

**Metabolic Engineering von**  
***Corynebacterium glutamicum***  
**zur Produktion von Methionin**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Grades**

**des Doktors der Naturwissenschaften**

**der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III**

**Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften**

**der Universität des Saarlandes**

**von**

**Verena Schütz**

**Saarbrücken**

**2010**

Tag des Kolloquiums: 24.09.2010

Dekan: Prof. Dr. Stefan Diebels

Berichterstatter: Prof. Dr. Elmar Heinzle

Prof. Dr. Friedrich Giffhorn

Vorsitz: Prof. Dr. Volkhard Helms

Akad. Mitarbeiter: Dr. Gert-Wieland Kohring

**Zwischen Reiz und Reaktion liegt ein Raum. In diesem Raum liegt unsere Macht zur Wahl unserer Reaktion. In unserer Reaktion liegen unsere Entwicklung und unsere Freiheit.**

*Victor Frankl (1905-1997), österreichischer Neurologe und Psychiater*

**Für meine Eltern**



# DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Elmar Heinzle für die Überlassung des Themas, das mir entgegengebrachte Vertrauen und die sehr gute wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit.

Herrn Professor Dr. Friedrich Giffhorn danke ich für die Bereitschaft zur Begutachtung dieser Arbeit.

Großer Dank gilt auch der BASF SE, Ludwigshafen, für die finanzielle Unterstützung und die Bereitstellung verschiedener Mutanten von *C. glutamicum*. Insbesondere möchte ich Herrn Dr. Hartwig Schröder für seine wertvollen Ratschläge bei allen Fragen zur Stammkonstruktion in *C. glutamicum* und für viele weitere Anregungen und Diskussionsbeiträge danken.

Maria Salas danke ich für die im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführten Elementarmodenanalysen in *C. glutamicum*. Tanja Reichert, Sarah Zimmet, Tobias Barduhn Ilya Galperin und Vassileios Delis danke ich für ihren experimentellen Beitrag, den sie während ihrer Forschungs- bzw. Masterarbeit geleistet haben. Vassilis und Sarah danke ich auch für ihre Freundschaft und die vielen lustigen Gespräche, die zur Aufheiterung des Laboralltags beigetragen haben. Für ihre Unterstützung bei instrumentellen Fragestellungen und bei der Analytik danke ich besonders Michel Fritz, Dr. Klaus Hollemeyer und Dr. Maria Lasaosa.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Technische Biochemie möchte ich für ihre große Hilfsbereitschaft, die schöne Zeit und die einzigartige Atmosphäre danken. Einige waren nicht nur Kollegen, sondern sind auch gute Freunde geworden. Ein besonders herzlicher Dank gilt Susanne Peifer, die immer bereit war, über die auftretenden Probleme mit mir zu diskutieren, und die das Korrekturlesen meiner Arbeit übernommen hat. Auch den übrigen Bewohnern der „Doktoranden-Suite“ Yongbo Yuan, Konstantin Schneider und Andreas Neuner gilt ein großes Dankeschön für die tolle Zusammenarbeit. Jens Niklas und Judith Wahrheit danke ich ebenfalls für das Korrekturlesen und Simone Beckers für die gegenseitige Motivation beim Zusammenschreiben der Arbeit. Judith möchte ich zudem für die außergewöhnlichen Diskussionen über das Leben im Allgemeinen und im Speziellen danken.

Meinem Freund Harald danke ich für seine Liebe, seine unendliche Geduld und seine langjährige Unterstützung. Danke, dass du da bist!

Ein ganz besonderer und herzlicher Dank gilt meinen Eltern dafür, dass sie mich in allen Lebenslagen bedingungslos unterstützen und dass sie immer an mich glauben. Ihr habt mir ermöglicht, diesen Weg zu gehen, und dafür bedanke ich mich bei Euch von ganzem Herzen.



---

# INHALTSVERZEICHNIS

---

<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>I</b>
<b>SYMBOLE UND ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>V</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>VIII</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>IX</b>
<b>I. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG .....</b>	<b>1</b>
1. Allgemeine Einleitung .....	1
2. Zielsetzung der Arbeit.....	5
<b>II. THEORETISCHE GRUNDLAGEN.....</b>	<b>7</b>
1. <i>Corynebacterium glutamicum</i> und seine Bedeutung in der Biotechnologie.....	7
2. Grundlagen des Stoffwechsels von <i>C. glutamicum</i> .....	8
2.1 Zentralstoffwechsel .....	8
2.2 Biosynthese von Methionin .....	10
2.3 Schwefelstoffwechsel.....	13
2.4 Regulation der Methioninbiosynthese und des Schwefelstoffwechsels .....	15
3. Thiosulfat als alternative Schwefelquelle .....	16
4. Bisherige Fortschritte zur Erzeugung eines Methioninproduzenten von <i>C. glutamicum</i> .....	17
5. Elementarmodenanalyse .....	19
6. Grundlagen zur Stammkonstruktion von <i>C. glutamicum</i> .....	21
6.1 Konstrukterzeugung mittels SOE-PCR.....	23
6.2 Homologe Rekombination .....	25
7. Grundlagen zur Metabolischen Flussanalyse .....	26
7.1 „Metabolite Balancing“ .....	26
7.2 <sup>13</sup> C-Metabolische Flussanalyse .....	28
<b>III. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>35</b>
1. Bakterienstämme .....	35
1.1 <i>Corynebacterium glutamicum</i> .....	35

---

1.2	<i>Escherichia coli</i> .....	37
2.	Plasmide .....	37
3.	Chemikalien .....	38
4.	Nährmedien.....	40
4.1	Nährmedien zur Kultivierung von <i>C. glutamicum</i> .....	40
4.2	Nährmedien zur Stammkonstruktion .....	42
4.3	Nährmedien zur Proteinexpression in <i>E. coli</i> und <i>C. glutamicum</i> .....	44
5.	Molekularbiologische Methoden.....	45
5.1	DNA-Isolierung .....	45
5.2	Bestimmung der DNA-Konzentration .....	46
5.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	47
5.4	Gelelektrophorese.....	50
5.5	Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	51
5.6	Vektorkonstruktion .....	52
5.7	Herstellung und Transformation Hitzeschock-kompetenter <i>E. coli</i> .....	53
5.8	Transformation von <i>C. glutamicum</i> durch Elektroporation.....	55
6.	Stammhaltung und Kultivierung.....	56
6.1	Stammhaltung in Gefrierkulturen.....	56
6.2	Kultivierung von <i>C. glutamicum</i> für physiologische Analysen .....	56
6.3	Kultivierung von <i>E. coli</i> und <i>C. glutamicum</i> zur Protein- überexpression.....	57
7.	Analytische Methoden.....	59
7.1	Bestimmung der Biomassekonzentration .....	59
7.2	Extraktion intrazellulärer Aminosäuren mittels schneller Filtration.....	61
7.3	Quantifizierung von Aminosäuren mittels RP-HPLC.....	61
7.4	Quantifizierung von Zuckern und organischen Säuren mittels HPLC .....	62
7.5	Markierungsexperimente .....	63
7.6	Spezifische Raten und Ausbeutekoeffizienten .....	66
7.7	<sup>13</sup> C-Metabolische Flussanalyse .....	67
7.8	Bilanzen.....	68
8.	Biochemische Methoden .....	71
8.1	Proteinaufreinigung.....	71
8.2	SDS-PAGE .....	73
8.3	Bestimmung von Enzymaktivitäten .....	75
9.	Elementarmodenanalyse.....	79
9.1	Das Netzwerk von <i>C. glutamicum</i> .....	79

9.2 Strategie zur rationalen Selektion von Deletionen .....	81
<b>IV. ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>84</b>
<b>1. Elementarmodenanalyse zum rationalen Design eines Methioninproduzenten von <i>Corynebacterium glutamicum</i> .....</b>	<b>84</b>
1.1 Elementarmodenanalyse des Wildtypnetzwerks von <i>C. glutamicum</i> .....	84
1.2 Selektion von Gendeletionen .....	86
1.3 Theoretische Flussverteilung während der Produktion von Methionin .....	92
<b>2. Erzeugung von Deletionsmutanten .....</b>	<b>102</b>
2.1 Adaption von <i>C. glutamicum lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpckΔpgi</i> .....	107
2.2 Genotypische und phänotypische Validierung der Deletionen des adaptierten Stammes von <i>C. glutamicum lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpckΔpgi</i> .....	108
<b>3. Systembiologischer Vergleich von <i>C. glutamicum lysC<sup>fbr</sup></i> und <i>lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpckΔpgi</i> .....</b>	<b>112</b>
3.1 Kultivierungsprofile .....	113
3.2 Vergleich von Wachstum und Substrataufnahme .....	115
3.3 Vergleich von Produkt- und Nebenproduktbildung .....	118
3.4 Vergleich des Metaboloms .....	121
3.5 <sup>13</sup> C-Metabolische Flussanalyse .....	125
3.6 Vergleich von Enzymaktivitäten .....	144
3.7 Konsequenzen für das Design eines Methioninproduzenten mittels Elementarmodenanalyse .	148
3.8 Deletion der Serin-Deyhydratase ( <i>sdaA</i> ) in <i>C. glutamicum lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpckΔpgi</i> .....	150
<b>4. Physiologische Analysen zu Mehrfach-Deletionsmutanten von <i>C. glutamicum</i> .....</b>	<b>153</b>
4.1 Spezifische Raten und Ausbeuten .....	155
4.2 <sup>13</sup> C-Metabolische Flussanalyse .....	159
<b>5. Analysen zur Verwertung von Thiosulfat als potentielle Schwefelquelle zur Methioninproduktion mit <i>Corynebacterium glutamicum</i> .....</b>	<b>176</b>
5.1 Beteiligung der Enzyme der assimilatorischen Sulfatreduktion an der Verwertung von Thiosulfat .....	176
5.2 Thiosulfat-Sulfurtransferase .....	182
5.3 Cystein-/S-Sulfocystein-Synthase .....	183
5.4 Abbau von Methionin zu Cystein in <i>C. glutamicum</i> .....	185
5.5 Aufreinigung von CysK und Cgl2136 mittels Ni <sup>2+</sup> -NTA-Affinitätschromatographie .....	187
<b>V. SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK .....</b>	<b>195</b>
<b>VI. LITERATUR .....</b>	<b>200</b>

<b>VII. ANHANG</b> .....	<b>215</b>
1. Das stöchiometrische Netzwerk von <i>C. glutamicum</i> zur Elementarmodenanalyse .....	215
2. Theoretische Flussverteilungen.....	219
3. Stöchiometrische Netzwerke zur Flussanalyse .....	222
4. Metabolische Flüsse.....	232
5. Massenisotopomerverteilungen.....	237
6. Verwendete Vektoren .....	246
7. DNA- und Protein-Molekulargewichtsmarker.....	248

---

## SYMBOLE UND ABKÜRZUNGEN

---

### SYMBOLE

C	Kapazität [F]
c	Konzentration [mol/l] bzw. [g/l]
d	Schichtdicke [cm]
$\Delta G^0$	freie Reaktionsenthalpie [kJ mol <sup>-1</sup> ] unter Standardbedingungen (pH7, 25 °C)
$\epsilon$	molarer Extinktionskoeffizient [l cm <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> ]
$\lambda$	Wellenlänge [nm]
m	Masse [g]
m/z	Verhältnis Masse Ladungszahl <sup>-1</sup>
$\mu$	spezifische Wachstumsrate [h <sup>-1</sup> ]
n	Stoffmenge [mol]
q <sub>s</sub>	spezifische Substrataufnahmerate
q <sub>p</sub>	spezifische Produktbildungsrate
R	Widerstand [ $\Omega$ ]
t	Zeit [h]
U	Units [ $\mu$ mol/min]
v	metabolischer Fluss [mmol g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]
$\lambda$	Wellenlänge [nm]
Y <sub>X/S</sub>	Biomasseausbeutekoeffizient [g mmol <sup>-1</sup> ]
Y <sub>P/S</sub>	Produktausbeutekoeffizient [mol mol <sup>-1</sup> ]
$\zeta$	Reversibilität

### ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
Ac-CoA	Acetyl-CoA
ABU	$\alpha$ -Aminobuttersäure
AKG/2-OXO	$\alpha$ -Ketoglutarat
AMM	Atom Mapping Matrix
APS	Adenosin-5'-Phosphosulfat
ASP	Aspartat
ASP-SA	Aspartat-Semialdehyd
ATCC	American Type Culture Collection
ATP/ADP/AMP	Adenosin-tri/di-/mono-Phosphat
BM/BTM	Biomasse/Biotrockenmasse
bp	Basenpaare
13-PG	1,3-Bisphosphoglycerat
BSA	bovine serum albumin

---

BSTFA	N,O-bis(trimethylsilyl)trifluor-acetamid
Cis-ACO	cis-Aconitat
CYS	Cystein
CYSTA	Cystathionin
CIT	Citrat
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DHA	Dihydroxyaceton
DHP	2,3-Dihydrodipicolinat
DMF	Dimethylformamid
DMP	Diaminopimelat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>et al.</i>	und andere ( <i>et alii</i> )
<i>fbr</i>	Endprodukt-resistent ( <i>feedback resistant</i> )
FMOC	9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid
E4P	Erythrose-4-Phosphat
FAD <sup>+</sup> /FADH <sub>2</sub>	Flavinadenindinukleotid, oxidiert/reduziert
F6P	Fructose-6-Phosphat
F-16-BP	Fructose-1,6-Bisphosphat
FUM	Fumarat
GC/MS	Gaschromatographie/Massenspektrometrie
GLC	Glucose
GLU	Glutamat
GA3P/GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
G6P	Glucose-6-Phosphat
G6PDH	Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase
GLYOXY	Glyoxylat
GLC-LAC	6-Phospogluconolacton
GTP/GDP/GMP	Guanosin-tri-/di-/mono-Phosphat
H-CoA	Coenzym-A
HOMOCYS	Homocystein
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICI	Isocitrat
IDP	Inosindiphosphat
IDV	Isotopomer Distribution Vector
IMM	Isotopomer Mapping Matrix
IPTG	Isopropyl-thio-β-D-galactopyranosid
Kan	Kanamycin
LYS/LYSex	Lysin/Lysin extrazellulär
MAL	Malat
MBDSTFA	N-methyl-N- <i>t</i> -butyldimethylsilyl-trifluoracetamid
MDV	Mass distribution vector
MFA	Metabolische Flussanalyse

---

MTHF	Methyltetrahydrofolat
MET/METex	Methionin/Methionin extrazellulär
NAD <sup>+</sup> /NADH	Nicotinamadenindinukleotid, oxidiert/reduziert
NADP <sup>+</sup> /NADPH	Nicotinamadenindinukleotidphosphat, oxidiert/reduziert
NTA	Nitriloacetat
O-AC-SER	O-Acetylserin
O-AC-HOM	O-Acetylhomoserin
OD	Optische Dichte
OPA	ortho-Phthaldialdehyd
ORI	Origin of Replication, Replikationsursprung
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PDC	Piperidin-2,6-Dicarboxylat
2-PG	2-Phosphoglycerat
3-PG	3-Phosphoglycerat
PGA	(2-und 3-) Phosphoglycerat
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenaktivität
3-PHB	3-Phosphohydroxypyruvat
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
6-P-Gluconate	6-Phosphogluconat
PEP	Phosphoenolpyruvat
PPP	Pentosephosphatweg
PTS	Phosphotransferasesystem
PYR	Pyruvat
RIB-5P	Ribulose-5-Phosphat
RIBO-5P	Ribose-5-Phosphat
RT	Raumtemperatur
P5P	Pentose-5-Phosphat
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
SAK	Succinyl-2-amino-6-ketopimelat
SDP	Succinyl-2,6-daminopimelat
SDS	Sodiumdodecylsulfat
S7P	Sedoheptulose-7-Phosphat
SER/SER-P	Serin/Serin-Phosphat
SUCC-CoA	Succinyl-CoA
Tab.	Tabelle
TCA-Zyklus	Tricarbonsäurezyklus
THF	Tetrahydrofolat
THL	Trehalose
XYL-5P	Xylulose-5-Phosphat



---

## ZUSAMMENFASSUNG

---

Methionin wird bisher nicht biotechnologisch, sondern chemisch produziert. In dieser Arbeit wurde eine neue Strategie zum rationalen Design eines Methioninproduzenten von *C. glutamicum* verfolgt. Basierend auf der Elementarmodenanalyse des metabolischen Netzwerks von *C. glutamicum* wurde eine Kombination von vier Gendeletionen zur Kopplung von Wachstum und Methioninproduktion selektiert und in *C. glutamicum* implementiert. Nach einer Adaption wuchs die Mutante auf Minimalmedium, allerdings ohne Methionin zu produzieren. Metabolom- und Fluxomanalyse zeigten eine Umleitung des Kohlenstoffflusses zu Serin. Serin wurde jedoch zu Pyruvat abgebaut, weshalb die Mutante ohne Methioninproduktion wachsen konnte. Dieser Abbau wurde auch in Dreifach-Deletionsmutanten zur Kompensation der gleichzeitigen Deletion von Pyruvat-Kinase und PEP-Carboxylase beobachtet. Da auch die zusätzliche Deletion der Serin-Dehydratase nicht zur Methioninproduktion führte, mussten weitere Reaktionen für den Serinabbau vorhanden sein, etwa die Nebenaktivität der Cystathionin- $\beta$ -Lyase, die jedoch als Teil aller selektierten Moden nicht deletiert werden kann. Die Untersuchung des Einsatzes von Thiosulfat zur Methioninproduktion zeigte, dass dieses bei gleichwertiger Nutzung der Schwefelatome zur Einsparung von NADPH in einem zukünftigen Produktionsprozess beiträgt. Während eine S-Sulfocystein-Synthase zur Thiosulfatverwertung wahrscheinlich auszuschließen ist, legen Markierungsexperimente eine Spaltung des Thiosulfats in Sulfid und Sulfit nahe, was mit einer Thiosulfat-Sulfurtransferase-Aktivität in Einklang stünde.

## ABSTRACT

---

Currently methionine is exclusively derived from chemical synthesis and cannot be produced biotechnologically. In this work a new strategy for the rational design of a methionine producing *C. glutamicum* strain was applied. Based on the elementary mode analysis of the metabolic network of *C. glutamicum*, a set of four gene deletions to couple cell growth with methionine production was selected and implemented in *C. glutamicum*. After an adaption, the cells were able to grow on minimal medium without producing methionine. Metabolome and fluxome analyses revealed a rearrangement of the carbon flux towards serine synthesis. However, the degradation of serine to pyruvate was activated thus still supporting modes with pure biomass formation. This degradation was also observed in triple-deletion mutants compensating for the concomitant loss of pyruvate kinase and PEP-carboxylase. As the deletion of serine dehydratase did not lead to methionine production either, further reactions such as the side activity of cystathionine- $\beta$ -lyase had to be responsible for serine degradation. As a part of all the selected elementary modes this enzyme cannot be deleted. Studies concerning thiosulfate as a sulfur source for methionine production showed that an equivalent use of its two sulfur atoms would reduce NADPH consumption in a future production process. With S-sulfocysteine synthase activity likely to be excluded tracer experiments suggested thiosulfate cleavage into sulfide and sulfite, which would be consistent with thiosulfate sulfurtransferase activity.

---

# I. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

---

## 1. Allgemeine Einleitung

Aminosäuren werden nicht nur von der Pharmaindustrie für die Herstellung spezieller Nahrungsmittel und Medikamente benötigt, sondern auch dem Tierfutter zugesetzt und sie finden als Bausteine in der chemischen Industrie eine Anwendung. Daher ist die Aminosäureproduktion ein bedeutender wirtschaftlicher Zweig mit jährlichen Zuwachsraten von 5-7 % (Eggeling und Sahn, 1999; Leuchtenberger et al., 2005). Methionin ist eine der wichtigsten essentiellen Aminosäuren, die sowohl in der menschlichen Ernährung als auch in pharmazeutischen Anwendungen, vor allem aber in der Supplementierung von Tierfutter in der Geflügelzucht eine große Rolle spielt (Baker, 2009; D'Mello und Lewis, 1978; Funfstuck et al., 1997; McCoy et al., 1974). Pflanzliche Futtermittel wie zum Beispiel Getreide, Soja, Mais und Reis sind arm an Methionin, Lysin und Threonin. Tierische Aminosäurequellen, wie Tier- oder Fischmehle, die reich an diesen Aminosäuren sind, sind jedoch mittlerweile verboten, da sie verschiedene Krankheitserreger enthalten können (vgl. BSE). Während in der Schweinemast mit Futter auf Weizen-Basis Lysin die erste limitierende Aminosäure darstellt, ist dies in Geflügelfutter auf Sojabasis Methionin. Dieses bestimmt somit, zu welchem Prozentsatz alle übrigen Aminosäuren im Tierfutter verwertet werden können. Wenn es an Methionin mangelt, können alle im Überschuss aufgenommenen Aminosäuren nicht in tierisches Protein umgesetzt werden, sondern werden abgebaut und ausgeschieden. Der hohe Bedarf des Geflügels an Methionin erklärt sich vor allem durch die Bildung von Kreatin für das Gefieder. Ein weiterer Nachteil natürlicher Aminosäurequellen besteht darin, dass ihr Aminosäuregehalt je nach Umweltbedingungen schwanken kann. Durch den gezielten Zusatz von Methionin kann daher eine effektive Steigerung des Nährwerts erreicht werden, wodurch sich die benötigte Futtermenge sowie der Stickstoffanteil der Exkremente deutlich reduzieren lässt (Leuchtenberger, 1996).

Gegenwärtig wird Methionin praktisch ausschließlich durch chemische Synthese mit Hilfe des Degussa-Verfahrens hergestellt (Lüssling et al., 1975). Bei der chemischen Synthese entsteht ein Racemat, d.h. ein Gemisch aus D- und L-Aminosäure, das direkt verfüttert werden kann (Leuchtenberger, 1996). Im Gegensatz zu allen anderen Aminosäuren kann D-Methionin durch eine Oxidase in die Ketosäure überführt, anschließend in L-Stellung wieder aminiert und so für den Organismus zugänglich gemacht werden. Studien über die

Äquivalenz des D- und des L- Isomers bzw. des racemischen Gemisches sind bislang allerdings sehr widersprüchlich (Baker, 1986; Katz und Baker, 1975). Eine pharmazeutische Anwendung ist hingegen nur mit der reinen L-Form möglich. Ein entscheidender Nachteil der chemischen Synthese besteht im Einsatz hochgiftiger und zum Teil krebserregender Substanzen wie Acrolein, Methanthiol und Blausäure als Ausgangsstoffe sowie der Verwendung großer Mengen von Lösungsmitteln wie Methanol und Aceton zur Aufreinigung des Methionins (Kumar und Gomes, 2005; Lüssling et al., 1975) und birgt somit ökologische und gesundheitliche Gefahren. Letztendlich beruht das chemische Syntheseverfahren auf der Basis von Rohöl und Erdgas, was die Kosten für die verwendeten Rohstoffe in den nächsten Jahren deutlich anheben wird. Als Ausgangssubstrate für eine biotechnologische Produktion dienen hingegen nachwachsende und relativ kostengünstige Rohstoffe wie Zucker und Stärkehydrolysate sowie einfache Stickstoff- und Schwefelverbindungen. Außerdem sind die Rückstände der Fermentation biologisch abbaubar. Es besteht daher ein erhebliches kommerzielles Interesse an der Entwicklung eines biotechnologischen Verfahrens zur Methioninherstellung (Kumar und Gomes, 2005).

Heutzutage stellt *Corynebacterium glutamicum* einen der wichtigsten Organismen zur industriellen Herstellung von Aminosäuren dar (Eggeling und Sahm, 1999). L-Glutamat (1,5 Millionen Jahrestonnen), das in der Lebensmittelindustrie als Geschmacksverstärker eingesetzt wird, und L-Lysin (850.000 Jahrestonnen), das als Futtermitteladditiv in der Tiernahrung Verwendung findet, sind die beiden wichtigsten biotechnologisch erzeugten Aminosäuren (de Graaf et al., 2001; Kimura, 2003; Leuchtenberger et al., 2005; Pfefferle et al., 2003). Bislang zählt Methionin zu den wenigen Ausnahmen proteinogener Aminosäuren, die nicht fermentativ produziert werden können. Aufgrund seines enormen Potentials zur Aminosäureproduktion kann *C. glutamicum* als vielversprechender Kandidat zur Entwicklung eines biotechnologischen Verfahrens zur Herstellung von Methionin angesehen werden. Produktionsstämme zur Aminosäureproduktion wurden in den letzten 50 Jahren hauptsächlich durch Zufallsmutagenese (*random mutagenesis*) und anschließende Selektion erzeugt (de Graaf et al., 2001; Vallino und Stephanopoulos, 2000). Trotz der beachtlichen Erfolge und der weitverbreiteten Anwendung in Industrie und Forschung konnte durch diese konventionelle Herangehensweise kein Durchbruch in der Entwicklung eines Produktionsstammes für Methionin erzielt werden, der mit dem chemischen Syntheseverfahren konkurrieren könnte (Kumar und Gomes, 2005).

Aus diesem Grund gewann in den letzten Jahren eine rationale Vorgehensweise mittels *Metabolic Engineering* eine zunehmende Bedeutung. Darunter versteht man die zielgerichtete Veränderung zellulärer Aktivitäten durch Manipulation sowohl enzymatischer und regulatorischer Funktionen als auch von Transportfunktionen der Zelle auf der Basis rekombinanter DNA-Technologie (Bailey, 1991). Dieser systembiologische Ansatz zielt darauf ab, ein umfassendes quantitatives Verständnis der dynamischen Interaktionen zwischen den Komponenten eines biologischen Systems zu erlangen und so das Verhalten des Systems als Ganzes zu verstehen (<http://www.bmbf.de/>). Daher werden nicht nur einzelne Gene oder Proteine untersucht, sondern es werden vielmehr die Gesamtheit der zu einem bestimmten Zeitpunkt unter bestimmten Bedingungen transkribierten Gene (Transkriptom), Proteine (Proteom) und Stoffflüsse (Fluxom) sowie die intra- und extrazellulären Metabolite (Metabolom) analysiert. Durch Integration der hierbei gewonnenen Daten mit Hilfe mathematischer Modelle und Computersimulationen besteht die Möglichkeit, Rückschlüsse auf das Verhalten des betrachteten Systems zu ziehen sowie Vorhersagen über die Auswirkung von Modifikationen zu treffen.

Die Basis zur systembiologischen Erforschung von *C. glutamicum* bildete die Entschlüsselung des Genoms (Kalinowski et al., 2003; Tauch et al., 2002) sowie die Entwicklung von Techniken seiner gezielten genetischen Manipulation (Kirchner und Tauch, 2003). Hierauf aufbauend wurden eine Vielzahl von Transkriptom- und Proteomstudien durchgeführt, etwa zur Untersuchung der Produktion organischer Säuren (Inui et al., 2007) und Aminosäuren (Brinkrolf et al., 2009; Krömer et al., 2004; Lasasosa et al., 2009), zur Verwertung verschiedener Kohlenstoffquellen (Gerstmeir et al., 2003; Haussmann et al., 2009; Polen et al., 2007; Teramoto et al., 2009) oder zur Stressantwort von *C. glutamicum* auf Änderungen des pH-Werts (Follmann et al., 2009) und auf Schwermetalle (Fanous et al., 2008). Da bei niedermolekularen Verbindungen wie Aminosäuren eine enge Verbindung zum Zentralstoffwechsel besteht, kommt bei ihrer Produktion der Metabolom- und Fluxomanalyse eine besondere Bedeutung zu. Hierdurch können Engpässe im Stoffwechsel und *in vivo* Aktivitäten von Enzymen bestimmt werden. So wurde in den letzten Jahren vor allem die Glutamat-Produktion (Gourdon und Lindley, 1999; Shirai et al., 2007; Shirai et al., 2005) und die Lysinproduktion (Becker et al., 2008; Becker et al., 2005; Kiefer et al., 2002; Krömer et al., 2004; Vallino und Stephanopoulos, 2000; Wittmann und Heinzle, 2002; Wittmann et al., 2004a) in *C. glutamicum* näher charakterisiert und optimiert.

Auch die Methioninproduktion in *C. glutamicum* stand bereits im Fokus erster systembiologischer Studien (Koch et al., 2005; Krömer et al., 2008; Rey et al., 2005; Rey et al., 2003; Rückert et al., 2005). Hierbei wurden vor allem die Rolle des Transkriptionsregulators der Methionin- und Cysteinbiosynthese McbR sowie die Verwertung verschiedener Schwefelquellen näher betrachtet, was zu einem verbesserten Verständnis der Methioninbiosynthese in *C. glutamicum* sowie zur Identifikation von Ansatzpunkten zur Stammoptimierung führte.

Neben den experimentellen Ansätzen hat sich die computergestützte metabolische Netzwerkanalyse, auch bekannt als Elementarmodenanalyse (*elementary mode analysis*) (Papin et al., 2004; Schilling et al., 1999; Schuster et al., 1999; Schuster et al., 2000), zur Modellierung von Netzwerkeigenschaften als besonders effektiv erwiesen. Bei diesem topologischen Verfahren lassen sich mit Hilfe der Stöchiometrie und der Thermodynamik der beteiligten biochemischen Reaktionen sowie unter der Annahme eines Fließgleichgewichts (*steady-state*) alle möglichen Flussverteilungen innerhalb des betrachteten metabolischen Netzwerks bestimmen. Diese *in silico* Analyse lieferte bereits wertvolle Hinweise zur Stamm- und Prozessentwicklung für die Methioninproduktion. So konnte gezeigt werden, dass neben der Einführung eines Glycinspaltungssystem in *C. glutamicum* die Verwertung unterschiedlich stark reduzierter Schwefelverbindungen sowie zusätzlicher C<sub>1</sub>-Quellen die theoretisch maximale Methioninausbeute enorm steigern kann (Krömer et al., 2006b). Neben der Bestimmung der maximalen Produktausbeute bei bestimmten genetischen Konstitutionen oder Substratangeboten nutzten andere Arbeiten diesen Ansatz zur Identifikation effizienter Stoffwechselwege um die Produktausbeute zu optimieren. So konnte beispielsweise die Ethanol- bzw. Biomasseproduktion in *E. coli* durch Deletion ineffizienter Wege deutlich gesteigert werden, wobei die *in vivo* Daten eine sehr gute Korrelation mit den theoretischen Vorhersagen zeigten (Carlson und Srienc, 2004; Trinh et al., 2006; Trinh et al., 2008a). Aufgrund ihres großen Potentials stellt die Elementarmodenanalyse zur Erzeugung eines Methioninproduzenten die Grundlage der vorliegenden Arbeit dar.

## 2. Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte die Methode der Elementarmodenanalyse zum rationalen *in silico* Design eines Methioninproduzenten von *C. glutamicum* eingesetzt werden. Zunächst wurde hierzu das Wildtypnetzwerk von *C. glutamicum* aufgestellt. Das Modell enthielt alle entscheidenden Wege des Zentralstoffwechsels, einen vereinfachten Schwefel- und C<sub>1</sub>-Stoffwechsel sowie die Methionin- und Lysin-Biosynthese. Für jeden der sich ergebenden Elementarmoden wurde die Kohlenstoffausbeute für die Biomasse ( $Y_{x/s}$ ) und Methionin ( $Y_{Met/S}$ ) berechnet. Anschließend sollten Kombinationen von Gendelektionen ausgewählt werden, die nur noch solche Moden erlauben, bei denen die Biomassebildung und Methioninproduktion zwingend aneinander gekoppelt sind. Bezeichnend für diesen Ansatz war daher, dass die Identifikation dieser Kombination von Deletionen aufgrund der Komplexität der zugrundeliegenden Kombinatorik alleine durch logisches Denken oder durch physiologische Analyse von aufeinanderfolgenden Einzelmutationen sehr unwahrscheinlich ist. Dies unterscheidet die vorliegende Arbeit von den gängigen Methoden zum rationalen Design von Produktionsstämmen, in denen für die Produktion positive Einzelmutationen durch detaillierte physiologische Analyse identifiziert und anschließend miteinander kombiniert werden (Wittmann, 2008). Die Vorhersage der Auswirkungen solcher Kombinationen ist bislang allerdings kaum möglich.

Aus der Identifikation der Kombinationen von Gendelektionen, bei denen Wachstum und Methioninproduktion aneinander gekoppelt sein sollten, ergaben sich weitere interessante Fragestellungen. Zunächst wurde analysiert, was die Moden kennzeichnet, die nach Einführung der Deletionen in das Netzwerk von *C. glutamicum* übrigbleiben. Wie viele Moden sind noch möglich und wie sehen deren theoretische Flussverteilungen aus? Welche Reaktionen tragen immer, manchmal oder nie zur Methioninsynthese bei? In welcher Richtung arbeiten reversible Enzymreaktionen und welche Methioninausbeuten können erreicht werden? Hierdurch können wichtige Einblicke in die Netzwerkstruktur von *C. glutamicum* erhalten werden. Außerdem eröffnen sich somit Möglichkeiten zur weiteren Stammverbesserung. So können beispielsweise durch die theoretische Betrachtung identifizierte Schlüsselenzyme durch solche mit verbesserten Eigenschaften ersetzt werden.

In einem nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob es möglich ist, die ausgewählten Deletionen *in vivo* miteinander zu kombinieren. Ist der Organismus weiterhin lebensfähig und wenn ja, ist das Wachstum tatsächlich an die Methioninproduktion gekoppelt? Durch detaillierte physiologische Untersuchungen sollte überprüft werden, inwieweit die

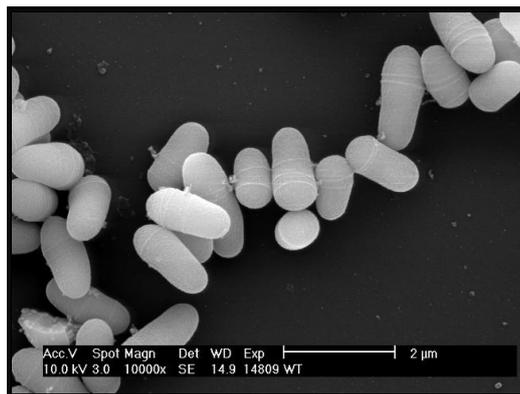
Vorhersagen der Elementarmodenanalyse mit den tatsächlichen Flussverteilungen übereinstimmen. Als zentrale Frage ist hierbei zu beantworten, ob diese Herangehensweise ein allgemein einsetzbares Werkzeug zum rationalen Design von Produktionsstämmen darstellt. Eine erfolgreiche Anwendung der Elementarmodenanalyse setzt voraus, dass alle wichtigen Reaktionen des betrachteten Netzwerkes bekannt sind. Wenn nach Einführung der Deletionen die Biomassebildung ohne Methioninproduktion möglich ist, muss es alternative Reaktionen geben, die im Netzwerk nicht berücksichtigt wurden. Ist es möglich, diese Reaktionen zu identifizieren, kann dies dazu beitragen, das zugrundegelegte Netzwerk zu verbessern und somit die Kenntnisse über die Flexibilität und Robustheit des Stoffwechsels von *C. glutamicum* zu erweitern. Des Weiteren wurden Mutanten mit verschiedenen Kombinationen von Gendeletionen im Zentralstoffwechsel näher charakterisiert, welche von genereller Bedeutung für die biotechnologische Produktion von Aminosäuren mit *C. glutamicum* sind.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit bildete die Charaktisierung der Verwertung von Thiosulfat als alternative Schwefelquelle zur Methioninproduktion mit *C. glutamicum*. Der Vorteil dieser Schwefelquelle besteht in ihrem stärkeren Reduktionsgrad im Vergleich zu Sulfat, welches üblicherweise in Nährmedium vorzufinden ist. Zur Aufklärung des Thiosulfatstoffwechsels wurden verschiedene Deletionsmutanten erzeugt und es wurden Markierungsexperimente auf  $^{34}\text{S}$ -markiertem Thiosulfat sowie Enzymassays mit aufgereinigten Enzymen durchgeführt.

## II. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

### 1. *Corynebacterium glutamicum* und seine Bedeutung in der Biotechnologie

*Corynebacterium glutamicum* gilt heute als bedeutendster Mikroorganismus zur biotechnologischen Produktion von Aminosäuren und wird außerdem für die Produktion von Vitaminen und Nukleotiden eingesetzt (Eggeling L., 2005). Er wurde in den fünfziger Jahren als Glutamat-produzierendes Bakterium isoliert (Kinoshita et al., 1957) und bald darauf industriell eingesetzt. Es handelt sich um ein Gram-positives, aerobes, unbewegliches sowie nicht-sporulierendes Bodenbakterium mit hohem GC-Gehalt der DNA. Seinen Namen verdankt es seiner meist keulenförmigen (*coryne* = Keule) Morphologie (Abbildung II.1).



**Abb. II-1:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (Krömer, 2006).

*C. glutamicum* wird zur *Corynebacterium*-, *Mycobacterium*-, *Nocardia*-Gruppe von Bakterien gezählt (Burkovski, 2003). Im Gegensatz zu den nahe verwandten pathogenen Spezies *C. diphtheriae*, *Mycobacterium tuberculosis* und *M. leprae* ist *C. glutamicum* nicht pathogen und besitzt die GRAS (*generally regarded as safe*) - Klassifikation, was ein entscheidender Vorteil für den industriellen Einsatz darstellt. *C. glutamicum* zeichnet sich neben seiner Eigenschaft, Aminosäuren ins Medium zu sekretieren, vor allem durch sein schnelles Wachstum und seine geringen Ansprüche an die Qualität der dazu benötigten Nährstoffe aus. Daher können zur Herstellung von hochwertigen Produkten Abfallstoffe aus der Zuckerindustrie wie Maisquellwasser oder Melasse eingesetzt werden.

## 2. Grundlagen des Stoffwechsels von *C. glutamicum*

Die Produktion von Methionin in *C. glutamicum* ist mit mehreren Stoffwechselwegen eng verknüpft. Hier ist zum einen der Zentralstoffwechsel zu nennen, der die notwendige Energie in Form von ATP bzw. GTP und Reduktionsäquivalente sowie Vorläufermoleküle bereitstellt. Der Schwefelstoffwechsel und der C<sub>1</sub>-Metabolismus liefern die benötigten Schwefelatome sowie die Methylgruppe. Ein weiterer Stoffwechselweg, der eng mit der Methioninsynthese zusammenhängt, ist die Bildung von S-Adenosylmethionin (SAM), dem universellen Methylgruppendonor. Methionin stellt, ausgehend von Glucose und Sulfat als Substrate, mit einem Verbrauch von 7 mol ATP und 8 Mol NADPH pro mol Methionin, die „teuerste“ Aminosäure dar (Mampel et al., 2005). Im Folgenden sind die zur Methioninproduktion notwendigen Stoffwechselwege beschrieben.

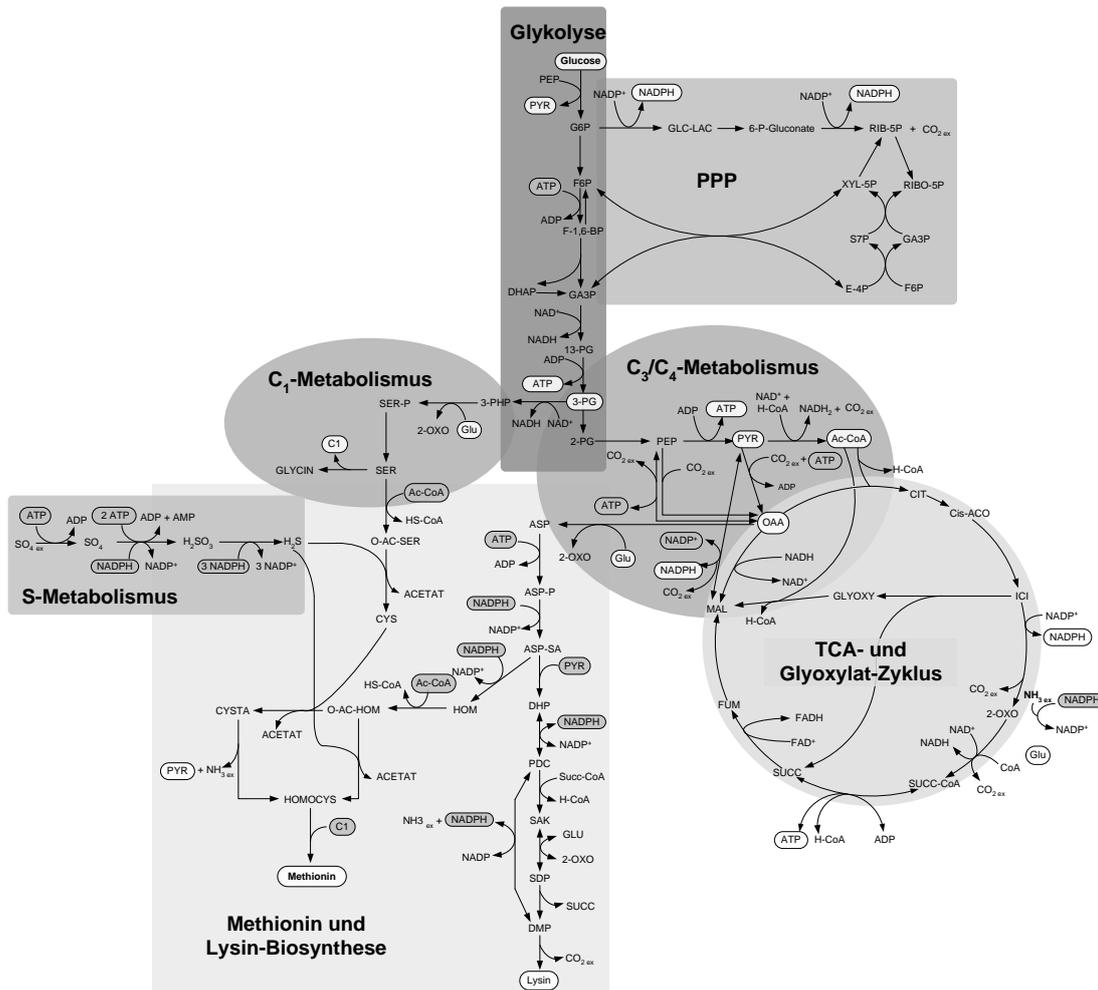
### 2.1 Zentralstoffwechsel

*C. glutamicum* verfügt über die Enzyme der Glykolyse, des Pentosephosphatweges, des TCA-Zyklus sowie des C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub>-Metabolismus zur Anaplerose bzw. Gluconeogenese (Abbildung II.2). Im Hinblick auf die Methioninbiosynthese dient der Zentralstoffwechsel der Bereitstellung von C<sub>4</sub>-Vorläufern in Form von Oxalacetat, von Serin für den C<sub>1</sub>-Metabolismus, von Acetyl-CoA zur Aktivierung von Homoserin und Serin, von Energie in Form von ATP bzw. GTP sowie von Reduktionsäquivalenten in Form von NADPH.

Die Zuckeraufnahme erfolgt in *C. glutamicum* durch Phosphoenolpyruvat-abhängige Phosphotransferasesysteme (PTS). Die eingeschleusten Zucker werden dabei phosphoryliert, wobei die Art der Phosphorylierung vom PTS-System abhängt (Parche et al., 2001). Glucose wird über den PTS<sup>Glc</sup>-Transporter als Glucose-6-Phosphat (G6P) in die Zelle aufgenommen (Sano et al., 1987; Yokota, 2005).

Die Glykolyse stellt 3-Phosphoglycerat (3-PG) zur Bildung von Serin bereit. Serin stellt die Verbindung zum C<sub>1</sub>-Stoffwechsel her, in welchem es die Methylgruppe für die Methioninsynthesen liefert. Zum anderen wird Serin zur Cysteinsynthese benötigt, welches über den Weg der Transsulfurierung in den Methioninstoffwechsel einfließen kann. Oxalacetat, der Vorläufer von Aspartat, wird vom TCA-Zyklus zur Verfügung gestellt. Dieser liefert außerdem  $\alpha$ -Ketoglutarat als Vorläufer von Glutamat, welches das zur Transaminierung notwendige Ammonium beisteuert. Zur Aktivierung der Zwischenstufen benötigt *C. glutamicum* bei der direkten Sulfurierung ein mol Acetyl-CoA und bei der Transsulfurierung zwei mol Acetyl-CoA pro mol Methionin (Hwang et al., 2002).

Glykolyse und TCA-Zyklus stellen außerdem (in Verbindung mit der oxidativen Phosphorylierung) Energie in Form von ATP und GTP bereit.



**Abb. II-2:** Überblick über Glykolyse, PPP, TCA-Zyklus, C<sub>1</sub>-, C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub>- Metabolismus sowie Methionin- und Lysinbiosynthese in *C. glutamicum*.

Eine besondere Stellung nimmt der C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub>-Metabolismus (Sauer, 2004) in der Synthese der Aminosäuren der Aspartat-Familie ein. So müssen die anaplerotischen (griechisch: auffüllende) Enzyme PEP- und Pyruvat-Carboxylase bei der Aminosäureproduktion OAA nachliefern, da sonst der TCA-Zyklus zum Erliegen käme. Die C<sub>4</sub>-decarboxylierenden Enzyme PEP-Carboxykinase, OAA-Decarboxylase und Malatenzym dienen dem Auffüllen des PEP- und Pyruvat-Pools.

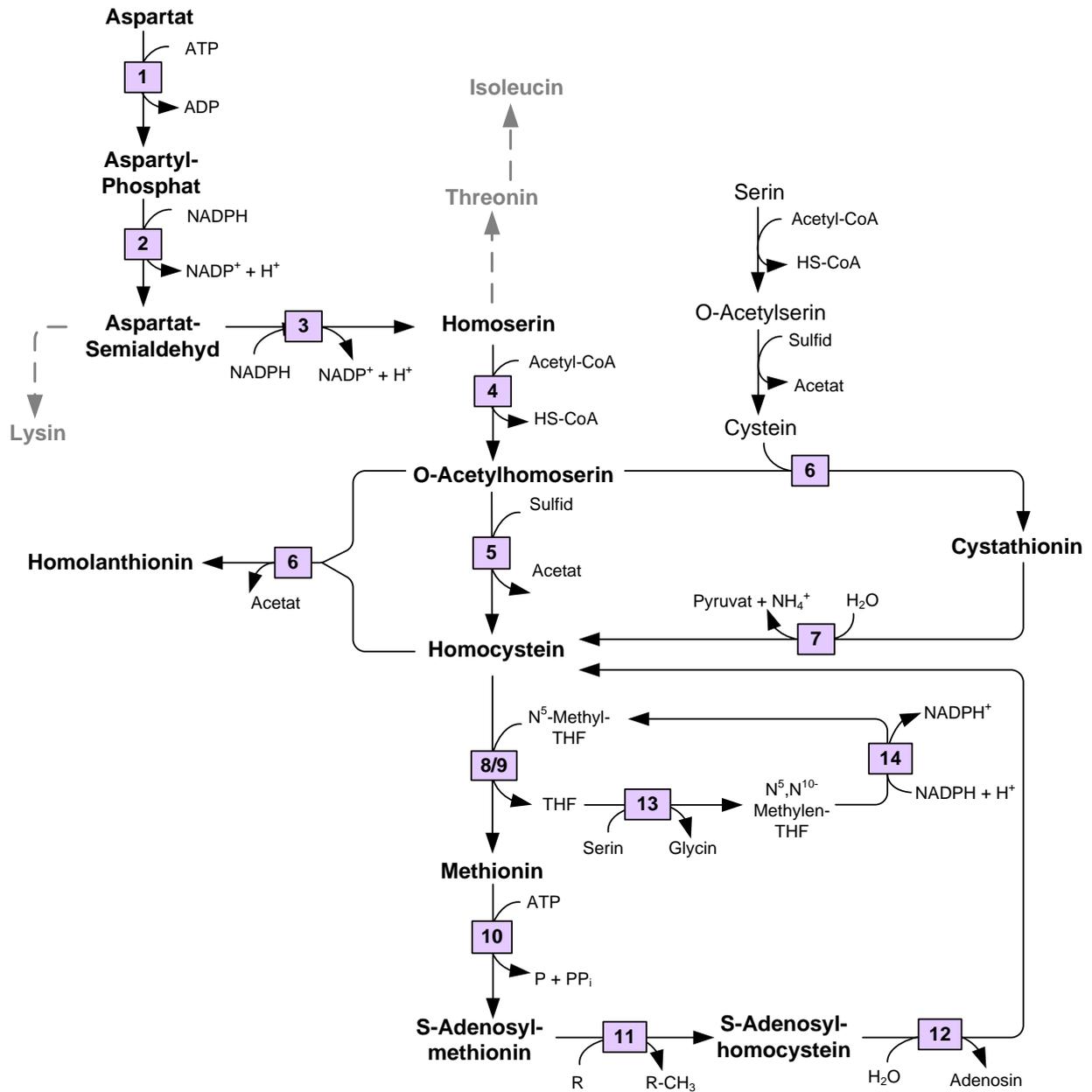
Die Bereitstellung von NADPH erfolgt durch den oxidativen Teil des Pentosphosphatwegs durch die beiden Enzyme Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase. Außerdem können das Malatenzym und die NADP<sup>+</sup>-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase des TCA-Zyklus zur NADPH-Bildung beitragen.

Die Biosynthese von Lysin erfordert äquimolare Mengen an Pyruvat und Oxalacetat. In *C. glutamicum* stehen zwei alternative Wege zur Lysinbiosynthese Verfügung, der Dehydrogenase-Weg oder der Succinylase-Weg (Schrumpf et al., 1991). Durch beide Wege wird D,L-Diaminopimelat (DMP) für die Zellwandsynthese bereitgestellt. Wird Lysin über den Succinylase-Weg statt über den Dehydrogenase-Weg gebildet, wird außerdem Succinyl-CoA zur Aktivierung benötigt. Die Lysinbiosynthese ist an einen hohen Bedarf an Reduktionsäquivalenten gekoppelt, wobei beide Synthesewege pro mol gebildetem Lysin 4 mol NADPH erfordern.

## 2.2 Biosynthese von Methionin

Methionin gehört wie Lysin, Isoleucin und Threonin zur Aspartat-Familie der Aminosäuren, welche ihr Kohlenstoffgerüst vom Oxalacetat, einem C<sub>4</sub>-Intermediat des TCA-Zyklus ableiten (Lee und Hwang, 2003). Zunächst ermöglicht die Aspartokinase (LysC, EC 2.7.2.4) unter ATP-Verbrauch die Phosphorylierung von Aspartat zu 4-Aspartyl-Phosphat. Die Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase (Asd, EC 1.2.1.11) katalysiert anschließend die Reaktion von 4-Aspartyl-Phosphat unter NADPH-Oxidation zu Aspartat-Semialdehyd und Phosphat. Aspartat-Semialdehyd wird durch die Homoserin-Dehydrogenase (HOM, EC 1.1.1.3) weiter zum Homoserin reduziert, wobei ein Molekül NADPH oxidiert wird. Homoserin ist der gemeinsame Vorläufer zur Isoleucin-, Threonin- und Methioninbiosynthese (Lee und Hwang, 2003). Alternativ kann Aspartat-Semialdehyd in den Lysinbiosyntheseweg eingehen. Aufgrund des großen Interesses an der Erzeugung eines Methionin-produzierenden Stammes wurden die ersten Enzyme des Methioninbiosyntheseweges in *C. glutamicum* bereits vor mehr als 25 Jahren biochemisch charakterisiert (Kase und Nakayama, 1974a; Kase und Nakayama, 1974b; Ozaki und Shiio, 1982). In den letzten Jahren konnten auch die dazugehörigen Gene identifiziert werden (Hwang et al., 1999; Hwang et al., 2002; Kim et al., 2001; Park et al., 1998; Rossol und Pühler, 1992). Der erste spezifische Schritt der Methioninsynthese besteht in der Acetylierung von Homoserin durch die Homoserin-Acetyltransferase (MetX, EC 2.3.1.31) unter Verwendung von Acetyl-CoA (Park et al., 1998). Andere Organismen wie *E. coli* nutzen die Succinylierung von Homoserin (Born und Blanchard, 1999). Von hier aus führen zwei verschiedene Wege zum Homocystein (Hwang et al., 2002). Bei der direkten Sulfurierung bildet die O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase (MetY, EC 2.5.1.49) unter Einbau von Sulfid und Abspaltung von Acetat Homocystein. Die Transsulfurierung hingegen verläuft über die Bildung von Cystathionin, einer Diaminosäure aus Cystein und

O-Acetylhomoserin, durch die Cystathionin- $\gamma$ -Synthase (MetB, EC 2.5.1.48). Diese kann des Weiteren die Bildung des erst kürzlich entdeckten Metaboliten Homolanthionin aus O-Acetylhomoserin und Homocystein katalysieren (Hwang et al., 1999; Krömer et al., 2006a). Die hydrolytische Spaltung von Cystathionin durch die Cystathionin- $\beta$ -C-S-Lyase (AecD/MetC), EC 4.1.1.8) führt zum Homocystein, dem direkten Vorläufer von Methionin (Rossol und Pühler, 1992). Die Funktion dieser beiden alternativen Wege ist bisher nicht eindeutig geklärt, jedoch könnten sie eine Rolle beim Ausgleich des intrazellulären Methionin- und Cysteinpools spielen. Im letzten Schritt wird Homocystein durch eine Vitamin B<sub>12</sub>-unabhängige (MetE, EC 2.1.1.14) und eine Vitamin B<sub>12</sub>-abhängige (MetH, EC 2.1.1.13) Methioninsynthase zu Methionin methyliert und es entsteht Methionin (Rückert et al., 2003). Die Methioninsynthase steht in enger Verbindung zum C<sub>1</sub>-Metabolismus, da dieser die notwendige Methylgruppe bereitstellt. Hierbei wird zunächst durch die Serin-Hydroxymethyltransferase (GlyA, EC 2.1.2.1) eine Methylen-Gruppe von Serin auf Tetrahydrofolat (THF) übertragen (Simic et al., 2002), wodurch Glycin und N<sup>5,10</sup>-Methylen-THF gebildet wird. Dieses wird anschließend durch die N<sup>5,10</sup>-Methylen-THF-Reduktase (MetF, EC 1.5.1.20) reduziert (Rückert et al., 2003). Folglich wird pro Methionin ein Molekül Serin verbraucht und ein Molekül Glycin gebildet. Ein zusätzlicher Schritt, die Umwandlung von Methionin zu S-Adenosylmethionin (SAM), wird durch die SAM-Synthase (MetK, EC 2.5.1.6) katalysiert. SAM ist der universelle Methylgruppendonor der Zelle und wird unter anderem zur Methylierung der DNA durch die Cytosin-5-Methyltransferase (EC 2.1.1.37) benötigt (Schafer et al., 1997). Das Produkt dieser Transmethylierungsreaktion ist S-Adenosylhomocystein, welches wieder durch die S-Adenosylhomocystein Hydrolase (EC 3.3.1.1) zum Homocystein recycelt werden kann (Rey et al., 2005). Die Produktion von Methionin erfordert das Vorhandensein entsprechender Exportsysteme. Als Hauptexportsystem für Methionin konnte BrnFE, welches ebenfalls Isoleucin transportiert, identifiziert werden, jedoch existiert noch ein zweites Exportsystem mit niedriger Affinität, aber hoher Kapazität (Trotschel et al., 2005). Abbildung II-3 zeigt eine Übersicht über den Methioninstoffwechsel in *C. glutamicum*.

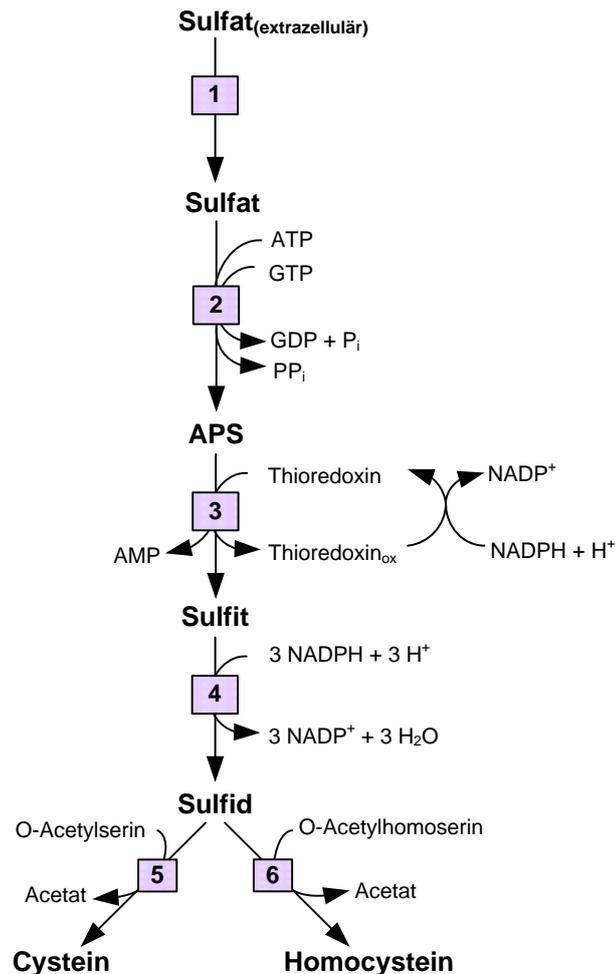


**Abb. II-3:** Übersicht über die Methioninbiosynthese in *C. glutamicum*. Beteiligte Enzyme: Aspartokinase LysC (1), Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase (2), Homoserin-Dehydrogenase Hom (3), Homoserin-Acetyltransferase MetX (4), O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase MetY (5), Cystathionin- $\gamma$ -Synthase MetB (6), Cystathionin- $\beta$ -Lyase AecD/MetC (7), Vitamin B<sub>12</sub>-unabhängige Methioninsynthase MetE (8), Vitamin B<sub>12</sub>-abhängige Methioninsynthase MetH (9), S-Adenosylmethionin-Synthase MetK (10), SAM-abhängige Methyltransferase (11), S-Adenosylhomocystein Hydrolase (12), Serin-Hydroxymethyltransferase GlyA (13), N<sup>5</sup>,<sup>10</sup>-Methylen-THF-Reduktase MetF (14).

