

**SYSTEMBIOTECHNOLOGISCHE
STUDIEN AN
CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM
ZUR CHARAKTERISIERUNG DER
METHIONINSYNTHESE**

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des akademischen Grades

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

*der Naturwissenschaftlich-technischen Fakultät III Chemie, Pharmazie, Bio- und
Werkstoffwissenschaften der Universität der Saarlandes*

Jens Olaf Krömer

Saarbrücken 2006

Tag der Prüfung:

30.06.2006

Dekan:

Prof. Dr. Kaspar Hegetschweiler

Berichterstatter:

Prof. Dr. Elmar Heinzle

Prof. Dr. Rolf Müller

Prof. Dr. Wolfgang Liebl



Meiner Familie

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Elmar Heinzle für die Bereitstellung des Themas und die sehr gute wissenschaftliche Betreuung der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. Christoph Wittmann, der mich stets unterstützte und zu Diskussionen bereit war.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Rolf Müller und Herrn Prof. Dr. Wolfgang Liebl für die Bereitschaft zur Begutachtung der Arbeit.

Großer Dank gilt der BASF AG, Ludwigshafen für die finanzielle Unterstützung und die dort durchgeführten Analysen. Insbesondere danke ich Dr. Hartwig Schröder für die tatkräftige Hilfe bei der Stammkonstruktion und den regen wissenschaftlichen Austausch.

Für die sehr gute Unterstützung bei Fermentationen, die sehr hilfreichen Diskussionen und Anregungen danke ich Oliver Frick, Tae Hoon Yang, Christoph Bolten und Dr. Andreas Tholey.

Für die sehr gute Zusammenarbeit bei der Weiterentwicklung der Analytik danke ich insbesondere Michel Fritz und für die Deletion der Pyruvatkinase in *C. glutamicum* danke ich Judith Becker. Verena Schütz und Sara Stephan danke ich für ihre experimentellen Arbeiten im Rahmen ihrer Diplom- bzw. Forschungsarbeit. Maria Lasaosa, Christian Zimmer und Sabine Bastian danke ich für die Unterstützung bei der rekombinanten Produktion von MetC und MetB in *E. coli*. Dr. Joseph Zapp danke ich für die NMR-Analyse des Homolanthionins und der Gruppe von Prof. Dr. P. Mestres für die Durchführung der REM & TEM-Analysen.

Dem gesamten Arbeitskreis danke ich für ein gutes Arbeitsklima und viele Diskussionsbeiträge und für das regelmäßige Zurücksetzen des Arbeitsspeichers danke ich GOHC und Schnulli.

Meinen Eltern danke ich für die Unterstützung meines Studiums.

Schließlich gilt mein ganz besonderer Dank meiner Frau Nina und meinem Sohn Nils für das Verständnis und die Geduld, die sie aufgebracht haben.

Inhaltsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG.....	1
2. ABSTRACT	4
3. EINLEITUNG	7
4. ZIELSETZUNG.....	11
5. THEORETISCHE GRUNDLAGEN	12
5.1. Methioninstoffwechsel von <i>C. glutamicum</i>	12
5.2. Zentralstoffwechsel von <i>C. glutamicum</i>	14
5.3. Schwefelstoffwechsel von <i>C. glutamicum</i>	17
5.4. C ₁ -Stoffwechsel von <i>C. glutamicum</i>	19
5.5. Regulation von Methioninsynthese und angrenzender Synthesen.....	20
5.5.1. Regulation auf Proteinebene	22
5.5.2. Regulation auf Genomebene	23
5.6. Elementarmodenanalyse.....	24
6. MATERIAL UND METHODEN.....	27
6.1. Bakterienstämme	27
6.1.1. <i>Corynebacterium glutamicum</i>	27
6.1.2. <i>Escherichia coli</i>	28
6.2. Chemikalien und Nährstoffe	28
6.3. Stammhaltung.....	29
6.3.1. Medien.....	29
6.4. Stammkonservierung.....	33
6.5. Stammkultivierung	33
6.5.1. Vorkultur	33
6.5.2. Kultivierung im Schüttelkolben	33
6.5.3. Kultivierung im Bioreaktor	34
6.6. Analytische Methoden.....	35
6.6.1. Zellkonzentration	35
6.6.2. Korrelation von optischer Dichte und Biotrockenmasse.....	36

6.6.3.	Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie	37
6.6.4.	Zellextraktion	38
6.6.5.	Quantifizierung von Glycerin und Dihydroxyaceton.....	38
6.6.6.	Quantifizierung von Zuckern und organischen Säuren.....	40
6.6.7.	Quantifizierung von Aminosäuren.....	40
6.6.8.	Quantifizierung von Sulfat.....	45
6.6.9.	Quantifizierung von S-Adenosylmethionin	46
6.6.10.	CG/MS-Analyse von Massenisotopomerenverteilungen.....	46
6.6.11.	¹³ C-Flussanalyse.....	47
6.6.12.	Proteomanalyse mittels 2D-PAGE.....	47
6.7.	Aufreinigung und Charakterisierung von MetB und MetC	49
6.7.1.	Proteinaufreinigung.....	50
6.8.	Synthese und Aufreinigung von Homolanthionin.....	52
6.9.	Elementarmodenanalyse.....	53
6.9.1.	Das Netzwerk von <i>C. glutamicum</i>	53
6.9.2.	Das Netzwerk von <i>E. coli</i>	55
7.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	58
7.1.	Elementarmodenanalyse zum rationalen Design eines Produzenten für Methionin 58	
7.1.1.	Vergleich der Methioninproduktion von <i>C. glutamicum</i> und <i>E. coli</i>	58
7.1.2.	Metabolische Flussverteilungen in <i>C. glutamicum</i> und <i>E. coli</i> während maximaler Methioninproduktion.....	62
7.1.3.	Einfluss alternativer Schwefel- und C ₁ -Quellen auf die Methioninproduktion	66
7.1.4.	Einfluss des Erhaltungsstoffwechsels auf die theoretische Ausbeute.....	70
7.1.5.	Optimierungsansätze aus der Elementarmodenanalyse	72
7.1.6.	Zusammenfassung.....	75
7.2.	Identifikation und Biosynthese von Homolanthionin in <i>C. glutamicum</i> Δ <i>mcbR</i>	77
7.2.1.	Bestimmung des CNS-Gehaltes des Metaboliten mittels GC/MS.....	78
7.2.2.	Bestimmung der Herkunft des neuen Metaboliten.....	78
7.2.3.	Identifikation eines alternativen Weges zur Isoleucinsynthese.....	79

7.2.4.	Ursprung der Vorläufer von Isoleucin und dem neuen Metaboliten.....	81
7.2.5.	Identifikation von Homolanthionin in <i>C. glutamicum</i> $\Delta mcbR$	82
7.2.6.	Aufklärung der Biosynthese von Homolanthionin in <i>C. glutamicum</i>	84
7.2.7.	Synthese, Strukturaufklärung und Quantifizierung von Homolanthionin	89
7.2.8.	Relative Flussverteilung in der Methioninsynthese	90
7.2.9.	Zusammenfassung.....	92
7.3.	Systembiologischer Vergleich von <i>C. glutamicum</i> Wildtyp und $\Delta mcbR$	93
7.3.1.	Elementaranalyse von <i>C. glutamicum</i>	93
7.3.2.	REM- und TEM-Analyse von <i>C. glutamicum</i>	95
7.3.3.	Vergleich von Wachstum und Produktbildung.....	101
7.3.4.	Vergleich des Metaboloms.....	106
7.3.5.	Vergleich des Fluxoms.....	113
7.3.6.	Vergleich des Proteoms.....	121
7.3.7.	Oxidativer Stress in <i>C. glutamicum</i> $\Delta mcbR$	129
7.3.8.	Vergleich der Verwertung unterschiedlicher Schwefelquellen.....	131
7.3.9.	Thiosulfatmetabolismus	135
7.3.10.	Verstoffwechslung von Methanthiol.....	139
7.3.11.	Zusammenfassung.....	141
8.	SCHLUSSFOLGERUNGEN	144
9.	AUSBLICK.....	147
10.	LITERATUR	149
11.	ANHANG	164
11.1.	Protokolle Aminosäureanalytik.....	164
11.1.1.	Synergi MAX-RP	164
11.1.2.	Gemini.....	166
11.2.	SDS-PAGE.....	169
11.2.1.	Gele	169
11.2.2.	Färbung.....	170
11.3.	Stöchiometrische Netzwerke.....	171

11.3.1.	Das Modell von <i>C. glutamicum</i>	171
11.3.2.	Das Modell von <i>E. coli</i>	174
11.4.	¹³ C-Flussanalyse.....	177
11.5.	NMR-Spektren von Homolanthionin.....	179

Symbole und Abkürzungen

Symbol / Abkürzung	Bedeutung
μ_{\max}	maximale spezifische Wachstumsrate [h^{-1}]
13-PG	1,3-Bisphosphoglycerat
2-OXO	α -Ketoglutarat
2-PG	2-Phosphoglycerat
3-PG	3-Phosphoglycerat
3-PHP	3-Phosphohydroxypyruvat
ABC-Transporter	Membrantransportprotein mit ATP-Bindekassette
Ac-CoA	Acetyl-CoenzymA
APS	Adenylylsulfat
ASP	Aspartat
ASP-P	Aspartylphosphat
ASP-SA	Aspartatsemialdehyd
ATP / ADP / AMP	Adenosin-tri/di/mono-Phosphat
BASF	Badische Anilin und Soda Fabrik
BTM	Biotrockenmasse
Cis-ACO	Cis-Aconitat
CIT	Citrat
CPR	Kohlendioxidbildungsrate [mM h^{-1}]
CYS	Cystein
<i>cysD</i> / CysD	Gen / Protein der Sulfat-Adenyltransferase
<i>cysE</i> / CysE	Gen / Protein der Serintransacetylase
<i>cysH</i> / CysH	Gen / Protein APS / PAPS-Reduktasen
<i>cysI</i> / CysI	Gen / Protein der Sulfitreduktase
<i>cysJ</i> / CysJ	Gen / Protein der Sulfitreduktase
<i>cysK</i> / CysK	Gen / Protein der O-Acetylserin-Sulphydrylase A
<i>cysM</i> / CysM	Gen / Protein der O-Acetylserin-Sulphydrylase B
<i>cysN</i> / CysN	Gen / Protein der Sulfat-Adenyltransferase
CYSTA	Cystathionin
DH	Dehydrogenase
DHA	Dihydroxyaceton
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E4P	Erythrose-4-Phosphat
EDX	Energiedispersive Röntgenanalytik
F-1,6-BP	Fruktose-1,6-Bisphosphat
F6P	Fruktose-6-Phosphat
FAD ⁺	Flavinadeninukleotid oxidiert
FADH	Flavinadeninukleotid reduziert

Symbol / Abkürzung	Bedeutung
FUM	Fumarat
G6P	Glucose-6-Phosphat
GA3P	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
Glc	Glucose
GLC-LAC	Gluconolacton
GLU	Glutamat
GLY	Glycin
<i>glyA</i> / GlyA	Gen / Protein der Glycin-Hydroxymethyltransferase
GTP / GDP	Guanosin-tri/di-Phosphat
H-CoA	CoenzymA
HOM	Homoserin
<i>hom</i> / Hom	Gen / Protein der Homoserindehydrogenase
HOMOCYS	Homocystein
<i>hsk</i> / Hsk	Gen / Protein der Homoserinkinase
ICI	Isocitrat
<i>lysC</i> / LysC	Gen / Protein der Aspartokinase
MAL	Malat
<i>mcbR</i>	Gen des Methionin- und Cysteinbiosynthese Regulators
m_e	Energiebedarf zum Erhaltungsstoffwechsel [$\text{mmol ATP g}^{-1} \text{h}^{-1}$]
<i>metB</i> / MetB	Gen / Protein der Cystathionin- γ -Synthase
<i>metC</i> / MetC	Gen / Protein der Cystathionin- β -Lyase
<i>metE</i> / MetE	Gen / Protein der Methioninsynthase (B_{12} -unabhängig)
<i>metF</i> / MetF	Gen / Protein der Methylenetetrahydrofolat-Reduktase
<i>metH</i> / MetH	Gen / Protein der Methioninsynthase (B_{12} -abhängig)
<i>metK</i> / MetK	Gen / Protein der SAM-Synthase
<i>metX</i> / MetX	Gen / Protein der Homoserintransacetylase
<i>metY</i> / MetY	Gen / Protein der O-Acetylhomoserin-Sulphydrolase
m_{glc}	Energiebedarf zum Erhaltungsstoffwechsel [$\text{mmol Glucose g}^{-1} \text{h}^{-1}$]
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	Messenger RNA
M-THF	Methyltetrahydrofolat
NAD^+	Nicotinamiddinukleotid oxidiert
NADH	Nicotinamiddinukleotid reduziert
NADP^+	Nicotinamiddinukleotidphosphat oxidiert
NADPH	Nicotinamiddinukleotidphosphat reduziert
OAA	Oxalacetat
O-AC-HOM	O-Acetylhomoserin
O-AC-SER	O-Acetylserin
OD	Optische Dichte
PAPS	Phosphoadenylylsulfat

Symbol / Abkürzung	Bedeutung
PAPS	Phospho-Adenylylsulfat
PEP	Phosphoenolpyruvat
PEP-CK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
PP _i	Pyrophosphat
PPP	Pentosephosphatweg
PTS	Phosphotransferasesystem
PYR	Pyruvat
q _{Glc}	Spezifische Glucoseaufnahme [mmol (g h) ⁻¹]
q _p	Spezifische Produktbildungsrate [mmol (g h) ⁻¹]
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RIB-5P	Ribulose-5-Phosphat
RIBO-5P	Ribose-5-Phosphat
RNA	Ribonukleinsäure
RQ	Respiratorischer Quotient [mol _{CO2} mol _{O2} ⁻¹]
S7P	Sedoheptulose-7-Phosphat
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
SER	Serin
SER-P	Serinphosphat
SUCC	Succinat
SUCC-CoA	Succinyl-CoenzymA
TCA-Zyklus	Tricarbonsäurezyklus
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
THF	Tetrahydrofolat
XYL-5P	Xylulose-5-Phosphat
Y _{Met/S}	Methioninausbeutekoeffizient [mol mol ⁻¹ x 100] bzw. [C-mol C-mol ⁻¹ x 100]
Y _{X/S}	Biomasseausbeutekoeffizient [mol mol ⁻¹ x 100] bzw. [C-mol C-mol ⁻¹ x 100]

1. ZUSAMMENFASSUNG

Die essentielle schwefelhaltige Aminosäure Methionin ist eine der wichtigsten Aminosäure zur Supplementierung von Tierfutter und hat einen geschätzten Weltmarkt von 1 – 1,4 Milliarden Euro. Methionin wird gegenwärtig ausschließlich in einer chemischen Synthese als Razemat hergestellt, wobei giftige Chemikalien zum Einsatz kommen. Ein biotechnologisches Verfahren könnte dies vermeiden und die reine L-Form produzieren. Allerdings wurde bislang noch kein Organismus isoliert oder optimiert, der Methionin in ausreichender Menge produziert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde vor diesem Hintergrund der Methioninmetabolismus in *Corynebacterium glutamicum* näher untersucht. Im Mittelpunkt standen dabei sowohl *in silico* als auch *in vivo* Studien.

Die *in silico* Analyse des Stoffwechsels lieferte wertvolle Informationen zur Stamm- und Prozessentwicklung. Durch die Berechnung der theoretischen Ausbeuten war es möglich, wichtige Grundrichtungen für die rationale Stammentwicklung festzulegen. Die Elementarmodenanalyse ermöglichte eine stöchiometrische Betrachtung der Methioninsynthese unter verschiedenen Bedingungen in *C. glutamicum* und *Escherichia coli*, den bedeutendsten Mikroorganismen für die industrielle Aminosäureproduktion. Die maximalen theoretischen Ausbeuten lagen für das Wildtypnetzwerk von *C. glutamicum* bei 49,3 % (C-mol C-mol⁻¹) und für *E. coli* bei 52,0 % (C-mol C-mol⁻¹). Die höhere Ausbeute bei *E. coli* führte zur Identifikation von Optimierungszielen in *C. glutamicum*. So konnte gezeigt werden, dass die Einführung eines Glycinspaltungsenzyms die theoretische Kohlenstoffausbeute für Methionin in *C. glutamicum* auf 57,1% (C-mol C-mol⁻¹) deutlich steigern kann. Ferner konnten die maximalen Kohlenstoffausbeuten des metabolischen Netzwerkes von *C. glutamicum* auf unterschiedlich stark reduzierten Schwefel- und zusätzlichen C₁-Quellen berechnet werden. So zeigte sich bei Kultivierung auf Thiosulfat, Glucose und Formiat eine theoretische Ausbeute von 66,3 %. Bei einer Kultivierung auf Methanthiol (CH₃SH) und Glucose kann *C. glutamicum* Methionin sogar mit 90,9 % theoretischer Kohlenstoffausbeute synthetisieren. In weiteren Studien wurde der Einfluss des Erhaltungsstoffwechsels auf die theoretischen Ausbeuten untersucht. Es konnte berechnet werden, wie stark die theoretische Ausbeute vom Erhaltungsstoffwechsel abhängen wird. Besonders bei hohem Energiebedarf und geringen Produktbildungsraten wird dieser Faktor

eine große Rolle spielen. Die Untersuchungen zeigten, dass ein biotechnologischer Methioninprozess durchaus mit der chemischen Synthese konkurrieren könnte.

Im Mittelpunkt der *in vivo* Studien stand der Vergleich des Metaboloms, Proteoms und Fluxoms des Wildtyps von *C. glutamicum* mit einer Deletionsmutante, der der transkriptionelle Repressor McbR, das zentrale Regulatorprotein von Methioninsynthese, Sulfatreduktion und Cysteinsynthese fehlt. Die Deletion dieses Regulatorproteins wurde bislang als ein erster Schritt in der Stammoptimierung zur Methioninproduktion betrachtet. Allerdings wurde auch von diesem Stamm keine signifikante Menge an Methionin gebildet, weshalb die Auswirkungen des Regulatorknockouts im Detail untersucht werden sollten. Zum Stammvergleich wurden im Rahmen dieser Arbeit zunächst Methoden zur Zellextraktion und Analyse der Intermediate des Methioninstoffwechsels von *C. glutamicum* entwickelt.

Die eingehende Untersuchung intrazellulärer Metabolite zeigte die Akkumulation einer zunächst unbekannt Substanz in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$. Diese Substanz konnte mittels GC/MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ und ^{15}N -, ^{13}C - und ^{34}S -Markierungsstudien als die ungewöhnliche schwefelhaltige Diaminosäure Homolanthionin identifiziert werden. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Cystathionin- γ -Synthase, ein Enzym des Methioninstoffwechsels, für die Bildung von Homolanthionin verantwortlich ist. Grund ist eine geringe Substratspezifität, die bewirkt, dass Homocystein anstelle von Cystein mit O-Acetylhomoserin umgesetzt wird. Zusätzlich bewirkt die Akkumulation von Homolanthionin in der Zelle die Aktivierung eines neuen, erstmals beschriebenen Biosyntheseweges für Isoleucin, der von Threonin unabhängig abläuft.

Der systembiologische Vergleich von *C. glutamicum* Wildtyp und $\Delta mcbR$ zeigte neben der Akkumulation von Homolanthionin drastische Veränderungen von Metabolom, Fluxom und Proteom. So sind beispielsweise im *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ fast alle Intermediate der Methioninsynthese höher konzentriert und auch viele Enzyme der Methioninsynthese und der Sulfatreduktion induziert, wobei jedoch kein Methionin ins Medium abgegeben wird. Der limitierende Schritt in der Methioninsynthese scheint die Methylierung von Homocystein zu sein. Gleichzeitig wird der Fluss durch den Tricarbonsäurezyklus von 58,5 auf 88,5 % deutlich erhöht. Es hat den Anschein, dass ein erhöhter oxidativer Stress in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ durch die Erhöhung der Expression respiratorischer Enzyme und der Sulfitreduktase vorliegt. Dies bedingt langsames Wachstum und eine sehr starke Überexpression der Katalase. Morphologische Untersuchungen haben zusätzlich gezeigt, dass sich in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ Einschlusskörper befinden, die noch näher charakterisiert werden müssen.

Inspiziert von der Elementarmodenanalyse wurden erste Studien zur Verwertbarkeit unterschiedlicher Schwefelquellen durch *C. glutamicum* durchgeführt. Sie ergaben, dass Thiosulfat, Methanthiol und Dimethyldisulfid von *C. glutamicum* gut verwertet werden können. Es hat den Anschein, dass Dimethyldisulfid in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ den oxidativen Stress senkt, wodurch ein schnelleres Wachstum möglich ist. Die Verwertung von ^{34}S -Thiosulfat zeigte deutliche Unterschiede zwischen *C. glutamicum* Wildtyp und $\Delta mcbR$, die die Thiosulfatoxidation im Wildtyp und eine Thiosulfatreduktasereaktion in $\Delta mcbR$ nahe legen.

In der Zukunft sollte der Schwefel- und C_1 -Stoffwechsel intensiver studiert werden. Zusätzlich sollten die vier Enzyme MetE, MetH, GlyA und MetF, die alle die Limitierung in der Methylierung von Homocystein verursachen könnten, näher charakterisiert werden. Sobald es gelingt Methionin zu produzieren, sollten die Strategien aus der *in-silico* Analyse in der Stammentwicklung umgesetzt werden.

2. ABSTRACT

The essential sulfur-containing amino acid methionine is one of the most important amino acids as supplement for animal feed. It has an estimated world market of 1 – 1.4 billion Euros. Currently methionine is exclusively produced as a racemic mixture in chemical synthesis, using hazardous chemicals. A biotechnological methionine production could avoid the use of these chemicals and additionally produce the pure L-isomer of methionine. However, so far it was not possible to isolate or optimize a methionine overproducing microorganism. In the present work the methionine metabolism of *Corynebacterium glutamicum*, one of the most important industrial amino acid producers, was therefore investigated in detail. The scope of this work comprised both *in silico* and *in vivo* studies.

The *in silico* analysis of the metabolism provided valuable information for strain and process design. The calculation of theoretical yields allowed the determination of important strain improvement strategies. The elementary mode analysis made the comparison of the methionine production in *C. glutamicum* and *Escherichia coli* under different conditions possible. The wildtype networks of *C. glutamicum* and *E. coli* exhibited theoretical maximum yields of 49.3 % (C-mol C-mol⁻¹) and 52.0 % (C-mol C-mol⁻¹), respectively. The higher yield in the *E. coli* network led to the identification of targets for improvements in *C. glutamicum*. Thus, it could be shown that the introduction of a glycine cleavage system into *C. glutamicum* could significantly increase the theoretical yield to 57.1% (C-mol C-mol⁻¹). Moreover, the yields on differently reduced sulfur sources and alternative C₁-sources were calculated for the *C. glutamicum* network. It was found that cultivation on glucose, thiosulfate and formic acid could reach a theoretical yield of 66.3 %. During cultivation on methanethiol (CH₃SH) and glucose *C. glutamicum* could be able to produce methionine with an even higher yield of 90.9 %. In additional studies the influence of maintenance energy was investigated. It was found that the high theoretical yields will depend on maintenance especially at a high maintenance energy demand and a low methionine secretion rate. The *in silico* studies showed, that a biotechnological methionine production could compete with the chemical synthesis.

The *in vivo* analyses were focused on the in-depth profiling of *C. glutamicum* and a regulator knockout mutant, using metabolome, proteome and fluxome analysis. In the mutant, the gene of the transcriptional repressor protein McbR was deleted. This protein is the central regulator of the methionine and cysteine biosynthesis and the sulfur assimilation pathway. Its knockout

was therefore considered as a central step in the development of a methionine overproducer. However, no significant amounts of methionine were produced by *C. glutamicum* $\Delta mcbR$, making an in-depth profiling essential. For this purpose different methods for cell extraction and analysis of intracellular metabolites, especially those related to methionine biosynthesis, were developed in the course of this work.

The in-depth metabolome analysis showed the tremendous accumulation of an unknown compound in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$. This compound could be identified as homolanthionine, using GC/MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ and ^{15}N -, ^{13}C - and ^{34}S -tracer studies. Additionally, it could be shown that cystathionine- γ -synthase, an enzyme of the methionine biosynthesis, was responsible for the formation of homolanthionine. The reason is the poor substrate specificity of cystathionine- γ -synthase causing the conversion of homocysteine instead of cysteine together with O-acetyl-homoserine. Besides this, the accumulation of homolanthionine activates a new, so far not described, route for isoleucine biosynthesis independent from threonine.

In addition to the accumulation of homolanthionine the systems biological analysis of *C. glutamicum* wild type and $\Delta mcbR$ showed drastic changes in the metabolome, fluxome and proteome of both strains. For instance, almost all intermediates of the methionine pathway are higher concentrated in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ and many enzymes of the methionine biosynthesis and the sulfur assimilation are induced, whereby no methionine was excreted or highly accumulated inside the cell. The limiting step seems to be the methylation of homocysteine. The analysis of the fluxome showed that the TCA-cycle flux significantly increased from 58.5 to 88.5 % in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$. It seems likely that in the mutant a higher oxidative stress is present, caused by the induced expression of respiratory enzymes and the sulfite reductase. This probably provoked slow growth and the over expression of the catalase in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$. Morphologic analysis of the two strains revealed inclusions in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$, which remain to be identified.

Inspired by the elementary flux mode analysis, the consumption of thiosulfate, methanethiol, and dimethyldisulfide by *C. glutamicum* was studied. All three sulfur sources are metabolized by *C. glutamicum*. Additionally it seems that dimethyldisulfide can reduce the oxidative stress in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$, enabling faster growth. The consumption of ^{34}S -thiosulfate showed significant differences between wild type and the mutant. The results imply an oxidation of thiosulfate in wild-type *C. glutamicum* and an active thiosulfate reductase in $\Delta mcbR$. In the future the sulfur and C_1 -metabolism should be studied in more detail, as it seems to be a key in achieving high yields. In addition the four enzymes MetE, MetH, GlyA and MetF involved in the methylation of homocysteine should be characterized. If one can overcome the

regulatory drawbacks in the methionine biosynthesis one should apply the optimization strategies derived from the *in-silico* pathway analysis of the metabolism.

3. EINLEITUNG

Methionin ist eine der wichtigsten essentiellen Aminosäuren zur Supplementierung von Tierfutter (D'Mello und Lewis, 1978) insbesondere in der Geflügelzucht (Moran, 1994; Murillo und Jensen, 1976; Sekiz *et al.*, 1975). Dies verdeutlicht der aktuelle Weltmarkt von 1 – 1,4 Milliarden Euro mit einem jährlichen Zuwachs von 3 - 5 % (H. Schröder, persönliche Mitteilung). Vor dem Hintergrund einer schnell wachsenden Weltbevölkerung und dem damit verbundenen Zuwachs des Fleischbedarfes, kann man einen noch stärkeren Zuwachs des Marktes in der Zukunft erwarten.

Die Produktion von Methionin erfolgt derzeit praktisch ausschließlich in chemischer Synthese. Produkt dieser chemischen Synthese ist das Razemat (Lüssling *et al.*, 1975; Wagner *et al.*, 1970), das direkt als Futtermittelzusatz verwendet werden kann. Der Grund dafür ist, dass höhere Tiere und vor allem Geflügel, das einen hohen Methioninbedarf für den Aufbau des Gefieders hat, über Aminosäureoxidasen verfügen, die die D-Form von Methionin in die Ketosäure überführen. Diese wird dann in L-Stellung wieder aminiert (Friedman, 1999). Einige Studien deuten an, dass die Effektivität der Verwertung von D-Methionin bei Säugern und Vögeln dosisabhängig ist und besonders bei niedriger Dosierung das L-Isomer bevorzugt wird (D'Mello und Lewis, 1978; Friedman, 1999). Andere Arbeiten zeigen, dass die L-Form wesentlich besser verwertet wird als die D-Form, ein Razemat aus beiden jedoch ebenso gut verstoffwechselt wird, wie die L-Form (Baker, 1986). Darüber hinaus verwendet die chemische Synthese giftige Stoffe, wie z.B. Acrolein, Zyanid, Methanthiol und Ammoniak und benötigt große Mengen an Lösungsmitteln (Methanol, Aceton) zur Aufreinigung des Methionins (Lüssling *et al.*, 1975, Wagner *et al.*, 1970). Dies birgt Gefahren für Mensch und Umwelt und stellt einen wichtigen Kostenfaktor in der chemischen Synthese dar. Außerdem beruht die chemische Synthese letztendlich auf Petrochemie, was die Rohstoffkosten in den nächsten Jahren zusätzlich anheben könnte.

Ein biotechnologisches Verfahren könnte genutzt werden um, wie bei Glutamat und Lysin, ausschließlich die L-Form aus nachwachsenden Rohstoffen herzustellen. Fermentativ gewonnenes Methionin könnte analog zu Lysin direkt verfüttert werden (Kelle *et al.*, 2005). Selbst die Abtrennung der Zellen wäre nicht unbedingt erforderlich, wenn Bakterien mit dem GRAS-Status (*generally recognized as safe*) verwendet würden. Deshalb besteht großes Interesse, die alte chemische Synthese durch einen modernen biotechnologischen Prozess zu

ersetzen. Bislang konnte jedoch noch kein Organismus isoliert, oder mit klassischen oder gentechnischen Verfahren optimiert werden, der ausreichende Mengen Methionin produziert, um mit der chemischen Synthese zu konkurrieren (Mondal *et al.*, 1996; Nakayama *et al.*, 1978). Heutzutage ermöglichen allerdings die modernen genom-orientierten biotechnologischen Methoden, gezielt in den Stoffwechsel eines Organismus einzugreifen und diesen so zu beeinflussen, dass ein gewünschtes Produkt hergestellt werden kann. Dies wird auch als *metabolic engineering* bezeichnet (Bailey, 1991). Hierbei wichtig für das Verständnis des biologischen Systems sind die möglichst vollständige Kenntnis aller Gene eines Organismus (Genom), die Analyse der aktiven Gene (Transkriptom), die Quantifizierung der aktiven Proteine (Proteom) und der Stoffflüsse, die durch sie katalysiert werden (Fluxom) und schließlich die möglichst präzise Analyse der Metabolite inner- und außerhalb einer Zelle (Metabolom). Ein systembiotechnologischer Ansatz bündelt all diese Informationen und nutzt sie, um Angriffspunkte für eine zielgerichtete Optimierung eines Organismus zu identifizieren und entsprechende Optimierungen einzuleiten (Lee *et al.*, 2005). Zusätzlich werden neben den experimentellen Ansätzen auch immer detaillierter *in silico* Modelle programmiert, die es erlauben, bestimmte Optimierungsschritte, wie beispielsweise die Auswahl der Kultivierungsbedingungen oder auch Knockouts bestimmter Enzyme oder die Einführung eines heterologen Stoffwechselweges, zu simulieren. Dies hat den Vorteil, dass man ohne experimentelle Arbeiten das Potential eines Organismus abschätzen kann und bestimmte Optimierungsrichtungen vorgeben kann. Die metabolische Netzwerkanalyse, auch bekannt als ‚*elementary flux mode analysis*‘ oder ‚*extreme pathway analysis*‘, stellt ein solches nützliches Werkzeug für die Analyse der Stoffwechseleigenschaften zellulärer Systeme dar (Papin *et al.*, 2004; Schilling *et al.*, 2000; Schuster *et al.*, 1999). Allgemein erlaubt die metabolische Netzwerkanalyse die Berechnung eines Lösungsraumes, der alle möglichen ‚*steady-state*‘ Flussverteilungen eines Netzwerkes enthält. Hierbei fließt die Stöchiometrie des untersuchten Netzwerkes, einschließlich des Bedarfes an Kohlenstoff, Sauerstoff, Stickstoff, Schwefel usw. und an Kofaktoren in die Berechnung ein. Verschiedene Organismen wurden in der Vergangenheit mit diesen Modellen analysiert und die Ergebnisse mit *in vivo* Daten korreliert. Beispielsweise wurde die Succinatproduktion (Cox *et al.*, 2005) oder auch die Produktion von Poly- β -hydroxybuttersäure mit *Saccharomyces cerevisiae* (Carlson *et al.*, 2002) untersucht. Außerdem wurde der Energiestoffwechsel und die Biomassebildung von Hefe (Duarte *et al.*, 2004; Förster *et al.*, 2002) und *Escherichia coli* (Carlson und Srienc, 2004a; Ibarra *et al.*, 2003; Liao und Oh, 1999) analysiert.

Die Entwicklung all dieser Methoden hat dazu beigetragen, dass die Forschung nach einem biotechnologischen Methioninverfahren in den letzten Jahren stark an Dynamik gewonnen hat (Lee und Hwang, 2003; Nakamori *et al.*, 1999; Ruckert *et al.*, 2003). Die wichtigsten Organismen zur industriellen Aminosäureproduktion sind *Corynebacterium glutamicum* und *Escherichia coli*. *C. glutamicum* wird vor allem zur großtechnischen Herstellung von Glutamat und Lysin (Eggeling und Sahm, 1999), *E. coli* zur Produktion von Threonin eingesetzt (Leuchtenberger, 1996). Die bereits erfolgreiche Produktion von Aminosäuren der Aspartatfamilie, zu der auch Methionin gehört, macht diese Organismen zu sehr interessanten Kandidaten für die Entwicklung eines Methioninprozesses.

In den letzten Jahren wurden für *C. glutamicum* die notwendigen Werkzeuge entwickelt, die es erlauben systembiologische Studien durchzuführen. So wurde mit der Entschlüsselung des Genoms von *C. glutamicum* (Kalinowski *et al.*, 2003; Tauch *et al.*, 2002) eine wichtige Voraussetzung für Transkriptomstudien (Loos *et al.*, 2001) gelegt. Solche Studien wurden unter anderem für die Aminosäureproduktion (Krömer *et al.*, 2004) und für das Wachstum auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen (Hayashi *et al.*, 2002) aber auch im Hinblick auf die Stressantwort in *C. glutamicum* auf Hitze (Muffler *et al.*, 2002) oder Ammoniumlimitierung (Silberbach *et al.*, 2005a; Silberbach *et al.*, 2005b) durchgeführt. Neben der Transkriptomuntersuchung rückte auch die Analyse des Proteoms in den Mittelpunkt (Hermann *et al.*, 2001). Es wurden sowohl die Stressantwort des Proteoms auf Hitze (Barreiro *et al.*, 2005) als auch auf Ammoniumlimitierung (Silberbach *et al.*, 2005b) untersucht. Zuletzt wurde eine Transkriptomanalyse auch mit dem Wildtyp und einer Knockoutmutante eines Regulatorproteins der Methioninsynthese durchgeführt (Rey *et al.*, 2005).

Für die Produktion niedermolekularer Stoffe, wie beispielsweise Aminosäuren, sind vor allem das Metabolom und das Fluxom wichtig. Die kombinierte Analyse aus Metabolom und Fluxom ermöglicht die Identifikation metabolischer Flaschenhälse und lässt Rückschlüsse über *in vivo* Aktivitäten bestimmter Enzyme zu. Besonders auf diesem Gebiet wurde *C. glutamicum* in den letzten Jahren intensiv untersucht. So wurde die Glutamatproduktion (Gourdon und Lindley, 1999; Shimizu *et al.*, 2003) und vor allem die Lysinproduktion anhand von Metabolom (Kiefer *et al.*, 2002; Kiss und Stephanopoulos, 1992; Krömer *et al.*, 2004) und Fluxom (Kiefer *et al.*, 2004; Krömer *et al.*, 2004; Marx *et al.*, 1996; Vallino und Stephanopoulos, 1993; Wittmann und Heinzle, 2001; Wittmann und Heinzle, 2002; Wittmann *et al.*, 2004a) näher charakterisiert.

Im Hinblick auf *C. glutamicum* war die Entdeckung des transkriptionellen Repressorproteins McbR (Rey *et al.*, 2005; Rey *et al.*, 2003) ein wichtiger Schritt zu einem besseren Verständnis

der Methioninsynthese. Dieses Regulatorprotein kontrolliert die Expression fast aller Gene des Methionin- und Cysteinestoffwechsels, sowie der Sulfatreduktion in *C. glutamicum*. Die Auswirkungen der Deletion von *mcbR* wurden in der vorliegenden Arbeit mit einem systembiotechnologischen Ansatz untersucht.

4. ZIELSETZUNG

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, mit systembiotechnologischen Methoden ein besseres Verständnis der Methioninsynthese in *C. glutamicum* zu erhalten sowie erste Ziele für eine Verbesserung des Organismus zur biotechnologischen Methioninproduktion zu identifizieren und umzusetzen.

Im Mittelpunkt stand dabei einerseits die metabolische Netzwerkanalyse, die es ermöglicht, das Potential eines Organismus für die Methioninproduktion zu berechnen. *C. glutamicum* und *E. coli* nutzen unterschiedliche Reaktionen zur Methioninsynthese und zur Bereitstellung wichtiger Vorläufer. Das Aufstellen der jeweiligen stöchiometrischen Netzwerke und die Analyse der Netzwerke mittels Elementarmodenanalyse (Pfeiffer *et al.*, 1999) erlaubte die Berechnung der theoretischen Methioninausbeute für beide Organismen und den Einfluss verschiedener Substrate bzw. genetischer Manipulationen.

Auf der anderen Seite stand der Vergleich von *C. glutamicum* Wildtyp und *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ im Mittelpunkt. Letzterer ist ein Stamm in dem das Gen des transkriptionellen Repressors McbR deletiert ist. Diese Mutation führt zur Überexpression fast aller Gene des Methionin-, Cystein- und Sulfatstoffwechsels (Rey *et al.*, 2005) und wurde als erster wichtiger Schritt auf dem Weg der Stammoptimierung zur Methioninproduktion betrachtet (Rey *et al.*, 2003). Die Aufklärung intrazellulärer Prozesse, die diese Mutation hervorruft, war deshalb ein zentrales Thema dieser Arbeit. Es wurden Proteom, Metabolom und Fluxom verglichen und Analysen von Zellzusammensetzung und Zellstruktur durchgeführt. Ferner wurden Markierungsexperimente mit den stabilen Isotopen ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O und ^{34}S genutzt, um qualitative Erkenntnisse über die Stoffwechselphysiologie der beiden Stämme zu erhalten.

5. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

Für die Produktion von Methionin in *C. glutamicum* spielen mehrere Stoffwechselwege eine zentrale Rolle. Zum einen liefert der Zentralstoffwechsel mit seinen Bestandteilen Glykolyse, Pentosephosphatweg (PPP), Zitronensäurezyklus (TCA-Zyklus) und C₃/C₄-Metabolismus sowohl das Kohlenstoffgerüst als auch die Energie in Form von ATP und die Reduktionskraft in Form von NADPH, zum anderen spielen bei der Synthese von Methionin auch der Schwefelmetabolismus und der C₁-Stoffwechsel eine wesentliche Rolle. Letztere sind für *C. glutamicum* noch nicht vollständig beschrieben. Die Synthese von Methionin ist mit einem enormen Energiebedarf verbunden. Geht man von einer Methioninsynthese aus Glucose und Sulfat aus, werden je mol Methionin 7 mol ATP und 8 mol NADPH benötigt (Mampel *et al.*, 2005).

Die Produkte aus Zentral-, C₁- und Schwefel-Metabolismus werden in der Methioninsynthese zum Endprodukt Methionin vereint. Die Stoffwechselwege werden im Folgenden näher beschrieben. Die biochemischen Reaktionen stammen aus aktuellen Datenbanken (<http://www.genome.ad.jp/kegg/metabolism.html>), Publikationen (entsprechend gekennzeichnet), Lehrbüchern der Biochemie (Michal, 1999; Stryer, 1996) und dem Handbuch von *C. glutamicum* (Eggeling und Bott, 2005).

5.1. Methioninstoffwechsel von *C. glutamicum*

Die Synthese von Methionin geht von Aspartat aus, welches den C₄-Grundkörper des Moleküls stellt. Außerdem werden ein reduziertes Schwefelatom und eine Methylgruppe zur Methioninsynthese benötigt (Abb. 5-1).

Aspartat wird von der Aspartokinase (LysC; E.C.2.7.2.4) unter ATP-Verbrauch zu 4-Aspartylphosphat umgesetzt. Dieses wird von der Aspartatsemialdehyd-Dehydrogenase (E.C.1.2.1.11) unter NADPH-Oxidation zu L-Aspartatsemialdehyd und Phosphat oxidiert. Aspartatsemialdehyd ist sowohl Vorläufer im Lysinbiosyntheseweg, als auch zur Homoserinbiosynthese. Diese Reaktion wird von der Homoserindehydrogenase (Hom; E.C.1.1.1.3) unter NADPH-Oxidation katalysiert. Im nächsten Schritt wird Homoserin am Sauerstoff der Carboxylgruppe acetyliert. Diese Reaktion wird von der Homoserin-Acetyltransferase (MetX, E.C.2.3.1.31) (Lee und Hwang, 2003; Park *et al.*, 1998) katalysiert,

wobei ein Acetyl-CoA verbraucht und HS-CoA reduziert wird. Das Produkt O-Acetylhomoserin kann nun über zwei alternative Wege zu Homocystein umgesetzt werden. Entweder kann die O-Acetylhomoserin-Sulphydrolase (MetY; E.C.2.5.1.49) (Hwang *et al.*, 2002) unter Einbau von Sulfid und Abspaltung von Acetat ein Homocystein zur Verfügung stellen, oder O-Acetylhomoserin wird von der Cystathionin- γ -Synthase (MetB, E.C.2.5.1.48) (Hwang *et al.*, 1999) unter Cysteineinbau zu Cystathionin umgesetzt und letzteres anschließend hydrolytisch durch die Cystathionin- β -Lyase (MetC; E.C.4.4.1.8) (Kim *et al.*, 2001) zu Homocystein, Pyruvat und Ammonium gespalten. Homocystein wird anschließend zu Methionin methyliert. Zur Methylierung stehen zwei Enzyme zur Verfügung: Eine Vitamin-B₁₂-abhängige (MetH; E.C.2.1.1.13) und eine Vitamin-B₁₂-unabhängige (MetE, E.C.2.1.1.14) Methioninsynthase (Abb. 5-1). Erstere verwendet als Methylgruppendonor Methyltetrahydrofolat oder dessen Polyglutamylderivate, während MetE die Methylgruppe von Methyltetrahydropteroyl-triglutamate auf Homocystein überträgt (Lee and Hwang, 2003). Die von MetH katalysierte Reaktion läuft bei *E. coli* ca. 120fach schneller ab, als die Vitamin-B₁₂-unabhängige Reaktion von MetE (Gonzalez *et al.*, 1992; Lee und Hwang, 2003).

Im Anabolismus wird Methionin zum Proteinaufbau verwendet. Im Katabolismus dient es vor allem als Methyl-Gruppendonor. Hierzu wird Methionin am Schwefel adenyliert, wobei ein ATP verbraucht wird und neben PP_i, S-Adenosylmethionin (SAM) entsteht. Verantwortlich für diese Reaktion ist die S-Adenosylmethionin-Synthase (MetK, E.C. 2.5.1.6). SAM wird von Methyltransferasen als Methylgruppendonor verwendet. Hier ist besonders die Cytosin-5-Methyltransferase (E.C. 2.1.1.37) zu nennen, die für die DNA-Methylierung wichtig ist. Produkt der Transmethylierung ist dann S-Adenosylhomocystein, das durch die S-Adenosylhomocysteinase (E.C. 3.3.1.1) zu Adenosin und Homocystein gespalten wird. Es existiert also ein Transmethylierungszyklus aus Methionin und Homocystein (Abb. 5-1).

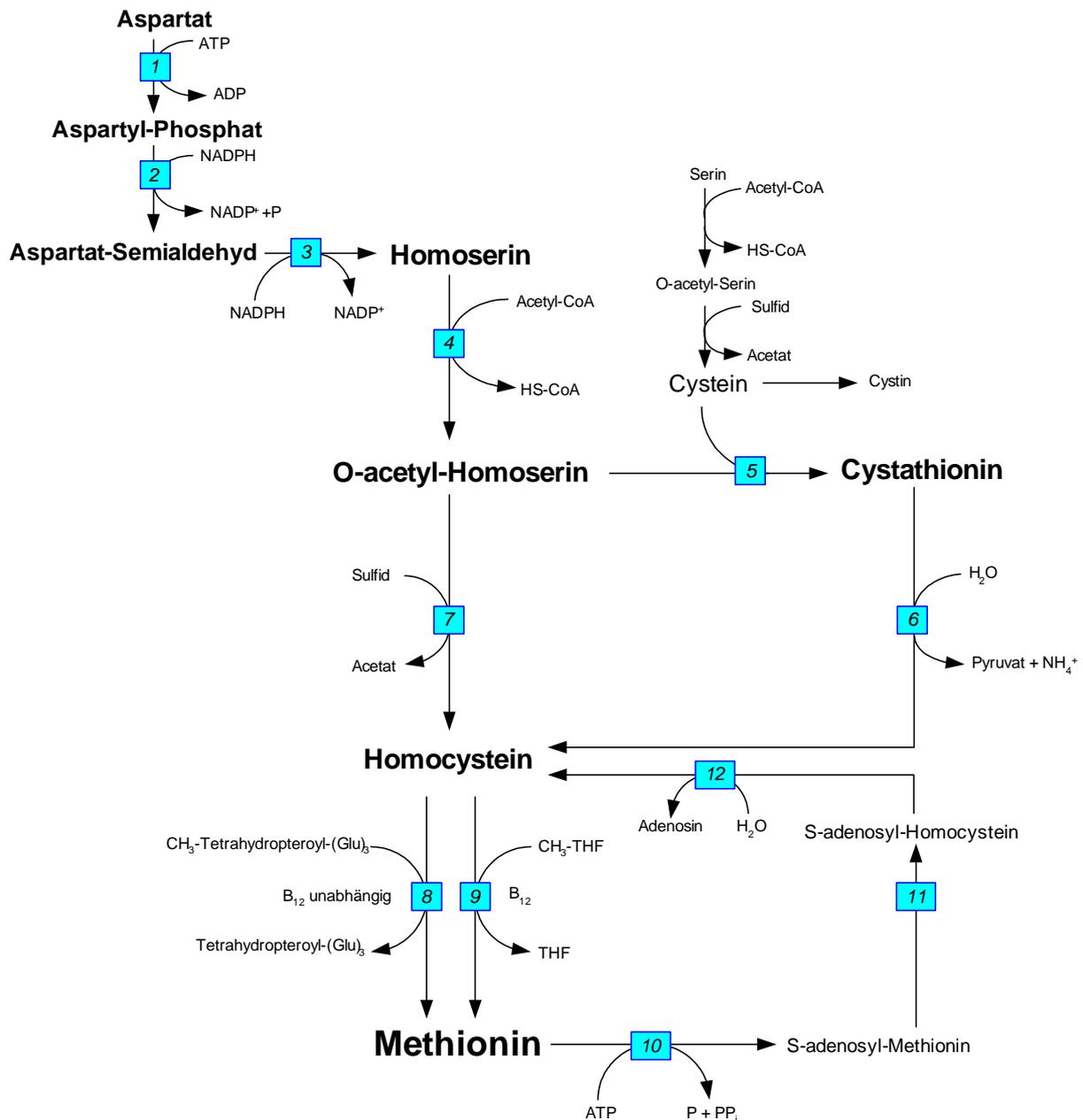


Abb. 5-1 Methioninbiosynthese und Abbau durch Transmethylierungen in *C. glutamicum*. Beteiligte Enzyme: Aspartokinase *lysC* (1); Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase (2); Homoserin-Dehydrogenase *hom* (3); Homoserin-Acetyltransferase *metX* (4); Cystathionin- γ -Synthase *metB* (5); Cystathionin- β -Lyase *metC* (6); O-Acetylhomoserin-Sulphydrolase *metY* (7); B₁₂-unabhängige Methionin-Synthase *metE* (8), B₁₂-abhängige Methionin-Synthase *metH* (9); S-Adenosylmethionin-Synthase *metK* (10); 5-Cytosin-Methyltransferase (11); Adenosyl-Homocysteinase (12).

5.2. Zentralstoffwechsel von *C. glutamicum*

Corynebacterium glutamicum verfügt über die Enzyme von Glykolyse, PPP, TCA-Zyklus und C₃/C₄-Metabolismus (Anaplerose / Gluconeogenese) (Abb. 5-2). Der Zentralstoffwechsel hat für die Methioninsynthese die wichtige Funktion der Bereitstellung von C₄-Vorläufern,

Energie in Form von ATP, Aktivierungsenergie in Form von Acetyl-CoA und Reduktionskraft in Form von NADPH.

Die Aufnahme der Kohlenstoffquelle erfolgt im Fall von Glucose, Saccharose und Fruktose über Phosphotransferasesysteme (PTS) (Yokota und Lindley, 2005). Im Hinblick auf die Methioninsynthese spielt vor allem die Bereitstellung der Reduktionsäquivalente in Form von NADPH eine große Rolle. Im Zentralstoffwechsel von *C. glutamicum* kann NADP⁺ an 4 Schlüsselstellen reduziert werden. Zum einen liefert der PPP pro mol Glucose 2 mol NADPH (Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und 6-Phospho-Gluconat-Dehydrogenase). Zum anderen verfügt *C. glutamicum* über eine NADP⁺-abhängige Isocitrat-DH im TCA-Zyklus. Schließlich ist noch das Malatenzym der Gluconeogenese zu nennen, das Malat zu Pyruvat decarboxyliert und dabei NADP⁺ reduziert (Abb. 5-2). Zwar wurde gezeigt, dass dieses Enzym bei Lysinproduktion auf Glucose nur eine untergeordnete Rolle spielt (Sahm *et al.*, 2000), es ist jedoch denkbar, dass das Enzym für die Methioninüberproduktion durchaus wichtig sein könnte. Schließlich benötigt die Methioninsynthese doppelt soviel NADPH wie die Lysinsynthese (Marx *et al.*, 1996).

Eine weitere wichtige Funktion des Zentralstoffwechsels ist die Bereitstellung der Vorläufermoleküle für Methionin. Die Glykolyse stellt mit 3-Phosphoglycerat (3-PG) den Vorläufer des C₁-Stoffwechsels bereit, der die Methylgruppe für die Methioninsynthesereaktionen liefert. Außerdem wird 3-PG zur Serinsynthese benötigt, welches für die Bildung von Cystein bei Methioninsynthese durch Transsulfurierung notwendig ist.

TCA-Zyklus und anaplerotische Reaktionen stellen Oxalacetat (OAA), C₄-Vorläufer von Aspartat, zur Verfügung. Außerdem wird im TCA-Zyklus α -Ketoglutarat bereitgestellt, das zur Fixierung von Ammonium in Form von Glutamat benötigt wird. Zusätzlich benötigt *C. glutamicum* im Methioninstoffwechsel zur Aktivierung von Zwischenstufen bei der Transsulfurierung 2 mol Acetyl-CoA, bei direkter Sulfhydrylierung 1 mol Acetyl-CoA pro mol Methionin (Hwang *et al.*, 2002). Schließlich stellen Glykolyse und TCA-Zyklus (in Verbindung mit der oxidativen Phosphorylierung) die notwendige Energie in Form von ATP und GTP bereit (Abb. 5-2).

Eine besondere Stellung hat der C₃/C₄-Metabolismus (Sauer und Eikmanns, 2005) in der Synthese von Aminosäuren der Aspartatfamilie. Die anaplerotischen Enzyme PEP-Carboxylase und Pyruvatcarboxylase können OAA nachliefern, wodurch der TCA-Zyklus auch während einer Überproduktion von Aspartat und damit auch Methionin aufrechterhalten wird. Bei Wachstum von *C. glutamicum* auf Glucose werden beide Enzyme exprimiert

(Krömer *et al.*, 2004). Die gluconeogenetischen Enzyme PEP-Carboxykinase, OAA-Decarboxylase und Malatenzym dienen dem Auffüllen der PEP- und Pyruvat-Pools (Jetten *et al.*, 1994; Sahn *et al.*, 2000). Erhöhte Aktivität von PEP-Carboxykinase, OAA-Decarboxylase führen zur Verminderung des verfügbaren OAA, weshalb die Lysinüberproduktion in *C. glutamicum* negativ mit dem Fluss durch die Decarboxylierungsreaktionen korreliert (Sahn *et al.*, 2000).

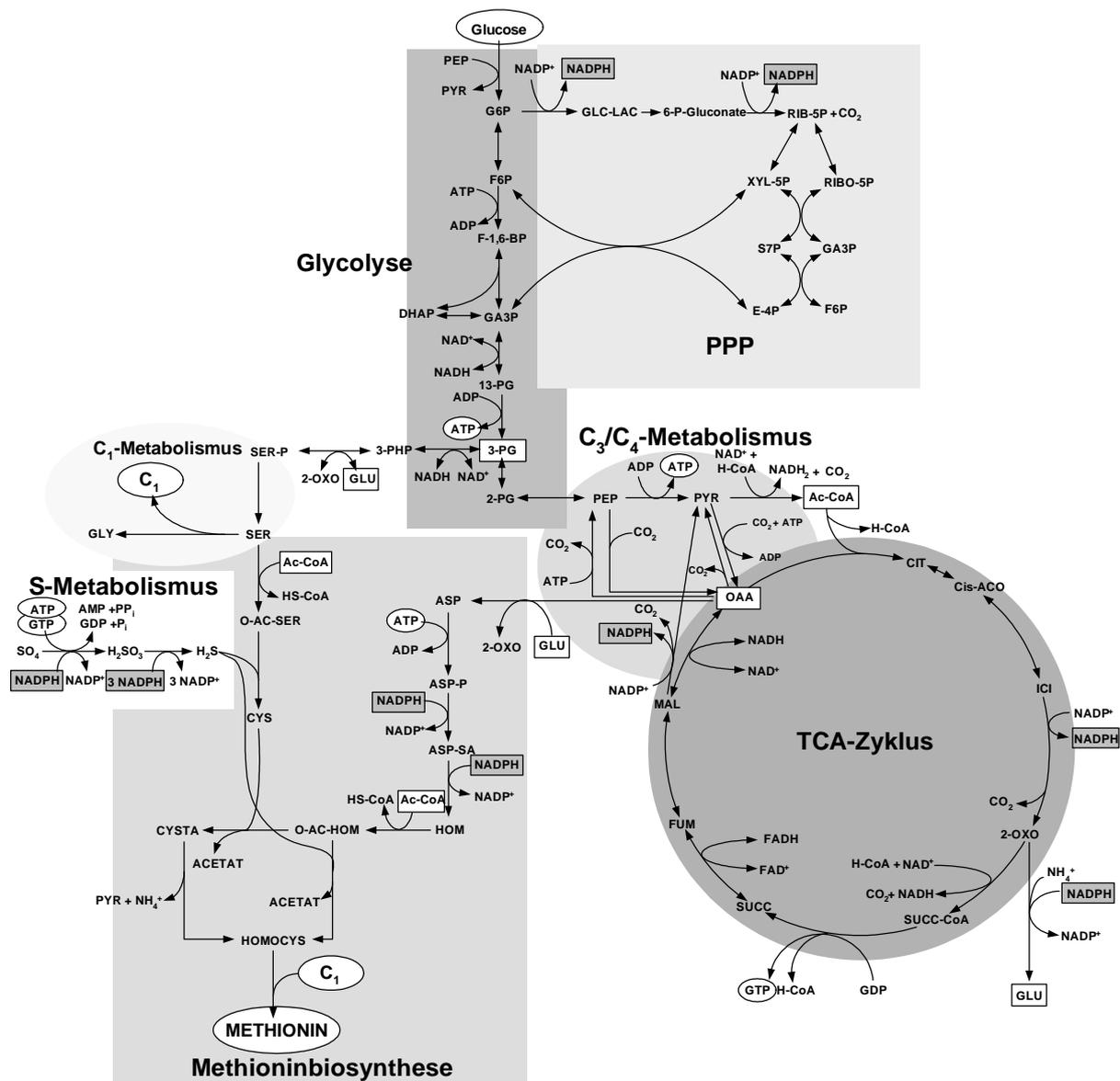


Abb. 5-2 Stoffwechselübersicht von *C. glutamicum* mit den Komponenten Glykolyse, PPP, C₃/C₄-Metabolismus, TCA-Zyklus, vereinfachter C₁- und Schwefelstoffwechsel und der Methioninsynthese.

Die Reaktion des Malatenzyms nimmt eine besondere Stellung ein, da in dieser Reaktion auch das wichtige Reduktionsäquivalent NADPH reduziert wird. Zusammen mit Pyruvatcarboxylase und Malatdehydrogenase fungieren diese Enzyme als Transhydrogenase,

die unter ATP-Verbrauch Protonen von NADH auf NADPH überträgt. Besonders bei ATP-Überschuss und hohem NADPH-Bedarf, könnte dieser Zyklus eine wichtige Rolle spielen, da durch den Verbrauch von ATP NADPH auch bei relativ niedrigen Konzentrationen von NADH gebildet werden kann, was durch eine lösliche Transhydrogenase in *E. coli* nicht möglich ist.

5.3. Schwefelstoffwechsel von *C. glutamicum*

Der Schwefelstoffwechsel in *C. glutamicum* ist noch nicht vollends aufgeklärt. Es gibt bislang keine genauen Kenntnisse über die Aufnahme der Schwefelquellen. Die wichtigsten Schwefelquellen sind Sulfat, Thiosulfat, organische Sulfonate und Aminosäuren (Lee, 2005). Für die Aufnahme von Sulfonaten wurden kürzlich die Gene eines vermutlichen ABC-Transporters entdeckt (Rey *et al.*, 2005). Bei *E. coli* werden Sulfat und Thiosulfat ebenfalls über einen ABC-Transporter importiert. *C. glutamicum* verfügt über homologe Gene. Allerdings wurden auch Gene identifiziert, die vermutlich für Sekundärtransporter kodieren. Entsprechende Proteine wurden bislang für keinen Transporter nachgewiesen (Lee, 2005).

Corynebacterium glutamicum fixiert Sulfat durch Adenylierung und anschließende Reduktion zum Sulfid (Lee, 2005). Die Sulfat-Adenyltransferase (*cysD*, *cysN*; E.C. 2.7.7.4) setzt Sulfat und ATP unter GTP-Hydrolyse zu Adenylyl-Sulfat (APS) und Pyrophosphat um. APS kann dann von der Adenylyl-Sulfatkinase (*cysC*; E.C. 2.7.1.25) unter ATP-Verbrauch zu 3-Phosphoadenylyl-Sulfat (PAPS) umgesetzt werden. Dieses Enzym wurde allerdings bisher in *C. glutamicum* noch nicht nachgewiesen. PAPS wird durch die PAPS-Reduktase (*cysH*; E.C. 1.8.4.8) unter Oxidation von NADPH zu Sulfit und Adenosin-3,5-Bisphosphat (PAP) gespalten. Letzteres wird zu Adenosin-Monophosphat (AMP) umgesetzt. Die Oxidation von NADPH erfolgt nicht direkt, sondern unter Beteiligung von Thioredoxin. Alternativ kann APS auch von einer APS-Reduktase (E.C. 1.8.99.2) unter AMP-Abspaltung direkt zu Sulfit umgewandelt werden. Auch bei dieser Reaktion wird zunächst Thioredoxin oxidiert, das dann von der Thioredoxin-Reduktase (E.C. 1.8.1.9) durch NADPH-Oxidation wieder reduziert wird. Die APS-Reduktasen und PAPS-Reduktasen zeigen große Sequenzübereinstimmungen und wurden daher alle als *cysH*-Gene annotiert. Allerdings weisen APS-Kinasegene Signalsequenzen auf, die den PAPS-Kinasegenen fehlen. Da man in *C. glutamicum* bisher kein *cysC*-Gen finden konnte und *cysH* von *C. glutamicum* die APS-typischen Signalsequenzen enthält, kann man davon ausgehen, dass APS direkt zu Sulfit und AMP

umgesetzt wird. Dies hat für die Zelle den energetischen Vorteil, dass pro mol Sulfit ein mol ATP eingespart wird. Sulfit wird unter Oxidation von 3 weiteren Molekülen NADPH zu Sulfid reduziert. Dies wird durch eine NADPH abhängige Sulfitreduktase (*cysI*, *cysJ*; E.C. 1.8.1.2) katalysiert (Lee, 2005; Rey *et al.*, 2005).

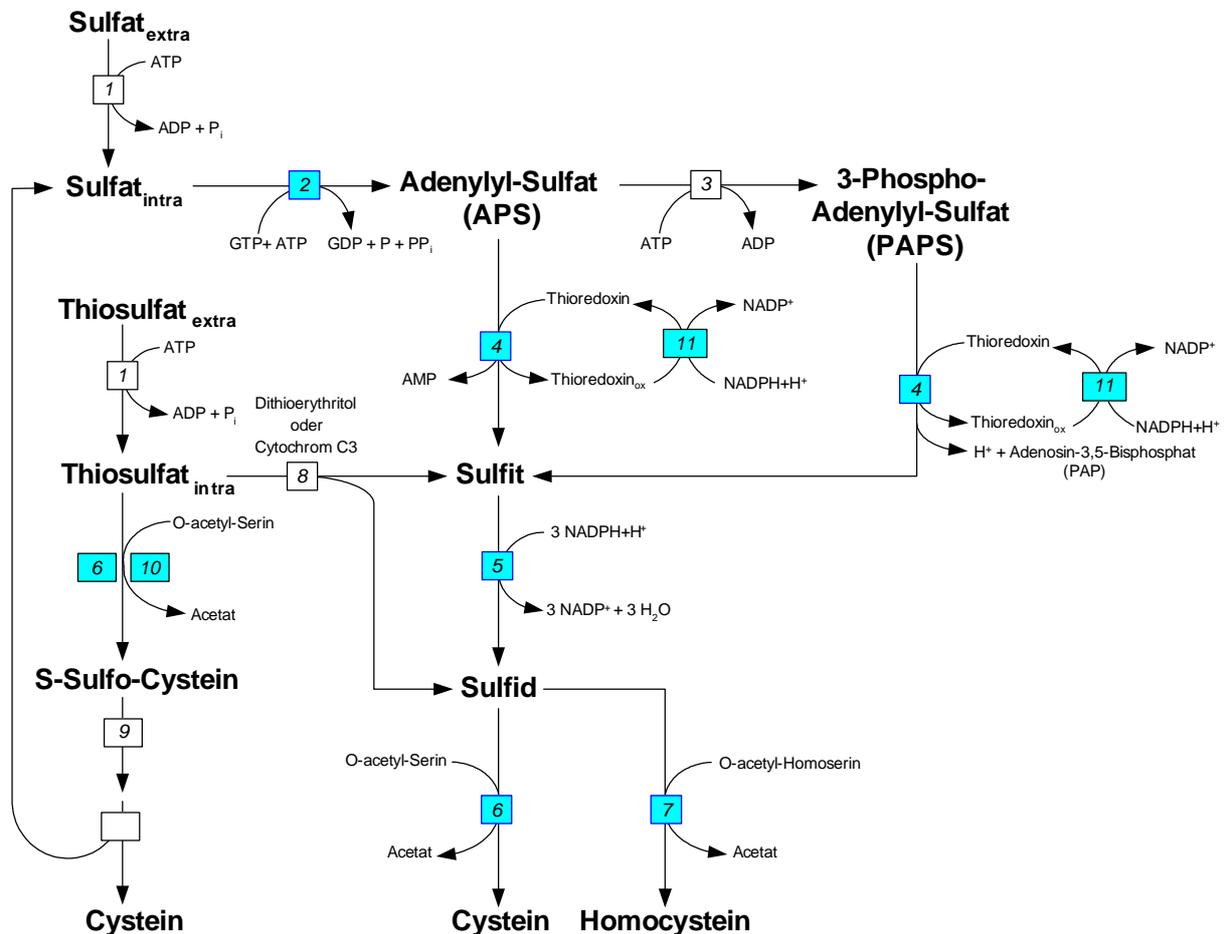


Abb. 5-3: Schwefelstoffwechsel in *C. glutamicum*. Beteiligte Enzyme: vermutlicher ABC-Transporter (1); Sulfat-Adenyltransferase *cysD/cysN* (2); Adenylyl-Sulfatkinase *cysC* (3); PAPS-Reduktase *cysH* (4); Sulfitreduktase *cysI/cysJ* (5); O-Acetylserin-Sulphydrylase A & B *cysK/cysM* (6); O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase *metY* (7); Thiosulfatreduktase (8); Sulfonatase (9); Cystathionin- γ -Synthase *metB* (10); Thioredoxin-Reduktase (11).

Sulfid kann dann entweder von der O-Acetylserin-Sulphydrylase A & B (*cysK*, *cysM*; E.C.2.5.1.47) auf O-Acetylserin, oder von der O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase (*metY*; E.C.2.5.1.49) auf O-Acetylhomoserin übertragen werden (Abb. 5-3).

Die Verstoffwechslung von Thiosulfat könnte über eine Thiosulfatreduktase (E.C. 2.8.1.5) oder über die O-Acetylserin-Sulphydrylase B (*cysM*; E.C. 2.5.1.47), bzw. die Cystathionin- γ -Synthase (E.C.2.5.1.48) ablaufen. Letztere sind für *C. glutamicum* beschrieben und führen

beide zur Bildung von S-Sulfo-Cystein welches schließlich zu Cystein und Sulfat gespalten wird. Das Gen einer vermutlichen Sulfonatase ist zwar kürzlich beschrieben worden (Rey et al., 2005) allerdings konnte bislang eine solche Aktivität zur S-Sulfo-Cystein-Spaltung noch nicht nachgewiesen werden. Eine Spaltung des Thiosulfats über eine Reduktasereaktion hätte für den Organismus den Vorteil, dass Reduktionskraft und Energie eingespart würde, da Thiosulfat dann direkt zu Sulfit und Sulfid gespalten würde.

5.4. C₁-Stoffwechsel von *C. glutamicum*

Der C₁-Stoffwechsel ist für die Produktion von Methionin in *C. glutamicum* von zentraler Bedeutung. Er stellt die Methylgruppe zur Verfügung, mit der Homocystein zu Methionin methyliert wird. Dabei spielen Glycin-Hydroxymethyltransferase (*glyA*; E.C. 2.1.2.1) und Methylenetetrahydrofolat-Reduktase (*metF*; E.C. 1.5.1.20) eine große Rolle. Erstere überträgt eine Methylgruppe von Serin auf Tetrahydrofolat (THF), wobei Glycin und 5,10-Methenylene-THF entstehen (Abb. 5-4). Die Reduktion des 5,10-Methenylene-THF zum Methyl-THF (M-THF) wird von der Methylenetetrahydrofolat-Reduktase katalysiert (Rückert et al., 2003), wobei allerdings noch nicht vollends geklärt ist, ob dieses Enzym in *C. glutamicum* NADPH oder FADH als Reduktionsäquivalent verwendet (<http://www.genome.jp/kegg/metabolism.html>).

Die Enzyme des Purinstoffwechsels Phosphoribosylglycinamid-Formyltransferase (E.C. 2.1.2.2) und Phosphoribosylaminoimidazolcarboxamid-Formyltransferase (E.C. 2.1.2.3) sind an der Umwandlung von THF in 10-Formyl-THF beteiligt. 10-Formyl-THF wird vor allem für die Formylierung der Aminogruppe von tRNA-gebundenem Methionin benötigt. Dieses formylierte Methionin ist bei Bakterien der Initiator der Translation (Stryer, 1996). Die Formylierung wird durch die Methionyl-tRNA-Formyltransferase (E.C. 2.1.2.9) katalysiert. Außerdem kann 10-Formyl-THF durch die Formyltetrahydrofolat-Deformylase (E.C. 3.5.1.10) wieder zu THF deformyliert werden. 5,10-Methenyltetrahydrofolat 5-Hydrolase (E.C. 3.5.4.9) und Methylenetetrahydrofolat-DH (E.C. 1.5.1.20) können 10-Formyl-THF auch in 5,10-Methenylene-THF überführen und dadurch für den Methioninstoffwechsel wieder zugänglich machen. Dies wäre auch der Weg über den Formiat als C₁-Quelle zur Methioninsynthese genutzt werden könnte, wenn *C. glutamicum* eine Formiat-Tetrahydrofolat-Ligase (E.C. 6.3.4.3) besitzen würde. Ein solches Enzym wurde aber bislang in *C. glutamicum* noch nicht nachgewiesen. Neben der Glycin-Hydroxymethyltransferase können auch Enzyme des Pyrimidinstoffwechsels (Thymidylat-Synthase E.C.2.1.1.148) und

des Lipoylproteinstoffwechsels (S-Aminomethyldihydrolipoylprotein (6S)-tetrahydrofolat-Aminomethyltransferase E.C. 2.1.2.10) THF in M-THF umwandeln.

