

**Funktion und Regulation
des Propionatstoffwechsels in
*Corynebacterium glutamicum***

DISSERTATION

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld

vorgelegt von
Jens Plassmeier
aus Herford

Bielefeld, im Dezember 2010

Inhaltsverzeichnis

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| I Zusammenfassung | 1 |
| II Einleitung | 2 |
| 1 Einleitung | 2 |
| 1.1 Taxonomie der Corynebakterien | 2 |
| 1.2 Biotechnologische und wirtschaftliche Relevanz der Corynebakterien | 3 |
| 1.3 Kohlenstoffmetabolismus in <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032 | 5 |
| 1.4 Essigsäure und Propionsäure als Kohlenstoffquellen in <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032 | 6 |
| 1.5 Transkriptionelle Regulation und Eigenschaften DNA-bindender Transkriptionsregulatoren | 11 |
| 1.6 <i>Profiling</i> Methoden in <i>C. glutamicum</i> | 13 |
| 1.7 Induzierbare Expressionsysteme | 14 |
| 2 Zielsetzung dieser Arbeit | 16 |
| III Material & Methoden | 17 |
| 1 Bakterienstämme und Plasmide | 17 |
| 1.1 Bakterienstämme | 17 |
| 1.2 Plasmide | 18 |
| 2 Wachstumsbedingungen und Lagerung von Bakterienstämmen | 18 |
| 2.1 <i>E. coli</i> Stämme | 19 |
| 2.2 <i>C. glutamicum</i> Stämme | 19 |
| 2.3 Nephelometrie | 19 |
| 2.4 Bestimmung des Bakterientiters | 19 |
| 2.5 Lagerung | 19 |
| 3 DNA Isolierung | 20 |
| 3.1 Isolierung von Gesamt DNA aus <i>C. glutamicum</i> | 20 |
| 3.2 Isolierung von Plasmid DNA | 20 |

| | | |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4 | PCR Methoden | 20 |
| 4.1 | PCR (Polymerasekettenreaktion) | 20 |
| 4.2 | Primer | 20 |
| 4.3 | PCR Produkt Aufreinigung | 22 |
| 4.4 | Agarose Gelelektrophorese | 22 |
| 5 | Konstruktion definierter Mutationen in <i>C. glutamicum</i> | 23 |
| 5.1 | Erstellung von Deletions- und DNA-Austauschkonstrukten mit der Gene SOEing-Methode | 23 |
| 5.2 | DNA Restriktionsspaltung | 24 |
| 5.3 | Ligation | 24 |
| 5.4 | Etablierung einer Deletion oder eines DNA Austauschs im Genom von <i>C. glutamicum</i> | 24 |
| 5.5 | Komplementation von chromosomalen Deletionen | 24 |
| 6 | DNA Transfer | 25 |
| 6.1 | Elektroporation | 25 |
| 6.2 | Herstellung kompetenter Zellen | 25 |
| 7 | Isolierung von Gesamt RNA aus <i>C. glutamicum</i> | 25 |
| 7.1 | Isolierung von Gesamt RNA | 25 |
| 7.2 | Test-PCR auf DNA Reste | 26 |
| 7.3 | RNA Konzentrationsbestimmung | 26 |
| 8 | RACE-PCR (<i>rapid amplification of cDNA ends</i>) | 26 |
| 9 | <i>Real time</i> RT-PCR | 27 |
| 10 | Microarray Hybridisierung | 27 |
| 11 | Konstruktion, Expression und Aufreinigung von PrpR | 28 |
| 11.1 | Konstruktion von PrpR mit Inteininfusion | 28 |
| 11.2 | Expression des rekombinanten PrpR Proteins | 28 |
| 11.3 | Proteinaufreinigung | 28 |
| 11.4 | Diskontinuierliche SDS-PAGE | 28 |
| 11.5 | Massenspektrometrische Analyse von reinem PrpR Protein | 29 |
| 12 | <i>Electrophoretic mobility shift assays</i> (EMSAs) | 29 |
| 13 | GC-MS Analyse | 29 |
| 13.1 | Zellernte für die GC-MS Analyse | 29 |
| 13.2 | Metabolitextraktion und Derevatisierung | 30 |
| 13.3 | GC-MS | 30 |
| 13.4 | Cluster und statistische Analysen | 30 |
| 14 | Cat Proteinmengenbestimmung | 31 |
| 15 | Aminosäureanalytik | 31 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| IV. Ergebnisse | 32 |
| 1 Charakterisierung des Propionatmetabolismus in <i>C. glutamicum</i> durch GC-MS Analysen | 32 |
| 1.1 GC-MS Analysen von <i>C. glutamicum</i> Kulturen | 32 |
| 1.2 Analyse von metabolischen Profilen von <i>C. glutamicum</i> , erhalten durch Anwendung verschiedener Erntemethoden, die sich in der <i>quenching</i> -Zeit unterscheiden | 37 |
| 1.3 Vergleich der metabolischen Profile mit Glukose oder Acetat als Kohlenstoffquelle gewachsener <i>C. glutamicum</i> Kulturen | 40 |
| 1.4 Die metabolischen Profile von <i>C. glutamicum</i> Kulturen welche mit Propionat als Kohlenstoffquelle gewachsen sind, weisen auf einen aktiven 2-Methylcitratzyklus hin | 41 |
| 1.5 Vergleichende metabolische Analysen zwischen dem <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 Wildtypstamm und den von ihm abgeleiteten Mutanten $\Delta prpC2$, $\Delta prpD2$ und $\Delta prpB2$ zeigen, dass der 2-Methylcitratzyklus auch in Kulturen aktiv ist die Acetat als Kohlenstoffquelle verwenden | 42 |
| 2 Analyse der transkriptionellen Regulation des Operons zum Abbau von Propionat in <i>C. glutamicum</i> | 45 |
| 2.1 Das <i>prpR</i> Gen aus <i>C. glutamicum</i> weist syntene Orthologe in Actinomyceten und α -Proteobakterien auf | 45 |
| 2.2 Das PrpR Regulon in <i>C. glutamicum</i> umfasst nur das <i>prpDBC2</i> Operon | 47 |
| 2.3 Eine 121 bp Region stromaufwärts von <i>prpD2</i> , die durch <i>in vivo</i> Promotor-testvektorfusionen identifiziert wurde, enthält die PrpR Bindestelle | 51 |
| 2.4 Der Metabolit 2-Methylcitrat ist der Koaktivator von PrpR | 54 |
| 2.5 Die Deletion von <i>prpR</i> im Stamm JP1 führt zu einer Verstärkung der Propionattoxizität | 55 |
| 2.6 Die An- oder Abwesenheit von PrpR beeinflusst die Metabolitkonzentrationen im 2-Methylcitratzyklus unter Propionatbedingungen | 56 |
| 3 Etablierung und biotechnologische Anwendung eines Propionat induzierbaren Expressionssystems unter Verwendung des transkriptionellen Regulators PrpR | 57 |
| 3.1 Die <i>prpD2</i> Promotor-/Operatorregion ist biotechnologisch als Expressionssystem im Produktionsmaßstab verwendbar | 57 |
| 3.2 Das <i>lysA</i> Gen kann durch das chromosomale Einbringen der <i>prpD2</i> Promotor-/Operatorregion induzierbar aus seinem Operon entkoppelt werden | 63 |
| 3.3 Chromosomal induzierbare <i>hom</i> und <i>thrB</i> Gene in einem Vorläufer Methioninproduktionsstamm leiten den Kohlenstofffluss von Lysin zu Homoserin, Threonin und Isoleucin um | 64 |

| | | |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| V | Diskussion | 68 |
| 1 | Der 2-Methylcitratzyklus und die Propionattoxizität in Bakterien | 68 |
| 2 | Die transkriptionelle Regulation des Operons für den Propionatabbau in Bakterien | 75 |
| 3 | Das PrpR basierte Expressionssystem aus <i>C. glutamicum</i> und seine Anwendung im industriellen Maßstab | 79 |
| | | |
| VI | Literatur | 83 |

I Zusammenfassung

Corynebacterium glutamicum ist in der Lage Propionat über den 2-Methylcitratzyklus zu verwerten. Um den Propionatkatabolismus auf metabolischer Ebene zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit zunächst Metabolomanalysen (*metabolic profiling*) durchgeführt. Hierzu wurde eine schnelle Erntemethode für Bakterienzellen entwickelt und die Metabolite der Zellen anschließend mit einer Kopplung aus Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS) semiquantitativ bestimmt. So konnte die Aktivität des 2-Methylcitratzyklus in *C. glutamicum* zum ersten Mal auf Metabolitebene durch Nachweis von zwei Intermediaten bestätigt werden. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der 2-Methylcitratzyklus auch in Abwesenheit von Propionat geringe Aktivität aufweist, was auf eine mögliche Funktion bei der Degradation von ungeradzahligen Fettsäuren und verzweigtkettigen Aminosäuren hinweist. Durch die Analysen wurde auch eine toxische Wirkung des Metaboliten 2-Methylcitrat auf *C. glutamicum* Zellen festgestellt.

Im Weiteren wurde der Transkriptionsregulator PrpR (Cg0800) als Aktivator der Gene des Propionatkatabolismus identifiziert. Das Regulon von PrpR, welches nur aus dem *prpDBC2* Operon besteht, konnte durch transkriptionelle Analysen charakterisiert werden. Untersuchungen verschiedener Transkriptionsfusionen in einem Promotortestvektor führten zur Bestimmung der 121 bp umfassenden Operatorregion stromaufwärts von *prpD2*, die essentiell für die Aktivierung durch PrpR ist. Durch EMSA Studien konnte 2-Methylcitrat als Koaktivator von PrpR identifiziert werden.

Auf der Basis des Regulators und seines Operators wurde ein neues Expressionssystem entwickelt und eingesetzt. Zu den Charakteristika des PrpR basierten Expressionssystems gehören eine schnelle Reaktionszeit (etwa 2 min) und hohe Induktionsraten (bis über 100 fach) nach einem Propionatpuls, sowie eine sehr geringe Propionatkonzentration (1 mg/l) die für maximale Expressionsraten ausreicht.

Abschließend wurde das Expressionssystem in das *C. glutamicum* Chromosom eingesetzt, um eine durch Propionatzugabe induzierbare Expression des Gens, welches für die Homoserindehydrogenase kodiert, zu erreichen. Durch diese Modifikation konnte der Kohlenstofffluss in einem Lysinproduktionsstamm nach einem Propionatpuls in Richtung anderer Aminosäuren umgeleitet werden. Dies führte zu einer deutlichen Steigerung der Konzentrationen der Aminosäuren Homoserin, Threonin und Isoleucin im Zellüberstand. Hierdurch konnte nachgewiesen werden, dass sich das PrpR basierte Expressionssystem für biotechnologische Zwecke im industriell relevanten Mikroorganismus *C. glutamicum* eignet.

II Einleitung

1 Einleitung

1.1 Taxonomie der Corynebakterien

Die Gattung der Corynebakterien beinhaltet Gram-positive, nichtmotile, nichtsporulierende und fakultativ anaerob bis aerob lebende Bakterien mit stäbchen- bis keulenförmiger Gestalt, welche sich durch einen hohen G+C-Gehalt der DNA auszeichnen. Erstmals wurde diese Gattung durch Lehmann und Neumann zur taxonomischen Einordnung des humanpathogenen Vertreters *Corynebacterium diphtheriae* in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* beschrieben (Jones und Collins, 1986). Phylogenetisch gesehen gehören die Corynebakterien zu den mycolsäurehaltigen Actinomyceten und sind eng verwandt mit den Mycobakterien (Nolden *et al.*, 2000). Corynebakterien weisen eine breite Diversität auf, die sich durch das Vorkommen von Mycolsäuren, dem stark schwankenden G+C-Gehalt der DNA (46 % bis 74 %) und in den verschiedenen Lebensräumen unterschiedlicher Corynebakterien widerspiegelt (Eikmanns *et al.*, 1991; Funke *et al.*, 1995). Die bisher bekannten Corynebakterien wurden sowohl aus human- und veterinärklinischen Proben isoliert, als auch aus dem Boden und aus Fäkalien, aus Käse und anderen Milchprodukten, von Gemüse oder Früchten, sowie aus Tierfutter (Eikmanns *et al.*, 1991). Aufgrund von 16S rDNA-Analysen lassen sich Corynebakterien allerdings eindeutig als monophyletische Gruppe beschreiben. Viele der zur Zeit beschriebenen 81 verschiedenen Corynebakterien Spezies sind von großem medizinischen und wirtschaftlichen Interesse (Eikmanns *et al.*, 1991; Ventura *et al.*, 2007).

Ein weiteres Merkmal ist die *snapping division*, welche während der Zellteilung auftritt und ein V-förmiges Abwinkeln der Zellen beschreibt, verursacht durch asymmetrisches Aufreißen der Zellwand (Abb. II.1). Weiterhin zeichnen sich die Corynebakterien Spezies durch eine hohe Stabilität ihrer Genome aus, eine Eigenschaft die nicht von den nah verwandten Mycobakterien geteilt wird, da sich deren Genome teilweise drastisch voneinander unterscheiden (Nakamura *et al.*, 2003). Einige der corynebakterielle Genome haben sich seit

der evolutionären Trennung von den Mycobakterien kaum verändert. Das Fehlen der *recBCD*-Gene könnte eine Erklärung für diese Syntenie sein, da diese Gene normalerweise an der Entstehung chromosomaler Inversionen beteiligt sind, und somit zur Evolution der Genome beitragen (Nakamura *et al.*, 2003).

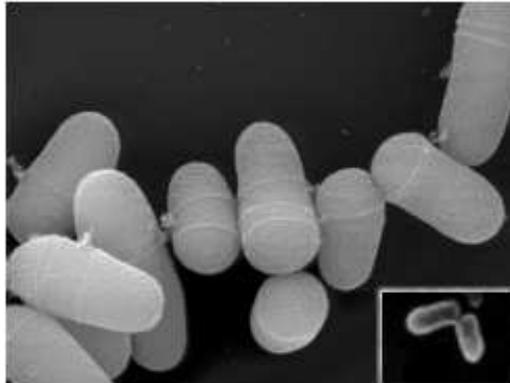


Abbildung II.1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Corynebacterium glutamicum*. Die typische Keulenform und das Abwinkeln der Zellen bei der Zellteilung (*snapping division*) sind zu erkennen. Im Kästchen unten rechts sind zwei Zellen gekennzeichnet, die nach der Zellteilung noch V-förmig miteinander verbunden sind. (Quelle: (Eggeling und Bott, 2005))

Da es innerhalb der Corynebakterien trotzdem zu einer diversen Artenbildung gekommen ist, geht man davon aus, dass dies auf den Verlust und den Zugewinn von Genen, sowie die Substitutionen einzelner Nukleotide in ihren Genomen zurückzuführen ist (Ventura *et al.*, 2007).

1.2 Biotechnologische und wirtschaftliche Relevanz der Corynebakterien

Neben den medizinisch relevanten Corynebakterien zeichnen sich andere Vertreter dieser Gattung durch ihr breites Spektrum an StoffwechsellLeistungen aus und sind dadurch von großem wirtschaftlichen Interesse. Die hier relevanten Spezies sind Boden- oder Wasserbewohner und kommen aufgrund ihrer Einordnung in die Gruppe der GRAS (*generally regarded as safe*) Organismen überwiegend in der fermentativen Produktion von Aminosäuren zum Einsatz, die als Futter- und Nahrungs- sowie als Arzneimittelzusätze verwendet werden (Schaffer *et al.*, 2001; Wohlleben *et al.*, 1993). Es gibt aber auch weitere Einsatzgebiete, in denen Corynebakterien Verwendung finden. Hierzu zählen die Herstellung und die Konversion von Steroiden in biotechnologischen Verfahren (Constantinides, 1980), sowie der Abbau halogener Kohlenwasserstoffe (Yokota *et al.*, 1987), die Klärung von Abwässern (Calabrese *et al.*, 2007) und die Käsereifung (Bonname *et al.*, 2000). Im Allgemeinen bietet die Produktion biogener Verbindungen durch Fermentation mittels Mikroorganismen verschiedene Vorteile gegenüber chemischen Syntheseverfahren, wie

beispielsweise die Reduktion des Energieverbrauchs, der Verzicht auf Entfernung von Nebenprodukten, keinem Einsatz teurer und/oder gesundheitsschädlicher Ausgangsverbindungen oder das Entfallen einer Racemattrennung.

Bereits 1957 wurde das wohl bekannteste produktionsrelevante Mitglied der Corynebakterien, *Corynebacterium glutamicum*, in einem *screening*-Verfahren für aminosäureproduzierende Mikroorganismen identifiziert, allerdings wurde es damals unter der Bezeichnung *Micrococcus glutamicus* geführt (Kinoshita *et al.*, 1957). Die Eigenschaft zur natürlichen Sekretion von Aminosäuren und die daraus resultierende Eignung von *C. glutamicum* als Aminosäureproduzent beruht auf einem *overflow*-Metabolismus, sowie begrenzten katabolischen Stoffwechselwegen zum Recycling überflüssiger Aminosäuren (Wohlleben *et al.*, 1993). Aufgrund der großen industriellen Bedeutung von *C. glutamicum* wurde die Forschung an diesem Bakterium in den letzten Jahren stark vorangetrieben, sodass eine kontinuierliche Entwicklung und Optimierung von gentechnischen Methoden für *C. glutamicum* stattfinden konnte, welche sowohl für die weitere Grundlagenforschung als auch für gezieltes *metabolic engineering* die Grundlagen schafften (Bardonnat und Blanco, 1991; Cadenas *et al.*, 1991; Eikmanns *et al.*, 1991; Kirchner und Tauch, 2003; Schafer *et al.*, 1994; Tauch *et al.*, 1995). Im Jahr 2003 wurde die Genomsequenz von *C. glutamicum* entschlüsselt (Abb. II.2) (Ikeda und Nakagawa, 2003; Kalinowski *et al.*, 2003), welche, in Kombination mit rekombinanten DNA-Transfertechniken, die Grundlage für die Konstruktion verbesserter Produktionsstämme von *C. glutamicum* bildet.

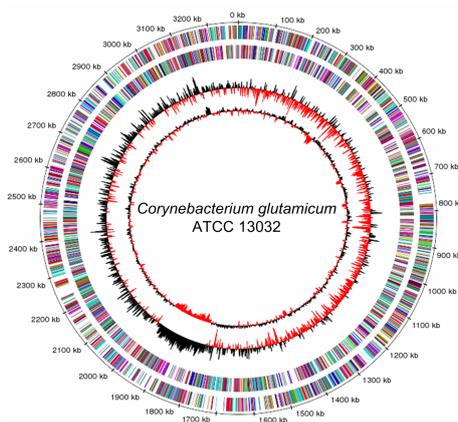


Abbildung II.2: Zirkuläre Darstellung des *C. glutamicum* Chromosoms. Die Darstellung zeigt das 3,28 Mbp große Genom von *C. glutamicum* ATCC 13032 mit drei charakteristischen Merkmalen. Die Kreise beschreiben von außen nach innen: (i) die Kodierregionen auf dem positiven DNA-Strang, (ii) die Kodierregionen auf dem negativen DNA-Strang, (iii) den GC-skew, der zur Identifizierung des *leading* und des *lagging strand* der DNA-Replikation genutzt wird und (iv) den durchschnittlichen G+C-Gehalt der DNA, wobei rote Werte negativ und schwarze Werte positiv vom Durchschnittswert abweichen.

Parallel zur Entwicklung neuer Forschungsmethoden, gab es wesentliche bioinformatische Fortschritte, die großen Beitrag zur Auswertung und Visualisierung von Daten, sowie der Vorhersage von möglichen Proteinfunktionen oder der Simulation von zellulären

Reaktionen haben. Gegenwärtig werden mit genetisch veränderten *C. glutamicum* Stämmen überwiegend die Aminosäuren L-Glutamat und L-Lysin mit einem jährlichen Gesamtvolumen von über 2 Mio t produziert (Leuchtenberger, 1996).

1.3 Kohlenstoffmetabolismus in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

Eine entscheidende Voraussetzung für die Konstruktion und Verbesserung von industriellen Aminosäureproduktionsstämmen ist die Kenntnis darüber, welche Substrate als Kohlenstoffquellen für den Organismus nutzbar sind, und welchen Einfluss sie auf den Zentralstoffwechsel bei der Gewinnung von Energie und Reduktionsäquivalenten (ATP, NADH₂, NADPH₂) und dem Aufbau biogener Verbindungen haben. Die zur Verfügung stehende Kohlenstoffquelle kann bereits Einfluss auf die produzierte Menge einer biogenen Verbindung haben (Kiefer *et al.*, 2002). Gezieltes *genetic engineering* des Zentralstoffwechsels kann dafür sorgen, dass die Bildung der Ausgangssubstanz für einen bestimmten Syntheseweg begünstigt und somit das gewünschte Produkt angereichert wird (Ikeda und Nakagawa, 2003; Ikeda *et al.*, 2006; Patnaik *et al.*, 1995).

Aufgrund seiner Lebensweise als frei lebendes Bodenbakterium ist *C. glutamicum* in der Lage eine Vielzahl von Kohlenstoffverbindungen als einzige Quelle für Kohlenstoff und Energie zu verwerten, wodurch es sich flexibel an das wechselnde Substratangebot seiner natürlichen Umgebung anpassen kann. Darüber hinaus ist *C. glutamicum* in der Lage auch Zuckeralkohole, organische Säuren (Claes *et al.*, 2002; Dominguez und Lindley, 1996; Kiefer *et al.*, 2002; Kramer *et al.*, 1990; Wendisch, 2003), den Alkohol Ethanol (Arndt *et al.*, 2008) oder das Nucleotid Uridin (Brinkrolf *et al.*, 2008) als Kohlenstoffquelle zu verwenden. Um einen effizienten Zentralstoffwechsel zu gewährleisten, haben viele Mikroorganismen Mechanismen entwickelt, um den Abbau von alternativen Kohlenstoffquellen in der Anwesenheit von Glukose oder anderen schnell verwertbaren Kohlenstoffen zu reprimieren (Brückner und Titgemeyer, 2002; Titgemeyer und Hillen, 2002). Dieser Mechanismus, bekannt als Katabolitrepression (*carbon catabolite repression*), ist in Gram-negativen Bakterien, wie *E. coli*, gut untersucht. Eine besondere Eigenschaft von *C. glutamicum* ist in diesem Zusammenhang die Fähigkeit verschiedene Kohlenstoffquellen und organische Säuren auch in Anwesenheit von Glukose zu verwerten (Wendisch *et al.*, 2000). Für *C. glutamicum* existieren bisher nur wenige Beispiele von Katabolitrepression. Diese beschränken sich auf die Repression der Glutamataufnahme bei gleichzeitigem Vorhandensein von Glukose im Wachstumsmedium (Parche *et al.*, 2001), die Repression der Gluconatgene *gntP* und *gntK* in Anwesenheit von Glukose, Fruktose und Sukrose (Mateos *et al.*, 2006) und die Repression des Alkoholdehydrogenasegens *adhA* in Gegenwart von Glukose und Acetat (Arndt *et al.*, 2008).

1.4 Essigsäure und Propionsäure als Kohlenstoffquellen in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

Neben den zuvor beschriebenen Kohlenstoffquellen ist *C. glutamicum* in der Lage sowohl Essigsäure als auch Propionsäure, beziehungsweise deren konjugierte Salze, Acetat und Propionat, zu verstoffwechseln. Acetat und Propionat sind die beiden am häufigsten auftretenden Karbonsäuren im Boden (Brock *et al.*, 2000; Chin und Conrad, 1995). Bei Wachstum mit Acetat als alleiniger Kohlenstoffquelle kommt es, bedingt durch einen erhöhten Energiemetabolismus, zu einer Abnahme der Biomasseausbeute und der spezifischen Wachstumsrate (Wendisch *et al.*, 2000), im Vergleich zu einer mit Glukose gewachsenen Kultur. Acetatkonzentrationen von über 180 mM verursachen zudem eine deutlich verlängerte Anwuchsphase und eine weitere Abnahme der Wachstumsrate (Wendisch *et al.*, 2000). Dieser inhibitorische Effekt beruht möglicherweise darauf, dass Acetat den transmembranen pH-Gradienten entkoppelt (Baronofsky *et al.*, 1984). Es konnte allerdings in *E. coli* gezeigt werden, dass Acetat die Methioninbiosynthese negativ beeinflusst (Roe *et al.*, 2002). Die Aufnahme von Acetat erfolgt mittels eines hochaffinen, protonengetriebenen, Sekundärtransporters (Jolkver *et al.*, 2009). Die anschließende Aktivierung des Acetats zu Acetyl-CoA erfolgt über die Enzyme Acetatkinase (Ack) und Phosphotransacetylase (Pta) (Abb. II.3). Das gebildete Acetyl-CoA wird in einer Kondensationsreaktion zu Citrat umgesetzt, die durch die Acetatkinase (Ack) katalysiert wird.

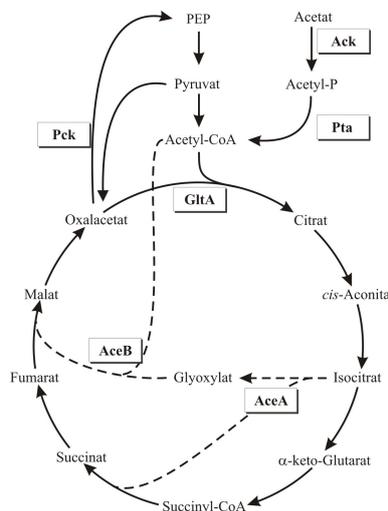


Abbildung II.3: Darstellung des Zitronensäurezyklus, der Acetataktivierung, des Glyoxylatwegs und zweier Glykolyseintermediate. Die dargestellten Enzyme sind die Acetatkinase (Ack), die Phosphotransacetylase (Pta), die Phosphoenolpyruvatkinase (Pck), die Isocitratlyase (AceA) und die Malatsynthase (AceB). PEP – Phosphoenolpyruvat

Wenn Acetat als Acetyl-CoA in den Metabolismus eingeschleust wird, und die einzige verfügbare Kohlenstoffquelle ist, verläuft der Katabolismus über den Zitronensäurezyklus,

welcher keine Nettoassimilation von Kohlenstoff erlaubt. Um die Zelle mit C₄- und C₃-Intermediaten für die Biosynthese von Zellmaterial zu versorgen, wird für das Wachstum der Glyoxylatzyklus als anaplerotischer Stoffwechselweg benötigt (Kornberg, 1966). Dieser besteht in *C. glutamicum* aus fünf Reaktionen, welche die zwei Decarboxylierungsschritte des Zitronensäurezyklus umgehen, und stellt für jedes Durchlaufen des Zyklus ein Molekül Malat aus zwei Molekülen Acetyl-CoA her. Ein Teil des Isocitrats wird durch die Isocitratlyase (AceA) in Glyoxylat und Succinat gespalten und dem Zitronensäurezyklus somit entzogen (Abb. II.3). Das entstandene Glyoxylat wird mit Acetyl-CoA in der nachfolgenden Reaktion durch die Malatsynthase (AceB) zu Malat kondensiert (Abb. II.3). Malat wird weiter umgesetzt zu Oxalacetat, das von der Zelle als Vorstufe für die vom Zitronensäurezyklus abzweigenden Aminosäuren oder für die Glukoneogenese genutzt werden kann. Wachstum auf Acetat erfordert die Bereitstellung von 3-Phosphoglycerat, sowie Hexose- und Pentosezuckern durch Glukoneogenese. Der initiale Schritt in den glukoneogenetischen Stoffwechselweg ist die Umwandlung eines Zitronensäurezyklusintermediates in Phosphoenolpyruvat. In *C. glutamicum* wird diese Reaktion von der Phosphoenolpyruvatcarboxykinase katalysiert, welche Oxalacetat in Phosphoenolpyruvat umwandelt (Abb. II.3). Bei Wachstum auf Kohlenstoffquellen die Glukoneogenese erfordern, ist dieses Enzym essentiell (Riedel *et al.*, 2001).

Propionat hat, wie Acetat, eine bakterio-statische Wirkung, weshalb es auch in der Lebensmittelindustrie als Konservierungsmittel eingesetzt wird. Trotz dieses Effekts sind diverse Mikroorganismen in der Lage Propionat als Kohlenstoffquelle zu nutzen, vorausgesetzt die Umgebungskonzentration ist nicht zu hoch (Bramer *et al.*, 2002; Brock und Buckel, 2004; Gottschalk, 1986; Horswill *et al.*, 2001a). Der resultierende Vergiftungseffekt konnte in *Aspergillus nidulans* (Brock, 2005; Brock und Buckel, 2004) und *Salmonella enterica* (Horswill *et al.*, 2001a) jeweils Metaboliten des Propionatabbauwegs zugeordnet werden. Auch für *C. glutamicum* ist eine Propionattoxizität zu beobachten (Claes *et al.*, 2002), welche besonders ausgeprägt ist, wenn Propionat als alleinige Kohlenstoffquelle angeboten wird. Es führt zu einer stark verlängerten Anwachsphase, welche bis zu sieben Tage lang sein kann. Die Länge dieser Wachstumsinhibition kann allerdings durch Zugabe einer zweiten Kohlenstoffquelle deutlich verkürzt werden (Claes *et al.*, 2002). Für den Abbau von Propionat sind verschiedene Stoffwechselwege beschrieben worden (Textor *et al.*, 1997), allerdings verläuft die Propionatdegradation in den meisten Bakterien über den 2-Methylcitratzyklus (Abb. II.4). Dieser konnte in *Salmonella enterica* mittels radioaktiv markierter Substrate als Abbauweg identifiziert (Horswill und Escalante-Semerena, 1999) und unter Verwendung aufgereinigter Enzyme *in vitro* komplett rekonstruiert werden (Horswill und Escalante-Semerena, 2001). Das auch *C. glutamicum* den 2-Methylcitratzyklus für die Propionatverwertung nutzt, wurde bereits auf transkriptioneller, sowie auf Proteinebene

nachgewiesen (Claes *et al.*, 2002; Hüser *et al.*, 2003). Zur Aufnahme von Propionat nutzt *C. glutamicum* den selben Sekundärtransporter, der auch für die Aufnahme von Acetat zuständig ist (Jolkver *et al.*, 2009) (Abb. II.4). Für die anschließende Aktivierung des Propionats zu Propionyl-CoA sind die Enzyme Acetatkinase (Ack) und Phosphotransacetylase (Pta), bei Wachstum mit Propionat als alleiniger Kohlenstoffquelle, essentiell. Bei gleichzeitiger Verwertung von Propionat und Glukose verfügt *C. glutamicum* über die Möglichkeit der Aktivierung durch eine CoA-Transferase (Cat) (Veit *et al.*, 2009). Propionyl-CoA kann auch intrazellulär bei der β -Oxidation von ungeradzahigen Fettsäuren entstehen. Das aktivierte Propionyl-CoA wird in einer Kondensationsreaktion, vermittelt durch die 2-Methylcitratsynthase (PrpC), mit Oxalacetat zu 2-Methylcitrat umgesetzt, das den ersten Metaboliten des 2-Methylcitratzyklus darstellt (Abb. II.4). Nachfolgend erfolgt die Isomerisierung von 2-Methylcitrat zu 2-Methyl-cis-Aconitat, vermittelt durch die 2-Methylcitratdehydratase (PrpD) (Abb. 1.4).

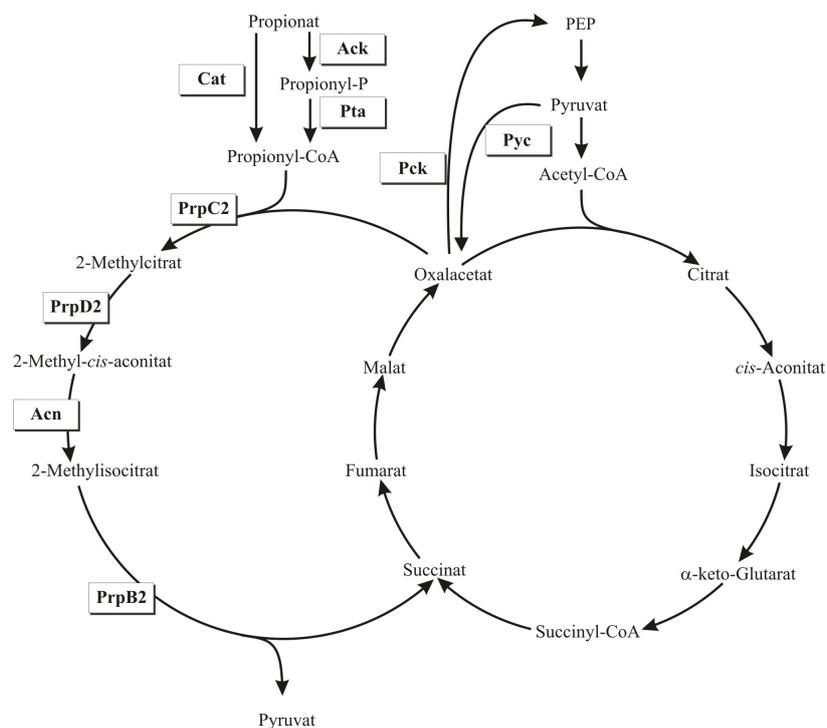


Abbildung II.4: Darstellung des 2-Methylcitratzyklus in *C. glutamicum*, welcher Propionat als Kohlenstoffquelle zugänglich macht. Ebenfalls dargestellt sind der Citratzyklus und ein Teil der Glykolyse. Auf der linken Seite der Abbildung finden sich die Intermediate und beteiligten Enzyme des 2-Methylcitratzyklus. Auf der rechten Seite sind die Metabolite des Zitronensäurezyklus dargestellt. Die beteiligten Enzyme sind die Acetatkinase (Ack), die Phosphotransacetylase (Pta), die CoA-Transferase (Cat), die 2-Methylcitratsynthase (PrpC2), die 2-Methylcitratdehydratase (PrpD2), die Aconitase (Acn), die 2-Methylisocitratlyase (PrpB2), die Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (Pck) und die Pyruvatcarboxylase (Pyc). PEP – Phosphoenolpyruvat.

Die folgende Umwandlung von 2-Methyl-cis-Aconitat zu 2-Methylisocitrat erfolgt unter Verwendung der Aconitase (Acn) (Abb. II.4), welche ebenfalls im Citratzyklus eine

entsprechende Hydratisierungsreaktion katalysiert. Beim abschließenden Schritt wird 2-Methylisocitrat in Pyruvat und Succinat gespalten; diese Reaktion wird durch die 2-Methylisocitratlyase (PrpB) vermittelt (Horswill und Escalante-Semerena, 2001) (Abb. II.4). Bei Wachstum mit Propionat als alleiniger Kohlenstoffquelle wird ein anaplerotischer Stoffwechselweg benötigt, um C4- und C3-Intermediate für Aminosäuresynthese und Glukoneogenese bereitzustellen. Der Eintritt in die Glukoneogenese erfolgt, wie beim Wachstum auf Acetat, mittels der Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (Pck) (Abb. II.4). Im Falle von Propionat wird hierbei nicht auf den Glyoxylatzyklus zurückgegriffen, wie beim Wachstum mit Acetat, sondern auf das Enzym Pyruvatcarboxylase (Pyc), welches das aus Propionat entstandene Pyruvat in Oxalacetat umwandelt (Abb. II.4). Dieses kann dann, analog zum Acetatmetabolismus, als Vorstufe für Aminosäuren und Glukoneogenese dienen.

In *C. glutamicum* wurden zwei Gencluster identifiziert, die Funktionen des Propionatabbaus katalysieren können (Claes *et al.*, 2002). Die Gencluster wurden *prpDBC1* und *prpDBC2* genannt und liegen im Genom etwa 30.800 bp von einander entfernt (Abb. II.5).

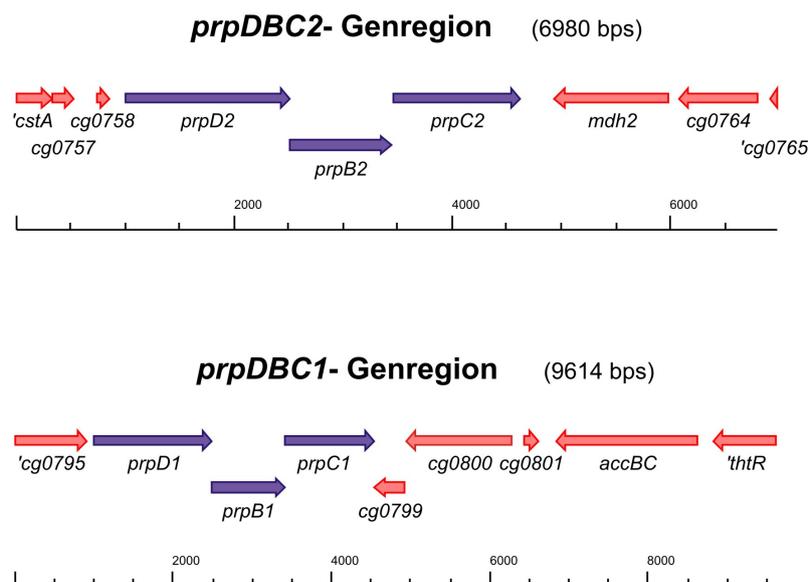


Abbildung II.5: Darstellung der genomischen Umgebung der *prpDBC1* und *prpDBC2* Gencluster. In lila sind die *prp* Gene dargestellt, rote Farbe wurde für die umliegenden Gene genutzt.

Obwohl beide Gencluster die Reaktionen des 2-Methylcitratzyklus katalysieren können, wurde nur das *prpDBC2* Gencluster als essentiell für das Wachstum mit Propionat als alleiniger Kohlenstoffquelle nachgewiesen (Claes *et al.*, 2002). Mit Hilfe von Proteingelen wurde eine starke Induktion des Genclusters *prpDBC2*, durch Propionat, nachgewiesen, während dieselbe Analyse für das *prpDBC1* Operon keine verstärkte Expression zeigt. Auf transkriptioneller Ebene wurde ebenfalls eine verstärkte Genexpression des zweiten Genclusters nachgewiesen, wenn Propionat im Medium vorhanden war, wobei hier auch das

erste Gencluster höhere Transkriptmengen aufwies. Die mRNA Menge war allerdings für *prpDBC1* geringer als für das essentielle *prpDBC2* Operon (Hüser *et al.*, 2003). Die Funktion des ersten Genclusters ist nach diesen Analysen nicht geklärt. Neben den Genen des *prpDBC2* Operon waren weitere 157 Gene zu beobachten, die bei Wachstum mit Propionat als zusätzlicher Kohlenstoffquelle, signifikant veränderte Transkriptmengen aufwiesen (Hüser *et al.*, 2003). Zu diesen gehören Gene, die in direktem Zusammenhang mit der Propionatverwertung stehen, wie zum Beispiel das *aceE* Gen, das für eine Untereinheit der Pyruvatdehydrogenase kodiert. Da Propionat nach seiner Aktivierung durch den 2-Methylcitratzyklus als Pyruvat in den zentralen Stoffwechsel einfließt, wird der Pyruvatdehydrogenasekomplex mit der Untereinheit AceE genutzt um das Pyruvat in Acetyl-CoA umzuwandeln, welches dann in den Zitronensäurezyklus eintreten kann, während das durch das Ack/Pta System aktivierte Acetat direkt als Acetyl-CoA in den zentralen Stoffwechsel einfließt. Das *pyc* Gen, welches für die Pyruvatcarboxylase kodiert, ist ebenfalls als verstärkt exprimiert identifiziert worden, wenn Propionat zusätzlich als Kohlenstoffquelle vorhanden ist (Hüser *et al.*, 2003). Hierdurch kann die entsprechende anaplerotische Reaktion, die bei Wachstum mit Acetat als Kohlenstoffquelle nicht möglich ist, verwendet werden, wenn Propionat zusätzlich als Kohlenstoffquelle auftritt. *C. glutamicum* nutzt bei einem Gemisch der Kohlenstoffquellen Acetat und Propionat nicht nur den anaplerotischen Weg über den Glyoxylatzyklus, sondern auch den über die Pyruvatcarboxylierung. Eine verstärkte Expression des Gens für die Methioninsynthase (*metE*) (Hüser *et al.*, 2003) lies sich auf einen zuvor beschriebenen wachstumsinhibierenden Effekt zurückführen, der auch bei Wachstum mit Acetat als Kohlenstoffquelle auftritt (Roe *et al.*, 2002). Dieser Effekt beruht auf einer Homocysteintoxizität, welche dazu führt, dass sich Homocystein in der Zelle ansammelt, wenn Acetat oder andere organische Säuren im Medium vorhanden sind, und das Wachstum verlangsamt. Um Homocystein in L-Methionin umzuwandeln, wird das Genprodukt von *metE*, die Methioninsynthase, benötigt. Die Zelle kann durch die verstärkte *metE* Expression den toxischen Effekt des Homocysteins vermindern (Hüser *et al.*, 2003). Eine induzierte Expression von *dtsR1* und *dtsR2* folgte aus der Erhöhung es Propionyl-CoA-Pools, da dieses entsteht direkt bei der Aktivierung von Propionat entsteht und in den 2-Methylzitracyklus einfließt (siehe Abb. II.4). Ein Zusammenhang der gesteigerten Transkription der *dtsR* Gene und der erhöhten mRNA Menge des *accBC* Gens konnte beobachtet werden. Die Genprodukte AccBC und DtsR1 bzw. DtsR2 müssen zusammen in einem Komplex vorhanden sein, um den ersten Schritt der Fettsäuresynthese katalysieren zu können (Kimura, 2002). Insgesamt wurde eine verstärkte Fettsäuresynthese vermutet werden, da auch *fasIB* (Fettsäuresynthase) und verstärkt exprimiert wurde (Hüser *et al.*, 2003). In Zellen die mit Acetat+Propionat als Kohlenstoffquelle angezogen wurden, fanden sich nur wenige Gene, die eine verringerte Transkriptmenge aufwiesen. Hierbei traten aber

zum Beispiel alle Untereinheiten der Succinatdehydrogenase auf, die durch das *sdhABCD* Gencluster kodiert werden (Hüser *et al.*, 2003). Da der Glyoxylatzyklus nur bei Wachstum mit der Kohlenstoffquelle Acetat maximal genutzt wird, führt das Vorhandensein einer zweiten Kohlenstoffquelle, wie in diesem Fall Propionat, dazu, dass der Glyoxylatzyklus weniger aktiv ist, was zu einer geringeren Succinatbildung führt. Dieses wurde auch beim Vergleich des Wachstums von Wildtypzellen, mit Glukose und Acetat als Kohlenstoffquellen, beobachtet (Wendisch *et al.*, 2000). Weiterführende Untersuchungen des Propionatmetabolismus existieren nicht, was bedeutet, dass bisher in *C. glutamicum* weder die Metabolite des 2-Methylcitratzyklus nachgewiesen, noch etwas über die Regulation der *prpDBC* Gencluster bekannt ist. Allerdings existieren Hinweise auf einen Regulator, der möglicherweise an der Expressionskontrolle des Propionatmetabolismus beteiligt ist. Dieser wurde PrpR genannt und durch Mutanten des *prpR* (*cg0800*) Gens identifiziert, welche eine erhöhte Citrat- und 2-Methylcitratsynthaseaktivität, im Vergleich zum Wildtypstamm aufweisen (Radmacher und Eggeling, 2007).