### 2.3 Schwefelstoffwechsel

Schwefel gehört zu den fünf Makroelementen, die in allen Organismen dieser Erde zu finden sind. Neben den schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein ist er Bestandteil von Eisen-Schwefel-Proteinen, Coenzym A, Fettsäuren, Mycothiol, Thiamin und verschiedenen anderen zellulären Komponenten. Aufgrund seiner chemischen Eigenschaft, leicht oxidiert und reduziert zu werden, stellt er einen idealen Kandidaten zum Transfer von Elektronen dar und ist daher meist im reaktiven Teil eines Moleküls zu finden. *C. glutamicum* kann eine große Bandbreite an organischen Schwefelquellen wie Sulfonate und Sulfonat-Ester, welche im Boden die Hauptquelle an verfügbaren schwefelhaltigen Verbindungen darstellen, verwerten. Die beiden Gencluster *ssuDICBA* und *ssuI-seuABC-ssuD2* zur Sulfonat-Nutzung konnten im Genom von *C. glutamicum* identifiziert werden (Koch et al., 2005). Ebenso ist *C. glutamicum* dazu in der Lage, auf anorganischen Schwefelquellen wie Sulfat, Sulfit, Sulfid und Thiosulfat, zu wachsen. Wie im Fall der Verwertung von organischen Schwefelverbindungen basieren auch die Modelle zur Assimilation anorganischer Schwefelverbindungen auf Genomdaten (Rückert et al., 2005). Die Gene zur assimilatorischen Sulfatreduktion liegen im Genom von *C. glutamicum* im sogenannten *fpr2cysIXHDNYZ*-Cluster vor (Rückert et al., 2005). Die Aufnahme von Sulfat geschieht in *C. glutamicum* höchst wahrscheinlich durch die Permease CysZ anstatt durch einen ABC-Transporter wie SbpCysPTWA in *E. coli* (Sirko et al., 1990). Jedoch scheint es mindestens noch einen zweiten Transporter mit geringerer Affinität zu geben, da das Wachstum einer  $\Delta$ *cysZ*-Mutante mit steigender Sulfat-Konzentration wieder hergestellt werden konnte. Dieser scheint nicht mit den *cys*-Genen in einem Cluster vorzuliegen und konnte bisher nicht identifiziert werden. Die nachfolgende Reduktion von Sulfat zu Sulfid benötigt in *C. glutamicum* im Gegensatz zu *E. coli* sehr wahrscheinlich nur zwei Schritte. Sulfat wird zunächst durch Adenylierung mittels ATP durch die Sulfat-Adenylyltransferase (CysD, CysN, EC 2.7.7.4) zu Adenosin-5'-Phosphosulfat (APS) umgesetzt. Die Synthese von APS ist energetisch gekoppelt mit der Hydrolyse von GTP. Die anschließende Reduktion von APS zu Sulfit erfolgt in *C. glutamicum* wahrscheinlich in einem Schritt durch die APS-Reduktase (CysH, EC 1.8.4.10). Diese Reaktion ist Thioredoxin-abhängig und verbraucht NADPH. Im Gegensatz hierzu wird in *E. coli* APS zunächst unter ATP-Verbrauch zu 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat (PAPS) phosphoryliert und erst anschließend zu Sulfit reduziert (Sekowska et al., 2000). *C. glutamicum* kann folglich pro mol Sulfat ein mol ATP im Vergleich zu *E. coli* einsparen. Die Reduktion von Sulfit zu Sulfid weist die größten Unterschiede

zwischen den beiden Modellorganismen auf. In *C. glutamicum* fehlt die Flavoprotein-Untereinheit CysJ (EC 1.8.1.2) von *E. coli* und *B. subtilis* (Ostrowski et al., 1989; van der Ploeg et al., 2001), was zu der Frage führt, auf welche Art und Weise Sulfit reduziert wird. Da die putative Häm-Untereinheit CysI (EC 1.7.7.1) eine höhere Ähnlichkeit zu Ferredoxin-abhängigen Nitrit- und Sulfit-Reduktasen aus Pflanzen als zu CysI-Proteinen aus *E. coli* oder *B. subtilis* aufweist, ähnelt die Sulfit-Reduktion in *C. glutamicum* wahrscheinlich der in Pflanzen. Diese Hypothese wird durch die Anwesenheit zweier NADP<sup>+</sup>-Ferredoxin-Reduktasen (Fpr1 und Fpr2) sowie des Ferredoxin-ähnlichen Proteins CysX unterstützt. Zusammen können diese Komponenten CysJ aller Wahrscheinlichkeit nach funktionell ersetzen. Des Weiteren könnten die Gene *cysH* und *cysY* für Proteine kodieren, die an der Sirohäm-Biosynthese beteiligt sind, welches einen essentiellen Cofaktor der Sulfit-Reduktase darstellt (Rückert et al., 2005). Insgesamt geht die Reduktion von Sulfit zu Sulfid mit der Oxidation von drei Molekülen NADPH einher. Sulfid wird anschließend durch spezifische Sulfhydrylasen in Cystein und Homocystein eingebaut (Abbildung II-4).



**Abb. II-4:** Assimilatorische Sulfatreduktion in *C. glutamicum*. Beteiligte Enzyme: Permease CysZ (1), Sulfat-Adenylyltransferase CysD, CysN (2), APS-Reduktase CysH (3), Sulfit-Reduktase CysI zusammen mit den  $\text{NADP}^+$ -Ferredoxin-Reduktasen Fpr1 und Fpr2 und dem Ferredoxin-ähnlichen Protein CysX (4), O-Acetylserin-Sulphydrylase (CysK) (5), O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase MetY (6).

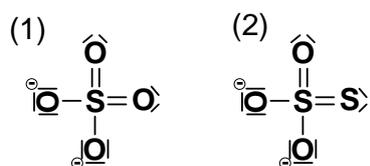
## 2.4 Regulation der Methioninbiosynthese und des Schwefelstoffwechsels

Die Methioninbiosynthese unterliegt einer strikten Regulation auf verschiedenen Ebenen. Die meisten Enzyme der Methioninbiosynthese werden durch Feedback-Inhibierung kontrolliert (Lee, 2005) wie etwa die Homoserin-Dehydrogenase (durch Threonin), die Homoserin-Acetyltransferase (Methionin, SAM, O-Acetylhomoserin), die Cystathionin- $\gamma$ -Synthase (SAM), die Cystathionin  $\beta$ -C-S-Lyase (Methionin, Cystein, Glycin) und die O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase (Methionin, O-Acetylserin). Von großer Bedeutung ist neben der Regulation auf enzymatischer Ebene die transkriptionelle Regulation. Die Deletion des 27,3 kDa großen Transkriptionsregulators McbR (**M**ethionine and **c**ysteine biosynthesis **R**egulator) führte bei 86 Genen zu einem erhöhten Expressionslevel und zu

einer verminderten Expression von 51 Genen. Die stärker exprimierte Gene waren vor allem am Transport und Metabolismus von schwefelhaltigen zellulären Komponenten beteiligt. Dazu gehörten die Gene *hom*, *metX*, *metY*, *metE*, *metH*, *metK*, *cysK* sowie die Gene der assimilatorischen Sulfatreduktion. Dies zeigt, dass die Zelle die Menge an reduziertem Schwefel strikt regulieren muss, da die meisten dieser Komponenten giftig sind. Zusätzlich fand man eine unterschiedliche Expression von Genen, die möglicherweise für Transkriptionsregulatoren kodieren, was auf eine hierarchische Netzwerkstruktur hindeutet (Rey et al., 2005; Rey et al., 2003). Als Effektorsubstanz zur Modulation der Funktion von McbR konnte S-Adenosylhomocystein identifiziert werden, welches die Bindung von McbR an seine DNA-Zielsequenz verhindert. Dadurch kommt es zur Induktion der Expression von Genen, die dem McbR-Regulon angehören. Dieser Regulationsmechanismus gewährleistet eine angemessene Verfügbarkeit von SAM, die unerlässlich zum optimalen Wachstum von Mikroorganismen ist (Rey et al., 2005).

### 3. Thiosulfat als alternative Schwefelquelle

Wie aus dem vorangegangenen Abschnitt deutlich wurde, ist der Schwefelstoffwechsel in *C. glutamicum* bislang nur unzureichend charakterisiert. Die verwendeten Modelle beruhen auf Genomdaten und es liegen kaum enzymatische Untersuchungen vor. Die übliche Schwefelquelle ist Sulfat, das von der Zelle aufgenommen, aktiviert und reduziert werden muss, was insgesamt 3 mol NADPH pro mol Methionin verbraucht. Elementarmodenanalysen zeigten, dass im Einsatz stärker reduzierter Schwefelverbindungen ein hohes Potential zur Steigerung der Ausbeuten in einem zukünftigen Methioninproduktionsprozess liegt. Eine solche alternative Schwefelquelle könnte Thiosulfat darstellen (Krömer et al., 2006b). Natriumthiosulfat ist durch Einrühren von Schwefel in kochende Natriumsulfidlösung unter leichtem Druck sehr einfach herzustellen und wird in der Papierindustrie zum Entfernen von Chlor verwendet. In der Photographie findet es seinen Einsatz als Fixiersalz. Die Struktur des Thiosulfats ähnelt der des Sulfats, wobei eines der Sauerstoffatome durch ein Schwefelatom ersetzt ist (Abbildung II-5).



**Abb. II-5:** Struktur des Sulfat- (1) und des Thiosulfat-Anions (2).

Die beiden Schwefelatome des Thiosulfats sind chemisch nicht äquivalent. Unter Annahme einer S-S-Doppelbindung kommt dem äußeren Sulfan-Schwefelatom eine Oxidationsstufe von 0 und dem inneren Sulfonat-Schwefelatom die Oxidationsstufe +IV zu. Eine Nutzung des bereits stärker reduzierten Sulfan-Schwefelatoms zum Einbau in die schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein könnte den Energieaufwand, der für deren Synthese notwendig ist, deutlich verringern. Die Verwertung von Thiosulfat in *C. glutamicum* ist allerdings nicht bekannt. Da eine Mutante mit Deletion der Sulfat-Permease CysZ auf Thiosulfat wachsen konnte, muss es für Thiosulfat ein anderes Transportsystem geben. Rückert et al. zeigten außerdem, dass das Wachstum auf Thiosulfat vor allem von der Sulfit-Reduktase und in geringerem Maße von der Sulfat-Adenyltransferase und APS-Reduktase abhängt (Rückert et al., 2005). Daher wurde die Vermutung aufgestellt, dass Thiosulfat auf irgendeine Art und Weise zu Sulfit gespalten und anschließend zu Sulfid reduziert wird. Außerdem wurde spekuliert, dass eine Thiosulfat-Sulfurtransferase am Thiosulfatabbau beteiligt sein könnte. Eine S-Sulfocysteinsynthase-Funktion zur Verwertung von Thiosulfat wie in *E. coli* wurde ausgeschlossen (Rückert, 2008), jedoch lagen hierzu keine näheren Untersuchungen vor. Die großen Unklarheiten bezüglich des Thiosulfat-Metabolismus in *C. glutamicum* sowie der potentielle industrielle Einsatz dieser Schwefelquelle zur Methioninproduktion erfordern daher weitere Analysen, die in dieser Arbeit durchgeführt werden sollten.

#### **4. Bisherige Fortschritte zur Erzeugung eines Methioninproduzenten von *C. glutamicum***

Die Erzeugung eines Methioninproduzenten ist aufgrund der starken Vernetzung und komplexen Regulation dieses Stoffwechselweges mit großen Herausforderungen verbunden, was zumindest teilweise die Frage beantwortet, weshalb bisher kein Produktionsprozess existiert. Aufgrund des großen wirtschaftlichen Interesses an der Herstellung von Methionin wurden in der Vergangenheit eine Vielzahl von Studien zur Methioninproduktion in *E. coli* (Nakamori et al., 1999), *S. cerevisiae* (Brigidi et al., 1988), und in *C. glutamicum* zur Entwicklung eines biotechnologischen Methioninproduktionsverfahren durchgeführt. Die Mehrzahl dieser Studien beruhte auf der Anwendung klassischer Mutagenese-Techniken zur Isolation von Mutanten mit veränderten regulatorischen Eigenschaften. So konnte eine Mutante von *Corynebacterium lilium* erzeugt werden, die eine Resistenz gegen verschiedene Methionin-Analoga wie Ethionin, Norleucin, Methionin-Sulfoxid und Methylmethionin aufwies und die 3,39 g/l

Methionin produzierte, wenn zusätzlich Cystein supplementiert wurde (Kumar et al., 2003). Neben der konventionellen Herangehensweise gab es auch erste Versuche mit Hilfe von *Genetic Engineering* gezielt Produktionsstämme von *C. glutamicum* herzustellen.

Die hierbei verfolgten Ansätze konzentrierten sich bislang darauf, die an der Biosynthese von Methionin und anderer schwefelhaltiger Verbindungen beteiligten Gene zu identifizieren und dann durch Überexpression oder Repression die Produktion an Methionin zu erhöhen. So erzeugten Park et. al (2007) basierend auf *C. glutamicum MH20-22B* (einem Lysin-Produzenten mit deregulierter Aspartokinase) einen Methioninproduzenten mit deregulierter Homoserin-Dehydrogenase und deletierter Threonin-Biosynthese. Die so erhaltenen Methioninausbeuten von 2,9 g/l waren allerdings weit entfernt von der wirtschaftlichen Nutzbarkeit.

Die Deletion von *McbR*, einem zentralen Regulationselement der Methioninsynthese, wurde zunächst als erster Schritt zur rationalen Erzeugung eines Methioninproduzenten angesehen (Rey et al., 2005; Rey et al., 2003). Jedoch produzierte die  $\Delta mcbR$ -Mutante kein Methionin, sondern wies eine starke intrazelluläre Akkumulation von Homolanthionin sowie eine erhöhte Homocystein-Konzentration auf (Krömer et al., 2006a). Die Bildung von Homolanthionin durch eine Nebenreaktion der Cystathionin- $\gamma$ -Synthase (*MetB*) könnte zur Vermeidung einer noch weiteren Akkumulation von Homocystein dienen. Hohe Homocystein-Konzentrationen führen im menschlichen Plasma zur Homocysteinylierung von Proteinen und stehen im Zusammenhang mit Gefäßerkrankungen (Jakubowski, 1999). Außerdem konnte ein erhöhter oxidativer Stress in der Mutante beobachtet werden. So standen etwa 40 der hochregulierten Enzyme in der Mutante mit oxidativem Stress in Verbindung. Dies spiegelte sich unter anderem in einem apparenten Überschuss an NADPH zur Bekämpfung des oxidativen Stresses wider. Durch Deletion der Cystathionin- $\gamma$ -Synthase in  $\Delta mcbR$  konnte zwar die Bildung von Homolanthionin verhindert werden, dennoch zeigte sich weder eine Sekretion von Methionin noch ein Anstieg im intrazellulären Methioninpool. Eine mögliche Limitierung in der  $\Delta mcbR$ -Mutante könnte daher die Verfügbarkeit von Serin als  $C_1$ -Vorläufer zur Bereitstellung der Methylgruppe im letzten Schritt der Methioninsynthese darstellen. Die Fütterung von Serin führte zwar zum Anstieg der intrazellulären Methioninkonzentration, dennoch musste es noch weitere Faktoren geben, weshalb die  $\Delta mcbR$ -Mutante kein Methionin produzierte. Eine Limitierung des Exports wurde jedoch ausgeschlossen, da sonst deutlich höhere intrazelluläre Methionin-Konzentrationen zu erwarten gewesen wären (Krömer et al., 2008).

Die Untersuchungen an der  $\Delta mcbR$ -Mutante zeigten insgesamt, dass dieser Stamm aufgrund der vielen unspezifischen Sekundäreffekte eher ungünstig für die Methioninproduktion ist. Gleichzeitig konnte jedoch beobachtet werden, dass sehr viel Kohlenstoff zum Homocystein geleitet und sehr viel NADPH zur Homolanthioninsynthese aufgewendet werden kann. Dies unterstreicht das hohe Potential von *C. glutamicum* zur Methioninproduktion. Umso mehr wird allerdings die hohe Relevanz der Entwicklung alternativer Methoden zur gezielten Identifikation von Ansatzpunkten zur Erzeugung eines Methioninproduzenten deutlich.

## 5. Elementarmodenanalyse

Im Zuge der rationalen Stammoptimierung wurden in den letzten Jahren unterschiedliche Algorithmen entwickelt (Papin et al., 2004; Schilling et al., 1999; Schuster et al., 1999), um komplexe Stoffwechselnetzwerke mathematisch zu analysieren. Diese Analysen, auch bekannt als Elementarmodenanalysen (*elementary mode analysis*), erlauben die theoretische Analyse metabolischer Netzwerke und ermöglichen es, eine Verbindung zwischen dem Phänotyp und dem Genotyp einer Zelle zu schaffen. Erste Elementarmodenanalysen zur Methioninproduktion mit *C. glutamicum* wurden von Krömer et. al (2006b) durchgeführt. Diese *in silico* Analyse erlaubte die Berechnung der theoretischen maximalen Methioninausbeute auf unterschiedlichen Kohlenstoff- und Schwefelquellen und ermöglichte die Quantifizierung der Effekte genetischer Modifikationen auf die Produktausbeute. Außerdem wurde ein Vergleich des Potentials von *E. coli* und *C. glutamicum* als Methioninproduzenten durchgeführt. Diese Ergebnisse konnten dazu genutzt werden, erste Kostenrechnungen und Prozesssimulationen durchzuführen und zeigten, dass ein biotechnologischer Methionin-Prozess mit *C. glutamicum* durchaus mit den existierenden chemischen Verfahren konkurrieren könnte.

Die Durchführung einer Elementarmodenanalyse erfordert die Definition von internen und externen Metaboliten sowie der Enzymreaktionen, die diese miteinander verbinden. Metabolite werden als extern bzw. intern definiert, je nachdem, ob sie die *steady-state*-Bedingung erfüllen oder nicht. Für jeden internen bzw. bilanzierbaren Metaboliten entspricht seine Produktionsrate seiner Verbrauchsrate. Im Gegensatz hierzu erfüllen externe Metabolite, auch „Pool-Metabolite“ genannt, diese Bedingung nicht. Externe Metabolite sind Substrate, Abfallprodukte, Speicherstoffe oder sekretierte Produkte. Des Weiteren muss die Reversibilität einer Reaktion berücksichtigt werden. Bei der Elementarmodenanalyse werden somit die Stöchiometrie und Topologie eines

metabolischen Netzwerkes mit thermodynamischen Informationen, die das Gleichgewicht von Reaktionen beschreiben, gekoppelt. Kinetische Parameter, die oftmals nicht bekannt sind, müssen nicht einbezogen werden.

Aus diesen Informationen wird nun mit Hilfe eines Algorithmus eine stöchiometrische Matrix erstellt, in welcher die einzelnen Elementarmoden enthalten sind. Die stöchiometrische Matrix gibt dabei die einzelnen Reaktionen sowie die stöchiometrischen Koeffizienten der an einem Elementarmodus beteiligten Metabolite an. Unter einem Elementarmodus oder *elementary mode* versteht man eine minimale Ausstattung an Enzymen, die unter *steady-state*-Bedingungen eine funktionelle Einheit bilden, wobei jede Reaktion nur in einer Richtung ablaufen darf. Wird eines der Enzyme dieser funktionellen Einheit blockiert, ist dieser Elementarmodus nicht mehr möglich. Die Elementarmodenanalyse erlaubt also die Beschreibung aller, nicht weiter zerlegbarer *steady-state* Flussverteilungen, die in einem gegebenen Netzwerk möglich sind. Für jeden einzelnen dieser Elementarmoden lassen sich die Ausbeuten des gewünschten Produktes berechnen, wodurch möglichst effiziente Stoffwechselwege identifiziert werden können. Bei der Interpretation von Elementarmoden ist prinzipiell zu beachten, dass diese ideale Situationen darstellen, die rein auf stöchiometrischen, topologischen und thermodynamischen Informationen beruhen. Die Gesamtheit der Elementarmoden umspannt sozusagen das biochemische Potential eines Organismus. Aufgrund kinetischer oder regulatorischer Faktoren ergibt sich die tatsächliche Flussverteilung einer Zelle allerdings meist aus einer Überlagerung mehrerer Elementarmoden. Der Metabolismus kann daher als eine gewichtete Überlagerung aller Moden, die durch das Netzwerk ermöglicht werden, gesehen werden. Dennoch können kinetische und regulatorische Faktoren nur Flussverteilungen ermöglichen, die aufgrund der Elementarmoden angelegt sind. Durch genetische Manipulationen sollte es daher möglich sein, diese Flussverteilungen so zu beeinflussen, dass Moden mit verbesserten Produktausbeuten genutzt werden können (Schuster et al., 2000).

Eine erfolgreiche Anwendung dieser Art von stöchiometrischem Design wurde beispielsweise für *E. coli* durchgeführt. Hier wurden die Kenntnisse des metabolischen Netzwerkes genutzt, um die effizientesten Wege zur optimalen Zellausbeute bzw. Ethanolausbeute bei bestimmten Umgebungsbedingungen zu identifizieren. Anschließend wurden ineffiziente Wege durch die Einführung von Gendelektionen ausgeschaltet (Carlson und Srienc, 2004; Trinh et al., 2006; Trinh et al., 2008a). In beiden Fällen zeigten die experimentell gefundenen Daten eine große Übereinstimmung mit den theoretischen

Vorhersagen. Es lässt sich unschwer vermuten, dass der durch die Gendelektionen hervorgerufene Selektionsdruck dafür verantwortlich ist. Eine genomweite Analyse zur Produktion von Polyhydroxybuttersäure in *Saccharomyces cerevisiae* wurde von Carlson et. al (2002) durchgeführt, um maximal mögliche Ausbeuten auf verschiedenen Substraten zu berechnen. Die Vorhersage von Phänotypen auf der Basis von Netzwerkanalysen birgt daher ein unschätzbare Potential für die Optimierung metabolischer Systeme.

## 6. Grundlagen zur Stammkonstruktion von *C. glutamicum*

Ein großer Nachteil der klassischen Stammoptimierung durch Zufallsmutagenese und Selektion besteht darin, dass dieses Verfahren keine genauen Kenntnisse über die physiologischen und genetischen Veränderungen in den erhaltenen Produktionsstämmen liefert (Sahm et al., 2000). Des Weiteren führt es oft zur Akkumulation unerwünschter Nebenmutationen, die sich negativ auf die Physiologie des Stammes auswirken können (Ohnishi et al., 2002). Auch lassen sich günstige Mutationen nicht kombinieren. Erst die Entschlüsselung des Genoms von *C. glutamicum* im Jahre 2003 (Kalinowski et al., 2003) und die Entwicklung robuster Methoden zur genetischen Manipulation (Kirchner und Tauch, 2003; Vertes et al., 2005) machten es möglich, bestimmte Gene gezielt auszuschalten, zu amplifizieren oder heterologe Gene und regulatorische Elemente einzubringen. Hierdurch eröffnete sich ein breites Spektrum zur Erzeugung von effizienten Produktionsstämmen. Eine Möglichkeit, stabile genetische Veränderungen in *C. glutamicum* zu erzeugen, ohne durch Antibiotika einen ständigen Selektionsdruck aufrechterhalten zu müssen, besteht in der Nutzung des Mechanismus der homologen Rekombination (Kirchner und Tauch, 2003).

Hierzu wird zunächst mittels SOE-PCR das gewünschte Konstrukt, welches über einen Bereich von ca. 500-1000 bp Homologie zu einem DNA-Abschnitt von *C. glutamicum* aufweisen sollte, erzeugt. Dieses wird anschließend in den integrativen Vektor pClik-int-sacB ligiert, welcher einen Replikationsursprung (*origin of replication*, ORI) für *E. coli*, nicht aber für *C. glutamicum* aufweist. Dieser wird in *E. coli* amplifiziert und mit Hilfe des pTC-Plasmids, das ein für *C. glutamicum* spezifisches Methylase-Gen trägt, methyliert. Da *C. glutamicum* DNA mit einem fremden Methylierungsmuster effizient degradieren kann (Bonamy et al., 2003; Bonnassie et al., 1990; Tzvetkov et al., 2003), trägt dies zur deutlichen Steigerung der Transformationseffizienz bei. Nach Reisolation der Plasmid-DNA aus *E. coli* kann diese zur Transformation von *C. glutamicum* durch Elektroporation (Tzvetkov et al., 2003) eingesetzt werden. Das Fehlen eines Replikationsursprunges für *C.*

*glutamicum* gewährleistet, dass nur Kolonien mit im Genom integriertem Plasmid wachsen können und die durch das Plasmid vermittelte Kanamycin-Resistenz (Kan<sup>R</sup>) aufweisen. Folglich können solche Klone auf Kanamycin-haltigen Agarplatten selektioniert werden. Die Überprüfung der 1. Rekombination erfolgt mittels PCR, in der sowohl das Wildtyp-Gen als auch das mutierte Gen nachweisbar sein sollten. Die nun folgende 2. Rekombination soll dazu führen, dass das Wildtyp-Gen durch das mutierte Gen mittels homologer Rekombination ersetzt wird. Die 2. Rekombination ist ein zufälliges Ereignis und kann zu zwei möglichen Ergebnissen führen:

- zu Wildtypzellen, bei denen der gesamte Vektor wieder entfernt wurde,
- zu Mutanten, bei denen das Wildtypgen und die nicht erwünschten Anteile des Vektors entfernt wurden.

Die Selektion der Klone nach der 2. Rekombination erfolgt auf CM<sup>Sac</sup>-Medium mit einem Anteil von 10 % Saccharose. Neben Kan<sup>R</sup> besitzt der Vektor den Selektionsmarker *sacB*. Dieser kodiert für das Enzym Levansucrase, das Saccharose abbaut, wobei toxische Levane entstehen, die für *C. glutamicum* letal sind (Jager et al., 1992). Zellen, die das *sacB*-Gen noch besitzen, können daher auf diesem Medium nicht wachsen. Allerdings kann es vorkommen, dass das *sacB*-Gen durch Insertionselemente inaktiviert wird. Solche Levansucrase-Revertanten lassen sich aufgrund ihrer Kanamycin-Resistenz identifizieren. Die Unterscheidung von Wildtyp und Mutante erfolgt mittels PCR. Positiv getestete Klone werden anschließend phänotypisch etwa durch Enzymtests oder Wachstumsversuche validiert. Abbildung II.6 zeigt einen Überblick über den Verlauf der Stammkonstruktion in *C. glutamicum*.

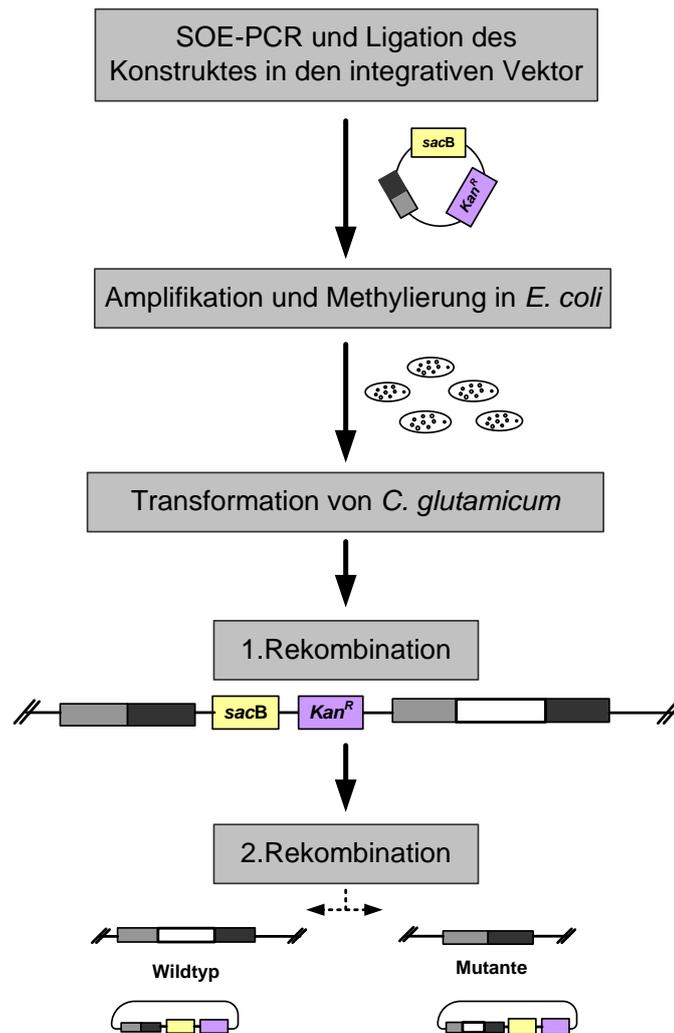
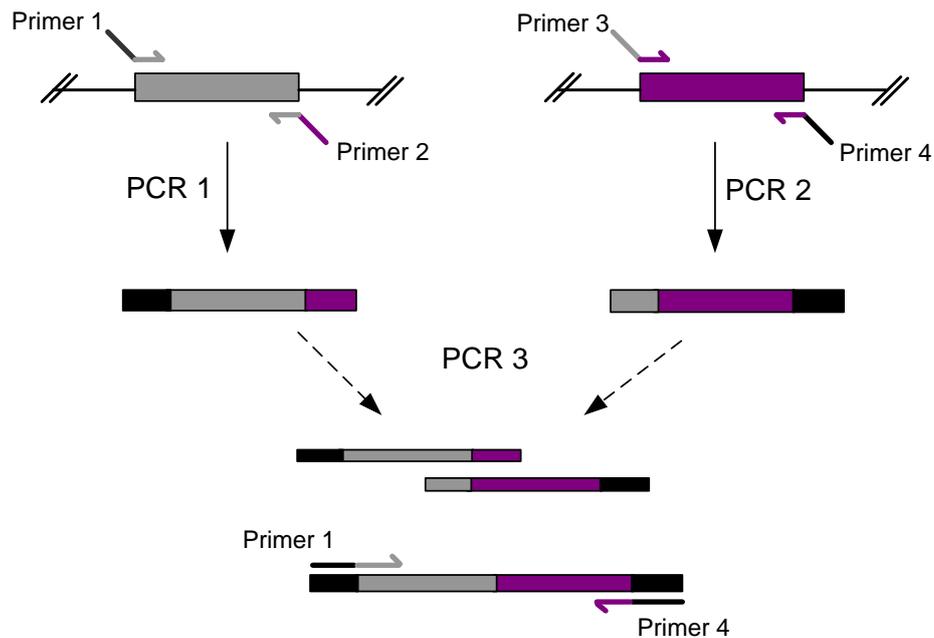


Abb. II-6: Übersicht über den Verlauf der Stammkonstruktion von *C. glutamicum*.

### 6.1 Konstrukterzeugung mittels SOE-PCR

Die SOE-PCR (Gene Splicing by Overlap Extension) stellt eine einfache Methode zur Erzeugung von DNA-Hybridmolekülen dar (Ho et al., 1989). Mit ihr können zwei voneinander unabhängige DNA-Bereiche zusammengefügt werden, was diese Methode vielseitig einsetzbar macht. Beispielsweise lassen sich Gene deletieren oder mit Punktmutationen versehen. Des Weiteren können sie mit einem anderen Promotor zur Variation der Expressionsstärke ausgestattet werden. Ebenso lassen sich Fremdgene heterolog exprimieren. Die genetische Veränderung wird dabei durch die Verwendung modifizierter Primer erzeugt, was in Abbildung II-7 gezeigt ist.

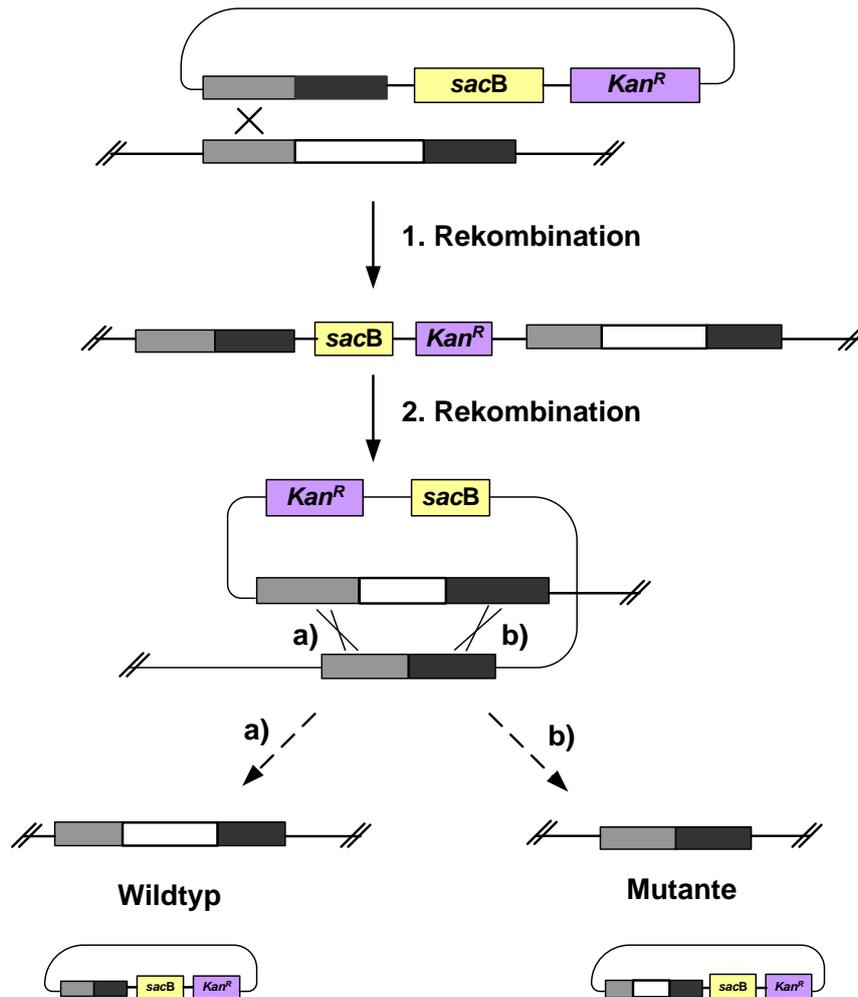


**Abb. II-7:** SOE-PCR zur Verbindung zweier getrennt liegender DNA-Abschnitte.

Durch Fusions-Primer (Primer 2 und 3), die über einen Bereich von etwa 18 bp komplementär sind wird die spätere Fusion der beiden DNA-Bereiche ermöglicht. Die Außenprimer (Primer 1 und 4) werden mit Restriktionsschnittstellen für die spätere Klonierung versehen. Im ersten Schritt werden zwei getrennte PCR-Reaktionen durchgeführt, in denen die zu fusionierenden DNA-Abschnitte amplifiziert werden. Das Ergebnis dieser ersten Reaktionen sind zwei DNA-Sequenzen, die an der Position der Fusions-Primer überlappen. Diese beiden Fragmente werden dann zur Fusion in einer dritten PCR mit den beiden Außenprimern eingesetzt.

## 6.2 Homologe Rekombination

Zur stabilen genetischen Modifikation wird ein vorhandener DNA-Abschnitt durch einen anderen DNA-Abschnitt mittels homologer Rekombination ersetzt. Hierbei muss der neu einzubringende DNA-Abschnitt über einen Abschnitt von ca. 500-100 bp homolog zu dem zu ersetzenden Abschnitt sein. In Abbildung II-8 sind die beiden zur Stammkonstruktion notwendigen Rekombinationsereignisse dargestellt.



**Abb. II-8:** Schematische Darstellung der homologen Rekombination zur Erzeugung stabiler genetischer Modifikationen mit Hilfe des Vektors pClik-int-sacB in *C. glutamicum*.

## 7. Grundlagen zur Metabolischen Flussanalyse

Eine der leistungsfähigsten und effizientesten Methoden zur detaillierten Analyse komplexer metabolischer Netzwerke ist die Metabolische Flussanalyse (Wei et al., 2002). Diese erlaubt die *in vivo* Quantifizierung der intrazellulären Stoffflüsse und stellt die Schlüsseltechnologie zur Untersuchung der Auswirkung genetischer oder umweltbedingter Modifikationen dar. Mit ihrer Hilfe können neue oder alternative Stoffwechselwege aufgedeckt und Engpässe im Metabolismus identifiziert werden. Sie leistet daher einen enormen Beitrag zur Erweiterung der Kenntnisse über die Regulation und Struktur des mikrobiellen Metabolismus und führte in einer Vielzahl von Studien in *C. glutamicum* zur Identifikation von Ansatzpunkten zur rationalen Optimierung von Produktionsstämmen (Wittmann, 2005; Wittmann, 2008). Die Metabolische Flussanalyse steht daher im Mittelpunkt des Metabolic Engineerings.

Als Ergebnis der Metabolischen Flussanalyse (MFA) erhält man ein Flussdiagramm in dem sowohl anabole als auch katabole Reaktionen in Bezug auf die Substrataufnahme quantitativ dargestellt sind. Die stöchiometrische Flussanalyse, auch genannt „Metabolite Balancing“, basiert auf stöchiometrischen Netzwerkmodellen, der Metabolitbilanzierung und der Messung extrazellulärer Flüsse. Die  $^{13}\text{C}$ -Metabolische Flussanalyse ist eine Erweiterung der stöchiometrischen Flussanalyse, die zusätzlich Substrate nutzt, welche an definierter Position durch das Kohlenstoffisotop  $^{13}\text{C}$  markiert sind (Schmidt et al., 1998; Wiechert, 2001; Wittmann, 2002; Wittmann und Heinzle, 2001b; Yang et al., 2009; Yang et al., 2008).

### 7.1 „Metabolite Balancing“

Die Grundlage des „Metabolite Balancing“ besteht in der Bilanzierung von Metaboliten auf der Basis eines stöchiometrischen Netzwerks des Zentralstoffwechsels, wodurch es möglich ist, intrazelluläre Flüsse aus gemessenen extrazellulären Flüssen wie Substrataufnahmerate, anabolen Flüssen, die sich aus der Biomassebildung ergeben, und Produktbildungsrate zu berechnen. Voraussetzung hierfür ist, dass die Metabolite sich in einem quasi-stationären (*quasi-steady-state*) Zustand befinden, d.h. dass sich ihre Konzentrationen mit der Zeit nicht ändern (Wiechert, 2001). Ein solcher Zustand kann für das exponentielle Wachstum eines Mikroorganismus angenommen werden. Dabei gilt für jeden Metaboliten, dass die Summe der Raten seiner Bildungsreaktionen, gleich der Summe der Raten seiner Verbrauchsreaktionen ist, was sich mathematisch wie folgt beschreiben lässt:

$$0 = \sum_{i=1}^n v_{\text{ein},i} - \sum_{j=1}^m v_{\text{aus},j} \quad [\text{mmol g}^{-1}\text{h}^{-1}] \quad (\text{Gl. II. 1})$$

Die Dimension der absoluten Flussraten wird in  $[\text{mmol g}_{\text{BTM}}^{-1} \text{h}^{-1}]$  angegeben. Bei der Angabe von prozentualen molaren Flüssen dient die spezifische Substrataufnahmerate ( $q_s$ ) als Bezugsgröße mit 100 %. Solche Bilanzgleichungen können für jeden intrazellulären Metaboliten aufgestellt werden, wodurch sich ein lineares Gleichungssystem ergibt, welches in Matrixform dargestellt werden kann. Es gilt:

$$S \cdot v = 0 \quad (\text{Gl. II. 2})$$

Dabei ist  $S$  eine stöchiometrische Matrix, deren Zeilen den zu bilanzierenden internen Metaboliten entsprechen und die Spalten einem Fluss mit dem Flussvektor  $v$ . Es kann jedoch nur ein kleiner Teil der Flüsse wie die Substrataufnahme, Produkt- und Biomassebildung direkt gemessen werden. Um zwischen gemessenen Flüssen  $v_m$  und zu berechnenden Flüssen  $v_c$  zu unterscheiden, wird Gleichung II.2 umgeformt.

$$S_m v_m + S_c v_c = 0 \Rightarrow S_c v_c = -S_m v_m \quad (\text{Gl. II. 3})$$

Ist  $S_c$  eine quadratische Matrix mit vollem Rang, so kann diese invertiert werden und durch Multiplikation mit  $-S_m v_m$  kann  $v_c$  berechnet werden. Ist  $S_c$  keine quadratische Matrix, so muss eine Pseudo-Inversion von  $S_c$  durchgeführt werden. Oftmals reicht die Anzahl der gemessenen Flüsse jedoch nicht aus, um eine allein gültige Lösung für das Gleichungssystem zu erhalten. In diesem Fall ist das System unterbestimmt.

Diese Art der metabolischen Flussanalyse wird daher nur dann eingesetzt, wenn wenige Messungen für ein sehr einfaches Netzwerk oder viele für ein komplexeres vorliegen. So wurden beispielsweise intrazelluläre Flüsse in Säugerzellen erfolgreich bestimmt, wobei die metabolischen Netzwerke stark vereinfacht waren und zusätzliche Messungen in Form von Aminosäuren vorlagen (Niklas et al., 2009; Quek et al., 2009). Oftmals müssen beim „Metabolite Balancing“ außerdem zusätzliche Annahmen über die Metabolite des Energiehaushalts wie ATP, NADH/NAD<sup>+</sup> und NADPH/NADP<sup>+</sup> gemacht werden (Bonarius et al., 1997), was voraussetzt, dass alle energieproduzierenden und verbrauchenden Reaktionen sowie ihre Umwandlungsreaktionen exakt bekannt sind. Die

Effizienz der Umwandlung von NADH zu ATP kann jedoch nicht präzise definiert werden (Hinkle, 2005) und es existieren hochaktive energieverbrauchende „futile cycles“ in der Anaplerose (Petersen et al., 2000). Eine stark aktive Transhydrogenase-Aktivität wie etwa in *B. subtilis*, durch die NADPH und NADH ineinander umgewandelt werden, macht die Bilanzierung der einzelnen Reduktionsäquivalente unmöglich (Dauner et al., 2001).

Eine weitere Einschränkung ist, dass alternative Wege mit gleicher Gesamtstöchiometrie sowie zyklische und bidirektionale Systeme mit dieser Methode aufgrund des Auftretens von Singularitäten nicht quantifiziert werden können (Bonarius et al., 1997). Diese Problematik führte zur Entwicklung der  $^{13}\text{C}$ -Metabolischen Flussanalyse, mit der redundante Wege, die aber unterschiedlich zur Markierungsverteilung eines Metaboliten beitragen, aufgelöst werden können. Da diese Methode ohne Annahmen über den Energiehaushalt oder Redoxbilanzen auskommt, sondern ausschließlich auf der Kohlenstoffbilanzierung beruht, kann mit ihr zudem die Konsistenz von Energie- und Redoxbilanzen überprüft werden (Wittmann, 2002).

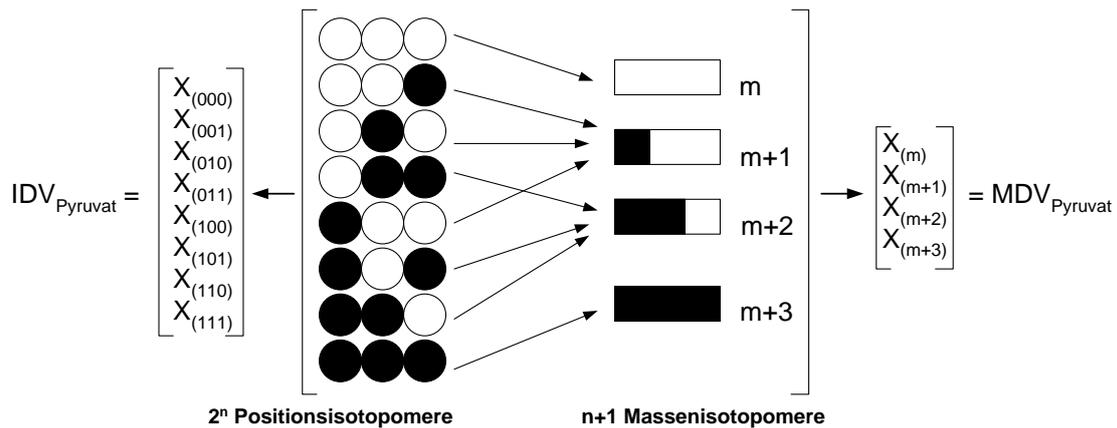
## 7.2 $^{13}\text{C}$ -Metabolische Flussanalyse

Zusätzlich zu den extrazellulär gemessenen Flüssen werden in der  $^{13}\text{C}$ -Metabolischen Flussanalyse Daten aus einem Kohlenstoffmarkierungsexperiment gewonnen. Das markierte Substrat wird dabei von den Zellen aufgenommen und die  $^{13}\text{C}$ -Atome verteilen sich durch die für jeden Organismus spezifischen Enzymreaktionen über die verschiedenen Stoffwechselwege der Zelle. Nach einiger Zeit gelangt die Markierungsanreicherung aller Metabolite in einen stationären Zustand. Da die Intermediatkonzentrationen wie z.B. von Phosphoenolpyruvat, Oxalacetat oder Erythrose-4-Phosphat oftmals zu gering sind, um deren Markierungszustand direkt zu messen, greift man auf die Markierungsmessung der Biomasse, welche aus den Vorläufern des Zentralstoffwechsels gebildet wird, zurück. Diese wird durch Hydrolyse ihrer Makromoleküle (Proteine, RNA, Zellwand etc.) in ihre Bausteine wie Aminosäuren oder Zucker zerlegt. Diese liegen dann in hoher Konzentration vor und ihre Markierungszustände können mittels NMR (*nuclear magnetic resonance*) oder Massenspektrometrie bestimmt werden. Während für die kleinen, schnell aufgebauten Intermediate im Zentralstoffwechsel wie PEP, Pyruvat oder OAA relativ schnell ein isotopisch stationärer Zustand erreicht wird, wird dieser für die Biomasse erst nach einer Verweilzeit von mindestens  $4/\mu$  angenommen. Die Untersuchung des  $^{13}\text{C}$ -Isotopenmusters in organischen Molekülen wird als Isotopomerenanalyse bezeichnet. Mit Hilfe eines Netzwerks aus Isotopomerenbilanzen können anhand der Isotopomerenverteilungen in den

Metaboliten die relativen Anteile der einzelnen biochemischen Reaktionen zueinander bestimmt werden (Wittmann und Heinzle, 1999). Hierzu muss die Topologie des Netzwerks bekannt sein, d.h. die Positionen der in den beteiligten Metaboliten enthaltenen Kohlenstoffatome müssen exakt definiert sein.

### 7.2.1 Isotopomere

Von zentraler Bedeutung für die  $^{13}\text{C}$ -Metabolische Flussanalyse ist das Isotopomer bzw. die Isotopomerenverteilung eines Metaboliten. Die Bezeichnung Isotopomer setzt sich aus den beiden Begriffen Isotop und Isomer zusammen und beschreibt den Markierungszustand eines Metaboliten (Malloy et al., 1988; Wiechert, 2001). Ein Metabolit mit  $n$  Kohlenstoffatomen kann an jedem Kohlenstoffatom in markierter oder unmarkierter Form auftreten und besitzt daher  $2^n$  verschiedene Markierungsmuster oder Positionsisotopomere (Wiechert, 2001). Mathematisch werden die Isotopomere als IDV (*isotopomer distribution vector*) dargestellt, dessen Elemente die molaren Anteile jedes einzelnen Positionsisotopomers darstellen (Schmidt et al., 1997; Wittmann und Heinzle, 1999). Die Isotopomere werden dabei in der binären Form angegeben, d.h. 1 steht für ein markiertes  $^{13}\text{C}$ -Atom und 0 für ein unmarkiertes  $^{12}\text{C}$ -Atom. Die Summe der molaren Anteile der Elemente eines IDVs ergibt 1. Prinzipiell kann die Analyse des Markierungszustands eines Metaboliten mittels NMR oder Massenspektrometrie erfolgen (Park et al., 1997a; Sonntag et al., 1995). In dieser Arbeit wurde aufgrund der hohen Sensitivität und relativ schnellen und einfachen Durchführbarkeit die Massenspektrometrie mittels GC/MS angewandt. Mit dieser Methode lassen sich jedoch keine Positionsisotopomere, sondern lediglich Massenisotopomere unterscheiden, d.h. sie liefert eine Aussage über die Anzahl der im Molekül markierten C-Atome. Ein Molekül mit  $n$  C-Atomen und  $2^n$  Positionsisotopomeren besitzt  $n+1$  mögliche Massenisotopomere ( $m, m+1, m+2, \dots, m+n$ ). Daher ist es notwendig, den IDV mathematisch in einen sogenannten MDV (*mass distribution vector*) zu transformieren. Dies geschieht, indem Isotopomere mit derselben Anzahl an markierten C-Atomen gruppiert werden. Ein MDV enthält dementsprechend die molaren Anteile jeder Masse eines Metaboliten, deren Summe 1 ergibt. Die Transformation eines IDVs in einen MDV ist in Abbildung II-9 am Beispiel des  $\text{C}_3$ -Körpers von Pyruvat dargestellt.



**Abb. II-9:** Positions- und Massenisotopomere für Pyruvat sowie deren Darstellung als IDV (*isotomer distribution vector*) bzw. MDV (*mass distribution vector*) nach Wittmann et. al (2002).

### 7.2.2 Mathematische Beschreibung des C-Atom-Transitionsnetzwerks

Das metabolische Modell für die  $^{13}\text{C}$ -Metabolische Flussanalyse wird aus dem stöchiometrischen Netzwerk und dem C-Atom-Transitionsnetzwerk gebildet, d.h. zu jedem Reaktionsschritt werden die Positionswechsel der C-Atome beschrieben. Dies geschieht mit Hilfe einer Atom Mapping Matrix (AMM) (Zupke und Stephanopoulos, 2002). Für die Reaktion eines Edukts mit  $n$  C-Atomen zu einem Produkt mit  $m$  C-Atomen ergibt sich eine  $(m \times n)$ -Matrix, deren Zeilen die Positionen der C-Atome im Produkt und die Spalten die Positionen der C-Atome im Edukt darstellen. Einem Element in der Matrix wird der Wert 1 zugeordnet, wenn ein C-Atom transferiert wird, andernfalls ist der Wert 0. Die Erzeugung einer solchen Matrix soll am Beispiel der Reaktion der Pyruvat-Carboxylase, die Pyruvat zu OAA unter Verbrauch von  $\text{CO}_2$  carboxyliert, verdeutlicht werden.

$$\text{AMM}_{\text{Pyruvat} \rightarrow \text{OAA}} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}, \quad \text{AMM}_{\text{CO}_2 \rightarrow \text{OAA}} = \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 1 \end{bmatrix} \quad (\text{Gl. II.4, Gl. II.5})$$

Bei dieser Reaktion werden die C-Atome 1,2 und 3 von Pyruvat auf die Positionen 1, 2 und 3 von OAA übertragen, während das C-Atom des  $\text{CO}_2$  Position 4 von OAA einnimmt. Für alle an einer Reaktion beteiligten Edukte und Produkte muss eine eigene AMM aufgestellt werden. Bei reversiblen Reaktionen ist außerdem ein zusätzlicher Satz an AMMs für die Rückreaktion erforderlich.

Mit Hilfe der AMMs kann anschließend mittels einer in MATLAB<sup>TM</sup> (The Mathworks, Natick, MA) implementierten Software eine entsprechende Isotopomer Mapping Matrix (IMM) erzeugt werden. Durch die Erzeugung einer IMM erhält man eine dem IDV

entsprechende Zuordnungsmatrix. Die IMM einer Reaktion definiert, welche Positionsisotomere eines Produktes aus den einzelnen Positionsisotomeren eines Edukts gebildet werden. Für eine Reaktion zwischen einem Edukt mit  $n$  C-Atomen zu einem Produkt mit  $m$  C-Atomen ergibt sich eine  $(2^m \times 2^n)$ -Matrix, in der die Anzahl der Zeilen der Anzahl der Isotomere des Edukts und die Anzahl der Spalten der Anzahl der Isotomere des Produkts entspricht. Einem Element in der IMM-Matrix wird der Wert 1 zugeordnet, wenn das entsprechende Produktisotopomer gebildet wird, andernfalls ist der Wert 0. Beispielhaft soll dies wiederum anhand der Reaktion der Pyruvat-Carboxylase von Pyruvat zu OAA gezeigt werden. Der Edukt-IDV von Pyruvat hat  $2^3 = 8$  Elemente, weshalb die IMM 8 Spalten besitzt. Der Produkt-IDV von OAA hat  $2^4 = 16$  Elemente, weshalb die IMM 16 Reihen besitzt.

$$\text{IMM}_{\text{Pyr} \rightarrow \text{OAA}} = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad (\text{Gl. II. 6})$$

Durch die Verwendung von IMM's können nun die IDVs der in einer Reaktion entstehenden Produkte durch Multiplikation der IDVs der Edukte mit den entsprechenden IMM berechnet werden. In der Reaktion von Pyruvat und  $\text{CO}_2$  zu OAA soll also der IDV von OAA berechnet werden. Zunächst wird hierzu die  $\text{IMM}_{\text{Pyr} \rightarrow \text{OAA}}$  ( $16 \times 8$ ) mit dem  $\text{IDV}_{\text{Pyr}}$  ( $8 \times 1$ ) und die  $\text{IMM}_{\text{CO}_2 \rightarrow \text{OAA}}$  ( $16 \times 2$ ) mit dem  $\text{IDV}_{\text{CO}_2}$  ( $2 \times 1$ ) multipliziert. Hierdurch erhält man zwei Vektoren mit 16 Spalten, deren elementweise Multiplikation ( $\otimes$ ) den IDV von OAA ergibt.

$$\text{IDV}_{\text{OAA}} = (\text{IMM}_{\text{Pyr} \rightarrow \text{OAA}} \times \text{IDV}_{\text{Pyr}}) \otimes (\text{IMM}_{\text{CO}_2 \rightarrow \text{OAA}} \times \text{IDV}_{\text{CO}_2}) \quad (\text{Gl. II. 7})$$

Im isotopisch stationären Zustand sind die Isotopomerenanteile aller Isotopomerenpools konstant, d.h. die Summe der molaren Bildungsraten der Isotopomere ist gleich der Summe ihrer Verbrauchsraten (Gleichung II.8).

$$0 = \sum_{i=1}^n v_{i,\text{ein}} \cdot \text{IDV}_{\text{OAA}} - \sum_{j=1}^m v_{j,\text{aus}} \cdot \text{IDV}_{\text{OAA}} \quad (\text{Gl. II. 8})$$

Die Methode der Isotopomerenbilanzierung führt jedoch zu tausenden von Gleichungen, die gelöst werden müssen, was zu sehr langen Berechnungszeiten führt. Um diese ohne Informationsverlust signifikant zu verkürzen, wurde das Konzept der Elementary Metabolite Units (EMUs) eingeführt (Antoniewicz et al., 2007). Dieses basiert auf einer effizienten Dekompositionsmethode, welche unter Berücksichtigung der Transition der C-Atome, das Minimum an Informationen identifiziert, um die  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung innerhalb des Netzwerks zu simulieren. Die funktionellen Einheiten, die sogenannten EMUs, stellen die Basis dieses Systems dar. Sie beschreiben die Beziehung zwischen den Flüssen und den gemessenen  $^{13}\text{C}$ -Anreicherungen. Die durch diese Methode berechneten Isotopomerhäufigkeiten sind identisch mit denen aus der Isotopomeren- oder Cumomerenbilanzierung (Wiechert und de Graaf, 1997). Die Anzahl der Gleichungen, die für ein typisches Reaktionsnetzwerk gelöst werden müssen, kann jedoch um eine Zehnerpotenz reduziert werden. Ein Metabolit mit n C-Atomen besitzt  $2^{n-1}$  EMUs. So hat beispielsweise ein Metabolit mit 3 C-Atomen 3 EMUs der Größe 1 ( $A_1, A_2, A_3$ ), 3 EMUs der Größe 2 ( $A_{12}, A_{13}, A_{23}$ ) und 1 EMU der Größe 3 ( $A_{123}$ ). Nach der Dekomposition des metabolischen Netzwerks in EMUs können die intrazellulären Flüsse berechnet werden.

### 7.2.3 Parameterschätzung

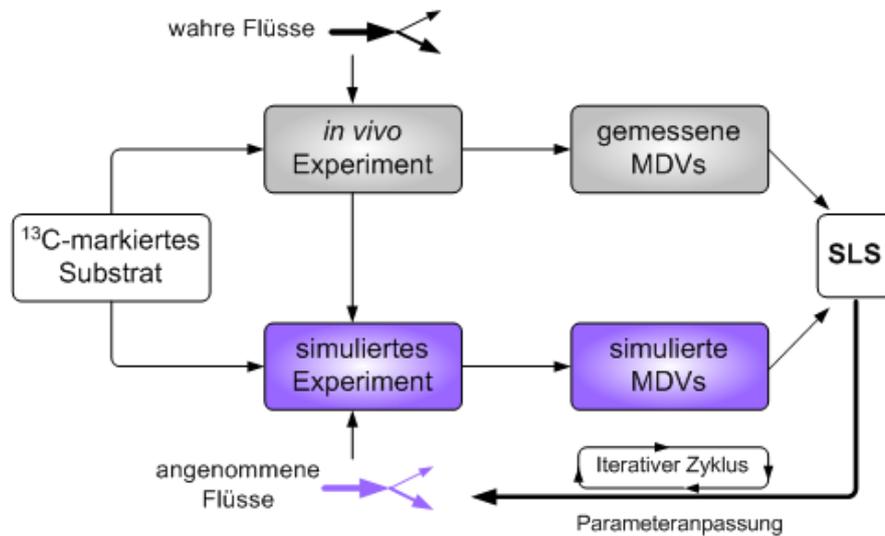
In der Computersimulation werden anhand der Flussraten als veränderliche Startwerte theoretische MDVs der beteiligten Metabolite berechnet, die sich aus dem Isotopomerenmuster des eingesetzten Substrates aufgrund der Topologie des Isotopomerennetzwerks ergeben. Diese theoretischen MDVs werden unter Variation der Flussraten den experimentell bestimmten MDVs, die aus einem  $^{13}\text{C}$ -Tracerexperiment gewonnen und mittels GC/MS gemessen wurden, angepasst.

Die mittels GC/MS gemessenen Moleküle setzen sich aus dem Kohlenstoff-Skelett und den am C-Skelett gebundenen Atomen zusammen. Viele der nicht C-Skelett Atome (z.B. H, O, N, Si), welche sowohl vom Analyt selbst als auch vom verwendeten Derivatisierungsreagenz stammen, kommen als Mischung verschiedener natürlicher

Massenisotope vor. Diese stabilen natürlichen Massenisotope führen zu einer Verschiebung der eigentlichen Massenisotopomeren-Verteilung aus dem  $^{13}\text{C}$ -Markierungsexperiment. Diese Verschiebung nimmt mit der Anzahl der gebundenen Atome zu und kann nicht vernachlässigt werden. Ebenso liegt der Kohlenstoff selbst als natürliche Mischung verschiedener Massenisotope vor, was ebenfalls berücksichtigt werden muss. Diese Differenz zwischen Markierungsmessung und theoretischer Verteilung der Massenisotopomere erforderte die Einführung spezifischer Korrekturmatriizen (Yang et al., 2009). Die so korrigierten MDVs können letztendlich dann als experimentell bestimmte Werte zur Bestimmung der Flussparameter eingesetzt werden. Die Anpassung der theoretischen MDVs an die experimentell bestimmten MDVs erfolgt durch die Minimierung der Quadratsumme ( $SLS = \text{sum of least squares}$ ) der relativen Differenzen aus den gemessenen ( $r_{\text{exp}}$ ) und in der Simulation bestimmten ( $r_{\text{sim}}$ ) relativen Anteile der verschiedenen Massenisotopomere (Wittmann, 2002). Zusätzlich wird hierbei der aus der GC/MS-Messung resultierende relative Fehler der experimentell bestimmten Massenisotopomeranteile ( $S_{r,i}^2$ ) berücksichtigt.

$$SLS = \sum_i \frac{\left(\frac{r_{\text{exp},i} - r_{\text{sim},i}}{r_{\text{exp},i}}\right)^2}{S_{r,i}^2} \quad (\text{Gl. II. 9})$$

Zur Anpassung wird ein iterativer Optimierungsalgorithmus verwendet, der es ermöglicht, in mehreren aufeinanderfolgenden Simulationen unter Variation der intrazellulären Flussraten für die nach Gleichung II.9 bestimmte Quadratsumme der Differenzen zwischen experimentell bestimmten und simulierten Markierungsmustern ein globales Minimum zu bestimmen (Yang et al., 2008).



**Abb. II-10:** Prinzip der <sup>13</sup>C-Metabolischen Flussanalyse. Die experimentellen (wahren) Daten werden aus einem <sup>13</sup>C-Kohlenstoff-Tracerexperiment gewonnen. Die Berechnung der Flüsse erfolgt über die Modellierung des Tracerexperiments. Die Parameter (metabolische Flüsse) des Modells werden bestmöglich an die gemessenen Daten angepasst (Wiechert, 2001).

#### 7.2.4 Statistische Auswertung

Zur statistischen Überprüfung der Qualität der Flussanpassung sowie zur Überprüfung der Empfindlichkeit der bestimmten Parameter in Bezug auf Messungenauigkeiten, wird die Monte-Carlo-Simulation angewandt (Mollney et al., 1999; Wittmann und Heinzle, 2002; Yang et al., 2008). Die Basis dieses statistischen Verfahrens stellen sehr häufig durchgeführte Zufallsexperimente dar. Dazu werden mehrere Parameterschätzungen hintereinander durchgeführt, in denen die zur Anpassung dienenden Markierungsdaten aus künstlich erzeugten Zufallswerten der Markierungsmuster bestehen. Für die aus der GC/MS-Messung gewonnenen Markierungsdaten wird dabei eine Normalverteilung angenommen, deren Standardabweichung zur Bestimmung der Intervalle der in der Monte-Carlo-Simulation eingesetzten Zufallswerte dient. Da sich die Häufigkeit eines mit der Monte-Carlo-Methode berechneten Ergebnisses immer weiter an die theoretische Wahrscheinlichkeit für dieses Ergebnis annähert, je häufiger die Simulation durchgeführt wird, ist eine sehr große Anzahl von aufeinanderfolgenden Simulationen notwendig (Metropolis und Ulam, 1949). Als Ergebnis erhält man für jeden in der Parameterschätzung bestimmten Flussparameter eine dementsprechend große Zahl an Einzelwerten, aus denen die Mittelwerte und Standardabweichungen der verschiedenen Flussraten berechnet werden können.

