenen Beads in 500 µl TGED-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, 10% (v/v) Glyzerin, 1 mM DTT (fisch zugesetzt), 0,05% Triton X-100, 100 mM NaCl) resuspendiert.

Für die Proteinbindung wurden die *C. glutamicum*-Proteinextrakte (ca. 500-1000 mg, vgl. 4.3.1) mit 500 µg chromosomaler *C. glutamicum*-DNA und den 5 mg DNA-beladenen Dynabeads in einem 50 ml Falcon gemischt und 45 min bei RT so geschüttelt, dass die Beads nicht sedimentierten. Dann wurde der Ansatz schrittweise in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, einmal mit 1 ml TGED-Puffer, zweimal mit je 1 ml TGED-Puffer mit jeweils 400 µg chromosomaler *C. glutamicum*-DNA und ein weiteres Mal mit 1 ml TGED gewaschen. Die gebundenen Proteine

wurden dann in zwei Schritten mit jeweils 350 µl Elutionspuffer (TGED-Puffer mit 2 M NaCl) eluiert. Die Eluate wurden vereinigt und mit 1/4 Volumen 100% (w/v) Trichloressigsäure (TCA) versetzt, 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 15 min bei 15.000 x *g* und 4℃ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 0,5 ml Aceton gewaschen und erneut für 15 min bei 15.000 x *g* und 4℃ zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet an der Luft getrocknet. Die Proteine wurden anschließend in 20 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,6) gelöst und mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert (vgl 4.7). Zur Regenration der DNA-beladenen Dynabeads wurden diese zunächst zweimal mit 1 ml Elutionspuffer und anschließend dreimal mit 1 ml B+W-Puffer gewaschen. Nach Resuspension in 1 ml TGED-Puffer konnten die DNA-beladenen Dynabeads bei 4℃ gelagert und für weitere Reinigungen eingesetzt werden.

4.6 Proteinaufreinigung mittels Ni-NTA-Agarose

Die Proteinaufreinigung des Polyhistidin-markierten Proteins NCgl2814 erfolgte über separate 15-ml-Polypropylen-Säulen, die nach Herstellerangaben präpariert wurden (Janknecht *et al.*, 1991). Die Säule wurde zunächst mit 25 ml TNI5-Puffer (TNIx-Puffer: 20 mM Tris, 300 mM NaCl, 5% (v/v) Glycerin, x mM Imidazol, pH 7,9) äquilibriert. Anschließend wurde der Rohextrakt (vgl. 4.3) auf die Säule gegeben. Schwach bzw. unspezifisch gebundene Proteine wurden durch Waschen mit 20 ml TNI20-Puffer und 10 ml TNI50-Puffer entfernt. Spezifisch gebundenes Protein wurde mit 6 x 1 ml TNI200-Puffer eluiert. Proteine, die immer noch an Ni^{2+} gebunden waren, wurden durch Entfernen der Ni^{2+}-Ionen mit 10 ml Strip-Puffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 100 mM EDTA, pH 7,9) entfernt. Die Säule wurde nun entweder bis zum nächsten Gebrauch bei 4℃ gelagert oder mit 5 ml 100 mM $NiSO_4$ für einen neuen Reinigungsschritt vorbereitet. Die eluierten Fraktionen wurden auf ihren Proteingehalt untersucht, indem je 50 µl des Eluats mit jeweils 200 µl Coomassie Plus Protein-Assay-Reagenz (Pierce) gemischt wurden. Die Blaufärbung der Lösung war ein Maß für den Proteingehalt. Die Eluatfraktionen mit Protein wurden vereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei 4℃ gelagert. Die Proteinaufreinigung wurde durch SDS-PAGE überprüft.

4.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Trennung von Proteinen in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht unter denaturierenden Bedingungen erfolgte diskontinuierlich in 10% Bis-Tris Polyacrylamidgelen des *NuPAGE* Systems (NOVEX Elektrophoresis, Frankfurt) (Fling und Gregeron, 1986). Die Elektrophorese wurde in MOPS-SDS (50 mM MOPS; 50 mM Tris pH 7,7; 1% (w/v) SDS; 1 mM EDTA) Puffer (NOVEX Elektrophoresis, Frankfurt) über 1,5 h bei einer Stromstärke von maximal 60 mA in einer *XCell II Mini-Cell* (NOVEX Elektrophoresis, Frankfurt) durchgeführt. Zur Größenbestimmung der Proteinbanden wurden 10 µl des Molekulargewichtsstandard des bereits vorgefärbten Größenstandards *SeeBluePlus2* (NOVEX Elektrophoresis, Frankfurt) genutzt. Nach der Elektrophorese wurden die SDS-Gele für 1 h mit bidest. H_2O gewaschen, mind. 1 h in ca. 20 ml GelCodeBlue Stain Reagent (Pierce) gefärbt und dann überschüssige Färbelösung durch Waschen in bidest. H_2O (mind. 1h) entfernt.

4.8 Identifizierung von Proteinen mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie und Datenbankvergleich

Die Identifizierung von Proteinen erfolgte mittels Peptidmassen-„Fingerprint“-Analyse (Fountoulakis und Langen, 1997; Nouwens *et al.*, 2000; Schaffer *et al.*, 2001). Dazu wurden die Banden mit einem Skalpell aus den SDS-Gelen geschnitten, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, zweimal für je 15 min in 30% (v/v) Acetonitril in 0,1 M NH_4HCO_3 gewaschen und für 20 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Zur Rehydrierung wurden die Gelstücke für 30 min in 2 µl 3 mM Tris-HCl pH 8,8 mit 10 ng/µl Trypsin (Promega, Mannheim) inkubiert. Anschließend wurden 4 µl 3 mM Tris-HCl pH 8,8 hinzugefügt und die Proben über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Elution der tryptisch gespaltenen Peptide aus der Gelmatrix erfolgte durch Inkubation mit 9 µl Wasser für 15 min, gefolgt von der Zugabe von 7,5 µl 30 % (v/v) Acetonitril in 0,1% (w/v) Trifluoressigsäure und weiteren 10 min Inkubation bei Raumtemperatur. Die Proben wurden entweder bis zur Messung bei -20 ℃ gelagert oder direkt zur Massenspektrometrie eingesetzt.

Zur MALDI-TOF-MS Analyse wurden 0,5 µl Probe in 0,5 µl Matrix (α-Cyano-4-hydroxy-trans-Zimtsäure in 50% (v/v) Acetonitril und 0,25 % (w/v) Trifluoressigsäure)

auf einer Probenplatte cokristallisiert (Vorm und Mann, 1994). Die Kalibrierung, Messung und Auswertung erfolgte erfolgte wie von Schaffer *et al.* (2001) beschrieben.

4.9 Gelretardierungsexperimente

Gelretardierungstests, die eine Protein-DNA-Interaktion nachweisen sollten erfolgte nach (Wennerhold *et al.*, 2005). Der aufgereinigte Regulator NCgl2814 (0-4,8 µM) mit dem zu testenden DNA-Fragment (*NCgl2816/lldD*-Promotor) (P0, 331 bp) oder den Subfragmenten P1, P12, P2, P23 und P3 (jeweils 110-115 bp) (10-30 nM) in einem gesamt Volumen von 20 µl gemischt. Der Reaktionspuffer enthielt 50 mM Tris/HCl, 10% (v/v) Glycerin, 50 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$ und 0,5 mM EDTA, pH 7,5. Als Negativkontrolle wurden ca. 40 nM der Promotorfragmente der Gene *NCgl0430* und *NCgl2027* eingesetzt, an die das Protein NCgl2814 nicht bindet (Wennerhold und Bott, 2006). Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben mit 4 µl Probenpuffer (89 mM Trisbase, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, 20% Glycerin, 0,01% (w/v) Bromphenolblau, 0,01% (w/v) Xylencyanol) versetzt und auf einem 10% nativen Polyacrylamidgel bei Raumtemperatur aufgetrennt. Wenn Effektoren getestet wurden, erfolgte zuerst eine 15-minütige Inkubation des Proteins NCgl2814 mit dem entsprechenden Effektor (10-40 mM) in 50 mM Tris-HCl, 10% (v/v) Glycerin, 50 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$ und 0,5 mM EDTA, pH 7,5. Anschließend wurden die DNA-Fragmente für 30 min zugegeben.
Die Elektrophorese fand bei 170 V in 1x TBE-Puffer (89 mM Trisbase, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA) in der horizontalen Gelapparatur *Powerpac 300* (BIORAD, München) statt. Im Anschluss daran wurden die Gele mit SyBr Green I (Sigma, Rödermark) anhand des Protokolls des Herstellers gefärbt und fotografiert.

5 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 (Shalon *et al.*, 1996; Zimmer *et al.*,

2000; Wendisch *et al.*, 2001; Rhodius *et al.*, 2002; Khodursky *et al.*, 2003). Die verwendete DNA-Chip-Technologie und das Robotorsystem zur Herstellung der DNA-Chips beruhten auf dem an der Stanford-Universität entwickelten System (Shalon *et al.*, 1996).

5.1 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* ATCC13032 als Matrize amplifiziert. Größe und Menge der PCR-Produkte wurden mittels 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 (Zimmer *et al.*, 2000; Wendisch *et al.*, 2001; Polen, 2002). 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.du/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).

5.2 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 (Lange *et al.*, 2003). Hierzu wurde die aufgebrachte DNA zunächst in einer Feuchtigkeitskammer über einer 1 x SSC-Lösung rehydratisiert und anschließend bei 100℃ für 2 - 3 sec getrocknet, um gleichmäßigere und größere Hybridisierungssignale erzielen zu können. Anschließend wurde die DNA durch UVBestrahlung (650 µJ; 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). Zur Denaturierung der DNA-Doppelstränge wurden die DNA-Chips für 1,5 min in 95℃ heißem Wasser inkubiert und die Einzelstränge anschließend durch Inkubation in kaltem Ethanol fixiert (Polen *et al.*, 2003; Shalon *et al.*, 1996). Nach Trocknung durch Zentrifugation (5 min, 50 x *g*) wurden die DNA-Chips bis zur Hybridisierung in einem Exsikkator gelagert.

5.3 Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden

Zum Vergleich genomweiter Genexpressionsmuster wurden fluoreszenzmarkierte cDNASonden von äquivalenten Mengen (15-25 µg) der zu vergleichenden RNA-Proben synthetisiert (Lange *et al.*, 2003). 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 (λEx max 550 nm, λEM max 570 nm/grünfluoreszierend oder λEx max 649 nm, λEM 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℃) wurde die Sonde mit HCl neutralisiert und mit Hilfe von Microcon YM-30 Säulen (Millipore, Schwalbach) unter Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide

eingeengt (Khodursky *et al*., 2003; Polen *et al*., 2003). Die bei einem zweiten Reinigungsschritt mit den Microcon-Säulen vereinigten fluoreszenzmarkierten Sonden wurden direkt zur DNA-Chip-Hybridisierung eingesetzt.

5.4 DNA-Chip-Hybridisierung

Zur Bestimmung relativer mRNA- oder DNA-Spiegel wurden je eine Cy3- und Cy5-markierte Sonde gleichzeitig auf einem DNA-Chip hybridisiert (Lange *et al.*, 2003). 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℃ und Abkühlen bei Raumtemperatur (5-10 min) für 8-16 h bei 65℃ (Zimmer *et al.*, 2000).

5.5 Messung und Quantifizierung 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 (Polen, 2002). Nach der Hybridisierung und dem stringenten Waschen des DNA-Chips wurden hierzu ortsaufgelöste Fluoreszenzintensitäten mit dem GenePix 4000A Laserscanner (Axon Inc., Union City, Kalifornien, USA) mit monochromatischem Licht der Wellenlänge 532 nm (Messung der Emission bei 570 nm), die von Cy5-dUTP mit 635 nm (Emission bei 670 nm) gemessen und als 16-bit-TIFF-Dateien elektronisch gespeichert (Software GenePix Pro 4.1, Axon Inc.).

5.6 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 wie beschrieben normiert und auf Auswertbarkeit überprüft. (Eisen *et al.*, 1998;

Khodursky *et al.*, 2000; Zimmer *et al.*, 2000; Wendisch *et al.*, 2001). 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) wie von Arfin *et al* (2000), Lehnen *et al*. (2002), Polen (2002) und Polen. (2003) beschrieben, durchgeführt

5.7 Archivierung von DNA-Chip-Daten

Zur Verwaltung und Archivierung von DNA-Chip-Daten wurde die für das Computer-Betriebssystem Linux frei erhältliche Datenbank mySQL (MySQL AB Company, Uppsala, Schweden) 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

5.8 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 und Wendisch, 2004) verwendet, die auf dem Algorithmus der hierarchischen Clusteranalyse Software von Eisen *et al*. (1998) beruht.

IV Ergebnisse

1 Charakterisierung der Wachstumsparameter von *C. glutamicum* Wildtyp auf Glukose, Fruktose und Saccharose

C. glutamicum kann auf verschiedenen Zuckern, Zuckeralkoholen und organischen Säuren als einziger Kohlenstoffquelle wachsen (Dominguez *et al.*, 1998; Kiefer *et al.*, 2002). Hier sollten die Wachstumsparameter von *C. glutamicum* bei Kultivierung auf PTS-Zuckern näher charakterisiert werden. Dafür wurde der Wildtyp ATCC13032 in Minimalmedium mit 10 mM, 20 mM, 50 mM, 100 mM und 200 mM Glukose bzw. Fruktose und mit 5 mM, 10 mM, 25 mM, 50 mM und 100 mM Saccharose kultiviert und die jeweiligen Wachstumsraten, Biomasseerträge und Substrataufnahmeraten bestimmt.

Die Abhängigkeit der ermittelten Wachstumsraten von den eingesetzten Zuckerkonzentrationen ist in Tabelle 3 dargestellt. Bereits bei einer Substratkonzentration von 10 mM Hexose erreicht *C. glutamicum* auf allen getesteten PTS-Zuckern nahezu die maximale Wachstumsrate. Daraus ergibt sich, dass die Substratkonzentration, bei der die Wachstumsrate halbmaximal ist (Monod-Konstante) (Monod, 1949), bei weniger als 5 mM Hexose liegen muss. Eine genauere Bestimmung war nicht möglich, da 10 mM Hexose die geringste getestete Substratkonzentration war. Mit zunehmenden Substratkonzentrationen bleibt die Wachstumsrate auf allen PTS-Zuckern nahezu konstant. Die durchschnittlichen Wachstumsraten unterscheiden sich nur geringfügig und betragen auf Glukose 0,34 h^{-1}, auf Fruktose 0,38 h^{-1} und auf Saccharose 0,39 h^{-1}.

Tabelle 3: Wachstumsraten von *C. glutamicum* ATCC13032 bei Wachstum auf verschiedenen Konzentrationen von Glukose, Fruktose und Saccharose

mM Hexose	10	20	50	100	200	
	Wachstumsrate (h^{-1})					Mittelwert
Glukose	0,33	0,35	0,35	0,34	0,35	0,34
Fruktose	0,39	0,40	0,37	0,36	0,39	0,38
Saccharose	0,39	0,42	0,39	0,39	0,38	0,39

Tabelle 4: Biomassebildung von *C. glutamicum* ATCC 13032 bei Wachstum auf verschiedenen Konzentrationen von Glukose, Fruktose und Saccharose mit Standardabweichungen <10%.

mM Hexose	10	20	50	100	200
	Biomassebildung (gDW / l)				
Glukose	0,7	1,2	3,5	6,6	13,1
Fruktose	0,6	1,1	2,9	7,0	8,8
Saccharose	0,6	1,2	2,8	6,5	10,4

Die Biomasseerträge stiegen proportional zu Zuckerkonzentrationen bis 100 mM Hexose an und sind auf allen PTS-Zuckern nahezu gleich, wohingegen auf 200 mM Glukose mehr Biomasse gebildet wird als auf Fruktose oder Saccharose (Tabelle 4).
Beim Wachstum auf 100 mM Glukose und Fruktose sowie 50 mM Saccharose wurden während der Kultivierung zu mehreren Zeitpunkten Proben entnommen und anhand der im zellfreien Überstand verbliebenen Substratmengen die Aufnahmeraten für den jeweiligen PTS-Zucker ermittelt (Tabelle 5). Sie betrugen 486 nMol C / [mg DW * min] auf Glukose, was mit den Daten von Wendisch *et al.* (2000) übereinstimmt. Auf Fruktose betrug die Aufnahmerate 510 nMol C / [mg DW * min], ähnliche Werte wurden von Dominguez *et al.* (1998) gemessen. Auf Saccharose betrugt die Aufnahmerate 576 nMol C / [mg DW * min]. Die geringfügigen Unterschiede in den Aufnahmeraten entsprechen dabei den Unterschieden in den Wachstumsraten (Tabelle 5).
Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass sich die Wachstumsparameter auf den PTS-Zuckern Glukose, Fruktose und Saccharose bis zu Konzentrationen von 100 mM Hexose nur sehr geringfügig unterscheiden. Lediglich auf 200 mM Glukose wurde mehr Biomasse als auf den anderen PTS-Zuckern gebildet. Ein solcher Effekt wurde bislang nicht beschrieben und die Ursachen sind unbekannt.

Tabelle 5: Biomasseertrag, Wachstumsrate und Substrataufnahmerate von *C. glutamicum* ATCC13032 auf 100 mM Glukose, 100 mM Fruktose und 50 mM Saccharose

Substrat (600 mM Kohlenstoff)	Glukose	Fruktose	Saccharose
gDW / l	7,3	6,8	8,0
Wachstumsrate [h^{-1}]	0,32	0,33	0,35
Aufnahmerate nMol / [mgDW * min]	81	85	48
Aufnahmerate nMolC / [mgDW * min]	486	510	576

2 Ethambutol-induzierte Glutamatproduktion mit *C. glutamicum* ATCC13032 auf Glukose, Fruktose und Saccharose

Bislang gibt es keine Daten darüber, ob es Unterschiede in der Ausbeute bei der Glutamatproduktion auf verschiedenen PTS-Zuckern gibt. Zur Beantwortung dieser Frage wurde *C. glutamicum* ATCC13032 auf CgXII-Minimalmedium mit 40 g/l Glukose, 40 g/l Fruktose, 40 g/l Saccharose und 20 g/l Glukose + 20 g/l Fruktose in Anwesenheit von 500 µg/ml Ethambutol kultiviert, nach 48h die im Überstand akkumulierte Glutamatkonzentration gemessen und anhand der verbrauchten Zuckers die Glutamatausbeute in [$Mol_{Glutamat}$ / Mol_{Hexose}] bestimmt. Die Mittelwerte einer Doppelbestimmung sind in Abbildung 2 dargestellt.

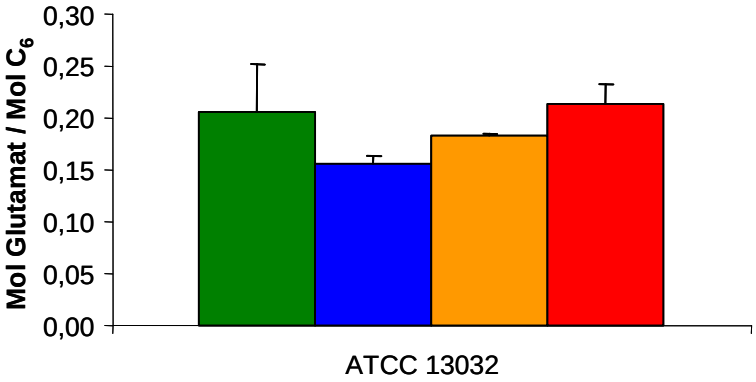

Abbildung 2: Ethambutol-induzierte Glutamatproduktion mit ATCC13032 auf 40 g/l Glukose, 40 g/l Saccharose, je 20 g/l Glukose + Fruktose und 40 g/l Fruktose

Die Glutamatausbeute betrug auf Glukose 0,17 [$Mol_{Glutamat}$ / Mol_{Hexose}], auf Fruktose 0,18 [$Mol_{Glutamat}$ / Mol_{Hexose}], auf Saccharose 0,14 [$Mol_{Glutamat}$ / Mol_{Hexose}] und auf Glukose + Fruktose 0,15 [$Mol_{Glutamat}$ / Mol_{Hexose}]. Insgesamt kann man schlussfolgern, dass die Glutamatproduktion nicht durch verschiedene PTS-Zucker als Kohlenstoffquelle beeinflusst wird.

3 Lysinproduktion mit verschiedenen *C. glutamicum*-Stämmen

Es sollte die Lysinproduktion mit den Stämmen DM1727, DM1800, DM1728, DM1729 und DM1730 in Abhängigkeit der Kohlenstoffquelle näher charakterisiert werden. Die Stämme unterscheiden sich vom Wildtyp, welcher kein Lysin produziert, durch Einführung der Punktmutationen *pyc*^{P458S}, *hom*^{V59A}, *lysC*^{T311I} und *zwf*^{A243T}. Die Punktmutationen betreffen die Enzyme Pyruvatcarboxylase, Homoserin-Dehydro-

genase, Aspartatkinase und Glukose-6-P-Dehydrogenase (Ando *et al.*, 2002; Ohnishi *et al.*, 2002). Es sollte untersucht werden, welchen Einfluss die jeweiligen Mutationen in Abhängigkeit von PTS-Zuckern als Kohlenstoffquelle auf die Lysinproduktion haben. Dafür wurden die Stämme in Minimalmedium mit insgesamt 100 g/l PTS-Zucker als Kohlenstoffquelle kultiviert und nach 72 h Inkubation die ins Medium ausgeschiedenen Aminosäuren und die verbliebenen Zucker quantifiziert.

Der Stamm DM1730, welcher alle vier Punktmutationen trägt, produzierte die größten Lysinkonzentrationen und zeigte dabei sehr deutliche Unterschiede auf den verschiedenen Kohlenstoffquellen (Tabelle 6). Auf Glukose akkumulierte dieser Stamm 75 mM Lysin im Medium, was mehr als das Vierfache im Vergleich zu den anderen getesteten Kohlenstoffquellen ist. Die Lysinausbeute von 0,15 [Mol_{Lysin} / Mol_{Hexose}] auf Glucose ist mindestens doppelt so hoch wie auf Fruktose, Saccharose oder Glukose + Fruktose. Dabei fällt auf, dass auf der äquimolaren Mischung aus Glukose + Fruktose die exkretierte Lysinausbeute nicht dem Mittelwert der Ausbeute auf 100 g/l Glukose und auf 100 g/l Fruktose entspricht, sondern dass die Ausbeute in diesem Fall fast so niedrig war, wie auf 100 g/l Fruktose.

Da der Stamm DM1727 kein Lysin produziert, ist ersichtlich, dass die Einführung der *pyc*-Mutation allein nicht ausreicht, damit *C. glutamicum* Lysin exkretiert. Nach zusätzlicher Einführung der *hom*-Mutation, exkretiert *C. glutamicum* DM1728 auf Glukose bereits 46 mM Lysin ins Medium. Die der weiteren Einführung des *lysC*-Allels wurde eine Steigerung der Lysinmenge von 46 mM auf 66 mM in DM1729 erreicht. Die zusätzliche Einführung der *zwf*-Mutation führte zu einer weiteren Erhöhung der Lysinmenge in DM1730 von 66 mM auf 75 mM. Diese Effekte waren jedoch nur auf Glukose als Kohlenstoffquelle zu beobachten. Auf allen anderen eingesetzten Kohlenstoffquellen erreichten die Stämme DM1800, DM1728 und DM1729 nur Lysinkonzentrationen im Bereich von 8 -23 mM.

Neben Lysin wurde auch Alanin und Valin im Medium gefunden und quantifiziert, wobei nur auf Glukose als Kohlenstoffquelle Mengen von >4 mM gemessen werden konnten. Dabei zeigte sich, dass DM1727, welcher nahezu kein Lysin produzierte, mit 27 mM deutliche Mengen Alanin produzierte, was auf einen Überfluss am Pyruvatknoten im Zentralstoffwechsel schließen lässt. DM1728 schied sogar 31 mM Alanin aus, wohingegen die Alaninmengen in DM1729 mit 24 mM und DM1730 mit 15 mM wieder sanken und gleichzeitig die Lysinerträge stiegen.

Tabelle 6: Lysinproduktion auf verschiedenen PTS-Zuckern mit verschiedenen vom Wildtyp abgeleiteten *C. glutamicum*-Stämmen: Es wurden 100 g/l Glukose, Fruktose oder Saccharose sowie 50 g/l Glukose + 50 g/l Fruktose als Kohlenstoffquelle eingesetzt. Die Lysinausbeute wurde in [Mol Lysin / Mol verbrauchter Hexose] angegeben. Die Fehler betrugen <5% für Lysinkonzentrationen, <5% für Alanin- und <10% für Valinkonzentrationen und <10% für die Lysinausbeuten.

Kohlenstoffquelle	*C. glutamicum* Stamm		Lysinausbeute	Konzentrationen (mM)		
			(Mol-C / Mol-C)	Lysin	Alanin	Valin
Glukose	DM1727	*pyc*	<0,01	1	27	5
	DM1800	*pyc lysC*	0,13	70	20	<1
	DM1728	*pyc hom*	0,08	46	31	10
	DM1729	*pyc hom lysC*	0,13	66	24	6
	DM1730	*pyc hom lysC zwf*	0,15	75	15	4
Fruktose	DM1727	*pyc*	<0,01	<1	2	<1
	DM1800	*pyc lysC*	0,04	11	2	<1
	DM1728	*pyc hom*	0,05	12	3	<1
	DM1729	*pyc hom lysC*	0,03	8	3	<1
	DM1730	*pyc hom lysC zwf*	0,05	11	3	<1
Glukose + Fruktose	DM1727	*pyc*	<0,01	<1	2	<1
	DM1800	*pyc lysC*	0,05	13	2	<1
	DM1728	*pyc hom*	0,05	14	3	<1
	DM1729	*pyc hom lysC*	0,05	13	3	<1
	DM1730	*pyc hom lysC zwf*	0,06	15	2	<1
Saccharose	DM1727	*pyc*	<0,01	<1	3	<1
	DM1800	*pyc lysC*	0,06	22	4	<1
	DM1728	*pyc hom*	0,05	11	3	<1
	DM1729	*pyc hom lysC*	0,05	16	3	<1
	DM1730	*pyc hom lysC zwf*	0,06	16	3	<1

Dies deutet darauf hin, dass mit der effizienteren Produktion des Hauptproduktes der Überflussmetabolismus von Nebenprodukten reduziert wird. Neben Alanin wurde auch Valin als Nebenprodukt identifiziert, welches in Mengen bis 10 mM ausschließlich auf Glukose nachweisbar war.

Es konnte gezeigt werden, dass die Einführung der *pyc*- und *hom*-Mutationen allein ausreichen, um auf Glukose 46 mM Lysin zu produzieren, und dass die Einführung des *lysC*-Allels und des *zwf*-Allels beide jeweils zu einer weiteren Steigerung der Lysinausbeute führen. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Unterschiede der Lysinproduktion auf Glukose, Fruktose und Saccharose im genetisch definierten Modellstamm wesentlich drastischer sind als im durch ungerichtete Mutagenese generierten Stamm von Kiefer *et al.*, (2002) beschrieben. Es ist offensichtlich, dass es auf Fruktose, Saccharose und Glukose + Fruktose limitierende Faktoren bei der Lysinproduktion gibt, die auf Glukose keine Rolle spielen.

4 Identifizierung von Zielgenen zur Optimierung der Lysinproduktion mit *C. glutamicum* DM1730

Aufgrund der drastischen Unterschiede in den Lysinausbeuten auf Glukose im Vergleich zu Fruktose, Saccharose und Glukose + Fruktose stellte sich die Frage, welche Faktoren für die Lysinproduktion auf fruktose- und saccharosehaltigen Medien limitierend sind. Es konnte gezeigt werden, dass die NADPH-Bereitstellung auf Glukose ein kritischer Faktor für die Lysinproduktion ist (Marx *et al.*, 1996; Marx *et al.*, 1997; Marx *et al.*, 1999). Da die Regeneration von NADPH über den Pentosephosphatweg auf Fruktose und Glukose/Fruktose-Gemischen deutlich geringer ist als auf Glukose (Pons *et al.*, 1996; Dominguez *et al.*, 1998; Kiefer *et al.*, 2004) wurde vermutet, dass die Bereitstellung von NADPH insbesondere auf fruktosehaltigen Medien ein Flaschenhals für die Lysinproduktion sein könnte. Als mögliche limitierende Faktoren wurden die Aktivitäten der Enzyme Fruktose-1,6-Bisphosphatase (Pons *et al.*, 1996; Kiefer *et al.*, 2004) und Malic enzyme vermutet (Dominguez *et al.*, 1998; Ohnishi *et al.*, 2003).