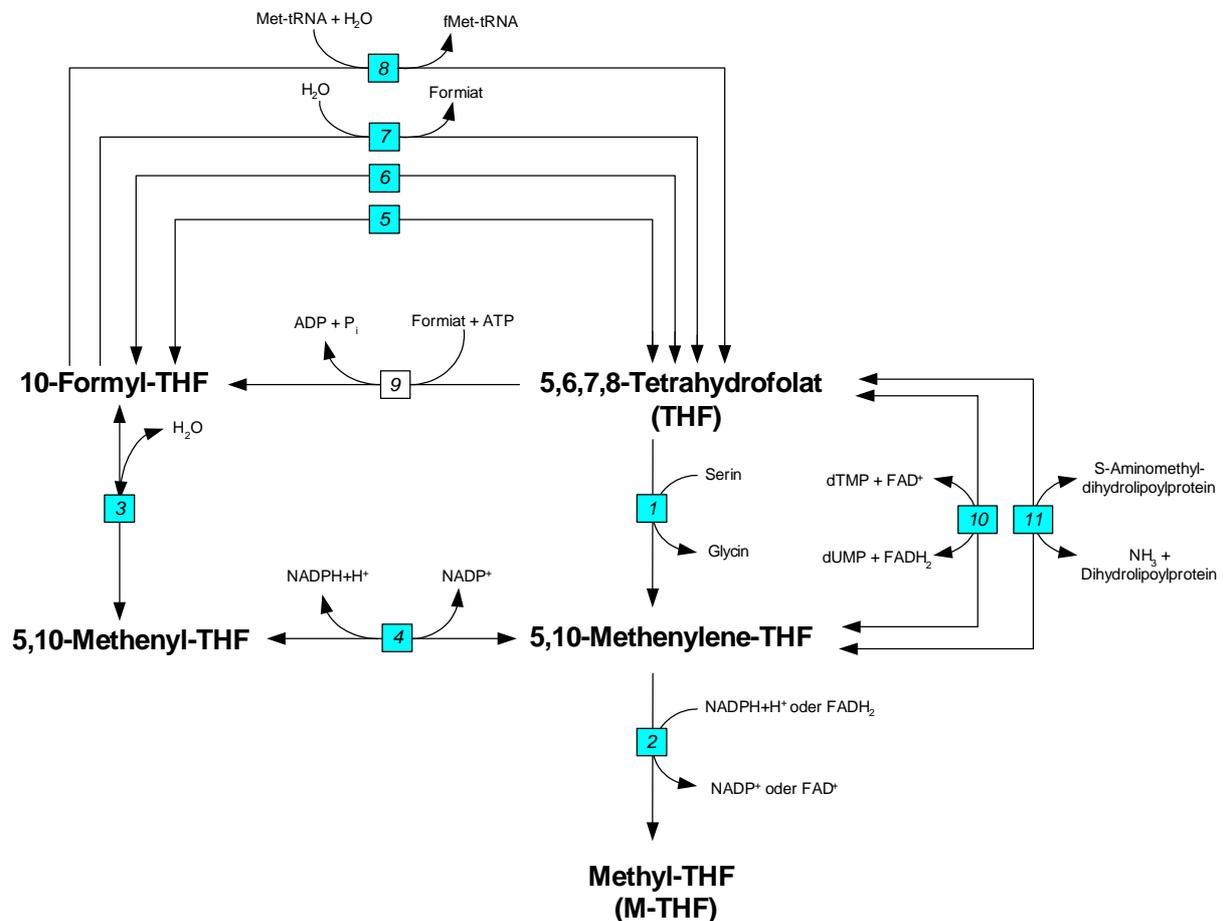


Abb. 5-4: C₁-Stoffwechsel in *C. glutamicum*. Beteiligte Enzyme: Glycin-Hydroxymethyltransferase *glyA* (1); NADPH oder FADH abhängige Methylenetetrahydrofolat-Reduktase *metF* (2); 5,10-Methenyltetrahydrofolat 5-Hydrolase (3); Methylenetetrahydrofolat-DH (4); Phosphoribosylglycinamid-Formyltransferase (5); Phosphoribosylaminoimidazolcarboxamid-Formyltransferase (6); Formyltetrahydrofolat-Deformylase (7); Methionyl-tRNA-Formyltransferase (8) Für *C. glutamicum* noch nicht beschrieben: Formiat-Tetrahydrofolat-Ligase (9); Thymidylat-Synthase (10); S-Aminomethyldihydrolipoylprotein:(6S)-tetrahydrofolat-Aminomethyltransferase (11);

5.5. Regulation von Methioninsynthese und angrenzender Synthesen

Die Methioninsynthese und die Synthesen von Threonin, Lysin und Cystein unterliegen einer strikten Regulation. Für Methionin ergibt sich ein äußerst komplexes Bild (Abb. 5-5). Die Regulation erfolgt sowohl auf transkriptioneller als auch auf Proteinebene mit Beteiligung

fast aller Intermediate des Methioninstoffwechsels (außer Homocystein und Cystathionin). Von essentieller Bedeutung ist neben der direkten Regulation durch Metabolite, die transkriptionelle Repression durch das Regulatorprotein McbR und seinen Effektor S-Adenosylhomocystein (SAH) (Rey *et al.*, 2005; Rey *et al.*, 2003). Dies führt zu einem sehr komplexen Regulationsnetzwerk, das die Frage, weshalb bisher keine biotechnologische Methioninproduktion mit *C. glutamicum* existiert, wohl zum Teil beantwortet (Abb. 5-5).

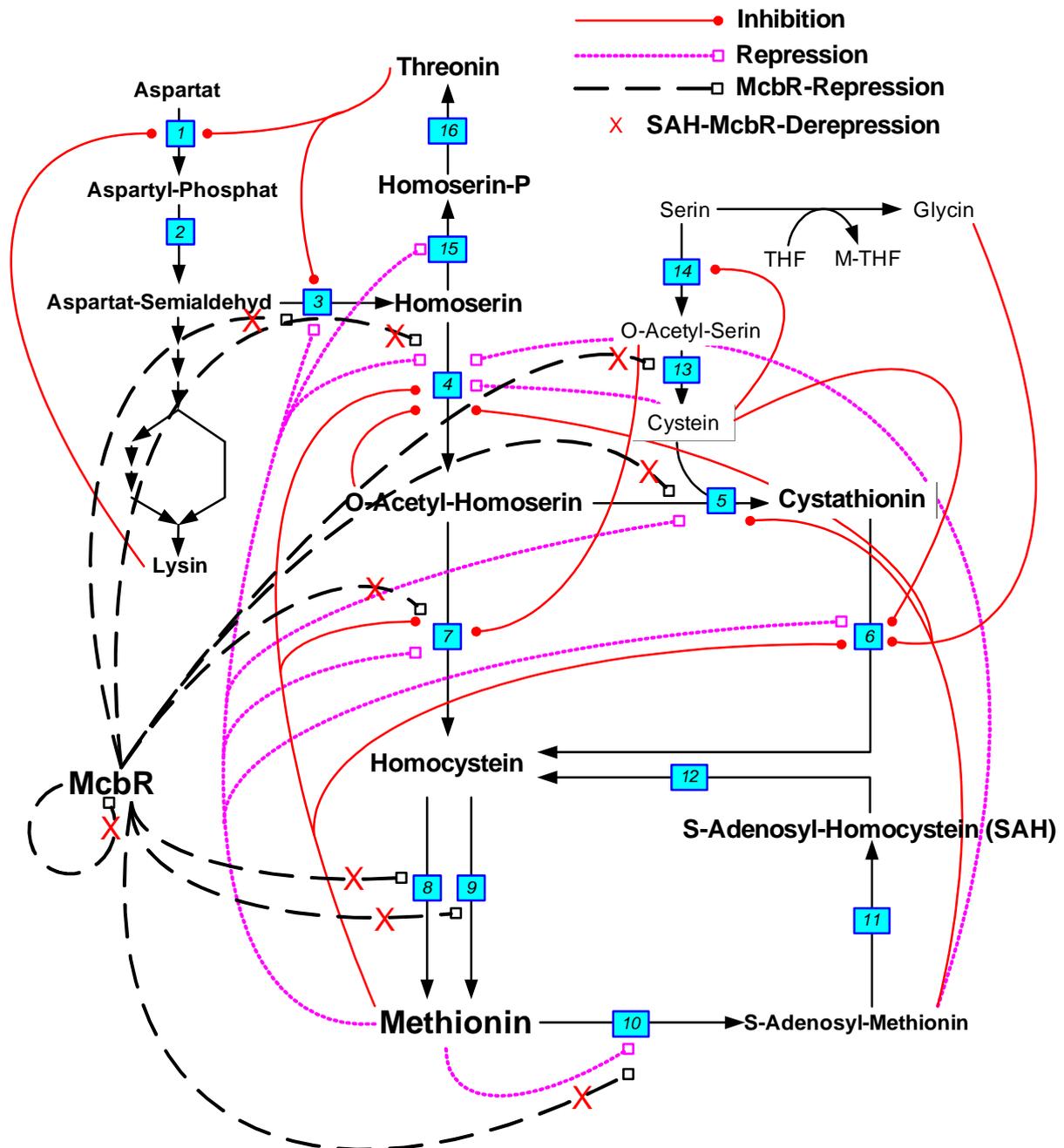


Abb. 5-5 Komplexe Regulation der Methioninbiosynthese in *C. glutamicum* nach Rey *et al.* (2005) und Lee (2005). Beteiligte Enzyme: Aspartokinase LysC (1); Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase (2); Homoserin-Dehydrogenase Hom (3); Homoserin-Acetyltransferase MetX (4); Cystathionin- γ -Synthase MetB (5); Cystathionin- β -Lyase MetC (6); O-Acetylhomoserin-Sulphydrolase MetY (7); B₁₂-unabhängige Methionin-

Synthase MetE (8), B₁₂-abhängige Methionin-Synthase MetH (9); S-Adenosylmethionin-Synthase MetK (10); 5-Cytosin-Methyltransferase (11); Adenosyl-Homocysteinase (12); Cysteinsynthase CysK/M (13); Serin-Acetyltransferase CysE (14); Homoserinkinase Hsk (15); Threoninsynthase (16).

5.5.1. Regulation auf Proteinebene

Die Intermediate der Methioninstoffwechsels O-Acetylhomoserin und S-Adenosylmethionin sowie die Aminosäuren Lysin, Threonin, Glycin und Cystein sind an der Regulation ihrer eigenen Synthese und der Methioninsynthese beteiligt. Lysin und Threonin hemmen gemeinsam die Aspartokinase (LysC), das Schlüsselenzym zur Synthese von Methionin, Lysin, Threonin und Isoleucin. Das erste Enzym in der Threonin- und Methioninsynthese, die Homoserin-DH (Hom), wird von Threonin inhibiert. O-Acetylhomoserin inhibiert seine eigene Synthese. Cystein inhibiert die Synthese seines Vorläufers O-Acetylserin und wirkt hemmend auf die Cystathionin- β -lyase (MetC). MetC hat auch Cysteinaseaktivität, was zur Cysteinspaltung in Pyruvat, Ammonium und Sulfid führt (eine wichtige Reaktion in der Bildung von Fe-S-Komplexen (Wada *et al.*, 2002). Diese Reaktion läuft zwar deutlich langsamer ab als die Cystathioninspaltung, könnte bei erhöhten Cysteinlevel aber zu einem Verlust von reduziertem Schwefel in Form von H₂S führen, weshalb eine Hemmung durch Cystein durchaus sinnvoll ist. Dieses Enzym wird auch durch Glycin und Methionin gehemmt. Die Hemmung durch Cystein, Glycin und Methionin deutet darauf hin, dass die Zelle die Akkumulation von Homocystein vermeiden möchte. Zwar ist die Hemmung durch Glycin noch nicht vollends verstanden (Lee, H.-S., 2005), könnte aber eine Rückkopplung des C₁-Stoffwechsels mit der Methioninsynthese darstellen. Schließlich kann *C. glutamicum* Glycin nur zur Proteinsynthese nutzen und müsste überschüssiges Glycin durch gesteigerte Methioninsynthaseaktivität ausscheiden. Methionin inhibiert außerdem noch die O-acetyltransferase (MetX) und die O-Acetylhomoserin-Sulphydrolase (MetZ). Letztere wird auch durch O-Acetylserin gehemmt, was darauf hindeutet, dass die Zelle vermeiden möchte, dass durch die Konkurrenz von MetZ und CysM/CysK um Sulfid eine Verarmung an Cystein und ein Überschuss an Homocystein entsteht. Es scheint auch hier die Akkumulation von Cystein einer Akkumulation von Homocystein bevorzugt zu werden. Cystein und Homocystein formen jeweils spontan Dimere (Cystin und Homocystin). Während Cystin durch MetC gespalten werden kann (Lee, 2005), ist eine analoge Reaktion für Homocystin bislang nicht beschrieben. Es könnte sein, dass deshalb die Zelle die Akkumulation von Homocystein vermeidet, da sonst 2 Schwefelatome, die mit großem Aufwand reduziert wurden, in einen schwer zugänglichen Metaboliten umgesetzt würden. Vor diesem Kontext

fällt auch auf, dass die beiden Homocystein verbrauchenden Enzyme MetE und MetH keiner Feedbackhemmung unterliegen, sondern nur auf transkriptioneller Ebene kontrolliert werden (Lee *et al.*, 2005). Homocystein soll scheinbar schnell wieder umgesetzt werden.

Für eine strikte Kontrolle des Homocysteinlevels spricht auch, dass S-Adenosylhomocystein (SAH), der Vorläufer von Homocystein aus Transmethylierungsreaktionen, die Repression vieler Gene des Methioninstoffwechsels, unter anderem auch von MetE und MetH durch McbR vermindert. Dies hat zur Folge, dass im Transmethylierungszyklus wieder mehr S-Adenosylmethionin (SAM) zur Verfügung steht, aber auch vor allem Homocystein schnell wieder methyliert wird. SAM selbst ist auch ein wichtiger Inhibitor im Methioninstoffwechsel. Es inhibiert sowohl MetX als auch MetB. Dies führt dazu, dass bei erhöhten SAH-Konzentrationen und Verminderung der McbR-Repression zwar Homocystein schnell recycled wird, aber kaum neues Homocystein entsteht. Da MetX und MetB durch SAM inhibiert werden, kann nur noch MetZ Homocystein bilden. Allerdings führt die Hemmung von MetX zur Verarmung an O-Acetylhomoserin und die Hemmung von MetB könnte zu einer kurzfristigen Akkumulation von O-Acetylserin führen, wodurch dann auch MetZ inhibiert würde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Inhibition der Enzyme im Methioninstoffwechsel und angrenzender Wege in *C. glutamicum* einerseits die adäquate Bereitstellung der benötigten Aminosäuren garantiert, es andererseits allerdings den Anschein hat, dass vor allem auch die Akkumulation von Homocystein auf jeden Fall vermieden werden soll.

5.5.2. Regulation auf Genomebene

Zusätzlich zur Regulation auf Proteinebene spielt in der Regulation der Methioninsynthese auch die Kontrolle der Genexpression der beteiligten Enzyme eine große Rolle. Besonders wichtig in der Repression ist das Repressorprotein McbR (**M**ethionine and **c**ysteine **b**iosynthesis **R**egulator). Bei Knockout von *mcbR* in *C. glutamicum* ist die Expression von mindestens 86 Genen gesteigert und von 51 Genen vermindert (Rey *et al.*, 2005). Unter den überexprimierten Genen befinden sich vor allem solche des Methionin-, Cystein- und Schwefelstoffwechsels, aber auch der oxidativen Stressantwort. Außerdem befinden sich auch mindestens zwei weitere potentielle Regulatoren unter den hochregulierten Genen. Dies deutet auf ein hierarchisches Regulationsnetzwerk mit McbR als Oberregulator (Rey *et al.*, 2005). McbR kontrolliert zusammen mit seinem Effektor SAH die Expression von *hom*, *metX*, *metB*, *metZ*, *metE*, *metH*, *metK* und *cysM*. Wobei SAH hier als Induktor fungiert,

beziehungsweise die Repression durch McbR aufhebt. Diese Gene verfügen über spezifische McbR-Bindestellen, die die Bindung der RNA-Polymerasen verhindert. SAH wiederum verhindert die Bindung von McbR. Interessanterweise verfügt auch das *mcbR*-Gen selbst über eine McbR-Bindestelle, was auf einen Autoregulationsmechanismus hindeutet (Rey *et al.*, 2005). Neben McbR wurde kürzlich ein weiterer putativer Repressor für das *cys*-Operon, sowie die Gene *metZ* und *cysK* entdeckt, der diese Gene wahrscheinlich in Abhängigkeit der extrazellulären Methioninkonzentration reguliert (Mampel *et al.*, 2005).

Außer der Repression durch McbR wurde in früheren Arbeiten die Genrepression durch Methionin, SAM und Cystein gezeigt (Lee, H.S., 2005). Methionin reprimiert die Expression von *hom*, *hsk*, *metX*, *metC* und *metZ*. Allerdings werden *hom*, und *metZ* nach neusten Erkenntnissen nicht mehr von Methionin inhibiert, wenn McbR deletiert ist (Rey *et al.*, 2005). Da Methionin kein Effektor für McbR ist (Rey *et al.*, 2005), könnten die anderen Regulatoren in der Repression durch Methionin eine Rolle spielen. Cystein und SAM reprimieren die Expression von *metX*. Auch hier könnte wieder die Akkumulation von Homocystein eine Rolle spielen. Sind bereits hohe Konzentrationen von SAM und Cystein vorhanden, könnte eine unverminderte MetX-Expression zu weiterem Fluss in die Methioninsynthese führen. Bei gleichzeitiger Inhibition von MetC und CysE durch Cystein würde die Reaktion von MetZ begünstigt, was zu einer Akkumulation von Homocystein führen könnte. Bei SAM-Überschuss könnte Homocystein auch nicht in den Methylierungszyklus einfließen. Der Knockout des Regulatorproteins McbR wird als erster wichtiger Schritt in der Entwicklung eines Methioninproduzenten mit *C. glutamicum* betrachtet (Rey *et al.*, 2005; Rey *et al.*, 2003).

5.6. Elementarmodenanalyse

Der hohe Bedarf an Reduktionskraft und Energie zur Synthese von Methionin in Bakterien ist ein grundlegendes Problem, für eine wirtschaftliche Überproduktion. Die Bereitstellung der Reduktionsäquivalente geht bei *C. glutamicum* immer mit der Freisetzung von CO₂ einher. Zwar kann dieses CO₂ in den anaplerotischen Reaktionen teilweise refixiert werden, allerdings wird auch immer CO₂ freigesetzt, was einen Kohlenstoffverlust darstellt. Da Methionin eine relativ günstige Chemikalie ist (ca. 2 US \$ / kg), sind die Ausgangsstoffe ein entscheidender Kostenfaktor. Für die Wirtschaftlichkeit eines biotechnologischen Methioninverfahrens sind daher die theoretisch mögliche Kohlenstoffausbeute und die Steigerung selbiger sehr wichtig. Die genaue Berechnung von Ausbeuten in komplexen Netzwerken, wie dem Zentralstoffwechsel mit Schwefel-, C₁- und Methioninmetabolismus ist nicht trivial. Allerdings wurden in den letzten Jahren unterschiedliche Algorithmen entwickelt

(Papin *et al.*, 2004; Schilling *et al.*, 2000; Schuster *et al.*, 1999), die diese komplexen Netzwerke mathematisch analysieren. Diese Analysen, auch bekannt als Elementarmodenanalyse, erlauben es, maximale Ausbeuten unter bestimmten Kultivierungsbedingungen, oder auch unterschiedlichen genetischen Konstitutionen, zu berechnen. Elementarmodenanalyse ist ein wichtiges Werkzeug in der Untersuchung metabolischer Netzwerke und wurde in der Vergangenheit erfolgreich zur Analyse metabolischer Netzwerke von *Saccharomyces cerevisiae* (Carlson *et al.*, 2002; Duarte *et al.*, 2004; Förster *et al.*, 2002) und *Escherichia coli* (Carlson und Srienc, 2004a; Ibarra *et al.*, 2003; Liao und Oh, 1999) eingesetzt.

Die unterschiedlichen Algorithmen beruhen auf ähnlichen Prinzipien: Es wird ein stöchiometrisches Netzwerk aufgestellt, das Edukte, Intermediate und Produkte enthält. Der Algorithmus berechnet nun einen Lösungsraum in dem alle möglichen *steady-state* Flussverteilungen enthalten sind. Es werden nun minimale Lösungen herausgesucht, um vom Edukt zum Produkt zu gelangen. Eine solche Minimallösung wird auch als Elementarmodus oder *elementary mode* bezeichnet (Pfeiffer *et al.*, 1999; Schuster *et al.*, 1999). Der Vorteil dieser Analyse ist, dass alle Reaktionen des Netzwerkes erfasst werden und auch Reaktionen berücksichtigt werden können, die Reduktionskraft oder Energie zur Verfügung stellen. Man kann also für die einzelnen Elementarmoden direkt die Produktausbeuten berechnen. Außerdem werden durch die ganzheitliche Betrachtung des Netzwerkes auch Reaktionen mit einbezogen, die zwar nicht direkt im „Lehrbuch“-Stoffwechselweg eines Zielproduktes vorhanden sind, aber gleiche Reaktionspartner besitzen. So können beispielsweise alternative Wege mit höheren Ausbeuten identifiziert werden. Ebenfalls von großem Interesse kann die Reaktionsrichtung einer reversiblen Reaktion unter optimaler Ausbeute sein, wenn man ein reversibles Enzym durch irreversible Reaktionen ersetzen kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Elementarmodenanalyse mittels METATOOL (Pfeiffer *et al.*, 1999; Schuster *et al.*, 1999) durchgeführt. Diese Analyse erlaubte die Berechnung der theoretischen Methioninausbeute auf unterschiedlichen Kohlenstoff- und Schwefelquellen und ermöglichte die Quantifizierung der Effekte genetischer Modifikationen auf die Produktausbeute. Im Falle der Methioninproduktion ermöglichen diese Analysen nicht nur die zielgerichtete Optimierung von Stämmen, sondern auch den Vergleich verschiedener Organismen untereinander (Krömer *et al.*, 2005c). Außerdem können die Ergebnisse genutzt werden um erste Kostenrechnungen und Prozesssimulationen durchzuführen und diese dann mit dem existierenden chemischen Verfahren zu vergleichen. Die Möglichkeit der

Berechnung von Produktausbeuten auf bestimmten Substraten stellt somit ein herausragendes Werkzeug in der Prozessoptimierung dar.

Es wurden Netzwerke für *Corynebacterium glutamicum* und *Escherichia coli* aufgestellt (Krömer *et al.*, 2006c). Diese Organismen sind gegenwärtig die wichtigsten biotechnologischen Aminosäureproduzenten (Leuchtenberger *et al.*, 2005) und deshalb gute Kandidaten zur Entwicklung eines Methioninproduzenten. Die Modelle enthielten alle entscheidenden Wege des Zentralstoffwechsels, vereinfachte Schwefel- und C₁-Stoffwechsel sowie die Methioninsynthese. Für jeden Elementarmodus wurde die Kohlenstoffausbeute von Biomasse ($Y_{X/S}$) und Methionin ($Y_{Met/S}$) berechnet. In einer Simulation gab es für jedes Netzwerk mehrere Hundert solcher Elementarmoden. Es wurden Modelle basierend auf unterschiedlichen Substraten und mit unterschiedlichen genetischen Modifikationen aufgestellt.

Betrachtet man den großen Energiebedarf zur Methioninsynthese, ist es interessant zu wissen, wie sich beispielsweise der Reduktionsgrad der verwendeten Schwefelquelle auf die Kohlenstoffausbeute auswirkt. Deshalb wurden Elementarmodenanalyse für *C. glutamicum* mit Sulfat, Thiosulfat, H₂S und Methanthiol als Schwefelquelle durchgeführt. Letzteres dient ebenfalls als C₁-Quelle, was in den Berechnungen der Ausbeuten berücksichtigt wurde. Zusätzlich wurden die Ausbeuten bei Zufütterung einer zweiten Kohlenstoffquelle (z.B. Ameisensäure als C₁-Quelle oder Methanthiol), die eine für die Zelle günstigere Versorgung mit Methylgruppen bringen könnte, betrachtet. Im Stammvergleich von *E. coli* und *C. glutamicum* fällt auf, dass *C. glutamicum* Homoserin mittels Acetylierung aktiviert, während *E. coli* diese Reaktion durch Succinylierung durchführt. Außerdem verfügt *E. coli* nicht über die direkte Sulphydrylierung. Hat dies einen Einfluss auf die maximal mögliche Kohlenstoffausbeute für Methionin? Welche Rolle spielen für *E. coli* die Transhydrogenasen, da NADPH ja ein limitierender Faktor in der Methioninsynthese sein könnte? Im Hinblick auf den C₁-Stoffwechsel ist auch wichtig zu wissen, mit welchem Anstieg der Kohlenstoffausbeute zu rechnen wäre, wenn Glycin durch *C. glutamicum* weiterverwertet werden könnte.

Zusammenfassend wurde die Elementarmodenanalyse dazu genutzt, um wichtige Ziele einer rationalen Stamm- und Prozessoptimierung zu identifizieren und deren zu erwartenden Effekte mit der Produktkohlenstoffausbeute quantifizierbar zu machen. Sobald Mutanten mit signifikanten Methioninproduktionsraten vorliegen, können die hier aufgedeckten Strategien auch *in vivo* umgesetzt werden.

6. MATERIAL UND METHODEN

6.1. Bakterienstämme

6.1.1. *Corynebacterium glutamicum*

Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 (Wildtyp) wurde von der American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) bezogen. *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ wurde vom Wildtyp durch Deletion des Gens *mcbR* (Rey *et al.*, 2003) abgeleitet. *C. glutamicum* $\Delta metB$ ist ein Stamm in dem die Cystathionin- γ -Synthase (MetB) deletiert ist. In *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ $\Delta metB$ ist außerdem zusätzlich *mcbR* ausgeschaltet. *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ Δhom Δhsk ist eine Threonin und Homoserin auxotrophe *mcbR* -Knockoutmutante (Tabelle 6-1).

C. glutamicum $lysC^{fbr}$ und *C. glutamicum* $lysC^{fbr}$ Δpyk sind Lysinproduzenten mit feedback-resistenter Aspartokinase ($lysC^{fbr}$) (Kalinowski *et al.*, 1991) und einem Pyruvatkinaseknockout. Sie dienten der Untersuchung von Optimierungsschritten zur Flussmaximierung in die Biosynthese von Aminosäuren der Aspartatfamilie.

Tabelle 6-1: Verwendete Mutanten von *Corynebacterium glutamicum*

Stamm	Genotyp
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	Wildtyp
<i>C. glutamicum</i> $\Delta metB$	Knockoutstamm der Cystathionin- γ -Synthase (MetB)
<i>C. glutamicum</i> $\Delta mcbR$	Knockoutstamm des McbR-Regulatorproteins
<i>C. glutamicum</i> $\Delta mcbR$ $\Delta metB$	Doppelknockout für McbR und MetB
<i>C. glutamicum</i> $\Delta mcbR$, Δhom , Δhsk	Dreifachknockout für McbR, Homoserin-Dehydrogenase (Hom) und Homoserinkinase (Hsk)
<i>C. glutamicum</i> $lysC^{fbr}$	Stamm mit feedbackresistenter Aspartokinase (LysC)
<i>C. glutamicum</i> $lysC^{fbr}$ Δpyk	Knockoutstamm der Pyruvatkinase mit feedbackresistentem LysC

Die Konstruktion der Mutanten erfolgte durch Dr. H. Schröder (BASF AG, Ludwigshafen, Deutschland) und ist teilweise in der Literatur beschrieben (Krömer *et al.*, 2006b). Alle Mutationen erfolgten im Genom.

6.1.2. *Escherichia coli*

Escherichia coli XL1-blue (Kan^r) diente als heterologer Expressionsstamm zur Isolation von Cystathionin- γ -Synthase (MetB) und Cystathionin- β -lyase (MetC). Die Zellen wurden nach der CaCl₂-Methode transformiert (Seidman *et al.*, 1997).

6.2. Chemikalien und Nährstoffe

Die Substrate Trypton, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Pepton, Casaminoacids sowie Agar wurden von Difco (Detroit, USA) bezogen. Alle anderen Chemikalien waren mindestens von analytischer Reinheit und wurden von folgenden Firmen bezogen: Grüssing (Filsum, Deutschland); Acros Organics (Geel, Belgien); Merck (Darmstadt, Deutschland); Aldrich (Steinheim, Deutschland); Fluka (Buchs, Schweiz). Soweit nicht anders vermerkt, wurde Reinstwasser (18,2 M Ω ; Elga, High Wycombe, Großbritannien) verwendet. Die Reinheit und die Hersteller der verwendeten isotoopenmarkierten Substanzen sind in Tabelle 6-2 wiedergegeben.

Tabelle 6-2: Anreicherung und Bezugsquellen der isotoopenmarkierten Substanzen

<i>Substanz</i>	<i>Anreicherung</i>	<i>Hersteller</i>
[1- ¹³ C]-Glucose	99 %	Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA)
[U- ¹³ C]-Glucose	99 %	Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA)
[³⁴ S]-Sulfat	99 %	BASF AG (Ludwigshafen, Deutschland)
[³⁴ S]-Thiosulfat	99 % [³⁴ S]-Sulfanschwefel	BASF AG (Ludwigshafen, Deutschland)
[U- ¹³ C]-Threonin	98 %	Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA)
[1- ¹³ C]-Methionin	99 %	Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA)
[¹⁸ O]-H ₂ O	95 % ¹⁸ O, 0,9% ¹⁷ O, 4% ¹⁶ O	Eurisotop (Gif sur Yvette, Frankreich)
[¹⁵ N]-(NH ₄) ₂ SO ₄	99%	Campro Scientific (Veenendaal, Niederlande)

6.3. Stammhaltung

6.3.1. Medien

CM-Medium

Zur Anzucht von Reinkulturen wurden Agarplatten mit CM-Komplexmedium verwendet. Der CM-Nährboden war folgendermaßen zusammengesetzt:

Lösung 1:

20 g Agar
Ad 500 ml H₂O, autoklavieren (121 °C, 30 min)

Lösung 2:

10 g Glucose
2,5 g NaCl
2,0 g Harnstoff
5,0 g Hefeextrakt
5,0 g Fleischextrakt
5,0 g Polypepton
20,0 g Casaminoacids
Ad 500 ml H₂O, pH 6,8, sterilfiltrieren (Millipore, ExpressTMPLUS 0,22 µm, Eschborn, Deutschland)

Für Flüssigmedium wurde statt Lösung 1 500 ml autoklaviertes H₂O zugeben.

Terrific Broth

Zur Überexpression von MetB und MetC in *E. coli* wurde das Komplexmedium Terrific Broth (Losen *et al.*, 2004) eingesetzt. Abweichend von der Literatur wurde eine erhöhte Menge Glycerin und zur besseren Pufferung 100 mM 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS) eingesetzt. Das Medium war folgendermaßen zusammengesetzt:

Lösung 1:

12 g Trypton
24 g Hefeextrakt
10 ml Glycerin
Ad 900 ml H₂O, autoklavieren (121 °C, 30 min)

Lösung 2:

2,3 g KH₂PO₄
12,5 g K₂HPO₄
20,9 g MOPS
pH 7,2 (NaOH), ad 100 ml H₂O, autoklavieren (121 °C, 30 min)

Nach dem Autoklavieren wurden die auf Raumtemperatur abgekühlten Lösungen vereinigt und 0,1 g l⁻¹ Ampicillin zugegeben.

Minimalmedium CG12½

Das vollsynthetische Mineralmedium CG12½ wurde aus verschiedenen Stammlösungen gemischt. Die Zusammensetzung des Mediums ist im Folgenden beschrieben.

Lösung 1:

25,0 g Glucose
Ad 100 ml H₂O, autoklavieren (121 °C, 30 min)

Lösung 2:

4,0 g KH₂PO₄
16,0 g K₂HPO₄
pH 7,0 (NaOH), ad 695 ml H₂O, autoklavieren (121 °C, 30 min)

Lösung 3:

10,0 g (NH₄)₂SO₄
pH 7,0 (NaOH), ad 200 ml H₂O, autoklavieren (121 °C, 30 min)

Lösung 4:

2,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

Ad 10 ml H_2O , sterilfiltrieren (Minisart, 0,22 μm , Sartorius, Göttingen, Deutschland)

Lösung 5:

0,1 g CaCl_2

Ad 10 ml H_2O , sterilfiltrieren (Minisart, 0,22 μm)

Lösung 6:

0,3 g 3,4-Dihydroxybenzoesäure

pH 12,0 (NaOH), ad 10 ml H_2O , sterilfiltrieren (Minisart, 0,22 μm)

Lösung 7:

50 μl Vitamin B12 (Cyanocobalamin, 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Stocklösung)

0,015 g Thiamin

10 μl Pyridoxal-Phosphat (0,1 mg ml^{-1} Stocklösung)

5 ml Biotin (1 mg ml^{-1} Stocklösung)

Ad 50 ml H_2O , sterilfiltrieren (Minisart, 0,22 μm)

Lösung 8:

0,5 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0,5 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

0,1 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

500 μl $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,02 g ml^{-1} Stocklösung)

50 μl $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,02 g ml^{-1} Stocklösung)

50 μl $\text{Na}_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,02 g ml^{-1} Stocklösung)

pH 1 (HCl), ad 50 ml H_2O , sterilfiltriert (Minisart, 0,22 μm)

1 Liter des Minimalmediums CG12½ wurde folgendermaßen zubereitet: 80 ml Lösung 1, 695 ml Lösung 2, 200 ml Lösung 3 sowie je 1 ml der Lösungen 4-8. Außerdem wurde je Liter 20 ml steriles Wasser, bzw. bei Kultivierung auxotropher Mutanten Lösungen der zusätzlich benötigten Substrate (500 mM) zugegeben.

CG12½-Medium enthielt pro Liter: 20 g Glucose, 16 g K₂HPO₄, 4 g KH₂PO₄, 20 g (NH₄)₂SO₄, 300 mg 3,4-Dihydroxybenzoesäure, 10 mg CaCl₂, 250 mg MgSO₄ * 7 H₂O, 10 mg FeSO₄ * 7 H₂O, 10 mg MnSO₄ * H₂O, 2 mg ZnSO₄ * 7H₂O, 200 µg CuSO₄* 5 H₂O, 20 µg NiCl₂ * 6 H₂O, 20 µg Na₂MoO₄ * 2H₂O, 100 µg Cyanocobalamin (Vitamin B₁₂), 300 µg Thiamin (Vitamin B₁), 4 µg Pyridoxal-Phosphat (Vitamin B₆) und 100 µg Biotin (Vitamin B₇).

Dichte des CG12½-Mediums

Zur exakten Berechnung der intrazellulären Konzentrationen und der Korrelation zwischen Biotrockenmasse und optischer Dichte muss das Probenvolumen genau bekannt sein. Da bei diesen Messungen nur die Masse der Probe bestimmt wird, wurde die Dichte des CG12½-Mediums bestimmt. 5 Eichkolben (100 ml ± 0.1 %, 20 °C) leer gewogen, mit 100 mL Medium befüllt und nochmals gewogen. Die Dichte des Mediums beträgt bei Raumtemperatur (23,4 °C) 1,01795 g ml⁻¹ mit einer Standardabweichung von ± 0,00053 g ml⁻¹ (~ 0,05 %). Bei Kultivierungstemperatur (30 °C) beträgt die Dichte des Mediums 1,01598 g ml⁻¹ mit einer Standardabweichung von ± 0,00062 g ml⁻¹ (~ 0,06 %).

Die Temperaturerhöhung um rund 6 °C bewirkt also eine 0,2%ige Verringerung der Dichte. Da die Proben außerhalb des Reaktors schnell abkühlen, ist die Vernachlässigbarkeit der Änderung der Dichte wichtig.

„Schwefelfreies“ CG12½-Medium

Zur Untersuchung der Verwertung unterschiedlicher Schwefelquellen durch *C. glutamicum* wurde ein „schwefelfreies“ CG12½-Medium angesetzt. Zu diesem Zweck wurden alle Sulfate durch Chloride ersetzt und so eingesetzt, dass sich die Konzentrationen der jeweiligen Kationen in den beiden Medien nicht unterschieden. Außerdem wurden die höchsten erhältlichen Reinheiten für alle Medienkomponenten eingesetzt. Im Einzelnen wurden folgende Salze eingesetzt: MgCl₂ * 6 H₂O (SO₄²⁻<0,002 %, Sigma); ZnCl₂ (SO₄²⁻<0,002 %, Sigma); NH₄Cl (SO₄²⁻<0,002 %, Fluka); MnCl₄ * 4 H₂O (SO₄²⁻<0,002 %, Sigma) und FeCl₂ * 4 H₂O (SO₄²⁻<0,01 %, Sigma).

6.4. Stammkonservierung

Die Stämme wurden auf CM-Medium gezüchtet, in der exponentiellen Wachstumsphase in Gefrier Röhrchen überführt, mit 40 % v/v Glycerin versetzt und in flüssigem Stickstoff (-180 °C) schockgefroren. Nach dem Einfrieren wurden die Gefrierkulturen bei -70 °C gelagert.

6.5. Stammkultivierung

6.5.1. Vorkultur

Als erste Vorkultur wurden Kolonien einer maximal 3 Tage alten Agarplatte (Inkubation bei 30 °C) eingesetzt. Die Zellen wurden 8 Stunden in CM-Medium (50 ml) bei 30 °C und 250 rpm im Schüttelschrank (HT Multitron, Infors, Bottmingen, Schweiz) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (10000g, 15 min, Biofuge Stratos, Heraeus / Kendro, Osterode, Deutschland) geerntet. Nach einmaligem Waschen (0,9 % NaCl, RT) wurde eine zweite Vorkultur auf CG12½-Medium gezüchtet. Die zweite Vorkultur wurde derart angeimpft, dass sich die Zellen zum Zeitpunkt der Ernte noch in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Diese Vorkultur wurde wie oben beschrieben geerntet und als Inokulum der Hauptkulturen verwendet. Bei Markierungsexperimenten wurde die zweite Vorkultur zweimal gewaschen, um einer Verschleppung der natürlich markierten Substrate und Produkte entgegen zu wirken. Die Hauptkulturen wurden in Markierungsexperimenten mit einer optischen Dichte von 0,05 sonst von 0,5-1,0 gestartet.

6.5.2. Kultivierung im Schüttelkolben

Kultivierungen von *C. glutamicum* im Schüttelkolben wurden immer in Schikanekolben (4 Schikanen) bei 30 °C und 250 rpm und einer Auslenkung von 5 cm im Schüttelschrank (Multitron, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) durchgeführt. Zur Vermeidung von Sauerstofflimitierung wurden die Kolben maximal zu 10 % mit Medium befüllt. Kultivierungen von *E. coli* zur Überexpression rekombinanter Proteine wurden mit Ausnahme der Temperatur unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Es wurden 37 °C während der Wachstumsphase und 20 °C während der Induktionsphase eingestellt, um die Bildung von Einschlusskörpern zu verhindern.

6.5.3. Kultivierung im Bioreaktor

Die Kultivierungen im Bioreaktor wurden in 2 Reaktoren Vario 1000 (Meredos, Bovenden, Deutschland) als parallele Batchfermentationen durchgeführt. Das Kulturvolumen betrug 100 ml. Das Kulturmedium wurde mit 1 vvm (bezogen auf das Anfangskulturvolumen) Luft begast und mit 800 rpm gerührt. Eine Steuereinheit (WMR Compact 4, Brooks Instruments, Veenendaal, Niederlande) mit zugeschaltetem Massendurchflussbegrenzer (5850 TR, Brooks Instruments, Veenendaal, Niederlande) kontrollierte die Begasung. Die Menge an gelöstem Sauerstoff in der Kulturflüssigkeit wurde mit einer pO₂-Elektrode (Broadley-James Corporation, Irvine, CA, USA) in Prozent der Sättigungskonzentration gemessen. Der pH-Wert wurde mit einer pH-Elektrode (Broadley-James Corporation, Irvine, CA, USA) bestimmt und mit 2 M NaOH auf 7,0 konstant gehalten. Die Lauge wurde über eine Pumpe, die vom pH-Regler gesteuert war, zugegeben. Die zugegebene Laugenmenge wurde gravimetrisch mit einer Laborwaage (Sartorius, Göttingen, Deutschland) gemessen. Während der Fermentation wurde die Gaszusammensetzung von Zu- und Abluft online mittels Quadrupol-Massenspektrometrie (Omnistar, Balzers AG, Balzers, Liechtenstein) gemessen. Berücksichtigt wurden die Partialdrücke von Argon, C¹⁸O¹⁶O, ¹³CO₂, CO₂, O₂ und N₂ in Zuluft und Abluft. Mittels Inertgasbilanz wurden der respiratorische Quotient (RQ), die volumetrische Sauerstoffaufnahme (Q_{O₂}) und die volumetrische Kohlendioxidproduktionsrate (Q_{CO₂}) errechnet. Alle Prozessdaten (Begasungsrate, Temperatur, pH-Wert, gelöster Sauerstoff, Rührung, zugegebene Laugenmenge und die Partialdrücke der genannten Gase) wurden mit dem Prozessleitsystem LUCULLUS PIMS (Version 2.01., Biospectra, Schlieren, Schweiz) erfasst (Abb. 6-1).

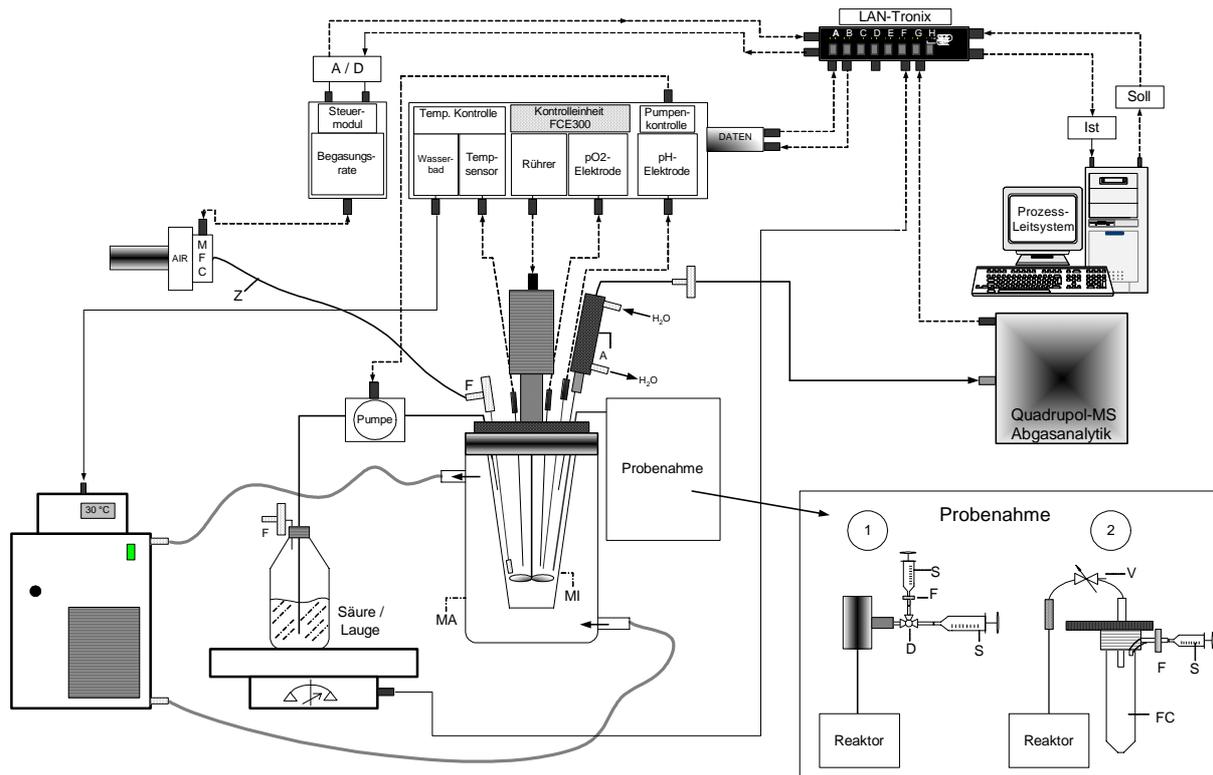


Abb. 6-1: Versuchsaufbau bei Fermentationen im Bioreaktor. A= Abluftkühler; A/D = Analog-Digitalwandler; D = Dreiwegehahn; F = Sterilfilter 0,45µm Porengröße; FC = Falcongefäß; MA = Meredosaußengefäß; MI = Meredosinnengefäß; S = Einwegspritze; V = Ventil; Z = Zuluft.

6.6. Analytische Methoden

6.6.1. Zellkonzentration

Die Konzentration der Zellen in Schüttelkolben und Bioreaktor wurde photometrisch bestimmt. Es wurde die optische Dichte (OD) bei 660 nm (Spektrophotometer Novaspec[®] II, Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK) gegen Wasser in Einwegküvetten (Plastibrand, Brand, Wertheim, Deutschland) in Duplikaten gemessen. Die Proben wurden vorher auf der Analysenwaage (Sartorius, Göttingen, Deutschland) verdünnt, um im linearen Bereich der Messung ($0,05 < OD < 0,3$) zu liegen. Zur Berechnung der intrazellulären Konzentrationen war die Bestimmung der Korrelation zwischen Biotrockenmasse (BTM) und OD notwendig.

6.6.2. Korrelation von optischer Dichte und Biotrockenmasse

Die Korrelation von optischer Dichte und Biotrockenmasse wurde mittels Geradenregression bestimmt. Hierzu wurden OD und BTM simultan während der exponentiellen Wachstumsphase im Bioreaktor auf CG12½-Medium gemessen. Die OD wurde in Doppelbestimmungen (Verdünnung auf der Analysenwaage), die BTM in Dreifachbestimmungen gemessen. Hierzu wurden 15 ml Falcongefäße (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) vorgetrocknet (80 °C, 48 h), im Exsikkator abgekühlt und gewogen (Sartorius, Göttingen, Deutschland). Während der Kultivierung im Bioreaktor wurden mit Probenahme 2 (Abb. 6-1) pro Messpunkt dreimal 10 ml Kultur entnommen, gewogen und abzentrifugiert (10 min, 4°C, 3750 g). Die Zellen wurden zweimal gewaschen (H₂O), erneut zentrifugiert (10 min, 4°C, 3750 g) und schließlich bis zur Gewichtskonstanz (3-8 Tage, 80 °C) getrocknet und erneut gewogen. Die Gewichtsdiﬀerenz entsprach der Biotrockenmasse im Falcon. Probengewicht und Dichte des Mediums zu Anfang der Analyse ergaben das Probenvolumen. Aus beidem lässt sich die Biotrockenmassekonzentration in g l⁻¹ direkt errechnen.

Für *C. glutamicum* ATCC 13032 ergab sich folgende Korrelation (Abb.6-2):

$$BTM_{ATCC13032} = 0,39 * OD_{660} \quad [g\ l^{-1}] \quad \text{Gl. 6-1}$$

Für *C. glutamicum* Δ*mcbR* ergab sich eine niedrigere Korrelation (Abb.6-2). Dies bedeutet, dass die Zellen größer, bzw. leichter sind als der Wildtyp. Mikroskopische Aufnahmen deuteten eventuell auf größere Zellen hin.

$$BTM_{\Delta mcbR} = 0,34 * OD_{660} \quad [g\ l^{-1}] \quad \text{Gl. 6-2}$$

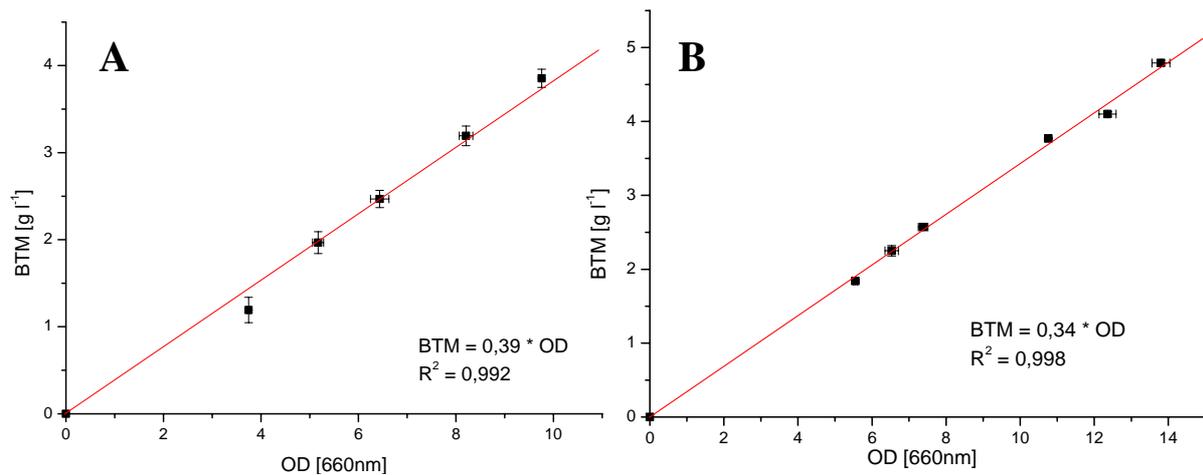


Abb.6-2: Korrelation zwischen optischer Dichte (OD) und Biotrockenmasse (BTM) für *C. glutamicum* ATCC13032 (A) und $\Delta mcbR$ (B) im Bioreaktor auf CG12½-Medium. Jeder Messpunkt (außer Nullpunkt) setzt sich aus 2 OD- und 3 BTM-Werten zusammen.

Die Aminosäurezusammensetzung der Biomasse von *C. glutamicum* wurde der Literatur entnommen (Marx *et al.*, 1996).

Es wurden Elementaranalysen für Kohlenstoff-, Sauerstoff, Schwefel- und Stickstoffgehalt durchgeführt. Hierzu wurden *C. glutamicum* ATCC 13032 und *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ Zellen während exponentiellen Wachstums auf Minimalmedium im Schüttelkolben geerntet (3750 g, RT, 5 min), zweimal gewaschen (Reinstwasser) und anschließend lyophilisiert. Die Elementarzusammensetzung der Zellpellets (in 2 Parallelen) wurden dann durch die BASF AG (Ludwigshafen, Deutschland) bestimmt.

6.6.3. Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie

Die Zellen von *C. glutamicum* ATCC 13032, *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ und *C. glutamicum* $\Delta mcbR \Delta metB$ wurden mittels Raster- (REM) und Transmissions- (TEM) Elektronenmikroskopie untersucht. Hierzu wurden die Zellen im Schüttelkolben auf CG12½-Medium gezüchtet und während der exponentiellen Wachstumsphase geerntet (16000 g, 1 min, 30°C). Das Zellpellet wurde direkt in 1 ml Fixierlösung (1% Paraformaldehyd, 1% Glutaraldehyd, 0,1 % gesättigte Pikrinsäure in 120 mM Phosphatpuffer, angefärbt mit Phenolrot) resuspendiert und bis zur Analyse bei 4 °C aufbewahrt. Proben zur Schwefelbestimmung mittels EDX (**E**nergiedispersive **X**-Ray (Röntgen)Analytik) wurden vor der Fixierung nochmals gewaschen (0.9 % NaCl, 1 min, 30 °C, 16000g). Die Analysen

wurden extern vom anatomischen Institut (Prof. Mestres, Universität des Saarlandes, Homburg, Deutschland) durchgeführt. Die Zellen zur TEM-Analyse wurden in Epoxydharz eingebettet und mit Osmiumtetroxid nachkontrastiert. Anschließend wurden Ultradünnschnitte analysiert. Bei REM-Aufnahmen wurden die Zellen osmiert (2% OsO₄) und auf einen Objektträger mit Polylysinbeschichtung aufgebracht. Es erfolgte eine Entwässerung mit einer Ethanolreihe und Aceton. Schließlich erfolgte eine Besputterung mit Platin. Die REM-Analyse erfolgte in einem XL-30 ESEM-FEG Mikroskop (FEI, Eindhoven, Niederlande). TEM-Bilder wurden mit dem Mikroskop Tecnai 12 (FEI, Eindhoven, Niederlande) aufgenommen.

6.6.4. Zellextraktion

Zur Gewinnung von Zellextrakten zur intrazellulären Metabolitanalyse wurde eine Schnellfiltrationsmethode eingesetzt, um Kälteschockphänomene zu vermeiden. Bei Kultivierungen im Bioreaktor wurde mit Probenahme 2 (Abb. 6-1), im Schüttelkolbenexperiment mit sterilen Einwegspritzen Kulturflüssigkeit entnommen und wie in der Literatur beschrieben weiterbehandelt (Wittmann *et al.*, 2004b).

6.6.5. Quantifizierung von Glycerin und Dihydroxyaceton

Da mittels HPLC (vgl. 6.6.6) Dihydroxyaceton (DHA) und Glycerin nicht unterschieden werden konnten, wurden diese mittels Enzymtestkit (Boehringer Mannheim, Deutschland) analysiert. Das Messprinzip beruht auf einer dreistufigen Reaktion: Glycerin / DHA werden von der Glycerokinase unter ATP-Verbrauch phosphoryliert. Das gebildete ADP wird von der Pyruvatkinase genutzt, um Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat umzusetzen. Im letzten Schritt nutzt die Laktatdehydrogenase Pyruvat und NADH, um Laktat und NAD zu bilden. Die Abnahme von NADH wird bei 340 nm photometrisch (helios α , Thermo Spectronic, Dreieich, Deutschland) verfolgt. NADH nimmt in äquimolaren Mengen zu Glycerin und DHA in der Probe ab. Die unterschiedliche Substratspezifität der Glycerokinase (GK) für Glycerin und DHA kann genutzt werden, um mit einem Assay beide Substrate im Gemisch zu quantifizieren. Hierzu werden die Proben zuerst mit einer niedrigen GK-Konzentration inkubiert (0,66 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Es wird praktisch nur Glycerin umgesetzt. Im nächsten Schritt wird

mit erhöhter GK-Konzentration ($3,32 \mu\text{g ml}^{-1}$) gearbeitet. Bei dieser Konzentration setzt das Enzym auch Dihydroxyaceton um, wenn Glycerin nicht mehr zugegen ist (Abb. 6-3).

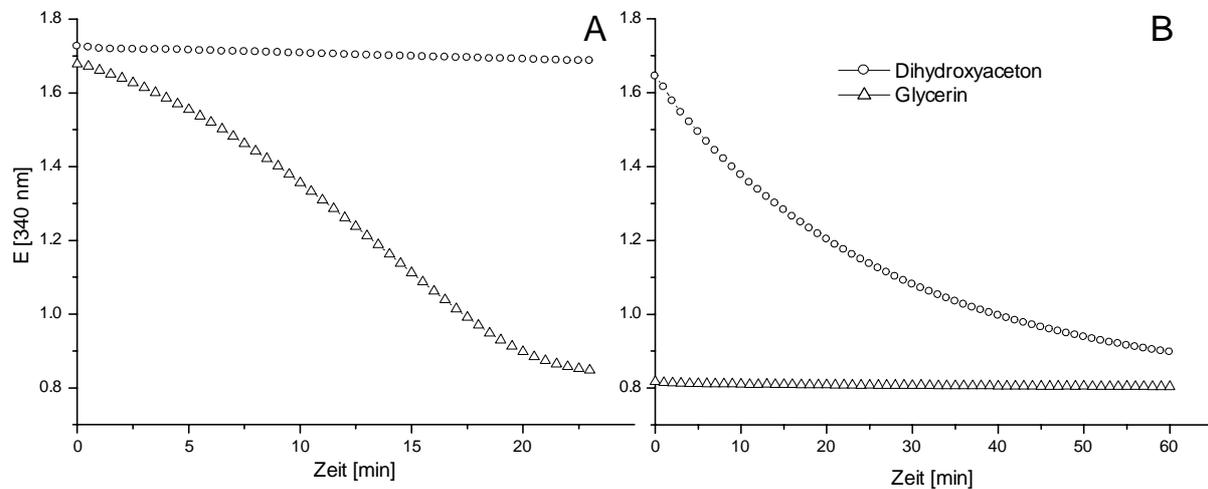


Abb. 6-3 Extinktionsverlauf im photometrischen Assay bei Umsatz von Glycerin (Dreiecke) und Dihydroxyaceton (Kreise) bei Zugabe von $0,66 \mu\text{g ml}^{-1}$ Glycerokinase (E2) (A) und Zugabe von weiteren $3,32 \mu\text{g ml}^{-1}$ Glycerokinase (E3) (B). Gezeigt sind die Extinktionen bei 340 nm für 400 mg l^{-1} Standards.

Das Protokoll des Herstellers wurde folgendermaßen modifiziert: Das Assayvolumen wurde auf $755 \mu\text{l}$ (vorher $3,02 \text{ ml}$) gesenkt. Die Inkubationszeit für Extinktion 1 wurde auf 15 min (vorher 5-7 min), die für Extinktion 2 auf 30 min (vorher 10-15 min) und die Inkubationszeit für Extinktion 3 auf 70 min (vorher 40-45 min) erhöht. Grund dafür war, dass die Zeiten im Herstellerprotokoll unzureichend waren. So war beispielsweise Glycerin erst nach 30 min vollständig umgesetzt (Abb. 6-3).

Die Berechnung der Glycerin-, bzw. DHA-Konzentration erfolgte nach folgender Formel:

$$c = \frac{v_g * M}{\varepsilon * d * v_p * 1000} * \Delta E \quad [\text{g l}^{-1}] \quad \text{Gl. 6-3}$$

v_g = Gesamtvolumen des Ansatzes (ml), M = Molekulargewicht ($M_{\text{Gly}} = 92,1 \text{ g mol}^{-1}$; $M_{\text{DHA}} = 90,1 \text{ g mol}^{-1}$), ε = Extinktionskoeffizient von NADH (bei 340nm = $6,3 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), d = Schichtdicke in cm, v_p = Volumen der Probe (ml); ΔE = Extinktionsdifferenz.

6.6.6. Quantifizierung von Zuckern und organischen Säuren

In Kulturüberständen wurden die Zucker Glucose und Trehalose sowie die organischen Säuren Citrat, Pyruvat, α -Ketoglutarat, Laktat, Fumarat und Acetat analysiert. Glycerin und Dihydroxyaceton wurden mit den gewählten Einstellungen nicht getrennt und lieferten nur ein Summensignal. Die Quantifizierung erfolgte mit einer HPLC-Anlage (Biotek, Neufahrn, Deutschland), ausgestattet mit einer Aminex HPX 87 H Säule (300 x 7,8 mm) (Biorad, Hercules, CA, USA). Die Säulentemperatur betrug 45 °C. Eluiert wurde isokratisch mit 1 ml min^{-1} 7 mM H_2SO_4 . Organische Säuren wurden mittels UV-Detektor bei 210 nm quantifiziert (HPLC 535, Biotek, Neufahrn, Deutschland). Die Quantifizierung der Zucker erfolgte mittels Brechungsindex- (RI) Detektor (ERC-7515A, ERC Inc, Alteglofsheim bei Regensburg, Deutschland).

6.6.7. Quantifizierung von Aminosäuren

Die Quantifizierung von Aminosäuren erfolgte sowohl in Kulturüberständen, als auch in Zellextrakten (vgl. 6.6.3) auf einer HPLC-Anlage (Agilent 1100, Agilent, Waldbronn, Deutschland). Alle Proben wurden vor der Analyse 1:10 mit einer 225 μM wässrigen Lösung von α -Aminobuttersäure (ABU) auf der Analysenwaage (Sartorius, Göttingen, Deutschland) verdünnt. ABU diente bei der Quantifizierung als interner Standard. Die Detektion der Aminosäuren wurde mittels Fluoreszenzdetektor (340 nm Anregung, 450 nm Emission; Agilent, Waldbronn, Deutschland) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde eine Vorsäulenderivatisierung mit o-Phthaldialdehyd (OPA) durchgeführt (Roth, 1971).

Bei Homocystein und Cystein ist zu beachten, dass diese Aminosäuren spontan Disulfide bilden und dann mit OPA nur noch schlecht derivatisiert werden können. Außerdem war der Methioninstoffwechsel von *C. glutamicum* in dieser Arbeit von besonderem Interesse. Die Optimierung der Stoffwechselwege zur Methioninproduktion könnte allerdings zur Akkumulation von Cystein und Homocystein führen, die dann ihrerseits auch als Thiolreagenz in der OPA-Derivatisierung fungieren könnten. Dies würde dann unterschiedliche Derivate einer Aminosäure erzeugen und dadurch zu Mehrfachsignalen führen. Um sicherzustellen, dass Cystein und Homocystein nicht als Dimer vorliegen und auch nicht in die OPA-Reaktion eingreifen können wurden die Disulfidbrücken vor der OPA-

Derivatisierung mit 2-Mercaptoethanol (bzw. 3-Mercaptopropionat) reduziert und anschließend eine Capping-Reaktion mit Iodessigsäure durchgeführt (Carducci *et al.*, 1999).

Ein Nachteil des Capping ist der Angriff der Iodessigsäure an einen Stickstoff des Histidinringes. Da diese Reaktion nicht vollständig abläuft, erhält man für Histidin ein acetyliertes und ein unacetyliertes Signal. Zur Quantifizierung von Histidin wurde nur ein Signal herangezogen (s.u.).

Da OPA nur mit primären Aminen reagiert, erforderte die Quantifizierung von Prolin eine weitere Derivatisierung. Prolin wurde mit 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-chlorid (FMOC) derivatisiert und konnte dann im Fluoreszenzdetektor (266 nm Anregung, 305 nm Emission; Agilent, Waldbronn, Deutschland) quantifiziert werden.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden Protokolle für die Quantifizierung proteinogener Aminosäuren und darüber hinaus der Intermediate des Methioninstoffwechsels in *C. glutamicum* auf zwei unterschiedlichen Silika-HPLC-Säulen (C₁₂-Synergi und C₁₈-Gemini; Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) entwickelt. Hierbei ist die Geminisäule, wegen der höheren Trennleistung (kürzere Analysenzeit) und der weitaus längeren Lebensdauer, besonders hervorzuheben. Die detaillierten Messprotokolle befinden sich im Anhang (11.1).

Aminosäureanalytik auf Synergi MAX RP

Die Analyse der Aminosäuren auf der Säule Synergi MAX-RP (4µ Partikelgröße, 80 Å, 150 * 4,6 mm; Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) ist in der Literatur näher beschrieben (Krömer *et al.*, 2005). Es wurde eine Trennung von 27 Substanzen erreicht (Abb. 6-4; Tabelle 6-3).

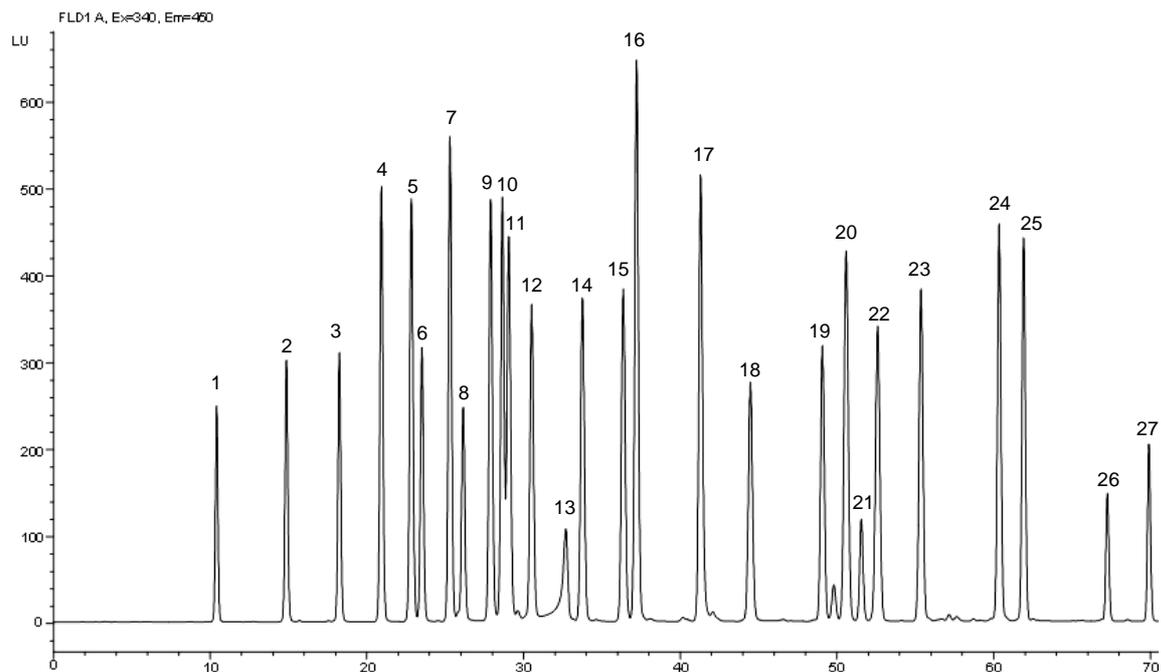


Abb. 6-4: HPLC-Chromatogramm eines Aminosäurestandards. Trennung erfolgte auf Synergisäule (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland). Die Peakannotation kann (Tabelle 6-3) entnommen werden.

Tabelle 6-3: Peaktabelle der mittels Synergi MAX RP-Säule trennbaren Aminosäuren

<i>Peaknummer</i>	<i>Aminosäure</i>	<i>Peaknummer</i>	<i>Aminosäure</i>
1	Aspartat	15	Alanin
2	Glutamat	16	γ -Aminobuttersäure
3	Cystein	17	O-Acetylhomoserin
4	Asparagin	18	α -Aminobuttersäure
5	Serin	19	Tryptophan
6	Homocystein	20	Methionin
7	Glutamin	21	LL-Cystathionin
8	Histidin	22	Valin
9	Homoserin	23	Phenylalanin
10	Arginin	24	Isoleucin
11	Glycin	25	Leucin
12	Threonin	26	Ornithin
13	Histidin 2 ¹	27	Lysin
14	Tyrosin		

¹Histidin lieferte 2 Signale (Peak 8 + 13), da Iodessigsäure auch den Ringstickstoff angreift. Zur Quantifizierung wurde sowohl im Standard und in den Proben nur Signal 8 verwendet. Es konnte eine sehr gute Korrelation zwischen Konzentration und Peakfläche festgestellt werden.