---

### III. MATERIAL UND METHODEN

---

#### 1. Bakterienstämme

##### 1.1 *Corynebacterium glutamicum*

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Stämme waren Abkömmlinge von *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA). Die Mutante *lysC<sup>fbr</sup>* trägt eine Punktmutation im Gen der Aspartokinase, dem Schlüsselenzym zur Regulation der Lysinbiosynthese. Bei der Mutation handelt es sich um einen Basenaustausch von Cytosin gegen Adenin, was in der Aminosäuresequenz des Proteins die Substitution von Threonin durch Isoleucin an Position 311 (T311I) in der regulatorischen  $\beta$ -Untereinheit zur Folge hat. Durch den Aminosäureaustausch kommt es zur Aufhebung der Feedback-Inhibition der Aspartokinase durch Lysin und Threonin (Kalinowski et al., 1991). Stämme mit Modifikationen im Zentralstoffwechsel beruhten auf *C. glutamicum lysC<sup>fbr</sup>*. Bei den Modifikationen handelte es sich um Deletionen der Pyruvat-Kinase (*pyk*), der PEP-Carboxylase (*ppc*), der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (*pck*) und der Glucose-6-Phosphat-Isomerase (*pgi*). In der Mutante *lysC<sup>fbr</sup>  $\Delta$ pyk $\Delta$ ppc $\Delta$ pck $\Delta$ pgi* wurden alle vier Deletionen miteinander kombiniert. Zusätzlich wurden verschiedene zweifach und dreifach Deletionsmutanten der genannten Enzyme hergestellt. Außerdem wurde in *lysC<sup>fbr</sup>  $\Delta$ pyk $\Delta$ ppc $\Delta$ pck $\Delta$ pgi $\Delta$ sdaA* die Serin-Dehydratase (*sdaA*) ausgeschaltet (Tabelle III-1).

Neben der Deletion von Genen des Zentralstoffwechsels wurden außerdem Modifikationen im Cystein- bzw. Schwefelstoffwechsel von *C. glutamicum* durchgeführt. Der Stamm  $\Delta$ *cysK* weist einen Defekt der Cystein-Synthase CysK auf. Im Fall der Mutante  $\Delta$ *cgl2136* ist die entsprechende Genfunktion bislang nicht eindeutig geklärt. Ein Datenbankabgleich (NCBI, BLAST) der Nukleotidsequenz dieses Gens zeigte, dass es sich entweder um eine zweite Cystein-Synthase oder um eine Cystathionin- $\beta$ -Synthase handeln könnte. Die Mutante  $\Delta$ *cysK* wurde neben der physiologischen Analyse zur Überexpression von *cgl2136* mit Hilfe des H574/575 PG Psod *cgl2136* 6xHis - Plasmids eingesetzt. *C. glutamicum*  $\Delta$ *cysD* und  $\Delta$ *cysI* weisen Deletionen im Sulfat-Operon auf. Die Deletion von *cysD* (Sulfat-Adenylyltransferase Untereinheit II) verhindert die Sulfat-Reduktion, während die Deletion von *cysI* (Sulfit-Reduktase) dazu führt, dass Sulfit nicht weiter reduziert werden kann. Außerdem wurden Knockout-Stämme von jeweils einer der beiden

Thiosulfat-Sulfurtransferasen untersucht. Diese werden im Folgenden als  $\Delta ThioI$  und  $\Delta ThioII$  bezeichnet. Tabelle III-1 zeigt die in dieser Arbeit untersuchten *C. glutamicum* Stämme.

**Tab. III-1:** Stämme von *C. glutamicum*

Stamm	Merkmale	Quelle/ Referenz
ATCC 13032	Wildtyp	American Type Culture Collection
<i>lysC<sup>fbr</sup></i>	Derivat von ATCC 13032 mit feedback-resistenter Aspartokinase (T311I)	BASF
<i>lysC<sup>fbr</sup> Δpyk</i>	<i>lysC<sup>fbr</sup></i> mit Deletion der Pyruvat Kinase ( <i>pyk</i> )	BASF
<i>lysC<sup>fbr</sup> Δpyk Δppc</i>	<i>lysC<sup>fbr</sup></i> mit Deletion von <i>pyk</i> und PEP-Carboxylase ( <i>ppc</i> )	diese Arbeit
<i>lysC<sup>fbr</sup> Δpyk Δppc Δpck</i>	<i>lysC<sup>fbr</sup></i> mit Deletion von <i>pyk</i> , <i>ppc</i> und PEP-Carboxykinase ( <i>pck</i> )	diese Arbeit
<i>lysC<sup>fbr</sup> ΔpykΔppcΔpgi</i>	<i>lysC<sup>fbr</sup></i> mit Deletion von <i>pyk</i> , <i>ppc</i> und Glucose-6-Phosphat-Isomerase ( <i>pgi</i> )	diese Arbeit
<i>lysC<sup>fbr</sup> ΔpykΔppcΔpck Δpgi</i>	<i>lysC<sup>fbr</sup></i> mit Deletion von <i>pyk</i> , <i>ppc</i> , <i>pck</i> und <i>pgi</i>	diese Arbeit
<i>lysC<sup>fbr</sup> ΔpykΔppcΔpck ΔpgiΔsdaA</i>	<i>lysC<sup>fbr</sup></i> mit Deletion für <i>pyk</i> , <i>ppc</i> , <i>pck</i> , <i>pgi</i> und Serin-Dehydratase ( <i>sdaA</i> )	diese Arbeit
$\Delta cysK$	Deletion der Cystein-Synthase ( <i>cysK</i> )	BASF
$\Delta cgl2136$	Deletion der putativen Cystein-Synthase II oder Cystathionin- $\beta$ -Synthase	BASF
$\Delta cysD$	Deletion der Sulfat-Adenylyltransferase Untereinheit II ( <i>cysD</i> )	diese Arbeit
$\Delta cysI$	Deletion der Sulfit-Reduktase ( <i>cysI</i> )	diese Arbeit
$\Delta ThioI$	Deletion der Thiosulfatsulfurtransferase I	BASF
$\Delta ThioII$	Deletion der Thiosulfatsulfurtransferase II	BASF

## 1.2 *Escherichia coli*

**Tab. III-2:** Stämme von *E. coli*

Stamm	Merkmale	Quelle / Referenz
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> endA1, hsdR17(rk <sup>-</sup> mk <sup>+</sup> ) supE44, thi-1 $\lambda$ <sup>-</sup> recA1 gyrA96 relA1 $\phi$ 80 $\Delta$ lacAm15	(Hanahan, 1983)
NM522	supE thi-1 $\Delta$ (lac-proAB) $\Delta$ (mcrB-hsdSM)5 (rK <sup>-</sup> mK <sup>+</sup> ) [F' proAB lacIqZ $\Delta$ M15]	Stratagene (La Jolla, CA)
XL1 Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZ $\Delta$ M15 Tn10 (Tetr)]	Stratagene (La Jolla, CA)

*E. coli* DH5 $\alpha$  diente der Amplifikation der integrativen pClik-int-*sacB*-Plasmide zur Plasmid Micro-Prep und wurde außerdem zur Amplifikation des PG-basierenden Expressionsplasmids und anschließender Midi-Prep eingesetzt. *E. coli* NM522, transformiert mit dem pTC-Plasmid, diente der corynespezifischen Methylierung und Amplifikation von pClik-int-*sacB* zur Plasmid Midi-Prep. *E. coli* XL1 Blue wurde mit dem H561 pQE30 *cysK* (YP\_226802) 6xHis-Plasmid transformiert und zur Überexpression der Cysteinsynthase CysK aus *C. glutamicum* eingesetzt.

## 2. Plasmide

Die Plasmidkarten der zur Stammkonstruktion eingesetzten Vektoren befinden sich im Anhang (Abbildungen VI-6 - VI-9).

**Tab. III-3:** Zur Stammkonstruktion eingesetzte Plasmide

Plasmid	Merkmale	Quelle/ Referenz
pTC	Expressions-Plasmid mit Methylase-Gen aus <i>C. glutamicum</i> , replizierend in <i>E. coli</i> , Tet <sup>R</sup>	BASF
pClik-int- <i>sacB</i>	Vektor zum allelischen Austausch durch homologe Rekombination, nicht-replizierend in <i>C. glutamicum</i> , Kan <sup>R</sup> , <i>sacB</i> , ORI EC (pMB)	BASF
pClik-int- <i>sacB</i> $\Delta$ <i>ppc</i>	pClik-int- <i>sacB</i> basierender Vektor zur chromosomalen Deletion der PEP-Carboxylase <i>ppc</i> ( <i>cgl1585</i> )	diese Arbeit
pClik-int- <i>sacB</i> $\Delta$ <i>pck</i>	pClik-int- <i>sacB</i> basierender Vektor zur chromosomalen Deletion der PEP-Carboxykinase <i>pck</i> ( <i>cgl2863</i> )	diese Arbeit
pClik-int- <i>sacB</i> $\Delta$ <i>pgi</i>	pClik-int- <i>sacB</i> basierender Vektor zur chromosomalen Deletion der Glucose-6-Phosphat-Isomerase <i>pgi</i> ( <i>cgl0851</i> )	diese Arbeit

pClik-int- <i>sacB</i> $\Delta$ <i>zwf</i>	pClik-int- <i>sacB</i> basierender Vektor zur chromosomalen Deletion der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase von <i>zwf</i> ( <i>cgl1576</i> )	diese Arbeit
pClik-int- <i>sacB</i> $\Delta$ <i>gnd</i>	pClik-int- <i>sacB</i> basierender Vektor zur chromosomalen Deletion der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase <i>gnd</i> ( <i>cgl1452</i> )	diese Arbeit
pClik-int- <i>sacB</i> $\Delta$ <i>sdaA</i>	pClik-int- <i>sacB</i> basierender Vektor zur chromosomalen Deletion der Serin-Dehydratase <i>sdaA</i> ( <i>cgl1645</i> )	diese Arbeit
H539 pClik-int- <i>sacB</i> $\Delta$ <i>cysK</i>	pClik-int- <i>sacB</i> basierender Vektor zur chromosomalen Deletion der Cystein-Synthase <i>cysK</i> ( <i>cgl2562</i> )	BASF
H541 pClik-int- <i>sacB</i> $\Delta$ <i>cgl2136</i>	pClik-int- <i>sacB</i> basierender Vektor zur chromosomalen Deletion von <i>cgl2136</i>	BASF
pClik-int- <i>sacB</i> $\Delta$ <i>cysD</i>	pClik-int- <i>sacB</i> basierender Vektor zur chromosomalen Deletion der Sulfat-Adenylyltransferase Untereinheit II <i>cysD</i> ( <i>cgl2815</i> )	diese Arbeit
pClik-int- <i>sacB</i> $\Delta$ <i>cysI</i>	pClik-int- <i>sacB</i> basierender Vektor zur chromosomalen Deletion der Sulfit-Reduktase <i>cysI</i> ( <i>cgl2817</i> )	BASF
pClik-int- <i>sacB</i> $\Delta$ <i>ThioI</i>	pClik-int- <i>sacB</i> basierender Vektor zur chromosomalen Deletion der Thiosulfatsulfurtransferase I	BASF
pClik-int- <i>sacB</i> $\Delta$ <i>ThioII</i>	pClik-int- <i>sacB</i> basierender Vektor zur chromosomalen Deletion der Thiosulfatsulfurtransferase II	BASF
H574/575 PG Psod <i>cgl2136</i> 6xHis	PG-Expressionsplasmid zur Überexpression von <i>cgl2136</i> in <i>C. glutamicum</i> ; Kan <sup>R</sup> , ORI-EC (pMB), Rep-Protein, pSOD-Promotor, N-terminal 6xHis-Tag <i>cgl2136</i>	BASF
H561 pQE30 <i>cysK</i> (YP_226802) 6xHis	pQE30-Expressionsplasmid zur Überexpression der Cystein-Synthase CysK aus <i>C. glutamicum</i> in <i>E. coli</i> ; Amp <sup>R</sup> , ColEI, T5-Promotor, lac-Operator, T5- Transkriptionsstart, N-terminal 6xHis-Tag <i>cysK</i> (YP_226802), $\lambda$ <sub>0</sub> und <i>rrnB</i> T1 Transkriptionsterminatoren	BASF

### 3. Chemikalien

Die Substrate Hefeextrakt, Fleischextrakt, Polypepton, Casaminoacids, Trypton, Brain Heart Infusion (BHI) sowie Agar zur Herstellung der Komplexmedien wurden von Difco Laboratories (Detroit, USA) bezogen. Alle anderen Chemikalien waren von mindestens analytischer Reinheit und wurden von folgenden Firmen bezogen: Fluka (Buchs, Schweiz), Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), Riedel-de-Haen (Seelze, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland) und Grüssing (Filsum, Deutschland). Hersteller und Reinheit der für die Markierungsexperimente verwendeten isotopenmarkierten Substanzen ist Tabelle III-4 zu entnehmen. Da in dieser Arbeit u. a. das Wachstum von *C. glutamicum* auf der

alternativen Schwefelquelle Thiosulfat untersucht wurde, wurde darauf geachtet, dass die verwendeten Substanzen zur Kultivierung möglichst frei von Verunreinigungen mit sonstigen schwefelhaltigen Verbindungen waren (Tabelle II-4).

**Tab. III-4:** Anreicherung und Bezugsquellen der isotopenmarkierten Substanzen

Substanz	Anreicherung	Hersteller
[1- <sup>13</sup> C] – Glucose	99%	Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA)
[2- <sup>13</sup> C] – Glucose	99%	Omicron Biochemicals, Inc. (South Bend, USA)
[1,2- <sup>13</sup> C] – Glucose	99%	Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA)
[ <sup>34</sup> S] - Thiosulfat	99%	BASF SE (Ludwigshafen, Deutschland)

**Tab. III-5:** Herkunft und Reinheit der zur Kultivierung von *C. glutamicum* verwendeten Chemikalien.

Substanz	Verunreinigung an Sulfat	Hersteller
D-(+)-Glucose	≤0,005 %	Fluka
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	≤0,003 %	Fluka
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	≤0,003 %	Fluka
NH <sub>4</sub> Cl	≤0,002 %	Fluka
MgCl <sub>2</sub> * 7H <sub>2</sub> O	≤0,002 %	Sigma
CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	≤0,005 %	Fluka
FeCl <sub>2</sub> * 4H <sub>2</sub> O	≤0,010 %	Sigma
MnCl <sub>2</sub> * 4H <sub>2</sub> O	≤0,002 %	Fluka
ZnCl <sub>2</sub>	≤0,002 %	Riedel-de Haen
CuCl <sub>2</sub>	≤0,010 %	Riedel-de Haen
NiCl <sub>2</sub> * H <sub>2</sub> O	≤0,005 %	Merck
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	≤0,005 %	Riedel-de Haen
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> * 5H <sub>2</sub> O	≤0,05 %	Fluka

## 4. Nährmedien

### 4.1 Nährmedien zur Kultivierung von *C. glutamicum*

#### 4.1.1 Komplexmedium

Zur Anzucht von Reinkulturen von *C. glutamicum* auf Agarplatten sowie zur Durchführung der ersten Vorkultur wurde CM-Komplexmedium eingesetzt. Die Zusammensetzung des Komplexmediums ist Tabelle III-6 zu entnehmen.

**Tab. III-6:** Komplexmedium CM für *Corynebacterium glutamicum*, Lösung 1

Glucose	10,0 g
NaCl	2,5 g
Harnstoff	2,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
Fleischextrakt	5,0 g
Polypepton	5,0 g
Casaminoacids	20,0 g
Ad 500 ml mit Aqua dest., pH 6,8 (NaOH); sterilfiltrieren	

Zur Anzucht auf Agarplatten wurden 500 ml Lösung 2 (20 g Agar ad 500 ml H<sub>2</sub>O, bei 121°C 30 min autoklavieren) zu Lösung 1 zugefügt. Zur Herstellung von Flüssigmedium wurden 500 ml autoklaviertes Wasser zugegeben.

#### 4.1.2 CG 12 ½ - Minimalmedium

Die Anzucht der Zellen der zweiten Vorkultur sowie der Hauptkultur erfolgte in vollsynthetischem Minimalmedium. Die Lösungen wurden getrennt angesetzt und bei Bedarf im entsprechenden Verhältnis gemischt. Tabelle III-7 zeigt die Stocklösungen für das CG 12 ½ - Minimalmediums.

**Tab. III-7:** Einzelne Stocklösungen des CG 12 ½ - Minimalmediums zur Anzucht von *C. glutamicum*.

<b>Lösung A: Substratlösung</b>	
Glucose	25 g
Ad 100 ml mit Aqua dest.; autoklavieren	
<b>Lösung B: Puffer</b>	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	16 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4 g
Ad 695 ml mit Aqua dest., pH 7 (NaOH), autoklavieren	
<b>Lösung C-1: Stickstoff- und Schwefelquelle</b>	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 g
Ad 200 ml mit Aqua dest., pH 7 (NaOH), autoklavieren	
<b>Lösung C-2: Stickstoffquelle für schwefelarmes Medium</b>	
NH <sub>4</sub> Cl	4,05 g
Ad 200 ml mit Aqua dest., pH 7 (NaOH), autoklavieren	
<b>Lösung D</b>	
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	2,062 g
Ad 10 ml mit Aqua dest.; sterilfiltrieren	
<b>Lösung E</b>	
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	0,1 g
Ad 10 ml mit Aqua dest.; sterilfiltrieren	
<b>Lösung F</b>	
3,4-Dihydroxybenzoesäure	0,3 g
Ad 10 ml mit Aqua dest.; pH 12 (NaOH); sterilfiltrieren	
<b>Lösung G: Vitaminlösung</b>	
Vitamin B <sub>12</sub>	50 µl
Thiamin	0,015 g
Pyridoxal 5` Phosphat	10 µl
Biotin (1 mg/ml Stocklösung)	5 ml
Ad 50 ml mit Aqua dest.; sterilfiltrieren	
<b>Lösung H: Spurensalzlösung</b>	
FeCl <sub>2</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	357,55 mg
MnCl <sub>2</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	585,50 mg
ZnCl <sub>2</sub>	47,40 mg
CuCl <sub>2</sub> (136,55 mg/10 ml Stocklösung)	500 µl
NiCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O (0,1 g/5 ml Stocklösung)	50 µl

Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O (0,8 g / 40 ml Stocklösung)	50 µl
Ad 50 ml Aqua dest., pH 1 (HCl); sterilfiltrieren	

Tabelle III-8 zeigt die Zusammensetzung des CG 12 ½ -Minimalmediums zur Anzucht von *C. glutamicum*.

**Tab. III-8:** Zusammensetzung des CG 12 ½ - Minimalmediums zur Anzucht von *C. glutamicum* auf Sulfat.

Lösung	ml l <sup>-1</sup>
A	80
B	695
C-1	200
D-H	je 1
Steriles Aqua dest.	20

Für Kultivierungen auf Thiosulfat bzw. Methionin als einziger Schwefelquelle wurde Stickstofflösung C-2 (für schwefelarmes Medium) verwendet.

## 4.2 Nährmedien zur Stammkonstruktion

### 4.2.1 LB- und SOC-Medium

Die Kultivierung von *E. coli* DH5a sowie von *E. coli* NM522 erfolgte auf LB-Medium. Handelte es sich um eine Plasmid-tragende Kultur, wurde dem Medium das entsprechende Antibiotikum in der Endkonzentration 50 µg/ml (Kanamycin, Stocklösung: 50 mg/ml) bzw. 12,5 µg/ml (Tetracyclin, Stocklösung 12,5 mg/ml in 70 % Ethanol) zugesetzt. Zur Regeneration der Zellen nach der Hitzeschocktransformation wurde SOC-Medium ohne Antibiotikum eingesetzt. In Tabelle III-9 ist die Zusammensetzung des LB- und des SOC-Mediums aufgelistet.

**Tab. III-9:** Zusammensetzung des LB-Mediums zur Kultivierung von *E. coli* DH5 $\alpha$  sowie *E. coli* NM522 Zellen und des SOC-Mediums zur Regeneration der Zellen nach Hitzeschocktransformation.

<b>LB-Medium</b>	
Hefeextrakt	5 g
Trypton	10 g
NaCl	10 g
Agar (bei LB-Platten)	20 g

Ad 1 l H<sub>2</sub>O dest., pH 7 eingestellt mit NaOH; autoklavieren

<b>SOC-Medium</b>	
Trypton	20 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	0,5 g
Ad 970 ml H <sub>2</sub> O dest.; autoklavieren	

Zugabe von je 10 ml MgCl<sub>2</sub> (1M), MgSO<sub>4</sub> (1M) und Glucose (2M), sterilfiltriert

Zur Herstellung von LB-Platten mit Antibiotikum wurden 40  $\mu$ l des entsprechenden Antibiotikums mit 160  $\mu$ l MilliQ verdünnt, auf der Platte verteilt und trocknen gelassen.

#### 4.2.2 BHI-Medien

Zur Elektroporation von *C. glutamicum* wurden sowohl die Zellen der Vor- als auch der Hauptkultur in angereichertem BHI-Medium (Brain Heart Infusion, Becton Dickenson, Heidelberg, Deutschland) angezogen. Auch für die 2. Rekombination wurden die Zellen in angereichertem BHI-Medium (bezeichnet als BHI<sup>++</sup>) inkubiert. Die Regeneration der Zellen nach der Elektroporation erfolgte in BHIS-Medium. Die elektroporierten Zellen wurden auf Selektivagarplatten BHIS mit Kanamycin ausplattiert. In folgender Tabelle ist die Zusammensetzung der BHI-Medien aufgeführt.

**Tab. III-10:** Zusammensetzung der BHI-Medien zur Stammkonstruktion von *C. glutamicum*.

<b>BHI</b>	<b>BHI<sup>++</sup></b>	<b>BHIS-Medium / - Agar</b>
37 g BHI, Ad 1 l H <sub>2</sub> O dest.	37 g BHI, Ad 850 ml H <sub>2</sub> O dest.	37 g BHI (22 g Agar), Ad 750 ml H <sub>2</sub> O dest.
15 min bei 121 °C autoklavieren		
	50 ml (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2 M), (sterilfiltriert)	250 ml Sorbitol (2 M), (sterilfiltriert)

Zur Herstellung von BHIS<sup>Kan</sup>-Platten wurden 20 µl Kanamycin (Stocklösung 50 mg/ml) mit 180 µl Milli Q verdünnt und auf die Platten aufgetragen.

### 4.2.3 CM-Medien

Zur Anzucht von *C. glutamicum* ohne Selektionsdruck wurde CM-Medium verwendet. Zur Selektion nach der 1. Rekombination wurden CM<sup>Kan</sup>-Agarplatten eingesetzt, die mit dem Antibiotikum Kanamycin (25 µg/ml) versetzt waren. Die Selektion nach der 2. Rekombination erfolgte auf CM<sup>Sac</sup>-Agarplatten, denen Saccharose zugesetzt war. In folgender Tabelle ist die Zusammensetzung des CM- und CM<sup>Sac</sup>-Mediums dargestellt.

**Tab. III-11:** Zusammensetzung der CM-Medien zur Stammkonstruktion von *C. glutamicum*.

	CM	CM <sup>Sac</sup>
Pepton	10 g	10 g
Fleischextrakt	5 g	5 g
Hefeextrakt	5 g	5 g
NaCl	2,5 g	2,5 g
Saccharose (50 %)		200 ml
Ad 925 ml H <sub>2</sub> O dest., 15 min bei 121°C autoklavieren		
Glucose (40 %) (sterilfiltriert)	25 ml	25 ml
Harnstoff (40 g/l) (sterilfiltriert)	50 ml	50 ml

Zur Herstellung von CM-Platten wurden vor dem Autoklavieren 25 g/l Agar zugegeben.

### 4.3 Nährmedien zur Proteinexpression in *E. coli* und *C. glutamicum*

Die Anzucht von *E. coli* XL1 Blue zur Überexpression von CysK6xHis aus *C. glutamicum* erfolgte in einer Vor- und Hauptkultur in DYT-Medium. Nach dem Autoklavieren wurden Pyridoxal-5'-Phosphat (1 mg/l) und Ampicillin (100 µg/ml) zugegeben.

**Tab. III-12:** DYT-Medium zur Proteinexpression in *E. coli*

<b>DYT-Medium</b>	
Hefeextrakt	10 g
Trypton	16 g
NaCl	5 g
Ad 1 l H <sub>2</sub> O dest., pH 7, autoklavieren	

Die Anzucht der Vorkultur von *C. glutamicum* zur Überexpression von Cgl2136 6xHis erfolgte in CM-Medium mit Zusatz von Pyridoxal-5'-Phosphat (1 mg/l) und Kanamycin (25 µg/ml). Zur Hauptkultur auf CG 12 ½ - Minimalmedium mit Sulfat wurde ebenfalls Pyridoxal-5'-Phosphat und Kanamycin zugegeben.

## 5. Molekularbiologische Methoden

### 5.1 DNA-Isolierung

Je nach Art und Verwendungszweck wurde die DNA nach unterschiedlichen Protokollen isoliert.

#### 5.1.1 Isolierung genomischer DNA zur SOE-PCR

Zur Isolation genomischer DNA von *C. glutamicum* ATCC 13032 wurden zunächst 2-3 Spatelspitzen Glaskügelchen (Durchmesser 0,1 - 0,25 mm, Retsch, Hahn, Deutschland) zusammen mit 550 µl H<sub>2</sub>O (MilliQ) in ein 2 ml Eppendorf-Tube vorgelegt und eine dicke Impföse frischen Zellmaterials von einer Agarplatte zugegeben. Anschließend wurden 600 µl Roti-Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) beigelegt und die Zellen 30 Sekunden bei höchster Frequenz (30 Hz) mit der Schwingmühle (MM 301, Retsch, Hahn, Deutschland) aufgeschlossen. Anschließend wurden die Zellen 5 Minuten bei 4°C, 13.000 rpm zentrifugiert, wodurch eine Trennung der organischen und der wässrigen Phase erfolgte. Die obere wässrige Phase, in der sich die DNA befand, wurde unter Vermeidung der Interphase in ein 2 ml Eppendorf Tube überführt und nach Zugabe von 4 µl RNase (10 mg/ml) 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Fällung der DNA wurden 65 µl (~1/10 Vol.) 3 M Natrium-Acetat Lösung (pH 5,5) und 1,3 ml (2 x Vol.) 100 %-iges Ethanol zugegeben, vorsichtig gemischt und 10 Minuten bei 4°C, 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70 %-igem Ethanol gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren (1 Minuten, 13.000 rpm, 4°C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet 5 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 100 µl Millipore durch Schütteln bei 30°C im Thermomixer für 30 Minuten resuspendiert und durch Messung der optischen Dichte die Konzentration der DNA-Lösung ermittelt.

### **5.1.2 Isolierung genomischer DNA zur Überprüfung der 1. und 2. Rekombination**

Die Isolation genomischer DNA zur Überprüfung der 1. und 2. Rekombination mittels PCR erfolgte durch Zellaufschluss mittels Schwingmühle (MM 301, Retsch, Hahn, Deutschland). Hierzu wurde 1 ml H<sub>2</sub>O (MilliQ) zusammen mit einer Spatelspitze Glaskügelchen (Durchmesser 0,1 - 0,25 mm, Retsch, Hahn, Deutschland) in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß vorgelegt und eine mit dem Zahnstocher entnommene Spur frischen Zellmaterials von der Platte zugegeben. Anschließend wurden die Zellen 30 Sekunden bei höchster Frequenz mit der Schwingmühle aufgeschlossen und 5 Minuten bei 4°C, 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand konnte für die PCR eingesetzt werden.

### **5.1.3 Plasmid-Isolation mittels Micro-Präp**

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus transformierten *E. coli* DH5 $\alpha$  wurden zunächst mit einem sterilen Zahnstocher die transformierten Klone gepickt und auf LB<sup>Kan</sup>-Rasterplatten überstrichen. Derselbe Zahnstocher wurde zum Animpfen von 3 ml LB<sup>Kan</sup>-Flüssigmedium verwendet. Die Flüssigkulturen wurden 12-16 Stunden bei 37°C und 230 rpm inkubiert und anschließend zur Plasmid Micro-Präp gemäß der Vorschrift des GFX<sup>TM</sup> Micro Prep Kits von Amersham Biosciences (Freiburg, Deutschland) eingesetzt.

### **5.1.4 Plasmid-Isolation mittels Midi-Präp**

Die Midi-Präp diente der Isolation von Plasmid-DNA aus transformierten *E. coli* NM522 bzw. XL1 Blue in größerem Maßstab. Da es sich bei den integrativen pClik-int-*sacB* Plasmiden um low-copy Plasmide handelte, wurden 150 ml LB<sup>Kan</sup>-Medium mit einem der transformierten Klone angeimpft. Für das verwendete high-copy PG-Expressionsplasmid wurden lediglich 50 ml LB<sup>Kan</sup>-Medium angeimpft. Die Plasmid-Isolation erfolgte gemäß der Anweisung des HiSpeed Plasmid Midi-Präp Kits von Qiagen (Hilden, Deutschland).

## **5.2 Bestimmung der DNA-Konzentration**

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm (Photometer Genesys10Bio, ThermoElectron, Oberhausen, Deutschland). Aus dem Verhältnis der Extinktion bei 260 nm und 280 nm lassen sich Rückschlüsse auf die Reinheit der DNA-Probe ziehen. Eine weitgehend protein- und phenolfreie Nukleinsäure-Lösung weist einen OD<sub>260/280nm</sub> - Quotienten von 1,8-2,0 auf. Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurden 57  $\mu$ l Millipore in eine Quarzküvette gegeben und ein Nullabgleich

vorgenommen. Dann wurde 3 µl DNA hinzugefügt, gemischt und die Konzentration gemessen.

### 5.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten PCR-Reaktionen erfolgten mit dem Thermocycler T*Gradient* der Firma Biometra (Göttingen, Deutschland).

#### 5.3.1 Primer

Zur Erzeugung der Fusions-Konstrukte mittels SOE-PCR mussten zunächst entsprechende Primer hergestellt werden. Die Länge der Primer betrug ca. 20-35 bp. Es wurde darauf geachtet, dass der GC-Gehalt der beiden für eine PCR ausgewählten Primer ähnlich ist, da sich die Annealing-Temperaturen der beiden Primer nicht zu sehr unterscheiden sollten. Zur Ligation der durch PCR amplifizierten Bereiche in den Vektor wurden an die 5`-Enden der Außen-Primer Restriktionsschnittstellen angefügt. Um die Effizienz des späteren Restriktionsverdau zu erhöhen, wurden zusätzlich zur Erkennungssequenz der Restriktionsenzyme an die 5`-Enden der Außen-Primer die Basen GATC angefügt.

In Tabelle III-13 sind die in dieser Arbeit verwendeten Primer gezeigt. Die Ableitung der Primer-Sequenzen erfolgte anhand der in der KEGG-Datenbank (<http://www.genome.jp/kegg/>) hinterlegten Genom-Sequenz von *C. glutamicum* ATCC 13032 (Kyowa Hakko). Die Primer VSXXXX (je 0,025 µmol, entsalzt, lyophilisiert) wurden von der Firma Sigma-Genosys (Steinheim, Deutschland) bezogen. Alle sonstigen Primer stammten von der BASF.

**Tab. III-13:** In dieser Arbeit verwendete Primer, die zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten oder zum Nachweis chromosomaler Manipulationen verwendet wurden. Eingeführte Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen und der entsprechende Restriktionsenzymname ist aufgeführt.

Primer	Beschreibung	Sequenz 5'→3'
VS0005	Primer 1 <i>Δppc</i> , 5' <i>Mlu</i> I, forward	GATC <u>ACGCGT</u> TATGACTGATTTTTACGC
VS0006	Primer 2 <i>Δppc</i> , fusion reverse	CGTCGAGGATCCGGCGCTGATCAATGGTCAACGCA
VS0007	Primer 3 <i>Δppc</i> , fusion forward	TGCGTTGACCATTGATCAGCGCCGAATCCTCGACG
VS0008	Primer 4 <i>Δppc</i> , 3' <i>Xba</i> I, reverse	GATCTCTAG <u>ACTAG</u> CCGGAGTTGCGCAG
VS0026	Nachweis <i>Δppc</i> , 5' forward	CTGCTTGCCTGGCAGATG
VS0027	Nachweis <i>Δppc</i> , 3' reverse	CGTGGAACAGGCGAAGCTTG
VS0010	Primer 1 <i>Δpck</i> , 5' <i>Mlu</i> I, forward	GATC <u>ACGCGT</u> TGGGAAAGTTGTCCCTG
VS0011	Primer 2 <i>Δpck</i> , fusion reverse	CGATTGCTACGCAGTACGCCGTAGCCGGAACC
VS0012	Primer 3 <i>Δpck</i> , fusion forward	GGTCCGGCTACGGCGTACTGCGTAGCAATCG

VS0013	Primer 4 $\Delta pck$ , 3' <i>Xba</i> I, reverse	GATCTCTAGAACGGGCACCCGCCTAAG
VS0018	Primer 1 $\Delta pgi$ , 5' <i>Mlu</i> I, forward	GATCACGCGTATCCCTTCTCCGGCATC
VS0019	Primer 2 $\Delta pgi$ , fusion reverse	CTGCTGGAGGTAAGCAGCGAACAATGTGGATTCTG
VS0020	Primer 3 $\Delta pgi$ , fusion forward	CAGAATCCACATTGTTTCGCTGCTTACCTCCAGCAG
VS0021	Primer 4 $\Delta pgi$ , 3' <i>Xba</i> I, reverse	GATCTCTAGATCCAGCGACCGAATAATC
VS0022	Primer 1 $\Delta gnd$ 5' <i>Mlu</i> I forward	GATCACGCGTCTCGATGGTGGTGTAGC
VS0023	Primer 2 $\Delta gnd$ , fusion reverse	GTTGCGCCGGAGAGTGCCGTTGTGGACCATTCTTG
VS0024	Primer 3 $\Delta gnd$ , fusion forward	CAAGATGGTCCACAACGGCACTCTCCGGCGCAAC
VS0025	Primer 4 $\Delta gnd$ , 3' <i>Xba</i> I, reverse	GATCTCTAGAAATCGCTGACACGGATTAC
VS 0028	Primer 1 $\Delta zwf$ , 5' <i>Mlu</i> I, forward	GATCACGCGTGTGAGCACAAACACGAC
VS 0029	Primer 2 $\Delta zwf$ , fusion reverse	CCTGCCAACCGGCAGCAGAAGATTCTGGGAAG
VS 0030	Primer 3 $\Delta zwf$ , fusion forward	CTTCCCAGAATCTTCTGCTGCCGGTTGGCAGG
VS 0031	Primer 4 $\Delta zwf$ , 3' <i>Xba</i> I, reverse	GATCTCTAGATTATGGCCTGCGCCAGG
VS 0032	Primer 1 $\Delta sdaA$ , 5' <i>Mlu</i> I, forward	GACTACGCGTTTCGTGCAACTTCAGAC
VS 0033	Primer 2 $\Delta sdaA$ , fusion reverse	GAGATCGAGGCATTTTAATGAACCCACCACC
VS 0034	Primer 3 $\Delta sdaA$ , fusion forward	GGTGGTGGGTTTCATTAATAATGCCTCGATCTC
VS 0035	Primer 4 $\Delta sdaA$ , 3' <i>Xba</i> I, reverse	GATCTCTAGATGGCGCAGGTCAC
VS 0001	Primer 1 $\Delta cysD$ , <i>Xho</i> I, forward	GATCCTCGAGCAATTGGATGCGAAACC
VS 0002	Primer 2 $\Delta cysD$ , fusion reverse	AGTCCAGTTGGAGATTGGGACAGTCTGCAGTGGGTT
VS 0003	Primer 3 $\Delta cysD$ , fusion forward	AACCCACTGCAGACTGTCCCAATCTCCAAGTGGACT
VS 0004	Primer 4 $\Delta cysD$ , <i>Mlu</i> I, reverse	GATCACGCGTAAGGTGGACTTGCCATC
HS 1172	Primer 1 $\Delta cysI$ , <i>Xho</i> I, forward	CTCGAGATGACAACAACCACCGGAAG
HS 1170	Primer 2 $\Delta cysI$ , fusion reverse	CTGCTGAAGAGCTGATCGATGCCAGCTCATTGCCATTGCT
HS 1171	Primer 3 $\Delta cysI$ , fusion forward	CATCAGCAATGGCAATGAGCTGGCATCGATCAGCTCTTC
HS 1173	Primer 4 $\Delta cysI$ , <i>Nde</i> I, reverse	CCCTTAAGCATATGTACACCAAATCTTCCTCAG
HS 1095	Primer 1 $\Delta cgl2136$ , <i>Mlu</i> I, forward	CGACGCGTGGTCGGCGAAGAAGCCTATT
HS 1093	Primer 2 $\Delta cgl2136$ , fusion reverse	AAGATTGCTAGGCTCGCTTCCTATCATTGGTGGCGGACCG
HS 1094	Primer 3 $\Delta cgl2136$ , fusion reverse	CGGTCCGCCACCAATGATAGGAAGCGAGCCTAGCAATCT
HS 1096	Primer 4 $\Delta cgl2136$ , <i>Xba</i> I, reverse	TCCCGTCTAGATTATTAGCAGGATAAGGAGA
HS 1099	Primer 1 $\Delta cysK$ , <i>Mlu</i> I, forward	CGACGCGTCCATTTGCCTTGTTTTTCGG
HS 1097	Primer 2 $\Delta cysK$ , fusion reverse	TGGTTAACAGTCGCTAAGAAGTCGGGTGGTGTCTCCAATC
HS 1098	Primer 3 $\Delta cysK$ , fusion forward	TGATTGGAGACCACCCGACTTCTTAGCGACTGTTAACCA
HS 1100	Primer 4 $\Delta cysK$ , <i>Xba</i> I, reverse	CTAGTCTAGAGATGACGATTCCCATTCGGT
HS 1101	Primer 1 $\Delta ThioI$ , <i>Mlu</i> I, forward	CGACGCGTCCACCCTTGCTCTGAAGCCG
HS 1102	Primer 2 $\Delta ThioI$ , fusion reverse	CACACCTTACTGGCAGTGCCTAATGTGACCAAGCGCAGC
HS 1103	Primer 3 $\Delta ThioI$ , fusion forward	CGCTGCGCTTGGTCACATTACGCACTGCCAGTAAGGTGTG
HS 1109	Primer 4 $\Delta ThioI$ , <i>Sall</i> , reverse	CGACGTCGACGCGCTGCGAACCAGGCAAA
HS 1105	Primer 1 $\Delta ThioII$ , <i>Mlu</i> I, forward	CGACGCGTAGCAGGTCAAAGTAGCCGC
HS 1106	Primer 2 $\Delta ThioII$ , fusion reverse	CGCAGGAAATATGGCTTATGTACTGTATCCCAGCATATTG
HS 1107	Primer 3 $\Delta ThioII$ , fusion forward	CCAATATGCTGGGATACAGTACATAAGCCATATTTCCTGC

HS 1108	Primer 4 $\Delta$ ThioII, <i>Sall</i> , reverse	GCGTGTCTGACGATGGACTCAGGTGAAGGT
---------	---	--------------------------------

### 5.3.2 Berechnung der Annealing-Temperatur

Da sich die verwendeten Primer in Länge und GC-Gehalt unterscheiden, erfolgte für jeden Primer die Berechnung der Annealing-Temperatur nach folgender Formel:

$$T_A [^{\circ}\text{C}] = (69,3 + (0,41 \times \text{GC \%}) - (650/\text{Länge})) - 2 \quad (\text{Gl. III.1})$$

Wenn sich die beiden Primer, die für eine PCR-Reaktion eingesetzt wurden, in ihren Annealing-Temperaturen unterschieden, wurde die niedrigere der beiden Temperaturen gewählt. Zur Berechnung der Annealing-Temperatur wurden die angefügten Schnittstellen und die Fusions-Bereiche der Primer nicht einbezogen.

### 5.3.3 Reaktionsansatz

PCR-Reaktionen zur späteren Klonierung der Produkte wurden mit Hilfe der *Pfu*-DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus*, einem hyperthermophilen Archaeobakterium, durchgeführt. Diese Polymerase besitzt eine Proof-Reading Funktion (3'→5'-Exonuclease-Aktivität). Für PCR-Reaktionen, bei denen die *Pfu*-Polymerase eine zu geringe Ausbeute an PCR-Produkt lieferte, wurde ein Gemisch aus *Pfu*- und *Taq*-Polymerase eingesetzt (High Fidelity PCR Enzyme Mix). Diente die PCR-Reaktion lediglich analytischen Zwecken, wurde die *Taq*-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, einem thermophilen Bakterium, eingesetzt. Diese besitzt keine Proof-Reading Funktion, aber eine deutlich höhere Prozessivität als die *Pfu*-Polymerase. Alle PCR-Reaktionen erfolgten in einem Volumen von 50  $\mu\text{l}$ . Die verwendeten PCR-Komponenten (Polymerasen, Puffer,  $\text{MgCl}_2$ , dNTP-Mix) wurden von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) bezogen. Tabelle III-14 zeigt die Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes.

**Tab. III-14:** Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes.

Substanz	Endkonzentration	Volumen [ $\mu\text{l}$ ]
10 x Puffer <sup>a</sup>	1 x	5
10 mM dNTP Mix	0,2 mM je dNTP	1
100 $\mu\text{M}$ Primer a	1 $\mu\text{M}$	0,5
100 $\mu\text{M}$ Primer b	1 $\mu\text{M}$	0,5
Template	50 pg – 1 $\mu\text{g}$ / 50 $\mu\text{l}$	variabel
Polymerase	1,25 – 2,5 u / 50 $\mu\text{l}$	variabel
		ad 50 $\mu\text{l}$ MilliQ

<sup>a</sup> Bei Verwendung der *Pfu*-Polymerase wurde 10 x Pfu-Puffer + MgSO<sub>4</sub> eingesetzt. Bei Verwendung des High Fidelity PCR Enzyme Mix wurde 10 x High Fidelity Buffer und zusätzlich 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Endkonzentration 1,75 mM) eingesetzt. Bei Verwendung der *Taq*-Polymerase wurde 10 x *Taq*-Puffer + KCl und zusätzlich 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Endkonzentration 1,75 mM) eingesetzt.

Diente genomische DNA zur Überprüfung der 1. bzw. 2. Rekombination als Template, betrug das eingesetzte Template-Volumen 10 µl. Ein PCR-Ansatz mit Wasser als Template diente als Negativ-Kontrolle.

### 5.3.4 Reaktionszyklus

In Tabelle III-15 ist der Reaktionszyklus für die PCR-Reaktionen dargestellt. Die Elongationszeit ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Templates und der verwendeten DNA-Polymerase. Bei Verwendung der *Pfu*-Polymerase ist eine Elongationszeit von 1 Minute pro 500 bp notwendig. Für die Amplifikation von Fragmenten bis zu 2 kb durch die *Taq*-Polymerase ist eine Elongationszeit von 1 Minute ausreichend. Bei Verwendung des High Fidelity PCR Enzyme Mix wurde für 1 kb eine Elongationszeit von 1 Minute gewählt. Für analytische PCR-Reaktionen wurden 30 Reaktionszyklen durchgeführt. Bei PCR-Reaktionen zur Konstrukterzeugung wurde die Zyklenzahl zur Vermeidung von Mutationen auf 25 reduziert.

**Tab. III-15:** Reaktionsschritte für PCR-Reaktionen.

	Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit [min]
	1. Denaturierung	95	5
<b>Zyklus</b>	2. Denaturierung	95	0,5
	3. Annealing	Primer abhängig	0,5
	4. Elongation	72	Template abhängig
	5. Elongation	72	7
	6. Ende	4	∞

## 5.4 Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten in einem elektrischen Feld erfolgte mit Hilfe von 1%-igen (w/v) Agarosegelen. Als Puffersystem diente 1 x TAE-Puffer. Bei präparativen Gelen, bei denen die aufgetrennte DNA weiterverwendet werden sollte, wurden 50 µl der DNA-Lösung mit 5 µl Gelladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Für analytische Gele wurden 6 µl DNA-Lösung mit 2 µl Gelladepuffer und 13 µl Wasser verwendet. Die Trennung erfolgte für 1-1,5 Stunden bei einer Spannung von 100-130 V. Anschließend

wurden die Gele 15 Minuten in einem Ethidiumbromid-Bad gefärbt und die DNA-Ethidiumbromid-Komplexe in einem UV-Transilluminator (E.A.S.Y. Plus System, Herolab, Wiesloch, Deutschland) sichtbar gemacht (Anregung 260-360 nm, Emission bei ~ 590 nm). Als DNA-Molekulargewichtsmarker diente sowohl bei präparativen als auch bei analytischen Gelen ein 1 kb-DNA-Leiter (GeneRuler™, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland).

**Tab. III-16:** Zusammensetzung von 50 x TAE- und Gelladepuffer

<b>50 x TAE-Puffer</b>	
Tris	2 M
EDTA (100 ml 0,5 M, pH 8)	50 mM
Essigsäure (100 %)	52 ml
Ad 1 l MilliQ	
<b>Gelladepuffer Orange G</b>	
Glycerin (50%)	50 ml
EDTA (1M, pH 8)	1 ml
Orange G	75 mg

## 5.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Aufreinigung der DNA Fragmente erfolgte mit Hilfe des GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland). Mit diesem Kit lassen sich Salze, Enzyme, nicht eingebaute Nukleotide und Primer effektiv entfernen.

### 5.5.1 Aufreinigung der DNA aus Agarose-Gelen

Für den Fall, dass sich in einer DNA-Lösung neben dem zu reinigenden Fragment noch weitere Fragmente befanden, wurden die gesuchten DNA-Fragmente nach der Trennung und Färbung aus dem präparativen Agarosegel ausgeschnitten und gemäß den Angaben GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit extrahiert.

### 5.5.2 Aufreinigung der DNA aus Lösungen

Die Isolation der DNA aus Ansätzen, bei denen keine weiteren Fragmente vorhanden waren, erfolgte direkt aus der Lösung nach Angaben des GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kits.

## 5.6 Vektorkonstruktion

Eine Möglichkeit, stabile genetische Veränderungen in *C. glutamicum* zu erzeugen, ohne durch Antibiotika einen ständigen Selektionsdruck aufrechterhalten zu müssen, besteht in der Nutzung des Mechanismus der homologen Rekombination (Kirchner und Tauch, 2003). Hierzu wird zunächst durch Fusions-PCR das gewünschte Konstrukt erzeugt, welches über einen Bereich von ca. 500 - 1000 bp Homologie zu einem DNA-Abschnitt von *C. glutamicum* aufweisen sollte. Dieses wird dann in den integrativen Vektor pClik-int-*sacB* eingebracht. Das Produkt aus der Fusions-PCR wurde zunächst über ein präparatives Gel aufgetrennt und daraus reisoliert. Anschließend erfolgte ein Restriktionsverdau des Vektors und des Fusions-Konstrukts.

### 5.6.1 Restriktionsverdau von DNA

Die Restriktionsspaltung der DNA erfolgte mit Restriktionseendonucleasen der Klasse II, welche die DNA an genau definierten palindromischen Erkennungssequenzen schneiden. Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme und die entsprechenden Puffer wurden von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) bezogen. Handelte es sich um einen präparativen Verdau, so wurde dieser für 4 Stunden bei 37 °C durchgeführt. Die Inkubationszeit für analytische Verdaue betrug lediglich 2 Stunden. Die Ansätze waren wie folgt zusammengesetzt:

**Tab. III-17:** Präparativer und analytischer Verdau von DNA

	<b>Präparativ</b>	<b>Analytisch</b>
DNA	25 µl	6 µl
Restriktionsenzym 1	2 µl	0,5 µl
Restriktionsenzym 2	2 µl	0,5 µl
Puffer	5 µl	2 µl
MilliQ	ad 50 µl	ad 20 µl

### 5.6.2 5`- Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um bei der Herstellung rekombinanter Plasmide eine erneute Ligation von einfach geschnittenem Vektor zu verhindern, wurde dieser nach dem Restriktionsverdau mit alkalischer Phosphatase (Shrimp Alkaline Phosphatase SAP, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) behandelt. Diese katalysiert die Freisetzung der 5`-Phosphatgruppe der

DNA, was zur Folge hat, dass an diesem 5'-Ende keine weiteren Nukleotide mehr angebaut werden können. Der Ansatz war wie folgt zusammengesetzt:

**Tab. III-18:** Ansatz zur 5'-Dephosphorylierung von DNA

DNA	40 µl
10x Reaktionspuffer	5 µl
MilliQ	ad 49 µl
SAP	1 µl (1U)

Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde bei 37 °C. Anschließend wurde der Vektor zum Entfernen der SAP über eine GFX-Säule aus der Lösung aufgereinigt.

### 5.6.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation zur Herstellung rekombinanter Plasmide erfolgte mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland). Bei der durchgeführten Ligation handelte es sich um eine *sticky-end*-Ligation. Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert betrug ~ 1:3. Die Ligation erfolgte für 1 Stunde bei Raumtemperatur.

**Tab. III-19:** Ansätze zur Ligation von DNA-Fragmenten

Ansatz 1	Ansatz 2	Negativ-Kontrolle
1 µl Vektor	1 µl Vektor	1 µl Vektor
2 µl Insert	3 µl Insert	0 µl Insert
12 µl MilliQ	11 µl MilliQ	14 µl MilliQ
4 µl Ligase Puffer, 1 µl T4 Ligase		

## 5.7 Herstellung und Transformation Hitzeschock-kompetenter *E. coli*

*E. coli* XL1 Blue wurden bereits als kompetente Zellen von der Firma Stratagene (La Jolla, CA) bezogen. Die Herstellung kompetenter *E. coli* DH5α und NM522<sup>pTC</sup> erfolgte nach Inoue et al. (1990). Hierzu wurden 5 ml LB-Medium mit 20 mM MgSO<sub>4</sub> mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C, 230 rpm inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 2 ml dieser Kultur zum Beimpfen von 250 ml LB-Medium mit 20 mM MgSO<sub>4</sub> verwendet und bei Raumtemperatur und 230 rpm bis zu einer OD<sub>600 nm</sub> von 0,4 - 0,6 inkubiert. Die Anzucht der NM522<sup>pTC</sup> Zellen, welche vorher mit dem pTC-Plasmid

transformiert wurden, erfolgte in Gegenwart von Tetracyclin (Endkonzentration 12,5 µg/ml). Anschließend wurden die Zellen für 10 Minuten auf Eis inkubiert, in sterile Falcons überführt und 10 Minuten bei 6000 rpm, 4°C zentrifugiert (Biofuge Stratos, Heraeus, Hanau, Deutschland). Das Pellet wurde in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (10 Minuten, 6000 rpm, 4°C) wurde das Pellet in 20 ml eiskaltem TB-Puffer mit 1,5 ml DMSO resuspendiert und wiederum 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden je 200 µl der Zellsuspension in sterile Eppis überführt, in einem Trockeneis/Aceton-Bad (-70 °C) eingefroren und anschließend bei -75 °C gelagert.

**Tab. III-20:** Zusammensetzung des TB-Puffers

	Stocklösung [M]	Endkonz. [mM]
PIPES (pH 6,7)	0,5	10
CaCl <sub>2</sub>	0,5	15
KCl	2	0,25
MnCl <sub>2</sub>	1	55

sterilfiltrieren, Lagerung bei 4°C

Zur Transformation kompetenter *E. coli* Zellen mittels Hitzeschock wurden 50 µl Zellen mit 3 µl Ligationsprodukt durch vorsichtiges Umrühren mit der Pipettenspitze gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation für 45 Sekunden bei 42 °C im Heizblock. Danach wurden die Zellen sofort für 2 Minuten auf Eis gestellt und 900 µl SOC-Medium zugegeben.

### 5.7.1 Kultivierung und Selektion transformierter *E. coli*

Nach der Hitzeschocktransformation wurden die *E. coli* Zellen zur Regeneration und Expression der Antibiotika-Resistenz 1 Stunde bei 37 °C, 230 rpm in 900 µl SOC-Medium inkubiert. Dann wurden die Zellen 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert und das Medium dekantiert. Die Zellen wurden im verbleibenden Rest des Mediums resuspendiert, auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum in verschiedenen Verdünnungen ausplattiert und 1 Tag bei 37 °C bebrütet. *E. coli* mit pClik-int-*sacB*- bzw. PG-basierendem Plasmid konnten auf LB<sup>Kan</sup>-Platten selektiert werden. Enthielten die Zellen auch das pTC-Plasmid, wurde zusätzlich Tetracyclin (12,5 µg/ml) zugegeben. *E. coli* XL1 Blue mit pQE30-basierendem Plasmid wurden auf Ampicillin-haltigen (100 µg/ml) LB-Platten selektiert. Von diesen Klonen wurden außerdem Gefrierkulturen angelegt.

## 5.8 Transformation von *C. glutamicum* durch Elektroporation

Die Anzucht von *C. glutamicum* zur Elektroporation erfolgte in Vor- und Hauptkultur in angereichertem BHI<sup>++</sup>-Medium. Zunächst wurde der entsprechende Stamm auf eine CM - Agarplatte ausgestrichen und für 2 Tage bei 30 °C im Brutschrank inkubiert. Die so erhaltenen Einzelkolonien wurden zum Animpfen von 25 ml BHI<sup>++</sup>-Medium eingesetzt und über Nacht bei 30 °C und 230 rpm inkubiert. Die Hauptkultur erfolgte in 50 ml BHI<sup>++</sup> - Medium mit einer Start-OD<sub>578nm</sub> zwischen 0,3 und 0,35. Die Zellen wurden bis zu einer OD<sub>578nm</sub> von ca. 1,0 kultiviert und durch Zentrifugation (Biofuge Stratos, Heraeus, Hanau, Deutschland) bei 4°C, 4000 rpm und 7 Minuten geerntet.

Anschließend wurden die Zellen dreimal mit je 25 ml eiskaltem EP-Waschpuffer (10 % Glycerin, 8mM Tris/HCl, pH 7,4) gewaschen und in 12,5 ml eiskaltem 10 %-igem Glycerin resuspendiert. Nach erneutem Zentrifugieren (5 Minuten, 4°C, 4000 rpm) wurden die Zellen pro Gramm Pellet in 4 ml eiskaltem 10 %-igem Glycerin aufgenommen. Die folgende Elektroporation wurde mit dem Gene Pulser II der Firma BioRad (Hercules, USA) bei 2,5 kV, 25 µF und 400 Ω durchgeführt. Zunächst wurde eine Kontrolltransformation ohne DNA zur Bestimmung der Zellzahl nachfolgender Transformationen durchgeführt. Lag die Elektroporationszeit unter 8 Millisekunden, wurde nochmals 1 ml 10 %-iges Glycerin zur Zellesuspension zugefügt. Im Fall der integrativen pClik-int-*sacB* Plasmide wurden zu Elektroporation 200 µl Zellen und 5 bzw. 10 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Zur Transformation von *C. glutamicum* mit dem replikativen PG-Expressionsplasmid wurden 100 bzw. 250 ng DNA eingesetzt.

### 5.8.1 Selektion transformierter *C. glutamicum*-Zellen

Die Regeneration der Zellen erfolgte in 1 ml BHIS-Medium bei 30 °C und 300 rpm im Thermomixer für 90 Minuten (integrative Plasmide) bzw. für 70 Minuten (replikative Plasmide). Für integrative Plasmide wurde der gesamte Ansatz kurz abzentrifugiert, die Zellen anschließend in einem Volumen von ca. 200 µl resuspendiert und komplett auf BHIS<sup>Kan</sup> - Agarplatten ausplattiert. Bei replikativen Plasmiden wurden lediglich 25 bzw. 50 µl des Ansatzes ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C im Brutschrank. Die erhaltenen Klone wurden auf CM<sup>Kan</sup>-Platten überimpft und für 24 Stunden inkubiert. Für Klone mit replikativen Plasmiden wurde sofort eine Gefrierkultur angelegt. Bei der Verwendung integrativer Plasmide zur Erzeugung von Gendelektionen wurden die Klone der 1. Rekombination mittels PCR überprüft. Positive Klone sollen hierbei sowohl die

Wildtyp als auch die Knockout-Bande aufweisen. Auch diese wurden anschließend zur Konservierung in Gefrierkulturen gelagert.

### **5.8.2 Durchführung, Selektion und Überprüfung der 2. Rekombination von *C. glutamicum***

Zur Durchführung der 2. Rekombination wurden je 5 ml BHI<sup>++</sup>-Medium mit einem positiven Klon der 1. Rekombination beimpft und über Nacht bei 30 °C und 230 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit BHI<sup>++</sup> - Medium 1:1000 und 1:2000 verdünnt, 100 µl der Suspension auf CM<sup>Sac</sup>-Platten ausplattiert und für 1-2 Tage bei 30 °C im Brutschrank inkubiert. Je 50 der Saccharose-insensitiven Klone wurden mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und zunächst auf CM<sup>Kan</sup>- und dann auf CM<sup>Sac</sup>-Platten ausgetrichen und wiederum 1-2 Tage bei 30 °C inkubiert. Pro Stamm wurden jeweils 10 der Kanamycin-sensitiven und Saccharose-insensitiven Klone zur Überprüfung der 2. Rekombination mittels PCR eingesetzt. Positive Klone, die das DNA-Fragment der gewünschten Größe enthielten, wurden anschließend zur Konservierung in Gefrierkulturen gelagert.

## **6. Stammhaltung und Kultivierung**

### **6.1 Stammhaltung in Gefrierkulturen**

Für die Herstellung von Gefrierkulturen wurde *C. glutamicum* bei 30 °C und 230 rpm in 5 ml CM-Medium (bei Plasmid-tragenden Kulturen mit Kanamycin 25 µg/ml) über Nacht angezogen. Die Anzucht von Plasmid-tragenden *E. coli* XL1 Blue erfolgte in 5 ml LB<sup>Amp</sup>-Medium (Ampicillin 100 µg/ml) über Nacht bei 37°C. Am nächsten Morgen wurden 0,5 ml der Kultur mit 0,5 ml sterilem 60 %-igem Glycerin versetzt und in Kryoröhrchen bei -75 °C gelagert.

### **6.2 Kultivierung von *C. glutamicum* für physiologische Analysen**

#### **6.2.1 Vorkulturen**

Die Anzucht der Zellen erfolgte ausgehend von Gefrierkulturen auf CM-Agarplatten für 2-3 Tage bei 30 °C im Brutschrank (Innova 4230, New Brunswick Scientific, Edison, USA). Die erhaltenen Einzelkolonien wurden zur Beimpfung der ersten Vorkultur in CM-Komplexmedium eingesetzt und für 8-12 Stunden bei 30 °C und 230 rpm inkubiert (Multitron II, Infors AG, Bottmingen, Schweiz). Die Zellen der ersten Vorkultur wurden in

der exponentiellen Phase durch Zentrifugation (7000 rpm, 3 Minuten, 4 °C Labofuge 400R, Heraeus, Hanau, Deutschland) geerntet, zweimal mit steriler 0,9 %-iger NaCl-Lösung gewaschen und als Inokulum für die zweite Vorkultur eingesetzt. Die zweite Vorkultur wurde in CG 12 ½-Minimalmedium durchgeführt. Das eingesetzte Kulturvolumen betrug immer 10 % des Kolbenvolumens und es wurden schikanierte Erlenmeyerkolben verwendet. Die zweite Vorkultur wurde je nach Stamm mit einer  $OD_{660\text{ nm}}$  zwischen 0,05 – 1 beimpft und für 12-16 Stunden bei 30 °C, 230 rpm inkubiert.

### 6.2.2 Hauptkultur

Die Hauptkulturen erfolgten ebenfalls in Schüttelkolben mit 4 Schikanen in einem Volumen von 10 % des Kolbenvolumens bei 30°C und 230 rpm in CG 12 ½ - Minimalmedium. Die Kulturen wurden je nach Stamm mit einer  $OD_{660\text{ nm}}$  zwischen 0,05 – 1,0 angeimpft. Je Stamm wurden zwei parallele Kultivierungen durchgeführt.