4.1 Auswirkungen der Überexpression des Gens *malE* auf die Lysinproduktion

Malic enzyme (MalE) katalysiert die reduktive Decarboxylierung von Malat zu Pyruvat, wobei NADPH gebildet wird. Es wurde vermutet, dass Überexpression des Gens für MalE die NADPH-Versorgung und damit die Lysinausbeute insbesondere auf fruktosehaltigen Medien erhöht (Dominguez *et al.*, 1998). Um dies zu überprüfen, sollte *malE* homolog überexprimiert werden und die Auswirkungen auf die Lysinausbeuten auf verschiedenen PTS-Zuckern analysiert werden. Dafür wurde das *malE*-Gen aus dem Genom von *C. glutamicum* WT mittels PCR amplifiziert und nach Verifizierung der fehlerfreien Sequenz durch Sequenzierung (AGOWA, Berlin) in den Vektor pVWEx1 kloniert. Das so konstruierte Plasmid pVWEx1-*malE* wurde in den Stamm DM1730 transformiert. Zum Nachweis der Überexpression von *malE* wurde zunächst die Enzymaktivität von MalE in den Stämmen DM1730(pVWEx1-malE) und DM1730(pVWEx1) auf 100 g/l Glukose, 100 g/l Saccharose, 50 g/l Glukose + 50 g/l Fruktose und 100 g/l Fruktose gemessen. Die spezifischen MalE-Aktivitäten lagen im

Stamm mit Leervektor zwischen 0,03-0,05 U*mg Protein^{-1} und im überproduzierenden Stamm zwischen 0,10-0,17 U*mg Protein^{-1}. Damit konnte nachgewiesen werden, dass die MalE-Aktivität nach Überexpression des *malE*-Gens auf allen Kohlenstoffquellen mindestens dreifach erhöht ist, was ähnlich hoch ist, wie von Netzer *et al.* (2004) beschrieben. Die nachfolgende Analyse der Lysinproduktion der Stämme DM1730(pVWEX1) und DM1730(pVWEx1-*malE*) ergab, dass die Überexpression von *malE* keine Auswirkungen auf die Lysinausbeute auf den getesteten Kohlenstoffquellen hat (Abbildung 3). Die mittleren Ausbeuten waren auf Glukose, wie zuvor schon beobachtet, zwar mehr als doppelt so hoch, wie auf den anderen getesteten Kohlenstoffquellen, die Überexpression von *malE* führte aber auf keiner Kohlenstoffquelle zu einer Steigerung der Lysinausbeute. Daraus kann man schlussfolgern, dass die Überexpression auf *malE* keinen Effekt auf die Lysinausbeuten mit den getesteten PTS-Zuckern hat.

Tabelle 7: Spezifische Enzymaktivitäten von Malic enzyme in den Stämmen DM1730(pVWEX1) und DM1730(pVWEx1-*malE* auf verschiedenen C-Quellen

	DM1730(pVWEx1)	DM1730(pVWEx1-*malE*)
Kohlenstoffquelle (100 g/l)	Spezifische Malic enzyme (MalE)-Aktivität [U * mg Protein^{-1}]	
Glukose	0,04	0,10
Saccharose	0,05	0,17
Glukose + Fruktose	0,03	0,12
Fruktose	0,04	0,12

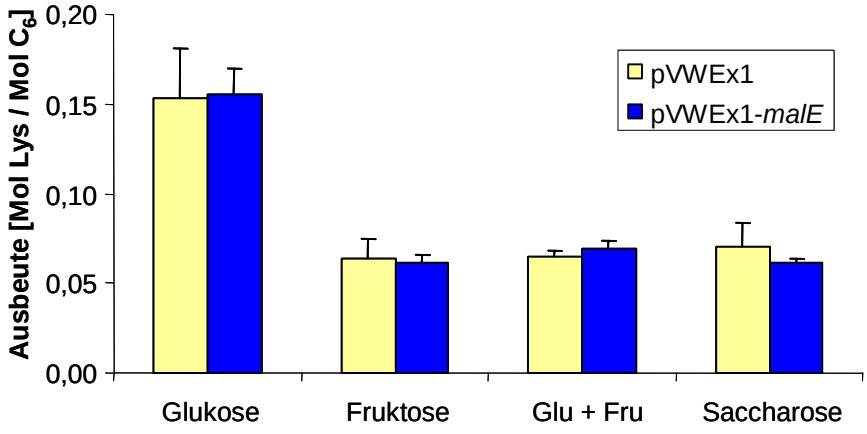

Abbildung 3: Lysinausbeuten von DM1730(pVWEx1) und DM1730(pVWEx1-*malE*) auf 100 g/l Glukose, 100 g/l Saccharose, 50 g/l Glukose + 50 g/l Fruktose und 100 g/l Fruktose

4.2 Auswirkungen der Überexpression des Gens *fbp* auf die Lysinproduktion

Neben Malic enzyme wurde auch für das Enzym Fruktose-1,6-Bisphosphatase (FBPase) vermutet, dass es insbesondere auf fruktosehaltigen Medien ein limitierender Faktor für die Lysinproduktion sein könnte (Pons *et al.*, 1996; Kiefer *et al.*, 2004). Es wurde die Hypothese erstellt, dass Überexpression des *fbp*-Gens den Fluss über den Pentosephosphatweg erhöhen und folglich durch eine bessere NADPH-Versorgung der Zelle auch zu einer erhöhten Lysinproduktion führen könnte (Kiefer *et al.*, 2004). Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde durch Klonierung des *fbp*-Gens (Rittmann *et al.*, 2003) in den Vektor pVWEx1 das Plasmid pVWEx1-*fbp* konstruiert. Nach Transformation in den Stamm DM1730 wurde die FBPase-Aktivität auf verschiedenen PTS-Zuckern gemessen. Die Enzymaktivitäten zeigten, dass kein Unterschied in der FBPase-Aktivität zwischen dem Wildtyp und DM1730 mit Leervektor vorhanden war. Beide Stämme hatten auf den getesteten C-Quellen sehr geringe Aktivitäten von 0,01 - 0,02 U * mg Protein^{-1}. Durch Überexpression von *fbp* im Stamm DM1730(pVWEx1-*fbp*) waren die FBPase-Aktivitäten auf allen getesteten Kohlenstoffquellen mindestens 7 bis 8-fach höher als im Kontrollstamm, der den Leervektor ohne das *fbp*-Gen trug (Tabelle 8). Ähnliche Aktivitäten wurden auch von Rittmann *et al.* (2003) gemessen.

Im Folgenden wurden die Auswirkungen der *fbp*-Überexpression auf die Lysinausbeute analysiert. Auf Glukose, Fruktose und Glukose + Fruktose hatte die Überexpression von *fbp* keine signifikante Auswirkungen auf die Lysinausbeute (Abbildung 4).

Tabelle 8: Spezifische Enzymaktivitäten von FBPase in den Stämmen *C. glutamicum* WT, DM1730(pVWEX1) und DM1730(pVWEx1-*fbp*) auf verschiedenen C-Quellen

	WT	DM1730(pVWEx1)	DM1730(pVWEx1-*malE*)
Kohlenstoffquelle (100 g/l)	Spezifische FBPase-Aktivität [U * mg Protein^{-1}]		
Glukose	0,02	0,02	0,15
Saccharose	0,02	0,02	0,14
Glukose + Fruktose	0,02	0,02	0,15
Fruktose	0,01	0,01	0,10

Auf Saccharose zeigte sich hingegen eine deutliche und signifikante Steigerung der Lysinausbeute durch *fbp*-Überexpression von 0,07 [Mol Lysin / Mol C_6-Zucker] bei DM1730(pVWEx1) auf 0,13 [Mol Lysin / Mol C_6-Zucker] bei DM1730(pVWEx1-*fbp*), was einer Erhöhung von 87% entspricht. Somit konnte *fbp* als limitierender Faktor für die Lysinproduktionn mit DM1730 auf Saccharose identifiziert werden.

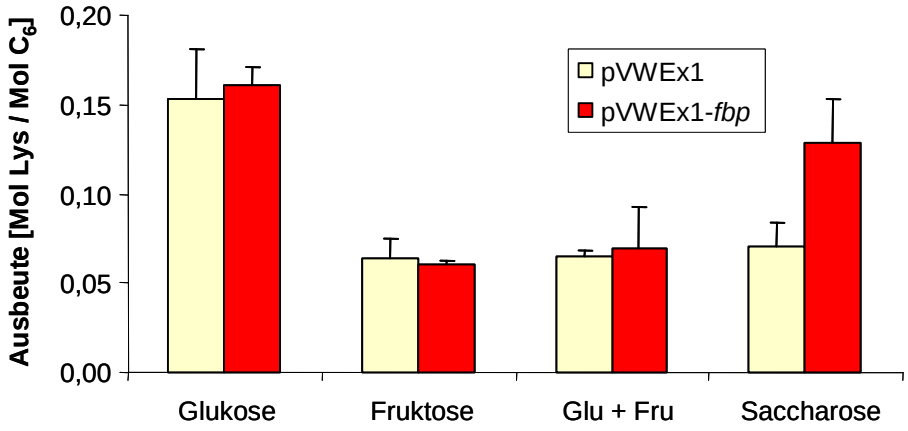

Abbildung 4: Lysinausbeuten von DM1730(pVWEx1) und DM1730(pVWEx1-*fbp*) auf 100 g/l Glukose, 100 g/l Saccharose, 50 g/l Glukose + 50 g/l Fruktose und 100 g/l Fruktose

Nach Überexpression von *fbp* zeigte sich auf Saccharose neben der gesteigerten Lysinausbeute auch ein deutlicher Anstieg beim Verbrauch der Kohlenstoffquelle (Tabelle 9). Der Kontrollstamm DM1730(pVWEx1) verbraucht 36% der im Medium verhandenen Saccharose während der Stamm DM1730(pVWEx1-*fbp*) 81% der Saccharose verbraucht. Diese Erhöhung des Verbrauches übersteigt die Menge an Kohlenstoff, die nach *fbp*-Überexpression auf Saccharose in zusätzliches Lysin umgesetzt wurde. Dies ist ein Indiz dafür, dass die Aufnahme oder Verwertung von Saccharose limitierend war.

Tabelle 9: Prozentualer Verbrauch der im Medium vorhandenen Kohlenstoffquellen der Stämme DM1730(pVWEx1) und DM1730(pVWEx1-*fbp*)

	DM1730(pVWEx1)	DM1730(pVWEx1-*fbp*)
C-Quelle (100 g/l)	Verbrauch der C-Quelle (%)	
Glukose	94	92
Fruktose	44	45
Glukose + Fruktose	45	56
Saccharose	36	81

4.3 Auswirkungen der *fbp*-Überexpression auf intrazelluläre Fruktose-6-Phosphat- und Fruktose-1,6-Bisphosphat-Konzentrationen

Das Enzym Fruktose-1,6-Bisphosphatase katalysiert die Umsetzung von Fruktose-1,6-P_2 zu Fruktose-6-P (Rittmann *et al.*, 2003). Es stellte sich die Frage, ob Überexpression von *fbp* zu einer Veränderung der intrazellulären Fruktose-1,6-P_2- und Fruktose-6-P-Konzentrationen im Stamm DM1730 führt. Anhand der Bestimmung dieser intrazellulären Metabolitkonzentrationen sollte geklärt werden, warum die Überexpression von *fbp* im Stamm DM1730 nur auf Saccharose als Kohlenstoffquelle zu einer erhöhten Lysinausbeute führte.

Dafür wurden die Stämme DM1730(pVWEx1) und DM1730(pVWEx1-*fbp*) auf 100 g/l PTS-Zucker als Kohlenstoffquelle kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Die Messung der intrazellulären Metabolite erfolgte wie in III.4.2 beschrieben.

Die intrazellulären Fruktose-6-P-Konzentrationen betrugen in DM1730(pVWEx1) auf Glukose 13 mM, auf Fruktose 1 mM und auf Glukose + Fruktose sowie Saccharose jeweils 5 mM (Tabelle 10). Die Überexpression von *fbp* führte zu einer leichten Erhöhung der Fruktose-6-P-Konzentration auf Glukose, Saccharose und Glukose + Fruktose wohingegen sie auf Fruktose unverändert blieb. Die Fruktose-6-P-Konzentration war auf Fruktose erwartungsgemäß am geringsten, da Fruktose nach der Aufnahme größtenteils in Form von Fruktose-1,6-P_2 in der Glykolyse verstoffwechselt wird (Dominguez *et al.*, 1998; Kiefer *et al.*, 2004). Dabei wird Fruktose-6-P nur über die FBPase-Reaktion gebildet. Glukose wird dagegen als Glukose-6-P in die Zelle aufgenommen (Pons *et al.*, 1996), so dass Fruktose-6-P als Intermediat bei der Verstoffwechslung über die Glykolyse auftritt. Darum ist die Fruktose-6-P-Konzentration auf Glukose erwartungsgemäß am höchsten, da in diesem Fall jedes Hexosemolekül der FBPase-Reaktion vorgeschaltet in den Zentralstoffwechsel eintritt.

Die Fruktose-1,6-P_2-Konzentationen betrugen in DM1730(pVWEx1) 27 mM auf Glukose, 40 mM auf Fruktose und jeweils 33 mM auf Glukose + Fruktose sowie Saccharose. Durch Überexpression von *fbp* sanken die Fruktose-1,6-P_2-Konzentrationen im Stamm DM1730(pVWEx1-*fbp*) auf Glukose, Glukose + Fruktose und Saccharose geringfügig um 1-3 mM. Auf Saccharose hingegen findet ein deutlicher, signifikanter Abfall von 33 mM auf 24 mM statt. Dies stellt eine plausible

Erklärung für die erhöhte Lysinausbeute auf Saccharose dar, da Fruktose-1,6-P_2 die Schlüsselenzyme des Penrtosephosphatweges, Glukose-6-P-Dehydrogenase und 6-Phosphoglukonat-Deydrogenase inhibiert (Sugimoto und Shiio, 1987; Sugimoto und Shiio, 1987; Moritz *et al.*, 2000). Es ist anzunehmen, dass so der Fluss über den Pentose-Phosphatweg erhöht ist. Dies führt zu einer verbesserten NADPH-Versorgung, welche höchstwahrscheinlich die Ursache für die erhöhte Lysinausbeute auf Saccharose nach Überexpression des *fbp*-Gens ist. Dabei bleibt ungeklärt, warum die Überexpression von *fbp* im Stamm DM1730 nur auf Saccharose, und nicht auf den anderen getesteten Kohlenstoffquellen eine Verringerung der intrazellulären Fruktose-1,6-P_2-Konzentation bewirkte.

Tabelle 10: Intrazelluläre Fruktose-6-P- und Fruktose-1,6-P_2-Konzentrationen von DM1730(pVWEx1) und DM1730(pVWEx1-*fbp*). Es wurden jeweils 2 unabhängige Bestimmungen mit Fehlern <15% durchgeführt.

C-Quelle (100g/l)	Fruktose-6-Phosphat (mM)		Fruktose-1,6-Bisphosphat (mM)	
	DM1730(pVWEx1)	DM1730(pVWEx1-*fbp*)	DM1730(pVWEx1)	DM1730(pVWEx1-*fbp*)
Glukose	13	17	27	25
Fruktose	1	1	40	39
Glu + Fru	5	7	33	30
Saccharose	5	7	**33**	**24**

4.4 Auswirkungen der heterologen Überexpression der Transhydrogenase *pntAB* aus *E. coli* in DM1730

Wie gezeigt, führte die Überexpression von *fbp* zu einer reduzierten intrazellulären Fruktose-1,6-P_2-Konzentration. Dies führt wahrscheinlich zu einer verbesserten NADPH-Bereitstellung und letztlich zu einer erhöhten Lysinausbeute. Es sollte nun überprüft werden, ob die Überexpression eines Enzyms, das direkt eine Reaktion zur Bildung von NADPH katalysiert, ebenfalls zu einer Stiegerung der Lysinausbeute führt. Dies würde eine direkte Korrelation zwischen NADPH-Bereitstellung und Lysinausbeute zeigen.

Dafür wurde die Transhydrogenase *pntAB* aus *E. coli,* die die reversible Reduktion von $NADP^+$ durch NADH katalysiert (Bizouarn *et al.*, 2002) in *C. glutamicum* DM1730

überexprimiert. Das Expressionsplasmid pEKEx2-*pntAB*, welches zu deutlichen Enzymaktivitäten von PntAB in *C. glutamicum* führte, lag vor (Kabus, 2006).

Zur Bestimmung der Lysinausbeuten wurden die Stämme DM1730(pEKEx2-*pntAB*) sowie die Leervektorkontrolle DM1730(pEKEx2) auf 100 g/l verschiedener PTS-Zucker kultiviert und die Lysinausbeute ermittelt.

In Abbildung 5 ist zu sehen, dass auf Glukose, Fruktose und Glukose + Fruktose nach *pntAB*-Überexpression 25-30% mehr Lysin produziert wird. Der stärkste Effekt zeigte sich hier, wie schon nach Überexpression von *fbp*, auf Saccharose, wo sich die Lysinausbeute fast verdoppelte. Die Bereitstellung von NADPH auf allen getesteten Kohlenstoffquellen erwies sich damit als limitierender Faktor. Auf Saccharose lässt sich diese Limitierung durch eine verbesserte NADPH-Bereitstellung weitgehend, aber nicht vollständig aufheben. Dennoch ist die Lysinausbeute auf Glukose auch in der Leervektorkontrolle immer noch höher als auf den anderen getesteten Kohlenstoffquellen nach Überexpression von *pntAB*.oder *fbp*. Folglich ist anzunehmen, dass es neben der Bereitstellung von NADPH auf fruktose- und saccharosehaltigen Medien weitere limitierende Faktoren für die Lysinproduktion gibt.

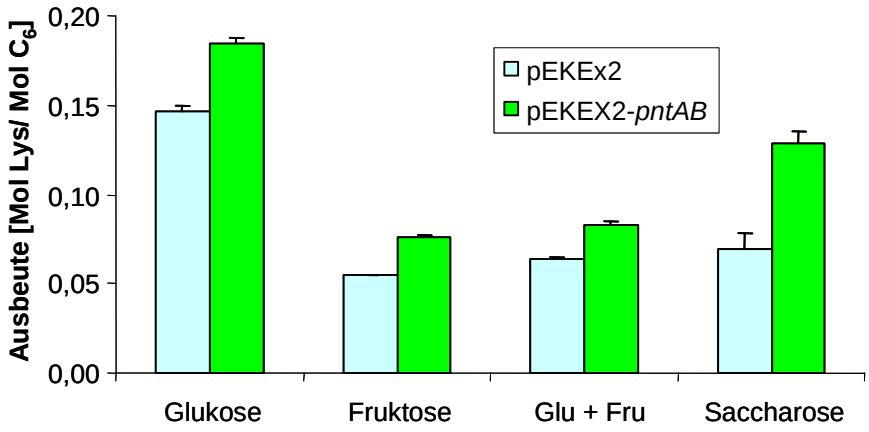

Abbildung 5: Lysinausbeuten von DM1730(pEKEx2) und DM1730(pEKEx2-*pntAB*) auf 100 g/l Glukose, 100 g/l Saccharose, 50 g/l Glukose + 50 g/l Fruktose und 100 g/l Fruktose.

Wie auch für Überexpression von *fbp* gezeigt, führte in DM1730 die Überexpression von *pntAB* auf Saccharose zu einem deutlich erhöhten Verbrauch des im Medium vorhandenen Zuckers (Tabelle 11).

Tabelle 11: Prozentualer Verbrauch der im Medium vorhandenen Kohlenstoffquellen der Stämme DM1730(pEKEx2) und DM1730(pEKEx2-*pntAB*).

	DM1730(pEKEx2)	DM1730(pEKEx2-*pntAB*)
C-Quelle (100 g/l)	Verbrauch der C-Quelle (%)	
Glukose	97	85
Fruktose	43	52
Glukose + Fruktose	49	56
Saccharose	43	92

5 Identifizierung zuckerspezifischer Stimulons mittels Transkriptomanalysen

Die regulatorische Wirkung von PTS-Zuckern auf die globale Genexpression war in *C. glutamicum* weitgehend unbekannt. Aufgrund der bisherigen Ergebnisse zur Lysinproduktion mit verschiedenen Zuckern konnte man schlussfolgern, dass die NADPH-Bereitstellung nicht der einzige Flaschenhals bei der Lysinproduktion ist, und dass dabei sehr wahrscheinlich auch genetische Regulationsmechanismen eine Rolle spielen. Es wurden mit Hilfe der DNA-Chip-Technologie Transkriptomanalysen durchgeführt, um zuckerspezifische Stimulons identifizieren zu können.

5.1 Transkriptomanalysen von *C. glutamicumin* bei Wachstum auf Minimalmedium mit verschiedenen PTS-Zuckern

Ziel war es, Unterschiede in der globalen Genexpression von *C. glutamicum* bei Wachstum auf Glukose, Fruktose, Saccharose und Glukose + Fruktose festzustellen. Für diese Experimente wurde der *C. glutamicum* Wildtyp in Minimalmedium mit 100 mM Glukose, 100 mM Fruktose, 50 mM Saccharose und 50 mM Glukose + 50 mM Fruktose als einzige(r) Kohlenstoffquelle(n) kultiviert. Dafür wurden bei exponentiell wachsenden Zellen die mRNA-Spiegel nach Kultivierung auf Fruktose, Saccharose oder Glukose + Fruktose, mit den mRNA-Spiegeln aus Zellen nach Kultivierung auf Glukose mittels der DNA-Chip-Technik (Lange *et al.*, 2003) verglichen. Wie bereits gezeigt, gab es mit diesen Kohlenstoffkonzentrationen keine signifikanten Unterschiede im Wachstum auf Glukose, Fruktose und Saccharose. In

Tabelle 12 sind die 14 Gene aufgeführt, die bei Wachstum auf 100 mM Glukose im Vergleich zum Wachstum auf Fruktose signifikant mindestens dreifach veränderte relative mRNA-Spiegel aufwiesen. Darunter fiel auch das Gen für die fruktosespezifischen PTS-Permease (*NCgl1861*) (Parche *et al.*, 2001) und ein fast direkt benachbartes Gen, welches für einen Regulator kodiert (*NCgl1859*) sowie das Gen für die quinonabhängige Malat-Dehydrogenase (*NCgl2297*) (Molenaar *et al.*, 2000), welche auf Fruktose im Vergleich zu Glukose ca. dreifach erhöhte mRNA-Spiegel zeigten. Alle anderen Gene, die bis zu siebenfach veränderte mRNA-Spiegel zeigten, können -sofern sie annotiert sind- nicht direkt mit dem Zucker- oder Zentralstoffwechsel in Verbinding gebracht werden. Vergleicht man die Genexpressionsveränderungen beim Wachstum auf Glukose + Fruktose mit dem Wachstum auf Glukose, so zeigte kein Gen eine mehr als dreifach veränderte Expression. Durch die Anwesenheit von Glukose wurden dabei fruktosespezifische Effekte offenbar kompensiert.

Tabelle 12: Signifikant veränderte Gene beim Transkriptomvergleich von *C. glutamicum* bei Wachstum auf 100 mM Fruktose und 100 mM Glukose.

NCgl[a]	BIOMAX[b]	Annotation[c]	mRNA-Verhältnis Fruktose / Glukose
*	190	Hypothetisches Protein	0,26
122	517	Hypothetisches Protein	5,03
123	518	Poly-beta-Hydroxybutyrat Polymerase	5,32
565	1080	Integrales Membranprotein mit TRKA Domänen	3,63
1859	2019	Transkriptionaler Repressor	3,08
1861	2021	Fruktosespezifische IIABC PTS-Komponente	3,12
1915	2093	Oligopeptid-bindendes Protein *oppA*	0,23
2297	64895	Malat-Dehydrogenase	3,00
2319	66055	Catechol 1,2-dioxygenase	0,33
2450	2920	2-Methylisocitrat-Synthase	5,94
2657	122	Phosphat-Acetyltransferase	0,14
2717	197	Phosphoadenosine-Phosphosulfat-Reduktase	3,12
2718	199	Ferredoxin-Nitrit-Reduktase	3,34
2787	281	"*Outer membrane usher*" protein *fimC*	0,14

Es sind Gene aufgeführt, die signifikant ($p<0,05$) mindestens dreifach veränderte relative mRNA-Spiegel aufwiesen.
[a]Nummer der Gene des Genoms von *C. glutamicum* ATCC13032 (GI58036263) in der Annotation des National Center of Biotechnology Information (NCBI)
[b]Nummern der offenen Leseraster (ORFs); alternative Gen-Numerierung nach Biomax-Annotation
[c]Annotation in Anlehnung an NCBI
*korrespondiert mit der Basenpaaren von 2996809 - 2997021 des Genoms vom Wildtyp (GI58036263)

Beim Transkriptomvergleich Saccharose gegen Glukose wiesen 9 Gene einen signifikant mehr als dreifachen veränderten mRNA-Spiegel auf (Tabelle 13). Keines dieser Gene kodiert für Enzyme zur Aufnahme oder Verstoffwechslung von Glukose oder Saccharose. Die NADH-abhängige L-Lactat Dehydrogenase (*NCgl2810*) und die quinonabhängige L-Lactat Dehydrogenase (*NCgl2817*) (Stansen *et al.*, 2005) sind beide auf Saccharose im Vergleich zu Glukose 3,5- bzw. 3-fach erhöht exprimiert. Die anderen Gene können nicht dem Zucker- oder Zentralstoffwechsel zugeordnet werden. Dies spricht dafür, dass auf Saccharose möglicherweise mehr L-Lactat gebildet wird als auf Glukose. Eine erhöhte L-Lactatbildung auf Fruktose im Vergleich zu Glukose in den durch ungerichtete Mutagenese generierten Stämmen konnte auch von Péquignot *et al* (1997) und Kiefer *et al*. (2004) gezeigt werden.
Insgesamt zeigte sich hier, dass sowohl im Vergleich Fruktose zu Glukose als auch Saccharose zu Glukose die stärksten Genexpressionsveränderungen nicht in solchen Genen zu finden sind, die für Proteine zur Zuckerverwertung kodieren. Lediglich die fruktosespezifischen PTS-Komponenten wurden auf Fruktose im Vergleich zu Glukose ca. 3-fach erhöht exprimiert.

Tabelle 13: Signifikant veränderte Gene beim Transkriptomvergleich von *C. glutamicum* bei Wachstum auf 50 mM Saccharose und 100 mM Glukose.

NCgl[a]	BIOMAX[b]	Annotation[c]	mRNA-Verhältnis	Saccharose / Glukose
2450	2920	2-Methylisocitrat-Synthase		4,80
122	517	Hypothetisches Protein		4,65
123	518	Poly-beta-Hydroxybutyrat Polymerase		4,15
2810	306	L-lactat-Dehydrogenase *ldh*		3,51
1646	3347	Sekretorische Serin-Protease		3,24
565	1080	Integrales Membranprotein mit TRKA Domänen		3,23
2817	313	L-lactate dehydrogenase *lldD*		3,04
*	190	Hypothetisches Protein		0,26
1915	2093	Oligopeptid-bindendes Protein *oppA*		0,29

Erläuterungen wie in Tabelle 12.

5.2 Transkriptomanalysen im Komplexmedium mit bzw. ohne PTS-Zucker

Durch Transkriptomanalysen in Minimalmedium konnten Genexpressionsunterschiede beim Wachstum auf Fruktose oder Saccharose im Vergleich zum Wachstum auf Glukose nachgewiesen werden. Dabei konnte aber nicht unterschieden werden, ob eine beispielsweise auf Fruktose erhöhte Genexpression durch eine Aktivierung durch Fruktose oder durch eine Repression durch Glukose zustande kam. Deshalb wurden Transkriptomanalysen auf Komplexmedium mit- bzw. ohne PTS-Zucker durchgeführt, um globale Genexpressionsveränderungen, die durch die Anwesenheit eines PTS-Zuckers als einzige Kohlenstoffquelle zustande kommen, zu untersuchen. *C. glutamicum* WT wurde parallel in LB-Medium mit oder ohne 100 mM Glukose, 100 mM Fruktose und 50 mM Saccharose kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Um auch Effekte von Nicht-PTS-Substraten testen zu können, wurden die Experimente zusätzlich mit 50 mM Maltose und 100 mM Citrat (Tino Polen, unveröffentlicht) durchgeführt. Generell führte die Anwesenheit einer zusätzlichen Kohlenstoffquelle in LB-Komplexmedium zu einer Vielzahl von Genexpressionsveränderungen. In jeweils drei unabängigen DNA-Chip-Experimenten zeigten 68 Gene signifikant mehr als dreifach veränderte mRNA-Level im Vergleich LB + Glukose zu LB, 70 Gene waren im Vergleich LB + Saccharose zu LB in der Expression mehr als dreifach verändert, 71 Gene zeigten mehr als dreifach Genexpressionsveränderungen im Vergleich LB + Fruktose zu LB, 47 Gene zeigten im Vergleich LB + Maltose zu LB eine mehr als dreifach veränderte Expression und 38 Gene waren im Vergleich LB + Citrat zu LB mehr als dreifach in der Expression verändert.

Um Gengruppen identifizieren zu können, deren übereinstimmende Expressionsmuster spezifisch für die Anwesenheit einer oder mehrerer Kohlenstoffquellen in Komplexmedium sind, wurden die experimentellen Daten in einer hierarchischen Clusteranalyse (Polen, 2002) verglichen. Alle Gene, die durch Anwesenheit mindestens einer Kohlenstoffquelle eine signifikant dreifach veränderte Expression aufwiesen, wurden für die Analyse berücksichtigt. Außerdem wurden Gene, die im Transkriptomvergleich LB + Citrat gegen LB signifikant dreifach verändert waren, berücksichtigt. Insgesamt konnten 6 verschiedene Expressionsmuster (Subcluster) identifiziert werden (Abbildung 6).

Subcluster 1 enthält 6 Gene, deren Expression durch Fruktose und Saccharose, aber nicht durch Glukose, Maltose oder Citrat reprimiert wurde. Darunter fallen 3 Gene für die Komponenten des Succinat-Dehydrogenase-Komplexes (*NCgl0359-0361*) (Bott und Niebisch, 2003), ein Gen, das für ein Oligopeptid-Bindeprotein kodiert, ein Gen, das in den Biotinmetabolismus involviert ist und ein Gen für ein hypothetisches Protein.