Aminosäureanalytik auf Gemini

Die Aminosäureanalytik mit der Geminisäule (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) verwendete als Thiolreagenz 3-Mercaptopropionat (0,5% in 0,5M Bicin) und außerdem wurde Prolin mittels FMOC-Derivatisierung quantifiziert. Die Trennung wurde bei einer Flussrate von 1 ml min^{-1} und einer Säulentemperatur von 40 °C durchgeführt. Folgende Laufmittel wurden eingesetzt: Eluent A = $40 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$ (pH=7,8, NaOH) als polare Phase. Eluent B = Acetonitril-Methanol-Wassergemisch (45:45:10) als apolare Phase. Der Gradient ist Tabelle 6-4 zu entnehmen. Die Detektion erfolgte im Fluoreszenzdetektor (340 nm Anregung, 450 nm Emission), wobei bei 43,5 min der Detektor auf die Wellenlängen zur Quantifizierung von FMOC-Prolin umgeschaltet wurde (266 nm Anregung, 305 nm Emission)

Tabelle 6-4: Gradient zur Trennung von Aminosäuren auf Gemini-Säule

<i>Zeit [min]</i>	<i>Anteil Eluent B [%]</i>
0	0
40.5	40.5
41	61
43	61
44	82
44.5	100
46.5	100
47	0
49	0

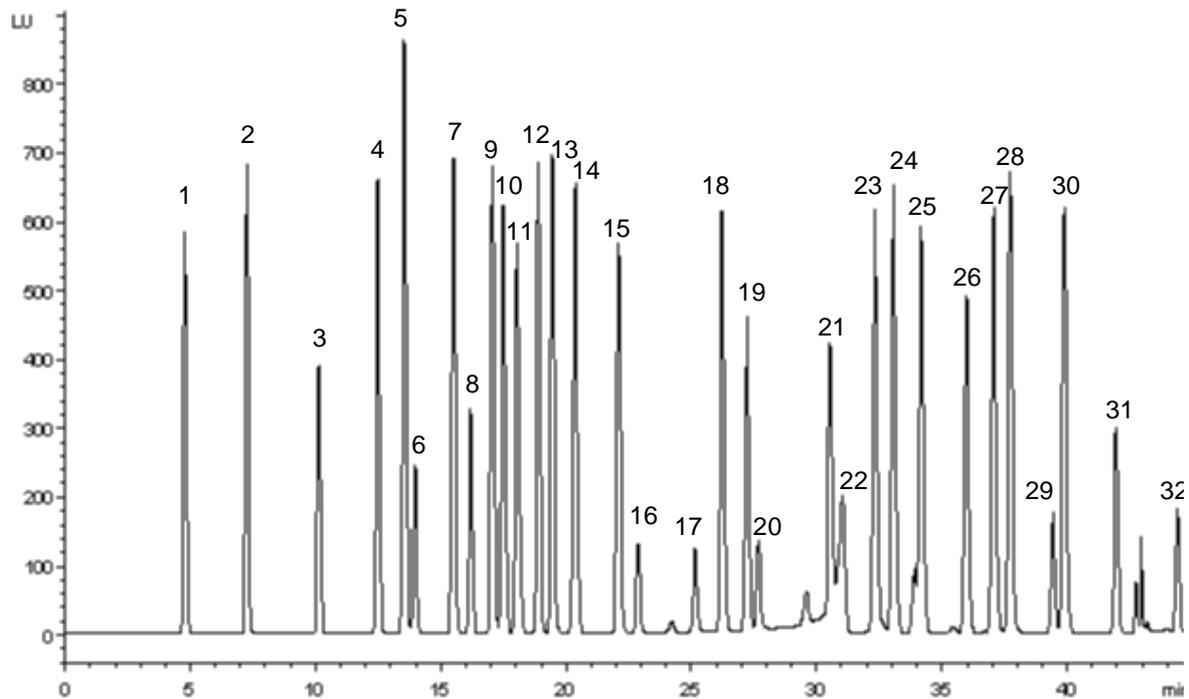


Abb. 6-5: HPLC-Chromatogramm eines Aminosäurestandards. Trennung erfolgte auf Geminisäule (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland). Die Peakannotation kann Tabelle 6-5 entnommen werden.

Tabelle 6-5: Peaktabelle der mittels Geminisäule trennbaren Aminosäuren

<i>Peaknummer</i>	<i>Aminosäure</i>	<i>Peaknummer</i>	<i>Aminosäure</i>
1	Aspartat	17	O-Acetylserin ²
2	Glutamat	18	Tyrosin
3	Cystein	19	O-Acetylhomoserin
4	Asparagin	20	α -Aminobuttersäure
5	Serin	21	LL-Cystathionin
6	Homocystein	22	Histidin 2 ¹
7	Glutamin	23	Valin
8	Histidin	24	Methionin
9	Homoserin	25	Norvalin ²
10	Glycin	26	Tryptophan
11	Threonin	27	Phenylalanin
12	Citrullin ²	28	Isoleucin
13	Arginin	29	Ornithin
14	β -Alanin	30	Leucin
15	Alanin	31	Lysin
16	γ -Aminobuttersäure	32	Prolin

¹Histidin lieferte 2 Signale (Peak 8 + 22), da Iodessigsäure auch den Ringstickstoff angreift. Zur Quantifizierung wurde sowohl im Standard und in den Proben nur Signal 8 verwendet. Es konnte eine sehr gute Korrelation zwischen Konzentration und Peakfläche festgestellt werden.

²Citrullin, Norvalin und O-Acetylserin wurden nicht standardmäßig quantifiziert.

6.6.8. Quantifizierung von Sulfat

Die Konzentration von Sulfat in Kulturüberständen wurde mittels Bariumchlorid-Nachweis (Spektroquant-Sulfat, Merck, Darmstadt, Deutschland) photometrisch bestimmt. Die Analysen wurden laut Hersteller durchgeführt, außer das das Ansatzvolumen an die verwendeten 1,5 ml Halbmikroküvetten (Brand, Wertheim, Deutschland) angepasst wurde. Die Messung erfolgte im Photometer (Helios α , Thermo Spectronic, Waltham, MA, USA) bei 820 nm gegen Wasser. Der lineare Messbereich lag zwischen 100-1000 mg Sulfat l⁻¹. Es wurde eine Eichgerade mit Ammoniumsulfat in Dreifachbestimmung aufgenommen (Abb. 6-6).

Die Sulfatkonzentration in CG12½ sollte theoretisch bei 14,53 g l⁻¹ (20 g l⁻¹ Ammoniumsulfat) liegen. Die Proben wurden 1:20 mit H₂O auf der Waage verdünnt, um im linearen Bereich der Messung zu liegen.

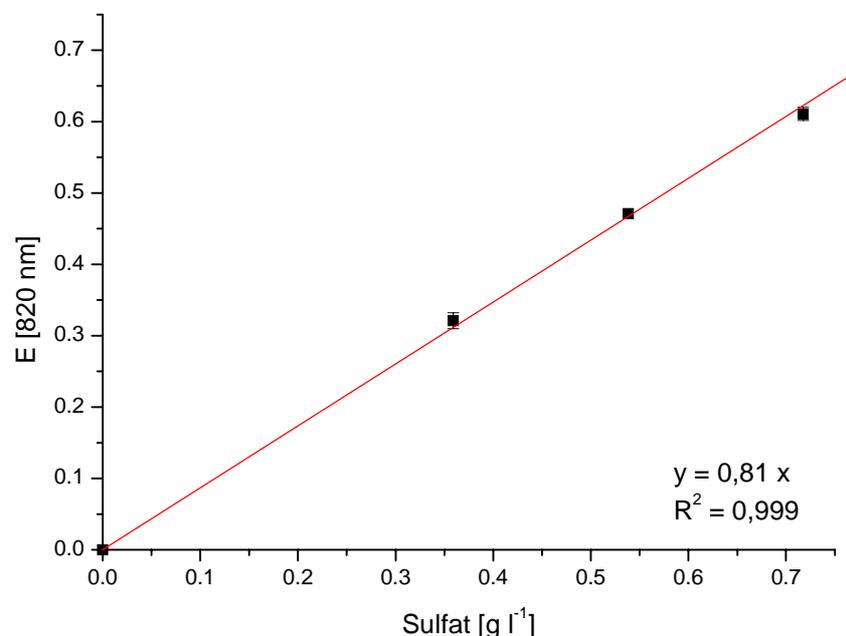


Abb. 6-6: Korrelation zwischen Extinktion (E) und der Sulfatkonzentration im BaCl₂-Nachweis. Dreifachbestimmung der Standards 717, 538 und 359 mg l⁻¹.

6.6.9. Quantifizierung von S-Adenosylmethionin

S-Adenosylmethionin wurde in Zellextrakten indirekt durch Zellextraktion in H_2^{18}O , Analyse der Markierungsverteilung von Homoserin mittels GC/MS und HPLC-Quantifizierung von Homoserin wie in der Literatur beschrieben, quantifiziert (Krömer *et al.*, 2006a).

6.6.10. CG/MS-Analyse von Massenisotopomerenverteilungen

Die Massenisotopomerenverteilungen von Aminosäuren aus Proteinhydrolysaten und von Trehalose aus dem Kulturüberstand, notwendig für die Berechnung metabolischer Flüsse, wurden mittels GC/MS analysiert.

Zur Markierungsanalyse von Aminosäuren wurden Zellen geerntet (16000 g, 4 °C, 5 min) und zweimal mit Wasser gewaschen. Die Biomasse (ca. 2 mg BTM) wurde anschließend hydrolysiert (48 h, 105 °C, 500 μL 6 N HCl). Die Hydrolysate wurden neutralisiert (6 N NaOH) und mittels Filtration (Ultrafree-MC, 0,22 μm , Durapore, Millipore, Bedford, USA) von partikulären Verunreinigungen getrennt. 50 μL des gefilterten Hydrolysates wurden gefriergetrocknet, in 50 μL Dimethylformamid (0,1 % Pyridin) aufgenommen und schließlich mit 50 μL N-Methyl(tertbutyl-dimethylsilyl)-trifluoroacetamid (MBDSTFA, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) 1 h bei 80°C derivatisiert. Die derivatisierten Proben wurden nochmals zentrifugiert (16000 g, 25 °C, 5 min), um überschüssiges Salz aus der Probe zu entfernen. Anschließend wurden die Proben mittels GC/MS analysiert. Folgende Anlage wurde verwendet: Ein Gaschromatograph HP 6890 GC (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA), ausgestattet mit einer HP-5MS Säule 5 % Phenyl-Methyl-Siloxan-Diphenylpolysiloxan; 30 m x 0,251 mm x 0,25 μm , Agilent, Waldbronn, Deutschland) und ein Quadrupol-Massenspektrometer (MS 5973, Agilent, Waldbronn, Deutschland). Es wurde ein Probenvolumen von 1 μL eingesetzt. Die Trennung im GC (Trägergas 1,5 ml min^{-1} Helium) erfolgte über folgenden Gradienten: 120 °C für 5 min, Temperaturerhöhung von 4 °C min^{-1} auf 270 °C, 20 °C min^{-1} auf 320 °C. Das Inlet hatte eine Temperatur von 300 °C, Interface und Quadrupol jeweils 320 °C. Die Ionisation erfolgte durch Elektronenstoßionisation bei 70 eV (Wittmann und Heinzle, 2002).

Das Markierungsmuster von Trehalose wurde mit gefriergetrockneten Kulturüberstand bestimmt (Kiefer *et al.*, 2004). Hierzu wurden 50 μL Überstand lyophilisiert, anschließend in 50 μL Pyridin aufgenommen und mit 50 μL N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA,

Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) derivatisiert (30 min, 80 °C). Nach erfolgter Zentrifugation (s.o.) wurde 1 µl Probe zur Analyse eingesetzt. Es wurde der Ionencluster $m/z = 361$ bis $m/z = 367$ analysiert. Dieses Fragment enthält ein komplettes Trehalosemonomer, dessen Kohlenstoffgerüst dem von Glucose-6-Phosphat entspricht. Die Messung wurde mit oben beschriebener Anlage durchgeführt, wobei folgender Gradient gefahren wurde: 150 °C für 5 min, Temperaturerhöhung von 8 °C min⁻¹ auf 310 °C, 310 °C für 10 min.

6.6.11. ¹³C-Flussanalyse

Die Bestimmung der intrazellulären Flüsse wurde mittels ¹³C-Flussanalyse durchgeführt. Zur Berechnung wurde Matlab 6.5 und Simulink 3.0 (The MathWorks, Natick, MA, USA) verwendet. Die Berechnungen wurden durch C. Wittmann (Technische Biochemie, Universität des Saarlandes) durchgeführt. In die Modellierung flossen der anabole Vorläuferbedarf zur Biomassebildung (Wittmann und de Graaf, 2005), die extrazellulär bestimmbaren Aufnahme- und Bildungsraten sowie die Markierungsmuster der proteinogenen Aminosäuren Alanin, Valin, Threonin, Aspartat, Glutamat, Lysin, Serin, Phenylalanin, Tyrosin und der Trehalose ein. Während der Berechnung wurden die Flussparameter solange verändert, bis die Abweichungsquadrate der berechneten Markierungsverteilungen von den experimentell bestimmten Markierungsverteilungen minimiert waren. Die mathematischen und stöchiometrischen Details des Modells sind in der Literatur näher beschrieben (Krömer *et al.*, 2004; Wittmann und Heinzle, 2001; Wittmann und Heinzle, 2002; Wittmann *et al.*, 2004a).

6.6.12. Proteomanalyse mittels 2D-PAGE

Die Analyse der cytosolischen Proteine (kurz: Proteomanalyse) in *C. glutamicum* wurde von der BASF AG (Ludwigshafen, Deutschland) durchgeführt. Die Kultivierung und die Gewinnung der Biomasse wurden in der Technischen Biochemie selbst durchgeführt. Im Folgenden wird die gesamte Vorgehensweise kurz erläutert.

Zellernte

Während Parallelkultivierungen im Bioreaktor wurden während 2 Zeitpunkten in der exponentiellen Wachstumsphase Proben zur Proteomanalyse gezogen. Hierbei wurden mittels Probenahme 2 (Abb. 6-1) 20 ml Kulturbrühe direkt in 50 ml Falcongefäße überführt, die 10 ml vorgekühlten Puffer (0°C, 20 mM TRIS, 5 mM MgCl₂, 20 mM NaN₃, pH 7.5) enthielten. Der Puffer wird wegen des Azidgehaltes auch als Killing-Puffer bezeichnet und wird normalerweise in der Transkriptomanalyse verwendet. Er wurde hier eingesetzt, um eventuelle Transkriptanalyse zu ermöglichen. Nach Probenahme wurden die Zellen zentrifugiert (4 °C, 3750 g, 5 min), der Überstand verworfen und das Pellet erneut in 10 ml frischen Puffer gewaschen. Nach dem zweiten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen und die Zellen in kaltem Azeton (-60 °C) schockgefroren. Bis zum Verschicken zur BASF auf Trockeneis, wurden die Zellen bei -70 °C gelagert.

Präparation der Proteinextrakte

250 mg der Zellpellets wurden in 750 µl Lysepuffer (20 mM TRIS, 5 mM EDTA, pH 7,5) aufgenommen. Der Lysepuffer enthielt einen Proteaseinhibitormix (Complete, Roche, Mannheim, Deutschland). Der Zellaufschluss wurde mit einer Schwingmühle (Retsch, MM 2000, Haan, Deutschland) bei 4 °C mit 0,25 – 0,5 mm Glassperlen durchgeführt. Zelltrümmer und Glasperlen wurden durch Zentrifugation (27.000 g, 1 h, 4 °C) abgetrennt. Die Proteinkonzentration in den Zellextrakten wurde nach Popov bestimmt (Popov *et al.*, 1975). Die Zellextrakte wurden entweder direkt zur Analyse eingesetzt, oder als Aliquots bei -80 °C gelagert.

Zweidimensionale SDS-PAGE

Für die 2D-Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE) der Proteine wurden 30 µg Protein des Rohextraktes in 450 µl Rehydratisierungspuffer (8M Harnstoff, 2M Thioharnstoff, 1% 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-Propansulfonat (CHAPS), 20 mM Dithiothreitol (DTT), 1% Ampholines 3,5 – 10 (Sigma) und ein paar Körnchen Bromphenolblau aufgenommen.

Erste Dimension: Zur isoelektrischen Fokussierung wurden vorgegossene 24 cm-IPG-Strips (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) mit linearem pH-Gradienten von 4,5 bis 5,5 verwendet. Die Fokussierung wurde in einer Fokussiereinheit Multiphor II (Amersham Biosciences) durchgeführt. Die Proteine wurden hierbei mit einem Gradienten bei bis zu 3500

V fokussiert. Insgesamt wurden 65000 Vh erreicht. Die fokussierten Gel-Strips wurden 2 mal für 15 min in Puffer (1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 6M Harnstoff, 30 % (vol/vol) Glycerin, 2 % (wt/vol) Natriumdodezylsulfat (SDS), 1 % (wt/vol) DTT) äquibriert, wobei beim zweiten Äquibrierungsschritt DTT durch 5 % (wt/vol) Iodacetamid ersetzt und wenige Körnchen Bromphenolblau zugesetzt wurden.

Zweite Dimension: Die Trennung der Proteine in der zweiten Dimension erfolgte durch SDS-PAGE mit 12,5 % Polyacrylamidgelen in einem Ettan-Dalt-Apparat (Amersham Biosciences) nach den Vorgaben des Herstellers. Anschließend wurden die Gele in einem Färbeautomaten (Eigenbau BASF) einer Coomassie- bzw. Silberfärbung (Blum *et al.*, 1987) unterzogen.

Verdau und Identifikation

Proteinspots wurden aus präparativen, coomassiegefärbten Gelen (300 µg Gesamtproteinauftrag) ausgeschnitten und mit modifiziertem Trypsin (Roche, Mannheim, Deutschland) nach Hermann *et al.* (Hermann *et al.*, 2001) verdaut. Die Identifikation erfolgte massenspektrometrisch (LCQ advantage, Thermo Electron, Dreieich, Deutschland) nach Trennung der Peptide mittels nano-HPLC (RP18 Säule, Länge 15 cm, 75 µm; LC Packings, Amsterdam, Niederlande) unter Verwendung der MASCOT Software (Perkins *et al.*, 1999). Die Annotation der Proteine wurde von der BASF AG (Ludwigshafen, Deutschland) erstellt und hier übernommen.

6.7. Aufreinigung und Charakterisierung von MetB und MetC

Zwei zentrale Enzyme des Methioninstoffwechsels (5.1) wurden im Rahmen dieser Arbeit in *E. coli* überexprimiert, aufgereinigt und charakterisiert. Zum einen wurde die Cystathionin-γ-Synthase (MetB), zum anderen die Cystathionin-β-Lyase (MetC) näher untersucht. Die Enzymaktivitäten wurden photometrisch mit Ellmans Reagenz (DTNB, 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure)) wie in der Literatur beschrieben, charakterisiert (Krömer *et al.*, 2006b). Außerdem wurden parallel dazu Assays ohne DTNB durchgeführt und mittels HPLC analysiert (Krömer *et al.*, 2005). Im Rahmen der Transformation wurde *E. coli* XL1-blue als Wirtsorganismus gewählt. Beim verwendeten Plasmid handelt es sich um pQE30 (Qiagen, Hilden, Deutschland). Das Gen für MetC bzw. MetB wurde in die multiple Klonierungsstelle (MCS) kloniert. Die Klonierung der Plasmide wurde von Dr. H. Schröder (BASF AG, Ludwigshafen, Deutschland) durchgeführt. Die Transformation erfolgte nach der CaCl₂-

Methode (Seidman *et al.*, 1997) in der technischen Biochemie. Die Kultivierung der Zellen und die Expression der rekombinanten Enzyme erfolgte wie in der Literatur beschrieben (Krömer *et al.*, 2006b).

6.7.1. Proteinaufreinigung

Die Aufreinigung der rekombinanten Proteine MetB und MetC wurde mittels FPLC (Fast Protein Liquid Chromatographie) in der Arbeitsgruppe Giffhorn (Universität des Saarlandes) mit freundlicher Unterstützung von Sabine Bastian und Christian Zimmer durchgeführt. Die Reinigung erfolgte mit einer ÄKTA Purifier 900 Anlage (Amersham Biosciences, Little Chalfont, England) ausgestattet mit einer 5 ml Hightrap® (Nickelsepharose) Säule (Amersham Biosciences, Little Chalfont, England). Es wurde eine Elution mit zwei verschiedenen Eluenten durchgeführt: Eluent A (Ladepuffer): 20 mM NaH₂PO₄, 0,5 M NaCl (pH = 7,4). Eluent B (Elutionspuffer): 20 mM NaH₂PO₄, 0,5 M NaCl und 0,5 M Imidazol (pH = 7,4). Zum Be- und Entladen der Säule mit Nickel wurden folgende Lösungen verwendet: Entladepuffer (Strippung): 20 mM NaH₂PO₄, 0,5 M NaCl und 50 mM EDTA (pH = 7,4). Nickelladepuffer: 0,1M NiCl₂*6 H₂O in H₂O. Während der Elution wurden automatisch 2 ml Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen wurden mittels SDS-Page auf den Gehalt an Zielprotein untersucht. Die genaue Durchführung der SDS-Page befindet sich im Anhang (vgl. Kap. 11.2)

Im Anschluss an FPLC wurden die Fraktionen, die das exprimierte Protein enthielten, vereinigt und mittels Filtration umpuffered. Die Umpufferung erfolgte durch mehrmaliges Waschen mit KH₂PO₄ (pH 7,5, 100 mM) und war nötig um noch im FPLC-Eluat vorhandenes Imidazol zu entfernen. Das Imidazol stört eine Proteinbestimmung mittels Bradfordassay, die hier durchgeführt werden sollte. Zur Filtration wurden 2,5 ml Gefäße (Centrisart 13249, Sartorius, Göttingen, Deutschland) mit einer Ausschlussgrenze von 20 kDa verwendet. Nach erfolgtem Umpuffern und Einengen wurden Proteinbestimmungen nach Bradford (BioRad-Assay, Hercules, USA) durchgeführt.

Sowohl MetB, als auch MetC konnten im Rahmen dieser Arbeit aufgereinigt werden (Abb. 6-7; Abb. 6-8). Anhand der klonierten Inserts wurden für die rekombinanten Proteine 42481 Da (MetB) und 41553 Da (MetC) erwartet. Die Molekulargewichte waren durch die 6 zusätzlichen Histidine etwas schwerer als die nativen Proteine (Hwang *et al.*, 1999; Kim *et al.*,

2001). Dies entspricht sehr gut den beobachteten Banden in der SDS-PAGE. Nach der Umpufferung lagen Proteinkonzentrationen von $12,5 \text{ g l}^{-1}$ MetB und $19,9 \text{ g l}^{-1}$ MetC vor. Die Aktivitäten wurden im Assay überprüft.

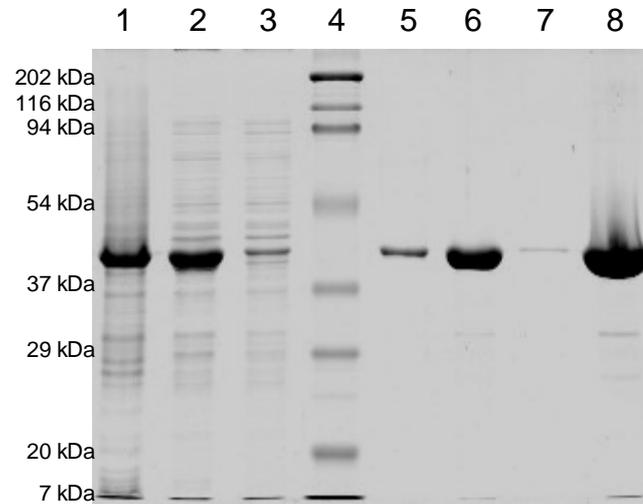


Abb. 6-7: SDS-PAGE der Aufreinigungsfractionen von MetC. Gesamtzellfraktion (1); Rohextrakt (2); Durchlaufraktion bei FPLC (3), Marker (4); Waschfraktion bei FPLC (5); vereinigte Zielfractionen aus FPLC (6); 20 kDa-Filtrat bei Umpufferung (7); Umgepuffertes MetC (8).

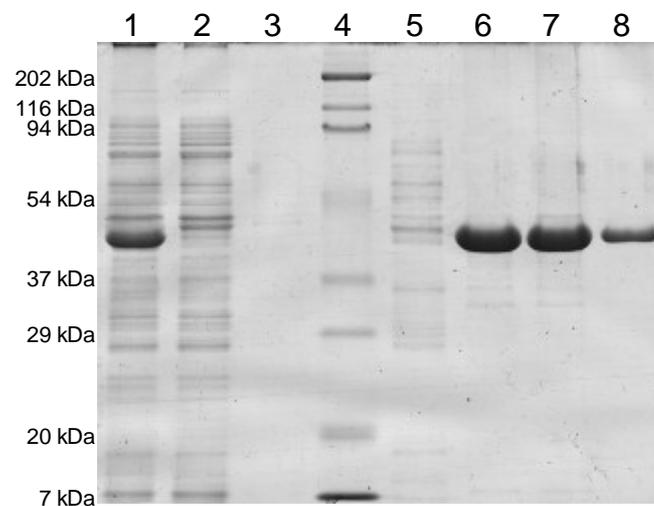


Abb. 6-8: SDS-PAGE der Aufreinigungsfractionen von MetB. Rohextrakt (1); Durchlaufraktion bei FPLC (2), Waschfraktionen bei FPLC (3+5) 0 und 5 % Eluent B; Marker (4); Zielfraction C1 aus FPLC (6); vereinigte Zielfractionen B10-C2 aus FPLC (7); Umgepuffertes MetB (8).

6.8. Synthese und Aufreinigung von Homolanthionin

Homolanthionin wurde im Rahmen dieser Arbeit mit dem vorher aufgereinigten MetB hergestellt. Zur Umsetzung von O-Acetylhomoserin und L-Homocystein mit MetB wurde ein Bioreaktor (Vario 1000, Meredos, Bovenden, Deutschland) eingesetzt. pH-Wert und Temperatur wurden konstant bei 7,5 bzw. 30 °C gehalten und die Lösung mit 200 rpm leicht gerührt. L-Homocystein wurde zuvor durch Spaltung des Thiolactons hergestellt (Duerre und Miller, 1966). Zur Vermeidung von hohen Homocysteinkonzentrationen, die eventuell zur Homocysteinylierung von MetB und damit zur Inaktivierung führen könnten, wurden beide Substrate mit 2 mM in Phosphatpuffer (100 mM pH = 7,5; 0,1 mM PLP) vorgelegt. MetB wurde in einer Konzentration von 125 mg ml⁻¹ zugegeben. Nach 30 min Inkubation wurde eine Zufütterung von 100 mM Substratlösungen und einer Rate von 20 ml h⁻¹ für 30 min gestartet. 25 min nach Ende der Fütterungsphase wurde die Reaktion gestoppt (100 °C, 5 min) und das Protein mittels Ultrafiltration abgetrennt (10 kDa Ausschlussgrenze; Amiconkammer Millipore, Schwalbach, Deutschland). HPLC-Analysen des Filtrates ergaben, dass Homocystein und O-Acetylhomoserin vollständig verbraucht waren und LL-Homolanthionin gebildet worden war. Daneben war nur noch Homoserin vorhanden, was im O-Acetylhomoserin zu etwa 10 % vorhanden war. Die Lösung wurde über einen Ionentauscher aufgereinigt (Dowex AG50X8; Biorad, Richmond, CA, USA). Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten 0-400 mM Ammoniumacetat. Die Fraktionen mit Homolanthionin (HPLC-Überprüfung) wurden vereinigt und lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in 25 ml H₂O aufgenommen und 1 h bei 80 °C mit 250 mg Aktivkohle gerührt (Kanzaki *et al.*, 1986). Die Aktivkohle wurde mittels Filtration entfernt (Cellulose-Nitrat, 0,45 µ; Sartorius, Göttingen, Deutschland). Das Filtrat wurde 1:1 mit Methanol versetzt und bei 4 °C kristallisiert (1 Woche). Die Kristalle wurden mit Methanol gewaschen und rekristallisiert. Nach Trocknung bei 80 °C (12 h) wurden 30 mg weißes Pulver erhalten. Die Reinheit wurde mittels HPLC auf ca. 97 % bestimmt. Strukturanalysen mittels NMR und GC/MS identifizierten die synthetisierte Substanz eindeutig als Homolanthionin (vgl. Kap. 7.2.7).

6.9. Elementarmodenanalyse

In der vorliegenden Arbeit wurde Elementarmodenanalyse (vgl. Kap. 5.6) mittels METATOOL (Pfeiffer *et al.*, 1999; Schuster *et al.*, 1999) durchgeführt. Die verwendete Version (*meta4.0.1_double.exe*) ist frei verfügbar (<http://www.biozentrum.uni-wuerzburg.de/bioinformatik/computing/metatool/>). Die mathematischen Details des Algorithmus sind in der Literatur beschrieben (Pfeiffer *et al.*, 1999).

Die Modelle wurden nach dem aktuellen biochemischen Wissen über die beiden Organismen (<http://www.genome.ad.jp/kegg/metabolism.html>) unter der Annahme aufgestellt, dass Wasser, Protonen und Phosphat in der Zelle ubiquitär sind. Diese Annahme reduzierte die Berechnungszeit signifikant, hatte aber keinen Einfluss auf die Kohlenstoffausbeute. Die genauen Reaktionsnetzwerke befinden sich im Anhang.

6.9.1. Das Netzwerk von *C. glutamicum*

Das grundlegende Stoffwechselnetzwerk (Abb. 6-9) von *C. glutamicum* wurde basierend auf den Substraten Glucose, Ammonium und Sulfat aufgestellt (Eggeling und Bott, 2005) (<http://www.genome.jp/kegg/metabolism.html>). Es beinhaltete Zuckeraufnahme über ein Phosphotransferasesystem (PTS), Glykolyse (EMP), Pentosephosphatweg (PPP), Tricarbonsäurecyclus (TCA-Cyclus) mit Glyoxylatweg, C₃/C₄-Stoffwechsel um PEP und Pyruvat, Atmungskette, C₁-Stoffwechsel, Schwefelstoffwechsel sowie die Methioninbiosynthese. Das gesamte Modell bestand aus 62 Stoffwechselreaktionen von denen 19 als reversibel betrachtet wurden. Insgesamt waren 59 interne und 8 externe Metabolite an diesen Reaktionen beteiligt. Die externen Metabolite waren die Substrate (Glucose, Sulfat, Ammonium, Sauerstoff) und Produkte (Biomasse, Methionin, CO₂, Glycin). Glycin wurde als externer Metabolit definiert, da pro mol Methionin 1 mol Glycin gebildet wird, was von *C. glutamicum* nicht wieder verwertet werden kann (Hüser *et al.*, 2005).

Für die ATP-Produktion in der Atmungskette wurde ein P/O-Verhältnis von 2 für NADH und 1 für FADH angenommen (Klapa *et al.*, 2003). Der Vorläuferbedarf (aus dem Zentralstoffwechsel) für die Bildung von Biomasse wurde der Literatur entnommen (Marx *et al.*, 1996). Der Bedarf an Reduktionskraft und Energie zur Biomassebildung sowie die NADH-Produktion bei Biomassebildung wurde der Literatur entnommen (Neidhardt *et al.*, 1990). Sulfat- und Ammoniumbedarf für die Biomasse wurde aus der

Aminosäurezusammensetzung der Biomasse berechnet. Der Schwefelgehalt von nicht organisch gebundenem Sulfid in Fe-S-Clustern wurde vernachlässigt. Die Reduktion von Sulfat zu Sulfid wurde vereinfacht in das Modell eingebunden (Schiff, 1979). Der Sulfatstoffwechsel wurde zu 2 Reaktionen zusammengefasst: Reduktion des Sulfats zu Sulfit (Verbrauch von 2 ATP und 1 NADPH) und Reduktion von Sulfit zum Sulfid (Verbrauch von 3 NADPH).

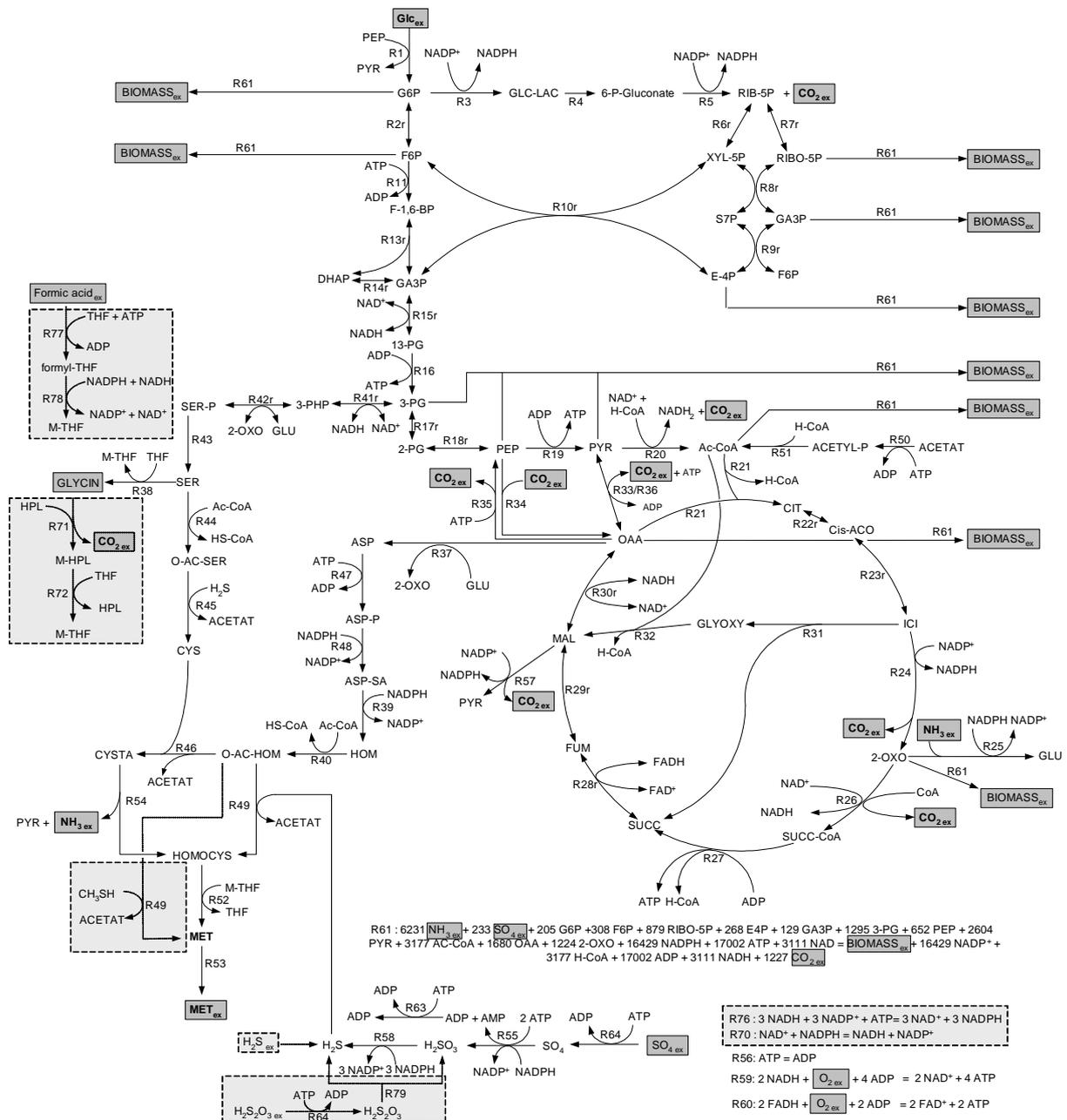


Abb. 6-9: Grundmodell des Stoffwechsels von *C. glutamicum* zur Elementarmodenanalyse. Während der Optimierung neu integrierte Reaktionen sind mit grauen Boxen (gestrichelte Linien) hinterlegt. Diese beinhaltenen (1) die Transhydrogenasen von *E. coli* (R70, R76); (2) der Formiatstoffwechsel (R77, R78); (3) die

Glycinspaltung (R71, R72) und die Verwertung alternativer Schwefelquellen (R79, R49). Externe Metabolite sind dunkelgrau hinterlegt.

6.9.2. Das Netzwerk von *E.coli*

Der Zentralstoffwechsel des *E.coli*-Netzwerkes wurde der Literatur (Carlson und Srienc, 2004b) und der KEGG-Datenbank (<http://www.genome.jp/kegg/metabolism.html>) entnommen. Das Modell enthielt die gleichen Komponenten, wie das Modell für *C. glutamicum*. Zusätzlich wurde der 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconatweg (KDPG-Weg) berücksichtigt (Abb. 6-10). Das Wildtypmodell für *E. coli* setzte sich aus 68 Reaktionen zusammen, von denen 20 als reversibel betrachtet wurden. Da *E. coli* über ein Glycinspaltungssystem verfügt, wurde Glycin als interner Metabolit betrachtet. Zwei Transhydrogenasen wurden in das Modell integriert (Sauer *et al.*, 2004). Es wurde eine cytosolische Transhydrogenase für die Protonenübertragung von NADPH auf NAD⁺ und eine membrangebundene Transhydrogenase für die Protonenübertragung von NADH auf NADP⁺ angenommen. Letztere reduziert je Übertragung den Protonengradienten um 1 H⁺, wodurch das Äquivalent von 1/3 ATP verbraucht wird. Dieses wurde ebenfalls berücksichtigt. Im Methioninstoffwechsel unterscheidet sich *E. coli* von *C. glutamicum* in zwei wichtigen Punkten: Erstens wird Homoserin durch Succinylierung aktiviert und Zweitens verfügt *E. coli* nicht über Enzyme, die eine direkte Sulphydrylierung katalysieren. *E. coli* muss also den Weg der Transsulfurierung über Cystathionin einschlagen (vgl. Abb. 5-1) (Sekowska *et al.*, 2000). Der Sulfatstoffwechsel wurde ebenfalls zu 2 Reaktionen zusammengefasst: Reduktion des Sulfats zu Sulfit (Verbrauch von 3 ATP und 1 NADPH) und Reduktion von Sulfit zum Sulfid (Verbrauch von 3 NADPH). Da *cysH* von *E. coli* eine PAPS-Reduktase ist, verbraucht *E. coli* hier zusätzlich ein weiteres ATP (vgl. Kapitel 5.3).

Zur ATP-Produktion in der Atmungskette wurden ebenfalls P/O-Verhältnisse von 2 (für NADH) and 1 (für FADH) angenommen (Carlson und Srienc, 2004b). Der Bedarf an Vorläufermolekülen zur Biomassebildung wurde der Literatur entnommen. (Edwards and Palsson, 2000; Weber *et al.*, 2002). Benötigte Reduktionskraft und Energie zur Biomassebildung sowie die NADH-Produktion bei Biomassebildung wurde der Literatur entnommen (Neidhardt *et al.*, 1990).

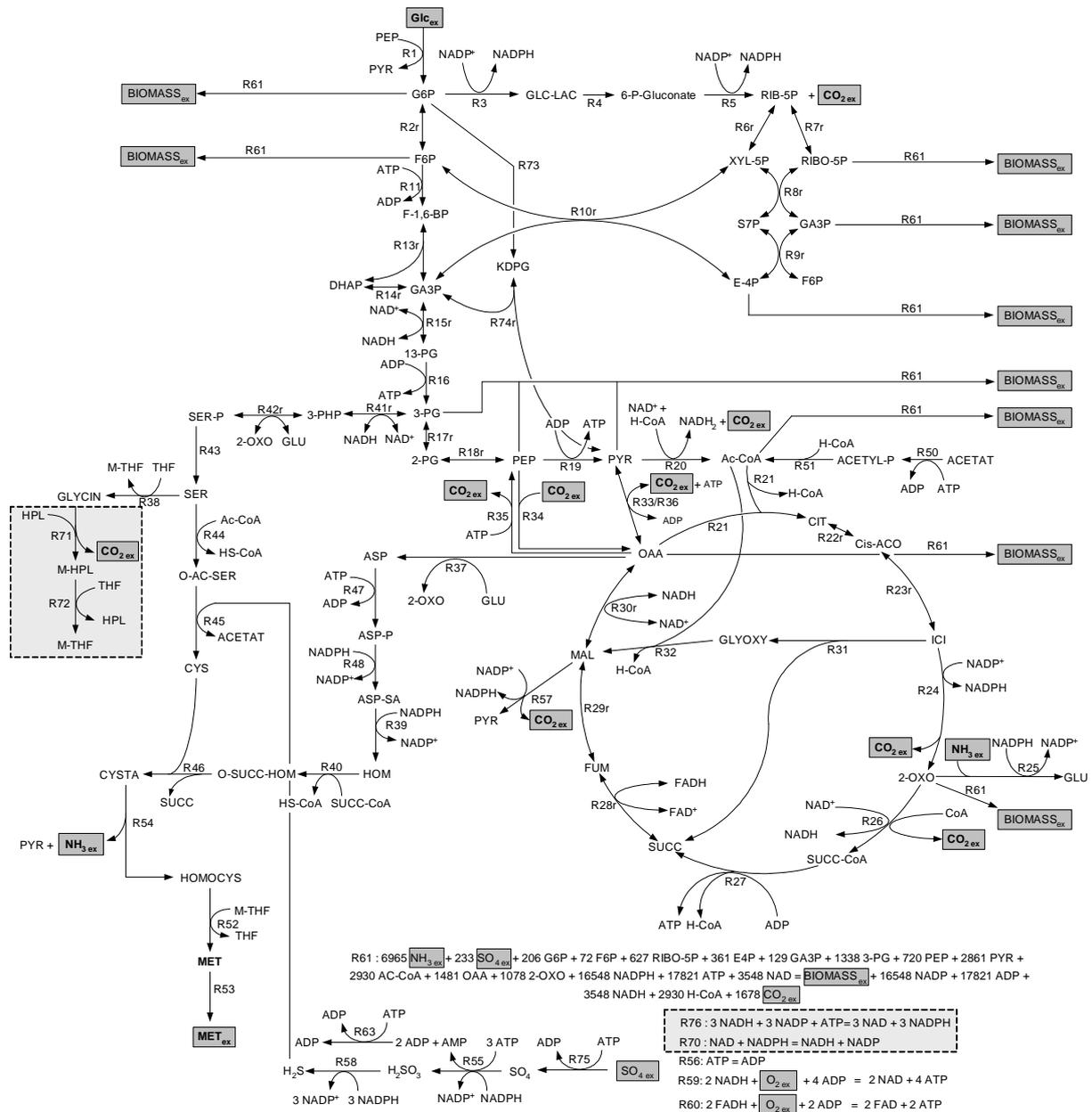


Abb. 6-10: Grundmodell des Stoffwechsels von *E. coli* zur Elementarmodenanalyse. Externe Metabolite sind dunkelgrau hinterlegt. Die im Laufe der Analysen ausgeschalteten Reaktionen sind hellgrau hinterlegt (gestrichelte Linie).

Transportmechanismen

Wie schon erwähnt wurde für Glucose ein aktiver Transport über ein PTS-System zugrunde gelegt. Für Sulfat und Thiosulfat wurden ABC-Transporter angenommen. Die Aufnahme dieser Substrate erfolgte also unter ATP-Verbrauch. Passiver Transport wurde für die Metabolite Sauerstoff, CO_2 , Ammonium, Sulfid, Methanthiol und Ameisensäure

angenommen. Der Methionin- und Glycinexport wurde als energieunabhängiger Prozess betrachtet.

7. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

7.1. Elementarmodenanalyse zum rationalen Design eines Produzenten für Methionin

C. glutamicum und *E. coli* sind viel versprechende Organismen zur biotechnologischen Produktion von Methionin. Beide werden bereits erfolgreich eingesetzt, um Aminosäuren der Aspartatfamilie, wie z.B. Lysin bzw. Threonin, biotechnologisch zu produzieren. Daher wurden Sie mittels Elementarmodenanalyse näher studiert, um das jeweilige Potential der metabolischen Netzwerke beurteilen zu können.

7.1.1. Vergleich der Methioninproduktion von *C. glutamicum* und *E. coli*

Die Elementarmodenanalyse ergab für die Wildtypmodelle von *C. glutamicum* und *E. coli* jeweils mehrere hundert Elementarmoden (vgl. Kap. 5.6) mit unterschiedlichen Kohlenstoffausbeuten für Biomasse und Methionin (Abb. 7-1). Ein Elementarmodus ist ein minimaler Satz an Enzymen, die notwendig sind, eine ‚steady-state‘ Flussverteilung innerhalb des Netzwerkes zu katalysieren. Für jeden Elementarmodus wurde die entsprechende Biomasse- und Methioninkohlenstoffausbeute bestimmt. Bei Auftragung von Biomasseausbeute gegen Methioninausbeute befinden sich alle Moden in einem dreieckigen Raum zwischen X- und Y-Achse und der Verbindungslinie von maximaler Biomasse- und maximaler Methioninausbeute (Abb. 7-1 A-F). Diese Linie stellt ein Optimum von Wachstum und Methioninbildung dar. Im Zuge einer Prozessoptimierung stellen besonders die Moden auf dieser Linie interessante Lösungen dar, da die Methioninsynthese natürlich immer von einer gewissen Biomassebildung abhängen wird. Im Zuge der Stamm- und Prozessoptimierung sollte diese Linie abgeflacht werden, also mehr Methionin und weniger Biomasse gebildet werden.

Ein Grossteil der beobachteten Moden waren extreme Lösungen des Netzwerkes in denen entweder nur Biomasse oder nur Methionin gebildet wurden. Diese Moden kann man daran erkennen, dass ihre maximalen Kohlenstoffausbeuten entweder auf der X- oder der Y-Achse zu liegen kommen. Zusätzlich gab es aber auch Minimallösungen, die gleichzeitig Biomasse und Methionin produzierten. Die maximale Kohlenstoffausbeute für die Biomasse waren 85,1 % und 85,07 % für *C. glutamicum* bzw. *E. coli* (Abb. 7-1 A&B). Der CO₂-Kohlenstoffanteil beträgt bei *E. coli* und bei *C. glutamicum* 14,9 %. Die maximale Kohlenstoffausbeute für Methionin beträgt für beide Organismen deutlich weniger als die Biomasseausbeute. So hat *C. glutamicum* eine theoretische Ausbeute von 49,3 % (Abb. 7-1 A), während *E. coli* mit 52,0 % (Abb. 7-1 B) etwas mehr Methionin aus der angebotenen Glucose bilden könnte. Dies deutet darauf hin, dass im Netzwerk von *E. coli* für die Kohlenstoffausbeute vorteilhafte Reaktionen vorhanden sind. Dies wurde mit zusätzlichen Simulationen untersucht, in denen Schlüsselenzyme in die jeweiligen Netzwerke eingefügt bzw. aus ihnen entfernt wurden.

Da *E. coli* im Methioninstoffwechsel auf Transsulfurierung angewiesen ist, wurde zunächst untersucht, welche Moden in *C. glutamicum* auch die entsprechenden Reaktionen beinhalten. In *C. glutamicum* wiesen die Moden, die Transsulfurierung verwendeten eine niedrigere Ausbeute auf, als vergleichbare Moden mit direkter Sulphydrierung. Grund hierfür ist, dass bei Transsulfurierung pro mol Methionin 2 mol Acetyl-CoA (statt 1), bzw. im Fall von *E. coli* 1 mol Succinyl-CoA und 1 mol Acetyl-CoA benötigt werden. Besonderes Augenmerk fiel auf zwei weitere Stoffwechselwege, die in *E. coli* aber nicht in *C. glutamicum* vorhanden sind: Die Transhydrogenasereaktionen und die Glycinspaltung (Glycinecarboxylase E.C.1.4.4.2). Die Glycinakkumulation in äquimolaren Mengen zum Methionin in *C. glutamicum* könnte die Kohlenstoffausbeute deutlich schmälern. Außerdem könnte eine Transhydrogenasereaktion die Ausbeute an Methionin positiv beeinflussen, da ja 9 mol NADPH bei Transsulfurierung und 8 mol NADPH bei *C. glutamicum* und 8,5 mol NADPH bei *E. coli* zur direkten Sulphydrierung pro mol Methionin gebraucht werden. Um den Einfluss der beiden Reaktionen auf die Methioninausbeute in beiden Organismen zu untersuchen, wurden sie in *E. coli* ausgeschaltet und in *C. glutamicum* eingeführt.

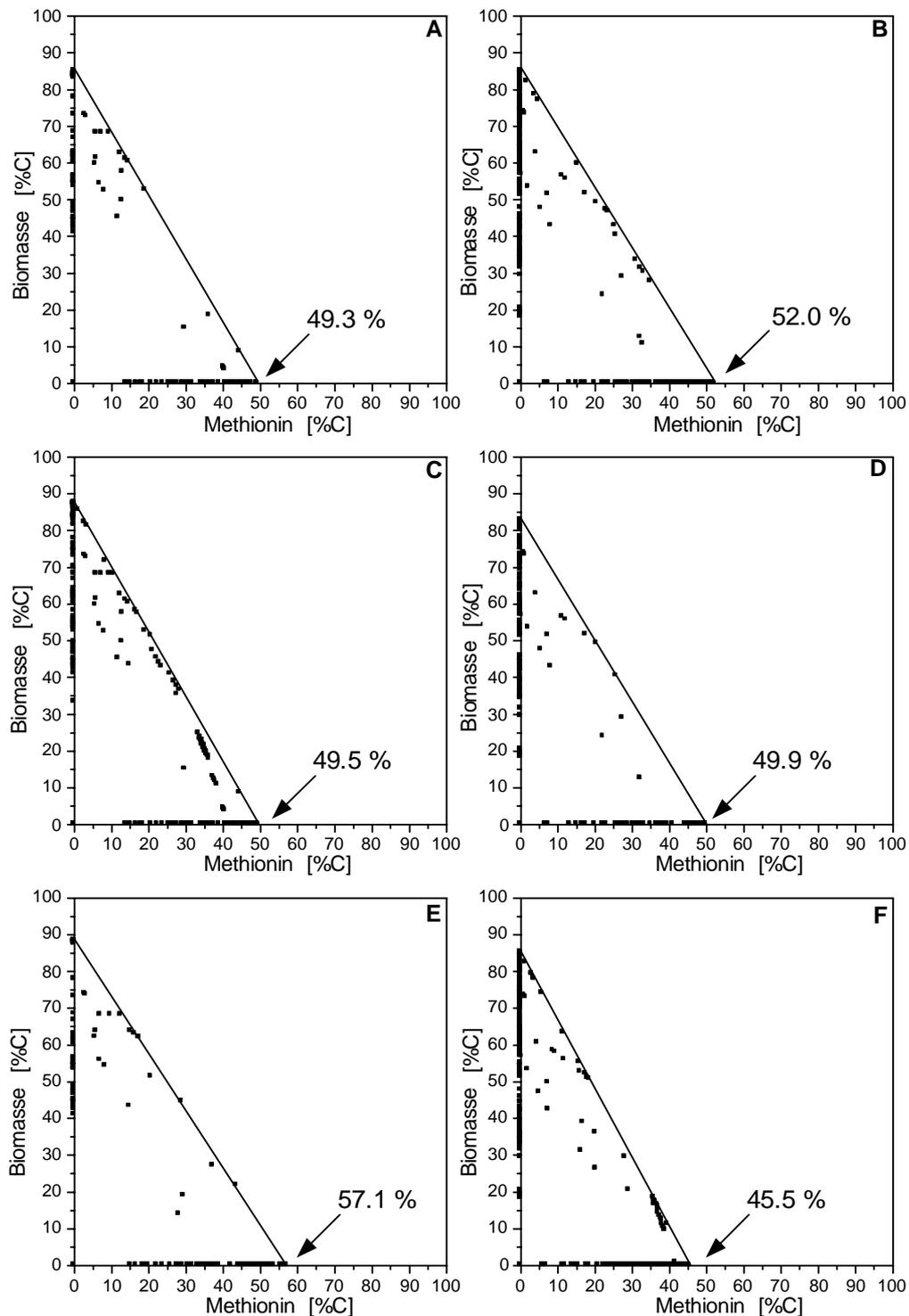


Abb. 7-1: Metabolische Netzwerkanalyse von *C. glutamicum* und *E. coli* zur Methioninproduktion: Kohlenstoffausbeute für Biomasse und Methionin für die Elementarmoden *C. glutamicum* Wildtyp (A), *E. coli* Wildtyp (B), *C. glutamicum* Mutante mit aktiver Transhydrogenase (C), *E. coli* Mutante ohne Transhydrogenase (D), *C. glutamicum* Mutante mit aktiver Glycinspaltung (E), *E. coli* Mutante ohne Glycinspaltung (F). Die Prozentzahl zeigt die jeweils maximale Kohlenstoffausbeute für die einzelnen Netzwerke. Die gerade Linie verbindet die Moden mit maximaler Biomasse- und maximaler Methioninausbeute.

Die Einführung der Transhydrogenasen in *C. glutamicum* erhöhte die Methioninausbeute auf 49,5 % (Abb. 7-1 C). Gleichzeitig erreichte die maximale Biomasseausbeute mit 87,4 % sogar noch höhere Werte als bei *E. coli*. Der Knockout der Transhydrogenasen in *E. coli* reduzierte die Ausbeuten für Methionin und Biomasse auf 49,9 % bzw. 82,8 % (Abb. 7-1 D). Dies zeigt, dass die hohen Ausbeuten von *E. coli* sehr stark von den Transhydrogenasereaktionen abhängen. Es ist für die Zelle also von großem Vorteil, wenn NADH in NADPH umwandelbar sind, da dem metabolischen Netzwerk dann zusätzliche Flexibilität gegeben wird.

Die Glycinspaltung spielt für die Methioninausbeute eine noch größere Rolle. Hierbei werden je Serin 2 (statt 1) Moleküle Tetrahydrofolat methyliert. Außerdem wird auch Ammonium wieder verfügbar, was sonst mit Glycin ausgeschieden würde. Die Einführung einer Glycinderboxylasereaktion in *C. glutamicum* resultierte in einem starken Anstieg der Methioninausbeute (um 7,8 Prozentpunkte), wohingegen der Knockout in *E. coli* zu einem Abfall um 6,5 Prozentpunkte führte (Abb. 7-1 E & F). Das schlechtere Abschneiden von *E. coli* ohne Glycinspaltung im Vergleich zum *C. glutamicum* Wildtyp ist vor allem auf die fehlende direkte Sulfhydrylierung in *E. coli* zurückzuführen. Während *C. glutamicum* pro Methionin nur ein Serin synthetisieren muss, muss *E. coli* gleich zwei Serinmoleküle zur Verfügung stellen. Dies erklärt auch, warum *C. glutamicum* mit Glycinspaltung eine höhere Ausbeute besitzt als der Wildtyp von *E. coli* (Abb. 7-1 E & B).

Die Analysen haben gezeigt, dass vor allem die Wiederverwertung von Glycin, oder alternative Quellen für die Methylgruppe in der Methioninsynthese ein großes Optimierungspotential in *C. glutamicum* bergen. Außerdem wurde auch deutlich, dass die Methioninsynthese in *E. coli* stärker von einer aktiven Transhydrogenase abhängt, als in *C. glutamicum*. Dies liegt vor allem an der direkten Sulfhydrylierung, bei der in *C. glutamicum* je mol Methionin nur 8 mol NADPH verbraucht werden, während die Methioninsynthese über Transsulfurierung bei *C. glutamicum* 9 mol NADPH je mol Methionin erfordert (Hwang *et al.*, 2002) und bei *E. coli* 8,5 mol NADPH. Eine interessante Frage, die sich daraus ergibt, ist die Flussverteilung in beiden Netzwerken unter maximaler Methioninproduktion.

7.1.2. Metabolische Flussverteilungen in *C. glutamicum* und *E. coli* während maximaler Methioninproduktion.

Die metabolischen Netzwerke unter maximaler Methioninproduktion werden im Folgenden für den Wildtyp von *C. glutamicum* und *E. coli* näher betrachtet. Die Flüsse sind, wie in der Flussanalyse üblich, auf die Kohlenstoffaufnahme normiert und daher in $\text{mol mol}^{-1} \times 100$ angegeben. Dies hat zur Folge, dass sie nicht direkt mit den maximalen Ausbeuten in C-mol $(\text{C-mol})^{-1} \times 100$ übereinstimmen. Prinzipiell verfügbare Reaktionen, die bei maximaler Methioninausbeute nicht aktiv waren (vgl. Abb. 6-9; Abb. 6-10), sind nicht dargestellt.

Die Flussverteilung beider Organismen unter maximaler Methioninsynthese unterscheidet sich signifikant (Abb. 7-2; Abb. 7-3). Für *C. glutamicum* wurde eine Ideallösung mit einer Methioninausbeute von 49,3 % C-mol $(\text{C-mol})^{-1} \times 100$ berechnet, während *E. coli* eine Methioninausbeute von 52,0 % C-mol $(\text{C-mol})^{-1} \times 100$ aufwies. In *C. glutamicum* ist die Bildung von Methionin mit einem sehr hohen PPP-Fluss verbunden (Abb. 7-2). Der oxidative Teil des PPP wird von 235 % des aufgenommenen Kohlenstoffs durchlaufen. Ein hoher theoretischer PPP-Fluss wurde bereits für *C. glutamicum* während der Lysinproduktion beobachtet (Stephanopoulos et al., 1998). Dieser war mit 150 % allerdings niedriger. Da die Hauptfunktion des PPP zur Lysinproduktion die Bereitstellung von NADPH ist, erklärt sich der noch höhere Fluss unter Methioninproduktion durch den verdoppelten NADPH-Bedarf im Vergleich zur Lysinproduktion. Der Fluss von 235 % wird durch die G6P-Isomerase ermöglicht, die in gluconeogenetischer Richtung arbeitet. Außerdem fällt auf, dass der TCA-Zyklus mit 3,4 % auf ein Minimum reduziert ist. Dies geht mit der Einführung eines Transaminierungszyklus aus α -Ketoglutarat, Glutamat, Oxalacetat und 3-Phosphonooxypyruvat einher. Dieser Zyklus wird mit einem Fluss von 118,3 % doppelt so stark durchlaufen wie die Methioninsynthese. Er fixiert Ammonium zur Aspartat- und Serinsynthese. Erstere Aminosäure dient als direkter Vorläufer von Methionin, während Serin als Methylgruppendonator fungiert.

Der Fluss von 96,6 % durch die Pyruvatcarboxylase führt zu einer Refixierung von 34 % des CO_2 aus den Decarboxylierungsreaktionen und stellt damit eine für die Kohlenstoffausbeute wichtige Reaktion dar.

7-1 D). Der KDPG-Weg spielte in den Moden mit maximaler Methioninausbeute keine Rolle.

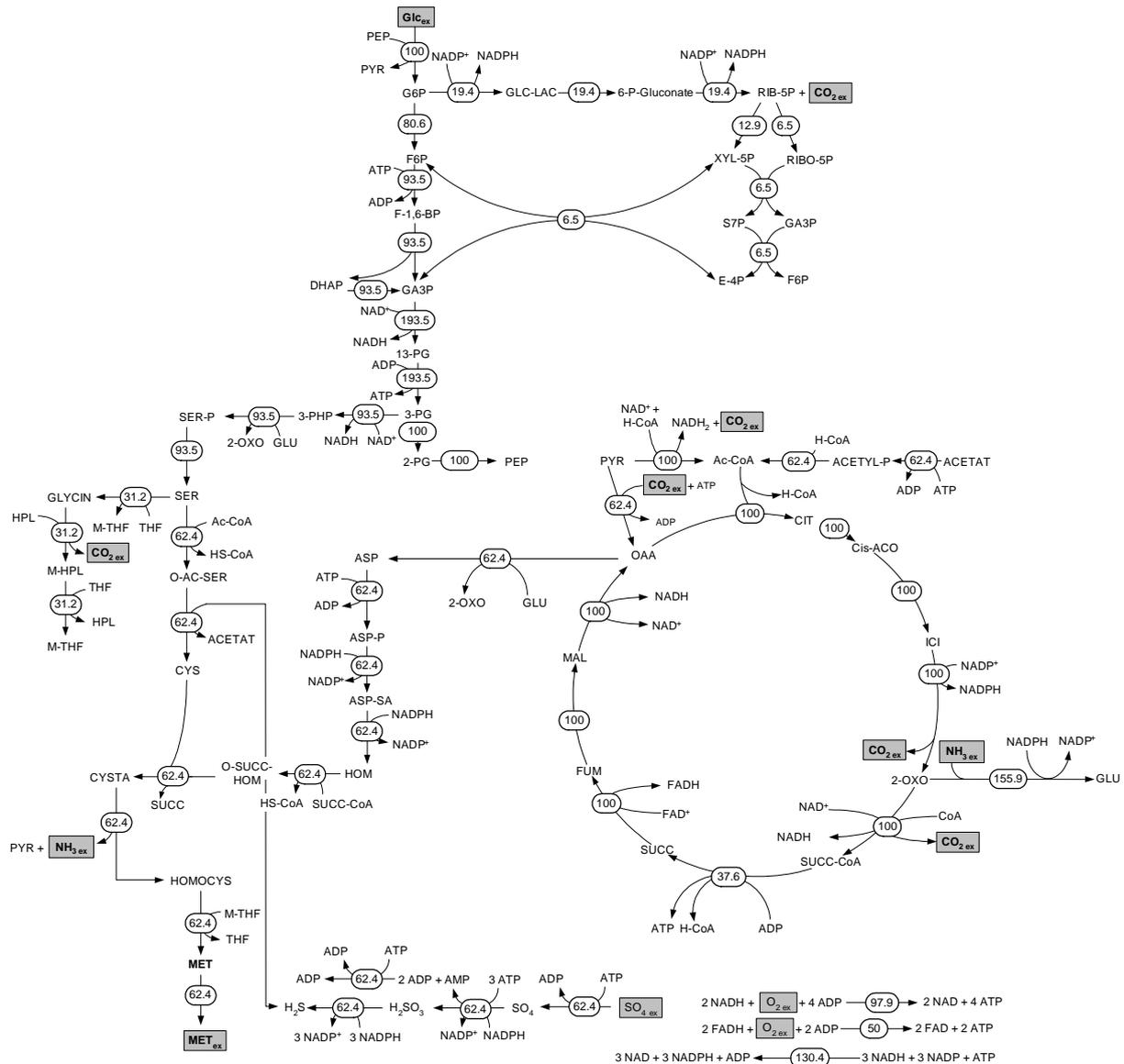


Abb. 7-3: Metabolische Flussverteilung von *E. coli* unter maximaler Methioninausbeute (54.9 % C-mol C-mol⁻¹). Die Flüsse sind als relative Flüsse bezogen auf die Kohlenstoffaufnahme dargestellt.

E. coli zeigte einen hohen Fluss von 100 % durch den TCA-Zyklus, da hier vor allem das NADH für die Transhydrogenierung generiert wurde. Außerdem ist in *E. coli* die Methioninsynthese durch die Homoserinaktivierung mittels Succinylierung direkt vom TCA-Zyklus abhängig. Dadurch wurde die Reaktion der Succinyl-CoA-Synthetase zu zwei Dritteln (Abb. 7-3) von der Homoserinaktivierungsreaktion (MetX) ersetzt. Der Transaminierungszyklus aus 2-Oxoglutarat und Glutamat wurde in *E. coli* mit 155,9 %

durchlaufen. Grund hierfür ist der größere Serinbedarf in *E. coli* zur Transsulfurierung und als C₁-Donor.

Betrachtet man beide Organismen hinsichtlich der Bereitstellung und des Verbrauchs von NADPH, zeigen sich deutliche Unterschiede (Tabelle 7-1). Während *C. glutamicum* NADPH praktisch ausschließlich über den PPP bereitstellt, übernehmen TCA-Zyklus und die membrangebundene Transhydrogenase in *E. coli* diese Aufgabe. Beim Verbrauch spiegeln sich in Sulfatassimilation und der Homoserinsynthese die Verhältnisse der Methioninausbeute wieder. Allerdings wird nun sehr deutlich, wie sich die direkte Sulfhydrierung und die Glycinspaltung positiv auf den NADPH-Bedarf auswirken. Während *C. glutamicum* gezwungen ist, fast doppelt so viel NADPH für die Generierung der C₁-Gruppe aufzuwenden wie *E. coli*, muss letzterer einen zum Methionin äquimolaren Fluss durch die Transsulfurierungsreaktionen bereitstellen, was einen zusätzlichen NADPH-Verbrauchsfluss von 62,4 % bedeutet. Insgesamt kann man durch den stöchiometrischen Vergleich der beiden Organismen nun auch ihren Gesamtbedarf an NADPH zur Methioninsynthese quantifizieren. In *C. glutamicum* beträgt dieser 8 mol NADPH je mol Methionin und in *E. coli* 8,5 mol NADPH je mol Methionin (Tabelle 7-1).

Interessanterweise spielt bei beiden Organismen die Pyruvatkinase keine Rolle. Pyruvat wird in *C. glutamicum* ausschließlich durch das PTS und in *E. coli* durch PTS und die Methioninsynthese selbst bereitgestellt. Die ATP-Produktion durch dieses Enzym ist zur Methioninsynthese offensichtlich verzichtbar. Dies stellt ein interessantes Ziel für die Stammoptimierung dar, da dadurch einerseits der Fluss in den Pyruvatpool und damit auch in Overflow-Metabolite limitiert werden könnte und andererseits die Bereitstellung von Pyruvat an die Aufnahme des Substrates gekoppelt würde. Frühere Arbeiten über die Lysinproduktion mit *C. glutamicum* haben gezeigt, dass die Substrataufnahme ein limitierender Faktor in der Produktion sein könnte (Krömer *et al.*, 2004).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Flussverteilungen in beiden Organismen sehr unterschiedlich sind. Dies ist ein eindruckvolles Beispiel für die Flexibilität biologischer Systeme. *C. glutamicum* und *E. coli* lösen das Problem der Methioninsynthese auf sehr unterschiedliche Art und Weise und erreichen dennoch vergleichbare Produktausbeuten.

Tabelle 7-1: Bereitstellung und Verbrauch von NADPH bei *C. glutamicum* Wildtyp mit einem Methioninfluss von 59,1 % und *E. coli* Wildtyp mit 62,4 % während maximaler Methioninproduktion. Die Werte sind mol_{glc}⁻¹ * 100 angegeben.

Bereitstellung von NADPH	<i>C. glutamicum</i>	<i>E. coli</i>
PPP	469,8	38,8
Isocitrat-Dehydrogenase	3,4	100,0
Membrangebundene Transhydrogenase	0	391,4
Σ	473,2	530,2
Verbrauch von NADPH	<i>C. glutamicum</i>	<i>E. coli</i>
Sulfatassimilation	236,4	249,6
Serin für den C ₁ -Metabolismus	59,1	31,2
Serin für Transsulfurierung	0	62,4
Homoserin für Methionin	177,3	187,2
Σ	472,8	530,4
Gesamtbedarf an NADPH für Methionin [mol mol ⁻¹]	8	8,5

7.1.3. Einfluss alternativer Schwefel- und C₁-Quellen auf die Methioninproduktion

Wie oben gezeigt, kann man mittels Elementarmodenanalyse potentiell interessante Targets für eine genetische Stamptoptimierung identifizieren. Allerdings werden für die Produktausbeute nicht nur die genetische und regulatorische Konstitution des Organismus, sondern auch die Kultivierungsbedingungen entscheidend sein. Vor allem die Verwertung von stärker reduzierten Schwefelquellen und alternativer C₁-Donoren könnte die Produktausbeuten signifikant steigern. Solche alternative Substrate wurden im Folgenden für eine Methioninsynthese mit *C. glutamicum* näher untersucht. Auf Seiten der Schwefelquellen

wurden zusätzlich zu Sulfat, Thiosulfat und Sulfid eingesetzt, während als alternative C₁-Quelle Ameisensäure diente. Außerdem wurde die Methioninausbeute mit Methanthiol, das die Vorteile einer bereits reduzierten Schwefelquelle mit einer alternativen C₁-Quelle in einem Molekül verbindet, untersucht. Zur Verwertung von Thiosulfat wurde eine Thiosulfatreduktase, die Thiosulfat in Sulfid und Sulfit spaltet (Schmidt et al., 1984) in das Modell integriert.

Vergleicht man die maximal mögliche Ausbeute für Methionin von Sulfat (Abb. 7-1 A) mit der von Thiosulfat (Abb. 7-4 A) und Sulfid (Abb. 7-4 C), zeigt sich deutlich, wie sich die Ersparnis an Reduktionskraft positiv auf die Ausbeute auswirkt. Der Methioninyield steigt von 49,3 % für Sulfat, über 60,8 % für Thiosulfat bis hin zu 67,8 % für Sulfid. Die Methioninausbeute ($Y_{\text{Met/S,max}}$) stieg also je eingespartes NADPH um 4,6 Prozentpunkte. Im Vergleich dazu führt das Einbringen einer Transhydrogenase in das Modell von *C. glutamicum* lediglich zu einer Steigerung der Methioninsynthese um 0,3 %. Die Verwendung von Thiosulfat führte zu einer Steigerung von $Y_{\text{Met/S,max}}$ um 11,5 Prozentpunkte, während die Verwendung von Sulfid die Ausbeute um weitere 7 Prozentpunkte steigerte. Da Sulfid allerdings ein giftiges Gas ist, könnte für die Prozessentwicklung Thiosulfat die interessantere Schwefelquelle sein. Es wird deutlich, dass die Oxidationsstufe der gewählten Schwefelquelle einen zentralen Punkt der Prozessoptimierung darstellt.