1.5 Transkriptionelle Regulation und Eigenschaften DNA-bindender Transkriptionsregulatoren

Mikroorganismen sind kontinuierlich wechselnden Umweltgegebenheiten und Stresssituationen ausgesetzt, die sich nachhaltig auf Wachstum und Zellteilung auswirken (Matic *et al.*, 2004). Im Laufe der Evolution haben sie deshalb Mechanismen entwickelt, um ihr metabolisches Gleichgewicht aufrechtzuerhalten. Diese Fähigkeit wird insbesondere bei nichtpathogenen Bakterien durch ein breites Spektrum an StoffwechsellLeistungen garantiert, das einer komplexen Regulation auf transkriptioneller Ebene unterliegt (Brinkrolf *et al.*, 2006, 2007; Ventura *et al.*, 2007). Innerhalb eines solchen Transkriptionsregulationsnetzwerks sensibilisieren regulatorische Proteine die Metabolite der Zelle, sowie die Substanzen in ihrer Umgebung und üben eine Kontrollfunktion auf die RNA-Polymerase-vermittelte Transkriptionsinitiation aus (Madan Babu und Teichmann, 2003a; Resendis-Antonio *et al.*, 2005).

In jedem Organismus gibt es unterschiedliche Gruppen regulatorischer Proteine, die an der Transkriptionskontrolle beteiligt sind. Eine wesentliche Rolle spielen dabei die DNA-bindenden Transkriptionsregulatoren (Schaffer *et al.*, 2001). Sie kontrollieren die Zellentwicklung und -differenzierung, indem sie sequenzspezifisch an die DNA binden und die Expression bestimmter Gene gezielt beeinflussen (Pabo und Sauer, 1992). Für die DNA-Bindung ist die DNA-Bindedomäne eines Transkriptionsregulators verantwortlich, die in

Bakterien überwiegend aus einem Helix-Turn-Helix-Motiv (HTH-Motiv) besteht (Pabo und Sauer, 1992; Perez-Rueda und Collado-Vides, 2000). Das HTH-Motiv setzt sich in der Regel aus zwei kurzen α -helikalen Abschnitten mit einer Länge von sieben bis neun Aminosäureresten zusammen, die durch eine β -Schleife voneinander getrennt sind (Wintjens und Rooman, 1996). Reichen diese beiden α -Helices für eine Faltung des Motivs nicht aus, können sie durch eine dritte α -Helix stabilisiert werden (Huffman und Brennan, 2002). Für eine Bindung des HTH-Motivs in der großen Furche der DNA ist die zweite α -Helix, die Erkennungshelix, verantwortlich (Huffman und Brennan, 2002). Der spezifische Kontakt zwischen Protein und DNA wird durch Aminosäureseitenketten vermittelt und über zahlreiche Wasserstoffbrückenbindungen aufrechterhalten (Pabo und Sauer, 1992). Aus Strukturanalysen geht hervor, dass Transkriptionsregulatoren zumeist als Homodimere an die DNA binden (Huffman und Brennan, 2002). Jedes HTH-Motiv erkennt dabei einen Teil einer Erkennungssequenz auf der DNA, die oft palindromisch ist, aber auch pseudopalindromisch oder repetitiv sein kann (Huffman und Brennan, 2002; Molina-Henares *et al.*, 2006). Neben der DNA-bindenden Domäne verfügen die meisten Transkriptionsregulatoren über weitere Proteindomänen. Beispielsweise werden zwei Drittel der Transkriptionsregulatoren aus *E. coli* als Zweidomänenproteine beschrieben (Madan Babu und Teichmann, 2003a). Diese Domänen binden häufig niedermolekulare Stoffe zur Aktivierung oder Inaktivierung des Proteins. Aufgrund der Position der DNA-Bindedomäne eines Transkriptionsregulators lässt sich eine erste Aussage über seine regulatorische Funktion als Aktivator oder Repressor treffen. So liegt das HTH-Motiv bei Repressoren überwiegend am N-Terminus des Proteins, während es bei Aktivatoren häufiger C-terminal lokalisiert ist (Perez-Rueda und Collado-Vides, 2000). Um die Transkriptionsinitiation eines Gens durch die RNA-Polymerase positiv oder negativ zu beeinflussen, binden Transkriptionsregulatoren über das HTH-Motiv an eine spezifische Erkennungssequenz stromaufwärts eines Zielgens, den Operator. Es gibt Repressoren, welche durch Bindung eines Signalmoleküls oder Effektors ihre Konformation ändern und so inaktiviert werden, da sie nicht mehr in der Lage sind ihre Erkennungssequenz zu binden. Im Gegensatz dazu liegen andere Repressoren ohne die Bindung eines Effektors in ihrer inaktiven Form vor und werden erst aktiviert, wenn ein geeignetes Molekül verfügbar ist. Das ist beispielsweise beim Repressor ArgR in *E. coli* der Fall, der in Anwesenheit des Effektors L-Arginin die Gene der Argininbiosynthese reprimiert (Lim *et al.*, 1987). Auch bei Transkriptionsaktivatoren unterscheidet man zwischen aktiver und inaktiver Form des Proteins. Um die Transkription des Zielgens durch die RNA-Polymerase zu ermöglichen, muss die aktive Form des Proteins an den Operator binden. Dabei kann der Aktivator inaktiv sein und durch einen Effektor aktiviert werden oder umgekehrt. Ein Beispiel für die Transkriptionsaktivierung wird durch

den Transkriptionsregulator MalT aus *E. coli* beschrieben. Das regulatorische Protein MalT muss zunächst durch die Effektoren ATP und Maltotriose aktiviert werden. Die aktive Form des Regulators ist daraufhin in der Lage, die Expression seiner Zielgene zu induzieren, die ihre Funktion in der Aufnahme und dem Abbau von Maltose- und Maltodextrin ausüben (Schaefer *et al.*, 1999). Die Funktion eines regulatorischen Proteins als Aktivator oder Repressor ist allerdings nicht immer bindend. So gibt es auch Transkriptionsregulatoren, die die Expression einzelner Gene reprimieren, während sie andere Gene aktivieren. Solche Proteine werden als duale Regulatoren bezeichnet. Häufig kann man die regulatorische Funktion eines dualen Regulators für ein bestimmtes Zielgen von der Position des entsprechenden Operators abhängig machen. Liegt die Bindesequenz stromaufwärts des Promoters wird das Gen zumeist aktiviert, während die Lage eines Operators in oder stromabwärts der Promotorregion auf eine Repression hindeutet (Madan Babu und Teichmann, 2003b). Für *C. glutamicum* wurden bereits Analysen des regulatorischen Netzwerkes durchgeführt (Brinkrolf *et al.*, 2007; Brune *et al.*, 2005). Mittels computergestützter Methoden konnten von den 3002 Kodierregionen in *C. glutamicum* 159 Gene identifiziert werden, die vermutlich als transkriptionelle Regulatoren der Genexpression fungieren. Die meisten dieser regulatorischen Proteine sind DNA-bindende Regulatoren, andere haben entweder weniger gut definierte Funktionen in der Transkriptionsregulation oder sogar noch allgemeinere Funktionen, wie z.B. Sigma-Faktoren. Eine Datenbank gestützte Rekonstruktion des regulatorischen Netzwerkes von *C. glutamicum*, erfasst 88 Transkriptionsregulatoren, die über 1001 regulatorische Interaktionen, die Expression von 627 Genen steuern (Baumbach, 2007).

1.6 Profiling Methoden in *C. glutamicum*

In den Modellorganismen *E. coli* und *Bacillus subtilis*, sind die globalen Regulationsmechanismen, die für die Nutzung von Kohlenstoff-, Energie-, Stickstoff- und Phosphorquellensteuerung zuständig sind, bereits bekannt. Mit Ausnahme der Regulation des Acetatstoffwechsels (reviewed in Gerstmeir *et al.*, 2004)) und der Stickstoffsteuerung (reviewed durch Burkovski, 2003)), ist bisher wenig über die globalen Regulationsmechanismen in *C. glutamicum* bekannt.

Um die globalen Regulationsmechanismen genauer untersuchen zu können sind für *C. glutamicum* in den letzten Jahren zahlreiche Analysemethoden entwickelt worden. Hierzu gehören vor allem Methoden die ein möglichst vollständiges Bild vom Transkriptom und Proteom abbilden.

Genomweite Expressionsanalysen mit DNA Microarrays erlauben das effiziente Identifizieren möglicher Regulons oder Stimulons. Zum Beispiel können so Gene identifiziert werden, die durch einen Regulator oder einen Stimulus gesteuert werden. Die Spezifität dieser Art der Analyse konnte zum Beispiel durch Untersuchungen zur Regulation des PTS (Phosphoenolpyruvat abhängiges Phosphotransferasesystem) in *C. glutamicum* gezeigt werden (Engels *et al.*, 2008). Hierbei konnten mit Hilfe der Durchführung eines *profiling* mittels Microarrays zahlreiche Zielgene des globalen Repressors SugR identifiziert werden. Dieses Beispiel zeigt, dass sich Microarrayanalysen hervorragend eignen um kohlenstoffabhängige Regulationsmechanismen zu untersuchen. Allerdings kann auch diese Technik schnell an ihre Grenzen stoßen, zum Beispiel wenn es um ein Hauptaugenmerk der Molekularbiologie geht, die Gen–Funktions-Korrelation. Diese wird heutzutage durch die etablierten Technologien der Transkriptomik (Lockhart *et al.*, 1996) und Proteomik (Shevchenko *et al.*, 1996) untersucht, wobei es allerdings nicht immer möglich ist, diese schwierige Aufgabe alleine durch Genexpressions- und Proteinanalysen zu lösen.

Vergleichende Messungen von Metabolitpools, welche eng korreliert sind mit einem beobachtbaren Phänotyp eines Organismus, besitzen das Potenzial unbekanntes Genfunktionen aufzuklären. Weiterhin sind Metabolomanalysen wichtig für einen echten, integrativen Ansatz zum Verständnis von lebenden Zellen durch genom-basierte Systembiologie. Technologische Fortschritte ermöglichen heutzutage die Analyse von komplexen Metabolitgemischen. *C. glutamicum* wurde bereits mit einer Reihe von Methoden metabolisch untersucht, hierzu gehören zum Beispiel *nuclear magnetic resonance spectroscopy* (NMR; (Wendisch *et al.*, 2000), *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF-MS; (Kiefer *et al.*, 2002), *high performance liquid chromatography* (HPLC; (Kiefer *et al.*, 2002), *high performance liquid chromatography-mass spectrometry* (HPLC-MS; (Magnus *et al.*, 2006) und *gas chromatography-mass spectrometry* (GC-MS; (Krömer *et al.*, 2004). Zuletzt wurde eine erste Methode zum *metabolic profiling* entwickelt (Strelkov *et al.*, 2004), welche auf einer vorher für Pflanzenmetabolite beschriebenen Analyse beruht (Fiehn *et al.*, 2000).

1.7 Induzierbare Expressionssysteme

Induzierbare Expressionssysteme sind nützliche Werkzeuge für zahlreiche Fragestellungen, wie zum Beispiel die funktionale Charakterisierung unbekannter Gene, oder die Synthese von rekombinanten Proteinen oder auch der Herstellung von Metaboliten und biotechnologischen Produkten. Eine wichtige Eigenschaft dieser Systeme ist das

Vorhandensein einer geringen oder keiner Hintergrundexpression im uninduzierten Zustand und hohe Induktionsraten bei Vorhandensein des Effektors. Für *E. coli* sind verschiedene Expressionssysteme beschrieben worden. Einer der am häufigsten genutzten Promotoren ist P_{tac} (Amann *et al.*, 1983; de Boer *et al.*, 1983), ein starker Hybridpromotor, bestehend aus der -35 Region des *trp* Promotors und der -10 Region des *lacUV5* Promotors. Die Expression ausgehend von P_{tac} wird durch das LacI Protein reprimiert. Das *lacI^q* Allel ist eine Promotormutation welche dazu führt, dass die intrazelluläre Konzentration des Repressors erhöht wird und so in einer starken Repression des P_{tac} resultiert. Befindet sich IPTG (Isopropyl- β -D-1-Thiogalactopyranosid) im Kulturmedium, so wird der LacI Repressor inaktiviert, was zu hohen Induktionsraten des Zielgens stromabwärts des P_{tac} führt. Allerdings weist dieses System auch zahlreiche Nachteile auf, welche sich vom verwendeten Induktor IPTG ableiten. Dieser ist teuer (Su *et al.*, 1990), nicht abbaubar und weist eine toxisch Wirkung auf (Figge *et al.*, 1988). Zusätzlich ist eine IPTG Kontamination von produzierten, rekombinanten Proteinen unerwünscht, sodass unter Umständen eine Reinigung notwendig ist (Figge *et al.*, 1988). Ein anderes Expressionssystem beruht auf dem Promotor des Arabinoseoperons (P_{ara}) in *E. coli* und wird kontrolliert durch den AraC Aktivator (Cagnon *et al.*, 1991). Die Expression des Promotors P_{ara} weist hohe Induktionsraten auf, wenn sich Arabinose im Kulturmedium befindet. Dagegen kommt es zu fast keiner Transkription, wenn Glukose als Kohlenstoffquelle benutzt wird und Arabinose nicht im Medium vorhanden ist (Schleif, 2000). Dies ist ein gutes Beispiel für kohlenstoffquellenabhängige Aktivierung von Genen, allerdings hat auch dieses System einen Nachteil, da es nicht in Medien nutzbar ist, die Glukose enthalten, da dieses die Arabinose abhängige Aktivierung signifikant abschwächt (Schleif, 2000). *C. glutamicum* ist ein industriell wichtiger Mikroorganismus für dessen Einsatz Expressionssysteme von großer Wichtigkeit für Forschungs- und Produktionszwecke sind. Allerdings sind native Promotoren, welche durch günstige Substanzen induzierbar sind, äußerst selten. Das auf LacI basierende Expressionssystem mit dem P_{tac} Promotor ist zwar funktional in *C. glutamicum*, weist hier aber dieselben Nachteile auf wie in *E. coli*. Abgesehen davon wurden in der letzten Zeit neue induzierbare Systeme für *C. glutamicum* beschrieben. Eines dieser Systeme basiert auf der Fusion des lambda Operators mit einem corynebakteriellen Promotor. Drei weitere Systeme nutzen kohlenstoffquellenabhängige Promotoren, im Einzelnen sind dies P_{malE1} , welcher durch Maltose induzierbar ist (Okibe *et al.*, 2010), P_{git1} , induzierbar durch Glukonat (Okibe *et al.*, 2010) und P_{araB} , der wie im *E. coli* System Arabinose induzierbar ist (Kawaguchi *et al.*, 2009). Ein weiterer kohlenstoffquellenabhängiger Ansatz für ein funktionales Expressionssystem wurde für den Promotor des *prpBCDE* Operons in *E. coli* und *Salmonella enterica* publiziert (Lee und Keasling, 2005, 2006). Die Vorteile dieses Systems sind I) eine kostengünstige Induktionssubstanz (Propionat), II) eine starke Expressionsrate, bestimmt

anhand des *green fluorescent protein* (GFP), bei hohen Propionatkonzentrationen und III) ein niedriges, basales Expressionslevel, welcher auf einer CAP-abhängigen Aktivierung des PrpR-P_{prpB} Systems beruht (Lee und Keasling, 2005). Mit diesem System war es weiterhin möglich, eine hohe Ausbeute an rekombinantem Protein zu erhalten (Lee und Keasling, 2008). Ein analoges System war bisher in *C. glutamicum* nicht möglich, da der Regulator der *prpDBC* Gene nicht bekannt war.

2 Zielsetzung dieser Arbeit

C. glutamicum ist ein Bodenbakterium, das industriell zur Gewinnung von L-Aminosäuren eingesetzt wird. Für eine stetige Verbesserung der Produktionsstämme sind das Verständnis der Stoffwechselwege, sowie deren Transkriptionsregulation von besonderem Interesse. Dabei bieten die Genomsequenz von *C. glutamicum* und die Verfügbarkeit eines Gesamtgenom-DNA-Microarrays die Möglichkeit der globalen Transkriptionsanalyse. Um die Möglichkeiten des globalen *profilings* zu erweitern soll im ersten Teil der Arbeit die Metabolomanalyse für *C. glutamicum* etabliert werden. Zu diesem Zweck soll zunächst eine Erntemethode entwickelt werden, die sich speziell für *C. glutamicum* Zellen eignet. Die Anwendung dieser Methode soll dann mit *C. glutamicum* Kulturen durchgeführt werden, welche mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen angezogen werden. Insgesamt soll im Rahmen dieser Arbeit die Analyse des Propionatmetabolismus im Vordergrund stehen. Hierzu soll versucht werden mit Hilfe von Mutanten der einzelnen *prpDBC2* Gene die Metabolite des 2-Methylcitratzyklus zu identifizieren und deren Konzentrationen unter Wachstumsbedingungen mit Propionat zu bestimmen.

Der zweite Teil der Arbeit dient der Charakterisierung des Regulators des Propionatmetabolismus in *C. glutamicum*. Mittels einer Deletions- und Komplementationsmutante werden die Auswirkungen dieser Eingriffe untersucht. Dabei sollen sowohl das Regulon, als auch der Operator an dem der Regulator bindet, identifiziert werden, als auch seine Funktionsweise.

Der dritte Teil soll klären, ob der Regulator des Propionatmetabolismus zusammen mit seiner Operatorsequenz für eine biotechnologische Anwendung als induzierbares Expressionssystem genutzt werden kann. Hierzu sind die Rahmenbedingungen zu testen unter welchen dieses System nutzbar wäre, sowie der Nachweis zu erbringen, dass dieses System mit heterologen Genen funktioniert. Abschließend soll das entwickelte Expressionssystem in einem biotechnologisch sinnvollen Kontext genutzt werden.

III Material & Methoden

1 Bakterienstämme und Plasmide

1.1 Bakterienstämme

Tabelle III.1: Verwendete Bakterienstämme.

| Bakterien | relevante Informationen | Quelle/Referenz |
|-----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| <i>E. coli</i> | | |
| <i>E. coli</i> JM109 | <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> (r_k^- , m_k^+), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>), F' <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>laqI^f</i> <i>lacZ</i> Δ M15 | (Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985) |
| <i>E. coli</i> ER2566 | F' <i>l- fhuA2 [lon] ompT lacZ::T7 gene1 gal sulA1</i> Δ (<i>mcrC-mrr</i>)144:: <i>IS10</i> R(<i>mcr-73::miniTn10-TetS</i>)2 R(<i>zgb-210::Tn10</i>)(<i>Tn10</i>) <i>endA1 [dcm]</i> | New England Biolabs |
| JP21 | <i>E. coli</i> ER2566 mit pTXB1_ <i>prpR_ex</i> | Diese Arbeit |
| <i>C. glutamicum</i> | | |
| ATCC 13032 | Wildtyp | ATCC |
| JP1 | Δ <i>prpR</i> | Diese Arbeit |
| JP2 | Δ <i>prpR</i> mit pZ8-1_ <i>prpR_ex</i> | Diese Arbeit |
| JP3 | ATCC 13032 mit pZ8-1 | Diese Arbeit |
| JP4 | ATCC 13032 mit pZ8-1_ <i>prpR_ex</i> | Diese Arbeit |
| JP5 | ATCC 13032 mit pRIM2 | Diese Arbeit |
| JP6 | ATCC 13032 mit pJP2 | Diese Arbeit |
| JP7 | ATCC 13032 mit pJP3 | Diese Arbeit |
| JP8 | ATCC 13032 mit pJP4 | Diese Arbeit |
| JP9 | ATCC 13032 mit pJP5 | Diese Arbeit |
| JP10 | ATCC 13032 mit pJP6 | Diese Arbeit |
| JP11 | ATCC 13032 mit pJP7 | Diese Arbeit |
| JP12 | ATCC 13032 mit pJP8 | Diese Arbeit |
| JP13 | ATCC 13032 mit pJP9 | Diese Arbeit |
| JP14 | ATCC 13032 mit pJP10 | Diese Arbeit |
| JP15 | ATCC 13032 mit pJP11 | Diese Arbeit |
| JP16 | ATCC 13032 mit pJP12 | Diese Arbeit |
| JP17 | ATCC 13032 mit pJP13 | Diese Arbeit |
| JP18 | ATCC 13032 mit pJPint_C_K | Diese Arbeit |
| JP19 | ATCC 13032 mit pJPex_EC_K | Diese Arbeit |
| ST06 | <i>lysC</i> ^{T311I} , <i>pyc</i> ^{P458S} , <i>hom</i> ^{Fbr} , P _{hom} ^{McbR-reg} Δ <i>metP</i> Δ <i>metNI</i> | Diese Arbeit |
| JP20 | ST06 mit P _{hom} ^{McbR-reg} Austausch gegen den <i>prpD2</i> Operator | Diese Arbeit |
| JP22 | ATCC 13032 mit Insertion des <i>prpD2</i> Operators vor <i>lysA</i> | Diese Arbeit |
| WAC5 | Δ <i>prpD2</i> | (Claes <i>et al.</i> , 2002) |
| WAC6 | Δ <i>prpB2</i> | (Claes <i>et al.</i> , 2002) |
| WAC7 | Δ <i>prpC2</i> | (Claes <i>et al.</i> , 2002) |

1.2 Plasmide

Tabelle III.2: Verwendete Plasmide.

| Plasmide | relevante Informationen | Quelle/Referenz |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| pK18 <i>mobsacB</i> | <i>sacB</i> , <i>lacZα</i> , <i>mcs</i> | Schafer <i>et al.</i> , 1994 |
| pRIM2 | promotorloses <i>cat</i> , <i>dppc</i> | Vašicová <i>et al.</i> , 1998 |
| pTXB1 | trägt eine Intein gekoppelte Chitin bindende Domäne | New England Biolabs |
| pZ8-1 | <i>P_{tac}</i> , <i>mcs</i> , KmR | Dusch <i>et al.</i> , 1999 |
| pZ8-1_ <i>prpR</i> _ex | pZ8-1:: <i>prpR</i> | Diese Arbeit |
| pTXB1_ <i>prpR</i> _ex | pTXB1:: <i>prpR</i> | Diese Arbeit |
| pJP1 | pK18 <i>mobsacB</i> mit <i>prpR</i> del | Diese Arbeit |
| pJP2 | pRIM2 mit einer Region stromaufwärts von <i>prpD2</i> (Konstrukt 2) | Diese Arbeit |
| pJP3 | pRIM2 mit einer Region stromaufwärts von <i>prpD2</i> (Konstrukt 3) | Diese Arbeit |
| pJP4 | pRIM2 mit einer Region stromaufwärts von <i>prpD2</i> (Konstrukt 4) | Diese Arbeit |
| pJP5 | pRIM2 mit dem Operator von <i>prpD2</i> (Konstrukt 5) | Diese Arbeit |
| pJP6 | pRIM2 mit einer Region stromaufwärts von <i>prpD2</i> (Konstrukt 6) | Diese Arbeit |
| pJP7 | pRIM2 mit einer Region stromaufwärts von <i>prpD2</i> (Konstrukt 7) | Diese Arbeit |
| pJP8 | pRIM2 mit einer Region stromaufwärts von <i>prpD2</i> (Konstrukt 8) | Diese Arbeit |
| pJP9 | pRIM2 mit einer Region stromaufwärts von <i>prpD2</i> (Konstrukt 9) | Diese Arbeit |
| pJP10 | pRIM2 mit einer Region stromaufwärts von <i>prpD2</i> (Konstrukt 10) | Diese Arbeit |
| pJP11 | pRIM2 mit einer Region stromaufwärts von <i>prpD2</i> (Konstrukt 11) | Diese Arbeit |
| pJP12 | pRIM2 mit <i>P_{prpD2}</i> | Diese Arbeit |
| pJP13 | pRIM2 mit <i>prpD2</i> Operator fusioniert mit einer TAT Sekretionssequenz | Diese Arbeit |
| pJP14 | pK18 <i>mobsacB</i> mit <i>P_{hom}</i> Austausch gegen den <i>prpD2</i> Operator | Diese Arbeit |
| pJP15 | pK18 <i>mobsacB</i> mit <i>prpD2</i> Operator Insertion vor <i>lysA</i> | Diese Arbeit |
| pJPint_C_K | pRIM2 mit <i>prpD2</i> Operator, verbesserter <i>mcs</i> , Δ <i>cat</i> | Diese Arbeit |
| pJPex_EC_K | pECXK99e mit Replikonaustausch von pGA1 zu pNG2; mit <i>prpD2</i> Operator, Δ <i>P_{trc}</i> , Δ <i>lacI^q</i> | Diese Arbeit |

2 Wachstumsbedingungen und Lagerung von Bakterienstämmen

Bakterienstämme und Plasmide, die für diese Arbeit verwendet und konstruiert wurden, sind in den Tabellen III.1 und III.2 aufgelistet. Alle Festmedien enthalten 1,5 % (w/v) Agar. Antibiotika werden den sterilen Medien nach dem Abkühlen aus sterilfiltrierten Stammlösungen zugegeben. Flüssigkulturen werden in Erlenmeyerkolben im Luftschüttler (Innova 4430; New Brunswick Scientific) bei 300 rpm angezogen. Im Falle von Fermentationen werden 1 l Bioreaktoren der Biostat Q Serie verwendet (Satorius Stedim). Der Sauerstoffpartialdruck beträgt 30 % und der pH Wert wird konstant bei 7 gehalten.

2.1 *E. coli* Stämme

E. coli JM109 wird bei 37 °C in Luria-Bertani-Medium (LB) (Sambrook *et al.*, 1989) oder auf LB-Agarplatten angezogen und für Standardklonierungen verwendet. Plasmidtragende *E. coli* Stämme werden mit Kanamycin (50 µg/ml) oder Ampicillin (100 µg/ml) selektiv angezogen. Für die Induktion des pTXB1 Plasmids wurde IPTG (0,5 mM) verwendet.

2.2 *C. glutamicum* Stämme

C. glutamicum Stämme werden bei 30 °C in MM1 Minimalmedium (Tauch *et al.*, 2002) mit 420 µg/l Thiamin oder auf CASO-Platten mit 50 mg/l Nalidixinsäure angezogen. Abweichungen bei der Kohlenstoffquelle sind an entsprechender Stelle angegeben. Plasmidtragende *C. glutamicum* Stämme werden selektiv mit 25 µg/ml Kanamycin angezogen.

2.3 Nephelometrie

Wachstumskurven von *C. glutamicum* werden im NEPHELOstar Galaxy (GMG Laboratories) in Zeitintervallen von 15 min aufgezeichnet. Dafür werden die zu untersuchenden Kulturen zunächst in einer Vorkultur bis zur exponentiellen Wachstumsphase angezogen und mit einer o.D.₆₀₀ = 0,01 in frisches Medium überimpft. Alle Messungen werden in sechs Replikaten durchgeführt. Darstellungen zeigen jeweils die Mittelwerte.

2.4 Bestimmung des Bakterientiters

Das Wachstum von Flüssigkulturen im Kulturkolben oder Fermenter wird im Spektralphotometer (Eppendorf) verfolgt. Dazu wird die optische Dichte der Probe bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600$ nm ermittelt. Als Referenz dient die jeweilige sterile Nährlösung. Eine o.D.₆₀₀ = 1 entspricht etwa 2×10^8 *E. coli* Zellen/ml und 1×10^9 *C. glutamicum* Zellen/ml.

2.5 Lagerung

Bakterienstämme auf Agarplatten können bei 4 °C gelagert werden. Für dauerhafte Stammkonservierungen werden Stämme als Glycerinkulturen bei –80 °C gelagert. Dazu wird eine kleine Menge Zellen von einer frischen Festmediumplatte in 300 µl LB (*E. coli*) oder LBG (mit 5 % (w/v) Glukose für *C. glutamicum*) resuspendiert und mit 900 µl sterilem 87 %igem Glycerin vermischt.

3 DNA Isolierung

3.1 Isolierung von Gesamt DNA aus *C. glutamicum*

Für eine Gesamt-DNA Isolierung aus *C. glutamicum* werden Zellen über Nacht im Schüttelkolben angezogen und anschließend durch Behandlung mit Lysozym und SDS (20 % w/v) lysiert. Durch Zugabe von Pronase E und einer anschließenden Phenolisierung werden die Proteine entfernt, bevor die DNA durch Ethanol fällung extrahiert werden kann (Tauch *et al.*, 1995).

3.2 Isolierung von Plasmid DNA

Für eine Plasmidisolierung wird der entsprechende Stamm zunächst auf Festmedium ausgestrichen und inkubiert. Die Plasmidisolierung erfolgt mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit. Die resuspendierten Zellen werden für 2 h bei 37 °C und 800 rpm inkubiert, bevor die Lyse nach dem Manual fortgesetzt wird. Plasmid-DNA wird entweder mit Puffer oder mit H₂O eluiert.

4 PCR-Methoden

4.1 PCR (Polymerasekettenreaktion)

Die Vervielfältigung von DNA-Fragmenten wird mit dem Mastercycler pro S Thermocycler (Eppendorf) auf chromosomaler DNA mit den Polymerasen Taq oder KOD durchgeführt. Im Unterschied zur Taq besitzt die KOD eine *proof-reading*-Funktion und wird für alle DNA-Fragmente eingesetzt, die für Klonierungen vorgesehen sind. Für die Reaktionsansätze und Cycling-Programme werden die Angaben der Hersteller beachtet.

- Taq (Bioline); nach Manual verwendet
- KOD (Merck); nach Manual verwendet
- dATP/dCTP/dGTP/dTTP Solution (Bioline); 100 mM

4.2 Primer

Die verwendeten Primersequenzen werden mit dem Programm Clone Manager 6.0 erstellt und von der Firma Invitrogen oder Metabion bezogen. Um das Klonieren von DNA-Fragmenten in einen Vektor zu vereinfachen, werden möglichst Primer generiert, an deren Sequenzenden Restriktionsschnittstellen angehängt sind. Um eine optimale Enzymfunktion zu gewährleisten, wird des Weiteren eine Sequenz aus sechs Basen (GATCTA) angehängt. Die Primer sind Tabelle III.3 aufgelistet.

Tabelle III.3: Verwendete Primer.

| Deletion & Komplementation | | |
|----------------------------|-------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| 1 | del <i>prpR</i> 1 | GATGTAGGATCC-ATGCGCTGATCCGACCATTG |
| 2 | del <i>prpR</i> 2 | AGGTTGTCAA-CCTGTCCAACCTCCTCAACTA |
| 3 | del <i>prpR</i> 3 | TTGACAACCTCCCGAAAAGC |
| 4 | del <i>prpR</i> 4 | CATGCGGAATTC-CGTTGTTCTCCTCGAGATCA |
| 5 | del <i>prpR</i> t1 | TCGACTTCTTCACACCACTG |
| 6 | del <i>prpR</i> t2 | ATAAGTCCGGAACCGTAACC |
| 7 | <i>prpR</i> compl. 1 | CATGCGCAATTGAAAGGAGGACAACC-ATGTCTGAAGCTTTACGCGGG |
| 8 | <i>prpR</i> compl. 2 | GATGTAGTCGAC-ATCGGCAAGGATCAGTGAGA |
| RACE-PCR | | |
| 9 | <i>prpR</i> sp1 | GGCCTCAACATCGAACACTT |
| 10 | <i>prpR</i> sp2 | GTTCCGGCGCAGTGCATTGAT |
| 11 | <i>prpD1</i> sp1 | CAATCCACCTGCACCTCAT |
| 12 | <i>prpD1</i> sp2 | AACATCCGGTGTACACTCCA |
| 13 | <i>prpD2</i> sp1 | CTGACCAATTGCCTGGTAGA |
| 14 | <i>prpD2</i> sp2 | TGCGCACTTCGTGGTTAATC |
| <i>cat</i> Fusionen | | |
| 15 | Konstrukt 2 | GGTGGTTCTAGA-TACAGTGACCTACATTGCTT |
| 16 | Konstrukt 3 | GGTGGTTCTAGA-CCAAGGAATTGGCGTTGAGG |
| 17 | Konstrukt 4 | GGTGGTTCTAGA-GCGCCGGTGGGGAGCGAAG |
| 18 | Konstrukt 5 | GGTGGTTCTAGA-CTCCAGCGTCCAAGAATATG |
| 19 | Konstrukt 6 | GGTGGTTCTAGA-GGCGCGTTGATTCTTAAGT |
| 20 | Konstrukt 7 | GGTGGTTCTAGA-ATTGCGGTGTGCATCAAGTC |
| 21 | Konstrukt 8 | GATCTAGGATCC-ATTTTGTGACCATCAAAGTGATTTTGAGTAAAACATGCAAAATCACCACC |
| 22 | Konstrukt 9 | GATCTAGGATCC-ATTTTGTGACCATCAAATAATCTCTGGGCAAGGCATACGAAGTCGCCACC |
| 23 | Konstrukt 10 | GGTGGTTCTAGA-CCCTCCAGCGTCCAAGAATATGCAACCCCCAAGGAATTGGCGT |
| 24 | Konstrukt 11 | GGTGGTTCTAGA-CCCCGCGCGCCGGTGGGGA |
| 25 | <i>prpD2</i> TSS | GATCTAGGATCC-GCACACCACACTAATTCTTT |
| 26 | pRIM2 t1 | TATGCTCCGGCTCGTATGT |
| 27 | pRIM2 t2 | GCTGAACGGTCTGGTTATAG |
| EMSA | | |
| 28 | intein 1 | GGTGGTCAT-ATGTCTGAAGCTTTACGCGGG |
| 29 | intein 2 | GGTGGTTGCTCTCCGCAGCC-GTTGAGGAGTTGGACAGGGG |
| 30 | EMSA fragment 1 | (Cy3)CTCCAGCGTCCAAGAATATG |
| 31 | EMSA fragment 2 | GCACACCACACTAATTCTTT |
| pJP13 | | |
| 32 | TAT-system <i>cat</i> 1 | CTTTGAAGT-AATGGAGAAAAAATCACTGG |
| 33 | TAT-system <i>cat</i> 2 | CCTTGTGCGCCTTGCGTATAA |
| 34 | TAT signal 1 | GATGTAGCTAAGGAAGCTAAA-ATGGCATAACGACAGTCGTTT |
| 35 | TAT signal 2 | TTTTCTCCAT-TACTTCAAAGGCCCAACCG |
| pJPint_C_K | | |
| 36 | Operator <i>prpD2</i> 1 | GCTATGACCATGATTACGCC-CTCCAGCGTCCAAGAATATG |
| 37 | Operator <i>prpD2</i> 2 | GGTGGTCTCGAGCAATTGCATATGATGCAT-AAAATCTCGTCAAGCTCGG |
| 38 | pRIM2 backbone 1 | GGTGGTCTCGAGTCTAGACTGCAGGCATGCAAGCTTGATATC-TTTTTTAAGGCAGTTATTG |
| 39 | pRIM2 backbone 2 | GGCGTAATCATGGTCATAGC |
| 40 | pRIM2 <i>prpR</i> t1 | TGGAGTGGTGAATCCGTTAG |
| 41 | pRIM2 <i>prpR</i> t2 | TTGGCGTTGAGGTGGTGATT |

| pJPex_EC_K | | |
|-------------------------|------------------------------|--------------------------------------------------|
| 42 | pEC backbone 1 | GGAAGACACAATTGGATATCCCTAGG-GGAATTCGAGCTCGGTACCC |
| 43 | pEC backbone 2 | GGGAAGACCACTAGTACGACGATGCAT-TCTACGTGTTCCGCTTCCTT |
| 44 | pEC backbone 3 | GGGAAGACCACTAGT-AAAGCCAGTCCGCAGAAACG |
| 45 | pEC backbone 4 | GGAAGACACAATTG-GCATGCCGCTTCGCCTTCGC |
| 46 | Operator <i>prpD2</i> 1 | GGTGGTGAATTC-CTCCAGCGTCCAAGAATATG |
| 47 | Operator <i>prpD2</i> 2 | GGTGGTCCTAGG-GCACACCACACTAATTCCTT |
| 48 | <i>repA</i> pBHK18 1 | CGGAAGACTCCATT-GCCTTCTTGACGAGTTCTTC |
| 49 | <i>repA</i> pBHK18 2 | CGGAAGACCGTAAT-GGTGCCTAATGAGTGAGCTA |
| 50 | pEC <i>repA</i> 1 | CGGAAGACCGAAT-GAAGCGGAACACGTAGAATGC |
| 51 | pEC <i>repA</i> 2 | CGGAAGACTCATT-TCGAAGCCGCACGTCATCTA |
| 52 | <i>repA</i> t1 | GCTAGATGACGTGCGGCTTC |
| 53 | <i>repA</i> t2 | TCTACGTGTTCCGCTTCCTT |
| pJP14 | | |
| 54 | <i>P_{hom}</i> ex1 | GATGTAGGATCC-GCCGGAGAGGTAGTAGGAGT |
| 55 | <i>P_{hom}</i> ex2 | CATATTCTTGGACGCTGGAG-TCGATTCACCTTCCCAGCTT |
| 56 | <i>P_{hom}</i> ex3 | AAAGAATTAGTGTGGTGTGC-GTACCCTTTTTGTTTTGGACACAT |
| 57 | <i>P_{hom}</i> ex4 | GATGTATCTAGA-GCCTTCAGAGCTGCGAGAAC |
| 58 | <i>P_{hom}</i> t1 | AATTCGTGGCACCTTCCTC |
| 59 | <i>P_{hom}</i> t2 | ATTGCGCCTGCAACAGCAGC |
| pJP15 | | |
| 60 | <i>P_{lysA}</i> int1 | GGTGGTTCTAGATGACCTCGTTGAAGCAATCG |
| 61 | <i>P_{lysA}</i> int2 | CATATTCTTGGACGCTGGAGTGTACATCTTCTCCGGTGC |
| 62 | <i>P_{lysA}</i> int3 | CTCCAGCGTCCAAGAATATG |
| 63 | <i>P_{lysA}</i> int4 | GGTTGTCCTCTTTCGGATTTGTCTACTCAAGC |
| 64 | <i>P_{lysA}</i> int5 | AATCCGAAAGGAGGACAACCATGGCTACAGTTGAAAATTT |
| 65 | <i>P_{lysA}</i> int6 | GGTGGTCTGCAGCGGATCAACACGTCCTGAAT |
| 66 | <i>P_{lysA}</i> t1 | TTCCACCGCTTCTACGATTC |
| 67 | <i>P_{lysA}</i> t2 | ACACCAGCGACGGTGACAAC |
| real time RT-PCR | | |
| 68 | LC <i>prpB2</i> 1 | CCGTCTCCGAACTCGAAGAT |
| 69 | LC <i>prpB2</i> 2 | CGAGCGCAGATGACGAATTG |
| 70 | LC <i>cat</i> 1 | AAGACGGTGAGCTGGTGATA |
| 71 | LC <i>cat</i> 2 | TTCACCGTAACACGCCACAT |
| 72 | LC pEC 1 | GGCTGTTTTGGCGGATGAGA |
| 73 | LC pEC 2 | CGGCGTTTCACTTCTGAGTT |
| 74 | LC <i>thrB</i> 1 | CGCTGACTCAAGAGCAGATT |
| 75 | LC <i>thrB</i> 2 | CGCAGTCGCACGAATATTGT |
| 76 | LC <i>prpR</i> 1 | ATGCGGAGTACAACATCACG |
| 77 | LC <i>prpR</i> 2 | GAGCTCTGCATGAGCAAGAA |

4.3 PCR Produkt Aufreinigung

PCR-Produkte werden mit dem QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt und entweder mit beiliegendem Puffer oder mit sterilem, bidestilliertem H₂O eluiert.

- QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen); nach Manual verwendet

4.4 Agarose Gelelektrophorese

Für die Größenanalyse von DNA-Fragmenten werden Proben in einem 1-2 %igen Agarosegel aufgetrennt und mit einem geeigneten Marker verglichen. Die Agarose wird dazu zunächst mit TA-Puffer angesetzt, aufgeköcht und in eine Gelkammer gegossen. Das Gel

wird nach dem Erkalten mit TA-Puffer überschichtet, die Proben werden mit einem BPB-haltigen Ladepuffer aufgetragen und 30 – 45 min bei 90 V aufgetrennt. Anschließend wird das Gel in einem Ethidiumbromid Bad (1 µg/ml EtBr) gefärbt und unter UV-Licht photographiert.

- 100 Bp-DNA Leiter (MBBL)
- 100 Bp-DNA Leiter, erweitert bis 5000 bp (MBBL)
- 250 BP-DNA Leiter (MBBL)

5 Konstruktion definierter Mutationen in *C. glutamicum*

5.1 Erstellung von Deletions- und DNA-Austauschkonstrukten mit der Gene SOEing-Methode

Mit Hilfe der Gene SOEing Methode wird eine Deletionen in der Kodierregion *cg0800* in der Genomsequenz von *C. glutamicum* etabliert (Lockhart *et al.*, 1996). Mit dem gleichen Verfahren ist es aber auch möglich DNA Fragmente auszutauschen. So wird der Promotor des *hom* Gens gegen die Promotor-/Operatorsequenz des *prpD2* Gens im Chromosom des Stamms *C. glutamicum* ST06 und ersetzt und der Operator des *prpD2* Gens vor *lysA* inseriert. Der Ablauf dieser Methode ist in Abbildung III.1 schematisch dargestellt. Dabei wird das Vorprodukt 1 spezifisch für jede Kodierregion mit den Primern P1 und P2 amplifiziert und das Vorprodukt 2 mit den Primern P3 und P4 (Tab. III.3). Um eine Fusion beider Vorprodukte zu gewährleisten, trägt P3 dabei am 5'-Ende einen Überhang, der komplementär zur Sequenz von P2 ist. Des Weiteren tragen die Primer P1 und P4 Restriktionsschnittstellen.

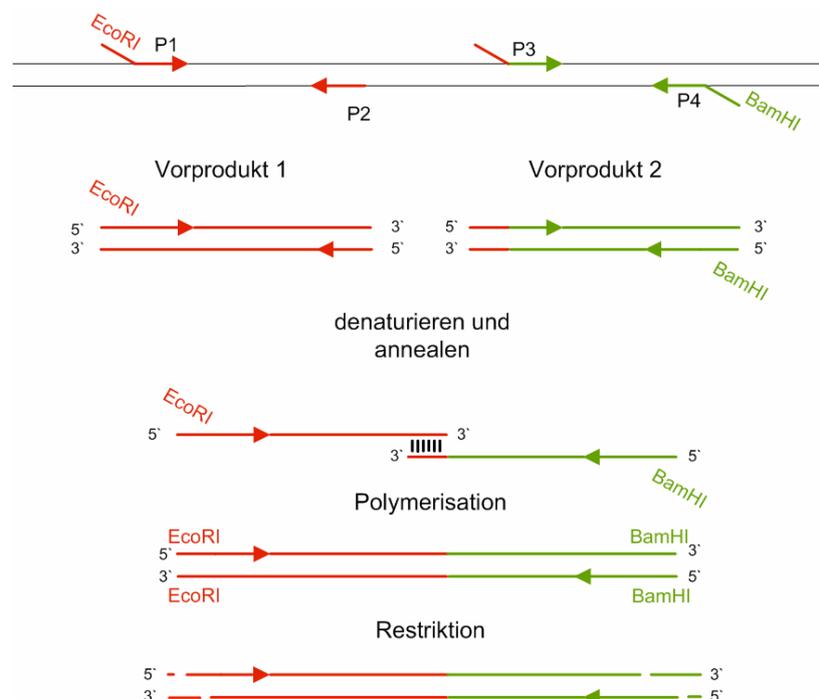


Abbildung III.1: Gene Splicing by Overlap Extension. Mit den Primern P1 und P2 sowie P3 und P4 werden zunächst zwei Vorprodukte amplifiziert. In einer zweiten PCR-Reaktion mit den Primern P1 und P4 werden diese Vorprodukte über den Sequenzüberhang an P3 zu einem Fusionsprodukt ergänzt. So erstellte Deletionskonstrukte lassen sich nach einer Restriktionsspaltung über *sticky ends* in einen entsprechend geschnittenen Shuttle Vektor klonieren.

5.2 DNA Restriktionsspaltung

Für die Klonierung der Deletions- und Operatoraustauschkonstrukte in den Shuttle-Vektor pK18*mobsacB* werden die DNA-Fragmente und der Vektor durch Restriktionsendonukleasen unter Standardbedingungen geschnitten. Nach der Restriktion wird die DNA mit dem QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt und mit beiliegendem Puffer oder mit bidestilliertem H₂O eluiert.

- Restriktionsendonukleasen (Fermentas); nach Herstellerangabe verwendet
- QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen); nach Manual verwendet

5.3 Ligation

Für die Erstellung von pK18*mobsacB* Derivaten werden die gespaltenen und aufgereinigten Deletions- und Operatoraustauschkonstrukte über die Basenüberhänge an den Schnittstellen in die *multiple cloning site* (MCS) des Vektors ligiert. Das entstehende Deletionsplasmid trägt eine *in frame* Mutation des *C. glutamicum prpR* Gens. Um die Reaktion zu beenden und den Ansatz von Salzen und Enzymen zu reinigen, werden die Ansätze mit dem QIAquick PCR Purification Kit (III.4.2) aufgereinigt. Zur Überprüfung der pK18*mobsacB* Derivate wird der aufgereinigte Ligationsansatz zunächst in elektrokompente *E. coli* Zellen transferiert (III.6.1), vermehrt und isoliert (III.2.2). Eine anschließende Restriktionsspaltung (III.5.2) gibt Aufschluss über die Beschaffenheit des Vektors.

- T4 DNA-Ligase (Fermentas); nach Herstellerangabe verwendet

5.4 Etablierung einer Deletion oder eines DNA Austauschs im Genom von *C. glutamicum*

Zur Etablierung einer Deletion, beziehungsweise eines DNA Austauschs im Genom von *C. glutamicum* wird ein pK18*mobsacB* Derivat mittels Elektroporation in elektrokompente *C. glutamicum* Zellen transferiert (III.6) und über ein doppeltes *crossover* gegen das native Gen ausgetauscht (Schafer *et al.*, 1994). Der Nachweis des Austausches erfolgt über eine PCR-Reaktion mit der Taq Polymerase (III.4.1) und Testprimern, die außerhalb der Vorprodukte 1 und 2 im Chromosom von *C. glutamicum* binden (Tab. III.3). Damit soll ausgeschlossen werden, dass der Vektor noch in der Genomsequenz integriert vorliegt. Dazu wird eine sehr kleine Menge Zellen für 5 min aufgekocht und die freigesetzte DNA als Template verwendet. Als Kontrolle dient Wildtyp DNA.

5.5 Komplementation von chromosomalen Deletionen

Für die genetische Komplementation der *cg0800* Deletion in der Mutante *C. glutamicum* JP2 wird die komplette Kodierregion mit dem nativen Promoter von *cg0800* mittels PCR mit der *proof-reading* Polymerase KOD amplifiziert (III.4.1). Das Amplifikat wird über geeignete Schnittstellen in den Shuttle Expressionsvektor pZ8-1 kloniert (III.5.3) und mittels Elektroporation in elektrokompente *C. glutamicum* JP1 Zellen transferiert (III.6). Die Primersequenzen sind in Tabelle III.3 aufgelistet.

6 DNA-Transfer

6.1 Elektroporation

Für den Transfer von Plasmid DNA mittels Elektroporation wird das zu transferierende Plasmid zunächst aufgereinigt und mit deionisiertem H₂O eluiert (III.3.2), weil Salze die Elektroporation negativ beeinflussen können. Die Elektroporation in kompetente Zellen wird wie in Tauch *et al.* beschrieben durchgeführt (Tauch *et al.*, 1994).

- *E. coli*: Pulsbedingungen: 25 µF Kapazität, 400 Ω Widerstand, 2,5 kV Spannung, Regeneration 45 min in SOC-Medium
- *C. glutamicum*: Pulsbedingungen: 25 µF Kapazität, 200 Ω Widerstand, 2,5 kV Spannung, Regeneration 60 min in BHIS-Medium

SOC-Medium

| | |
|-------------------------------------------------|---------------|
| - Trypton | 2 % (w/v) |
| - Hefeextrakt | 0,5 % (w/v) |
| - Glukose-Monohydrat | 0,4 % (w/v) |
| - NaCl | 0,06 % (w/v) |
| - KCl | 0,018 % (w/v) |
| - MgCl · H ₂ O | 0,2 % (w/v) |
| - MgSO ₄ · H ₂ O | 0,23 % (w/v) |
| in deionisiertem H ₂ O; autoklaviert | |

BHIS

| | |
|-------------------------------------------------|-------------|
| - Hirn-Herz-Bouillon | 3,7 % (w/v) |
| - Sorbitol | 9,1 % (w/v) |
| in deionisiertem H ₂ O; autoklaviert | |

6.2 Herstellung kompetenter Zellen

Für die Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen wird eine Kultur bis zur frühlogarithmischen Phase in LB-Medium angezogen und anschließend durch schnelles Abkühlen in diesem Zustand „arretiert“. Die Kultur wird mehrfach mit deionisiertem H₂O und 15 %igem Glycerin gewaschen, um die Suspension zu deionisieren. Die kompetenten Zellen werden im Anschluss aliquotiert und sind so für mehrere Monate bei –80 °C haltbar (Tauch *et al.*, 1994).

Für die Herstellung kompetenter *C. glutamicum* Zellen wird eine Kultur in CASO mit 10 % (w/v) Sorbitol bis zur frühlogarithmischen Phase angezogen und schnell abgekühlt. Für das Waschen der Kultur wird neben Glycerin auch TG Puffer verwendet. Die Stringenz des Waschens wird durch mehrfache Wiederholung erreicht (Tauch *et al.*, 2002).

7 Isolierung von Gesamt-RNA aus *C. glutamicum*

7.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus *C. glutamicum* werden etwa $7,5 \times 10^9$ Zellen aus einer exponentiell wachsenden Kultur geerntet, für 30 sek durch Zentrifugieren pelletiert und ohne Überstand in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zellpellets werden bei –80 °C gelagert. Die RNA-Isolierung erfolgt mit dem RNeasy Mini Kit. Dazu werden die gefrorenen Zellpellets zunächst in 800 µl RLT-Puffer resuspendiert und in Fast Protein Tubes (Qbiogene) im Precellys (Pepqlab) mit dem Speed-Level 6,5 in 30 sek aufgeschlossen. Abweichend vom Isolierungsprotokoll des Kits werden die Proben zwei DNase I-Behandlungen

unterzogen. Der erste Verdau mit DNase I (Roche) findet im Eppendorfgefäß statt, der zweite Verdau mit DNase I (QIAGEN) auf der Säule. Anschließend wird die RNA entsprechend des Protokolls aufgereinigt.

- DNase I recombinant, RNase-free (Roche); 10 µl DNase I + 10 µl Puffer; 1 h bei 34 °C
- RNase-Free DNase Set (QIAGEN); 1 h bei 34 °C
- RNeasy Mini Kit (QIAGEN); Manual: Version April 2006

7.2 Test-PCR auf DNA Reste

Im Anschluss an die RNA-Isolierung wird eine Test-PCR auf DNA Reste mit Taq DNA Polymerase durchgeführt (III.4.1). Dafür werden Testprimer eingesetzt, die ein etwa 250 bp großes und ein 500 bp großes Amplifikat auf *C. glutamicum* DNA erzeugen. Als Positiv-Kontrolle dient Wildtyp DNA. Wird mit den Testprimern ein Amplifikat in den RNA Proben erhalten, muss ein weiterer Verdau und eine weitere Aufreinigung durchgeführt werden.

7.3 RNA Konzentrationsbestimmung

Die RNA-Konzentration der Proben wird mit dem Nanodrop 2000 (PepLab) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Einen Hinweis auf mögliche Verunreinigungen der RNA-Proben gibt der Quotient der Absorptionen bei 260 und 280 nm (A_{260}/A_{280}). Ein Wert von $> 0,15$ deutet auf eine reine Probe hin. Für die Messung werden 2 µl Probe eingesetzt.

8 RACE-PCR (*rapid amplification of cDNA ends*)

Die Bestimmung der Transkriptionsstarts von *prpR*, *prpD1* und *prpD2* wird mit dem 5'/3' RACE PCR-Kit wie in Abbildung III.2 dargestellt durchgeführt. Als Ausgangspunkt dient dabei 1 µg Gesamt-RNA (III.7), die nach Möglichkeit eine große Menge des zu analysierenden Transkripts enthält. Für die Analyse werden jeweils zwei Primer, SP1 und SP2, generiert (Tab. III.3). SP1 bindet etwa 250 bp, SP2 etwa 200 bp hinter dem Startcodon. Die Versuchsdurchführung hält sich an das Manual des Kits. Für die PCR-Reaktionen wird KOD Polymerase verwendet (III.3.1).

Die erstellten cDNAs werden mit dem TOPO TA Cloning Kit in das Plasmid pCR2.1-TOPO inseriert und in *E. coli* TOP10 Zellen transformiert. Plasmid-DNA wird anschließend aufgereinigt (III.3.2), und die Inserts werden sequenziert (IIT Biotech, Bielefeld). Aus den Sequenzen lassen sich die Startpunkte der mRNA-Moleküle ablesen.

- TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen); Manual Version J
- 5'/3' RACE PCR-Kit, 2nd Generation (Roche Diagnostics), nach Manual verwendet

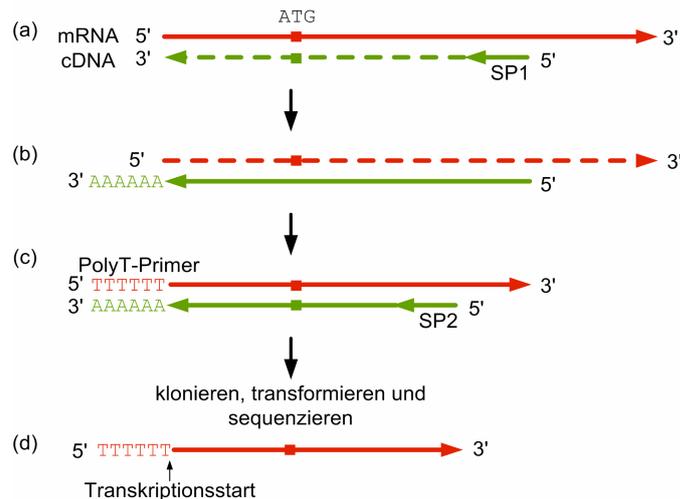


Abbildung III.2: Schematischer Ablauf der 5'-RACE-PCR. (a) Synthese der cDNA durch den Primer SP1. **(b)** Degradation der mRNA und Anheften eines PolyA-Schwanzes an die aufgereinigte cDNA. **(c)** Amplifikation der cDNA mit dem Primer SP2 und dem PolyT-Primer. **(d)** Das sequenzierte Vektorinsert enthält den Transkriptionsstart stromabwärts des PolyT-Schwanzes.

9 Real time RT-PCR

Die *real time reverse transcription* (RT)-PCR wird auf Gesamt-RNA unterschiedlicher *C. glutamicum* Stämme mit dem LightCycler (Roche Diagnostics) und dem 2x SensiMix One-Step Kit durchgeführt, um differentielle Genexpression unterschiedlicher Proben zu detektieren. Für die Analyse im LightCycler werden 250 ng Gesamt-RNA eingesetzt. Die verwendeten Primer (Tab. III.3) amplifizieren jeweils etwa 200 bp große Fragmente, die in einer Schmelzkurvenanalyse überprüft werden. Unterschiede in der Genexpression werden durch Vergleiche der *crossing points* zwischen zwei biologischen Replikaten in jeweils zwei technischen Replikaten ermittelt. Die *crossing points* werden durch die LightCycler Software 3.5 (Roche Diagnostics) ermittelt.

- PCR Applications Manual, 2nd Edition
- 2x SensiMix One-Step Kit (Quantace), nach Datenblatt

10 Microarray Hybridisierung

Für die Amplifizierung von cDNA werden 8 µg Gesamt-RNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032, *C. glutamicum* JP1 und *C. glutamicum* JP2, beziehungsweise ein Gesamt RNA Pool aus allen Stämmen eingesetzt. Der Ablauf des *labeling* und der Hybridisierung des *C. glutamicum* Microarrays wird wie bereits beschrieben durchgeführt (Rückert *et al.*, 2008). Auf einem Array sind jeweils vier Replikate eines *C. glutamicum* Gens vertreten. Die Normalisierung und Berechnung der Daten wird mit der EMMA 2.2 Software (Dondrup *et al.*, 2009) und einem *cut off* des m-Wert von ± 1 durchgeführt, was einer mehr als zweifachen Expressionsänderung entspricht. Dabei wird eine Fehlerwahrscheinlichkeit von weniger als 5 % im *students t test* zugrunde gelegt.

- ChargeSwitch PCR Clean-Up Kit (Invitrogen), modifiziert nach Manual 2005
- Centri sep Spin Columns (Princeton Separations)
- Bioscript (Bioline)

11 Konstruktion, Expression und Aufreinigung von PrpR

11.1 Konstruktion von PrpR mit Inteinfusion

Für die Konstruktion eines rekombinanten PrpR Proteins wird die Kodierregion von *cg0800* mittels PCR-Reaktion mit der KOD Polymerase amplifiziert (III.4.1). Die verwendeten Primer (Tab. 10) werden mit der PrimerDesigner Software 4 (SciEd) erstellt. Das entstehende PCR Produkt wird mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *SapI* geschnitten, aufgereinigt (III.4.2) und in den Vektor pTXB1 (New England Biolabs) kloniert (III.5.3). Das Vektor-Derivat wird mittels Elektroporation in elektrokompetente *E. coli* ER 2566 Zellen transferiert (III.6).

- *NdeI* und *SapI* (Fermentas); Ansatz nach Herstellerangabe

11.2 Expression des rekombinanten PrpR Proteins

Die Expression des rekombinanten Proteins erfolgt nach dem Manual von New England Biolabs (III.11.3). Dabei werden die Plasmid tragenden *E. coli* Zellen (JP21) bei 37 °C selektiv bis zu einer o.D.₆₀₀ zwischen 0,6 und 0,8 angezogen. Die Expression des klonierten Gens wird mit 0,5 mM IPTG induziert. Die *E. coli* Zellen werden geerntet und in 25 ml Lysepuffer (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7) resuspendiert. Für den Aufschluss des Zellextrakts wird die French Pressure Cell Press (Thermo Scientific) bei 1200 psi Druck verwendet. Der Zellextrakt wird im Anschluss bei 4 °C für 20 min zentrifugiert.

11.3 Proteinaufreinigung

Das rekombinante PrpR Protein wird wie im IMPACT Protokoll (New England Biolabs) beschrieben aufgereinigt, mit der Änderung, dass ein modifizierter Waschpuffer (20 mM Tris, 1 M NaCl) verwendet wird. Die Spaltungsreaktion des Inteins wurde bei 20 °C für 40 h durchgeführt. Die erhaltene PrpR Proteinlösung wurde mit Amicon ultra-4 10000 MWCO Zentrifugenfiltern (Millipore) aufkonzentriert.

11.4 Diskontinuierliche SDS-PAGE

Die aufgereinigten Proteineluate werden zu Analyse Zwecken in einer diskontinuierlichen SDS-PAGE aufgetrennt (Tab. III.4) (Sambrook *et al.*, 1989). Dazu werden 5 µl Probe mit Proben-Puffer für 5 min aufgeköcht und auf das Gel aufgetragen. Als Längenstandard werden 5 µl Proteinmarker aufgetragen. Die Proben werden zunächst bei 15 mA für 1 h im Sammelgel gesammelt und danach bei 30 mA im Trenngel aufgetrennt. Fertige SDS-Gele werden in Coomassie-Blue R250/G250 (BioRad) gefärbt.

- PageRule Prestained Protein Ladder (Fermentas);

Tabelle III.4: Zusammensetzung des Gels für die diskontinuierliche SDS-PAGE. Das Gel trennt Proteine in einem Bereich zwischen 15 und 60 kDa.

| Acrylamid | Trenngel 12,5 % | Sammelgel 5 % |
|------------------------------------------|-----------------|---------------|
| Acrylamid / Bisacrylamid | 2,5 ml | 0,66 ml |
| Trenngel-Tris-Puffer (1,88 M ; pH 8,8) | 1,2 ml | |
| Sammelgel-Tris-Puffer (0,625 M ; pH 6,8) | | 0,8 ml |
| deionisiertes H ₂ O | 1,1 ml | 1,74 ml |
| SDS-Lösung | 1,2 ml | 0,8 ml |
| TEMED (10 %) | 5 µl | 4 µl |
| APS-Lösung (10 %) | 60 µl | 40 µl |

11.5 Massenspektrometrische Analyse von reinem PrpR Protein

Um das aufgereinigte Protein eindeutig als PrpR zu identifizieren, wird die entsprechende Bande aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und mit modifiziertem Trypsin im Gel verdaut. Die entstehenden Fragmente des Proteins werden anschließend mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie im Ultraflex Massenspektrometer (Bruker Daltonics) und der MASCOT-Software (Perkins *et al.*, 1999) analysiert (Hansmeier *et al.*, 2006)

- Trypsin (Promega)

12 Electrophoretic mobility shift assays (EMSAs)

EMSAs werden mit Cy3 markierten Fragmenten durchgeführt. Zum einen wird ein 176 bp Promoter-/Operatorfragment von *prpD2* als Testfragment und zum anderen eine 137 bp stromaufwärts von *bioA* gelegene DNA Region als Negativkontrolle verwendet. Für die Ansätze werden 40 pmol Protein, 0,05 pmol DNA, 10 % (v/v) Glycerin und 0,06 µg Heringssperma DNA gemischt und mit Bindepuffer (10 mM Na₂HPO₄, 137 mM NaCl, 22 mM KCl; pH 7) auf 20 µl aufgefüllt. Für *band shifts* mit Effektoren wird der Ansatz mit 50 mM Citrat, 2-Methylcitrat, 2-Methylisocitrat, Propionat oder Propionyl-CoA ergänzt. Alle Ansätze werden bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert und anschließend für 40 min bei 55 V in einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt. Gele mit Cy3-markierten DNA-Fragmenten werden im Typhoon 8600 Variable Mode Imager (Amersham Bioscience Europe) gescannt. Für Verdrängungsexperimente mit unmarkierten Oligonukleotiden werden diese zu doppelsträngigen DNA Fragmenten zusammengelagert. Hierzu wird eine 10 mM Verdünnung der jeweils zusammengehörigen Oligonukleotide für 5 min bei 94 °C erhitzt und anschließend für 15 min bei Raumtemperatur abgekühlt.

13 GC-MS Analyse

13.1 Zellernte für die GC-MS Analyse

Die *C. glutamicum* Zellen werden, wenn nicht anders angegeben, nach dem Standardprotokoll geerntet. Zwei erweiterte Protokolle werden zu Testzwecken verwendet.

Standardprotokoll: 2 ml einer exponentiell wachsenden Bakterienkultur werden per Zentrifugation geerntet. Die Zellen werden in 2 ml Schraubdeckelgefäßen bei 16.100 g für 15 sek bei Raumtemperatur pelletiert und der Überstand verworfen. Die Gefäße werden im Anschluss in Flüssigstickstoff gefroren und dann lyophilisiert. Die *Quenching*-Zeit beträgt etwa 30 sek.

Erweitertes Protokoll 1: Die Zellen werden wie zuvor beschrieben durch 15 sek Zentrifugation bei Raumtemperatur bei 16.100 g geerntet. Dem Verwerfen des Überstands schließt sich ein Waschschrift mit 1 ml bidest. Wasser an. Die Zellen werden dann erneut 15 sek bei Raumtemperatur bei 16.100 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Gefäße werden in Flüssigstickstoff gefroren und anschließend lyophilisiert.

Erweitertes Protokoll 2: Die Kulturen werden aus dem Schüttler entfernt und für 60 sek außerhalb bei Raumtemperatur gelagert. Danach folgt die Ernte wie im erweiterten Protokoll1 beschrieben.

13.2 Metabolitextraktion und Derevatisierung

Die Extraktion erfolgt wie zuvor beschrieben (Roessner *et al.*, 2000). 1 ml 80 % Methanol, das 10 µM Ribitol (interner Standard) enthält, wird zusammen mit 0,5 g säuregewaschenen Glaskügelchen, der lyophilisierten Probe zugesetzt. Die Proben werden dann im Precellys (Peqlab) mit dem *speed*-Level 6,5 in 45 sek aufgeschlossen. Nach einer Zentrifugation bei 18.500 g für 20 min bei Raumtemperatur wird der Überstand überführt und in einem Stickstoffstrom bis zur vollständigen Trockenheit verdampft. Die Methoximierung der Carbonylreste wird für 90 min bei 37 °C unter konstantem Rühren durchgeführt. Für die Reaktion wird eine 20 mg/ml Lösung von Methoxylaminehydrochlorid in Pyridin genutzt. Azidische Protonen werden durch Trimethylsilylgruppen geschützt, durch Behandlung mit 50 µl *N*-Methyl-*N*-[Trimethylsilyl]-Trifluoroacetamid bei 37 °C für 30 min.

- säuregewaschene Glaskügelchen (Sigma-Aldrich)
- Methoxylaminehydrochlorid (Sigma-Aldrich)
- Pyridin (Sigma-Aldrich)
- *N*-Methyl-*N*-[Trimethylsilyl]-Trifluoroacetamid (Sigma-Aldrich)

13.3 GC-MS

Die GC-MS Analyse wird mit einem TraceGC Gaschromatograph und einem PolarisQ Ionenfallenmassenspektrometer (Thermo Finnigan) durchgeführt. Proben werden mit einem Volumen von 1 µl bei 250 °C ohne *split* injiziert. Der Gaschromatograph ist mit einer 30 m x 0,25 mm Equity-5 Säule ausgestattet, die eine 0,25 µm 5 % Diphenyl/ 95 % Dimethylsiloxan Beschichtung (Supelco) trägt. Die Eingangstemperatur liegt bei 250 °C und die Ionenquellentemperatur beträgt 200 °C. Helium wird als Trägergas mit einem konstanten Fluss von 1 ml/min verwendet. Nach dem Heizen des Ofens für 3 min mit 80 °C, wird die Temperatur in Schritten von 5 °C/min auf 325 °C erhöht. Um das System für die folgende Injektion zu equilibrieren wird die Temperatur für 5 min bei 80 °C gehalten. Die Massenspektren werden mit einer Rate von 2 Scans/sek in einem Bereich von 50 bis 500 m/z aufgenommen. Die Evaluation der Chromatogramme erfolgt mit dem Xcalibur 2.0 Programm (Thermo Finnigan). Metabolite werden durch Vergleich mit der NIST 98 Datenbank (NIST) und Reinsubstanzen identifiziert. Eine automatische *peak*-Quantifizierung ausgewählter Metabolite wird im Rahmen der Xcalibur Auswertung verwendet. Für virtuelle Fragmentierungen wird das Programm Mass Frontier 2.0 genutzt.

13.4 Cluster und statistische Analysen

Die hierarchische Clusteranalyse (HCA) wird mit dem Pirouette 3.02 Programm (Infometrix), wie bereits zuvor beschrieben (Fiehn *et al.*, 2000), durchgeführt. Die HCA erlaubt die Darstellung von Clustern in einem Dendrogramm, in welchem die Ähnlichkeit von zwei Proben über die Distanz zur Achse, in der sie in ein einzelnes Cluster münden, bestimmt werden kann. Der *t*-test Algorithmus von Excel (Microsoft) wird verwendet, um signifikant veränderte Poolgrößen zu identifizieren.

14 Cat Proteinmengenbestimmung

Um die Menge an Cat Protein zu bestimmen wird ein kommerzieller Cat-ELISA Test verwendet. Die Durchführung erfolgte wie in der Anweisung beschrieben.

- Cat ELISA (Roche), Manual August 2008

15 Aminosäureanalytik

Die Aminosäureanalyse wird mittels OPA-Vorsäulenderivatisierung in zellfreiem Medium durchgeführt. Trennung und Quantifizierung von Aminosäuren erfolgt durch eine HPLC (Knauer). Zur Derivatisierung werden die 200 µl Medium zunächst mit 800µl Methanol gemischt. Zu 250 µl dieser Lösung werden 100 µl Boratpuffer (0,5 M, pH 8,5), 50 µl OPA-Thiol-Lösung (1 % OPA (m / v), 90,5 % Methanol (v / v), 9,5 % Boratpuffer (0,5 M, pH 8,5), 1 % 2-Mercaptoethanol und 20 µl HCl (0,75 N) gegeben. Anschließend wird ein einminütiger Inkubationsschritt durchgeführt. 20 µl der derivatisierten Aminosäurelösung wird in die HPLC injiziert. Als mobile Phase werden Acetat/Methanol-Lösungen verwendet (Puffer A: 50 mM Acetat (pH 7,1), 19 % Methanol; Puffer B: 50 mM Acetat (pH 7,1), 75 % Methanol). Ein Gradientenlauf mit diesen Lösungen wird durchgeführt, um die Aminosäuren mit einer 300 mm x 5 mm dsaf Säule (Waters) zu trennen. Der Lauf beginnt mit 100 % Puffer A Lösungen für 25 Minuten und wechselt innerhalb von 60 min auf 100 % Puffer B.

IV. Ergebnisse

1 Charakterisierung des Propionatmetabolismus in *C. glutamicum* durch GC-MS Analysen

1.1 GC-MS Analysen von *C. glutamicum* Kulturen

Für die GC-MS Analysen von *C. glutamicum* musste zuerst eine zuverlässige und reproduzierbare Erntemethode etabliert werden. Im Rahmen der Methodenentwicklung war es ebenfalls wichtig die biologische und technische Reproduzierbarkeit der erhaltenen Ergebnisse zu überprüfen und die Daten im Kontext bisheriger Methoden zu betrachten. Das Standardprotokoll soll hier zuerst dargestellt werden, da sich die anderen verwendeten Methoden von ihm ableiten. Nach diesem Protokoll werden 2 ml einer exponentiell wachsenden Kultur von *C. glutamicum* durch Zentrifugation geerntet, wobei die entsprechenden Kulturen in Minimalmedium MM1 (Tauch *et al.*, 2002) mit Glukose als Kohlenstoffquelle angezogen wurden. Dazu werden die Zellen in 2 ml Röhrchen für 15 Sekunden bei 16.100 *g* und Raumtemperatur pelletiert. Direkt nach dem Zentrifugationsschritt werden die Zellen ohne Überstand in Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend lyophilisiert. Die Ernte dieser Zellen dauerte etwa 30 sek bis zur Inaktivierung der Enzyme (dem *quenching*) und führte zu reproduzierbaren metabolischen Profilen.

Um die relativen Metabolitmengen der verschiedenen Extrakte vergleichen zu können, wurden die *peak*-Flächen der charakteristischen Ionenspuren jedes Metaboliten auf die des internen Standards Ribitol normalisiert. Nach Dekonvolution der Chromatogramme mittels des AMDIS Programms (Halket *et al.*, 1999) wurden rund 300 verschiedene Stoffe nachgewiesen. Von diesen konnten 74 Substanzen eindeutig über Referenzsubstanzen identifiziert werden (Tab. IV.1.1). Zu den identifizierten Stoffen gehören 28 Aminosäuren, 11 Zucker oder Zuckerphosphate, 23 organische Säuren, sowie 12 weitere Substanzen. Die lipophile Phase konnte mit der entwickelten Methode aufgrund der methanolischen Extraktion nicht analysiert werden. Darüber hinaus konnten einige Zwischenprodukte der

Glykolyse (Glycerinaldehyd-3-P, Fruktose-1,6-bis-P, 1,3-bis-P-Glycerat) und des Zitronensäurezyklus (cis-Aconitat, Oxalacetat) ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 1.1: Über Reinsubstanzen nachweisbare Metabolite.

| Aminosäuren | Zucker & Zuckerphosphate | Organische Säuren | Weitere |
|-----------------------|-------------------------------------|---------------------------|----------------|
| 4-Aminobutyrat | Arabinose | 2-Hydroxyglutarat | Adenosin |
| 5-Methyl-Thioadenosin | Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) | 2-Isopropylmalat | Gluconat |
| Adenin | Fruktose | 2-Ketoisocaproat | Gluconat-6-P |
| Alanin | Fruktose-6-P | 2-Methylcitrat | Myo-Inositol |
| Arginin | Glukose | 2-Methylisocitrat | Myo-Inositol-P |
| Asparagin | Glukose-6-P | α -Glycerophosphat | Pinitol |
| Aspartat | Ribitol | α -Ketoglutarat | Putrescin |
| β -Alanin | Ribose | Citrat | Spermin |
| Cystein | Ribose-5-P | Fumarat | Thymin |
| Diaminopimelat | Sukrose | Glucuronsäure | Uracil |
| Glutamat | Trehalose | Glycerat | Harnstoff |
| Glutamin | | Glycerat-2-P | |
| Glycin | | Glycerat-3-P | |
| Homocystein | | Isocitrat | |
| Homoserin | | Lactat | |
| Isoleucin | | Malat | |
| L,L-Cystathionin | | Maleinsäure | |
| Leucin | | Phosphoenolpyruvat (PEP) | |
| Lysin | | Pyruvat | |
| Methionin | | Salicylsäure | |
| N-Acetyl-L-Serin | | Shikimat | |
| O-Acetyl-L-Homoserin | | | |
| O-Acetyl-L-Serin | | Succinat | |
| Ornithin | | | |
| Panthotenat | | | |
| Phenylalanin | | | |
| Prolin | | | |
| Serin | | | |
| Threonin | | | |
| Tryptophan | | | |
| Tyrosin | | | |
| Valin | | | |

Der Grund hierfür könnte sein, dass die nicht enzymgebundenen Zwischenprodukte in zu geringen Konzentrationen vorliegen. Die Analyse war darüber hinaus nicht in der Lage Succinyl-CoA, ein weiteres Zwischenprodukt des Zitronensäurezyklus, zu identifizieren. Dies liegt wahrscheinlich an dessen zu hohem Molekulargewicht (MW 867,64 g/mol⁻¹), da es eine deutlich höhere Masse aufweist, als das größte Molekül das gemessen werden konnte (S-Adenosyl-Homocystein (SAH); MW 384,41 g/mol⁻¹).

Um die technische Reproduzierbarkeit der GC-MS Messungen zu testen wurde eine metabolische Probe von *C. glutamicum* verwendet, die zehnmal hintereinander ins CG-MS

Instrument injiziert und analysiert wurde. Von insgesamt 61 getesteten Metabolitpools ließen sich neun mit einer relativen Standardabweichung zwischen 10 % und 12 % messen, 33 wiesen eine relative Standardabweichung von weniger als 10 % auf, und zwölf Metabolite konnten mit einer relativen Standardabweichung von unter 5 % gemessen werden. Die durchschnittliche relative Standardabweichung, gemittelt über alle Metabolite, betrug 7,6 % (Tab. IV.1.2). Dieser Wert liegt dicht an dem relativen Fehler von 6 %, der in einer vorherigen Studie für GC-MS Anwendungen von *C. glutamicum* beschrieben wurde (Strelkov *et al.*, 2004).