Subcluster 2 umfasst 53 Gene, deren Expression durch alle getesteten Kohlenstoffquellen reprimiert wurde. Davon sind die Produkte von 6 Genen als Proteine der Aufnahme von Oligopeptiden annotiert, deren verringerte Expression eine Reaktion darauf sein könnte, dass die Zelle durch die zusätzliche Kohlenstoffquelle weniger auf die Verwertung von Oligopeptiden als Kohlenstoffquelle angewiesen ist. Insgesamt 18 der 52 Gene sind dem Metabolismus zuzuordnen. 14 dieser 18 Gene kodieren für Proteine des Kohlenstoffstoffwechsels, darunter die beiden Gene der Succinyl-CoA-Synthetase (*NCgl2476-2477*) (Bott und Niebisch, 2003) oder *pyc*, was für die Pyruvatcarboxylase kodiert (Peters-Wendisch *et al.*, 1998). 4 der 18 Gene kodieren Enzyme des Protokatechuatstoffwechsels. Insgesamt 8 Gene kodieren für Proteine mit Transportfunktion, darunter solche, die alternative Kohlenstoffquellen transportieren wie z.B. Glutamat (*NCgl1876-1877*) (Kronemeyer *et al.*, 1995).
Obwohl die meisten dieser Transporter biochemisch noch nicht näher charakterisiert wurden, spricht dies für eine Katabolitrepression (Stülke und Hillen, 1999) durch die verwendeten Kohlenstoffquellen in Komplexmedium, da Gene für Proteine zur Verwertung alternativer Kohlenstoffquellen durch die Anwesenheit des Zuckers reprimiert werden. Es wurden 2 Gene identifiziert, die regulatorische Funktionen haben, darunter *ramB*, welches für den Regulator des Acetatstoffwechsels kodiert (Gerstmeir *et al.*, 2004) und NCgl2199, was für einen Regulator der ArsR-Familie kodiert. Insgesamt 19 weitere Gene kodieren Proteine mit anderen Funktionen oder hypothetische Proteine.



Abbildung 6: Hierarchische Clusteranalyse zur Identifizierung von Gengruppen mit ähnlichen Expressionsmustern beim Vergleich der Expression von *C. glutamicum* auf LB + Saccharose mit LB (S), LB + Fruktose mit LB (F), LB + Glukose mit LB (G), LB + Maltose gegen LB (M) und LB + Citrat mit LB (C). Die durch die ORF-Nummern bezeichneten Gene sind in Reihen angeordnet. Die Farbskala gibt das mRNA-Verhältnis LB + C-Quelle/LB an

Subcluster 3 besteht aus 3 Genen, die ausschließlich bei Wachstum auf LB + Citrat erhöht exprimiert werden (*NCgl2724-2726*). Die Gene sind als Tricarbonsäurebinde- und Transportproteine annotiert und sind wahrscheinlich in einem Operon organisiert. Höchstwahrscheinlich katalysiert das Transportsystem die Aufnahme von Citrat in die *C. glutamicum* Zelle (Schaffer und Bott, persönliche Mitteilung).

Subcluster 4 umfasst 26 Gene, die durch Zugabe aller Kohlenstoffquellen mit Ausnahme von Fruktose erhöhte mRNA-Spiegel aufweisen. Darunter sind 13 Gene annotiert für ribosomale Proteine, einen Translationsinitialisierungsfaktor, Komponenten der ATP-Synthase, 2 Proteine, die eine Rolle im Eisenstoffwechsel spielen und 7 hypothetische Proteine. Obwohl es beim Wachstum des Wildtyps auf LB + Glukose, LB + Fruktose, LB + Saccharose, LB + Maltose und LB + Citrat keine Unterschiede in den Wachtumsraten gab, sind diese Gene in Anwesenheit von Fruktose nicht erhöht exprimiert. Zur Überprüfung wurden DNA-Chip-Experimente mit RNA aus Zellen, die auf LB + Glukose gewachsen sind mit RNA aus LB + Fruktose gewachsenen Zellen verglichen. Hier zeigte sich, dass viele Gene, die für ribosomale Proteine kodieren auf LB + Glukose höher exprimiert waren als auf LB + Fruktose. Dies zeigt, dass die Gene von ribosomalen Proteinen speziell in Anwesenheit von Fruktose in LB im Vergleich zu den anderen Zuckern verringert exprimiert sind. Die Ursachen für diesen Befund sind unbekannt.

Subcluster 5 enthält 25 Gene, die in Anwesenheit jeder der getesteten Kohlenstoffquellen erhöhte mRNA-Spiegel aufwiesen. 12 Gene kodieren für Proteine der Aufnahme und Verstoffwechslung von Eisen, 3 Gene sind in die Aufnahme von Dipeptiden involviert, 2 Gene kodieren für Proteine des Kohlenstoffstoffwechsels. Hinzu kommen Gene für einen putativen Regulator (*NCgl0943*), einen putativen Transporter, ein Protein, das am Nickeltransport beteiligt ist, ein Protein der Pyridoxinbiosynthese und 4 hypothetische Proteine.

Subcluster 6 besteht aus 21 Genen, die in Anwesenheit von Fruktose und Saccharose erhöhte mRNA-Spiegel zeigten, nicht aber in Anwesenheit von Glukose, Maltose oder Citrat. Der Hauptanteil dieser Gene (13 von 21) kodiert für Proteine des Stickstoffstoffwechsels. Darunter fallen mehrere Komponenten der Urease (*NCgl0083-0085*) (Puskas *et al.*, 2000) oder sind als "Urease-assoziierte Proteine"

annotiert (*NCgl0087-0089*) (Puskas *et al.*, 2000), eine Komponente der Glutamatsynthase (*NCgl0182*) (Beckers *et al.*, 2001; Schulz *et al.*, 2001), der Ammoniumtransporter Amt (*NCgl1521*) (Meier-Wagner *et al.*, 2001) und das durch *glnK* (*NCgl1981*) kodierte P_{II}-Signaltransduktionsprotein, welches das Hauptsignal-transduktionprotein des Stickstoffmetabolismus in *C. glutamicum* ist (Burkovski, 2003).

5 Operons, in denen 11 der oben genannten Gene enthalten sind, weisen im Promotorbereich eine AmtR-Bindestelle auf (Promotoren von *NCgl0074*, *NCgl0075*, *NCgl0083*, *NCgl1521* und *NCgl2451*). AmtR ist der globale Stickstoffregulator in *C. glutamicum* (Jakoby *et al.*, 2000; Burkovski, 2003). Da die Expression der meisten Gene dieses Subclusters bei Stickstoffmangel induziert wird (Burkovski, 2003), spricht das Expressionsmuster dieser Gene für eine Stickstoffmangelantwort, die nur bei Anwesenheit von Fruktose und Saccharose auftritt.

Um diese Daten zu verifizieren, wurden weitere DNA-Chip-Experimente durchgeführt. Die Expressionsunterschiede der 21 Gene von Subcluster 6 wurde bei Wachstum auf LB + 100 mM Fruktose mit Wachstum auf LB + 100 mM Glukose im direkten Vergleich bestimmt. Ausserdem wurde untersucht, ob die Zugabe von 20 g/l Ammoniumsulfat als zusätzliche Stickstoffquelle eventuell auftretende Genex-pressionsunterschiede kompensiert. In der Expressionsanalyse der 21 Gene (Abbildung 7) zeigte sich wie erwartet, dass die meisten dieser Gene beim Wachstum auf LB + Fruktose im Vergleich zu LB + Glukose erhöhte mRNA-Spiegel aufwiesen (Abbildung 7B). Dies bestätigt die Ergebnisse, dass diese veränderte Genexpression fruktosespezifisch ist. Nach Zugabe von 20 g/l Ammoniumsulfat zeigten sich bei diesen Genen keine Expressionsunterschiede mehr im Vergleich LB + Fruktose + Ammoniumsulfat zu LB + Glukose + Ammoniumsulfat (Abbildung 7A). Dies lässt vermuten, dass die Stickstoffverfügbarkeit in LB-Medium in Anwesenheit von Fruktose entweder geringer ist als in Anwesenheit der anderen getesteten Kohlenstoffquellen oder sensibler wahrgenommen wird. Durch Zugabe zusätzlichen Stickstoffes in Form von Ammonium lässt sich dieser fruktosespezifische Effekt kompensieren, woraus hervorgeht, dass die Expressionsveränderungen der Gene von Subcluster 6 nicht prinzipiell in Anwesenheit von Fruktose auftreten, sondern auch vom Stickstoffgehalt des Mediums abhängig sind.

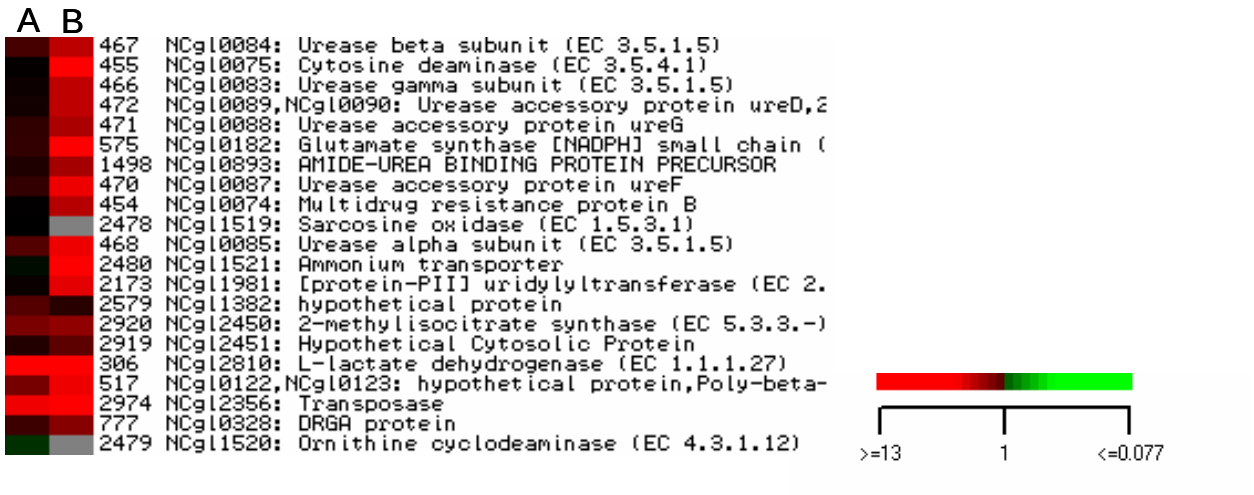

Abbildung 7: Vergleichen der Genexpression zwischen WT auf LB + 100 mM Fruktose gegen WT auf LB + 100 mM Glukose (B) und zwischen WT auf LB + 100 mM Fruktose + 20g/l $(NH_4)_2SO_4$ gegen WT auf LB + 100 mM Glukose + 20g/l $(NH_4)_2SO_4$ (A). Berücksichtigt wurden 21 Gene, die Subcluster 6 aus Abbildung 6 darstellen. Die Farbskala gibt das mRNA-Verhältnis LB + Fruktose zu LB + Glukose an.

Einige Gene sind auch nach Zugabe von Ammoniumsulfat in Anwesenheit von Fruktose im Vergleich zu Glukose erhöht exprimiert. Diese Gene kodieren aber nicht für Proteine des Stickstoffstoffwechsels. Neben Genen des Stickstoffmetabolismus zeigten 8 Gene nur in Anwesenheit von Fruktose und Saccharose erhöhte mRNA-Spiegel. Darunter fallen Gene für 4 hypothetische Proteine, die NADH-abhängige L-Lactat-Dehydrogenase (*NCgl2810*) (Inui *et al.*, 2004) und 3 Gene anderer Funktionen.

Die Zugabe von Zuckern oder organischen Säuren führte in Komplexmedium zu zahlreichen Genexpressionsveränderungen. Es zeigte sich eine Katabolitrepression in Anwesenheit aller getesteten Zucker, indem eine große Anzahl von Genen, die für Proteine zur Aufnahme oder Verwertung alternativer Kohlenstoffquellen kodieren, in ihrer Expression reprimiert wurden. Es konnten neben Genen, die einheitlich durch die Anwesenheit jeder der getesteten zusätzlichen Kohlenstoffquellen verändert exprimiert wurden, insbesonders solche identifiziert werden, die ein spezifisches Expressionsmuster durch Anwesenheit von Fruktose aufwiesen. Es waren aus nicht bekannten Gründen Gene für ribosomale Proteine nur in Anwesenheit von Fruktose erhöht exprimiert. Des Weiteren waren Gene von Proteinen, die bei Stickstoffmangel benötigt werden, spezifisch in Anwesenheit von Fruktose und Saccharose erhöht exprimiert, was vermuten lässt, dass unter diesen Bedingungen in LB-Medium die

Stickstoffverfügbarkeit limitierend ist. Wie auch bei den Experimenten in Minimalmedium, traten auch in Komplexmedium die stärksten Genexpressionsveränderungen durch Anwesenheit einer zusätzlichen Kohlenstoffquelle nicht bei Genen der initialen Verstoffwechslung der entsprechenden C-Quelle auf. Die einzige Ausnahme ist in diesem Fall Citrat, dessen Aufnahmesystem durch Anwesenheit von Citrat 8-20-fach erhöht exprimiert wurde.

6 Substratverwertung bei *C. glutamicum*

In *E. coli* und *B. subtilis* findet bei Anwesenheit von Glukose eine Katabolitrepression statt, die über das PTS-System vermittelt wird (Stülke und Hillen, 1999). Die Katabolitrepression spiegelt sich häufig in einem diauxischen Wachstum wider, bei dem in den meisten Fällen Glukose die bevorzugte Kohlenstoffquelle ist (Monod, 1949). Da in *C. glutamicum* bislang weitgehend unbekannt ist, unter welchen Bedingungen Katabolitrepression auftritt und mit welchem Mechanismen sie ausgeübt wird, stellt die Suche nach Diauxien ein geeignetes Mittel dar, um regulatorische Mechanismen identifizieren zu können. Es wurde die Substratverwertung von *C. glutamicum* untersucht, indem die Zellen auf Substratgemischen, bestehend aus PTS-Zucker und einer organischen Säure, kultiviert wurden.

6.1 Kultivierung von *C. glutamicum* WT auf Minimalmedium mit Glukose/Saccharose + Acetat/Pyruvat/L-Lactat

Beim Wachstum von *C. glutamicum* auf Glukose und einer organischen Säure konnte bislang gezeigt werden, dass *C. glutamicum* Glukose und Acetat (Wendisch *et al.*, 1997) sowie Glukose + L-Lactat (Cocaign und et al., 1993) und auch Acetat + L-Lactat coverstoffwechselt (Wendisch *et al.*, 1997). Im Gemisch mit Glutamat wird Glukose jedoch sequentiell vor Glutamat verstoffwechselt, was auf einer Repression der Gene des Glutamataufnahmesystems in Anwesenheit von Glukose beruht (Kronemeyer *et al.*, 1995). Des Weiteren ist bekannt, dass *C. glutamicum* auf Acetat (Gerstmeir *et al.*, 2003), Pyruvat und L-Lactat (Stansen *et al.*, 2005) als einziger Kohlenstoffquelle wachsen kann. Über die Substratverwertung von *C. glutamicum*

beim Wachstum auf Mischsubstraten bestehend aus Saccharose und einer organischen Säure war nichts bekannt.

C. glutamicum Wildtyp wurde in Minimalmedium auf Substratgemischen, bestehend aus Glukose + organische Säure oder Saccharose + organische Säure kultiviert und zu verschiedenen Zeitpunkten die im Medium verbliebenen Kohlenstoffquellen quantifiziert (Abbildung 8).

Beim Wachstum auf Glukose + Acetat wurden Glukose und Acetat wie erwartet coverstoffwechselt (Wendisch *et al.*, 2000). Dabei wurde Acetat mit einer Verbrauchsrate von etwa 400 nMol C / [mg DW * min] konstant in die Zelle aufgenommen, während die Glukoseverbrauchsrate stark inhibiert ist und nur ca. 120 nMol C / [mg DW * min] beträgt (Abbildung 8A), was viermal weniger ist als beim Wachstum auf Glukose als einziger Kohlenstoffquelle (vgl. Tabelle 5). Bei einer OD_{600} von ca. 18 ist das Acetat nahezu komplett verstoffwechselt, während noch über 60% der eingesetzten Glukose im Medium zurückbleibt. Erst wenn das Acetat fast vollständig verbaucht war, stieg die Glukoseaufnahmerate auf 290 nMol C / [mg DW * min]. Eine Inhibierung der Glukoseaufnahme durch Acetat wurde auch schon von Wendisch *et al.* (2000) beschrieben. Beim Wachstum auf Glukose + Pyruvat und Glukose + L-Lactat (Abbildung 8) ist die Substratverwertung sehr ähnlich. Während die organischen Säuren Pyruvat und L-Lactat konstant mit etwa 600-650 nMol C / [mg DW * min] verbraucht werden, ist die Glukoseverwertung stark inhibiert. Folglich führt die Anwesenheit von Acetat, Pyruvat und L-Lactat zu einer mindestens vierfachen Verringerung der Glukoseverwertung. Die Wachstumsraten betrugen 0,40 h^{-1} auf Glukose + Acetat, 0,38 h^{-1} auf Glukose + Pyruvat und 0,33 h^{-1} auf Glukose + L-Lactat. Trotz der inhibierten Glukoseverbrauchsraten in Anwesenheit der getesteten organischen Säuren sind sie damit höher bei Wachstum auf Glukose als einziger Kohlenstoffquelle (μ = 0,32 h^{-1}).

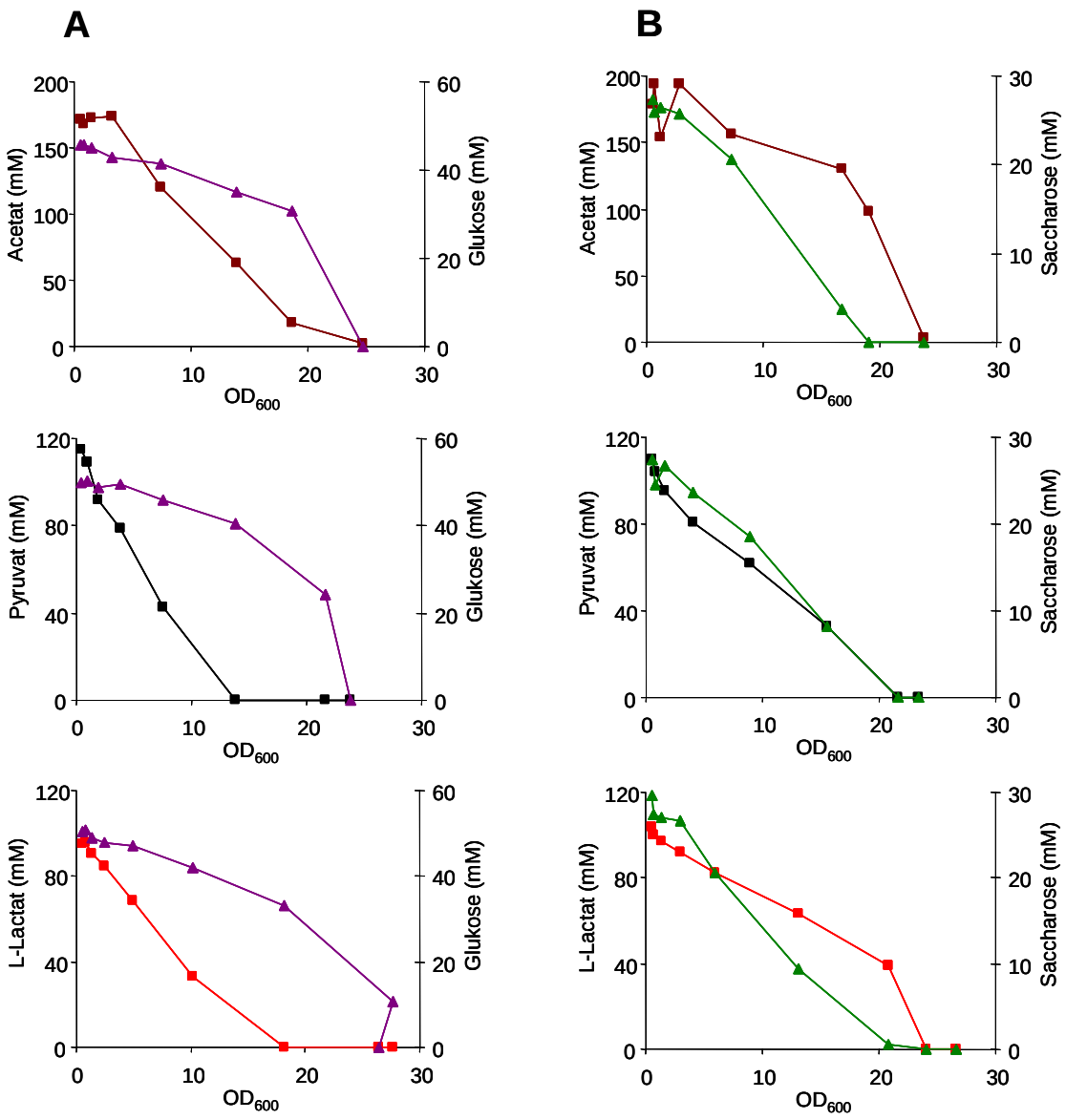

Abbildung 8: Auftragung der im Medium verbliebenen Kohlenstoffquellen gegen der optischen Dichte zur Probenentnahme bei Wachstum von A: *C. glutamicum* WT auf 50 mM Glukose (▲) + 200 mM Acetat (■), 50 mM Glukose (▲) + 100 mM Pyruvat (■) und 50 mM Glukose (▲) + 100 mM L-Lactat (■) und B: *C. glutamicum* WT auf 25 mM Saccharose (▲) + 200 mM Acetat (■), 25 mM Saccharose (▲) + 100 mM Pyruvat (■) und 25 mM Saccharose (▲) + 100 mM L-Lactat (■).

Saccharose wurde sowohl mit Acetat als auch Pyruvat und L-Lactat coverstoffwechselt (Abbildung 8B). Die Verbrauchsrate von Saccharose im Substratgemisch war ähnlich mit der beim Wachstum auf Saccharose als einziger Kohlenstoffquelle und wurde somit durch die Anwesenheit der organischen Säuren nicht inhibiert. Die Verwertung von Acetat und L-Lactat wurde leicht inhibiert, so lange noch Saccharose im Medium war (Abbildung 8B). Bei einer OD_{600} von 18-20 steigerte sich die Aufnahmerate, wenn Saccharose vollständig verbraucht war. Pyruvat dagegen wurde auch in Anwesenheit von Saccharose mit einer konstanten

Rate verbraucht. Die Wachstumsraten sind auch hier beim Wachstum auf Mischsubstrat mit 0,44 h^{-1} auf Saccharose und Acetat, 0,44 h^{-1} auf Saccharose und Pyruvat und 0,37 h^{-1} auf Saccharose und L-Lactat höher als beim Wachstum auf Saccharose als einziger Kohlenstoffquelle (μ = 0,35 h^{-1}).

Die Experimente zeigten, dass die Verwertung von Glukose durch die Anwesenheit der getesteten organischen Säuren stark inhibiert wurde, während die Verwertung von Saccharose nicht beeinflusst wurde. In allen getesteten Substratkombinationen wurden beide angebotenen Kohlenstoffquellen coverstoffwechselt. Offenbar wird die Glukoseverwertung auf noch unbekannte Weise genetisch oder auf Aktivitätsebene reguliert, während die Verwertung von Saccharose durch Anwesenheit der getesteten organsichen Säuren unbeeinflusst bleibt.

6.2 Kultivierung *C. glutamicum* WT auf Minimalmedium mit Fruktose + Acetat/Pyruvat/L-Lactat

Für dieses Experiment wurde der *C. glutamicum* Wildtyp in Minimalmedium auf einem Substratgemisch aus Fruktose und einer organischen Säure (Abbildung 9) kultiviert und die im Medium bestimmten Substratkonzentrationen während des Wachstums gegen die OD_{600} zum Zeitpunkt der Probenentnahme aufgetragen. Die Wachstumsraten waren im Substratgemisch mit 0,49 h^{-1} auf Fruktose + Acetat, 0,42 h^{-1} auf Fruktose und Pyruvat und 0,36 h^{-1} auf Fruktose + L-Lactat höher als beim Wachstum auf Fruktose als einziger Kohlenstoffquelle (μ = 0,33 h^{-1}). Fruktose und Acetat sowie Fruktose und Pyruvat wurden coverstoffwechselt (Abbildung 9A, B), wobei die Fruktoseverbrauchsrate ca. 420 nMol C / [mg DW * min] betrug. Dieser Wert ist der Verbrauchsrate auf Fruktose als einziger Kohlenstoffquelle (486 nMol C / [mg DW * min]) ähnlich. Beim Wachstum auf Fruktose + L-Lactat zeigte sich jedoch, dass mehr als 80% des L-Lactats im Medium verblieb, bis Fruktose bei einer OD_{600} von ca. 17 vollständig konsumiert wurde (Abbildung 9C). Erst dann wird L-Lactat bei einer geringeren Wachstumsrate konstant verbraucht. Die Verstoffwechslung von Fruktose vor L-Lactat konnte auch im Gemisch 20 mM und 80 mM Fruktose mit 100 mM L-Lactat beobachtet werden. Auch in diesen Fällen wurde L-Lactat erst verstoffwechselt, wenn die Fruktose vollständig konsumiert wurde (Daten nicht gezeigt). Es handelt sich hierbei um das dritte bekannte Beispiel für ein diauxisches

Wachstums in *C. glutamicum*, bei dem Fruktose sequentiell vor L-Lactat verstoffwechselt wird.

.

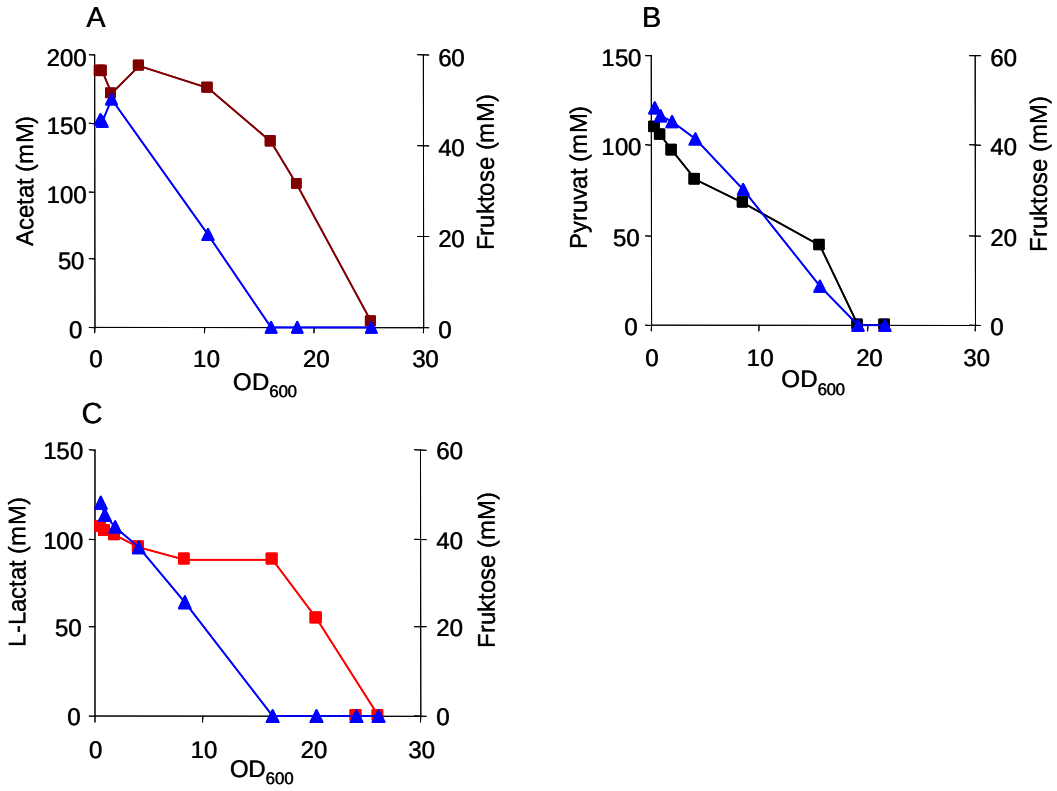

Abbildung 9: Bestimmung der im Medium verbliebenen Kohlenstoffquellen von *C. glutamicum* WT auf 50 mM Fruktose (▲) + 200 mM Acetat (■) (A), 50 mM Fruktose (▲) + 100 mM Pyruvat (■) (B) und 50 mM Fruktose (▲) + 100 mM L-Lactat (■) (C). Die Meßwerte sind über der korrespondierenden OD_{600} zum Zeitpunkt der Probenentnahme aufgetragen.

7 Identifizierung von Regulatoren der Gene für Enzyme der L-Lactatverwertung

Die sequentielle Verstoffwechslung von Fruktose vor L-Lactat deutet darauf hin, dass es eine fruktosespezifische Regulation der Verwertung von L-Lactat geben könnte. Das *NCgl2816/lldD*-Operon kodiert für einen putativen Transporter und die quinonabhängige L-Lactat Dedydrogenase und ist essentiell für die Verwertung von L-Lactat (Stansen *et al.*, 2005). Es sollte mittels Affinitätschromatographie versucht werden, Regulatoren dieses Operons zu isolieren. Hierfür wurde ein 331 bp großes PCR-Fragment (Position -251 bis +80 bezüglich des Translationsstarts des

NCgl2816-lldD-Operons) mit biotinylierten Primern amplifiziert und an Streptavidin-beschichtete paramagnetische Beads gekoppelt (Abbildung 10).