Die Überproduktion von Methionin mit *C. glutamicum* ist mit der Akkumulation von äquimolaren Mengen an Glycin verbunden. Um dieses Problem zu umgehen, kann entweder eine Glycinecarboxylase eingeführt werden (s. o.) oder ein alternatives Substrat zur Glucose gefüttert werden, was den Zellen als Methylgruppendonoren dienen kann. Die Glycinspaltung hat den Nachteil, dass Glycin in Ammonium, CO₂ und eine Methylgruppe gespalten wird. Ausgehend vom Serin werden also nur $\frac{2}{3}$ des Kohlenstoffes auf THF übertragen. Die Verwertung einer alternativen C₁-Quelle könnte dagegen ohne Kohlenstoffverlust ablaufen. Im Folgenden wurde untersucht, wie sich die zusätzliche Fütterung mit Ameisensäure (Formiat) auf die Kohlenstoffausbeute auswirken würde. Zur Verwertung von Formiat durch *C. glutamicum* mussten die metabolischen Netzwerke durch eine Formiat-Tetrahydrofolat-Ligase (E.C. 6.3.4.3), beispielsweise aus diversen Bazilli (vgl. Kap. 5.4) und die entsprechenden Umwandlungsschritte von 10-Formyl-THF zu Methylen-THF erweitert werden. Die Umsetzung von 10-Formyl-THF wurde in einer Gleichung zusammengefasst. Diese Umsetzung erforderte die Oxidation von 1 NADPH und 1 NADH. Bei Wachstum auf

Glucose führte die gleichzeitige Verwertung von Glucose und Formiat zu einem Zuwachs von $Y_{\text{Met/S,max}}$ um 2 Prozentpunkte (Abb. 7-4 E). In Kombination mit der Verwertung von alternativen Schwefelquellen stieg $Y_{\text{Met/S,max}}$ allerdings sehr deutlich an. So konnte für die Methioninproduktion auf Glucose, Thiosulfat und Formiat eine theoretische Kohlenstoffausbeute von 66,3 % errechnet werden (Abb. 7-4 B). Diese Ausbeute ist beinahe gleich hoch wie bei Wachstum auf Sulfid und Glucose (Abb. 7-4 C). Es hätte aber für die Prozessführung den Vorteil, dass auf giftiges H_2S verzichtet werden könnte. Kombiniert man Sulfid mit Glucose und Formiat kann bereits eine sehr hohe Ausbeute von 74,8 % (Abb. 7-4 D) erreicht werden, eine Steigerung um weitere 7 Prozentpunkte verglichen mit der Produktion auf Glucose und Sulfid. Dies zeigt, dass die Kombination unterschiedlicher Substrate synergistische Effekte haben kann. Während die Zugabe von Formiat zu Glucose und Sulfat nur eine Steigerung von 2 Prozentpunkten bewirkt, wird die Ausbeute bei Zugabe zu Glucose und Thiosulfat 5,5 Prozentpunkte gesteigert. Über die Verwertung von Thiosulfat in *C. glutamicum* gibt es noch keine näheren Untersuchungen. Vor allem die Verwertung der beiden Schwefelatome des Thiosulfats ist bislang noch nicht untersucht. Die Spaltung in Sulfid und Sulfit ist allerdings für die Zelle die energetisch günstigste Variante, die auch im Rahmen einer Stammoptimierung angestrebt werden sollte. Sollte sich herausstellen, dass es in *C. glutamicum* ein solches Enzym nicht gibt, wäre die Einführung einer Thiosulfatreduktase eine wichtige Aufgabe für die genetische Optimierung von *C. glutamicum* zur Methioninproduktion auf Thiosulfat. Insgesamt wird im Vergleich zu Sulfat der NADPH-Bedarf zur Methioninsynthese auf Thiosulfat um rund 30 % gesenkt. Die Verwertung von Sulfid als Schwefelquelle würde den NADPH-Bedarf zur Methioninsynthese sogar um 50 % senken. Mit 4 NADPH hätte Methionin im Sinne der notwendigen Reduktionsäquivalente den gleichen Preis für die Zelle wie Lysin, das ja bereits sehr erfolgreich mit *C. glutamicum* hergestellt wird (Leuchtenberger *et al.*, 2005).

Die Verwertung von Methanthiol (CH_3SH) zur Produktion von Methionin weist mit 90,9 % die höchste hier berechnete Methioninkohlenstoffausbeute für alternative C_1 - und Schwefelquellen auf (Abb. 7-4 E). Durch zusätzliche Einführung einer Transhydrogenase ließ sich die Ausbeute noch auf 92,9 % steigern. Zur Modellbildung wurde angenommen, dass Methanthiol frei über die Cytoplasmamembran diffundieren kann und zur direkten Sulphydrierung von O-Acetylhomoserin durch MetZ oder MetB eingesetzt werden kann. Es entstünde dann kein Homocystein mehr, sondern direkt Methionin. In der Biomassereaktion

wurde Sulfat einfach durch CH_3SH ersetzt. Im Fall von Cystein (Bedarf von $87 \mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$) wurde die Methylgruppe vernachlässigt, da nicht genau bekannt war, wie das beim Einbau von CH_3SH in O-Acetylserin entstehende Methylcystein verstoffwechselt würde.

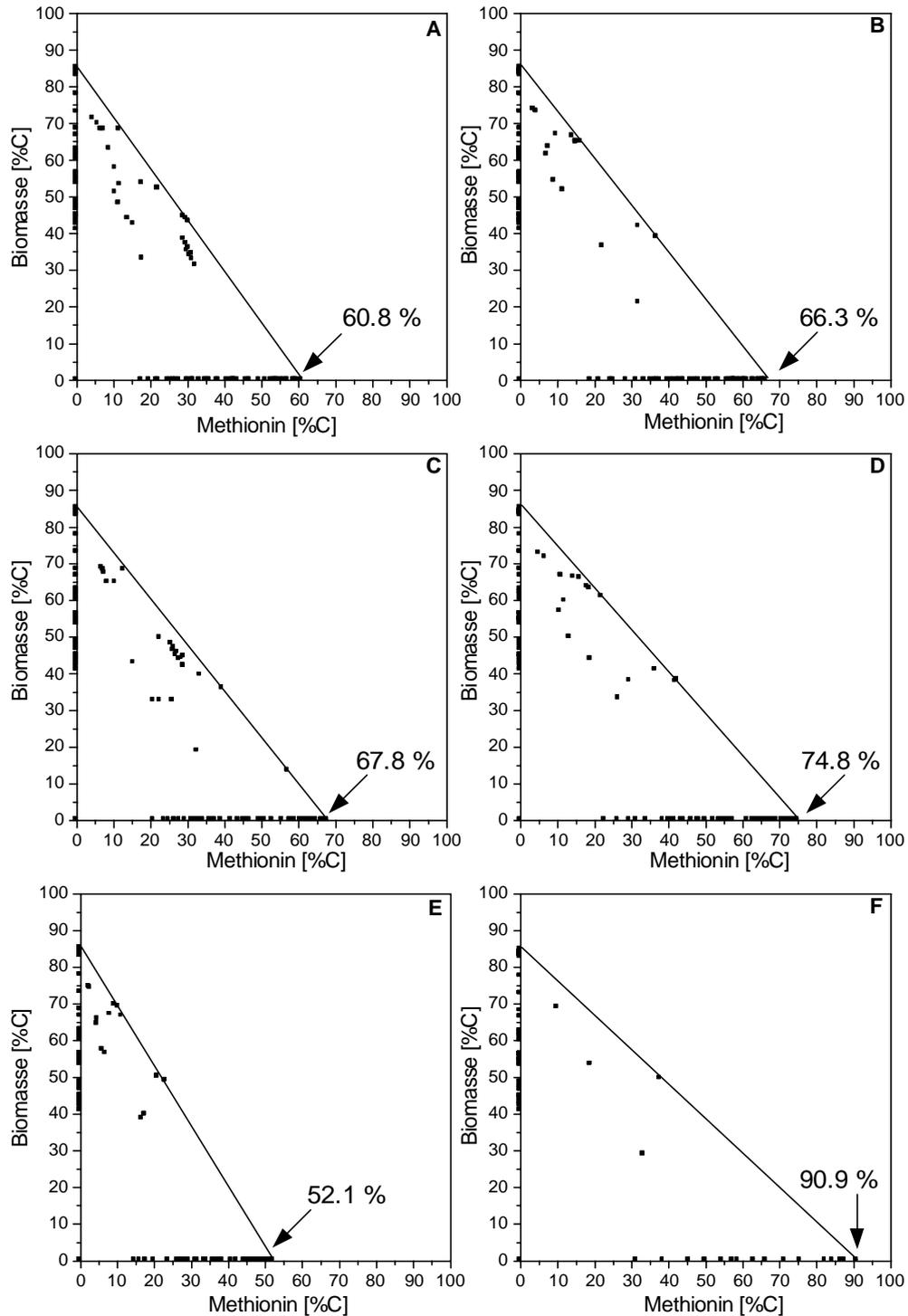


Abb. 7-4: Metabolische Netzwerkanalyse von *C. glutamicum* zur Methioninproduktion mit unterschiedlichen Schwefel- und C_1 Quellen.: Kohlenstoffausbeute für Biomasse und Methionin für die Elementarmoden von *C. glutamicum* bei Wachstum auf Glucose & Thiosulfat (A), Glucose & Thiosulfat &

Formiat (B), Glucose & Sulfid (C), Glucose & Sulfid & Formiat (D), Glucose & Sulfat & Formiat (E), Glucose & Methanthiol (F). Die Prozentzahl zeigt die jeweils maximale Kohlenstoffausbeute für die einzelnen Netzwerke. Die gerade Linie verbindet die Moden mit maximaler Biomasse- und maximaler Methioninausbeute.

Die Bedeutung von C₁- und Schwefelquelle für die Produktion von Methionin mit *C. glutamicum* ist sehr deutlich geworden. Könnte man die Einsparpotentiale an Reduktionskraft, Energie und Kohlenstoff in einem Substrat vereinigen, wäre dies sicher optimal für die Produktivität. Ein solches Substrat stellt CH₃SH dar. Dieser Stoff besteht nicht nur aus reduziertem Schwefel, sondern bringt auch die Methylgruppe zur Methioninsynthese mit. Die Kultivierung auf Methanthiol stellt demnach eine sehr interessante Perspektive für eine Methioninproduktion mit *C. glutamicum* dar. Zwar ist Methanthiol ein giftiges Gas, wird aber von *C. glutamicum* selbst gebildet (Bonnarme *et al.*, 2000), was vermuten lässt, dass auch seine Verwertung in *C. glutamicum* möglich ist. Diese könnte ähnlich wie bei *Roseobacter spec.* (Kiene *et al.*, 1999) über eine Cystathionin- γ -Synthase erfolgen.

7.1.4. Einfluss des Erhaltungsstoffwechsels auf die theoretische Ausbeute

Es ist allgemein bekannt, dass Bakterien zur Erhaltung der Zellfunktionen auch ohne Wachstum Energie verbrauchen. Dieser ATP-Verbrauch wird auch als Erhaltungsstoffwechsel, oder *maintenance* bezeichnet. In *C. glutamicum* wurde beobachtet, dass in Abhängigkeit vom osmotischen Druck der Energiebedarf für den Erhaltungsstoffwechsel von $m_e = 1,8 \text{ mmol ATP g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ auf $m_e = 9,2 \text{ mmol ATP g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ansteigt (Varela *et al.*, 2004). Im Sinne der Kohlenstoffausbeuten für Methionin wäre es am günstigsten, wenn man ruhende Zellen als Katalysator verwenden könnte, also kein Substrat zur Biomassebildung verbraucht würde. Doch selbst beim Erreichen eines solchen Zustandes würde immer auch Kohlenstoff zur Energieproduktion für den Erhaltungsstoffwechsel gebraucht. Im Folgenden wurde daher betrachtet, wie sich der Bedarf an Energie für *maintenance* auf die theoretische Methioninausbeute auswirken wird. Die Betrachtung wurde beispielhaft für *C. glutamicum* bei Methioninproduktion mit Glucose und Sulfid durchgeführt. Da der Energiebedarf zur Zellerhaltung eine zeitabhängige Rate ist und die Zeit nicht in die stöchiometrische Betrachtung der Elementarmodenanalyse einfließt, wurden folgende Annahmen getroffen: Methionin wird mit einer Rate $q_{\text{met}} = 0,65 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ gebildet, wie sie

auch für Lysin beobachtet wurde (Krömer *et al.*, 2004). Bei einer P/O-Ratio von 2 für NADH und 1 für FADH werden je mol Glucose maximal 26 mol ATP gebildet, daher beträgt die Erhaltungsenergie in Abhängigkeit von der Glucose $m_{\text{glc}} = 1,8 * 26^{-1}$ bzw. $9,2 * 26^{-1}$ mmol Glucose $g_{\text{BTM}}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Ferner wurden Wachstumsraten für *C. glutamicum* zwischen $\mu = 0,1 \text{ h}^{-1}$ und $0,4 \text{ h}^{-1}$ angenommen, wie sie in dieser Arbeit üblicherweise beobachtet wurden. Die maximalen Ausbeuten wurden der Elementarmodenanalyse mit Sulfid als Schwefelquelle entnommen (vgl. Abb. 7-4 C). $Y_{\text{X/S}}$ betrug $7,923 \text{ mmol}_{\text{glc}} g_{\text{BTM}}^{-1}$. $Y_{\text{S/met}}$ betrug $1,229 \text{ mmol}_{\text{glc}} \text{ mmol}_{\text{met}}^{-1}$. Mit diesen Informationen lässt sich gemäß Gleichung 7-1 die spezifische Glucoseaufnahmerate berechnen.

$$q_{\text{glc}} = \mu * Y_{\text{S/X}} + q_{\text{met}} * Y_{\text{S/met}} + m_{\text{glc}} \quad [\text{mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}] \quad \text{Gl. 7-1}$$

Anhand des relativen Anteils der drei Terme Biomassebildung, Methioninsynthese und Erhaltungsstoffwechsel an der Gesamtglucoseaufnahmerate lassen sich die berechneten theoretischen Ausbeuten aus der Elementarmodenanalyse korrigieren.

Die Untersuchung zeigt, dass die Biomasse- und Methioninausbeute durch den Erhaltungsstoffwechsel geschmälert wird (Abb. 7-5). Besonders bei hohem Energiebedarf und langsamem Wachstum sinkt die Biomasseausbeute von 85,1 % auf 58,9 % signifikant ab. Die Ausbeute an Methionin sinkt bei niedrigem Bedarf an Erhaltungsenergie von 67,8 % auf 62,4 %. Dies entspricht einem moderaten Abfall um 8 %. Bei hohem Energiebedarf sinkt die Ausbeute allerdings bis auf 47 %, was einem Abfall um 31 % entspricht. Es wird also deutlich, dass der Einfluss des Erhaltungsstoffwechsels mit steigendem Energiebedarf ansteigt. Aus Gleichung 7-1 folgt allerdings auch, dass insbesondere höhere Produktbildungsrate die Bedeutung des Erhaltungsstoffwechsels für die Kohlenstoffausbeute des Produktes minimieren.

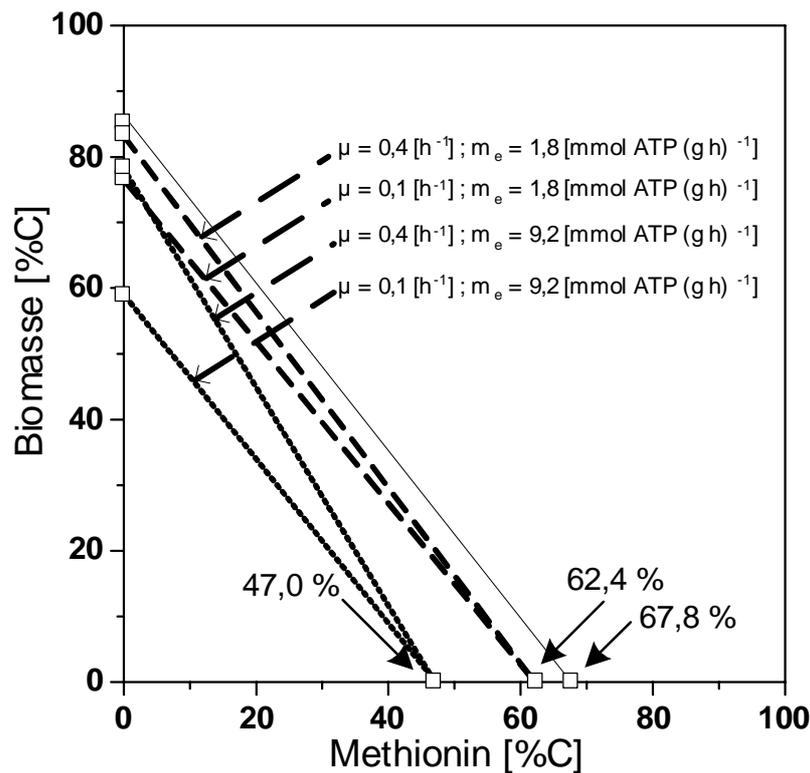


Abb. 7-5: Theoretischer Einfluss des Energiebedarfs zum Erhaltungsstoffwechsel auf die Ausbeuten von Methionin und Biomasse von *C. glutamicum* bei Wachstum und Produktbildung auf Glucose und Sulfid. Angenommen sind jeweils eine maximale und minimale Wachstumsrate und ein maximaler und minimaler Energiebedarf zum Erhaltungsstoffwechsel sowie eine konstante Methioninbildungsrate von $q_{met} = 0,65 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

7.1.5. Optimierungsansätze aus der Elementarmodenanalyse

Die Ergebnisse der Elementarmodenanalyse waren Motivation für *in vivo* Studien. Da bislang kein Stamm vorliegt, der signifikante Mengen an Methionin produziert, wurde insbesondere der Effekt des Pyruvatkinaseknockouts in einem Lysinproduzenten von *C. glutamicum* untersucht. Außerdem zeigten die hohen theoretischen Ausbeuten auf den unterschiedlichen Schwefelquellen, dass hier großes Optimierungspotential vorhanden ist. Daher wurde die Verwertung unterschiedlicher Schwefelquellen durch *C. glutamicum* (vgl. Kap. 7.3.8) näher charakterisiert.

Pyruvatkinaseknockout zur Produktivitätssteigerung

Die Elementarmodenanalyse hat gezeigt, dass für die maximale Ausbeute von Methionin keine Pyruvatkinase benötigt wird. Diese Mutation könnte von Vorteil sein, da dann die Bereitstellung von Pyruvat mit der Aufnahme des Substrates gekoppelt wird. Es wurde *in vivo* überprüft, ob eine solche Mutation die Produktivität von Aminosäuren der Aspartatfamilie steigern kann. Da bislang keine Produktionsmutante für Methionin vorlag, wurde diese Untersuchung mit einer definierten Lysinproduktionsmutante durchgeführt. Es wurde ein Stammvergleich zwischen *C. glutamicum lysC^{fbr}* und *C. glutamicum lysC^{fbr} Δpyk* durchgeführt. *C. glutamicum lysC^{fbr}* ist eine Mutante von *C. glutamicum*, die im Gen der Aspartokinase eine Punktmutation aufweist (Kalinowski *et al.*, 1991). Diese Punktmutation führt zu einer Feedbackresistenz des Enzyms, wodurch Threonin und Lysin dieses nicht mehr inhibieren können. Konsequenz ist die Überproduktion von Lysin (vgl. Abb. 5-5). In diesem Stamm wurde dann zusätzlich die Pyruvatkinase deletiert (*C. glutamicum lysC^{fbr} Δpyk*).

Beide Stämme wurden im Schüttelkolben auf Minimalmedium kultiviert und die Kohlenstoffausbeuten für Biomasse, Lysin und die Nebenprodukte bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte aus 2 unabhängigen Experimenten. Die Untersuchung zeigte, dass die Lysinausbeute durch den Knockout der Pyruvatkinase von 7,5 % auf 12,1 % deutlich anstieg. Dies entspricht einer Steigerung um rund 62 % (Abb. 7-6). Gleichzeitig sank die Ausbeute an Biomasse von 0,44 g g⁻¹ auf 0,35 g g⁻¹ deutlich ab. Es fällt allerdings auch auf, dass die Akkumulation der Nebenprodukte Glycerin und Dihydroxyaceton (DHA) sehr stark zunahm. Ihr Anteil am verbrauchten Kohlenstoff stieg von zusammen 1,1 % auf 8,4 % und übertraf damit sogar die Lysinkohlenstoffausbeute von *C. glutamicum lysC^{fbr}*.

Die Akkumulation dieser Nebenprodukte deutet auf einen metabolischen Flaschenhals in der unteren Glykolyse hin. Es bildet sich wahrscheinlich ein Metabolitrückstau bis zum Dihydroxyacetonphosphat, dem Vorläufer von Glycerin und DHA. Der Flaschenhals ist höchstwahrscheinlich die fehlende Pyruvatkinase, bzw. das Phosphotransferasesystem, das nicht genügend PEP zu Pyruvat umsetzen kann. Es könnte sich aber auch um eine limitierende Aktivität der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase handeln. So wurde früher beobachtet, dass dieses Enzym negativ vom Verhältnis von NADH zu NAD⁺ reguliert wird (Dominguez *et al.*, 1998). Es wäre denkbar, dass in *C. glutamicum lysC^{fbr} Δpyk* durch das verminderte Wachstum und die geringere Biomasseausbeute ein Überschuss an NADH besteht, was zur Hemmung der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase führen könnte.

In einem weiteren Optimierungsschritt könnte die alkaline Phosphatase ausgeschaltet werden. Dieses Enzym bildet DHA.

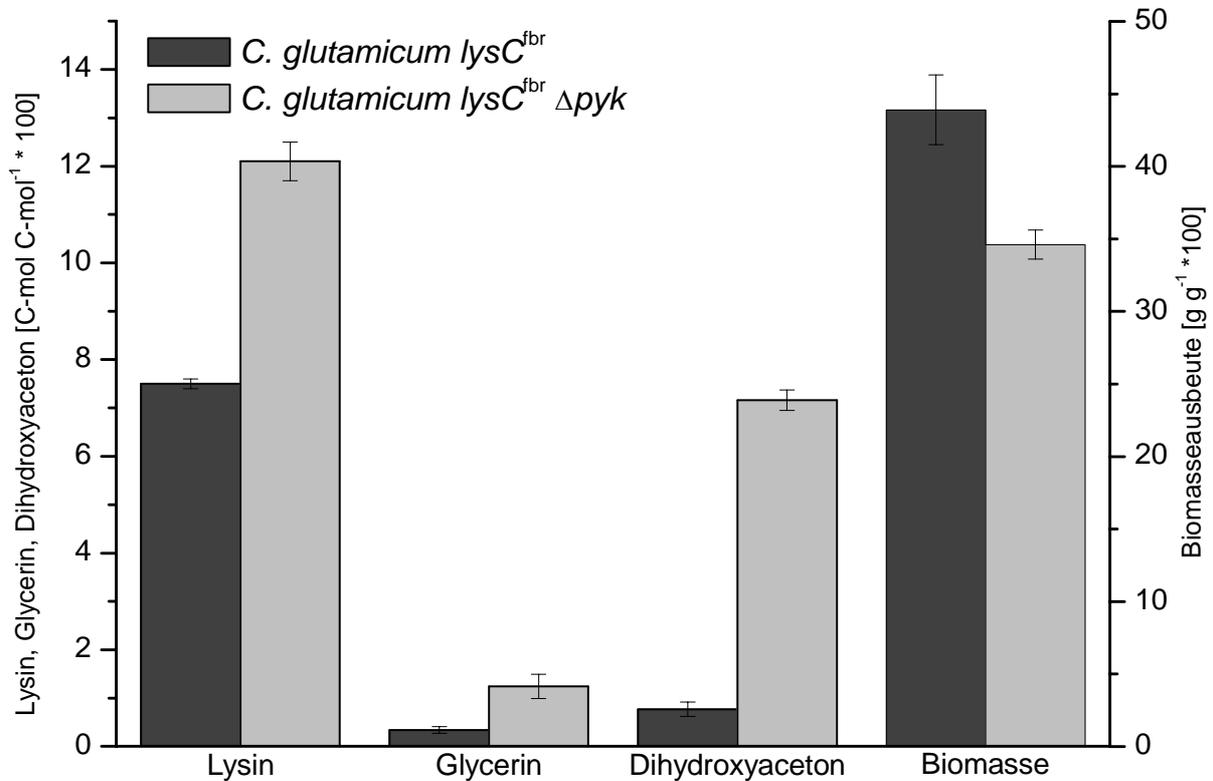


Abb. 7-6: Kohlenstoffausbeuten für Lysin, Glycerin und Dihydroxyacetone und die Biomasseausbeute für *C. glutamicum lysC^{fbr}* und *C. glutamicum lysC^{fbr} Δpyk* bei Kultivierung im Schüttelkolben auf CG12½-Medium mit Glucose.

Park *et al.* (1997) führten den Pyruvatkinaseknockout bereits in einem Lysinproduzenten durch. Auch dort wurden signifikante Mengen an Glycerin und Dihydroxyacetone akkumuliert. Allerdings wurde ein Absinken der Lysinausbeute auf Glucose um etwa 30 % beobachtet (Park *et al.*, 1997). Der in damaliger Arbeit verwendete Stamm *C. glutamicum* ATCC 21253 war ein klassisch optimierter Produzent mit Homoserin- und Leucinauxotrophie. Es ist möglich, dass weitere negative Mutationen vorhanden waren, die eine Steigerung der Lysinausbeute bei Pyruvatkinaseknockout verhinderten. Dies zeigt, dass im Rahmen der Stammoptimierung ein definierter Hintergrund zur Überprüfung der Effekte von Mutationen wichtig ist. Die Zufallsmutante *C. glutamicum* ATCC 21253 war nicht geeignet, um die Auswirkungen des Pyruvatkinaseknockouts auf die Lysinproduktion zu bewerten. Park *et al.*

beobachteten ferner einen reduzierten Fluss durch TCA-Zyklus und Glykolyse und einen erhöhten Fluss durch den PPP der genutzt wurde, um den Rückstau im Zentralstoffwechsel durch Decarboxylierungen etwas zu reduzieren (Park *et al.*, 1997). Es wurde vermutet, dass die Überproduktion an Reduktionskraft in *C. glutamicum* ATCC 21253 Δpyk durch eine aktive Transhydrogenase ausgeglichen wurde. Bei *C. glutamicum lysC^{fbr} Δpyk* hat es jedoch den Anschein, dass der Rückstau in der Glycolyse zwar zu einem erhöhten PPP-Fluss führt, der Überschuss an NADPH scheint aber vor allem die Lysinsynthese anzutreiben. Die Korrelation von zunehmendem PPP-Flux und steigender Lysinsynthese wurde schon früher beobachtet (Wittmann und Heinzle, 2002). Berechnet man den Fluss in den PPP nach Kultivierung von *C. glutamicum lysC^{fbr}* und *C. glutamicum lysC^{fbr} Δpyk* auf [¹³C]-Glucose aus der Markierungsverteilung von Alanin (Wittmann, 2002) ergibt sich ein PPP-Flux von 39,7 bzw. 43,3 %. *C. glutamicum lysC^{fbr} Δpyk* weist also tatsächlich einen leicht erhöhten PPP-Flux auf.

Dieses Beispiel hat deutlich gezeigt, wie die Elementarmodenanalyse genutzt werden kann, um Ziele im Zentralstoffwechsel zur Stammoptimierung zu identifizieren, die nicht auf der Hand liegen. Im Hinblick auf die Lysinsynthese war der Knockout der Pyruvatkinase alles andere als offensichtlich, denn schließlich bedarf die Lysinsynthese selbst eines Pyruvats. Man würde erwarten, dass der Knockout der Pyruvatkinase in erster Linie zu einem Mangel an Pyruvat und einem Absinken der Lysinausbeute führt. Das Gegenteil war der Fall. Die Steigerung der Lysinausbeute um 62 % hat gezeigt, dass durch den Knockout der Pyruvatkinase mehr Kohlenstoff in die Lysinsynthese geschleust wird.

7.1.6. Zusammenfassung

Elementarmodenanalyse konnte erfolgreich angewandt werden, um die Effekte der Substratwahl und genetischer Modifikationen auf die maximale Kohlenstoffausbeute zu untersuchen. Es ergaben sich interessante Ziele für die Stamm- und Prozessoptimierung, wie beispielsweise die Kultivierung mit alternativen Schwefelquellen, die genetische Einführung eines Glycinspaltungssystems, einer Transhydrogenase oder die Formiatverwertung. Außerdem konnten im Zentralstoffwechsel Optimierungsansätze, wie beispielsweise der Knockout der Pyruvatkinase, identifiziert werden. Die *in vivo* Untersuchungen an einem Lysinproduzenten zeigten, dass diese Mutation tatsächlich zu einer Steigerung der

Kohlenstoffausbeute des Lysins führt. Die Mutation lenkt also mehr Kohlenstoff in die Synthese von Aminosäuren der Aspartatfamilie, zu der auch Methionin gehört. Die stöchiometrische Netzwerkanalyse ermöglichte es außerdem, den Bedarf an Reduktionsäquivalenten mit der Kohlenstoffausbeute zu korrelieren. So wird beispielsweise der Methioninyield je eingespartes NADPH um 4,6 % erhöht, wenn man unterschiedliche Schwefelquellen betrachtet. Außerdem konnte der Einfluss des Erhaltungsstoffwechsels auf die Produktausbeute unter bestimmten Annahmen quantifiziert werden. Hier zeigte sich, dass die Produktbildungsrate und die Produktivität positiv korrelieren.

7.2. Identifikation und Biosynthese von Homolanthionin in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$

Im Rahmen der Metabolomuntersuchungen wurde beim Vergleich der Aminosäurechromatogramme von Zellextrakten ein unbekannter Metabolit entdeckt, der nur in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ vorhanden war (Abb. 7-7). Dieses neue Signal wies eine Retentionszeit auf, die zwischen Phenylalanin und Isoleucin lag (Synergi-Analytik, vgl. Kap. 6.6.7). Bei Messung ohne OPA-Derivatisierung war das Signal nicht vorhanden, wodurch eine selbstfluoreszierende Substanz ausgeschlossen werden konnte. Außerdem war dies ein starkes Indiz für mindestens eine primäre Aminogruppe in der Substanz.

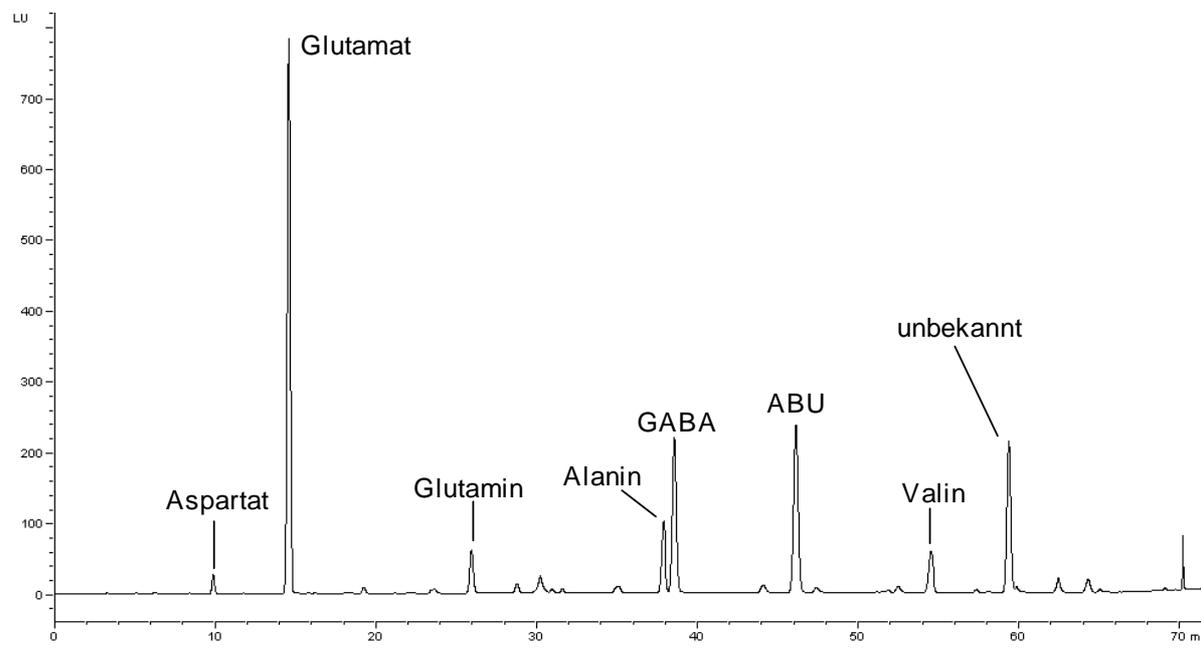


Abb. 7-7: Aminosäurechromatogramm eines Zellextraktes von *C. glutamicum* $\Delta mcbR$. γ -Aminobuttersäure (GABA) und α -Aminobuttersäure (ABU) wurden als interne Standards zugegeben.

Aufgrund der veränderten Proteinexpression und Transkription in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ (Rey *et al.*, 2005; Rey *et al.*, 2003) konnte vermutet werden, dass dieser Metabolit in irgendeiner Weise mit der Methioninsynthese zusammenhängt. Die Identifikation der neuen Substanz war deshalb von zentraler Bedeutung für die Charakterisierung von *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ und die Entwicklung eines Methioninproduzenten.

7.2.1. Bestimmung des CNS-Gehaltes des Metaboliten mittels GC/MS

In GC/MS-Messungen wiesen die Spektren von *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ ebenfalls einen zusätzlichen Peak auf. Zur Aufklärung der Struktur des neuen Metaboliten wurden Markierungsexperimente mit stabilen Isotopen durchgeführt und die Massenverschiebung im zugehörigen [M-57] Signal ($m/z = 635$) mit GC/MS analysiert. Hierzu wurde *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ im Schüttelkolben auf unterschiedlichen markierten Substanzen kultiviert (Tabelle 7-2). Die Markierungsverschiebung $m/z = 635$ -Signal des neuen Metaboliten wurden in Zellextrakten und Biomassehydrolysaten bestimmt.

Tabelle 7-2: GC/MS-Massenverschiebung im vermuteten M-57-Signal des neuen Metaboliten nach Kultivierung von *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ auf CG12½-Minimalmedium mit unterschiedlichen isotoopenmarkierten Substanzen.

<i>Substanz</i>	<i>Massenverschiebung im M-57 Signal ($m/z = 635$)</i>
[U- ¹³ C]-Glucose	+ 8
[³⁴ S]-Sulfat	+ 2
[¹⁵ N]-(NH ₄) ₂ SO ₄	+ 2

Die Markierungsstudien ergaben, dass der neue Metabolit 8 Kohlenstoffatome, 1 Schwefelatom und 2 Stickstoffe enthält. Einer der Stickstoffe musste mindestens als primäres Amin vorliegen, da sonst keine HPLC-Messung mit der verwendeten Methode möglich wäre. Durch die Messung der Biomassehydrolysate wurde zusätzlich die Säurestabilität der Substanz festgestellt.

7.2.2. Bestimmung der Herkunft des neuen Metaboliten

Zur Untersuchung der Herkunft des schwefelhaltigen Metaboliten wurde eine spezielle Mutante von *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ konstruiert. *C. glutamicum* $\Delta mcbR \Delta hom \Delta hsk$ ist ein Regulatorknockoutstamm, der zusätzlich auxotroph für Homoserin und Threonin ist, da Homoserin-DH und Homoserinkinase deletiert sind. In diesem Stamm ist also der

Kohlenstofffluss im Methioninstoffwechsel vom Zentralstoffwechsel isoliert. Diese Mutante wurde auf $[U^{13}C_6]$ -Glucose, $[U^{13}C_4]$ -Threonin und natürlich markiertem Homoserin gezüchtet.

Die Markierungsmessung im Zellextrakt zeigte, dass die 8 Kohlenstoffe des Metaboliten eine natürliche Markierungsverteilung aufwiesen. Das Kohlenstoffgerüst des Metaboliten stammt also eindeutig aus dem Methioninstoffwechsel. Außerdem konnte im Zellextrakt von *C. glutamicum* $\Delta mcbR \Delta hom \Delta hsk$ im GC/MS ein außerordentlich hohes Signal des Metaboliten detektiert werden. Die Fütterung von 10 mM Homoserin begünstigte offensichtlich die Bildung des Metaboliten. Wäre der Ursprung der Substanz allerdings im Cystein- oder Schwefelstoffwechsel der Zelle zu suchen, müsste ihr Kohlenstoffgerüst vollmarkiert sein. Wenn sich das Kohlenstoffgerüst aus verschiedenen Stoffwechselwegen ableitete, müsste eine Massenverschiebung zwischen 1 und 7 resultieren.

7.2.3. Identifikation eines alternativen Weges zur Isoleucinsynthese

Ein weiteres interessantes Ergebnis dieses Experimentes war allerdings das Markierungsmuster von Isoleucin. Es trat in 13,3 % der gemessenen Ionen nur eine Massenverschiebung von 2 auf. Da Glucose zu 99 % und Threonin zu 98 % mit ^{13}C markiert waren, hätte man für das gemessene Fragment $m/z = 200$ (C_2 - C_6 von Isoleucin) im GC/MS einer Massenverschiebung von 5 (in 90,4 % der Moleküle) erwartet. Dies bedeutete, dass der C_4 -Vorläufer von diesen Isoleucinmolekülen unmarkiert war und nur Pyruvat mit seiner Vollmarkierung zu einer Massenverschiebung von 2 führte (CO_2 wird von Pyruvat beim Einbau abgespalten). Da die Markierungsverteilung von Threonin im Proteinhydrolysat mit der im extrazellulär zugegebenen Threonin identisch war, kann man eine latente Threonineigensynthese in *C. glutamicum* $\Delta mcbR \Delta hom \Delta hsk$ ausschließen. Man würde erwarten, dass Isoleucin so markiert ist, wie Threonin und Pyruvat, die beiden Kohlenstoffvorläufermoleküle von Isoleucin (Abb. 7-8).

Dies bedeutet aber, dass es in diesem Stamm einen alternativen Weg zur Synthese von Isoleucin aus Vorläufern von Methionin geben muss und diese Aminosäure nicht, wie allgemein angenommen, nur aus Threonin synthetisiert wird. Dies ist für die Methioninproduktion unerwünscht, da es dadurch zu einem Kohlenstoffverlust aus der

Methioninsynthese kommt. Die Identifikation des Isoleucinvorläufers war daher von großem Interesse.

Außer Isoleucin und Methionin zeigten alle anderen Aminosäuren die erwartete Vollmarkierung. Methionin zeigte lediglich eine Massenverschiebung von 1, was auf die Methylgruppe zurückzuführen ist.

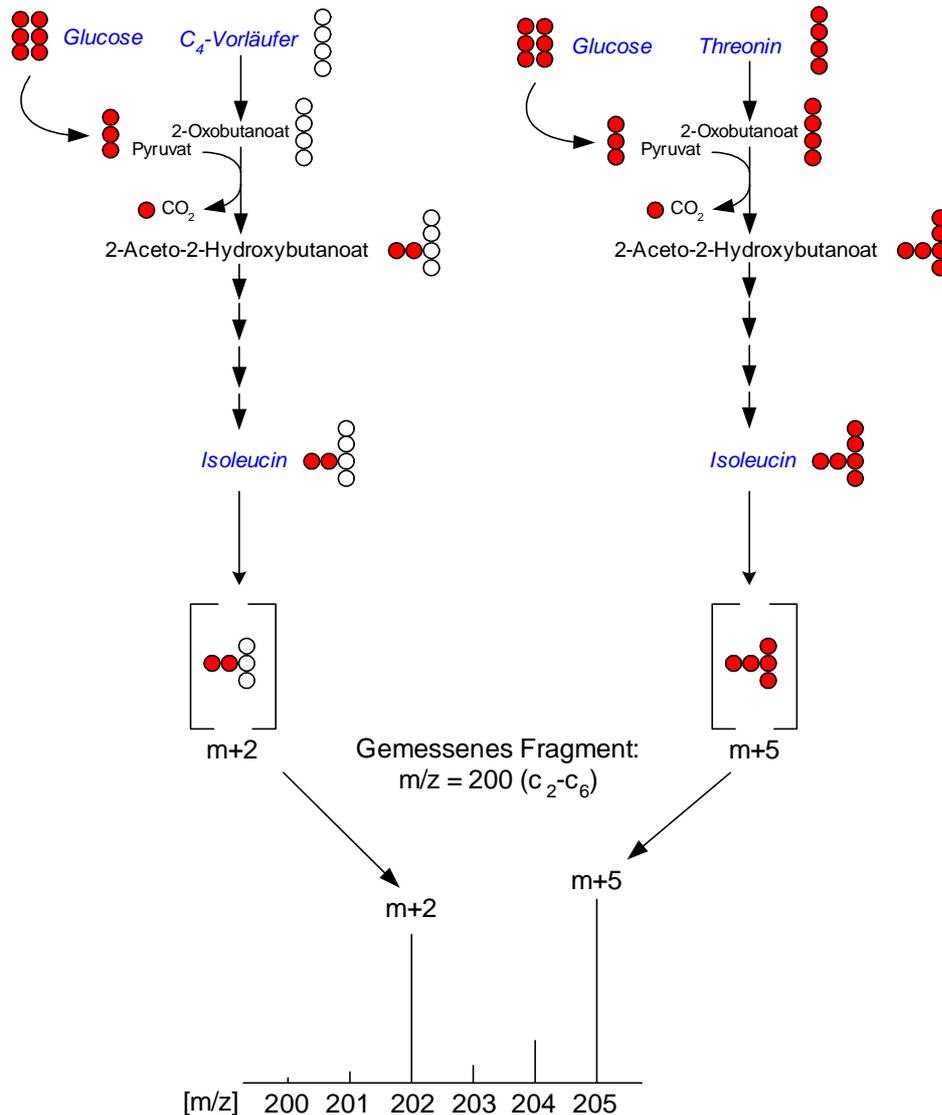


Abb. 7-8: Schematische Darstellung der Markierungsverteilung im Isoleucinmolekül bei Kultivierung von *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ Δhom Δhsk auf CG12 $\frac{1}{2}$ -Minimalmedium mit 99 % [U¹³C₆]-Glucose, 98 % [U¹³C₄]-Threonin und natürlich markiertem Homoserin. Linke Seite: alternative Isoleucinbiosynthese Rechte Seite: Isoleucinsynthese aus Threonin.

7.2.4. Ursprung der Vorläufer von Isoleucin und dem neuen Metaboliten

Da nun die Herkunft des neuen Metaboliten auf den Methioninmetabolismus eingegrenzt werden konnte, wurde *C. glutamicum* $\Delta mcbR \Delta hom \Delta hsk$ mit weiteren Intermediaten des Methioninstoffwechsels statt Homoserin kultiviert. Es wurde Homocystein, Cystathionin und Methionin an Stelle von Homoserin eingesetzt. Die Zellen wuchsen auf allen drei Substraten, wobei das schnellste Wachstum auf Methionin vorlag. Es wurde beobachtet, dass der neue Metabolit bei Fütterung mit Methionin und Cystathionin nicht gebildet wurde. Bei Kultivierung auf Homocystein wurde nur sehr wenig akkumuliert. Allerdings konnten auch geringe Mengen an Homoserin detektiert werden, was darauf schließen lässt, dass entweder Homocystein, Methionin, SAM oder SAH zu Homoserin abgebaut wurde, oder Homoserin als Kontamination im vorgelegten Homocystein (Reinheit: 95 %) vorhanden war. Es hatte den Anschein, dass nur wenn Homoserin vorhanden war und der obere Teil der Methioninsynthese (MetX, MetB, MetC, MetZ) ablief auch der Metabolit gebildet wurde. Interessanterweise konnte der Massenshift im Isoleucin nur beobachtet werden, wenn auch der neue Metabolit akkumuliert wurde. Es zeigte sich also, dass der Metabolit selbst, oder seine Abbauprodukte für den neuen Weg der Isoleucinsynthese verantwortlich sind.

Tabelle 7-3: Relative Massenisotopomerenverteilung im M-159-Signal von Isoleucin. Ionencluster $m/z = 200 - 205$ (enthält die Kohlenstoffe C_2-C_6 von Isoleucin). Gemessen im Proteinhydrolysat von *C. glutamicum* $\Delta mcbR \Delta hom \Delta hsk$ nach Kultivierung auf CG12½-Minimalmedium mit 99 % $[U^{13}C_6]$ -Glucose, 98 % $[U^{13}C_4]$ -Threonin und natürlich markiertem Homoserin, Methionin, Homocystein bzw. Cystathionin.

Relative Massenisotopomerenverteilung von Isoleucin auf natürlich markierten Substraten [%]

	<i>Homoserin</i>	<i>Methionin</i>	<i>Homocystein</i>	<i>Cystathionin</i>
m	0,5	0,3	0,3	0,3
m+1	0,5	0,1	0,2	0,1
m+2	13,3	1,0	1,9	0,9
m+3	1,4	1,6	1,8	1,7
m+4	8,0	8,9	8,8	8,9
m+5	76,3	88,1	87,1	88,0

Da die einzelnen Kohlenstoffe in der Glucose jeweils zu 99 % und im Threonin jeweils zu 98 % markiert sind, ergibt sich eine theoretisch mögliche Anreicherung der Markierung im Isoleucin von 90,4 % ($0,99^2 \cdot 0,98^4$). Tatsächlich wies Isoleucin bei Kultivierung auf Methionin, Cystathionin und Homocystein annähernd diese theoretische Anreicherung auf (Tabelle 7-3). Nur bei Fütterung von Homoserin war die Markierung des Isoleucins signifikant verändert und ein m+2-Signal zu detektieren. Bei Kultivierung auf Homocystein war m+2 im Vergleich zu den Kultivierungen auf Methionin und Cystathionin auch leicht erhöht, was ein weiteres Indiz für die Rolle des neuen Metaboliten als Ausgangsstoff für die neue Isoleucinroute war. Dies zeigte außerdem, dass der Abbau von Methionin bei einem Überschuss an Methioninvorläufern vernachlässigbar war.

7.2.5. Identifikation von Homolanthionin in *C. glutamicum* Δ mcbR

Die obigen Experimente zeigen, dass es sich bei der neuen Substanz um ein Zwischenprodukt der Methioninsynthese handelt. Da alle üblichen Zwischenprodukte der Methioninsynthese in *C. glutamicum* bereits von der in dieser Arbeit entwickelten Analytik erfasst wurden (Krömer *et al.*, 2005) und außerdem typische Intermediate der Methioninsynthesen von anderen Organismen (z.B. O-Succinylhomoserin) weder in HPLC noch in GC/MS vergleichbare Signale lieferten, wurden die GC/MS-Fragmentmuster mit anderen Substanzen verglichen. Bei diesem Vergleich zeigte vor allem Cystathionin eine große Übereinstimmung (Abb. 7-9), wobei die Massen der großen Fragmente immer genau um 14 verschoben waren. Außerdem zeigte auch Homocystein im Bereich der kleineren Fragmente sowohl mit Cystathionin als auch mit der neuen Aminosäure übereinstimmende Fragmente. Dies deutete daraufhin, dass auch der unbekannte Metabolit einen Homocysteinrest in sich trägt. Die Massen der typischen Fragmente bei GC/MS-Messung von MBDSTFA-Derivaten M ($m/z = 692$), M-15 ($m/z = 677$), M-57 ($m/z = 635$), M-85 ($m/z = 607$) und M-302 ($m/z = 390$) waren in der neuen Aminosäure immer exakt 14 Massen schwerer als die zugehörigen Fragmente in Cystathionin. Dies legte nahe, dass es sich bei der neuen Aminosäure um ein Cystathionin mit einer zusätzlichen Methylengruppe handelte. Ein solches Molekül würde nach der Derivatisierung zur GC/MS-Messung auch mit 4 TBDMS-Gruppen vorliegen und hätte die Masse 692. Die Präsenz der Homocysteinfragmente $m/z = 272$, $m/z = 244$ und $m/z = 170$ in beiden Fragmentmustern

(Abb. 7-9) und die Abwesenheit kleinerer Fragmente von Cystathionin im Fragmentmuster der neuen Aminosäure deuteten darauf hin, dass es sich um ein Molekül handelte, das aus zwei C₄-Körpern bestand und nicht wie Cystathionin aus einem C₃ und einem C₄-Rest. Das Dimer von Homocystein konnte ausgeschlossen werden, da die Markierungsexperimente gezeigt hatten, dass nur 1 Schwefel vorhanden war. Die Masse des Moleküliions von Homocystin wäre außerdem um 32 Massen schwerer.

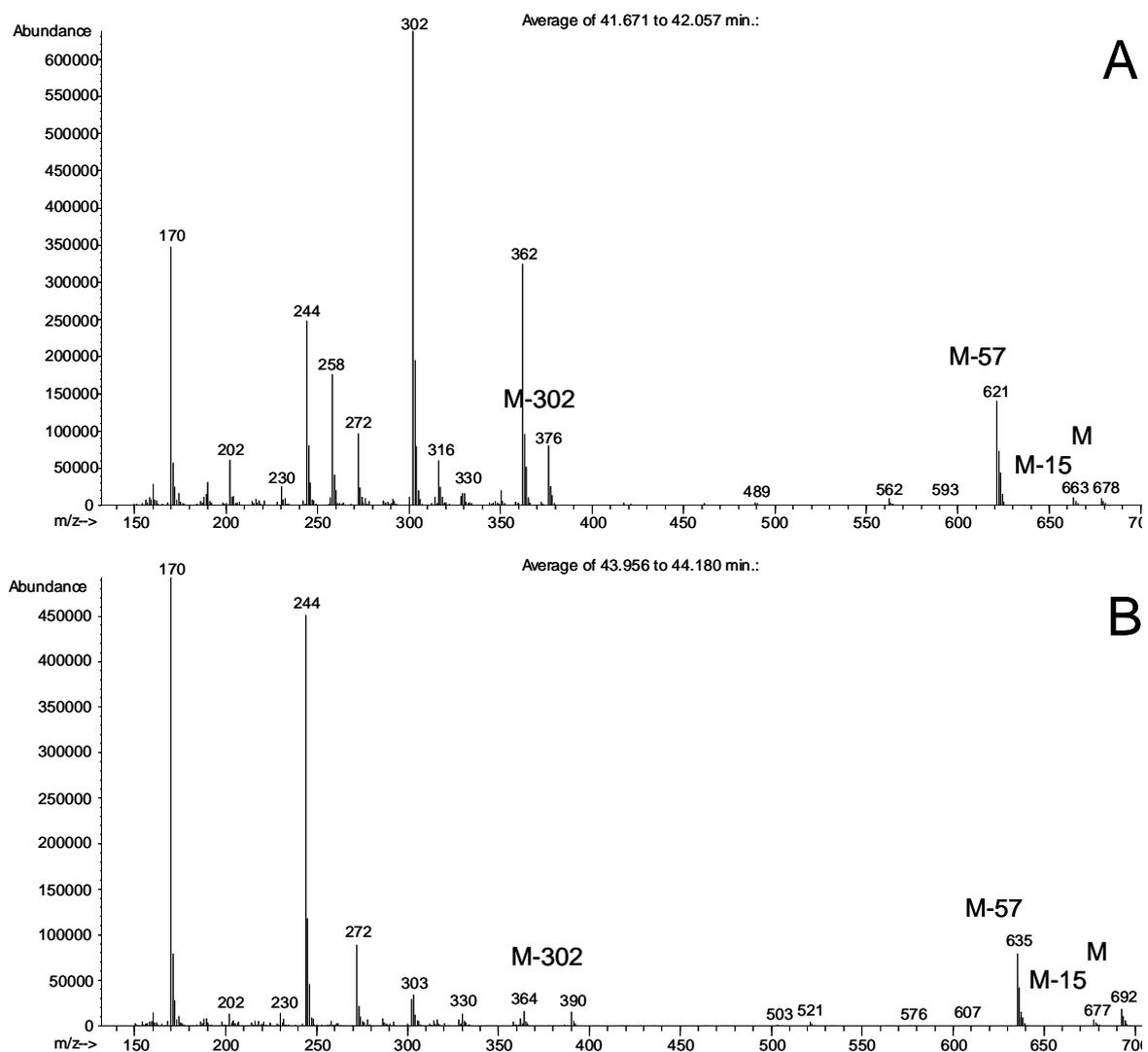


Abb. 7-9: GC/MS-Fragmentmuster von Cystathionin (A) und der neuen Aminosäure (B). Gezeigt sind die über das gesamte Signal gemittelten Intensitäten der einzelnen m/z-Verhältnisse.

Auf Grundlage der Summenformel von Cystathionin mit einer zusätzlichen Methylengruppe ergab sich für den unbekannteten Metaboliten die Summenformel C₈H₁₆O₄N₂S. Datenbankrecherche (Chemical Abstracts) mit dieser Summenformel ergab unter anderem

die Substanz Homolanthionin. Diese Substanz könnte durch Cystathionin- γ -Synthase (MetB) aus Homocystein und O-Acetylhomoserin gebildet werden. Normalerweise wird durch MetB aus Cystein und O-Acetylhomoserin Cystathionin gebildet. Eine zu Cystathionin analoge Spaltung von Homolanthionin durch die Cystathionin- β -Lyase (MetC) könnte auch die Herkunft des Isoleucinvorläufers erklären, da bei dieser Spaltung Homocystein, Ammonium und 2-Oxobutanoat entstehen würde. Tatsächlich führte der Knockout von MetB in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ zum Verschwinden von Homolanthionin im Zellextrakt. Da die Transkription von MetB in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ erhöht ist (Rey *et al.*, 2005), wurde angenommen, dass es sich bei der beobachteten Bildung von Homolanthionin um eine Nebenreaktion von MetB handelt, die durch eine geringe Substratspezifität von MetB zustande kommt.

Homolanthioninakkumulation ist vorher für Methionin auxotrophe Mutanten von *E. coli* und *Aspergillus nidulans* (Huang, 1963; Paszewski und Grabski, 1975) beschrieben worden. Diese Stämme waren Knockoutmutanten der Methioninsynthase. Außerdem kann Homolanthionin auch durch die Cystathionase aus menschlicher Leber (Tallan *et al.*, 1971) und von *Streptomyces phaeochromogenes* (Kanzaki *et al.*, 1986) gebildet werden. Die Cystathionin- γ -Synthase von *Arabidopsis thaliana* (Ravanel *et al.*, 1998) kann die Homolanthioninbildung aus Homocystein und O-Acetylhomoserin katalysieren. Zum endgültigen Beweis fehlte aber eine Referenzsubstanz für Homolanthionin, um die GC/MS- und HPLC-Analysen zu validieren. Darüber hinaus sollte die Synthese von Homolanthionin durch MetB und seine etwaige Spaltung durch MetC *in vitro* überprüft werden.

7.2.6. Aufklärung der Biosynthese von Homolanthionin in *C. glutamicum*.

Es wurde gezeigt, dass die Akkumulation von Homolanthionin bei Knockout von MetB nicht mehr erfolgt. Zur endgültigen Aufklärung der Biosynthese von Homolanthionin in *C. glutamicum* wurden MetB und MetC als rekombinante Proteine in *E. coli* überexprimiert und mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt (vgl. Kap. 6.7). Die Charakterisierung der Enzyme zeigte, dass MetB in der Lage war, sowohl Cystein als auch Homocystein zusammen mit O-Acetylhomoserin umzusetzen (Abb. 7-10 A & B). HPLC-Analysen ergaben, dass aus Cystein und O-Acetylhomoserin Cystathionin gebildet wurde, und dass

aus Homocystein und O-Acetylhomoserin Homolanthionin synthetisiert wurde. Eine Umsetzung von Homocystein oder Homoserin alleine erfolgte nicht. Die Synthese von Homolanthionin durch MetB zeigte sich auch *in vitro*.

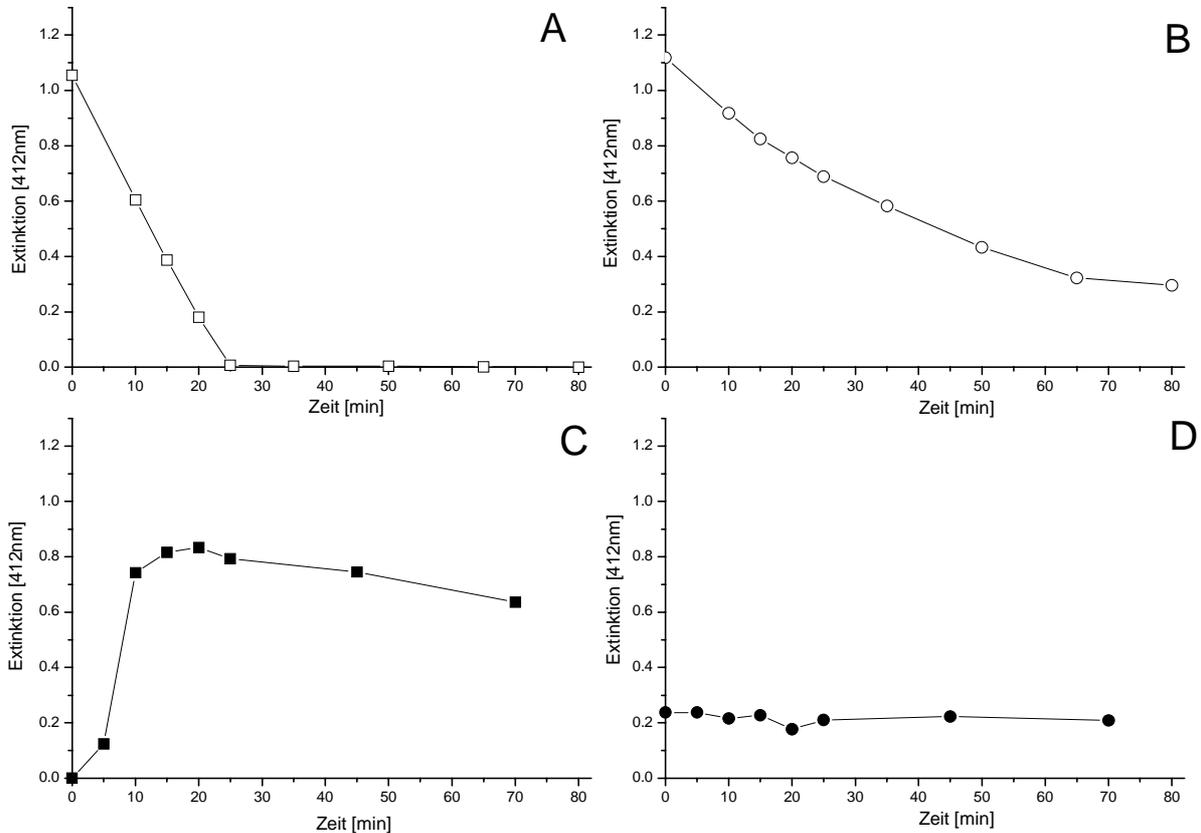


Abb. 7-10: Charakterisierung von Cystathionin- γ -Synthase (MetB) und Cystathionin- β -Lyase (MetC) von *C. glutamicum* nach Expression als His-Tag-Proteine in *E. coli* und anschließender Aufreinigung. Die Umsetzung von O-Acetylhomoserin und L-Cystein (A) und O-Acetylhomoserin und L-Homocystein durch MetB (B) und die Spaltung von LL-Cystathionin (C) und LL-Homolanthionin (D) durch MetC wurden photometrisch verfolgt. Es wurden die freien SH-Gruppen mittels Ellmans Reagenz bei 412 nm quantifiziert. Vor der Zugabe von MetC wurde MetB durch Ultrafiltration entfernt (Centrisart, Ausschluss 20,000 Da, Sartorius, Göttingen, Deutschland). Es waren in D noch Reste von Homocystein vorhanden, die in B nicht umgesetzt wurden, daher startet dieser Assay bei einer Extinktion $> 0,2$.

Da Homolanthionin kommerziell nicht zu beziehen war, wurde die Spaltung von Homolanthionin zunächst anhand der gleichen Assays untersucht. Nach Entfernung von MetB mittels Ultrafiltration wurde MetC zugegeben. Cystathionin wurde von MetC schnell in Homocystein, Ammonium und Pyruvat gespalten, was sowohl im photometrischen Assay (Abb. 7-10 C), als auch in der HPLC beobachtet werden konnte. Die Spaltung von

Homolanthionin war im photometrischen Test nicht zu sehen (Abb. 7-10 D). In HPLC-Analysen konnte eine geringe Abnahme des Homolanthioninpeaks beobachtet werden, allerdings wurden von dieser Umsetzung keine Produkte detektiert.

Tabelle 7-4: Affinitätskonstanten (K_M) für Cystathionin- γ -Synthase (MetB) und Cystathionin- β -Lyase (MetC) von *C. glutamicum* (diese Arbeit) und anderen Organismen aus der Literatur.

Enzym	Substrat	Affinitätskonstante		Referenz
		K_M [μM]		
Cystathionin- γ - Synthase	L-Cystein	260	(<i>C. glutamicum</i>)	(diese Arbeit)
		180	(Spinat)	(Ravanel <i>et al.</i> , 1995)
		50	(<i>E. coli</i>)	(Holbrook <i>et al.</i> , 1990)
	L-Homocystein	540	(<i>C. glutamicum</i>)	(diese Arbeit)
Cystathionin- β -Lyase	LL-Cystathionin	110	(<i>C. glutamicum</i>)	(diese Arbeit)
		40	(<i>E. coli</i>)	(Dwivedi <i>et al.</i> , 1982)
		220	(<i>S. typhimurium</i>)	(Dwivedi <i>et al.</i> , 1982)
		70	(<i>B. avium</i>)	(Gentry-Weeks <i>et al.</i> , 1993)
	L-Homolanthionin	4540	(<i>E. coli</i>)	(Dwivedi <i>et al.</i> , 1982)

Die K_M -Werte von MetB für Cystein und Homocystein wurden zu 260 μM für L-Cystein und 540 μM für L-Homocystein bestimmt. Diese Werte liegen im Bereich derer von anderen Organismen (Tabelle 7-4). Das Enzym hat also für Cystein eine doppelte Affinität im Vergleich zu Homocystein.

Der K_M -Wert von MetC für LL-Cystathionin war mit 110 μM fast dreimal so hoch wie der des entsprechenden Enzyms in *E. coli*, aber nur halb so hoch wie in *Salmonella typhimurium* (Tabelle 7-4). Ein K_M -Wert von MetC für Homolanthionin war in dieser Arbeit leider nicht zu bestimmen, da die Umsetzung offensichtlich nicht vollständig ablief. Es ist denkbar, dass die Umsetzung *in vivo* trotzdem erfolgt und ein ähnlich hoher K_M -Wert wie bei *E. coli* vorliegt (Tabelle 7-4). Dafür spricht auch, dass MetC von *C. glutamicum* in der Lage ist neben Cystathionin auch Cystin, Cystein, Djenkolsäure, Lanthionin und Methionin zu spalten (Wada *et al.*, 2002). Der hier bestimmte K_M -Wert von MetC für Cystathionin ist allerdings viel kleiner als der Wert der in einer früheren Arbeit auf 5 mM für L-Cystathionin (Kase und Nakayama, 1974) in Rohextrakt von *C. glutamicum* bestimmt wurde. Der Unterschied könnte dadurch erklärt werden, dass in der früheren Arbeit die Messung bei

37 °C und pH 8,2 durchgeführt wurde, während hier die Bestimmung bei Raumtemperatur und pH 7,5 gemacht wurde. Außerdem ist es möglich, dass Kase und Nakayama eine Mischung aus LL- und L-allo-Cystathionin eingesetzt haben. HPLC-Analysen mit einem solchen Gemisch zeigten eine schlechtere Umsetzung von L-allo-Cystathionin (Daten nicht gezeigt).

Es könnte auch sein, dass noch andere Enzyme in die Spaltung von Homolanthionin involviert sind. Vieles spricht dafür, dass die Spaltung von Homolanthionin zur Bildung von Oxobutanoat führt und damit den alternativen C₄-Vorläufer von Isoleucin liefert. Andere Reaktionen, die im Methioninstoffwechsel von *C. glutamicum* Oxobutanoat freisetzen könnten (Homocystein-Desulphydrase, Cystathionin- γ -Lyase (setzt Cystein und Oxobutanoat frei) und Methionin- γ -Lyase), wurden bereits durch die Fütterungsversuche mit *C. glutamicum* $\Delta mcbR \Delta hom \Delta hsk$ (vgl. Kap. 7.2.4) ausgeschlossen.

Zusammenfassend stellt sich die Methioninsynthese von *C. glutamicum* nun etwas anders dar, als weitläufig angenommen (vgl. Kap. 5.1). Besonders bei erhöhten intrazellulären Homocysteinkonzentrationen, wie sie in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ vorliegen (vgl. Kap. 7.3.4), kann MetB durch seine relativ große Affinität zu Homocystein eine neue Aminosäure akkumulieren. Die Akkumulation von Homolanthionin führt zur Aktivierung einer neuen Isoleucinsyntheseroute, die zum Kohlenstofffluss von der Methioninsynthese in die Isoleucinsynthese führt (Abb. 7-11). Die intrazelluläre Akkumulation von Homocystein könnte auch bei den Methioninsynthaseknockouts von *E. coli* und *Aspergillus nidulans* (Huang, 1963; Paszewski und Grabski, 1975) die Ursache für die Homolanthioninbildung gewesen sein. In diesen Stämmen konnte die Methioninsynthese bis zum Homocystein ablaufen und war erst im letzten Schritt blockiert. Extrazelluläres Methionin, das für Transmethylierungen verbraucht wurde, konnte nicht mehr regeneriert werden und akkumulierte wahrscheinlich als Homocystein, das dann von der Zelle in Homolanthionin überführt wurde. Dies unterstützt die These, dass die Regulation der Methioninsynthese in *C. glutamicum* darauf abzielt, die Akkumulation von Homocystein zu vermeiden (vgl. Kap. 5.5). In menschlichem Plasma führen erhöhte Homocysteinkonzentrationen zu Homocysteinylierung von Proteinen (Ferretti *et al.*, 2004; Hop und Bakhtiar, 2002). Hierbei spielt Homocystein-Thiolacton eine herausragende Rolle. Dieses wird bei der Fehlbeladung von Aminoacyl-tRNA-Synthetasen mit Homocystein gebildet. Die kovalenten Protein-

Homocysteinaddukte werden durch das Thiolacton gebildet und stehen beim Menschen im Zusammenhang mit Gefäßerkrankungen (Jakubowski, 1999).

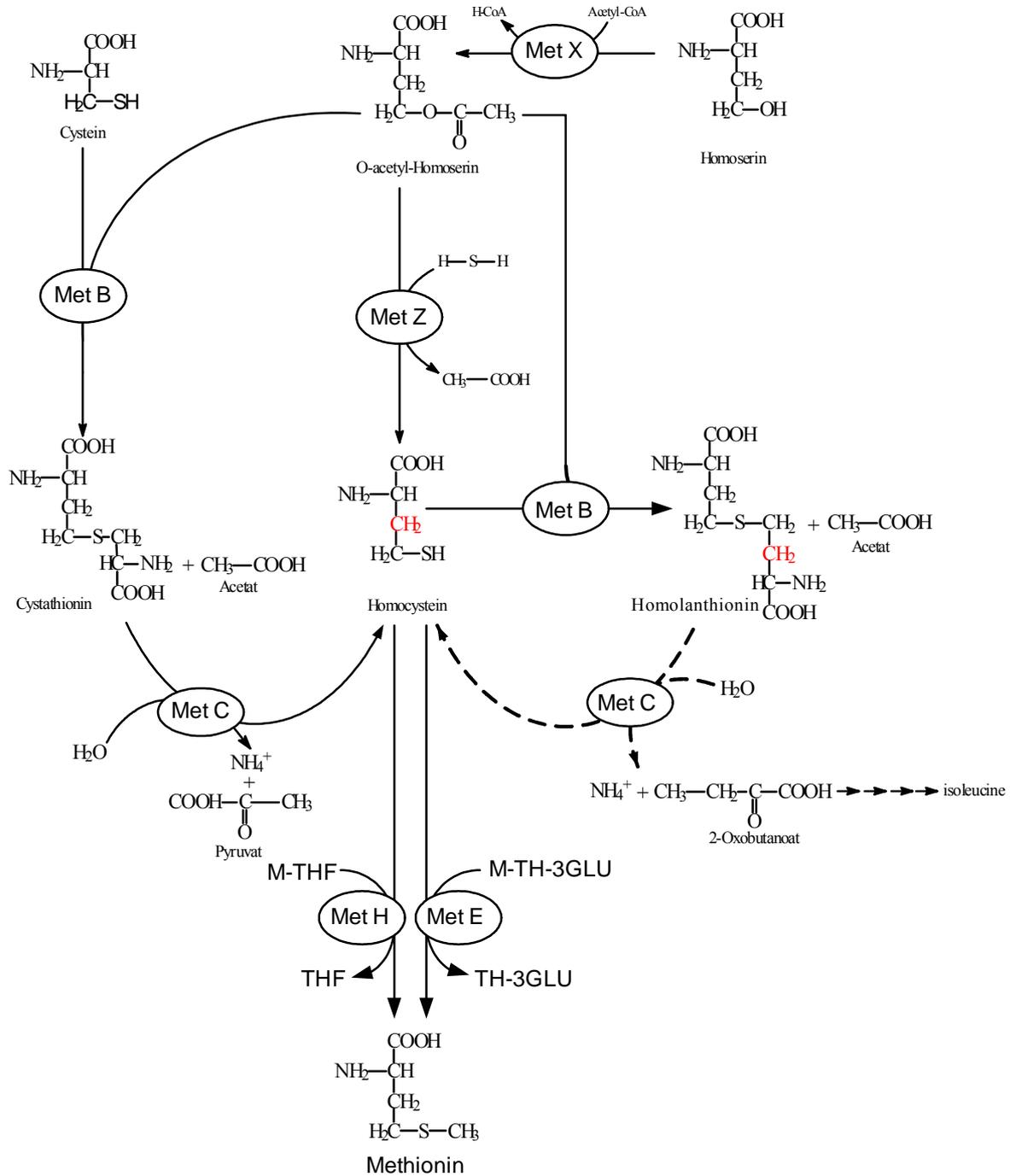


Abb. 7-11: Methioninsynthese in *C. glutamicum* mit Homolanthionin als zusätzlichem Intermediat. Die Homolanthioninsspaltung durch MetC ist noch nicht endgültig bewiesen.