### 6.2.3 Probennahme und Weiterbehandlung

Im weiteren Verlauf wurden in regelmäßigen zeitlichen Abständen jeweils 1 ml Probe steril entnommen und zur Bestimmung der  $OD_{660\text{ nm}}$  eingesetzt. Für weiterführende Analysen wurde der Kulturüberstand vom Zellmaterial durch Zentrifugation (5 Minuten, 13000 rpm, 4°C, Biofuge Fresco, Heraeus, Hanau, Deutschland) abgetrennt und zur Bestimmung von extrazellulären Aminosäuren, Glucose sowie organischen Säuren herangezogen.

## 6.3 Kultivierung von *E. coli* und *C. glutamicum* zur Protein-überexpression

### 6.3.1 *E. coli*

Die Cystein-Synthase CysK aus *C. glutamicum* sollte in *E. coli* XL1 Blue als N-terminale Histidin-Fusion überexprimiert und mittels  $Ni^{2+}$ -NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Mit dem Plasmid H561 pQE30 cysK (YP\_226802) 6xHis transformierte *E. coli* Zellen wurden aus einer Gefrierkultur auf  $LB^{Amp}$ -Platten ausplattiert, für 2 Tage im Brutschrank bei 30 °C bebrütet und zur Beimpfung der Vorkultur eingesetzt. Die Kultivierung erfolgte über Nacht in 10 ml DYT-Medium mit Pyridoxal-5'-Phosphat und Ampicillin in schikanierten 50 ml Erlenmeyerkolben bei 30 °C und 230 rpm.

Die Vorkultur diente zur Inokulation von 250 ml Hauptkultur mit einer  $OD_{600}$  von 0,1. Für die Hauptkultur wurde ebenfalls DYT-Medium mit Pyridoxal-5'-Phosphat und Ampicillin

verwendet. Die Kultivierung erfolgte in 2 l Schikane-Kolben bei 30 °C und 230 rpm. Die optische Dichte der Hauptkultur wurde in regelmäßigen Abständen verfolgt. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6 erfolgte die Induktion der Proteinexpression mit 0,1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG). Die Kultur wurde für weitere 4,5 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 6500 rpm für 20 Minuten bei 4 °C geerntet und das Zellpellet über Nacht bei -20 °C aufbewahrt. Es wurden zwei parallele Kultivierungen durchgeführt.

### 6.3.2 *C. glutamicum*

Die putative zweite Cystein-Synthase oder Cystathionin-β-Synthase Cgl2136 aus *C. glutamicum* sollte in *C. glutamicum* Δ*cysK* als N-terminale Histidin-Fusion überexprimiert und ebenfalls über eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Mit dem Plasmid H574/575 PG Psod *cgl2136* 6xHis transformierte *C. glutamicum* Δ*cysK* Zellen wurden aus einer Gefrierkultur auf CM<sup>Kan</sup>-Platten ausplattiert, für 2 Tage im Brutschrank bei 30 °C bebrütet und zur Beimpfung der Vorkultur eingesetzt. Die Kultivierung erfolgte über Nacht in 50 ml CM-Medium Pyridoxal-5'-Phosphat und Kanamycin in schikanierten 500 ml Erlenmeyerkolben bei 30 °C und 230 rpm. Die Vorkultur diente zur Inokulation von 250 ml Hauptkultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0,1. Als Medium wurde CG 12 ½ - Minimalmedium mit Sulfat als Schwefelquelle, versetzt mit Pyridoxal-5'-Phosphat und Kanamycin, verwendet. Die Kultivierung erfolgte in 2 l Schikane-Kolben bei 30 °C und 230 rpm. Die optische Dichte der Hauptkultur wurde in regelmäßigen Abständen verfolgt. Die Kultivierung erfolgte bis zum Ende der exponentiellen Phase. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 6500 rpm für 5 Minuten bei 4 °C geerntet und das Zellpellet über Nacht bei -20 °C aufbewahrt. Es wurden zwei parallele Kultivierungen durchgeführt.

## 7. Analytische Methoden

### 7.1 Bestimmung der Biomassekonzentration

Die Berechnung der Biomassekonzentration erfolgte aufgrund der Korrelation zwischen der optischen Dichte (OD) der Kulturflüssigkeit und der Biotrockenmassekonzentration [ $\text{g l}^{-1}$ ].

#### 7.1.1 Optische Dichte

Die optische Dichte der Kultursuspension wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 660 nm im Spektralphotometer (Spectrophotometer Novaspec<sup>®</sup>II, Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK) bestimmt. Die Proben wurden stets in Doppelbestimmung gegen Wasser als Leerwert in 1,5 ml Polystyrol-Einwegküvetten Halbmikro-Plastibrand, Wertheim, Deutschland) gemessen. Bei höheren OD-Werten wurde die Zellsuspension auf der Analysenwaage (Sartorius, Göttingen, Deutschland) mit Wasser so verdünnt, dass der sich ergebende Messwert stets im linearen Bereich zwischen 0,05 und 0,3 lag.

#### 7.1.2 Biotrockenmasse

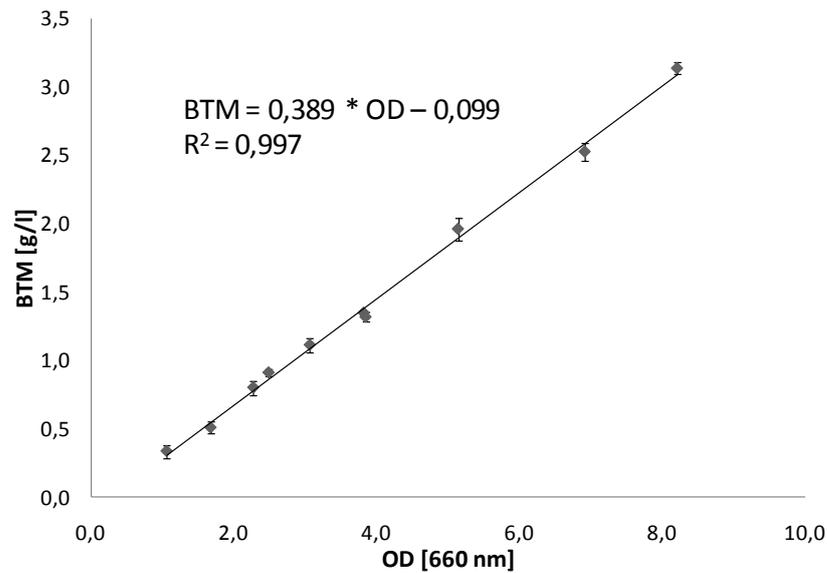
Für das verwendete Photometer und CG 12 ½ - Minimalmedium wurde folgende Korrelation zwischen optischer Dichte (OD) und Biotrockenmasse (BTM) für *C. glutamicum lysC<sup>fbr</sup>* angenommen (Krömer et al., 2004):

$$\text{BTM [g l}^{-1}\text{]} = 0,39 \times \text{OD}_{660\text{nm}} \quad (\text{Gl. III.2})$$

Für die an CG 12 ½ - Minimalmedium adaptierte Mutante *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpckΔpgi* wurde die Korrelation zwischen optischer Dichte und Biotrockenmasse mittels Geradenregression bestimmt. Hierzu wurden während der exponentiellen Wachstumsphase im Schüttelkolben simultan die optische Dichte bei 660 nm sowie die Konzentration der Biotrockenmasse bestimmt. Die OD wurde in Doppelbestimmungen (Verdünnung auf der Analysenwaage), die BTM in Dreifachbestimmungen gemessen. Hierzu wurden 15 ml Falcongefäße (Greiner PP-Zentrifugenröhrchen, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) bis zur Gewichtskonstanz bei 80 °C getrocknet (~72 Stunden), im Vakuumexsikator (Sartorius, Göttingen, Deutschland) abgekühlt und gewogen. Es wurden pro Messzeitpunkt dreimal 10 ml Kultur entnommen, gewogen und zentrifugiert (10 Minuten, 4°C, 7500 rpm, Biofuge Stratos, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland). Die Zellen wurden zweimal mit MilliQ-Wasser gewaschen und erneut zentrifugiert (10

Minuten, 4°C, 7500 rpm), 8 Tage bei 80°C getrocknet und anschließend gewogen. Die Gewichts­differenz entsprach der Biotrocken­masse im Falcon und das Probengewicht zu Anfang der Analyse dem Probenvolumen. Aus beidem lässt sich die Biotrocken­masse­konzentration in g l<sup>-1</sup> errechnen. Für die untersuchte Mutante ergab sich folgende Korrelation zwischen optischer Dichte und Biotrocken­masse (Abb. III-1, Gl. III.3):

$$\text{BTM [g l}^{-1}\text{]} = 0,389 * \text{OD}_{660\text{nm}} \quad (\text{Gl. III.3})$$



**Abb. III-1:** Korrelation zwischen optischer Dichte ( $\text{OD}_{660\text{nm}}$ ) und Konzentration der Biotrocken­masse (BTM) der an CG 12 ½ - Minimalmedium adaptierten Mutante *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpckΔpgi*. Jeder Messpunkt resultiert aus der Doppelbestimmung der OD und der Dreifachbestimmung der Biotrocken­masse.

Die an Minimalmedium adaptierte Mutante *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpckΔpgi* zeigte annähernd die gleiche Korrelation zwischen OD und BTM wie der Ausgangsstamm *C. glutamicum lysC<sup>fbr</sup>*.

## 7.2 Extraktion intrazellulärer Aminosäuren mittels schneller Filtration

Zur Konzentrationsbestimmung der intrazellulären Aminosäuren wurde die schnelle Filtrationsmethode (Wittmann et al., 2004b) angewendet. In der exponentiellen Wachstumsphase wurden zwischen 2 und 5 ml Kultursuspension steril entnommen und die Zellen durch Vakuum-Filtration (Cellulose Nitrat Filter 25 mm, 0,45  $\mu\text{m}$  Porengröße, Sartorius) vom Kulturüberstand abgetrennt. Die Zellen wurden mit 15 ml frischem Kulturmedium auf dem Filter gewaschen und der Filter anschließend in ein Plastikgefäß mit 2 ml  $\alpha$ -Aminobuttersäure-Lösung (ABU-Lösung, [197,505  $\mu\text{M}$ ]) gegeben. Die Extraktion der intrazellulären Metabolite erfolgte bei 100 °C für 15 Minuten im Wasserbad. Nach dem Abkühlen auf Eis konnte der Überstand durch Zentrifugation (5 Minuten, 13000 rpm, 4°C, Biofuge Fresco, Heraeus, Hanau, Deutschland) von den Zelltrümmern abgetrennt und zur Metabolit-Analyse mittels HPLC eingesetzt werden. Parallel zur Zellentnahme wurde die optische Dichte bestimmt. Die eingesetzten Volumina von Zellsuspension und  $\alpha$ -Aminobuttersäure-Lösung wurden gewogen und die Konzentrationen der intrazellulären Aminosäuren auf die Biotrockenmasse normiert ( $\mu\text{mol/g}_{\text{BTM}}$ ).

## 7.3 Quantifizierung von Aminosäuren mittels RP-HPLC

Die Quantifizierung der Aminosäuren in Kulturüberständen erfolgte mit Hilfe der HPLC-Anlage Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland). Die Kulturüberstände wurden hierzu 1:10 mit  $\alpha$ -Aminobuttersäure-Lösung [197,505  $\mu\text{M}$ ] als internem Standard verdünnt. Zur Kalibration wurden mit  $\alpha$ -Aminobuttersäure-Lösung verdünnte Aminosäurestandards eingesetzt. Nach einer automatischen Vorsäulenderivatisierung mit o-Phthaldialdehyd (OPA), erfolgte die Detektion der Aminosäuren mit einem Fluoreszenzdetektor (Anregung bei 340 nm, Emission bei 450 nm). Die Trennung wurde auf einer RP-Säule (Gemini 5u C18 110A, 150 x 4,6 mm) der Firma Phenomenex mit Vorsäule bei einer Flussrate von 1 ml  $\text{min}^{-1}$  und einer Säulentemperatur von 40 °C durchgeführt. Der Gradient wurde mit den beiden Eluenten A und B gefahren. Eluent A bestand aus 40 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 7,8) und Eluent B aus einem Gemisch aus Methanol, Acetonitril und Wasser im Verhältnis 45:45:10. In Tabelle III-16 ist das Zeitprofil des Gradienten dargestellt. Da Aminosäuren mit endständigen Thiolgruppen wie Cystein und Homocystein spontan zur Bildung von Disulfidbrücken neigen und dann nur noch schlecht mit o-Phthaldialdehyd derivatisiert werden können, wurden vor der OPA-Derivatisierung die Disulfidbrücken durch 0,5 % 2-

Mercaptopropionat (in 0,4 M Borat-Puffer) reduziert und anschließend eine erneute Oxidation durch eine Capping-Reaktion mit Iodacetat (50 mg/ml Iodacetat in 0,4 M Borat-Puffer) verhindert. Die Quantifizierung der Iminosäure Prolin erforderte eine zusätzliche Derivatisierung, da OPA nur mit primären Aminen reagiert. Nach Derivatisierung mit 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-chlorid (FMOC) konnte Prolin im Fluoreszenzdetektor (Anregung bei 266 nm, Emission bei 305 nm) quantifiziert werden. In Tabelle III-21 ist das Zeitprofil des Gradienten dargestellt.

**Tab. III-21:** Zeitprofil des Gradienten aus Eluent A und Eluent B bei der Auftrennung von Aminosäuren mittels HPLC

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	100	0
41,0	59	41
46,0	19	81
46,5	0	100
49,0	0	100
49,5	100	0
52,0	100	0

#### 7.4 Quantifizierung von Zuckern und organischen Säuren mittels HPLC

Die in den Kulturüberständen enthaltenen Zucker und organischen Säuren wurden mit einer HPLC-Anlage von Kroma System (Kontron Instruments, Neufahrn, Deutschland) quantifiziert. Das Einspritzvolumen der 1:10 mit ABU verdünnten Proben betrug 20 µl. Die Analyse wurde bei einer Ofentemperatur von 40 °C und einem Fluss von 0,8 ml min<sup>-1</sup> mit Hilfe eines externen Standards durchgeführt. Die Elution erfolgte isokratisch mit 7 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> über eine Aminex®-HPX-87H-Säule (300 mm x 7,8 mm). Die Detektion der Zucker erfolgte aufgrund von Änderungen im Brechungsindex mittels eines RI-Detektors (ERC-7515A, ERC Inc, Altegolfsheim bei Regensburg, Deutschland). Organische Säuren wurden über einen UV-Detektor bei 210 nm detektiert.

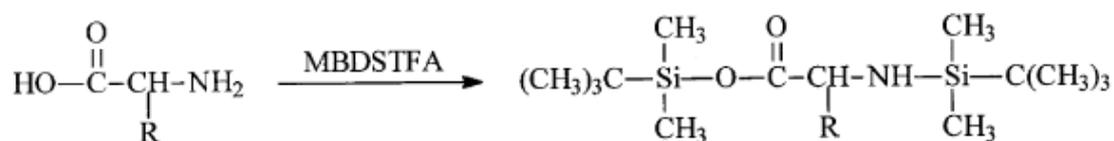
## 7.5 Markierungsexperimente

Zur Durchführung von Markierungsexperimenten wurden die zu untersuchenden Bakterienstämme auf [<sup>13</sup>C]-markierter Glucose bzw. [<sup>34</sup>S]-markiertem Thiosulfat (mit Markierung am äußeren Sulfan-Schwefel) im Schüttelkolben kultiviert. Die Zellen wurden in zwei Vor- und einer Hauptkultur kultiviert, wobei nur in der Hauptkultur markiertes Substrat eingesetzt wurde. Die Hauptkultur wurde mit einer OD<sub>660nm</sub> zwischen 0,02-0,05 gestartet und die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase durch Zentrifugation (5 Minuten, 13000 rpm, 4 °C, Biofuge Fresco, Heraeus, Hanau, Deutschland) geerntet. Zur Abtrennung extrazellulärer Metabolite und Salze wurde das Zellpellet zweimal mit Wasser gewaschen. Die Proteinhydrolyse erfolgte anschließend durch Zugabe von 6 M HCl (50 µl/g<sub>BTM</sub>). Bei Verwendung von [<sup>13</sup>C]-markierter Glucose zur Bestimmung des intrazellulären Kohlenstoffflusses wurde das Zellpellet bei 110 °C für 24 Stunden inkubiert. Zur Analyse des Markierungsmusters von Methionin bei Einsatz von [<sup>34</sup>S]-markiertem Thiosulfat wurde die Inkubation lediglich für 8 Stunden bei 110 °C durchgeführt. Die abgekühlten Proben wurden durch Zugabe von 6 M NaOH (38 µl/g<sub>BTM</sub>) neutralisiert und durch Filtration (Ultrafree-MC Centrifugal Filter Devices, Porengröße 0,22 µm, Amicon, Bioseparations, Bedford, USA) von partikulären Verunreinigungen getrennt. 50 µl des erhaltenen Hydrolysats wurden anschließend lyophilisiert und nach der Derivatisierung zur GC/MS-Messung eingesetzt.

### 7.5.1 Bestimmung der Massenisotopomerenverteilungen proteinogener Aminosäuren mittels GC/MS

Die Massenisotopomerenverteilung proteinogener Aminosäuren wurde mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) bestimmt (Wittmann et al., 2002). Die hierzu verwendete GC/MS-Anlage bestand aus dem Gaschromatographen HP 6890 GC (Hewlett Packard, Palo Alto, Californien, USA) mit einer HP-5-MS-Säule (5% Phenyl-Methyl-Siloxan-Diphenylpolysiloxan; 30 m x 0,251 mm x 0,25 µm; Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) sowie ein Quadrupol-Massenspektrometer MS 5973 (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) mit Elektronenstoßionisation bei 70 eV. Als Trägergas wurde Helium mit einer Flussrate von 1,5 ml min<sup>-1</sup> eingesetzt. Die erhaltenen Lyophilisate wurden in 50 µl Dimethylformamid (DMF) mit 0,1 % Pyridin aufgenommen und zur Derivatisierung mit 50 µl MBDSTFA (N-methyl-N-t-butyltrimethylsilyl-trifluoracetamid, Macherey&Nagel, Düren, Deutschland) versetzt und für 30 Minuten bei 80 °C inkubiert. Die Inkubation mit MBDSTFA führt zur Silylierung

aller funktionellen Gruppen (-OH, -COOH, -NH<sub>2</sub>, =NH, -SH) der Aminosäuren in deren *tert*-Butyldimethylsilyl-Derivate (TBDMS-Aminosäuren). Die entstehenden Derivate sind äußerst stabil und leicht flüchtig. Abbildung III-2 zeigt das Prinzip der Derivatisierung von Aminosäuren mit MBDSTFA.



**Abb. III-2:** Reaktion einer Aminosäure mit N-methyl-N-*t*-butyldimethylsilyltrifluoracetamid (MBDSTFA) zum korrespondierenden *t*-Butyldimethylsilyl (TBDMS)-Derivat (Wittmann et al., 2002).

Die derivatisierten Proben wurden nochmals zentrifugiert (13.000 g, 5 Minuten, 4°C, Biofuge Pico, Heraeus / Kendro, Osterode, Deutschland), um das durch Hydrolyse und Neutralisation entstandene Salz zu entfernen. Anschließend wurden die Proben mittels GC/MS analysiert. Die Trennung im Gaschromatographen erfolgte über einen Temperaturgradienten: Anfangstemperatur 130°C, dann Temperaturerhöhung von 10°C min<sup>-1</sup> auf 310°C für 19 Minuten. Das Inlet hatte eine Temperatur von 290°C, Interface und Quadrupol jeweils 320°C. Das injizierte Probenvolumen betrug jeweils 1 µl. Die Injektion erfolgte über einen Split/Splitless-Einzelinjektor im Splitless Modus. Bei der Ionisierung im Massenspektrometer zerfallen die primären Ionen in Fragment-Ionen, welche ein für das jeweilige Fragment charakteristisches Verhältnis von Masse zu Ladungszahl (*m/z*) aufweisen (Tab. III-22). Die Identifikation der jeweiligen Aminosäuren erfolgte über ihre Retentionszeit und Fragmentierungsmuster im SCAN-Modus mit einem Massenbereich von 150 bis 650 *m/z*.

**Tab. III-22:** Verhältnis zwischen Masse und Ladungszahl der einzelnen, durch Ionisation aus dem primären Ion (M) der derivatisierten Aminosäuren entstehenden Fragment-Ionen.

Analyt	M [m/z]	M-57 [m/z]	M-85 [m/z]	M-159 [m/z]
Alanin	317	260	232	158
Glycin	303	246	218	144
Valin	345	288	260	186
Leucin	359	302	274	200
Isoleucin	359	302	274	200
Serin	447	390	362	288
Threonin	461	404	376	302
Phenylalanin	393	336	308	234
Aspartat	475	418	390	316
Glutamat	489	432	404	330
Lysin	488	431	403	329
Arginin*	499*	442	414	340
Histidin	497	440	412	338
Tyrosin	523	466	438	364

\* Die Silylierung der Guanidinogruppe des Arginins verläuft unter Abspaltung von  $\text{NH}_3$  was zu einem Massenverlust von  $m/z = 17$  führt.

Für die Berechnung der relativen Massenisotopomere einer Aminosäure wurden jeweils die [M-57]-Fragmente im SIM-Modus (Selected Ion Monitoring) gemessen, da diese aufgrund sehr hoher Intensitäten eine sehr gute Bestimmbarkeit zeigten und das gesamte Kohlenstoffgerüst des Metaboliten enthalten. Für Leucin und Isoleucin wurden die [M-159]-Fragmente gemessen. Bei diesen beiden Aminosäuren kann für das [M-57]-Fragment nicht unterschieden werden, ob die Seitenkette der Aminosäure oder die  $\text{C}_4\text{H}_9$ -Gruppe des Derivatisierungs-Reagenz bei der Ionisierung abgespalten wurde, da beide die gleiche Masse besitzen.

### 7.5.2 Bestimmung des Markierungsmusters von Trehalose mittels GC/MS

Zur Analyse des Markierungsmusters von Trehalose wurden 50  $\mu\text{l}$  Kulturüberstand lyophilisiert, in 50  $\mu\text{l}$  Pyridin aufgenommen und durch Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  BSTFA (N,O-bis(trimethylsilyl)trifluor-acetamid, Macherey&Nagel, Düren, Deutschland) und Inkubation für 30 Minuten bei 80 °C derivatisiert. Durch die Derivatisierung wurden alle funktionellen Gruppen von Trehalose zu Trimethylsilylderivaten umgesetzt. Die

derivatisierten Proben wurden zur Abtrennung von Salzen zentrifugiert und in GC-Vials überführt. Die anschließende Trennung und Ionisierung erfolgten analog zur Aminosäureanalytik. Die Analyse des Markierungsmusters erfolgte anhand des Ionenclusters  $m/z = 361-367$ . Dieses Fragment enthält eine vollständige Monomereinheit der Trehalose und somit das Kohlenstoffgerüst von Glucose-6-Phosphat. Die Messung wurde mit oben beschriebener Anlage durchgeführt, wobei folgender Temperaturgradient gefahren wurde: 150 °C für 4 Minuten, Temperaturerhöhung um 8°C pro Minute auf 310 °C für 25 Minuten. Das Inlet hatte eine Temperatur von 300°C, Interface und Quadrupol jeweils 320°C.

### 7.5.3 Automatische Integration und Isotopenkorrektur von GC/MS Daten

Die Integration der im SIM-Modus erhaltenen GC/MS-Daten zur Bestimmung der relativen Massenisotopomere einer Aminosäure erfolgte mit Hilfe eines auf MATLAB R2007b basierenden Programmes, welches durch Prof. Elmar Heinzle erstellt wurde. Hierbei wurde außerdem eine Massenisotopenkorrektur der gemessenen Substanzen durchgeführt, die aufgrund des Vorhandenseins natürlicher Isotope notwendig (Yang et al., 2009) ist .

### 7.6 Spezifische Raten und Ausbeutekoeffizienten

#### *Spezifische Wachstumsrate*

Durch die Bestimmung der  $OD_{660nm}$  konnten Wachstumsraten ermittelt werden. Die Wachstumsrate  $\mu$  [ $h^{-1}$ ] als Maß für die Geschwindigkeit des Zellwachstums ist für einen bestimmten Mikroorganismus spezifisch. Sie kann durch Ableitung der Funktion des Logarithmus der optischen Dichte über die Zeit berechnet werden nach:

$$\mu [h^{-1}] = \frac{d \ln OD_{660}}{dt} \quad (\text{Gl. III. 4})$$

#### *Spezifische Substrataufnahmerate*

Die spezifische Substrataufnahmerate  $q_s$  [ $mmol \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ ] wurde berechnet durch die Division der zeitlichen Änderung der Substratkonzentration  $S$  [ $mmol \cdot l^{-1}$ ] durch die mittlere Biomassekonzentration  $X$  [ $g \cdot l^{-1}$ ] nach:

$$q_s [mmol \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}] = \frac{dS}{dt} \cdot \frac{1}{X} \quad (\text{Gl. III. 5})$$

**Spezifische Produktbildungsrate**

Die spezifische Produktbildungsrate  $q_P$  [ $\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ] wurde berechnet durch die Division der zeitlichen Änderung der Produktkonzentration  $P$  [ $\text{mmol l}^{-1}$ ] durch die mittlere Biomassekonzentration  $X$  [ $\text{g l}^{-1}$ ] nach:

$$q_P [\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}] = \frac{dP}{dt} \cdot \frac{1}{X} \quad (\text{Gl. III. 6})$$

**Biomasseausbeutekoeffizient**

Der Ausbeutekoeffizient  $Y_{X/S}$  [ $\text{g mmol}^{-1}$ ] für die während der Kultivierung gebildete Biomasse wurde berechnet durch die Division der zeitlichen Änderung der Biomassekonzentration  $X$  [ $\text{g l}^{-1}$ ] durch die zeitliche Änderung der Substratkonzentration  $S$  [ $\text{mmol l}^{-1}$ ] nach:

$$Y_{X/S} [\text{g} \cdot \text{mmol}^{-1}] = \frac{dX/dt}{dS/dt} \quad (\text{Gl. III. 7})$$

**Produktausbeutekoeffizient**

Der Ausbeutekoeffizient  $Y_{P/S}$  [ $\text{mol mol}^{-1}$ ] für die während der Kultivierung gebildeten Produkte wurde berechnet durch die Division der zeitlichen Änderung der Produktkonzentration  $P$  [ $\text{mol l}^{-1}$ ] durch die zeitliche Änderung der Substratkonzentration  $S$  [ $\text{mol l}^{-1}$ ] nach:

$$Y_{P/S} [\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}] = \frac{dP/dt}{dS/dt} \quad (\text{Gl. III. 8})$$

**7.7 <sup>13</sup>C-Metabolische Flussanalyse**

Die Bestimmung der intrazellulären Stoffflüsse wurde mittels [<sup>13</sup>C]-Metabolischer Flussanalyse durchgeführt. Die mathematische Modellierung umfasste dabei sämtliche zentralen Stoffwechselwege wie Glykolyse, Pentosephosphatweg, Tricarbonsäurezyklus und anaplerotische Carboxylierungen. Zusätzlich wurden Stoffwechselwege für die Bildung von Trehalose, Dihydroxyaceton (DHA), Glycin, Lactat, Lysin und Glutamat eingeführt sowie die Biomassebildung aus Intermediaten des Zentralmetabolismus implementiert. Die Modellierung umfasste sämtliche extrazellulär bestimmbar Substrataufnahme- und Produktbildungsraten sowie die Markierungsmuster der proteinogenen Aminosäuren und von Trehalose. Aus den Markierungsmustern dieser Analyte wurden die Massenisotopomerverteilungen charakteristischer Intermediate des Zentralmetabolismus abgeleitet, welche Vorläufermoleküle zur Biosynthese dieser

Bestandteile darstellen. Zusätzlich wurde der anabole Bedarf an Intermediaten des Zentralstoffwechsels für die Bildung von Biomasse berücksichtigt. Die Berechnung des anabolen Bedarfs an Biomassevorstufen erfolgte aufgrund von Literaturdaten über die Biomassezusammensetzung von *Corynebacterium glutamicum* (Cocaign-Bousquet und Lindley, 1995; Eggeling L., 2005; Marx et al., 1996). Durch Multiplikation des anabolen Bedarfs an Biomassevorläufern  $[\text{mmol}_{\text{Vorläufer}} \text{g}^{-1}_{\text{BTM}}]$  mit dem Biomasseausbeutekoeffizienten  $Y_{X/S} [\text{g}_{\text{BTM}} \text{mmol}_{\text{Substrat}}^{-1}]$  wurde dieser Wert auf die Substrataufnahme normiert und in der Flussbestimmung eingesetzt.

Für die Flussberechnung wurden jeweils Daten aus zwei parallelen Kultivierungen kombiniert. Hierbei wurden die Flussparameter in der Simulation variiert, bis die Abweichung zwischen experimentell bestimmten und simulierten Markierungsverteilungen minimal war. Als zu minimierender Parameter diente die gewichtete Summe der kleinsten Fehlerquadrate. Die Simulation für die metabolische Flussanalyse von *C. glutamicum* wurde mit Hilfe eines von Dr. Tae Hoon Yang entwickelten mathematischen Modells (Yang et al., 2008) unter Verwendung von MATLAB R2007b (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA) durchgeführt. Hierbei wurde die Methode der Isotopomeren-Bilanzierung (Wiechert und de Graaf, 1997) unter anschließender Anwendung des EMU-Dekompositionsalgorithmus verwendet (Antoniewicz et al., 2007). Zur statistischen Absicherung der berechneten Flüsse wurde eine Monte-Carlo-Analyse mit 100 Läufen durchgeführt und von den so erhaltenen Daten 90 %-Konfidenzintervalle berechnet.

## 7.8 Bilanzen

### *Kohlenstoffbilanz*

Zur Validierung der Analytik wurde für die  $^{13}\text{C}$ -Tracerkultivierungen von *C. glutamicum* eine Massenbilanz für Kohlenstoff aufgestellt. Hierzu wurden alle gemessenen kohlenstoffhaltigen Substrate und Produkte erfasst und in C-mol umgerechnet.

Der prozentuale molare  $\text{CO}_2$ -Produktionsfluss wurde anhand der erstellten Flusskarten berechnet. Dabei wurden alle  $\text{CO}_2$ -produzierenden und  $\text{CO}_2$ -verbrauchenden Reaktionen des Zentralmetabolismus und des Anabolismus berücksichtigt. Bei den  $\text{CO}_2$ -produzierenden Reaktionen handelt es sich um die Reaktionen der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase des PPP, der Pyruvat-Dehydrogenase, der Isocitrat-Dehydrogenase und der  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase des TCA-Zyklus. Zusätzlich kommt es zur  $\text{CO}_2$ -Bildung durch die Sekretion von Lysin und durch den Anabolismus. Während alle Reaktionen genaue stöchiometrische Werte liefern, wurde die anabole  $\text{CO}_2$ -Produktion für *C.*

*glutamicum* aus der Biomasseausbeute [g/mol] und der biomassespezifischen CO<sub>2</sub>-Produktion von 1025 μmol/g<sub>BTM</sub> abgeschätzt (Yang et al., 2005). Der anaplerotische CO<sub>2</sub>-Produktionsfluss wurde anhand der Differenz der Hin- und Rückflüsse zwischen C<sub>3</sub>-Pool (PEP/Pyruvat) und C<sub>4</sub>-Pool (Oxalacetat/Malat) berechnet. Anhand des prozentualen molaren CO<sub>2</sub>-Produktionsflusses wurden die CO<sub>2</sub>-Menge in C-mol und ausgehend davon der CO<sub>2</sub>-Anteil am Gesamtkohlenstoff in C-mol C-mol<sup>-1</sup> berechnet.

### ***NADPH-Bilanz***

NADPH-Bildung und Verbrauch können anhand der erhaltenen Flusskarten berechnet werden. Im Zentralstoffwechsel von *C. glutamicum* wird die Bereitstellung von NADPH vorwiegend von drei Enzymen übernommen: der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase des PPW (je 1 mol) und der NADP<sup>+</sup>-abhängigen Isocitrat-Dehydrogenase (1 mol) des TCA-Zyklus. Die minimale NADPH-Bildung ergibt sich aus der Summe der prozentualen molaren Flüsse durch den PPW und den TCA-Zyklus. Eine weitere Quelle für NADPH stellt das Malatenzym (1 mol) dar (Dominguez et al., 1998). Je nach verwendetem Flussmodell ist allerdings keine Unterscheidung zwischen Malat und Oxalacetat sowie PEP und Pyruvat möglich, weshalb der Fluss vom C<sub>4</sub>- zum C<sub>3</sub>-Pool nicht eindeutig der Aktivität des Malatenzyms zugeordnet werden kann (Wittmann und Heinzle, 2001b). Wird der gesamte Fluss vom C<sub>4</sub>- zum C<sub>3</sub>-Pool der Aktivität des Malatenzyms zugeschrieben, lässt sich ein maximaler Wert für die NADPH-Bildung angeben. Der NADPH-Bedarf wird aus der Summe des Bedarfs für die beiden Hauptprodukte der untersuchten Stämme, Biomasse und Lysin, berechnet. Während die NADPH-Bildung durch den PPW, den TCA-Zyklus und durch das Malatenzym sowie der Bedarf zur Lysinsynthese (4 mol) genaue stöchiometrische Werte liefern, wurde der NADPH-Bedarf für die Biomassebildung aus der Biomasseausbeute [g/mol] und dem biomassespezifischen NADPH-Bedarf von 16,4 mmol/g<sub>BTM</sub> abgeschätzt (Wittmann, 2005).

### ***NADH-Bilanz***

Die Berechnung der NADH-Bildung erfolgte ebenso anhand der Flusskarten. Dabei wurden die Flüsse der NADH bildenden Enzyme Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Pyruvat-Dehydrogenase, α-Ketoglutarat-Dehydrogenase und Malat-Dehydrogenase (Wittmann et al., 2004a). Die anabole NADH-Produktion wurde aus der Biomasseausbeute [g/mol] und der biomassespezifischen NADH-Bildung von 3,2 mmol/g<sub>BTM</sub> (Yang et al., 2006) abgeschätzt. Die Berechnung des NADH-Verbrauchs

erfordert die Analyse der CO<sub>2</sub>-Bildung bzw. des Sauerstoffverbrauchs (Yang et al., 2006), was in dieser Arbeit jedoch nicht durchgeführt wurde.

### ***ATP-Bilanz***

Analog zur NADPH-Bilanz kann auch eine ATP-Bilanz erstellt werden. Die ATP-Bildung erfolgt in Glykolyse, TCA-Zyklus und Atmungskette, wobei letztere den Großteil der ATP-Bildung übernimmt. Die Anzahl der in Glykolyse (Phosphoglycerat-Kinase und Pyruvat-Kinase) und TCA-Zyklus (Succinyl-CoA-Synthetase) gebildeten ATP-Moleküle wird aus der Stöchiometrie der chemischen Reaktionen bestimmt. Die Ausbeute in der oxidativen Phosphorylierung steht dagegen nicht eindeutig fest, da die Stöchiometrien der Protonenpumpen bei der ATP-Synthese und dem Transport von Molekülen keine festen Werte einnehmen und auch nicht ganzzahlig sein müssen (Stryer, 2003). Die in dieser Studie durchgeführte Ausbeuteberechnung der oxidativen Phosphorylierung erfolgte anhand des P/O-Quotienten (P/O = 2 für NADH und P/O = 1 für FADH) (Krömer et al., 2006b). Dieser Quotient gibt an, wie viel mol ATP pro Grammatom Sauerstoffverbrauch gebildet wird. Der ATP-Verbrauch in der Glykolyse durch die Enzyme Hexokinase und Phosphofruktokinase wurde anhand der prozentualen molaren Flüsse berechnet. Der ATP-Verbrauch für den Anabolismus wurde aus der Biomasseausbeute [g/mol] und dem biomassespezifischen ATP-Bedarf von 17 mmol ATP/g<sub>BTM</sub> abgeschätzt (Krömer et al., 2006b). Zusätzlich wurde der ATP-Bedarf von 2 mol ATP je mol Lysin berücksichtigt.

## 8. Biochemische Methoden

### 8.1 Proteinaufreinigung

#### 8.1.1 Zellaufschluss von *E. coli* und *C. glutamicum*

Der Aufschluss von *E. coli* erfolgte enzymatisch mittels Lysozym. Hierzu wurde das Zellpellet 15 Minuten auf Eis aufgetaut, in 10 ml nativem Lyse-Puffer resuspendiert und anschließend für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Während der Inkubation wurde die Zellsuspension 3-mal vorsichtig durch Invertieren gemischt. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (30 Minuten, 8500 rpm, 4 °C, Labofuge 400R, Heraeus, Hanau, Deutschland) abgetrennt und der Überstand zur Proteinaufreinigung weiterverwendet. Der Aufschluss von *C. glutamicum* erfolgte mechanisch mittels Ultraschall. Hierzu wurde das Zellpellet 15 Minuten auf Eis aufgetaut und in nativem Aufschluss-Puffer (4 ml Puffer / g Zellen) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen (5 x 15 Sekunden, 20 microns, auf Eis). Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (2 x 30 Minuten, 8500 rpm, 4 °C, Labofuge 400R, Heraeus, Hanau, Deutschland) abgetrennt und der Überstand zur Proteinaufreinigung weiterverwendet. Tabelle III-23 zeigt die Zusammensetzung des Aufschluss-Puffers. Die Zusammensetzung des Lyse-Puffers war dieselbe, allerdings enthielt dieser Lysozym (100 µl Lysozym-Lösung (0,1 mg/µl) in 10 ml Puffer, Qiagen, Hilden, Deutschland).

**Tab. III-23:** Zusammensetzung des Aufschluss-Puffers

<b>Aufschluss-Puffer, pH 8</b>	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	10 mM

Zu 10 ml Puffer wurden 10 µl einer Benzonase-Nuklease-Lösung (2000 U) zugegeben (Qiagen, Hilden, Deutschland). Benzonase-Nuklease ist eine genetisch veränderte Endonuklease aus *Serratia marcescens* und ist in der Lage, alle Formen von DNA und RNA zu degradieren (einzelsträngig, doppelsträngig, linear, zirkulär). Der Abbau der DNA und RNA dient der Reduzierung der Viskosität des Zellextrakts. Des Weiteren wurden zu 10 ml Puffer 100 µl eines Protease Inhibitor Cocktails (P8849-1ML, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) zur Aufreinigung von Proteinen mit His-Tag zugegeben.

Außerdem wurden zu 10 ml Puffer 100 µl einer Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP)-Stocklösung (0,1 mg/ml) zugefügt.

### 8.1.2 Proteinaufreinigung mittels Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie

Fusionsproteine mit 6xHis-Tag lassen sich leicht und schnell mittels Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie reinigen. Die Histidin-Reste können zweiwertige Kationen wie Ni<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> und Cu<sup>2+</sup> komplexieren. In der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Chromatographie sind zweiwertige Ni<sup>2+</sup>-Ionen über vier ihrer sechs Bindungsstellen an Nitrilotriessigsäure (NTA), einem vierzähligen Liganden, der an die Agarose-Matrix gekoppelt ist, gebunden. Histidinreste der rekombinanten Proteine können an die beiden verbleibenden Bindungsstellen des Ni<sup>2+</sup>-Ions über ihre Imidazolringe binden, wodurch die Proteine an der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säule immobilisiert werden. Imidazol alleine, eine Teilstruktur von Histidin, bindet ebenfalls an Ni<sup>2+</sup>-Ionen und kann zur Elution gebundener Proteine verwendet werden. Bei einer Imidazolkonzentration von 100-250 mM eluieren die 6xHis-Proteine von der Säule, da sie nicht länger mit Imidazol konkurrieren können. Sowohl CysK als auch Cgl2136 wurden mit Hilfe des Ni<sup>2+</sup>-NTA Fast Start Kits der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) gemäß der beiliegenden Anleitung gereinigt. Alle Aufreinigungsschritte erfolgten bei 4 °C unter nativen Bedingungen. Folgende Puffer wurden verwendet (Tab. III-24).

**Tab. III-24:** Zusammensetzung des Wasch- und Elutionspuffers

	Waschpuffer, pH 8	Elutionspuffer, pH 8
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM	50 mM
NaCl	300 mM	300 mM
Imidazol	20 mM	250 mM

Zur Verminderung unspezifischer Bindungen von Proteinen an die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix enthielten sowohl der Aufschluss- als auch der Waschpuffer eine geringe Imidazolkonzentration. Die Pufferlösungen hatten einen pH-Wert von 8, da bei diesem pH-Wert der Imidazol-Ring des Histidins ungeladen vorliegt und so mit den Ni<sup>2+</sup>-Ionen interagieren kann.

### 8.1.3 Umpufferung und Aufkonzentrieren gereinigter Proteine

Die Umpufferung der Proteinlösungen erfolgte durch zweimaliges Waschen mit Kaliumphosphat-Puffer (100 mM, pH 7,8) und war nötig, um das im Eluat vorhandene Imidazol zu entfernen, da dieses die Proteinbestimmung mittels Bradford-Assay stört. Zur Ultrafiltration wurden 4 ml Gefäße mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa (Vivaspin 4, VS0403, Sartorius, Göttingen, Deutschland) verwendet. Nach erfolgtem Umpuffern und Einengen wurde eine Proteinbestimmung mittels Bradford-Assay durchgeführt. Anschließend wurde die Proteinlösung mit 10 % Glycerin versetzt, aliquotiert und bei – 75 °C eingefroren.

## 8.2 SDS-PAGE

Zur Überprüfung des Erfolgs der Aufreinigung der beiden Enzyme wurden die Aufreinigungsfraktionen mittels SDS-PAGE analysiert. Es wurde eine Bio-Rad Mini Protean III Anlage (Bio-Rad, Hercules, USA) verwendet.

### 8.2.1 Gele

Die Protein-Auftrennung erfolgte mit Hilfe von 4%-igen Sammel- und 12,5 %-igen SDS-Trenngelen (12 x 8 cm). Die Herstellung der Gele kann Tabelle III-25 entnommen werden.

**Tab. III-25:** Herstellung von zwei 12,5-%igen Trenn- und zwei 4-%igen Sammelgelen

Lösungen	12,5 %-iges Trenngel	4%-iges Sammelgel
H <sub>2</sub> O	3,2 ml	3,05 ml
30% Acrylamid/Bisacrylamid	4,1 ml	0,65 ml
1,5 M Tris pH 8,8	2,5 ml	---
0,5 M Tris pH 6,8	---	1,25 ml
10 % SDS	100 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl
10 % APS	50	50 µl

Nach dem Gießen des Trenngels wurde dieses mit Isopropanol überschichtet und für 30 Minuten polymerisieren gelassen. Danach wurde das Isopropanol abgegossen und das Gel nacheinander mit MilliQ und Tris-Puffer (0,5 M, pH 6,8) gewaschen. Anschließend wurde das Sammelgel gegossen und für 10 Minuten polymerisieren gelassen.

### 8.2.2 Denaturierung der Proben

Vor dem Auftragen der Proben auf das SDS-PAGE Gel wurden diese nach Zugabe von SDS-Probenpuffer (Tab. III-26) im Verhältnis 1:1 (Probe: Puffer) für 5 Minuten im Wasserbad gekocht. Die Denaturierung der Proteine erfolgte durch die Einwirkung von  $\beta$ -Mercaptoethanol, SDS und durch die Hitze.

**Tab. III-26:** Zusammensetzung des SDS-Probenpuffers

<b>SDS-Probenpuffer</b>	
500 mM Tris HCl pH 6,8	4 ml
Glycerin	5 ml
SDS	0,1 g
Bromphenolblau (in Ethanol, 3 % w/v)	0,6 ml
$\beta$ -Mercaptoethanol	2,5 ml
→ Ad 50 ml mit Milli Q; aliquotieren; bei -20°C lagern	

Es wurden 5  $\mu$ l jeder Aufreinigungsfraction auf das Gel aufgetragen. Zum Größenvergleich der aufgetrennten Banden wurden 10  $\mu$ l des Molekulargewichtsmarkers 161-0374 (Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Dual Color Standards, Bio-Rad, Hercules, USA) verwendet.

### 8.2.3 Trennung der Proteine

Nach Auftragen der Proben erfolgte zunächst eine Konzentration der Proteine im Sammelgel bei 100 V für 5 Minuten. Die Trennung der Proteine wurde bei 150 V solange durchgeführt, bis das leichteste Protein des Markers das Ende des Gels erreicht hatte (ca. 1 Stunde). Tabelle III-27 zeigt die Zusammensetzung des Laufpuffers.

**Tab. III-27:** Zusammensetzung des SDS-Laufpuffers

<b>5 x SDS-Laufpuffer</b>	
Glycerin	72 g
Tris	15 g
SDS	5 g
→ Ad 1 l mit Milli Q, pH 8,3;	

### 8.2.4 Färbung

Zur Färbung der Gele wurden die Proteine zunächst für 10 Minuten im Gel fixiert und anschließend für 20 Minuten mit Coomassie brilliant blue gefärbt. Danach wurden die Gele mit Entfärber behandelt, bis deutliche Banden sichtbar wurden. Tabelle III-28 zeigt die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen.

**Tab. III-28:** Zusammensetzung von Fixier-, Färbe-, und Entfärber-Lösung

	Fixier-Lösung	Färbe-Lösung	Entfärber-Lösung
Ethanol	30 %		5 %
Essigsäure	10 %	10 %	10 %
Methanol		40 %	
Glycerin		2 %	
Coomassie G-250,		0,005 % , 0,2 % in	
Coomassie R-25		10 % Ethanol	
→ Ad 1 l mit Milli Q			

## 8.3 Bestimmung von Enzymaktivitäten

### 8.3.1 Zellaufschluss zur Bestimmung von Enzymaktivitäten in Zellextrakten

Die Anzucht der Zellen erfolgte, wie oben beschrieben, in zwei Vor- und einer Hauptkultur. Für die Hauptkultur wurde ein Volumen von 50 ml (500 ml-Schikanekolben) eingesetzt. Die Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet (5 Minuten, 6500 rpm, 4°C, Labofuge 400R, Heraeus, Hanau, Deutschland) und zweimal mit Aufschlusspuffer (100 mM Tris, 10 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, pH 7,5, 4°C) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 4 ml Aufschlusspuffer pro g Zellpellet resuspendiert und es wurde DTT (Dithiothreitol) in einer Endkonzentration von 0,75 mM zugegeben. Der Zellaufschluss erfolgte mit Hilfe einer Schwingmühle (2 x 5 Minuten, 30 Hz, 4°C; MM301, Retsch, Hahn, Deutschland). Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (15 Minuten, 8500 rpm, 4°C, Labofuge 400R, Heraeus, Hanau, Deutschland) abgetrennt und der Überstand wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration und der Enzymaktivitäten eingesetzt.

### 8.3.2 Bestimmung der Proteingesamtkonzentration

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration erfolgte colorimetrisch mit Hilfe des Bradford-Assays (Bradford, 1976) anhand einer Eichgeraden für Rinderserumalbumin. Dieser Assay beruht auf einem Absorptionsshift der Farbreagenzlösung von 465 nm auf 595 nm. Ursache für den Shift ist die Bindung von Coomassie brilliant blue an Proteine im sauren Milieu. Das von Biorad bezogene Bradford-Reagenz (Phosphorsäure, Methanol, Coomassie brilliant blue) wurde dazu 1:5 mit H<sub>2</sub>O verdünnt und anschließend zur Proteinbestimmung eingesetzt. Die Messung erfolgte in 1,5 ml Polystyrol-Einwegküvetten (Halbmikro-Plastibrand, Wertheim, Deutschland) mit 20 µl zuvor mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> verdünnten Zellextrakt und 1 ml Bradford-Reagenz. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm gemessen.

### 8.3.3 Enzymassays

Die Berechnung der Enzymaktivitäten erfolgte mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes. Dieses Gesetz besagt, dass bei bekanntem molarem Extinktionskoeffizienten und bekannter Schichtdicke aus einer gemessenen Absorptionsänderung die Konzentrationsänderung einer chemischen Verbindung pro Zeit berechnet werden kann (Gleichung III.9).

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (\text{Gl. III. 9})$$

$\varepsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient [ $\text{l cm}^{-1} \text{mol}^{-1}$ ]

$c$  = molare Konzentration des gelösten Stoffes [ $\text{mol l}^{-1}$ ]

$d$  = Schichtdicke [cm]

Für die Änderung der NAD(P)H-Konzentration pro Zeiteinheit ergibt sich daraus:

$$\frac{\Delta c_{\text{NAD(P)H}}}{\Delta t} = \frac{\Delta A_{340\text{nm}}}{\varepsilon_{\text{NAD(P)H}} \cdot d \cdot \Delta t} \quad (\text{Gl. III. 10})$$

$t$  = Zeit [min],  $\varepsilon_{\text{NAD(P)H}} = 6,22 \text{ l} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die Aktivität eines Enzyms wird in µmol des umgesetzten Substrates pro Minute (= 1 Unit [U]) angegeben. Die spezifische Aktivität eines Enzyms gibt die Enzymaktivität pro mg Enzym an (Einheit [U/mg]). Sie lässt sich durch Kenntnis der eingesetzten Proteinmenge berechnen. Die Messungen erfolgten mit Hilfe eines Photometers (Helios, Spectronic Unicam, UK) in einem Arbeitsvolumen von 1 ml in 1,5 ml Polystyrol-Einwegküvetten bei 30°C gegen Wasser als Leerwert.

### ***Pyruvat-Kinase Assay***

Bei der Bestimmung der Pyruvat-Kinase Aktivität (Netzer et al., 2004) wird PEP durch die Pyruvatkinase zu Pyruvat umgesetzt, welches in einer gekoppelten Enzymreaktion durch die Lactat-Dehydrogenase (LDH) zu Lactat reduziert wird. Dabei wird NADH verbraucht, was durch eine Absorptionsabnahme bei 340 nm direkt verfolgt werden kann. Der Assay wurde bei pH 7 durchgeführt und enthielt 100 mM Tris/HCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ADP, 1 mM NADH, 0,25 mM NADH, 12 mM PEP, 5.5 U LDH und 10 µl Zellextrakt. Als Negativkontrollen dienten Ansätze ohne PEP bzw. ohne Zellextrakt.

### ***PEP-Carboxylase und PEP-Carboxykinase Assay***

Die Bestimmung der PEP-Carboxykinase bzw. PEP-Carboxylase Aktivität erfolgte nach Jetten et al. (1993). Die PEP-Carboxykinase Aktivität (PEP-CK) wird in einem gekoppelten Enzymtest mit Hilfe der Malat-Dehydrogenase (MDH) bestimmt. Durch die Aktivität der PEP-CK wird PEP zu OAA umgesetzt, das dann durch MDH zu Malat reduziert wird. Als Cofaktor der MDH dient NADH, welches dabei oxidiert wird. Die Aktivität der PEP-CK lässt sich daher anhand der Absorptionsabnahme bei 340 nm verfolgen. Um die PEP-Carboxylaseaktivität zu hemmen, wird Aspartat zugegeben. Die Aktivitätsbestimmung der PEP-CX erfolgt nach dem gleichen Prinzip. Um die PEP-CK Aktivität beim Test auszuschließen, wird dem Test allerdings kein Inosindiphosphat (IDP) zugegeben. Der Ansatz zur Bestimmung der PEP-CX(K) Aktivität enthielt 80 mM MOPS/HCl, pH6,6 mit 40 mM KHCO<sub>3</sub>, (30 mM Aspartat), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM Glutathion, 0,5 mM NADH, (2,5 mM IDP), 10 U MDH, 10 mM PEP, und 50 µl Zellextrakt. Als Negativkontrollen dienten Ansätze ohne PEP bzw. ohne Zellextrakt.

### ***Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Assay***

Glucose-6-Phosphat wird durch die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase mit NADP<sup>+</sup> als Cofaktor, zum Phosphogluconolacton (PGL) und NADPH umgesetzt. Die Messung der Enzymaktivität beruht dabei auf der Absorptionszunahme von NADPH bei 340 nm (Moritz et al., 2000). Der Assay enthielt 100 mM Tris/HCl, (pH 7,8), 100 mM KCl, 5 mM Glucose-6-Phosphat, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM NADP<sup>+</sup> und 50 µl Zellextrakt (Moritz et al., 2000). Als Negativkontrollen dienten Ansätze ohne Glucose-6-Phosphat bzw. ohne Zellextrakt.

### ***Malatenzym Assay***

Malat wird durch das Malatenzym mit NADP als Cofactor zu Pyruvat und NADPH umgesetzt. Die Messung der Enzymaktivität beruht dabei auf der Absorptionzunahme von NADPH bei 340 nm (Dominguez et al., 1998). Der Assay enthielt 100 mM Tris/HCl (pH 7,8) mit 200 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM NADP<sup>+</sup>, 40 mM Malat und 50 µl Zellextrakt. Als Negativkontrollen dienten Ansätze ohne Malat bzw. ohne Zellextrakt.

### ***Isocitrat-Dehydrogenase Assay***

Isocitrat wird mit NADP<sup>+</sup> als Cofactor durch die Isocitrat-Dehydrogenase zu  $\alpha$ -Ketoglutarat, CO<sub>2</sub> und NADPH umgesetzt. NADPH ist die Messgröße und wird aufgrund seiner Absorption bei 340 nm bestimmt (Holms und Bennett, 1971). Der Ansatz enthielt 32,5 mM Tris/HCl (pH 7,5) 0,2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,8 mM NADP<sup>+</sup>, 1 mM D-threo-Isocitrat und 50 µl Zellextrakt. Als Negativkontrollen dienten Ansätze ohne D-threo-Isocitrat bzw. ohne Zellextrakt.

### ***Isocitrat-Lyase Assay***

Isocitrat wird durch die Isocitrat-Lyase zu Glyoxylat und Succinat gespalten. Glyoxylat wird anschließend in einer gekoppelten Enzymreaktion durch die Lactatdehydrogenase (LDH) zu Glycolat reduziert. Dabei wird NADH verbraucht, was durch die Absorptionsabnahme bei 340 nm direkt verfolgt werden kann (Wendisch et al., 1997). Der Ansatz enthielt 50 mM MOPS (pH 7,3), 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25 mM NADH, 5 mM DTT, 1 mM EDTA, 8 U LDH (PIG Heart Isoenzym I), 5 mM D-threo-Isocitrat und 50 µl Zellextrakt. Als Negativkontrollen dienten Ansätze ohne D-threo-Isocitrat bzw. ohne Zellextrakt.

### ***Cystein-Synthase und S-Sulfocysteinsynthase Assay***

Bei der Cystein-Synthase-Reaktion wird O-Acetylserin und Sulfid zu Cystein umgesetzt. Die S-Sulfocystein-Synthase setzt O-Acetylserin und Thiosulfat zu S-Sulfocystein um. Die Messung von Cystein sowie von S-Sulfocystein erfolgte mittels HPLC. Der Assay wurde in Anlehnung an Wada et. al (Wada et al., 2004) durchgeführt. Der Ansatz enthielt 50 mM Tris/HCl (pH 7,2), 2 mM DTT, 0,4 mM Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP), 10 mM O-Acetylserin und 2,5 mM Na<sub>2</sub>S bzw. 10 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Die Ansätze wurden bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Enzyme durch Zentrifugation für 10 Minuten, 13.000 rpm bei 4°C mit Hilfe von Filtereinsätzen mit einer Ausschlussgrenze von 10.000 Da (Amicon<sup>®</sup> Ultra Centrifugal Filters, Millipore, Billerica, MA) entfernt.

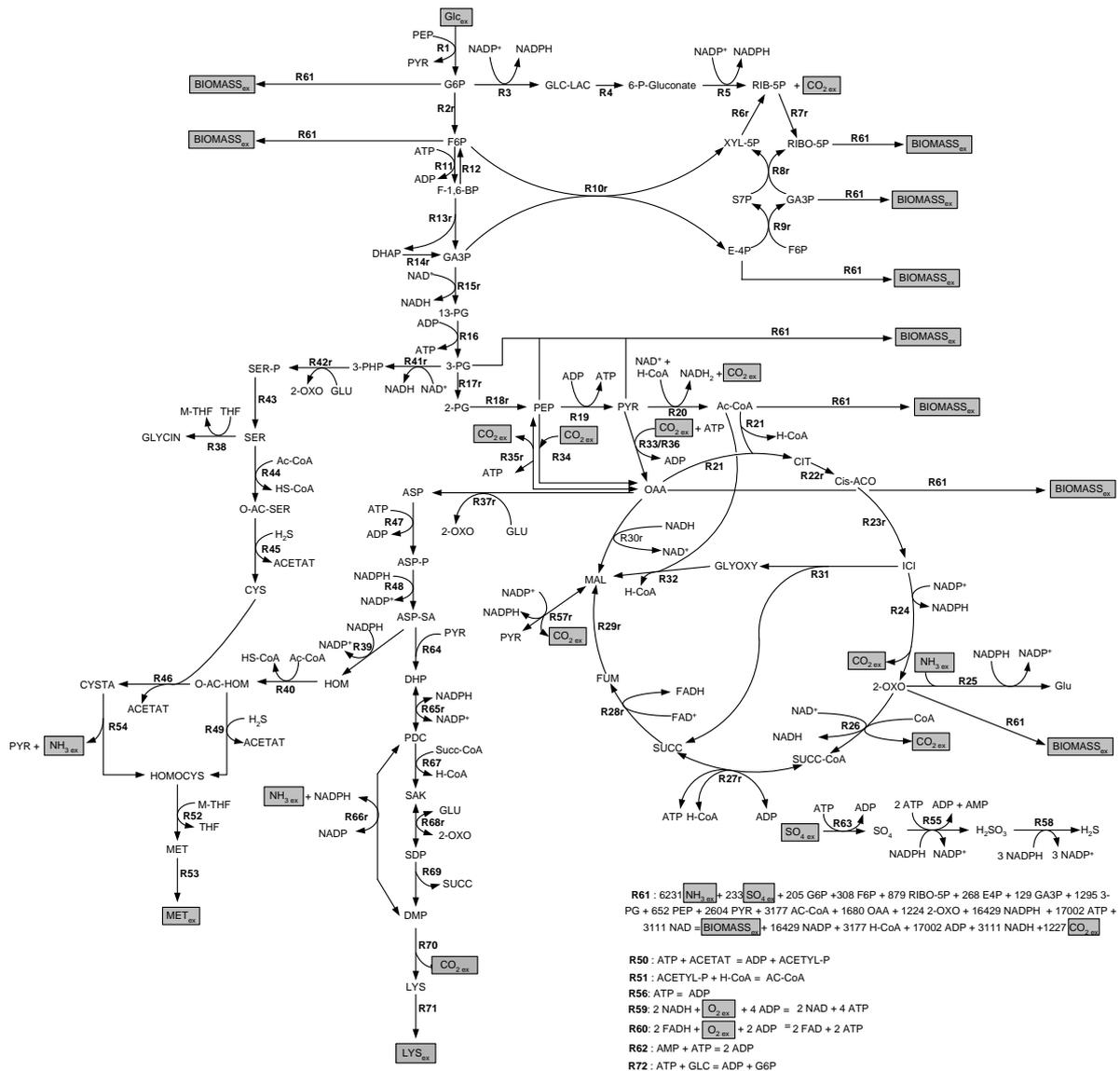
## 9. Elementarmodenanalyse

In der vorliegenden Arbeit wurden Elementarmodenanalysen mittels der beiden Programme „METATOOL“ (Pfeiffer et al., 1999; Schuster et al., 1999) und „efmtool“ (Terzer und Stelling, 2008) durchgeführt. Beide Programme sind auf den folgenden Internetseiten frei verfügbar: <http://www.biozentrum.uni.wuerzburg.de/metatool.html>, <http://www.csb.ethz.ch/tools/efmtool>. Die mathematischen Details der verwendeten Algorithmen sind in der angegebenen Literatur beschrieben. Das verwendete „efmtool“ kann in MATLAB integriert werden und zeichnet sich gegenüber „METATOOL“ durch eine schnellere Verarbeitung von Netzwerken mit größerem Umfang aus. Die Modelle wurden nach dem aktuellen biochemischen Wissen über *C. glutamicum* in öffentlichen Datenbanken (<http://www.genome.jp/kegg/>) sowie anhand von Literaturangaben erstellt. Es wurde angenommen, dass Wasser, Protonen und Phosphat in der Zelle ubiquitär sind, wodurch die Berechnungszeit signifikant verkürzt wird, ohne einen Einfluss auf die Kohlenstoffausbeute zu nehmen.