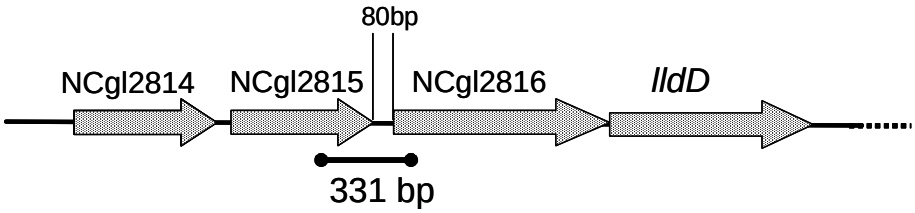

Abbildung 10: Genetische Organisation der zur Verwertung von L-Lactat essentiellen Gene. Der schwarze Balken repräsentiert das 331 bp lange DNA-Fragment, das für die Affinitätschromatographie eingesetzt wurde. Es um fasst 80 bp des N-terminalen Bereiches von NCgl2816, 80 bp des intergenen Bereichs zwischen NCgl 2815 und NCgl2816 und 171 bp des C-terminalen Bereichs des Gens für das hypothetische Protein NCgl2815.

Diese wurden dann mit Proteinrohextrakten von *C. glutamicum*, die auf Pyruvat oder L-Lactat gewachsen waren, inkubiert und gewaschen. Anschließend wurden die Proteine, die an die Promotor DNA von *NCgl2816-lldD* gebunden haben, mit 2 M NaCl eluiert und über SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 11).

Neben einigen sequenzunspezifisch bindenen Proteinen und dem Regulator RamA (Cramer *et al.*, 2006) wurde beim Wachstum auf L-Lactat aber nicht auf Pyruvat das Protein NCgl2814 als an die Promotorregion des *NCgl2816-lldD*-Operon bindendes Protein identifiziert. Dieser Befund konnte in einem unabhängigen Experiment reproduziert werden (Daten nicht gezeigt). NCgl2814 besteht der DNA-Sequenz (Kalinowski *et al.*, 2003) nach aus 231 Aminosäuren, hat ein Molekulargewicht von 25,1 kDa (Kalinowski *et al.*, 2003) und ist in *C. glutamicum* bislang nicht näher charakterisiert. NCgl2814 ist als Regulator annotiert und Mitglied der GntR-Familie (Kalinowski *et al.*, 2003). In *C. efficiens* gibt es ein Homolog mit einer Aminosäureidentität von 79%. NCgl2814 hat 29% Aminosäureidentität zu GlcC aus *E. coli*, was als Aktivator von Genen für Proteine zur Glykolatverwertung in *E. coli* fungiert (Pellicer *et al.*, 1996).

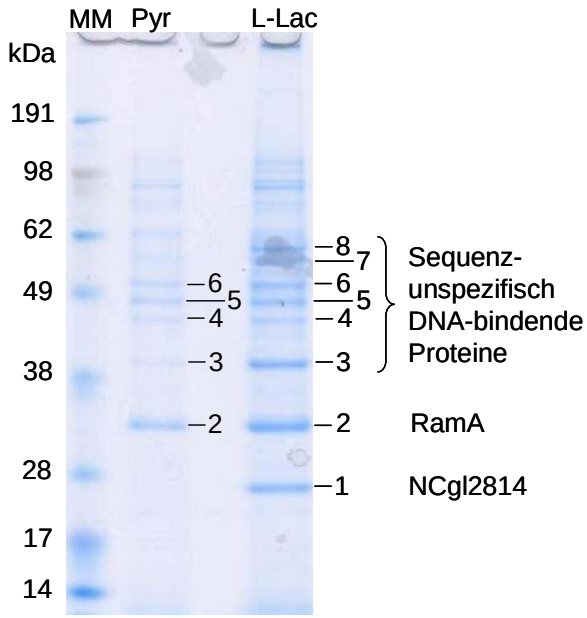

Abbildung 11: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel von Proteinen, die über DNA-Affinitäts-chromatographie mit der Promotorregion des *NCgl2816-lldD*-Operons angereichert wurden. Es wurden Rohextrakte von *C. glutamicum* nach Wachstum auf Pyruvat (Pyr) und nach Wachstum auf L-Lactat (L-Lac) verwendet. Numerierte Banden wurden ausgeschnitten und mittels MALDI ToF-Analyse untersucht. 1: NCgl2814, 2: RamA, 3: Untereinheit einer TypII Restriktions-endonuklease (NCgl1704), 4: nicht identifizierbar, 5: Untereinheit der DNA-Polymerase I (NCgl1299), 6: nicht identifizierbar, 7: nicht identifizierbar, 8: Untereinheit einer TypII Restriktionsendonuklease (NCgl1705). MM: Molekulargewichtsmarker.

Bei Betrachtung von Abbildung 10 fällt auf, dass das Gen für NCgl2814 in unmittelbarer Nähe zum Promotorbereich des *NCgl2816-lldD*-Operons im Genom von *C. glutamicum* lokalisiert ist. Dies verstärkt die Vermutung, dass NCgl2814 an der Regulation der L-Lactatverwertung beteiligt sein könnte, da Regulatoren oft in unmittelbarer Nähe ihres Genlocus wirken.

7.1 Heterologe Expression und Aufreinigung von NCgl2814

Um den putativen Regulator NCgl2814 näher charakterisieren zu können, sollte das Protein aufgereinigt werden. Dafür wurde das entsprechende Gen aus genomischer DNA des *C. glutamicum* Wildtyps mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pET-16b kloniert, woraus das Plasmid pET-16b-*NCgl2814* resultierte. Das Plasmid erlaubt die Überproduktion von NCgl2814 mit einem N-terminalen His-Tag und besitzt eine Schnittstelle für Faktor Xa zur Entfernung des His-Tags. NCgl2814 wurde in *E. coli* Bl21(DE3) mit diesem Plasmid überexprimiert und es konnte gezeigt werden, dass nach Induktion eine zusätzliche Bande auftaucht, die die erwartete Größe von ca.

28 kDa aufweist (Abbildung 12, Spur 2). Nach Aufreinigung mittels Ni-Chelat-Chromatographie lag NCgl2814^{His} in nahezu reiner Form vor (Abbildung 12, Spur 3), wogegen nach Abspaltung des His-Tags leichte Verunreinigungen zu sehen waren (Abbildung 12, Spur 4). Diese kommen vermutlich durch eine unvollständige Entfernung des Enzyms Faktor Xa und dem abgeschnittenen His-Tag zustande.

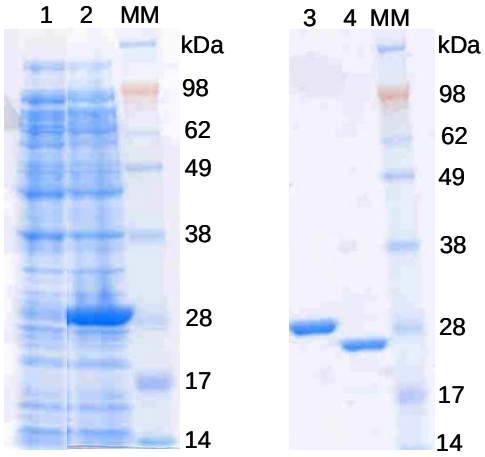

Abbildung 12: SDS-Polyacrylamidgele zum Nachweis von NCgl2814 im Rohextrakt vor Induktion (Spur 1), im Rohextrakt 4h nach Induktion mit 1 mM IPTG (Spur 2), aufgereinigtem Protein mit His-Tag (Spur 3), aufgereinigtem Protein nach Abspaltung des His-Tags (Spur 4) und Molekulargewichtsmarker (MM).

7.2 Untersuchungen zur Bindung von NCgl2814 an den NCgl2816-*lldD*-Promotor

Die Bindung von NCgl2814 an die Promotorregion des *NCgl2816-lldD*-Operons konnte mittels DNA-Affinitätschromatographie gezeigt werden (Abbildung 11). Dieses Ergbnis sollte *in vitro* mittels Retardierungsgelelektrophorese bestätigt werden. Dazu wurde aufgereinigtes NCgl2814-Protein mit und ohne His-Tag in verschiedenen Konzentrationen mit dem 331 bp Promotorfragment (Abbildung 10), und einem Fragment, an das NCgl2814 nicht bindet, inkubiert und anschließend auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt, so dass anhand der Retardierung der DNA-Fragmente eine Bindung von NCgl2814 gezeigt werden sollte. In Abbildung 13 sieht man in der ersten Spur die DNA-Fragmente ohne Protein (-). Bereits bei 10-fachem molaren Überschuss von NCgl2814 mit und ohne His-Tag (entspricht 0,24 µM) wurde das Promotorfragment vollständig retardiert. Bei 50-fachem Überschuss wird der Protein-

DNA-Komplex noch stärker retardiert. Ab 100-fachem molarem Überschuss von NCgl2814 wurde auch das Kontrollfragment retardiert, was auf eine unspezifische Bindung aufgrund der hohen Proteinkonzentrationen hindeutet.

Es zeigte sich, dass NCgl2814 sowohl mit als auch ohne His-Tag *in vitro* in der Lage ist, an das Promotorfragment des *NCgl2816-lldD*-Operons zu binden. Eine weitere Titration der Proteinmenge ergab, dass NCgl2814 ab einem 6-fachen molaren Überschuss einen Protein-DNA-Komplex mit dem *NCgl2816-lldD*-Promotorfragmentes ausbildet (Daten nicht gezeigt). Für weitere Experimente wurde Protein mit His-Tag eingesetzt, da NCgl2814^{His} und NCgl2814 gleich an den *NCgl2814-lldD*-Promotor gebunden haben aber nach Verdau mit Faktor Xa der abgeschnittene His-Tag und das Enzym Faktor Xa nicht vollständig entfernt werden konnten (Abbildung 12).

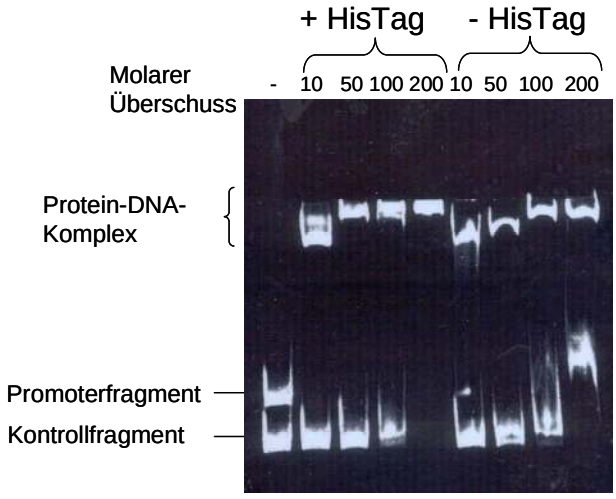

Abbildung 13: Gelretardierungsexperiment mit NCgl2814 und 100 ng des 331 bp Promotorfragmentes des *NCgl2816-lldD*-Operons. SyBr-Green gefärbtes 10% (w/v) Polyacrylamidgel. Es wurde NCgl2814 mit und ohne His-Tag in 10-, 50-, 100-, und 200-fachem molaren Überschuss eingesetzt, wobei ein 10-facher molarer Überschuss einer Proteinkonzentration von 0,24 µM entsprach. Als Kontrollfragment wurden 100 ng eines 175 bp langen Promotorfragmentes von NCgl0430 eingesetzt.

7.3 Bestimmung der Bindestelle von NCgl2814 an den *NCgl2816-lldD*-Promotor

Nachdem die Bindung von NCgl2814 an den *NCgl2816-lldD*-Promotor sowohl mittels DNA-Affinitätschromatographie als auch mit Gelretardierung nachgewiesen werden konnte, sollte die Bindestelle im Folgenden näher eingegrenzt werden. Dafür wurden, basierend auf dem 331 bp großen Fragment, das bei der DNA-Affinitäts-chromatographie eingesetzt wurde (F0), die teilweise überlappenden jeweils ca. 110 bp langen Subfragmente F1-F5 mittels PCR hergestellt (Abbildung 14A). Anhand von Gelretardierungsexperimenten sollte überprüft werden, an welche dieser Subfragmente NCgl2814 bindet. Es zeigte sich, dass NCgl2814 bei Inkubation mit einer Negativkontrolle nur an die Subfragmente F3 und F4 bindet (Abbildung 14B: F3, F4 + 0430), wogegen die anderen Fragmente keine Retardierungsbande aufwiesen. Inkubiert man die Subfragmente mit dem Fragment F0 zusammen so zeigte sich erwartungsgemäß ein NCgl2814-F0-Komplex. Zusätzlich konnten die Subfragmente F3 und F4 aber mit F0 kompetitieren, so dass neben demNCgl2814-F0-Komplex ein NCgl2814-F3- bzw. NCgl2814-F4-Komplex zu sehen ist. Die leicht unterschiedliche Laufhöhe von F3 und F4 könnte durch topologische Effekte nach Bindung von NCgl2814 entstehen (V. Wendisch, persönliche Mitteilung). Da die Subfragmente F3 und F4 überlappend sind, ist anzunehmen, dass die tatsächlich Bindestelle von NCgl2814 in der überlappenden Sequenz der beiden Subfragmente liegt. Damit konnte die Bindestelle von NCgl2814 am *NCgl2816-lldD*-Promotor auf ein 55 bp umfassenden Bereich eingegrenzt werden.

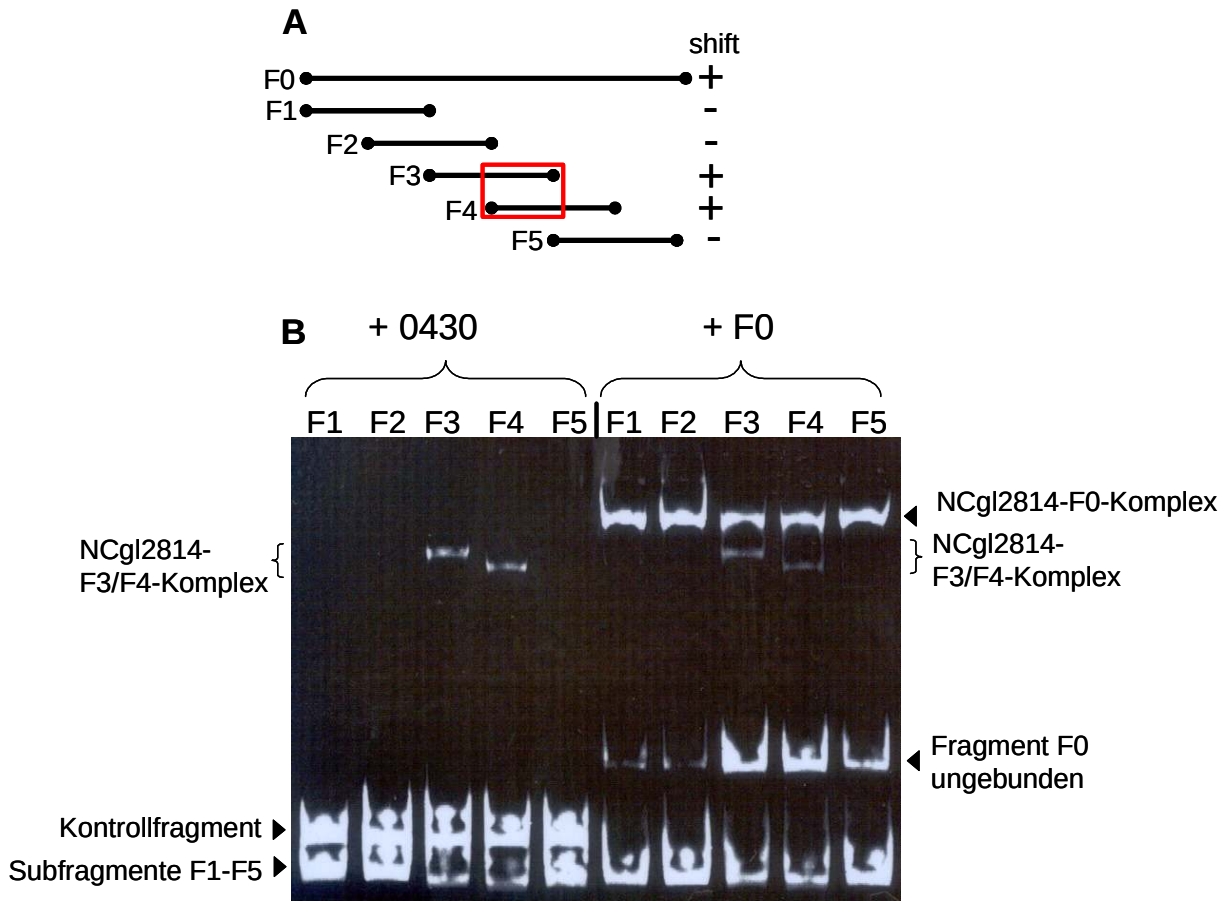

Abbildung 14: A: Anordnung der Fragmente F0-F5 zur Eingrenzung der Bindestelle von NCgl2814 am *NCgl2816-lldD*-Promotor. F0 ist das 331 bp Fragment, welches in der DNA-Affinitätschromatographie eingesetzt wurde. F1-F5 stellen überlappende ca. 110 bp lange Subfragmente dar. Shift gibt an, ob das DNA-Fragment von NCgl2814 retardiert wurde (+) oder nicht (-). Die rote Box beschreibt den Bereich, der anhand der Retardierungsexperimente als Bindestelle von NCgl2814 eingegrenzt werden konnte.
B: SyBr-green gefärbtes 10% (w/v) Polyacrylamidgel eines Retardierungsexperimentes zur Eingrenzung der Bindestelle von NCgl2814 an den *NCgl2816-lldD*-Promotor. In den linken 5 Spuren wurden die Subfragmente F1-F5 mit dem Promotorkontrollfragment von NCgl0430 zusammen mit NCgl2814 mit His-Tag (0,48 µM) inkubiert. In den rechten 5 Spuren wurden die Subfragmente F1-F5 mit dem Fragment F0 zusammen mit NCgl2814 mit His-Tag (0,48 µM) inkubiert.

7.4 Suche nach einem Effektor von NCgl2814

Viele DNA-bindende Proteine können durch ein Effektormolekül in ihrer Bindeaktivität moduliert werden. Das bekannteste Beispiel dafür ist der Lac-Repressor in *E. coli*, dessen Bindung an den Promotor durch Lactose inhibiert wird (Ohshima *et al.*, 1974). Es stellte sich die Frage, ob die Bindung von NCgl2814 durch ein bestimmtes Effektormolekül beeinflusst werden konnte. Zur Beantwortung dieser Frage wurden

Retardierungsexperimente durchgeführt, bei denen aufgereinigtes NCgl2814 mit His-Tag zuvor mit verschiedenen Metaboliten des Zentralstoffwechsels inkubiert wurde. Es sollte untersucht werden, ob die Zugabe eines dieser Metabolite die Bindung von NCgl2814 positiv oder negativ beeinflusst.

In Abbildung 15A sieht man, dass Glukose-6-P, Fruktose-6-P, Fruktose-1,6-P_2, Pyruvat und AcetylCoenzymA keinen Einfluss auf die Bindung von NCgl2814 haben. Das Retardationsmuster ist nahezu identisch mit der Positivkontrolle (Abbildung 15A (+)). Nach Zugabe von Phosphoenolpyruvat (PEP) ist kein Protein-DNA-Komplex mehr zu sehen. Dies liess zunächst darauf schließen, dass PEP die Bindung von NCgl2814 inhibieren könnte.

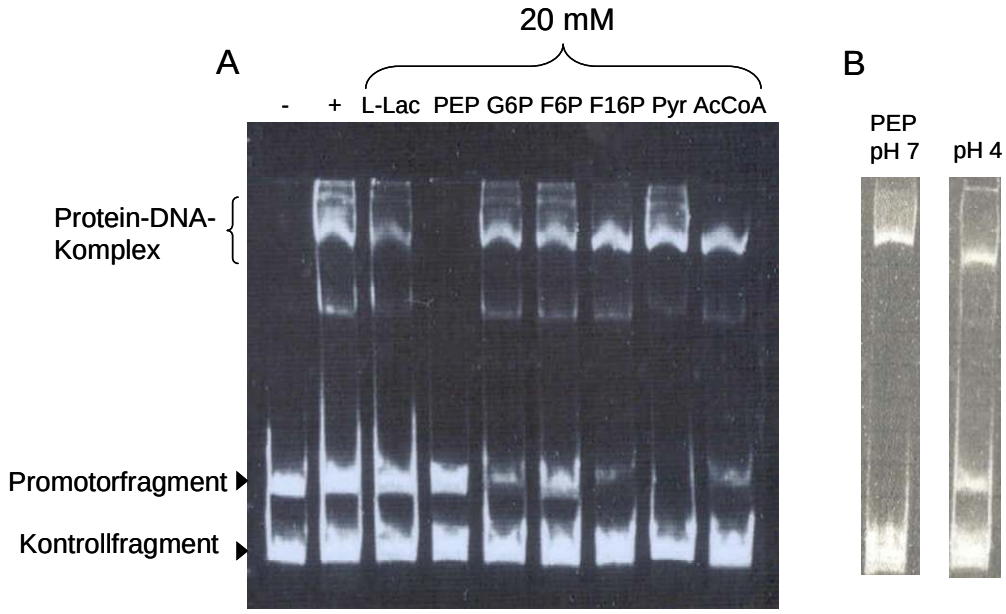

Abbildung 15: : SyBr-Green gefärbtes 10% (w/v) Polyacrylamidgel eines Retardierungs-experimentes mit NCgl2814 (0,48 µM) nach Inkubation mit verschiedenen putativen Effektoren und der Promotorregion des *NCgl2816-lldD*-Operons. A: Vor Zugabe der DNA wurde NCgl2814 mit jeweils 20 mM L-Lactat (L-Lac), Phosphoenolpyruvat (PEP), Glukose-6-Phosphat (G6P), Fruktose-6-Phosphat (F6P), Fruktose-1,6-Bisphosphat (F16P), Pyruvat (Pyr) oder AcetylCoenzymA (AcCoA) inkubiert. Es wurde zusätzlich eine Negativkontrolle ohne Protein aufgetragen (-) und eine Positivkontrolle ohne Effektor (+). B: Vor Zugabe der DNA wurde NCgl2814 mit 20 mM PEP, das auf pH 7.0 titriert wurde, inkubiert (links). Inkubation ohne Effektor bei pH 4 (rechts).

Es zeigte sich jedoch, dass es sich dabei um einen pH-Effekt handelt, da die Zugabe von PEP den pH-Wert von 7 auf ca. 4 senkte. Wurde PEP vor Zugabe auf pH 7,0 titriert, so wurde das *NCgl2816-lldD*-Promotorfragment vollständig von NCgl2814 retardiert, wogegen die Bindung von NCgl2814 ohne Effektor bei pH 4 inhibiert wurde (Abbildung 15B). Auch wenn bei pH 4 die Bindung nicht vollständig inhibiert

wurde, kann man davon ausgehen, dass PEP die Bindung von NCgl2814 nicht beeinflusst. Möglicherweise war die pH-Messung mit pH-Papier ungenau und Zugabe von PEP führte zu einem geringeren pH-Wert als 4.

In Abbildung 15A sieht man ferner, dass die Zugabe von 20 mM L-Lactat die Bindung von NCgl2814 inhibiert, da die Protein-DNA-Komplex-Bande schwächer ist als in der Positivkontrolle.

In einem weiteren Retardationsexperiment zeigte sich, dass die Zugabe von auf pH 7,0 tiriertem L-Lactat ab einer Konzentration von 10 mM die Bindung von NCgl2814 inhibiert. Dieser Effekt verstärkt sich mit steigenden L-Lactatkonzentrationen bis 40 mM (Abbildung 16). Während in der Positivkontrolle das Promotorfragment nahezu vollständig retardiert wurde, bleibt durch Zugabe von 40 mM L-Lactat der größte Anteil des Fragmentes unretardiert. Die Zugabe von bis zu 40 mM D-Lactat hatte dagegen keinen Einfluss auf die Bindung, so dass man schlussfolgern kann, dass L-Lactat spezifisch die Bindung von NCgl2814 am *NCgl2816-lldD*-Promotor inhibiert. In dem durch ungerichtete Mutagenese entstandenen Stamm *C. glutamicum* ATCC17965 wurden bei Wachstum auf Glukose und Fruktose intrazelluläre L-Lactatkonzentrationen von 32-39 mM gemessen (Pequignot *et al.*, 1997). Somit sind die gemessenen Konzentrationen, bei denen L-Lactat die Bindung von NCgl2814 inhibiert in *C. glutamicum* ATCC13032 sehr wahrscheinlich im physiologischen Bereich.

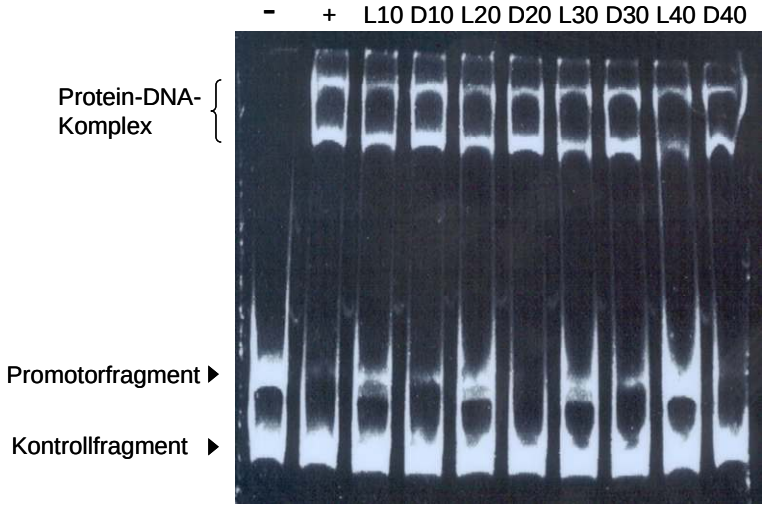

Abbildung 16: SyBr-Green gefärbtes 10% (w/v) Polyacrylamidgel eines Retardationsexperimentes mit NCgl2814 (0,48 µM) nach Inkubation mit 10, 20, 30 und 40 mM L-Lactat und 10, 20, 30 und 40 mM D-Lactat der Promotorregion des *NCgl2816-lldD*-Operons- Zusätzlich ist eine Negativkontrolle ohne Protein (-) und eine Positivkontrolle ohne Effektor aufgetragen (+).

8 Einfluss der *NCgl2814*-Deletion und *NCgl2814*-Überexpression in *C. glutamicum*

Um die Funktion von NCgl2814 im Stoffwechsel und auf genetischer Ebene näher untersuchen zu können, wurde das Gen sowohl deletiert als auch homolog überexprimiert. Es wurde eine *in-frame*-Deletionsmutante erzeugt, bei der die Codons 7-214 deletiert wurden, woraus der Stamm (WT∆*NCgl2814*) resultierte. Die chromosomale Struktur der Mutante wurde mittels Kolonie-PCR mit dem Primerpaar 310-0/310-1 überprüft. Die PCR-Produkte hatten die für den Wildtyp (1,56 kb) und die ∆NCgl2814-Mutante (0,93 kb) erwarteten Größen (Abbildung 17).

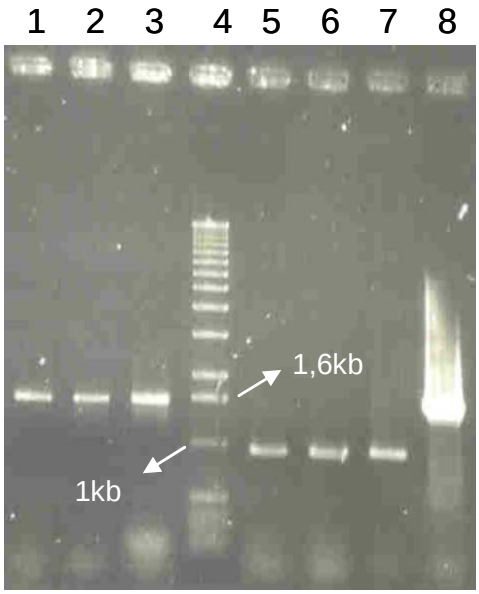

Abbildung 17: Agarosegel von Proben einer Kolonie-PCR von *C. glutamicum* WT (Spur 1-3) und von WT∆*NCgl2814* (Spur 4-6). Die erwarteten Fragmentlängen betragen 1566 bp für den Wildtyp und 928 bp für die *NCgl2814*-Deletionsmutante. Spur 8 zeigt eine Probe mit präparierter genomischer DNA aus dem Wildtyp.

Zur homologen Überexpression von NCgl2814 wurde das entsprechende Gen mit dem Primerpaar 310-for/310-rev mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pVWEx1 kloniert, woraus das Plasmid pVWEx1-*NCgl2814* resultierte. Das konstruierte Plasmid wurde anschließend in den Wildtyp und in die *NCgl2814*-Deletionsmutante transformiert.

Es wurde überprüft, ob die Deletion oder die Überexpression von NCgl2814 einen Einfluss auf das Wachstum in Minimalmedium mit verschiedenen Kohlenstoffquellen hat. Dafür wurden die Stämme WT(pVWEx1), WT∆*NCgl2814*(pVWEx1) und

WTΔ*NCgl2814*(pVWEx1-*NCgl2814*) auf 200 mM Glukose, 100 mM Pyruvat und 200 mM L-Lactat kultiviert und die Biomassebildung gemessen.