Es konnte gezeigt werden, dass besonders die Homocysteinylierung von LDL und HDL (low/high density lipoproteins) zu einer höheren Empfindlichkeit von Endothelzellen gegenüber oxidativem Stress führt (Ferretti *et al.*, 2003). Außerdem führt Homocysteinylierung bei Proteinen oft zu Funktionsverlust, Multimerisierung und zum Ausfallen (Jakubowski, 1999). Rey *et al.* (2005) haben festgestellt, dass in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ auch viele Gene der oxidativen Stressantwort überexprimiert werden. Es könnte sein, dass die Synthese von Homolanthionin für die Zelle den Vorteil hat, dass überschüssiges Homocystein entgiftet wird.

Bislang wurde Homocysteinylierung bei Bakterien meines Wissens noch nicht beschrieben. Dies könnte also ein erster Hinweis auf dieses Phänomen in der Bakterienwelt sein. Dafür, dass die Homolanthioninsynthese für die Zelle entgiftende Wirkung haben könnte spricht, dass der Knockoutstamm von MetB *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ $\Delta metB$ zwar kein Homolanthionin mehr bildete, aber im Vergleich zu *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ nur sehr schlecht wuchs. Obwohl vorher beobachtet wurde, dass sowohl Transsulfurierung und direkte Sulfhydrierung in *C. glutamicum* zu etwa gleichen Teilen ablaufen (Hwang *et al.*, 2002). Man würde also erwarten, dass ein $\Delta metB$ -Stamm trotzdem noch gut wachsen kann.

7.2.7. Synthese, Strukturaufklärung und Quantifizierung von Homolanthionin

Die Bedeutung der Homolanthionakkumulation in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ mit den genannten Konsequenzen für die Methioninsynthese machten eine Quantifizierbarkeit dieses Metaboliten erforderlich. Außerdem stand der letzte Beweis der Struktur des neuen Metaboliten noch aus. Homolanthionin wurde deshalb im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert und aufgereinigt. Es gelang mit Hilfe des aufgereinigten MetB-Proteins rund 30 mg Homolanthionin aus L-Homocystein und O-Acetylhomoserin herzustellen (vgl. Kap. 6.8). Das synthetisierte Homolanthionin bestätigte die Ergebnisse der GC/MS- und HPLC-Analysen. Zusätzlich wurde die Substanz extern mittels NMR durch Dr. J. Zapp (Pharmazie, Universität des Saarlandes, Saarbrücken) analysiert. Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Analyse identifizierte die synthetisierte Substanz als Homolanthionin (S-[(3S)-3-Amino-3-carboxypropyl]-L-homocystein; CAS 102044-65-5). Die Daten der ^1H -Analyse stimmten gut mit den Literaturwerten überein (Kanzaki *et al.*, 1986). ^{13}C -NMR-Daten für Homolanthionin

sind noch nicht hinterlegt. (Die NMR-Spektren befinden sich im Anhang dieser Arbeit). Das kalkulierte Molekulargewicht von $M = 236 \text{ g mol}^{-1}$ wurde auch experimentell mittels LC-MS bestätigt (Dr. J. Zapp, Pharmazie, Universität des Saarlandes). Das Molekül hat folgende Struktur (Abb. 7-12):

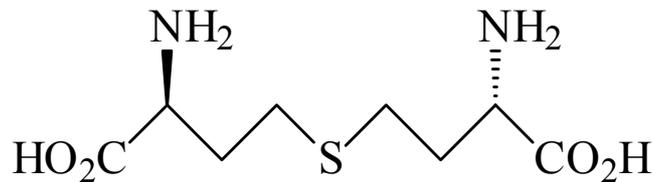


Abb. 7-12: Strukturformel von LL-Homolanthionin (S-[(3S)-3-Amino-3-carboxypropyl]-L-homocystein) CAS 102044-65-5.

Die erfolgreiche Synthese von Homolanthionin in hoher Reinheit ermöglichte die Quantifizierung dieser Substanz im Zellextrakt von *C. glutamicum ΔmcbR*. Es wurden im Zellextrakt des Mutanten während exponentiellen Wachstums auf CG12½-Medium im Bioreaktor $209,8 \pm 6,5 \text{ } \mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ Homolanthionin (Mittelwert aus 10 Extrakten) detektiert. Dies ist eine sehr hohe Akkumulation, wenn man berücksichtigt, dass die häufigste Aminosäure in *C. glutamicum* Glutamat eine intrazelluläre Konzentration von rund $385 \text{ } \mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ aufweist (s.u.). Homolanthionin ist damit die zweithäufigste Aminosäure in diesem Stamm.

7.2.8. Relative Flussverteilung in der Methioninsynthese

Die drastische Akkumulation der neuen Aminosäure im Methioninstoffwechsel von *C. glutamicum* führt zu Kohlenstoffverlusten für die Methioninsynthese. Anhand des anabolen Bedarfes an Isoleucin ($202 \text{ } \mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$), Threonin ($275 \text{ } \mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$) und Methionin ($146 \text{ } \mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$) für die Synthese der Biomasse (Marx *et al.*, 1996) und anhand der Akkumulation von $209,8 \text{ } \mu\text{mol}$ Homolanthionin je g_{BTM} wurde eine relative Flussverteilung berechnet. Die Akkumulation von intrazellulärem Isoleucin, Methionin und Threonin war vernachlässigbar. Zusätzlich wurde auch die Homolanthioninspaltung mit 13,3 % des Isoleucinbedarfs für die Biomasse berücksichtigt (vgl. Kap. 7.2.4). Für die Verzweigung zwischen Transsulfurierung und direkter Sulfydrierung wurde anhand der entsprechenden

Enzymaktivitäten im Wildtyp auf Minimalmedium (Hwang *et al.*, 2002) ein Verhältnis von 1:0,95 angenommen.

Die Flussverteilung erlaubt einen tieferen Einblick in die Synthese von Aminosäuren aus Homoserin in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$. vor allem vor dem Hintergrund der Nebenreaktion von MetB und MetC, die nicht nur zur Synthese von Homolanthionin führen, sondern auch zur Eröffnung einer Isoleucinsynthese aus Intermediaten des Methioninstoffwechsels (Abb. 7-13).

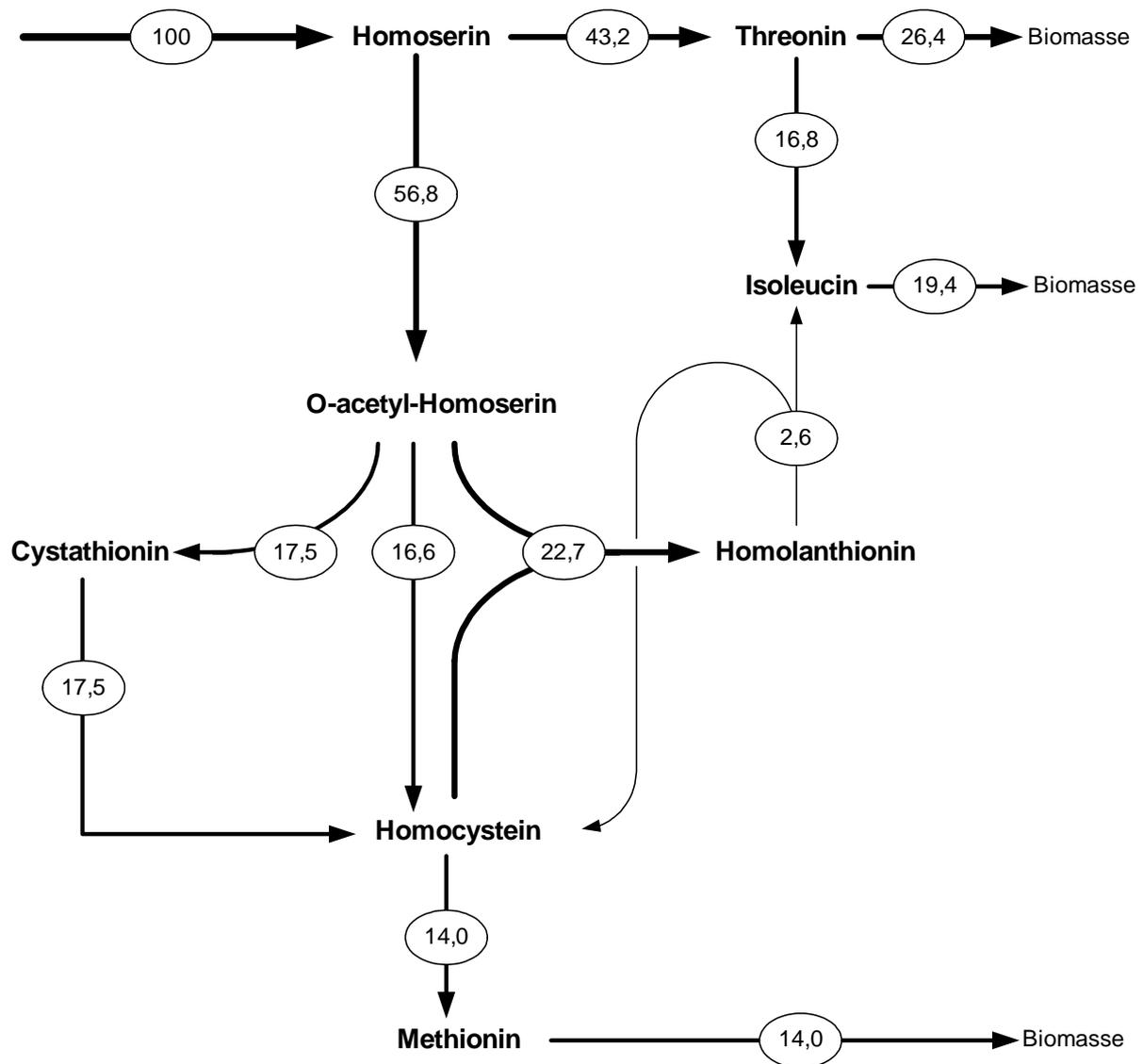


Abb. 7-13: Relative Flussverteilung im Methionin, Threonin und Isoleucin-Stoffwechsel von *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ unter Berücksichtigung von Homolanthioninsynthese und Abbau. Zugrunde gelegt sind der anabole Bedarf an Isoleucin, Methionin und Threonin (Marx *et al.*, 1996) und das Verzweungsverhältnis von Transsulfurierung und direkter Sulfhydrierung ((Hwang *et al.*, 2002).

Am Homoserinknotenpunkt wird der Kohlenstoff im Verhältnis 1:0,76 zwischen O-Acetylhomoserin und Homoserinphosphat verteilt. O-Acetylhomoserin wird nur zu einem kleinen Teil durch MetY umgesetzt. Der Löwenanteil fließt dagegen durch MetB. MetB zeigt *in vivo* zwei Aktivitäten: Einerseits wird ein Fluss von 22,7 % zum Homolanthionin und andererseits ein kleinerer Fluss von 17,5 % zum Cystathionin katalysiert. Der hohe Fluss zum Homolanthionin bewirkt zusätzlich einen äquimolaren Rückfluss von Homocystein, wodurch nur ein kleiner Teil des Homocysteins zum Methionin geleitet wird. Die Spaltung von Homolanthionin führt dagegen nur zu einem kleinen Rückfluss zum Homocystein und in die Isoleucinsynthese (Abb. 7-13).

Insgesamt werden nur 14,0 % des Homoserins auch letztendlich zu Methionin umgesetzt. Bezogen auf den Fluss zum O-Acetylhomoserin sind dies rund 25 %. Dies bedeutet, dass 75 % des Kohlenstoffes von O-Acetylhomoserin entweder in Homolanthionin deponiert, oder in die Isoleucinsynthese geschleust werden. Dies verdeutlicht die negative Auswirkung der Akkumulation von Homolanthionin auf die Methioninproduktivität.

7.2.9. Zusammenfassung

In diesem Teil der Arbeit konnte die Biosynthese von Homolanthionin, einer schwefelhaltigen Diaminosäure, in *C. glutamicum* aufgeklärt werden. Homolanthionin wird in einer Nebenreaktion durch die Cystathionin- γ -Synthase (MetB) gebildet, die Homocystein anstelle von Cystein als Substrat verwendet. Der geringe Abbau von Homolanthionin, höchstwahrscheinlich durch die Cystathionin- β -Lyase (MetC), führt zu einer dramatischen Akkumulation von $210 \mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$. Zusätzlich eröffnet der Abbau einen vom Threonin unabhängigen Weg zur Isoleucinsynthese aus Homoserin oder Homocystein Kohlenstoffkörpern.

Im Hinblick auf die Methioninproduktion mit *C. glutamicum* kann festgehalten werden, dass die Homolanthioninakkumulation die negativen Effekte hat, dass einerseits ein schwer spaltbarer Metabolit akkumuliert wird und andererseits seine Spaltung, wenn sie erfolgt, zum Stoffverlust in den Isoleucinweg führt. Beide Effekte sind für die Kohlenstoffausbeute in einem Methioninbioprocess sehr negativ, was sich auch in der relativen Flussverteilung in der Methioninsynthese widerspiegelt. Die Synthese von Homolanthionin verbraucht zudem

die Reduktionskraft von 10 NADPH. Die Akkumulation von Homolanthionin während einer industriellen Produktion hätte also drastische Folgen für die Kohlenstoffausbeute (vgl Kap. 7.1). Der Knockout von *metB* ist damit ein wichtiger Schritt in der Optimierung von *C. glutamicum* zur Überproduktion von Methionin. Allerdings zeigt das schlechte Wachstum von *C. glutamicum* Δ *mcbR* Δ *metB*, dass eventuell die Akkumulation von Homocystein für die Zelle problematisch sein könnte und die Homolanthioninsynthese einer Entgiftung gleichkommt.

7.3. Systembiologischer Vergleich von *C. glutamicum* Wildtyp und Δ *mcbR*

Der Knockout des transkriptionellen Regulators McbR in *C. glutamicum* wurde bislang als ein wichtiger Schritt in der Entwicklung eines Methioninproduzenten aus *C. glutamicum* angesehen (Rey *et al.*, 2005; Rey *et al.*, 2003). Im vorangegangenen Kapitel wurde jedoch deutlich, dass ein solcher Knockout nicht zur gewünschten Akkumulation von Methionin im Medium, sondern zur Akkumulation von Homolanthionin in der Zelle führt. Ein systembiologischer Vergleich von Wildtyp und *C. glutamicum* Δ *mcbR* wurde durchgeführt, um einen tieferen Einblick in die Auswirkungen des Regulatorknockouts auf *C. glutamicum* zu erhalten. Die Zellen wurden mittels Metabolom-, Proteom- und Fluxomanalyse näher physiologisch charakterisiert und zusätzlich anhand der Elementarzusammensetzung und mittels Elektronenmikroskopie auch morphologisch verglichen.

7.3.1. Elementaranalyse von *C. glutamicum*

Der Wildtyp von *C. glutamicum* zeigte Sauerstoff-, Schwefel- und Stickstoffgehalte, die mit Literaturwerten vergleichbar sind (Tabelle 7-5). Lediglich der Kohlenstoffgehalt war mit 44,6 % etwas erhöht. Ursache könnte ein erhöhter Lipidgehalt sein, da Kohlenhydratspeicherstoffe (wie beispielsweise Glycogen) auch den Sauerstoffgehalt erhöhen würden. Vergleicht man die Werte mit dem Lysinproduzenten ATCC 21253, zeigt sich, dass bereits der Übergang zur Lysinproduktion einen Einfluss auf die Zusammensetzung haben kann (Lysin: C = 49.3 %; O = 17.8 %; N = 15.6%). Es ist

außerdem zu erkennen, dass die Elementarzusammensetzung wohl stark von den Kultivierungsbedingungen abhängt.

Vergleicht man die Biomassezusammensetzung von *C. glutamicum* Wildtyp mit der von *C. glutamicum* $\Delta mcbR$, sticht vor allem der Schwefelgehalt hervor (Abb. 7-14). Im Regulatorknockoutstamm wird der Schwefelgehalt von $3,5 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$ auf $6,2 \text{ mg g}_{\text{BTM}}^{-1}$ erhöht, was fast einer Verdoppelung entspricht (Tabelle 7-5). Während der Kohlenstoff und Sauerstoffgehalt für beide sehr ähnlich waren, war der Stickstoffgehalt in $\Delta mcbR$ geringer. Grund für den gestiegenen Schwefelgehalt in der Biomasse von *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ dürfte die Akkumulation von Homolanthionin (13,5 Gew-% Schwefel) sein.

Tabelle 7-5: Elementarzusammensetzung von *C. glutamicum* ATCC 13032. Gezüchtet in drei unterschiedlichen Mineralmedien: BMCG (Liebl, 2005); CGXII (Keilhauer *et al.*, 1993); CG12½ diese Arbeit. Außerdem ist die Zusammensetzung eines Lysinproduzenten *C. glutamicum* ATCC 21253 auf PMB (Vallino und Stephanopoulos, 2000) gezeigt.

Element	BMCG	CGXII	CG12½	PMB
C	40,0	41,3	44,6	47,6
O	38,4	37,3	37,0	31,0
S	0,26	0,40	0,35	n.b. ¹
N	7,87	8,45	9,6	11,8

¹n.b. = nicht bestimmt

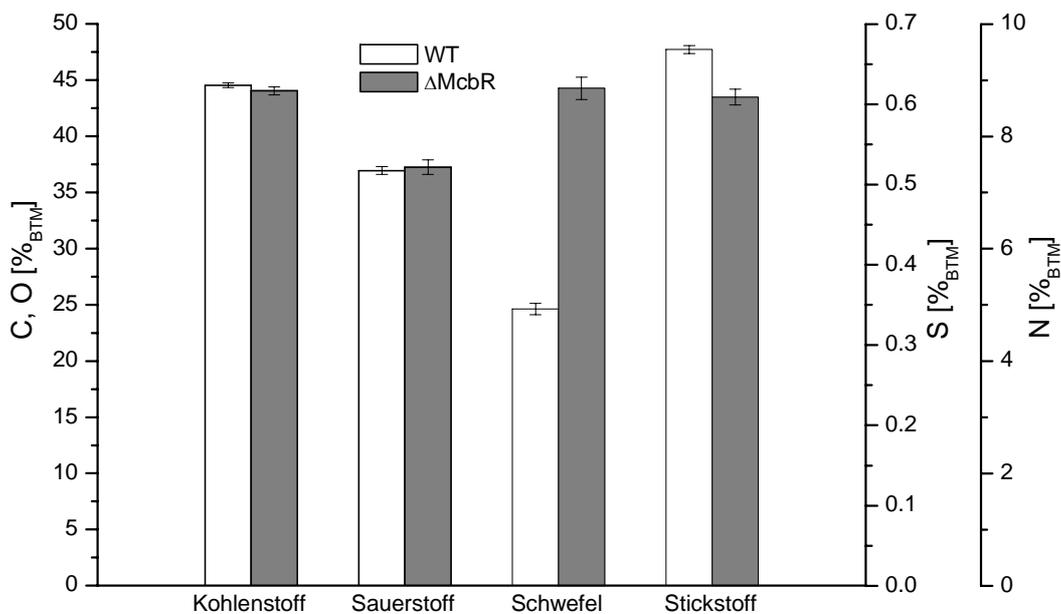


Abb. 7-14: CNOS-Gehalt von *C. glutamicum* ATCC 13032 und *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ nach Kultivierung auf CG12½-Medium. Die Werte sind in % der Biotrockenmasse (BTM) angegeben und wurden zweifach bestimmt.

7.3.2. REM- und TEM-Analyse von *C. glutamicum*

Zellen von *C. glutamicum* Wildtyp und $\Delta mcbR$ -Mutante wurden während der exponentiellen Wachstumsphase auf Minimalmedium fixiert und dann mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) auf morphologische Unterschiede untersucht.

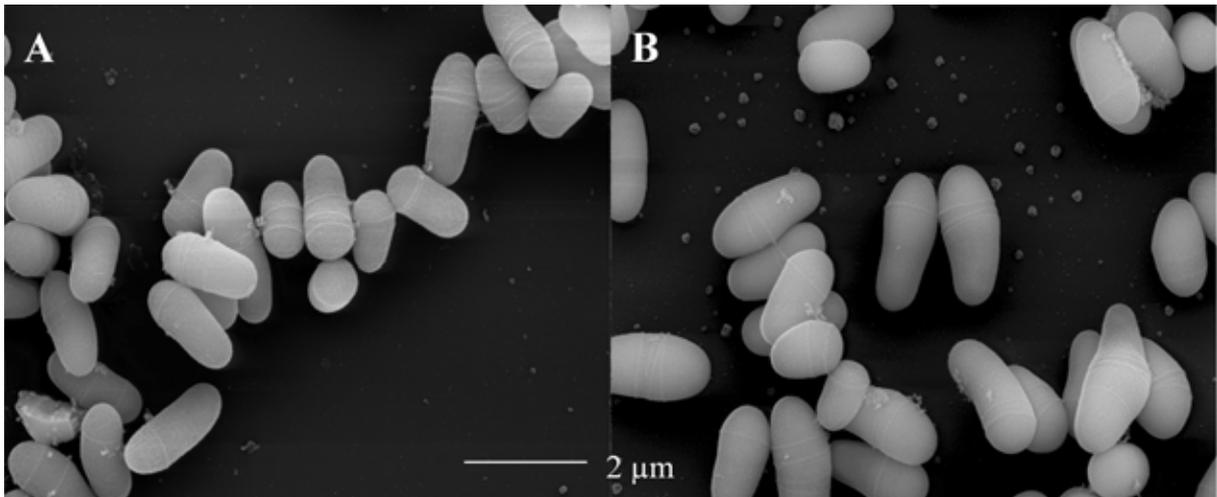


Abb. 7-15: REM-Aufnahme von *C. glutamicum* ATCC 13032 (A) und *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ (B) nach Kultivierung auf CG12½-Medium. 10000fache Vergrößerung

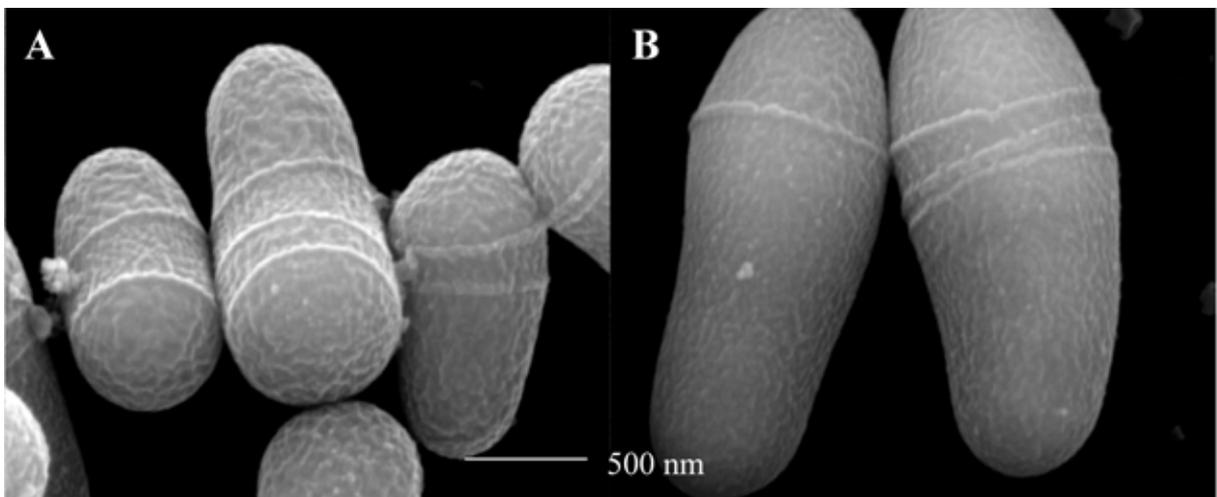


Abb. 7-16: REM-Aufnahme von *C. glutamicum* ATCC 13032 (A) und *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ (B) nach Kultivierung auf CG12½-Medium. 40000fache Vergrößerung

Die REM-Aufnahmen zeigten deutlich die Narben, die eine Zellteilung in der Zellwand hinterlässt. Die für Corynebakterien typische Keulenform (Griechisch: coryne = Keule) war

auch zu erkennen. Die Zellen waren ca. 1,5 μm lang und ca. 0,5-0,7 μm breit (Abb. 7-15; Abb. 7-16). Beide Stämme unterschieden sich hinsichtlich ihrer äußeren Erscheinung nicht wesentlich. Es hatte lediglich den Anschein, dass die Zellen von *C. glutamicum* ΔmcbR etwas größer waren, als die des Wildtyps. Dies steht im Einklang mit der Korrelation von optischer Dichte und Biotrockenmasse von Wildtyp und *C. glutamicum* ΔmcbR (vgl. Kap. 6.6.2).

Es wurde daher vereinfacht das Zellvolumen berechnet. Dazu wurden Mittelwerte von Länge und Breite von je 40 zufällig ausgewählten Zellen von *C. glutamicum* Wildtyp und *C. glutamicum* ΔmcbR gemessen. Als Vereinfachung wurde die Bakterienzelle in einen Zylinder und 2 Halbkugeln (= 1 Kugel) zerlegt. Das Volumen der Kugel wurde als $V_k = 4/3\pi r^3$, das des Zylinders als $V_z = \pi r^2 * S_2$ berechnet (Abb. 7-17). Das Gesamtvolumen ist die Summe aus V_k und V_z .

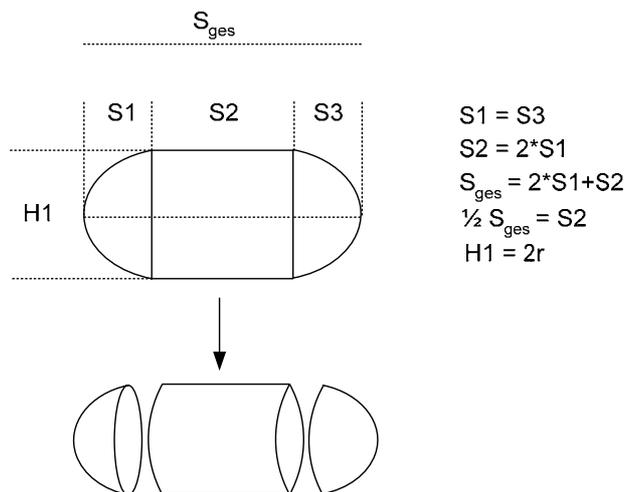


Abb. 7-17: Vereinfachte geometrische Zerlegung einer Bakterienzelle in eine Kugel und einen Zylinder zur Volumenberechnung.

Im Mittel wies *C. glutamicum* Wildtyp eine Länge von 1,544 μm (= 2*S2) und eine Breite von 0,706 μm (= 2r) auf. Dies entspricht einem Volumen von 0,487 μm^3 . *C. glutamicum* ΔmcbR hatte sowohl eine größere Länge (1,655 μm), als auch eine größere Breite (0,828 μm). Dies entspricht einem Zellvolumen von 0,742 μm^3 . Die Zellen von *C. glutamicum* ΔmcbR sind im Mittel also tatsächlich rund 53 % größer. Die Standardabweichung betrug für die Zellbreite bei beiden rund 8% und für die Länge 17 % beim Mutanten und 23 % beim Wildtyp. Die relativ hohen Standardabweichungen sind darauf zurückzuführen, dass sich die

einzelnen Zellen nicht synchron teilten und daher alle unterschiedlich groß waren, als Sie fixiert wurden. Die Stichprobengröße von 40 Zellen sollte jedoch ausreichen um einen generellen Trend zu zeigen. In der Literatur wird die Korrelation zwischen Cytoplasmavolumen und Biotrockenmasse mit $1,95 \pm 0,05 \mu\text{l mg}_{\text{BTM}}^{-1}$ (Gutmann *et al.*, 1992) angegeben. Unter Berücksichtigung des größeren Volumens kann man für den Mutanten näherungsweise eine Korrelation von $2,98 \mu\text{l mg}_{\text{BTM}}^{-1}$ annehmen. Dies gilt allerdings nur, falls die Zellen ihr Trockengewicht nicht wesentlich ändern.

Außerdem hatte es den Anschein, dass die Zelloberfläche des Wildtyps etwas rauer war (Abb. 7-15). Möglicherweise steht dies im Zusammenhang mit den von Corynebakterien auf die Zellwand aufgelagerten Mycolsäuren (Bayan *et al.*, 2003). Mycolsäuren sind langkettige Carbonsäuren bei *C. glutamicum* mit 22-36 C-Atomen (Bayan *et al.*, 2003). Es wurde beobachtet, dass die Corynemycolyltransferase in *C. glutamicum* ΔmcbR schwächer exprimiert wird (Rey *et al.*, 2005). Diese Enzym ist an der Bildung von Trehalose-Dicorynomycolat, einem Hauptbestandteil der Mycolsäureschicht, beteiligt und selbst in der Zellhülle lokalisiert (Brand *et al.*, 2003). Es ist denkbar, dass sich durch den Knockout von McbR die Zusammensetzung der Mycolsäureschicht von *C. glutamicum* ändert, wodurch auch das äussere Erscheinungsbild verändert werden könnte.

Die Transmissionsaufnahmen erlaubten den Blick in die Zellen. Hierbei ergab sich ein sehr unterschiedliches Bild für *C. glutamicum* ATCC 13032 und *C. glutamicum* ΔmcbR . Beide Stämme zeigten hellere Bereiche mit erhöhtem Kohlenhydratgehalt (Glycogen) und dunklere proteinreichere Regionen. Die Zellwand konnte auch als dünnes weißes Band um die Zelle erkannt werden. Bei Zellen, die während einer Teilung fixiert wurden, konnte man sogar die neue Zellwand erkennen, die in die Zellen hineinwuchs (Abb. 7-18 A).

Der markanteste Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante war allerdings die intrazelluläre Einlagerung eines stark kontrastierenden Körperchens (elektronendichter als andere Regionen) (Abb. 7-18 C & D). Solche Einschlüsse wurden ausschließlich bei *C. glutamicum* ΔmcbR gefunden. Jedoch gab es auch ΔmcbR Zellen, die diesen Einschluss nicht zeigten, was eventuell an der jeweiligen Schnittebene lag. Auch bei Wiederholung des Experimentes wurden die Einschlüsse nur bei *C. glutamicum* ΔmcbR gefunden. Ein Messartefakt ist auszuschließen.

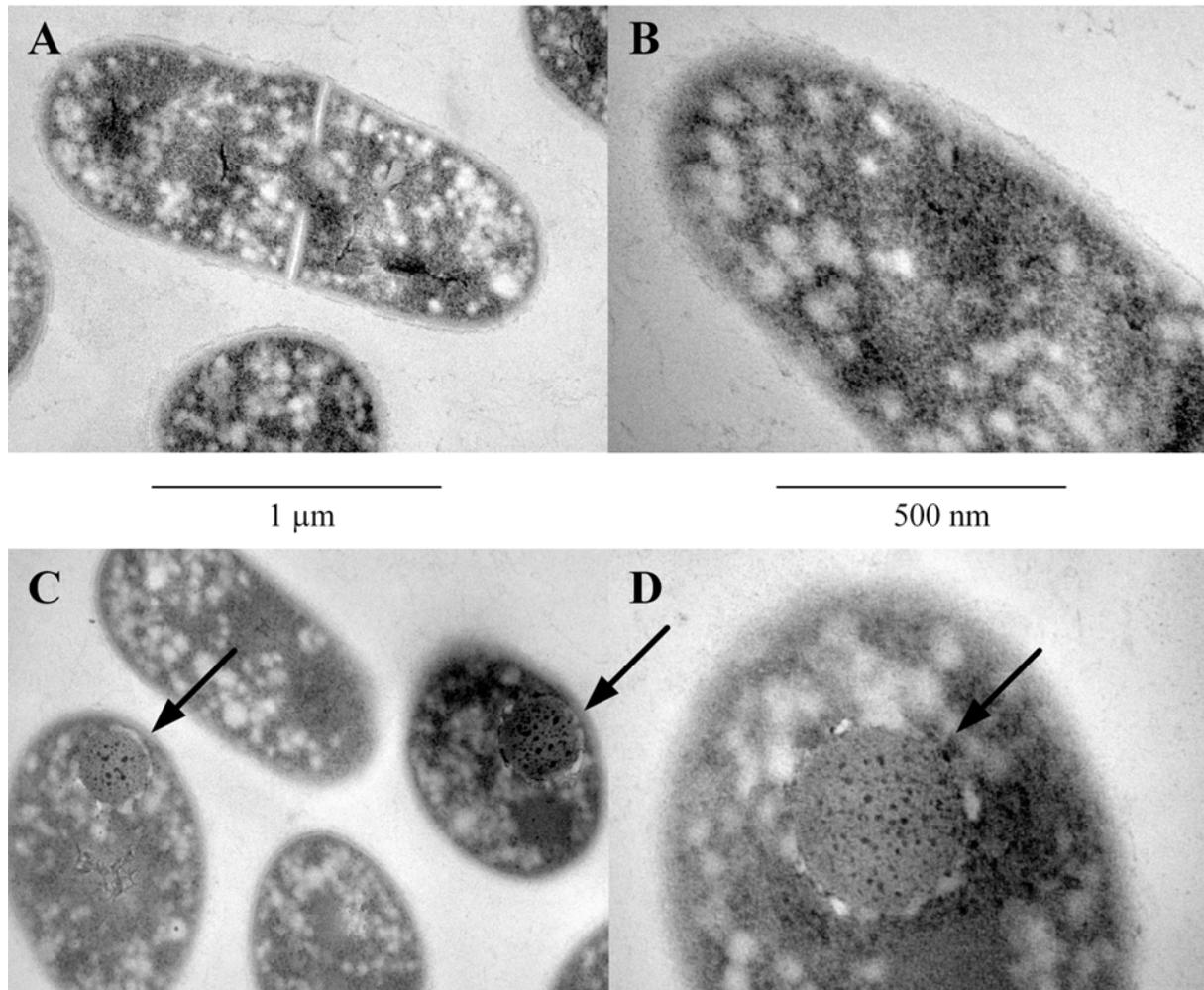


Abb. 7-18: TEM-Aufnahme von *C. glutamicum* ATCC 13032 (A & B) und *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ (C & D) nach Kultivierung auf CG12½-Medium. Die Pfeile deuten auf die ungewöhnlichen Einschlüsse in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$.

Die Elementaranalyse und die Akkumulation von Homolanthionin legten nahe, dass die Einschlüsse Schwefel enthalten könnten oder eventuell aus ausgefallenem Homolanthionin bestünden. Es wurde daher mittels EDX-Analyse untersucht, ob die Einschlusskörper im Vergleich zum Cytoplasma eine erhöhte Schwefelkonzentration aufweisen. Hierzu wurden für einen Dünnschnitt EDX-Messungen sowohl im Einschlusskörper, als auch außerhalb im Cytoplasma durchgeführt. Die Analysen ergaben, dass in beiden Bereichen eine gleiche Elementverteilung vorhanden war. Zusätzlich wurden Aufnahmen von *C. glutamicum* $\Delta mcbR \Delta metB$ gemacht. Der Knockout von MetB in $\Delta mcbR$ zeigte, dass die mikroskopischen Einschlüsse nicht von der Akkumulation von Homolanthionin abhängen,

da dieser Stamm ja kein Homolanthionin mehr akkumulierte. Der $\Delta mcbR \Delta metB$ -Stamm zeigte im TEM ebenfalls die gleichen Einschlüsse (Abb. 7-19).

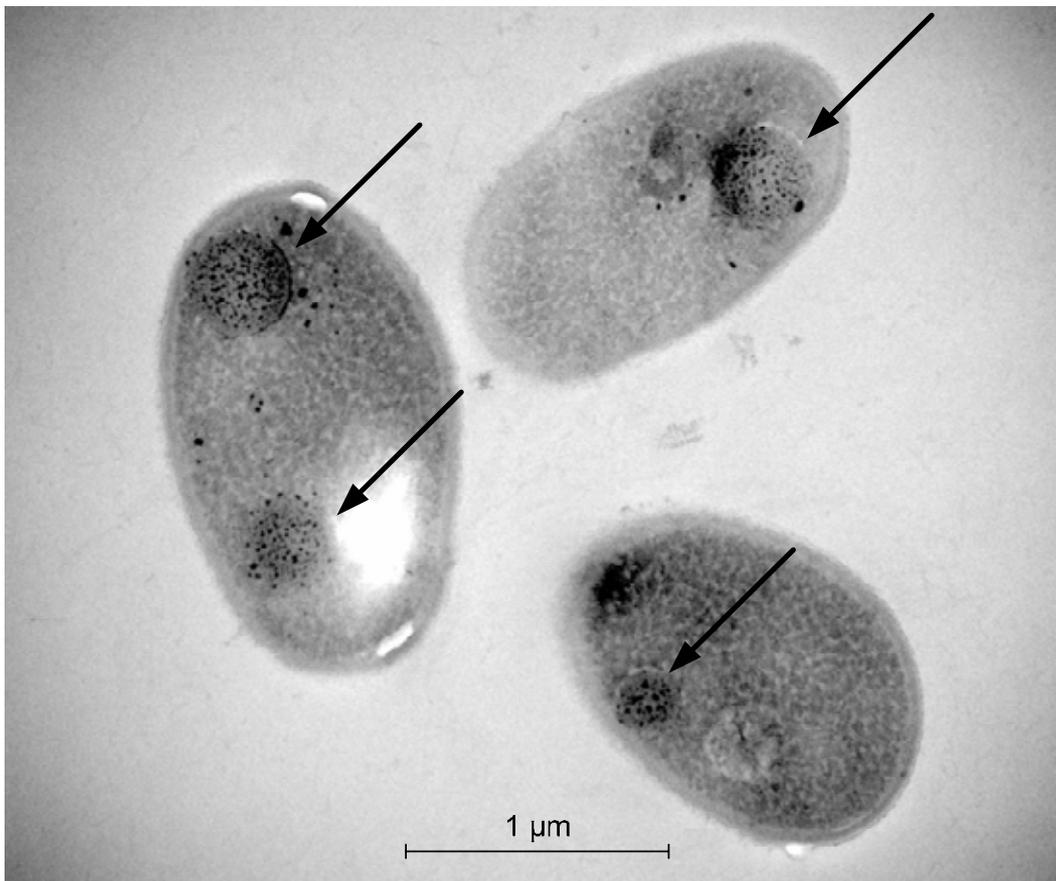


Abb. 7-19: TEM-Aufnahme von *C. glutamicum* $\Delta mcbR \Delta metB$ nach Kultivierung auf CG12½-Medium. Die Pfeile deuten auf die ungewöhnlichen Einschlüsse.

Es wurde ferner untersucht, ob es sich bei den Einschlüssen um Proteineinlagerungen (*inclusion bodies*) handelt. Es ist zwar wenig wahrscheinlich, dass sich ein *inclusion body* nur an einer Stelle in der Zelle bildet, die Möglichkeit sollte aber trotzdem ausgeschlossen werden. Hierzu wurden mittels SDS-Page die Proteinmuster für Cytosol, Waschfraktion des Pellets und Pellet nach Schwingmühlenaufschluss von *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ untersucht. Die jeweiligen Fraktionen wurden mit zwei Teilen Probenpuffer denaturiert und jeweils 2 µl auf ein 12,5 %iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die Extraktion erfolgte in Extraktionspuffer (4,5 µl $\text{mg}_{\text{Pellet}}^{-1}$) (vgl. Kap. 6.6.12), während das Pellet nach dem Entfernen des Extraktionspuffers noch mal in Rehydrierungspuffer (2,0 µl $\text{mg}_{\text{Pellet}}^{-1}$) gewaschen wurde (vgl. Kap. 6.6.12). Der Rehydrierungspuffer stört die Proteinbestimmung, weshalb diese nur für die cytosolische Fraktion durchgeführt wurde. Hier lag eine

Konzentration von $3,55 \text{ g l}^{-1}$ vor. Anhand des Verhältnisses von Pellet zu Puffer könnte man eine etwa doppelte Proteinkonzentration in der Waschfraktion erwarten.

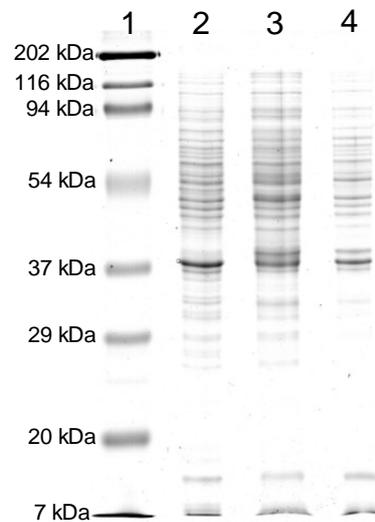


Abb. 7-20: SDS-PAGE der Proteine von *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ in Cytosol (2), Waschfraktion des Pellets (3) und im Pellet nach Schwingmühlenaufschluss (4). Auftrag von je $2 \mu\text{l}$ nach Denaturierung mit 2:1 SDS-Probenpuffer. Marker (1).

Die Banden der Waschfraktion deuten daraufhin, dass hier die Proteinkonzentration tatsächlich etwas höher war (Abb. 7-20). Es wurde keine Bande gefunden, die nur in der Zelltrümmerfraktion deutlich größer war, als in den gelösten Fraktionen (Abb. 7-20). Ein Protein, das im Elektronenmikroskop als definierte Struktur sichtbar würde, sollte auch eine entsprechend große Bande im SDS-Gel aufweisen (Ami *et al.*, 2005). Es fällt allerdings auf, dass eine Bande in allen 3 Fraktionen sehr intensiv ist (Abb. 7-20, bei 37 kDa). Diese Bande wurde ausgeschnitten, verdaut (vgl. Kap. 6.6.12) und mittels Peptidmassenfingerprint identifiziert (durch Maria Lasaosa, Technische Biochemie). Es handelt sich um die Cysteinsynthase (CysK). Dieses Enzym wird in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ stark induziert (vgl. Kap. 7.3.6.). Da die Cysteinsynthase sowohl in der Waschfraktion als auch in der Trümmerfraktion gegenwärtig ist, kann nicht geklärt werden, ob die Bande in der Trümmerfraktion von gelöstem Protein oder einem *inclusion body* stammt. Eine Möglichkeit wäre noch, dass der Einschlusskörper aus vielen unterschiedlichen Proteinen bestünde, die beispielsweise durch Homocysteinylierung ausgefallen sind. Gegen einen *inclusion body* aus Protein spricht aber, dass der Stickstoffgehalt der Biomasse in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ kleiner war als im Wildtyp (Abb. 7-14). Da Proteine naturgemäß reich an Stickstoff sind, würde

man bei einem sichtbaren Proteinkörper eher mit einer Erhöhung des Stickstoffgehaltes rechnen.

Die Herkunft der Einschlusskörper bleibt unklar. Es könnte versucht werden, diese mittels Dichtegradientenzentrifugation aus einem Rohextrakt von *C. glutamicum* zu isolieren.

7.3.3. Vergleich von Wachstum und Produktbildung

C. glutamicum ATCC 13032 und *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ wurden im Bioreaktor kultiviert. Die Kultivierungen wurden dreifach durchgeführt und führten zu gleichen Ergebnissen.

Der Wildtyp verbrauchte $17,4 \text{ g l}^{-1}$ [^{13}C]-Glucose in 13,9 h und bildete dabei $8,2 \text{ g l}^{-1}$ Biomasse (Abb. 7-21 A). Dies entspricht einer Biomasseausbeute von $Y_{X/S} = 0,47 \text{ (g g}^{-1}\text{)}$. *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ bildete aus $20,56 \text{ g l}^{-1}$ [^{13}C]-Glucose innerhalb von 37,4 h $6,78 \text{ g l}^{-1}$ Biomasse (Abb. 7-21 B), was einer Biomasseausbeute von $Y_{X/S} = 0,33 \text{ (g g}^{-1}\text{)}$ entspricht. Die Biomasseausbeuten waren sowohl für den Wildtyp als auch für $\Delta mcbR$ während der exponentiellen Wachstumsphase sehr konstant. Im Durchschnitt lag die Ausbeute bei *C. glutamicum* ATCC 13032 bei $Y_{X/S} = 0,49 (\pm 5 \%) \text{ (g g}^{-1}\text{)}$ und bei $\Delta mcbR$ bei $Y_{X/S} = 0,34 (\pm 3,5 \%) \text{ (g g}^{-1}\text{)}$. Die Konstanz der Biomasseausbeute zeigt, dass während exponentiellen Wachstums "Quasi-Steady-State" herrschte. Man spricht hier auch von *balanced growth*. Die Ergebnisse der Flussberechnung sind damit auf andere Zeitpunkte innerhalb der Wachstumsphase übertragbar.

Beide Stämme wuchsen exponentiell mit spezifischen Wachstumsraten von $\mu = 0,40 \text{ h}^{-1}$ (Wildtyp) und $\mu = 0,18 \text{ h}^{-1}$ ($\Delta mcbR$). *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ akkumulierte während der Kultivierung $1,0 \text{ mM}$ Succinat und $0,23 \text{ mM}$ Acetat. Der Wildtyp bildete von diesen Nebenprodukten $0,32 \text{ mM}$ beziehungsweise $0,31 \text{ mM}$. Die gesteigerte Akkumulation von Succinat deutet auf eine erhöhte Aktivität des TCA-Zyklus in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ hin. Neben diesen Nebenprodukten waren besonders Trehalose und Glycin wichtig. Das Disaccharid Trehalose wird aus Glucose-6-Phosphat und UDP-Glucose synthetisiert und dient als kompatibles Solut in der Osmoregulation (Morbach und Kramer, 2005a). Der Wildtyp akkumulierte $0,3 \text{ mM}$, der Mutant $1,0 \text{ mM}$ Trehalose. Dies könnte auf einen höheren osmotischen Stress bei *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ hindeuten. Vielleicht steht dies im Zusammenhang mit einer Turgorerhöhung (z.B. durch die Akkumulation von Homolanthionin) und dadurch auch mit der erhöhten Zellgröße bei geringerer Trockenmasse.

Unter den akkumulierten Aminosäuren stellte Glycin mit 0,7 mM (ATCC13032) und 0,3 mM ($\Delta mcbR$) die größte Fraktion (Abb. 7-21 C & D). Extrazelluläres Methionin wurde in keiner Fermentation detektiert. Außerdem bildete *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ auch noch Glycerin (0,23 mM) und Dihydroxyaceton (0,26 mM), zwei typische Overflow-Metabolite der Glykolyse (Park *et al.*, 1997). Die maximale CO₂-Produktionsrate betrug 60 mM h⁻¹ für *C. glutamicum* ATCC13032 und 41 mM h⁻¹ für $\Delta mcbR$ (Abb. 7-21 A & B). In der späten exponentiellen Wachstumsphase war der respiratorische Quotient für beide Stämme relativ konstant bei 1. Die Zellen wuchsen also auf Glucose aerob und hatten eine ausreichende Sauerstoffversorgung.

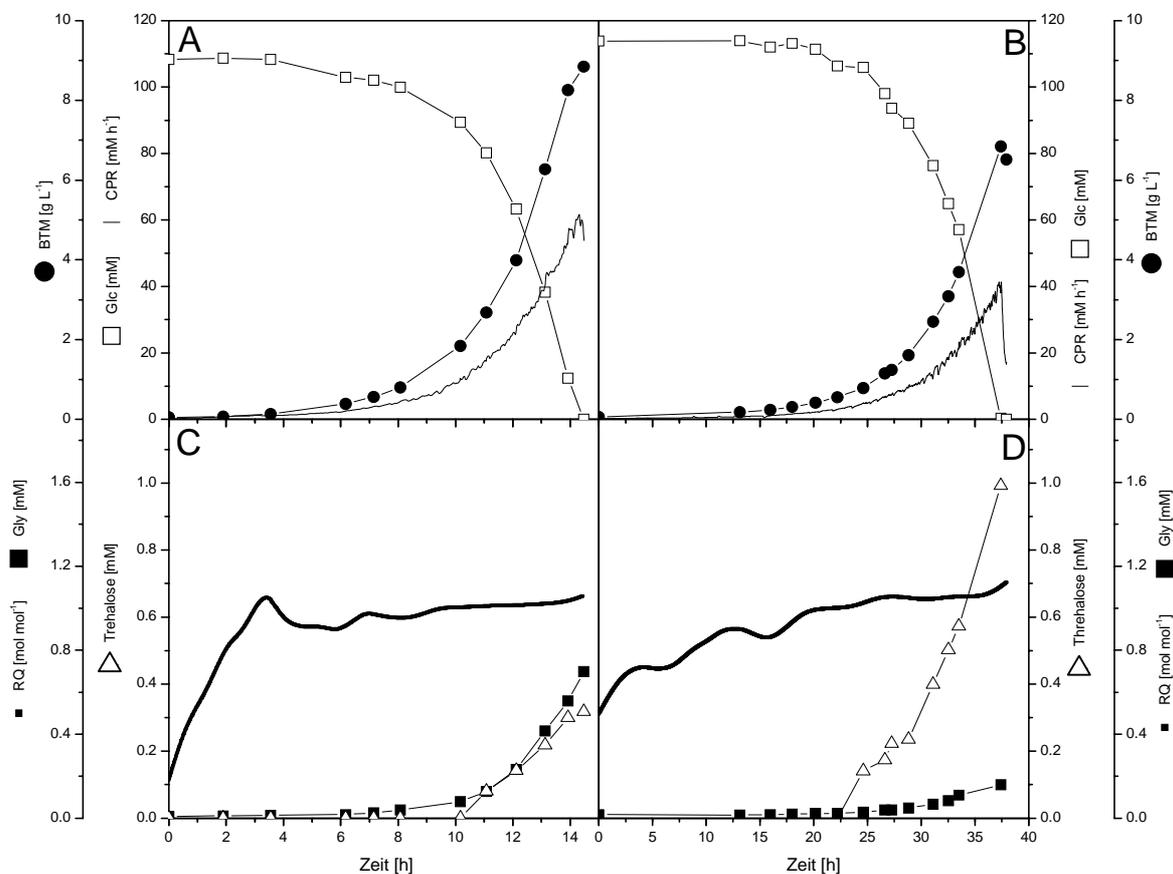


Abb. 7-21: Kultivierungsprofile von *C. glutamicum* ATCC13032 (A&C) und $\Delta mcbR$ (B&D) bei Fermentation im Bioreaktor auf CG12½-Minimalmedium. Gezeigt sind Glucosekonzentration, Biomassekonzentration, CPR, RQ und Glycin und Trehalose.

Der Sulfatverbrauch wurde mittels Bariumnachweis quantifiziert. Allerdings waren die Änderungen während den Fermentationen aufgrund des geringen Schwefelbedarfs so klein, dass aufgrund der Messgenauigkeit diese Quantifizierung lediglich einen Trend anzeigte.

C. glutamicum Wildtyp und *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ verbrauchten während des Wachstums im Bioreaktor auf CG12 $\frac{1}{2}$ -Minimalmedium 31,6 bzw. 93,7 mg Schwefel (Abb. 7-22). Der Bedarf des Wildtyps zur Synthese der im Reaktor gebildeten Biomasse (errechnet aus der Biomassekonzentration und der Elementarzusammensetzung) betrug 28,5 mg. Die tatsächlich gemessene Schwefelmenge stimmt trotz des großen Fehlers (3fach Bestimmungen) recht gut mit dem theoretischen Bedarf überein. *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ verbraucht fast die dreifache Menge. Allerdings sind für die Synthese der Biomasse nur 42,4 mg Schwefel erforderlich. Da jedoch die Synthese von 210 $\mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ Homolanthionin bereits eine Schwefelmenge von 45,97 mg Schwefel je g_{BTM} erfordert, deutet dies auf eine Unterbestimmung des Schwefels in der Elementaranalyse hin. Die Proben zur Elementaranalyse mussten mehrmals mit Reinstwasser gewaschen und anschließend zentrifugiert werden. Es ist denkbar, dass die Abkühlung auf Raumtemperatur und das Waschen mit Reinstwasser einen Schockzustand verursacht haben könnte, der zum Verlust intrazellulärer Metabolite (insbesondere von Homolanthionin) ins Waschwasser geführt haben könnte. Ähnliches wurde zuvor für Kälteschock bei *C. glutamicum* und *E. coli* nachgewiesen (Wittmann *et al.*, 2004b). Nimmt man den Schwefelbedarf für Biomasse und Homolanthionin zusammen, stimmen die beobachteten Werte gut mit den theoretischen überein (Abb. 7-22).

Kommt es im Zuge der Stammentwicklung zu einer massiven Methioninüberproduktion könnte der Sulfatnachweis an Bedeutung gewinnen.

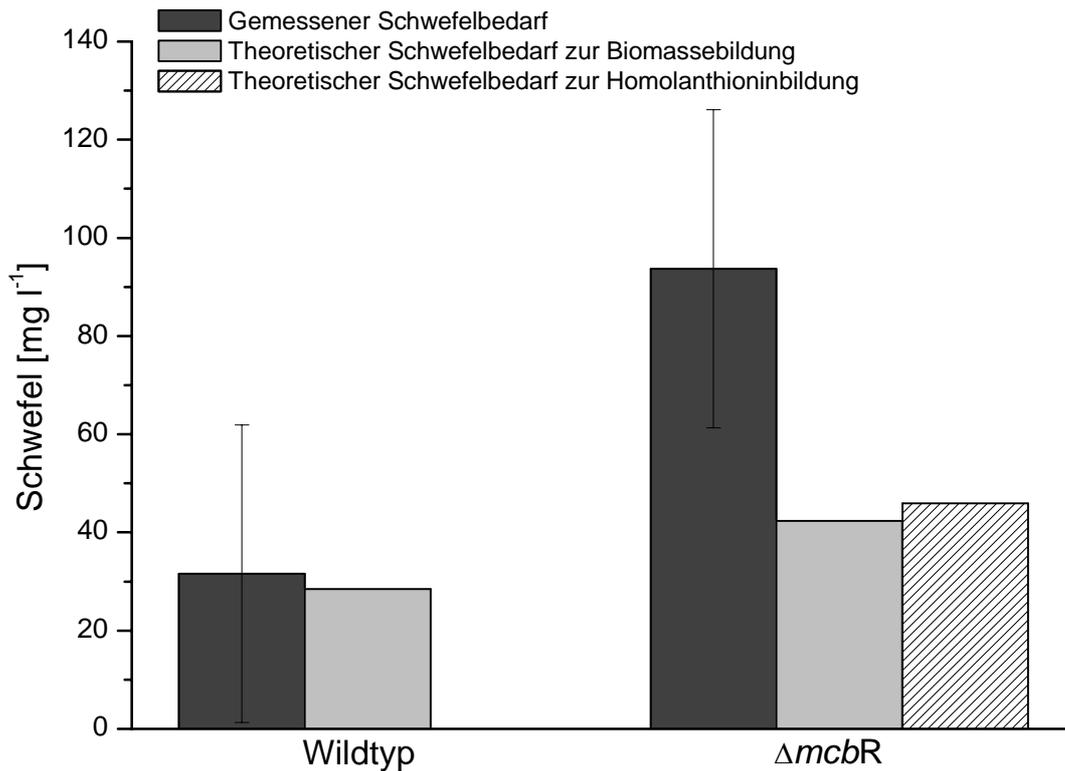


Abb. 7-22: Schwefelverbrauch und theoretischer Bedarf an Schwefel zur Bildung der Biomasse (aus Elementaranalysen) und zur Homolanthioninbildung während Wachstum von *C. glutamicum* Wildtyp und *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ im Bioreaktor auf CG12½-Minimalmedium.

Für die Berechnung der Kohlenstoffbilanz wurden die Kohlenstoffgehalte der Biomasse aus den Elementaranalysen und die OD-BTM-Korrelation zugrunde gelegt. Gemittelt über die späte exponentielle Wachstumsphase betrug die Kohlenstoffwiederfindung $84,6_{\pm 2,5}$ % für *C. glutamicum* ATCC13032 und $90,7_{\pm 1,7}$ % für *C. glutamicum* $\Delta mcbR$. Die niedrige Wiederfindung liegt sehr wahrscheinlich an einer Unterbestimmung des Kohlendioxids (vgl. Kap.7.3.5). Bei den Fermentationen wurden als Abgasleitungen Norprene[®]-Schläuche verwendet, die, wie sich später herausstellte, CO₂ recht gut diffundieren lassen (Permeabilität für CO₂ = 1200; sonst verwendete Viton[®]-Schläuche weisen nur eine Permeabilität von 79 [(cc-mmsec-cm²-cm Hg) x 10⁻¹⁰] auf (Cole-Parmer Technical Library, London, Grossbritannien)). Da beim Wildtyp im Abgas bis zu 1,8 % CO₂ (Mutant nur 1,1 %) enthalten waren, könnte dieser größere Gradient zur Umgebung zu größeren Verlusten als beim Mutanten geführt haben. Eine Unterbestimmung der Biomasse ist eher unwahrscheinlich, da der Wildtyp mit $Y_{X/S} = 0,47$ (g g⁻¹) bereits nahe der theoretischen maximalen Biomasseausbeute bei aerober Glucoseverwertung von 0,5 g g⁻¹ liegt. Aus

früheren Experimenten mit dem Wildtyp ist auch nicht zu erwarten, dass weitere Nebenprodukte akkumuliert werden, die nicht von der Analytik erfasst würden.

Die Verteilung des Kohlenstoffes in die Produkte Biomasse, CO₂ und die genannten Nebenprodukte unterschied sich bei beiden Stämmen signifikant (Abb. 7-23). Während beim Wildtyp Biomasse das Hauptprodukt war, bildete der Mutant hauptsächlich CO₂. Der Anteil der Biomasse am Gesamtkohlenstoff machte bei *C. glutamicum* ATCC13032 im Mittel 50,6 % bei $\Delta mcbR$ nur 37,3 % aus, wohingegen bei letzterem der Anteil des Kohlendioxids mit 50,8 % deutlich höher war als beim Wildtyp mit 32,6 %. Insgesamt war der Anteil der Nebenprodukte an der Gesamtbilanz eher gering, aber der Mutant akkumulierte mit 2,6 % des Kohlenstoffes fast doppelt so viele Nebenprodukte als der Wildtyp.

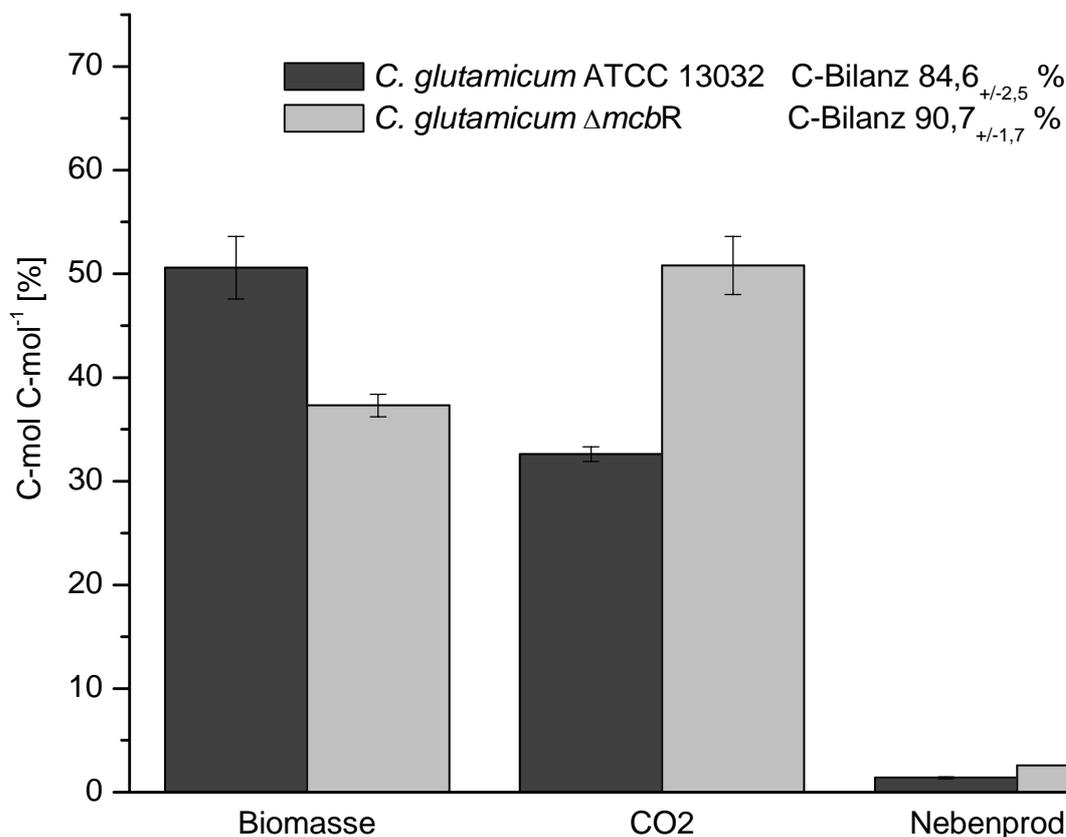


Abb. 7-23: Kohlenstoffverteilung in den Produkten Biomasse, CO₂ und Nebenprodukte in *C. glutamicum* ATCC13032 und $\Delta mcbR$ bei Fermentation im Bioreaktor auf CG12½-Minimalmedium.

7.3.4. Vergleich des Metaboloms

Im Folgenden wurde der Effekt des Regulatorknockouts auf die intrazellulären Metabolite, vor allem die intrazellulären Aminosäuren, untersucht. Hierzu wurden während exponentiellen Wachstums im Bioreaktor Zellextrakte zu unterschiedlichen Zeitpunkten genommen und die Aminosäurekonzentrationen im Zellextrakt analysiert.

Intermediate des Zentralstoffwechsels, beispielsweise Pyruvat, Fumarat oder α -Ketoglutarat, wurden in den Zellextrakten nicht analysiert, da sich die Konzentrationen dieser intrazellulären Metabolite zu schnell ändern, wenn die Zellen vor der Extraktion nicht gequ coastet werden (Wittmann *et al.*, 2004b). Die Konzentrationen der Aminosäuren wurden auf die entnommene Biomasse normiert (Angaben in $\mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$) und über die exponentielle Wachstumsphase gemittelt (9 Extrakte für den Wildtyp und 10 für den Mutanten). Die intrazellulären Aminosäurekonzentrationen wiesen für beide Stämme relativ geringe Standardabweichungen auf (Abb. 7-24; Abb. 7-25). Dies zeigt die Reproduzierbarkeit der Extraktionsmethode und gleichzeitig den „Quasi-Steady-State“-Zustand der exponentiell wachsenden Zellen.

Im Vergleich von *C. glutamicum* ATCC13032 und *C. glutamicum* ΔmcbR zeigten sich deutliche Unterschiede. Die am höchsten konzentrierten proteinogenen Aminosäuren waren in beiden Stämmen Glutamat, Glutamin, Aspartat, Alanin (Abb. 7-24) und Prolin (Abb. 7-26). Homolanthionin war in *C. glutamicum* ΔmcbR nach Glutamat die am höchsten konzentrierte Aminosäure. Homolanthionin akkumuliert im Mutanten mit $210 \mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$. Während Glutamat bei beiden Stämmen etwa gleich hoch konzentriert war (rund $385 \mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$), war die Glutaminkonzentration in ΔmcbR um 30 % deutlich erhöht (Abb. 7-24). Aspartat war im Mutant um 45 % geringer konzentriert. Die Konzentrationen von Alanin und Histidin waren in *C. glutamicum* ΔmcbR leicht erhöht, während Tyrosin, Phenylalanin und Asparagin unverändert waren. Deutliche Unterschiede zeigten der Valin-, Lysin- und Leucinpool. Valin war um 53 % geringer konzentriert, wohingegen Lysin um 76 % und Leucin um 1000 % gesteigert waren (Abb. 7-24). Die Akkumulation von zusätzlichen $3,1 \mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ Leucin ging mit einer Abnahme von $3,8 \mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ Valin einher. Es hat also den Anschein, dass das Verzweignungsverhältnis am 2-Oxoisovaleratpunkt in *C. glutamicum* ΔmcbR zugunsten von Leucin verändert ist. Rey *et al.* (2005) haben festgestellt, dass im Mutanten die Expression der Isopropylmalat-Dehydratase (LeuC) sinkt. Außerdem wird die Isopropylmalat-Synthase, das Enzym, das 2-Oxoisovalerat in den Leucinweg einschleust,

durch Leucin sehr stark reprimiert und inhibiert (Willis *et al.*, 2005). Da Isoleucin und Valin gemeinsame Enzyme für ihre Synthese benötigen und die Isoleucinkonzentration sogar ansteigt und *ilvD* (s.u.) nachweislich überexprimiert wird (Rey *et al.*, 2005), ist die Abnahme von Valin zugunsten von Leucin verwunderlich, insbesondere bei gleichzeitigem Herunterregeln von Leucingenen. Dies deutet daraufhin, dass hier der Knockout von *McbR* auch die Synthese der verzweigt-kettigen Aminosäuren sehr stark beeinträchtigt.