Tabelle 1.2: Relativer Fehler der Metabolitmessung bei zehn Injektionen derselben Probe.

| Aminosäuren | Mittelwert (n=10) | Standardabweichung | rel. Fehler (%) | Pentose-Phosphat-Zyklus | Mittelwert (n=10) | Standardabweichung | rel. Fehler (%) |
|-------------------------|-------------------|--------------------|-----------------|-------------------------|-------------------|--------------------|-----------------|
| O-Acetyl-L-Homoserin | 0,64 | 5,5E-02 | 8,6 | Gluconate-6-P | 0,08 | 7,7E-03 | 9,3 |
| O-Acetyl-L-Serin | 0,22 | 1,2E-02 | 5,7 | Erythrose-4-P | 0,17 | 2,3E-02 | 13,3 |
| β-Alanin | 1,71 | 1,6E-01 | 9,4 | Ribose-5-P | 4,80 | 4,5E-01 | 9,4 |
| L-Alanin | 1,19 | 9,1E-02 | 7,6 | Shikimat | 3,72 | 1,2E-01 | 3,1 |
| L-Asparagin | 0,04 | 2,5E-03 | 6,1 | DNA/RNA Basen | Mittelwert (n=10) | Standardabweichung | rel. Fehler (%) |
| L-Aspartat | 22,66 | 1,1E+00 | 5,0 | Adenin | 0,03 | 3,6E-03 | 11,7 |
| L-Cystein | 0,04 | 3,3E-03 | 9,5 | Adenosin | 0,01 | 1,6E-03 | 11,1 |
| L-Glutamat | 25,90 | 1,5E+00 | 5,8 | Thymin | 0,22 | 1,8E-02 | 8,2 |
| L-Glutamin | 0,06 | 3,7E-03 | 5,9 | Uracil | 0,65 | 2,8E-02 | 4,4 |
| L-Glycin | 10,05 | 3,9E-01 | 3,9 | Zitronensäurezyklus | Mittelwert (n=10) | Standardabweichung | rel. Fehler (%) |
| L-Homocystein | 0,02 | 1,5E-03 | 9,7 | Citrat | 0,75 | 3,2E-02 | 4,3 |
| L-Homoserin | 0,51 | 3,3E-02 | 6,4 | Isocitrat | 0,66 | 5,9E-02 | 8,8 |
| L-Isoleucin | 4,26 | 4,2E-01 | 9,8 | α-Ketoglutarat | 1,70 | 6,3E-02 | 3,7 |
| L-Leucin | 0,94 | 7,4E-02 | 7,9 | Succinat | 5,90 | 4,6E-01 | 7,9 |
| L-Phenylalanin | 0,03 | 4,0E-03 | 11,8 | Fumarat | 0,43 | 3,8E-02 | 8,9 |
| L-Lysin | 6,64 | 9,2E-01 | 13,9 | Malat | 2,55 | 1,5E-01 | 6,1 |
| L-Methionin | 0,60 | 4,7E-02 | 7,9 | Zucker | Mittelwert (n=10) | Standardabweichung | rel. Fehler (%) |
| L-Prolin | 2,97 | 2,6E-01 | 8,9 | Glukose | 339,59 | 1,7E+01 | 4,9 |
| L-Serin | 0,26 | 2,1E-02 | 8,1 | Fruktose | 2,93 | 1,0E-01 | 3,5 |
| L-Threonin | 1,58 | 1,3E-01 | 8,0 | Sukrose | 13,75 | 4,5E-01 | 3,3 |
| L-Valin | 21,65 | 1,5E+00 | 6,7 | Trehalose | 459,36 | 1,2E+01 | 2,6 |
| L,L-Cystathionin | 0,11 | 9,9E-03 | 8,7 | Weitere | Mittelwert (n=10) | Standardabweichung | rel. Fehler (%) |
| Ornithin | 0,17 | 2,0E-02 | 11,8 | 2-Hydroxyglutarat | 0,35 | 2,3E-02 | 6,7 |
| Glykolyse | Mittelwert (n=10) | Standardabweichung | rel. Fehler (%) | 2-Isopropylmalat | 4,26 | 2,0E-01 | 4,8 |
| Glulose-6-P | 33,83 | 1,8E+00 | 5,3 | 2-Methylcitrat | 0,22 | 2,5E-02 | 11,3 |
| Fruktose-6-P | 10,82 | 6,0E-01 | 5,6 | α-Glycerophosphat | 37,99 | 1,9E+00 | 5,0 |
| Fruktose-1,6-bis-P | 0,07 | 8,3E-03 | 11,6 | Glucuronsäure | 0,52 | 3,4E-02 | 6,5 |
| Dihydroxyacetonphosphat | 0,02 | 2,2E-03 | 9,8 | Gluconat | 0,41 | 3,7E-02 | 8,9 |
| Glyceraldehyd-3-P | 0,62 | 7,3E-02 | 11,9 | Glycerat | 0,33 | 3,1E-02 | 9,3 |
| Glycerat-3-P | 0,44 | 2,1E-02 | 4,9 | Harnstoff | 20,43 | 2,0E+00 | 9,9 |
| Glycerat-2-P | 0,24 | 1,9E-02 | 8,2 | Myo-Inositol | 0,81 | 7,8E-02 | 9,6 |
| Phosphoenolpyruvat | 19,61 | 7,9E-01 | 4,0 | Myo-Inositol-P | 2,28 | 1,3E-01 | 5,7 |
| Pyruvat | 1,47 | 1,3E-01 | 8,8 | Panhotenat | 3,56 | 1,7E-01 | 4,8 |
| | | | | Pinitol | 0,18 | 1,5E-02 | 8,1 |

Als nächstes wurde die relative Standardabweichung für biologische Replikate bestimmt. Hierzu wurden drei unabhängige Kulturen des *C. glutamicum* Wildtyps im MM1 Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle angezogen. Bei einer o.D.₆₀₀ von 3 wurden Proben genommen und daraufhin per GC-MS analysiert. Für diese Proben ergab sich eine relative Standardabweichung von 23 % über 74 auswertbare Metabolite; auch dieser Wert ist vergleichbar mit der vorherigen Studie (Strelkov *et al.*, 2004). Metabolite, die größere interne Pools aufweisen, konnten mit einer geringeren relativen Standardabweichung gemessen werden. Von den 74 getesteten Substanzen, welche insgesamt eine relative Standardabweichung von 23 % hatten, konnten 28 mit einer relativen Standardabweichung von weniger als 12 % gemessen werden. Zu diesen gehören einige Metabolite des Zentralstoffwechsels, wie zum Beispiel Intermediate der Glykolyse und des Zitronensäurezyklus. Das bedeutet, dass der Zentralstoffwechsel mit der verwendeten Ernte- und Analysemethode auch bei unabhängigen Kulturen mit relativ geringen Fehlern gemessen werden kann.

Der lineare Detektionsbereich des verwendeten GC-MS Instruments wurde mittels Reinsubstanzen für 27 verschiedene Metabolite bestimmt. Jeder Metabolit wurde hierzu einzeln in definierten Mengen von 1 fmol bis zu 1 nmol vermessen. In Abbildung IV.1.1 sind hierzu beispielhaft die logarithmierten *Peak*-Flächen gegen die logarithmierte Metabolitmenge dargestellt.

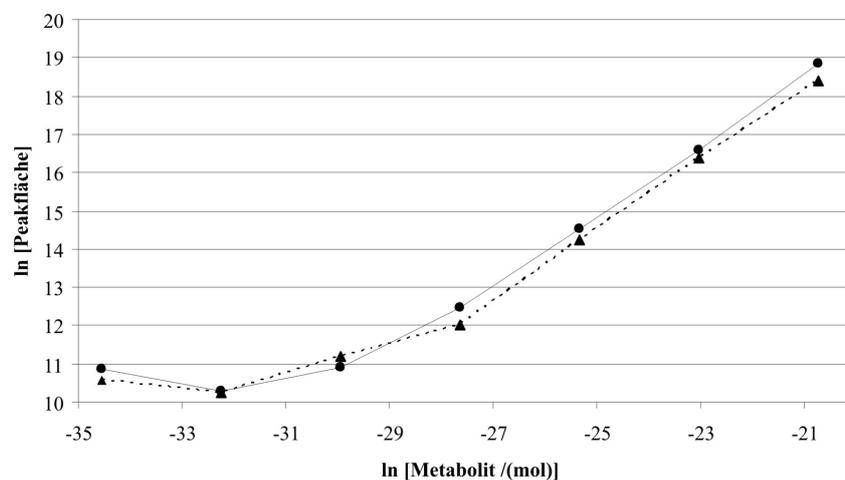


Abbildung IV.1.1: Darstellung von zwei logarithmierten *Peak*-Flächen gegen die logarithmierte Metabolitmenge. Gezeigt sind Kurven für Lysin (Kreise) und Serin (Dreiecke), in denen die im GC-MS gemessenen *Peak*-Flächen gegen die eingesetzten Mengen dargestellt werden. Beide Achsen sind logarithmiert.

Der Graph zeigt einen linearen Bereich zwischen 1 pmol und 1 nmol und damit über einen Bereich von mindestens 10^3 . Die Korrelationskoeffizienten (R^2) der Gradgleichungen für 23 Metabolite lag bei über 0,99 und für die vier weiteren bei über 0,98 (Tab. IV.1.3) Für alle Metabolite ergab sich ein linearer Bereich über mindestens drei Zehnerpotenzen.

Tabelle IV.1.3: Korrelationskoeffizienten von Regressionsgraden einiger Metabolite im linearen Messbereich der GC-MS Analyse.

| Metabolit | R ² | Metabolit | R ² |
|-------------------|----------------|----------------------|----------------|
| 2-Methylcitrat | 0,995 | L-Cystein | 0,9948 |
| 2-Methylisocitrat | 0,9902 | Leucin | 0,9878 |
| Citrat | 0,9878 | L-Glutamat | 0,997 |
| DHAP | 0,999 | L-Glutamin | 0,9965 |
| Fruktose-6-P | 0,9982 | L-Homocystein | 0,9908 |
| Fumarat | 0,9938 | L-Homoserin | 0,9942 |
| Glukose-6-P | 0,9946 | L-Methionin | 0,9988 |
| Glycerat-2-P | 0,9959 | L-Threonin | 0,9974 |
| Glycerat-3-P | 0,9971 | L-Tyrosin | 0,9813 |
| Isocitrat | 0,9954 | Malat | 0,9993 |
| L,L-Cystathionin | 0,9961 | O-Acetyl-L-Homoserin | 0,9934 |
| L-Alanin | 0,9994 | Pyruvat | 0,9914 |
| L-Asparagin | 0,9991 | Succinat | 0,9871 |
| L-Aspartat | 0,9964 | | |

Für einige Metabolite wurden Messungen der absoluten Konzentrationen durchgeführt um zu überprüfen ob die ermittelten Werte vergleichbar mit vorherigen Publikationen sind, welche unterschiedliche Ernte- und Analysemethoden eingesetzt haben (Kiefer *et al.*, 2002; Krömer *et al.*, 2004). Für diese Bestimmung wurden mit Reinsubstanzen Eichgeraden für 26 Metabolite erstellt. Anhand der Eichgeraden wurden die internen Metabolitkonzentrationen ermittelt (Tab. IV.1.4). Diese liegen im Bereich der zuvor veröffentlichten Daten anderer Studien, was darauf hindeutet, dass das in dieser Arbeit entwickelte Protokoll zuverlässige und genaue Werte liefert. Da der Fokus in dieser Arbeit darauf ausgerichtet ist ein schnelles, vergleichendes metabolische *profiling* zu entwickeln, für das nur die Bestimmung der Verhältnisse der einzelnen Metabolitpools wichtig ist, wurde im Folgenden auf die aufwendige Messung der exakten internen Metabolitkonzentrationen verzichtet.

Tabelle IV.1.4: Absolute Metabolitkonzentrationen einiger Metabolite im Vergleich zu anderen Arbeiten.

| | Konzentration $\mu\text{mol (g CDW)}^{-1}$ | | | | |
|------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------|-----------------------|
| | Diese Arbeit [§] | Krömer. J., <i>et al.</i> 2005 ^{#,*} | Wittmann. C., <i>et al.</i> 2004 [#] | | |
| | N ₂ | Filtration | Filtration | Methanol (Methode I) | Methanol (Methode II) |
| Glukose-6-P | 78.92 | | | | |
| Fruktose-6-P | 4.93 | | | | |
| DHAP | 0.35 | | | | |
| Glycerat-3-P | 2.60 | | | | |
| Glycerat-2-P | 0.26 | | | | |
| Pyruvat | 0.22 | | | | |
| Citrat | 8.41 | | | | |
| Isocitrat | 0.03 | | | | |
| α -Ketoglutarat | 2.48 | | | | |
| Succinat | 13.02 | | | | |
| Fumarat | 0.44 | | | | |
| Malat | 0.81 | | | | |
| L-Homoserin | 2.70 | 6.3 | | | |
| L,L-Cystathionin | 0.47 | 0.45 | | | |
| L-Homocystein | 0.26 | 0.075 | | | |
| O-Acetyl-L-Homoserin | 0.26 | | | | |
| Methionin | 0.86 | 0.5 | | | |
| Lysin | 4.50 | 2.6 | 6 | 2.9 | 2 |
| 2-Methylcitrat | 0.02 | | | | |
| Alanin | 2.96 | 10 | 21.4 | 9.9 | 1.3 |
| Glycin | 0.93 | 4 | 9.5 | 3.2 | 5.7 |
| Isoleucin | 2.01 | 0.12 | 0.5 | 0.3 | 0.4 |
| Leucin | 1.20 | | 2.3 | 1 | 0.7 |
| Serin | 0.50 | 6.5 | 1.9 | 0.3 | 2.6 |
| Tyrosin | 3.00 | 1.8 | 0.9 | 0.2 | 0.3 |

DHAP. Dihydroxyacetonphosphat; P - Phosphat

* Parameter abgeleitet aus Graphen

§ GC Analyse

HPLC Analyse

1.2 Analyse von metabolischen Profilen von *C. glutamicum*, erhalten durch Anwendung verschiedener Erntemethoden, die sich in der *quenching*-Zeit unterscheiden

Für Metabolit Messungen ist eine schnelle Ernte- und *quenching*-Methode essentiell, weil Veränderungen in den Pools in einem Zeitrahmen von Sekunden oder sogar Millisekunden auftreten. Um zu testen, wie die Erntezeit die metabolischen Profile beeinflusst, wurde ein Experiment durchgeführt, in dem die Zeitspanne bis zum *quenching* der Proben variiert wurde. Hierzu wurde Minimalmedium MM1 verwendet, welches mit verschiedenen

Kohlenstoffquellen, bzw. Gemischen dieser (Glukose, Acetat, Acetat/Propionat) supplementiert war. Für die Ernte der Kulturen wurden drei Erntemethoden genutzt, zum einen die Standardmethode und zwei erweiterte Methoden. Die erweiterten Methoden unterscheiden sich von der Standardmethode im wesentlichen dadurch, dass beide Methoden einen Waschschrift enthalten, wobei die erweiterte Methode 1 eine *quenching*-Zeit von 60 sek und die erweiterte Methode 2 eine von 120 sek aufwies (Abb. IV.1.2).

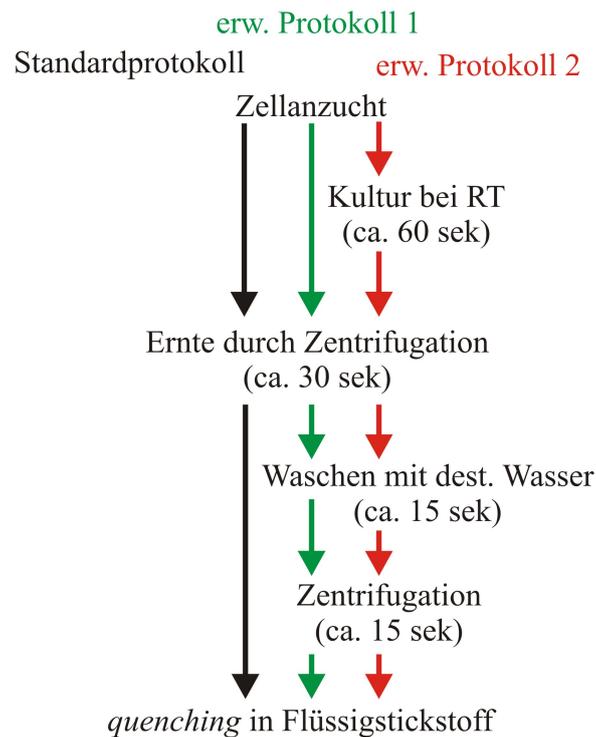


Abbildung IV.1.2: Schematische Darstellung von drei verwendeten Erntemethoden. Gezeigt wird der Ablauf der Zellernte nach dem Standardprotokoll (schwarz), dem erweiterten Protokoll 1 (grün) und dem erweiterten Protokoll 2 (rot).

Für den Vergleich der drei Ernteverfahren, wurden jeweils drei unabhängig gewachsene Kulturen für jede der drei Kohlenstoffquellen angezogen und anschließend getestet. Alle weiteren Analysen in diesem und dem folgenden Kapitel basieren auf den Daten die mit diesem Experiment erzeugt wurden. Eine hierarchische Clusteranalyse (HCA) wurde auf den gesamten Datensatz angewandt, um die experimentelle Reproduzierbarkeit zu bestimmen. Das Clustering basiert auf allen 74 Metaboliten, die durch entsprechende Referenzsubstanzen in der GC-MS Analyse eindeutig identifiziert und quantifiziert werden konnten.

In der HCA bilden sich verschiedene Cluster (Abb. IV.1.3), welche mit den verwendeten Kohlenstoffquellen und Erntemethoden korrelieren. So bilden die Kulturen die auf den drei unterschiedlichen Kohlenstoffquellen gewachsen sind und nach dem Standardprotokoll geerntet wurden jeweils ein Cluster. In zwei weiteren Clustern befinden sich zum einen die

Kulturen, die mit Glukose als Kohlenstoffquelle angezogen wurden und nach den beiden erweiterten Methoden 1 und 2 geerntet wurden und zum anderen Kulturen, die mit den erweiterten Methoden 1 und 2 geerntet wurden und Acetat oder Acetat/Propionat als Kohlenstoffquellen zur Verfügung hatten.

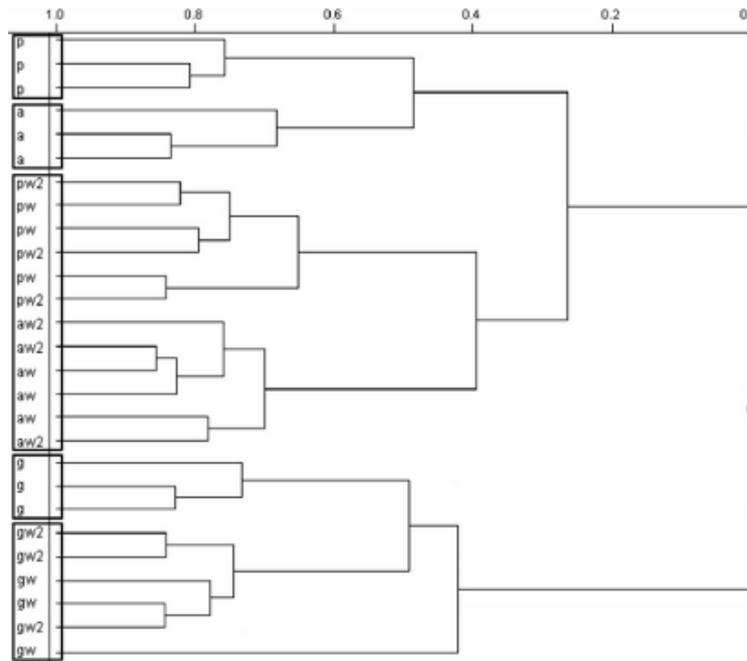


Abbildung IV.1.3: Dendrogramm einer hierarchischen Clusteranalyse (HCA) von Metabolitdaten. Die untersuchten *C. glutamicum* Zellen wurden in MM1 Medium mit Glukose (g), Acetat (a) oder Acetat+Propionat (p) als Kohlenstoffquellen angezogen und mit drei unterschiedlichen Methoden geerntet. Das erste verwendete Protokoll für die Ernte ist das Standardprotokoll ohne einen Waschschrift (nur Angabe der Kohlenstoffquelle), bei dem zweiten handelt es sich um das erweiterte Protokoll 1 mit Waschschrift (w) und das dritte verwendete Protokoll ist das erweiterte Protokoll 2, ebenfalls mit Waschschrift (w2). Alle Kulturen wurden unabhängig angezogen und geerntet. Die Distanzen zwischen den einzelnen Kulturen wurden berechnet wie im Methodenteil angegeben (III.13.4). Es wurden hierzu die normalisierten Werte der Einzelmessungen verwendet.

Die starke Korrelation der jeweiligen Replikate in der HCA zeigt eine hohe Reproduzierbarkeit in der Anzucht der Kulturen und bei der Durchführung der individuellen Erntemethoden. Allerdings fällt auf, dass bei Anzucht mit gleicher Kohlenstoffquelle ein deutlicher Unterschied beim Clustering der verschiedenen Erntemethoden zu beobachten ist. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf die verlängerte Zeit bis zum *quenching* bei den erweiterten Methoden 1 und 2 zurückzuführen.

Die stark korrelierenden metabolischen Profile der Kulturen die mit einem der beiden erweiterten Protokolle geerntet wurden deuten darauf hin, dass diese Kulturen einen metabolischen Zustand erreicht haben, der sich kaum noch verändert und sich deutlich von dem unterscheidet, der *in vivo* vorlag. Betrachtet man die Profile der Kulturen die mit den unterschiedlichen Kohlenstoffquellen angezogen wurden, so zeigt sich wie erwartet eine größere Übereinstimmung der Profile der mit Acetat und Acetat/Propionat gewachsenen Kulturen im Vergleich zu denen, die mit Glukose angezogen wurden.

1.3 Vergleich der metabolischen Profile von mit Glukose oder Acetat als Kohlenstoffquelle gewachsenen *C. glutamicum* Kulturen

Um die biologische Bedeutung der erhaltenen Ergebnisse zu bewerten und die metabolische Situation genauer zu analysieren, wurden die Profile der Kulturen die auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen gewachsen waren genauer analysiert. Es wurden zuerst die Daten der mit Glukose- oder Acetat als alleiniger Kohlenstoffquelle gewachsenen Kulturen verglichen. Da bereits eine Fülle von Informationen verfügbar ist, wie diese Substrate den Stoffwechsel in *C. glutamicum* beeinflussen, ist eine genaue Bewertung der Zuverlässigkeit der Erntemethode möglich (Gerstmeir *et al.*, 2004; Muffler *et al.*, 2002; Wendisch *et al.*, 2000). Im Falle von Glukose als Kohlenstoffquelle sollten sich die Intermediate der Glykolyse nachweisen lassen, wohingegen während des Acetat Abbaus der Zitronensäurezyklus, der Glyoxylatweg, sowie die Glukoneogenese stimuliert sein sollten. Ein Vergleich der entsprechenden Chromatogramme zeigte, dass die meisten der Metabolite des zentralen Kohlenstoffmetabolismus in beiden Proben nachgewiesen werden konnten. Einige dieser Metabolite zeigten jedoch deutliche Unterschiede in ihren Poolgrößen.

In Tabelle IV.1.5 sind die Verhältnisse einiger Metabolite angegeben, berechnet aus dem Median der Poolgrößen der mit Glukose, beziehungsweise Acetat gewachsenen Kulturen. Die Zwischenprodukte des ersten Teils der Glykolyse, Glukose-6-P und Fruktose-6-P, weisen größere Pools in den mit Glukose als Kohlenstoffquelle gewachsenen Kulturen auf. In den mit Acetat gewachsenen Kulturen wurden größere Pools für die Metabolite des zweiten Teils der Glykolyse beobachtet, was auf die Verwendung gluconeogenetischer Reaktionen hinweist, welche bereits durch eine andere Studie per Stoffflussanalysen nachgewiesen wurden (Wendisch *et al.*, 2000). Die GC-MS Analyse liefert Hinweise darauf, dass die Glykolyse aktiv ist wenn sich Glukose im Medium befindet und dass die Gluconeogenese in den Kulturen abläuft, die mit Acetat als Kohlenstoffquelle angezogen wurden. Somit entsprechen die hier erhaltenen Daten dem, was schon an anderer Stelle publiziert wurde. Die Poolgrößen von Isocitrat, Succinat, Fumarat und Malat sind in der mit Acetat gewachsenen Kultur im Vergleich zu der mit Glukose gewachsenen Kultur mindestens verdoppelt (Tab. IV.1.5). Succinat ist der Metabolit im Zitronensäurezyklus der den größten Unterschied in den Poolgrößen, von mit Glukose oder Acetat gewachsenen Kulturen, zeigt. Es ist einer der Metabolite welche durch den Glyoxylatweg produziert werden. Ein großer Pool in der mit Acetat gewachsenen Kultur weist somit auf einen aktiven Glyoxylatweg hin. Dies wurde bereits vorher durch Stoffflussanalysen bestätigt (Wendisch *et al.*, 2000). Die erhöhten Fumarat- und Malatpools der mit Acetat gewachsenen Kultur entstehen wahrscheinlich durch Rückstau direkt aus dem erhöhten Succinatpool.

Tabelle IV.1.5: Poolgrößenverhältnisse ausgewählter Metabolite von *C. glutamicum* Zellen, die mit Glukose oder Acetat als Kohlenstoffquelle angezogen wurden.

| Metabolite | Verhältnis A/G* | t-Test Wert** |
|------------------------|-----------------|---------------|
| Glukose-6-P | 0,17 | 0,0003 |
| Fruktose-6-P | 0,19 | 0,0127 |
| DHAP | 0,20 | 0,0481 |
| 3-P-Glycerat | 3,49 | 0,0677 |
| 2-P-Glycerat | 12,24 | 0,0274 |
| PEP | 10,97 | 0,0073 |
| Pyruvat | 2,77 | 0,0077 |
| Citrat | 1,30 | 0,1338 |
| Isocitrat | 2,72 | 0,0002 |
| α -Ketoglutarat | 1,63 | 0,0429 |
| Succinat | 3,88 | 0,0213 |
| Fumarat | 2,76 | 0,1902 |
| Malat | 2,60 | 0,0256 |

Der Nachweis des charakteristischen Zwischenprodukts des Glyoxylatwegs (Glyoxylat) in den Extrakten war nicht möglich. Dies war bedingt dadurch, dass es aufgrund seiner relativ geringen Größe wahrscheinlich schon im ersten, nichtquantifizierbaren Teil der GC-MS Chromatogramms vorkommt.

1.4 Die metabolischen Profile von *C. glutamicum* Kulturen welche mit Propionat als Kohlenstoffquelle gewachsen sind, weisen auf einen aktiven 2-Methylcitratzyklus hin

Genetische und proteomische Analysen zeigen, dass Propionat mit Hilfe des 2-Methylcitratzyklus metabolisiert wird. Die Proteine dieses Abbauweges werden durch das *prpDBC2* Operon kodiert.

Für die Analyse der metabolischen Wirkung von Propionat auf den Stoffwechsel von *C. glutamicum*, wurde der Wildtypstamm in Minimalmedium MM1 mit entweder Acetat oder Acetat+Propionat als Kohlenstoffquellen angezogen. In dieser Analyse konnten 2-Methylcitrat und 2-Methylisocitrat nachgewiesen werden, beides sind exklusive Produkte des 2-Methylcitratzyklus. Sowohl 2-Methylcitrat, als auch 2-Methylisocitrat wurden unter Verwendung der entsprechenden Referenzsubstanzen eindeutig identifiziert. Während 2-Methylcitrat kommerziell erhältlich war, wurde 2-Methylisocitrat von W. Buckel (Universität Marburg) zur Verfügung gestellt. Das dritte Zwischenprodukt des 2-Methylcitratzyklus, 2-

Methyl-cis-Aconitat, konnte aufgrund einer fehlenden Referenzsubstanz nicht nachgewiesen werden. Die gemessenen Konzentrationen der beiden identifizierten Metabolite waren hoch, wenn sich Propionat im Kulturmedium befand und betrug $12,5 \text{ pmol (g CDW)}^{-1}$ für 2-Methylcitrat und $52,9 \text{ pmol (g CDW)}^{-1}$ für 2-Methylisocitrat. Jeweils signifikant niedriger fielen die Konzentrationen für die mit Acetat gewachsenen Kulturen aus. Hier konnten nur $0,2 \text{ pmol (g CDW)}^{-1}$ 2-Methylcitrat nachgewiesen werden, während 2-Methylisocitrat nicht mehr nachweisbar war. Dies ist ein weiterer Beweis dafür, dass der Propionatabbau in *C. glutamicum* durch den 2-Methylcitratzyklus katalysiert wird.

1.5 Vergleichende metabolische Analysen zwischen dem *C. glutamicum* ATCC 13032 Wildtypstamm und den von ihm abgeleiteten Mutanten $\Delta prpC2$, $\Delta prpD2$ und $\Delta prpB2$ zeigen, dass der 2-Methylcitratzyklus auch in Kulturen aktiv ist die Acetat als Kohlenstoffquelle verwenden

Für eine tiefergehende Analyse des Propionatstoffwechsels in *C. glutamicum* wurden verschiedenen Mutanten getestet die Deletionen (Δ) in den Genen des Abbauweges (*prpD2*, *prpB2* und *prpC2*) tragen. Die Mutantenstämme entstanden in einer vorhergehenden Arbeit und tragen deshalb die Namen unter denen sie veröffentlicht wurden. Diese sind WAC7 für die *prpC2* Deletion, WAC5 für $\Delta prpD2$ und WAC 6 für die Deletion in *prpB2*. Für diese Analysen wurden sowohl der Wildtyp als auch die Mutanten mit Acetat oder Acetat+Propionat als Kohlenstoffquellen angezogen. Wie sich herausstellte war es nicht möglich die *prpD2* Deletionsmutante auf Acetat in Gegenwart von Propionat zu kultivieren, obwohl dieser Stamm in der Lage ist, Acetat als alleinige Kohlenstoffquelle zu nutzen. Im Gegensatz dazu wuchsen die beiden anderen Deletionsmutanten ($\Delta prpC2$ und $\Delta prpB2$), auch in propionathaltigem Kulturmedium. Aufgrund des Wachstumsdefizits der $\Delta prpD2$ Mutante in Gegenwart von Propionat wurden die Zellen aller Stämme bis zur exponentiellen Wachstumsphase in MM1 Medium mit Acetat als alleiniger Kohlenstoffquelle angezogen. Bei einer o.D.₆₀₀ von 3 wurden 8 g/l Acetat beziehungsweise 4 g/l Acetat und 4 g/l Propionat hinzugefügt. Eine Stunde und 45 Minuten nach Zugabe der zusätzlichen Kohlenstoffquellen wurden die Kulturen unter Verwendung des Standardprotokolls für Metabolomproben geerntet. In Abbildung IV.1.4 sind die relativen Poolgrößen von 2-Methylcitrat in den unterschiedlichen Stämmen dargestellt.

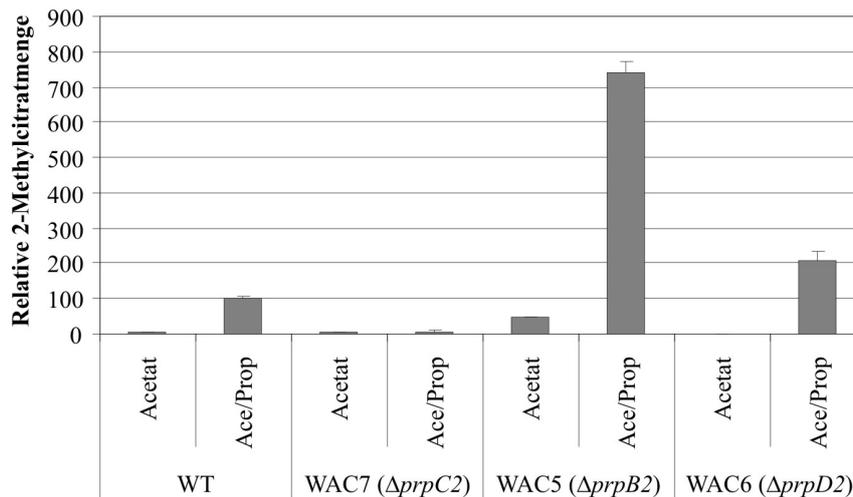


Abbildung IV.1.4: 2-Methylcitratpools verschiedener *C. glutamicum* Stämme. Die untersuchten Stämme sind der Wildtyp (WT) und die Deletionsstämme der einzelnen *prp2* Gene (WAC5, WAC6 und WAC7). Die Zellen wurden in Minimalmedium MM1 mit Acetat (Acetat) oder Acetat+Propionat (Ace/Prop) als Kohlenstoffquellen angezogen. Die Metabolite wurden mittels hydrophiler Extraktion erhalten und per GC-MS Analyse quantifiziert. Die Poolgröße des Wildtyps, gewachsen mit Acetat+Propionat, wurde auf 100 % gesetzt, alle anderen Werte sind hierzu ins Verhältnis gesetzt.

Wie erwartet wurde kein 2-Methylcitrat in der $\Delta prpC2$ Mutante, die keine 2-Methylcitratsynthaseaktivität aufweist, gefunden. Im Wildtypstamm konnte ein großer 2-Methylcitratpool nachgewiesen werden wenn Propionat im Kulturmedium vorhanden war, und ein sehr kleiner aber messbarer Pool, wenn Acetat als alleinige Kohlenstoffquelle genutzt wurde. In der $\Delta prpB2$ Mutante kann man eine ähnliche Beobachtung machen, allerdings ist hier in der mit Acetat gewachsenen Kultur kein 2-Methylcitrat messbar und der Pool der mit Acetat+Propionat gewachsenen Kultur erhöht. Der größte Pool an 2-Methylcitrat konnte in der $\Delta prpD2$ Mutante (2-Methylcitratdehydratase) gemessen werden, wenn Propionat im Kulturmedium vorhanden war. In diesem Fall ist allerdings auch ein deutlich nachweisbarer Pool vorhanden, wenn Acetat die alleinige Kohlenstoffquelle war. Das deutet darauf hin, dass Propionyl-CoA, die unmittelbare Vorstufe von 2-Methylcitrat, produziert wird wenn kein Propionat im Medium vorhanden ist und dieses dann ebenfalls über den 2-Methylcitratzyklus metabolisiert wird. Das zweite nachgewiesene Zwischenprodukt des 2-Methylcitratzyklus, 2-Methylisocitrat, zeigte eine starke Anreicherung im $\Delta prpB2$ Stamm, dem die 2-Methylisocitratelase fehlt (Abb. IV.1.5).

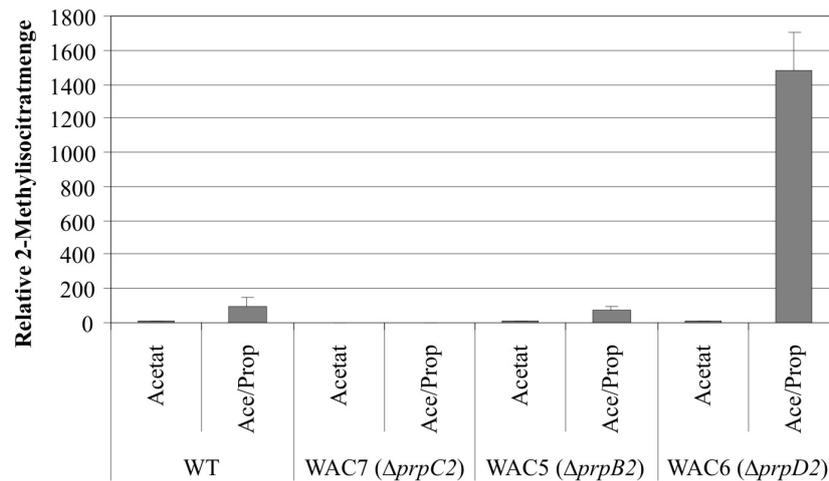


Abbildung IV.1.5: 2-Methylisocitratpools verschiedener *C. glutamicum* Stämme. Die untersuchten Stämme sind der Wildtyp (WT) und die Deletionsstämme der einzelnen *prp2* Gene (WAC5, WAC6 und WAC7). Die Zellen wurden in Minimalmedium MM1 mit Acetat (Acetat) oder Acetat+Propionat (Ace/Prop) als Kohlenstoffquellen angezogen. Die Metabolite wurden mittels hydrophiler Extraktion erhalten und per GC-MS Analyse quantifiziert. Die Poolgröße des Wildtyps, gewachsen mit Acetat+Propionat, wurde auf 100 % gesetzt, alle anderen Werte sind hierzu ins Verhältnis gesetzt.

Der $\Delta prpD2$ Stamm sowie der Wildtypstamm zeigten ähnliche große Pools von 2-Methylisocitrat in Anwesenheit von Propionat im Kulturmedium, bei Verwendung von Acetat als alleiniger Kohlenstoffquelle konnte dieser Metabolit in keiner Kultur nachgewiesen werden.

2. Analyse der transkriptionellen Regulation des Operons zum Abbau von Propionat in *C. glutamicum*

2.1 Das *prpR* Gen aus *Corynebacterium glutamicum* weist syntene Orthologe in Actinomyceten und α -Proteobakterien auf

Da nicht viel über die Regulation des Propionatmetabolismus in *C. glutamicum* bekannt war, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Identifizierung und Charakterisierung des entsprechenden Regulators. Basierend auf den Ergebnissen von (Radmacher und Eggeling, 2007), welche beobachtet haben, dass Mutationen im *prpR* Gen zu einer erhöhten Citrat- und 2-Methylcitratsynthaseaktivität führen, war dieser Regulator ein interessanter Kandidat, besonders weil kein Homolog zu bekannten Regulatoren der Gene des Propionatkatabolismus (ebenfalls PrpR genannt) aus *E. coli* und *S. enterica* mittels Sequenzähnlichkeitsanalysen in *C. glutamicum* identifiziert werden konnte. Aus diesem Grund wurde die SEED Datenbank (Overbeek *et al.*, 2005) für eine Syntenie Untersuchung der *prp* Operons und des *prpR* Gens von verschiedenen, taxonomisch mit *C. glutamicum* verwandten Spezies verwendet. Durch diesen Ansatz konnten Homologe des *prpR* Gens aus *C. glutamicum* in eine Reihe von Actinomyceten identifiziert werden, welche in einer Kopf zu Kopf Anordnung mit den *prp* Genen liegen (Abb. IV.2.1). Die Ähnlichkeit der Orthologe zu *prpR* aus *C. glutamicum* auf Nukleotidebene reicht von 39 % in *M. marinum* bis zu 43 % in *G. bronchialis*. In *C. glutamicum*, sowie einigen α -Proteobakterien ist diese syntene Anordnung durch Geninsertionen bei den α -Proteobakterien, beziehungsweise durch Geninversion abgeschwächt (Abb. IV.2.1). Interessanterweise liegt das *prpR* Gen geclustert mit dem *prpDBC1* Operon vor, dessen Funktion unbekannt ist und nicht geclustert mit dem *prpDBC2* Operon, welches essentiell für die Verwertung von Propionat ist. Das *prpR* Gen konnte durch BLAST Analysen auch im *C. glutamicum* R Stamm identifiziert werden, allerdings nicht im nahe verwandten Stamm *C. efficiens*.

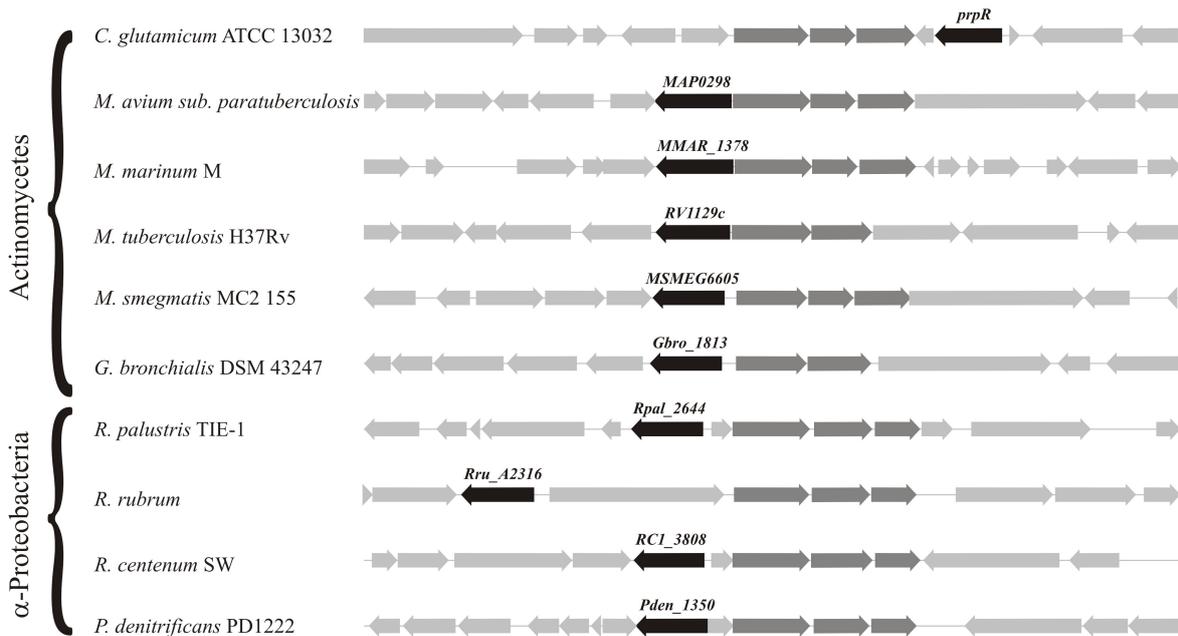


Abbildung IV.2.1: Identifizierung von *C. glutamicum* *prpR* Homologen in verschiedenen Bakterien. Dargestellt sind die *prpDBC* Operons (dunkelgrau) aus unterschiedlichen Actinomyceten und α -Proteobakterien, editiert aus einer SEED Datenbank-Analyse. In Schwarz sind die konservierten Kodierregionen dargestellt, welche potentiell die Regulatoren der *prp* Operons kodieren. Die Kodierregion in *C. glutamicum* wurde *prpR* benannt, alle Orthologe tragen den Namen ihrer Kodierregion.