### 9.1 Das Netzwerk von *C. glutamicum*

Das grundlegende Stoffwechselnetzwerk von *C. glutamicum* basierte auf Krömer et. al (Krömer et al., 2006b). Es beinhaltete Zuckeraufnahme über ein Phosphotransferasesystem (PTS), die Glykolyse (EMP), den Pentosephosphatweg (PPP), den Tricarbonsäurezyklus (TCA-Zyklus) mit Glyoxylatweg, den C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub>-Stoffwechsel um PEP-Pyruvat-Oxalacetat, den C<sub>1</sub>-Stoffwechsel, den Schwefelstoffwechsel sowie die Methioninbiosynthese. Aufgrund der Tatsache, dass schon geringfügige Änderungen des Netzwerkes erhebliche Auswirkungen auf die Anzahl der erhaltenen Moden und auf deren Ausbeuten haben, wurde dieses Modell im Rahmen der Master-Arbeit von Maria Salas (Salas, 2007) erweitert. Da PTS-negative *C. glutamicum* Stämme weiterhin in der Lage sind, auf Glucose zu wachsen, wurde das Vorhandensein einer Permease zur Zuckeraufnahme postuliert (Dominguez und Lindley, 1996). Aus diesem Grund wurde in das Stoffwechselmodell eine zusätzliche Glucose-Kinase Aktivität zur Glucose-Aufnahme integriert. Herrscht Unsicherheit bezüglich der Reversibilität einer Reaktion, ist es sinnvoll, diese als reversibel zu betrachten, da reversible Reaktionen die Anzahl der möglichen Moden erhöhen. Daher wurden die Reaktion der Succinyl-CoA Synthase, der PEP-Carboxykinase und des Malat-Enzyms als reversibel betrachtet. Außerdem wurde die Lysin-Biosynthese in das Modell integriert. Das so erweiterte Modell bestand aus 72 Stoffwechselreaktionen, von denen 25 als reversibel betrachtet wurden. Insgesamt waren

65 interne Metabolite und 9 externe Metabolite an diesen Reaktionen beteiligt. Die externen Metabolite waren die Substrate (Glucose, Sulfat, Ammonium, Sauerstoff) und Produkte (Biomasse, Methionin, Glycin, Lysin, CO<sub>2</sub>). Glycin wurde als externer Metabolit definiert, da pro mol Methionin 1 mol Glycin gebildet wird, was von *C. glutamicum* nicht wieder verwertet werden kann. Für die ATP-Produktion in der Atmungskette wurde ein P/O-Verhältnis von 2 für NADH und 1 für FADH<sub>2</sub> 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 der Biomassebildung wurde ebenfalls der Literatur entnommen (Neidhardt, 1990). Während für Glucose und Sulfat ein aktiver Transport unter ATP-Verbrauch angenommen wurde, erfolgte der Transport von Sauerstoff, CO<sub>2</sub> und Ammonium passiv. Der Methionin- und Glycinexport wurde als energieunabhängiger Prozess betrachtet. Das verwendete Netzwerk von *C. glutamicum* ist im Anhang sowie in Abbildung III-3 dargestellt.

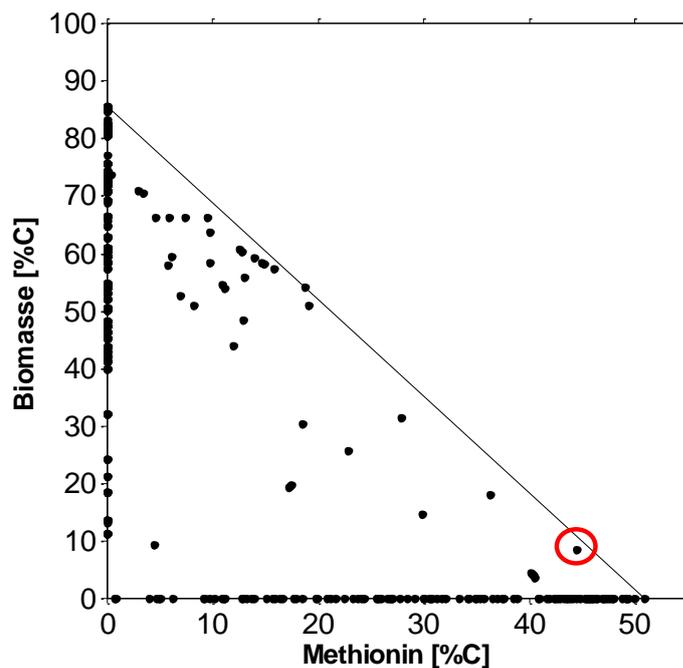


**Abb. III-3:** Grundmodell des Stoffwechsels von *C. glutamicum* Wildtyp zur Elementarmodenanalyse. Reversible Reaktionen sind durch Doppelpfeile gekennzeichnet. Externe Metabolite sind mit grauen Boxen hinterlegt.

### 9.2 Strategie zur rationalen Selektion von Deletionen

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob es möglich ist, das metabolische Netzwerk von *C. glutamicum* so zu manipulieren, dass die Produktion von Methionin an das Wachstum gekoppelt ist. Zunächst wurde daher mit Hilfe des oben beschriebenen Netzwerkes eine Elementarmodenanalyse durchgeführt. Für jeden der erhaltenen Moden wurde die entsprechende Kohlenstoffausbeute (in % C-mol) für Biomasse und Methionin berechnet. 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- bzw. Methioninausbeute, was in Abbildung

III-4 dargestellt ist. Ein Großteil der Moden sind extreme Lösungen des Netzwerkes, in denen entweder nur Methionin oder nur Biomasse gebildet wird. Die Kohlenstoffausbeuten dieser Moden liegen auf der X- bzw. Y-Achse. Es sind allerdings auch solche Minimallösungen möglich, die gleichzeitig Biomasse und Methionin bilden. Im Zuge der Stammoptimierung stellt der in Abbildung III-4 umrahmte Elementarmodus eine besonders interessante Lösung dar, da dieser hohe Methionin-Ausbeuten bei gleichzeitig minimaler Biomassebildung zeigt.



**Abb. III-4:** Metabolische Netzwerkanalyse von *C. glutamicum* zur Methioninproduktion. Kohlenstoffausbeuten für Biomasse- und Methionin für die Elementarmoden von *C. glutamicum* Wildtyp.

*In vivo* ist es wahrscheinlich kaum möglich, diese Situation zu erreichen, da hierzu viele Gene (unter Umständen mehr als 10) deletiert werden müssten. Je mehr Gene deletiert werden, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass Reaktionen betroffen sind, die eine wichtige Rolle in Stoffwechselprozessen spielen, die in dem zugrundegelegten metabolischen Netzwerk nicht repräsentiert sind. Dies könnte dazu führen, dass der resultierende Stamm nicht lebensfähig ist. Daher sollte eine Kombination einer möglichst geringen Anzahl von Deletionen gefunden werden, welche nur solche Moden ermöglicht, die das gewünschte Produkt - in diesem Fall Methionin - mit hoher Ausbeute bilden. Gleichzeitig dürfen Moden mit ausschließlicher Bildung von Biomasse, also ohne Methioninproduktion, nicht erlaubt sein. Da die Methioninsynthese immer von einem

gewissen Wachstum des Organismus abhängen wird, muss zumindest einer der verbleibenden Moden die Produktion von Biomasse beinhalten. Anhand der Liste aller der in dem metabolischen Netzwerk möglichen Elementarmoden können diejenigen identifiziert werden, die nach Ausschalten einer oder mehrerer Enzymreaktionen übrigbleiben. Im Folgenden sind die Kriterien zur Selektion der Deletionen in der Reihenfolge ihrer Wichtigkeit aufgeführt.

- Es darf kein Elementarmodus ohne Produktbildung übrigbleiben.
- Zumindest einer der verbleibenden Moden muss die Bildung von Biomasse beinhalten.
- Unter den erhaltenen möglichen Kombinationen von Deletionen werden solche mit der höchsten minimalen Produktausbeute und der geringsten Anzahl an notwendigen Deletionen herausgesucht.

Zur endgültigen Auswahl der Kombination von Deletionen wurden bisherige Studien in Bezug auf Deletionsmutanten, Unsicherheiten über Genfunktionen usw. berücksichtigt. Die möglichen Deletionskombinationen wurden mittels der ersten beiden Kriterien selektiert. Hierzu wurde ein spezieller Algorithmus, welcher in MATLAB implementiert wurde, verwendet. Die Entwicklung dieses Algorithmus erfolgte durch Prof. Elmar Heinzle und Maria Salas (Salas, 2007). Aus der erhaltenen Liste an Kombinationsmöglichkeiten wurde mittels der letzten beiden Kriterien die beste ausgewählt.

---

## IV. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

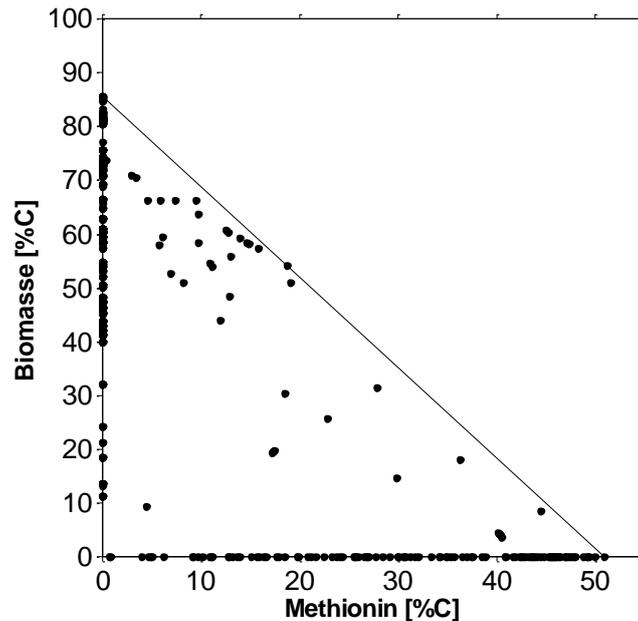
---

### 1. Elementarmodenanalyse zum rationalen Design eines Methioninproduzenten von *Corynebacterium glutamicum*

*C. glutamicum* ist ein vielversprechender Organismus zur biotechnologischen Herstellung von Methionin und wird unter anderem zur Produktion von Lysin eingesetzt, das ebenso wie Methionin zur Aspartat-Familie gehört. Bisher war es jedoch mit keinem der klassischen Mutageneseverfahren möglich, einen Methionin-Überproduzenten zu isolieren, der mit dem chemischen Syntheseverfahren konkurrieren könnte. In der vorliegenden Arbeit sollte daher basierend auf einer Elementarmodenanalyse des metabolischen Netzwerks von *C. glutamicum* eine rationale Strategie zur Erzeugung eines Methioninproduktionsstammes verfolgt werden.

#### 1.1 Elementarmodenanalyse des Wildtypnetzwerks von *C. glutamicum*

Die Elementarmodenanalyse des Wildtypnetzwerks von *C. glutamicum* ergab mehrere tausend Elementarmoden. Ein Elementarmodus ist ein minimaler Satz an Enzymen, der notwendig ist, um eine *steady-state* Flussverteilung innerhalb des metabolischen Netzwerks zu katalysieren. Für jeden der erhaltenen Moden wurden die Kohlenstoffausbeuten für Methionin und Biomasse bestimmt. Von den insgesamt 4383 möglichen Moden waren 2993 dazu in der Lage, Methionin und/oder Biomasse zu produzieren. Bei der Auftragung von Biomasse- gegen Methioninausbeute befanden sich alle Moden in einem Dreieck zwischen X- und Y-Achse und der Verbindungslinie zwischen maximaler Biomasse- und maximaler Methioninausbeute (Abbildung IV-1). Ein Großteil der beobachteten Moden waren extreme Lösungen des Netzwerks, in denen entweder nur Methionin- oder nur Biomasse gebildet wurden. Die maximalen Kohlenstoffausbeuten dieser Moden lagen auf der X- bzw. Y-Achse. Zusätzlich gab es aber auch Minimallösungen, die gleichzeitig Methionin und Biomasse produzierten. Für das zugrundeliegende Netzwerk lag die maximale Kohlenstoffausbeute für die Biomasse bei 85,1 % und für Methionin bei 49,3 %.



**Abb. IV-1:** Metabolische Netzwerkanalyse von *C. glutamicum* Wildtyp. Kohlenstoffausbeuten für Methionin und Biomasse [% C-mol] für die erhaltenen Elementarmoden. Die Gerade verbindet die Moden mit maximaler Biomasse- und maximaler Methioninausbeute.

Die große Anzahl der möglichen Elementarmoden verdeutlicht die hohe Komplexität und Flexibilität des zugrundeliegenden Netzwerks und zeigt, dass es praktisch kaum möglich ist all diese Reaktionskombinationen manuell zu ermitteln. Obwohl die Elementarmodenanalyse alle thermodynamisch und stöchiometrisch möglichen *steady-state* Flussverteilungen innerhalb des Netzwerks erfasst, müssen diese *in vivo* nicht tatsächlich erreicht werden. Aufgrund regulatorischer Einschränkungen, die die Genexpression oder die Aktivität von Enzymen betreffen, kann die Anzahl der möglichen Moden deutlich reduziert werden. In einem realen System wie einem Organismus sind daher bestimmte Moden physiologisch relevanter als andere (Wlaschin et al., 2006). Da der Wildtyp von *C. glutamicum* kein Methionin produziert, sind dies die Moden auf der Y-Achse, die ausschließlich Biomasse bilden. Das Ergebnis einer Elementarmodenanalyse ist eine stöchiometrische Matrix, die für jeden einzelnen Modus angibt, welche Enzymreaktionen beteiligt sind. Da jeder Elementarmodus eine minimale Ausstattung an Enzymen darstellt, reicht schon die Deletion eines der beteiligten Enzyme dazu aus, dass ein Modus nicht mehr existieren kann. Durch genetische Manipulation können also unerwünschte Moden ausgeschaltet werden (Trinh et al., 2008b). Dieses Prinzip sollte nun angewandt werden, um eine Kombination von Gendelektionen zu selektieren, durch die Moden mit Wachstum ohne gleichzeitige Methioninproduktion nicht mehr möglich sind.

## 1.2 Selektion von Gendeletionen

Anhand der Liste aller in dem metabolischen Netzwerk von *C. glutamicum* möglichen Elementarmoden können diejenigen identifiziert werden, die nach dem Ausschalten einer oder mehrerer Enzymreaktionen übrigbleiben. Mittels eines in MATLAB implementierten Algorithmus wurden so Deletionskombinationen selektiert, durch die kein Elementarmodus ohne Methioninproduktion mehr vorhanden sein durfte. Gleichzeitig musste zumindest einer der verbleibenden Moden die Bildung von Biomasse beinhalten. Die so erhaltenen möglichen Kombinationen von Gendeletionen sind in Tabelle IV-1 dargestellt.

Es wurde deutlich, dass es nicht nur eine, sondern mehrere Kombinationsmöglichkeiten gab, welche die beiden genannten Bedingungen erfüllten. Interessanterweise waren schon vier Deletionen ausreichend, um Wachstum und Methioninproduktion miteinander zu koppeln. Allerdings gab es auch Kombinationsmöglichkeiten mit fünf Deletionen. Die meisten Reaktionen, die ausgeschaltet werden sollten, betrafen den Zentralstoffwechsel. Sowohl die Anzahl der verbleibenden Moden als auch das Spektrum von maximaler und minimaler Methionin- bzw. Biomasseausbeute variierten stark je nach Kombination. Daher war es notwendig, eine Auswahl zu treffen, welche der Kombinationen nun tatsächlich in *C. glutamicum* eingebracht werden sollte. Dabei wurden zunächst solche mit der geringsten Anzahl an notwendigen Deletionen ausgewählt. Als weiteres Auswahlkriterium wurde eine möglichst hohe minimale Methioninausbeute herangezogen. Es wurden daraufhin nur Kombinationen mit vier Deletionen weiter berücksichtigt, die nun näher diskutiert werden sollen.

### Fall 1:

Die Kombinationsmöglichkeiten Nr. 4-11 in Tabelle IV-1 beinhalteten jeweils die Deletion einer der Reaktionen im Pentosephosphatweg (R3, R4, R5, R6r, R8r, R9r oder R10r), die Deletion der Pyruvat-Kinase (R19), der PEP-Carboxylase (R34) sowie der PEP-Carboxykinase (R35r). Diese Kombinationsmöglichkeiten zeigten mit 40,5 % die höchsten minimalen Methioninausbeuten. Insgesamt verblieben nur 9 Moden, wobei nur ein einziger dazu in der Lage war, Methionin und gleichzeitig Biomasse zu bilden. Die maximale Biomasseausbeute war mit 3,6 % sehr niedrig. Die übrigen Moden lagen auf der X-Achse und zeigten ausschließlich Methioninbildung.

**Fall 2:**

Die zweithöchsten minimalen Methioninausbeuten zeigten Kombination Nr.1 und Nr. 2 mit 15,87 % bzw. 23,03 %. Diese Kombinationen beinhalteten unter anderem die Deletion des Phosphotransferase (PTS)-Systems (R1) zur Glucoseaufnahme. Des Weiteren waren die Reaktionen der Pyruvat-Kinase (R19), der Oxalacetat-Decarboxylase (R36) sowie der Malat-Dehydrogenase (R30r, Nr.1) bzw. des Malat-Enzyms (R57r, Nr.2) ausgeschaltet. Von den insgesamt 50 möglichen Moden in Kombination Nr.2 war auch hier nur ein Modus in der Lage, sowohl Methionin als auch Biomasse zu bilden.

**Fall 3:**

In Kombination Nr. 3 waren die Reaktionen der Glucose-6-Phosphat-Isomerase (R2r), der Pyruvat-Kinase (R19), der PEP-Carboxylase (R34) sowie der PEP-Carboxykinase (R35r) deletiert. Die minimale Methioninausbeute lag hier bei 7,36 % und es verblieben insgesamt 60 Moden, von denen 16 sowohl Methionin als auch Biomasse bildeten.

**Tab. IV-1:** Liste der möglichen Kombinationen von Gendeletionen, bei denen Wachstum und Methioninproduktion gekoppelt sein sollen.

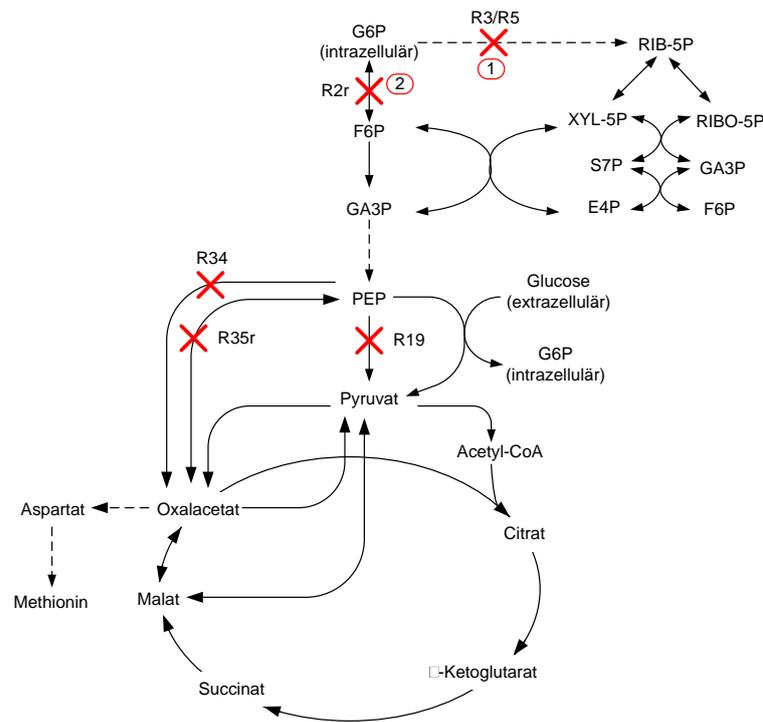
Anzahl der Deletionen	Kombination Nr.	Kombinationen von Gendeletionen	Anzahl der Moden	Methioninausbeute (%C)		Biomasseausbeute (%C)	
				Maximum	Minimum	Maximum	Minimum
4	1	R1, R19, R30r, R36	250	49.90	15.87	31.30	0.00
4	2	R1, R19, R36, R57r	50	49.90	27.03	31.30	0.00
4	3	R2r, R19, R34, R35r	60	46.48	7.36	66.22	0.00
4	4	R2r, R19, R36, R64	250	48.70	0.26	73.80	0.00
4	5	R3, R19, R34, R35r	9	42.50	40.50	3.60	0.00
4	6	R4, R19, R34, R35r	9	42.50	40.50	3.60	0.00
4	7	R5, R19, R34, R35r	9	42.50	40.50	3.60	0.00
4	8	R6r, R19, R34, R35r	9	42.50	40.50	3.60	0.00
4	9	R8r, R19, R34, R35r	9	42.50	40.50	3.60	0.00
4	10	R9r, R19, R34, R35r	9	42.50	40.50	3.60	0.00
4	11	R10r, R19, R34, R35r	9	42.50	40.50	3.60	0.00
4	12	R19, R30r, R34, R35r	60	49.90	5.88	66.22	0.00
4	13	R19, R34, R35r, R36	150	49.90	4.50	66.22	0.00
4	14	R19, R34, R35r, R57r	100	49.90	5.88	66.22	0.00
5	1	R1, R2r, R19, R36, R64	70	48.70	9.70	63.70	0.00
5	2	R1, R12, R19, R30r, R36	100	49.90	15.87	31.30	0.00
5	3	R1, R12, R19, R36, R57r	33	49.90	27.03	31.30	0.00
5	4	R1, R19, R27r, R30r, R36	70	49.90	15.87	31.30	0.00
5	5	R1, R19, R27r, R36, R57r	31	49.90	27.03	31.30	0.00
5	6	R1, R19, R30r, R36, R57r	24	49.90	27.03	31.30	0.00
5	7	R1, R19, R34, R36, R57r	22	49.90	27.03	31.30	0.00
5	8	R1, R19, R35r, R36, R57r	22	49.90	27.03	31.30	0.00
5	9	R12, R19, R30, R34, R35r	50	49.90	5.88	66.22	0.00
5	10	R12, R19, R34, R35r, R57r	40	49.90	5.88	66.22	0.00
5	11	R19, R27r, R30r, R34, R35r	40	49.90	5.88	66.22	0.00
5	12	R19, R27r, R34, R35r, R36	100	49.90	4.50	66.22	0.00
5	13	R19, R28r, R34, R35r, R57r	18	49.90	5.88	66.22	0.00
5	14	R19, R30r, R34, R35r, R46	19	49.90	13.03	55.85	0.00
5	15	R19, R34, R35r, R36, R46	60	49.90	9.74	58.48	0.00
5	16	R19, R34, R35r, R46, R57r	40	49.90	13.03	55.85	0.00

Die übrigen Kombinationen wurden aufgrund ihrer geringen minimalen Methioninausbeute nicht weiter in Betracht gezogen. Zur endgültigen Auswahl der Kombination von Deletionen wurden außerdem bisherige Studien in Bezug auf Deletionsmutanten sowie Unsicherheiten über Genfunktionen berücksichtigt. Die zweithöchste minimale Methioninausbeute konnte im Fall 2 bei Deletion des Phosphotransferase-Systems (R1) zur Glucoseaufnahme erzielt werden. Glucose wird über den PTS<sup>Glc</sup>-Transporter als Glucose-6-Phosphat in die Zelle aufgenommen, wobei PEP zu Pyruvat umgesetzt wird (Yokota, 2005). Mutanten ohne detektierbare PEP-abhängige Glucose-Transportaktivität sind immer noch dazu in der Lage, auf Glucose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle zu wachsen, jedoch mit deutlich verringerter Wachstumsrate. Da in *C. glutamicum* sowohl eine Glucose-Kinase-Aktivität als auch die entsprechende Gensequenz (*glk*) nachgewiesen werden konnte, liegt eine zusätzliche Möglichkeit der Glucoseaufnahme durch eine Permease nahe (Park et al., 2000; Sano et al., 1987). Diese wurde deshalb auch in das Netzwerk zur Elementarmodenanalyse integriert. Zur biotechnologischen Produktion von Aminosäuren ist ein detailliertes Verständnis über die Regulation des Kohlenstoffflusses durch die entsprechenden Transportsysteme notwendig (Moon et al., 2007). Da bisherige Studien in *C. glutamicum* bezüglich dieser alternativen Aufnahmemöglichkeit nicht ausreichend sind und das PTS-System die Hauptmöglichkeit zur Glucoseaufnahme darstellt, wurde davon abgesehen, eine Kombination mit Deletion des PTS-Systems umzusetzen.

Fall 1 zeigte die höchste minimale Methioninausbeute. Allerdings finden sich für *C. glutamicum* bislang keine Studien zu definierten Gendeletionen im Pentosephosphatweg. Eine Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase negative Mutante zeigte im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich verlangsamte Wachstumsrate, was auf einen Mangel an NADPH und/oder eine mögliche Akkumulation von Glucose-6-Phosphat zurückgeführt wurde (Ihnen und Demain, 1969). Diese Mutante wurde jedoch durch Zufallsmutagenese erzeugt. Daher ist es schwer zu beurteilen, ob die beobachteten phänotypischen Effekte alleine auf das Fehlen der Enzymaktivität oder auf zusätzliche unbekannte Mutationen zurückzuführen waren. Eine Transketolase-negative Mutante von *C. glutamicum* zeigte eine Auxotrophie für Shikimat bzw. aromatische Aminosäuren und Vitamine. Bei Kultivierung auf Glucose und Shikimat akkumulierte diese Mutante extrazellulär Ribulose (Ikeda et al., 1998). Die Transketolase katalysiert in dem metabolischen Netzwerk zur Elementarmodenanalyse zwei Reaktionen, die als Transketolase 1 und 2 bezeichnet wurden. Auf jeweils eine dieser Reaktionen kann verzichtet werden, ohne dass eine

Auxotrophie entsteht. Allerdings werden diese beiden Reaktionen durch dasselbe Enzym katalysiert, da in *C. glutamicum* nur ein Transketolase-Gen existiert. Daher kann dieses ohne gleichzeitige Supplementierung von Shikimat nicht ausgeschaltet werden. Weitere Studien zu Geninaktivierungen im Pentosephosphatweg von *C. glutamicum* wurden in der Literatur nicht diskutiert. Es sollte daher der oxidative Teil des Pentosephosphatwegs, durch Deletion der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (R3) bzw. der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (R5), inaktiviert werden. Da die Reaktionen des nicht-oxidativen Teils des Pentosephosphatwegs reversibel sind, können über die Verbindung zu Glykolyse die notwendigen Biomasse-Vorläufermoleküle weiterhin gebildet werden.

In Fall 3 sollte die Glucose-6-Phosphat-Isomerase (R2r) deletiert werden, was in *C. glutamicum* bereits erfolgreich durchgeführt wurde (Marx et al., 2003). Fall 1 und 3 hatten jeweils drei Deletionen gemeinsam, nämlich die der Pyruvat-Kinase (R19), der PEP-Carboxylase (R34) sowie der PEP-Carboxykinase (35r). Alle drei Gendeletionen wurden bereits einzeln in *C. glutamicum* eingebracht und führten zu Stämmen, die weiterhin zum Wachstum auf Glucose fähig waren (Becker et al., 2008; Peters-Wendisch et al., 1993; Riedel et al., 2001). Aufgrund der Unsicherheit bezüglich der Deletion im Pentosephosphatweg sollte daher versucht werden, sowohl die Kombinationsmöglichkeit von Fall 1 als auch von Fall 3 trotz der geringeren minimalen Methioninausbeute umzusetzen. Abbildung IV-2 zeigt eine schematische Darstellung des Stoffwechsels von *C. glutamicum* und die Position der einzubringenden Deletionen.



**Abb. IV-2:** Schematische Darstellung des Zentralstoffwechsels von *C. glutamicum*. Die zu deletierenden Reaktionen sind mit einem roten Kreuz gekennzeichnet. Kombination 1: Deletion von R5 (6-Phosphogluconat-Dehydrogenase)/R3 (Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase), R19 (Pyruvat-Kinase), R34 (PEP-Carboxylase), R35r (PEP-Carboxykinase). Kombination 2: Deletion von R2r (Glucose-6-Phosphat-Isomerase), R19 (Pyruvat-Kinase), R34 (PEP-Carboxylase), R35r (PEP-Carboxykinase).

Tabelle IV-2 fasst die Methionin- und Biomasseausbeuten für beide Kombinationsmöglichkeiten, die letztendlich in *C. glutamicum* eingebracht werden sollten, zusammen.

**Tab. IV-2:** Ausbeute an Methionin und Biomasse für die beiden ausgewählten Deletionskombinationen zur rationalen Erzeugung eines Methioninproduzenten von *C. glutamicum*.

	Methioninausbeute [%C]		Biomasseausbeute [%C]	
	Maximum	Minimum	Maximum	Minimum
Kombination 1	42.5	40.54	3.6	0
Kombination 2	46.48	7.36	66.22	0

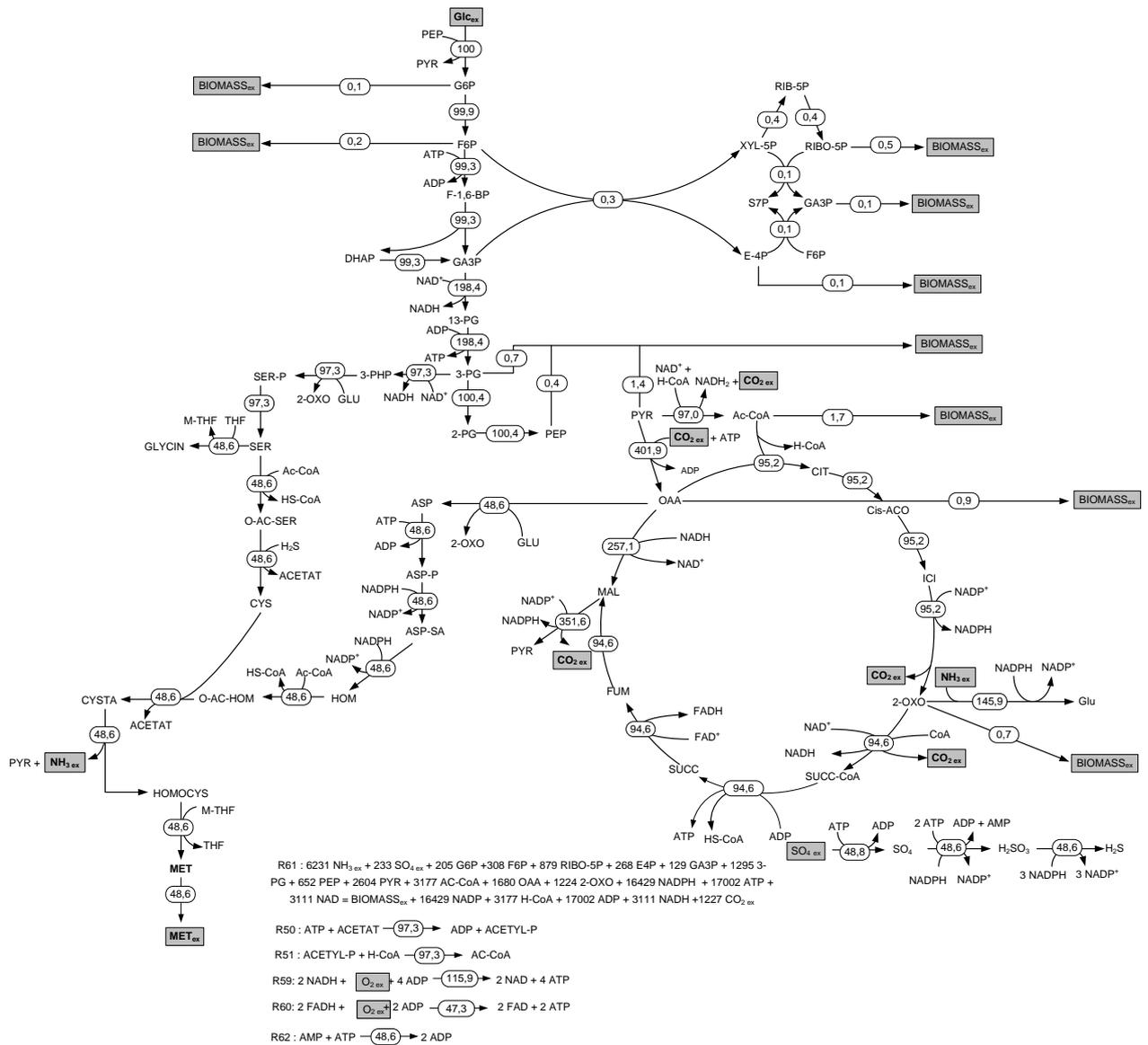
### 1.3 Theoretische Flussverteilung während der Produktion von Methionin

Aus der Identifikation dieser Kombination von Gendelektionen ergab sich die Fragestellung, was die Elementarmoden kennzeichnet, die nach Einführung der Deletionen in das Netzwerk von *C. glutamicum* übrigbleiben. Hierzu wurden diejenigen Elementarmoden, die gleichzeitig Methionin und Biomasse bilden, aufgrund ihrer Gesamtstöchiometrie in Familien unterteilt. Jedes Mitglied einer solchen Familie kann unterschiedliche interne Reaktionen nutzen. Trotzdem bleiben die Nettoakkumulationsraten der externen Metabolite und somit die Gesamtstöchiometrie gleich. In Kombinationsmöglichkeit 1 mit Deletion der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, der PEP-Carboxylase, der PEP-Carboxykinase sowie der Pyruvat-Kinase produziert nur ein einziger der insgesamt 10 Moden sowohl Biomasse als auch Methionin. In Kombinationsmöglichkeit 2 mit Deletion der Glucose-6-Phosphat-Isomerase verbleiben 60 Moden, von denen insgesamt 16 sowohl Methionin als auch Biomasse produzieren. Diese Moden wurden aufgrund ihrer Gesamtstöchiometrie wiederum in 7 Familien gruppiert, was in Tabelle IV-3 dargestellt ist.

**Tab. IV-3:** Gesamtstöchiometrie der Familien von Elementarmoden sowie die Anzahl der beteiligten Moden für die beiden ausgewählten Deletionskombinationen zum rationalen Design eines Methioninproduzenten von *C. glutamicum*.

Familie	Gesamtstöchiometrie für Kombination 1	Moden
1	182291 Glucose + 297520 O <sub>2</sub> + 183598 NH <sub>3</sub> + 88916 SO <sub>4</sub> = Biomasse + 88684 Methionin + 432411 CO <sub>2</sub> + 88684 Glycin	1
Familie	Gesamtstöchiometrie für Kombination 2	
1	11072 Glucose + 8347 O <sub>2</sub> + 9919 NH <sub>3</sub> + 2077 SO <sub>4</sub> = Biomasse + 1844 Methionin + 12971 CO <sub>2</sub> + 1844 Glycin	3
2	9909 Glucose + 9598 O <sub>2</sub> + 7981 NH <sub>3</sub> + 1108 SO <sub>4</sub> = Biomasse + 875 Methionin + 12777 CO <sub>2</sub> + 875 Glycin	1
3	10861 Glucose + 8567 O <sub>2</sub> + 9567 NH <sub>3</sub> + 1901 SO <sub>4</sub> = Biomasse + 1668 Methionin + 12936 CO <sub>2</sub> + 1668 Glycin	1
4	13581 Glucose + 21226 O <sub>2</sub> + 10429 NH <sub>3</sub> + 2332 SO <sub>4</sub> = Biomasse + 2099 Methionin + 26241 CO <sub>2</sub> + 2099 Glycin	8
5	21685 Glucose + 19411 O <sub>2</sub> + 23682 NH <sub>3</sub> + 5033 SO <sub>4</sub> = Biomasse + 4800 Methionin + 32403 CO <sub>2</sub> + 4800 Glycin + 3925 Lysin	1
6	12152 Glucose + 8850 O <sub>2</sub> + 11719 NH <sub>3</sub> + 1856 SO <sub>4</sub> = Biomasse + 1623 Methionin + 14272 CO <sub>2</sub> + 1623 Glycin + 1121 Lysin	1
7	12002 Glucose + 10037 O <sub>2</sub> + 11470 NH <sub>3</sub> + 1806 SO <sub>4</sub> = Biomasse + 1573 Methionin + 14173 CO <sub>2</sub> + 1573 Glycin + 1047 Lysin	1

Die Flussverteilungen dieser Familien besitzen aufgrund kinetischer oder regulatorischer Faktoren eine bestimmte Wahrscheinlichkeit. Dennoch zeigen diese Familien die gesamte Bandbreite an Flussverteilungen, die bei Methioninproduktion und gleichzeitiger Biomassebildung in diesem genetischen Hintergrund theoretisch möglich sind. Sie können daher entscheidende Hinweise für die spätere Flussanalyse geben, wenn es gelingt, die Deletionen in *C. glutamicum* tatsächlich zu kombinieren. Eine wichtige Frage dabei ist, inwiefern die theoretisch vorhergesagten Flussverteilungen mit den tatsächlichen übereinstimmen. Im Folgenden soll daher betrachtet werden, wie in dem jeweiligen genetischen Hintergrund der Kohlenstofffluss umgelenkt werden muss, um Methionin- und Biomassebildung zu koppeln. Wie in der Flussanalyse üblich sind die Flüsse auf die Kohlenstoffaufnahme normiert und in  $\text{mol mol}^{-1} \times 100$  angegeben. Daher stimmen sie nicht direkt mit den theoretischen Ausbeuten in % C-mol überein. Abbildung IV-3 zeigt die theoretische Flussverteilung bei Methioninproduktion und gleichzeitiger Biomassebildung in Kombination 1. Für Kombination 2 ist die Flussverteilung mit der höchsten Methioninausbeute dargestellt (Abbildung IV-4). Prinzipiell verfügbare, aber inaktive Reaktionen sind nicht gezeigt. Die theoretischen Flussverteilungen aller Familien befinden sich in Tabelle VI-1 und VI-2 im Anhang.



**Abb. IV-3:** Theoretische Flussverteilung in *C. glutamicum* in Kombination 1 mit Deletion der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, der Pyruvat-Kinase, der PEP-Carboxylase sowie der PEP-Carboxykinase.

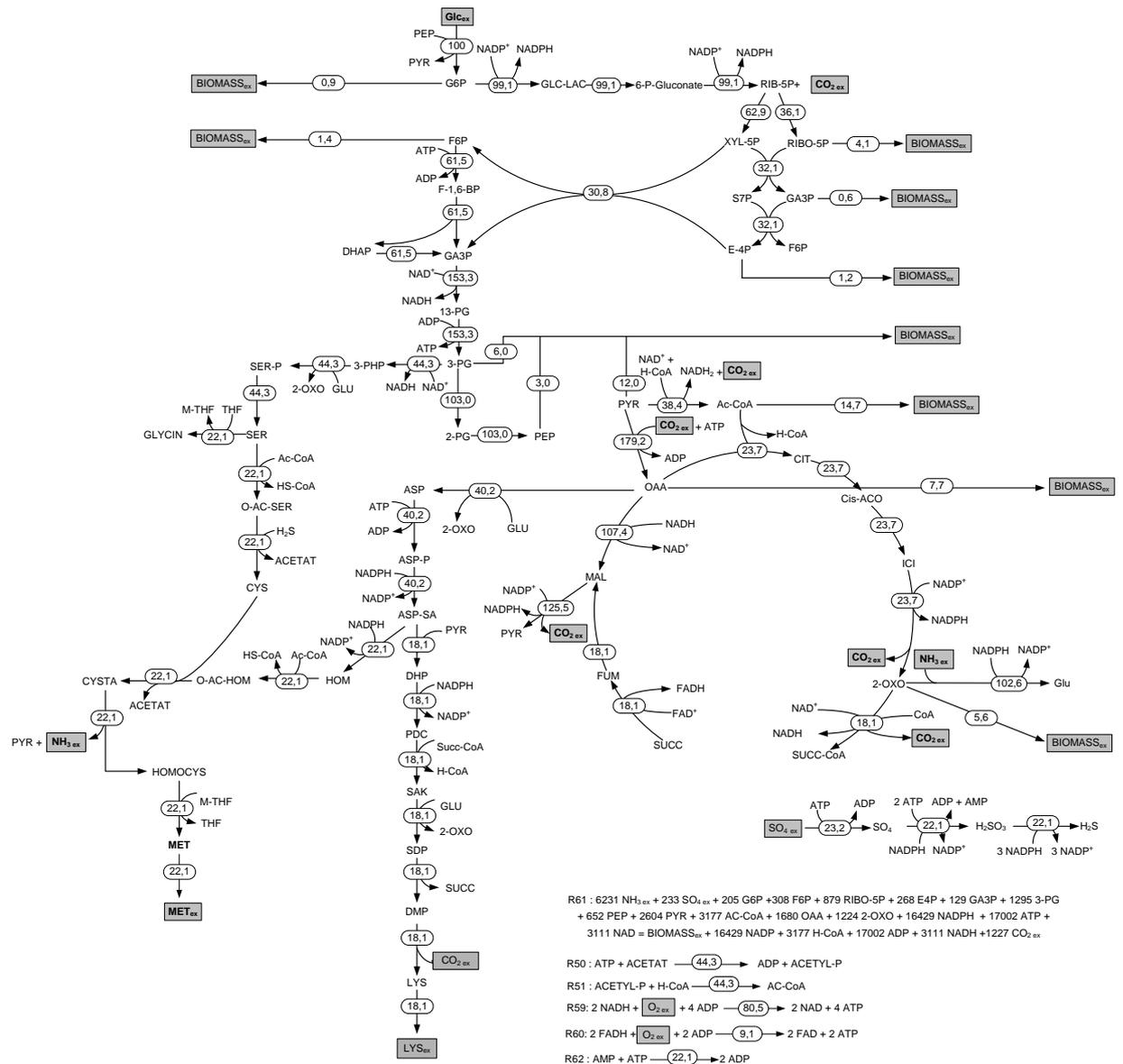
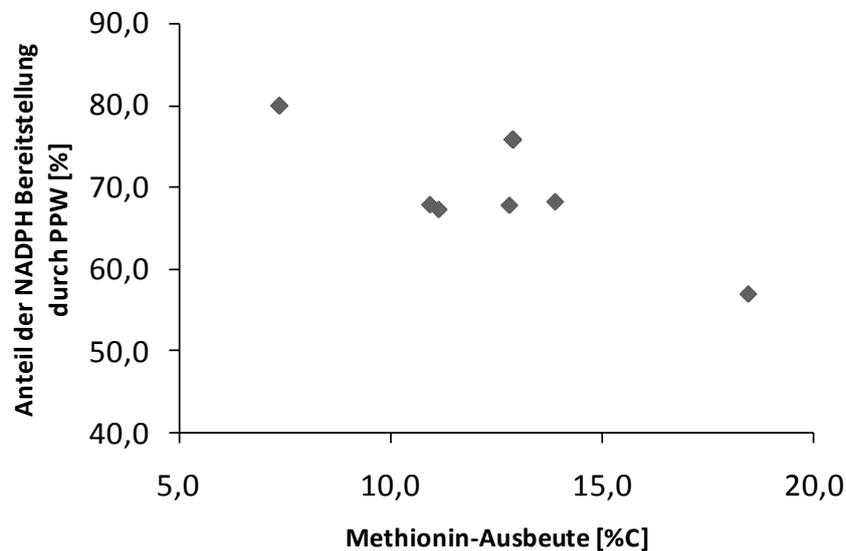


Abb. IV-4: Theoretische Flussverteilung in *C. glutamicum* in Kombination 2 mit Deletion der Glucose-6-Phosphat-Isomerase, der Pyruvat-Kinase, der PEP-Carboxylase sowie der PEP-Carboxykinase.

1.3.1 Bereitstellung von NADPH

Ebenso wie bei der Produktion von Lysin stellt die Bereitstellung von NADPH einen entscheidenden Faktor für die Methioninproduktion dar. Mit 8 mol NADPH pro mol Methionin ist der Bedarf an NADPH sogar doppelt so hoch im Vergleich zur Lysinproduktion. Für verschiedene Lysinproduktionsstämme konnte gezeigt werden, dass der PPP die Hauptquelle für NADPH darstellt und dass eine höhere Lysinproduktion mit einem erhöhten Fluss durch den PPP korreliert (Wittmann und Heinzle, 2002). Gemäß Krömer et. al (2006b) wird bei theoretisch maximaler Methioninproduktion der oxidative

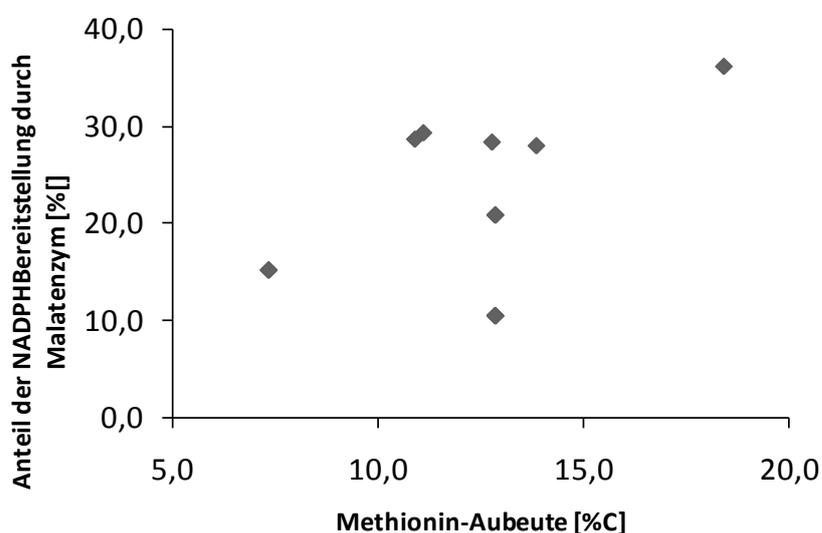
Teil des PPP mit 235 % durchlaufen. Dies wird durch die Glucose-6-Phosphat-Isomerase ermöglicht, die in gluconeogentischer Richtung arbeitet. In Kombinationsmöglichkeit 1 ist der oxidative Teil des PPP ausgeschaltet. Er spielt daher als NADPH-Quelle zur Methioninproduktion keine Rolle. In Kombinationsmöglichkeit 2 ist die Glucose-6-Phosphat-Isomerase deletiert, weshalb der Fluss durch den PPP auf 99 % limitiert ist. Abbildung IV-5 zeigt den prozentualen Anteil des PPP an der NADPH-Bereitstellung in den verschiedenen Familien von Kombination 2 in Abhängigkeit von der Methioninausbeute. Der Anteil des PPP an der Bereitstellung von NADPH sinkt mit steigender Methioninausbeute. Es wird also deutlich, dass der PPP alleine den NADPH-Bedarf zur gleichzeitigen Biomassebildung und Methioninproduktion nicht decken kann.



**Abb. IV-5:** Prozentualer Anteil der NADPH-Bereitstellung durch den PPP in Abhängigkeit von der Methioninausbeute [% C] für Kombination 2.

Es muss in Kombinationsmöglichkeit 1 und 2 folglich zusätzliche NADPH-Quellen geben. Zur Bereitstellung von NADPH in *C. glutamicum* stehen neben dem PPP die NADP<sup>+</sup>-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase des TCA-Zyklus sowie das Malatenzym zur Verfügung. Zusammen mit der Pyruvat-Carboxylase und der NADH-abhängigen Malat-Dehydrogenase kann das Malatenzym einen ATP-abhängigen Zyklus katalysieren, in dem NADPH aus NADH gewonnen werden kann. Das durch die Pyruvat-Carboxylase fixierte CO<sub>2</sub> wird durch das Malatenzym wieder freigesetzt, so dass netto kein Kohlenstoffverlust entsteht (Cocaign-Bousquet und Lindley, 1995). Dieser Transhydrogenase-ähnliche Zyklus scheint aufgrund des Fehlens eines Transhydrogenase-Gens in *C. glutamicum* vorteilhaft. Eine Transhydrogenase, wie sie etwa *E. coli* besitzt, katalysiert die direkte Umwandlung

von NADH zu NADPH und ist in diesem Organismus die Hauptquelle an NADPH bei theoretisch maximaler Methioninproduktion (Krömer et al., 2006b). In Kombination 1 stellt der Transhydrogenase-ähnliche Zyklus 78,7% des gebildeten NADPHs bereit. Mit Ausnahme von Familie 4 in Kombinationsmöglichkeit 2 durchlaufen ebenfalls alle Moden diesen Zyklus, so auch derjenige Modus mit der höchsten Methioninausbeute. Auch in Familie 4 trägt das Malatenzym zur Bildung von NADPH bei, allerdings entsteht Malat nicht direkt aus OAA. Die Malat-Dehydrogenase ist nicht aktiv. Es werden zwei verschiedene Möglichkeiten zur Bildung von Malat genutzt. Zum einen kann dieses durch die Aktivität des Glyoxylat-Zyklus entstehen, in dem Isocitrat zu Glyoxylat und Succinat gespalten wird. Sowohl Succinat als auch Glyoxylat können zu Malat umgesetzt werden. Die Bildung von Malat aus Glyoxylat erfordert Acetyl-CoA. In den Moden mit aktivem Glyoxylat-Zyklus ist daher eine verstärkte Aktivität des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes notwendig, was mit einem Verlust von CO<sub>2</sub> einhergeht. Die nachfolgende Reaktion des Malatenzym zur Gewinnung von NADPH ist ebenfalls mit einer Decarboxylierung verbunden. In Abbildung IV-6 ist der Anteil des Malatenzym zu NADPH-Bereitstellung in den verschiedenen Familien in Abhängigkeit von der Methioninausbeute dargestellt.



**Abb. IV-6:** Prozentualer Anteil der NADPH-Bereitstellung durch das Malatenzym in Abhängigkeit von der Methioninausbeute [% C] für Kombination 2.

Es lässt sich deutlich erkennen, dass der Anteil des Malatenzym zur NADPH-Bereitstellung mit der Methioninausbeute bis auf 36,1 % zunimmt. Die zweite Möglichkeit zur Bildung von Malat besteht ausschließlich durch den TCA-Zyklus, was bei der Hälfte der Moden in Familie 4 der Fall ist. Hier ist der Fluss durch das Malatenzym allerdings nur

halb so hoch im Vergleich zu den Moden mit aktivem Glyoxylat-Zyklus. Bei diesen ist daher auch der Anteil des Malatenzyms an der NADPH-Bereitstellung niedriger als bei den anderen Moden, nämlich nur 10,4 %. Der Anteil der Isocitrat-Dehydrogenase an der NADPH-Bereitstellung beträgt in Kombination 1 nur 21,3 % trotz des hohen Flusses von 95,2 %. Je nach Familie variierte der relative Fluss durch dieses Enzym in Kombination 2 zwischen 9,01 % und 36,1 % und war also deutlich reduziert. Der Beitrag zur NADPH-Bereitstellung war entsprechend gering, nämlich zwischen 3,5 % und maximal 13,9 % bei Bildung von Malat durch den TCA-Zyklus. NADPH, das in beiden Fällen in hohem Maße produziert wird, sollte die Methioninsynthese antreiben, da sonst Glucoseaufnahme und somit das Wachstum zum Erliegen kämen.

### 1.3.2 Bereitstellung der Vorläufermoleküle

Neben NADPH stellt der Zentralstoffwechsel die Vorläufermoleküle für Methionin bereit. Serin dient zum einen als Vorläufer von Methyl-THF und zum anderen kann es über die Cysteinsynthese und anschließender Transsulfurierung zur Methioninsynthese beitragen. OAA stellt das Kohlenstoffgerüst von Aspartat zur Verfügung und Glutamat ist zur Transaminierung sowohl von Serin als auch von Aspartat notwendig. Zur Aktivierung von Zwischenstufen im Methioninstoffwechsel benötigt *C. glutamicum* pro mol Methionin bei Transsulfurierung 2 mol Acetyl-CoA und 1 mol bei direkter Sulfurierung (Hwang et al., 2002). Außerdem liefern Glykolyse und TCA-Zyklus (in Verbindung mit der oxidativen Phosphorylierung) Energie in Form von ATP und GTP.

Die Umlenkung des Kohlenstoffflusses von 3-Phosphoglycerat zur Serinsynthese wird durch einen glykolytischen Rückstau unterhalb dieses Metaboliten erzeugt. Durch Deletion der Pyruvat-Kinase ist die Umwandlung von PEP zu Pyruvat an die Glucoseaufnahme durch das Phosphotransferase-System gekoppelt. Der direkte Fluss von PEP zu Pyruvat ist daher auf 100 % limitiert. In einer  $\Delta pyk$ -Mutante wurde eine Umlenkung des Kohlenstoffflusses von PEP zu OAA durch die PEP-Carboxylase und anschließend über Malat hin zu Pyruvat beobachtet, wodurch die Mutante genügend Pyruvat zur Verfügung hatte, um einen ausreichenden Fluss durch die Pyruvat-Dehydrogenase und den TCA-Zyklus zu gewährleisten (Becker et al., 2008). Die hieran beteiligte PEP-Carboxylase ist in beiden Kombinationsmöglichkeiten deletiert. Die PEP-Carboxykinase wurde in dem vorliegenden metabolischen Netzwerk als reversibel definiert und könnte theoretisch das Fehlen der PEP-Carboxylase kompensieren. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass diese Reaktion ebenfalls deletiert werden musste. Folglich kommt es zu einem glykolytischen

Rückstau. Dieser könnte durch einen Rückfluss in den oxidativen Teil des PPP in Form einer erhöhten  $\text{CO}_2$ -Bildung ausgeglichen werden. Durch Deletion des oxidativen Teils des PPP wird dies in Kombinationsmöglichkeit 1 komplett verhindert. In Kombination 2 mit Deletion der Glucose-6-Phosphat-Isomerase wird die aufgenommene Glucose ausschließlich über den PPP geleitet. Hierdurch geht schon im Vorhinein ein Teil des Kohlenstoffes in Form von  $\text{CO}_2$  verloren, wodurch der Rückstau in der Glykolyse nicht so ausgeprägt ist wie bei Kombination 1. Allerdings kann er ebenfalls nicht durch einen Rückfluss in den PPP ausgeglichen werden. Sowohl die Deletion des oxidativen Teils des PPP als auch die Deletion der Glucose-6-Phosphat-Isomerase bewirken daher in beiden Kombinationen, dass der glykolytische Rückstau auf anderem Wege kompensiert werden muss, um eine ausgeglichene Kohlenstoffbilanz zu ermöglichen. In dem zugrundegelegten metabolischen Netzwerk gibt es hierzu ausschließlich die Möglichkeit der Umlenkung des Kohlenstoffflusses in Richtung der Serinsynthese ausgehend von 3-Phosphoglycerat. In Kombination 1 geht kein  $\text{CO}_2$  im oxidativen Teil des PPP verloren und dementsprechend sind der Fluss zur Serinsynthese und hierdurch auch die Methioninausbeute höher als in Kombination 2 mit Deletion der Isomerase. Wachstum ist in beiden Kombinationen folglich nur durch die Umlenkung des Kohlenstoffflusses in Richtung Serinsynthese möglich. Ebenso muss Serin anschließend zur Synthese von  $\text{C}_1$ -Vorläufern und Cystein für die Methioninproduktion genutzt werden. Hierdurch wird eine ausgeglichene Kohlenstoffbilanz ermöglicht.

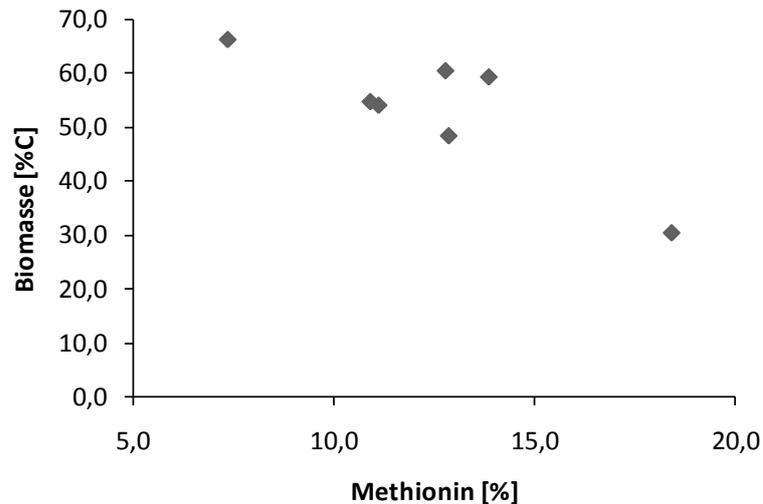
Die Methioninproduktion erfordert neben 3-Phosphoglycerat die Bereitstellung von OAA, einem Intermediat des TCA-Zyklus. Die anaplerotischen Enzyme PEP-Carboxylase und Pyruvat-Carboxylase liefern OAA nach, wodurch der TCA-Zyklus auch während der Produktion von Aspartat und damit auch von Methionin aufrechterhalten wird. Die Bildung von OAA aus PEP durch die PEP-Carboxylase ist in beiden Kombinationen aufgrund der Deletion der PEP-Carboxylase nicht möglich. Folglich kommt zum Auffüllen des OAA-Pools ausschließlich die Pyruvat-Carboxylase in Frage. Dies wiederum erfordert eine ausreichende Bereitstellung von Pyruvat. Der direkte Fluss von PEP zu Pyruvat ist durch die Deletion der Pyruvat-Kinase jedoch, wie bereits beschrieben, auf 100 % limitiert. In beiden Kombinationen von Gendeletionen fällt auf, dass nur ein einziger Modus sowohl die Transsulfurierung als auch die direkte Sulfurierung zur Methioninsynthese nutzt. Alle anderen Moden synthetisieren Methionin ausschließlich über die Transsulfurierung. Durch die Cystathionin- $\beta$ -Lyase wird in der Transsulfurierung Pyruvat freigesetzt. Auf diese

Weise stellt die Methioninsynthese also selbst eine zusätzliche Pyruvat-Quelle neben dem PTS-System bereit.

OAA kann in *C. glutamicum* durch die C<sub>4</sub>-decarboxylierenden Reaktionen der PEP-Carboxykinase und der OAA-Decarboxylase verbraucht werden, was zu einer Verminderung des verfügbaren OAA führen würde. Dies ist ein weiterer Grund, weshalb in beiden Kombinationen die PEP-Carboxykinase ausgeschaltet ist. Des Weiteren ist in keinem der Elementarmoden eine Aktivität der OAA-Decarboxylase zu verzeichnen. Lediglich das Malatenzym katalysiert die Decarboxylierung von Malat und damit einen Rückfluss zu Pyruvat, um NADPH bereitzustellen. Geschieht dies durch den bereits oben beschriebenen Transhydrogenase-ähnlichen Zyklus, kann OAA nicht im TCA-Zyklus regeneriert werden. Dies ist in Kombination 1 und bei der Hälfte der Moden in Kombination 2 der Fall.

Die Methioninsynthese erfordert nicht nur die Bildung von OAA, sondern auch die Synthese von Acetyl-CoA aus Pyruvat. Die Transsulfurierung verbraucht pro mol Methionin sogar 2 mol Acetyl-CoA. Um ausreichend Acetyl-CoA zur Aufrechterhaltung des TCA-Zyklus und anaboler Reaktionen bilden zu können, muss in beiden Kombinationen das gesamte in der Methioninsynthese verbrauchte Acetyl-CoA regeneriert werden. Dies geschieht, indem das freigesetzte Acetat durch die Acetat-Kinase unter ATP-Verbrauch zu Acetyl-Phosphat aktiviert und durch die Phosphotransacetylase wieder zu Acetyl-CoA umgewandelt wird. Es konnte gezeigt werden, dass beide Enzyme zwar eine dreifach höhere spezifische Aktivität beim Wachstum auf Acetat aufwiesen und die Transkription der entsprechenden Gene durch Acetat induziert wurde. Dennoch waren beide Enzyme auch beim Wachstum auf Glucose aktiv (Reinscheid et al., 1999). Die Aktivität dieser beiden Enzyme wird essentiell zur Kopplung von Wachstum und Methioninproduktion sein.