Auf Glukose zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Stämmen, alle erreichten die gleiche End-OD_{600} und wiesen nahezu identische Wachstumsraten auf (μ = 0,29 - 0,33 h^{-1}) (Abbildung 18A). Auf 200 mM L-Lactat wuchsen Wildtyp und Deletionsmutante mit gleicher Wachstumsrate (μ = 0,10 - 0,12 h^{-1}) zur gleichen End-OD_{600}. Der Überproduzent von NCgl2814 hingegen zeigte einen massiven Wachstumsdefekt (μ <= 0,04 h^{-1}) und erreichte auch nach 80 h Inkubation nur die Hälfte der Biomasse im Vergleich zu den anderen Stämmen. Dieser massive Wachstumsdefekt, der spezifisch auf L-Lactat als einziger Kohlenstoffquelle auftrat, deutete darauf hin, dass NCgl2814 als Repressor der L-Lactat-verwertenden Gene fungiert.

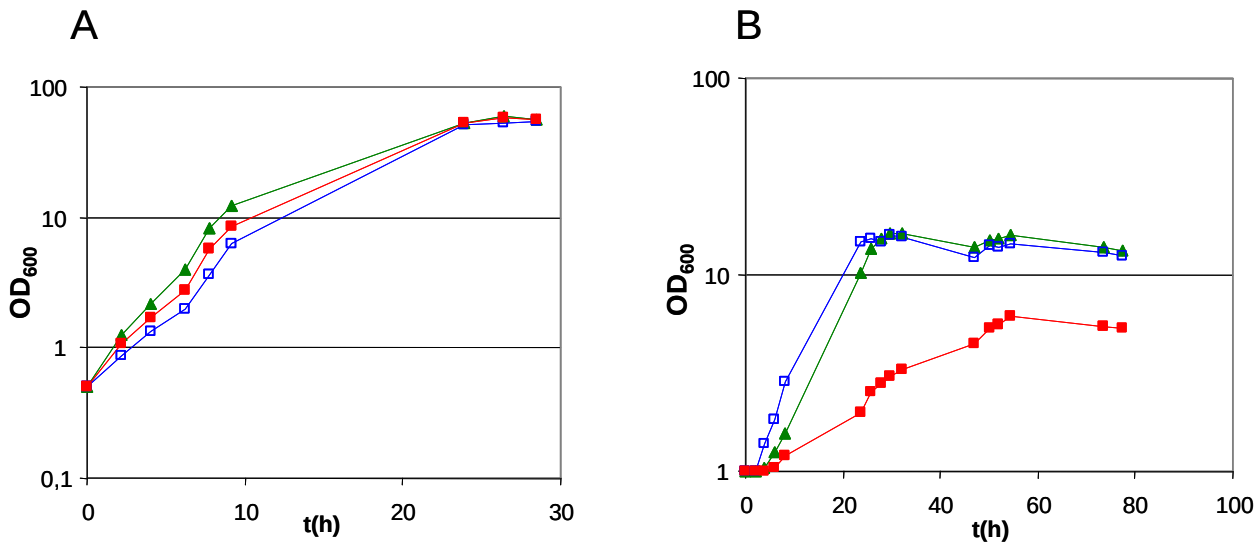

Abbildung 18: Wachstum der *C. glutamicum* Stämme WT(pVWEx1) (▲), WTΔ*NCgl2814*(pVWEx1) (□) und WTΔ*NCgl2814*(pVWEx1-*NCgl2814*) (■) auf CgXII-Minimalmedium mit 200 mM Glucose (A) und 200 mM L-Lactat (B)

Die quinonabhängigen L-Lactat-Dehydrogenase (*lldD*) ist essentiell für das Wachstum auf L-Lactat als einziger Kohlenstoffquelle (Stansen *et al.*, 2005). Da NCgl2814 an den Promotorbereich von *lldD* bindet, sollte nun überprüft werden, ob die Deletion oder Überexpression von NCgl2814 die Enzymaktivität von LldD beeinflusst. Hierfür wurden die Stämme WT(pVWEx1), WTΔ*NCgl2814*(pVWEx1) und WTΔ*NCgl2814*(pVWEx1-*NCgl2814*) auf verschiedenen Kohlenstoffquellen kultiviert und bei einer OD_{600} von 6-10 zur Bestimmung der LldD-Aktivität geerntet.

Wie für einen Repressor erwartet, zeigte sich, dass bei Überexpression von *NCgl2814* im Stamm WT∆*NCgl2814*(pVWEx1-*NCgl2814*) nahezu keine LldD-Aktivität nachzuweisen war (Tabelle 14). Auf L-Lactat konnte keine Aktivität gemessen werden, da die in diesem Experiment im Gegensatz zum Wachstumsexperiment die Zellen nicht gewachsen sind. Im Wildtyp mit Leerplasmid ist die Aktivität auf L-lactathaltigen Medien mindestens 0,08 µmol min^{-1} mg^{-1} während in Medien ohne L-Lactat maximal 0,02 µmol min^{-1} mg^{-1} erreicht wurden. In der Deletionsmutante war in Anwesenheit von L-Lactat eine leicht geringere Aktivität zum Wildtyp zu beobachten. In Medien ohne L-Lactat führte die *NCgl2814*-Deletion zu einer Derepression des *NCgl2816-lldD*-Operons, was sich in einer 3-20-fachen Steigerung der LldD-Aktivität zeigte. Dabei ist auffällig, dass die Steigerung der LldD-Aktivität in der Deletionsmutante auf Fruktose mit einem Faktor von 3 am geringsten ausfällt. Genauso zeigt sich Fruktose + L-Lactat, dass die Akivität geringer ist im Vergleich zum Wachstum auf L-Lactat oder Glukose + L-Lactat.

Tabelle 14: Spezifische Aktivitäten der quninonabhängigen L-Lactat-Dehydrogenase in den *C glutamicum* Stämmen WT(pVWEx1), WT∆*NCgl2814*(pVWEx1) and WT∆*NCgl2814*(pVWEx1-*NCgl2814*) nach Wachstum auf 200 mM L-Lactat, 50 mM Glukose + 100 mM L-Lactat, 50 mM Fruktose + 100 mM L-Lactat, 100 mM Glukose, 100 mM Fruktose, 200 mM Pyruvat, 200 mM Acetat und 100 mM Ribose.

	Spezifische Aktivität der quinonabhängigen L-Lactat-Dehydrogenase (µmol min^{-1} mg^{-1})		
C-Quelle / Stamm	WT13032 (pVWEx1)	WT∆*NCgl2814* (pVWEx1)	WT∆*NCgl2814* (pVWEx1-*NCgl2814*)
L-Lactat	0,13	0,08	n.d.
Glukose + L-Lactat	0,15	0,12	0,01
Fruktose + L-Lactat	0,08	0,07	0,01
Glukose	0,01	0,13	0,01
Fruktose	0,02	0,06	<0,01
Pyruvat	0,01	0,10	0,01
Acetat	0,01	0,16	<0,01
Ribose	0,02	0,14	<0,01

Die Daten sind Mittelwerte aus mindestens 2 unabhängigen Bestimmungen mit Fehlern <15%

Anhand der Retardierungsexperimente wurde vermutet, dass NCgl2814 als Repressor der Gene der L-lactatverwertenden Enzyme agiert. Die nun gewonnenen *in vivo*-Daten bestätigen diese Hypothese, da die Überexpression von NCgl2814 das Wachstum auf L-Lactat und die LldD-Aktivität beim Wachstum auf allen getesteten

Kohlenstoffquellen extrem herabsetzt. Im Gegensatz dazu führt die Deletion von NCgl2814 zu einer sehr deutlichen Steigerung der Aktivität in Abwesenheit von L-Lactat. Die Tatsache, dass die Deletion von NCgl2814 in Anwesenheit von L-Lactat kaum Auswirkungen hat, ist ein Indiz dafür, dass NCgl2814 in Anwesenheit von L-Lactat nicht aktiv ist.

8.1 Einfluss von NCgl2814 auf die globale Genexpression in *C. glutamicum*

Die bisherigen Experimente konnten zeigen, dass NCgl2814 an die Promotorregion des *NCgl2816-lldD*-Operons bindet und dadurch dessen Expression reprimiert wird. Es stellte sich die Frage, ob NCgl2814 auch an der Regulation weiterer Gene beteiligt ist. Zur Beantwortung dieser Frage wurden Transkriptomanalysen durchgeführt, bei denen die relativen mRNA-Spiegel aller Gene des Wildtyps mit der Deletionsmutante bzw. dem Überproduzenten von NCgl2814 mittels DNA-Chip-Analysen verglichen wurde. In Abwesenheit von NCgl2814 zeigten nur drei Gene ein signifikant mehr als dreifach verändertes mRNA-Level (Tabelle 15). Die beiden Gene des *NCgl2816-lldD*-Operons zeigten 8,8-fach und 6,8-fach erhöhte mRNA-Spiegel und ein Gen für eine Untereinheit einer putativen Membranprotease (NCgl2737), welches einen knapp vierfach verringerten mRNA-Spiegel aufwies.

Nach Überexpression des *NCgl2814*-Gens zeigten nur 4 Gene signifikant veränderte Expression. Der mRNA-Spiegel von NCgl2814 war 25-fach erhöht, was die plasmidäre Überexpression dieses Gens bestätigte. Die Gene des *NCgl2816-lldD*-Operons zeigten ungefähr 20-fach veringerte mRNA-Spiegel. Zusätzlich war noch *NCgl2737* etwa vierfach verringert exprimiert.

Die Transkriptomdaten bestätitgten erneut die reprimierende Wirkung von NCgl2814 auf das *NCgl2816-lldD*-Operon. Nach Deletion waren die mRNA-Spiegel des Operons stark erhöht, während die Überexpression zu einer drastischen Reduktion des mRNA-Spiegel führte. Neben Genen für Proteine zur L-Lactatverwertung zeigten sich jedoch bis auf NCgl2737 keine weiteren Expressionsveränderungen nach Deletion oder Überexpression von NCgl2814. Dies deutet darauf hin, dass es sich um einen lokalen Regulator handelt, der nur an der Regulation des L-Lactat-stoffwechsels beteiligt ist.

Tabelle 15: Transkriptomvergleiche zwischen *C. glutamicum* WT(pVWEx1) und WTΔ*NCgl2814*(pVWEx1) bei Wachstum auf 100 mM Ribose sowie zwischen WT(pVWEx1) und WTΔ*NCgl2814*(pVWEx1-*NCgl2814*) bei Wachstum auf 50 mM Fruktose + 100 mM L-Lactat.

NCgl[a]	BIOMAX[b]	Annotation[c]	mRNA-Verhältnis WTΔ*NCgl2814* (pVWEx1) / WT(pVWEx1)
2816	312	Putativer Transporter	8,8
2817	313	Quinonabhängige L-Lactat-Dehydrogenase *lldD*	6,8
2737	225	Putative Membranprotease-Untereinheit	0,27

NCgl[a]	BIOMAX[b]	Annotation[c]	mRNA-Verhältnis WTΔ*NCgl2814* (pVWEx1-*NCgl2814*) / WT(pVWEx1)
2814	310	Regulator des L-lactate-Metabolismus	24,9
2816	312	Putativer Transporter	0,04
2817	313	Quinonabhängige L-Lactat-Dehydrogenase *lldD*	0,09
2737	225	Putative Membranprotease-Untereinheit	0,25

Es sind Gene aufgeführt, die signifikant ($p<0,05$) mindestens dreifach veränderte relative mRNA-Spiegel aufwiesen.

[a]Nummer der Gene des Genoms von *C. glutamicum* ATCC13032 (GI58036263) in der Annotation des National Center of Biotechnology Information (NCBI)

[b]Nummern der offenen Leseraster (ORFs); alternative Gen-Numerierung nach Biomax-Annotation

[c]Annotation in Anlehnung an NCBI

* Neben den aufgeführten Genen wurde auch für *NCgl2814* in WTΔ*NCgl2814* ein 7-fach verringerter mRNA-Spiegel nachgewiesen. Dabei handelt es sich nicht um eine Expressionsveränderung, sondern spiegelt die Deletion in der *NCgl2814*-Mutante wieder.

8.2 Einfluss der Deletion von *NCgl2814* auf die sequentielle Verstoffwechslung von Fruktose vor L-Lactat

Wie gezeigt werden konnte, verwertet *C. glutamicum* Fruktose sequentiell vor L-Lactat (vgl. IV.6.2). Nachdem NCgl2814 als Repressor der für die Verwertung von L-Lactat essentiellen Gene identifiziert werden konnte, stellte sich nun die Frage, ob NCgl2814 für die sequentielle Verstoffwechslung von Fruktose vor L-Lactat verantwortlich ist. Zur Beantwortung dieser Frage wurden die Stämme *C. glutamicum* WT und WTΔ*NCgl2814* auf 50 mM Glukose + 100 mM L-Lactat und 50 mM Fruktose + 100 mM L-Lactat kultiviert und die Substratverwertung während des Wachstums gemessen.

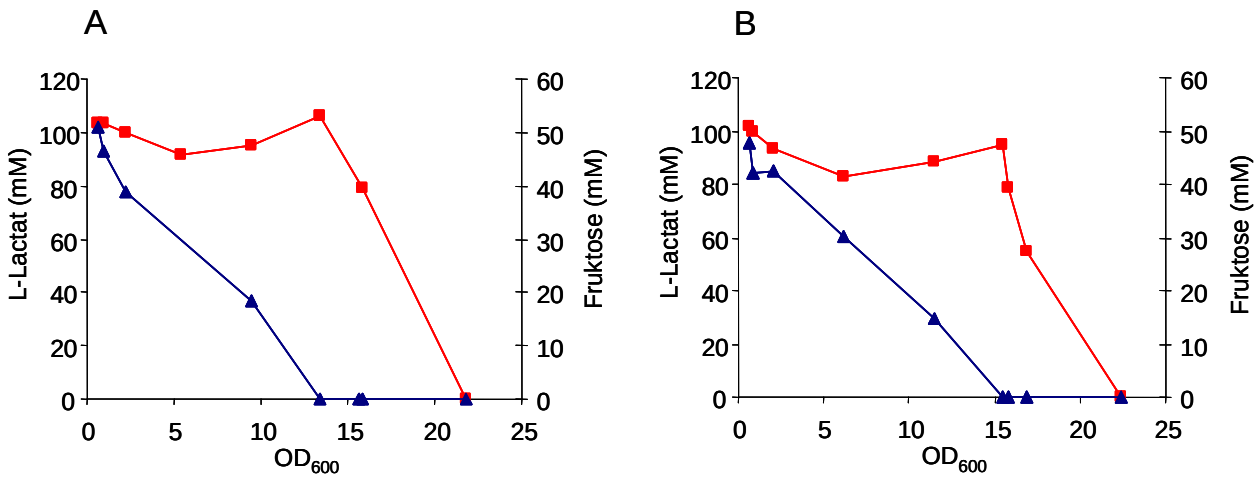

Abbildung 19: Auftragung der im Medium verbliebenen Kohlenstoffquellen gegen die optische Dichte zur Probenentnahme von *C. glutamicum* WT (A) und WTΔ*NCgl2814* (B) kultiviert auf 50 mM Fruktose (▲) und 100 mM L-Lactat (■)

Beim Wachstum auf Fruktose + L-Lactat zeigte sich kein Unterschied zwischen dem Wildtyp und der Deletionsmutante. Beide Stämme verstoffwechseln zuerst Fruktose und erst dann L-Lactat, wenn die Fruktose vollständig konsumiert wurde. Damit kann man schlussfolgern, dass NCgl2814 nicht essentiell für die sequentielle Verstoffwechslung von Fruktose vor L-Lactat ist. Beim Wachstum auf Glukose + L-Lactat zeigte sich ebenfalls kein Unterschied in der Substratverwertung zwischen Wildtyp und der Deletionsmutante WTΔ*NCgl2814* (Daten nicht gezeigt).

9 Einfluss von RamA auf die L-Lactatverwertung in *C. glutamicum*

Bei der DNA-Affinitätschromatographie konnte neben NCgl2814 mit RamA ein zweiter Regulator identifiziert werden, der an die Promotorregion des *NCgl2816-lldD*-Operons bindet (Abbildung 11). Über RamA ist bekannt, dass es als Aktivator der Gene der Acetataktivierung *pta-ack* und der Gene des Glyoxylatzyklus *aceA* und *aceB* fungiert (Cramer *et al.*, 2006). Des Weiteren ist bekannt, dass eine Deletion von *ramA* dazu führt, dass *C. glutamicum* nicht mehr auf L-Lactat als einziger Kohlenstoffquelle wachsen kann (B. Eikmanns, persönliche Mitteilung). Dies lässt vermuten, dass RamA Gene, die für das Wachstum auf L-Lactat essentiell sind, aktiviert. Darunter könnten das für die Glukoneogenese essentielle Gen für die PEP-Carboxykinase *pck* oder die Gene für Proteine zur L-Lactatverwertung fallen. Im Folgenden wurde überprüft, ob die Deletion von *ramA* einen Einfluss auf die

Substratverwertung beim Wachstum auf Glukose + L-Lactat sowie Fruktose + L-Lactat hat. Dazu wurde *C. glutamicum* WT und *C. glutamicum* RG2 (WTΔramA) (Cramer *et al.*, 2006) in Minimalmedium mit 50 mM Glukose + 100 mM L-Lactat oder 50 mM Fruktose + 100 mM L-Lactat kultiviert und die im Medium vorhandenen Substratmengen während des Wachstums bestimmt. Bei Wachstum auf Fruktose + L-Lactat zeigte die *ramA*-Deletion keinen Effekt. Sowohl im Wildtyp als auch in der Deletionsmutante erfolgte eine sequentielle Verstoffwechslung von Fruktose vor L-Lactat. Im Gegensatz zur parallelen Verstoffwechslung von Glukose und L-Lactat in *C. glutamicum* WT zeigte sich in der *ramA*-Deletionsmutante eine sequentielle Verstoffwechslung, in diesem Fall von Glukose vor L-Lactat (Abbildung 20B). Dabei wurde, nachdem Glukose vollständig konsumiert wurde, das verbliebene L-Lactat nahezu vollständig verwertet. Im Wildtyp hingegen fand, wie schon unter IV.6.1 gezeigt, eine konstante Aufnahme von L-Lactat statt, während die Glukoseverwertung stark inhibiert wurde (Abbildung 20A). Die Ergebnisse zeigten, dass RamA in Anwesenheit von Glukose offensichtlich zur Verwertung von L-Lactat benötigt wird. Möglicherweise wird die Aktivität von RamA durch ein Metabolit beeinflusst. Diese liegt eventuell beim Wachstum auf Fruktose + L-Lacat im Vergleich zu Glukose + L-Lactat in unterschiedlichen intrazellulären Konzentrationen vor. Dies könnte in Anwesenheit von Fruktose zu einer geringeren Aktivierung des *NCgl2814-lldD*-Operons führen, was zur sequentiellen Verstoffwechslung von Fruktose vor L-Lactat führen könnte.

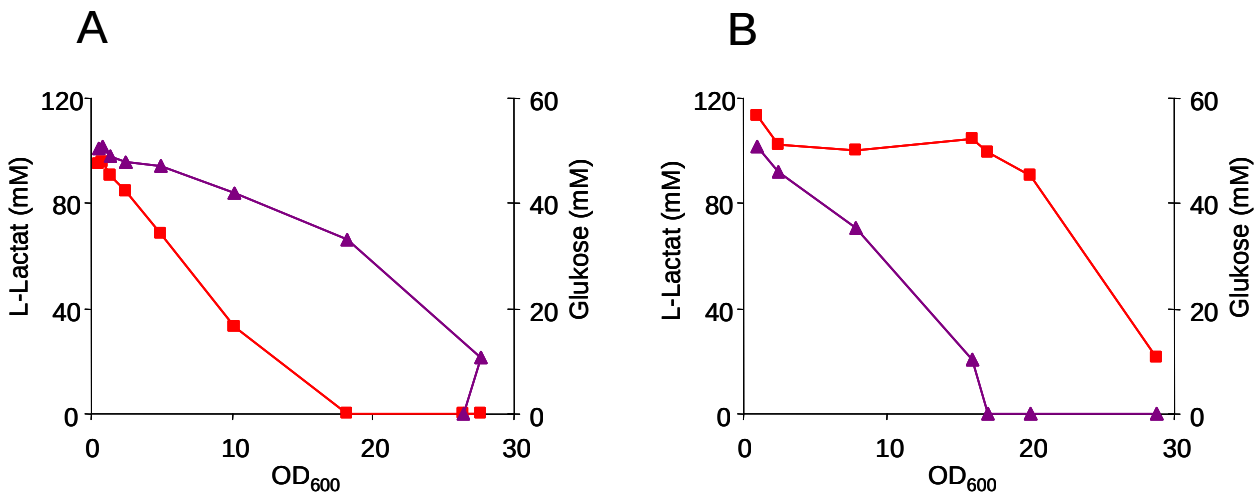

Abbildung 20: Auftragung der im Medium verbliebenen Kohlenstoffquellen gegen die optischen Dichte zur Probenentnahme bei Wachstum von *C. glutamicum* WT (A) und *C. glutamicum* RG2 (B) auf 50 mM Glukose (▲)+ 100 mM L-Lactat (■).

V Diskussion

1 Glutamat- und Lysinproduktion mit *C. glutamicum* auf verschiedenen PTS-Zuckern

Glutamat: In *C. glutamicum* wird ein Mol NADPH zur Biosynthese von einem Mol Glutamat benötigt. In der Glutamatbiosynthese werden durch das Enzym Isocitrat-Dehydrogenase die Glutamatvorstufe 2-Oxoglutarat sowie NADPH in einem äquimolaren Verhältnis bereitgestellt (Eikmanns *et al.*, 1995). Obwohl der Fluss über den Pentosephosphatweg und damit die NADPH-Regeneration auf Fruktose und Glukose/Fruktose-Gemischen geringer ist als auf Glukose (Pons *et al.*, 1996; Dominguez *et al.*, 1998; Kiefer *et al.*, 2004), konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Glutamatproduktion durch den verwendeten PTS-Zucker nicht signifikant beeinflusst wurde (Abbildung 2). Es ist davon auszugehen, dass auf allen getesteten Kohlenstoffquellen während der Glutamatproduktion der NADPH-Bedarf durch das Enzym Isocitrat-Dehydrogenase, welches unter NADPH-Bildung Isocitrat zu 2-Oxoglutarat umsetzt (Eikmanns *et al.*, 1995), gedeckt wird.

Lysin: In den Ergebnissen zur Lysinproduktion mit verschiedenen Produktionsstämmen mit den PTS-Zuckern Glukose, Fruktose und Saccharose konnte gezeigt werden, dass *C. glutamicum* DM1727 aufgrund der *pyc*-Mutation allein auf keiner der getesteten Kohlenstoffquellen Lysin ins Medium exkretierte (Tabelle 6). In Kombination mit der *lysC*-Punktmutation wurden von *C. glutamicum* DM1800 auf Glukose 70 mM Lysin exkretiert, was die herausragende Wichtigkeit der Resistenz der Aspartatkinase gegenüber der Feedback-Inhibition durch L-Lysin und L-Threonin bestätigte. Die *lysC*-Mutation ist allerdings nicht essentiell zur Lysinproduktion, da der Stamm DM1728, der die *pyc*- und *hom*-Mutationen trägt, auch mit Wildtypallel des Aspartatkinase-Gens auf Glukose 46 mM Lysin ins Medium ausscheidet. Daraus kann man schlussfolgern, dass die Feedback-Inhibition der Aspartatkinase durch L-Lysin zur Exkretion bis 46 mM L-Lysin nicht limitierend ist.
Kiefer *et al.*, (2002) zeigten, dass im durch ungerichtete Mutagenese entstandenen Produktionsstamm die Lysinausbeute auf Glukose 8% höher ist als auf Saccharose

und 30% höher als auf Fruktose. Als Gründe dafür wurden eine auf Fruktose höhere Nebenproduktbildung als auf Glukose angesehen. Diese sind die Folge einer erhöhten spezifischen CO_2-Produktionsrate auf Fruktose, woraus eine höhere Aktivität des TCA-Zyklus rückgeschlossen wurde. Damit wurde die erhöhte Bildung von durch NADH-Vebrauch gebildeten Nebenprodukten erklärt (Kiefer *et al.*, 2002). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Lysinausbeute mit *C. glutamicum* DM1730 auf Glukose um mehr als 100% höher war als auf allen anderen getesteten Kohlenstoffquellen. Ein wesentlicher Unterschied war dabei, dass der Stamm DM1730 durch Einführung von vier Punktmutationen in den *C. glutamicum* Wildtyp entstanden ist, während der von Kiefer *et al.* (2002) verwendete Stamm ATCC 21253 durch ungerichtete Mutagenese generiert wurde und somit einen anderen Genotypen hat. Dies äußert sich unter anderem in einer Threonin- und Methioninauxotrophie. ATCC 21253 produzierte auf Glukose unter den getesteten Bedingungen 18,8 mM Lysin (Kiefer *et al.*, 2002) während DM1730 in dieser Arbeit auf Glukose 75 mM Lysin exkretierte. Hinzu kommt, dass der Stamm ATCC 21253 im Gegensatz zu DM1730 neben dem Hauptprodukt Lysin einen wesentlich höheren Anteil an organischen Säuren als Nebenprodukte bildetet als DM1730. Folglich sind die in dieser Arbeit gezeigten wesentlich ausgeprägteren Unterschiede in der Lysinausbeute auf Glukose, Fruktose und Saccharose mit *C. glutamicum* DM1730 im Vergleich zu zu ATCC 21253 sehr wahrscheinlich auf den Stammhintergrund zurückzuführen. Es ist davon auszugehen, dass unter den Produktionsbedingungen von DM1730 weitere Faktoren in Anwesenheit von Fruktose bei der Lysinproduktoin limitierend waren. Einer dieser Faktoren könnte die Zuckerverwertung sein. Während bei der Lysinproduktion auf Glukose der Zucker fast vollständig verbraucht wurde, verblieb bei der Produktion auf den anderen getesteten Zuckern ca. die Hälfte des zugegebenen Zuckers im Medium zurück. Dies zeigt, dass in DM1730 die Aufnahme oder Verwertung von Fruktose oder Saccharose anders reguliert wird als die von Glukose.

Eine inhibitorische Wirkung durch Anwesenheit von Fruktose konnte auch bei der L-Phenylalanin-Produktion mit *C. glutamicum* (*Brevibacterium flavum*) gezeigt werden, wo die Ausbeuten der L-Phenylalanin-Produktion auf Fruktose fast viermal geringer waren als auf Glukose (Shiio *et al.*, 1990). Als Ursachen dafür wurde eine geringere intrazelluläre Konzentration von Fruktose-6-P bei Kultivierung auf Fruktose im Vergleich zu Glukose angenommen. Fruktose-6-P ist eine Vorstufe von Erythrose-

4-P (Sugimoto und Shiio, 1989), welches wiederum eine Vorstufenmolekül in der Phenylalaninbiosynthese darstellt (Shiio *et al.*, 1990). Die unterschiedlichen intrazellulären Fruktose-6-P-Konzentrationen kommen durch eine geringe Aktivität der Fruktose-1,6-Bisphosphatase zustande, die essentiell zur Bildung von Fruktose-6-P ist (Shiio *et al.*, 1990; Rittmann *et al.*, 2003). Folglich kommen in diesem Fall die vierfach geringeren Phenylalanin-Ausbeuten auf Fruktose im Vergleich zu Glukose durch eine schlechtere Bereitstellung von Vorstufenverbindungen der Phenylalaninbiosynthese zustande. Die Aktivität der Fruktose-1,6-Bisphosphatase ist dabei auf fruktosehaltigen Medien sehr wahrscheinlich ein limitierender Faktor.

2 Bedeutung von Malic enzyme, Fruktose-1,6-Bisphosphatase und *E.coli* PntAB für die Lysinproduktion

Malic enzyme: Ohnishi *et al.* (2003) konnten zeigen, dass der genetisch definierte Stamm AHP-3 mit den Mutationen *pyc*^{P458}, *hom*^{V59A} und *lysC*^{T311I} bei 40°C auf Glukose mehr Lysin produzierte als bei 30°C. Mit der erhöhten Produktion gingen Expressionsveränderungen von 21 aus 120 analysierten Genen hervor. Darunter wurden von den Autoren besonders eine erhöhte Expression der Gene für Malic enzyme *malE* und PEP-Carboxykinase *pck* sowie eine verringerte Expression der Citratsynthase *gltA* hervorgehoben.

Für die *malE*-Überexpression wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls gezeigt, dass eine dreifach erhöhte MalE-Aktivität auf Glukose keinen Einfluss auf die Lysinproduktion in *C. glutamicum* DM1730 hat. Folglich kann man davon ausgehen, dass die von Ohnischi *et al.*, (2003) gefundene erhöhte *pck*- und *malE*-Expression in Korrelation zu einer gesteigerten Lysinproduktion bei erhöhten Temperaturen wahrscheinlich eine Konsequenz der Temperaturerhöhung war. Man kann schlussfolgern, dass bei 30°C Malic enzyme auf Glukose kein limitierender Faktor für die Lysinproduktion ist und dass eine Erhöhung der Aktivität die Lysinausbeute nicht erhöht.