Das regulatorische Protein, das durch *prpR* kodiert wird, gehört zur HTH_XRE Regulatorfamilie (Brune *et al.*, 2005). Es weist eine Länge von 441 Aminosäuren auf und besitzt eine λ -Repressor-ähnliche DNA-Bindedomäne. Außer dieser konnten mittels NCBI *conserved domain search* noch zwei konservierte Domänen mit unbekannter Funktion im C-terminalen Bereich identifiziert werden. Der engste Verwandte von PrpR, in einer NCBI BLAST-Analyse, ist mit 39 % identischen und 55 % positiven Aminosäuren RamB aus *C. glutamicum*, dem transkriptionellen Regulator des Acetatmetabolismus, welcher mit 474 Aminosäuren auch eine ähnliche Länge aufweist (Gerstmeir *et al.*, 2004). Der Hauptunterschied zwischen beiden Regulatoren liegt im N-terminalen Teil, in welchem RamB laut einer Aminosäuresequenzanalyse eine Insertion von 25 Aminosäuren aufweist, welche nicht in PrpR vorhanden sind. Ein multiples Alignment aller PrpR-Homologe aus den Actinomyceten und α -Proteobakterien, sowie RamB aus *C. glutamicum* weist keine Region auf, die nur in den PrpR-Homologen konserviert ist und nicht in RamB, was bedeutet, dass eine mögliche Kofaktorbindestelle nicht eingegrenzt werden konnte. Von den anderen Mitgliedern der XRE-Regulatorfamilie in *C. glutamicum* ist nur noch einer beschrieben, dieses ist ClgR, ein Regulator, der bei der Regulation der Protolyse und der DNA-Reparatur beteiligt ist (Engels *et al.*, 2004), allerdings weist kein weiterer Regulator dieser Gruppe signifikante Ähnlichkeiten mit PrpR auf.

2.2 Das PrpR Regulon in *C. glutamicum* umfasst nur das *prpDBC2* Operon

Um zu testen ob PrpR Einfluss auf den Propionatkatabolismus hat wurde in *C. glutamicum* ein Deletionsstamm erstellt, bei dem die *prpR* Kodierregion vollständig entfernt wurde ($\Delta prpR$, JP1). Zusätzlich wurde ein *prpR* exprimierendes Plasmid hergestellt, welches auf dem Expressionsplasmid pZ8-1 (Degussa, 1994) beruht, bei dem das *prpR* Gen unter die Kontrolle des starken konstitutiven Promotors P_{trc} gestellt wurde (pZ8-1::*prpR*). Dieses Plasmid wurde verwendet um den $\Delta prpR$ Stamm genetisch zu komplementieren (JP2). Um die Gene zu identifizieren welche direkt und indirekt von PrpR reguliert werden, wurde eine Hybridisierung mit Gesamtgenom-Microarrays von *C. glutamicum* durchgeführt, bei welcher der Wildtyp mit dem JP1 Stamm verglichen wurde. Beide Stämme wurden in Minimalmedium MM1 mit Glukose (2 g/l) als Kohlenstoffquelle angezogen und bei einer o.D.₆₀₀ von 3 wurde dem Medium Propionat (500 mg/l) zugesetzt. 60 Minuten nach dem Propionatpuls wurden Proben gezogen, die daraus gewonnene mRNA wurde in cDNA umgeschrieben, mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und für die Microarrayanalyse eingesetzt. Der Vergleich der beiden erhaltenen transkriptionellen Profile zeigt, dass die *prpDBC2* Gene die am stärksten differenziell exprimierten sind (Abb. IV.2.2).

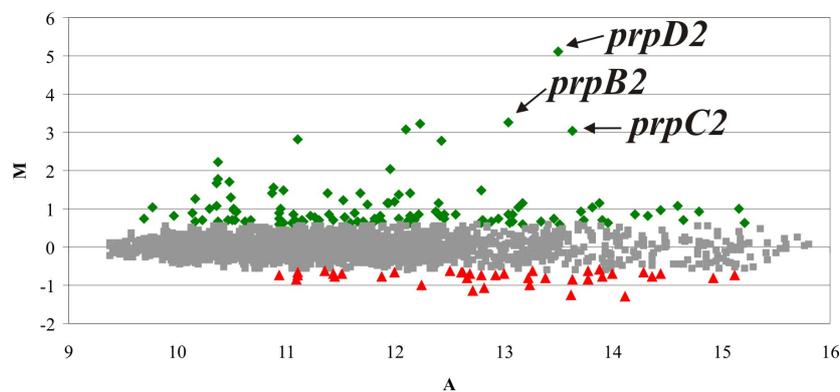


Abbildung IV.2.2: Analyse der Transkriptionsprofile eines Wildtyp- und *prpR* Deletionsstamms unter Propionatbedingungen. M/A Grafik abgeleitet aus einer cDNA Hybridisierung des Wildtypstamms und des JP1 Stamms ($\Delta prpR$). Beide Stämme wurden in MM1 mit Glukose als Kohlenstoffquelle angezogen und bei einer o.D.₆₀₀ von 3 wurde ein Propionatpuls gegeben. Proben wurden 60 Minuten nach der Propionatzugabe genommen. Gene mit einem positiven M Wert weisen eine höhere Transkriptmenge im Wildtypstamm auf, während negative Werte eine höhere Transkriptmenge im JP1 Stamm anzeigen. M Werte größer 0,6 (grün) oder kleiner -0,6 (rot) gelten als signifikant.

Da diese im Wildtyp eine höhere mRNA Menge aufweisen, scheint die $\Delta prpR$ Mutation zu bewirken, dass die Expression dieser Gene in Gegenwart von Propionat nicht mehr induziert werden kann. Zusätzlich zu den *prpDBC2* Genen weisen noch eine Reihe weiterer, Gene eine differenzielle Expression auf, diese kodieren für konserviert hypothetische Proteine. Um zu testen welche der differenziell exprimierten Gene unter der direkten Kontrolle von PrpR

stehen, wurden weitere Microarrayanalysen durchgeführt. Hierzu wurden sechs unterschiedliche Bedingungen getestet, die in Tabelle IV.2.1 aufgelistet sind.

Tabelle IV.2.1: Definition von Stamm, Medium, Propionatpuls und Erntezeitpunkt für ein Microarrayexperiment mit sechs unterschiedlichen Zuständen

| Stamm | Medium | Propionatpuls | Erntezeitpunkt |
|-------------------------------------------|-----------------|---------------|-----------------------------------|
| Wildtyp | MM1 mit Glukose | - | vor Propionatzugabe (t0) |
| Wildtyp | MM1 mit Glukose | + | 60 min nach Propionatzugabe (t60) |
| JP2 ($\Delta prpR$) | MM1 mit Glukose | - | vor Propionatzugabe (t0) |
| JP2 | MM1 mit Glukose | + | 60 min nach Propionatzugabe (t60) |
| JP3 ($\Delta prpR$ pZ8-1:: <i>prpR</i>) | MM1 mit Glukose | - | vor Propionatzugabe (t0) |
| JP3 | MM1 mit Glukose | + | 60 min nach Propionatzugabe (t60) |

Unter allen aufgeführten Bedingungen wurden Zellen angezogen und Proben genommen. Nach der RNA Isolierung und dem Umschreiben wurde die farbstoffmarkierte cDNA auf Microarrays hybridisiert und ausgewertet. Als gemeinsame Referenz für diese Analyse diente der RNA Pool aus allen sechs getesteten Zuständen.

Für die Auswertung wurde eine HCA benutzt, um Gene zu finden, die für alle Bedingungen ein ähnliches Transkriptionsprofil aufweisen. Auffällig hierbei ist, dass sich ein Cluster bildet, das den maximalen berechneten Abstand zu allen anderen Clustern ausweist. Dieses Cluster enthält nur die Gene des *prpDBC2* Operons, welche sehr eng zusammen liegen und mit etwas Abstand das *prpR* Gen (Abb. IV.2.3). Aus diesen Daten lässt sich ableiten, dass die Zielgene und somit das Regulon von PrpR, nur aus dem *prpDBC2* Operon besteht und dass es sich bei PrpR um einen Aktivator handelt. Um die Ergebnisse der Microarrayanalysen zu bestätigen und genauere Werte für die Induktionsstärke zu bestimmen wurden *real time* RT-PCR Messungen durchgeführt. Hierfür wurden die relativen mRNA Mengen von *prpB2*, repräsentativ für das gesamte *prpDBC2* Operon, für den Wildtyp, den *prpR* Deletionsstamm (JP1) und den komplementierten $\Delta prpR$ Stamm (JP2) bestimmt. Zusätzlich wurden auch noch ein Wildtypstamm mit dem pZ8-1 Leerplasmid (JP3) und ein weiterer Wildtypstamm mit dem pZ8-1::*prpR* Komplementationsplasmid (JP4) unter den oben beschriebenen Bedingungen angezogen und die relative *prpB2* mRNA Menge bestimmt (Abb. IV.2.4). Proben von allen Kulturen wurden vor dem Propionatpuls (t0) und 60 Minuten danach (t60) genommen.

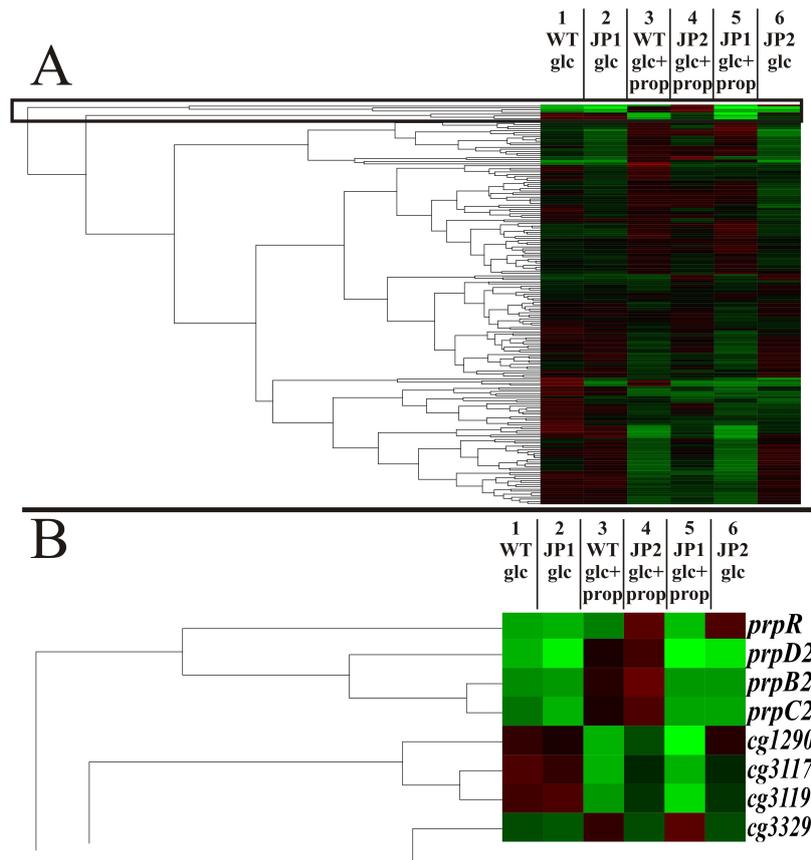


Abbildung IV.2.3: Bestimmung des PrpR Regulons. **A:** Dendrogramm einer hierarchischen Cluster Analyse (HCA) von Microarraydaten verschiedener *C. glutamicum* Kulturen in unterschiedlichen Bedingungen. Alle Stämme wurden in MM1 Minimalmedium angezogen. Die einzelnen dargestellten Bedingungen sind: 1) Wildtypstamm (WT), Kohlenstoffquelle: Glukose (glc); 2) JP1 Stamm ($\Delta prpR$), Kohlenstoffquelle: Glukose; 3) WT, Kohlenstoffquellen: Glukose und Propionatpuls (glc+prop); 4) JP2 Stamm ($\Delta prpR$ [pZ8-1::*prpR*]), Kohlenstoffquellen: Glukose und Propionatpuls; 5) JP1 Stamm, Kohlenstoffquellen: Glukose und Propionatpuls; 6) JP2 Stamm, Kohlenstoffquelle: Glukose. Als gemeinsame Referenz für die Hybridisierungen wurde ein RNA Pool aus allen 6 Bedingungen verwendet. Mit einem schwarzen Kasten ist eine Region markiert, welche als Ausschnitt in B vergrößert dargestellt ist.

B: Ausschnittvergrößerung des Bereichs des schwarzen Kastens aus A. Stämme und Konditionen sind identisch zu A. Der Name des Gens oder der Kodierregion sind hinter jeder Zeile angegeben.

Wie erwartet zeigt der Wildtyp nach Propionatzugabe (t60) eine starke Induktion des *prpB2* Gens. Ein ähnliches Transkriptionsprofil weist der JP3 Stamm auf, was bedeutet, dass das Leerplasmid keine Auswirkungen auf die Transkription des *prpDBC2* Operons hat und somit auf dem Plasmid beruhende polare Effekte ausgeschlossen werden können. Die Expression des *prp2* Gens im $\Delta prpR$ Stamm ist nicht mehr durch Propionat induzierbar, allerdings lässt sich dies durch Einbringen des plasmidbasierten *prpR* Gens wieder in den Wildtypzustand überführen, wie durch Stamm JP2 belegt wird. Die relative mRNA Menge des *prpB2* Gens im JP2 Stamm zum Zeitpunkt t0 liegt unterhalb der Menge im Wildtyp zum selben Zeitpunkt. Das gleiche trifft auf die zweite Kontrolle (JP4 Stamm) zu, die ein identisches Verhalten zum JP2 Stamm ($\Delta prpR$ pZ8-1::*prpR*) aufweist, sodass vermutet werden kann, dass die Kopienzahl des Plasmids und somit die Menge an PrpR Protein einen leicht negativen Einfluss auf die basale Expressionsstärke hat. Allerdings konnte kein signifikanter

Unterschied in der Transkriptionsstärke nach der Induktion (t60) in den *prpR* tragenden Stämmen festgestellt werden, hierfür ist es anscheinend nicht relevant ob das Gen im Genom oder auf einem Plasmid kodiert ist.

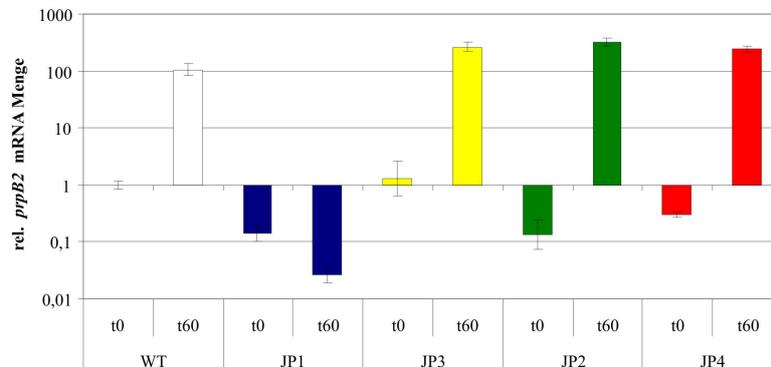


Abbildung IV.2.4: Auswirkungen einer *prpR* Deletion und Komplementation auf die Expression der PrpR Zielgene. *Real time* RT-PCR Messung des *prpB2* Gens als Repräsentant des *prpDBC2* Operons. Die relative mRNA Mengen des Wildtypstamms (WT, weiß) und der Stämme JP1 ($\Delta prpR$, blau), JP2 ($\Delta prpR$ pZ8-1::*prpR*, grün), JP3 (WT pZ8-1, gelb) und JP4 (WT pZ8-1::*prpR*, rot) wurden bestimmt und dargestellt. Die Zellen wurden in Minimalmedium MM1 mit Glukose als Kohlenstoffquelle angezogen. Bei einer o.D.₆₀₀ von 3 wurde ein Propionatpuls gegeben. Proben wurden vor (t0) und 60 Minuten (t60) nach der Propionatzugabe genommen. Die mRNA Menge des Wildtypstamms zum Zeitpunkt t0 wurde auf 1 normiert (Referenz), alle anderen gemessenen Werte sind relativ zur Referenz dargestellt.

Für die in Tabelle IV.2.1 angegebenen Wachstums- und Erntedingungen wurden zusätzlich zu den Microarrayanalysen noch *real time* RT-PCT Messungen durchgeführt, um die Expression des *prpR* Gens zu analysieren. Dabei konnte mit und ohne Propionat im Medium eine konstitutive Expression des *prpR* Gens im Wildtypstamm beobachtet werden (Abb. IV.2.5), was bedeutet, dass PrpR nicht seine eigene Transkription induzieren kann und dass ein Kofaktor benötigt wird um die Expression des *prpDBC2* Operons zu steigern.

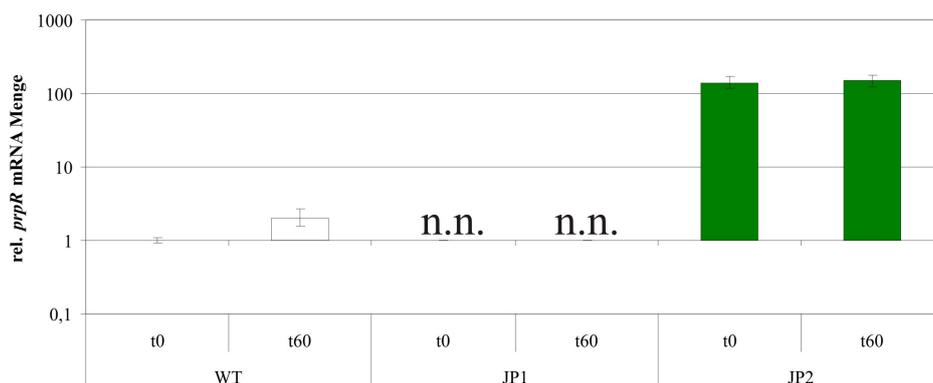


Abbildung IV.2.5: Bestimmung der *prpR* mRNA Menge in verschiedenen Stämmen. *Real time* RT-PCR Messung des *prpR* Gens. Die relative mRNA Mengen des Wildtypstamms (WT, weiß) und der Stämme JP1 ($\Delta prpR$, n.n.), JP2 ($\Delta prpR$ pZ8-1::*prpR*, grün), wurden bestimmt und dargestellt. Die Zellen wurden in Minimalmedium MM1 mit Glukose als Kohlenstoffquelle angezogen. Bei einer o.D.₆₀₀ von 3 wurde ein Propionatpuls gegeben. Proben wurden vor (t0) und 60 Minuten (t60) nach der Propionatzugabe genommen. Die mRNA Menge des Wildtypstamms zum Zeitpunkt t0 wurde auf 1 normiert (Referenz), alle anderen gemessenen Werte sind relativ zur Referenz dargestellt. Die *prpR* mRNA im JP1 Stamm war nicht nachweisbar (n.n.).

Wie erwartet konnte im $\Delta prpR$ Stamm kein Transkript von *prpR* nachgewiesen werden, während es im komplementierten $\Delta prpR$ Stamm aufgrund des Plasmids zu einer starken Überexpression kommt. Dieses beweist, dass PrpR nicht seine eigene Transkription reguliert und dass ein Kofaktor benötigt wird um die Induktion des *prpDBC2* Operons zu vermitteln.

2.3 Eine 121 bp Region stromaufwärts von *prpD2*, die durch *in vivo* Promotortestvektorfusionen identifiziert wurde, enthält die PrpR Bindestelle

Nach dem Nachweis, dass PrpR ein transkriptioneller Aktivator ist, fehlte der Nachweis der Bindestellen. Für diese Analyse wurden zunächst die transkriptionellen Startpunkte des *prpDBC1* und *prpDBC2* Operons, sowie des *prpR* Gens durch eine 5'-RACE-PCR bestimmt. Im Fall von *prpDBC1* befindet sich dieser 36 bp stromaufwärts des Translationsstarts (Abb. IV.2.6), einer sehr ähnliche Distanz zum Transkriptionsstart wie sie das *prpDBC2* Operon mit 37 bp aufweist. Der Transkriptionsstart von *prpR* liegt mit 81 bp etwas weiter entfernt als die der beiden Operons mit 36, beziehungsweise 37. Alle drei transkriptionellen Startpunkte scheinen von einem SigA Promotor aus transkribiert zu werden, da die -10 Regionen der jeweiligen Promotoren mit den hoch konservierten Basen TA beginnen, und auch die nachfolgenden T Regionen ausweisen (Patek *et al.*, 2003). Zusätzlich sind in den -35 Regionen der beiden *prp* Operons drei von sechs Positionen der SigA Konsensussequenz vorhanden (Patek *et al.*, 2003). Der Promotor von *prpR* besitzt in der -35 Region vier der sechs Konsensusbasen und in der -10 Region sogar fünf von sechs, was die vorherige Vermutung unterstützt, dass es sich hier um ein konstitutives Transkript handelt.

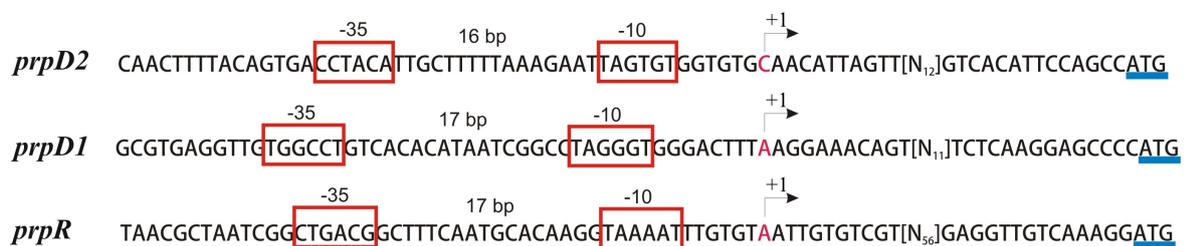


Abbildung IV.2.6: Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte von *prpR*, *prpD1* und *prpD2*. Dargestellt sind die Sequenzen für die Gene *prpD2*, *prpD1* und *prpR*. Der Abstand zwischen den putativen -10 und -35 Regionen der Promotoren ist angegeben, sowie die zusätzliche Anzahl Basen zwischen den transkriptionellen (+1) und translationalen (ATG blau unterlegt) Startpunkten. Alle transkriptionellen Startpunkte wurden per RACE-PCR bestimmt.

Mit der Kenntnis über die potentielle Promoterregion folgte die Suche nach möglichen Elementen des *prpD2* Operatorbereichs. Da bakterielle transkriptionelle Aktivatoren normalerweise stromaufwärts der -35 Region der Zielgene an *inverted repeats* (IR) binden, wurde die Region vor *prpDBC2* auf solche Strukturen untersucht. Sie beinhaltet zwei *inverted repeats*, welche potenzielle PrpR Bindestellen darstellen könnten. Die erste Region (IR1; CCCcgCGCgCC-N₆-GGaGCGaaGGG) befindet sich 127 Basen stromaufwärts des Transkriptionsstarts des *prpDBC2* Operons, die zweite Region, ein perfekter *inverted repeat* (IR2; GTGATTTTG-N₁₁-CAAAATCAC), liegt 70 Basen stromaufwärts. Für die präzise Eingrenzung des PrpR Operators wurden verschiedene Teile der stromaufwärts gelegenen Region von *prpDBC2* mit einem promotorlosen *cat* Gen auf dem Promotortestvektor pRIM2 fusioniert, sodass eine *in vivo* Bestimmung des Operators möglich war. Nach der Integration des Vektors wurden Anzuchten der einzelnen, Konstrukte tragenden Stämme (JP6 bis JP17) durchgeführt. Hierbei wurde MM1 Medium verwendet und als Kohlenstoffquelle stand Glukose (2 g/l) zur Verfügung. Bei einer o.D.₆₀₀ von 3 wurde ein Propionatpuls mit einer Konzentration von 500 mg/l gegeben. Proben wurden vor Propionatzugabe und nach Propionatzugabe genommen, und die daraus gewonnene mRNA wurde per *real time* RT-PCR untersucht um die relative *cat* mRNA Menge zu bestimmen und so auf eine Propionatinduzierbarkeit schließen zu können. Alle untersuchten Fragmente sind in Abbildung IV.2.7 dargestellt, ebenso ist angegeben ob es möglich war das *cat* Gen des jeweiligen Konstrukts durch Propionatzugabe zu induzieren. Wie erwartet konnte keine Induktion für das promotorlose *cat* Gen nachgewiesen werden (Abb. IV.2.7). Ebenso waren die Fragmente welche die Regionen 42 bp (Promotor), 136 bp (IR2 + Promotor) und 148 bp (IR1-IR2 + Promotor) stromaufwärts des *prpDBC2* Transkriptionsstartpunkts (+1) nicht durch Propionat zu induzieren. Im Gegensatz dazu waren Fragmente die mindestens beide *inverted repeats*, den Promotor und einen 21 bp stromaufwärts von IR1 gelegenen Bereich enthalten voll durch Propionat induzierbar, was durch die Regionen 176 bp, 417 bp und 828 bp stromaufwärts des *prpDBC2* Transkriptionsstartpunkts (+1) nachgewiesen wurde. Basierend auf diesen Daten liegt die Grenze des 5' Bereich des PrpR Operators zwischen den 21 bp stromaufwärts und den ersten 6 Basen innerhalb von IR1 (-176 – -149). Um die stromabwärts gelegene Grenze zu bestimmen wurde die Region welche die Basen von -176 bis -56 (21 bp-IR1-IR2) enthält mit einem artifiziellen Promotor fusioniert, welcher aus einer -35 (TGGTCA) und einer -10 (GGTACCCA) Region besteht, die Ähnlichkeiten zu bekannten SigA Erkennungssequenzen aufweist (Patek *et al.*, 2003). Dieses führte zu einer vollen Induzierbarkeit des artifiziellen Promotors durch Propionat, was die Bindestelle(n) auf eine 121 bp große Region eingrenzt (Abb. IV.2.7, Nr. 8).

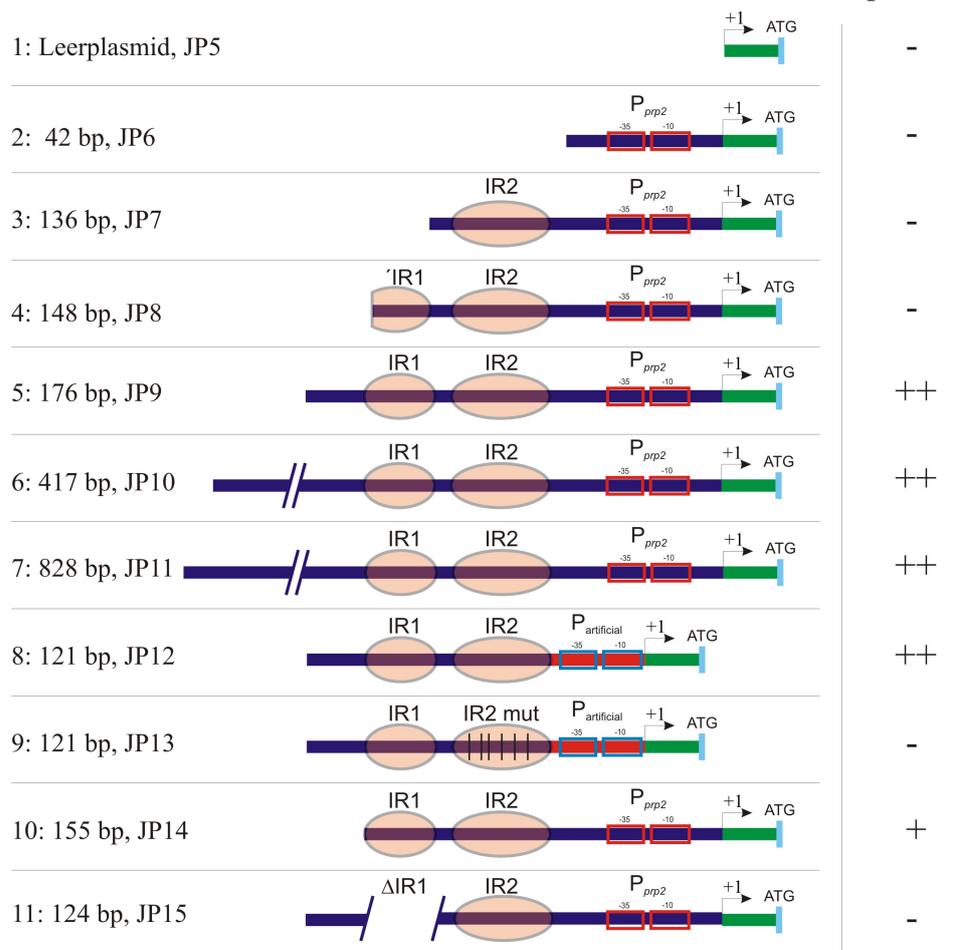
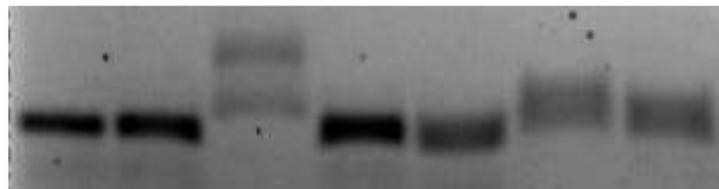
cat durch Propionat induzierbar?

Abbildung IV.2.7: Stromaufwärts von *prpD2* gelegene Fragmente, die *in vivo* auf ihre Induzierbarkeit durch Propionat getestet wurden. Darstellung verschiedener Teile der *prpD2* stromaufwärts gelegenen Region, die mit einem *cat* Gen im Promortestvektor pRIM2 fusioniert wurden. Schematisch gezeigt sind der Translationsstartpunkt des *cat* Gens (ATG), der Transkriptionsstartpunkt (+1), der Promotorregion (-10 und -35, zusätzlich P) und zwei *inverted repeats* (IR1 und IR2). Die Länge des Fragmentes (in bp) ist hinter der Konstruktnummer (1-11) gegeben. Propionatinduzierbarkeit des *cat* Gens wird durch ++ (stark induzierbar), + (schwach induzierbar) und - (nicht induzierbar) angegeben. Die Konstrukte 2-7 enthalten zunehmend mehr der stromaufwärts von *prpD2* gelegenen Region. Konstrukt 8 ist eine am 3' Ende verkürzte Version von Konstrukt 5, bei welcher der natürliche Promotor P_{prpD2} gegen einen artifiziellen Promotor ausgetauscht wurde. Konstrukt 9 ist identisch mit Konstrukt 8, trägt aber Mutationen in der zweiten palindromischen Region. Konstrukt 10 ist eine leicht verlängerte Version von Konstrukt 4, welche exakt beide palindromischen Regionen umfasst, aber keine weiteren 5' gelegenen Basen und Konstrukt 11 ist bis auf eine Deletion der ersten palindromischen Region identisch mit Konstrukt 5.

Alle weiteren Versuche die Bindestelle *in vivo* genauer zu bestimmen, entweder durch Einbringen von Transitionsmutationen in IR2 (Abb. IV.2.7, Nr. 9), oder das Entfernen der 21 bp stromaufwärts von IR1 (Abb. IV.2.7, Nr. 10) resultierten in einer entweder deutlich abgeschwächten oder einer vollkommen verlorenen Induzierbarkeit durch Propionat. Für ein Fragment welches eine Deletion von IR1 trägt (Abb. IV.2.7, Nr. 11) konnte ebenfalls keine Propionatinduzierbarkeit gemessen werden, was darauf hinweist, dass die komplette 121 bp Region zwischen -176 und -56 für eine Propionat vermittelte Induzierbarkeit benötigt wird und somit den PrpR Operatorbereich darstellt.

2.4 Der Metabolit 2-Methylcitrat ist der Koaktivator von PrpR

Um die Bindestelle von PrpR vor dem *prpDBC2* Operon einzugrenzen und den vermuteten Kofaktor zu identifizieren wurden EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) Analysen genutzt. Für diese wurde das zuvor identifizierte Operatorfragment (176 bp) mit dem Farbstoff Cy3 markiert und zusammen mit reinem PrpR Protein und einer Reihe möglicher Kofaktoren eingesetzt. Um reines PrpR Protein zu erhalten wurde eine PrpR-Intein Fusion für die Expression und Aufreinigung genutzt, die Durchführung ist im Methodenteil dieser Arbeit beschrieben. Als Kofaktoren wurden für die EMSA Experimente Propionat, Metabolite des Propionatabbaus (Propionyl-CoA, 2-Methylcitrat, 2-Methylisocitrat) und Citrat getestet. Eine klare Retardation der Bande lässt sich nur für 2-Methylcitrat beobachten (Abb. IV.2.8). Die zwei strukturell nahe verwandten Metabolite Citrat und 2-Methylisocitrat führen möglicherweise auch zu einer leichten Interaktion, da sich hier breitere Banden beobachten lassen, die allerdings keine klare zweite Bande bilden, wie in Fall von 2-Methylcitrat.



| | | | | | | | |
|-------------------------------------------|---|---|------|------|-------|-------|------|
| <i>prpD2</i> Promoter-/Operatorfragment : | + | + | + | + | + | + | + |
| PrpR Protein (40 pM) : | - | + | + | + | + | + | + |
| Effektor (50 mM) : | - | - | 2-MC | Prop | P-CoA | 2-MIC | Citr |

Abbildung IV.2.8: Bestimmung des PrpR Koaktivators durch Gelretardationsexperimente. *Electrophoretic mobility shift assays* (EMSAs) mit dem 176 bp Promotor-/Operatorfragment des *prpDBC2* Operons. Die DNA wurde mit dem Farbstoff Cy3 fluoreszent markiert und für das Experiment zusammen mit reinem PrpR Protein und verschiedenen Kofaktoren eingesetzt. Für die Ansätze werden 40 pmol Protein, 0,05 pmol DNA, 10 % (v/v) Glycerin und 0,06 µg Heringssperma DNA gemischt und mit Bindepuffer (10 mM Na₂HPO₄, 137 mM NaCl, 22 mM KCl; pH 7) auf 20 µl aufgefüllt. Effektoren werden den Ansätzen mit jeweils 50 mM zugesetzt. 2-MC - 2-Methylcitrat; Prop – Propionat; P-CoA - Propionyl-CoA; 2-MIC - 2-Methylisocitrat; Citr - Citrat

Um die Bindestelle genauer zu bestimmen wurden weitere Experimente mit dem Cy3-markierten 176 bp Fragment und 40 bp unmarkierten Oligonukleotiden durchgeführt. Die Oligonukleotiden deckten das 176 bp Fragment vollständig ab und überlappten mit jeweils 20 bp. Sie wurden in EMSA Konkurrenzexperimenten zusammen mit dem 176 bp Fragment eingesetzt, allerdings konnte mit keinem die exakte Bindestelle nachgewiesen werden. Da in der *prpD2* Promotor-/Operatorregion mittels BLAST Analysen keine Ähnlichkeiten zur Bindestelle von RamB identifiziert werden konnten, gibt es keine weiteren Hinweise auf die exakte Bindestelle von PrpR.

Aus diesen Experimenten kann geschlossen werden, dass für die PrpR Bindung möglicherweise die gesamte 121 bp Region benötigt. Es konnte im Genom keine weitere

Region identifiziert werden, die signifikante Ähnlichkeiten zu der PrpR Operatorregion ausweist, ein weiterer Nachweis, dass das *prpDBC2* Operon die einzige Transkriptionseinheit ist die von PrpR reguliert wird.

2.5 Die Deletion von *prpR* im Stamm JP1 führt zu einer Verstärkung der Propionattoxizität

Um eine phänotypische Charakterisierung des Einflusses von PrpR durchzuführen, wurden Wachstumstest in Minimalmedium MM1 mit dem Wildtyp, dem JP1 und dem JP2 Stamm durchgeführt. Als Kohlenstoffquelle wurden 4 g/l Glukose eingesetzt. Unter diesen Bedingungen erreichten alle Stämme dieselbe optische Dichte und zeigten identische Wachstumsraten ($\mu = 0,225$) (Abb. IV.2.9). Alle Stämme weisen eine verlängerte Anwachsphase auf, wenn sich im Medium zusätzlich 500 mg/l Propionat befinden (Wildtypstamm 25 h, JP2 Stamm 30h). Nach dem Anwachsen weist der JP2 Stamm ($\mu = 0,153$) eine geringfügig höhere Wachstumsrate als der Wildtyp ($\mu = 0,145$) auf, während der JP1 Stamm im Vergleich zu den anderen langsamer wächst ($\mu = 0,113$) und eine noch einmal deutlich verlängerte Anwachsphase zeigt (42 h). Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass Propionat einen direkten Einfluss auf das Wachstum der unterschiedlichen Stämme hat, ein Effekt, der auch schon zuvor beschrieben wurde (Claes *et al.*, 2002). Die deutlich verlängerte Anwachsphase und das verlangsamte Wachstum des *prpR* Deletionsstamms JP1 deuten darauf hin, dass PrpR in der Wachstumsadaption an Propionat eine wichtige Rolle spielt.

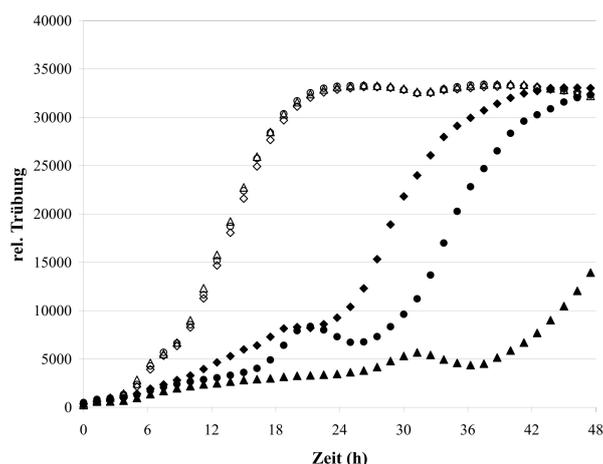


Abbildung IV.2.9: Analyse der Propionatsensitivität des Wildtyp, des *prpR* Deletions und des Komplementationsstamms. Wachstumskurven verschiedener *C. glutamicum* Stämme. Dargestellt sind der Wildtyp (Vierecke), der Stamm JP1 ($\Delta prpR$, Dreiecke) und der Stamm JP2 ($\Delta prpR$ [pZ8-1::*prpR*], Kreise), angezogen in MM1 mit Glukose (Symbole ohne Füllung) oder Glukose+Propionat (schwarz gefüllte Symbole) als Kohlenstoffquellen. Alle Stämme wurden in sechs Replikaten gemessen. Die optische Dichte wurde über Nephelometrie bestimmt und ist in relativen Einheiten angegeben.

2.6 Die An- oder Abwesenheit von PrpR beeinflusst die Metabolitkonzentrationen im 2-Methylcitratzyklus unter Propionatbedingungen

Um zu testen ob der Propionatmetabolismus in *C. glutamicum* durch PrpR beeinflusst wird, wurden Messungen des Wildtyps, der Deletionsmutante JP1 und der komplementierten Deletionsmutante JP2 vor (t0) und 60 min nach (t60) einem Propionatpuls (0,5 g/l) mittels GC-MS durchgeführt um die Metabolite des 2-Methylcitratzyklus (2-Methylcitrat und 2-Methylisocitrat) relativ zu bestimmen (Abb. IV.2.10).

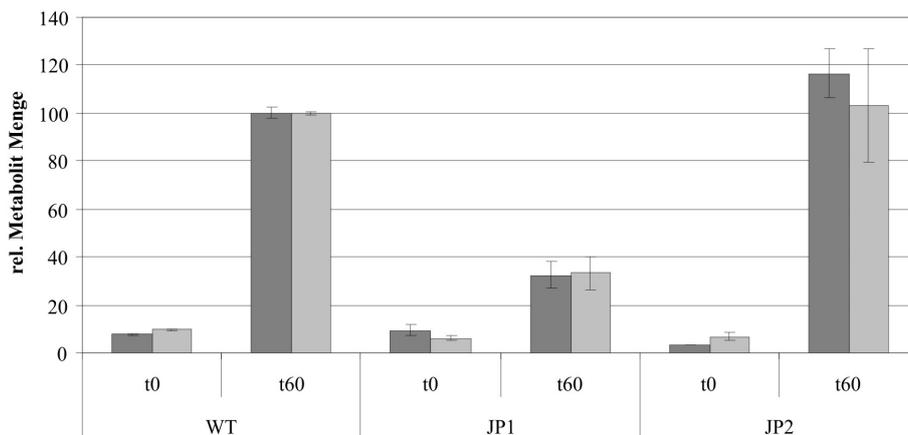


Abbildung IV.2.10: Untersuchung des Einflusses von PrpR auf zwei Intermediaten des 2-Methylcitratzyklus verschiedener Stämme vor und nach einem Propionatpuls. 2-Methylisocitrat- und 2-Methylisocitratpools des Wildtyp (WT), JP1 ($\Delta prpR$) und JP2 Stamms ($\Delta prpR$ pZ8-1::prpR). Die Zellen wurden in Minimalmedium MM1 mit Glukose als Kohlenstoffquelle angezogen. Bei einer o.D.₆₀₀ von 3 wurde ein Propionatpuls gegeben. Proben wurden vor (t0) und 60 Minuten (t60) nach der Propionatzugabe genommen. Die Metabolite 2-Methylcitrat (dunkelgrau) und 2-Methylisocitrat (hellgrau) wurden mittels hydrophiler Extraktion erhalten und per GC-MS Analyse quantifiziert. Die Poolgröße des Wildtyps, gewachsen mit Glukose+Propionat, wurde auf 100 % gesetzt, alle anderen Werte stehen hierzu im Verhältnis.