Mit steigender Methioninproduktion wird der Fluss von Acetyl-CoA in Richtung anaboler Reaktionen abgesenkt. So weist Kombination 1 mit der höchsten minimalen Methioninausbeute von 40,54 % C-mol eine stark reduzierte Biomasseausbeute von lediglich 3,6 % C-mol auf. Wie Abbildung IV-7 für Kombination 2 zeigt, geht auch hier eine erhöhte Methioninausbeute mit einer verminderten Biomasseausbeute und damit mit einem verminderten Kohlenstofffluss in Richtung anaboler Reaktionen einher.



**Abb. IV-7:** Biomasseausbeute [% C] in Abhängigkeit von der Methioninausbeute [% C] für Kombinationsmöglichkeit 2.

Die Methioninsynthese benötigt je mol Methionin 7 mol ATP. Der durch die Deletionen hervorgerufene glykolytische Rückstau erfordert, wie oben beschrieben, einen hohen Fluss durch die 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase, dem ersten Enzym der Serinsynthese. Dieses Enzym bildet NADH und stellt somit eine zusätzliche Quelle für Reduktionsäquivalente neben dem TCA-Zyklus dar, die zur ATP-Bildung genutzt werden kann. Während die Methioninsynthese, die in allen Moden wie beschrieben über die Transsulfurierung verläuft, eine Schlüsselposition zur Versorgung mit Pyruvat einnimmt, kommt der Serinsynthese somit eine entscheidende Rolle bei der Erzeugung von Reduktionsäquivalenten zur Energieversorgung der Zelle zu.

Die Bereitstellung der Aminogruppe für Asparat und Serin geht mit einem Transaminierungszyklus aus  $\alpha$ -Ketoglutarat, Glutamat, Oxalacetat sowie Phosphohydroxypyruvat einher. Einige Moden in Kombination 2 produzieren nicht nur Methionin, sondern können auch Lysin bilden. So sekretiert Familie 5 mit der höchsten Methioninausbeute ebenfalls Lysin mit einer Ausbeute von 18 % C-mol. Eine gleichzeitige Lysinbildung steht der Methioninproduktion somit nicht im Wege.

## 2. Erzeugung von Deletionsmutanten

Das Design eines Methioninproduzenten von *C. glutamicum* mittels Elementarmodenanalyse beruhte bisher ausschließlich auf theoretischen Betrachtungen. Im Folgenden sollten die identifizierten Gendeletionen, durch die Wachstum- und Methioninproduktion gekoppelt sein sollten, in *C. glutamicum* eingebracht werden. Das Ziel dabei ist es, zu überprüfen, ob die Selektion von Mutanten zur Methionin-Herstellung mittels Elementarmodenanalyse auch in der Praxis umsetzbar ist und somit möglicherweise ein generelles Werkzeug zur Erzeugung von Produktionsstämmen darstellt. Die zur Stammkonstruktion notwendigen molekularbiologischen Methoden wurden im Zuge dieser Arbeit in der Arbeitsgruppe etabliert. Alle Deletionen wurden in den definierten Stammhintergrund *C. glutamicum lysC<sup>fbr</sup>* eingebracht. Dieser Stamm ist gekennzeichnet durch eine Punktmutation im Gen der Aspartokinase (Kalinowski et al., 1991). Diese führt zur Feedback-Resistenz des Enzyms, wodurch Threonin und Lysin dieses nicht mehr inhibieren können. Hierdurch wird der Fluss zum Aspartat-Seminaldehyd, dem Verzweigungspunkt zwischen Lysin- und Methioninsynthese, erhöht. Somit steht für die Methioninsynthese eine größere Menge an Vorläufermolekülen zur Verfügung. Die Mutante *lysC<sup>fbr</sup> Δpyk* mit Deletion der Pyruvat-Kinase stand bereits zur Verfügung (Becker et al., 2008). In diese wurden alle weiteren Gendeletionen eingebracht.

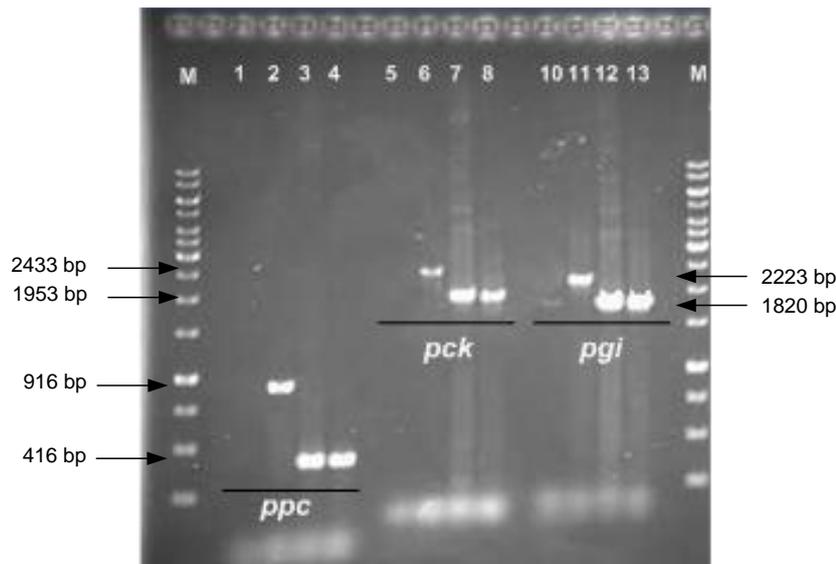
Die Konstruktion genetisch stabiler Mutanten erfolgte in Anlehnung an eine von Kirchner und Tauch (2003) beschriebene Methode. Hierbei wurden die jeweiligen chromosomalen Wildtyp-Gensequenzen mittels Allelaustausch durch verkürzte Sequenzen ersetzt. Die Herstellung der Deletionskonstrukte erfolgte mittels SOE-PCR. Hierbei wurden zwei die Deletionsregion flankierende DNA-Fragmente von jeweils mindestens 500 bp amplifiziert und anschließend in einer dritten PCR-Reaktion aufgrund komplementärer Sequenzen, die durch die 5'-Bereiche der Fusionsprimer erzeugt wurden, miteinander verknüpft. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden anschließend in den Vektor pClik-int-*sacB* ligiert. Dieser wurde mittels Elektroporation in *C. glutamicum* eingebracht. Über homologe Rekombination konnten so die entsprechenden Deletionskonstrukte ins Genom integrieren, was mittels PCR überprüft wurde. Positive Klone zeigten sowohl die Wildtyp- als auch die Knockout-Bande. Durch anschließende Kultivierung der erhaltenen Klone auf BHI-Medium ohne Kanamycin und Saccharose wurde die Entfernung des Vektors durch ein zweites Rekombinationsereignis ermöglicht. Klone, die eine zweite Rekombination durchlaufen hatten, konnten aufgrund ihrer Kanamycin-Empfindlichkeit und ihrer Saccharose-Toleranz selektiert werden (Jäger et al., 1992). Bei der zweiten Rekombination

handelt es sich um ein zufälliges Ereignis, bei dem theoretisch 50 % Wildtyp-Zellen und 50 % Mutanten entstehen. Daher wurden die erhaltenen Klone mittels PCR auf das Vorhandensein der verkürzten Knockout-Bande überprüft. In Tabelle IV-4 sind die in den jeweiligen PCR-Reaktionen zu erwartenden Banden aufgelistet.

**Tab. IV-4:** Zu erwartende Banden (Knockout- und Wildtyp-Banden) und Nachweis-Primer zur Überprüfung der Klone der 1. Rekombination und 2. Rekombination von *C. glutamicum* mit den Plasmiden pClik-int-sacB  $\Delta ppc$ , pClik-int-sacB  $\Delta pck$ , pClik-int-sacB  $\Delta pgi$  und pClik-int-sacB  $\Delta gnd$  sowie pClik-int-sacB  $\Delta zwf$ .

Gen	Knockout-Bande [bp]	Wildtyp-Bande [bp]	Nachweis-Primer
<i>ppc</i>	916	416	VS0026/ VS0027
<i>pck</i>	1953	2433	VS0010/ VS0013
<i>pgi</i>	1820	2223	VS0018/ VS0021
<i>gnd</i>	1742	2024	VS0022/ VS0025
<i>zwf</i>	1220	1565	VS0028/ VS0031

Für die Plasmide zur Deletion von *ppc*, *pck*, *pgi* und *gnd* wurden in der ersten Rekombination positive Klone erhalten. Die zweite Rekombination führte für die Gene *ppc*, *pck* und *pgi* zu Klonen mit der verkürzten Knockout-Bande. Letztendlich war es möglich, die in der Elementarmodenanalyse identifizierte Kombination 2 mit Deletion der Pyruvat-Kinase (*pyk*), PEP-Carboxylase (*ppc*), PEP-Carboxykinase (*pck*) sowie der Glucose-6-Phosphat-Isomerase (*pgi*) umzusetzen. Die Überprüfung der Deletionen mittels PCR ist in Abbildung IV-9 gezeigt.



**Abb. IV-9:** Ergebnis der PCR zur Überprüfung der in *C. glutamicum*  $lysC^{fbr} \Delta pyk$  eingebrachten Gendelektionen der PEP-Carboxylase (*ppc*), PEP-Carboxykinase (*pck*) und der Glucose-6-Phosphat-Isomerase (*pgi*) M = Marker; Spur 1,5,10 = Negativ-Kontrolle mit H<sub>2</sub>O; Spur 2, 6,11= Wildtyp-Kontrolle genomische DNA *C. glutamicum* ATCC 13032, Spur 3,7,12 = Plasmid-Kontrollen: pClik-int-*sacB* $\Delta ppc$ , pClik-int-*sacB* $\Delta pck$ , pClik-int-*sacB* $\Delta pgi$ , Spur 4,8,13 = Deletionsmutante  $lysC^{fbr} \Delta pyk \Delta ppc \Delta pck \Delta pgi$ .

Für die Deletion der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (*gnd*) gab es in der zweiten Rekombination keine positiven Klone. Alle getesteten Klone zeigten ausschließlich die Wildtypbande. Da der Versuch unternommen wurde, diese Deletion in die Mutante  $lysC^{fbr} \Delta pyk \Delta ppc \Delta pck$  einzubringen, sollte untersucht werden, ob es nur nicht möglich ist, das Gen in diesem speziellen Stammhintergrund auszuschalten. Daher wurde das Plasmid pClik-int-*sacB*  $\Delta gnd$  in *C. glutamicum* Wildtyp eingebracht. Auch hier zeigten alle 150 getesteten Klone der zweiten Rekombination ausschließlich die Wildtyp-Bande. Offensichtlich ist es unabhängig vom gewählten Stammhintergrund nicht oder jedenfalls nur sehr schwer möglich, dieses Gen in *C. glutamicum* auszuschalten.

Alternativ zur Deletion der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase kam gemäß der Elementarmodenanalyse auch der Knockout der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase in Frage. Dieses Enzym besteht in *C. glutamicum* aus zwei verschiedenen Proteinuntereinheiten, welche durch die beiden Gene *zwf* und *opcA* kodiert werden. Obwohl essentiell für die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase Aktivität in Cyanobakterien (Sundaram et al., 1998), ist die Rolle des *opcA*-Genprodukts in *C. glutamicum* noch nicht aufgeklärt. Daher sollte die *zwf*-Untereinheit mit bekannter katalytischer Aktivität ausgeschaltet werden. Das Plasmid pClik-int-*sacB*  $\Delta zwf$  sollte sowohl in  $lysC^{fbr}$

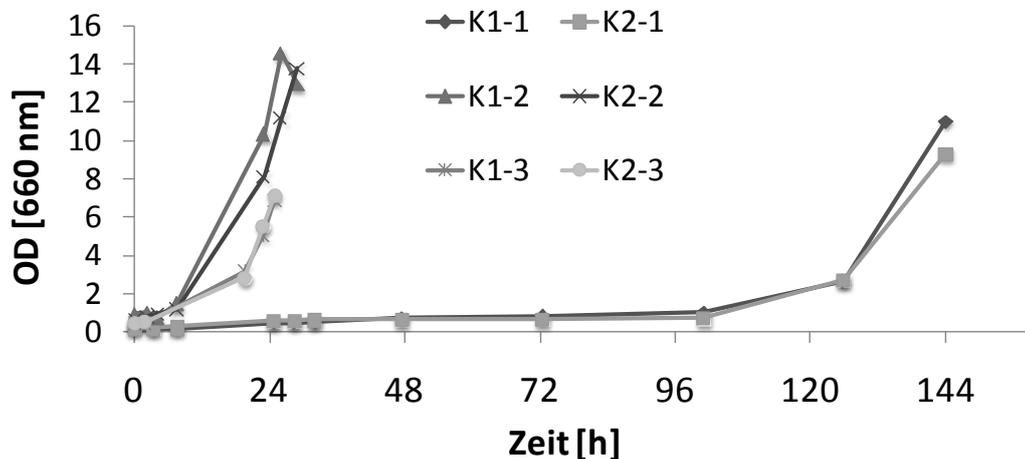
$\Delta pyk\Delta ppc\Delta pck$  als auch zur Kontrolle in den Wildtyp eingebracht werden. In beiden Fällen war trotz der relativ großen Homologie-Bereiche von jeweils 600 bp und mehrfacher Wiederholung der Elektroporation schon die erste Rekombination nicht erfolgreich.

In *E. coli* war es möglich, sowohl die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (*gnd*) als auch die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (*zwf*) ohne nennenswerte Beeinträchtigung des Wachstums auf Glucose zu deletieren (Xu et al., 2004). Interessanterweise war in der *gnd*-Mutante die Enzymaktivität der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase im Vergleich zum Wildtyp nur geringfügig niedriger. In Flussanalysen konnte außerdem gezeigt werden, dass der Fluss durch dieses Enzym zwar vermindert, aber nicht gänzlich blockiert war (Xu et al., 2004). Die Aktivität der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase führt zur Bildung von 6-Phosphogluconolacton, das in höheren Konzentrationen toxisch wirkt (Juhnke et al., 1996). In *E. coli* führte die *gnd*-Deletion zur Aktivierung des Entner-Doudoroff Weges, durch den das 6-Phosphogluconolacton in Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Pyruvat abgebaut werden konnte (Xu et al., 2004). Der Knockout von *gnd* in *Saccharomyces cerevisiae* war zwar möglich, obwohl dieser Organismus keinen Entner-Doudoroff Weg besitzt. Allerdings führte die Deletion zu schweren Beeinträchtigungen des Wachstums (Juhnke et al., 1996). *C. glutamicum* besitzt ebenfalls nicht die Möglichkeit der Entgiftung des 6-Phosphogluconolactons durch den Entner-Doudoroff-Weg (Vallino und Stephanopoulos, 2000). Möglicherweise ist die Empfindlichkeit von *C. glutamicum* gegenüber diesem Metaboliten höher als in *S. cerevisia*. Somit könnten toxische Konzentrationen des 6-Phosphogluconolactons das Wachstum einer  $\Delta gnd$ -Mutante unterdrücken. Am Ende dieser Arbeit wurde *C. glutamicum*  $\Delta zwf$  von der Arbeitsgruppe Bott (Forschungszentrum Jülich) zur Verfügung gestellt. Prinzipiell ist es also möglich dieses Gen in *C. glutamicum* zu deletieren. Die Kultivierung der Mutante auf Minimalmedium zeigte eine Wachstumsrate von  $0,007 \text{ h}^{-1}$  (persönliche Mitteilung, Susanne Peifer, Technische Biochemie). Das langsame Wachstum dieser Mutante könnte auf einen Mangel an NADPH oder auf inhibitorische bzw. reprimierende Konzentrationen von Glucose-6-Phosphat zurückzuführen sein (Ihnen und Demain, 1969). In der Analyse der theoretischen Flussverteilungen der Kombination mit Deletion des oxidativen Teils des PPPs wurde das Malatenzym mit einem Anteil von 78,7% als hauptsächliche NADPH-Quelle identifiziert. Ein weitere NADPH-Quelle stellt die Isocitrat-Dehydrogenase des TCA-Zyklus dar (Wittmann und Heinzle, 2002). In *E. coli* werden die Deletion von *gnd* als auch von *zwf* und der hierdurch hervorgerufene NADPH-Mangel durch einen erhöhten Fluss durch die Isocitrat-Dehydrogenase und das Malatenzym kompensiert (Xu et al., 2004). Betrachtet

man allerdings das Verzweigungsverhältnis zwischen Glykolyse und PPP in *C. glutamicum* und *E. coli* Wildtyp, so fällt auf, dass der Beitrag des PPP zur Versorgung mit NADPH in *C. glutamicum* mit 51 % (Wittmann und Heinzle, 2002) deutlich höher ist als in *E. coli* mit lediglich 20 %. In *E. coli* ist daher schon eine relativ geringe Erhöhung der Flüsse durch die Isocitrat-Dehydrogenase und das Malatenzym ausreichend, um das fehlende NADPH aus dem PPP zu kompensieren (Xu et al., 2004). Außerdem besitzt *E. coli* Transhydrogenasen, die NADH in NADPH umwandeln können (Clarke und Bragg, 1985). Die in der Elementarmodenanalyse berechneten Flussverteilungen sind stöchiometrisch sowie thermodynamisch aufgrund der definierten Richtung einer Reaktion möglich. Allerdings wird keine Aussage über die Reaktionsgeschwindigkeit getroffen. Auch werden Regulationen auf den unterschiedlichen Ebenen des Stoffwechsels nicht berücksichtigt. Aufgrund des deutlich höheren Beitrags des PPP zur NADPH Versorgung in *C. glutamicum* wäre es daher möglich, dass in *C. glutamicum* die Aktivitäten des Malatenzyms und der Isocitrat-Dehydrogenase aufgrund kinetischer oder regulatorischer Faktoren nicht ausreichend sind, um die Blockade des PPP zu kompensieren. An diesem Beispiel werden also die praktischen Grenzen der Elementarmodenanalyse aufgezeigt.

## 2.1 Adaption von *C. glutamicum lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpckΔpgi*

Im nächsten Schritt sollte die Deletionsmutante *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpckΔpgi* auf CG 12 ½ - Minimalmedium kultiviert werden, was in Abbildung IV-10 gezeigt ist.



**Abb. IV-10:** Wachstumsverlauf von *C. glutamicum lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpckΔpgi* auf CG 12 ½ - Minimalmedium. Die Kultivierungen erfolgten in zwei Parallelkolben (K1 und K2). Der Stamm wurde jeweils zweimal in frisches Medium überimpft.

Die Mutante zeigte für mindestens 96 Stunden kein signifikantes Wachstum auf CG 12 ½ - Minimalmedium. Erst nach längerer Inkubationsdauer war sie zum Wachstum auf Minimalmedium fähig. Diese Zellen wurden zweimal in frisches Minimalmedium überimpft und konnten nun ohne vorherige lag-Phase mit einer Wachstumsrate von  $\mu = 0,12 \text{ h}^{-1}$  wachsen. Von diesen Zellen wurde eine Gefrierkultur angelegt. Nach erneutem Ausstreichen auf CM-Agarplatten und Inokulation einer Vorkultur in CM-Komplexmedium wurden die Zellen wieder in Minimalmedium überführt. Dabei zeigte sich ebenfalls sofort Wachstum ( $\mu = 0,13 \text{ h}^{-1}$ ). Da die Wachstumsrate sich nicht mehr veränderte, wurde an dieser Stelle die Adaption beendet. Beide Parallelkultivierungen zeigten das gleiche Wachstumsprofil. Die Zellen des adaptierten Stammes wurden vereinzelt und es wurde ein Klon ausgewählt, mit dem im Folgenden weitergearbeitet wurde. Somit wurde gewährleistet, dass alle Zellen der Kultur die gleichen Eigenschaften aufwiesen.

Die eingebrachten Deletionen betrafen wichtige Knotenpunkte des Zentralstoffwechsels von *C. glutamicum*. Daher war zu erwarten, dass das Zellwachstum deutlich beeinträchtigt sein würde. Die Tatsache, dass die Mutante sich nach einer gewissen Zeit adaptieren konnte, belegt die Robustheit und Flexibilität des metabolischen Netzwerks von *C.*

*glutamicum*. Prinzipiell können verschiedene Mechanismen der Kompensation von Gendelektionen zu Grunde liegen. Eine Möglichkeit besteht in der Umlenkung des Kohlenstoffflusses durch bereits existierende Wege ohne signifikante Änderung von Enzymkonzentrationen. Solche Anpassungen können ausschließlich auf Änderungen in Metabolitkonzentrationen, die in enger Verbindung mit dem deletierten Enzym stehen, beruhen (Ishii et al., 2007). In anderen Fällen können alternative Wege durch Änderung der Genexpression oder durch Mutationen induziert werden (Fong und Palsson, 2004; Ishii et al., 2007). Ein weiterer, bislang wenig untersuchter Mechanismus kann auftreten, wenn Eingriffe in den Stoffwechsel so gravierend sind, etwa durch die Kombination mehrerer Deletionen, dass ein „normaler“ Stoffwechselweg nicht mehr möglich ist. So wurde in einer Transaldolase-defizienten Mutante von *E. coli* eine neue Möglichkeit zum Abbau von Sedoheptulose-7-Phosphat zu Erythrose-4-Phosphat und Dihydroxyacetonphosphat durch die Glykolyse-Enzyme Phosphofruktokinase und Aldolase beobachtet. Beide Enzyme zeigten keine Änderung der Genexpression. Stattdessen wurde diese Nebenaktivität durch die Akkumulation von Sedoheptulose-7-Phosphat induziert. Der durch diese Nebenaktivität ermöglichte Fluss war allerdings so hoch, dass die Mutante ein ähnliches Wachstumsverhalten wie der Wildtyp aufwies (Ishii et al., 2007).

Wenn das in der Elementarmodenanalyse zugrundegelegte Netzwerk alle relevanten Reaktionen umfasst und keine unerwarteten Nebenreaktionen auftreten, sollte durch die eingeführten Deletionen ein Selektionsdruck erzeugt werden, der den Organismus zwingt Methionin zu produzieren, um wachsen zu können. Da hiermit zunächst weitreichende Umlenkungen im Kohlenstofffluss einhergehen müssen, ist der beobachtete Adaptionsprozess positiv zu bewerten.

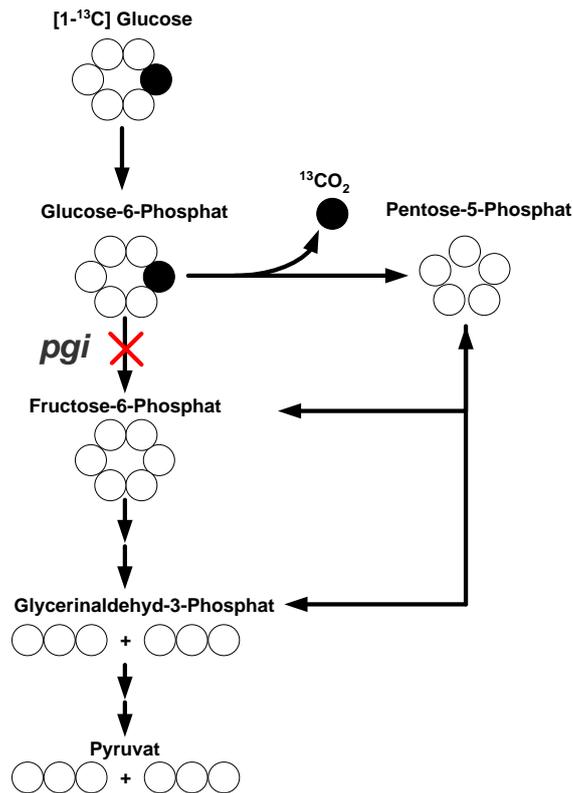
## **2.2 Genotypische und phänotypische Validierung der Deletionen des adaptierten Stammes von *C. glutamicum* $lysC^{fbr} \Delta pyk \Delta ppc \Delta pck \Delta pgi$**

Vor der eingehenden Charakterisierung der Mutante sollte zunächst sichergestellt werden, dass es sich bei dem adaptierten Stamm nicht um eine Kontamination mit einem anderen Organismus handelte. Hierzu wurde zunächst wieder mittels PCR untersucht, ob die ursprünglich eingebrachten Gendelektionen noch vorhanden waren. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass ein anderer Organismus kultiviert wurde. Zusätzlich zur genotypischen Validierung der Deletionen sollten diese auch phänotypisch überprüft werden. So kann es vorkommen, dass die genetische Modifikation keinen vollständigen Knockout, sondern lediglich eine Aktivitätssenkung der jeweiligen Enzyme zur Folge hat,

was ebenfalls überprüft werden musste. Des Weiteren sollte die Aktivierung von bisher nicht bekannten Isoenzymen oder Nebenaktivitäten anderer Enzyme ausgeschlossen werden. Untersuchungen an *C. glutamicum*-Mutanten mit den jeweiligen Einzelgendeletionen zeigten, dass keine Isoenzyme der betreffenden Gene vorliegen (Gubler et al., 1994; Marx et al., 2003; Peters-Wendisch et al., 1993; Riedel et al., 2001). Aufgrund der Tatsache, dass die Deletionsmutante erst nach Adaption auf Minimalmedium wachsen konnte, könnten aber unter Umständen bisher unbekannte Isoenzyme aktiviert worden sein. So wurde im Fall des Pyruvat-Kinase Gens in der KEGG-Datenbank von *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (Kyowa Hako) neben der deletierten Sequenz NCgl2008 eine zweite Pyruvat-Kinase Gensequenz NCgl2809 gefunden. Diese ist in der bekannten Literatur allerdings nicht erwähnt. Da in *C. glutamicum* *lysC<sup>fbr</sup>Δpyk* (NCgl2008) keine Pyruvat-Kinase Aktivität nachgewiesen werden konnte (Becker et al., 2008), scheint das Isoenzym normalerweise nicht aktiv zu sein. Trotzdem muss in der adaptierten Mutante eine Aktivität in dem bestehenden Stammhintergrund ausgeschlossen werden. Zum phänotypischen Nachweis der Deletionen wurden zwei unterschiedliche Strategien verfolgt. Während die Überprüfung des Knockouts der Glucose-6-Phosphat-Isomerase über ein Tracer-Experiment mit [1-<sup>13</sup>C]-Glucose erfolgte, sollte die Deletion der Pyruvat-Kinase, der PEP-Carboxylase und der PEP-Carboxykinase enzymatisch nachgewiesen werden.

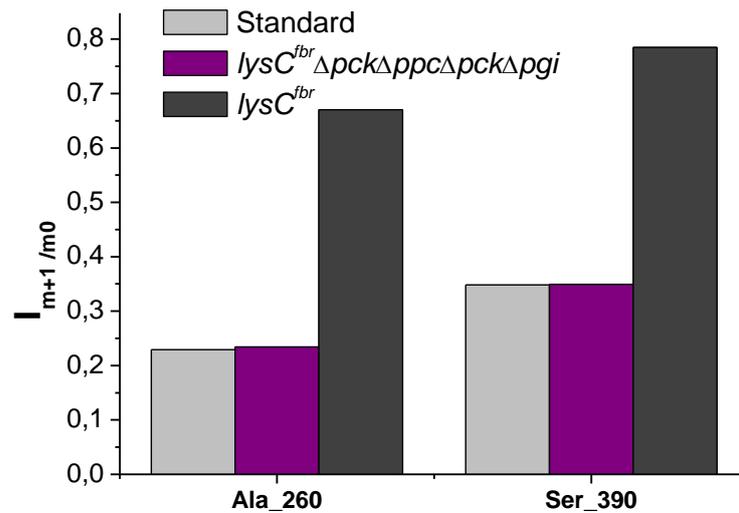
### **2.2.1 Phänotypische Überprüfung der Deletion der Glucose-6-Phosphat-Isomerase durch Kultivierung auf [1-<sup>13</sup>C]-Glucose**

Die phänotypische Überprüfung der Deletion der Glucose-6-Phosphat-Isomerase (*pgi*) erfolgte mit Hilfe eines Tracer Experiments auf [1-<sup>13</sup>C]-Glucose. Verläuft die Verstoffwechselung des Substrates ausschließlich über die Glykolyse, entsteht ein äquimolares Verhältnis aus natürlich markiertem und einfach markiertem Pyruvat. Bei Deletion von *pgi* muss die gesamte aufgenommene Glucose über den Pentosphosphatweg (PPP) geleitet werden. Durch die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase wird das erste Kohlenstoffatom der Glucose als <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> freigesetzt, womit ausschließlich natürlich markiertes Pyruvat entstehen sollte, was in Abbildung IV-11 gezeigt ist (Wittmann, 2002).



**Abb. IV- 11:** Schematischer Überblick über die Verteilung der <sup>13</sup>C-Markierung bei Kultivierung von *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpckΔpgi* zum phänotypischen Nachweis der Deletion der Glucose-6-Phosphat-Isomerase (*pgi*) auf [1-<sup>13</sup>C]-Glucose. (<sup>13</sup>C-Atome sind schwarz, natürlich markierte C-Atome sind weiß dargestellt; das Kreuz markiert den Knockout von *pgi*).

Da bei der Synthese der Aminosäuren Alanin und Serin das Kohlenstoffgerüst der beiden Vorläufermoleküle Pyruvat und 3-Phosphoglycerat nicht verändert wird, ist die Markierungsverteilung in diesen beiden Aminosäuren repräsentativ für die Markierung im Pyruvat bzw. im 3-Phosphoglycerat. Im Folgenden wurde sowohl der Ausgangsstamm *lysC<sup>fbr</sup>* als auch die Mutante auf [1-<sup>13</sup>C]-Glucose kultiviert und das Markierungsmuster dieser beiden proteinogenen Aminosäuren mittels GC/MS bestimmt (Abbildung IV-12). Zur Analyse wurden die [m-57]-Fragmente herangezogen, da sie das intakte Kohlenstoffgerüst der beiden Aminosäuren enthalten. Dargestellt ist das Verhältnis der Intensitäten der beiden Massenisotopomere m0 und m+1 der Aminosäuren Alanin und Serin.



**Abb. IV-12:** Verhältnisse der Intensitäten bei GC/MS-Messung der beiden Massenisotopomere  $m_0$  und  $m+1$  der Aminosäuren Alanin und Serin in einem natürlich markiertem Aminosäurestand, in der Mutante *lysC<sup>fbr</sup> ΔpykΔppcΔpckΔpgi* und im Ausgangstamm *lysC<sup>fbr</sup>*. Beide Stämme wurden auf  $[1-^{13}\text{C}]$ -Glucose kultiviert.

Der Ausgangsstamm *lysC<sup>fbr</sup>* zeigte sowohl für Alanin als auch für Serin ein deutlich erhöhtes Verhältnis von  $m+1$  zu  $m_0$ , was bedeutet, dass ein Teil der  $^{13}\text{C}$ -Markierung erhalten blieb. Dies zeigt, dass die aufgenommene  $[1-^{13}\text{C}]$ -Glucose sowohl über den PPP als auch über die Glykolyse verstoffwechselt wurde. Im Fall der Knockout-Mutante entspricht das Verhältnis von  $m+1$  zu  $m_0$  für Alanin und Serin dem des natürlich markierten Aminosäurestandards. Folglich muss das erste  $^{13}\text{C}$ -Atom der Glucose abgespalten worden sein, was nur möglich ist, wenn die gesamte Glucose durch den PPP geleitet wurde. Somit war davon auszugehen, dass in der adaptierten Mutante praktisch kein Fluss durch die Glykolyse zu verzeichnen war. Es konnte daher sowohl eine Restaktivität der Glucose-6-Phosphat-Isomerase als auch das Vorhandensein von Isoenzymen ausgeschlossen werden.

### 2.2.2 Phänotypische Überprüfung der Deletionen der Pyruvat-Kinase, PEP-Carboxykinase und PEP-Carboxylase

Die phänotypische Validierung der Deletionen der Pyruvat-Kinase, der PEP-Carboxykinase sowie der PEP-Carboxylase erfolgte durch Messung der entsprechenden Enzymaktivitäten. In folgender Tabelle sind die gemessenen spezifischen Enzymaktivitäten im Vergleich zu *lysC<sup>fbr</sup>* als Positiv-Kontrolle dargestellt.

**Tab. IV-5:** Spezifische Enzymaktivitäten in [mU/mg] der Stämme *lysC<sup>fbr</sup>*, *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpckΔpgi* zur Überprüfung der Deletionen der Pyruvat-Kinase, der PEP-Carboxykinase sowie der PEP-Carboxylase.

	Spezifische Enzymaktivität [mU/mg]		
	Pyruvat-Kinase	PEP-Carboxykinase	PEP-Carboxylase
<i>lysC<sup>fbr</sup></i>	1172	227	238
<i>lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpckΔpgi</i>	0	0	0

Während der Ausgangsstamm *lysC<sup>fbr</sup>* für alle untersuchten Enzyme hohe spezifische Aktivitäten zeigte, konnten diese in der Mutante nicht nachgewiesen werden. Es kann daher sowohl eine Restaktivität der jeweiligen Enzyme als auch das Vorhandensein von Isoenzymen ausgeschlossen werden. Die eingebrachten Gendeletionen in der adaptierten Mutante wurden somit sowohl genotypisch als auch phänotypisch validiert. Im Folgenden kann eine eingehende physiologische Analyse der Mutante im Vergleich zu *lysC<sup>fbr</sup>* durchgeführt werden.

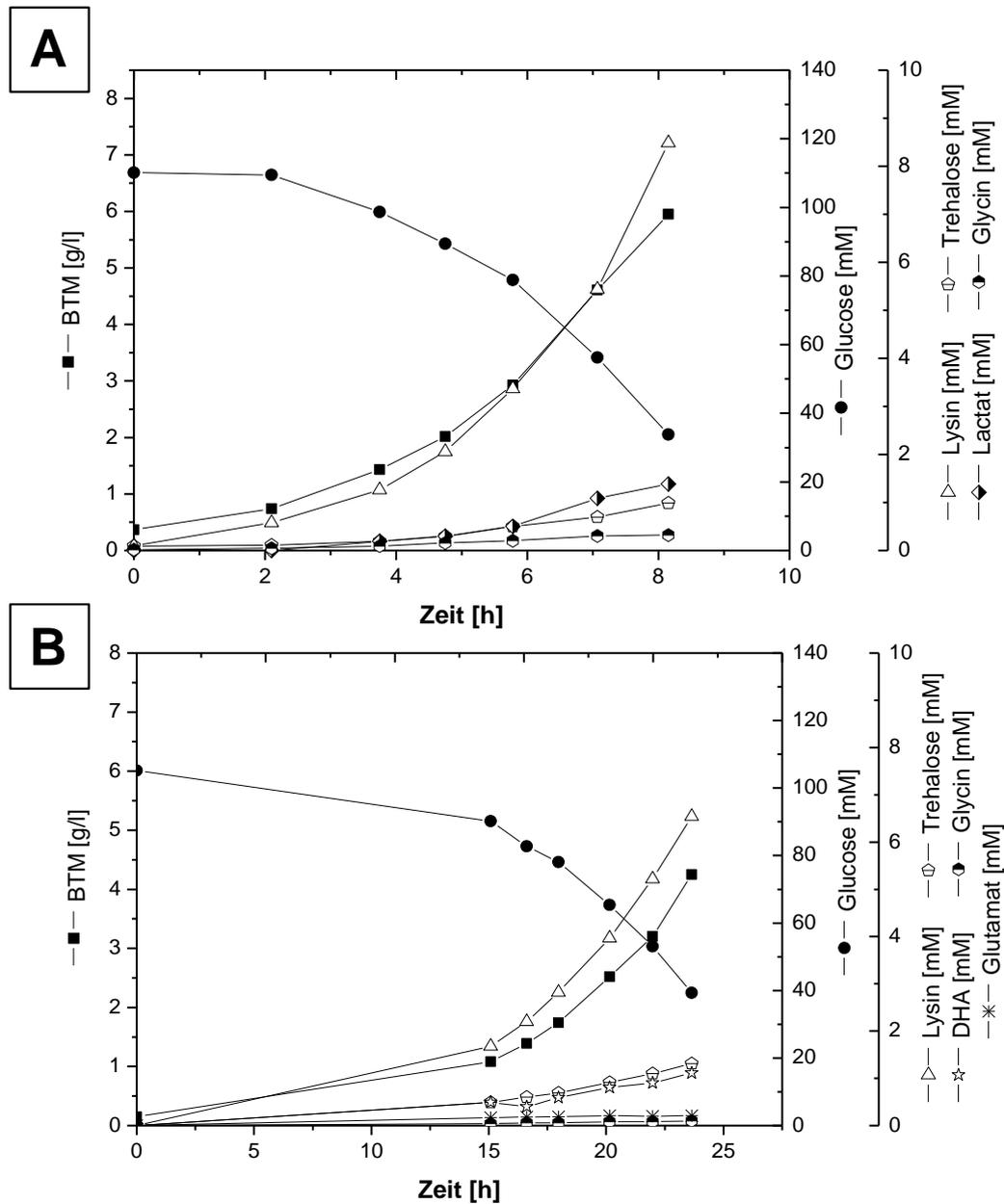
### 3. Systembiologischer Vergleich von *C. glutamicum lysC<sup>fbr</sup>* und *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpckΔpgi*

Die Erzeugung der Deletionsmutante *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpckΔpgi* basierend auf der theoretischen Elementarmodenanalyse könnte einen entscheidenden Schritt zur rationalen Erzeugung eines Methioninproduzenten von *C. glutamicum* darstellen. Der vorangegangene Teilbereich zeigte, dass aufgrund der eingebrachten Gendeletionen weitreichende Umlenkungen des Kohlenstoffflusses zu erwarten sind. Im Folgenden soll untersucht werden, ob in der Mutante Biomassebildung und Methioninproduktion tatsächlich gekoppelt sind. Durch Analyse von Wachstum, Produktbildung sowie der Untersuchung von Metabolom und Fluxom soll eine eingehende Charakterisierung der Mutante erfolgen. Zusammen mit der Bestimmung von Enzymaktivitäten kann so eine Verbindung zwischen genetischer Modifikation und der Aktivität verschiedener Stoffwechselwege erstellt werden.

### 3.1 Kultivierungsprofile

Der erste Analyseschritt zur Charakterisierung der Mutante *C. glutamicum lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpckΔpgi* und des Ausgangsstammes *lysC<sup>fbr</sup>* bestand im Vergleich der Wachstumsprofile, der Quantifizierung der Substrataufnahme sowie der Produktbildung (Abbildung IV-13). Die Batch-Kultivierungen erfolgten im Schüttelkolben. Die jeweils durchgeführten Parallelkultivierungen zeigten eine gute Reproduzierbarkeit. Beide Stämme wiesen in CG 12 ½ - Minimalmedium auf Glucose exponentielles Wachstum mit spezifischen Wachstumsraten von 0,38 h<sup>-1</sup> (*lysC<sup>fbr</sup>*) bzw. 0,15 h<sup>-1</sup> (Mutante) auf. Dies entspricht einer Verminderung des Wachstums um 61 % in der Mutante. Der Ausgangsstamm *lysC<sup>fbr</sup>* verbrauchte 76,15 mM Glucose in 8,2 Stunden und bildete dabei 5,95 g/l Biotrockenmasse. Die Mutante verbrauchte in etwa 23 Stunden nur 66 mM Glucose und bildete daraus 4,25 g/l Biotrockenmasse. Sowohl die Glucoseaufnahme als auch die Biomasseausbeute waren in der Mutante folglich deutlich vermindert. Als Hauptprodukt bildeten beide Stämme Lysin. Ebenso wie die Biomasse nahm auch die Lysinkonzentration im Verlauf der Kultivierung exponentiell zu, bis am Ende der Kultivierung eine Konzentration von 8,5 mM für *lysC<sup>fbr</sup>* und 6,5 mM für die Mutante erreicht wurde. Die Lysinproduktion erfolgte bei beiden Stämmen parallel zum Wachstum und der Batch-Prozess war nicht wie bei anderen Lysinproduzenten von *C. glutamicum* in eine Wachstums- und Produktionsphase gegliedert (Krömer et al., 2004). Neben Lysin wurden noch geringe Mengen an Nebenprodukten vorgefunden. Während beide Stämme Trehalose und Glycin bildeten, konnte Lactat nur in *lysC<sup>fbr</sup>* nachgewiesen werden. Die Bildung von DHA und geringen Mengen Glutamat war hingegen nur in der Mutante zu verzeichnen. Methionin war in den Kulturüberständen der Mutante allerdings nicht zu finden. Um auszuschließen, dass nur der hier ausgewählte Klon des adaptierten Stammes kein Methionin produzierte, wurden auch die Überstände nach der Adaption an Minimalmedium aber vor der Vereinzelung der Klone überprüft. Auch hier war kein Methionin zu finden. Somit konnte die Vorhersage der Elementarmodenanalyse, gemäß derer bei der vorliegenden Kombination an Deletionen das Wachstum an die Methioninproduktion gekoppelt sein muss, nicht bestätigt werden. Dies bedeutet, dass trotz der eingebrachten Gendelektionen Elementarmoden möglich waren, die Wachstum ohne Methioninproduktion erlauben. Während des Adaptionsprozesses der Mutante müssen folglich Reaktionen aktiviert worden sein, die in dem ursprünglichen Wildtyp-Modell, das als Grundlage für die Elementarmodenanalyse diente, nicht berücksichtigt wurden. Daher

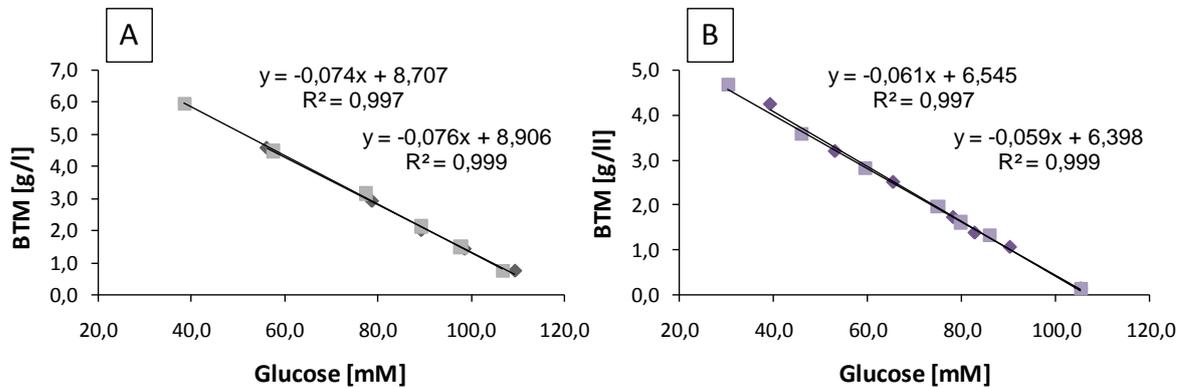
war es notwendig, diese im weiteren Verlauf der Arbeit zu identifizieren, um somit eine verbesserte Grundlage zur rationalen Erzeugung eines Methioninproduzenten zu schaffen.



**Abb. IV-13:** Kultivierungsprofile von *C. glutamicum*  $lysC^{fbr}$  (A) und  $lysC^{fbr} \Delta pyk \Delta ppc \Delta pck \Delta pgi$  (B) bei Batch-Kultivierung im Schüttelkolben auf CG 12 ½ - Minimalmedium mit Glucose. Dargestellt sind die Konzentrationen von Biomasse [g/l], Glucose und Lysin [mM] sowie die Konzentration der Nebenprodukte Trehalose, DHA, Glycin, Glutamat und Lactat [mM].

### 3.2 Vergleich von Wachstum und Substrataufnahme

Durch Auftragung der Biomassekonzentrationen gegen die Glucosekonzentration über den gesamten exponentiellen Kultivierungsverlauf konnten die Biomasseausbeuten für die beiden Stämme ermittelt werden (Abbildung IV-14).



**Abb. IV-14:** Biomassebildung in [g/l] von *C. glutamicum lysC<sup>fbr</sup>* (A) und *lysC<sup>fbr</sup> ΔpykΔppcΔpckΔpgi* (B) bezogen auf den Glucoseverbrauch in [mM] bei Batch-Kultivierung im Schüttelkolben auf CG 12 ½ - Minimalmedium mit Glucose.

Die in Abbildung IV-14 berechnete Steigung der Geraden bzw. deren Betrag entspricht dabei der Biomasseausbeute in [g/mmol]. Es wurden Mittelwerte aus den jeweiligen Parallelkultivierungen berechnet (Tabelle IV-6). Die Produktion der Biomasse über den hier dargestellten exponentiellen Bereich der Wachstumsphase war konstant, was bedeutet, dass während des exponentiellen Wachstums *quasi-steady-state* herrschte (Deshpande et al., 2009). Man spricht hier auch von *balanced growth* (Trudel et al., 1996). Durch Multiplikation der spezifischen Wachstumsrate mit dem Kehrwert der Biomasseausbeute lässt sich die spezifische Substrataufnahmerate berechnen. Tabelle IV-6 fasst die Wachstumsraten, Biomasseausbeuten sowie Glucoseaufnahmeraten der beiden Stämme zusammen.

**Tab. IV-6:** Übersicht über die spezifischen Wachstumsraten ( $\mu$ ) und Substrataufnahmeraten ( $q_s$ ) sowie die jeweiligen Biomasseausbeuten der beiden Stämme *lysC<sup>fbr</sup>* und *lysC<sup>fbr</sup> ΔpykΔppcΔpckΔpgi* (Mutante).

	<i>lysC<sup>fbr</sup></i>	Mutante
$\mu$ [h <sup>-1</sup> ]	0,38 (± 0,01)	0,15 (± 0,01)
$Y_{x/s}$ [g/mol]	75,4 (± 4,5)	60,4 (± 1,2)
$q_s$ [mmol/g/h]	5,08	2,54

Anhand der beiden Geraden wird deutlich, dass sich die Biomasseausbeuten der beiden Stämme, wie oben erwähnt, unterschieden. Die Ausbeuten lagen bei 72,6 g/mol für *lysC<sup>fbr</sup>* und bei 60,4 g/mol für die Mutante. Die Glucoseaufnahmerate war in der Mutante mit 2,54 mmol/g/h im Vergleich zu *lysC<sup>fbr</sup>* mit 5,084 mmol/g/h halbiert. Als Konsequenz zeigte die Mutante auch eine deutlich verminderte Wachstumsrate.

In der Mutante muss durch die Deletion der Glucose-6-Phosphat-Isomerase die gesamte aufgenommene Glucose über den PPP verstoffwechselt werden. Für die Lysinproduzierende  $\Delta$ *pgi*-Mutante von *C. glutamicum* DSM5715 wurde ebenso eine reduzierte spezifische Wachstums- und Glucoseaufnahmerate festgestellt. Auch wurde eine verminderte Biomasseausbeute beschrieben (Marx et al., 2003). Eine verminderte Wachstumsrate konnte auch für  $\Delta$ *pgi*-Mutanten von *E. coli* beobachtet werden. Die maximale spezifische Wachstumsrate war hier von 0,74 h<sup>-1</sup> im Wildtyp auf 0,16 h<sup>-1</sup> in der Mutante reduziert (Canonaco et al., 2001). Die Beeinträchtigung des Wachstums wurde sowohl in *E. coli* als auch in *C. glutamicum* auf ein Ungleichgewicht im NADPH/NADP<sup>+</sup>-Haushalt zurückgeführt. Das im PPP produzierte NADPH muss reoxidiert werden, weshalb eine unzureichende Reoxidationskapazität zu einer verminderten Wachstumsrate und Glucoseaufnahme führen könnte. Moritz et al. (2000) konnten außerdem zeigen, dass in *C. glutamicum* die beiden Enzyme Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase der Feedbackregulation durch NADPH unterliegen. Die verminderte Glucoseaufnahme in  $\Delta$ *pgi*-Mutanten von *C. glutamicum* könnte also durch die *in vivo* Aktivität dieser beiden Enzyme limitiert werden. Die Methioninproduktion, welche pro mol Methionin 8 mol NADPH verbrauchen würde, könnte somit zu einer verbesserten Glucoseaufnahme führen. In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass die Verbesserung der NADPH-Reoxidationskapazität durch Überexpression der löslichen Transhydrogenase UdhA die spezifische Wachstumsrate um etwa 25 % steigerte, was diese Hypothese unterstützt. Ein weiterer Grund für die geringere Glucoseaufnahme und somit für das schlechtere Wachstum der Mutante könnte in einem Mangel an verfügbarem Glucose-6-Phosphat durch eine unzureichende Aktivität des PTS-Systems zur Glucoseaufnahme oder aber in einer unzureichenden Expression der Enzyme des PPP liegen.

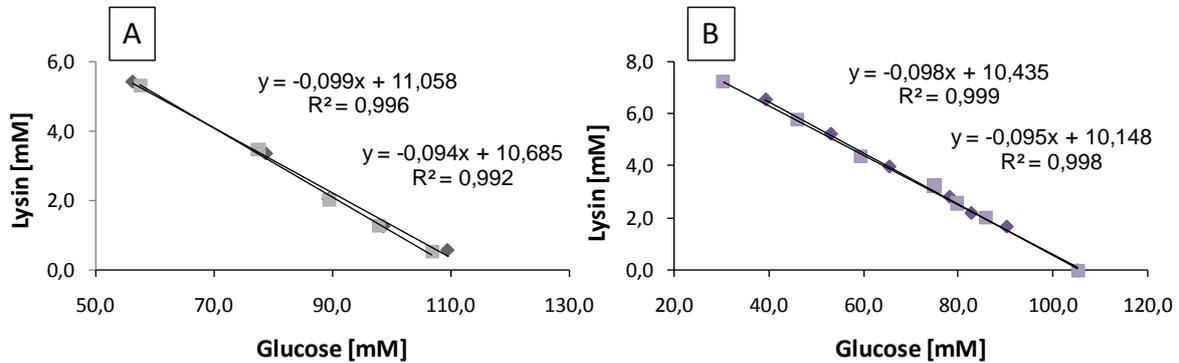
Die Deletion der Pyruvat-Kinase in *lysC<sup>fbr</sup>* alleine hatte keinen signifikanten Einfluss auf Wachstums- und Glucoseaufnahmerate. Während in *lysC<sup>fbr</sup>* gezeigt wurde, dass die Pyruvat-Carboxylase das wichtigste anaplerotische Enzym darstellt, konnte in der  $\Delta$ *pyk*-Mutante kein Fluss durch diese Reaktion festgestellt werden. Vielmehr konnte die Carboxylierung von PEP zu Oxalacetat als einzige anaplerotische Reaktion identifiziert

werden. Durch die Umlenkung des Kohlenstoffflusses von PEP zu Oxalacetat und Malat und anschließend zu Pyruvat über die Enzyme PEP-Carboxylase, Malat-Dehydrogenase und Malat-Enzym ist diese Mutante in der Lage, den Verlust der Pyruvat-Kinase zu kompensieren und ausreichende Mengen an Pyruvat bereitzustellen (Becker et al., 2008). Die Kombination der Deletionen  $\Delta pyk \Delta ppc$  in der *C. glutamicum* 21253 führt jedoch zu einer deutlich verminderten spezifischen Glucoseaufnahme- und Wachstumsrate (Park et al., 1997b). Die einzige Möglichkeit zur Pyruvat-Synthese in der Doppelmutante besteht in der Glucoseaufnahme durch das PTS<sup>Glc</sup>-System, wobei pro mol aufgenommene Glucose ein mol Pyruvat gebildet wird. Somit ist in der Doppelmutante die Verfügbarkeit von Pyruvat zur Synthese von Oxalacetat durch Pyruvat-Carboxylierung sowie zur Acetyl-CoA-Synthese durch die Pyruvat-Dehydrogenase vermindert. Dies wiederum führt zu einer Limitierung an Energie und Biosynthesevorläufern.

Da in der vorliegenden Mutante die Deletionen  $\Delta pyk$ ,  $\Delta ppc$  und  $\Delta pgi$  miteinander kombiniert wurden, sind die verringerte Wachstumsrate, die verminderte Glucoseaufnahme und eine geringere Biomasseausbeute zu erwarten gewesen. Die  $\Delta pck$ -Mutation führt zumindest als Einzeldelation nicht zu schlechterem Wachstum und Glucoseaufnahme (Petersen et al., 2001). Allerdings ist sie in Kombination mit den anderen Deletionen bisher nicht untersucht.

### 3.3 Vergleich von Produkt- und Nebenproduktbildung

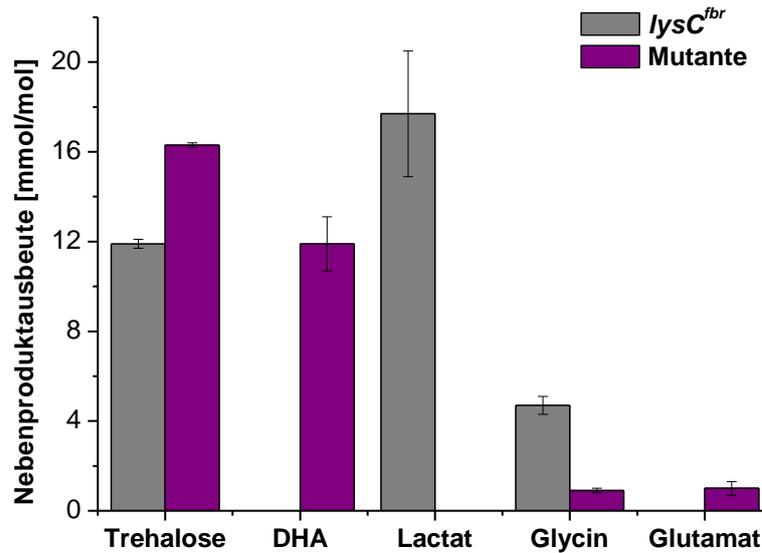
Zur Berechnung der Lysinausbeute wurden die entsprechenden Konzentrationen gegen die Glucosekonzentration während des exponentiellen Bereichs der Wachstumsphase aufgetragen (Abbildung IV-15).



**Abb. IV-15:** Lysinbildung in [mM] von *C. glutamicum lysC<sup>fbr</sup>* (A) und *lysC<sup>fbr</sup> ΔpykΔppcΔpckΔpgi* (B) bezogen auf den Glucoseverbrauch in [mM] bei Batch-Kultivierung im Schüttelkolben auf CG 12 ½ - Minimalmedium mit Glucose.

Die Lysinproduktion war ebenso wie die Produktion der Biomasse über den exponentiellen Bereich der Wachstumsphase konstant. Die Ausbeuten lagen bei 95,2 mmol/mol ( $\pm 7,4$ ) in *lysC<sup>fbr</sup>* und bei 96,9 mmol/mol ( $\pm 2,3$ ) in der Mutante. Die Lysinausbeute zeigte trotz der deutlich verringerten Glucoseaufnahmerate in der Mutante keinen signifikanten Unterschied zum Ausgangsstamm. Die unveränderte Lysinausbeute ging mit einer verringerten Biomasseausbeute in der Mutante einher. Dies bedeutet, dass eine Umlenkung des Kohlenstoffflusses in Richtung Lysinproduktion stattgefunden hat. Die Synthese von einem C-mol Lysin verbraucht 0,7 mol NADPH, während bei der Bildung von einem C-mol Biomasse nur 0,4 mol NADPH reoxidiert werden. Je C-mol Lysin kann also 75 % mehr NADPH reoxidiert werden als durch die Produktion von Biomasse. Die erhöhte NADPH-Bereitstellung aufgrund der *pgi*-Deletion treibt offenbar NADPH-verbrauchende Reaktionen an (Marx et al., 2003), um den intrazellulären NADPH-Spiegel zu verringern, damit Glucoseaufnahme und Wachstum nicht zum Erliegen kommen.

Auch zeigten sich deutliche Unterschiede in den gebildeten Nebenprodukten (Abbildung IV-16). Die Nebenproduktausbeuten waren über den Kultivierungszeitraum in beiden Stämmen ebenfalls konstant (nicht dargestellt).



**Abb. IV-16:** Vergleich der Nebenproduktausbeuten der beiden Stämme *lysC<sup>fbr</sup>* und *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpckΔpgi* (Mutante) auf CG 12 ½ - Minimalmedium. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen Doppelbestimmungen. Die Ausbeuten wurden über den gesamten exponentiellen Kultivierungsverlauf berechnet.

Das Hauptnebenprodukt bei der Kultivierung auf CG 12 ½ - Medium war Trehalose. Die Mutante akkumulierte mit 16,3 mmol/mol 27 % mehr Trehalose als *C. glutamicum lysC<sup>fbr</sup>* mit 11,9 mmol/mol. Dieses Disaccharid wird aus Glucose-6-Phosphat und UDP-Glucose synthetisiert und zählt wie Glutamat, Prolin und Betain zu den sogenannten kompatiblen Soluten, die unter anderem zur Osmoregulation dienen (Ronsch et al., 2003; Wolf et al., 2003). Die deutliche Akkumulation dieses Metaboliten zeigt in diesem Fall, dass die verringerte Glucoseaufnahme in der Mutante nicht an einer unzureichenden Aktivität des PTS-Systems zur Glucose-Aufnahme und somit an einem Mangel an verfügbarem Glucose-6-Phosphat liegen kann. Vielmehr unterstützt die erhöhte Sekretion von Trehalose die Vermutung, dass die Aktivitäten der Enzyme des PPP nicht ausreichend sind, um die aufgenommene Glucose komplett in den PPP zu schleusen, wodurch es zu einer Akkumulation von Glucose-6-Phosphat kommt. Für eine *Δpgi*-Mutante von *E. coli* konnte eine erhöhte intrazelluläre Konzentration von Glucose-6-Phosphat gezeigt werden, was diese Vermutung weiter untermauert (Nor 'Aini A.R., 2006).

Während der Ausgangsstamm kein Dihydroxyaceton (DHA) bildete, zeigte die Mutante mit 12 mmol/mol eine deutliche Akkumulation dieses Metaboliten. Die Akkumulation dieses Nebenproduktes deutet auf einen metabolischen Engpass im unteren Teil der Glykolyse hin. Es bildet sich ein Metabolitrückstau bis zum Dihydroxyacetonphosphat,

dem Vorläufer von DHA. Auch frühere Studien konnten eine Akkumulation dieses overflow-Metaboliten bei Deletion der Pyruvat-Kinase zeigen (Becker et al., 2008; Park et al., 1997b). Eine Ursache könnte eine limitierende Aktivität der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase sein, deren Aktivität durch ein erhöhtes Verhältnis von NADH zu  $\text{NAD}^+$  negativ beeinflusst wird (Dominguez et al., 1998). In *C. glutamicum lysC<sup>fbr</sup>Δpyk* konnte allerdings gezeigt werden, dass der Fluss durch dieses Enzym im Vergleich zu *lysC<sup>fbr</sup>* nicht verringert war, so dass diese Möglichkeit eher nicht in Betracht kommt. In *lysC<sup>fbr</sup>Δpyk* wurde die anaplerotische Carboxylierung vollständig durch die PEP-Carboxylase übernommen, so dass eine Beteiligung dieses Enzyms an der beobachteten Limitierung wahrscheinlicher ist (Becker et al., 2008). Eine Blockade der Carboxylierung von PEP, wie sie in der Mutante vorliegt, muss demzufolge zu einem glykolytischen Rückstau führen, was auch schon in der theoretischen Diskussion der Flussverteilungen vorhergesagt wurde. Bei einer Glucoseaufnahmerate von 2,54 mmol/g/h ist die Bildungsrate für DHA mit 0,03 mmol/g/h allerdings zu gering, um den glykolytischen Rückstau vollständig zu kompensieren. Aufgrund der Deletion der Glucose-6-Phosphat-Isomerase kann auch kein Ausgleich über einen Rückfluss des Kohlenstoffes in den PPP stattfinden. Dies zeigt wieder, dass es andere Reaktionen geben muss, um den Rückstau in der Glykolyse zu kompensieren, welche aber in der Elementarmodenanalyse nicht berücksichtigt wurden. Die theoretische Flussanalyse sagte eine Umlenkung des Kohlenstoffflusses auf der Höhe des 3-Phosphoglycerates Richtung Serinsynthese und anschließend zur Methioninsynthese voraus. Methionin war, wie bereits erwähnt, in den Überständen allerdings nicht zu finden. Die Glycinbildung war in der Mutante mit einer Ausbeute von 0,9 mmol/mol im Vergleich zu *lysC<sup>fbr</sup>* mit 4,7 mmol/mol stark vermindert. Da Glycin bei der Bildung von Methyl-THF aus Serin entsteht, legen die gemessenen Glycinausbeuten eine deutliche Änderung im Bereich der Serinsynthese nahe. Die Messung intrazellulärer Metabolite sollte hier nähere Hinweise geben.