In dieser Arbeit wurde die Lysinproduktion nach Überexpression von *malE* auf Glukose, Fruktose, Saccharose und Glukose + Fruktose untersucht. Auf allen getesteten Kohlenstoffquellen war die Lysinausbeute in *C. glutamicum* DM1730(pVWEx1-*malE*) nicht höher als im Kontrollstamm DM1730(pVWEx1),

obwohl auf allen Kohlenstoffquellen die MalE-Aktivität nach Überexpression des *malE*-Gens mindestens dreifach erhöht war (Tabelle 7). Im Stamm DM1730(pVWEx1-*malE*) wiesen zwei Genprodukte des Reaktionszyklus, in dem NADPH aus NADH geformt wird, erhöhte Aktivitäten auf. Das Gen *malE* ist plasmidär überexprimiert, während die Punktmutation *pyc*^{P458S} zu einer höheren Aktivität der Pyruvatcarboxylase als im Wildtyp führt (Ohnishi *et al.*, 2002). In *S. cerevisiae* resultierte die gleichzeitige Überexpression der Gene, die für Malic enzyme und Pyruvatcarboxylase kodieren, zu keiner Veränderung des NADPH/NADP$^+$-Verhältnisses in der Zelle, führt aber zu einem verringerten Fluss über den Pentose-Phosphatweg (Moreira dos Santos *et al.*, 2004). In *C. glutamicum* wurde durch *malE*-Überexpression keine Steigerung der Lysinproduktion erreicht. Möglicher Weise wird in *C. glutamicum* durch *malE*-Überexpression ebenfalls der Fluss über den Pentosephosphatweg reduziert, dafür gibt es aber zur Zeit keine Evidenzen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in *C. glutamicum* DM1730 die Aktivität von Malic enzyme kein limitierender Faktor für die Lysinproduktion ist.

Fruktose-1,6-Bisphosphatase (FBPase) katalysiert die reverse Reaktion der 6-Phospho-Fruktokinase, bei der Fruktose1,6-P_2 zu Fruktose-6-P umgesetzt wird (Sedivy *et al.*, 1984; Rittmann *et al.*, 2003). In *C. glutamicum* ist die FBPase-Aktivität beim Wachstum auf Glukose und Fruktose gering (Sedivy *et al.*, 1984; Dominguez *et al.*, 1998; Rittmann *et al.*, 2003). Beim Wachstum auf glukoneogenetischen Substraten ist die FBPase-Aktivität in *S. cerevisiae* im Vergleich zum Wachstum auf Glukose erhöht wogegen es *C. glutamicum* diesbezügliche keine Unterschiede gibt (Rittmann *et al.*, 2003).

In den Ergebnissen wurde gezeigt, dass die Überexpression des FBPase-Gens beim Wachstum auf Glukose die Lysinproduktin nicht beeinflusst. Folglich kann man davon ausgehen, dass ein ATP-verbrauchender Zyklus zwischen der 6-Phospho-fruktokinase-Reaktion und der umgekehrten FBPase-Reaktion (Daldal und Fraenkel, 1983) entweder nicht stattfand oder, wenn doch, die Lysinproduktion nicht störte. Die Überexpression von *fbp* im genetisch definierten Lysinproduktionsstamm *C. glutamicum* DM1730 führte auf Fruktose jedoch weder zu einer Steigerung der Lysinproduktion, noch zu einer Verringerung der intrazellulären Fruktose-1,6-P_2-Konzentration. Bei einer beobachteten intrazellulären Fruktose-1,6-P_2-Konzentration von 40 mM beim Wachstum auf Fruktose inhibiert Fruktose-1,6-P_2 die Enzyme des

Pentosephosphatweges Glukose-6-P-Dehydrogenase und 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase (Sugimoto und Shiio, 1987; Sugimoto und Shiio, 1987; Moritz *et al.*, 2000), wobei der K_{ic}-Wert durch Fruktose-1,6-P_2 bei 14 mM lag. Eine intrazelluläre Fruktose-1,6-P_2-Konzentration von 46 mM beim Wachstum auf Fruktose wurde von Dominguez *et al.* (1998) gemessen. Auf Saccharose hingegen führt eine 7-8-fach erhöhte FBPase-Aktivität zu einer fast zweifachen Steigerung der Lysinausbeute. Im Gegensatz zum Wachstum auf Fruktose führte bei Wachstum auf Saccharose die Überexpression von *fbp* zu einer signifikanten Reduktion der intrazellulären Fruktose-1,6-P_2-Konzentration. Dies liegt im physiologisch relevanten Bereich, so dass man davon ausgehen kann, dass mit der gesteigerten Lysinproduktion auf Saccharose auch der Fluss über den Pentosephosphatweg erhöht wurde. Kürzlich wurde gezeigt, dass die Insertion eines Allels der 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase, welches das Enzym weniger sensitiv gegenüber der Inhibition durch Fruktose-1,6-P_2 macht, zu einem erhöhtem Fluss über den Pentosephosphatweg und einer Steigerung der Lysinproduktion führt (Ohnishi *et al.*, 2005). In Kombination mit den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen zur *fbp*-Überexpression wurde das Enzym 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase als wichtiges Ziel zur Optimierung der Lysin-produktion identifiziert, da dessen Aktivität einen limitierendenden Faktor für die Lysinproduktion darstellt.

Mit der Überexpression von *fbp* wurde auf Saccharose über 80% der im Medium vorhandenen Kohlenstoffquelle verwertet, während im Kontrollstamm fast zwei Drittel des im Medium vorhandenen Zuckers verblieb. Folglich ist anzunehmen, dass entweder die Aufnahme des Zuckers oder dessen intrazelluläre Verwertung an einem gewissen Punkt limitierend ist. Möglicherweise hebt eine reduzierte intrazelluläre Fruktose-1,6-P_2-Konzentration diese Limitierung auf. Fruktose-1,6-P_2 moduliert in *B. subtilis* als Effektor nicht nur die Aktivität allosterischer Enzyme sondern, aktiviert auch CggR, einen transkriptionellen Repressor der Glykolysegene. Darüber hinaus aktiviert Fruktose-1,6-P_2 die *B. subtilis* HPr(Ser)-Kinase und damit die Repression von Genen zur Verwertung sekundärer Kohlenstoffquellen durch CcpA (Titgemeyer und Hillen, 2002). In *C. glutamicum* hingegen ist bislang nicht bekannt, ob intrazelluläres Fruktose-1,6-P_2 direkt an der Regulation der Kohlenstoffverwertung beteiligt ist.

Anhand der Ergebnisse zur Bedeutung von *fbp* für die Lysinproduktion war anzunehmen, dass nach *fbp*-Überexpression auf Saccharose zu einem höheren Fluss über den Pentosephosphatweg und die damit verbundene verbesserte NADPH-Versorgung die Ursache für die fast zweifach gesteigerte Lysinproduktion war. Das Gen *pntAB* aus *E. coli* kodiert für eine Transhydrogenase, die $NADP^+$ durch NADH reduziert (Bizouarn *et al.*, 2002). Bei Wachstum von *E. coli* unter aeroben Bedingungen bildet PntAB 35-45% des NADPH, welches für die Biosynthese notwendig ist (Sauer *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu *E. coli* besitzen andere biotechnologisch relevanten Organismen wie *S. cerivisiae* oder *C. glutamicum* keine solche Transhydrogenase und können NADPH nur über die Reaktionen der Enzyme des Pentosephohsphatweges, der Isocitrat-Dehydrogenase und Malic enzyme regenerieren (Moreira dos Santos *et al.*, 2004; Krömer *et al.*, 2006). Die heterologe Überexpression von *pntAB* in *S. cerevisiae* führte überraschenderweise während der anaeroben Fermentation zu einer Verringerung des NADPH-Pools. Somit war davon auszugehen, dass PntAB in *S. cerevisiae* nicht die Regeneration von NADPH, sondern die Bildung von NADH katalysierte (Anderlund *et al.*, 1999).

In *C. glutamicum* DM1730 führte die heterologe Überexpression von *E. coli pntAB* mit allen getesteten Kohlenstoffquellen zu einer Steigerung der Lysinproduktion. Demnach kann man davon ausgehen, dass PntAB in *C. glutamicum* zur Regeneration von NADPH beiträgt. Ein positiver Effekt der *pntAB*-Überexpression für die Lysinproduktion konnte auf Glukose bereits nachgewiesen werden (Pfefferle *et al.*, 2003; Kabus, 2006). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die NADPH-Verfügbarkeit neben Glukose auch auf Fruktose und Saccharose offenbar ein limitierender Faktor bei der Lysinproduktion ist. Um dies direkt zu beweisen, müssten die intrazellulären NADPH-Pools bestimmt werden. Neben der NADPH-Versorgung muss es bei der Lysinprodution mit *C. glutamicum* auf fruktose- und saccharosehaltigen Medien allerdings noch weitere limitierende Faktoren geben, da auch nach Überexpression von *pntAB* weder auf Fruktose noch auf Saccharose die Lysinausbeute erreicht werden konnte, die mit Glukose als Kohlenstoffquelle erzielt wurde. Die Ursachen dafür liegen möglicherweise in einer unterschiedlichen genetischen Regulation in Anwesenheit verschiedener PTS-Zucker bei der Lysinproduktion.

3 Regulation durch PTS-Zucker in *C. glutamicum*

Die Regulation durch PTS-Zucker auf die globale Genexpression ist in *C. glutamicum* weitgehend unverstanden. Darum wurde in dieser Arbeit in Minimalmedium die globale Genexpression von Zellen beim Wachstum auf Fruktose, Saccharose oder Glukose + Fruktose mit Zellen verglichen, die auf Glukose gewachsen sind. Des Weiteren wurden die Auswirkungen durch die Anwesenheit der genannten Kohlenstoffquellen auf die globale Genexpression in Komplexmedium untersucht. Für L-Lactat (Stansen *et al.*, 2005) und Ribose (Wendisch, unveröffentlicht) war bekannt, dass die Anwesenheit dieser Kohlenstoffquellen zu starken Expressionsveränderungen von Genen führt, die für Proteine zur Aufnahme oder der initialen Verstoffwechslung von L-Lactat bzw. Ribose kodieren. Ein solches Expressionsmuster konnte hier auch bei Anwesenheit von Citrat im Komplexmedium beobachtet werden, wo die stärksten Expressionsveränderungen (ca. 20-fach) durch Anwesenheit von Citrat bei Genen zu beobachten waren, die für ein Citrataufnahmesystem (Bott, unveröffentlicht) kodieren.

In *B. subtilis* ist die Expression des Gens für die glukosespezifische PTS-Permease in Anwesenheit von Glukose 30-fach höher exprimiert als in Abwesenheit von Glukose (Blencke *et al.*, 2003). Ob eine derartige Induktion auch durch Fruktose oder Saccharose ausgelöst werden kann, wurde bislang nicht untersucht. In *B. subtilis* werden die Gene vieler PTS-Permeasen durch operonspezifische Transkriptionsregulatoren oder Antiterminatoren als Antwort auf die Anwesenheit eines Zuckers reguliert (Moreno *et al.*, 2001). Anhand der in den Ergebnissen gezeigten Transkriptomdaten konnten keine derartigen Transkriptionsregulatoren in *C. glutamicum* identifiziert werden, die zuckerspezifisch die Expression von Genen von PTS-Permeasen regulieren

Eine konstitutive Expression von PTS-Permeasen in *C. glutamicum* wurde von Dominguez *et al.* (1997, 1998) vermutet. Es wurde gezeigt, dass Glukose und Fruktose coverstoffwechselt werden, was für ein gewisses Maß an konstitutiver Expression der glukose- und fruktosespezifischen PTS-Permeasen spricht (Dominguez *et al.*, 1997). Da die Aufnahmeraten der jeweiligen Zucker bei Wachstum auf Glukose + Fruktose halb so hoch waren wie bei Wachstum auf Glukose oder Fruktose als einziger Kohlenstoffquelle, wurde vermutet, dass die

Expression oder Aktivität der Gene bzw. Proteine mindestens zweifach reguliert werden (Dominguez *et al.*, 1997).
In dieser Arbeit wurde auf mRNA-Ebene gezeigt, dass lediglich das Gen für die fruktosespezifische PTS-Permease *ptsF* bei Wachstum auf Fruktose im Vergleich zu Glukose dreifach erhöht exprimiert war. Die Gene für die glukose- und saccharosespezifischen PTS-Permeasen zeigten kaum Veränderungen in ihrer Expression. Dies bestätigte die Vermutung von Dominguez *et al.* (1997), dass die Expression der Gene von PTS-Permeasen nur geringfügig reguliert wird, wobei eine basale konstitutive Expression vorhanden ist.

Durch Untersuchung der globalen Genexpression bei Wachstum auf LB im Vergleich zum Wachstum auf LB + PTS-Zucker oder Maltose konnte eine Klasse von Genen identifiziert werden, die in Anwesenheit aller getesteten Kohlenstoffquellen einen verringerten mRNA-Spiegel aufwiesen. Darunter waren zu einem großen Teil Gene für Transportsysteme alternativer Kohlenstoffquellen. Da die Repression von Genen für Transporter alternativer Kohlenstoffquellen auch durch Anwesenheit von Maltose zu beobachten war, welches nicht über das PTS-System transportiert wird, kann man vermuten, dass in *C. glutamicum* in LB-Medium die Repression der hier aufgeführten Gene in Anwesenheit der getesteten Zucker nicht über Komponenten des PTS-Systems vermittelt wurde.
13 Gene, deren Produkte bei Stickstoffmangel benötigt werden, zeigten in Komplexmedium nur durch Anwesenheit von Fruktose und Saccharose aber nicht durch Glukose und Maltose deutlich erhöhte mRNA-Spiegel. Fast alle dieser Gene besitzen im Promotorbereich eine Bindestelle für den globalen Stickstoffregulator AmtR (Jakoby *et al.*, 2000; Burkovski, 2003). Dies spricht dafür, dass sich in *C. glutamicum* die Wahrnehmung der Stickstoffverfügbarkeit in Anwesenheit von Fruktose und Saccharose im Vergleich zur Anwesenheit zu Glukose unterscheidet. Der Sensor der Stickstoffverfügbarkeit in *C. glutamicum* GlnK (Jakoby *et al.*, 1999; Nolden *et al.*, 2001) liegt bei Stickstoffmangel cytoplasmatisch vor, während er nach Zugabe von Ammonium membranassoziiert vorliegt (Strosser *et al.*, 2004). Untersuchungen zur intrazellulären Lokalosation von GlnK ergaben, dass GlnK bei Wachstum auf Minimalmedium sowohl in Anwesenheit von Glukose als auch in Anwesenheit von Fruktose membranassoziiert vorliegt (Burkovski, unveröffenlicht). Folglich kann eine unterschiedliche Lokalisation von GlnK nicht die Ursache für die in

den Ergebnissen beobachteten erhöhten Expressionen von Genen für Proteine der Stickstoffmangelantwort in Anwesenheit von Fruktose sein. In LB-Medium stellen hauptsächlich Peptide und Aminosäuren die Stickstoffquellen dar. Die Analyse der Expression der Gene *NCgl1915*, *NCgl1916* und *NCgl2562*, die alle als Oligopeptid-Bindeproteine annotiert sind (Kalinowski *et al.*, 2003) zeigte, dass deren mRNA-Spiegel bei Wachstum auf LB-Medium in Anwesenheit von Fruktose und Saccharose 3- bis 5-mal stärker reduziert waren als in Anwesenheit von Glukose. Somit wäre es möglich, dass durch durch Fruktose oder Saccharose die Verwertung von Oligopeptiden so stark beeintächtigt wird, dass die Zellen unter Stickstoffmangel leiden, was die Expression der oben genannten 13 Gene induziert.

Zur Identifikation von Regulationsmechanismen, die direkt die Aufnahme oder initiale Verstoffwechslung von Substraten betreffen, wurde die Substrataufnahme bei Wachstum auf Mischsubstraten, bestehend aus einem PTS-Zucker und einer organischen Säure durchgeführt. Dabei konnten wesentliche Unterschiede bei der Substratverwertung in Abhängigkeit von Glukose, Fruktose und Saccharose identifiziert werden. Während die Verbrauchsrate von Fruktose und Saccharose durch Anwesenheit von Pyruvat, L-Lactat oder Acetat nahezu unverändert im Vergleich zum Wachstum auf Fruktose oder Saccharose als einziger Kohlenstoffquelle bleibt, wird die Glukosverwertung durch die Anwesenheit dieser organischen Säuren stark inhibiert. Verringerte Substrataufnahmeraten von Glukose und Acetat von *C. glutamicum* bei Wachstum auf Glukose + Acetat im Vergleich zum Wachstum auf den jeweiligen einzelnen Kohlenstoffquellen konnte bereits von Wendisch *et al.* (2000) gezeigt werden. Es lag die Vermutung nahe, dass es einen Regulator gibt, der spezifisch die Expression der Gene für die Proteine der Glukoseaufnahme reguliert. In *Listeria monocytogenes* konnte kürzlich der Regulator PrfA identifiziert werden, von dem vermutet wird, dass er die Expression der Gene für Proteine der Glukoseaufnahme inhibiert, da Überexpression des *pfrA*-Gens zu einem Wachstumdefekt auf Glukose führt (Marr *et al.*, 2006). In *C. glutamicum* wird eine solche Funktion für den Regulator RamA vorgeschlagen (Cramer *et al.*, 2006). RamA wurde als Aktivator von Genen für Enzyme der Acetataktivierung und des Glyoxylatzyklus identifiziert. Die Deletion von *ramA* führt jedoch zu einem Wachstumsdefekt auf Glukose (Cramer *et al.*, 2006). Eine Analyse des Promotors des Gens für die PTS-Permease für Glukose *ptsG* (Moon *et al.*, 2005) ergab, dass

dort eine Bindestelle für RamA vorhanden ist (V. Werner, persönliche Mitteilung). Direkte Evidenzen für eine Regulation von *ptsG* durch RamA gibt es jedoch noch nicht.

Weitere PTS-zuckerspezifische Effekte konnten beim Wachstum auf PTS-Zucker + L-Lactat beobachtet werden. Während Glukose und Saccharose mit L-Lactat coverstoffwechselt wurden, fand bei Wachstum auf Fruktose + L-Lactat ein diauxisches Wachstum unter Bevorzugung von Fruktose statt. Bislang konnte eine sequentielle Vertoffwechslung in *C. glutamicum* nur für Glukose und Glutamat (Kronemeyer *et al.*, 1995) sowie Glukose und Ethanol (Eikanns, unveröffentlicht) gezeigt werden. Somit konnte in *C. glutamicum* das dritte Beispiel für ein diauxisches Wachstum gefunden werden.

4 Regulation der Gene der L-Lactatverwertenden Enzyme in *C. glutamicum* durch NCgl2814

Um die Ursachen für die sequentielle Verstoffwechslung von Fruktose vor L-Lactat aufzuklären, wurden Untersuchungen zur Regulation der Gene für die Enzyme der L-Lactatverwertung (Stansen *et al.*, 2005) durchgeführt. Dabei wurde mittels DNA-Affinitätschromatographie der bis dahin in *C. glutamicum* unbekannte Regulator NCgl2814 reproduzierbar als an die Promotorregion des Operons der Gene für Enzyme der L-Lactatverwertung (*NCgl2816-lldD*) bindendes Protein identifiziert. NCgl2814 hat 29% Aminosäureidentität zu GlcC, dem Aktivator von Genen für Enzyme der Glycolatverwertung in *E. coli* (Pellicer *et al.*, 1996), gehört aber zur Klasse der GntR-Proteine, die nach dem Repressor der Gene des Glukonat-Operons GntR in *B. subtilis* benannt wurde (Miwa und Fujita, 1990; Haydon und Guest, 1991). Zu den Vertretern diese Klasse gehören unter anderem FadR aus *E. coli*, welches als Repressor von Genen für Enzyme des Fettsäureabbaus fungiert (DiRusso, 1988; DiRusso, 1992), HutC, der Repressor von Genen für Proteine der Histidinverwertung in *Klebsiella aerogenes* (Schwacha und Bender, 1990) und KorA, welches an der genetischen Kontrolle des Plasmidtransfers in verschiedenen *Streptomyces*-Spezies beteiligt ist (Kendall und Cohen, 1988). Wie auch die meisten anderen GntR-Proteine besitzt NCgl2814 ein N-terminales Helix-Turn-Helix-Motiv (Haydon und Guest, 1991),

was dafür spricht, dass es sich um einen Repressor handelt (Perez-Rueda und Collado-Vides, 2000).

Mittels Retardierungsgelelektrophorese konnte die Bindung von NCgl2814 an den *NCgl2816-lldD*-Promotor auch *in vitro* nachgewiesen werden. Dabei kam es ab einer Konzentration von 0,12 µM zur Ausbildung eines Protein-DNA-Komplexes zwischen 0,15-0,2 µM war die Bindung von NCgl2814 halbmaximal. Die Bindestelle von NCgl2814 konnte mit weiteren Retardierungsexperimenten auf eine 55 bp umfassende Region eingegrenzt werden. NCgl2814 bindet -89 bis -35 bp stromaufwärts vom Translationsstart des *NCgl2816-lldD*-Oprerons. Die Analyse dieser Sequenz ergab, dass in dieser Region insgesamt 3 potentielle Bindemotive sind, die entweder invertiert oder direkt wiederholt angeordnet sind (Abbildung 21). Die Bindestellen von Repressoren überlappen typischerweise mit der RNA-Polymerase-Bindestelle (-35 bis -10 -Region). Im *NCgl2816-lldD*-Promotor konnte diese Region durch Sequenzvergleiche mit anderen Promotoren in *C. glutamicum* (Patek *et al.*, 1996) bislang nicht identifiziert werden. In zukünftigen Experimenten sollte der exakte Transkriptionsstart des *NCgl2816-lldD*-Operons mittels Primer-Extension-Analyse bestimmt werden. Darüber hinaus sollte durch "Foot-Print"-Analysen die genaue Bindestelle von NCgl2814 ermittelt werden. Auf diesem Weg könnte durch Mutationsanalysen ein spezifisches DNA-Bindemotiv für NCgl2814 identifiziert werden.

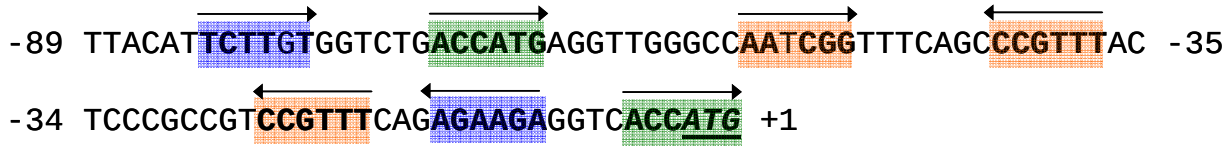

Abbildung 21: Promotorregion des *NCgl2816-lldD*-Operons von Position -89 bis Position +1 bezüglich des Translationsstarts. In der Region von -89 bis -35 konnte die Bindung von NCgl2814 nachgewiesen werden. Die eingefärbten Bereiche zeigen insgesamt 3 potentielle Bindemotive, die Pfeile geben die Orientierung der potentiellen Motive an. Der Translations-start ist kursiv und unterstrichen.

Durch weitere Retardierungsexperimente konnte gezeigt werden, dass die Bindung von NCgl2814 an den *NCgl2816-lldD*-Promotor in Anwesenheit von L-Lactat ab einer Konzentration von 10 mM inhibiert wurde, wobei die Inhibition mit zunehmenden L-Lactatkonzentrationen bis 40 mM L-Lactat verstärkt wurde. Dagegen wurde die Bindung von NCgl2814 in Anwesenheit von 40 mM D-Lactat nicht inhibiert (Abbildung 16). Péquignot *et al.* (1997) haben in *C. glutamicum* ATCC 17965 bei

Wachstum auf Fruktose oder Glukose intrazelluläre L-Lactatkonzentrationen von 32-39 mM gemessen, so dass davon auszugehen ist, dass die in dieser Arbeit gemessenen Effektorkonzentrationen im physiologisch relevanten Bereich liegen. Dies deutet darauf hin, dass die Regulation der Expression des *NCgl2814-lldD*-Operons ähnlich wie die des *lac*-Operons in *E. coli* erfolgt (Ohshima *et al.*, 1974), bei der die Anwesenheit von Lactose die Expression der Gene für Enzyme zur Verwertung von Lactose induziert (Ohshima *et al.*, 1974).
In *C. glutamicum* wurden bislang nur für wenige Effektoren von Transkriptionsregulatoren gefunden, die die Bindung der Proteine an die DNA modulieren. Diese sind GlxR, welches durch cAMP-Bindung aktiviert wird (Kim *et al.*, 2004) sowie RipA und DtxR, deren DNA-Bindefähigkeit durch Eisen verstärkt wird (Wennerhold *et al.*, 2005; Wennerhold und Bott, 2006). Für die Transkriptionsregulatoren im Schwefelmetabolismus von *C. glutamicum* SsuR und McbR konnten mit S-Adenosylhomocystein bzw. Sulfat Effektoren gefunden werden, die die Bindung des Regulators an die Zielpromotoren inhibieren (Koch *et al.*, 2005; Rey *et al.*, 2005). NCgl2814 ist in *C. glutamicum* das dritte Beispiel für einen Regulator, dessen Bindung and die DNA durch einen Effektor inhibiert wird.

Während die Bildung von L-Lactat von NAD-abhängigen L-Lactat-Dehydrogenasen katalysiert wird, wird die Umsetzung von L-Lactat zu Pyruvat über NAD-unabhängige L-Lactat-Dehydrogenasen katalysiert, die als Elektronenakzeptoren unter anderem Flavinmononukleotid, Ferricytochrom C oder Quinon verwenden (Garvie, 1980; Dong *et al.*, 1993; Alberti *et al.*, 2000; Bott und Niebisch, 2003). NAD-abhängige L-Lactat-Dehydrogenasen sind in zahlreichen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien identifiziert und charakterisiert worden (Garvie, 1980). In vielen Spezies werden sie durch Fruktose-1,6-P_2 aktiviert (Garvie, 1980; Gibello *et al.*, 1999). Für NAD-unabhängie L-Lactat-Dehydrogenasen konnten erhöhte Aktivitäten in Anwesenheit von L-Lactat in *Kluyveromyces lactis* und *E. coli* gezeigt werden (Dong *et al.*, 1993; Alberti *et al.*, 2000). Über die genetische Regulation von NAD-unabhängigen L-Lactat-Dehydrogenasen ist nur wenig bekannt. In *E. coli* konnte ein für die Verwertung von L-Lactat essentieller Genlocus identifiziert werden, der Gene für einen Transporter, eine flavinmononukleotidabhängige L-Lactatdehydrogenase und einen Repressor enthält (Dong *et al.*, 1993). Die Aktivität der L-Lactatdehydrogenase wird in *E. coli* durch L-Lactat und die Sauerstoffverfügbarkeit moduliert (Dong *et al.*,

1993), wobei letzteres über das Zwei-Komponenten-System ArcB/ArcA vermittelt wird (Iuchi und Lin, 1988). Eine direkte Regulation der Gene für Enzyme zur Verwertung von L-Lactat durch den in diesem Locus kodierten Repressor wurde aber bislang nicht gezeigt.

In *C. glutamicum* konnte anhand von Wachstumsexperimenten, DNA-Chip-Untersuchungen und Enzymaktivitätsbestimmungen mit unterschiedlichen Methoden gezeigt werden, dass NCgl2814 als Repressor des *NCgl2816-lldD*-Operons fungiert und dass diese Repression in Anwesenheit von L-Lactat aufgehoben wird. Demzufolge wurde ein Modell erstellt, das die Funktion von NCgl2814 in *C. glutamicum* beschreibt (Abbildung 22). In Abwesenheit von L-Lactat bindet NCgl2814 in der Region von -89 bis -35 stromaufwärts vom Translationsstarts des *NCgl2816-lldD*-Operons und reprimiert dessen Expression, so dass L-Lactat nicht oder nur kaum verwertet werden kann. In Anwesenheit von L-Lactat dissoziiert NCgl2814 durch Bindung von L-Lactat vom Promotor was zur erhöhten Expression des *NCgl2816-lldD*-Operons führt.

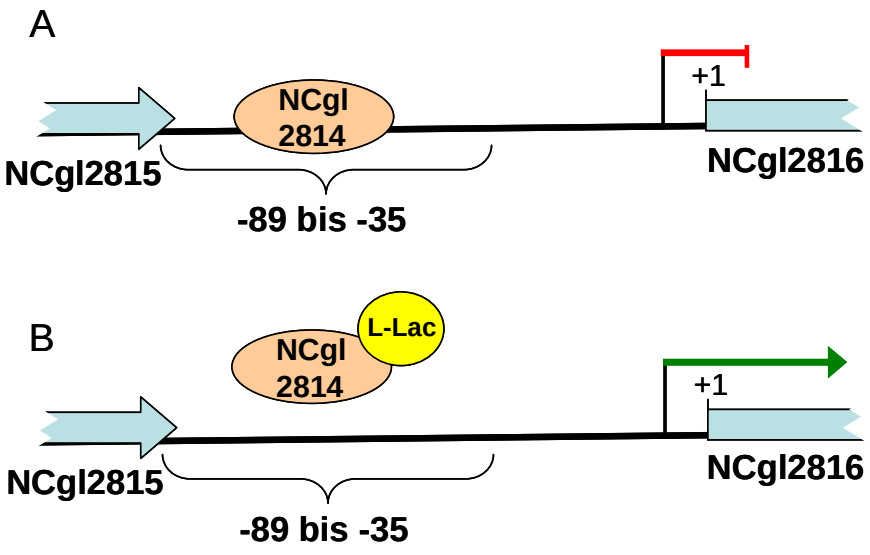

Abbildung 22: Modell zur genetischen Regulation des *NCgl2816-lldD*-Operons durch NCgl2814 in Abwesenheit von L-Lactat (A) und in Anwesenheit von L-Lactat (B).