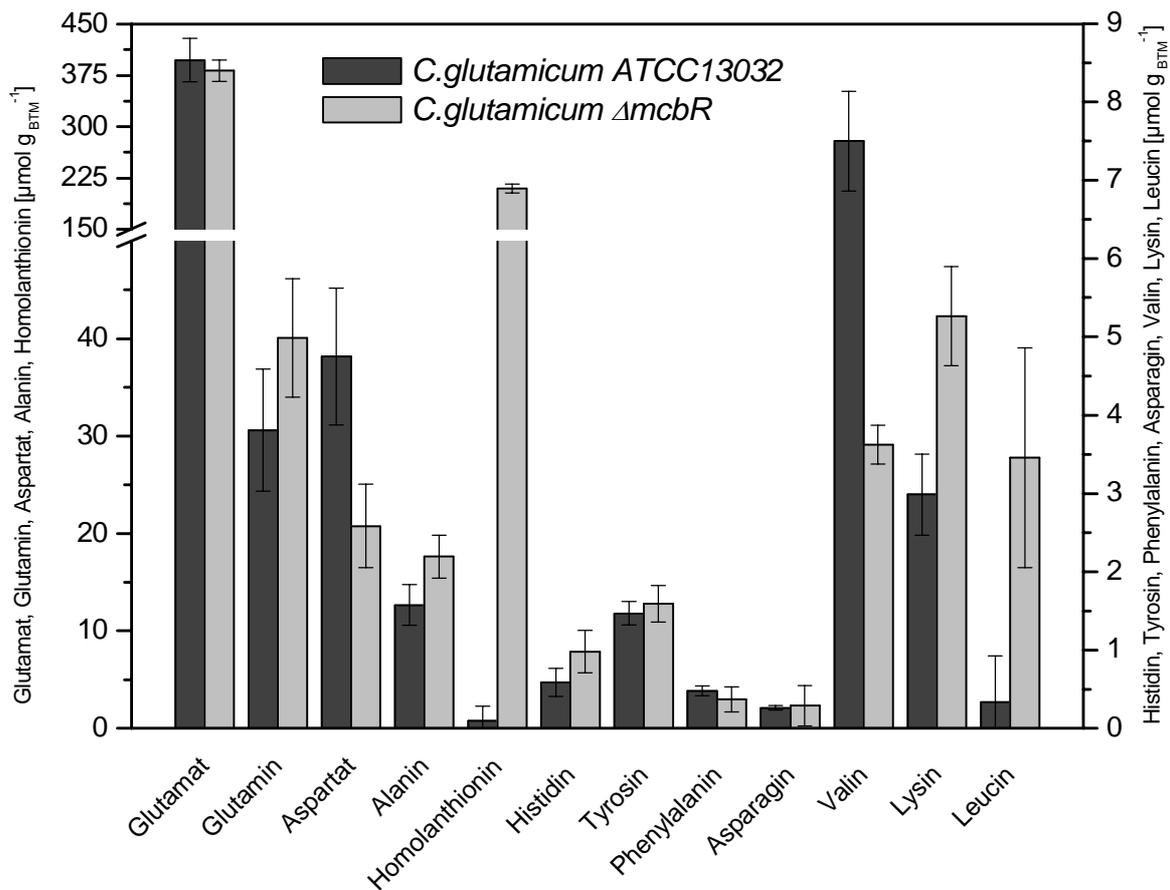


Abb. 7-24: Intrazelluläre Aminosäurekonzentrationen in *C. glutamicum* ATCC13032 und ΔmcbR bei Fermentation im Bioreaktor auf CG12½-Minimalmedium. Die Konzentrationen sind bezogen auf die Biomasse in $\mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ angegeben. Gezeigt sind Mittelwerte von aufeinander folgenden Proben aus der exponentiellen Wachstumsphase (ATCC13032 9 Extrakte; ΔmcbR 10 Extrakte).

Betrachtet man den Methioninstoffwechsel und die mit ihm zusammenhängenden Aminosäuren, so kann man erkennen, dass insbesondere Cystein und Homocystein signifikant akkumulieren (Abb. 7-25). Homocystein ist mit $3,4 \mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ mehr als 50fach

höher konzentriert als in *C. glutamicum* ATCC13032. Cystein weist in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ mit $3,0 \mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ eine 8fache Konzentration auf. Rechnet man die Konzentrationen auf das Cytoplasmavolumen von *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ $2,98 \mu\text{l mg}_{\text{BTM}}^{-1}$ um (vgl. Kap. 7.3.2), ergeben sich Konzentrationen von 1,1 mM bzw. 1,0 mM. Die Cystathionin- β -Lyase (MetC) wird von Cystein und Glycin inhibiert. Allerdings liegen die Hemmkonzentrationen höher als die hier beobachteten. Das Enzym wurde *in vitro* zu 83 % bei 10 mM Cystein und zu 45 % bei 5 mM Glycin gehemmt (Lee, 2005). Man kann also davon ausgehen, dass es hier *in vivo* aktiv war und in der Lage wäre, Homolanthionin zu spalten. Zwar weist MetC für Homolanthionin wahrscheinlich einen sehr hohen K_M -Wert auf (vgl. Kap. 7.2.6), das Enzym sollte allerdings angesichts der intrazellulären Konzentration von 70 mM Homolanthionin und 0,22 mM Cystathionin (K_M -Wert für Cystathionin 110 μM) auch Homolanthionin umsetzen. Die Umrechnung auf das Cytoplasmavolumen kann hier nur als Näherung angesehen werden, da sich Mutant und Wildtyp auch in ihrer Masse unterscheiden können.

Die intrazelluläre Cystathioninkonzentration steigt mit $0,65 \mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ im Mutanten auf das 2,5 fache des Wildtypwertes an. Obwohl Cystein und Homocystein etwa gleich konzentriert sind, akkumuliert MetB also viel mehr Homolanthionin als Cystathionin. Ein Grund dafür könnte die schlechte Spaltung von Homolanthionin durch MetC sein. Für die Synthese des Homolanthionins wird letztlich die doppelte Menge Homoserin benötigt. Dies erklärt das Absinken des Homoserinpools, obwohl die Homoserin-DH in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ 1,8fach stärker transkribiert wird (Rey *et al.*, 2005). Dies könnte auch der Grund für ein Absinken der Aspartatkonzentration sein, da die Metabolite in den Methioninstoffwechsel verlagert werden. Gleichzeitig hängt die Synthese von Threonin direkt vom Homoserin ab, wodurch auch diese intrazelluläre Konzentration absinkt. Interessanterweise steigt die Isoleucinkonzentration an, was darauf hindeutet, dass in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ aufgrund der Spaltung von Homolanthionin eine erhöhte Menge an 2-Oxobutanoat vorliegen könnte. 2-Oxobutanoat stimuliert die Transkription von *ilvB* einem Gen des Isoleucinstoffwechsels. Außerdem wurde beobachtet, dass in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ die Dihydroxysäure-Dehydratase (*ilvD*) verstärkt exprimiert wird (vgl. Kap. 7.3.6) (Rey *et al.*, 2005). Über die Regulation der Genexpression von *ilvD* liegen noch kaum Erkenntnisse vor (Willis *et al.*, 2005), es könnte jedoch sein, dass auch hier 2-Oxobutanoat eine Rolle spielt.

Der intrazelluläre Methioninpool steigt auf $0,4 \mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$. Beim Wildtyp war Methionin nicht messbar. Angesichts des in großen Mengen vorhandenen Vorläufers Homocystein ist dieser Anstieg jedoch bescheiden. Dies zeigt, dass offensichtlich in *C. glutamicum* die Expression der Methioninsynthase nicht von Homocystein reguliert werden, wie dies bei anderen Organismen der Fall ist (Kacprzak *et al.*, 2003). Tatsächlich konnte in Proteomstudien keine Erhöhung der Konzentrationen von MetE und MetH in *C. glutamicum* ΔmcbR beobachtet werden (vgl. Kap. 7.3.6). Allerdings bewirkte die früher für *C. glutamicum* ΔmcbR beschriebene Überexpression der SAM-Synthase (MetK) (Rey *et al.*, 2005; Rey *et al.*, 2003) einen Anstieg des intrazellulären S-Adenosylmethionins um 64 % auf $1 \mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ bzw. 0,33 mM. Dies entspricht der 1,5fachen Hemmkonzentration (50 % Inhibition bei 0,26 mM SAM) der Homoserin-Transacetylase (MetX) (Lee, 2005). Möglicherweise ist dies der Grund, weshalb die Konzentration von O-Acetylhomoserin sinkt, da dieses für die Homolanthioninsynthese schnell verbraucht wird und wegen der reduzierten Aktivität von MetX nur wenig nachgeliefert wird.

Serin und Glycin sinken beide im Mutanten ab. Bei erhöhter Methioninsynthese würde man eine Erhöhung der Glycinkonzentration erwarten. Da diese intra- und extrazellulär absinkt, könnte dies auf einen Mangel an Methylgruppendonoren für die Methioninsynthese hindeuten. Die hohe Akkumulation von Homocystein bei nur leicht ansteigender intrazellulärer Methioninmenge deutet daraufhin, dass die Methylierung der limitierende Schritt ist. Da Serin in etwa in gleicher Menge absinkt wie Cystein ansteigt, könnte ein Mangel an Serin für die ausbleibende Methioninüberproduktion mitverantwortlich sein.

Parallele Kultivierung von *C. glutamicum* ΔmcbR im Schüttelkolben mit und ohne zusätzlich 10 mM Serin (je 3 Extrakte) auf CG12½-Minimalmedium führte zu einer Steigerung der intrazellulären Cysteinkonzentration von $2,6_{\pm 0,3}$ auf $4,5_{\pm 0,3} \mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$. Gleichzeitig erhöhte sich auch die Glycinkonzentration deutlich und die Methioninkonzentration stieg von $0,42_{\pm 0,06}$ auf $0,71_{\pm 0,12} \mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ um rund 70 % an. Anhand der intrazellulären Konzentration von $47,8_{\pm 5} \mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ Serin kann die Versorgung des C₁-Stoffwechsels mit Serin allerdings als limitierender Faktor der Methioninsynthese ausgeschlossen werden. Es wurde auch beobachtet, dass in ΔmcbR ein Methioninimporter (*metD*) induziert wird (Rey *et al.*, 2005; Trotschel *et al.*, 2005). Wäre jedoch der Methioninexport limitierend in der Überproduktion von Methionin, würde man viel höhere intrazelluläre Konzentrationen erwarten. Zwar wurde bislang nicht beobachtet, dass MetE oder MetH *feedback* inhibiert

werden (Lee, 2005), aber die ausbleibende Akkumulation von Methionin bei gleichzeitiger Fütterung von Serin könnte darauf hindeuten. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass die Expression der Methioninsynthasen posttranskriptionell reguliert ist.

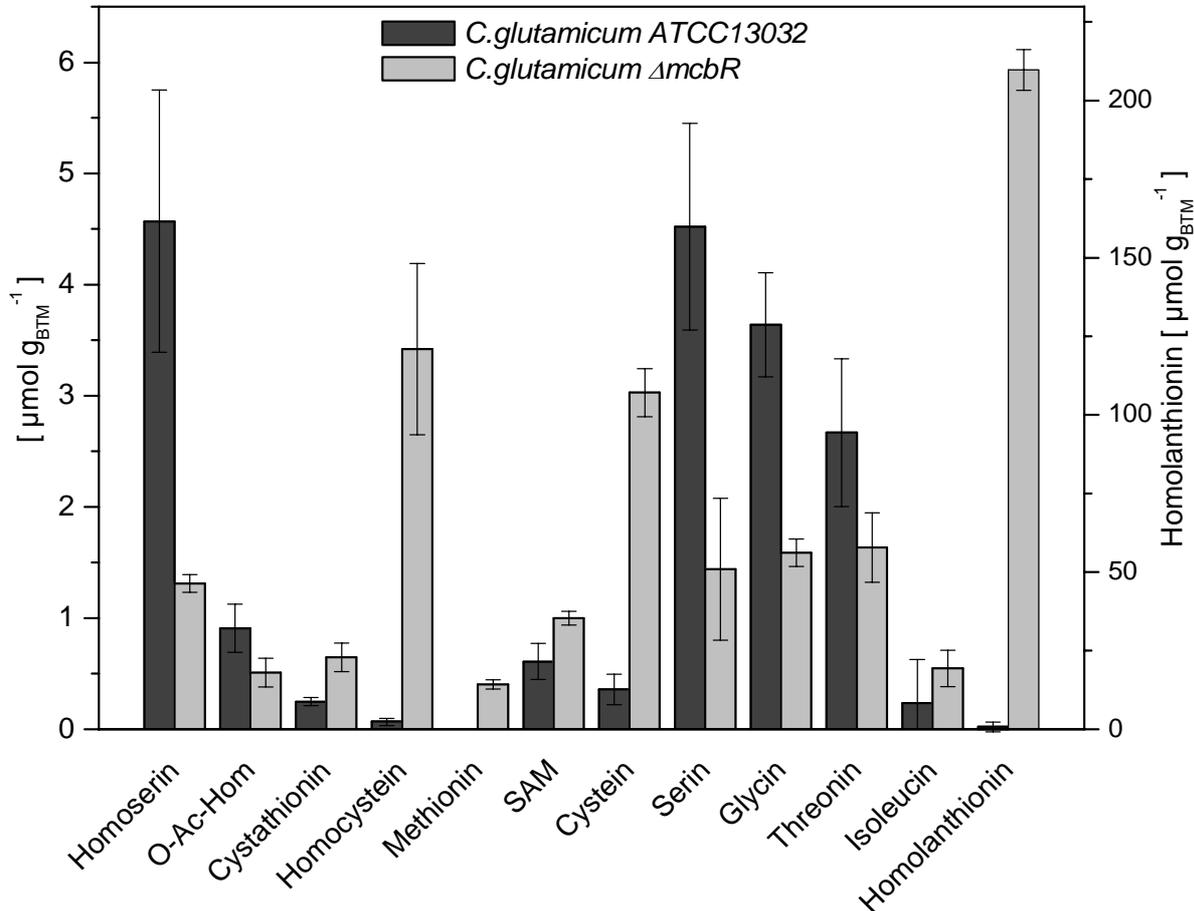


Abb. 7-25: Intrazelluläre Aminosäurekonzentrationen des Methioninstoffwechsels und involvierte Aminosäuren in *C. glutamicum* ATCC13032 und ΔmcbR bei Fermentation im Bioreaktor auf CG12½-Minimalmedium. Die Konzentrationen sind bezogen auf die Biomasse in $\mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ angegeben. Gezeigt sind Mittelwerte aus der exponentiellen Wachstumsphase (ATCC13032 10 Extrakte; ΔmcbR 10 Extrakte).

Die intra- und extrazellulären Konzentrationen der beiden kompatiblen Solute Prolin und Trehalose wiesen in Mutant und Wildtyp eine unterschiedliche Verteilung auf. Beide Stoffe spielen bei *C. glutamicum* eine wichtige Rolle in der Osmoregulation. Es wurde beobachtet, dass Trehalose vor allem bei Stickstofflimitierung und Prolin bei ausreichender Stickstoffversorgung akkumuliert wird (Morbach und Krämer, 2005b). Eine Stickstofflimitierung kann hier ausgeschlossen werden, da das CG12½-Medium sehr reich an Stickstoff ist. Im Mittel akkumulierte der Wildtyp $32 \mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ Prolin und $9 \mu\text{mol}$

$\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$ Trehalose und *C. glutamicum* ΔmcbR 17 $\mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ Prolin und 62 $\mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ Trehalose (Abb. 7-26). Es fällt auf, dass die Konzentrationen im Mutant für Prolin etwa 50 % niedriger und für Trehalose 4,5fach höher lagen. Die intrazelluläre Trehalosekonzentration spiegelte sich auch extrazellulär wieder, allerdings waren hier die Konzentrationen deutlich höher. Die extrazelluläre Trehalosekonzentration (mM) wurde zur besseren Vergleichbarkeit auf die Biomasse bezogen. Hierzu wurden die Konzentrationsverhältnisse von extrazellulärer Trehalose zu Biomasse über die exponentielle Wachstumsphase gemittelt. Das Verhältnis von Biomasse zu Trehalose blieb während dieser Phase relativ konstant, d.h. die spezifischen Trehalosebildungsraten und die Wachstumsraten änderten sich kaum, was durch die geringe Standardabweichung erkennbar ist. Beim Wildtyp betrug die normierte mittlere Trehalosekonzentration 35 $\mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ und beim Mutant 158 $\mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$.

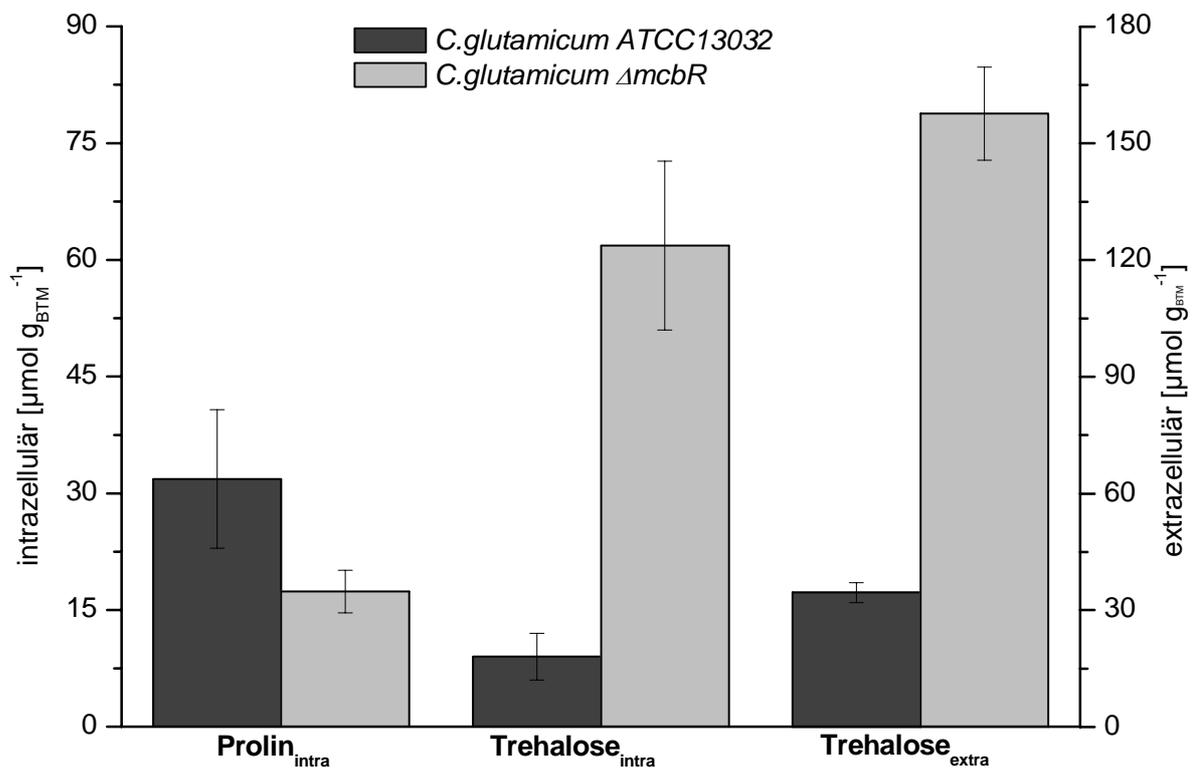


Abb. 7-26: Intra- und extrazelluläre Konzentrationen der kompatiblen Solute Prolin und Trehalose. Prolin war extrazellulär nicht nachweisbar. Die extrazelluläre Trehalosekonzentration wurde zur besseren Vergleichbarkeit auch auf die Biomasse normiert.

Extrazelluläres Prolin konnte weder beim Wildtyp noch beim Mutanten gemessen werden. Eine Ammoniumlimitierung ist zwar eher unwahrscheinlich, aber die intrazelluläre Verfügbarkeit von Ammonium könnte einen Einfluss auf die Bildung der beiden Solute haben. Da der Mutant in den Elementaranalysen einen Stickstoffgehalt von 8,7 % und der Wildtyp einen Anteil von 9,6 % aufwies, könnte dies auf eine geringere Ammoniumversorgung im Mutanten hindeuten. Die Akkumulation von $210 \mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ Homolanthionin sollte den Stickstoffgehalt in *C. glutamicum* ΔmcbR sogar um 0,58 Prozentpunkte anheben. Es ist also denkbar, dass der Stickstoffgehalt in der Biomasse ohne Homolanthionin noch geringer war. In diesem Kontext fällt auch auf, dass die intrazelluläre Glutaminkonzentration in ΔmcbR ca. 30 % höher war, als im Wildtyp (Abb. 7-24). Es ist bekannt, dass sich die Aktivität der Glutaminsynthetase in *C. glutamicum* reziprok zur Ammoniumkonzentration verhält (Burkovski, 2005). Ammonium wird also bei hohen Konzentrationen durch die Glutamatdehydrogenase und bei niedrigeren Konzentrationen verstärkt durch die Glutaminsynthetase fixiert. Die erhöhte Konzentration von Glutamin könnte auf eine erhöhte Ammoniumfixierung durch die Glutaminsynthetase hinweisen und damit ein Indiz für eine geringere Versorgung des Mutanten mit Ammonium sein, insbesondere durch den gesteigerten Bedarf für die Synthese der Diaminosäure Homolanthionin.

Eine andere Ursache für die veränderte Verteilung der Solute Prolin und Trehalose könnte auch der gesteigerte Bedarf an NADPH sein. Benötigt *C. glutamicum* normalerweise 16,4 mmol NADPH je gebildetes Gramm Biotrockenmasse (Wittmann und de Graaf, 2005), so wurde der Bedarf in *C. glutamicum* ΔmcbR durch die Akkumulation von Homolanthionin deutlich gesteigert. Zur Synthese von 1 mmol Homolanthionin werden 10 mmol NADPH benötigt. Diese Diaminosäure ist also, was den Bedarf an Reduktionskraft anbelangt, für die Zelle noch teurer als Methionin. Insgesamt werden also je Gramm Zellen zusätzlich noch 2,1 mmol NADPH für die Synthese von Homolanthionin gebraucht. Dies steigert den Gesamtbedarf an NADPH um 12,8 %. Die Synthese von Prolin benötigt 3 NADPH (Wittmann und de Graaf, 2005), während die Synthese von Trehalose ohne NADPH auskommt. Die Akkumulation von Trehalose anstelle von Prolin könnte also nicht nur von der Stickstoffverfügbarkeit, sondern auch von der Verfügbarkeit von NADPH abhängen.

Insgesamt fällt auf, dass der Mutant mehr Solute akkumuliert als der Wildtyp. Es deutet darauf hin, dass der osmotische Druck im Mutanten verändert ist. Eine Ursache könnte die

Akkumulation von Homolanthionin sein, oder die gesteigerte Sulfataufnahme, die in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ vermutlich vorliegt (Rey *et al.*, 2005). Aber auch die gesteigerte Zellgröße und der Einschlusskörper könnten hier eine Rolle spielen. Dies bleibt zu klären. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die drastische Akkumulation von Homolanthionin zeigte, dass der Metabolismus von *C. glutamicum* in der Lage ist, große Mengen an C₄-Vorläufern und reduziertem Schwefel zur Methioninsynthese bereitzustellen. Die geringe intrazelluläre Akkumulation von Methionin lässt entweder auf einen Mangel an Methylgruppen, oder eine starke Regulation der beiden Methioninsynthasen schließen. Die schwache intrazelluläre Akkumulation zeigt aber auch, dass Transportprozesse gegenwärtig wahrscheinlich nicht für die ausbleibende extrazelluläre Akkumulation verantwortlich sind.

7.3.5. Vergleich des Fluxoms

Es wurden anhand der stöchiometrischen Daten, den extrazellulären Flüssen und ¹³C-Markierungsdaten Flussberechnungen für die intrazellulären Flussverteilungen in *C. glutamicum* ATCC 13032 und *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ durchgeführt. Die Berechnungen erfolgten anhand der bereitgestellten Daten durch C. Wittmann. Die Akkumulation von Homolanthionin wurde für den Mutanten als Bestandteil der Biomasse in das Modell integriert. Die Flüsse sind als relative Flüsse bezogen auf die Glucoseaufnahmerate dargestellt. Der Vergleich zwischen experimentell bestimmten Markierungsverteilungen und theoretisch im Modell berechneten befindet sich im Anhang. Die Konfidenzintervalle waren vergleichbar mit denen vorheriger Arbeiten (vgl. Kap. 6.6.11) und sind hier nicht mehr explizit dargestellt.

Substrataufnahme

Die Glucoseaufnahme beträgt zum Zeitpunkt der Flussanalyse beim Wildtyp 4,7 mmol (g h)⁻¹, bei $\Delta mcbR$ 2,72 mmol (g h)⁻¹. Die niedrigere Glucoseaufnahmerate in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ korreliert sehr gut mit den Beobachtungen von Rey *et al.* (2005), die herausgefunden haben, dass die Expression von Komponenten des Phosphotransferasesystems deutlich abnimmt. Während durchschnittlich die Expression der PTS-Gene auf 62 % des Wildtypniveaus fällt, sinkt die Glucoseaufnahmerate auf 58 %. Dies zeigt eine direkte Korrelation zwischen Genexpression und Fluss für das PTS. Eine solche Korrelation wurde

bereits bei dem lysinproduzierenden *C. glutamicum* ATCC13287 beobachtet (Krömer *et al.*, 2004).

Glykolyse, PPP und Anaplerose

Betrachtet man die Flussverteilungen im Zentralstoffwechsel von *C. glutamicum* Wildtyp und der $\Delta mcbR$ -Mutante, zeigen sich Unterschiede. Im Mutanten reduziert sich der relative Fluss in den PPP von 44,3 % auf 39,0 % der aufgenommenen Glucose (Abb. 7-27; Abb. 7-28). Analog dazu ist der relative Fluss in die Glykolyse beim Wildtyp mit 53,1 % etwas niedriger als im Mutanten mit 57,7 %. Gleichzeitig nimmt der anaplerotische Fluss vom C₃-Pool zum Oxalacetat im Mutanten von 27,5 % auf 23,8 % ab und die Reversibilität, das Verhältnis zwischen Rückfluss und Nettofluss, steigt von 0,7 auf 1,0. Dies korreliert gut mit der niedrigeren Expression der Pyruvatcarboxylase (Rey *et al.*, 2005) und der höheren Expression der PEP-Carboxykinase (vgl. Kap. 7.3.6) in $\Delta mcbR$. Eine Hemmung der Pyruvatcarboxylase durch Aspartat (Koffas *et al.*, 2002), kann hier ausgeschlossen werden, da im Mutanten ja eine niedrigere Aspartatkonzentration beobachtet wurde. Bei Lysinproduzenten geht die Produktion von Lysin mit einem erhöhten Nettofluss durch die Anaplerose, einer verminderten Reversibilität und einem erhöhten Fluss in den PPP einher (Wittmann und Heinzle, 2002). Gleiches könnte man auch bei der Synthese von Methionin bzw. Homolanthionin erwarten, da hier der Bedarf an NADPH deutlich größer ist als bei Lysin. Für *Corynebacterium lilium* wurde tatsächlich ein erhöhter anaplerotischer Fluss bei steigender Methioninproduktion beobachtet (Kumar *et al.*, 2005). *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ zeigt allerdings eine völlig gegenläufige Umverteilung der Kohlenstoffflüsse. Grund ist hier wahrscheinlich die deutliche Reduktion der Wachstumsrate (vgl. Kap. 7.3.3), die mit der Akkumulation von Homolanthionin einhergeht.

Die extrazelluläre Akkumulation von Dihydroxyaceton und Glycerin spiegelt sich beim Mutanten in einem entsprechenden Fluss wider. Dies deutet auf eine limitierende Aktivität der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-DH bei *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ hin (Dominguez *et al.*, 1998). Interessanterweise haben Proteomanalysen ergeben, dass dieses Enzym im Mutanten stärker exprimiert wird als im Wildtyp (vgl. Kap. 7.3.6). Dies könnte ein Hinweis auf ein gestiegenes NADH/NAD⁺ Verhältnis sein, da die Aktivität des Enzyms negativ mit der Größe dieses Verhältnisses korreliert (Dominguez *et al.*, 1998).

TCA-Zyklus

Durch die Bildung von Homolanthionin hat der Mutant einen zusätzlichen Bedarf von 420 $\mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ an Oxalacetat (2 Moleküle je Homolanthionin). Beim Wildtyp beträgt der Bedarf insgesamt 1680 $\mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ (Wittmann und de Graaf, 2005). Dies entspricht einer Steigerung um 25 %. Gleichzeitig sinkt der anaplerotische Fluss um 14 % ab. Der Mutant scheint also seinen Oxalacetatbedarf hauptsächlich durch einen erhöhten TCA-Fluss zu decken. Tatsächlich steigt der Fluss in den TCA-Zyklus von 58,5 % auf 88,5 % deutlich an. Absolut gesehen ist der Fluss im TCA bei beiden mit 2,75 und 2,41 mmol (g h)^{-1} sogar sehr ähnlich, während im Mutanten die Flüsse in den Anabolismus und PPP relativ und absolut gesehen niedriger sind. Die erhöhte Aktivität des TCA-Zyklus spiegelt sich auch im höheren Anteil von CO_2 an der Kohlenstoffbilanz in ΔmcbR wider (Abb. 7-23). Gleichzeitig führt der erhöhte Fluss wohl auch zur Akkumulation von Succinat im Medium. Succinat ist ein typischer Overflow-Metabolit des TCA-Zyklus. Grund für den hohen Fluss im TCA-Zyklus könnte ein erhöhter Energiebedarf sein. Obwohl die Zellen langsamer wachsen, ist es denkbar, dass die Zellen einen höheren Bedarf an ATP für den Erhaltungsstoffwechsel haben. Außerdem zeigten die Transkriptanalysen die Überexpression von insgesamt 11 Genen, die zu mindestens 3 verschiedenen ABC-Transportern gehören (Rey *et al.*, 2005), was den Bedarf an ATP sicherlich auch steigern könnte. Dagegen spricht allerdings, dass Rey *et al.* (2005) eine verminderte Genexpression von Komponenten der ATP-Synthase in *C. glutamicum* ΔmcbR beobachtet haben. Vielleicht gleichen die Zellen mit dem erhöhten TCA-Fluss auch die geänderte Expression von PEP-CK und Pyc aus.

Ein weiterer Grund könnte auch ein gestiegener Bedarf an NADH oder FADH sein. In früheren Studien mit einem Lysinproduzenten wurde beobachtet, dass sich der Fluss in den PPP bei Austausch der NADPH-abhängigen Glutamatdehydrogenase von *C. glutamicum* gegen ein NADH-abhängiges Enzym reduzierte und der TCA-Fluss gesteigert wurde (Marx *et al.*, 1999). Zwar weist ΔmcbR vor allem durch die Akkumulation von Homolanthionin einen gestiegenen NADPH-Bedarf je g_{BTM} auf, aber gleichzeitig werden auch NADH abhängige Enzyme, wie z.B. eine putative NADH-abhängige Oxidoreduktase, oder FADH-abhängige Flavoproteine wie die Sulfitreduktase oder ein putatives Elektronentransferprotein induziert (Rey *et al.*, 2005). Dies könnte zu erhöhtem oxidativem Stress führen (vgl. Kap. 7.3.7). Im Hinblick auf die Methioninproduktion zeigt dies, dass der Knockout von *mcbR* problematisch ist, da für eine hohe Methioninausbeuten einerseits ein niedriger TCA-Fluss

Die Reversibilitäten befinden sich in Klammern. Die Flüsse sind auf die spezifische Glucoseaufnahme q_{Glc} zum Zeitpunkt der Flussanalyse normiert. Diese ist neben dem Fluss des PTS angegeben.

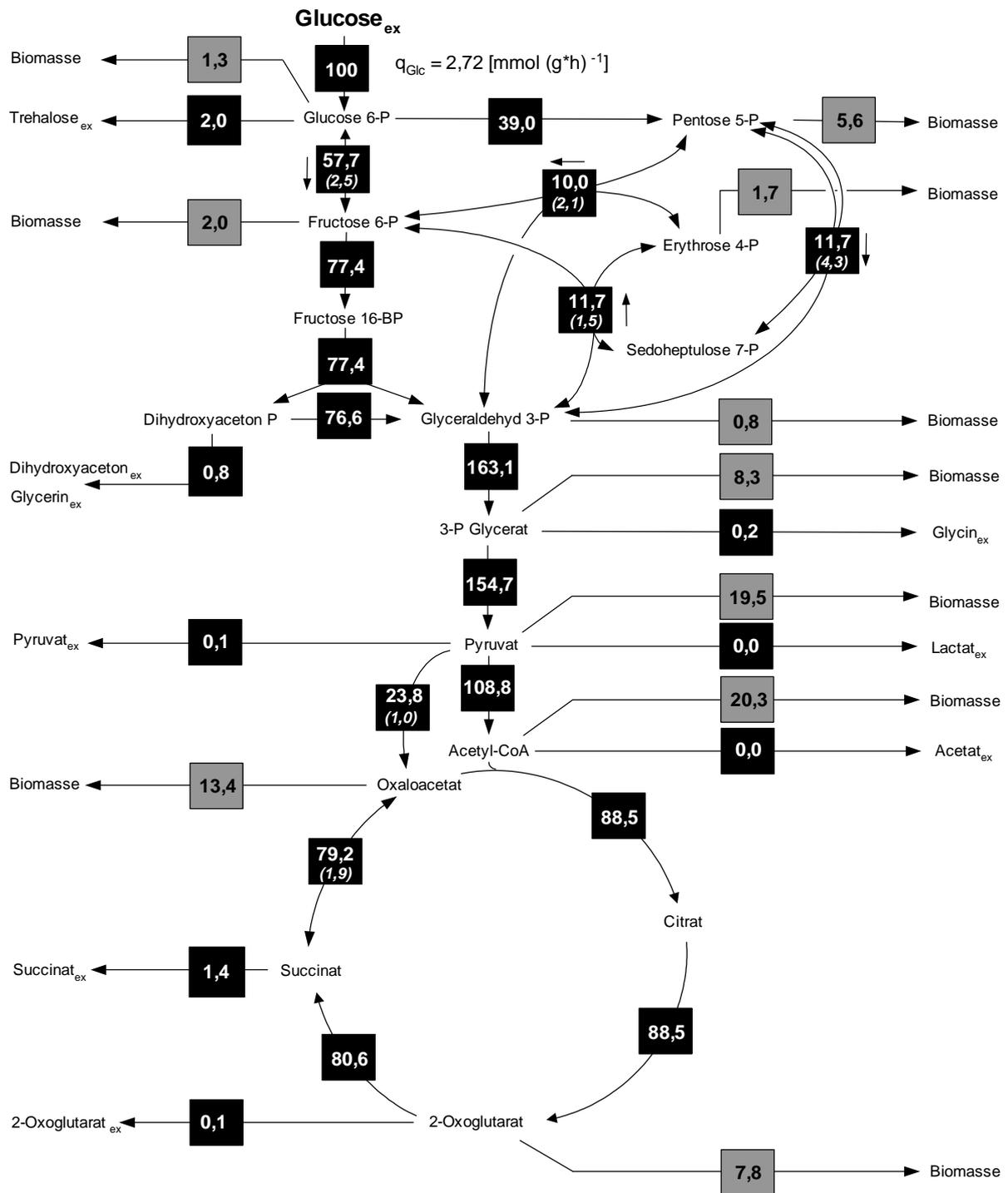


Abb. 7-28: Flussverteilung in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ bei Wachstum auf CG12½-Minimalmedium im Bioreaktor. Anabole Flüsse sind grau unterlegt. Reversible Reaktionen sind mit den Nettoflüssen angegeben. Die Reversibilitäten befinden sich in Klammern. Die Flüsse sind auf die spezifische Glucoseaufnahme q_{Glc} zum Zeitpunkt der Flussanalyse normiert. Diese ist neben dem Fluss des PTS angegeben.

NADPH-Bilanz

C. glutamicum verfügt im Zentralstoffwechsel über vier Enzyme, die NADP⁺ reduzieren: Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, Gluconate-6-phosphat-Dehydrogenase, Isocitrat-Dehydrogenase und das Malatenzym. Da NADPH nicht in die Flussberechnungen einfließt, kann man anhand der Flüsse durch diese Reaktionen die NADPH-Produktion quantifizieren. Der molare Gesamtfluss zur NADP⁺-Reduktion beträgt im Wildtyp 146,9 % und im Mutant 166,5 %. Errechnet man den erforderlichen molaren Flux für die Biomassesynthese, ergibt sich für den Wildtyp 146,14 % und für den Mutant 118,6 %. Die Bilanz ist für den Wildtyp also ausgeglichen. In früheren Studien wurde bei *C. glutamicum* Wildtyp ein NADPH-Überschuss von 67 % beobachtet (Sonntag *et al.*, 1995), gleichzeitig lagen aber auch geringere Biomasseausbeuten und Wachstumsraten vor, was sicher durch ein unterschiedliches Minimalmedium (Eikmanns *et al.*, 1991) erklärbar ist. *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ verfügt dagegen über einen NADPH-Überschuss von 47,9 %, obwohl der NADPH-Bedarf für die Homolanthioninsynthese bereits in die Berechnung des theoretischen Bedarfs eingeflossen ist. Einen NADPH-Überschuss wurde bei *C. glutamicum* während der Lysinproduktion in früheren Arbeiten ebenfalls beobachtet (Wittmann und Heinzle, 2001; Wittmann und Heinzle, 2002). Dieser Überschuss könnte dazu dienen, reaktive Sauerstoffspezies in NADPH-abhängigen Reaktionen zu entgiften, wie es bei *E. coli* (Brumaghim *et al.*, 2003; Iuchi und Weiner, 1996) oder *Staphylococcus aureus* (Streker *et al.*, 2005) der Fall ist (vgl. Kap. 7.3.7). Außerdem könnte die Synthese des noch unbekanntem Einschlusskörpers auch zu einem gesteigerten Bedarf an NADPH führen.

Eine weitere Möglichkeit, wie *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ einen Überschuss an NADPH, wie er bei früheren Studien mit *C. glutamicum* während der Lysinproduktion oft beobachtet wurde (Wittmann und de Graaf, 2005), abbauen könnte, ist die Oxidation von NADPH durch Enzyme der Atmungskette. Matsushita *et al.* (2001) haben beobachtet, dass die NADH-Dehydrogenase II von *C. glutamicum* auch NADPH-Oxidase und NADPH-Ubiquinone-1-Oxidoreduktase-Aktivitäten besitzt (Matsushita *et al.*, 2001). Es könnte also sein, dass NADPH tatsächlich in die Atmungskette fließt. Allerdings ist fraglich, ob die Elektronen dort wirklich die oxidative Phosphorylierung antreiben, da z.B. in *E. coli* die NADH-Dehydrogenase II neben der Sulfitreduktase die Hauptquelle von reaktiven Sauerstoffspezies ist (Messner und Imlay, 1999). Tatsächlich wird in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ eine NAD(P)H-

Quinon-Oxidoreduktase induziert (s.u.). Dies könnte erklären, was mit dem überschüssigen NADPH passiert und eventuell auch, wie der erhöhte oxidative Stress entsteht.

Redoxbilanz

Anhand der berechneten Flüsse lässt sich eine Redoxbilanz aufstellen. Dies ist möglich, da weder NADPH- noch FADH/NADH (XADH) in die Berechnungen der Flüsse einfließen. Die Redoxbilanz wurde auf zwei unterschiedliche Arten erstellt (Yang *et al.*, 2006). Es wurden alle Flüsse als absolute Flüsse (bezogen auf die Glucoseaufnahme in $\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$) bilanziert die NADPH und XADH bilden und verbrauchen. Diese Berechnung ergibt den Nettoüberschuss an NADPH und XADH als spezifische Raten q_{XADH} und q_{NADPH} $\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$. Ist die Redoxbilanz geschlossen, sollte der Nettoüberschuss der doppelten experimentell bestimmten Sauerstoffaufnahme $q_{\text{O}_2 \text{ exp}}$ $\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ entsprechen (Gl. 7-2).

$$q_{\text{O}_2 \text{ exp}} = \left(\frac{1}{2} q_{\text{XADH}} + \frac{1}{2} q_{\text{NADPH}} \right) \quad \text{Gl. 7-2}$$

Die Abweichung von $q_{\text{O}_2 \text{ exp}}$ und der halben Summe von q_{XADH} und q_{NADPH} lässt sich prozentual darstellen.

$$\frac{q_{\text{O}_2}}{\left(\frac{1}{2} q_{\text{XADH}} + \frac{1}{2} q_{\text{NADPH}} \right)} * 100 = 100\% \quad \text{Gl. 7-3}$$

Eine andere Möglichkeit eine Redoxbilanz zu erstellen, ist die Verwendung des respiratorischen Quotienten und der spezifischen CO_2 -Bildungsrate $q_{\text{CO}_2 \text{ calc}}$. Hierbei werden auch alle Reaktionen bilanziert in denen CO_2 gebildet und verbraucht wird und schließlich eine Nettoproduktionsrate für CO_2 $q_{\text{CO}_2 \text{ calc}}$ in $\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ berechnet (Gl. 7-4). Der berechnete RQ_{calc} kann dann direkt mit dem experimentell bestimmten Wert RQ_{exp} verglichen werden.

$$\text{RQ}_{\text{calc}} = \frac{2q_{\text{CO}_2 \text{ calc}}}{(q_{\text{XADH}} + q_{\text{NADPH}})} \quad \text{Gl. 7-4}$$

Die Redoxbilanz zeigte mit beiden Methoden unterschiedliche Ergebnisse (Tabelle 7-6). Bei Verwendung des Respiratorischen Quotienten war die Bilanz für beide Stämme im Rahmen der Messgenauigkeit geschlossen. Die Bilanzierung anhand der Sauerstoffaufnahme war jedoch nicht annähernd geschlossen. So wurden beim Wildtyp nur 65,7 %, beim Mutanten 75,5 % erreicht. Grund hierfür ist höchstwahrscheinlich die Abgasmessung.

Tabelle 7-6: Redoxbilanz für *C. glutamicum* Wildtyp und $\Delta mcbR$. Berechnet wurde die Bilanz mit zwei unterschiedlichen Methoden (vgl. Text).

	Wildtyp	$\Delta mcbR$
$q_{\text{NADPH calc}} [\text{mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}]$	0.03	1.82
$q_{\text{XADH calc}} [\text{mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}]$	19.40	14.47
$q_{\text{O}_2 \text{ exp}} [\text{mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}]$	6.38	6.15
Bilanz q_{O_2} [%]	65,7	75,5
$q_{\text{CO}_2 \text{ calc}} [\text{mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}]$	10.36	8.19
RQ_{exp}	1.037	1.056
RQ_{calc}	1.066	1.006
Bilanz RQ [%]	102,8	95,2

Wie bereits bei der Kohlenstoffbilanz erwähnt (vgl. Kap. 7.3.3), wurden bei den Fermentationen im Bioreaktor relativ gasdurchlässige Schläuche in Teilen der Abgasleitung verwendet. Eine Erniedrigung der CO_2 -Konzentration und eine Erhöhung der O_2 -Konzentration im Abgas sind deshalb wahrscheinlich. Dadurch sinken $q_{\text{CO}_2 \text{ exp}}$ und $q_{\text{O}_2 \text{ exp}}$. Verwendet man dagegen den RQ-Wert zur Berechnung wird die fehlerhafte Abgasmessung kompensiert, wenn sich das Verhältnis der Raten $q_{\text{CO}_2 \text{ exp}}$ und $q_{\text{O}_2 \text{ exp}}$ nicht ändert. Dies scheint hier der Fall zu sein. Für die Kohlenstoffbilanz bedeutet dies, dass sehr wahrscheinlich eine Unterbestimmung des Kohlendioxids für die relativ geringe Kohlenstoffwiderfindung von 84,6 % beim Wildtyp und 90,7 % bei $\Delta mcbR$ verantwortlich ist.

7.3.6. Vergleich des Proteoms

Das Proteom von *C. glutamicum* Wildtyp und der Regulatorknockoutmutante wurde anhand von 2D-Polyacrylamidgelen aus jeweils 4 Proben aus zwei unabhängigen Fermentationen im Bioreaktor untersucht. Anhand von Gelüberlagerungen wurden 54 Proteinspots entdeckt, die signifikante Unterschiede in der Intensität zwischen Wildtyp und Mutante zeigten (Abb. 7-29). Diese Spots wurden ausgestanzt und identifiziert. Von diesen 54 Spots waren nur 6 Spots im Mutanten kleiner als im Wildtyp. Dies unterstreicht die Funktion von McbR als transkriptioneller Repressor (Rey *et al.*, 2005).

Auf alle Gele wurde die gleiche Proteinmenge aufgetragen. Die "Konzentrationen" der Proteine errechnen sich aus dem Integral sämtlicher Pixel in der detektierten Spotfläche, sind also das Volumenintegral des dreidimensionalen Spots (BASF, Dr. H. Platsch persönliche Mitteilung). Dadurch erhält man eine relative Proteinmenge eines einzelnen Proteins auf dem Gel. Dies wurde bei beiden Stämmen für insgesamt 4 unabhängige Gele gemacht und die relative Proteinmenge der Spots in Wildtyp und $\Delta mcbR$ als Mittelwerte berechnet. Dies ermöglicht eine relative Quantifizierung einzelner Proteine (Tabelle 7-7).

Rey *et al.* (2005) haben eine McbR-Bindestelle vor 22 Genen identifiziert, die in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ überexprimiert waren. Insgesamt wurden allerdings 86 Gene stärker und 51 Gene in $\Delta mcbR$ schwächer exprimiert als im Wildtyp. Es hat also den Anschein, dass McbR primär zunächst weniger Proteine kontrolliert. Die Effekte, die der Knockout von *mcbR* auf diese Proteine hat, werden hier als primäre bezeichnet, während die restlichen als Sekundäreffekte betrachtet werden.

Primäre Effekte des Knockouts von *mcbR* auf den Schwefel- und Methioninstoffwechsel:

Zu den Genen mit McbR-Bindestelle zählen im Methioninstoffwechsel *hom*, *metX*, *metB*, *metY*, *metE*, *metH* und *metK*. Die Analyse der identifizierten Proteine zeigte, dass vor allem Proteine des Schwefelstoffwechsels und der Methioninsynthese überexprimiert wurden (Abb. 7-30, Abb. 7-31). Im Methioninstoffwechsel wurden außer den beiden Methioninsynthasen (MetE; MetH) der Homoserindehydrogenase (Hom) und der Cystathionin- β -Synthase (MetB) alle Proteine der Methioninsynthese überexprimiert. Rey *et al.* (2005) hatten für *metE*, *metH*, und *metB* auch eine stärkere Transkription beobachtet. Es ist möglich, dass die Transkription dieser Proteine nicht zwangsläufig mit einer erhöhten Proteinkonzentration

korreliert. Vielleicht ist die Konzentration dieser Proteine zusätzlich durch weitere Mechanismen, wie z.B. die Translationsinitiation oder auch durch die Stabilität der Transkripte *in vivo*, wie das beispielsweise für MetB von Arabidopsis (Frankard *et al.*, 2002) der Fall ist, reguliert. Hom wurde in früheren Arbeiten auch auf SDS-Gelen als in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ überexprimiert identifiziert (Rey *et al.*, 2003).

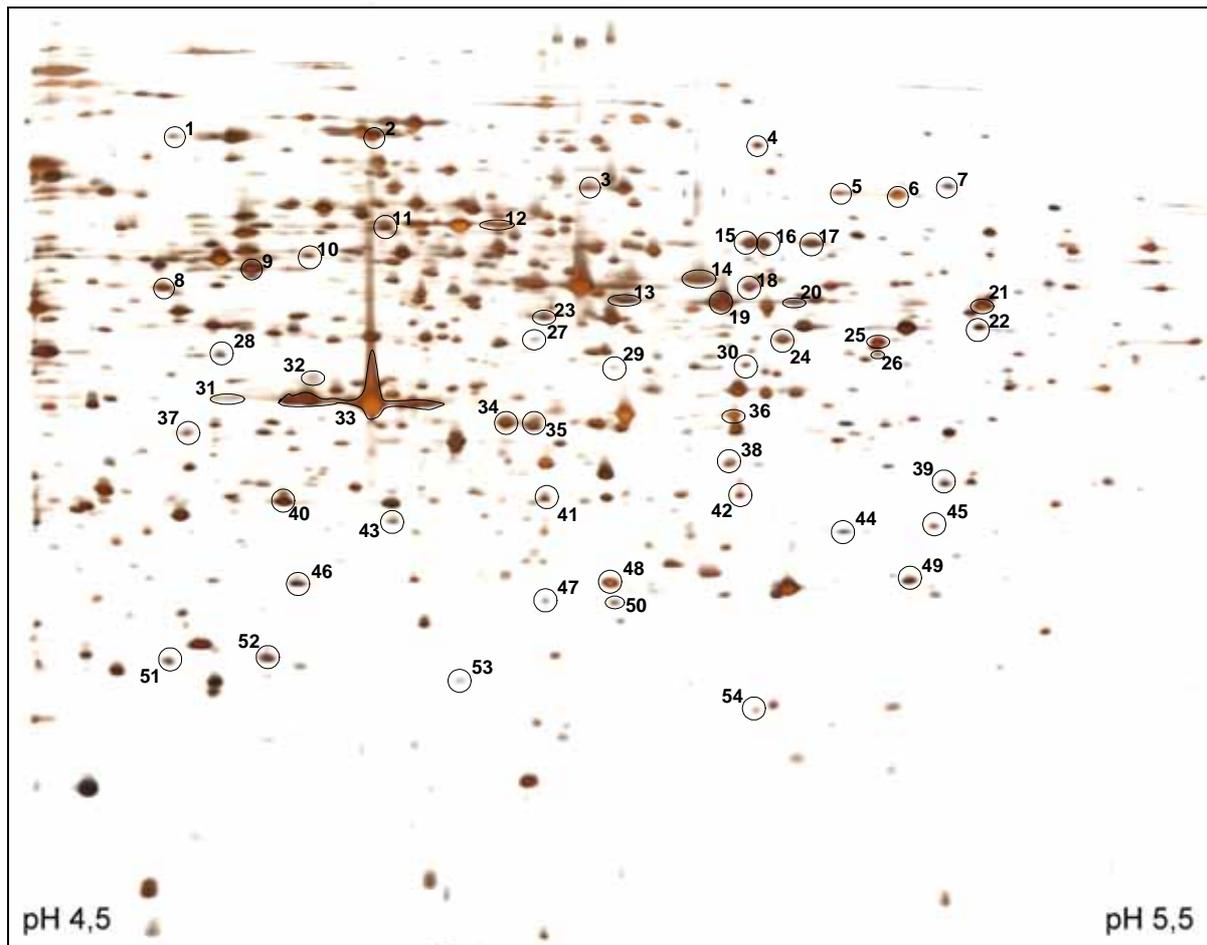


Abb. 7-29: 2D-SDS-PAGE der cytosolischen Proteine von *C. glutamicum* $\Delta mcbR$. Isoelektrische Fokussierung im pH-Bereich 4,5 bis 5,5. Die identifizierten 54 Spots mit den deutlichsten Unterschieden zum Wildtyp sind umkreist. (vgl. Tabelle 7-7)

Im Sulfat- und Cysteinmetabolismus weisen die Gene *cysI*, *cysJ* und *cysK* McbR-Bindestellen auf. Diese wurden auch in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ stärker transkribiert (Rey *et al.*, 2005). Das am höchsten konzentrierte Protein in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ war die Cysteinsynthase CysK. Diese lieferte auf den SDS-Gelen zusätzlich zum Hauptspot noch

mehrere Satelliten (Spot 33; Abb. 7-29). Die starke Überexpression dieses Proteins wurde ja schon bei 1D-SDS-PAGE beobachtet (vgl. Kap. 7.3.2). Gleichzeitig wurden die Proteine der Sulfatreduktion CysH und CysD/N in *C. glutamicum ΔmcbR* stark induziert. Die beiden Sulfitreduktasen CysI und CysJ sind auf den Gelen nicht gefunden worden. Dies liegt sicher an der isoelektrischen Fokussierung, da beide Proteine pI-Werte von >5,5 haben. In früheren Arbeiten wurde CysI bei einer Fokussierung zwischen pH 4 und 7 in *C. glutamicum ΔmcbR* als induziert detektiert (Rey *et al.*, 2003).

Tabelle 7-7: Über- bzw. schwächer exprimierte Proteine in *C. glutamicum ΔmcbR* im Vergleich zum Wildtyp. Gezeigt sind Mittelwerte für die relative Proteinmenge auf je 4 unabhängigen 2D-SDS-Polyacrylamidgelen und die relative Änderung im Vergleich zum Wildtyp. Sind mehrere Proteine für einen Spot angegeben bedeutet dies, dass im Gel mehrere Proteine im gleichen Spot vorhanden waren. UE = Untereinheit.

Spot Nr.	Protein	Rel. Proteinmenge Wildtyp	Rel. Proteinmenge $\Delta mcbR$	Quotient $\Delta mcbR$ Wildtyp ⁻¹
Schwefel- & Methioninmetabolismus				
42	Phosphoadenosin-phosphosulfat-Reduktase CysH	15151	19485	1.3
44	Alkansulfonattransport ATP-Bindeprotein <i>ssuB</i>	0	18743	
23	Cystathionin- γ -Lyase (EC 4.4.1.1) MetC	263	53624	203.6
21	Cystein-Desulfurase (EC 2.8.1.7) / Selenocystein-Lyase (EC 4.4.1.16) / Citrate synthase (EC 4.1.3.7)	93106	129024	1.4
32	Cysteinsynthase (EC 2.5.1.47) CysK/CysM	2220	17747	8.0
33	Cysteinsynthase (EC 2.5.1.47) CysK/CysM	194636	2338420	12.0
25	Homoserin-O-Acetyltransferase MetX	1265	86627	68.5
2	Methioninsynthase (MetE)	396641	210592	0.5
20	O-Acetylhomoserin-Sulphydrolase MetY	0	49618	
13	O-Acetylhomoserin-Sulphydrolase MetY	646	129962	201.1
19	O-Acetylhomoserin-Sulphydrolase MetY / Cystein-Desulfurase (EC 2.8.1.7) / Selenocystein-Lyase (EC 4.4.1.16)	58295	361474	6.2
39	Phosphoadenosinphosphosulfat-Reduktase (EC 1.8.4.8) CysH	272	30484	112.1
29	Rhodanese-verwandte Schwefeltransferase	3593	3882	1.1
9	S-Adenosylmethionin-Synthetase (EC 2.5.1.6) MetK	25968	238321	9.2
14	Sulfatadenylyltransferase UE 1 (EC 2.7.7.4) CysN	42212	213426	5.1
27	Sulfatadenylyltransferase UE 1 (EC 2.7.7.4) CysN Luciferase-ähnliche Monooxygenase (EC 1.14.-.-)	2959	5621	1.9
36	Sulfat-Adenylyltransferase UE 2 (EC 2.7.7.4) CysD	1959	54099	27.6
Zentralstoffwechsel				
22	GA3P-Dehydrogenase (EC 1.2.1.12)	463	38630	83.5
11	Glucose-6-Phosphatisomerase (EC 5.3.1.9) / Glucose-6-phosphat 1-Epimerase (EC 5.1.3.15)	51045	84421	1.7
31	Malatdehydrogenase (EC 1.1.1.37)	0	11745	

Spot Nr.	Protein	Rel. Proteinmenge Wildtyp	Rel. Proteinmenge $\Delta mcbR$	Quotient $\Delta mcbR$ Wildtyp ⁻¹
1	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (EC 4.1.1.32)	2790	13086	4.7
16	Succinyl-CoA:Coenzyme A Transferase (EC 2.8.3.-)	203970	103896	0.5
17	Succinyl-CoA:Coenzyme A Transferase (EC 2.8.3.-)	11243	82537	7.3
Aminosäuremetabolismus				
47	3-Isopropylmalat-Dehydratase kleine UE (EC 4.2.1.33)	15758	4617	0.3
37	Acetylglutamatkinase (EC 2.7.2.8)	9590	18974	2.0
15	Argininosuccinat-Lyase (EC 4.3.2.1)	24490	102975	4.2
26	Aspartataminotransferase (EC 2.6.1.1)	25993	17322	0.7
7	Catalase (EC 1.11.1.6) Dihydroxysäure-Dehydratase (EC 4.2.1.9)	335	20804	62.1
12	Glutamin Synthase / Ferredoxin-NADP Reduktase (EC 1.18.1.2) Sulfatreduktionsoperon	0	116847	
Respiration & Oxidation				
52	Adenylatkinase (EC 2.7.4.3) / Nucleosid-diphosphat-Kinase (EC 2.7.4.6) / Unspez. DNA-Bindeprotein Dps / Eisenbindendes Ferritin-ähnliches Antioxidationsprotein / Ferroxidase (EC 1.16.3.1)	47644	44015	0.9
5	Catalase (EC 1.11.1.6)	17	19486	1166.3
6	Catalase (EC 1.11.1.6)	2975	56885	19.1
40	Elektronentransfer-Flavoprotein β -UE / Unspez. DNA-Bindeprotein Dps / Eisenbindendes Ferritin-ähnliches Antioxidationsprotein / Ferroxidase (EC 1.16.3.1)	48340	143673	3.0
30	Luciferase-ähnliche Monooxygenase (EC 1.14.-.-)	716	14630	20.4
48	NAD(P)H-Quinon-Oxidoreduktase (DrgA Proteinhomologes) / Phosphoribosylglycinamid-Formyltransferase (EC 2.1.2.2)	28562	61634	2.2
50	Oxidoreduktase (EC 1.1.1.-)	0	10116	
51	Unspez. DNA-Bindeprotein Dps / Eisenbindendes Ferritin-ähnliches Antioxidationsprotein / Ferroxidase (EC 1.16.3.1)	60	20835	346.1
49	Vermutlich NAD-abhängige Dehydrogenase	801	51571	64.4
24	Vermutliche NADH-abhängige Flavin Oxidoreduktase, / Homoserin-O-Acetyltransferase (EC 2.3.1.31)	815	62316	76.4
Sonstiges				
18	ABC Transporter ATP-Bindeprotein	30598	71436	2.3
46	ATP-abhängige Clp-Protease proteolytische UE (EC 3.4.21.92)	64013	36371	0.6
43	Carboxyvinyl-carboxyphosphonat-phosphorylmutase (EC 2.7.8.23)	13486	18097	1.3
38	GMP-Synthase – Glutamin-Amidotransferase-Domäne Polyprenyl-phosphat- β -D-Mannosyltransferase (EC 2.4.1.-)	7924	31080	3.9
28	Hypothetisches cytosolisches Protein	14705	22753	1.5
4	Hypothetisches cytosolisches Protein	679	25940	38.2
54	Hypothetisches cytosolisches Protein	1434	7348	5.1
45	Hypothetisches Protein	4871	13318	2.7
8	Hypothetisches Protein	31520	59913	1.9

Spot Nr.	Protein	Rel. Proteinmenge Wildtyp	Rel. Proteinmenge $\Delta mcbR$	Quotient $\Delta mcbR$ Wildtyp ⁻¹
53	IscU Protein	9	5204	550.9
41	Kurze-Ketten Dehydrogenase Biotin-Operonrepressor / Biotin--[acetyl-CoA-carboxylase] Synthetase (EC 6.3.4.15)	7496	22249	3.0
10	Magnesium-Chelatase UE chII	10329	32812	3.2
3	Propionyl-CoA-Carboxylase biotinenthaltende UE (EC 6.4.1.3)	14190	39683	2.8
34	Pyridoxin-Biosyntheseprotein	28367	91627	3.2
35	Pyridoxin-Biosyntheseprotein / Kurze-Ketten-Dehydrogenase / Sulfat-Adenyltransferase UE 2 (EC 2.7.7.4)	25395	78965	3.1

Zusätzlich zu den Proteinen des Sulfat-, Cystein- und Methioninstoffwechsel stehen auch die Gene für die Aufnahme und Verwertung von Organoschwefelverbindungen unter direkter McbR-Kontrolle (Rey *et al.*, 2005; Rey *et al.*, 2003). Die Proteomuntersuchung zeigte die Überexpression von *ssuB*, einem ATP-Bindeprotein zum Alkansulfonattransport (Tabelle 7-7).

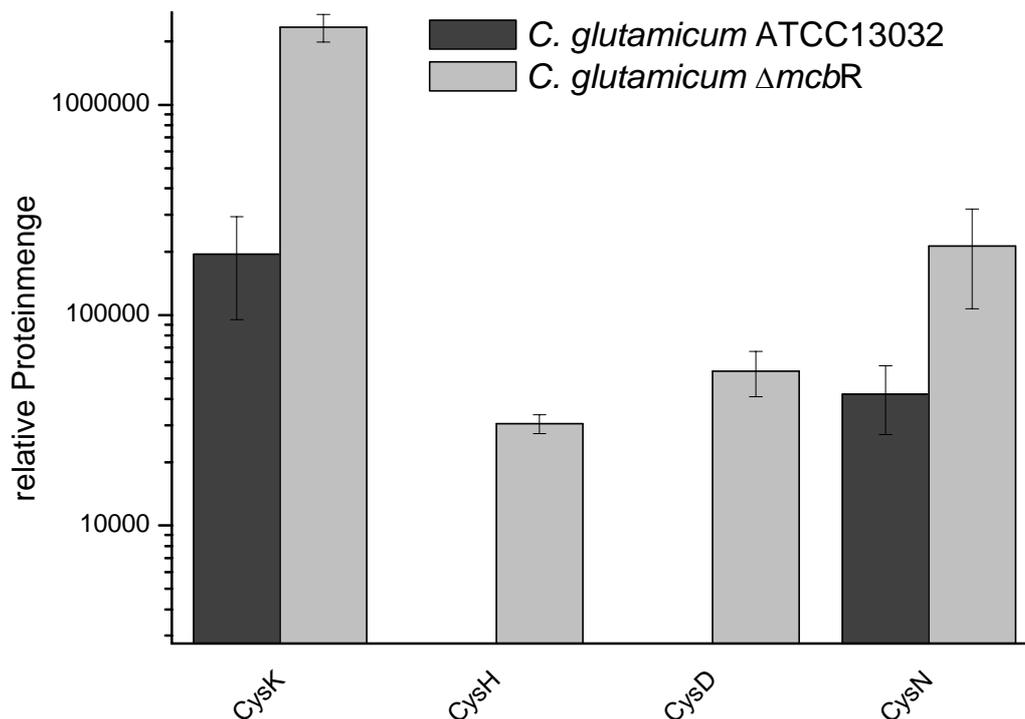


Abb. 7-30 Relative Proteinmenge auf 2D-SDS-PAGE von *C. glutamicum* Wildtyp und $\Delta mcbR$. Proteine des Cysteinestoffwechsels. CysK = Cysteinsynthase; CysH = APS-Kinase / PAPS-Reduktase; CysD/N = Sulfat-Adenyltransferase. Mittelwerte aus je 4 unabhängigen Proben mit Standardabweichung.

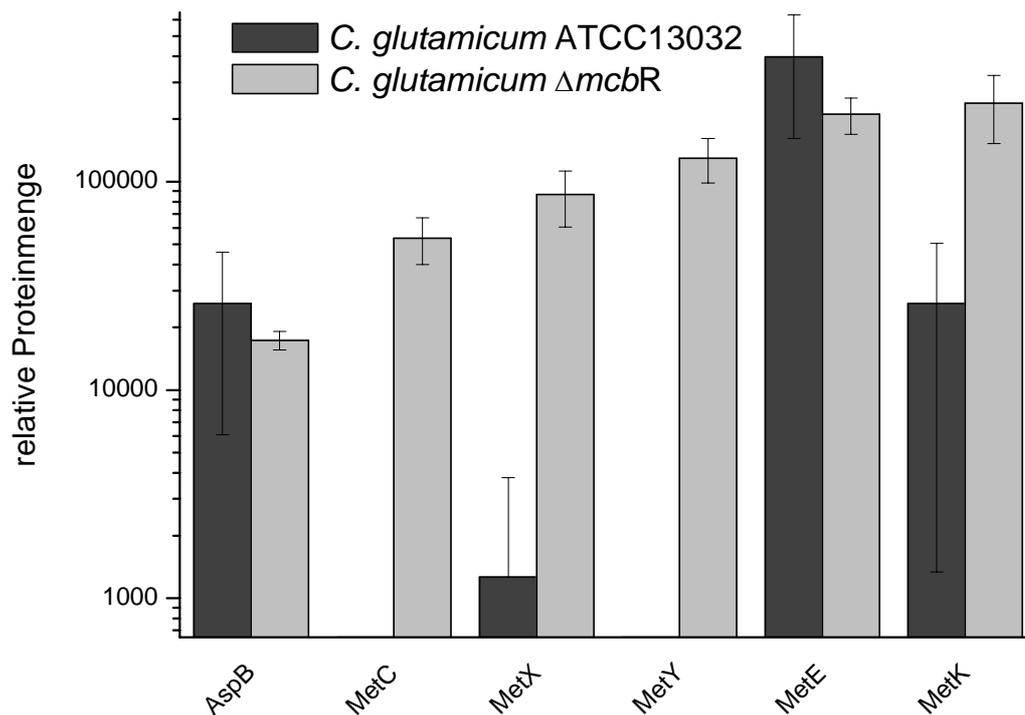


Abb. 7-31: Relative Proteinmenge auf 2D-SDS-PAGE von *C. glutamicum* Wildtyp und $\Delta mcbR$. Proteine des Methioninstoffwechsels. AspB = Aspartat-Aminotransferase; MetC = Cystathionin- β -Lyase; MetX = Homoserin-transacetylase; MetY = O-Acetylhomoserin-Sulphydrolase; MetE = Methioninsynthase (B_{12} -abhängig); MetK = S-Adenosylmethionin-Synthase. Mittelwerte aus je 4 unabhängigen Proben mit Standardabweichung.

Der Knockout des Regulatorproteins führt im Schwefel- und Methioninstoffwechsel zur Überexpression fast aller Gene. Die Proteomstudien bestätigen in weiten Teilen die Beobachtungen von Rey *et al.* (2005). Allerdings zeigen die Studien zusätzlich, wie die Konzentration bestimmter Enzyme nicht nur auf Ebene der Transkription, sondern auch auf Ebene der Translation und der Proteinstabilität reguliert wird. So führt beispielsweise eine leichte Erhöhung der Transkriptkonzentration zu einer dramatischen Zunahme einiger Proteine, während bei anderen eine stärkere Zunahme der Transkription eine sehr viel geringere Zunahme des Proteins bewirkt. Beispielsweise führt eine Verdreifachung der Expression von *metY* (Rey *et al.*, 2005) zu einer 200fachen Zunahme der Proteinmenge (Tabelle 7-7). Die Verfunffachung der Expression von *cysH* (Rey *et al.*, 2005) steigert dagegen die Proteinmenge nur um das 1,3fache (Tabelle 7-7). Andererseits konnten Rey *et al.* kein Transkript des *metC* (*aecD*)-genes in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ und Wildtyp detektieren. Sie schlossen daraus, dass dieses Protein nicht unter die Regulation von McbR fällt. Hier

konnte jedoch gezeigt werden, dass die Proteinmenge von MetC in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ rund 200fach erhöht ist (Tabelle 7-7). Dies könnte darauf hindeuten, dass die mRNA von MetC sehr kurzlebig ist und deshalb von den Transkriptionsanalysen nicht erfasst wurde, das MetC-Protein ist allerdings langlebig und deshalb höher konzentriert.

Interessanterweise wurden MetH und MetE, die beiden Methioninsynthesen von *C. glutamicum*, im Proteom nicht als überexprimiert detektiert. Die Expression von MetE war in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ sogar leicht niedriger als im Wildtyp (Abb. 7-31). Rey et al. (2005) hatten jedoch eine erhöhte Transkription der Gene von MetE (2,5fach) und MetH (2,8fach) beobachtet. Gleichzeitig zeigten die Metabolomstudien, dass der Schritt der Methylierung von Homocystein der limitierende Schritt in der Methioninsynthese zu sein scheint. Dies deutet darauf hin, dass hier die Regulation zum Teil auf Ebene der Proteinstabilität oder der Translationsinitiation oder -elongation erfolgen könnte. Ein Stoppen der Elongation von Cystathionin- γ -Synthase (MetB) von *Arabidopsis thaliana* wird beispielsweise durch SAM bewirkt (Chiba et al., 2003; Lambein et al., 2003; Onouchi et al., 2005) und führt auch zum Abbau der RNA. Da bislang auch eine Feedback-Inhibition von MetE und MetH in *C. glutamicum* durch Methionin nicht beschrieben ist (Lee, 2005), könnte die geringe Konzentration von MetE und MetH für das Ausbleiben einer größeren Methioninakkumulation verantwortlich sein.

Sekundäre Effekte des Knockouts von *mcbR*:

Die sekundären Effekte des Regulatorknockouts sind sehr vielseitig und es ist schwierig zu klären, welcher Effekt nun Ursache oder Wirkung ist. Es zeigte sich, dass ein langsames Wachstum und offensichtlich ein höherer oxidativer Stress in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ vorlag. Gleichzeitig wurde der Fluss durch den TCA-Zyklus signifikant gesteigert, was seinerseits bei gleichzeitiger Reduktion der Genexpression von Komponenten der ATP-Synthase (Rey et al., 2005) die Fragen aufwirft: Wachsen die Zellen langsamer weil die ATP-Synthase schwächer exprimiert wird, oder umgekehrt? Ist der oxidative Stress größer, weil mehr TCA-Fluss mehr FADH und NADH bereitstellt, oder umgekehrt?