Die gemessenen Poolgrößen beider Intermediate sind im Wildtyp und im JP2 Stamm 60 min nach dem Propionatpuls stark erhöht. Der Anstieg der Poolgrößen ist vergleichbar zu dem Anstieg der im ersten Teil der Ergebnisse unter Punkt 1.5 beobachtet wurde, während der Anstieg der Konzentration in JP1 Stamm deutlich geringer ist nach der Propionatzugabe. Aus dieser Analyse wird deutlich, dass PrpR einen sofortigen und starken Einfluss auf den Propionatstoffwechsel von *C. glutamicum* hat, wahrscheinlich bedingt durch die Unfähigkeit des Deletionsstamms JP1 die Transkription des *prpDBC2* Operons zu induzieren, welches nur in einer basalen Expression der Enzyme resultiert, welche für die Verwertung von Propionat benötigt werden. Der leichte Anstieg der Metabolitkonzentrationen von 2-Methylcitrat und 2-Methylisocitrat im JP2 Stamm könnte aus der basalen Transkription des *prpDBC2* Operons und/oder den enzymatischen Seitenaktivitäten der Enzyme PrpC1, PrpD1 und GlfA resultieren, für die gezeigt werden konnte, dass sie partiell die Funktionalität des *prpDBC2* Operons übernehmen können (Claes *et al.*, 2002).

3. Etablierung und biotechnologische Anwendung eines Propionat induzierbaren Expressionssystems unter Verwendung des transkriptionellen Regulators PrpR

3.1 Die *prpD2* Promotor-/Operatorregion ist biotechnologisch als Expressionssystem im Produktionsmaßstab verwendbar

Wie zuvor gezeigt, besitzt der Regulator PrpR zusammen mit seiner Promotor-/Operatorregion das Potenzial als induzierbares Expressionssystem für biotechnologische Zwecke eingesetzt zu werden. Im Folgenden soll untersucht werden, ob sich dieses System für die Expressionskontrolle verschiedener Gene eignet, und ob es in industriellen Prozessen verwendet werden kann. Um zu testen ob die *prpD2* Promotor-/Operatorregion als ein kostengünstiges und stark induzierbares System für die Expression von Genen angewandt werden kann, wurden Fermentationen mit *C. glutamicum* Wildtypzellen in MM1 mit Glukose als Kohlenstoffquelle durchgeführt. Die eingesetzte Menge Glukose betrug 20 g/l zu Beginn der Fermentation, bei einer o.D.₆₀₀ von 3 wurde Propionat in einer Konzentration von entweder 1 mg/l oder 10 mg/l hinzugegeben. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Propionatzugabe wurde die mRNA Menge des *prpB2* Gens bestimmt. Hierbei konnte beobachtet werden, dass die Transkription der Gene des *prpDBC2* Clusters nach der Propionatzugabe schnell ansteigt und für die beide getesteten Bedingungen auf diesem hohen Niveau bleibt (Abb. IV.3.1).

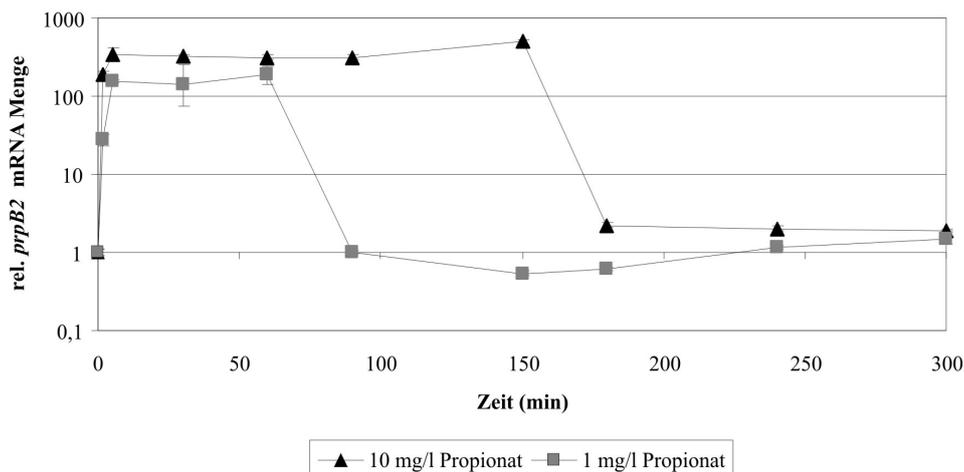


Abbildung IV.3.1: Bestimmung der minimalen Propionatkonzentration, welche zu einer maximalen Induktion des *prpDBC2* Operons führt. Real time RT-PCR Messung des *prpB2* Gens als Repräsentant des *prpDBC2* Operons. Die relative mRNA Menge des *C. glutamicum* Wildtypstamms wurde bestimmt und dargestellt. Die Zellen wurden im Fermenter in Minimalmedium MM1 mit Glukose als Kohlenstoffquelle angezogen. Bei einer o.D.₆₀₀ von 3 wurde ein Propionatpuls mit einer Konzentration von 1 mg/l (grau, Vierecke), beziehungsweise 10 mg/l (schwarz, Dreiecke) gegeben. Proben wurden vor (0 min) und zu zehn Zeitpunkten (2 min – 1050 min) nach der Propionatzugabe genommen. Die mRNA Menge zum Zeitpunkt 0 min wurde jeweils auf 1 normiert (Referenz), alle anderen gemessenen Werte sind relativ zur Referenz dargestellt.

Der Unterschied zwischen den beiden Konzentrationen zeigt sich in der Dauer der Induktion. So besitzt die Kultur, der 1 mg/l Propionat zugesetzt wurde, eine hohe Transkriptmenge für 1 Stunde, während in der 10 mg/l Kultur ein hohes mRNA Level für 2,5 Stunden aufrecht erhalten wird. Dies bedeutet, dass der *prpD2* Promotor/Operator ein sehr schnell reagierendes System ist, und dass es die Möglichkeit einer stabilen Expression in Abhängigkeit von der Propionatkonzentration bietet.

Um zu Bestimmen ob es zu einem Gendosiseffekt kommt, wenn mehrere Kopien der Promotor-/Operatorregion und/oder eines Zielgens vorhanden sind, wurden ein integratives und ein replikatives Plasmid konstruiert und auf die mRNA Expression untersucht. Beide Plasmide können in *E. coli* replizieren und sollten in *C. glutamicum* als Expressionssysteme genutzt werden können. Das integrative Expressionsplasmid, pJPint_C_K, beruht auf dem pRIM2 Vektor. Für dieses Konstrukt wurde der *prpD2* Promotor-/Operatorbereich in den Vektor kloniert und eine verbesserte multiple Klonierstelle, welche über zusätzliche Restriktionsschnittstellen verfügt, inseriert. Zusätzlich wurde das *cat* Gen komplett entfernt (Abb. IV.3.2). Da dieses Plasmid in Genom integriert und so exakt eine Kopie pro Zelle vorhanden ist, sollte dieses System die gleichen Charakteristika wie im Wildtyp aufweisen. Um die Expression dieses Vektors in *C. glutamicum* zu testen wurden der Wildtyp- und ein pJPint_C_K tragender Stamm (JP18) in MM1 Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle angezogen und bei einer o.D. von 3 wurde Propionat zugegeben. Proben wurden direkt vor (t0) und 60 Minuten nach (t60) dem Propionatpuls genommen. Nach der RNA Isolierung wurden *real time* RT-PCR Messungen einer Region zwischen Promotor und Terminator durchgeführt um die Expressionsstärke zu bestimmen. Die Resultate zeigten, dass sowohl die basale Expression, als auch die Induktionsraten des Plasmids vergleichbar sind mit denen des *prpDBC2* Operons im Wildtyp. Dies war ein Beweis dafür, dass das integrative System keinen Effekt auf die Transkription der Zielregion hat, und dass das Plasmid pJPint_C_K für eine induzierbare Genexpression in *C. glutamicum* genutzt werden kann. Da dieser Vektor ins Genom integrieren muss um erhalten zu bleiben, kann dieses System genutzt werden, wenn es wichtig ist exakt eine Kopie pro Zelle zu haben oder die basale Expression sehr gering gehalten werden soll.

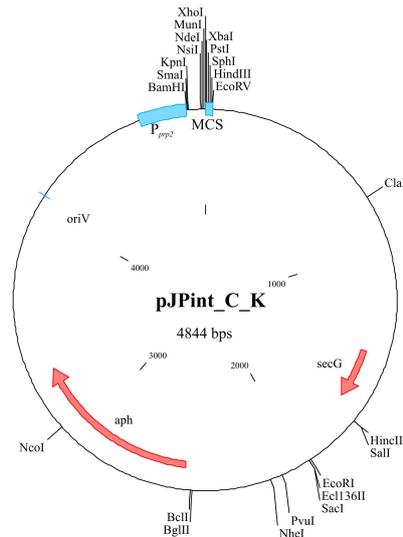


Abbildung IV.3.2: Konstruiertes Expressionsplasmid pJPint_C_K. Integratives Expressionsplasmid basierend auf dem pECXK99e Plasmid und dem *prpD2* Operator. Restriktionsschnittstellen, sowie P_{prpD2} und die verbesserte multiple Klonierstelle (MCS) sind angegeben.

Im Falle des pECXK99e Plasmids wurden der Promotor P_{trc} und das *lacI^f* Gen durch die 176 bp lange *prpD2* Promotor-/Operatorregion ersetzt. Da dieses Plasmid eine mittlere Kopienzahl in *C. glutamicum* besitzt, sollte getestet werden ob die zusätzlichen Kopien zu unterschiedlichen Expressionsprofilen im Vergleich zum chromosomalen System (*prpDBC2*) im Wildtypstamm führen. Um die Unterschiede in den Expressionscharakteristika zwischen dem plasmidbasierten und dem nativen System zu bestimmen wurden der Wildtyp- und ein plasmidtragender Stamm in MM1 Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle angezogen und bei einer o.D. von 3 wurde Propionat zugegeben. Proben wurden direkt vor (t0) und 60 Minuten nach (t60) dem Propionatpuls genommen. Nach der RNA Isolierung wurden *real time* RT-PCR Messungen durchgeführt um die Expressionsstärke entweder des *prpB2* Gens, für den Wildtypstamm, beziehungsweise für den plasmidtragenden Stamm einer Region zwischen Promotor und Terminator auf dem Plasmid, zu bestimmen. Diese Analyse zeigte eine um 100 fach erhöhte basale Expression des plasmidtragenden Stamms, verglichen mit der *prpDBC2* Expression im Wildtyp. Weiterhin war nur eine 1,2 fache Propionatinduktion auf dem Plasmid zu erreichen. Dieses zeigt eindeutig, dass sich die mittlere Kopienzahl des Plasmids negativ auf die Eigenschaften des Systems auswirkt und es in dieser Version nicht biotechnologisch verwendbar ist. Um zu testen ob eine geringere Kopienzahl des Plasmids wieder zu den gleichen Charakteristika führt, wie sie im Wildtypsystem vorhanden sind, wurde das *repA* Gen, welches die Kopienzahl des Plasmids in der Zelle reguliert, von pGA1 (mittlere Kopienzahl) in pGN2 (niedrige Kopienzahl) geändert (Abb. IV.3.3), um die nicht induzierte mRNA Menge, die vom *prpD2* Promotor aus gebildet wird, zu verringern. Das erhaltene Plasmid wurde pJPex_EC_K genannt und auch hier wurde die Funktionalität des konstruierten Expressionsplasmids per *real time* RT-PCR mit einem plasmidtragenden

Stamm (JP19) überprüft. Hierzu wurden der Wildtyp und ein pJPex_EC_K tragender Stamm (JP19) in MM1 Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle angezogen und bei einer o.D. von 3 wurde Propionat zugegeben. Proben wurden direkt vor (t0) und 60 Minuten nach (t60) dem Propionatpuls genommen. Nach der RNA Isolierung wurden *real time* RT-PCR Messungen durchgeführt um die Expressionsstärke entweder des *prpB2* Gens, für den Wildtypstamm, beziehungsweise für den plasmidtragenden Stamm einer Region zwischen Promotor und Terminator auf dem Plasmid, zu bestimmen. Hierbei konnte eine leicht erhöhte basale Expression des für das pJPex_EC_K Plasmid im Vergleich zum *prpDBC2* Operon im Wildtyp bestimmt werden. Die Induktionsrate sowohl des plasmidbasierten (112 fach), als auch des nativen Systems (123 fach) nach einem Propionatpuls liegen im gleichen Bereich. Somit lässt sich feststellen, dass der Kopienzahleffekt fast vollständig rückgängig gemacht wurde und das Plasmid somit auch für die zeitgesteuerte Expression von Zielgenen in *C. glutamicum* genutzt werden kann.

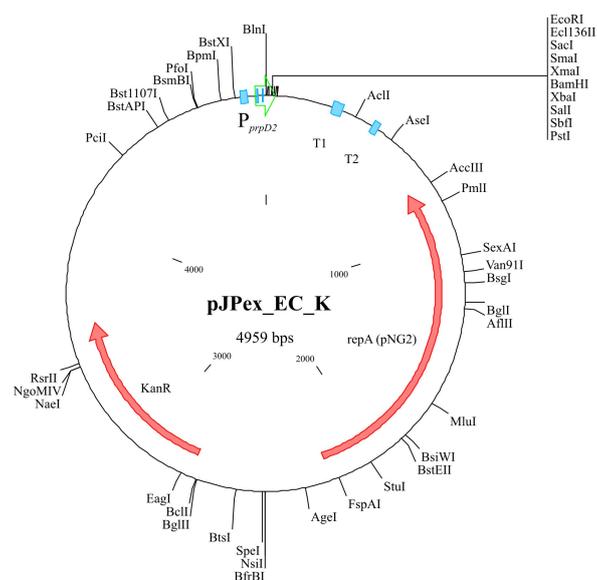


Abbildung IV.3.3: Konstruiertes Expressionsplasmid pJPex_EC_K. Replizierendes Expressionsplasmid basierend auf dem pECXK99e Vektor und dem *prpD2* Operator, das Replikon wurde von pGA1 in pNG2 ausgetauscht. Restriktionsschnittstellen, sowie P_{prpD2} und die Terminationssequenzen (T1 und T2) sind angegeben.

Nach der erfolgreichen Anwendung des PrpR basierten Systems auf einem integrativen Plasmid wurde ein ähnliches für die Expression eines heterologen Gens in *C. glutamicum* genutzt. Zu diesem Zweck wurden Fermentationen mit dem zuvor identifizierten 176 bp *prpD2* Promoter/Operator Fragment durchgeführt, welches genutzt wird um das plasmidbasierte *cat* (Chloramphenicol-Acetyl-Transferase) Gen zu transkribieren (Stamm JP9).

Hier wurde mittels *real time* RT-PCR die mRNA Menge des *cat* Gens einer Kultur gemessen, die mit Glukose als Kohlenstoffquellen angezogen wurde und der Propionat bei einer o.D.₆₀₀ von 3 hinzu gegeben wurde. Die *cat* mRNA Menge steigt in dieser Analyse auf den gleichen Level wie die Transkription der *prpDBC2* Gene im Wildtypstamm. Auch die Reaktionszeit ist vergleichbar, da es schon in den ersten Minuten zu einem starken Ansteigen der Transkript Menge kommt (Abb. IV.3.4).

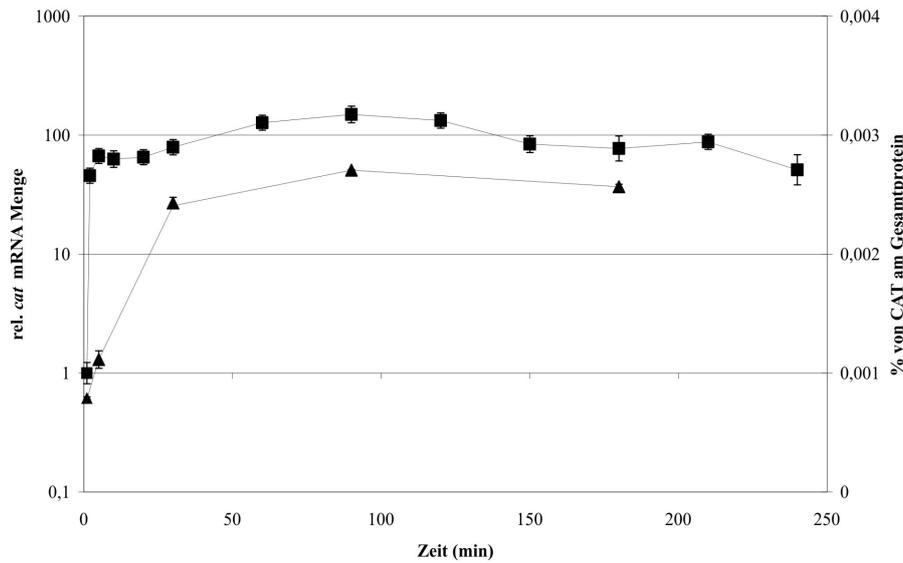


Abbildung IV.3.4: Bestimmung der transkriptionalen und translationalen Reaktionszeit und der Induktionskonstanz eines PrpR basierten Expressionssystems nach einem Propionatpuls. *Real time* RT-PCR Messung des *cat* Gens und relative Menge an Cat Protein am Gesamtprotein. Die relative mRNA Menge (Vierecke), sowie der prozentuale Anteil des Cat Proteins am Gesamtprotein (Dreiecke) des *C. glutamicum* JP9 Stamms wurden per *real time* RT-PCR, beziehungsweise Cat-ELISA bestimmt und dargestellt. Die Zellen wurden im Fermenter in Minimalmedium MM1 mit Glukose als Kohlenstoffquelle angezogen. Bei einer o.D.₆₀₀ von 3 wurde ein Propionatpuls gegeben. Proben wurden vor (0 min) und für bis zu 13 Zeitpunkte (2 min – 1000 min) nach der Propionatzugabe genommen. Die mRNA Menge zum Zeitpunkt 0 min wurde auf 1 normiert (Referenz), alle anderen gemessenen Werte sind relativ zur Referenz dargestellt.

Das Expressionsmuster bleibt stabil über die gesamte Fermentation. Dasselbe trifft für die gebildete Menge an Cat Protein zu, obwohl der Anstieg nicht so schnell verläuft wie bei der transkriptionellen Antwort (Abb. IV.3.4). Um zu testen ob sich das Expressionssystem auch in Komplexmedien eingesetzt werden kann, wurden *C. glutamicum* Zellen, welche das zuvor beschriebene Plasmid mit dem vom *prpD2* Promotor-/Operatorfragment transkribierten *cat* Gen tragen, in BHI, LB und MM1 mit einem Propionatpuls von 500 mg/l bei einer o.D.₆₀₀ von 3 als Referenz angezogen. Für die beiden Komplexmedien konnte keine erhöhte mRNA Menge nachgewiesen werden, nur für die MM1 Kultur war eine verstärkte Transkription nach der Propionatzugabe zu beobachten (Abb. IV.3.5).

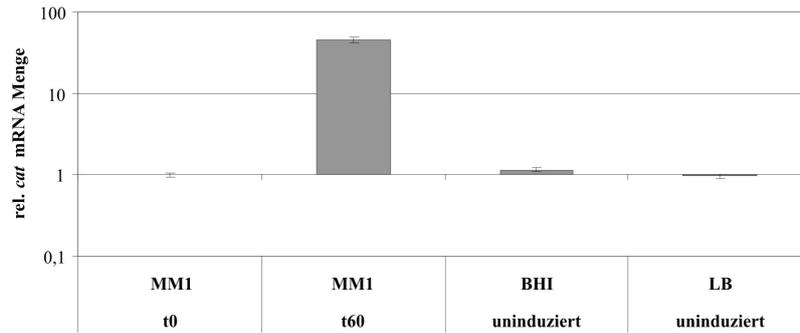


Abbildung IV.3.5: Analyse zur Anwendbarkeit des PrpR basierten Expressionssystems in Komplexmedien. *Real time* RT-PCR Messung des *cat* Gens. Die relative *cat* mRNA Menge des *C. glutamicum* JP9 Stamms wurde bestimmt und dargestellt. Die Zellen wurden in Minimalmedium MM1 mit Glukose (MM1), Komplexmedium BHI oder Komplexmedium LB angezogen. Bei einer o.D.₆₀₀ von 3 wurde in der MM1 gewachsenen Kultur ein Propionatpuls gegeben. Proben der MM1 Kultur wurden vor (t0) und 60 min (t60) nach der Propionatzugabe genommen, die Komplexmedien Kulturen wurden zum Zeitpunkt t0 uninduziert geerntet. Die mRNA Menge zum Zeitpunkt t0 in der MM1 gewachsenen Kultur wurde auf 1 normiert (Referenz), alle anderen gemessenen Werte sind relativ zur Referenz dargestellt.

Im Anschluss wurden zwei Fermentationen des p_{PRM2}-tragenden Stamms in einem Minimalmedium (MM1) und einem Komplexmedium (LBG) durchgeführt und bei beiden wurde bei einer o.D.₆₀₀ von 3 Propionat in einer Konzentration von 500 mg/l zugegeben. Direkt vor Zugabe (0 min) und zu einigen Zeitpunkten danach wurden Proben genommen. In beiden Fällen ergab die anschließende *cat* mRNA Messung denselben Effekt eines schnellen und starken Anstiegs der Transkription, wie bei den *prpDBC2* Genen des Wildtypstammes nach einem Propionatpuls (Abb. IV.3.6).

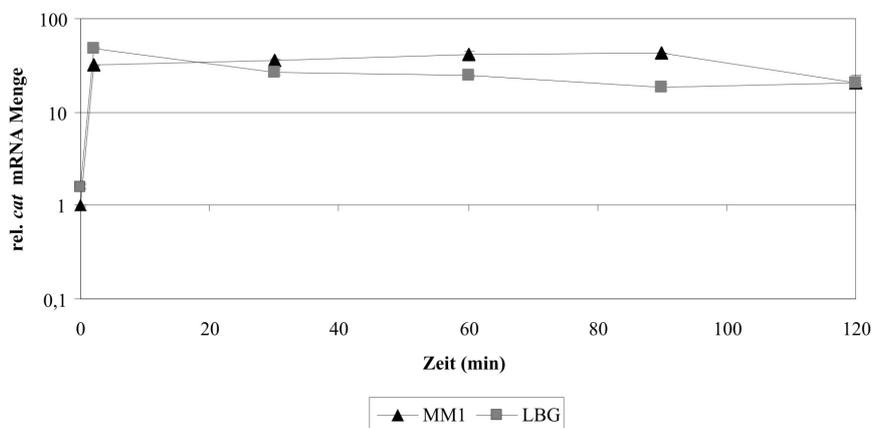


Abbildung IV.3.6: Bestimmung der transkriptionellen Charakteristiken des PrpR basierten Expressionssystems in einem Minimal- und einem Komplexmedium. *Real time* RT-PCR Messung des *cat* Gens. Die relative mRNA Menge des *C. glutamicum* JP9 Stamms wurde bestimmt und dargestellt. Die Zellen wurden im Fermenter in Minimalmedium MM1 mit Glukose als Kohlenstoffquelle (schwarz, Dreiecke) oder in LBG (grau, Vierecke) angezogen. Bei einer o.D.₆₀₀ von 3 wurde ein Propionatpuls gegeben. Proben wurden vor (0 min) und zu sechs Zeitpunkten (2 min – 1100 min) nach der Propionatzugabe genommen. Die mRNA Menge zum Zeitpunkt 0 min wurde für die in MM1 gewachsene Kultur auf 1 normiert (Referenz), alle anderen gemessenen Werte sind relativ zur Referenz dargestellt.

Auch hier konnte eine stabile Transkription über den gesamten Fermentationsverlauf beobachtet werden. Dies bedeutet, dass das Expressionssystem sowohl für Minimal-, als auch für Komplexmedien geeignet ist.

3.2 Das *lysA* Gen kann durch das chromosomale Einbringen der *prpD2* Promotor-/Operatorregion induzierbar aus seinem Operon entkoppelt werden

In dieser Anwendung des soll getestet werden ob sich auch chromosomal kodierte Gene transkriptionell durch das 176 bp *prpD2* Promotor-/Operatorfragment induzieren lassen. Für diesen Test wurde das *lysA* Gen ausgewählt, weil hier nicht nur die Induktion getestet werden kann, sondern gleichzeitig auch, ob es möglich ist das Gen von seiner Transkriptionseinheit mit *argS* zu entkoppeln. Das *argSlysA* Operon wird im Wildtypzustand von einem Promotor vor *argS* in einem Transkript abgelesen. Der *prpD2* Promotor-/Operatorbereich wurde in die 3 bp intergenische Region zwischen *argS* und *lysA* eingefügt, was diese auf 179 verlängert. Der so konstruierte Stamm JP22 und der Wildtypstamm als Referenz wurden in Minimalmedium MM1 mit Glukose als Kohlenstoffquelle angezogen. Bei einer o.D.₆₀₀ von 3 wurde ein Propionatpuls gegeben, direkt vor diesem (t0) und eine Stunde danach (t60) wurden Proben genommen und nach der RNA Isolierung mittels *real time* RT-PCR untersucht. Vor der Propionatinduktion wird das Operon in beiden Fällen vom *argS* Promotor transkribiert, was sich in identischer Expression im Wildtyp und JP22 Stamm äußert (Abb. IV.3.7). Nach der Propionatzugabe ist im JP22 Stamm eine stark erhöhte mRNA Menge von *lysA* vorhanden, während die Menge von *argS* konstant bleibt, für den Wildtyp ist keine Transkriptionsänderung durch den Propionatpuls feststellbar. Somit konnte nachgewiesen werden, dass der *prpD2* Promotor/Operator auch chromosomal für die Induktion von Genen eingesetzt werden kann und dass es mit diesem System möglich ist Teile von transkriptionell gekoppelten Einheiten individuell zu steuern.

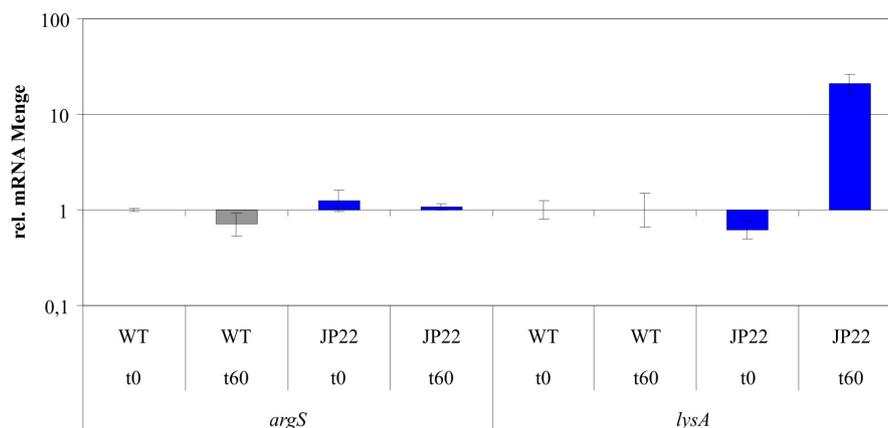


Abbildung IV.3.7: Analyse der chromosomalen Anwendbarkeit des PrpR basierten Expressionssystems. *Real time* RT-PCR Messung der im Operon liegenden Gene *argS* und *lysA*. Die relative mRNA Menge des *C. glutamicum* Wildtyp (grau) und JP22 (blau) Stamms wurde bestimmt und dargestellt. Die Zellen wurden in Minimalmedium MM1 mit Glukose als Kohlenstoffquelle angezogen. Bei einer o.D.₆₀₀ von 3 wurde ein Propionatpuls gegeben. Proben wurden vor (t0) und 60 min nach (t60) der Propionatzugabe genommen. Die mRNA Menge zum Zeitpunkt t0 wurde für die Wildtyp Kultur für jedes Gen einzeln auf 1 normiert (Referenz), alle anderen gemessenen Werte sind relativ zur jeweiligen Referenz dargestellt.

3.3 Chromosomal induzierbare *hom* und *thrB* Gene in einem Vorläufer Methioninproduktionsstamm leiten den Kohlenstofffluss von Lysin zu Homoserin, Threonin und Isoleucin um

Nachdem bewiesen wurde, dass das *prpD2* Promotor-/Operatorexpressionssystem chromosomal funktional ist, sollte noch die biotechnologische Anwendbarkeit demonstriert werden. Hierbei soll das System genutzt werden um den Kohlenstofffluss in einem Produktionsstamm zu einem bestimmten Zeitpunkt umzuleiten und so bestimmte Metabolite konditional zu produzieren. Der Stamm *C. glutamicum* ST06, der große Mengen Lysin produziert und sekretiert, wurde als Basis für einen Austausch der nativen Promotorregion des *hom* Gens gegen das *prpD2* Promotor-/Operatorfragment verwendet und so der Stamm JP20 konstruiert. Da *hom* zusammen mit *thrB* in einem Operon transkribiert wird, sollten beide Gene durch einen Propionatpuls induzierbar sein. Die Stämme JP20 und ST06 (Referenz) wurden in einer Fermentation in MM1 mit Glukose als Kohlenstoffquelle kultiviert und Proben wurden direkt vor einem Propionatpuls (t_0), gegeben bei einer o.D.₆₀₀ von 10, eine Stunde danach (t_{60}), drei Stunden danach (t_{180}), und für die Bestimmung sekretierter Aminosäuren, 25 Stunden (t_{1500}) danach genommen. Die Proben wurden mittels *real time* RT-PCR untersucht um die Induktionsraten des *homthrB* Operons zu bestimmen, eine GC-MS Untersuchung wurde durchgeführt um den Einfluss auf die internen Metabolite zu analysieren, und per HPLC wurden die Konzentrationen der sekretierten Aminosäuren gemessen. Die mRNA Proben für den Zeitpunkt eine Stunde nach Propionatzugabe zeigten eine starke Induktion der Gene *hom* und *thrB* im JP20 Stamm (Abb. IV.3.8).

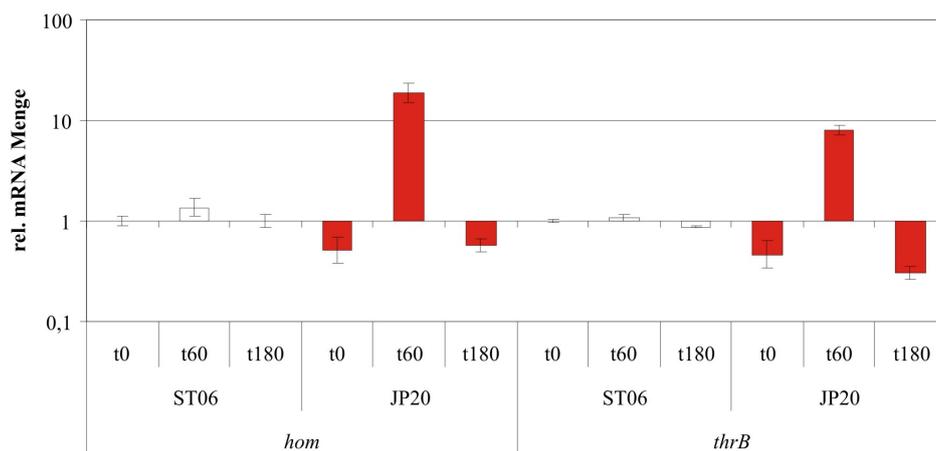


Abbildung IV.3.8: Analyse der chromosomalen Genexpression eines Operons, gesteuert durch das PrpR-basierte Expressionssystem. *Real time* RT-PCR Messung der im Operon liegenden Gene *hom* und *thrB*. Die relative mRNA Menge des *C. glutamicum* ST06 (weiß) und JP20 (rot) Stamms wurde bestimmt und dargestellt. Die Zellen wurden im Fermenter in Minimalmedium MM1 mit Glukose als Kohlenstoffquelle angezogen. Bei einer o.D.₆₀₀ von 10 wurde ein Propionatpuls gegeben. Proben wurden vor (t_0), 60 min (t_{60}) und 180 min (t_{180}) nach der Propionatzugabe genommen. Die mRNA Menge zum Zeitpunkt t_0 wurde für die ST06 Kultur für jedes Gen einzeln auf 1 normiert (Referenz), alle anderen gemessenen Werte sind relativ zur jeweiligen Referenz dargestellt.

Die Induktion ist nach drei Stunden nicht mehr nachweisbar, was auf die komplette Metabolisierung des eingesetzten Propionats hinweist. Im Referenzstamm ST06 kann kein Einfluss des Propionatpulses auf die Expression der *hom* und *thrB* Gene nachgewiesen werden. Interessanterweise ist die mRNA Menge beider Gene zu den Zeitpunkten t0 und t180 im JP20 Stamm geringer als im ST06 Stamm. In der metabolomischen Analyse waren zahlreiche Poolgrößen verändert über die unterschiedlichen Zeitpunkte. Einige Metabolitpools liegen nach dem Propionatpuls in beiden Stämmen erhöht vor, speziell Pyruvat und davon abgeleitete Metabolite, wie die Zitronensäurezyklusintermediate, Leucin und Valin, sowie die Intermediate ihrer Biosynthesewege, genauso wie Glycerat-3-Phosphat, Glycerat-2-Phosphat und Phosphoenolpyruvat (Abb. IV.3.9). Die Metabolite Homoserin, O-Acetylhomoserin, Cystathionin, Homolanthionin, Threonin und Isoleucin sind auch in beiden Stämmen erhöht, allerdings weist der JP20 Stamm immer noch größere Pools auf als der ST06 Stamm. Nur ein einziger Metabolitpool, der von Diaminopimelat, ist im ST06 Stamm erhöht, während er im JP20 Stamm unverändert (t60) oder sogar erniedrigt (t180) ist.

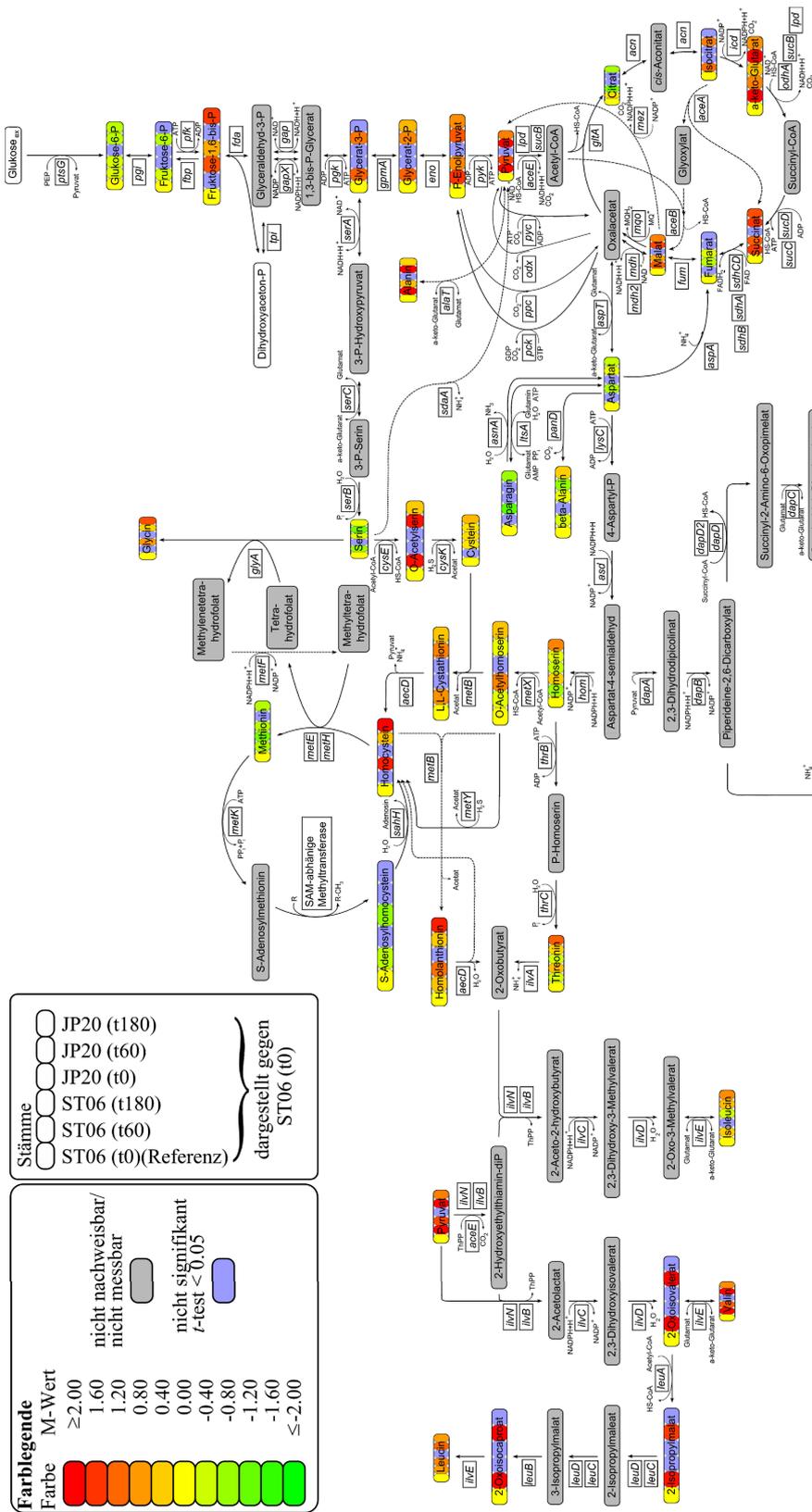


Abbildung IV.3.9: Bestimmung der Auswirkungen eines Propionatpulses auf das Metabolom zweier Stämme. Dargestellt sind relative Metabolitpoolgrößen der *C. glutamicum* ST06 und JP20 Stämme wurde bestimmt und sind jeweils für drei unabhängig gewachsene Kulturen dargestellt. Die Zellen wurden im Fermenter in Minimalmedium MM1 mit Glukose als Kohlenstoffquelle angezogen. Bei einer o.D.₆₀₀ von 10 wurde ein Propionatpuls gegeben. Proben wurden vor (t0), 60 min (t60) und 180 min (t180) nach der Propionatzugabe genommen. Die Poolgrößen vom ST06 Stamm zum Zeitpunkt t0 (Referenz) wurden auf 0 (gelb) gesetzt, alle anderen sind relativ zur Referenz dargestellt. Dabei entspricht die Farbe einem entsprechend positiven (rot) oder negativen (grün) M-Wert.

Die Messung der externen Aminosäuren zeigte, dass die meisten in beiden Stämmen in identischen Mengen sekretiert wurden, allerdings weisen die drei Aminosäuren Homoserin (+137 %, Abb. IV.3.10), Threonin (+251 %) und Isoleucin (+166 %, Abb. IV.3.10) nach Propionatzugabe, am Ende der Fermentation (t1500) deutlich höhere Konzentrationen im Überstand des JP20 Stamms im Vergleich zum ST06 Stamm auf, während sie ohne Propionat, also zu Anfang der Fermentation etwas verringert waren.