5 Funktion von RamA bei der Regulation des *NCgl2816-lldD*-Operons

Anhand der Resultate der DNA-Affinitätschromatographie konnte neben NCgl2814 auch RamA als ein an die Promotorregion des *NCgl2816-lldD*-Operon bindendes Protein identifiziert werden. Diese Bindung konnte auch mit Retardierungs-gelelektrophorese verifiziert werden (B. Eikmanns, persönliche Mitteilung). Für RamA konnte kürzlich gezeigt werden, dass es als Aktivator für Gene des Acetatabbaus und des Glyoxylatzyklus fungiert (Cramer *et al.*, 2006). Dabei wurde ein RamA-Bindemotiv charakterisiert (A/C/TG_{4-6}T/C oder AC_{4-6}A/G/T). Anhand dieser Konsen-sussequenz tritt das RamA-Bindemotiv im Promotorbereich des *NCgl2816-lldD*-Operens im Bereich -230 bis -110 bp stromaufwärts vom Translationsstart insgesamt dreimal auf. *In vivo* gibt es bislang zwei Hinweise dafür, dass RamA aktivierend auf die Expression des *NCgl2816-lldD*-Operons wirkt. Einerseits ist eine *ramA*-Deletionsmutante nicht in der Lage, auf L-Lactat als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen (R. Gerstmeir, persönliche Mitteilung). Zum Anderen wird in einer *ramA*-Deletionsmutante Glukose sequentiell vor L-Lactat verstoffwechselt, während im Wildtyp beide Substrate coverstoffwechselt werden. Es wurde ein Modell erstellt, das eine Erweiterung des Modells der Abbildung 22 darstellt.

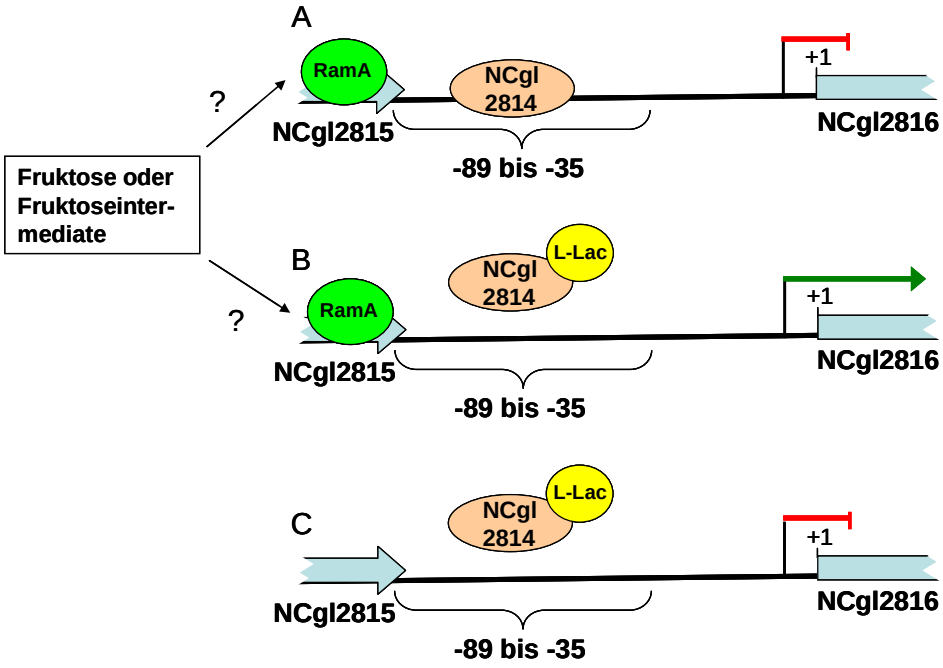

Abbildung 23: Erweitertes Modell zur Regulation des *NCgl2816-lldD*-Operons in Anwesenheit von RamA und Abwesenheit von L-Lactat (A), in Anwesenheit von RamA und L-Lactat (B), in Abwesenheit von RamA und in Anwesenheit von L-Lactat (C).

In Abwesenheit von L-Lactat binden RamA und NCgl2814 an den Promotorbereich des *NCgl2816-lldD*-Operons. Die Bindung von NCgl2814 reprimiert die Expression des *NCgl2816-lldD*-Operons. In Anwesenheit von L-Lactat dissoziiert NCgl2814 vom *NCgl2814-lldD-Promotor* und die Expression des Operons ist dereprimiert. In einer *ramA*-Deletionsmutante wird das *NCgl2816-lldD*-Operon jedoch auch in Anwesenheit von L-Lactat nicht exprimiert, weil RamA als Aktivator für die Expression von Genen der L-lactatverwertenden Enzyme essentiell ist.

Es wird vermutet, dass die Bindung von RamA durch Fruktose oder Fruktose-intermediate moduliert werden kann, da die L-Lactatverwertung aufgrund des diauxischen Wachstums auf Fruktose und L-Lactat offenbar fruktosespezifisch inhibiert wurde. Dem zu Folge könnte es sein, dass beim Wachstum auf Fruktose die RamA-Bindung durch Fruktose oder durch ein Fruktoseintermediat inhibiert wird, was dazu führt, dass das *NCgl2816-lldD*-Operon nicht exprimiert wird. Dies könnte die sequentielle Verstoffwechslung von Fruktose vor L-Lactat erklären. In weiteren Experimenten müsste die Auswirkung einer *ramA*-Überepxression auf diese sequentielle Verstoffwechslung untersucht werden. Möglicherweise führt dies dazu, dass Fruktose und L-Lactat coverstoffwechselt werden, weil durch stark erhöhte RamA-Konzentationen keine Inhibition durch Fruktose oder Fruktoseintermediate mehr stattfinden könnte.

6 Engpässe bei der Lysinproduktion auf Fruktose und Saccharose

In den getesteten *C. glutamicum* Lysinproduktionsstämmen war die Lysinausbeute auf Fruktose und Saccharose deutlich geringer als auf Glukose. In Abbildung 24 sind mögliche Ursachen und Lösungsansätze für dieses Problem dargestellt. Die NADPH-Versorgung, die auch auf Glukose limitierend ist (Marx *et al.*, 1996), wurde bereits von Dominguez *et al.* (1998) und Wittman *et al.* (2004) als limitierender Faktor für die Lysinproduktion vorgeschlagen, aber nicht experimentell bewertet. Als Lösungs-ansatz konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass homologe Überexpression der Fruktose-1,6-Bisphosphatase (Rittmann *et al.*, 2003) die Lysinausbeute auf Saccharose erhöhte, und dass heterologe Überexpression der Transhydrogenase *pntAB* (Bizouarn *et al.*, 2002) die Lysinausbeute auf Glukose, Fruktose und Saccharose verbesserte. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Stickstoffverfügbarkeit beim Wachstum auf Komplexmedium offenbar mit

Fruktose bzw. Sacchaose geringer ist als beim Wachstum auf Komplexmedium mit Glukose. Dies äußerte sich darin, dass die Expression der Gene von Proteinen der Stickstoffmangelantwort in Anwesenheit von Fruktose und Saccharose induziert wurden. Da bekannt ist, dass der Kohlenstoffmetabolismus in vielen Bakterien auch von der Stickstoffverfügbarkeit beeinflusst werden kann (Commichau *et al.*, 2006), ist es denkbar, dass die mangelnde Stickstoffverfügbarkeit zu geringeren Lysinausbeuten auf Fruktose oder Saccharose führen könnte, zumal zur effektiven Aminosäureproduktion eine optimale Stickstoffverfügbarkeit ohnehin eine Voraussetzung ist. Dem könnte entgegengewirkt werden, indem das Medium mit zusätzlichen Ammoniumsulfat supplementiert wird. Anhand von DNA-Chip-Experimeten konnte gezeigt werden, dass dies die Induktion der Stickstoff-mangelantwort in Anwesenheit von Fruktose in LB-Medium aufhebt. Möglicherweise wird dadurch die Lysinausbeute auf Fruktose und Saccharose erhöht.

Ein dritter Punkt ist die Regulation durch RamA, die sich beim Wachstum auf Glukose, Fruktose und Saccharose unterscheidet. So wird im *C. glutamicum* Wildtyp Glukose mit L-Lactat coverstoffwechselt während eine *ramA*-Deletionsmutante Glukose sequentiell vor L-Lactat verstoffwechselt. RamA aktiviert die Gene von Enzymen der Acetatverwertung und des Glyoxylatzyklus (Cramer *et al.*, 2006) und ist für das Wachstum auf L-Lactat als einziger Kohlenstoffquelle essentiell (R. Gerstmeir, persönliche Mitteilung). Anhand von DNA-Chip-Experimenten wurde gezeigt, dass die Deletion von *ramA* zu einer Vielzahl von Genexpressions-veränderungen führt (Cramer, unveröffentlicht), so dass vermutet wird, dass RamA ein pleiotroper Regulator sein könnte (Cramer *et al.*, 2006). Kürzlich konnte RamA als Aktivator von Genen, die zur Ausbildung eines "S-layers" essentiell ist (Hansmeier *et al.*, 2006). Die Deletion des pleiotropen Repressors *ramB* (Gerstmeir *et al.*, 2004) resultierte in einer Erhöhung der Lysinausbeute auf Glukose (Patent WO 02/27009 A1, Degussa). Auch wenn die stoffwechselphysiologischen und genetischen Ursachen hierfür unverstanden sind, wäre es möglich, dass auch die Aktivierung noch nicht identifizierter Gene durch RamA für die Lysinausbeute limitierend sein könnte. Dies könnte insbesonders auf fruktosehaltigen Medien eine Rolle spielen, da anhand der Ergebnisse dieser Arbeit vermutet wird, dass die Aktivität von RamA zuckerspezifisch moduliert werden kann. Folglich wäre die Über-expression von *ramA* eine möglicher Ansatz, um eine Steigerung der Lysinausbeute auf fruktose- und saccharosehaltigen Medien zu erreichen.

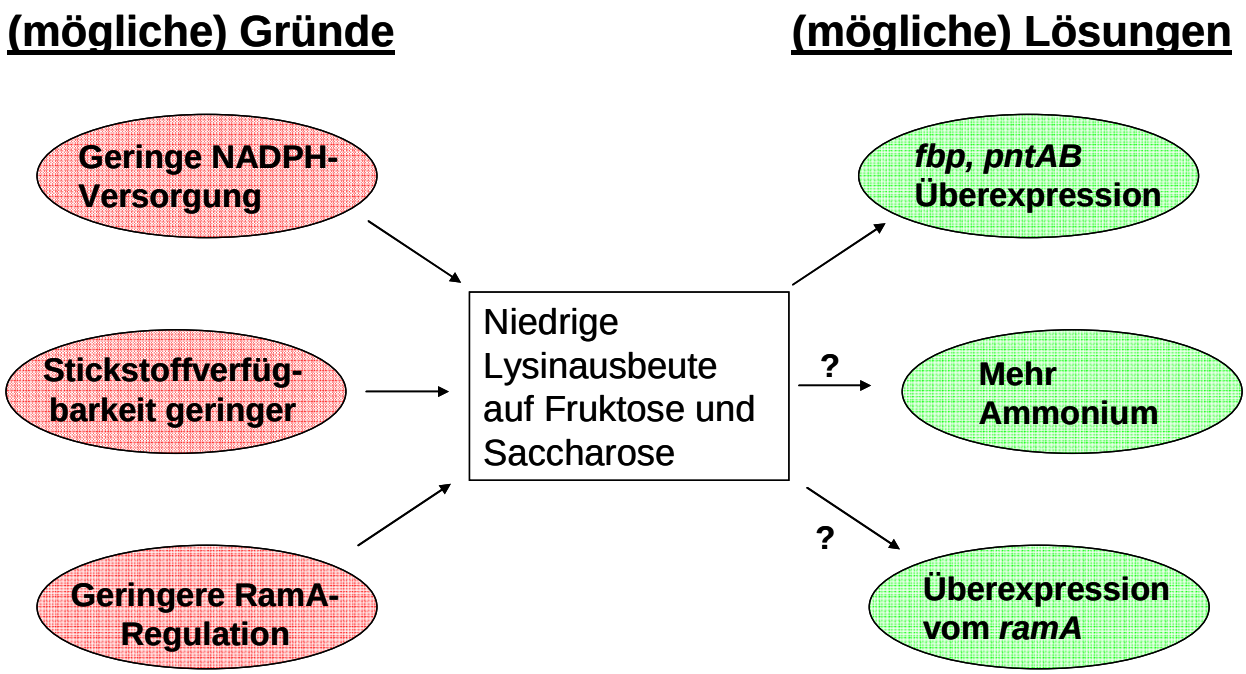

Abbildung 24: Lysinproduktion auf Fruktose und Saccharose: Mögliche Engpässe und Lösungen zum Überwinden dieser Engpässe

VI Literatur

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

Alberti, A., P. Goffrini, I. Ferrero and T. Lodi (2000). "Cloning and characterization of the lactate-specific inducible gene KlCYB2, encoding the cytochrome b(2) of *Kluyveromyces lactis*." *Yeast* **16**(7): 657-65.

Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Res* **25**(17): 3389-402.

Anderlund, M., T. L. Nissen, J. Nielsen, J. Villadsen, J. Rydstrom, B. Hahn-Hagerdal and M. C. Kielland-Brandt (1999). "Expression of the *Escherichia coli* pntA and pntB genes, encoding nicotinamide nucleotide transhydrogenase, in *Saccharomyces cerevisiae* and its effect on product formation during anaerobic glucose fermentation." *Appl Environ Microbiol* **65**(6): 2333-40.

Ando, S., K. Ochiai, H. Yokoi, S. Hashimoto and Y. Yonetani (2002). "Novel glucose-6-phosphate dehydrogenase." *Patent WO0198472* **(2002-01-02)**.

Beckers, G., L. Nolden and A. Burkovski (2001). "Glutamate synthase of *Corynebacterium glutamicum* is not essential for glutamate synthesis and is regulated by the nitrogen status." *Microbiology* **147**(Pt 11): 2961-70.

Bellmann, A., M. Vrljic, M. Patek, H. Sahm, R. Kramer and L. Eggeling (2001). "Expression control and specificity of the basic amino acid exporter LysE of *Corynebacterium glutamicum*." *Microbiology* **147**(Pt 7): 1765-74.

Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res* **7**(6): 1513-23.

Bizouarn, T., M. Althage, A. Pedersen, A. Tigerstrom, J. Karlsson, C. Johansson and J. Rydstrom (2002). "The organization of the membrane domain and its interaction with the NADP(H)-binding site in proton-translocating transhydrogenase from *E. coli*." *Biochim Biophys Acta* **1555**(1-3): 122-7.

Blencke, H. M., G. Homuth, H. Ludwig, U. Mader, M. Hecker and J. Stulke (2003). "Transcriptional profiling of gene expression in response to glucose in *Bacillus subtilis*: regulation of the central metabolic pathways." *Metab Eng* **5**(2): 133-49.

Bott, M. and A. Niebisch (2003). "The respiratory chain of *Corynebacterium glutamicum*." *J Biotechnol* **104**(1-3): 129-53.

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**: 248-54.

Bramucci, M. G. and V. Nagarajan (1996). "Direct selection of cloned DNA in *Bacillus subtilis* based on sucrose-induced lethality." *Appl Environ Microbiol* **62**(11): 3948-53.

Brückner, R. and F. Titgemeyer (2002). "Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization." *FEMS Microbiol Lett* **209**(2): 141-8.

Burkovski, A. (2003). "Ammonium assimilation and nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum* and its relatives: an example for new regulatory mechanisms in actinomycetes." *FEMS Microbiol Rev* **27**(5): 617-28.

Burkovski, A. (2003). "I do it my way: regulation of ammonium uptake and ammonium assimilation in *Corynebacterium glutamicum*." *Arch Microbiol* **179**(2): 83-8.

Cocaign, M. and et al. (1993). "Batch kinetics of *Corynebacterium glutamicum* during growth on various carbon sources: use of substrate mixtures to localise metabolic bottlenecks." *Appl. Microbiol. Biotechnol. 40:526-530*.

Commichau, F. M., K. Forchhammer and J. Stulke (2006). "Regulatory links between carbon and nitrogen metabolism." *Current Opinion in Microbiology* **9**(2): 167-172.

Cramer, A., R. Gerstmeir, S. Schaffer, M. Bott and B. J. Eikmanns (2006). "Identification of RamA, a Novel LuxR-Type Transcriptional Regulator of Genes Involved in Acetate Metabolism of *Corynebacterium glutamicum*." *J Bacteriol* **188**(7): 2554-67.

Cremer, J., L. Eggeling and H. Sahm (1991). "Control of the lysine biosynthetic sequence in *Corynebacterium glutamicum* as analyzed by overexpression of the individual corresponding genes." *Appl Environ Microbiol* **57**: 1746-52.

Daldal, F. and D. G. Fraenkel (1983). "Assessment of a futile cycle involving reconversion of fructose 6-phosphate to fructose 1,6-bisphosphate during gluconeogenic growth of *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **153**(1): 390-4.

Derouaux, A., D. Dehareng, E. Lecocq, S. Halici, H. Nothaft, F. Giannotta, G. Moutzourelis, J. Dusart, B. Devreese, F. Titgemeyer, J. Van Beeumen and S. Rigali (2004). "Crp of *Streptomyces coelicolor* is the third transcription factor of the large CRP-FNR superfamily able to bind cAMP." *Biochem Biophys Res Commun* **325**(3): 983-990.

DiRusso, C. C. (1988). "Nucleotide sequence of the fadR gene, a multifunctional regulator of fatty acid metabolism in *Escherichia coli*." *Nucleic Acids Res* **16**(16): 7995-8009.

DiRusso, C. C. (1992). "Characterization of FadR, a global transcriptional regulator of fatty acid metabolism in *Escherihcia coli*: interaction with the fadB promoter is prevented by long chain fatty acyl coenzyme As." *J. Biol. Chem. 267:8685-8691*.

Dominguez, H., M. Cocaign-Bousquet and N. D. Lindley (1997). "Simultaneous consumption of glucose and fructose from sugar mixtures during batch growth of *Corynebacterium glutamicum*." *Applied Microbiology and Biotechnology* **47**(5): 600-603.

Dominguez, H. and N. D. Lindley (1996). "Complete sucrose metabolism requires fructose phosphotransferase activity in *Corynebacterium glutamicum* to ensure phosphorylation of liberated fructose." *Appl. Env. Microbiol. 62:3878-3880*.

Dominguez, H., C. Rollin, A. Guyonvarch, J. L. Guerquin-Kern, M. Cocaign-Bousquet and N. D. Lindley (1998). "Carbon-flux distribution in the central metabolic pathways of *Corynebacterium glutamicum* during growth on fructose." *Eur J Biochem* **254**(1): 96-102.

Dong, J. M., J. S. Taylor, D. J. Latour, S. Iuchi and E. C. Lin (1993). "Three overlapping *lct* genes involved in L-lactate utilization by *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **175**(20): 6671-8.

Eggeling, L. (1994). "Biology of L-lysine overproduction by *Corynebacterium glutamicum*." *Amino acids* **6**: 261-272.

Eggeling, L. and M. Bott (2005). "Handbook of *Corynebacterium glutamicum*." *CRC Press, Boca Raton, USA*.

Eikmanns, B. (2005). Central Metabolism: Sugar uptake and Conversion. Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. L. Eggeling and M. Bott. Boca Raton, USA, CRC Press. **10**.

Eikmanns, B. J., M. Metzger, D. Reinscheid, M. Kircher and H. Sahm (1991). "Amplification of three threonine biosynthesis genes in *Corynebacterium glutamicum* and its influence on carbon flux in different strains." *Appl Microbiol Biotechnol* **34**(5): 617-22.

Eikmanns, B. J., D. Rittmann and H. Sahm (1995). "Cloning, sequence analysis, expression, and inactivation of the *Corynebacterium glutamicum icd* gene encoding isocitrate dehydrogenase and biochemical characterization of the enzyme." *J Bacteriol* **177**(3): 774-82.

Eikmanns, B. J., N. Thum-Schmitz, L. Eggeling, K. U. Lüdtke and H. Sahm (1994). "Nucleotide sequence, expression and transcriptional analysis of the *Corynebacterium glutamicum gltA* gene encoding citrate synthase." *Microbiology* **140**(Pt 8): 1817-28.

Eisen, M. B., P. T. Spellman, P. O. Brown and D. Botstein (1998). "Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(25): 14863-8.

Engels, S., C. Ludwig, J. E. Schweitzer, C. Mack, M. Bott and S. Schaffer (2005). "The transcriptional activator ClgR controls transcription of genes involved in proteolysis and DNA repair in *Corynebacterium glutamicum*." *Mol Microbiol* **57**(2): 576-91.

Engels, S., J. E. Schweitzer, C. Ludwig, M. Bott and S. Schaffer (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**(1): 285-302.

Fling, S. P. and D. S. Gregeron (1986). "Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using high-molarity tris buffer system without urea." *Anal Biochem* **155**: 83-8.

Follettie, M. T., H. K. Shin and A. J. Sinskey (1988). "Organization and regulation of the *Corynebacterium glutamicum hom-thrB* and *thrC* loci." *Mol Microbiol* **2**(1): 53-62.

Fountoulakis, M. and H. Langen (1997). "Identification of proteins by matrix-assisted laser desorption ionization-mass spectrometry following in-gel digestion in low-salt, non-volatile buffer and simplified peptide recovery." *Anal. Biochem.* **250**: 153-156.

Garvie, E. I. (1980). "Bacterial lactate dehydrogenases." *Microbiol Rev* **44**(1): 106-39.

Gazdik, M. A. and K. A. McDonough (2005). "Identification of cyclic AMP-regulated genes in *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria under low-oxygen conditions." *J Bacteriol* **187**(8): 2681-92.

Gerstmeir, R., A. Cramer, P. Dangel, S. Schaffer and B. J. Eikmanns (2004). "RamB, a novel transcriptional regulator of genes involved in acetate metabolism of *Corynebacterium glutamicum*." *J Bacteriol* **186**(9): 2798-809.

Gerstmeir, R., V. F. Wendisch, S. Schnicke, H. Ruan, M. Farwick, D. Reinscheid and B. J. Eikmanns (2003). "Acetate metabolism and its regulation in *Corynebacterium glutamicum*." *J Biotechnol* **104**(1-3): 99-122.

Gibello, A., M. D. Collins, L. Dominguez, J. F. Fernandez-Garayzabal and P. T. Richardson (1999). "Cloning and analysis of the L-lactate utilization genes from *Streptococcus iniae*." *Appl Environ Microbiol* **65**(10): 4346-50.

Gourdon, P., M. F. Baucher, N. D. Lindley and A. Guyonvarch (2000). "Cloning of the Malic Enzyme Gene from *Corynebacterium glutamicum* and Role of the Enzyme in Lactate Metabolism." *Appl Environ Microbiol* **66**(7): 2981-2987.

Gubler, M., M. Jetten, S. H. Lee and A. J. Sinskey (1994). "Cloning of the pyruvate kinase gene (pyk) of *Corynebacterium glutamicum* and site-specific inactivation of pyk in a lysine-producing *Corynebacterium lactofermentum* strain." *Appl Environ Microbiol* **60**(7): 2494-500.

Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *J Mol Biol* **166**(4): 557-80.

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.

Hansmeier, N., A. Albersmeier, A. Tauch, T. Damberg, R. Ros, D. Anselmetti, A. Puhler and J. Kalinowski (2006). "The surface (S)-layer gene *cspB* of *Corynebacterium glutamicum* is transcriptionally activated by a LuxR-type regulator and located on a 6 kb genomic island absent from the type strain ATCC 13032." *Microbiology* **152**(Pt 4): 923-35.

Haydon, D. J. and J. R. Guest (1991). "A new family of bacterial regulatory proteins." *FEMS Microbiol Lett* **63**(2-3): 291-5.

Hermann, T. (2003). "Industrial production of amino acids by coryneform bacteria." *J Biotechnol* **104**(1-3): 155-72.

Hoischen, C. and R. Krämer (1989). "Evidence for an efflux carrier system involved in the secretion of glutamate by *Corynebacterium glutamicum*." *Arch Microbiol* **151**: 342-47.

Inui, M., S. Murakami, S. Okino, H. Kawaguchi, A. A. Vertes and H. Yukawa (2004). "Metabolic analysis of *Corynebacterium glutamicum* during lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions." *J Mol Microbiol Biotechnol* **7**(4): 182-96.

Iuchi, S. and E. C. Lin (1988). "*arcA* (*dye*), a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in aerobic pathways." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(6): 1888-92.

Jakoby, M., R. Kramer and A. Burkovski (1999). "Nitrogen regulation in *Corynebacterium glutamicum*: isolation of genes involved and biochemical characterization of corresponding proteins." *FEMS Microbiol Lett* **173**(2): 303-10.

Jakoby, M., L. Nolden, J. Meier-Wagner, R. Kramer and A. Burkovski (2000). "AmtR, a global repressor in the nitrogen regulation system of *Corynebacterium glutamicum*." *Mol Microbiol* **37**(4): 964-77.

Janknecht, R., G. de Martynoff, J. Lou, R. A. Hipskind, A. Rordheim and H. G. Stunnenberg (1991). "Rapid and efficient purification of a native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccina virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 8972-6.

Jones, B. N. and J. P. Gilligan (1983). "o-Phthaldialdehyde precolumn derivatization and reversed-phase high-performance liquid chromatography of polypeptide hydrolysates and physiological fluids." *J Chromatogr* **266**: 471-82.

Kabus, A. (2006). "Energie und Redoxstoffwechsel von *Corynebacterium glutamicum*." *Heinrich-Heine Universität* **Düsseldorf**.

Kalinowski, J., B. Bathe, D. Bartels, N. Bischoff, M. Bott, A. Burkovski, N. Dusch, L. Eggeling, B. J. Eikmanns, L. Gaigalat, A. Goesmann, M. Hartmann, K. Huthmacher, R. Krämer, B. Linke, A. C. McHardy, F. Meyer, B. Mockel, W. Pfefferle, A. Pühler, D. A. Rey, C. Rückert, O. Rupp, H. Sahm, V. F. Wendisch, I. Wiegrabe and A. Tauch (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**(1-3): 5-25.

Kalinowski, J., J. Cremer, B. Bachmann, L. Eggeling, H. Sahm and A. Puhler (1991). "Genetic and biochemical analysis of the aspartokinase from *Corynebacterium glutamicum*." *Mol Microbiol* **5**(5): 1197-204.

Keilhauer, C., L. Eggeling and H. Sahm (1993). "Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon." *J Bacteriol* **175**(17): 5595-603.

Kendall, K. J. and S. N. Cohen (1988). "Complete nucleotide sequence of the *Streptomyces lividans* plasmid pIJ101 and correlation of the sequence with genetic properties." *J Bacteriol* **170**(10): 4634-51.

Khodursky, A. B., J. A. Bernstein, B. J. Peter, V. Rhodius, V. F. Wendisch and D. P. Zimmer (2003). "*Escherichia coli* spotted double-strand DNA microarrays: RNA extraction, labeling, hybridization, quality control, and data management." *Methods Mol Biol* **224**: 61-78.

Khodursky, A. B., B. J. Peter, N. R. Cozzarelli, D. Botstein, P. O. Brown and C. Yanofsky (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**(22): 12170-12175.

Kiefer, P., E. Heinzle and C. Wittmann (2002). "Influence of glucose, fructose and sucrose as carbon sources on kinetics and stoichiometry of lysine production by *Corynebacterium glutamicum*." *J Industrial Microbiol Biotechnol* **28**: 338-43.

Kiefer, P., E. Heinzle, O. Zelder and C. Wittmann (2004). "Comparative metabolic flux analysis of lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* cultured on glucose or fructose." *Appl Environ Microbiol* **70**(1): 229-39.

Kim, H. J., T. H. Kim, Y. Kim and H. S. Lee (2004). "Identification and characterization of *glxR*, a gene involved in regulation of glyoxylate bypass in *Corynebacterium glutamicum*." *J Bacteriol* **186**(11): 3453-60.

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

Koch, D. J., C. Ruckert, A. Albersmeier, A. T. Huser, A. Tauch, A. Puhler and J. Kalinowski (2005). "The transcriptional regulator SsuR activates expression of the *Corynebacterium glutamicum* sulphonate utilization genes in the absence of sulphate." *Mol Microbiol* **58**(2): 480-94.

Kotrba, P., M. Inui and H. Yukawa (2001). "The *ptsI* Gene Encoding Enzyme I of the Phosphotransferase System of *Corynebacterium glutamicum*." *Biochem Biophys Res Commun* **289**(5): 1307-13.

Krämer, R., C. Lambert, C. Hoischen and H. Ebbighausen (1990). "Uptake of glutamate in *Corynebacterium glutamicum*. 1. Kinetic properties and regulation by internal pH and potassium." *Eur J Biochem* **194**(3): 929-35.

Krömer, J. O., C. Wittmann, H. Schroder and E. Heinzle (2006). "Metabolic pathway analysis for rational design of L-methionine production by Escherichia coli and *Corynebacterium glutamicum*." *Metab Eng*.