Geht man davon aus, dass die Expression der Sulfitreduktase CysI/J zu einem großen Teil des oxidativen Stresses führt (Messner und Imlay, 1999) (vgl. Kap.7.3.7), wäre der Knockout von McbR für den Stress verantwortlich, da ja *cysI* und *cysJ* direkt unter McbR-Kontrolle stehen. Allerdings befinden sich unter den Genen mit McbR-Bindestelle auch 2

putative transkriptionelle Regulatoren der NagC-Familie (cg0012 und cg0156; (Rey *et al.*, 2005)) und unter den hochregulierten Genen 4 weitere putative Regulatoren (Rey *et al.*, 2005). Dies deutet auf eine Regulationskaskade hin, mit McbR als übergeordnetem Regulator. Es ist also schwierig, die sekundären Effekte mit McbR eindeutig zu korrelieren. In *E. coli* ist NagC in die Regulation des PTS involviert (Plumbridge, 2001). Es ist also möglich, dass durch den Knockout von McbR und die damit verbundene Induktion von NagC die beobachtete niedrigere Expression der PTS-Gene bewirkt wird (Rey *et al.*, 2005) und die Regulatorknockoutmutante deshalb langsamer wächst. Die oxidative Stressantwort war sowohl im Transkriptom (Rey *et al.*, 2005) als auch im Proteom deutlich zu erkennen (vgl. Kap. 7.3.7). So wurde insbesondere die Catalase als überexprimiertes Enzym detektiert. Zusätzlich wurden ein eisenbindendes, Ferritin-ähnliches Antioxidationsprotein und die Ferroxidase und eine nicht näher identifizierte luciferaseähnliche Monooxygenase überexprimiert (Tabelle 7-7).

Die Proteine des Zentralstoffwechsels von $\Delta mcbR$ zeigten ebenfalls deutliche Änderungen. So waren beispielsweise die Enzyme des TCA-Zyklus Malat-DH und Citratsynthase stärker exprimiert (Tabelle 7-7). Letztere wurde allerdings in einem Spot gemeinsam mit einer Cystein-Desulfurase detektiert. Ferner wurden die glykolytischen Enzyme G6P-Isomerase und die GA3P-DH überexprimiert, was gut mit dem erhöhten glykolytischen Fluss korreliert. GA3P-DH wurde im Mutanten im Vergleich zum Wildtyp 83,5fach induziert. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass das Enzym durch ein erhöhtes NADH/NAD⁺-Verhältnis eine reduzierte Aktivität aufweist (Dominguez *et al.*, 1998) und der Organismus durch die Überexpression versucht den metabolischen Flaschenhals, der zur Akkumulation von DHA im Medium führt, zu durchbrechen (vgl. Kap. 7.3.5). Das gluconeogenetische Enzym PEP-CK wurde im Mutanten 4,7fach induziert. Zusammen mit der von Rey *et al.* (2005) beobachteten geringeren Expression von *pyc* könnte dies der Grund für den geringeren anaplerotischen Nettofluss und die leicht gestiegene Reversibilität in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ sein (Abb. 7-28).

Interessanterweise war die Expression der Aspartat-Transaminase im Mutanten etwas niedriger. Dies korreliert gut mit der beobachteten niedrigeren Konzentration von Aspartat im Mutanten (vgl. Kap. 7.3.4) und dem niedrigeren anabolen Fluss von Oxalacetat (vgl. Kap. 7.3.5.). Da die Zellen langsamer wachsen, reicht trotz der Akkumulation von Homolanthionin eine geringere Konzentration dieses Enzyms aus.

Die Überexpression der Pyridoxal-Phosphat (PLP) – abhängigen Enzyme CysK, MetC und MetY führt wahrscheinlich zu einem gesteigerten Bedarf an PLP, wodurch die Pyridoxin-Biosyntheseproteine induziert werden (Tabelle 7-7).

Abschließend lässt sich sagen, dass der Knockout von *mcbR* zwar zur Überexpression vieler wichtiger Gene des Methioninstoffwechsels und der Sulfatreduktion führt, gleichzeitig aber wohl auch eine geringere Substrataufnahme und einen erhöhten oxidativen Stress bewirkt. Eine Methioninakkumulation bleibt aus und die Methioninsynthasen wurden nicht stärker translatiert. Der Vergleich von Proteom und Transkriptom deutet bei einigen Genen, inklusive der Methioninsynthasen, auf posttranskriptionelle Regulationsmechanismen, die für eine erfolgreiche Überproduktion von Methionin unbedingt näher untersucht werden müssen.

7.3.7. Oxidativer Stress in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$

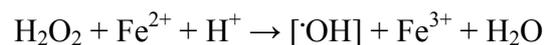
Die Analyse von Proteom, Fluxom und Transkriptom deuten auf einen erhöhten oxidativen Stress in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ hin. Ursache von oxidativem Stress sind reaktive Sauerstoffspezies (Superoxide, Peroxide, Hydroxylradikale), auch ROS genannt. In *E. coli* sind die zwei Hauptquellen für ROS die Atmungskette und die Sulfitreduktase (Messner und Imlay, 1999). In der Atmungskette ist vor allem die NADH-Dehydrogenase II für die Bildung von ROS verantwortlich. Generell geschieht die Bildung von ROS zum großen Teil durch die Autooxidation von Flavinen (Messner und Imlay, 1999). Aber auch die Gegenwart von Thiolen wie Cystein oder Glutathion kann die Bildung von ROS begünstigen (Hasegawa *et al.*, 2004).

Die Untersuchungen von Metabolom, Transkriptom, Proteom und Fluxom in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ gaben vielfältige Hinweise auf erhöhten oxidativen Stress. So lagen beispielsweise erhöhte intrazelluläre Konzentrationen der Thiole Cystein und Homocystein vor, was die Bildung von ROS begünstigt. Transkriptomstudien zeigten die erhöhte Expression von Genen (*sod*, *kata*, *trx*, *trxB*, *trxC*, *sufBCD* und *nifSU*) der oxidativen Stressantwort (Rey *et al.*, 2005).

Die Proteomstudien zeigten, dass in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ die Catalase überexprimiert wird. Messner und Imlay (1999) korrelierten einen erhöhten oxidativen Stress mit einer erhöhten

Konzentration der Flavoproteine Sulfitreduktase und NADH-DH II. Eine Überexpression von Sulfitreduktase (Rey *et al.*, 2005) und Genen der Atmungskette (vgl. Kap. 7.3.6) in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ deuteten darauf hin, dass mit einer erhöhten Konzentration von ROS zu rechnen ist. Dies ist auch der Grund weshalb die Expression der Sulfitreduktase in Bakterien sehr stark reguliert wird (Messner und Imlay, 1999). Die Sulfitreduktase von *E. coli* produziert zu 97 % H_2O_2 und nicht O_2^- (Messner und Imlay, 1999). Dies korreliert gut mit der Überexpression der Catalase in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$.

Gleichzeitig wurde in der Flussanalyse beobachtet, dass *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ einen erhöhten Fluss durch den TCA-Zyklus und einem apparenten Überschuss an NADPH vorweist. Dieser Überschuss könnte dazu dienen, um reaktive Sauerstoffspezies in NADPH-abhängigen Reaktionen zu entgiften, wie es bei *E. coli* (Brumaghim *et al.*, 2003; Iuchi und Weiner, 1996) oder *Staphylococcus aureus* (Streker *et al.*, 2005) der Fall ist. Bei letzterem wird dies durch eine NADPH-abhängige Oxidoreduktase katalysiert, die auch Disulfide reduzieren kann. Die Protonen werden von NADPH auf FMN übertragen. Dafür spricht auch die Überexpression der Mangan-abhängigen Superoxiddismutase (Rey *et al.*, 2005) und der Catalase (s.o.) in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$. In *E. coli* wurde beobachtet, dass oxidativer Stress mit H_2O_2 das Verhältnis von NADH zu NADPH zugunsten von NADPH verschiebt (Brumaghim *et al.*, 2003). NADH reduziert Fe^{3+} , nachdem in der sog. Fenton-Reaktion Fe^{2+} von H_2O_2 oxidiert wurde (Imlay *et al.*, 1988):



NADPH hat dagegen eine geringere Reaktivität mit Fe^{3+} . Dies führt zu einem Mangel an NADH, der auch den beobachteten gestiegenen Fluss durch den TCA-Zyklus erklären kann. Geht man davon aus, dass die Sulfitreduktase eine Hauptquelle von ROS ist, ist eine erhöhte Konzentration von H_2O_2 sehr wahrscheinlich. Die Fenton-Reaktion würde aber auch zu einem Mangel an Fe^{2+} führen, wenn nicht genügend NADH vorhanden ist, um Fe^{3+} wieder zu reduzieren. In *E. coli* wird das *suf*-Operon durch oxidativen Stress oder Eisenmangel induziert. Diese Gene sind maßgeblich am Aufbau von Fe-S-Clustern beteiligt. Bei oxidativem Stress führt ein H_2O_2 -Sensor, OxyR, zur Induktion des *suf*-Operons (Outten *et al.*, 2003). In *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ sind die Gene *sufB,C,D* ebenfalls induziert (Rey *et al.*,

2005). Dies könnte also auch ein Hinweis auf oxidativen Stress durch H₂O₂ oder auch gleichzeitig auf Eisenmangel sein.

Die Überexpression von Flavoproteinen begünstigt die Autooxidation des Kofaktors FADH, wodurch ROS gebildet werden. Es ist also möglich, dass NADH und FADH aus dem TCA-Zyklus nur zum Teil in die Atmungskette eingeschleust werden und der Rest eine Fenton-Reaktion durchläuft, bzw. eine Autooxidation erleidet, die dann zur Bildung von oxidativem Stress führt. In zukünftigen Studien könnte versucht werden, oxidative Stressmarker wie z.B. meta- und ortho-Tyrosin, oxidative Produkte von Phenylalanin, zu detektieren (Blount und Duncan, 1997). Methioninsulfoxid könnte eventuell auch als Marker dienen, da in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ auch eine Peptidmethioninsulfoxidreduktase induziert wird (Rey *et al.*, 2005).

7.3.8. Vergleich der Verwertung unterschiedlicher Schwefelquellen

Die Elementarmodenanalyse hat ergeben, dass die zu erwartende Ausbeute an Methionin sehr stark vom Reduktionsgrad der Schwefelquelle abhängen wird. Es konnte berechnet werden, dass je eingespartes NADPH ein Ausbeutezuwachs von 4,6 % zu erwarten ist. Bisher liegen jedoch nur sehr unvollständige Daten über das Wachstum und die Verwertung unterschiedlicher Schwefelquellen durch *C. glutamicum* vor (Abb. 7-32). So ist beispielsweise nicht endgültig geklärt, wie Sulfat und Thiosulfat aufgenommen werden und wie Thiosulfat weiter gespalten wird. Außerdem ist nicht klar, ob und wenn ja von welchen Enzymen Methanthiol verwertet wird. Gleiches gilt auch für Dimethyldisulfid, einem Dimer von Methanthiol, das erst noch gespalten werden muss, um verwertet werden zu können. Diese Spaltung geht wahrscheinlich mit Oxidation von NADPH oder einem anderen Reduktionsäquivalent einher.

Im Folgenden wurde zunächst das Wachstum von *C. glutamicum* Wildtyp und $\Delta mcbR$ Mutante auf Sulfat und Thiosulfat im Schüttelkolben verglichen (die Messungen wurden zusammen mit Verena Schütz durchgeführt). Hierzu wurden die entsprechenden Schwefelquellen in äquimolaren Schwefelkonzentrationen zu schwefelfreiem CG12^{1/2}-Minimalmedium gegeben.

Zur Untersuchung der Verwertung von Methanthiol und Dimethyldisulfid (DMDS) wurden $\Delta metB$ -Stämme von Wildtyp und Mutante eingesetzt und diese dann gleichzeitig mit Cystein gefüttert. Dies war notwendig, da die Spaltung von Methionin scheinbar sehr langsam abläuft und die Zellen, die ausschließlich Methanthiol bzw. DMDS als Schwefelquelle erhielten, fast gar nicht mehr wuchsen. Ein weiteres Problem könnte auf diesen Substraten die Bildung von Methylcystein sein, das nur langsam gespalten wird. Methanthiol lag gasförmig vor, weshalb diese Schwefelquelle durch Kühlen unter 6 °C (Siedepunkt) in den flüssigen Zustand überführt wurde. Es wurde dann nur soviel Methanthiol zupipettiert, wie in H₂O bei 30 °C löslich ist. Die lösliche Konzentration von Methanthiol sollte aber anhand des Schwefelbedarfs für die Biomassebildung ausreichen.

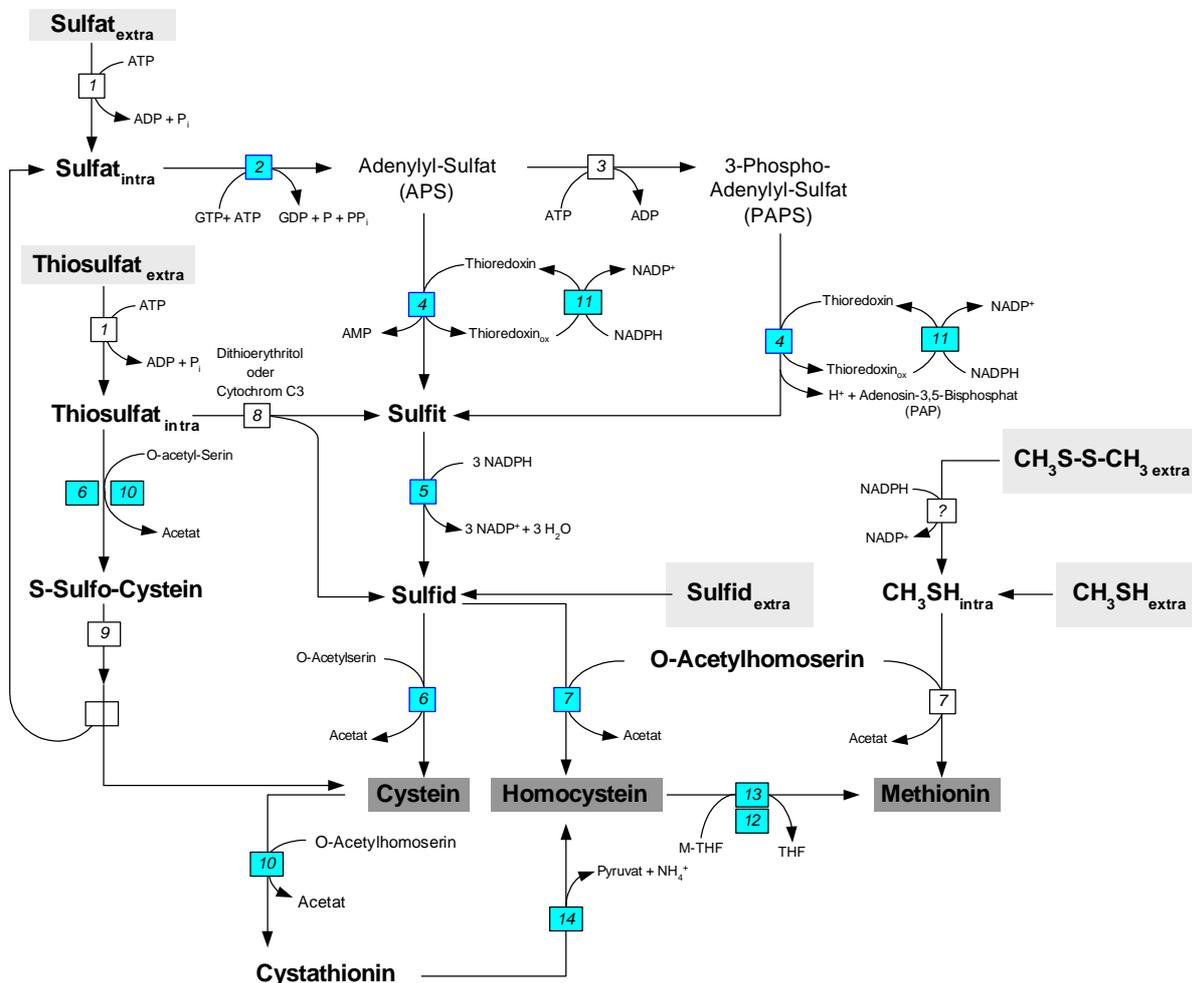


Abb. 7-32: Verwertung der Schwefelquellen Sulfat, Thiosulfat, Sulfid, Methanthiol (CH₃SH) und Dimethyldisulfid (CH₃-S-S-CH₃) in *C. glutamicum* nach bisherigem Wissensstand. Beteiligte Enzyme: vermutlicher ABC-Transporter (1); Sulfat-Adenyltransferase *cysD/cysN* (2); Adenylyl-Sulfatkinase *cysC* (3); PAPS-Reduktase *cysH* (4); Sulfitreduktase *cysI/cysJ* (5); O-Acetylserin-Sulphydrylase A & B *cysK/cysM* (6);

O-Acetylhomoserin-Sulphydrolase *metY* (7); Thiosulfatreduktase (8); Sulfonatase (9); Cystathionin- γ -Synthase *metB* (10); Thioredoxin-Reduktase (11); Methioninsynthasen MetE/MetH (12 & 13) und Cystathionin- γ -Synthase (14).

DMDS ist eine Flüssigkeit, die jedoch in höheren Konzentrationen für die Zellen toxisch wird. Diese Schwefelquelle wurde daher zunächst an ein Harz (Amberlite® XAD4, Fluka) absorbiert, das dann im Kulturmedium immer nur geringe Mengen an DMDS freisetzte. Es wurden immer auch Kontrollen kultiviert, die nur Cystein enthielten. In diesen Kultivierungen mussten die Zellen Cystein spalten, um den Schwefel für die Homocysteinsynthese freizusetzen. Die Spaltung verläuft sehr langsam und die Kultivierungen wiesen deutlich geringere Wachstumsraten auf, als mit DMDS bzw. Methanthiol. DMDS wird in der Zelle wahrscheinlich unter Oxidation von NADH oder NADPH in 2 Moleküle Methanthiol gespalten.

Es zeigte sich, dass alle Stämme auf Sulfat und Thiosulfat wachsen konnten (Tabelle 7-8). Die höchste Wachstumsrate wurde für den Wildtyp mit $\mu_{\max} = 0,44 \text{ h}^{-1}$ auf Sulfat erzielt. Dies scheint die bevorzugte Schwefelquelle von *C. glutamicum* zu sein. Interessanterweise verwertete *C. glutamicum* Thiosulfat langsamer, was sich in einer reduzierten Wachstumsrate von $\mu_{\max} = 0,31 \text{ h}^{-1}$ widerspiegelte. Die Ausbeute an Biomasse stieg beim Wildtyp von $0,53 \text{ g g}^{-1}$ auf Sulfat auf $0,60 \text{ g g}^{-1}$ auf Thiosulfat an. Bei $\Delta mcbR$ steigerte sich die Ausbeute sogar von $0,42 \text{ g g}^{-1}$ auf $0,51 \text{ g g}^{-1}$. Dies entspricht einer Ausbeutesteigerung von 13 % bzw. 21 %. Die Ersparnis an ATP und NADPH wirkte sich also auf die Kohlenstoffausbeute nicht nur *in silico*, sondern auch *in vivo* positiv aus. Da der Bedarf an Reduktionsäquivalenten zur Biomassensynthese nur zu einem kleinen Teil aus der Reduktion des Schwefels stammt, kann man bei Produktion von Methionin mit einem größeren Zuwachs rechnen. *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ wuchs sowohl auf Sulfat als auch auf Thiosulfat langsamer, als *C. glutamicum* Wildtyp (Tabelle 7-8). Während *C. glutamicum* $\Delta metB$ auf Sulfat und Thiosulfat etwa die gleichen Wachstumsraten aufwies, wie der Wildtyp, unterschied sich die Wachstumsrate von *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ $\Delta metB$ mit $\mu_{\max} = 0,12 \text{ h}^{-1}$ auf Thiosulfat deutlich von der Rate von *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ mit $\mu_{\max} = 0,22 \text{ h}^{-1}$. Die Wachstumsrate ging fast um 50 % zurück. Dies deutet daraufhin, dass die Cystathionin- γ -Synthase in $\Delta mcbR$ -Stämmen für das Wachstum mit Thiosulfat als Schwefelquelle eine größere Bedeutung hat als im Wildtyp.

DMDS wurde sowohl von *C. glutamicum* $\Delta metB$ als auch von *C. glutamicum* $\Delta mcbR \Delta metB$ als Schwefelquelle gut verwertet. *C. glutamicum* $\Delta metB$ zeigte mit $\mu_{max} = 0,42 \text{ h}^{-1}$ eine Wachstumsrate, die der des Wildtyps auf Sulfat sehr nahe kommt. *C. glutamicum* $\Delta metB$ zeigte auch auf Methanthiol gutes Wachstum, das mit dem Wachstum auf Sulfat oder DMDS vergleichbar war (Tabelle 7-8). Interessanterweise zeigte *C. glutamicum* $\Delta mcbR \Delta metB$ auf dieser Schwefelquelle eine Wachstumsrate die doppelt so groß war wie die von *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ auf Sulfat. Gleichzeitig war die Wachstumsrate auch signifikant größer als die eigene auf Sulfat. Gründe hierfür sind bislang noch nicht gefunden, allerdings wurde früher in marinen Algen beobachtet, das Dimethylsulfid (DMS) ein Fänger für reaktive Sauerstoffspezies (ROS) ist (Sunda *et al.*, 2002). Möglicherweise kommt DMDS in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ eine ähnliche Funktion zu. Schließlich wurde in Transkriptom- und Proteomdaten von *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ beobachtet, dass die oxidative Stressantwort induziert wird (vgl. Kap. 7.3.7). Vieles spricht dafür, dass die erhöhte Wachstumsrate von *C. glutamicum* $\Delta mcbR \Delta metB$ auf DMDS mit einem reduzierten oxidativen Stress korreliert.

Tabelle 7-8: Maximale spezifische Wachstumsrate μ_{max} unterschiedlicher Mutanten von *C. glutamicum* auf verschiedenen Schwefelsubstraten. Bestimmt im Schüttelkolben auf Glucose und CG12½-Minimalmedium.

Stamm	Spezifische Wachstumsraten μ_{max} [h^{-1}]			
	Sulfat	Thiosulfat	Cystein und Methanthiol	Cystein und DMDS
<i>C. glutamicum</i>	0,44	0,31	n.b. ¹	n.b.
<i>C. glutamicum</i> $\Delta mcbR$	0,17	0,22	n.b.	n.b.
<i>C. glutamicum</i> $\Delta metB$	0,38	0,31	0,39	0,42
<i>C. glutamicum</i> $\Delta mcbR \Delta metB$	0,22	0,12	n.b.	0,36

¹ n.b. = nicht bestimmt.

Hier könnten systembiologische Untersuchungen auf den unterschiedlichen Schwefelquellen Klärung bringen. Die NADPH-Ersparnis dürfte nicht so sehr ins Gewicht fallen, da in diesem Stamm aufgrund des MetB-Knockouts kein Homolanthionin mehr akkumuliert wurde und das Wachstum auf Thiosulfat ja sogar langsamer war, als auf Sulfat. Außerdem ist zu erwarten, dass DMDS, falls es als Antioxidanz wirkt, selbst oxidiert wird und dann wieder reduziert werden muss. Thiosulfat könnte als Thiol auch den oxidativen Stress

erhöhen, weshalb bei 3 von 4 Stämmen ein langsames Wachstum auf dieser Schwefelquelle beobachtet wurde (Tabelle 7-8).

Diese Studie zeigte, dass die stärker reduzierten Schwefelquellen Thiosulfat, Methanthiol und DMDS durch *C. glutamicum* gut verstoffwechselt werden können. Dies ist ein wichtiger Schritt in der Entwicklung eines Methioninproduzenten aus *C. glutamicum*, insbesondere vor dem Hintergrund der theoretischen Kohlenstoffausbeuten auf diesen Substraten. Außerdem zeigte sich auch, dass bei einzelnen Schwefelquellen neben dem Reduktionsgrad auch noch sekundäre Effekte für ein besseres Wachstum bestimmter Stämme verantwortlich sein könnten.

7.3.9. Thiosulfatmetabolismus

Das vorangegangene Kapitel hat gezeigt, dass Thiosulfat von Wildtyp und Mutante als alleinige Schwefelquelle genutzt werden kann. Die Unterschiede der Wachstumsraten der einzelnen Stämme auf diesem Substrat deuten allerdings auf unterschiedliche Arten der Verstoffwechslung hin. Bisher wurde noch nicht geklärt, wie *C. glutamicum* Thiosulfat verwertet (vgl. Kap. 5.3.).

Wachstumsversuche mit ^{34}S markiertem Thiosulfat wurden durchgeführt, um nähere Erkenntnisse über die Verwertung von Thiosulfat zu erhalten. Es stellte sich die Frage, ob beide Schwefelatome des Thiosulfats gleich gut von den Zellen verwertet werden, wo doch ein Schwefel stärker reduziert ist und daher für die Zellen „günstiger“ sein sollte als das oxidiertere S-Atom. Es wurde Thiosulfat eingesetzt, das ausschließlich am reduzierten Sulfan-Schwefelatome mit dem stabilen Isotop ^{34}S markiert war. Die Kultivierungen wurden auf CG12½-Minimalmedium im Schüttelkolben durchgeführt und die Zellen in der späten exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Die Biomasse wurde hydrolysiert und mittels GC/MS die Markierungsmuster von Methionin, Cystein und Homocystein sowie in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ auch von Homolanthionin untersucht.

Die Markierungsverteilungen der S-haltigen Aminosäuren zeigten fundamentale Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante (Abb. 7-33). Es zeigte sich, dass der Wildtyp zu rund 80 % den oxidierteren Schwefel in seine Aminosäuren einbaute, während der reduzierte ^{34}S -Schwefel nur in 20 % der Aminosäuren vorhanden war. Bei *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ werden beide Schwefelatome gleichgut verwertet (Abb. 7-33). Dies zeigt, dass durch

den Knockout des Regulatorproteins offensichtlich eine verbesserte Thiosulfatverwertung möglich wird. Die Untersuchung zeigt auch dass im Wildtyp Thiosulfat vermutlich nicht über die Zwischenstufe S-Sulfo-Cystein metabolisiert wird (vgl. Kap. 5.3.). Wäre dies der Fall, würde man erwarten, dass vor allem ^{34}S -Cystein entstehen würde. Rätselhaft bleibt jedoch der Verbleib des markierten Schwefels im Wildtyp. Die Reduktion der markierten Fraktion auf 20 % bedeutet, dass der markierte Schwefel nur zur Hälfte für die Aminosäuresynthese zur Verfügung steht. Der Rest muss entweder selektiv die Zellen verlassen haben oder in einem anderen Stoffwechselprodukt akkumulieren. *Rhodopseudomonas palustris* zeigte in früheren Arbeiten, dass der Abbau von Thiosulfat konzentrationsabhängig ist. Bei niedrigeren Konzentrationen wurde Thiosulfat zu Sulfat und bei höheren Konzentrationen zu Tetrathionat und Sulfat abgebaut (Rodova und Pedan, 1980).

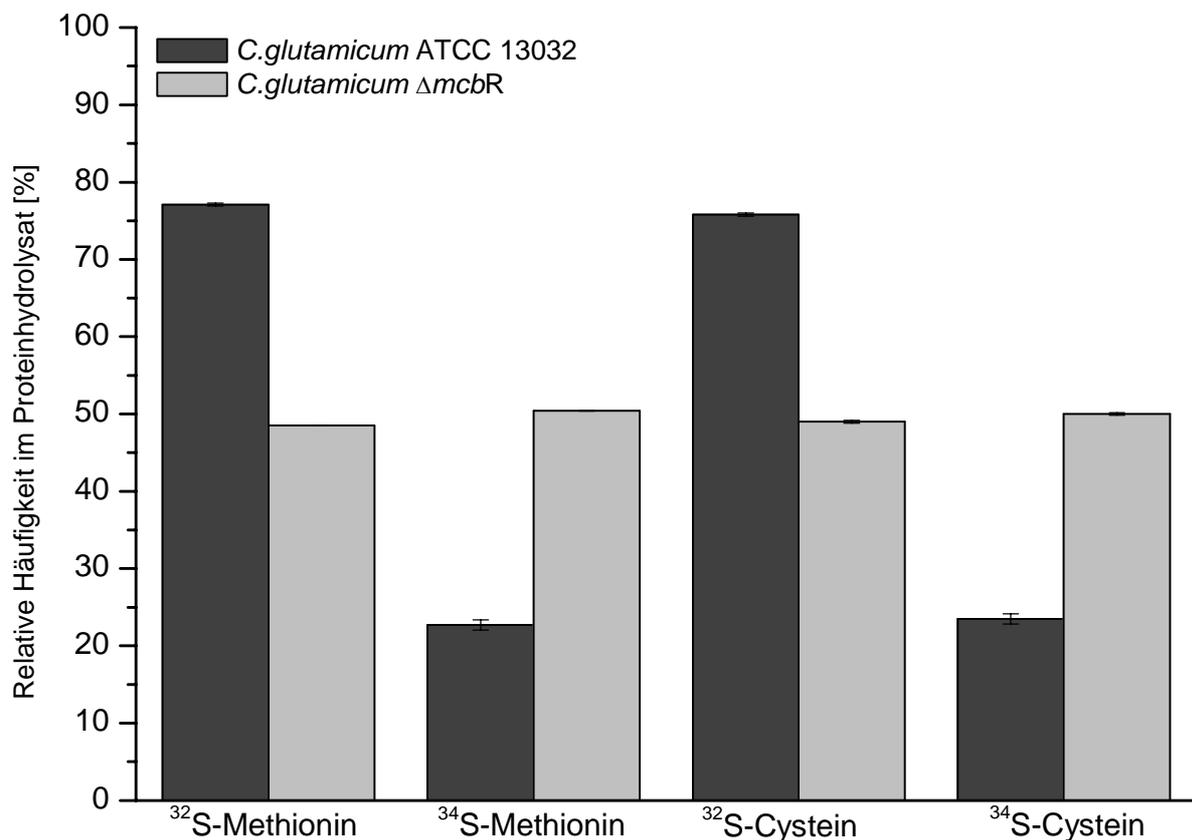
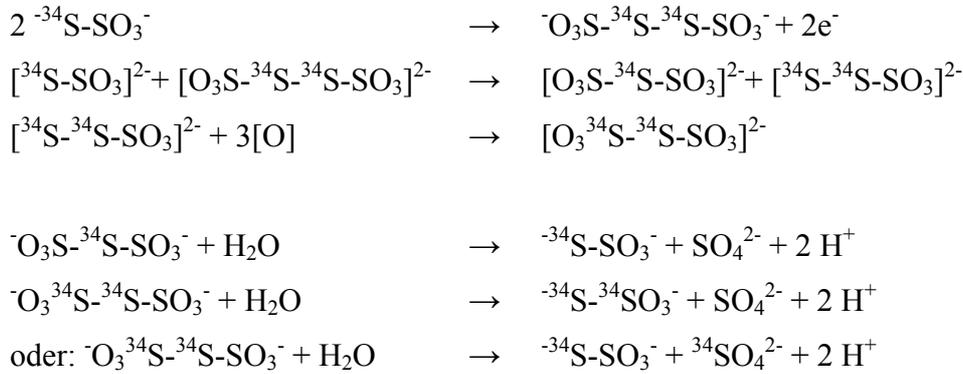
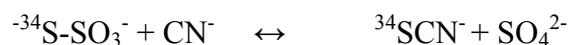


Abb. 7-33: Markierungsverteilung in Methionin und Cystein im Proteinhydrolysat nach Kultivierung von *C. glutamicum* Wildtyp und $\Delta mcbR$ auf am Sulfanschwefel ^{34}S -markiertem Thiosulfat als alleiniger Schwefelquelle.

Die Oxidation von Thiosulfat zu Tetrathionat läuft vermutlich schneller ab, als die Reduktion des Tetrathionaten zurück zum Thiosulfat (Trudinger, 1967). In *Thiobacillus neapolitanus* wurde Thiosulfat zum Tetrathionat oxidiert und mittels folgendem Mechanismus zum Sulfat oxidiert (Kelly *et al.*, 1997):



In der Summe entstehen also aus 3 ^{34}S -Thiosulfaten entweder erneut zwei gleich markierte ^{34}S -Thiosulfate sowie ein ^{34}S -Sulfat und ein ^{32}S -Sulfat oder ein doppelt und ein einfach markiertes Thiosulfat sowie 2 ^{32}S -Sulfate. Geht man davon aus, dass ^{34}S -Thiosulfat in sehr großem Überschuss vorhanden ist, würde man erwarten, das Sulfat nur noch zu rund 25 % markiert vorliegt. Da Thiosulfat im Überschuss eingesetzt wurde, könnte dies den Verlust an ^{34}S erklären, insbesondere da die Thiosulfatoxidation bei *Paracoccus* und *Thiobacillus* vollständig oder zumindest zum Teil im periplasmatischen Raum abläuft. Die zu erwartende Markierung von 25 % stimmt recht gut mit der beobachteten Markierung von 22,7 % beim Wildtyp überein. Fraglich ist nur, warum *C. glutamicum* Thiosulfat erst zu Sulfat oxidieren sollte, um es dann wieder zu Sulfid zu reduzieren. Die vorgenannten Organismen nutzen diese Oxidation von Thiosulfat als Elektronendonator und treiben damit die Atmungskette an (Kelly *et al.*, 1997). Ein Experiment mit Thiosulfat als limitierender Schwefelquelle könnte hier Klärung bringen. Man würde dann eine 1:1 Verteilung von ^{34}S und ^{32}S im Zellprotein erwarten. Eine weitere Möglichkeit zum „Verschwinden“ des markierten Schwefels wäre eine Rhodanesereaktion (Kelly und Wood, 1994):



In dieser Reaktion ist normalerweise Cyanid der Akzeptor des Sulfanschwefels und Thiocyanat wird gebildet. Allerdings kommen auch weitere Akzeptoren in Frage, wie beispielsweise die α -Liponsäure (Cianci *et al.*, 2000; Le Faou *et al.*, 1990). Diese ist sowohl Cofaktor des Pyruvatdehydrogenasekomplexes (Schwinde *et al.*, 2001) und kann auch als Antioxidanz wirken (Patel und Hong, 1998). Die α -Liponsäure-Synthase wird in $\Delta mcbR$ sogar induziert (Rey *et al.*, 2005), was sicher ein Teil der oxidativen Stressantwort ist. Die Proteomuntersuchungen haben gezeigt, dass eine Rhodanese-verwandte Schwefeltransferase sowohl im Wildtyp als auch in $\Delta mcbR$ gleichstark exprimiert werden (vgl. Kap. 7.3.6). Allerdings kann weder die Übertragung des Sulfanschwefels auf Cyanid (dessen Herkunft hier auch nicht erklärt werden kann) noch die Übertragung auf die α -Liponsäure das Verhältnis von ^{34}S zu ^{32}S hinreichend erklären. Wahrscheinlich transferiert die Liponsäure den Sulfanschwefel als anorganischen Schwefel auf Fe-S-Komplexe (Cianci *et al.*, 2000). Allerdings sind in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ Enzyme der Synthese von Fe-S-Komplexen und die α -Liponsäure-Synthase überexprimiert, was eigentlich erwarten ließe, dass im Mutanten ^{34}S verstärkt in Fe-S-Komplexe gelangt und nicht in die Aminosäuren. In *Chromatium* wird der Sulfanschwefel als elementarer Schwefel akkumuliert (Kelly *et al.*, 1997). Diese Möglichkeit könnte in *C. glutamicum* auch bestehen, jedoch ist es auch dann nicht klar, warum im Wildtyp mehr elementarer Schwefel akkumulieren sollte. Andererseits ist fraglich, warum zwar der Wildtyp Thiosulfat oxidieren sollte, die Regulatorknockoutmutante jedoch nicht. Falls der Wildtyp Thiosulfat im Überschuss wirklich oxidiert, wäre dies sicher ein Nachteil für eine industrielle Methioninproduktion mit *C. glutamicum* und eine genauere Untersuchung ist dringend erforderlich.

Die Regulatorknockoutmutante verstoffwechselt beide Schwefelatome des Thiosulfats gleich gut. In *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ werden die Cysteinsynthase CysK und die Cystathionin- γ -Synthase MetB überexprimiert. Was zur Bildung von Sulfocystein führen könnte, das dann über die ebenfalls überexprimierte Sulfonatase *ssuD1* (Rey *et al.*, 2005) zu Cystein und Sulfat gespalten werden könnte (vgl. Kap. 5.3). Ein solcher Weg würde allerdings eine erhöhte Markierung im Cystein erwarten lassen, da ja je gespaltenes Thiosulfat erst einmal ein ^{34}S -Cystein entstünde. Allerdings war die Verteilung der Markierung unter den verschiedenen Aminosäuren innerhalb eines Stammes sehr konstant (Abb. 7-33), was darauf schließen lässt, dass die Synthese aller Aminosäuren aus dem gleichen Pool von reduziertem Schwefel erfolgte. Außerdem wurde in früheren Arbeiten beobachtet, dass die Sulfat-

Adenyltransferase, das erste Enzym im Sulfatreduktionsweg, von Thiosulfat inhibiert wird (Le Faou *et al.*, 1990), so dass dann ^{32}S -Sulfat akkumulieren würde. Eine andere Möglichkeit wäre die Verstoffwechslung von Thiosulfat durch eine Thiosulfatreduktase (Bang *et al.*, 2000):



Diese Reaktion würde direkt Sulfid und Sulfit verfügbar machen, die dann, nach erfolgter Reduktion des Sulfits, beide in die Aminosäuresynthese einfließen könnten. Die Markierungsdaten legen einen solchen Mechanismus nahe. Allerdings ist eine Thiosulfatreduktase bislang nicht für *C. glutamicum* beschrieben worden. Die unterschiedliche Verwertung der beiden Schwefelatome des Thiosulfats in *C. glutamicum* Wildtyp und ΔmcbR spiegelte sich auch in der Steigerung der Biomasseausbeute wider. Während sich die Ausbeute im Wildtyp auf Thiosulfat um 13 % steigerte, stieg die Ausbeute im Mutanten um 21 % an (vgl. Kap. 7.3.8). Dies entspricht fast einer Verdoppelung, die auch bei der Verwertung des Sulfanschweifels in ΔmcbR vorliegt.

Die Markierungsstudien mit ^{34}S -Thiosulfat haben gezeigt, dass *C. glutamicum* Thiosulfat als alleinige Schwefelquelle nutzen kann, dieses aber auf unterschiedlichen Wegen verstoffwechselt. Eine Analyse der Markierung des extrazellulären Thiosulfats und auch des eventuell akkumulierten Sulfats könnte dazu dienen, die Bildung von Tetrathionaten und damit die Oxidation von Thiosulfat zu bestätigen oder auszuschließen. Der Knockout der Rhodanese, oder auch der Sulfonatase könnte dazu dienen, einzelne Wege auszuschließen und so den tatsächlichen Zustand in den beiden Stämmen aufklären zu können.

7.3.10. Verstoffwechslung von Methanthiol

Es wurde untersucht, ob Methanthiol von *C. glutamicum* direkt in Methionin eingebaut wird, oder vorher gespalten wird. Hierzu wurde *C. glutamicum* ΔmetB mit Cystein und $\text{D}_3\text{C-SH}$ (deuteriertes Methanthiol) im Schüttelkolben kultiviert und anschließend die Massenverschiebung von Methionin im Proteinhydrolysat mittels GC/MS quantifiziert. Da Methionin während der Hydrolyse zum Teil in Homocystein abgebaut wird, wurden die

Hydrolysate von zwei unabhängigen Kultivierungen vereint und über eine C18-Säule entsalzt. Dies ermöglichte den Einsatz größerer Hydrolysatmengen zur GC/MS-Messung.

Das Methionin in *C. glutamicum* $\Delta metB$ war zu 67,4 % natürlich markiert und zu 30,3 % um 3 Massen schwerer. Das heißt, dass ein Drittel des Methionins direkt aus O-Acetylhomoserin und Methanthiol entstanden sind. Dies zeigt darüber hinaus, dass die O-Acetylhomoserin-Sulphydrolase (MetY) von *C. glutamicum* in der Lage ist, Methanthiol anstelle von Sulfid als Substrat zu verwerten. Die Nichtmarkierung in 67,4 % der Methioninmoleküle kann mehrere Ursachen haben:

Zum einen könnte ein Teil des Methanthiols zur Bildung von Methylcystein führen, wenn es auf O-Acetylserin übertragen wird. Der Abbau dieser Aminosäure könnte dann Sulfid freisetzen, das seinerseits zur Homocysteinsynthese verwendet werden könnte. Eine weitere Möglichkeit besteht in der γ -Lyaseaktivität von MetC. Dieses Enzym kann Cystein zu Sulfid, Ammonium und Pyruvat spalten (Wada *et al.*, 2002). Eine wichtige Reaktion in der Bildung von Fe-S-Clustern. Auch diese Reaktion könnte zur Bildung von Homocystein führen, das dann mit einer unmarkierten Methylgruppe zu Methionin umgesetzt würde. Die dritte und vermutlich wichtigste Ursache ist die Transmethylierung. Wird markiertes Methionin zum SAM aktiviert und die Methylgruppe übertragen, entsteht auch Homocystein. Die Wiederholung des Experimentes mit ^{34}S -Methanthiol könnte zeigen, ob die Transmethylierung oder auch die beiden erstgenannten Reaktionen für die Markierungsverteilung verantwortlich sind. Bei ausschließlicher Aktivität der Transmethylierung würde man nur ^{34}S -Methionin erhalten. Bei Bildung von Methylcystein würde zwar Methionin markiert sein, aber auch Cystein zumindest teilweise. Bei Abbau von Cystein durch MetC würde dagegen die natürliche Markierung des ^{32}S -Cysteins im Medium auch im Methionin sichtbar werden. Würde sich herausstellen, dass für die Markierungsverteilung im Methionin nur die Transmethylierung verantwortlich ist, könnte die Kultivierung mit $\text{D}_3\text{C-SH}$ direkt genutzt werden, um den Bedarf an SAM für die anabole Zwecke *in vivo* zu studieren. Allerdings wurde beobachtet, dass in *C. glutamicum* die DNA nur zu einem geringen Teil methyliert ist. So wurden für in *C. glutamicum* ATCC 13032 0,17 mol % 5-methyl-2-Deoxycytidin und 0,06 mol % 6-methyl-2-Deoxyadenosin detektiert (Jang *et al.*, 1996). Nimmt man einen DNA-Gehalt von 3,1 % der Biotrockenmasse an, wie er bei *E. coli* beobachtet wurde (Neidhardt *et al.*, 1990) und nimmt man ferner die Molekulargewichte von $242,2 \text{ g mol}^{-1}$ für 5-methyl-2-Deoxycytidin und $266,3 \text{ g mol}^{-1}$ 6-

methyl-2-Deoxyadenosin, ergibt sich für die methylierten Nukleotide eine Konzentration von $0,23 \mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$. Stellt man dies dem anabolen Bedarf an Methionin von $146 \mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ (Neidhardt *et al.*, 1990) gegenüber, zeigt sich, dass die Methylierung der DNA sicher nicht für den hohen Anteil an unmarkiertem Methionin verantwortlich ist, selbst wenn der DNA-Gehalt deutlich über dem von *E. coli* liegen würde.

Für die Verwendung von Methanthiol als Schwefelquelle in einer biotechnologischen Methioninproduktion ist dieses Ergebnis von zentraler Bedeutung. Nicht nur, dass die Zellen das Gas als Schwefelquelle nutzen können, sondern auch die Verwertung als C1-Quelle wird hier deutlich. Gleichzeitig zeigt sich auch ein weiterer positiver Effekt des Knockouts von MetB. Da die Zellen den Transsulfurierungsweg nicht mehr direkt, sondern nur noch indirekt über die Spaltung von Cystein durchlaufen können und diese langsamer abläuft als die Spaltung von Cystathionin (Wada *et al.*, 2002), würde Methanthiol hauptsächlich zur Methioninsynthese eingesetzt, während Sulfat, das in industriellen Produktionsmedium nicht zu vermeiden ist, hauptsächlich in die Biomassesynthese fließen würde.

7.3.11. Zusammenfassung

Der systembiologische Vergleich von *C. glutamicum* Wildtyp und *C. glutamicum* ΔmcbR hat vielfältige Effekte der Deletion des Regulatorproteins McbR auf den Organismus aufgedeckt. Besonders drastisch stellte sich dies anhand der Akkumulation von Homolanthionin dar, die zu einer messbaren Erhöhung des Schwefelgehaltes in der Biomasse führte. Außerdem zeigten die Korrelation von optischer Dichte und Biomasse und die REM-Aufnahmen eine Vergrößerung der Zellen von *C. glutamicum* ΔmcbR . Dünnschnitte durch die Zellen ließen zusätzlich die Existenz von Einschlusskörpern im Regulatorknockoutstamm erkennen. Diese Einschlusskörper bestehen nicht aus Homolanthionin, was die Deletion von MetB eindeutig zeigte. Allerdings konnten sie noch nicht näher spezifiziert werden.

Beide Stämme unterschieden sich auch in Wachstum und Biomasseausbeute. Während *C. glutamicum* Wildtyp die Glucose fast optimal verwertete, wuchs ΔmcbR nur halb so schnell und bildete signifikant mehr CO_2 . Extrazellulär werden vor allem Trehalose und Glycin akkumuliert. Eine Akkumulation von Methionin konnte nicht beobachtet werden. Die Untersuchung der intrazellulären Aminosäuren zeigt, dass in *C. glutamicum* ΔmcbR vor allem Intermediate des Methioninstoffwechsels akkumulierten. Aber auch die Verhältnisse

zwischen Prolin und Trehalose, zwei wichtige Metabolite der Osmoregulation, zeigten veränderte Verteilungen innerhalb und außerhalb der Zellen. Dies deutete auf einen erhöhten osmotischen Stress im Regulatorknockoutmutanten hin. Die ^{13}C -Flussanalyse zeigt vor allem eine starke Erhöhung des relativen Flusses von 58,5 auf 88,5 % in den TCA-Zyklus. Diese relative Erhöhung führt dazu, dass dieser Fluss absolut gesehen in beiden Stämmen fast gleich ist. Dies ist die Ursache der erhöhten Produktion von CO_2 in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$. Gleichzeitig dürfte dies zu einem Überschuss von NADH und FADH führen, da die Zellen langsamer wachsen. Die Proteomstudien zeigten, dass in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ respiratorische Enzyme überexprimiert werden. Gleichzeitig wurde in Transkriptomstudien beobachtet, dass neben respiratorischen Enzymen die Sulfitreduktase überexprimiert und die ATP-Synthase schwächer exprimiert werden. Es ist also anzunehmen, dass die Reduktionskraft nicht zu einer erhöhten oxidativen Phosphorylierung genutzt wird. Der Überschuss an NADH und FADH und die Überexpression der Atmungskette ohne die ATP-Synthase sowie die Überexpression der Sulfitreduktase führen in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ wahrscheinlich zu erhöhtem, oxidativem Stress. Dies spiegelt sich auch in einer erhöhten Proteinkonzentration der Catalase wider. Der erhöhte oxidative Stress könnte auch zum langsameren Wachstum von $\Delta mcbR$ geführt haben. Auf den Sulfat- und Schwefelmetabolismus hat die Deletion von *mcbR* die Auswirkung, dass fast alle Enzyme dieser Stoffwechselwege überexprimiert werden. Dies spiegelt sich auch im Metabolom wider. Eine große Ausnahme stellen die Methioninsynthasen dar. Diese wurden zwar in früheren Transkriptomstudien als induziert detektiert, aber es konnten keine erhöhten Proteinkonzentrationen für diese Schlüsselenzyme gemessen werden. Dies deutet auf eine posttranskriptionelle Regulation der Expression hin und könnte erklären, warum in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ keine signifikante Produktion von Methionin stattfindet. Der Stamm kann aus Homocystein große Mengen Homolanthionin bilden. Die limitierende Reaktion scheint also die Methylierung von Homocystein zu sein. Da das Zufüttern von Serin nur sehr geringe Steigerungen der intrazellulären Methioninkonzentrationen bewirkte, ist vermutlich die Aktivität der Methioninsynthasen limitierend.

Die Untersuchungen zur Verwertung unterschiedlicher Schwefelquellen durch *C. glutamicum* haben gezeigt, dass der Organismus in der Lage ist, neben Sulfat auch Thiosulfat, Methanthiol und Dimethyldisulfid als Schwefelquelle zu nutzen. Methanthiol dient auch als C_1 -Donor, was höchstwahrscheinlich auch für Dimethyldisulfid gilt, da dieses

in der Zelle erst zu 2 Molekülen Methanthiol gespalten wird. Die Untersuchungen zur Thiosulfatverwertung haben gezeigt, dass diese Schwefelquelle von Wildtyp und $\Delta mcbR$ -Stamm unterschiedlich verwertet werden. Während der Wildtyp den Sulfatschwefel zu rund 80 % verwertet, werden im Regulatorknockoutstamm beide Schwefel gleichwertig verwertet. Ursache könnte im Wildtyp eine Thiosulfatoxidation zum Tetrathionat und im Mutanten die Expression einer Thiosulfatreduktase sein. Im Hinblick auf eine industrielle Produktion auf Thiosulfat wäre eine Oxidation des Thiosulfats sehr ungünstig, da dann nicht mehr mit einer Ersparnis an Reduktionsäquivalenten und damit auch nicht mehr mit einer Erhöhung der Kohlenstoffausbeute zu rechnen wäre.

8. SCHLUSSFOLGERUNGEN

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Reihe verschiedener Techniken zur Charakterisierung der Methioninproduktion mit *C. glutamicum* angewandt. Diese beinhalteten sowohl *in silico* Methoden, wie z.B. die Elementarmodenanalyse als auch morphologische und metabolische Studien sowie Analysen von Proteom und Fluxom.

Die Elementarmodenanalyse betrachtete die Methioninproduktion von einem rein stöchiometrischen Aspekt und ermöglichte den Vergleich der Methioninausbeuten einerseits von *C. glutamicum* und *E. coli* und andererseits von *C. glutamicum* mit unterschiedlichen genetischen Mutationen oder auf verschiedenen Substraten (Krömer *et al.*, 2006c). Es ergaben sich interessante Targets für die Stamm- und Prozessoptimierung, wie beispielsweise die Kultivierung mit alternativen Schwefelquellen, die genetische Einführung eines Glycinspaltungssystems, einer Transhydrogenase oder der Enzyme für die Formiatverwertung. Im Zentralstoffwechsel konnten außerdem Optimierungsansätze, wie beispielsweise der Knockout der Pyruvatkinase, identifiziert werden. Die *in vivo* Untersuchungen an einem Lysinproduzenten zeigten, dass diese Mutation tatsächlich zu einer Steigerung der Kohlenstoffausbeute des Lysins führt. Die Mutation lenkt also mehr Kohlenstoff in die Synthese von Aminosäuren der Aspartatfamilie, zu der auch Methionin gehört. Die stöchiometrische Netzwerkanalyse ermöglichte es außerdem den Bedarf an Reduktionsäquivalenten mit der Kohlenstoffausbeute zu korrelieren. So wird beispielsweise die Methioninausbeute je eingespartes NADPH um 4,6 % erhöht, wenn man unterschiedlich stark reduzierte Schwefelquellen betrachtet.

Die Methioninproduktion mit *C. glutamicum* erfordert zur Maximierung der Kohlenstoffausbeute die Verwendung stärker reduzierter Schwefelquellen als Sulfat. Erste Studien im Rahmen dieser Arbeit haben gezeigt, dass Thiosulfat, Methanthiol oder Dimethyldisulfid als eine solche Schwefelquelle dienen könnten und Methanthiol auch als alternative C₁-Kohlenstoffquelle eingesetzt werden kann. Dies gilt höchstwahrscheinlich auch für Dimethyldisulfid, da dieses in der Zelle erst zu 2 Molekülen Methanthiol gespalten wird. Die Untersuchungen zur Thiosulfatverwertung haben eine unterschiedliche Verwertung dieser Schwefelquelle durch *C. glutamicum* Wildtyp und $\Delta mcbR$ gezeigt. Auf der einen Seite

verwertet der Wildtyp zu rund 80 % den Sulfatschwefel, während auf der anderen Seite im Regulatorknockoutstamm beide Schwefelatome gleichwertig verwertet werden. Eine mögliche Erklärung könnte eine Thiosulfatoxidation zum Tetrathionat im Wildtyp von *C. glutamicum* sein. Dies würde bei einem großen Überschuss an Thiosulfat, wie es im Experiment der Fall war, zu einer gesteigerten Menge an Sulfatschwefel führen. Im Mutanten könnte die Expression einer Thiosulfatreduktase die gleichwertige Verwertung beider Schwefelatome des Thiosulfats bewirken. Dies könnte der erste Hinweis auf die Existenz eines solchen Enzyms in *C. glutamicum* sein. Für die industrielle Produktion von Methionin mit Thiosulfat als Schwefelquelle würde die Oxidation des Thiosulfats dazu führen, dass die gleichen Ausbeuten, wie auf Sulfat zu erwarten wären.

Die Entwicklung robuster Methoden zur Analytik intrazellulärer Metabolite (Krömer *et al.*, 2005; Krömer *et al.*, 2006a; Wittmann *et al.*, 2004b) ermöglichte intensive Studien des Stoffwechsels von *C. glutamicum* Wildtyp und *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ und erlaubte die Methioninsynthese nicht nur stöchiometrisch, sondern auch regulatorisch zu betrachten. Neben der Akkumulation von Intermediaten des Methioninstoffwechsels führte der Regulatorknockout auch zur Überexpression vieler Proteine der Methioninsynthese und der Sulfatreduktion. So konnte die Methylierung von Homocystein als die limitierende Reaktion in der Produktion von Methionin identifiziert werden. Wahrscheinlich liegt dies an einer posttranskriptionellen Regulation der Methioninsynthesen, da bislang keine Feedbackregulation für diese Enzyme beobachtet wurde und gleichzeitig die Induktion der Gene in $\Delta mcbR$ nachgewiesen wurde. Diese Regulation könnte beispielsweise auf Ebene der Elongation oder der Proteinstabilität erfolgen. Dafür spricht auch, dass das Füttern von Serin nur zu einer knappen Verdoppelung der intrazellulären Methioninkonzentration führte. Eine Limitierung durch den Export von Methionin kann angesichts der niedrigen intrazellulären Konzentrationen ausgeschlossen werden.

Der systembiologische Ansatz zeigte aber auch, dass in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ erhöhter oxidativer Stress vorliegt, was wahrscheinlich mit der Expression respiratorischer Enzyme und der Sulfitreduktase zusammenhängt. Damit im Zusammenhang steht vermutlich auch der erhöhte Fluss in den TCA-Zyklus und das langsamere Wachstum von *C. glutamicum* $\Delta mcbR$. Die metabolischen Studien an *C. glutamicum* Wildtyp und der Regulatormutante *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ führten darüber hinaus zur Entdeckung der Biosynthese und Verstoffwechslung von Homolanthionin in *C. glutamicum* (Krömer *et al.*, 2006b). Es konnte

gezeigt werden, dass Homolanthionin in einer Nebenreaktion der Cystathionin- γ -Synthase aufgrund geringer Substratspezifität gebildet wird. Gespalten wird Homolanthionin nur sehr gering, höchstwahrscheinlich durch die Cystathionin- β -Lyase. Die Spaltung aktiviert einen zusätzlichen Weg zur Isoleucinsynthese. Die Deletion der Cystathionin- γ -Synthase kann daher als wichtiger Schritt in der Stammoptimierung angesehen werden.

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass der Knockout von *mcbR*, wegen der vielen unspezifischen Sekundäreffekte auf die Zelle, ungünstig für die Methioninproduktion ist. Im Rahmen einer rationalen Stammentwicklung wäre es sicher besser, nur an bestimmten Genen die McbR-Bindestellen zu entfernen, oder andere Promotoren einzubauen. Gleichzeitig konnte aber auch beobachtet werden, dass in *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ sehr viel Kohlenstoff bis zur Ebene des Homocysteins fließt und gleichzeitig sehr viel NADPH zur Synthese des Homolanthionins bereitgestellt werden kann. Dies deutet darauf hin, dass *C. glutamicum* ein hohes Potential für die Methioninproduktion hat. Allerdings bedürfen die Methylierungsreaktionen und der C₁-Stoffwechsel weiterer Untersuchungen.

Schlussendlich wird, meiner Meinung nach, die zielgerichtete Optimierung von *C. glutamicum* und der Kultivierungsbedingungen früher oder später das große Potential dieses Organismus zur Produktion von Methionin freisetzen und eine wirtschaftliche biotechnologische Produktion von L-Methionin möglich machen.

9. AUSBLICK

In dieser Arbeit konnten neue Erkenntnisse über den Schwefel- und Methioninstoffwechsel in *C. glutamicum* gewonnen werden. Allerdings wurden auch viele neue Fragen aufgeworfen, die in der Zukunft kreativer und hartnäckiger Forschung bedürfen. Beispielsweise sollte die Identität der Einschlüsse unbedingt geklärt werden, da dies wichtige Informationen über die weit reichenden Effekte des Regulatorknockouts liefern könnte. Die Verwertung der unterschiedlichen Schwefelquellen erfordert ebenfalls weitere Studien, denn nur wenn die Schwefelquellen wirklich in der reduzierten Form dem Methioninmetabolismus zufließen, führen Sie auch wirklich zu einer Erhöhung der Kohlenstoffausbeute. In diesem Kontext ist es auch wichtig den Kometabolismus verschiedener Schwefelquellen zu untersuchen, da es in komplexen Nährmedien der industriellen Produktion nicht möglich sein wird, sulfatfrei zu arbeiten. Sulfat ist jedoch für *C. glutamicum* die bevorzugte Schwefelquelle. Systembiologische Untersuchungen beispielsweise von *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ bei Wachstum mit Dimethyldisulfid könnten tiefere Erkenntnisse über den oxidativen Stress und die dadurch bedingte Stressantwort in *C. glutamicum* bringen. Dieser Stress spielt im industriellen Prozess vielleicht eine große Rolle, insbesondere da die Stressantwort oft mit der Synthese von Fe-S-Clustern verknüpft ist, die eine Cysteinspaltung voraussetzt. Es wäre also nur von Vorteil, wenn eine reduzierte Schwefelquelle zusätzlich auch noch den oxidativen Stress mindern würde. Hier könnte die Analyse von Stressmarkern dazu genutzt werden, um den oxidativen Stress quantitativ zu untersuchen.

Die in dieser Arbeit aufgestellten stöchiometrischen Modelle sollten in Zukunft dazu genutzt werden, um zusammen mit Analyse von Metabolom, Fluxom und Proteom die Stammoptimierung zu begleiten. Während erstere zur Analyse des stöchiometrischen Optimums bestimmter Mutanten herangezogen werden können, geben letztere Auskunft über das regulatorische Optimum. Die erfolgreiche Produktion von Methionin mit *C. glutamicum* mit hohen Ausbeuten wird die Optimierung sowohl auf stöchiometrischer, als auch auf regulatorischer Ebene erfordern. Insbesondere die Regulation der Methioninsynthesen und des C₁-Stoffwechsels sollte daher näher charakterisiert werden, da dies der limitierende Faktor in der Methioninsynthese zu sein scheint. Hier könnte auch die Synthese von

Methyltetrahydropteroyltriglutamat dem Methylgruppendonor von MetE wichtig sein. Die Synthese dieses Stoffes in *C. glutamicum* ist bislang gänzlich unbekannt. Die Verwertbarkeit von Formiat durch *C. glutamicum* ist hier eine ebenso interessante Fragestellung wie die Charakterisierung von GlyA und MetF, den Hauptenzymen des C₁-Stoffwechsels, die nicht unter Kontrolle von McbR stehen.

10. LITERATUR

- Ami, D., A. Natalello, P. Gatti-Lafranconi, M. Lotti and S. M. Doglia.** 2005. Kinetics of inclusion body formation studied in intact cells by FT-IR spectroscopy. *FEBS Lett.* **579**: 3433-3436.
- Bailey, J. E.** 1991. Toward a science of metabolic engineering. *Science.* **252**: 1668-1675.
- Baker, D. H.** 1986. Utilization of isomers and analogs of amino acids and other sulfur-containing compounds. *Prog Food Nutr Sci.* **10**: 133-178.
- Bang, S. W., D. S. Clark and J. D. Keasling.** 2000. Engineering hydrogen sulfide production and cadmium removal by expression of the thiosulfate reductase gene (phsABC) from *Salmonella enterica serovar typhimurium* in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3939-3944.
- Barreiro, C., E. Gonzalez-Lavado, S. Brand, A. Tauch and J. F. Martin.** 2005. Heat shock proteome analysis of wild-type *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 and a spontaneous mutant lacking GroEL1, a dispensable chaperone. *J. Bacteriol.* **187**: 884-889.
- Bayan, N., C. Houssin, M. Chami and G. Leblon.** 2003. Mycomembrane and S-layer: two important structures of *Corynebacterium glutamicum* cell envelope with promising biotechnology applications. *J. Biotechnol.* **104**: 55-67.
- Blount, B. C. and M. W. Duncan.** 1997. Trace quantification of the oxidative damage products, meta- and ortho-tyrosine, in biological samples by gas chromatography-electron capture negative ionization mass spectrometry. *Anal Biochem.* **244**: 270-276.
- Blum, H., H. Beier and H. J. Gross.** 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis.* **8**: 93-99.
- Bonnarme, P., L. Psoni and H. E. Spinnler.** 2000. Diversity of L-methionine catabolism pathways in cheese-ripening bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 5514-5517.
- Brand, S., K. Niehaus, A. Pühler and J. Kalinowski.** 2003. Identification and functional analysis of six mycolyltransferase genes of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032: the genes cop1, cmt1, and cmt2 can replace each other in the synthesis of trehalose dicorynomycolate, a component of the mycolic acid layer of the cell envelope. *Arch Microbiol.* **180**: 33-44.
- Brumaghim, J. L., Y. Li, E. Henle and S. Linn.** 2003. Effects of hydrogen peroxide upon nicotinamide nucleotide metabolism in *Escherichia coli*: changes in enzyme levels and

- nicotinamide nucleotide pools and studies of the oxidation of NAD(P)H by Fe(III). *J. Biol. Chem.* **278**: 42495-42504.
- Burkovski, A.** 2005. Nitrogen Metabolism and Its Regulation. In: Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. Eggeling, L., Bott, M. (Eds.). pp 333-349. CRC Press, Taylor and Francis. Boca Raton, FL, USA
- Carducci, C., M. Birarelli, M. Nola and I. Antonozzi.** 1999. Automated high-performance liquid chromatographic method for the determination of homocysteine in plasma samples. *J Chromatogr A.* **846**: 93-100.
- Carlson, R., D. Fell and F. Srienc.** 2002. Metabolic pathway analysis of a recombinant yeast for rational strain development. *Biotechnol. Bioeng.* **79**: 121-134.
- Carlson, R. and F. Srienc.** 2004a. Fundamental *Escherichia coli* biochemical pathways for biomass and energy production: creation of overall flux states. *Biotechnol. Bioeng.* **86**: 149-162.
- Carlson, R. and F. Srienc.** 2004b. Fundamental *Escherichia coli* biochemical pathways for biomass and energy production: identification of reactions. *Biotechnol. Bioeng.* **85**: 1-19.
- Chiba, Y., R. Sakurai, M. Yoshino, K. Ominato, M. Ishikawa, H. Onouchi and S. Naito.** 2003. S-adenosyl-L-methionine is an effector in the posttranscriptional autoregulation of the cystathionine gamma-synthase gene in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**: 10225-10230.
- Cianci, M., F. Gliubich, G. Zanotti and R. Berni.** 2000. Specific interaction of lipoate at the active site of rhodanese. *Biochim Biophys Acta.* **1481**: 103-108.
- Cox, S. J., S. Shalel Levanon, A. Sanchez, H. Lin, B. Peercy, G. N. Bennett and K. Y. San.** 2005. Development of a metabolic network design and optimization framework incorporating implementation constraints: A succinate production case study. *Metab. Eng.*
- D'Mello, J. P. F. and D. Lewis.** 1978. Effect of Nutrient Deficiencies in Animals: Amino Acids. Rechigl, M. (Ed), CRC Handbook Series in Nutrition and Food. 441-490.
- Dominguez, H., C. Rollin, A. Guyonvarch, J. L. Guerquin-Kern, M. Cocaign-Bousquet and N. D. Lindley.** 1998. Carbon-flux distribution in the central metabolic pathways of *Corynebacterium glutamicum* during growth on fructose. *Eur. J. Biochem.* **254**: 96-102.
- Duarte, N. C., B. B. Palsson and P. Fu.** 2004. Integrated analysis of metabolic phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics.* **5**: 63.
- Duerre, J. A. and C. H. Miller.** 1966. Preparation of L-homocysteine from L-homocysteine thiolactone. *Anal Biochem.* **17**: 310-315.

-
- Dwivedi, C. M., R. C. Ragin and J. R. Uren.** 1982. Cloning, purification, and characterization of beta-cystathionase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*. **21**: 3064-3069.
- Eggeling, L. and H. Sahm.** 1999. L-Glutamate and L-lysine: traditional products with impetuous developments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 146-153.
- Eggeling, L. and M. Bott.** 2005. Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. CRC Press; Taylor and Francis, Boca Raton, FL, USA
- Eikmanns, B. J., M. Metzger, D. Reinscheid, M. Kircher and H. Sahm.** 1991. Amplification of three threonine biosynthesis genes in *Corynebacterium glutamicum* and its influence on carbon flux in different strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 617-622.
- Ferretti, G., T. Bacchetti, E. Marotti and G. Curatola.** 2003. Effect of homocysteinylation on human high-density lipoproteins: a correlation with paraoxonase activity. *Metabolism*. **52**: 146-151.
- Ferretti, G., T. Bacchetti, C. Moroni, A. Vignini, L. Nanetti and G. Curatola.** 2004. Effect of homocysteinylation of low density lipoproteins on lipid peroxidation of human endothelial cells. *J Cell Biochem.* **92**: 351-360.
- Förster, J., A. K. Gombert and J. Nielsen.** 2002. A functional genomics approach using metabolomics and in silico pathway analysis. *Biotechnol. Bioeng.* **79**: 703-712.
- Frankard, V., G. Ispas, H. Hesse, M. Jacobs and R. Hoefgen.** 2002. A defect in cystathionine beta-lyase activity causes the severe phenotype of a *Nicotiana plumbaginifolia* methionine auxotroph. *Plant Science*. **162**: 607-614.
- Friedman, M.** 1999. Chemistry, nutrition, and microbiology of D-amino acids. *J Agric Food Chem.* **47**: 3457-3479.
- Gentry-Weeks, C. R., J. M. Keith and J. Thompson.** 1993. Toxicity of *Bordetella avium* beta-cystathionase toward MC3T3-E1 osteogenic cells. *J. Biol. Chem.* **268**: 7298-7314.
- Gonzalez, J. C., R. V. Banerjee, S. Huang, J. S. Sumner and R. G. Matthews.** 1992. Comparison of cobalamin-independent and cobalamin-dependent methionine synthases from *Escherichia coli*: two solutions to the same chemical problem. *Biochemistry*. **31**: 6045-6056.
- Gourdon, P. and N. D. Lindley.** 1999. Metabolic analysis of glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*. *Metab. Eng.* **1**: 224-231.