Ein deutlicher Unterschied zwischen Ausgangsstamm und Mutante war außerdem in der Lactatsekretion zu finden. Lactat, das direkt aus Pyruvat gebildet wird, konnte in *lysC<sup>fbr</sup>* mit einer Ausbeute von 17,7 mmol/mol detektiert werden, während die Mutante kein Lactat ins Medium abgab. Pyruvat wird sowohl für anabole Reaktionen als auch für den TCA-Zyklus benötigt. Die Lysinsynthese verbraucht äquimolare Mengen an Pyruvat und OAA. Die Bildung von OAA zur Lysinsynthese und zur Aufrechterhaltung des TCA-Zyklus kann in der Mutante wiederum ausschließlich durch die Pyruvat-Carboxylase aus Pyruvat

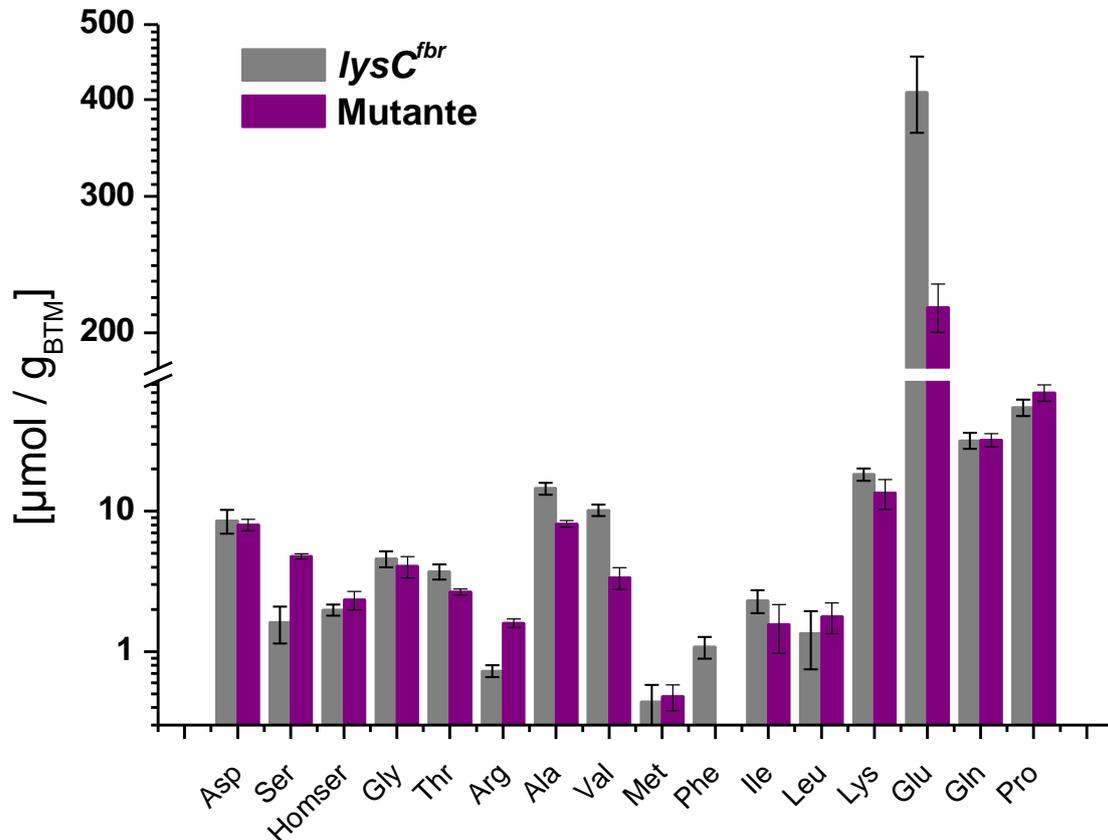
gebildet werden. Daher ist eine Lactatsekretion als Pyruvat overflow-Metabolismus in der Mutante auch nicht zu erwarten.

### 3.4 Vergleich des Metaboloms

Im Folgenden wurde der Effekt der Deletionen auf die intrazellulären Aminosäuren untersucht. Hierzu wurden während des exponentiellen Wachstums im Schüttelkolben Zellextrakte mittels schneller Filtration hergestellt und diese mittels HPLC analysiert. Intermediate des Zentralstoffwechsels wie Pyruvat, Fumarat oder  $\alpha$ -Ketoglutarat wurden nicht analysiert, da sich deren Konzentrationen zu schnell ändern, wenn die Zellen vor der Extraktion nicht gequ coastet werden (Krömer et al., 2008; Wittmann et al., 2004b). Die Konzentrationen der Aminosäuren wurden auf die entnommene Biomasse normiert (Angaben in  $\mu\text{mol g}_{\text{BTM}}^{-1}$ ) und es wurden pro Stamm je vier Extrakte aus jeweils zwei Parallelkolben zu verschiedenen Zeitpunkten hergestellt. Die hieraus gebildeten Mittelwerte der Konzentrationen der intrazellulären Aminosäuren wiesen relativ geringe Standardabweichungen auf, was zum einen die Reproduzierbarkeit der Extraktionsmethode zeigt und zum anderen den *quasi-steady-state* Zustand während der exponentiellen Wachstumsphase bestätigt.

Die Untersuchung der extrazellulären Metabolite zeigte kein Methionin im Kulturüberstand. Trotzdem könnte es sein, dass die intrazellulären Konzentrationen von Intermediaten des Methioninstoffwechsels in der Mutante erhöht sind und es aufgrund eines Flaschenhalses in diesem Stoffwechselweg nicht zur Sekretion von Methionin kommt. So wurde beispielsweise in *C. glutamicum*  $\Delta\text{mcbR}$  die Akkumulation des Metaboliten Homolanthionin, einem Intermediat des Methioninstoffwechsels, gefunden. Diese Deletionsmutante zeichnet sich durch einen Knockout des Methionin- und Cystein-Biosynthese Regulatorgens (*mcbR*) aus, wodurch es zur Expressionssteigerung nahezu aller am Methioninsyntheseweg beteiligten Gene kommt. Die Synthese der nicht-proteinogenen Diaminosäure Homolanthionin aus O-Acetylhomoserin und Homocystein wird durch die Cystathionin- $\gamma$ -Synthase katalysiert und stellt eine durch die geringe Substratspezifität bedingte Nebenreaktion dieses Enzyms dar. Normalerweise katalysiert die Cystathionin- $\gamma$ -Synthase die Synthese von Cystathionin aus Cystein und O-Acetylserin. Die Akkumulation von Homolanthionin wurde als Möglichkeit zur Entgiftung hoher Homocystein-Konzentrationen in der  $\Delta\text{mcbR}$ -Mutante angesehen. Gleichzeitig zeigt diese Akkumulation, dass der letzte Schritt der Methioninsynthese, nämlich die Methylierung von Homocystein, einen Flaschenhals für die Methioninproduktion darstellt (Krömer et al.,

2006a; Rey et al., 2005). In Abbildung IV-17 sind die gemessenen intrazellulären Aminosäurekonzentrationen von *C. glutamicum lysC<sup>fbr</sup>* und *lysC<sup>fbr</sup> ΔpykΔppcΔpckΔpgi* mit den dazugehörigen Standardabweichungen dargestellt.



**Abb. IV-17:** Intrazelluläre Aminosäurekonzentrationen von *C. glutamicum lysC<sup>fbr</sup>* und *lysC<sup>fbr</sup> ΔpykΔppcΔpckΔpgi* (Mutante) bei Kultivierung im Schüttelkolben auf CG 12 ½ - Minimalmedium. Gezeigt sind die Mittelwerte von jeweils 8 Extrakten pro Stamm (vier Extrakte aus zwei Parallelkolben) mit den dazugehörigen Standardabweichungen. Die Konzentrationen der Aminosäuren wurden auf die Biomasse normiert (Angaben in μmol/g<sub>BTM</sub>) und sind halblogarithmisch dargestellt.

Der intrazelluläre Methioninpool war in der Mutante im Vergleich zu *lysC<sup>fbr</sup>* nicht erhöht. Auch eine erhöhte Konzentration des Vorläufermoleküls Homoserin konnte nicht beobachtet werden. Andere Intermediate des Methioninstoffwechsels wie O-Acetylhomoserin, Homocystein oder Cystathionin waren weder im Ausgangsstamm noch in der Mutante detektierbar. Dementsprechend kam es auch nicht zur Akkumulation von Homolanthionin. Durch die eingebrachten Deletionen wurde somit der Fluss in den Methioninsyntheseweg selbst nicht gesteigert. Außerdem konnte für die gegenwärtige Situation ausgeschlossen werden, dass Transportprozesse für die ausbleibende

extrazelluläre Sekretion von Methionin durch die Mutante verantwortlich sind, da sonst höhere intrazelluläre Methionin-Konzentrationen zu erwarten gewesen wären.

Signifikante Unterschiede waren allerdings in der Serinkonzentration zu verzeichnen. Diese war in der Mutante mit  $4,8 \mu\text{mol/g}_{\text{BTM}}$  um das Dreifache im Vergleich zu  $lysC^{fbr}$  mit  $1,6 \mu\text{mol/g}_{\text{BTM}}$  erhöht. Hier zeigt sich, wie schon in der Analyse der Nebenproduktbildung vermutet, eine deutliche Veränderung im Serinstoffwechsel der Mutante. Eine erhöhte intrazelluläre Serinkonzentration kann ein Hinweis auf einen erhöhten Fluss in diesen Stoffwechselweg sein, was wiederum mit den theoretischen Vorhersagen zu der Deletionsmutante übereinstimmen würde. Wenn gleichzeitig zu dem erhöhten Fluss Richtung Serin ein verbesserter Fluss in den  $C_1$ -Stoffwechsel vorliegen würde, wäre ein Anstieg der intrazellulären Glycinkonzentration zu erwarten. Die Glycinkonzentration blieb aber im Vergleich zu  $lysC^{fbr}$  unverändert. Die verbesserte Bereitstellung von Serin wurde also nicht dazu genutzt, mehr  $C_1$ -Vorläufer für die Methioninsynthese zu bilden. Aufgrund der verminderten Sekretion von Glycin in der Mutante schien der Fluss in diesen Stoffwechselteil eher vermindert. Trotzdem versuchte die Zelle einen möglichst konstanten intrazellulären Glycinpool aufrechtzuerhalten, da Glycin zur Synthese von Purinen und des Häms benötigt wird. Auch wirkte sich die erhöhte Serinkonzentration nicht messbar auf den Cysteinpool aus. Cystein konnte in keinem der Extrakte nachgewiesen werden. Der beobachtete Anstieg der intrazellulären Serinkonzentration war allerdings auch zu gering, um den durch die Deletionen hervorgerufenen Rückstau in der Glykolyse auszugleichen. Auch hier zeigt sich wieder, dass es andere Reaktionen geben muss, die in den Elementarmoden zur Selektion der Deletionen nicht berücksichtigt wurden.

Ein deutlicher Unterschied zwischen Ausgangstamm und Mutante war außerdem in den Aminosäuren der Pyruvatfamilie zu erkennen. Die intrazelluläre Valinkonzentration war mit  $3,4 \mu\text{mol/g}_{\text{BTM}}$  in der Mutante im Vergleich zu  $lysC^{fbr}$  mit  $10,2 \mu\text{mol/g}_{\text{BTM}}$  um 67 % niedriger. Ebenso war die intrazelluläre Konzentration von Alanin um 45 % von  $14,6 \mu\text{mol/g}_{\text{BTM}}$  in  $lysC^{fbr}$  auf  $8,1 \mu\text{mol/g}_{\text{BTM}}$  in der Mutante verringert. Die Konzentration von Leucin hingegen zeigte keinen signifikanten Unterschied in Mutante und Ausgangstamm. Die Poolgröße von Leucin war im Vergleich zu den beiden anderen Aminosäuren mit  $1,4 \mu\text{mol/g}_{\text{BTM}}$  in  $lysC^{fbr}$  und  $1,8 \mu\text{mol/g}_{\text{BTM}}$  in der Mutante allerdings auch deutlich geringer. Lysin, welches aus OAA und Pyruvat gebildet wird, zeigte keine signifikanten Unterschiede, wurde jedoch sekretiert. Entsprechend zur Lysinkonzentration zeigte sich auch kein Unterschied in der intrazellulären Konzentration von Aspartat, dem Vorläufer von Lysin. Die Synthese von Alanin und Valin verbraucht 1 mol bzw. 2 mol NADPH.

Valin wird außerdem aus zwei Pyruvatmolekülen synthetisiert. Offensichtlich wird in der Mutante die Verwendung von Pyruvat für die Lysinsynthese, in der 4 mol NADPH reoxidiert werden können, bevorzugt.

Die am höchsten konzentrierte intrazelluläre Aminosäure stellte in beiden Stämmen Glutamat dar. Die Glutamatkonzentration in der Mutante war mit  $216 \mu\text{mol/g}_{\text{BTM}}$  im Vergleich zu *lysC<sup>fbr</sup>* mit  $409 \mu\text{mol/g}_{\text{BTM}}$  fast halbiert. Die Glutaminkonzentration hingegen blieb unverändert. Beide Aminosäuren fixieren Ammonium und fungieren somit als Aminogruppendonoren, um Stickstoff für die Zelle zugänglich zu machen (Merrick und Edwards, 1995). Die Fixierung von Ammonium erfolgt bei hohen Konzentrationen durch die NADP<sup>+</sup>-abhängige Glutamat-Dehydrogenase (GDH) in einer reduktiven Aminierung von  $\alpha$ -Ketoglutarat zu Glutamat. Glutamat kann außerdem durch die aufeinanderfolgenden Reaktionen der Glutamin-Synthetase (GS) und der Glutamat-Synthase (GOGAT) unter Verbrauch von ATP und NADPH gebildet werden. Während die Expression der GDH konstitutiv ist, wird das GS/GOGAT-System bei hohen Ammoniumkonzentrationen herunterreguliert. Trotzdem muss die Glutamin-Synthetase auch dann noch aktiv sein, um Glutamin zu synthetisieren (Burkovski, 2003). Eine Stickstofflimitierung im Medium kann ausgeschlossen werden, da das verwendete CG 12 ½ - Minimalmedium sehr reich an Stickstoff ist. Ein verringerter Glutamat-Pool in der Mutante könnte auf einen erhöhten Glutamat-Bedarf als Stickstoffdonor für die Lysinproduktion in der Mutante zurückzuführen sein. Des Weiteren könnte eine verminderte Bereitstellung von  $\alpha$ -Ketoglutarat zu der geringeren intrazellulären Glutamatkonzentration beitragen. Dies wiederum lässt auf einen niedrigeren Fluss durch den TCA-Zyklus in der Mutante schließen. Da Glutamin direkt aus Glutamat gebildet wird, wäre folglich auch eine verminderte Glutaminkonzentration in der Mutante zu erwarten, was allerdings nicht der Fall war. Glutamin dient als Stickstoffquelle für die Synthese von Carbamoylphosphat, Histidin, Purinen und Glucosamin-6-Phosphat, einem Vorläufer des Peptidoglykans. Der Peptidoglykan-Gehalt in gram-positiven Bakterien wie *C. glutamicum* ist ca. 3- bis 7-mal höher als in gram-negativen Bakterien (Jakoby et al., 1997). Daher ist es wahrscheinlich, dass die Zellen versuchen, den intrazellulären Glutaminpool auch bei verminderter Verfügbarkeit von  $\alpha$ -Ketoglutarat konstant zu halten, um somit die Integrität der Zellwand zu gewährleisten.

Die intrazelluläre Konzentration von Prolin, das wie Glutamin aus Glutamat gebildet wird, war von  $55,1 \mu\text{mol/g}_{\text{BTM}}$  in *lysC<sup>fbr</sup>* auf  $70,2 \mu\text{mol/g}_{\text{BTM}}$  in der Mutante erhöht. Die Synthese von Prolin aus Glutamat verbraucht zusätzlich 2 mol NADPH und könnte durch den

vermuteten Überschuss von NADPH in der Mutante begünstigt werden. Die Argininkonzentration war in der Mutante erhöht, allerdings waren auch hier die beobachteten Poolgrößen sehr niedrig.

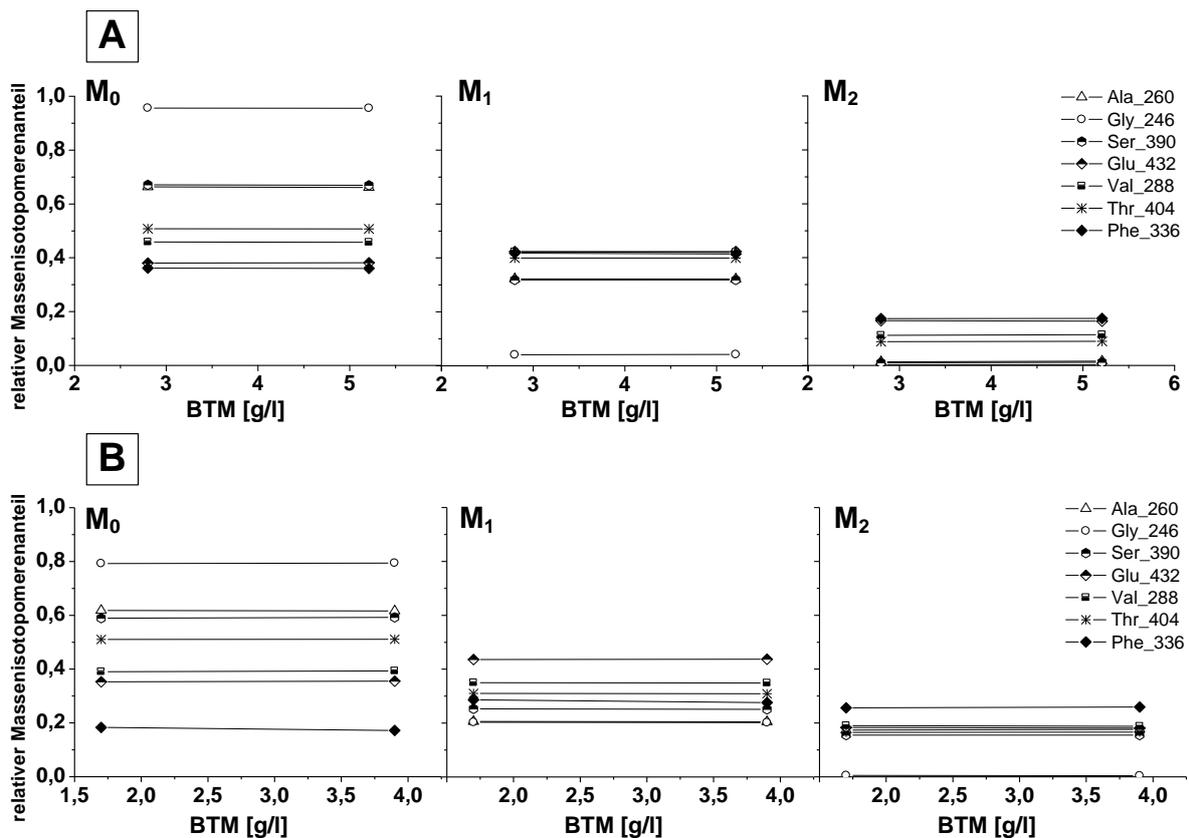
### 3.5 <sup>13</sup>C-Metabolische Flussanalyse

Einen weiteren Teilbereich dieser Arbeit stellte der Vergleich der beiden Stämme *lysC<sup>fbr</sup>* und *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpckΔpgi* mittels <sup>13</sup>C-Metabolischer Flussanalyse dar. Hierdurch sollten die Auswirkungen der genetischen Manipulationen auf die *in vivo* Aktivitäten der verschiedenen Stoffwechselwege genauer untersucht werden. Wie bereits dargelegt muss es in der Mutante Reaktionen geben, die Wachstum ohne Methioninproduktion ermöglichen. Die Metabolische Flussanalyse kann Hinweise auf diese in der Elementarmodenanalyse nicht berücksichtigten Reaktionen geben und somit zur Verbesserung der Kenntnisse der Physiologie von *C. glutamicum* beitragen. Die Identifikation dieser Reaktionen kann außerdem einen weiteren Schritt zur rationalen Erzeugung eines Methioninproduzenten bedeuten. Zur Berechnung der intrazellulären Flüsse wurden die extrazellulär gemessenen Flüsse, der anabole Bedarf an Vorläufermolekülen zur Biomassebildung sowie <sup>13</sup>C-Markierungsdaten der proteinogenen Aminosäuren und von Trehalose aus Tracerstudien mit <sup>13</sup>C-markierter Glucose herangezogen. Außerdem erfordert die Metabolische Flussanalyse geeignete mathematische Modelle, welche eine Kombination aus einem Netzwerk zur stöchiometrischen Bilanzierung der beteiligten Metabolite („Metabolite Balancing“) und einem Isotopomeren-Netzwerk zur Bilanzierung von <sup>13</sup>C-Markierungsanteilen („Isotope Balancing“) darstellen (Wittmann, 2002; Wittmann und Heinzle, 2001a; Wittmann und Heinzle, 2001b; Yang et al., 2008; Yang et al., 2004).

#### 3.5.1 Gleichgewicht der Massenisotopomerverteilungen

Die Bestimmung der intrazellulären Flüsse setzt zunächst sowohl einen metabolischen Gleichgewichtszustand (*metabolic steady-state*) als auch ein Gleichgewicht der Massenisotopomerverteilungen (*isotopic steady-state*) voraus. Der metabolische Gleichgewichtszustand wurde durch das konstante Wachstums- und Produktionsverhalten der untersuchten Stämme nachgewiesen (vgl. Abb. IV-14,15). Zum Beweis des Gleichgewichts der Massenisotopomerverteilungen wurde während der Kultivierung auf <sup>13</sup>C-markierter Glucose zu verschiedenen Zeitpunkten und somit bei unterschiedlichen Biomassekonzentrationen während des exponentiellen Wachstums die Markierungsverteilung der proteinogenen Aminosäuren mittels GC/MS bestimmt.

Die Markierungsexperimente erfolgen jeweils in zwei Parallelkolben. Die Kultivierung des Ausgangstammes *lysC<sup>fbr</sup>* erfolgte auf 99 % [1-<sup>13</sup>C]-Glucose, während die Mutante *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpckΔpgi* auf 99 % [2-<sup>13</sup>C]-Glucose kultiviert wurde. In Abbildung IV-18 sind die relativen Anteile der Massenisotopomere M<sub>0</sub> (unmarkiert), M<sub>1</sub> (einfach markiert) sowie M<sub>2</sub> (zweifach markiert) für proteinogene Aminosäuren aus verschiedenen Teilen des metabolischen Netzwerks der beiden untersuchten Stämme dargestellt. Exemplarisch wurden hierzu Alanin, Glycin, Serin, Glutamat, Valin, Threonin und Phenylalanin ausgewählt.



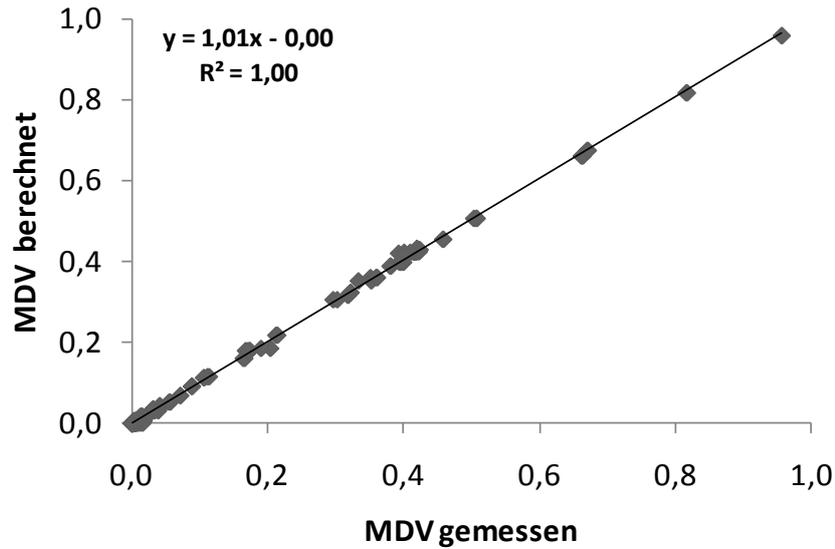
**Abb. IV-18:** Überprüfung des Gleichgewichts der Massenisotopomerverteilungen bei Kultivierung von *C. glutamicum lysC<sup>fbr</sup>* auf [1-<sup>13</sup>C]-Glucose (A) und *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpckΔpgi* auf [2-<sup>13</sup>C]-Glucose (B). Gezeigt sind die relativen Anteile der Massenisotopomere M<sub>0</sub> (unmarkiert), M<sub>1</sub> (einfach markiert) sowie M<sub>2</sub> (zweifach markiert) der proteinogenen Aminosäuren Alanin, Glycin, Serin, Glutamat, Valin, Threonin und Phenylalanin bei verschiedenen Biotrockenmassekonzentrationen (BTM [g/l]).

Die Markierungsmuster waren sowohl im Ausgangsstamm als auch in der Mutante zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung konstant und es konnte von einem Gleichgewicht der Massenisotopomerverteilungen über den exponentiellen Bereich der

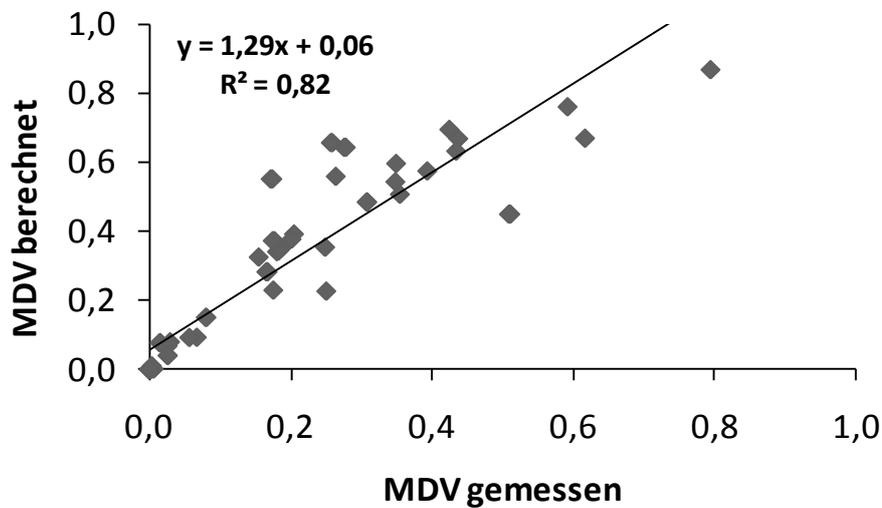
Kultivierung ausgegangen werden. Die anhand der Markierungsverteilungen berechneten Flussdaten waren somit repräsentativ für den gesamten Kultivierungszeitraum.

### 3.5.2 Vergleich der gemessenen und berechneten Massenisotopomerverteilungen

Für die Berechnung der intrazellulären Flüsse wurde die minimale Abweichung zwischen gemessenen und berechneten Massenisotopomerverteilungen (*mass isotopomer distribution vector*, MDV) als Kriterium für die Anpassung herangezogen (Yang et al., 2008). Die zur Flussberechnung benötigten MDVs wurden zuvor auf das Vorhandensein natürlicher Isotope korrigiert (Yang et al., 2009). Zur Bestimmung der Massenisotopomerverteilungen wurden Proteinhydrolysate aus Parallelkolben verwendet. Jedes dieser Hydrolysate wurde in der GC/MS zweimal im SIM-Modus vermessen und der Mittelwert sowie die Standardabweichung bestimmt. Für  $lysC^{fbr}$  wurde zudem die Markierung von Trehalose im Kulturüberstand mittels GC/MS bestimmt. Der sich dabei aus den Parallelexperimenten sowie der jeweiligen Doppelbestimmung jeder Messung ergebende experimentelle Messfehler der Massenisotopomerfraktionen für  $lysC^{fbr}$  lag im Durchschnitt bei 0,1 % und für die Mutante bei 0,11 %. In beiden Fällen war der statistische Messfehler also sehr gering und es kann von einer hohen Präzision der Messung ausgegangen werden. In Abbildung IV-19 und IV-20 sind die Ergebnisse der Anpassung der simulierten an die experimentell bestimmten MDVs für die Kultivierung von  $lysC^{fbr}$  sowie  $lysC^{fbr} \Delta pyk \Delta ppc \Delta pck \Delta pgi$  gezeigt. Die berechneten Werte stellen Mittelwerte aus 100 Monte-Carlo-Simulationen dar.



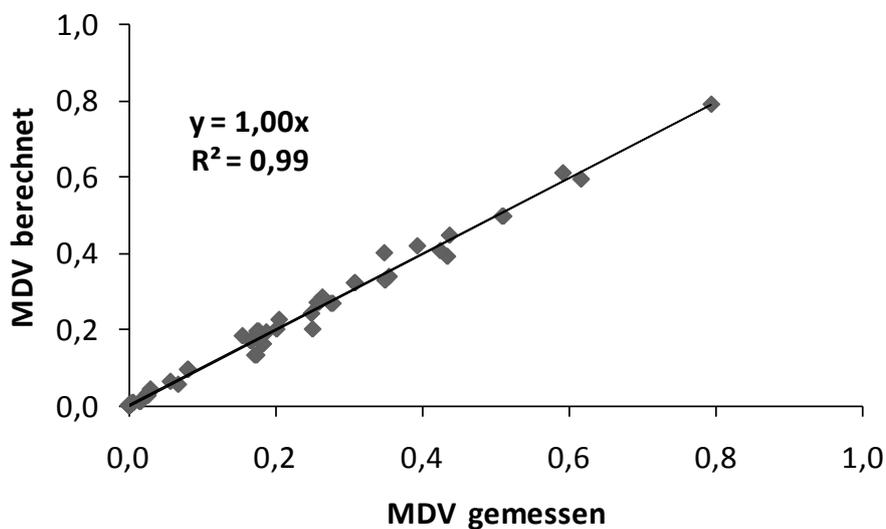
**Abb. IV-19:** Graphische Anpassung der vom Modell berechneten und mittels GC/MS gemessenen Massenisotopomerverteilungen (MDV) proteinogener Aminosäuren und Trehalose für die Kultivierung von *C. glutamicum lysC<sup>fbr</sup>* bei Kultivierung im Schüttelkolben auf [1-<sup>13</sup>C]-Glucose.



**Abb. IV-20:** Graphische Anpassung der vom Modell berechneten und mittels GC/MS gemessenen Massenisotopomerverteilungen (MDV) proteinogener Aminosäuren für die Kultivierung von *C. glutamicum lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpckΔpgi* im Schüttelkolben auf [2-<sup>13</sup>C]-Glucose. Die Reaktionen der Glucose-6-Phosphat-Isomerase, der Pyruvat-Kinase, der PEP-Carboxylase sowie der PEP-Carboxykinase wurden nicht in das Modell zur Flussanalyse integriert.

Für *lysC<sup>fbr</sup>* wurde eine sehr gute Anpassung der gemessenen und vom Modell berechneten Markierungsverteilungen erreicht (Abb. IV-20), so dass davon auszugehen ist, dass die berechneten Flüsse sehr gut den metabolischen Zustand dieses Stammes reflektieren. Für die Mutante *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpckΔpgi* war dies allerdings nicht der Fall; hier konnte keine gute Anpassung erzielt werden. In der Deletionsmutante wurden die Reaktionen der Glucose-6-Phosphat Isomerase, der Pyruvat-Kinase, der PEP-Carboxylase sowie der PEP-Carboxykinase nicht in das Modell zur Flussanalyse integriert, was durch den genotypischen und phänotypischen Nachweis der Deletionen gerechtfertigt werden konnte. In dem Programm zur Flussberechnung wird die Konsistenz von Modell und experimentellen Daten ermittelt (Yang et al., 2008). Dieser Konsistenztest schlug für die Mutante allerdings fehl, was bedeutet, dass ein Widerspruch zwischen den ermittelten Daten und dem verwendeten Modell existiert. Hierfür kann es zwei mögliche Gründe geben. Zum einen können experimentelle Fehler vorliegen oder es gibt in der Mutante Reaktionen, die im Modell nicht beschrieben wurden. Experimentelle Fehler sind aufgrund der durchgeführten unabhängigen Parallelexperimente und der guten Reproduzierbarkeit der Mehrfachmessungen recht unwahrscheinlich. Vielmehr gab es deutliche Hinweise darauf, dass es in der Mutante Reaktionen gibt, die im Ausgangsstamm nicht aktiv sind und somit weder im Modell zur Flussanalyse noch in der Elementarmodenanalyse berücksichtigt wurden. Zum einen ist die Mutante erst nach längerer Adaption dazu in der Lage, auf Minimalmedium zu wachsen, was zeigt, dass eine weitgehende Umleitung des intrazellulären Kohlenstoffflusses stattgefunden haben muss. Allerdings produziert die Mutante kein Methionin, wie in der Elementarmodenanalyse vorhergesagt wurde. Trotzdem muss der durch die Deletionen verursachte glykolytische Rückstau kompensiert werden. Einen Anhaltspunkt hierfür lieferte der dreifach erhöhte intrazelluläre Serinpool in der Mutante im Vergleich zu *lysC<sup>fbr</sup>*. Die Erhöhung des Serinpools führte aber weder zu einem erhöhten intrazellulären Glycinpool noch zu einem erhöhten Cysteinpool. Netzer et al. (2004) konnten zeigen, dass *C. glutamicum* eine hohe Kapazität besitzt, Serin in Gegenwart von Glucose zu cometabolisieren, während das Wachstum auf Serin als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle nicht möglich ist. Durch Fütterungsexperimente mit <sup>13</sup>C-markiertem Serin und natürlich markierter Glucose konnte dabei gezeigt werden, dass Serin vor allem zu Pyruvat desaminiert wurde (Netzer et al., 2004). Dieser Abbauweg könnte innerhalb des Adaptionsprozesses der Deletionsmutante durch einen erhöhten Fluss in Richtung Serin-Biosynthese aufgrund der Akkumulation von Glykolyse-Intermediaten induziert worden sein. Auf diese Weise könnte Serin wieder dem Zentralstoffwechsel

zugeführt werden, den glykolytischen Rückstau kompensieren und gleichzeitig zur Versorgung mit Pyruvat und NADH beitragen. Aus diesem Grund wurden die beiden Reaktionen von 3-Phosphoglycerat zu Serin und von Serin zu Pyruvat in das Modell zur Flussanalyse der Mutante integriert. Die sich hieraus ergebende Anpassung der experimentell bestimmten und der simulierten MDVs war deutlich besser als im Modell ohne diese Reaktionen (Abbildung IV-21). Daher erfolgte die Berechnung der Flussverteilungen in der Mutante auf Basis dieses Modells. Die exakten numerischen Werte der berechneten und gemessenen Massenisotopomerverteilungen für beide Stämme sind im Anhang in Tabelle VII-8 und VII-12 dargestellt.



**Abb. IV-21:** Graphische Anpassung der vom Modell berechneten und mittels GC/MS gemessenen Massenisotopomerverteilungen (MDV) proteinogener Aminosäuren für die Kultivierung von *C. glutamicum lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpckΔpgi* im Schüttelkolben auf [2-<sup>13</sup>C]-Glucose. Die Reaktionen der Glucose-6-Phosphat-Isomerase, der Pyruvat-Kinase, der PEP-Carboxylase sowie der PEP-Carboxykinase waren nicht im Modell zur Flussanalyse enthalten. Stattdessen wurden die Reaktionen von 3-Phosphoglycerat zu Serin und von Serin zu Pyruvat integriert.

Die verwendeten Modelle befinden sich ebenfalls im Anhang (Abb. VII-1, VII-2). In  $\Delta pgi$ -Mutanten von *E. coli* wurde eine Aktivierung des Glyoxylat-Zyklus beobachtet (Fong und Palsson, 2004; Hua et al., 2003). Durch diesen kann die Reaktion der NADPH-produzierenden Isocitrat-Dehydrogenase des TCA-Zyklus umgangen und so eine erhöhte NADPH-Produktion durch den PPP ausgeglichen werden. Für die  $\Delta pgi$ -Mutante von *C. glutamicum* DSM5715 wurde dies allerdings nicht beobachtet. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte in keinem der beiden Stämme bei Kultivierung auf Glucose eine Aktivität

der Isocitrat-Lyase, dem ersten Enzym des Glyoxylat-Zyklus, nachgewiesen werden. Als Positiv-Kontrolle für den Enzymtest wurde *lysC<sup>fbr</sup>* auf Acetat kultiviert. Hier zeigte sich eine spezifische Aktivität der Isocitrat-Lyase von 174 mU/mg. Ein Grund, weshalb die Deletion von *pgi* in dem vorliegenden genetischen Hintergrund nicht zur Aktivierung des Glyoxylat-Zyklus führte, könnte die entkoppelte Lysinproduktion sein, welche selbst die Möglichkeit der NADPH-Reoxidation bietet. Die Reaktionen des Glyoxylat-Zyklus wurden daher weder im Modell der Mutante noch in *lysC<sup>fbr</sup>* berücksichtigt.

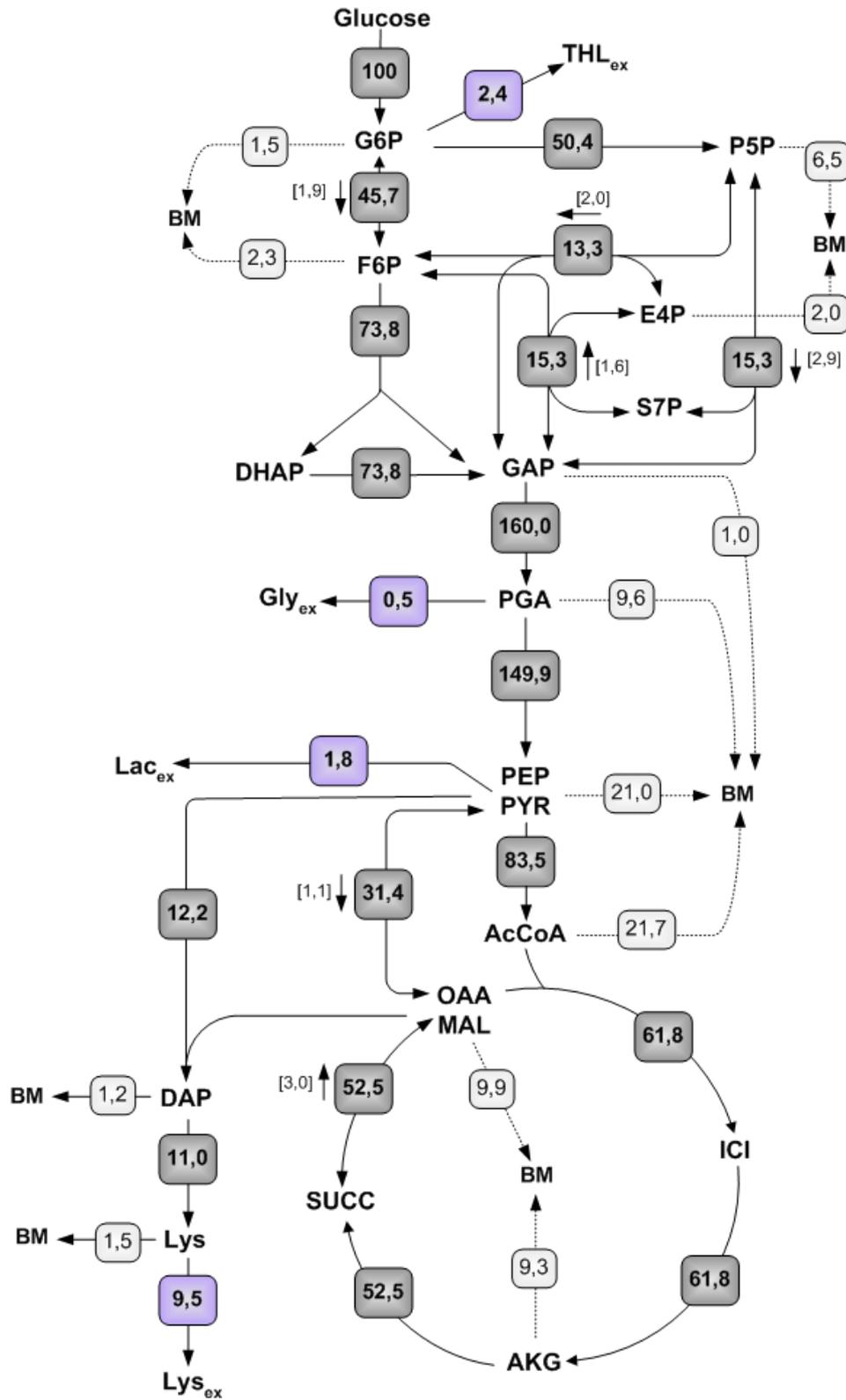
### 3.5.3 Vergleich des Fluxoms

Die erstellten Flusskarten geben die Aktivitäten der einzelnen Stoffwechselwege in Form prozentualer molarer Flüsse wieder. Die spezifische Glucoseaufnahmerate ( $q_s$ ) diente dabei als Bezugsgröße mit 100 %. Tabelle VII-3 und VII-7 im Anhang enthalten sämtliche berechneten intrazellulären Flüsse einschließlich der Intervalle für 90 % Konfidenz nach jeweils 100 durchgeführten Monte-Carlo-Simulationen.

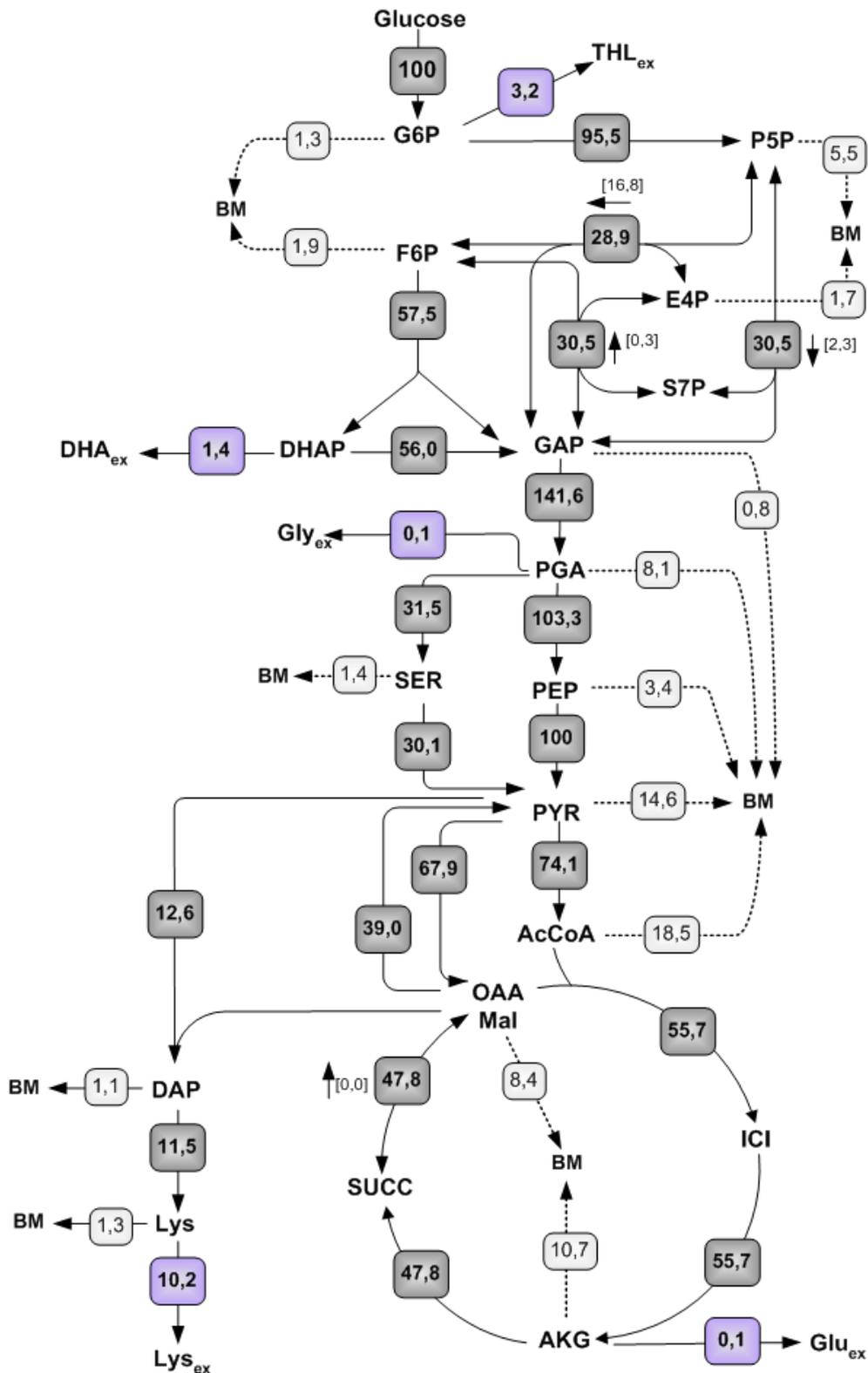
#### *Glykolyse und Pentosephosphatweg*

Die Analyse der Flussverteilungen der Mutante *C. glutamicum lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpckΔpgi* (Abb. IV-23) zeigte im Vergleich zu *lysC<sup>fbr</sup>* (Abb. IV-22) deutliche Unterschiede am Glucose-6-Phosphat-Knoten, dem Verzweigungspunkt zwischen Glykolyse und Pentosephosphatweg. In *lysC<sup>fbr</sup>* flossen 50,4 % der aufgenommenen Glucose in den PPP und 45,7 % in die Glykolyse, was sehr gut mit den vorhandenen Literaturdaten übereinstimmt (Becker et al., 2008; Kim, 2006). Im Gegensatz hierzu war in der Mutante ein direkter Fluss in die Glykolyse aufgrund der Deletion der Glucose-6-Phosphat-Isomerase nicht möglich. Hier musste die aufgenommene Glucose über den PPP geleitet werden, was einem relativen Fluss von 95,5 % entsprach. Die Umlenkung des Kohlenstoffflusses in den PPP führte demnach fast zu einer Verdoppelung der NADPH-Bereitstellung durch den PPP von 191 % in der Mutante im Vergleich zu *lysC<sup>fbr</sup>* mit 100,8 %. Die Diskussion des Gesamtanteils des PPP an der NADPH-Bilanz soll in einem späteren Abschnitt erfolgen. Aufgrund der stark verminderten Glucoseaufnahmerate in der Mutante müssen zusätzlich zu den relativen auch die absoluten Flüsse betrachtet werden. Hierbei zeigte sich, dass der absolute Fluss in den PPP in der Mutante mit 2,43 mmol/g/h im Vergleich zum Ausgangsstamm mit 2,59 mmol/g/h sogar etwas erniedrigt war. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des oxidativen Teils des PPP ist die Aktivität der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, welche der Feedback-Inhibierung durch NADPH unterliegt (Moritz et al., 2000). Ein erhöhtes Verhältnis von NADPH zu  $\text{NADP}^+$  in der

Mutante könnte daher den absoluten Fluss durch den oxidativen Teil des PPP limitieren. Die Kapazität zur NADPH-Reoxidation ist in der Mutante offensichtlich nicht ausreichend, um einen höheren Fluss durch den PPP zu ermöglichen. Der Trehalose-Fluss war mit 3,2 % in der Mutante höher als in *lysC<sup>fbr</sup>* mit 2,4 %. Ein Teil der aufgenommenen Glucose blieb also ungenutzt und wurde in Form von Trehalose als overflow-Metabolit ausgeschleust, was ebenfalls für eine unzureichende Kapazität der Enzyme des oxidativen Teils des PPP spricht. Eine unzureichende Expression der Enzyme des PPP könnte einen weiteren limitierenden Faktor für den Fluss durch diesen Stoffwechselweg darstellen. So führte die Überexpression der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase in *C. glutamicum lysC<sup>fbr</sup>* zu einer Erhöhung des Flusses durch den PPP von 46,8 % auf 62 %, was in absoluten Werten einem Fluss von 3,22 mmol/g/h im Vergleich zu *lysC<sup>fbr</sup>* von 2,29 mmol/g/h entsprach (Becker et al., 2008). Von den 50,4 % des in den PPP eingeschleusten Kohlenstoffes flossen in *lysC<sup>fbr</sup>* 41,9 % über die Transketolase- und Transaldolase-Reaktionen wieder in den Fructose-6-Phosphat-Pool (26,6 %) und in den Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Pool (15,3 %) zurück; lediglich 8,5 % wurden für die Biomassebildung benötigt. Sowohl die Glucose-6-Phosphat-Isomerase als auch die Transketolase und Transaldolase zeigten nur eine geringe Reversibilität. Die treibende Kraft für den hohen Fluss über die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase stellte also vor allem der NADPH-Bedarf und nicht der anabole Bedarf an Ribose-5-Phosphat und Erythrose-4-Phosphat dar (Wittmann und Heinzle, 2002). Die relativen Flüsse durch den nicht-oxidativen Teil des PPP waren in der Mutante etwa doppelt so hoch wie im Ausgangsstamm, wodurch die absoluten Flüsse in beiden Stämmen sehr ähnlich waren. Die Bereitstellung von Fructose-6-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat durch den PPP blieb also weitestgehend unverändert, um eine Aufrechterhaltung der Glykolyse zu gewährleisten. Allerdings ging dies zu Lasten der anabolen Flüsse, welche ausgehend von Pentose-5-Phosphat und Erythrose-4-Phosphat relativ und absolut vermindert waren, was sich in der geringeren Biomasseausbeute der Mutante widerspiegelte. Aufgrund des Fehlens der Glucose-6-Phosphat-Isomerase kamen in der Mutante nur 59,4 % der aufgenommenen Glucose im Fructose-6-Phosphat-Pool an, während dies in *lysC<sup>fbr</sup>* 74,3 % waren. Dementsprechend waren auch die anabolen Flüsse ausgehend vom Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Pool und vom Fructose-6-Phosphat-Pool in der Mutante vermindert.



**Abb. IV-22:** Flussverteilung in *C. glutamicum lysC<sup>fbr</sup>* bei Wachstum auf CG 12 ½-Minimalmedium mit 99 % [1-<sup>13</sup>C]-Glucose im Schüttelkolben. Die prozentualen molaren Flüsse wurden auf die spezifische Glucoseaufnahme rate (q<sub>s</sub> = 5,14 mmol/g/h) normiert, welche als 100 % gesetzt wurde. Für reversible Reaktionen ist in Klammern die Reversibilität und durch einen Pfeil die Richtung der Nettoreaktion angegeben.



**Abb. IV-23:** Flussverteilung in *C. glutamicum*  $lysC^{fbr}\Delta pyk\Delta ppc\Delta pck\Delta pgi$  bei Wachstum auf CG 12 1/2- Minimalmedium mit 99% [2-<sup>13</sup>C]-Glucose im Schüttelkolben. Die prozentualen molaren Flüsse wurden auf die spezifische Glucoseaufnahme ( $q_s = 2,54$  mmol/g/h) normiert, welche als 100 % gesetzt wurde. Für reversible Reaktionen ist in Klammern die Reversibilität und durch einen Pfeil die Richtung der Nettoreaktion angegeben.

Krömer et. al (2004) beobachteten unterschiedliche Reversibilitäten im PPP zu verschiedenen Kultivierungsphasen eines Lysinproduzenten von *C. glutamicum* und führten dies auf Konzentrationsänderungen der Intermediate des PPP zurück. Allerdings darf nicht außer Acht gelassen werden, dass die Bestimmung von Reversibilitäten mit relativ großen Unsicherheiten behaftet ist (Wiechert et al., 1997) und daher nur bedingt Rückschlüsse zulässt. Dennoch könnten die Änderungen der Reversibilitäten im nicht-oxidativen Teil des PPP in der Mutante und in *lysC<sup>fbr</sup>* auf veränderte Poolgrößen zurückzuführen sein. So war die Reversibilität der Transketolase 1, die die Umwandlung von Fructose-6-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat in Erythrose-4-Phosphat und Pentose-5-Phosphat katalysiert, gegenüber dem Ausgangsstamm deutlich erhöht, was einen hohen Austausch zwischen den jeweiligen Pools zeigt. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass ausschließlich der Pentosephosphatweg sowohl zur Aufrechterhaltung dieser Vorläufer-Pools für den anabolen Bedarf als auch für den Glucosekatabolismus zur Verfügung steht. Die Transaldolase-Reaktion, die die Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Sedoheptulose-7-Phosphat in Fructose-6-Phosphat und Erythrose-4-Phosphat katalysiert, war hingegen kaum reversibel.

Da der PPP sowohl den anabolen Bedarf als auch den Glucosekatabolismus bedienen muss, betrug der Fluss durch die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase in der Mutante nur 141,6 % im Vergleich zum Ausgangsstamm mit 160,0 %. Aufgrund des Messprinzips mit [1-<sup>13</sup>C]-Glucose mittels GC/MS, das lediglich eine Unterscheidung einzelner Massenisotopomere ermöglicht, konnte in der Metabolischen Flussanalyse in *lysC<sup>fbr</sup>* nicht zwischen PEP und Pyruvat und ebenso nicht zwischen Malat und Oxalacetat differenziert werden. In der Mutante war der Fluss von PEP zu Pyruvat durch die Deletion der Pyruvat-Kinase an das PTS-System gekoppelt und betrug somit - wie die Glucose-Aufnahme - 100 %. Dementsprechend wurden PEP und Pyruvat in der Mutante als getrennte Pools betrachtet. Becker et. al (2008) konnten die Carboxylierungs- und Decarboxylierungsreaktionen um den PEP/Pyruvat-Knoten durch die Kombination von Markierungsexperimenten mit [1-<sup>13</sup>C]-Glucose und einem 50:50 Gemisch aus [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-Glucose und natürlich markierter Glucose sowie durch GC/MS-Messung zusätzlicher Aminosäurefragmente und erweiterter mathematischer Modelle detailliert auflösen. Hierdurch war es auch in *lysC<sup>fbr</sup>* möglich, PEP und Pyruvat als getrennte Pools zu betrachten und es konnten die Konsequenzen der Pyruvat-Kinase-Deletion auf die Verteilung der Kohlenstoffflüsse näher untersucht werden. Aufgrund der guten Übereinstimmung der Flussverteilungen von *lysC<sup>fbr</sup>* in der vorliegenden Arbeit mit den

Flussdaten der Studie von Becker et. al kann angenommen werden, dass auch die Flussverteilungen um den PEP/Pyruvat-Knoten ähnlich waren.

In *lysC<sup>fbr</sup>* betrug der Fluss von PEP nach Pyruvat 137,6 % und sowohl die Pyruvat-Carboxylase als auch die PEP-Carboxylase trugen zur anaplerotischen Carboxylierung bei. Im Gegensatz hierzu erfolgte in *lysC<sup>fbr</sup>Δpyk* aufgrund der Deletion der Pyruvat-Kinase der direkte Fluss von PEP zu Pyruvat ausschließlich durch das PTS-System und war somit auf 100 % limitiert. Weiterhin wurde die anaplerotische Carboxylierung ausschließlich durch die PEP-Carboxylase katalysiert, während durch die Pyruvat-Carboxylase kein Fluss zu verzeichnen war. Hierdurch kam es zur Umlenkung des Kohlenstoffflusses über PEP-Carboxylase, Malat-Dehydrogenase und Malatenzym hin zu Pyruvat. Die Aktivierung dieser Umleitung war der Schlüssel zur Kompensation des Verlusts der Pyruvat-Kinase-Aktivität und ermöglichte es, weiterhin den Fluss durch den TCA-Zyklus, den PPP, die Glykolyse und durch anabole Reaktionen aufrechtzuerhalten (Becker et al., 2008). Auch in Pyruvat-Kinase defizienten *E. coli*-Zellen, die ausschließlich über die PEP-Carboxylase als anaplerotisches Enzym verfügen, war ein erhöhter Fluss durch diesen Weg zu verzeichnen (Al Zaid Siddiquee et al., 2004; Emmerling et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde neben der Pyruvat-Kinase allerdings auch die PEP-Carboxylase deletiert, weshalb eine Umlenkung des Kohlenstoffflusses auf diese Art nicht mehr möglich war. Als einziges anaplerotisches Enzym blieb somit die Pyruvat-Carboxylase. *B. subtilis* besitzt als einziges anaplerotisches Enzym ebenfalls die Pyruvat-Carboxylase (Diesterhaft und Freese, 1973), weshalb auch hier bei Deletion der Pyruvat-Kinase die Flussumleitung, wie oben beschrieben, nicht möglich ist. Die Deletion der Pyruvat-Kinase führte daher in *B. subtilis* zu stark verringerten Wachstumsraten (Fry et al., 2000). Je mol aufgenommener Glucose entstehen zwei mol PEP, wovon durch das PTS-System nur ein mol zu Pyruvat umgewandelt werden kann. Eine Ableitung des „überschüssigen“ PEP durch die PEP-Carboxylase und unter Umständen durch die PEP-Carboxykinase (welche in anaplerotischer Richtung arbeiten müsste) in den TCA-Zyklus ist in der Mutante nicht möglich. Ebenso kann aufgrund der Deletion der Glucose-6-Phosphat-Isomerase kein Rückfluss in den PPP stattfinden, wodurch überschüssiger Kohlenstoff in Form von CO<sub>2</sub> abgegeben werden könnte. Zwar kann ein Teil des Kohlenstoffs in Form von DHA als Nebenprodukt ausgeschleust werden; allerdings reicht ein Fluss von 1,4 % nicht aus, um den gesamten Überschuss zu kompensieren. Der Organismus wäre folglich nicht mehr lebensfähig, wenn es nicht einen weiteren Ausweg gäbe.

Der in den Elementarmoden vorhergesagte Ausweg stellte die Umlenkung des Kohlenstoffflusses in Richtung Methioninsynthese dar, welche über die Transsulfurierung zusätzliches Pyruvat liefern und das Wachstum erst ermöglichen würde. Dies erfordert eine Abzweigung des Kohlenstoffes auf der Höhe von 3-Phosphoglycerat in Richtung der Synthese von Serin, was in der Deletionsmutante offenbar tatsächlich der Fall ist. Die 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase (PGDH), kodiert durch *serA*, leitet die Serinbiosynthese in *C. glutamicum* ein. Sie katalysiert die Oxidation des Glykolyseintermediats 3-Phosphoglycerat zu Phosphohydroxypyruvat. Durch diese Reaktion konnte in der Deletionsmutante ein Fluss von 31,5 % berechnet werden. Der Fluss durch das Glykolyse-Enzym 3-Phosphoglyceratmutase, welches die reversible Umsetzung von 3-Phosphoglycerat zu 2-Phosphoglycerat katalysiert und so mit der PGDH um das gemeinsame Substrat konkurriert, war auf 103,3 % reduziert. Anschließend wurde Serin allerdings nicht in den C<sub>1</sub>- und Methioninstoffwechsel gelenkt, sondern direkt zu Pyruvat abgebaut, wodurch die Akkumulation von Glykolyseintermediaten ausgeglichen wurde und die Zellen wachsen konnten. Die Sekretion von DHA in der Mutante weist allerdings auf eine limitierte Kapazität der PGDH oder aber auch des Serinabbaus zu Pyruvat hin.