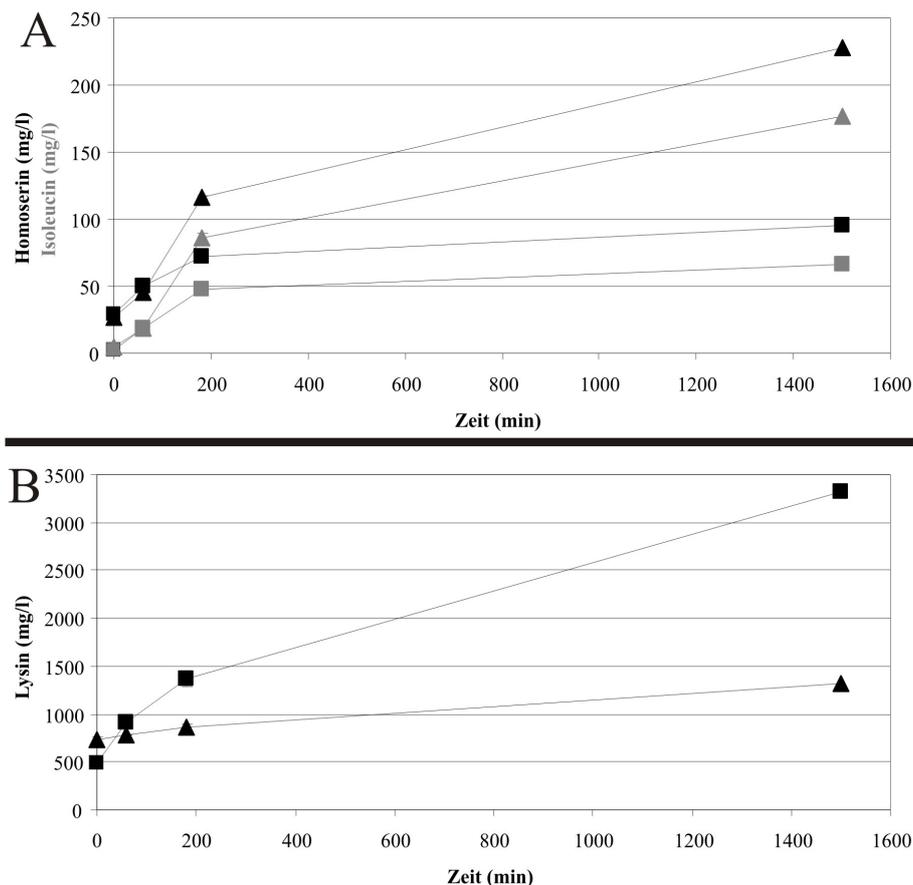


Abbildung IV.3.10: Konzentrationen der Aminosäuren Homoserin, Isoleucin und Lysin im Zellüberstand.
A: Die Konzentrationen der Aminosäuren Homoserin (schwarz) und Isoleucin (grau) wurden im Zellüberstand der *C. glutamicum* ST06 (Vierecke) und JP20 (Dreiecke) Kulturen bestimmt und dargestellt. Die Zellen wurden im Fermenter in Minimalmedium MM1 mit Glukose als Kohlenstoffquelle angezogen. Bei einer o.D.₆₀₀ von 10 wurde ein Propionatpuls gegeben. Proben wurden vor (t₀), 60 min (t₆₀), 180 min (t₁₈₀) und 1500 min (t₁₅₀₀) nach der Propionatzugabe genommen.
B: Konzentration der Aminosäure Lysin im Zellüberstand von *C. glutamicum* ST06 (Vierecke) und JP20 (Dreiecke) Kulturen. Wuchs- und Ernteparameter sind identisch zu A.

Die sekretierte Menge der Aminosäure Leucin ist am Ende der Fermentation (t₁₅₀₀) leicht (-17 %) und die von Lysin signifikant (-60 %, Abb. IV.3.10) reduziert, wenn sich Propionat im Medium befindet, allerdings sind die Konzentrationen vor Propionatzugabe etwas höher. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich der *prpD2* Promotor/Operator eignet um induzierbar den Kohlenstofffluss in Produktionsstämmen umzuleiten.

V Diskussion

1. Der 2-Methylcitratzyklus und die Propionattoxizität in Bakterien

Während der Ernte und der Prozessierung von zellulärem Material können sich drastische Veränderungen in den Metabolitpools ergeben, wenn die enzymatische Aktivität der Zelle nicht schnell und vollständig gestoppt wird (Fiehn, 2002). Um zuerst die Verlässlichkeit und Reproduzierbarkeit der Erntemethode nach dem Standardprotokoll und des eingesetzten Gerätes zu testen, wurden zahlreiche Analysen durchgeführt. Durch diese konnte bestätigt werden, dass das verwendete GC-MS einen geringen technischen Fehler aufweist und der zudem Vergleichbar ist mit dem einer vorherigen Studie (Strelkov *et al.*, 2004). Der bei den Untersuchungen aufgetretene biologische Fehler ist ebenfalls vergleichbar mit publizierten Daten (Strelkov *et al.*, 2004) und die durch absolute Quantifizierung ermittelten zellinternen Metabolitkonzentrationen liegen im Bereich der Werte, die in anderen Studien publiziert wurden (Kiefer *et al.*, 2002; Krömer *et al.*, 2005). Die Anzahl von 300 identifizierten hydrophilen Zellkomponenten (Chromatogramm-*peaks*) pro Chromatogramm liegt ebenfalls im Bereich vorheriger Untersuchungen mittels GC-MS (Strelkov *et al.*, 2004). Somit konnte bestätigt werden, dass sowohl die Erntemethode nach dem Standardprotokoll, als auch das verwendete Gerät geeignet sind, um metabolische Analysen durchzuführen.

Die zusätzlich zum Standardprotokoll getesteten Erntemethoden (erweiterte Methode 1 und erweiterte Methode 2) unterschieden sich stark in der *quenching*-Zeit, welche von 30 Sekunden für das Standardprotokoll, über 60 Sekunden für die erweiterte Methode 1 bis zu 120 Sekunden für die erweiterte Methode 2 reichen. Durch die Hierarchische Cluster Analyse (HCA) konnte gezeigt werden, dass die nach dem Standardprotokoll geernteten Zellen im Vergleich zu den anderen Protokollen ein metabolisches Profil aufwiesen, welches dem *in vivo* Zustand, aufgrund der kürzesten Zeit bis zur Enzyminaktivierung, am nächsten kommt. Bei Betrachtung der beiden erweiterten Protokolle wird sichtbar, dass die Zelle zu einem metabolisch stabilen Zustand strebt, der sich nicht mehr mit der erwarteten *in vivo* Situation deckt. Für die schnelle Erntemethode nach dem Standardprotokoll konnte eine gute Reproduzierbarkeit nachgewiesen werden, da alle Replikate der auf einer bestimmten Kohlenstoffquelle angezogenen Zellen in der HCA eng zusammen liegen. Da die Proben aus den unterschiedlichen Kohlenstoffquellen in einzelne, klar getrennte Cluster eingeordnet werden, ist es offensichtlich, dass Zellen bei Verstoffwechslung einer Kohlenstoffquelle jeweils ein spezifisches metabolisches Profil aufweisen. Die Ähnlichkeit der metabolischen Profile von mit Acetat und Acetat+Propionat gewachsenen Kulturen ist größer als die zu den mit Glukose gewachsenen Kulturen. Dieses war nicht überraschend, da in beiden Kulturen

Acetat als Kohlenstoffquelle zur Verfügung stand und es sich auch Propionat um eine Karbonsäure handelt. Propionat wird in *C. glutamicum* ähnlich verwertet wie Acetat, ganz im Gegensatz zu Glukose, welche über die Glykolyse abgebaut wird. Ein kritischer Punkt bei der Betrachtung der Daten ist, dass die bekannten metabolischen *turnover rates* nahe legen, dass die Pools vieler untersuchter Metabolite einige Male bis zum Abstoppen der metabolischen Zellaktivität umgeschlagen wurden. Die hier etablierte Methode birgt also den Nachteil nicht die *in vivo* Profile messen zu können, ist aber für funktionale, genomische Studien geeignet, da sich bei dieser Methode immer noch klar definierte metabolische Profile bestimmen lassen. Eine schnellere Methode zur Trennung von Zellen und Kulturmedium wurde bereits zuvor für *E. coli* beschrieben (Schaefer *et al.*, 1999). Hierbei wird die Enzyminaktivierung durch Ernte in -50°C kaltem Methanol erreicht, anschließend folgt eine Zentrifugation bei -20°C. Es ist allerdings fraglich ob diese Methode von *E. coli* auf *C. glutamicum* übertragbar ist, da bei deren Anwendung ein Auslaufen der Metabolite in das Medium beobachtet wurde (Kiefer *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu konnte die Methode in einer anderen Studie (Magnus *et al.*, 2006) erfolgreich eingesetzt werden, allerdings unter der Annahme, dass der Prozentsatz der durch Auslaufen verlorenen Metaboliten für alle Proben einer Zeitserie identisch ist. Eine weitere für *C. glutamicum* beschriebene Erntemethode für metabolische Untersuchungen (Strelkov *et al.*, 2004) erscheint nach den Daten dieser Arbeit nicht ideal, da diese eine *quenching*-Zeit von über vier Minuten aufweist. Der Nachteil von Verschleppungen von Mediumbestandteilen, welcher beim Standardprotokoll auftreten kann, kann durch Verwendung von synthetischen Minimalmedien überwunden werden, welche hauptsächlich kleine anorganische Komponenten und neben der Kohlenstoffquelle im Falle von *C. glutamicum* Kultivierungen nur noch eine essentielle organische Komponente (D-Biotin), enthalten.

Somit steht durch diese Arbeit eine schnelle, einfache und reproduzierbare Erntemethode für metabolische Untersuchungen von *C. glutamicum* zur Verfügung.

Eine detaillierte Analyse der Metabolitdaten von mit Glukose gewachsenen Kulturen zeigte, dass die Metabolite aus dem ersten Teil der Glykolyse, Glukose-6-Phosphat und Fruktose-6-Phosphat, in deutlich höheren intrazellulären Konzentrationen vorliegen als in Kulturen die Acetat metabolisieren. Dies ist nicht überraschend, da die Glykolyse der Hauptstoffwechselweg für die Verwertung von Glukose ist, und Glukose-6-Phosphat direkt bei der Aufnahme von Glukose durch das PTS-System erhalten wird. Interessanterweise weisen die Metabolite des zweiten Teils der Glykolyse, Glycerat-3-Phosphat, Glycerat-2-Phosphat, Phosphoenolpyruvat und Pyruvat in den mit Acetat gewachsenen Kulturen größere Pools auf. Phosphoenolpyruvat entsteht bei einer glukoneogenetischen Reaktion aus Oxalacetat, welche durch die Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (Pck) katalysiert wird.

Dies ist also ein Hinweis auf die Aktivität der Glukoneogenese, welche bereits in Stoffflussanalysen nachgewiesen werden konnte, wenn Acetat als alleinige Kohlenstoffquelle zur Verfügung steht (Wendisch *et al.*, 2000). Der größere Pyruvatpool resultiert wahrscheinlich direkt aus dem erhöhten Phosphoenolpyruvatpool, in Verbindung mit einer verringerten Expression der Pyruvatdehydrogenase E1 Untereinheit, welche in Microarrayanalysen beobachtet wurde (Muffler *et al.*, 2002). Die meisten der Zitronensäurezyklusintermediate zeigten größere Pools in den mit Acetat gewachsenen Kulturen, welches mit einem gesteigerten Stofffluss im Zitronensäurezyklus korreliert, der in Zellen nachgewiesen wurde die mit Acetat als Kohlenstoffquelle angezogen wurden (Wendisch *et al.*, 2000). Die erhöhten Pools von Succinat, Fumarat und Malat in den mit Acetat gewachsenen Kulturen lassen sich durch einen hohen Stofffluss durch den Glyoxylatweg erklären (Wendisch *et al.*, 2000), zusammen mit einer möglichen limitierenden Menge an Succinatdehydrogenase und/oder Malatdehydrogenase. Dass die anaplerotischen Reaktionen des Glyoxylatwegs, nur aktiv sind wenn Acetat im Medium vorhanden ist, wurde bereits durch Enzymaktivitätsmessungen (Reinscheid *et al.*, 1994a, 1994b), Expressionsanalysen (Muffler *et al.*, 2002) und Stoffflussmessungen (Wendisch *et al.*, 2000) nachgewiesen. Eine weitere Erklärung für die erhöhten Succinat-, Fumarat- und Malatpools könnte eine Limitierung von Acetyl-CoA sein, welches benötigt wird, um Oxalacetat in Citrat umzusetzen. Es konnte bereits in mit Acetat gewachsenen im Vergleich zu mit Glukose gewachsenen Kulturen nachgewiesen werden, dass sich der Stofffluss von Isocitrat aus zu 25 % in Richtung Glyoxylat und zu 75 % in Richtung α -Ketoglutarat verzweigt (Wendisch *et al.*, 2000). Auf metabolischer Ebene konnte in dieser Arbeit ein um 63 % größerer α -Ketoglutaratpool in den mit Acetat gewachsenen Kulturen beobachtet werden. Verglichen mit dem um 172 % vergrößertem Isocitratpool in denselben Kulturen lässt sich auch hier eine Aufteilung des Stoffflusses am Isocitratknoten vermuten. In Abbildung V.1.1 ist für Kulturen, die mit Glukose oder Acetat gewachsen sind der Vergleich einer Microarrayanalyse, (Muffler *et al.*, 2002), mit den in dieser Arbeit beobachteten Poolgrößen dargestellt.

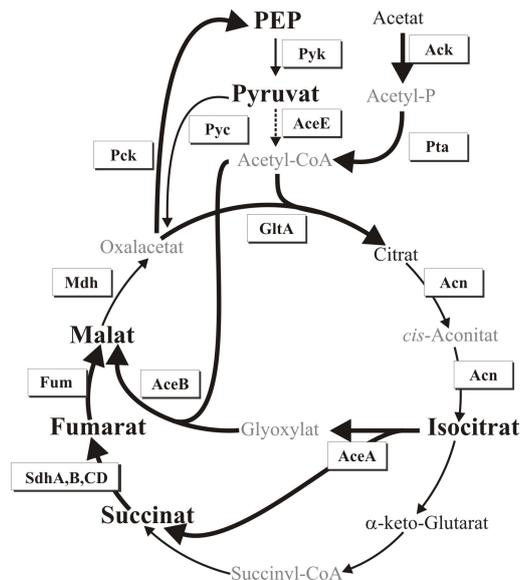


Abbildung V.1.1: Darstellung von Transkriptom- und Metabolomdaten im Zitronensäurezyklus, in der Acetataktivierung, im Glyoxylatwegs sowie zweier Glykolyseintermediate. Dargestellt sind signifikante Änderungen in der Genexpression und den Poolgrößen von Kulturen die mit Acetat als Kohlenstoffquelle gewachsen waren, im Vergleich zu Kulturen welche Glukose als Kohlenstoffquelle verwendeten. Höhere mRNA Mengen der mit Acetat gewachsenen Kulturen werden durch dickere Pfeile kenntlich gemacht, niedrigere Mengen durch gestrichelte Pfeile. Größere Metabolitpools werden durch den Metabolitnamen in Fettschrift dargestellt, kleinere Metabolitpools durch den Metabolitnamen in kursiv. Die dargestellten Enzyme sind die Pyruvatkinase (Pyk), der Pyruvatdehydrogenasekomplex (durch Untereinheit: AceE), die Citratsynthase (GltA), die Aconitase (Acn), die Acetatkinase (Ack), die Phosphotransacetylase (Pta), die Citratsynthase (GltA), die Phosphoenolpyruvatkinase (Pck), die Pyruvatcarboxylase (Pyc), die Isocitratlyase (AceA), die Malatsynthase (AceB), die Succinatdehydrogenase (SdhA,B,CD), die Fumarase (Fum) und die Malatdehydrogenase (Mdh). PEP – Phosphoenolpyruvat.

Hier sind einige Korrelationen zwischen diesen beiden unterschiedlichen Datensätzen auffällig. Die Gene des Glyoxylatwegs zeigen höhere Expressionsraten wenn Acetat im Medium vorhanden ist, zusätzlich sind die Produkt- und Edukt pools dieses Wegs (Isocitrat, Succinat, Malat) ebenfalls signifikant erhöht. Die Gene *sdhABCD* (Succinatdehydrogenase) und *fum* zeigen verstärkte Expressionsraten und der Fumaratpool ist ebenfalls erhöht. Die erhöhte mRNA Menge des Phosphoenolpyruvatcarboxykinase Gens (*pck*) in mit Acetat gewachsenen Kulturen korreliert mit einem deutlich erhöhten Phosphoenolpyruvatpool. Größere Pools in den Metaboliten des zweiten Teils der Glykolyse scheinen in den mit Acetat gewachsenen Kulturen benötigt zu werden, um effektiv Glukoneogenese zu betreiben, wahrscheinlich um die Reaktion in die energetisch aufwendige, rückwärtige Richtung der Glykolyse in einer Weise aufrecht zu erhalten, die es ermöglicht ausreichend Zuckerphosphate für den zellulären Stoffwechsel, und somit für weiteres Wachstum, zu produzieren.

Die Integration von transkriptomischen und metabolomischen Daten enthüllt detaillierte Informationen über das biologische Netzwerk von *C. glutamicum*. Der nächste Schritt könnte die zusätzliche Integration von Datensätzen aus proteomischen Ansätzen und Stoffflussanalysen sein. Diese Methoden bilden zusammen die experimentelle Basis für die

Systembiologie bildet und metabolische Messungen hierbei einen wichtigen Teil darstellen. Der GC-MS basierte Ansatz für ein metabolisches *profiling*, der in dieser Arbeit entwickelt wurde, besitzt außerdem großes Potenzial bei der Verbesserung von industriellen Produktionstämmen, da durch die Fähigkeit viele Metabolite schnell zu bestimmen die Identifizierung von metabolischen Regulationssystemen ermöglicht wird, ohne dass aufwendige Stoffflussanalysen durchgeführt werden müssen.

Proteomische und transkriptomische Ansätze konnten zeigen, dass die Gene des 2-Methylcitratzyklus, *prpDBC2*, stark exprimiert werden, wenn Propionat im Medium vorhanden ist (Claes *et al.*, 2002; Hüser *et al.*, 2003). Diese Tatsache korreliert mit der Beobachtung, dass die Intermediate des Zyklus (2-Methylcitrat, 2-Methylisocitrat), welche in dieser Arbeit identifiziert werden konnten, große Pools aufwiesen, wenn Propionat als Kohlenstoffquelle vorhanden war. Somit konnte zum ersten Mal die Aktivität des 2-Methylcitratzyklus in *C. glutamicum* auf metabolischer Ebene nachgewiesen werden.

Die transkriptionellen Daten einer Microarrayanalyse (Hüser *et al.*, 2003) und die Poolgrößen die in dieser Arbeit gemessen wurden, wurden in Abbildung V.1.2 zusammengeführt. In beiden Experimenten wurden Kulturen verwendet, die mit Acetat, oder mit einer Mischung aus Acetat und Propionat als Kohlenstoffquellen angezogen wurden. Obwohl nur wenige Pools und Transkripte des Zentralstoffwechsels signifikante Unterschiede zeigen, sind einige Korrelationen offensichtlich. Die Pools des 2-Methylcitratzyklus, sowie dessen mRNA Mengen zeigen erhöhte Werte in den Kulturen welche zusätzlich mit Propionat angezogen wurden. Dieses ist ein direkter Effekt, der sich aus der Verwertung von Propionat als Kohlenstoffquelle ergibt.

Es lassen sich auch Unterschiede in den aktiven anaplerotischen Reaktionen der untersuchten Kulturen finden. Während in den mit Acetat gewachsenen Kulturen nur der Glyoxylatweg aktiv ist, scheint dieser in den mit Acetat+Propionat gewachsenen Kulturen herunterreguliert zu sein, was sich auch von dem größeren Pool von α -Ketoglutarat und von dem verringerten Malatpool in den mit Acetat+Propionat gewachsenen Kulturen ableiten lässt. Es lässt sich darüber spekulieren, ob ein höherer Fluss durch den Glyoxylatweg in den mit Acetat gewachsenen Kulturen zu einem niedrigeren α -Ketoglutaratpool führt, da weniger Isocitrat in α -Ketoglutarat umgewandelt wird und der erhöhte Malatpool auf die verstärkte Expression der Malatsynthase (AceB) zurückzuführen ist. Die zusätzliche anaplerotische Reaktion, welche in den mit Acetat+Propionat gewachsenen Kulturen aktiv ist, wird katalysiert durch die Pyruvatcarboxylase (Pyc), welche Pyruvat, das im 2-Methylcitratzyklus gebildet wird, als Edukt verwendet. Sowohl der Pyruvatpool, als auch die Expression von *pyc* weist signifikant erhöhte Werte für die mit Acetat+Propionat gewachsenen Kulturen.

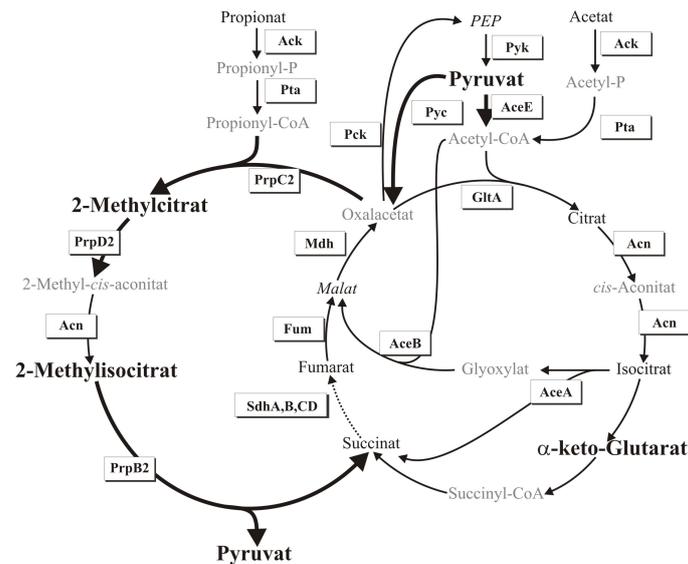


Abbildung V.1.2: Darstellung von Transkriptom- und Metabolomdaten im 2-Methylcitratzyklus, im Zitronensäurezyklus, in der Acetataktivierung, im Glyoxylatwegs sowie zweier Glykolyseintermediate. Dargestellt sind signifikante Änderungen in der Genexpression und den Poolgrößen von Kulturen die mit Acetat+Propionat als Kohlenstoffquellen gewachsen waren, im Vergleich zu Kulturen welche Acetat als Kohlenstoffquelle verwendeten. Höhere mRNA Mengen der mit Acetat+Propionat gewachsenen Kulturen werden durch dickere Pfeile kenntlich gemacht, niedrigere Mengen durch gestrichelte Pfeile. Größere Metabolitpools werden durch den Metabolitnamen in Fettschrift dargestellt, kleinere Metabolitpools durch den Metabolitnamen in kursiv. Die dargestellten Enzyme sind die Acetatkinase (Ack), die Phosphotransacetylase (Pta), die 2-Methylcitratsynthase (PrpC2), die 2-Methylcitratdehydratase (PrpD2), die Aconitase (Acn), die 2-Methylisocitratlyase (PrpB2), die Citratsynthase (GltA), die Phosphoenolpyruvatkinase (Pck), die Pyruvatcarboxylase (Pyc), die Pyruvatkinase (Pyk), der Pyruvatdehydrogenasekomplex (durch Untereinheit: AceE), die Isocitratlyase (AceA), die Malatsynthase (AceB), die Succinatdehydrogenase (SdhABCD), die Fumarase (Fum) und die Malatdehydrogenase (Mdh). PEP – Phosphoenolpyruvat.

Eine weitere Pyruvat umsetzende Reaktion wird durch den Pyruvatdehydrogenasekomplex katalysiert und liefert Acetyl-CoA. Das *aceE* Gen (E1 Untereinheit des Pyruvatdehydrogenasekomplexes) weist ebenfalls ein erhöhtes Transkriptlevel auf, wenn Propionat im Medium vorhanden ist, was darauf hindeutet, dass das aus Propionat entstehende Pyruvat anteilig für die Energiegewinnung über Acetyl-CoA und für die anaplerotische Reaktion über Oxalacetat genutzt wird.

Um den Propionatabbau und die Aktivität des 2-Methylcitratzyklus in *C. glutamicum* genauer zu charakterisieren, wurden die metabolischen Profile verschiedener Mutanten untersucht, die Defekte in den unterschiedlichen Schritten des Zyklus aufweisen. Die erste Reaktion des 2-Methylcitratzyklus ist die Kondensation von Propionyl-CoA und Oxalacetat. Diese wird durch PrpC2 katalysiert und liefert 2-Methylcitrat. Der $\Delta prpC2$ Stamm ist nicht mehr in der Lage 2-Methylcitrat zu synthetisieren wenn Propionat im Medium vorliegt, was bedeutet, dass dieses Enzym für die Propionatdegradation essentiell ist.

Während der Wachstumstests konnte nachgewiesen werden, dass der $\Delta prpD2$ Stamm nicht mehr in der Lage ist auf Mixturen der Kohlenstoffquellen Acetat und Propionat zu wachsen. Das führt zu der Annahme, dass die Anhäufung von 2-Methylcitrat in diesem Stamm, welche

nach Zugabe von Propionat zu einer mit Acetat gewachsenen Kultur beobachtet wird, einen bakteriostatischen Effekt auf die *C. glutamicum* Zellen hat. Ein toxischer Effekt von 2-Methylcitrat konnte auch in *S. enterica* nachgewiesen werden (Horswill *et al.*, 2001b), während dieser in *Aspergillus nidulans* auf Propionyl-CoA und 2-Methylisocitrat beruht (Brock, 2005; Brock *et al.*, 2000). Die Toxizität von 2-Methylcitrat beruht möglicherweise auf einer Inhibition von essentiellen Enzymen. Interessanterweise konnte 2-Methylcitrat im $\Delta prpD2$ Stamm nachgewiesen werden, der Acetat als alleinige Kohlenstoffquelle zur Verfügung hatte. Das bedeutet, dass Propionyl-CoA, der Vorläufer von 2-Methylcitrat auch in Abwesenheit von Propionat hergestellt werden muss. Generell kann Propionyl-CoA bei der Degradation ungradzahliger Fettsäuren entstehen, die allerdings in *C. glutamicum* selten sind, oder durch den Abbau verzweigtkettiger Aminosäuren. Die Anhäufung von 2-Methylcitrat im mit Acetat gewachsenen $\Delta prpD2$ Stamm ist offensichtlich nicht so groß, dass eine Wachstumsinhibition auftritt. Dasselbe trifft auf den $\Delta prpB2$ Stamm zu, der mit Acetat+Propionat als Kohlenstoffquellen gewachsen ist. Hier ist der 2-Methylcitratpool nur $\frac{1}{4}$ so groß wie der inhibitorisch wirkende Pool im $\Delta prpD2$ Stamm bei dem Propionat im Medium vorhanden war. Diese Beobachtung und der Nachweis von 2-Methylisocitrat in dem $\Delta prpD2$ Stamm führt zu der Annahme, dass noch mindestens ein weiteres Enzym neben PrpD2 in der Lage sein muss *in vivo* die Reaktion von 2-Methylcitrat zu 2-Methylisocitrat zu katalysieren. Das könnte bedeuten, dass die Reaktion von 2-Methylcitrat zu 2-Methyl-cis-Aconitat zum Teil durch das PrpD1 Enzym realisiert wird, welches im paralogen *prpDBC1* Operon liegt (Claes *et al.*, 2002), oder durch die Aconitase. Die Aktivität der Aconitase ist 2,5 fach erhöht bei Wachstum von *C. glutamicum* mit Propionat im Vergleich zu Glukose (Krug *et al.*, 2005). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Aconitase am Propionatabbau beteiligt sein könnte, allerdings ist die Aktivität dann nicht ausreichend um das Wachstum in dem $\Delta prpD2$ Stamm wieder herzustellen.

Die letzte Reaktion des 2-Methylcitratzyklus ist die Bildung von Pyruvat und Succinat aus 2-Methylisocitrat, katalysiert durch PrpB2. Dies wird belegt durch die Anhäufung von 2-Methylisocitrat im $\Delta prpB2$ Stamm. Die Analyse der Deletionsstämme belegt auf metabolischer Ebene, dass die Propionatdegradation in *C. glutamicum* über die Genprodukte des *prpDBC2* Operons verläuft und dass die vorhergesagte Reaktionsreihenfolge korrekt ist (Claes *et al.*, 2002).

2. Die transkriptionelle Regulation des Operons für den Propionatabbau in Bakterien

Obwohl viele Bakterien *prp* Gene besitzen die ihnen ermöglichen Propionat als Kohlenstoffquelle zu nutzen, scheint deren Regulation divers gelöst zu sein. Die bis jetzt beschriebenen Regulatoren des Propionatmetabolismus aus *E. coli* und *S. enterica* (Horswill und Escalante-Semerena, 1997; Lee und Keasling, 2005) weisen kein Ortholog in *C. glutamicum* auf. Eine Analyse der genomischen Umgebung der *prp* Gene in verschiedenen Bakterien konnte allerdings einen Regulator identifizieren, der in einigen Actinomyceten und α -Proteobakterien eng mit den *prp* Genen geclustert vorliegt. Da lokale Regulatoren häufig mit den Genen die sie regulieren geclustert liegen und da ein Ortholog in *C. glutamicum* vorliegt, war dies ein weiterer Hinweis darauf, dass *cg0800* (*prpR*) der Regulator des *prpDBC2* Operons sein könnte. Wegen der ähnlichen genomischen Anordnung und der Ähnlichkeit zwischen den Regulatoren *MAP0298* (*M. avium*), *MMAR_1378* (*M. marinum*), *RV1129c* (*M. tuberculosis*), *MSMEG6605* (*M. smegmatis*), *Gbro_1813* (*G. bronchialis*), *Rpal_2644* (*R. palustris*), *Rru_A2316* (*R. rubrum*), *RC1_3808* (*R. centenum*), *Pden_1350* (*P. denitrificans*) und *prpR* aus *C. glutamicum*, ist es wahrscheinlich, dass diese auch für Regulatoren des Propionatkatabolismus kodieren. Interessanterweise konnte kein Ortholog zu *prpR* aus *C. glutamicum* in dem nahe Verwandten *C. efficiens* identifiziert werden, obwohl das *prpDBC* Operon vorhanden ist und auch die Anordnung dieser Gene in der genomische Umgebung konserviert ist. Das könnte bedeuten, dass *C. efficiens* nicht in der Lage ist die *prp* Gene zu regulieren oder dass hier ein anderes regulatorisches System *prpR* ersetzt.

Das Protein PrpR hat Ähnlichkeit mit einem Regulator des Acetatmetabolismus, RamB (Gerstmeir *et al.*, 2004), welcher in *C. glutamicum*, im Gegensatz zu PrpR, ein breites Spektrum an Zielgenen hat. Ein weiterer Unterschied liegt im Funktionsmechanismus der beiden Regulatoren. Während RamB als Repressor beschrieben wurde, konnte diese Arbeit zeigen, dass PrpR ein Aktivator ist. Bei beiden Regulatoren liegt das HTH DNA-Bindemotif N-terminal (Gerstmeir *et al.*, 2004), welches für Repressor wie RamB häufig auftritt, für einen Aktivator wie PrpR aber eher ungewöhnlich (Perez-Rueda und Collado-Vides, 2000). Die Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz beider Regulatoren beruht möglicherweise auf einem gemeinsamen Vorfahren, aus dem sich nach Duplikation *ramB* und *prpR* entwickelt haben. Interessanterweise sind auch die Stoffe Acetat und Propionat, deren Abbau sie regulieren, strukturell eng verwandt.

Die komparative transkriptionelle Analyse des Wildtypstamms und des $\Delta prpR$ Stamms mittels Microarrayhybridisierungen zeigte, dass die Deletionsmutante nicht mehr fähig ist die die Transkription des *prpDBC2* Operons zu induzieren, wenn Propionat zur Verfügung steht. Das deutet darauf hin, dass PrpR dieses Operon reguliert. Interessanterweise liegt *prpR* in der Nähe des *prpDBC1* Operons, welches anhand der HCA der Microarraydaten nicht PrpR reguliert erscheint. Die Microarraydaten konnten durch *real time* RT-PCR Messungen des Wildtyp-, des $\Delta prpR$ - und des komplementierten $\Delta prpR$ Stamms nachgewiesen werden. Dass die Stämme, welche das Überexpressionsplasmid von *prpR* tragen, bei Wachstum mit Glukose als Kohlenstoffquelle eine geringere basale Expression zeigen als der Wildtypstamm, könnte darauf beruhen, dass mehr PrpR Protein in den Überexpressionszellen vorliegen sollte. Das Vorhandensein einer identischen Menge des Effektors führt dann möglicherweise zu einer geringeren Sensitivität des gesamten Systems, da. Zusätzliches aktiviertes PrpR Protein scheint keinen positiven Effekt auf die Induktionsstärke nach Propionatzugabe zu haben. Der Grund dafür ist wahrscheinlich, dass die Menge an PrpR im Wildtyphintergrund schon ausreichend ist um die maximale Transkriptionsstärke zu erreichen. Die Beobachtung, dass die mRNA Menge des *prpDBC2* Operons im $\Delta prpR$ Stamm nach der Propionatzugabe sinkt, könnte auf der erhöhten toxischen Auswirkung von Propionat auf diesen Stamm beruhen, welcher in den Wachstumstests nachgewiesen wurde. Dieser wachstumsinhibierende Effekt führt zu einer temporär stationären Kultur, in der sich das Verhältnis von mRNA zu stabiler RNA aufgrund der schnelleren mRNA Degradation verschiebt. Nach der Normalisierung auf die Gesamt-RNA Menge erhält man in der *real time* RT-PCR Analyse sehr niedrige relative Expressionsstärken.

Für die Charakterisierung der Promotorregion der Gene *prpD1*, *prpD2* und *prpR* wurden 5'-RACE Experimente durchgeführt. Für alle war es möglich den transkriptionellen Startpunkt und die wahrscheinliche Promotorregion zu bestimmen. Aufgrund der Sequenz der vorhergesagten Promotoren kann man vermuten, dass alle Promotoren vom Hauptsigmafaktor (SigA) in *C. glutamicum* erkannt werden (Patek *et al.*, 2003). SigA gehört zur σ^{70} - Familie der Sigmafaktoren. Für *E. coli* und *S. enterica* wird für die verstärkte Transkription der *prp* Gene ein Sigmafaktor der σ^{54} -Familie benötigt (Palacios und Escalante-Semerena, 2000), was für ein unterschiedliches regulatorisches System in *C. glutamicum* im Vergleich zu den Enterobakterien spricht. Das die Transkriptionsstarts der beiden *prpDBC* Operons einen fast identischen Abstand zum Translationsstart aufweisen, ist ein weiterer Hinweis darauf, dass beide Operons von einem gemeinsamen Vorfahren abstammen und wahrscheinlich durch Genduplikation entstanden sind.

Mittels EMSAs wurde der Koaktivator von PrpR bestimmt. Die zuvor *in vivo* identifizierte Promotor-/Operatorregion von *prpD2* wurde für diese Gelretardierungsexperimente eingesetzt, zusammen mit verschiedenen Substanzen die als Effektor in Frage kamen. Eine klare Verschiebung der Bande kann nur im Fall von 2-Methylcitrat beobachtet werden, allerdings kommt es auch möglicherweise bei Citrat und 2-Methylisocitrat zu einer leichten Interaktion, da hier eine etwas nach oben verbreiterte Bande beobachtet werden kann. Aus zwei Gründen ist es allerdings unwahrscheinlich, dass es sich um eine relevante Interaktion handelt. Zum einen wird keine klare zweite Bande wie im Fall von 2-Methylcitrat gebildet, was für eine feste Bildung zwischen Aktivator und DNA sprechen würde. Zum zweiten kann eine *in vivo* Aktivierung durch Citrat ausgeschlossen werden, da dieses in den Zellen bei Wachstum unabhängig von der Kohlenstoffquelle in großen Mengen vorhanden ist, aber eine Induktion der *prpDBC2* Gene nur spezifisch auftritt wenn Propionat im Medium vorhanden ist. Folglich kann man annehmen, dass 2-Methylcitrat der *in vivo* aktive Koaktivator ist. Dies ist vorteilhaft für die Zelle, da 2-Methylcitrat, wie zuvor gezeigt, einen toxischen Effekt hat. Detektiert der Organismus den toxischen Metaboliten, kommt es im Folgenden zur Induktion des *prpDBC2* Operons, welches für eine Entgiftung des Metaboliten durch beschleunigten Abbau sorgt. 2-Methylcitrat wurde auch in *E. coli* und *S. enterica* als Kofaktor nachgewiesen, und auch für diese Organismen wird spekuliert, dass es im Zusammenhang mit der Zellentgiftung steht (Palacios und Escalante-Semerena, 2004). Die Detektion von giftigen Komponenten durch die Sensierung als Kofaktor von Regulatoren ist nicht ungewöhnlich in *C. glutamicum*. Beispiele hierfür sind TetR, welcher Tetracyclin erkennt und das Tetracyclineffluxprotein reguliert (Tauch *et al.*, 2002; Tauch *et al.*, 2000), sowie AsrR, der Arsenat sensiert und an der Regulation der Gene beteiligt ist, welche für die Umwandlung von Arsenat zu Arsenit und den anschließenden Export des Arsenits zuständig sind (Mateos *et al.*, 2006). Ein weiteres Beispiel ist der Regulator Cg2965, dessen wahrscheinlicher Kofaktor Phenol ist, und welcher die Phenol-2-Monooxygenase reguliert. Diese wandelt Phenol in Catechol um, welches dann weiter über den β -Ketoacidweg katabolisiert wird (Brinkrolf *et al.*, 2006). Dieser Mechanismus ist dem sehr ähnlich, der auch bei PrpR verwendet wird. In beiden Fällen wird ein toxischer Stoff sensiert und dadurch werden die Gene welche für die Enzyme des Abbauwegs kodieren, und somit die Entgiftung zuständig sind, aktiviert.

In einer Studie wurden PrpR Mutanten Stämme beschrieben, die in der Lage waren, durch Fehlen der Citratsynthasen CitA und PrpC1 entstandene Wachstumsdefizite auszugleichen, indem es zu einer erhöhten 2-Methylcitrat- und Citratsynthaseaktivität kam (Radmacher und Eggeling, 2007). Die Vermutung hierbei war, dass es zu einer erhöhten Expression von PrpC2 Protein, in Abwesenheit von Propionat, kommt. Da die Mutationen alle in einer kleinen Region der *prpR* Kodierregion vorkommen und alle bis auf eine zu einem Austausch

von Glycin zu einer geladenen Aminosäure führen, wird vermutet, dass starke strukturelle Veränderungen dazu führen, dass PrpR in der Lage ist ohne Kofaktor zu binden. Daraus folgt, dass 2-Methylcitrat wahrscheinlich in dem C-terminalen Teil gebunden wird, in dem die Mutationen auftraten.

Der Wachstumsdefizit, der sich beim *prpR* Deletionsstamm in Gegenwart von Propionat zeigt, ist nicht durch die in Teil IV.1.5 beschriebene 2-Methylcitrattoxizität erklärbar. Die Pools dieses Metaboliten sind im Wildtypstamm und in dem komplementierten $\Delta prpR$ Stamm identisch groß und liegen im *prpR* Deletionsstamm verringert vor. Es muss daher noch ein weiterer toxischer Wirkmechanismus vom Propionat ausgehen, und da ein ähnlicher Effekt auch für Kulturen beobachtet wird, die mit Acetat als Kohlenstoffquelle wachsen, könnte es sein, dass dieser aus einer Änderung des zellinternen pH Werts entsteht. Für kurzkettige Karbonsäuren ist bekannt, dass sie den Protonengradienten entkoppeln können, da sie membrangängig sind und anschließend im Cytoplasma dissoziieren können (Blankenhorn *et al.*, 1999; Salmond *et al.*, 1984). Eine weitere Möglichkeit ist, dass der Effekt auf einer Homocysteintoxizität beruht, die durch kurzkettige Karbonsäuren ausgelöst wird und für *E. coli* beschrieben wurde (Roe *et al.*, 2002). Eine Überexpression von *metE*, dessen Genprodukt Homocystein in das weniger toxische Methionin umsetzt, konnte in Microarrays für *C. glutamicum* beobachtet werden, wenn Propionat als zusätzliche Kohlenstoffquelle vorhanden ist, was auf eine Entgiftung des Homocysteins hinweist (Hüser *et al.*, 2003). Neben 2-Methylcitrat wurden allerdings auch noch weitere Intermediate des Propionatkatabolismus als toxisch beschrieben. Diese sind 2-Methylisocitrat in *Aspergillus nidulans* (Brock, 2005) und Propionyl-CoA, beschrieben für *E. coli* (Man *et al.*, 1995), *Rhodobacter spheroides* (Maruyama und Kitamura, 1985) und *A. nidulans* (Brock und Buckel, 2004). Da 2-Methylisocitrat in *C. glutamicum* keinen toxischen Effekt zu haben scheint (Teil IV.1.5 dieser Arbeit), kann diese Möglichkeit ausgeschlossen werden, sodass es wahrscheinlich ist, dass der zusätzliche toxische Effekt des Propionats auf einer genannten Möglichkeiten, oder deren Kombinationen, beruht.