- Gutmann, M., C. Hoischen and R. Krämer.** 1992. Carrier-mediated glutamate secretion by *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation. *Biochim Biophys Acta.* **1112:** 115-123.
- Hasegawa, T., A. Bando, K. Tsuchiya, S. Abe, M. Okamoto, K. Kirima, S. Ueno, M. Yoshizumi, H. Houchi and T. Tamaki.** 2004. Enzymatic and nonenzymatic formation of reactive oxygen species from 6-anilino-5,8-quinolinequinone. *Biochim Biophys Acta.* **1670:** 19-27.
- Hayashi, M., H. Mizoguchi, N. Shiraishi, M. Obayashi, S. Nakagawa, J. Imai, S. Watanabe, T. Ota and M. Ikeda.** 2002. Transcriptome analysis of acetate metabolism in *Corynebacterium glutamicum* using a newly developed metabolic array. *Biosci Biotechnol Biochem.* **66:** 1337-1344.
- Hermann, T., W. Pfefferle, C. Baumann, E. Busker, S. Schaffer, M. Bott, H. Sahm, N. Dusch, J. Kalinowski, A. Pühler, A. K. Bendt, R. Krämer and A. Burkovski.** 2001. Proteome analysis of *Corynebacterium glutamicum*. *Electrophoresis.* **22:** 1712-1723.
- Holbrook, E. L., R. C. Greene and J. H. Krueger.** 1990. Purification and properties of cystathionine gamma-synthase from overproducing strains of *Escherichia coli*. *Biochemistry.* **29:** 435-442.
- Hop, C. E. and R. Bakhtiar.** 2002. Homocysteine thiolactone and protein homocysteinylation: mechanistic studies with model peptides and proteins. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **16:** 1049-1053.
- Huang, H. T.** 1963. Accumulation of 1-homolanthionine by an *Escherichia coli* mutant. *Biochemistry.* **2:** 296-298.
- Hüser, A. T., C. Chassagnole, N. D. Lindley, M. Merkamm, A. Guyonvarch, V. Elisakova, M. Patek, J. Kalinowski, I. Brune, A. Pühler and A. Tauch.** 2005. Rational design of a *Corynebacterium glutamicum* pantothenate production strain and its characterization by metabolic flux analysis and genome-wide transcriptional profiling. *Appl. Environ. Microbiol.* **71:** 3255-3268.
- Hwang, B. J., Y. Kim, H. B. Kim, H. J. Hwang, J. H. Kim and H. S. Lee.** 1999. Analysis of *Corynebacterium glutamicum* methionine biosynthetic pathway: isolation and analysis of metB encoding cystathionine gamma-synthase. *Mol Cells.* **9:** 300-308.
- Hwang, B. J., H. J. Yeom, Y. Kim and H. S. Lee.** 2002. *Corynebacterium glutamicum* utilizes both transsulfuration and direct sulfhydrylation pathways for methionine biosynthesis. *J. Bacteriol.* **184:** 1277-1286.
- Ibarra, R. U., P. Fu, B. O. Palsson, J. R. DiTonno and J. S. Edwards.** 2003. Quantitative analysis of *Escherichia coli* metabolic phenotypes within the context of phenotypic phase planes. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **6:** 101-108.

- Imlay, J. A., S. M. Chin and S. Linn.** 1988. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science*. **240**: 640-642.
- Iuchi, S. and L. Weiner.** 1996. Cellular and molecular physiology of *Escherichia coli* in the adaptation to aerobic environments. *J Biochem (Tokyo)*. **120**: 1055-1063.
- Jakubowski, H.** 1999. Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels. *Faseb J*. **13**: 2277-2283.
- Jang, K. H., P. J. Chambers and M. L. Britz.** 1996. Analysis of nucleotide methylation in DNA from *Corynebacterium glutamicum* and related species. *FEMS Microbiol Lett*. **136**: 309-315.
- Jetten, M., G. A. Pitoc, M. T. Follettie and A. J. Sinskey.** 1994. Regulation of phospho(enol)-pyruvate- and oxaloacetate-converting enzymes in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **41**: 47-52.
- Kacprzak, M. M., I. Lewandowska, R. G. Matthews and A. Paszewski.** 2003. Transcriptional regulation of methionine synthase by homocysteine and choline in *Aspergillus nidulans*. *Biochem J*. **376**: 517-524.
- Kalinowski, J., J. Cremer, B. Bachmann, L. Eggeling, H. Sahm and A. Pühler.** 1991. Genetic and biochemical analysis of the aspartokinase from *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol*. **5(5)**: 1197-1204.
- Kalinowski, J., B. Bathe, D. Bartels, N. Bischoff, M. Bott, A. Burkovski, N. Dusch, L. Eggeling, B. J. Eikmanns, L. Gaigalat, A. Goesmann, M. Hartmann, K. Huthmacher, R. Krämer, B. Linke, A. C. McHardy, F. Meyer, B. Mockel, W. Pfefferle, A. Pühler, D. A. Rey, C. Rückert, O. Rupp, H. Sahm, V. F. Wendisch, I. Wiegrabe and A. Tauch.** 2003. The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J. Biotechnol*. **104**: 5-25.
- Kanzaki, H., M. Kobayashi, T. Nagasawa and H. Yamada.** 1986. Synthesis of S-substituted L-homocysteine derivatives by cystathionine γ -lyase of *Streptomyces phaeochromogenes*. *Agric Biol Chem*. **50**: 391-397.
- Kase, H. and K. Nakayama.** 1974. The regulation of L-methionine synthesis and the properties of cystathionine gamma-synthase and beta-cystathionase in *Corynebacterium glutamicum*. *Agric Biol Chem*. **38 (11)**: 2235-2242.
- Keilhauer, C., L. Eggeling and H. Sahm.** 1993. Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the ilvB-ilvN-ilvC operon. *J. Bacteriol*. **175**: 5595-5603.
- Kelle, R., T. Hermann and B. Bathe.** 2005. L-Lysine Production. In: Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. Eggeling, L., Bott, M. (Eds.). pp 465-488. CRC Press, Taylor and Francis. Boca Raton, FL, USA.

- Kelly, D. P. and A. P. Wood.** 1994. Enzymes involved in microbiological oxidation of thiosulfate and polythionates. *Methods Enzymol.* **243**: 501-520.
- Kelly, D. P., J. K. Shergill, W. P. Lu and A. P. Wood.** 1997. Oxidative metabolism of inorganic sulfur compounds by bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **71**: 95-107.
- Kiefer, P., E. Heinzle and C. Wittmann.** 2002. Influence of glucose, fructose and sucrose as carbon sources on kinetics and stoichiometry of lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* **28**: 338-343.
- Kiefer, P., E. Heinzle, O. Zelder and C. Wittmann.** 2004. Comparative metabolic flux analysis of lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* cultured on glucose or fructose. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 229-239.
- Kiene, R. P., L. J. Linn, J. Gonzalez, M. A. Moran and J. A. Bruton.** 1999. Dimethylsulfoniopropionate and methanethiol are important precursors of methionine and protein-sulfur in marine bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4549-4558.
- Kim, J. W., H. J. Kim, Y. Kim, M. S. Lee and H. S. Lee.** 2001. Properties of the *Corynebacterium glutamicum* metC gene encoding cystathionine beta-lyase. *Mol Cells.* **11**: 220-225.
- Kiss, R. D. and G. Stephanopoulos.** 1992. Metabolic Characterization of a L-lysine-producing Strain by Continuous Culture. *Biotechnol. Bioeng.* **39**: 565-574.
- Klappa, M. I., J. C. Aon and G. Stephanopoulos.** 2003. Systematic quantification of complex metabolic flux networks using stable isotopes and mass spectrometry. *Eur. J. Biochem.* **270**: 3525-3542.
- Koffas, M. A., G. Y. Jung, J. C. Aon and G. Stephanopoulos.** 2002. Effect of pyruvate carboxylase overexpression on the physiology of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 5422-5428.
- Krömer, J. O., O. Sorgenfrei, K. Klopprogge, E. Heinzle and C. Wittmann.** 2004. In-depth profiling of lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* by combined analysis of the transcriptome, metabolome, and fluxome. *J. Bacteriol.* **186**: 1769-1784.
- Krömer, J. O., M. Fritz, E. Heinzle and C. Wittmann.** 2005. In vivo quantification of intracellular amino acids and intermediates of the methionine pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Anal Biochem.* **340**: 171-173.
- Krömer, J. O., E. Heinzle and C. Wittmann.** 2006a. Quantification of S-adenosyl methionine in microbial cell extracts. *Biotechnology letters.* accepted.

- Krömer, J. O., H. Schröder, E. Heinzle and C. Wittmann.** 2006b. Homolanthionine accumulation and a new isoleucine biosynthetic route in *Corynebacterium glutamicum* McbR deletion strains. J. Bacteriol. submitted.
- Krömer, J. O., C. Wittmann, H. Schröder and E. Heinzle.** 2006c. Metabolic Pathway Analysis for Rational Design of L-Methionine Production by *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*. Metab. Eng. submitted.
- Kumar, D., K. Subramanian, V. S. Bisaria, T. R. Sreekrishnan and J. Gomes.** 2005. Effect of cysteine on methionine production by a regulatory mutant of *Corynebacterium lilium*. Bioresour Technol. **96**: 287-294.
- Lambein, I., Y. Chiba, H. Onouchi and S. Naito.** 2003. Decay kinetics of autogenously regulated CGS1 mRNA that codes for cystathionine gamma-synthase in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol. **44**: 893-900.
- Le Faou, A., B. S. Rajagopal, L. Daniels and G. Fauque.** 1990. Thiosulfate, polythionates and elemental sulfur assimilation and reduction in the bacterial world. FEMS Microbiol Rev. **6**: 351-381.
- Lee, H. S. and B. J. Hwang.** 2003. Methionine biosynthesis and its regulation in *Corynebacterium glutamicum*: parallel pathways of transsulfuration and direct sulfhydrylation. Appl. Microbiol. Biotechnol. **62**: 459-467.
- Lee, H.-S.** 2005. Sulfur Metabolism and Its Regulation. In: Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. Eggeling, L., Bott, M. (Eds.). pp 351-371. CRC Press, Taylor and Francis. Boca Raton, FL, USA.
- Lee, S. Y., D. Y. Lee and T. Y. Kim.** 2005. Systems biotechnology for strain improvement. Trends Biotechnol. **23**: 349-358.
- Leuchtenberger, W.** 1996. Amino Acids -Technical Production and Use. In: Rehm, H.J., Reed, G., Pühler, A., Stadler, P. (Eds.), Biotechnology, Vol.6 VCH, Weinheim, Germany. 465-502.
- Leuchtenberger, W., K. Huthmacher and K. Drauz.** 2005. Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1-8.
- Liao, J. C. and M. K. Oh.** 1999. Toward predicting metabolic fluxes in metabolically engineered strains. Metab. Eng. **1**: 214-223.
- Liebl, W.** 2005. *Corynebacterium* Taxonomy. In: Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. Eggeling, L., Bott, M. (Eds.). pp 9-34. CRC Press; Taylor & Francis. Boca Raton, FL, USA.

- Loos, A., C. Glanemann, L. B. Willis, X. M. O'Brien, P. A. Lessard, R. Gerstmeir, S. Guillouet and A. J. Sinskey.** 2001. Development and validation of *Corynebacterium* DNA microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2310-2318.
- Losen, M., B. Frölich, M. Pohl and J. Büchs.** 2004. Effect of oxygen limitation and medium composition on *Escherichia coli* fermentation in shake-flask cultures. *Biotechnol Prog.* **20**: 1062-1068.
- Lüssling, T., K. P. Müller, G. Schreyer and F. Theissen.** 1975. Verfahren zur Wiedergewinnung von Methionin und Kalium aus den im Kreislauf geführten Lösungen des Kaliumcarbonat-Methioninverfahrens. German Patent 24 21 167.
- Mampel, J., H. Schröder, S. Haefner and U. Sauer.** 2005. Single-gene knockout of a novel regulatory element confers ethionine resistance and elevates methionine production in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**: 228-236.
- Marx, A., A. A. de Graaf, W. Wiechert, L. Eggeling and H. Sahm.** 1996. Determination of the Fluxes in the Central Metabolism of *Corynebacterium glutamicum* by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Combined with Metabolite Balancing. *Biotechnol. Bioeng.* **49** (2): 111-129.
- Marx, A., B. J. Eikmanns, H. Sahm, A. A. de Graaf and L. Eggeling.** 1999. Response of the central metabolism in *Corynebacterium glutamicum* to the use of an NADH-dependent glutamate dehydrogenase. *Metab. Eng.* **1**: 35-48.
- Matsushita, K., A. Otofujii, M. Iwahashi, H. Toyama and O. Adachi.** 2001. NADH dehydrogenase of *Corynebacterium glutamicum*. Purification of an NADH dehydrogenase II homolog able to oxidize NADPH. *FEMS Microbiol Lett.* **204**: 271-276.
- Messner, K. R. and J. A. Imlay.** 1999. The identification of primary sites of superoxide and hydrogen peroxide formation in the aerobic respiratory chain and sulfite reductase complex of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **274**: 10119-10128.
- Michal, G.** 1999. *Biochemical Pathways. An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology.* John Wiley & Sons, Inc.; Stektrum Akademischer Verlag.
- Mondal, S., Y. B. Das and S. P. Chatterjee.** 1996. Methionine production by microorganisms. *Folia Microbiol. (Praha).* **41**: 465-472.
- Moran, E. T., Jr.** 1994. Response of broiler strains differing in body fat to inadequate methionine: live performance and processing yields. *Poult. Sci.* **73**: 1116-1126.
- Morbach, S. and R. Krämer.** 2005. Osmoregulation. In: *Handbook of Corynebacterium glutamicum.* Eggeling, L., Bott, M. (Eds.). pp 417-435. CRC Press, Taylor and Francis. Boca Raton, FL, USA.

- Muffler, A., S. Bettermann, M. Haushalter, A. Horlein, U. Neveling, M. Schramm and O. Sorgenfrei.** 2002. Genome-wide transcription profiling of *Corynebacterium glutamicum* after heat shock and during growth on acetate and glucose. *J. Biotechnol.* **98**: 255-268.
- Murillo, M. G. and L. S. Jensen.** 1976. Sulfur amino acid requirement and foot pad dermatitis in turkey poults. *Poult. Sci.* **55**: 554-562.
- Nakamori, S., S. Kobayashi, T. Nishimura and H. Takagi.** 1999. Mechanism of L-methionine overproduction by *Escherichia coli*: the replacement of Ser-54 by Asn in the MetJ protein causes the derepression of L-methionine biosynthetic enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 179-185.
- Nakayama, K., K. Araki and H. Kase.** 1978. Microbial production of essential amino acid with *Corynebacterium glutamicum* mutants. *Adv Exp Med Biol.* **105**: 649-661.
- Neidhardt, F. C., J. L. Ingraham and M. Schaechter.** 1990. *Physiology of the Bacterial Cell - A molecular approach.* Sinauer Ass. Inc., Sunderland, MA, USA.
- Onouchi, H., Y. Nagami, Y. Haraguchi, M. Nakamoto, Y. Nishimura, R. Sakurai, N. Nagao, D. Kawasaki, Y. Kadokura and S. Naito.** 2005. Nascent peptide-mediated translation elongation arrest coupled with mRNA degradation in the CGS1 gene of *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **19**: 1799-1810.
- Outten, F. W., M. J. Wood, F. M. Munoz and G. Storz.** 2003. The SufE protein and the SufBCD complex enhance SufS cysteine desulfurase activity as part of a sulfur transfer pathway for Fe-S cluster assembly in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **278**: 45713-45719.
- Papin, J. A., J. Stelling, N. D. Price, S. Klamt, S. Schuster and B. O. Palsson.** 2004. Comparison of network-based pathway analysis methods. *Trends Biotechnol.* **22**: 400-405.
- Park, S. D., J. Y. Lee, Y. Kim, J. H. Kim and H. S. Lee.** 1998. Isolation and analysis of metA, a methionine biosynthetic gene encoding homoserine acetyltransferase in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Cells.* **8**: 286-294.
- Park, S. M., A. J. Sinskey and G. Stephanopoulos.** 1997. Metabolic and Physiological Studies of *Corynebacterium glutamicum* Mutants. *Biotechnol. Bioeng.* **55**: 864-879.
- Paszewski, A. and J. Grabski.** 1975. Homolanthionine in fungi: accumulation in the methionine-requiring mutants of *Aspergillus nidulans*. *Acta Biochim. Pol.* **22**: 263-268.
- Patel, M. S. and Y. S. Hong.** 1998. Lipoic acid as an antioxidant. The role of dihydrolipoamide dehydrogenase. *Methods Mol Biol.* **108**: 337-346.

- Perkins, D. N., D. J. Pappin, D. M. Creasy and J. S. Cottrell.** 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*. **20**: 3551-3567.
- Pfeiffer, T., I. Sanchez-Valdenebro, J. C. Nuno, F. Montero and S. Schuster.** 1999. METATOOL: for studying metabolic networks. *Bioinformatics*. **15**: 251-257.
- Plumbridge, J.** 2001. Regulation of PTS gene expression by the homologous transcriptional regulators, Mlc and NagC, in *Escherichia coli* (or how two similar repressors can behave differently). *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 371-380.
- Popov, N., M. Schmitt, S. Schulzeck and H. Matthies.** 1975. Reliable micromethod for determination of the protein content in tissue homogenates. *Acta Biol Med Ger.* **34**: 1441-1446.
- Ravel, S., M. Droux and R. Douce.** 1995. Methionine biosynthesis in higher plants. I. Purification and characterization of cystathionine gamma-synthase from spinach chloroplasts. *Arch Biochem Biophys.* **316**: 572-584.
- Ravel, S., B. Gakiere, D. Job and R. Douce.** 1998. Cystathionine gamma-synthase from *Arabidopsis thaliana*: purification and biochemical characterization of the recombinant enzyme overexpressed in *Escherichia coli*. *Biochem J.* **331 (2)**: 639-648.
- Rey, D. A., A. Pühler and J. Kalinowski.** 2003. The putative transcriptional repressor McbR, member of the TetR-family, is involved in the regulation of the metabolic network directing the synthesis of sulfur containing amino acids in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* **103**: 51-65.
- Rey, D. A., S. S. Nentwich, D. J. Koch, C. Rückert, A. Pühler, A. Tauch and J. Kalinowski.** 2005. The McbR repressor modulated by the effector substance S-adenosylhomocysteine controls directly the transcription of a regulon involved in sulphur metabolism of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Mol Microbiol.* **56**: 871-887.
- Rodova, N. A. and L. V. Pedan.** 1980. [Thiosulfate metabolism in *Rhodospseudomonas palustris*]. *Mikrobiologiya.* **49**: 221-226.
- Roth, M.** 1971. Fluorescence reaction for amino acids. *Anal Chem.* **43**: 880-882.
- Rückert, C., A. Pühler and J. Kalinowski.** 2003. Genome-wide analysis of the L-methionine biosynthetic pathway in *Corynebacterium glutamicum* by targeted gene deletion and homologous complementation. *J. Biotechnol.* **104**: 213-228.
- Sahm, H., L. Eggeling and A. A. de Graaf.** 2000. Pathway analysis and metabolic engineering in *Corynebacterium glutamicum*. *Biol Chem.* **381**: 899-910.

- Sauer, U., F. Canonaco, S. Heri, A. Perrenoud and E. Fischer.** 2004. The soluble and membrane-bound transhydrogenases UdhA and PntAB have divergent functions in NADPH metabolism of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **279**: 6613-6619.
- Sauer, U. and B. J. Eikmanns.** 2005. The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* **29**: 765-794.
- Schiff, J. A.** 1979. Pathways of assimilatory sulphate reduction in plants and microorganisms. *Ciba Found Symp.* 49-69.
- Schilling, C. H., D. Letscher and B. O. Palsson.** 2000. Theory for the systemic definition of metabolic pathways and their use in interpreting metabolic function from a pathway-oriented perspective. *J. Theor. Biol.* **203**: 229-248.
- Schuster, S., T. Dandekar and D. A. Fell.** 1999. Detection of elementary flux modes in biochemical networks: a promising tool for pathway analysis and metabolic engineering. *Trends Biotechnol.* **17**: 53-60.
- Schwinde, J. W., P. F. Hertz, H. Sahm, B. J. Eikmanns and A. Guyonvarch.** 2001. Lipoamide dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum*: molecular and physiological analysis of the *lpd* gene and characterization of the enzyme. *Microbiology.* **147**: 2223-2231.
- Seidman, C. E., K. Struhl, J. Sheen and T. Jessen.** 1997. Introduction of Plasmid DNA into Cells. In: *Current Protocols in Molecular Biology.* **1**: 1.8.1-1.8.3. John Wiley & Sons, Inc. Weinheim, Deutschland.
- Sekiz, S. S., M. L. Scott and M. C. Nesheim.** 1975. The effect of methionine deficiency on body weight, food and energy utilization in the chick. *Poult. Sci.* **54**: 1184-1188.
- Sekowska, A., H. F. Kung and A. Danchin.** 2000. Sulfur metabolism in *Escherichia coli* and related bacteria: facts and fiction. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2**: 145-177.
- Shimizu, H., H. Tanaka, A. Nakato, K. Nagahisa, E. Kimura and S. Shioya.** 2003. Effects of the changes in enzyme activities on metabolic flux redistribution around the 2-oxoglutarate branch in glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*. *Bioprocess Biosyst Eng.* **25**: 291-298.
- Silberbach, M., A. Hüser, J. Kalinowski, A. Pühler, B. Walter, R. Krämer and A. Burkovski.** 2005a. DNA microarray analysis of the nitrogen starvation response of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* **119**: 357-367.
- Silberbach, M., M. Schäfer, A. T. Hüser, J. Kalinowski, A. Pühler, R. Krämer and A. Burkovski.** 2005b. Adaptation of *Corynebacterium glutamicum* to ammonium limitation: a global analysis using transcriptome and proteome techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 2391-2402.

- Sonntag, K., J. Schwinde, A. de Graaf, A. Marx, B. Eikmanns, W. Wiechert and H. Sahm.** 1995. ¹³C NMR studies of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* during growth and overproduction of amino acids in batch cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**: 489-495.
- Streker, K., C. Freiberg, H. Labischinski, J. Hacker and K. Ohlsen.** 2005. *Staphylococcus aureus* NfrA (SA0367) is a flavin mononucleotide-dependent NADPH oxidase involved in oxidative stress response. *J. Bacteriol.* **187**: 2249-2256.
- Stryer, L.** 1996. *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Sunda, W., D. J. Kieber, R. P. Kiene and S. Huntsman.** 2002. An antioxidant function for DMS and DMS in marine algae. *Nature.* **418**: 317-320.
- Tallan, H. H., T. A. Pascal, K. Schneidman, B. M. Gillam and G. E. Gaull.** 1971. Homolanthionine synthesis by human liver cystathionase. *Biochem Biophys Res Commun.* **43**: 303-310.
- Tauch, A., I. Homann, S. Mormann, S. Ruberg, A. Billault, B. Bathe, S. Brand, O. Brockmann-Gretza, C. Rückert, N. Schischka, C. Wrenger, J. Hoheisel, B. Mockel, K. Huthmacher, W. Pfefferle, A. Pühler and J. Kalinowski.** 2002. Strategy to sequence the genome of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032: use of a cosmid and a bacterial artificial chromosome library. *J. Biotechnol.* **95**: 25-38.
- Trotschel, C., D. Deutenberg, B. Bathe, A. Burkovski and R. Krämer.** 2005. Characterization of methionine export in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **187**: 3786-3794.
- Trudinger, P. A.** 1967. Metabolism of thiosulfate and tetrathionate by heterotrophic bacteria from soil. *J. Bacteriol.* **93**: 550-559.
- Vallino, J. J. and G. Stephanopoulos.** 2000. Metabolic flux distributions in *Corynebacterium glutamicum* during growth and lysine overproduction. Reprinted from *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 41, Pp 633-646 (1993). *Biotechnol Bioeng.* **67**: 872-885.
- Varela, C. A., M. E. Baez and E. Agosin.** 2004. Osmotic stress response: quantification of cell maintenance and metabolic fluxes in a lysine-overproducing strain of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 4222-4229.
- Wada, M., N. Awano, K. Haisa, H. Takagi and S. Nakamori.** 2002. Purification, characterization and identification of cysteine desulphydrase of *Corynebacterium glutamicum*, and its relationship to cysteine production. *FEMS Microbiol Lett.* **217**: 103-107.
- Wagner, H., H. Tanner, E. Liebetanz, S. P. Mannsfeld and A. Pfeiffer.** 1970. Verfahren zur Herstellung von Methionin. German Patent 19 06 405.

-
- Willis, L. B., P. A. Lessard and A. J. Sinskey.** 2005. Synthesis of L-Threonine and Branched-Chain Amino Acids. In: Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. Eggeling, L., Bott, M. (Eds.). pp 511-531. CRC Press, Taylor and Francis. Boca Raton, FL, USA.
- Wittmann, C. and E. Heinzle.** 2001. Application of MALDI-TOF MS to lysine-producing *Corynebacterium glutamicum*: a novel approach for metabolic flux analysis. Eur. J. Biochem. **268**: 2441-2455.
- Wittmann, C.** 2002. Metabolic flux analysis using mass spectrometry. Adv Biochem Eng Biotechnol. **74**: 39-64.
- Wittmann, C. and E. Heinzle.** 2002. Genealogy profiling through strain improvement by using metabolic network analysis: metabolic flux genealogy of several generations of lysine-producing corynebacteria. Appl. Environ. Microbiol. **68**: 5843-5859.
- Wittmann, C., P. Kiefer and O. Zelder.** 2004a. Metabolic fluxes in *Corynebacterium glutamicum* during lysine production with sucrose as carbon source. Appl. Environ. Microbiol. **70**: 7277-7287.
- Wittmann, C., J. O. Krömer, P. Kiefer, T. Binz and E. Heinzle.** 2004b. Impact of the cold shock phenomenon on quantification of intracellular metabolites in bacteria. Anal Biochem. **327**: 135-139.
- Wittmann, C. and A. de Graaf.** 2005. Metabolic Flux Analysis in *Corynebacterium glutamicum*. In: Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. Eggeling, L., Bott, M. (Eds.). pp 277-304. CRC Press, Taylor and Francis. Boca Raton, FL, USA.
- Yang, T. H., C. Wittmann and E. Heinzle.** 2006. Respirometric ¹³C-Flux Analysis. Part II: In vivo Flux Estimation of Lysine-producing *Corynebacterium glutamicum*. Metab. Eng. submitted.
- Yokota, A. and N. D. Lindley.** 2005. Central Metabolism: Sugar Uptake and Conversion. In: Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. Eggeling, L., Bott, M. (Eds.). pp 215-240. CRC Press, Taylor and Francis. Boca Raton, FL, USA.

Eigene Publikationen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Wittmann, C., **Krömer, J.O.**, Kiefer, P., Binz, T. and Heinzle, E. (2004). Impact of the cold shock phenomenon on quantification of intracellular metabolites in bacteria. *Anal Biochem.* **327**: 135-9.

Krömer, J.O., Fritz, M., Heinzle, E., Wittmann, C. (2005). In vivo quantification of intracellular amino acids and intermediates of the methionine pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Anal Biochem.* **340(1)**:171-3.

Krömer, J.O., Heinzle, E. and Wittmann, C. (2005) Amino Acids – OPA Derivatives. Application Note – HPLC. Application Database, Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA.

Krömer, J.O., Heinzle, E. and Wittmann, C. (2006a). Quantification of S-adenosyl methionine in microbial cell extracts. *Biotechnol Lett.* **28**: 69-71.

Krömer, J.O., Schröder, H., Heinzle, E. and Wittmann, C. (2006b). Homolanthionine accumulation and a new isoleucine biosynthetic route in *Corynebacterium glutamicum* McbR deletion strains. *J. Bacteriol.* **188**: 609-618.

Krömer, J.O., Schröder, H., Wittmann, C. and Heinzle, E. (2006c). Metabolic Pathway Analysis for Rational Design of L-Methionine Production by *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*. *Metab. Eng.* **In Press**

Krömer, J.O., Schröder, H., Heinzle, E. and Wittmann, C. (2006d). Response of fluxome, metabolome and proteome to deletion of the transcriptional repressor McbR in *Corynebacterium glutamicum*. **Submitted to** *J. Bacteriol.*

Weitere eigene Publikationen:

Krömer, J.O., Sorgenfrei, O., Klopprogge, K., Heinzle, E. and Wittmann, C. (2004). In-depth profiling of lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* by combined analysis of the transcriptome, metabolome, and fluxome. *J Bacteriol* **186(6)**: 1769-84.

Wittmann C., Weber, J., Betiku, E., **Krömer, J.O.** and Rinas, U. (2006). Response of fluxome and metabolome to temperature-induced recombinant protein synthesis in *Escherichia coli*. **Submitted to** *Appl. Env. Microbiol.*

Konferenzbeiträge

J. O. Krömer, C. Wittmann, H. Schröder E. Heinzle. Metabolic pathway analysis for rational design of biotechnological methionine production. Society for Industrial Microbiology, Annual Meeting 21-25.08.2005 Chicago (**SIM 2005**).

C. Wittmann, E. Betiku, J. Weber, J.O. Krömer, U. Rinas. Metabolic flux profiling of recombinant protein production by *E. coli*. 1-4.05.2005 DECHEMA: System-biotechnologie für industrielle Prozesse (**SYPRO 2005**).

E. Betiku, D. Böhm, R. Kang, J.O. Krömer, S. Marten, P. Neubauer, U. Rinas, M. Schmidt, A. Seeger, J. Weber, C. Wittmann. In-depth analysis of a recombinant *E. coli* process 1-4.05.2005 DECHEMA: Systembiotechnologie für industrielle Prozesse (**SYPRO 2005**).

J. O. Krömer, P. Kiefer, E. Heinzle, C. Wittmann, A robust method for in vivo quantification of free intracellular amino acids in *Corynebacterium glutamicum*. 24-25.08.2003 11th European Congress on Biotechnology (**ECB11**).

C. Wittmann, J. O. Krömer, K. Klopprogge, O. Sorgenfrei, E. Heinzle. In-depth profiling of lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* by combined analysis of transcriptome, metabolome, and fluxome. 24-25.08.2003 11th European Congress on Biotechnology (**ECB11**).

J. O. Krömer, E. Heinzle, O. Sorgenfrei, K. Klopprogge, C. Wittmann, Combined Metabolic Characterization and Expression Analysis for in Depth Profiling of L-Lysine Producing *Corynebacterium glutamicum*. 2-4.04.2003 **DECHEMA**-Jahrestagung der Biotechnologen.

11. ANHANG

11.1. Protokolle Aminosäureanalytik

Folgende Messmethoden wurden im Rahmen der Arbeit selbst entwickelt und können genutzt werden, um Aminosäuregemische aus Fermentationen, Zellextrakten (Krömer *et al.*, 2005) oder Hydrolysaten zu analysieren. Die Methoden sind optimiert für den Einsatz der C₁₂-Säule Synergi MAX-RP sowie der C₁₈-Säule Gemini von Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland) auf der HPLC-Anlage 1100 von Agilent (Waldbronn, Deutschland). Die Geminisäule weist eine Kürzere Analysendauer, sowie eine stark verlängerte Lebensdauer (>1500 runs) gegenüber der Synergisäule auf. Für die Vermeidung von Probenverschleppung sind die Injektor-Programme (vgl.: Agilent 1100 Autosampler1, injector program table) von besonderer Bedeutung.

11.1.1. Synergi MAX-RP

Amino Acid Quantification -----High Resolution
 -- Synergi 4 μ MAX-RP 80 A (150*4.6 mm), PHENOMENEX --
 OPA-METHOD with disulfide reduction and thioester formation
 Development of Jens O. Krömer, Michel Fritz, Elmar Heinze and
 Christoph Wittmann

Biochemical Engineering
 Saarland University
 Building 2, 2nd floor
 66123 Saarbrücken
 Germany
 j.kroemer@mx.uni-saarland.de

Solutions:
 ELUENT A: 40 mM NaH₂PO₄, pH=7.8 (NaOH)
 ELUENT B: MeOH/H₂O (100+1 v/v)
 BUFFER: 500 mM Bicine (pH=9.0 NaOH)
 REDUCING AGENT: 0.5 % 2-MCE (v/v) in Bicine
 Acid for Thioester formation: 50 g/L Iodoacetic acid in Bicine
 OPA-Reagent:
 10 g/L Phthalaldehyde in 2-MCE/MeOH/Bicine (1:45:54 v/v)
 or: SIGMA Product Number: P 0532

1100 High Pressure Gradient Pump 1

Control
 Column Flow : 1.000 ml/min
 Stoptime : 76.50 min
 Posttime : Off
 Solvents

Solvent A : 100.0 % (40mM NaH₂PO₄, Monohydrate pH=7.8)
 Solvent B : 0.0 % (MeOH/H₂O, 100/1)

PressureLimits
 Minimum Pressure : 0 bar
 Maximum Pressure : 399 bar

Auxiliary
 Maximal Flow Ramp : 100.00 ml/min²
 Compressibility A : 50*10⁻⁶/bar
 Minimal Stroke A : 20 µl
 Compressibility B : 115*10⁻⁶/bar
 Minimal Stroke B : Auto

Timetable

Time	Solv.B	Flow	Pressure
0.00	0.0		
39.00	39.0		
70.00	64.0		
70.50	100.0		
74.00	100.0		
74.50	0.0		
76.50	0.0		

Agilent 1100 Fluorescence Detector 1

Signal
 Excitation : 340 nm
 Emission : 450 nm

Time
 Stoptime : 73.00 min
 Posttime : Off

Peakwidth : > 0.2 min
 PMT-Gain : 13

Analog Outputs
 Zero offset output 1 : 5 %
 Zero offset output 2 : 5 %
 Attenuation output 1 : 100 LU
 Attenuation output 2 : 100 LU

Fluorescence Scan
 Excitation Range : 220 to 380 nm, Step 5 nm
 Emission Range : 300 to 500 nm, Step 5 nm

Signal Timetable

Time	Ex.	Em.	PMT	Baseline
68.00	340	450	12	

Agilent 1100 Autosampler 1

Injection
 Injection Mode : Injector Program
 Injector volume : 20.0 µl

Auxiliary
 Drawspeed : 200 µl/min
 Ejectspeed : 600 µl/min
 Draw position : 2.0 mm

Time
 Stoptime : As Pump
 Posttime : Off

Injector program table

Row	Action
1	VALVE mainpass
2	WAIT 0.30 min

```

3 VALVE bypass
4 // 2-MCE 0.5% in 0.5M Bicine: reducing agent
5 DRAW 0.5 µl from vial 6
6 DRAW 0.5 µl from sample
7 MIX 1.0 µl in air, 500 µl/min speed, 3 times
8 // needle rinse
9 DRAW 0.0 µl from vial 91
10 // Iodoacetic acid 50mg/ml in 0.5M Bicine: SH-capping
11 DRAW 1.5 µl from vial 7
12 MIX 2.5 µl in air, 500 µl/min speed, 3 times
13 // needle rinse
14 DRAW 0.0 µl from vial 92
15 WAIT 1.00 min
16 // 0.5M Bicine Buffer
17 DRAW 2.5 µl from vial 4
18 // 10mg/ml OPA-Reagenz, 1/45/54 v/v/v, 2-MCE/MeOH/Bicine 0.5M
19 DRAW 0.5 µl from vial 2
20 MIX 5.5 µl in air, 500 µl/min speed, 3 times
21 WAIT 0.30 min
22 // MilliQ Dilution
23 DRAW 32.0 µl from vial 5
24 MIX 37.5 µl in air, 500 µl/min speed, 3 times
25 INJECT
26 // Cleaning procedure
27 DRAW 90.0 µl from vial 11, 500 µl/min speed
28 EJECT 90.0 µl into seat, 500 µl/min speed
29 DRAW 90.0 µl from vial 12, 500 µl/min speed
30 EJECT 90.0 µl into seat, 500 µl/min speed
31 DRAW 90.0 µl from vial 13, 500 µl/min speed
32 EJECT 90.0 µl into seat, 500 µl/min speed
33 DRAW 90.0 µl from vial 14, 500 µl/min speed
34 EJECT 90.0 µl into seat, 500 µl/min speed

```

Agilent 1100 Column Thermostat 1

Temperature settings

```

Left temperature   : 40.0°C
Right temperature  : Same as left
Enable analysis    : When Temp. is within setpoint +/- 0.5°C
Store left temperature : Yes
Store right temperature: No

```

11.1.2. Gemini

Amino Acid Quantification -----High Resolution
----- Gemini 5µ 110 A (150*4.6 mm), PHENOMENEX -----
OPA-METHOD with disulfide reduction and thioester formation
Development of Jens O. Krömer, Michel Fritz, Elmar Heinzle and
Christoph Wittmann

Biochemical Engineering
Saarland University
Building 2, 2nd floor
66123 Saarbrücken
Germany
j.kroemer@mx.uni-saarland.de

Solutions:

ELUENT A: 40 mM NaH₂PO₄, pH=7.8 (NaOH)
ELUENT B: ACN/MeOH/H₂O (45/45/10)

BUFFER: 500 mM Bicine (pH=9.0 NaOH)
 REDUCING AGENT: 0.5 % 3-Mercaptopropionat in Bicine
 Acid for Thioester formation: 50 g/L Iodoacetic acid in Bicine
 OPA-Reagent: AGILENT Technologies (P#: 5061-3335)

1100 High Pressure Gradient Pump 1

Control

Column Flow : 1.000 ml/min
 Stoptime : 49.00 min
 Posttime : Off

Solvents

Solvent A : 100.0 % (40mM NaH₂PO₄, Monohydrate pH=7.8)
 Solvent B : 0.0 % (ACN/MeOH/H₂O, 45/45/10)

PressureLimits

Minimum Pressure : 0 bar
 Maximum Pressure : 250 bar

Auxiliary

Maximal Flow Ramp : 100.00 ml/min²
 Compressibility A : 50*10⁻⁶/bar
 Minimal Stroke A : 20 µl
 Compressibility B : 115*10⁻⁶/bar
 Minimal Stroke B : Auto

Timetable

Time	Solv.B	Flow	Pressure
0.00	0.0		
40.50	40.5		
41.00	61.0		
43.00	61.0		
44.00	82.0		
44.50	100.0		
46.50	100.0		
47.00	0.0		
49.00	0.0		

Agilent 1100 Fluorescence Detector 1

Signal

Excitation : 340 nm
 Emission : 450 nm

Time

Stoptime : 45.00 min
 Posttime : Off

Peakwidth : > 0.2 min

PMT-Gain : 13

Analog Outputs

Zero offset output 1 : 5 %
 Zero offset output 2 : 5 %
 Attenuation output 1 : 100 LU
 Attenuation output 2 : 100 LU

Fluorescence Scan

Excitation Range : 220 to 380 nm, Step 5 nm
 Emission Range : 300 to 500 nm, Step 5 nm

Signal Timetable

Time	Ex.	Em.	PMT	Baseline
43.50	266	305	11	

Agilent 1100 Autosampler 1

Injection

Injection Mode : Injector Program
 Injector volume : 20.0 µl
 Auxiliary
 Draws speed : 200 µl/min
 Ejects speed : 600 µl/min
 Draw position : 2.0 mm
 Injector program table
 Row Action

 1 VALVE mainpass
 2 WAIT 0.50 min
 3 VALVE bypass
 4 // Mercaptopropionat 0.5% in 0.5M Bicine: reducing agent
 5 DRAW 0.4 µl from vial 6
 6 DRAW 0.5 µl from sample
 7 MIX 0.9 µl in air, 500 µl/min speed, 3 times
 8 WAIT 0.50 min
 9 // needle rinse
 10 DRAW 0.0 µl from vial 91
 11 // Iodoacetic acid 50mg/ml in 0.5M Bicine: SH-capping
 12 DRAW 0.1 µl from vial 7
 13 MIX 1.0 µl in air, max. speed, 3 times
 14 WAIT 0.50 min
 15 // needle rinse
 16 DRAW 0.0 µl from vial 92
 17 // 0.5M Bicine Buffer
 18 DRAW 3.0 µl from vial 4
 19 // 10mg/ml OPA-Reagenz, AGILENT
 20 DRAW 0.5 µl from vial 1
 21 MIX 4.5 µl in air, 500 µl/min speed, 3 times
 22 // needle rinse
 23 DRAW 0.0 µl from vial 92
 24 // FMOc
 25 DRAW 0.5 µl from vial 3
 26 MIX 5.0 µl in air, 500 µl/min speed, 3 times
 27 // DILUTION
 28 DRAW 32.5 µl from vial 5
 29 MIX 37.5 µl in air, max. speed, 3 times
 30 INJECT
 31 // Cleaning procedure
 32 DRAW 90.0 µl from vial 11, 500 µl/min speed
 33 EJECT 90.0 µl into seat, 500 µl/min speed
 34 DRAW 90.0 µl from vial 12, 500 µl/min speed
 35 EJECT 90.0 µl into seat, 500 µl/min speed
 36 DRAW 90.0 µl from vial 13, 500 µl/min speed
 37 EJECT 90.0 µl into seat, 500 µl/min speed
 38 DRAW 90.0 µl from vial 14, 500 µl/min speed
 39 EJECT 90.0 µl into seat, 500 µl/min speed

Agilent 1100 Column Thermostat 1

Temperature settings

Left temperature : 40.0°C
 Right temperature : Same as left
 Enable analysis : When Temp. is within setpoint +/- 0.5°C
 Store left temperature : Yes
 Store right temperature: No

11.2. SDS-PAGE

Der Erfolg der Überexpression und der Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Es wurde eine Bio-Rad Mini Protean III Anlage (Bio-Rad, Hercules, USA) verwendet.

11.2.1. Gele

Die Proteinauftrennung wurde mit 4 % igen Sammel- und 12,5 % igen Trenn-SDS-Gelen (10 x 8 cm) durchgeführt. Zum Giessen von 2 Gelen wurden folgende Lösungen zusammen pipettiert:

Trenngel (12,5 %):

3,2 ml H₂O
4,1 ml Acrylamidlösung (30 % Acrylamid + 0,2 % Bisacrylamid)
2,5 ml Tris/HCl-Puffer (1,5 M, pH 8,8)
100 µL SDS (Natriumdodecylsulfat, 10 %)
5 µL TEMED (N,N,N,N-Tetramethyl-ethylenediamine)
50µL Ammoniumpersulfat (100 g / L)

Sammelgel (4%):

3,05 ml H₂O
0,65 ml Acrylamidlösung (30 % Acrylamid + 0,2 % Bisacrylamid)
1,25 ml Tris/HCl-Puffer (0,5 M, pH 6,8)
100 µL SDS (Natriumdodecylsulfat, 10 %ig)
5 µL TEMED
50µL APS

Marker

Als Molekulargewichtsmarker wurde der vorgefärbte Marker 161-0318 (Bio-Rad, Hercules, USA) verwendet.

Der Marker enthält folgende Proteine:

Myosin	(201661 Da; auf Tris-HCl Gel)
β-Galactosidase	(116473 Da)
BSA	(93594 Da)
Ovalbumin	(53615 Da)
Carbonic anhydrase	(37238 Da)
Soybeantrypsin inhibitor	(29050 Da)
Lysozyme	(19651 Da)
Aprotinin	(6669 Da)

Laufpuffer

Folgender Laufpuffer wurde eingesetzt:

3 g L⁻¹ Tris
14,4 g L⁻¹ Glycin
1 g L⁻¹ SDS pH = 8,3 (HCl).

Probendenaturierung

Vor dem Auftrag auf das Gel wurden die Proben 15 min bei 95 °C mit Probenpuffer (doppeltes Volumen als Probe) inkubiert. Der Probenpuffer war folgendermaßen zusammengesetzt:

4 ml Tris/HCl-Puffer (0,5 M, pH 6,8)
5 ml Glycerin
0,1 g SDS
18 mg Bromphenolblau
2,5 ml Mercaptoethanol
ad 50 ml H₂O

Trennung:

Die Trennung wurde solange durchgeführt, bis das leichteste Protein des Markers das Ende des Gels erreicht hatte (ca. 70 min). Es wurde eine Spannung von 150 V angelegt.

11.2.2. Färbung

Zur Färbung der Proteine wurde Coomassie Brilliant Blue verwendet. Die Gele wurden ca. 30 min gefärbt. Die Färbelösung war folgendermaßen zusammengesetzt:

Färber:

0.1 % Coomassie R-250
0.005 % Coomassie G-250 in 40% Methanol / 10 % Essigsäure / 2 % Glycerin Wassergemisch.

Vor dem Färben wurden die Proteine im Gel fixiert:

Fixierer:

20 % Trichloressigsäure in H₂O

Nach erfolgter Färbung wurden die Gele mit zwei Entfärbem behandelt. Entfärber 1 entfärbt Gel und Proteine und wird für ca. 20 min angewendet. Entfärber 2 entfärbt über Nacht nur das Gel. Zur schnelleren Entfärbung wurden Zellstofftücher in die Wannen gegeben. Der Zellstoff bindet selektiv das Coomassie, so dass der Entfärber länger klar bleibt.

Entfärber 1:

40% Methanol / 10 % Essigsäure / 2 % Glycerin in H₂O

Entfärber 2:

5% Methanol / 10 % Essigsäure in H₂O

11.3. Stöchiometrische Netzwerke

Die folgenden Modelle können als txt.file gespeichert und zur Durchführung der Elementarmodenanalyse mit METATOOL (version:meta4.0.1_double.exe) genutzt werden.

11.3.1. Das Modell von *C. glutamicum*

(vgl. Abb. 6-9):

#R1 : Phospho-transferase system
#R2r : G6P-isomerase
#R3 : G6P-DH
#R4 : Lactonase
#R5 : Gluconate-DH
#R6r : Ribose-5-P-epimerase
#R7r : Ribose-5-P-isomerase
#R8r : Transketolase 1
#R9r : Transaldolase
#R10r : Transketolase 2
#R11 : Phosphofructo kinase
#R12 : Fructosebisphosphatase
#R13r : Fructosebisphosphate-aldolase
#R14r : Triosephosphate-isomerae
#R15r : 3-phospho glycerate-Kinase
#R16 : PG-kinase
#R17r : PG-mutase
#R18r : PEP-hydrolase
#R19 : PYR-kinase
#R20 : PYR-DH
#R21 : CIT-synthase
#R22r : ACO-hydrolase
#R23r : ACONITASE
#R24 : Isocitrate-DH
#R25 : Glutamate-DH
#R26 : 2-OXO-DH
#R27 : SUCC-CoA-synthase
#R28r : SUCC-DH
#R29r : FUMARASE
#R30r : MAL-DH
#R31 : ICI-lyase
#R32 : MAL-synthase
#R33 : PYR-carboxylase
#R34 : PEP-carboxylase
#R35 : PEP-carboxykinase

#R36 : OAA-decarboxylase
 #R37r : ASP-transaminase
 #R38 : M-THF synthesis 1
 #R39 : HOM-DH
 #R40 : HOM-transacetylase
 #R41r : PG-DH
 #R42r : Phosphoserin-transaminase
 #R43 : Phosphoserin-phosphatase
 #R44 : Serine-transacetylase
 #R45 : Cysteine-synthase
 #R46 : Cystathionine-synthase
 #R47 : Aspartokinase
 #R48 : ASP-P-DH
 #R49 : O-Ac-HOM sulphhydrilase
 #R50 : ACETAT-kinase
 #R51 : Phosphotransacetylase
 #R52 : MET-synthase (MetE/H)
 #R53 : Methionine exporter
 #R54 : Cystathionine-□-lyase
 #R55 : ATP-sulfurylase
 #R56 : ATP-hydrolysis
 #R57 : Malic enzyme
 #R58 : Sulfite-reductase
 #R59 : Respiratory chain 1
 #R60 : Respiratory chain 2
 #R61 : Biomass formation
 #R63 : Adenylate kinase
 #R64 : sulfate uptake (ABC-Transporter)

-ENZREV

R2r R6r R7r R8r R9r R10r R13r R14r R15r R17r R18r R22r R23r R28r R29r R30r R37r R41r R42r

-ENZIRREV

R1 R3 R4 R5 R11 R16 R19 R20 R21 R24 R25 R26 R27 R31 R32 R33 R34 R35 R36 R38 R39 R40 R43 R44 R45 R46 R47 R48 R49 R50
R51 R52 R53 R54 R55 R56 R57 R58 R59 R60 R61 R63 R64

-METINT

G6P AMP F6P F-16-BP ASP ASP-P ASP-SA HOM ATP O-AC-HOM HOMOCYS 3-PHP SER-P SER O-AC-SER CYS CYSTA GA3P
DAHP 13-PG 3-PG 2-PG AC-CoA PYR PEP CIT OAA Cis-ACO ICI 2-OXO GLU SUCC-CoA SUCC FUM MAL GLYOXY H2SO3 H2S
6-P-Gluconate GLC-LAC RIB-5P RIBO-5P XYL-5P S7P E-4P MET NADP NADPH acetyl-phosphate ACETAT H-CoA FAD FADH ADP
NADH NAD MTHF THF SO4

-METEXT

BIOMASS GLC METex O2 NH3 CO2 SO4ex GLYCIN

-CAT

R1 : PEP + GLC = PYR + G6P .
 R2r : G6P = F6P .
 R3 : G6P + NADP = GLC-LAC + NADPH .
 R4 : GLC-LAC = 6-P-Gluconate .

R5 : 6-P-Gluconate + NADP = RIB-5P + CO2 + NADPH .
R6r : RIB-5P = XYL-5P .
R7r : RIB-5P = RIBO-5P .
R8r : S7P + GA3P = RIBO-5P + XYL-5P .
R9r : S7P + GA3P = E-4P + F6P .
R10r : F6P + GA3P = E-4P + XYL-5P .
R11 : ATP + F6P = ADP + F-16-BP .
R13r : F-16-BP = GA3P + DAHP .
R14r : DAHP = GA3P .
R15r : GA3P + NAD = 13-PG + NADH .
R16 : ADP + 13-PG = ATP + 3-PG .
R17r : 3-PG = 2-PG .
R18r : 2-PG = PEP .
R19 : PEP + ADP = PYR + ATP .
R20 : PYR + H-CoA + NAD = AC-CoA + NADH + CO2 .
R21 : AC-CoA + OAA = CIT + H-CoA .
R22r : CIT = Cis-ACO .
R23r : Cis-ACO = ICI .
R24 : ICI + NADP = 2-OXO + CO2 + NADPH .
R25 : 2-OXO + NH3 + NADPH = GLU + NADP .
R26 : 2-OXO + NAD + H-CoA = SUCC-CoA + NADH + CO2 .
R27 : SUCC-CoA + ADP = SUCC + H-CoA + ATP .
R28r : SUCC + FAD = FUM + FADH .
R29r : FUM = MAL .
R30r : MAL + NAD = OAA + NADH .
R31 : ICI = GLYOXY + SUCC .
R32 : GLYOXY + AC-CoA = MAL + H-CoA .
R33 : PYR + ATP + CO2 = OAA + ADP .
R34 : PEP + CO2 = OAA .
R35 : OAA + ATP = PEP + ADP + CO2 .
R36 : OAA + ADP = PYR + CO2 + ATP .
R37r : OAA + GLU = ASP + 2-OXO .
R38 : THF + SER = MTHF + GLYCIN .
R39 : ASP-SA + NADPH = HOM + NADP .
R40 : HOM + AC-CoA = O-AC-HOM + H-CoA .
R41r : 3-PG + NAD = 3-PHP + NADH .
R42r : 3-PHP + GLU = SER-P + 2-OXO .
R43 : SER-P = SER .
R44 : SER + AC-CoA = O-AC-SER + H-CoA .
R45 : O-AC-SER + H2S = CYS + ACETAT .
R46 : CYS + O-AC-HOM = CYSTA + ACETAT .
R47 : ASP + ATP = ASP-P + ADP .
R48 : ASP-P + NADPH = ASP-SA + NADP .
R49 : O-AC-HOM + H2S = HOMOCYS + ACETAT .
R50 : ATP + ACETAT = ADP + acetyl-phosphate .
R51 : acetyl-phosphate + H-CoA = AC-CoA .
R52 : HOMOCYS + MTHF = MET + THF .
R53 : MET = METex .
R54 : CYSTA = HOMOCYS + NH3 + PYR .
R55 : SO4 + 2 ATP + NADPH = H2SO3 + ADP + AMP + NADP .
R56 : ATP = ADP .
R57 : MAL + NADP = PYR + CO2 + NADPH .

R58 : $\text{H}_2\text{SO}_3 + 3 \text{NADPH} = \text{H}_2\text{S} + 3 \text{NADP}$.

R59 : $2 \text{NADH} + \text{O}_2 + 4 \text{ADP} = 2 \text{NAD} + 4 \text{ATP}$.

R60 : $2 \text{FADH} + \text{O}_2 + 2 \text{ADP} = 2 \text{FAD} + 2 \text{ATP}$.

R61 : $6231 \text{NH}_3 + 233 \text{SO}_4 + 205 \text{G6P} + 308 \text{F6P} + 879 \text{RIBO-5P} + 268 \text{E-4P} + 129 \text{GA3P} + 1295 \text{3-PG} + 652 \text{PEP} + 2604 \text{PYR} + 3177 \text{AC-CoA} + 1680 \text{OAA} + 1224 \text{2-OXO} + 16429 \text{NADPH} + 17002 \text{ATP} + 3111 \text{NAD} = \text{BIOMASS} + 16429 \text{NADP} + 3177 \text{H-CoA} + 1227 \text{CO}_2 + 17002 \text{ADP} + 3111 \text{NADH}$.

R63 : $\text{AMP} + \text{ATP} = 2 \text{ADP}$.

R64 : $\text{SO}_4\text{ex} + \text{ATP} = \text{SO}_4 + \text{ADP}$.

11.3.2. Das Modell von *E. coli*

(vgl. Abb. 6-10):

#R1 : Phospho-transferase system

#R2r : G6P-isomerase

#R3 : G6P-DH

#R4 : Lactonase

#R5 : Gluconate-DH

#R6r : Ribose-5-P-epimerase

#R7r : Ribose-5-P-isomerase

#R8r : Transketolase 1

#R9r : Transaldolase

#R10r : Transketolase 2

#R11 : Phosphofructo kinase

#R12 : Fructosebisphosphatase

#R13r : Fructosebisphosphate-aldolase

#R14r : Triosephosphate-isomerae

#R15r : 3-phospho glycerate-Kinase

#R16 : PG-kinase

#R17r : PG-mutase

#R18r : PEP-hydrolase

#R19 : PYR-kinase

#R20 : PYR-DH

#R21 : CIT-synthase

#R22r : ACO-hydrolase

#R23r : ACONITASE

#R24 : Isocitrate-DH

#R25 : Glutamate-DH

#R26 : 2-OXO-DH

#R27 : SUCC-CoA-synthase

#R28r : SUCC-DH

#R29r : FUMARASE

#R30r : MAL-DH

#R31 : ICI-lyase

#R32 : MAL-synthase

#R33 : PYR-carboxylase

#R34 : PEP-carboxylase

#R35 : PEP-carboxykinase

#R36 : OAA-decarboxylase

#R37r : ASP-transaminase

#R38 : M-THF synthesis 1
 #R39 : HOM-DH
 #R40 : HOM-transacetylase
 #R41r : PG-DH
 #R42r : Phosphoserin-transaminase
 #R43 : Phosphoserin-phosphatase
 #R44 : Serine-transacetylase
 #R45 : Cysteine-synthase
 #R46 : Cystathionine-synthase
 #R47 : Aspartokinase
 #R48 : ASP-P-DH
 #R50 : ACETAT-kinase
 #R51 : Phosphotransacetylase
 #R52 : MET-synthase (MetE/H)
 #R53 : Methionine exporter
 #R54 : Cystathionine-□-lyase
 #R55 : ATP-sulfurylase
 #R56 : ATP-hydrolysis
 #R57 : Malic enzyme
 #R58 : Sulfite-reductase
 #R59 : Respiratory chain 1
 #R60 : Respiratory chain 2
 #R61 : Biomass formation
 #R63 : Adenylate kinase
 #R64 : sulfate uptake (ABC-Transporter)
 #R70 : Cytosolic Transhydrogenase
 #R71 : Glycine cleavage 1
 #R72 : Glycine cleavage 2
 #R76 : Transmembrane Transhydrogenase

-ENZREV

R2r R6r R7r R8r R9r R10r R13r R14r R15r R17r R18r R22r R23r R28r R29r R30r R37r R41r R42r R74r

-ENZIRREV

R1 R3 R4 R5 R11 R12 R16 R19 R20 R21 R24 R25 R26 R27 R31 R32 R33 R34 R35 R36 R38 R39 R40 R43 R44 R45 R46 R47 R48 R50
 R51 R52 R53 R54 R55 R56 R57 R58 R59 R60 R61 R71 R72 R73 R63 R64 R70 R76

-METINT

G6P KDPG F6P F-16-BP ASP ASP-P ASP-SA HOM ATP O-SUCC-HOM HOMOCYS 3-PHP SER-P SER O-AC-SER CYS CYSTA
 GA3P DAHP 13-PG 3-PG 2-PG AC-CoA PYR PEP CIT OAA Cis-ACO ICI 2-OXO GLU SUCC-CoA SUCC FUM MAL GLYOXY
 H2SO3 H2S 6-P-Gluconate GLC-LAC RIB-5P RIBO-5P XYL-5P S7P E-4P MET NADP NADPH H-CoA FAD FADH ADP NADH NAD
 MTHF THF ACETAT acetyl-phosphate GLYCIN HPL Methyl-HPL SO4 AMP

-METEXT

BIOMASS GLC METex O2 NH3 CO2 SO4ex

-CAT

R1 : PEP + GLC = PYR + G6P .

R2r : G6P = F6P .

R3 : G6P + NADP = GLC-LAC + NADPH .

R4 : GLC-LAC = 6-P-Gluconate .

R5 : 6-P-Gluconate + NADP = RIB-5P + CO2 + NADPH .
 R6r : RIB-5P = XYL-5P .
 R7r : RIB-5P = RIBO-5P .
 R8r : S7P + GA3P = RIBO-5P + XYL-5P .
 R9r : S7P + GA3P = E-4P + F6P .
 R10r : F6P + GA3P = E-4P + XYL-5P .
 R11 : ATP + F6P = ADP + F-16-BP .
 R12 : F-16-BP = F6P .
 R13r : F-16-BP = GA3P + DAHP .
 R14r : DAHP = GA3P .
 R15r : GA3P + NAD = 13-PG + NADH .
 R16 : ADP + 13-PG = ATP + 3-PG .
 R17r : 3-PG = 2-PG .
 R18r : 2-PG = PEP .
 R19 : PEP + ADP = PYR + ATP .
 R20 : PYR + H-CoA + NAD = AC-CoA + NADH + CO2 .
 R21 : AC-CoA + OAA = CIT + H-CoA .
 R22r : CIT = Cis-ACO .
 R23r : Cis-ACO = ICI .
 R24 : ICI + NADP = 2-OXO + CO2 + NADPH .
 R25 : 2-OXO + NH3 + NADPH = GLU + NADP .
 R26 : 2-OXO + NAD + H-CoA = SUCC-CoA + NADH + CO2 .
 R27 : SUCC-CoA + ADP = SUCC + H-CoA + ATP .
 R28r : SUCC + FAD = FUM + FADH .
 R29r : FUM = MAL .
 R30r : MAL + NAD = OAA + NADH .
 R31 : ICI = GLYOXY + SUCC .
 R32 : GLYOXY + AC-CoA = MAL + H-CoA .
 R33 : PYR + ATP + CO2 = OAA + ADP .
 R34 : PEP + CO2 = OAA .
 R35 : OAA + ATP = PEP + ADP + CO2 .
 R36 : OAA + ADP = PYR + CO2 + ATP .
 R37r : OAA + GLU = ASP + 2-OXO .
 R38 : THF + SER = MTHF + GLYCIN .
 R39 : ASP-SA + NADPH = HOM + NADP .
 R40 : HOM + SUCC-CoA = O-SUCC-HOM + H-CoA .
 R41r : 3-PG + NAD = 3-PHP + NADH .
 R42r : 3-PHP + GLU = SER-P + 2-OXO .
 R43 : SER-P = SER .
 R44 : SER + AC-CoA = O-AC-SER + H-CoA .
 R45 : O-AC-SER + H2S = CYS + ACETAT .
 R46 : CYS + O-SUCC-HOM = CYSTA + SUCC .
 R47 : ASP + ATP = ASP-P + ADP .
 R48 : ASP-P + NADPH = ASP-SA + NADP .
 R50 : ATP + ACETAT = ADP + acetyl-phosphate .
 R51 : acetyl-phosphate + H-CoA = AC-CoA .
 R52 : HOMOCYS + MTHF = MET + THF .
 R53 : MET = METex .
 R54 : CYSTA = HOMOCYS + NH3 + PYR .
 R55 : SO4 + 3 ATP + NADPH = H2SO3 + 2 ADP + AMP + NADP .
 R56 : ATP = ADP .
 R57 : MAL + NADP = PYR + CO2 + NADPH .

R58 : $\text{H}_2\text{SO}_3 + 3 \text{NADPH} = \text{H}_2\text{S} + 3 \text{NADP}$.

R59 : $2 \text{NADH} + \text{O}_2 + 4 \text{ADP} = 2 \text{NAD} + 4 \text{ATP}$.

R60 : $2 \text{FADH} + \text{O}_2 + 2 \text{ADP} = 2 \text{FAD} + 2 \text{ATP}$.

R61 : $6965 \text{NH}_3 + 233 \text{SO}_4 + 206 \text{G6P} + 72 \text{F6P} + 627 \text{RIBO-5P} + 361 \text{E-4P} + 129 \text{GA3P} + 1338 \text{3-PG} + 720 \text{PEP} + 2861 \text{PYR} + 2930 \text{AC-CoA} + 1481 \text{OAA} + 1078 \text{2-OXO} + 16548 \text{NADPH} + 17821 \text{ATP} + 3548 \text{NAD} = \text{BIOMASS} + 16548 \text{NADP} + 2930 \text{H-CoA} + 1678 \text{CO}_2 + 17821 \text{ADP} + 3548 \text{NADH}$.

R63 : $\text{AMP} + \text{ATP} = 2 \text{ADP}$.

R64 : $\text{SO}_4\text{ex} + \text{ATP} = \text{SO}_4 + \text{ADP}$.

R70 : $\text{NADPH} + \text{NAD} = \text{NADP} + \text{NADH}$.

R71 : $\text{GLYCIN} + \text{HPL} = \text{Methyl-HPL} + \text{CO}_2$.

R72 : $\text{Methyl-HPL} + \text{THF} = \text{HPL} + \text{MTHF} + \text{NH}_3$.

R73 : $\text{G6P} = \text{KDPG}$.

R74r : $\text{KDPG} = \text{PYR} + \text{GA3P}$.

R76 : $3 \text{NADP} + 3 \text{NADH} + \text{ATP} = 3 \text{NADPH} + 3 \text{NAD} + \text{ADP}$.

Veränderungen an den Wildtypmodellen:

Escherichia coli Model:

- Deletion von R70, R76.
- Deletion von R71, R72; Glycin externer Metabolit

C. glutamicum Model:

- Insertion von R70, R76 aus *E. coli* .
- Insertion von R71, R72 aus *E. coli*; Glycin interner Metabolit
- Sulfid als externe Schwefelquelle:
Sulfid externer Metabolit, Deletion von R55, R58,
- Thiosulfat als externe Schwefelquelle:
Insertion von Thiosulfatreduktase: $\text{Thiosulphat} = \text{H}_2\text{SO}_3 + \text{H}_2\text{S}$.
Modifikation von R64 als Thiosulfat-ABC-Transporter.
- Methanthiol als externe Schwefelquelle.
Modifikation von R49 : $\text{O-AC-HOM} + \text{CH}_3\text{SH} = \text{MET} + \text{ACETAT}$
- Insertion des Formiatstoffwechsels:
R77 : $\text{formate} + \text{THF} + \text{ATP} = \text{formyl-THF} + \text{ADP}$.
R78 : $\text{formyl-THF} + \text{NADPH} + \text{NADH} = \text{MTHF} + \text{NADP} + \text{NAD}$.

Die Änderungen des NADPH-Bedarfes für die Biomassebildung auf unterschiedlichen Schwefelquellen wurde auch berücksichtigt.

11.4. ^{13}C -Flussanalyse

Tabelle 11-1: Massenisotopomerefraktionen proteinogener Aminosäuren und der Trehalose bei Kultivierung von *C. glutamicum* Wildtyp auf $[1^{13}\text{C}]$ -Glucose. Vergleich der experimentell bestimmten Anteile (exp) und den im Modell berechneten (cal).

Aminosäure / Trehalose		Massenisotopomerenfraktionen		
		M	M+1	M+2
Alanin	cal	0.5021	0.3590	0.1077
	exp	0.5023	0.3591	0.1073
Valin	cal	0.3361	0.4004	0.1896
	exp	0.3364	0.3996	0.1898
Threonin	cal	0.3274	0.3741	0.1995

	exp	0.3271	0.3752	0.1998
Aspartat	cal	0.3268	0.3734	0.1998
	exp	0.3283	0.3733	0.1995
Glutamat	cal	0.2452	0.3648	0.2413
	exp	0.2443	0.3623	0.2417
Lysin	cal	0.2229	0.3565	0.2529
	exp	0.2285	0.3517	0.2534
Trehalose	cal	0.0595	0.6132	0.2041
	exp	0.0597	0.6158	0.2048
Serin	cal	0.4432	0.3620	0.1444
	exp	0.4423	0.3628	0.1444
Phenylalanin	cal	0.2660	0.3813	0.2323
	exp	0.2662	0.3808	0.2322
Tyrosin	cal	0.2290	0.3553	0.2480
	exp	0.2283	0.3543	0.2472

Tabelle 11-2: Massenisotopomerefraktionen proteinogener Aminosäuren und der Trehalose bei Kultivierung von *C. glutamicum* $\Delta mcbR$ auf $[1^{13}C]$ -Glucose. Vergleich der experimentell bestimmten Anteile (exp) und den im Modell berechneten (cal).

		Massenisotopomerenfraktionen		
Aminosäure /		M	M+1	M+2
Trehalose				
Alanin	cal	0.4817	0.3703	0.1143
	exp	0.4828	0.3705	0.1129
Valin	cal	0.3109	0.4025	0.2037
	exp	0.3113	0.4005	0.2042
Threonin	cal	0.3023	0.3741	0.2127
	exp	0.3020	0.3751	0.2136
Aspartat	cal	0.3017	0.3734	0.2130
	exp	0.3030	0.3745	0.2125
Glutamat	cal	0.2217	0.3587	0.2537
	exp	0.2219	0.3554	0.2544
Lysin	cal	0.1988	0.3461	0.2649
	exp	0.2081	0.3413	0.2633
Trehalose	cal	0.0741	0.5891	0.2098
	exp	0.0747	0.5943	0.2130
Serin	cal	0.4290	0.3698	0.1486
	exp	0.4261	0.3718	0.1490
Phenylalanin	cal	0.2378	0.3735	0.2479
	exp	0.2388	0.3712	0.2484
Tyrosin	cal	0.2048	0.3457	0.2597
	exp	0.2077	0.3429	0.2570

11.5. NMR-Spektren von Homolanthionin




Abb. 11-1: ^1H -NMR-Spektrum von Homolanthionin.




Abb. 11-2: ^{13}C -NMR-Spektrum von Homolanthionin.

Curriculum vitae

Zu meiner Person:



Vornamen: Jens Olaf
 Nachname: Krömer
 Geburtsdatum: 14.04.1976
 Geburtsort: Neunkirchen, Saar
 Staatsangehörigkeit: Deutsch
 Familienstatus: verheiratet, 2 Kinder

Aktuelle Tätigkeit:

12.2005-08.2006



Postdoc-Projekt in der Technischen Biochemie: Metabolom-Profilung von *Saccharomyces cerevisiae* nach Infektion mit dem Brome-Mosaik-Virus. Förderung durch die DFG; Kooperation mit der Universität Pompeu Fabra, Barcelona (Spanien).

Akademische Ausbildung:

12.2002-12.2005



Doktorarbeit in der Gruppe für Systembiotechnologie von Dr. C. Wittmann im Institut für Technische Biochemie von Prof. Dr. E. Heinzle an der Universität des Saarlandes in Saarbrücken.

Titel der Arbeit: **Systembiotechnologische Studien an *Corynebacterium glutamicum* zur Charakterisierung der Methioninsynthese.** Diese Arbeit entstand im Rahmen einer Kooperation mit der BASF AG, Ludwigshafen.

10.1996-11.2002



Biologiestudium an der Universität des Saarlandes. Vordiplom 1998. Note: Gut (1,8).1999 Auslandsstudium (s.u.). Abschluss 2002 als Diplom-Biologe. Note: Gut (1,7).

Diplomarbeit bei Prof. Heinzle, Technische Biochemie: (02.2002–10.2002): **Metabolische Charakterisierung und Expressionsanalyse L-Lysin produzierender Stämme von *Corynebacterium glutamicum***. Diese Arbeit entstand im Rahmen einer Kooperation mit der Axaron Bioscience AG, Heidelberg.

02.1999-12.1999



Austauschstudient an der University of Technology, Sydney, Australien (2 Semester).

Schwerpunkt waren biotechnologische Studieninhalte, die in das Studium in Saarbrücken integrierbar waren.

Zivildienst:

08.1995-09.1996



Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz, Rettungswache Völklingen.

Schulische Ausbildung:

1982-1995



1982 – 1986 Grundschule.

1986 – 1995 Marie Luise Kaschnitz Gymnasium, Völklingen.

1995 Abitur. Leistungskurse: Englisch, Biologie und Erdkunde.