Kronemeyer, W., N. Peekhaus, R. Kramer, H. Sahm and L. Eggeling (1995). "Structure of the *gluABCD* cluster encoding the glutamate uptake system of *Corynebacterium glutamicum*." *J Bacteriol* **177**(5): 1152-8.

Krug, A., V. F. Wendisch and M. Bott (2005). "Identification of AcnR, a TetR-type repressor of the aconitase gene *acn* in *Corynebacterium glutamicum*." *J Biol Chem* **280**(1): 585-95.

Lange, C., D. Rittmann, V. F. Wendisch, M. Bott and H. Sahm (2003). "Global expression profiling and physiological characterization of *Corynebacterium glutamicum* grown in the presence of L-valine." *Appl Environ Microbiol* **69**(5): 2521-32.

Lengeler, J. W., K. Jahreis and U. F. Wehmeier (1994). "Enzymes II of the phospho enol pyruvate-dependent phosphotransferase systems: their structure and function in carbohydrate transport." *Biochim Biophys Acta* **1188**(1-2): 1-28.

Letek, M., N. Valbuena, A. Ramos, E. Ordonez, J. A. Gil and L. M. Mateos (2006). "Characterization and use of catabolite-repressed promoters from gluconate genes in *Corynebacterium glutamicum*." *Journal of Bacteriology* **188**(2): 409-423.

Liebl, W. (1991). The genus *Corynebacterium*-nonmedical. The prokaryotes. A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K. H. Schleifer. New York, Springer. **2:** 1157-1171.

Lindroth, P. and K. Mopper (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., D. Phillips and G. M. Church (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**(20): 6228-37.

Marr, A. K., B. Joseph, S. Mertins, R. Ecke, S. Muller-Altrock and W. Goebel (2006). "Overexpression of PrfA Leads to Growth Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Glucose-Containing Culture Media by Interfering with Glucose Uptake." *J Bacteriol* **188**(11): 3887-901.

Marx, A., A. A. de Graaf, W. Wiechert, L. Eggeling and H. Sahm (1996). "Determination of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* by nuclear magnetic resonance spetroscopy combined with metabolite balancing." *Biotechnology Bioengineering* **49**: 111-29.

Marx, A., B. J. Eikmanns, H. Sahm, A. A. de Graaf and L. Eggeling (1999). "Response of the Central Metabolism in *Corynebacterium glutamicum* to the use of an NADH-Dependent Glutamate Dehydrogenase." *Metabolic Engineering* **1**(1): 35-48.

Marx, A., K. Striegel, A. A. de Graaf, H. Sahm and L. Eggeling (1997). "Response of the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* to different flux burdens." *Biotechnology Bioengineering* **56**: 168-80.

Meier-Wagner, J., L. Nolden, M. Jakoby, R. Siewe, R. Kramer and A. Burkovski (2001). "Multiplicity of ammonium uptake systems in *Corynebacterium glutamicum*: role of Amt and AmtB." *Microbiology* **147**(Pt 1): 135-143.

Michal, G. and H. D. Beutler (1974). "D-Fructose-1,6-diphosphate, dihydroxyacetone phosphate and D-glyeraldehyde-3-phosphate." *Methods of Enzymatic Analysis* **3**: 1359-1364.

Miwa, Y. and Y. Fujita (1990). "Determination of the *cis* sequence involved in catabolite repression of the *Bacillus subtilis gnt* operon; implication of a consensus sequence in catabolite repression in the genus *Bacillus*." *Nucleic Acids Res* **18**(23): 7049-53.

Molenaar, D., M. E. van Der Rest, A. Drysch and R. Yucel (2000). "Functions of the membrane-associated and cytoplasmic malate dehydrogenases in the citric acid cycle of *Corynebacterium glutamicum*." *J Bacteriol* **182**(24): 6884-91.

Molinari, R. and F. J. Lara (1960). "The lactic dehydrogenase of *Propionibacterium pentosaceum*." *Biochem J* **75**: 57-65.

Monod, J. (1949). "The growth of bacterial cultures." *Ann. Rev. Microbiol. 3:371-394*.

Moon, M. W., H. J. Kim, T. K. Oh, C. S. Shin, J. S. Lee, S. J. Kim and J. K. Lee (2005). "Analyses of enzyme II gene mutants for sugar transport and heterologous expression of fructokinase gene in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032." *FEMS Microbiol Lett* **244**(2): 259-66.

Moreira dos Santos, M., V. Raghevendran, P. Kotter, L. Olsson and J. Nielsen (2004). "Manipulation of *malic enzyme* in *Saccharomyces cerevisiae* for increasing NADPH production capacity aerobically in different cellular compartments." *Metab Eng* **6**(4): 352-63.

Moreno, M. S., B. L. Schneider, R. R. Maile, W. Weyler and M. H. Saier (2001). " Protein in *Bacillus subtilis*: novel modes of regulation revealed by whole-genome analyses." *Mol Microbiol* **39**(5): 1366-81.

Moritz, B., K. Striegel, A. A. De Graaf and H. Sahm (2000). "Kinetic properties of the glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases from *Corynebacterium glutamicum* and their application for predicting pentose phosphate pathway flux *in vivo*." *Eur J Biochem* **267**(12): 3442-52.

Netzer, R., M. Krause, D. Rittmann, P. G. Peters-Wendisch, L. Eggeling, V. F. Wendisch and H. Sahm (2004). "Roles of pyruvate kinase and malic enzyme in *Corynebacterium glutamicum* for growth on carbon sources requiring gluconeogenesis." *Arch Microbiol* **182**(5): 354 -63.

Nolden, L., C. E. Ngouoto-Nkili, A. K. Bendt, R. Kramer and A. Burkovski (2001). "Sensing nitrogen limitation in *Corynebacterium glutamicum*: the role of *glnK* and *glnD*." *Mol Microbiol* **42**(5): 1281-95.

Nouwens, A. S., S. J. Cordwell, M. R. Larsen, M. P. Molloy, M. Gillings, M. D. P. Willcox and W. B.J. (2000). "Complementing genomics with proteomics: The membrane subproteome of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1." *Electrophoresis* **21**: 3797-809.

Ohnishi, J., M. Hayashi, S. Mitsuhashi and M. Ikeda (2003). "Efficient 40 degrees C fermentation of L-lysine by a new *Corynebacterium glutamicum* mutant developed by genome breeding." *Appl Microbiol Biotechnol* **62**(1): 69-75.

Ohnishi, J., R. Katahira, S. Mitsuhashi, S. Kakita and M. Ikeda (2005). "A novel *gnd* mutation leading to increased L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum*." *FEMS Microbiol Lett* **242**(2): 265-74.

Ohnishi, J., S. Mitsuhashi, M. Hayashi, S. Ando, H. Yokoi, K. Ochiai and M. Ikeda (2002). "A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine-producing mutant." *Appl Microbiol Biotechnol* **58**(2): 217-23.

Ohshima, Y., T. Mizokoshi and T. Horiuchi (1974). "Binding of an inducer to the lac repressor." *J Mol Biol* **89**(1): 127-36.

Parche, S., A. Burkovski, G. A. Sprenger, B. Weil, R. Kramer and F. Titgemeyer (2001). "*Corynebacterium glutamicum*: a dissection of the PTS." *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**(3): 423-8.

Patek, M., B. J. Eikmanns, J. Patek and H. Sahm (1996). "Promoters from *Corynebacterium glutamicum*: cloning, molecular analysis and search for a consensus motif." *Microbiology* **142**(Pt 5): 1297-309.

Pellicer, M. T., J. Badia, J. Aguilar and L. Baldoma (1996). "*glc* locus of *Escherichia coli*: Characterization of genes encoding the subunits of glycolate oxidase and the Glc regulator protein." *Journal of Bacteriology* **178**(7): 2051-2059.

Pequignot, C., C. G. Dussap, A. Pons and J. B. Gros (1997). "Intra- and extracellular concentrations of glutamate, lactate and acetate during growth of *Corynebacterium glutamicum* on different media." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **18**(5): 312-318.

Perez-Rueda, E. and J. Collado-Vides (2000). "The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in Escherichia coli K-12." *Nucleic Acids Res* **28**(8): 1838-47.

Peters-Wendisch, P. G., C. Kreutzer, J. Kalinowski, M. Patek, H. Sahm and B. J. Eikmanns (1998). "Pyruvate carboxylase from *Corynebacterium glutamicum*: characterization, expression and inactivation of the *pyc* gene." *Microbiology* **144**(Pt 4): 915-27.

Peters-Wendisch, P. G., B. Schiel, V. F. Wendisch, E. Katsoulidis, B. Mockel, H. Sahm and B. J. Eikmanns (2001). "Pyruvate carboxylase is a major bottleneck for glutamate and lysine production by *Corynebacterium glutamicum*." *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**(2): 295-300.

Pfefferle, W., B. Mockel, B. Bathe and A. Marx (2003). "Biotechnological manufacture of lysine." *Adv Biochem Eng Biotechnol* **79**: 59-112.

Polen, T. (2002). Genomweite Genexpressionsanalysen mit DNA-Chips zur Charakterisierung des Glucose-Überflussmetabolismus von *Escherichia coli*. Düsseldorf, Heinrich-Heine Universität.

Polen, T., D. Rittmann, V. F. Wendisch and H. Sahm (2003). "DNA microarray analyses of the long-term adaptive response of *Escherichia coli* to acetate and propionate." *Appl Environ Microbiol* **69**(3): 1759-74.

Polen, T. and V. F. Wendisch (2004). "Genomewide expression analysis in amino acid-producing bacteria using DNA microarrays." *Appl Biochem Biotechnol* **118**(1-3): 215-32.

Pons, A., C. G. Dussap, C. Pequinot and J. B. Gros (1996). "Metabolic flux distribution in *Corynebacterium melassecola* ATCC 17965 for various carbon sources." *Biotechnology Bioengineering* **51**: 77-189.

Puskas, L. G., M. Inui and H. Yukawa (2000). "Structure of the urease operon of *Corynebacterium glutamicum*." *DNA Seq* **11**(5): 383-94, 467.

Rey, D. A., S. S. Nentwich, D. J. Koch, C. Ruckert, A. Puhler, A. Tauch and J. Kalinowski (2005). "The McbR repressor modulated by the effector substance S-adenosylhomocysteine controls directly the transcription of a regulon involved in sulphur metabolism of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032." *Molecular Microbiology* **56**(4): 871-887.

Rhodius, V., T. K. Van Dyk, C. Gross and R. A. LaRossa (2002). "Impact of genomic technologies on studies of bacterial gene expression." *Annu Rev Microbiol* **56**: 599-624.

Rittmann, D., S. Schaffer, V. F. Wendisch and H. Sahm (2003). "Fructose-1,6-bisphosphatase from *Corynebacterium glutamicum*: expression and deletion of the *fbp* gene and biochemical characterization of the enzyme." *Arch Microbiol* **180**(4): 285-92.

Sahm, H., L. Eggeling and A. A. de Graaf (2000). "Pathway analysis and metabolic engineering in *Corynebacterium glutamicum*." *Biol Chem* **381**(9-10): 899-910.

Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). "Molecular Cloning. A Laboratory Manual." *Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratoy Press*.

Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-7.

Sauer, U., F. Canonaco, S. Heri, A. Perrenoud and E. Fischer (2004). "The soluble and membrane-bound transhydrogenases UdhA and PntAB have divergent functions in NADPH metabolism of *Escherichia coli*." *J Biol Chem* **279**(8): 6613-9.

Schäfer, A., A. Tauch, W. Jäger, J. Kalinowski, G. Thierbach and A. Puhler (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**(1): 69-73.

Schaffer, S., B. Weil, V. D. Nguyen, G. Dongmann, K. Gunther, M. Nickolaus, T. Hermann and M. Bott (2001). "A high-resolution reference map for cytoplasmic and membrane-associated proteins of *Corynebacterium glutamicum*." *Electrophoresis* **22**(20): 4404-22.

Schulz, A. A., H. J. Collett and S. J. Reid (2001). "Nitrogen and carbon regulation of glutamine synthetase and glutamate synthase in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032." *FEMS Microbiol Lett* **205**(2): 361-7.

Schwacha, A. and R. A. Bender (1990). "Nucleotide sequence of the gene encoding the repressor for the histidine utilization genes of *Klebsiella aerogenes*." *J Bacteriol* **172**(9): 5477-81.

Schwarzer, A. and A. Pühler (1991). "Manipulation of *Corynebacterium glutamicum* by gene disruption and replacement." *Biotechnology (N Y)* **9**(1): 84-7.

Sedivy, J. M., F. Daldal and D. G. Fraenkel (1984). "Fructose bisphosphatase of *Escherichia coli*: cloning of the structural gene (*fbp*) and preparation of a chromosomal deletion." *J Bacteriol* **158**(3): 1048-53.

Shalon, D., S. J. Smith and P. O. Brown (1996). "A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization." *Genome Res* **6**(7): 639-45.

Shiio, I. and R. Miyajima (1969). "Concerted inhibition and its reversal by end products of aspartate kinase in *Brevibacterium flavum*." *J Biochem (Tokyo)* **65**(6): 849-59.

Shiio, I., S. Sugimoto and K. Kawamura (1990). "Effects of Carbon Source Sugars on the Yield of Amino-Acid Production and Sucrose Metabolism in *Brevibacterium-Flavum*." *Agricultural and Biological Chemistry* **54**(6): 1513-1519.

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

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

Stansen, C., D. Uy, S. Delaunay, L. Eggeling, J. L. Goergen and V. F. Wendisch (2005). "Characterization of a *Corynebacterium glutamicum* Lactate Utilization Operon Induced during Temperature-Triggered Glutamate Production." *Appl Environ Microbiol* **71**(10): 5920-8.

Strosser, J., A. Ludke, S. Schaffer, R. Kramer and A. Burkovski (2004). "Regulation of GlnK activity: modification, membrane sequestration and proteolysis as regulatory principles in the network of nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum*." *Mol Microbiol* **54**(1): 132-47.

Stülke, J. and W. Hillen (1999). "Carbon catabolite repression in bacteria." *Current Opinion in Microbiology*(2): 195-201.

Sugimoto, S. I. and I. Shiio (1987). "Regulation of 6-phosphogluconate dehydrogenase in *Brevibacterium flavum*." *Agric. Biol. Chem.* **51**: 1257-1263.

Sugimoto, S. I. and I. Shiio (1987). "Regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Brevibacterium flavum*." *Agric. Biol. Chem.* **51**: 101-108.

Sugimoto, S. I. and I. Shiio (1989). "Fructose metabolism and regulation of 1-phosphofructokinase and 6-phosphofructokinase in *Brevibacterium flavum*." *Agric. Biol. Chem. 53:1261-1268*.

Tauch, A., O. Kirchner, B. Loffler, S. Gotker, A. Puhler and J. Kalinowski (2002). "Efficient electrotransformation of *Corynebacterium diphtheriae* with a mini-replicon derived from the *Corynebacterium glutamicum* plasmid pGA1." *Curr Microbiol* **45**(5): 362-7.

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

Titgemeyer, F. and W. Hillen (2002). "Global control of sugar metabolism: a gram-positive solution." *Antonie Van Leeuwenhoek* **82**(1-4): 59-71.

Vorm, O. and M. Mann (1994). "Improved mass accuracy in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of peptides." *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **5**: 955-8.

Wendisch, V. F. (2003). "Genome-wide expression analysis in *Corynebacterium glutamicum* using DNA microarrays." *J Biotechnol* **104**(1-3): 273-85.

Wendisch, V. F., A. A. de Graaf, H. Sahm and B. J. Eikmanns (2000). "Quantitative determination of metabolic fluxes during coutilization of two carbon sources: comparative analyses with *Corynebacterium glutamicum* during growth on acetate and/or glucose." *J Bacteriol* **182**(11): 3088-96.

Wendisch, V. F., M. Spies, D. J. Reinscheid, S. Schnicke, H. Sahm and B. J. Eikmanns (1997). "Regulation of acetate metabolism in *Corynebacterium glutamicum*: transcriptional control of the isocitrate lyase and malate synthase genes." *Arch Microbiol* **168**(4): 262-9.

Wendisch, V. F., D. P. Zimmer, A. Khodursky, B. Peter, N. Cozzarelli and S. Kustu (2001). "Isolation of *Escherichia coli* mRNA and comparison of expression using mRNA and total RNA on DNA microarrays." *Anal Biochem* **290**(2): 205-13.

Wennerhold, J. and M. Bott (2006). "The DtxR Regulon of *Corynebacterium glutamicum*." *J Bacteriol* **188**(8): 2907-18.

Wennerhold, J., A. Krug and M. Bott (2005). "The AraC-type regulator RipA represses aconitase and other iron proteins from *Corynebacterium* under iron limitation and is itself repressed by DtxR." *J Biol Chem* **280**(49): 40500-8.

Wittmann, C., P. Kiefer and O. Zelder (2004). "Metabolic fluxes in *Corynebacterium glutamicum* during lysine production with sucrose as carbon source." *Appl Environ Microbiol* **70**(12): 7277-87.

Yokota, A. and N. D. Lindley (2005). Central Metabolism: Sugar uptake and Conversion. Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. L. Eggeling and M. Bott. Boca Raton, USA, CRC Press. **11**.

Zimmer, D. P., E. Soupene, H. L. Lee, V. F. Wendisch, A. B. Khodursky, B. J. Peter, R. A. Bender and S. Kustu (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**(26): 14674-9.

VII Anhang

1 Oligonukleotidsequenzen

Tabelle 16: Oligonukleotidsequenzen, die zur Amplifizierung von DNA Fragmenten, zur Sequenzierung oder zum Nachweis chromosomaler Manipulationen verwendet wurden. Eingeführte Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen und der entsprechende Enzymname hinter der Sequenz in Klammern aufgeführt. Überlappende Sequenzen der *cross-over* PCR sind durch Fettdruck hervorgehoben. Artifizielle Ribosomenbindestellen und Startcodons sind kursiv.

Primer	Basensequenz in 5' → 3' Richtung	Verwendung
Überexpression		
MalE-for	GCGTCGAC*AAGGAGATATAGAT*ATGACCAT CGACCTGCAGCG (*Sal*I)	Amplifikation des malE-Gens (for)
MalE-rev	GCGTCGACTATTGGCGCCTCGACGGG (*Sal*I)	Amplifikation des malE-Gens (rev)
310-Kom-for	GCGTCGAC*AAGGAGATATAGAT*ATGAGTG TGAAAGCACATGAATC (*Sal*I)	Amplifikation des Gens NCgl2814 (for)
310-Kom-rev	GCGTCGACCGTGTAGATCTGAAACCGC (*Sal*I)	Amplifikation des Gens NCgl2814 (rev)
310-His-for	GCCAT*ATG*AGTGTGAAAGCACATGAATC TGTC (*Nde*I)	Amplifikation von NCgl2814 zur Aufreinigung (for)
310-His-rev	GCGTCGACTTAGGCCTCGGCGGCAG (*Sal*I)	Amplifikation von NCgl2814 zur Aufreinigung (rev)
Deletion *NCgl2814*		
310-A	GCGCATGCAGGTTCCGCGGATAAACAG (*Sph*I)	Amplifikation des li. internen Fragmentes (for)
310-B	**CCCATCCACTAAACTTAAACA**TTCATGTGC TTTCACACTCATTAG	Amplifikation des li. internen Fragmentes (rev)
310-C	**TGTTTAAGTTTAGTGGATGGG**GGCTACTAC GAAGAAACCG	Amplifikation des re.internen Fragmentes (for)
310-D	GCTCTAGATTGTTTCGCGGTGAGGC (*Xba*I)	Amplifikation des re. internen Fragmentes (rev)
310-0	TCAAAGCTTTCAACGTGCC	Nachweis der Deletion (for)
310-1	GCTAGTTCGTCGTCTAGC	Nachweis der Deletion (rev)

Primer	Basensequenz in 5' → 3' Richtung	Verwendung
Gelretardierung		
312-F1	GCCACGTGGAGGATCCTTTGGG (*Bam*HI)	Amplifikation des Fragmentes 312-0 und 312-1 (for)
312-R3	CTGCCACTCGAGCTCCCCAGC (*Sac*I)	Amplifikation des Fragmentes 312-0 und 312-5 (rev)
312-R1	CCCATTTAAGCAACAGAGTTAGTTAATC	Amplifikation des Fragmentes 312-0 und 312-1 (rev)
312-F12	GCGTCCGTGGCCGTTTCC	Amplifikation des Fragmentes 312-2 (for)
312-R21	GGCGTGTCACCTTTAATTGTCAATGG	Amplifikation des Fragmentes 312-2 (rev)
312-F2	GGTAATTGGATTCGACTGTTTTCC	Amplifikation des Fragmentes 312-3 (for)
312-R2	TAAACGGGCTGAAACCGATTGG	Amplifikation des Fragmentes 312-3 (rev)
312-F22	TTACATTCTTGTGGTCTGACCATG	Amplifikation des Fragmentes 312-4 (for)
312-R31	TTTTGATCTACTGCGGTTGTCATG	Amplifikation des Fragmentes 312-4 (rev)
312-F3	TCCCGCCGTCCGTTTCAGAGAAGAGG	Amplifikation des Fragmentes 312-5 (for)
0430-for	GAAAGCTCAGAAGAAGGTCCAGAG	Amplifikation des Fragmenrtes 0430 (for)
0430-rev	GCTGGATGGGATAACGGAGGTC	Amplifikation des Fragmenrtes 0430 (rev)

2 Plasmidkarten

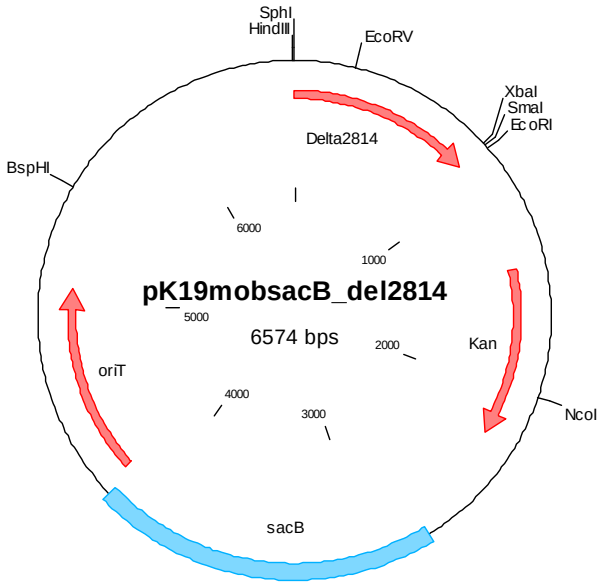

Abbildung 25: Plasmid pK19mob*sacB*_del2814 zur *in-frame* Deletion des Gens *NCgl2814.*

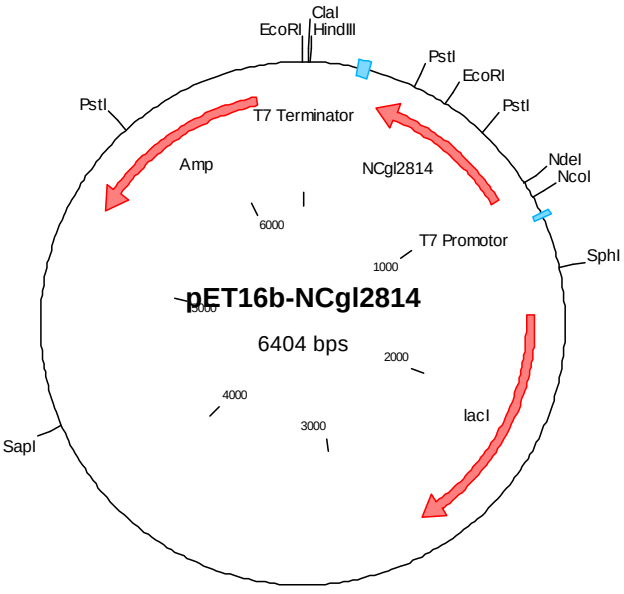

Abbildung 26: Plasmid pET16b-*NCgl2814* zur Überexpression von NCgl2814 mit einem N-terminalen His_{10}-Tag.

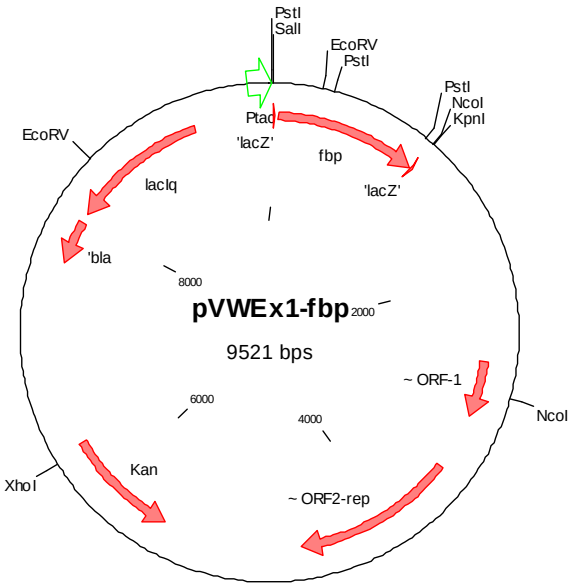

Abbildung 27: Plasmid pVWEx1-*fbp* zur homologen Überexpression des Gens für die Fruktose-1,6-Bisphosphatase.

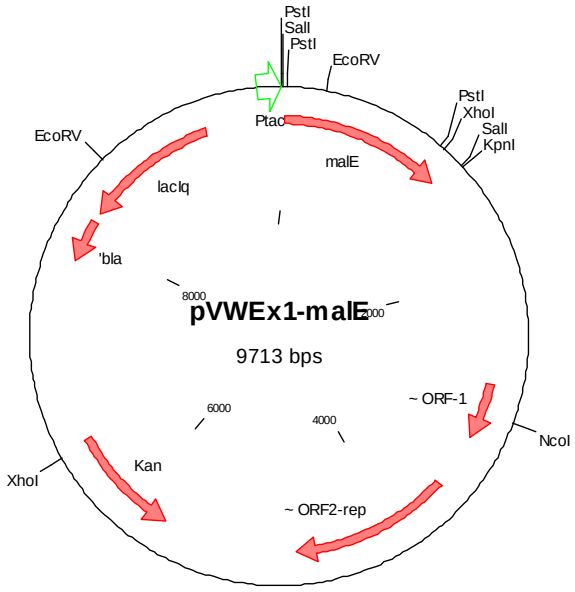

Abbildung 28: Plasmid pVWEx1-*malE* zur homologen Überexpression des Gens für Malic enzyme.

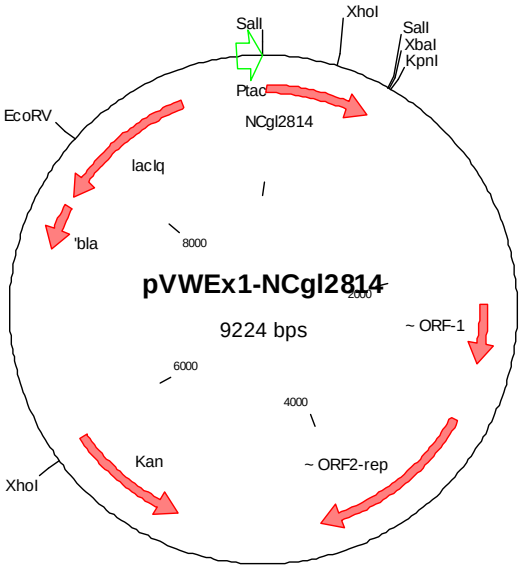

Abbildung 29: Plasmid pVWEx1-*NCgl2814* zur homologen Überexpression von NCgl2814.

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

Düsseldorf, den 01.06.2006

Tobias Georgi

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Hermann Sahm danke ich für die Überlassung des Themas und dem Interesse am Fortgang der Arbeit sowie die zur Verfügung gestellten hervorragenden Arbeitsbedingungen im Institut.

Herrn Prof Dr. Volker Wendisch danke ich für die hervorragende Betreuung während der Doktorarbeit, für die ständige Diskussionsbereitschaft und die wertvollen Ratschläge in allen wissenschaftlichen Bereichen.

Dr. Tino Polen danke ich ganz besonders für die Tätigkeit als Mentor bei der Einführung in die DNA-Chip-Technik sowie die vielen konstruktiven Diskussionen zu biologischen und auch nicht-biologischen Themen.

Doris Rittmann danke ich für die Genom-PCR von *C. glutamicum*, ohne die die DNA-Chip-Technik in Jülich nicht möglich gewesen wäre.

Ulrike Sorger, Melanie Brocker und Sarah Schaaf danke ich für die Einführung in die DNA-Affinitätschromatographie und Proteinaufreinigung.

Marcel Merfort, Christoph Bremus und Verena Werner danke ich für die konstruktiven Diskussionen in vielen fachlichen aber gerne auch mal weniger fachlichen Angelegenheiten. Beonderer Dank auch nochmal an Verena fürs Korrekturlesen.

Ich danke Corinna, Andrea, Christian, Siggi, und allen anderen schon genannten, sowie den ehemaligen Mitgliedern der AG Wendisch für das angenehme Arbeitsklima.

Ich danke meiner Freundin Yuliya und meinen Freunden Alex, Christian, Isa, Klaus, Sonja, Nadine, Peter, Marius und Maike für die Unterstützung in allen Lebenslagen.

Ich danke meinen Eltern, meinem Bruder Boris, meiner Schwägerin Helga und meinen beiden kleinen Neffen Jonas und Julian für die familiäre Unterstützung.

Und zu guter letzt danke ich all denen, die ich hätte erwähnen müssen, es aber im Eifer des Gefechts vergessen habe.