Durch diese Ergebnisse konnte der Aktivator PrpR mit seinem Regulon (*prpDBC2*), seiner Operatorregion (121bp stromaufwärts von *prpD2*) und seinem Koaktivator (2-Methylcitrat) beschrieben werden. Für einen Regulator der HTH_XRE Familie konnte zuvor keine Beteiligung an der Regulation der *prp* Gene gezeigt werden.

3. Das PrpR basierte Expressionssystem aus *C. glutamicum* und seine Anwendung im industriellen Maßstab

Für ein Expressionssystem, das nicht nur für Forschungszwecke sondern auch industriell einsetzbar sein soll, gibt es einige wichtige Voraussetzungen die erfüllt sein müssen. Dazu gehören eine preiswerte Induktionssubstanz, schnelle Reaktionszeiten, hohe Induktionsraten und ein stabiler Expressionslevel so lange die Induktionssubstanz vorhanden ist. Falls die Induktionssubstanz nicht im Medium vorhanden ist, sollte das System keine, oder nur sehr geringe Transkription des Zielgens aufweisen. Von höchster Bedeutung für industrielle Anwendungen ist die Möglichkeit das Expressionssystem in Komplexmedien nutzen zu können und dass das Verhalten dem in Minimalmedien entspricht. Um zu testen, ob alle Voraussetzungen vom PrpR basierten Expressionssystem erfüllt werden, wurden einige Experimente durchgeführt. Verschiedene Propionatkonzentrationen wurden getestet um die minimale Konzentration zu bestimmen, welche noch zu einer maximalen Induktion des *prpDBC2* Operons führt. Dabei stellte sich heraus, dass 1 mg/l Propionat ausreichend ist um das System für eine Stunde zu induzieren. Höhere Konzentrationen führten nicht zu einer weiteren Verstärkung der Transkription, sondern zu einem längeren Anhalten des Effekts. Nachdem das zugegebene Propionat im Medium verbraucht war, fiel die Transkription wieder auf den Level vor der Induktion ab. Dieser Verlauf zeigt ein sehr sensibles System an, in dem es möglich ist die Induktionsdauer über die Propionatkonzentration gezielt zu steuern. Im Vergleich zu anderen propionatinduzierbaren Systemen ist die benötigte Konzentration für eine maximale Expression in *C. glutamicum* mit rund 10 µM um den Faktor 500 geringer als die 50 mM die in *E. coli* benötigt werden (Lee und Keasling, 2005). Das enterobakterielle System ist noch mit 200 µM induzierbar (Lee und Keasling, 2005), allerdings nur mit geringen Induktionsraten und auch dies ist noch die zwanzigfache Konzentration die in *C. glutamicum* für eine maximale Transkription ausreicht. Ein genauer Vergleich der Induktionsraten von *C. glutamicum* und *E. coli* ist nicht möglich, da für *E. coli* nur die Proteinakkumulation gemessen wurde, während für *C. glutamicum* mRNA Level bestimmt wurden. Zwei anderen kohlenstoffquellenabhängige Promotoren wurden für *C. glutamicum* als Expressionssysteme beschrieben, allerdings wurden hier nur die Induktionsraten über Enzymaktivitäten bestimmt, welche im induzierten Zustand 3,4 und 4,2 fach erhöht vorlagen (Okibe *et al.*, 2010). Die Messung von mRNA Induktionsraten erscheint am besten geeignet für transkriptionelle Expressionssysteme, da sowohl die Proteinsynthese und Degradation, die posttranslationale Modifikation, sowie die Enzymaktivität durch viele Faktoren in der Zelle geändert werden können.

Mittels zweier plasmidbasierter Expressionssysteme konnte ein eindeutiger Kopienzahleffekt

nachgewiesen werden. Eines dieser Systeme ist ein integrativer Vektor (pJPint_C_K), welcher benutzt werden kann um exakt eine Kopie ins Zielgenom einzubringen, während das andere ein niedrigkopienzahl Plasmid ist (pJPex_EC_K), das sich für schnelles klonieren und exprimieren von Zielgenen eignet. Der Expressionslevel vor und nach Propionatinduktion beider plasmidbasierten Expressionssysteme korrelierte mit der parallel gemessenen Expression des *prpDBC2* Operons von *C. glutamicum* Wildtypzellen. Somit sind beide Systeme funktional und für die propionatinduzierte Expression von Zielgenen in *C. glutamicum* geeignet.

Anhand der Transkription des *cat* Gens konnte gezeigt werden, dass die stabile Expression von heterologen Proteinen mit den PrpR basierten System möglich ist. Der mRNA Level zeigt schon nach zwei Minuten die volle Induktionsstärke und auch auf Proteinebene ist ein schneller Anstieg zu beobachten. Die auch in der Stationärphase noch deutlich erhöhte Menge an Cat Protein, im Gegensatz zur schon deutlich reduzierten mRNA Menge, lässt sich durch die hohe Stabilität des Proteins erklären, welches in *C. glutamicum* nur schlecht degradiert wird.

Im Bezug auf die Stabilität der Induktion konnte nachgewiesen werden, dass der mRNA Level über die gesamte Fermentation konstant ist, solange Propionat im Medium vorhanden ist, was für eine sehr stabile Transkription spricht. Das PrpR basierte System kann sowohl im Minimalmedien, wie MM1, aber auch in Komplexmedien wie BHI und LB erfolgreich eingesetzt werden. Die mRNA Mengen vor der Propionatinduktion liegen alle im gleichen Bereich und eine Induktion des Expressionssystems konnte nur nach Propionatzugabe festgestellt werden. Im Falle von Fermentationen mit LB beziehungsweise MM1 werden die gleichen Induktionslevel erreicht und in beiden Kulturen wird das *cat* Gens über den gesamten Prozess stabil transkribiert. Dasselbe konnte für das *E. coli* basierte PrpR System nachgewiesen werden, für das die Induktionsmessungen in LB Medium durchgeführt wurden (Lee und Keasling, 2005).

Für diese Untersuchung wurde die propionatinduzierbare *prpD2* Promotor-/Operatorregion in die intergenische Region zwischen die Gene *argS* und *lysA*, die in einem Operon liegen, kloniert. Mittels Transkriptionsanalysen konnte nachgewiesen werden, dass das *lysA* Gen induziert exprimierbar war, während es unter nicht induzierten Bedingungen weiter als Operon zusammen mit *argS* transkribiert wurde. Dies bedeutet, dass es möglich ist chromosomale Gene induzierbar über eine Kopplung mit dem PrpR basierten Expressionssystem zu transkribieren und ebenfalls konnte nachgewiesen werden, dass so Gene aus ihren bisherigen Transkriptionseinheiten entkoppelt werden können.

Um diese Anwendung biotechnologisch zu verwerten wurde der Promotor des *hom* Gens chromosomal gegen die *prpD2* Promotor-/Operatorregion ausgetauscht, was in einer

propionatinduzierbaren *homthrB* Genexpression resultiert. Der Referenzstamm, ohne die induzierbaren Gene (ST06) zeigte keine transkriptionellen Veränderungen des *homthrB* Operons nach einem Propionatpuls, während für den Teststamm (JP20) eine deutliche Induktion nachgewiesen wurde, wenn Propionat im Medium vorhanden war. Der Promotoraustausch führt im JP20 Stamm zu geringeren mRNA Mengen des *homthrB* Operons wenn kein Propionat als Kohlenstoffquelle zur Verfügung steht, verglichen mit dem ST06 Stamm. Das weist darauf hin, dass der natürliche *hom* Promotor im ST06 Stamm stärker ist als der uninduzierte *prpD2* Promotor. Das Metabolom beider Stämme weist deutliche Veränderungen nach dem Propionatpuls auf. Viele von ihnen scheinen direkte Effekte der Propionatmetabolisierung zu sein, da sie ihren Ursprung im erhöhten Pyruvatpool haben, welcher durch den Propionat degradierenden 2-Methylcitratzyklus entsteht. Ein größerer Pool an Pyruvat konnte auch schon während der Untersuchung des 2-Methylcitratzyklus im ersten Teil dieser Arbeit festgestellt werden. Auch die erhöhten Pools der Metabolite Glycerat-3-Phosphat, Glycerat-2-Phosphat, Phosphoenolpyruvat und der Zitronensäurezyklusintermediaten konnten, wie im ersten Teil der Arbeit, erneut gefunden werden. Dies deutet darauf hin, dass es sich hier um Effekte handelt, die direkt auf die Verwendung von Propionat als Kohlenstoffquelle zurückzuführen sind und somit vom Promotoraustausch unabhängig sind. Zusätzlich können alle Pools, die in beiden Stämmen identisch verändert sind (Leucin, Valin und deren Biosyntheseintermediate) als direkte Propionateffekte betrachtet werden. Im Gegensatz dazu ist es wahrscheinlich, dass die Änderung in den Metabolitpools von Homoserin, O-Acetylhomoserin, Cystathionin, Homolanthionin, Threonin und Isoleucin, welche größere interne Pools im JP20 Stamm im Vergleich zum ST06 Referenzstamm aufweisen, aus der verstärkten Expression des *homlthrB* Operons resultieren. Ein weiterer Pool der durch die Expressionsänderung des *homlthrB* Operons beeinflusst wird ist der von Diaminopimelat. Für diesen Metaboliten ist der Pool im ST06 Stamm kleiner, was durch einen erhöhten Kohlenstofffluss von Aspartat-4-Semialdehyd zu Homoserin erklärbar ist, ausgelöst durch die erhöhte Menge der Homoserindehydrogenase (Hom). Der Kohlenstofffluss in Richtung 2,3-Dihydropicolinat von Aspartat-4-Semialdehyd aus ist deshalb herabgesetzt und resultiert in einem geringeren Diaminopimelatpool im ST06 Stamm. Obwohl es generell nicht möglich ist Kohlenstoffflüsse von Poolgrößen abzuleiten kommen zusätzliche Hinweise auf einen umgeleiteten Kohlenstofffluss von den Konzentrationen der sekretierten Aminosäuren, welche die Endpunkte des Kohlenstoffflusses sind und als solche Kohlenstoff fixieren. Das bedeutet, dass ein verstärkter Kohlenstofffluss in Richtung einer sekretierten Aminosäure in höheren externen Konzentrationen resultiert. Die drei Aminosäuren Homoserin, Threonin und Isoleucin weisen höhere Konzentrationen im Überstand des JP20 Stamm im Vergleich zum Referenzstamm auf. Die höheren Konzentrationen der Aminosäuren korrelieren den

größeren internen Metabolitpools im ST06 Stamm. Eine weitere Korrelation lässt sich bei der Betrachtung der externen Konzentration von Lysin nachweisen, welche im JP20 Stamm im Vergleich zur Referenz geringer ist und dem internen Pool von Diaminopimelat welcher im JP20 Stamm einen kleineren Pool aufweist. In diesem Fall ist Diaminopimelat eine direkte Vorstufe von Lysin. Die wahrscheinlichste Erklärung für diese Daten ist deshalb eine Umleitung des Kohlenstoffflusses am Verzweigungspunkt Aspartat-4-Semialdehyd, welche aus der durch Propionatzugabe verstärkten Transkription des *homthrB* Operons resultiert. Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass das PrpR basierte Expressionssystem für die Kohlenstoffflussumleitung in *C. glutamicum* Produktionsstämmen genutzt werden kann. Diese Anwendung kann genutzt werden um in Produktionsstämmen von Wachstum auf Produktion eines bestimmten Metaboliten umzuschalten. Zunächst kann der Organismus unter normalen Wachstumsbedingungen angezogen, wobei er hohe Wachstumsraten erreicht und zu einem bestimmten Zeitpunkt kann der Kohlenstofffluss durch Propionatzugabe von Biomasseproduktion in Richtung des biotechnologischen Produkts umgeschaltet werden.

Diese Arbeit trägt zum besseren Verständnis des Propionatabbaus in *C. glutamicum* bei. Zusätzlich wurde durch die Identifizierung und Charakterisierung des Regulators PrpR nicht nur die Regulation des Propionatabbaus aufgeklärt, sondern darauf aufbauend konnte ein PrpR basiertes Expressionssystem entwickelt werden. In dieser Arbeit ist ein breites Spektrum von Anwendungen für die PrpR basierten Expressionssysteme vorgestellt worden. Aufgrund der günstigen Induktorsubstanz (Propionat) und der hohen Induktionsraten zeigt das System ein großes Potential zukünftig in Forschung und Industrie eingesetzt zu werden.

VI Literatur

Amann, E., Brosius, J., Ptashne, M., (1983) Vectors bearing a hybrid trp-lac promoter useful for regulated expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene* 25, 167-178.

Arndt, A., Auchter, M., Ishige, T., Wendisch, V.F., Eikmanns, B.J., (2008) Ethanol catabolism in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 15, 222-233.

Bardonnet, N., Blanco, C., (1991) Improved vectors for transcriptional signal screening in corynebacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 68, 97-102.

Baronofsky, J.J., Schreurs, W.J., Kashket, E.R., (1984) Uncoupling by Acetic Acid Limits Growth of und Acetogenesis by *Clostridium thermoaceticum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 1134-1139.

Baumbach, J., (2007) CoryneRegNet 4.0 - A reference database for corynebacterial gene regulatory networks. *BMC Bioinformatics* 8, 429.

Blankenhorn, D., Phillips, J., Slonczewski, J.L., (1999) Acid- und base-induced proteins during aerobic und anaerobic growth of *Escherichia coli* revealed by two-dimensional gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* 181, 2209-2216.

Bonnarme, P., Psoni, L., Spinnler, H.E., (2000) Diversity of L-methionine catabolism pathways in cheese-ripening bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5514-5517.

Bramer, C.O., Silva, L.F., Gomez, J.G., Priefert, H., Steinbüchel, A., (2002) Identification of the 2-methylcitrate pathway involved in the catabolism of propionate in the polyhydroxyalkanoate-producing strain *Burkholderia sacchari* IPT101(T) und analysis of a mutant accumulating a copolyester with higher 3-hydroxyvalerate content. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 271-279.

Brinkrolf, K., Brune, I., Tauch, A., (2006) Transcriptional regulation of catabolic pathways for aromatic compounds in *Corynebacterium glutamicum*. *Genet. Mol. Res.* 5, 773-789.

Brinkrolf, K., Brune, I., Tauch, A., (2007) The transcriptional regulatory network of the amino acid producer *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* 129, 191-211.

Brinkrolf, K., Ploger, S., Solle, S., Brune, I., Nentwich, S.S., Hüser, A.T., Kalinowski, J., Pühler, A., Tauch, A., (2008) The LacI/GalR family transcriptional regulator UriR negatively controls uridine utilization of *Corynebacterium glutamicum* by binding to catabolite-responsive element (cre)-like sequences. *Microbiology* 154, 1068-1081.

Brock, M., (2005) Generation und phenotypic characterization of *Aspergillus nidulans* methylisocitrate lyase deletion mutants: methylisocitrate inhibits growth und conidiation. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5465-5475.

Brock, M., Buckel, W., (2004) On the mechanism of action of the antifungal agent propionate. *Eur. J. Biochem.* 271, 3227-3241.

Brock, M., Fischer, R., Linder, D., Buckel, W., (2000) Methylcitrate synthase from *Aspergillus nidulans*: implications for propionate as an antifungal agent. *Mol. Microbiol.* 35, 961-973.

- Brückner, R., Titgemeyer, F., (2002) Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source und autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiol. Lett.* 209, 141-148.
- Brune, I., Brinkrolf, K., Kalinowski, J., Pühler, A., Tauch, A., (2005) The individual und common repertoire of DNA-binding transcriptional regulators of *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium efficiens*, *Corynebacterium diphtheriae* und *Corynebacterium jeikeium* deduced from the complete genome sequences. *BMC Genomics* 6, 86.
- Burkovski, A., (2003) I do it my way: Regulation of ammonium uptake und ammonium assimilation in *Corynebacterium glutamicum*. *Arch. Microbiol.* 179, 83-88.
- Cadenas, R.F., Martin, J.F., Gil, J.A., (1991) Construction und characterization of promoter-probe vectors for *Corynebacteria* using the kanamycin-resistance reporter gene. *Gene* 98, 117-121.
- Cagnon, C., Valverde, V., Masson, J.M., (1991) A new family of sugar-inducible expression vectors for *Escherichia coli*. *Protein Eng.* 4, 843-847.
- Calabrese, F., Molteni, R., Maj, P.F., Cattaneo, A., Gennarelli, M., Racagni, G., Riva, M.A., (2007) Chronic duloxetine treatment induces specific changes in the expression of BDNF transcripts und in the subcellular localization of the neurotrophin protein. *Neuropsychopharmacology* 32, 2351-2359.
- Chin, K.J., Conrad, R., (1995) Intermediary metabolism in methanogenic paddy soil und the influence of temperature. *FEMS Microbiol. Ecol.* 18, 85-102.
- Claes, W.A., Pühler, A., Kalinowski, J., (2002) Identification of two *prpDBC* gene clusters in *Corynebacterium glutamicum* und their involvement in propionate degradation via the 2-methylcitrate cycle. *J. Bacteriol.* 184, 2728-2739.
- Constantinides, A., (1980) Steroid transformation at high substrate concentrations using immobilized *Corynebacterium simplex* cells. *Biotechnol. Bioeng.* 22, 119-136.
- de Boer, H.A., Comstock, L.J., Vasser, M., (1983) The *tac* promoter: a functional hybrid derived from the *trp* und *lac* promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 21-25.
- Degussa, A., (1994) European patent 0 375 889. In: AG, D. (Ed.).
- Dominguez, H., Lindley, N.D., (1996) Complete Sucrose Metabolism Requires Fructose Phosphotransferase Activity in *Corynebacterium glutamicum* To Ensure Phosphorylation of Liberated Fructose. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3878-3880.
- Dondrup, M., Albaum, S.P., Griebel, T., Henckel, K., Jünemann, S., Kahlke, T., Kleindt, C.K., Küster, H., Linke, B., Mertens, D., Mittard-Runte, V., Neuweger, H., Runte, K.J., Tauch, A., Tille, F., Pühler, A., Goesmann, A., (2009) EMMA 2--a MAGE-compliant system for the collaborative analysis und integration of microarray data. *BMC Bioinformatics* 10, 50.
- Dusch, N., Puhler, A., Kalinowski, J., (1999) Expression of the *Corynebacterium glutamicum panD* gene encoding L-aspartate-alpha-decarboxylase leads to pantothenate overproduction in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1530-1539.
- Eggeling, L., Bott, M., (2005) Handbook of *Corynebacterium glutamicum* (ed.).

- Eikmanns, B.J., Kleinertz, E., Liebl, W., Sahm, H., (1991) A family of *Corynebacterium glutamicum*/*Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, und promoter probing. *Gene* 102, 93-98.
- Engels, S., Schweitzer, J.E., Ludwig, C., Bott, M., Schäffer, S., (2004) *clpC* und *clpP1P2* gene expression in *Corynebacterium glutamicum* is controlled by a regulatory network involving the transcriptional regulators ClgR und HspR as well as the ECF sigma factor sigmaH. *Mol. Microbiol.* 52, 285-302.
- Engels, V., Lindner, S.N., Wendisch, V.F., (2008) The global repressor SugR controls expression of genes of glycolysis und of the L-lactate dehydrogenase LdhA in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 190, 8033-8044.
- Fiehn, O., (2002) Metabolomics--the link between genotypes und phenotypes. *Plant Mol. Biol.* 48, 155-171.
- Fiehn, O., Kopka, J., Dormann, P., Altmann, T., Trethewey, R.N., Willmitzer, L., (2000) Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat. Biotechnol.* 18, 1157-1161.
- Figge, J., Wright, C., Collins, C.J., Roberts, T.M., Livingston, D.M., (1988) Stringent regulation of stably integrated chloramphenicol acetyl transferase genes by *E. coli lac* repressor in monkey cells. *Cell* 52, 713-722.
- Funke, G., Lawson, P.A., Collins, M.D., (1995) Heterogeneity within human-derived centers for disease control und prevention (CDC) coryneform group ANF-1-like bacteria und description of *Corynebacterium auris* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 735-739.
- Gerstmeir, R., Cramer, A., Dangel, P., Schaffer, S., Eikmanns, B.J., (2004) RamB, a novel transcriptional regulator of genes involved in acetate metabolism of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 186, 2798-2809.
- Gottschalk, G., (1986) Bacterial metabolism. 2nd edition, Springer Verlag, New York, Berlin, Heidelberg.
- Halket, J.M., Przyborowska, A., Stein, S.E., Mallard, W.G., Down, S., Chalmers, R.A., (1999) Deconvolution gas chromatography/mass spectrometry of urinary organic acids--potential for pattern recognition und automated identification of metabolic disorders. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13, 279-284.
- Hansmeier, N., Chao, T.C., Pühler, A., Tauch, A., Kalinowski, J., (2006) The cytosolic, cell surface und extracellular proteomes of the biotechnologically important soil bacterium *Corynebacterium efficiens* YS-314 in comparison to those of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Proteomics* 6, 233-250.
- Horswill, A.R., Dudding, A.R., Escalante-Semerena, J.C., (2001a) Studies of propionate toxicity in *Salmonella enterica* identify 2-methylcitrate as a potent inhibitor of cell growth. *J. Biol. Chem.* 276, 19094-19101.
- Horswill, A.R., Dudding, A.R., Escalante-Semerena, J.C., (2001b) Studies of propionate toxicity in *Salmonella enterica* identify 2-methylcitrate as a potent inhibitor of cell growth. *J. Biol. Chem.* 276, 19094-19101.
- Horswill, A.R., Escalante-Semerena, J.C., (1997) Propionate catabolism in *Salmonella typhimurium* LT2: two divergently transcribed units comprise the *prp* locus at 8.5 centisomes, *prpR* encodes a member of the sigma-54 family of activators, und the *prpBCDE* genes constitute an operon. *J. Bacteriol.* 179, 928-940.

- Horswill, A.R., Escalante-Semerena, J.C., (1999) *Salmonella typhimurium* LT2 catabolizes propionate via the 2-methylcitric acid cycle. *J. Bacteriol.* 181, 5615-5623.
- Horswill, A.R., Escalante-Semerena, J.C., (2001) In vitro conversion of propionate to pyruvate by *Salmonella enterica* enzymes: 2-methylcitrate dehydratase (PrpD) und aconitase Enzymes catalyze the conversion of 2-methylcitrate to 2-methylisocitrate. *Biochemistry* 40, 4703-4713.
- Huffman, J.L., Brennan, R.G., (2002) Prokaryotic transcription regulators: more than just the helix-turn-helix motif. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12, 98-106.
- Hüser, A.T., Becker, A., Brune, I., Dondrup, M., Kalinowski, J., Plassmeier, J., Pühler, A., Wiegräbe, I., Tauch, A., (2003) Development of a *Corynebacterium glutamicum* DNA microarray und validation by genome-wide expression profiling during growth with propionate as carbon source. *J. Biotechnol.* 106, 269-286.
- Ikeda, M., Nakagawa, S., (2003) The *Corynebacterium glutamicum* genome: features und impacts on biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62, 99-109.
- Ikeda, M., Ohnishi, J., Hayashi, M., Mitsuhashi, S., (2006) A genome-based approach to create a minimally mutated *Corynebacterium glutamicum* strain for efficient L-lysine production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33, 610-615.
- Jolkver, E., Emer, D., Ballan, S., Kramer, R., Eikmanns, B.J., Marin, K., (2009) Identification und characterization of a bacterial transport system for the uptake of pyruvate, propionate, und acetate in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 191, 940-948.
- Jones, D., Collins, M.D., (1986) Irregular, non-sporing, gram-positive rods. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1261-1266.
- Kalinowski, J., Bathe, B., Bartels, D., Bischoff, N., Bott, M., Burkovski, A., Dusch, N., Eggeling, L., Eikmanns, B.J., Gaigalat, L., Goesmann, A., Hartmann, M., Huthmacher, K., Kramer, R., Linke, B., McHardy, A.C., Meyer, F., Mockel, B., Pfefferle, W., Pühler, A., Rey, D.A., Rückert, C., Rupp, O., Sahm, H., Wendisch, V.F., Wiegräbe, I., Tauch, A., (2003) The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence und its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids und vitamins. *J. Biotechnol.* 104, 5-25.
- Kawaguchi, H., Sasaki, M., Vertes, A.A., Inui, M., Yukawa, H., (2009) Identification und functional analysis of the gene cluster for L-arabinose utilization in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 3419-3429.
- Kiefer, P., Heinzle, E., Wittmann, C., (2002) Influence of glucose, fructose und sucrose as carbon sources on kinetics und stoichiometry of lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28, 338-343.
- Kimura, E., (2002) Triggering mechanism of L-glutamate overproduction by DtsR1 in coryneform bacteria. *J. Biosci. Bioeng.* 94, 545-551.
- Kinoshita, J.H., Udaka, S., Shimono, M., (1957) Amino acid fermentation. Part 1. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *Appl. Microbiol* 3, 193-205.
- Kirchner, O., Tauch, A., (2003) Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* 104, 287-299.
- Kornberg, H.L., (1966) The role und control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 99, 1-11.

- Kramer, R., Lambert, C., Hoischen, C., Ebbighausen, H., (1990) Uptake of glutamate in *Corynebacterium glutamicum*. 1. Kinetic properties und regulation by internal pH und potassium. Eur. J. Biochem. 194, 929-935.
- Krömer, J.O., Fritz, M., Heinzle, E., Wittmann, C., (2005) In vivo quantification of intracellular amino acids und intermediates of the methionine pathway in *Corynebacterium glutamicum*. Anal. Biochem. 340, 171-173.
- Krömer, J.O., Sorgenfrei, O., Klopprogge, K., Heinzle, E., Wittmann, C., (2004) In-depth profiling of lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* by combined analysis of the transcriptome, metabolome, und fluxome. J. Bacteriol. 186, 1769-1784.
- Krug, A., Wendisch, V.F., Bott, M., (2005) Identification of AcnR, a TetR-type repressor of the aconitase gene *acn* in *Corynebacterium glutamicum*. J. Biol. Chem. 280, 585-595.
- Lee, S.K., Keasling, J.D., (2005) A propionate-inducible expression system for enteric bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 71, 6856-6862.
- Lee, S.K., Keasling, J.D., (2006) A Salmonella-based, propionate-inducible, expression system for *Salmonella enterica*. Gene 377, 6-11.
- Lee, S.K., Keasling, J.D., (2008) Heterologous protein production in *Escherichia coli* using the propionate-inducible pPro system by conventional und auto-induction methods. Protein Expr. Purif. 61, 197-203.
- Leuchtenberger, W., (1996) Amino acids: Technical production und use.
- Lim, D.B., Oppenheim, J.D., Eckhardt, T., Maas, W.K., (1987) Nucleotide sequence of the *argR* gene of *Escherichia coli* K-12 und isolation of its product, the arginine repressor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 6697-6701.
- Lockhart, D.J., Dong, H., Byrne, M.C., Follettie, M.T., Gallo, M.V., Chee, M.S., Mittmann, M., Wang, C., Kobayashi, M., Horton, H., Brown, E.L., (1996) Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. Nat. Biotechnol. 14, 1675-1680.
- Madan Babu, M., Teichmann, S.A., (2003a) Evolution of transcription factors und the gene regulatory network in *Escherichia coli*. Nucleic Acids Res. 31, 1234-1244.
- Madan Babu, M., Teichmann, S.A., (2003b) Functional determinants of transcription factors in *Escherichia coli*: protein families und binding sites. Trends Genet. 19, 75-79.
- Magnus, J.B., Hollwedel, D., Oldiges, M., Takors, R., (2006) Monitoring und modeling of the reaction dynamics in the valine/leucine synthesis pathway in *Corynebacterium glutamicum*. Biotechnol. Prog. 22, 1071-1083.
- Man, W.J., Li, Y., O'Connor, C.D., Wilton, D.C., (1995) The binding of propionyl-CoA und carboxymethyl-CoA to *Escherichia coli* citrate synthase. Biochim. Biophys. Acta 1250, 69-75.
- Maruyama, K., Kitamura, H., (1985) Mechanisms of growth inhibition by propionate und restoration of the growth by sodium bicarbonate or acetate in *Rhodospseudomonas sphaeroides* S. J. Biochem. 98, 819-824.
- Mateos, L.M., Ordonez, E., Letek, M., Gil, J.A., (2006) *Corynebacterium glutamicum* as a model bacterium for the bioremediation of arsenic. Int. Microbiol. 9, 207-215.

- Matic, I., Taddei, F., Radman, M., (2004) Survival versus maintenance of genetic stability: a conflict of priorities during stress. *Res. Microbiol.* 155, 337-341.
- Molina-Henares, A.J., Krell, T., Eugenia Guazzaroni, M., Segura, A., Ramos, J.L., (2006) Members of the IclR family of bacterial transcriptional regulators function as activators and/or repressors. *FEMS Microbiol Rev.* 30, 157-186.
- Muffler, A., Bettermann, S., Haushalter, M., Hörlein, A., Neveling, U., Schramm, M., Sorgenfrei, O., (2002) Genome-wide transcription profiling of *Corynebacterium glutamicum* after heat shock und during growth on acetate und glucose. *J. Biotechnol.* 98, 255-268.
- Nakamura, Y., Nishio, Y., Ikeo, K., Gojobori, T., (2003) The genome stability in *Corynebacterium* species due to lack of the recombinational repair system. *Gene* 317, 149-155.
- Nolden, L., Beckers, G., Möckel, B., Pfefferle, W., Nampoothiri, K.M., Krämera, R., Burkovskia, A., (2000) Urease of *Corynebacterium glutamicum*: organization of corresponding genes und investigation of activity. *FEMS Microbiol. Lett.* 189, 305-310.
- Okibe, N., Suzuki, N., Inui, M., Yukawa, H., (2010) Isolation, evaluation und use of two strong, carbon source-inducible promoters from *Corynebacterium glutamicum*. *Let. Appl. Microbiol.* 50, 173-180.
- Overbeek, R., Begley, T., Butler, R.M., Choudhuri, J.V., Chuang, H.Y., Cohoon, M., de Crecy-Lagard, V., Diaz, N., Disz, T., Edwards, R., Fonstein, M., Frank, E.D., Gerdes, S., Glass, E.M., Goemann, A., Hanson, A., Iwata-Reuyl, D., Jensen, R., Jamshidi, N., Krause, L., Kubal, M., Larsen, N., Linke, B., McHardy, A.C., Meyer, F., Neuweger, H., Olsen, G., Olson, R., Osterman, A., Portnoy, V., Pusch, G.D., Rodionov, D.A., Ruckert, C., Steiner, J., Stevens, R., Thiele, I., Vassieva, O., Ye, Y., Zagnitko, O., Vonstein, V., (2005) The subsystems approach to genome annotation und its use in the project to annotate 1000 genomes. *Nucleic Acids Res.* 33, 5691-5702.
- Pabo, C.O., Sauer, R.T., (1992) Transcription factors: structural families und principles of DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 1053-1095.
- Palacios, S., Escalante-Semerena, J.C., (2000) *prpR*, *ntrA*, und *ihf* functions are required for expression of the *prpBCDE* operon, encoding enzymes that catabolize propionate in *Salmonella enterica* serovar typhimurium LT2. *J. Bacteriol.* 182, 905-910.
- Palacios, S., Escalante-Semerena, J.C., (2004) 2-Methylcitrate-dependent activation of the propionate catabolic operon (*prpBCDE*) of *Salmonella enterica* by the PrpR protein. *Microbiology* 150, 3877-3887.
- Parche, S., Burkovski, A., Sprenger, G.A., Weil, B., Kramer, R., Titgemeyer, F., (2001) *Corynebacterium glutamicum*: a dissection of the PTS. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3, 423-428.
- Patek, M., Nesvera, J., Guyonvarch, A., Reyes, O., Leblon, G., (2003) Promoters of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* 104, 311-323.
- Patnaik, R., Spitzer, R.G., Liao, J.C., (1995) Pathway engineering for production of aromatics in *Escherichia coli*: Confirmation of stoichiometric analysis by independent modulation of AroG, TktA, und Pps activities. *Biotechnol. Bioeng.* 46, 361-370.
- Perez-Rueda, E., Collado-Vides, J., (2000) The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* 28, 1838-1847.

- Perkins, D.N., Pappin, D.J., Creasy, D.M., Cottrell, J.S., (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 3551-3567.
- Radmacher, E., Eggeling, L., (2007) The three tricarboxylate synthase activities of *Corynebacterium glutamicum* und increase of L-lysine synthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 587-595.
- Reinscheid, D.J., Eikmanns, B.J., Sahm, H., (1994a) Characterization of the isocitrate lyase gene from *Corynebacterium glutamicum* und biochemical analysis of the enzyme. *J. Bacteriol.* 176, 3474-3483.
- Reinscheid, D.J., Eikmanns, B.J., Sahm, H., (1994b) Malate synthase from *Corynebacterium glutamicum*: sequence analysis of the gene und biochemical characterization of the enzyme. *Microbiology* 140 (Pt 11), 3099-3108.
- Resendis-Antonio, O., Freyre-Gonzalez, J.A., Menchaca-Mendez, R., Gutierrez-Rios, R.M., Martinez-Antonio, A., Avila-Sanchez, C., Collado-Vides, J., (2005) Modular analysis of the transcriptional regulatory network of *E. coli*. *Trends Genet.* 21, 16-20.
- Riedel, C., Rittmann, D., Dangel, P., Möckel, B., Petersen, S., Sahm, H., Eikmanns, B.J., (2001) Characterization of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene from *Corynebacterium glutamicum* und significance of the enzyme for growth und amino acid production. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3, 573-583.
- Roe, A.J., O'Byrne, C., McLaggan, D., Booth, I.R., (2002) Inhibition of *Escherichia coli* growth by acetic acid: a problem with methionine biosynthesis und homocysteine toxicity. *Microbiology* 148, 2215-2222.
- Roessner, U., Wagner, C., Kopka, J., Trethewey, R.N., Willmitzer, L., (2000) Technical advance: simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. *Plant J.* 23, 131-142.
- Rückert, C., Milse, J., Albersmeier, A., Koch, D.J., Pühler, A., Kalinowski, J., (2008) The dual transcriptional regulator CysR in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 controls a subset of genes of the McbR regulon in response to the availability of sulphide acceptor molecules. *BMC Genomics* 9, 483.
- Salmond, C.V., Kroll, R.G., Booth, I.R., (1984) The effect of food preservatives on pH homeostasis in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 130, 2845-2850.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2 ed.
- Schaefer, U., Boos, W., Takors, R., Weuster-Botz, D., (1999) Automated sampling device for monitoring intracellular metabolite dynamics. *Anal. Biochem.* 270, 88-96.
- Schafer, A., Tauch, A., Jager, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., Puhler, A., (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 und pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145, 69-73.
- Schaffer, S., Weil, B., Nguyen, V.D., Dongmann, G., Günther, K., Nickolaus, M., Hermann, T., Bott, M., (2001) A high-resolution reference map for cytoplasmic und membrane-associated proteins of *Corynebacterium glutamicum*. *Electrophoresis* 22, 4404-4422.

- Schleif, R., (2000) Regulation of the L-arabinose operon of *Escherichia coli*. Trends Genet. 16, 559-565.
- Shevchenko, A., Jensen, O.N., Podtelejnikov, A.V., Sagliocco, F., Wilm, M., Vorm, O., Mortensen, P., Boucherie, H., Mann, M., (1996) Linking genome und proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 14440-14445.
- Strelkov, S., von Elstermann, M., Schomburg, D., (2004) Comprehensive analysis of metabolites in *Corynebacterium glutamicum* by gas chromatography/mass spectrometry. Biol. Chem. 385, 853-861.
- Su, T.Z., Schweizer, H., Oxender, D.L., (1990) A novel phosphate-regulated expression vector in *Escherichia coli*. Gene 90, 129-133.
- Tauch, A., Gotker, S., Puhler, A., Kalinowski, J., Thierbach, G., (2002) The 27.8-kb R-plasmid pTET3 from *Corynebacterium glutamicum* encodes the aminoglycoside adenylyltransferase gene cassette aadA9 und the regulated tetracycline efflux system Tet 33 flanked by active copies of the widespread insertion sequence IS6100. Plasmid 48, 117-129.
- Tauch, A., Kassing, F., Kalinowski, J., Pühler, A., (1995) The *Corynebacterium xerosis* composite transposon Tn5432 consists of two identical insertion sequences, designated IS1249, flanking the erythromycin resistance gene *ermCX*. Plasmid 34, 119-131.
- Tauch, A., Kirchner, O., Wehmeier, L., Kalinowski, J., Pühler, A., (1994) *Corynebacterium glutamicum* DNA is subjected to methylation-restriction in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 123, 343-347.
- Tauch, A., Puhler, A., Kalinowski, J., Thierbach, G., (2000) TetZ, a new tetracycline resistance determinant discovered in gram-positive bacteria, shows high homology to gram-negative regulated efflux systems. Plasmid 44, 285-291.
- Textor, S., Wendisch, V.F., De Graaf, A.A., Muller, U., Linder, M.I., Linder, D., Buckel, W., (1997) Propionate oxidation in *Escherichia coli*: evidence for operation of a methylcitrate cycle in bacteria. Arch. Microbiol. 168, 428-436.
- Titgemeyer, F., Hillen, W., (2002) Global control of sugar metabolism: a gram-positive solution. Antonie Van Leeuwenhoek 82, 59-71.
- Vašicová, P., Abrahámová, Z., Nešvera, J., Pátek, M., Sahm, H., B., E., (1998) Integrative und autonomously replicating vectors for analysis of promoters in *Corynebacterium glutamicum*. Biotechnol. Tech. 12, 743-746.
- Veit, A., Rittmann, D., Georgi, T., Youn, J.W., Eikmanns, B.J., Wendisch, V.F., (2009) Pathway identification combining metabolic flux und functional genomics analyses: acetate und propionate activation by *Corynebacterium glutamicum*. J. Biotechnol. 140, 75-83.
- Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G.F., Chater, K.F., van Sinderen, D., (2007) Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 71, 495-548.
- Wendisch, V.F., (2003) Genome-wide expression analysis in *Corynebacterium glutamicum* using DNA microarrays. J. Biotechnol. 104, 273-285.

Wendisch, V.F., de Graaf, A.A., Sahm, H., Eikmanns, B.J., (2000) Quantitative determination of metabolic fluxes during cointegration of two carbon sources: comparative analyses with *Corynebacterium glutamicum* during growth on acetate and/or glucose. J. Bacteriol. 182, 3088-3096.

Wintjens, R., Rooman, M., (1996) Structural classification of HTH DNA-binding domains and protein-DNA interaction modes. J. Mol. Biol. 262, 294-313.

Wohlleben, W., Muth, G., Kalinowski, J., (1993) Genetic engineering of gram-positive bacteria. Biotechnology, 457-505.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J., (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene 33, 103-119.

Yokota, T., Omori, T., Kodama, T., (1987) Purification and properties of haloalkane dehalogenase from *Corynebacterium* sp. strain m15-3. J. Bacteriol. 169, 4049-4054.

Danksagung

Herrn Professor Dr. Alfred Pühler danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas meiner Dissertation und für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung. Herrn Dr. Jörn Kalinowski danke ich für die Zeit die ich in seiner Arbeitsgruppe verbringen durfte und dafür, dass er mich zu jeder Zeit mit Rat und Tat unterstützt hat.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Corynes für das äußerst angenehme Arbeitsklima und die häufigen und immer lustigen Freizeitaktivitäten. Herausheben möchte ich hier noch Charlott, Britta, Tobi, Marcus, Iris und Karina, die in all den Jahren zu guten Freunden geworden sind. Natürlich darf hier nicht die Coryne-Kultur-AG fehlen, mit der die Auslandsreisen immer ganz besondere Erfahrungen waren.

Zum Schluss möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern und meinen Freunden bedanken, die mir immer mit viel Hilfsbereitschaft, Geduld und Verständnis zur Seite standen.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbst angefertigt und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle aus der Literatur entnommenen Zitate sind als solche kenntlich gemacht.

Weiterhin erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation weder vollständig noch in Auszügen einer anderen Fakultät mit dem Ziel vorgelegt worden ist, einen akademischen Titel zu erwerben. Ich bewerbe mich hiermit erstmalig um den Doktorgrad der Naturwissenschaften der Universität Bielefeld.

Bielefeld, den 03.12.2010

Jens Plassmeier