### ***Pyruvat-Knotenpunkt, TCA-Zyklus und Lysinproduktion***

Aufgrund seiner Position an der Schnittstelle zwischen Glykolyse und TCA-Zyklus, nimmt die Flussverteilung am Pyruvat-Knotenpunkt eine Schlüsselstellung im Zentralsstoffwechsel von *C. glutamicum* ein. Pyruvat wird außerdem für die Bildung von Lysin und Biomasse benötigt. Das durch die Carboxylierung von Pyruvat entstehende Oxalacetat dient zur Bildung von Aspartat, dem Vorläufer von Methionin und Lysin. Für die Lysinsynthese müssen Pyruvat und Oxalacetat in äquimolaren Mengen bereitgestellt werden, während die Methioninsynthese nur Oxalacetat benötigt.

In *lysC<sup>fbr</sup>* flossen 74,9 % des aufgenommenen Kohlenstoffs zum Pyruvat. In der Mutante waren dies aufgrund des Beitrags von Serin zur Pyruvat-Bildung immerhin 65,1 %. Der Fluss von Pyruvat zu Acetyl-CoA betrug in der Mutante 74,1 % und war somit im Vergleich zu *lysC<sup>fbr</sup>* mit 83,5 % etwas verringert. Der anaplerotische Nettofluss vom C<sub>3</sub>-Pool (PEP und Pyruvat) zum C<sub>4</sub>-Pool (Oxalacetat und Malat) war im Ausgangsstamm mit 31,4 % im Vergleich zur Mutante mit 28,9 % etwa gleich hoch. Gleichzeitig war der Fluss in den TCA-Zyklus mit 55,7 % in der Mutante im Vergleich zum Ausgangsstamm mit 61,8 % etwas verringert. Auch die anabolen Flüsse zur Biomassebildung, ausgehend von Pyruvat und Acetyl-CoA waren in der Mutante geringer als im Ausgangsstamm und es

wurde kein Lactat sekretiert. Obwohl in der Mutante etwa 9,8 % weniger Kohlenstoff im Pyruvat ankamen als in *lysC<sup>fbr</sup>*, konnte dies in der Mutante somit kompensiert werden und ein in etwa gleich hoher relativer Fluss zur Lysinproduktion wie in *lysC<sup>fbr</sup>* wurde erreicht. Dies war jedoch nur durch den Beitrag von Serin zur Pyruvat-Bildung möglich.

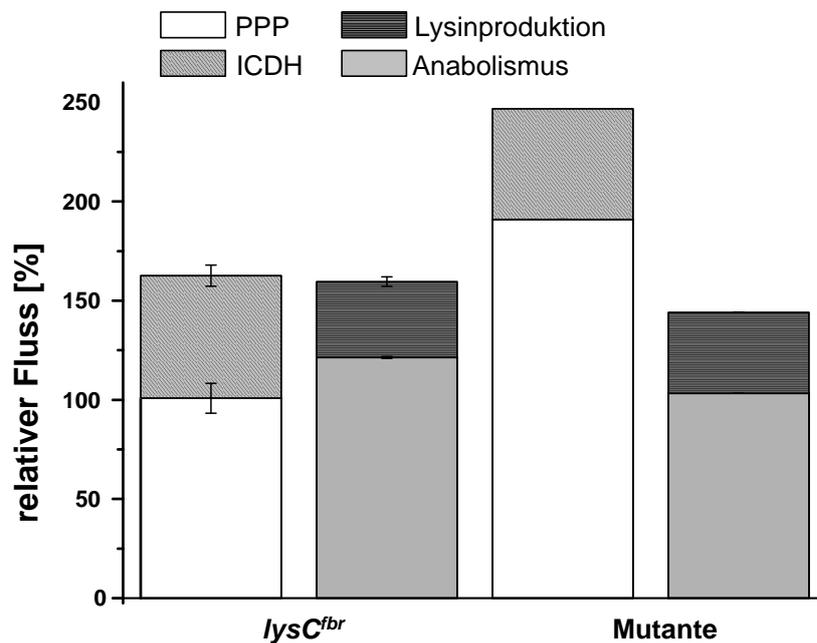
Eine genauere Betrachtung des Beitrags der C<sub>3</sub>-Carboxylierungs- und C<sub>4</sub>-Decarboxylierungsreaktionen zeigte deutlich Unterschiede zwischen den beiden Stämmen. Während die Flüsse zwischen Pyruvat und dem C<sub>4</sub>-Pool in der Mutante mit einer hohen Genauigkeit bestimmt werden konnten, muss für *lysC<sup>fbr</sup>* wieder auf Daten von Becker et al. (2008) zurückgegriffen werden. Für *lysC<sup>fbr</sup>* betrug die anaplerotische Carboxylierung durch die PEP-Carboxylase 29,1 % und durch die Pyruvat-Carboxylase 46,5 %. In der Mutante musste die Pyruvat-Carboxylase die gesamte anaplerotische Carboxylierung übernehmen und der relative Fluss betrug 67,9 %. Ebenso wie in *lysC<sup>fbr</sup>* war in der Mutante ein Rückfluss von OAA zu Pyruvat zu verzeichnen. Dieser betrug in der Mutante 39 % und im Ausgangsstamm 15,4 %. Dieser Rückfluss wurde in *lysC<sup>fbr</sup>* vollständig dem Malatenzym zugeschrieben, das in dieser Richtung NADPH produziert. In der Mutante würde eine weitere Produktion von NADPH keinen Sinn ergeben, da durch die Deletion von *pgi* schon ein Überschuss an NADPH zu erwarten ist. Somit könnte dieser Rückfluss im Gegensatz zu *lysC<sup>fbr</sup>* der OAA-Decarboxylase zugeschrieben werden, da diese kein zusätzliches NADPH bildet. Die gleichzeitige Aktivität der Pyruvat-Carboxylase und der OAA-Decarboxylase stellt einen ATP-verbrauchenden *futile cycle* dar. Ein starker Austausch zwischen C<sub>3</sub>- und C<sub>4</sub>-Pool wurde in *C. glutamicum* bereits mehrfach beschrieben. Die gleichzeitige Aktivität von Carboxylierungs- und Decarboxylierungsreaktionen könnte für die Zelle eine Möglichkeit der Feinabstimmung kataboler, anaboler sowie anaplerotischer Reaktionen sein (Petersen et al., 2000). Bisher war die physiologische Funktion der OAA-Decarboxylase nicht klar (Sauer, 2004). Die vorliegende Arbeit legt nahe, dass sie bei einer erhöhten Produktion von NADPH die Funktion des Malatenzyms zum Ausgleich des C<sub>3</sub>/C<sub>4</sub>-Pools übernehmen kann.

### 3.5.4 Bilanzen

Die enormen Unterschiede in den Flussverteilungen der Deletionsmutante im Vergleich zu *C. glutamicum lysC<sup>fbr</sup>* lassen den Schluss zu, dass sich die genetischen Modifikation auch in den Bilanzen für NADPH, NADH sowie ATP widerspiegeln, die im Folgenden miteinander verglichen werden.

#### *NADPH-Bilanz*

Die Berechnung von NADPH-Bildung und Verbrauch erfolgte wie im Material- und Methoden-Teil beschrieben (Kapitel III, Abschnitt 7.8). Anhand der prozentualen molaren Flüsse durch den PPP und den TCA-Zyklus ließ sich das Mindestangebot an gebildetem NADPH berechnen. Da der Fluss vom Oxalacetat/Malat-Pool zu Pyruvat in den Flusskarten nicht aufgelöst bzw. dieser nicht eindeutig dem Malatenzym zugeschrieben werden konnte, wurde das Malatenzym nicht in die Berechnungen miteinbezogen (Wittmann und Heinzle, 2002). In Abbildung IV-24 sind die NADPH-Bilanzen der beiden Stämme dargestellt.



**Abb. IV-24:** NADPH-Bilanz der *C. glutamicum* Stämme *lysC<sup>fbr</sup>* und *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpckΔpgi* (Mutante). Als NADPH-bildende Reaktionen wurden die Glucose-6-Phosphat-Isomerase und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase des PPP sowie die Isocitrat-Dehydrogenase des TCA-Zyklus betrachtet; als NADPH-verbrauchende Reaktionen wurden der Anabolismus und die Lysinproduktion einbezogen.

Der molare Gesamtfluss zum NADPH zeigte in beiden Stämmen erhebliche Unterschiede. Während dieser in *lysC<sup>fbr</sup>* 162,6 % betrug, war in der Mutante ein Fluss von insgesamt 246,7% zu verzeichnen, was einer Differenz von 84 % entspricht. Der Beitrag des TCA-Zyklus zur NADPH-Bildung war in der Mutante mit 55,7 % etwas niedriger als im Ausgangsstamm mit 61,8 %. In beiden Fällen stellte der PPP den Hauptsyntheseweg zur Bildung von NADPH dar. Dieser war in der Mutante allerdings mit 191 % um 91 % höher als im Ausgangsstamm mit 100 %. Daher sind die Unterschiede in der NADPH-Bereitstellung auf die *pgi*-Deletion und die damit verbundene Umleitung des Kohlenstoffflusses in den PPP zurückzuführen. Der NADPH-Verbrauch durch die Bildung von Biomasse und Lysinproduktion war in der Mutante aufgrund der geringeren Biomasseausbeute mit 144,2 % im Vergleich zu 159,5 % in *lysC<sup>fbr</sup>* etwas niedriger. Während der Ausgangsstamm unter Berücksichtigung der Standardabweichungen der berechneten Flüsse eine ausgeglichene NADPH-Bilanz zeigte, wies die Mutante einen erheblichen NADPH-Überschuss von 102,5 % auf. Die angegebene NADPH-Bildung stellt, wie bereits erwähnt, nur das Mindestangebot an NADPH dar, da die durch das Malatenzym katalysierte NADPH-Bildung nicht mit eingerechnet wurde. Da in *lysC<sup>fbr</sup>* nur eine Angabe des Nettoflusses von Pyruvat zu OAA/Malat möglich war, lässt sich über den Beitrag des Malatenzyms zur NADPH-Bereitstellung keine genaue Aussage treffen. In der Mutante ist eine Bereitstellung von NADPH durch das Malatenzym relativ unwahrscheinlich, da diese schon ohne diese Reaktion einen Überschuss von NADPH aufwies und eine weitere NADPH-Bildung die Glucoseaufnahme und das Wachstum eher verschlechtern würden. Der Fluss vom OAA/Malat-Pool hin zu Pyruvat war daher wahrscheinlich der OAA-Decarboxylase zuzuschreiben.

Ein apparenter NADPH-Überschuss in der Mutante zeigt das Vorliegen weiterer NADPH-verbrauchender Reaktionen an, da das überschüssige NADPH reoxidiert werden muss, um den Stoffwechsel aufrechtzuerhalten. Eine Möglichkeit hierzu stellt die Aktivität des Malatenzyms dar, das in umgekehrter Richtung von Pyruvat zu Malat arbeiten könnte (Netzer et al., 2004). Eine weitere Möglichkeit ist die Oxidation von NADPH durch Enzyme der Atmungskette. So konnten Matsushita et. al (2001) zeigen, dass die NADH-Dehydrogenase II von *C. glutamicum* auch NADPH-Oxidase und NADPH-Ubiquinon-I-Oxidoreduktase-Aktivitäten besitzt. Um dies in der Mutante zu untermauern, könnte durch Bestimmung der spezifischen Sauerstoffaufnahme eine Redoxbilanz erstellt werden. In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass die NADH-Dehydrogenase II der Atmungskette neben der Sulfitreduktase die Hauptquelle für reaktive Sauerstoffspezies darstellt (Messner und

Imlay, 1999). Somit könnte der Überschuss an NADPH in der Mutante zu einem erhöhten oxidativen Stress führen, was das Wachstum der Mutante beeinträchtigen könnte.

**NADH-Bildung**

Die NADH-Bildung konnte anhand der prozentualen molaren Flüsse von Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, Pyruvat-Dehydrogenase,  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase und Malat-Dehydrogenase (Kiefer et al., 2002) sowie der anabolen NADH-Produktion von 3,2 mmol NADH/g<sub>BTM</sub> (Yang et al., 2006) quantifiziert werden. Aufgrund des Flusses von 3-Phosphoglycerat zu Serin stellt der Fluss durch die 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase eine zusätzliche NADH-Quelle dar und wurde in der Mutante berücksichtigt. Der Ausgangsstamm zeigte eine NADH-Bereitstellung von 372 %. Die NADH-Bereitstellung war in der Mutante mit 363 %, wovon 31,5 % durch die -Phosphoglycerat-Dehydrogenase bereitgestellt wurden, etwas niedriger. Die geringere NADH-Bildung in der Mutante spricht dafür, dass nicht ein ungünstiges Verhältnis von NADH zu NAD<sup>+</sup> und eine so hervorgerufene Hemmung der Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase für die Bildung von DHA verantwortlich ist.

**ATP-Bilanz**

Ein Vergleich der ATP bildenden und verbrauchenden Reaktionen für beide Stämme ist in Tabelle IV-7 dargestellt.

**Tab. IV-7:** ATP-Bilanz der *C. glutamicum* Stämme *lysC<sup>fbr</sup>* und *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpckΔpgi* (Mutante).

	<i>lysC<sup>fbr</sup></i>	Mutante
<b>ATP-Bildung [%]</b>		
<b>Glykolyse</b>		
Phosphoglycerat-Kinase	160,0	103,3
Pyruvat-Kinase	149,9	0
<b>TCA-Zyklus</b>		
Succinyl-CoA Synthetase	52,5	47,8
<b>Atmungskette</b>		
NADH	744,4	725,7
FADH <sub>2</sub>	52,5	47,8
<b>Summe</b>	<b>1159,3</b>	<b>924,6</b>
<b>ATP-Verbrauch [%]</b>		
<b>Glykolyse</b>		

Hexokinase	100	100
Phosphofruktokinase	73,8	57,5
<b>Anabolismus</b>	128,0	109,0
<b>Summe</b>	301,8	266,5
<b>ATP-Überschuss</b>	<b>857,5</b>	<b>658,1</b>

Eine maximale ATP-Bereitstellung geht davon aus, dass überschüssiges NADPH in die Atmungskette fließen würde. Da in *lysC<sup>fbr</sup>* der Fluss durch das Malatenzym nicht bestimmt werden und somit keine genaue Aussage über den NADPH-Überschuss getroffen werden konnte, war für diesen Stamm lediglich die Angabe einer minimalen ATP-Bildung möglich. Die ATP-Gesamtproduktion betrug in *lysC<sup>fbr</sup>* 1159,3 % und in der Mutante 924,6 %. Falls in der Mutante der Überschuss an gebildetem NADPH (vgl. NADPH-Bilanz) ebenfalls in die Atmungskette und zur Generation von ATP verwendet werden würde, läge die ATP-Bildung hier bei 1027 %. Allerdings wurde noch nicht zweifelsfrei bewiesen, ob die Elektronen von NADPH tatsächlich in die Atmungskette fließen (Krömer et al., 2005). Bei der Berechnung des ATP-Verbrauchs müsste der anaplerotische Fluss durch die Pyruvat-Carboxylase, welche die Carboxylierung von Pyruvat zu OAA unter ATP-Hydrolyse katalysiert, berücksichtigt werden. Da die Fixierung von CO<sub>2</sub> in *lysC<sup>fbr</sup>* aber auch durch die PEP-Carboxylase ohne ATP-Verbrauch geschieht, kann hier keine genauere Aussage über den maximalen ATP-Verbrauch gemacht werden. Daher stellt die Angabe von 301,8 % nur den minimalen ATP-Verbrauch dar. Aufgrund der Deletion der PEP-Carboxylase kann in der Mutante neben dem minimalen ATP-Verbrauch von 266,5 % auch ein maximaler ATP-Verbrauch von 334 % unter Berücksichtigung der Pyruvat-Carboxylase angegeben werden. Beide Stämme zeigten einen Überschuss an ATP, der jedoch im Ausgangsstamm wesentlich höher war als in der Mutante. Ein Überschuss an ATP dient zur Deckung des sogenannten Maintenance-Bedarfs wie z.B. zur DNA-Reparatur oder zur Erhaltung des Membranpotentials. Der Unterschied in der ATP-Bildung war im Wesentlichen auf die Deletion der ATP-bildenden Pyruvat-Kinase zurückzuführen.

### 3.5.5 CO<sub>2</sub>-Produktionsfluss

Der prozentuale CO<sub>2</sub>-Produktionsfluss wurde anhand der erstellten Flusskarten bestimmt. Die für die beiden Stämme erhaltenen Werte sind Tabelle IV-8 zu entnehmen.

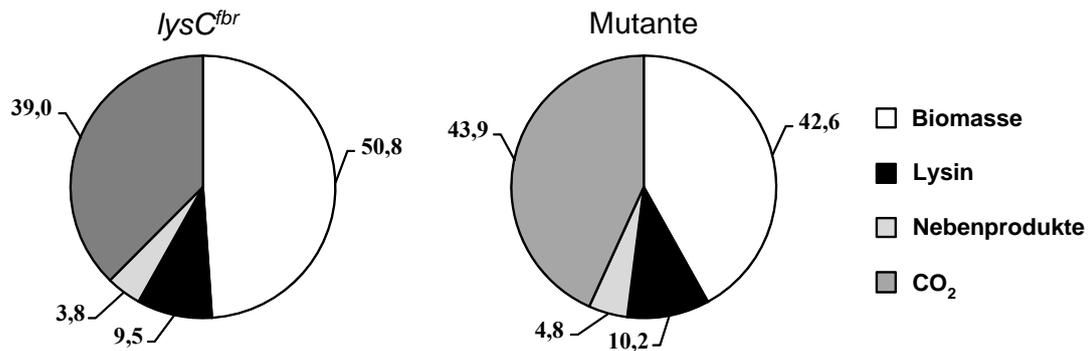
**Tab. IV-8:** Prozentualer CO<sub>2</sub>-Produktionsfluss der Stämme in *lysC<sup>fbr</sup>* und *lysC<sup>fbr</sup> ΔpykΔppcΔpckΔpgi* (Mutante).

	<i>lysC<sup>fbr</sup></i>	Mutante
<b>CO<sub>2</sub>-Produktion [%]</b>		
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	50	95
Pyruvat-Dehydrogenase	84	74
Isocitrat Dehydrogenase	62	56
α-Ketoglutarat-Dehydrogenase	53	48
Anabolismus	8	6
Lysin	11	12
<b>CO<sub>2</sub>-Verbrauch [%]</b>		
Anaplerotische Carboxylierung	31	29
<b>CO<sub>2</sub>-Produktionsfluss [%]</b>		
	236	262

In der Mutante stieg der prozentuale Gesamtfluss zur CO<sub>2</sub>-Bildung im Vergleich zu *lysC<sup>fbr</sup>* von 236 % auf 262 % an. Betrachtet man die CO<sub>2</sub>-bildenden Reaktionen war dies auf die Umlenkung des Kohlenstoffflusses durch den PPP zurückzuführen. Der so entstehende Kohlenstoffverlust konnte zum Teil durch eine geringere CO<sub>2</sub>-Bildung durch die Pyruvat-Dehydrogenase, den TCA-Zyklus sowie den Anabolismus kompensiert werden.

### 3.5.6 Kohlenstoffbilanz

Ein Vergleich der Verteilung des Kohlenstoffes in CO<sub>2</sub>, Biomasse, Lysin und Nebenprodukten in den beiden Stämmen ist in Abbildung IV-25 gezeigt. Anhand des prozentualen CO<sub>2</sub>-Produktionsflusses wurde der Kohlendioxidanteil gemessen am Gesamtkohlenstoff berechnet.



**Abb. IV-25:** Graphische Darstellung der Kohlenstoffverteilung in den Produkten Biomasse, Lysin, Nebenprodukten und CO<sub>2</sub> in *lysC<sup>fbr</sup>* und *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpckΔpgi* (Mutante) bei Kultivierung im Schüttelkolben. Die Werte wurden auf die Glucoseaufnahmerate normiert und sind in [% C-mol] angegeben. Der CO<sub>2</sub>-Anteil wurde anhand der Flusskarten berechnet.

Die Ermittlung des Kohlendioxidanteils anhand der molaren Stoffflüsse kann zwar die Messung von CO<sub>2</sub> mittels Abgasanalytik nicht vollends ersetzen, jedoch konnte in vorangehenden Arbeiten (Yang et al., 2008) eine gute Übereinstimmung zwischen diesen beiden Methoden gefunden werden. Da in die Berechnung der CO<sub>2</sub>-Bildung sowohl extrazellulär gemessene Flüsse als auch Isotopomerenverteilungen mit eingingen, konnte der relative Anteil der Kohlendioxidbildung an den gebildeten Produkten zumindest näherungsweise abgeschätzt werden.

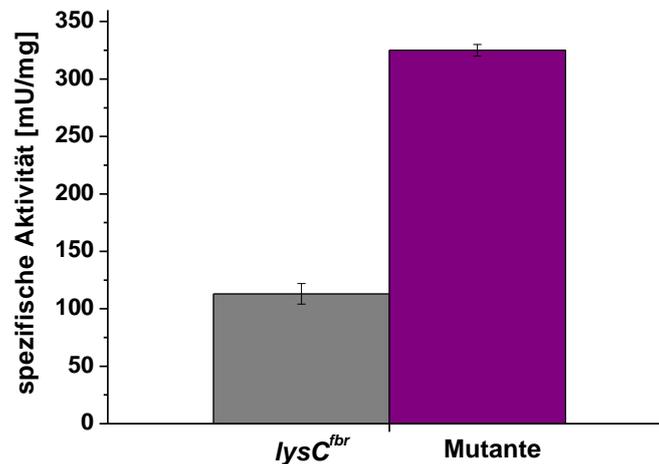
Der Anteil des aufgenommenen Kohlenstoffes, der als CO<sub>2</sub> verloren ging, war in der Mutante mit 43,9 % um etwa 13 % höher als im Ausgangsstamm mit 39 %. Gleichzeitig war der Anteil des Kohlenstoffes, der in Lysin und Nebenprodukte geschleust wurde, etwas erhöht, was vor allem zu Lasten der Biomassebildung ging. Deren Anteil am Gesamtkohlenstoff betrug nur 42,6 % in der Mutante im Vergleich zu 50,8 % in *lysC<sup>fbr</sup>*.

### 3.6 Vergleich von Enzymaktivitäten

Im Folgenden sollen die bestimmten Flüsse der beiden Stämme mit den *in vitro* Aktivitäten ausgewählter Enzyme des Zentralstoffwechsels verglichen werden. Die spezifische Enzymaktivität gibt Auskunft über die vorhandene Menge des untersuchten Enzyms, welche durch die Regulation von Transkription und Translation beeinflusst wird.

### *Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase*

Die vorhergehenden Analysen legten nahe, dass der absolute Fluss durch den PPP und somit die Glucoseaufnahme in der Mutante durch einen apparenten Überschuss von NADPH limitiert war. Im Folgenden sollte durch die Bestimmung der Aktivität der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase untersucht werden, ob eine unzureichende Expression dieses Enzyms ebenfalls zu der beobachteten Limitierung beitrug. In Abbildung IV-26 ist die spezifische Aktivität dieses Enzyms in *lysC<sup>fbr</sup>* im Vergleich zur Mutante dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase in der Mutante um das Dreifache erhöht war. Vergleicht man den absoluten Fluss durch den PPP in der Mutante mit 40,5 nmol/mg/min mit der spezifischen Enzymaktivität von 325 nmol/mg/min, wird deutlich, dass theoretisch ein achtmal höherer Fluss aufgrund der Expression der Glucose-6-Phosphat-Isomerase möglich wäre.

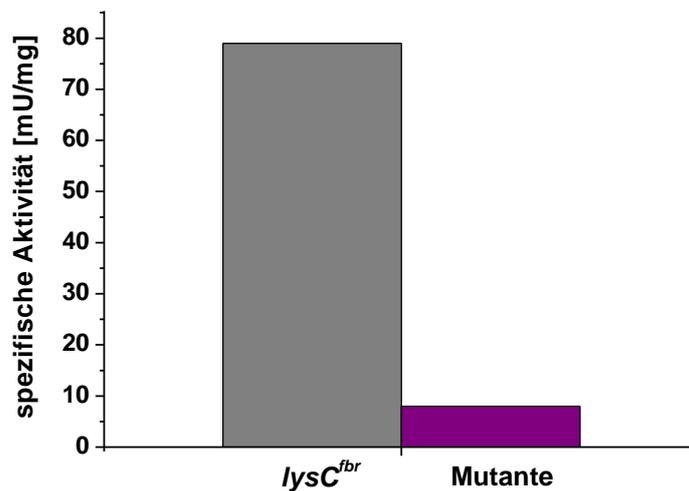


**Abb. IV-26:** Spezifische Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität [mU/mg] der Stämme *lysC<sup>fbr</sup>* und *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpckΔpgi* (Mutante). Gezeigt sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Dies Expression dieses Enzyms stellte folglich nicht den limitierenden Faktor für den Fluss durch den PPP dar und eine weitere Erhöhung der Expression, etwa durch einen stärkeren Promotor, würde kaum eine verbesserte Glucoseaufnahme erzielen. Die Deletion von *pgi* bewirkt offensichtlich eine verstärkte Expression der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, um die Feedback-Inhibition durch NADPH zu kompensieren. Ein Verbrauch von NADPH - etwa durch die Methioninsynthese - könnte somit die Glucoseaufnahme verbessern, falls die übrigen Enzyme des PPP nicht auf eine andere Art limitierend wirken.

### Malatenzym

Aufgrund des apparenten NADPH-Überschusses in der Mutante war es fraglich, ob die Reaktion vom OAA/Malat-Pool zu Pyruvat in der Mutante auf das Malatenzym zurückzuführen war, da dieses zusätzliches NADPH generieren würde. Abbildung IV-27 zeigt die spezifischen Aktivitäten dieses Enzyms in *lysC<sup>fbr</sup>* im Vergleich zur Mutante. Die Aktivität des Malatenzyms in der Mutante war mit 8 mU/mg im Vergleich zum Ausgangsstamm mit 79 mU/mg kaum vorhanden. Während im Ausgangsstamm das Malatenzym zur NADPH-Bereitstellung beitrug, was auch schon in früheren Arbeiten beobachtet wurde (Becker et al., 2008; Kim, 2006), war dies in der Mutante tatsächlich kaum der Fall. Die Rückreaktion von OAA/Malat zu Pyruvat musste demnach auf die Aktivität der OAA-Decarboxylase zurückzuführen sein.

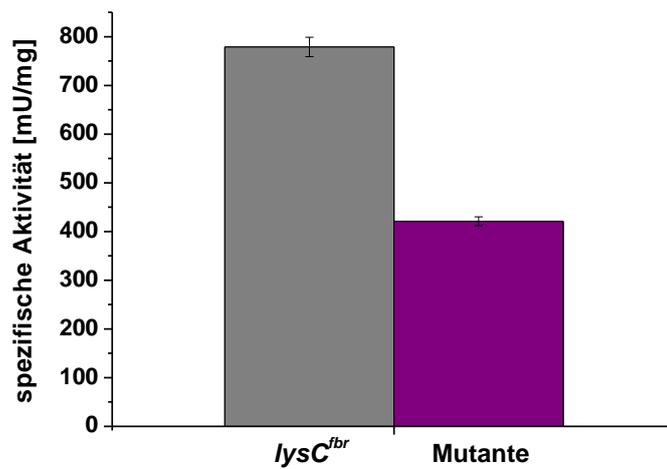


**Abb. IV-27:** Spezifische Aktivität des Malatenzyms [mU/mg] der Stämme *lysC<sup>fbr</sup>* sowie *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpckΔpgi* (Mutante). Gezeigt sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Das Malatenzym kann prinzipiell auch die Carboxylierung von Pyruvat zu Malat unter NADPH-Verbrauch katalysieren, allerdings wird die umgekehrte Reaktion aufgrund der geringen Affinität des Enzyms für Pyruvat ( $K_m = 13,4$  mM) bevorzugt. Da das Malat-Enzym in der Mutante kaum aktiv war, lässt sich der Fluss von Pyruvat in den C<sub>4</sub>-Pool vollständig der Pyruvat-Carboxylase zuschreiben. Offensichtlich wird auch die Aktivität des Malatenzyms durch das NADPH/NADP<sup>+</sup>-Verhältnis in der Zelle beeinflusst. Auf welche Art und Weise diese Regulation erfolgt, bedarf weiterer Untersuchungen.

### *Isocitrat-Dehydrogenase*

Der Fluss in den TCA-Zyklus war mit 55,7 % in der Mutante im Vergleich zum Ausgangsstamm mit 61,8 % nur etwas verringert. Jedoch war der absolute Fluss in der Mutante mit 1,41 mmol/g/h im Vergleich zu  $lysC^{fbr}$  mit 3,17 mmol/g/h etwa halbiert. Abbildung IV-28 zeigt einen Vergleich der Enzymaktivitäten der Isocitrat-Dehydrogenase im Ausgangsstamm und in der Mutante. Die Halbierung des absoluten Flusses durch den TCA-Zyklus spiegelte sich auch in der spezifischen Aktivität der Isocitrat-Dehydrogenase wieder, die in der Mutante ebenfalls nur noch halb so hoch wie in  $lysC^{fbr}$  war.



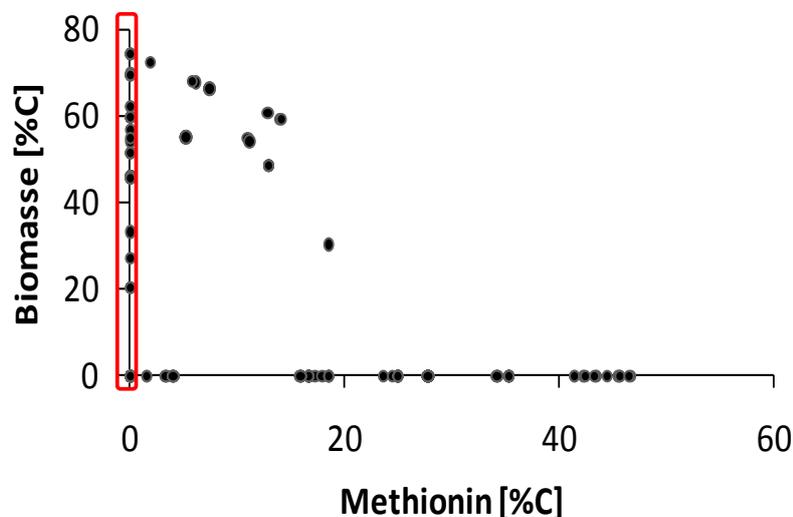
**Abb. IV-28:** Spezifische Aktivität der Isocitrat-Dehydrogenase [mU/mg] der Stämme  $lysC^{fbr}$  und  $lysC^{fbr} \Delta pyk \Delta ppc \Delta pck \Delta pgi$  (Mutante). Gezeigt sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Diese Beobachtung steht ebenfalls im Einklang mit dem halbierten Glutamat-Pool in der Mutante, was die Konsistenz der Analysen untermauert. Bisher wurde von einer konstitutiven Expression der Isocitrat-Dehydrogenase in *C. glutamicum* ausgegangen, da die spezifische Aktivität dieses Enzyms unabhängig von der verwendeten Kohlenstoffquelle oder der Wachstumsphase war (Sonntag et al., 1995). Im Gegensatz hierzu wurde in *E. coli* eine Regulation der Enzymaktivität durch reversible Phosphorylierung festgestellt. In *Vibrio sp.* ABE wurde eine Änderung der spezifischen Enzymaktivität auf eine transkriptionelle Regulation zurückgeführt. Die in dieser Arbeit vorgefundene deutlich veränderte spezifische Aktivität lässt vermuten, dass die Isocitrat-Dehydrogenase sehr wohl nicht nur der Inhibition durch Oxalacetat und Glyoxylat (Sonntag et al., 1995) unterliegt. Allerdings lässt sich nicht sagen, ob diese Regulation transkriptionell, translational oder durch reversible Phosphorylierung erfolgt. Hierzu bedarf es weiterer Studien. Krömer et. al (2004) konnten durch Transkriptomstudien zeigen, dass

die Expression der Isocitrat-Dehydrogenase mit einem verringertem TCA-Fluss absinkt, was auf eine transkriptionelle Regulation schließen lässt.

### 3.7 Konsequenzen für das Design eines Methioninproduzenten mittels Elementarmodenanalyse

Die Vorhersage der Elementarmoden, gemäß derer bei der vorliegenden Kombination von Deletionen Wachstum und Methioninproduktion gekoppelt sein müssen, kann nur zutreffen, wenn alle relevanten Reaktionen des metabolischen Netzwerks berücksichtigt wurden. Wachsen die Zellen, ohne Methionin zu produzieren, war eine Umlenkung des Kohlenstoffflusses auf andere Art und Weise möglich. Im vorliegenden Fall wurde der Kohlenstofffluss zwar - wie durch die Elementarmoden vorhergesagt - zum Serin geleitet; dieses wurde aber direkt zu Pyruvat abgebaut. Die Integration dieses Abbauweges in das Modell zur Elementarmodenanalyse zeigte, dass somit trotz der eingebrachten Deletionen Moden möglich waren, die ausschließlich Biomasse bildeten. Dies sind die Moden auf der Y-Achse, die in Abbildung IV-29 rot umrahmt sind.



**Abb. IV-29:** Metabolische Netzwerkanalyse der Mutante *C. glutamicum lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpckΔpgi* bei Integration des Serinabbaus zu Pyruvat: Kohlenstoffausbeuten für Methionin und Biomasse [% C-mol] für die erhaltenen Elementarmoden.

Die Methioninbiosynthese unterliegt einer strikten Regulation sowohl auf transkriptioneller als auch auf Proteinebene mit Beteiligung fast aller Intermediate des Methioninstoffwechsels. Neben der Regulation durch Metabolite ist die transkriptionelle Repression durch das Regulatorprotein McbR und seinen Effektor S-Adenosylhomocystein von essentieller Bedeutung (Rey et al., 2005; Rey et al., 2003), weshalb ein sehr

komplexes Regulationsnetzwerk entsteht. Der Abbau von Serin zu Pyruvat erfordert dagegen lediglich einen Reaktionsschritt und stellt für die Zelle wahrscheinlich den Weg des geringsten Widerstandes dar, um Wachstum zu ermöglichen. Der hohe apparente Überschuss von NADPH fördert zwar NADPH-verbrauchende Reaktionen. Allerdings reicht dieser Selektionsdruck in der Mutante nicht aus, um die Methioninproduktion mit ihrem hohen NADPH-Verbrauch zu favorisieren. *C. glutamicum* besitzt, wie die NADPH-Bilanz der Mutante zeigte, eine hohe Kapazität zur Reoxidation von NADPH ohne Beteiligung von biosynthetischen Reaktionen.

Der beobachtete Adaptionsprozess der Mutante könnte wie folgt erklärt werden: Zunächst konnte die Mutante nicht auf Minimalmedium wachsen; da dies später aber möglich war, müssen die Zellen trotzdem Glucose zur Deckung des Maintenance-Bedarfs aufgenommen haben. Durch die eingeführten Gendelektionen kam es dabei zur Akkumulation von Glykolyseintermediaten. Die Reaktion der 3-Phosphoglyceratdehydrogenase, dem ersten Enzym der Serin-Biosynthese, ist reversibel, wobei das Gleichgewicht auf der Seite des 3-Phosphoglycerats liegt (Sugimoto und Pizer, 1968). Sobald eine bestimmte intrazelluläre Konzentration von 3-Phosphoglycerat erreicht war, konnte jedoch durch Verschiebung der Gleichgewichtslage ein erhöhter Fluss Richtung Serin katalysiert werden. Hierdurch kam es zum Anstieg der intrazellulären Serin-Konzentration. Die PGDH ist das Schlüsselenzym der Serinsynthese und unterliegt in *C. glutamicum*, ebenso wie in *E. coli*, einer allosterischen Kontrolle durch das Endprodukt (*feedback*-Hemmung). Während die Inhibitionskonstante für das *E. coli* Enzym lediglich 8  $\mu\text{M}$  Serin beträgt (Bell et al., 2002), sind in *C. glutamicum* relativ hohe Serin Konzentrationen von 10 mM sowie eine vorhergehende Inkubation mit dem Inhibitor notwendig, um die Aktivität des Enzyms um etwa 40 % zu senken (Peters-Wendisch et al., 2002). Dies lässt darauf schließen, dass in *C. glutamicum* höhere intrazelluläre Serin-Konzentrationen möglich sind. Anschließend wurde Serin nicht in den  $\text{C}_1$ - und Methioninstoffwechsel gelenkt, sondern konnte direkt zu Pyruvat abgebaut werden, wodurch die Akkumulation von Glykolyseintermediaten ausgeglichen wurde und die Zellen wachsen konnten. *C. glutamicum* kann zwar auf Serin als einziger Kohlenstoffquelle nicht wachsen, dieses aber bei gleichzeitiger Fütterung von Glucose effektiv cometabolisieren (Netzer et al., 2004). Wie *E. coli* besitzt auch *C. glutamicum* eine sogenannte Serin-Dehydratase welche, wie Netzer et. al (2004) zeigen konnten, Serin zu Pyruvat abbaut. Die Serin-Dehydratase besitzt allerdings nur eine relativ geringe Affinität zu ihrem Substrat (11 mM bei Substratkonzentrationen bis 50 mM), so dass davon auszugehen ist, dass die Reaktion im Wildtyp ohne Serin-Fütterung

normalerweise nicht aktiv ist. Eine erhöhte intrazelluläre Serin-Konzentration, wie sie in der Mutante vorlag, könnte aber diesen Abbauweg ermöglichen. Der Adaptionsprozess war daher zumindest teilweise auf die Akkumulation von Metaboliten zurückzuführen. Ob in der Mutante zusätzliche Veränderungen im Genexpressionsmuster der an der Umlenkung des Kohlenstoffflusses beteiligten Enzyme vorliegen, könnten Transkriptomanalysen aufklären.

### 3.8 Deletion der Serin-Dehydratase (*sdaA*) in *C. glutamicum* *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpckΔpgi*

Als Konsequenz der gewonnenen Erkenntnisse sollte der Abbau von Serin durch die Deletion des *sdaA*-Gens, das für die Serin-Dehydratase kodiert, ausgeschaltet werden. Die Vorgehensweise zur Einführung dieses Knockouts in den adaptierten Stamm *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpckΔpgi* erfolgte wie bereits für die anderen Deletionen beschrieben. Die positiven Klone der zweiten Rekombination wiesen ausschließlich die Knockoutbande von  $\Delta sdaA$  mit einer Größe von 1020 bp auf (die Wildtypbande hatte eine Größe von 1570 bp; verwendete Primerpaare: VS0032/VS0035). Die so erhaltene Mutante mit fünf Gendeletion wurde anschließend zunächst auf Komplex- und dann auf Minimalmedium kultiviert. Die Mutante war in der Lage, auf beiden Medien ohne vorhergehende lag-Phase zu wachsen. Auch konnte keine Beeinträchtigung des Wachstums auf Minimalmedium beobachtet werden und die Mutante produzierte kein Methionin. Somit ist die zusätzliche Deletion von *sdaA* auch nicht ausreichend um Wachstum und Methioninproduktion zu koppeln.

Netzer et. al (2004) konnten bei Serin-Fütterung eine erhöhte Expression des *aecD* (*metC*)-Gens nachweisen. Dieses Gen kodiert für die Cystathionin- $\beta$ -Lyase, die die Spaltung von Cystathionin zu Homocystein, Pyruvat und  $\text{NH}_4^+$  katalysiert und eine Rolle in der Transsulfurierung zur Methioninsynthese spielt (Kim et al., 2001; Rückert et al., 2003). Neben der Spaltung von Cystathionin ist AecD auch in der Lage, Cystein in Sulfid,  $\text{NH}_4^+$  und Pyruvat abzubauen (Rossol und Pühler, 1992; Wada et al., 2002).

Für *Neurospora crassa* wurde gezeigt, dass dieses Enzym auch als Serin-Dehydratase fungiert (Flavin und Slaughter, 1964). Darüber hinaus wurde mit einer Serin-Dehydratase-negativen *E. coli*-Mutante nachgewiesen, dass die Überexpression der Cystathionin- $\beta$ -Lyase zum Wachstum auf L-Serin befähigt, was darauf hindeutet, dass das Enzym in *E. coli* auch Serin-Dehydratase-Aktivität besitzt (Brown et al., 1990). Mit Hilfe von Enzymtests konnten Netzer et. al (2004) für das *C. glutamicum* Enzym *in vitro* ebenfalls

eine Serin-Dehydratase-Aktivität nachweisen. Des Weiteren führte die zusätzliche Deletion von *aecD* (*metC*) in einem  $\Delta sdaA$ -Hintergrund in *C. glutamicum* zu signifikant geringeren Serin-Abbauraten, was belegt, dass dieses Enzym auch *in vivo* eine Serin-desaminierende Funktion besitzt. Allerdings konnte selbst in der Doppelknockout-Mutante weiterhin ein Abbau von Serin beobachtet werden, was für die Beteiligung weiterer Enzyme spricht. So besitzen die Threonin-Dehydratase aus *E. coli* und die  $\beta$ -Untereinheit der Tryptophan-Synthase aus *Salmonella serovar typhimurium* *in vitro* ebenfalls eine Serin-desaminierende Funktion (Netzer et al., 2004).

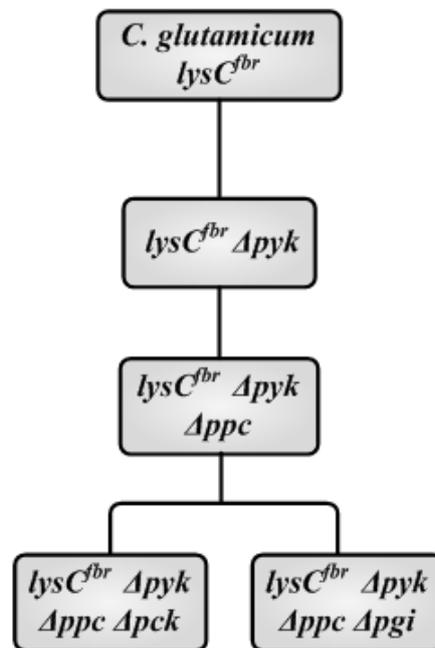
Folglich gäbe es auch bei Deletion von *sdaA* in *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpckΔpgi* weiterhin die Möglichkeit des Abbaus von Serin zu Pyruvat, wodurch weiterhin Moden möglich sind, die ausschließlich Biomasse bilden. Daher wäre eine zusätzliche Deletion dieser Gene in der Mutante erforderlich. In der theoretischen Betrachtung der Flussverteilungen der Elementarmoden konnte gezeigt werden, dass die Methioninsynthese in allen Moden über die Transsulfurierung verlaufen muss. Die Cystathionin- $\beta$ -Lyase *aecD* (*metC*) ist jedoch Teil dieses Stoffwechselweges. Das Ausschalten dieses Enzyms wäre also einerseits notwendig, da aufgrund seiner Serin-desaminierenden Nebenfunktion Wachstum und Methioninproduktion nicht gekoppelt sein können. Andererseits kann das Enzym nicht ausgeschaltet werden, da es Teil aller Elementarmoden der Deletionsmutante ist.

Hierin wird die prinzipielle Problematik der *in silico* Analyse von metabolischen Netzwerken zum rationalen Design von Produktionsstämmen deutlich. Diese Herangehensweise greift auf Genominformationen, die in Datenbanken wie KEGG hinterlegt sind, zurück und berücksichtigt so im Allgemeinen nur die Hauptfunktion einer bestimmten Enzymreaktion. Nebenreaktionen sind zum einen oftmals nicht hinterlegt, wie im Falle der Cystathionin- $\beta$ -Lyase für die in KEGG keine Serin-desaminierende Funktion beschrieben ist. Zum anderen treten bestimmte Enzymaktivitäten erst unter extremen Bedingungen überhaupt in Erscheinung, wie im Fall der  $\Delta mcbR$ -Mutante. Bei Deletion dieses transkriptionellen Regulators der Methionin- und Cysteinbiosynthese konnte die Bildung von Homolanthionin auf eine Nebenreaktion der Cystathionin- $\gamma$ -Synthase (*metB*) zurückgeführt werden. Diese Reaktion wurde zuvor für *C. glutamicum* nicht beschrieben (Krömer et al., 2006a). Bei großen Netzwerken oder gar genomweiten Netzwerkanalysen (Kjeldsen und Nielsen, 2009) ist eine Literaturrecherche über etwaige Nebenreaktionen außerdem aufgrund der Komplexität und Vielzahl an Möglichkeiten mit den derzeit verfügbaren Mitteln schwer realisierbar.

Da der Ansatz der vorliegenden Arbeit, aufgrund der effizienten Umleitung des Kohlenstoffflusses zum Serin, dennoch in die richtige Richtung weist, sollten die Nebenreaktionen sowohl von MetC als auch von MetB, da diese einer Kopplung von Wachstums und Methioninproduktion ebenfalls entgegenstehen würde, Gegenstand künftiger wissenschaftlicher Arbeit sein. Die unerwünschten Nebenaktivitäten dieser Enzyme könnten durch Zufallsmutageneseverfahren und anschließender Selektion eliminiert und die so veränderten Enzymvarianten in die Fünffach-Mutante eingebracht werden. Es ist außerdem zu untersuchen, ob in *C. glutamicum* die Threonin-Dehydratase und die Tryptophan-Synthase Serin-desaminierende Aktivitäten besitzen, die dann ebenfalls ausgeschaltet werden sollten. Ist dies möglich, sollte es gelingen Wachstum- und Methioninproduktion, aneinander zu koppeln.

#### 4. Physiologische Analysen zu Mehrfach-Deletionsmutanten von *C. glutamicum*

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden im Zuge der Konstruktion der Vierfach-Deletionsmutante zur Kopplung von Wachstum und Methioninproduktion verschiedene Zwei- und Dreifach Deletionsmutanten der entsprechenden Gene erzeugt (Abbildung IV-30). Die ausgeschalteten Enzymreaktionen betrafen wichtige Knotenpunkte im Zentralstoffwechsel, die für die Produktion von Aminosäuren wie Lysin oder Methionin von entscheidender Bedeutung sind: die Glucose-6-Phosphat-Isomerase am Verzweigungspunkt zwischen Glykolyse und PPP (Marx et al., 2003), die Pyruvat-Kinase als Schlüsselenzym des Energiemetabolismus und als Angriffspunkt für vielfältige Regulationen auf Metabolitebene (Jetten et al., 1994) sowie die PEP-Carboxylase und PEP-Carboxykinase zur Interkonversion der C<sub>3</sub>- bzw. C<sub>4</sub>-Metabolite PEP und Oxalacetat (Jetten und Sinskey, 1993; Peters-Wendisch et al., 1993).



**Abb. IV-30:** Übersicht über die erzeugten Deletions-Mutanten von *C. glutamicum lysC<sup>fbr</sup>*. Pyruvat-Kinase (*pyk*), PEP-Carboxylase (*ppc*), PEP-Carboxykinase (*pck*), Glucose-6-Phosphat-Isomerase (*pgi*).

Mit Hilfe dieser Mehrfachdeletionmutanten lassen sich schrittweise Veränderungen im Stoffwechsel nachvollziehen und somit wichtige Erkenntnisse über das Zusammenspiel verschiedener Elemente des Zentralstoffwechsels von *C. glutamicum* gewinnen.

Darüber hinaus besteht ein zentrales Ziel bei der Analyse komplexer metabolischer Netzwerke darin, jedem Element in einem System eine spezifische Funktion zuzuordnen. Um solche kausalen Beziehungen herzustellen, werden in den meisten Studien Einzelgendeletionen durchgeführt. Ein klassisches Beispiel hierfür ist die systematische Deletion von Einzelgenen um herauszufinden, ob diese essentiell für die Überlebensfähigkeit eines Organismus sind (Carpenter und Sabatini, 2004; Winzeler et al., 1999). Drei Mechanismen tragen jedoch dazu bei, dass Einzelgendeletionen oftmals nur eine relativ geringe Auswirkung auf den Phänotyp haben. Redundante Gene mit ähnlicher Funktion können den Verlust eines bestimmten Gens kompensieren (Gourdon et al., 2003; Nowak et al., 1997) oder der Stoffwechsel kann über alternative Wege umgeleitet und somit funktionell komplementiert werden. Des Weiteren kann es sein, dass die Bedeutung eines Gens erst unter bestimmten genetischen Konstitutionen oder Umweltbedingungen zum Tragen kommt (Deutscher et al., 2008).

So konnte in einer Studie des Modellorganismus *S. cerevisiae* gezeigt werden, dass durch die Analyse von Einzelgendeletionen mindestens 33 % der Gene, die signifikant zum Wachstumspotential dieses Organismus beitragen, phänotypisch nicht erkannt werden (Deutscher et al., 2008). Diese Feststellung lässt den Schluss zu, dass die funktionelle Organisation eines komplexen biologischen Systems alleine durch Einzeldelationen nicht erfasst werden kann. Aus diesem Grund gewannen in letzter Zeit Studien zu Mehrfach-Deletionsmutanten immer größere Bedeutung (Behre et al., 2008; Deutscher et al., 2008; Ishii et al., 2007). Multiple Knockouts sind außerdem in der Biotechnologie insbesondere bei der Optimierung von Produktionsstämmen von Bedeutung, etwa wenn ineffiziente Wege oder unerwünschte Nebenreaktionen ausgeschaltet werden müssen.

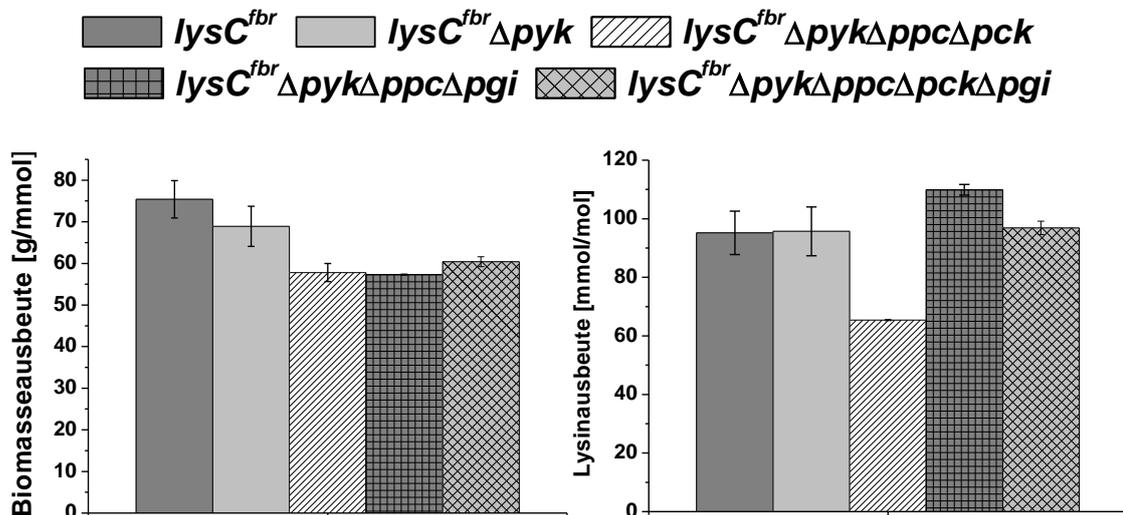
Daher sollte in diesem Teil der Arbeit ein physiologischer Vergleich der erzeugten Mutanten erfolgen. Dabei wurden die Parameter wie Wachstum, Glucoseaufnahme sowie Lysin- und Nebenproduktbildung erfasst. Des Weiteren wurden für jeden Stamm Flussanalysen durchgeführt und die Aktivitäten verschiedener Schlüsselenzyme gemessen. Die im Folgenden angegebenen Werte stellen Mittelwerte aus jeweils zwei Parallelkultivierungen auf CG12  $\frac{1}{2}$ -Minimalmedium mit Glucose dar. Die Zellen befanden sich in der exponentiellen Wachstumsphase, so dass von einem metabolischen *quasi-steady-state* ausgegangen werden konnte.

### 4.1 Spezifische Raten und Ausbeuten

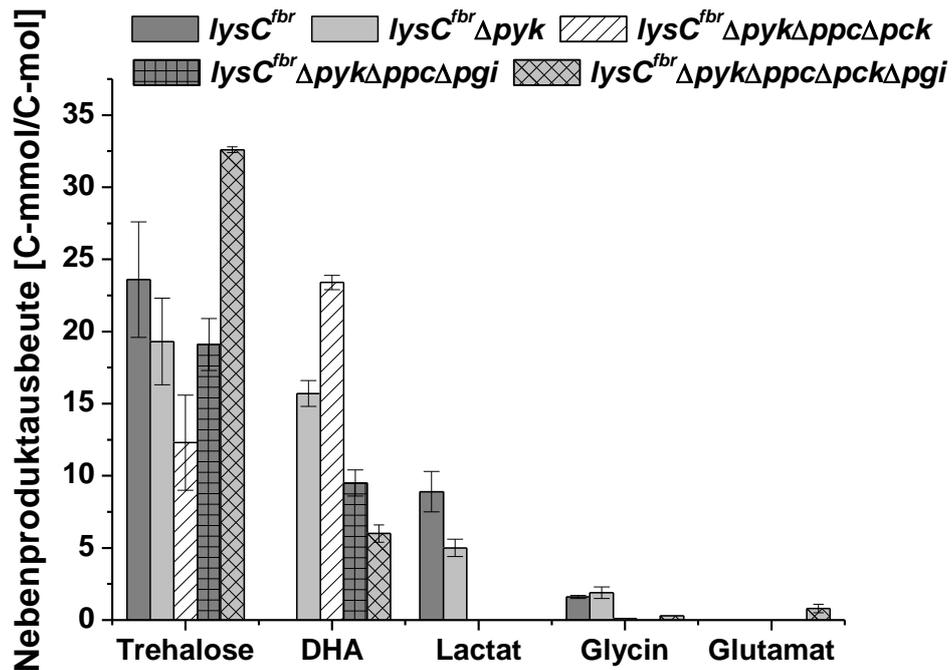
Tabelle IV-9 zeigt einen Vergleich der spezifischen Wachstums ( $\mu$ )- und Glucose ( $q_s$ )-Aufnahmeraten der untersuchten Stämme. In den Abbildungen IV-31 und IV-32 sind die Biomasse- und Lysinausbeuten sowie die Ausbeuten der Nebenprodukte gezeigt. Auch die Werte der Vierfach-Deletionsmutante sind zum Vergleich nochmals dargestellt.

**Tab. IV-9:** Übersicht über die spezifischen Wachstums- ( $\mu$ ) und Substrat ( $q_s$ )-Aufnahmeraten der untersuchten *C. glutamicum* Stämme bei Batch-Kultivierung im Schüttelkolben auf CG 12 1/2-Minimalmedium mit Glucose.

	$\mu$ [ $h^{-1}$ ]	$q_s$ [mmol/g/h]
<i>lysC<sup>fbr</sup></i>	0,38 ( $\pm$ 0,01)	5,08
<i>lysC<sup>fbr</sup> <math>\Delta</math>pyk</i>	0,32 ( $\pm$ 0,01)	4,65
<i>lysC<sup>fbr</sup> <math>\Delta</math>pyk<math>\Delta</math>ppc</i>	kein Wachstum	/
<i>lysC<sup>fbr</sup> <math>\Delta</math>pyk<math>\Delta</math>ppc<math>\Delta</math>pck</i>	0,28 ( $\pm$ 0,00)	4,80
<i>lysC<sup>fbr</sup> <math>\Delta</math>pyk<math>\Delta</math>ppc<math>\Delta</math>pgi</i>	0,16 ( $\pm$ 0,01)	2,85
<i>lysC<sup>fbr</sup> <math>\Delta</math>pyk<math>\Delta</math>ppc<math>\Delta</math>pck<math>\Delta</math>pgi</i>	0,15 ( $\pm$ 0,01)	2,54



**Abb. IV-31:** Vergleich von Biomasse- [g/mmol] und Lysinausbeute [mmol/mol] der untersuchten *C. glutamicum* Stämme. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen Doppelbestimmungen. Die Ausbeuten wurden über den gesamten exponentiellen Kultivierungsverlauf berechnet.



**Abb. IV-32:** Vergleich der Nebenproduktausbeuten [C-mmol/C-mol] der untersuchten *C. glutamicum* Stämme. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen Doppelbestimmungen. Die Ausbeuten wurden über den gesamten exponentiellen Kultivierungsverlauf berechnet.

In vorangehenden Arbeiten wurde die Deletion der Pyruvat-Kinase (*pyk*) als Ansatzpunkt zur Verbesserung der Lysinausbeute untersucht (Becker et al., 2008; Gubler et al., 1994; Park et al., 1997b; Shii I, 1987). Die Lysinbiosynthese erfordert die Bereitstellung von Pyruvat und OAA in einem molaren Verhältnis von 1:1. Die Aktivität des PTS-Systems und der Pyruvat-Kinase führt zur fast vollständigen Umwandlung der Glucose zu Pyruvat. Die PEP-Carboxylase und das PTS-System liefern zusammen hingegen äquimolare Mengen von OAA und Pyruvat. Die Deletion der Pyruvat-Kinase sollte demnach das zur Lysinbiosynthese erforderliche 1:1 Verhältnis an Pyruvat und OAA bereitstellen sowie den Fluss in den TCA-Zyklus und damit den Verlust von Kohlenstoff in Form von CO<sub>2</sub> absenken. Während Shii et. al (1987) über eine verbesserte Lysinausbeute bei Deletion der Pyruvat-Kinase berichteten, konnte dies von anderen Arbeiten nicht bestätigt werden (Becker et al., 2008; Gubler et al., 1994). Auch in der vorliegenden Arbeit war keine Steigerung der Lysinausbeute in *lysC<sup>fbr</sup> Δpyk* im Vergleich zu *lysC<sup>fbr</sup>* festzustellen. Die Lysinausbeute war in beiden Stämmen etwa gleich. Ebenso zeigte die Biomasseausbeute keine signifikanten Unterschiede zum Ausgangsstamm. Sowohl die Wachstumsrate als auch die Glucoseaufnahme waren in *lysC<sup>fbr</sup> Δpyk* etwas verringert. Die Sekretion des Glykolyse-overflow-Metaboliten DHA in *lysC<sup>fbr</sup> Δpyk* von 15,7 C-mmol/C-mol war ein

Hinweis auf eine Akkumulation von Glykolyseintermediaten oberhalb von PEP. Wahrscheinlich bildete sich ein Rückstau bis zum Dihydroxyacetonphosphat, dem Vorläufer von DHA. Ebenso zeigte die etwas verringerte Bildung des Pyruvat-overflow-Metaboliten Lactat, in *lysC<sup>fbr</sup>Δpyk* eine verminderte Verfügbarkeit von Pyruvat an. Die übrigen Nebenprodukte Trehalose und Glycin zeigten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu *lysC<sup>fbr</sup>*. Insgesamt war die Nebenproduktbildung in der Mutante mit 41,9 C-mmol/C-mol durch die Sekretion von DHA im Vergleich zu *lysC<sup>fbr</sup>* mit 34 C-mmol/C-mol erhöht.

Die PEP-Carboxylase (*ppc*) katalysiert die anaplerotische Carboxylierung von PEP zu OAA. Die Einzeldelation dieses Gens hatte keinen Einfluss auf Wachstum und Lysinproduktion in *C. glutamicum* (Park et al., 1997b; Peters-Wendisch et al., 1993), da der Verlust der PEP-Carboxylase durch die Pyruvat-Carboxylase, dem zweiten anaplerotischen Enzym, kompensiert wird. Die Doppelknockout-Mutante *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppc* war jedoch nicht in der Lage, auf CG 12 ½ - Minimalmedium zu wachsen und konnte auch nicht adaptiert werden. Becker et. al (2008) zeigten, dass die anaplerotische Carboxylierung in *lysC<sup>fbr</sup>Δpyk* vollständig auf die PEP-Carboxylase verlagert war; durch die Pyruvat-Carboxylase war kein Fluss zu verzeichnen. Offensichtlich war die Pyruvat-Carboxylase auch in *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppc* nicht oder nicht ausreichend aktiv, um den Verlust der PEP-Carboxylase zu kompensieren. Ohne anaplerotische Reaktionen ist es jedoch nicht möglich, den TCA-Zyklus aufrechtzuerhalten und es kann kein Wachstum erfolgen.

Park et. al (1997b) führten bereits einen Doppelknockout der Pyruvat-Kinase und der PEP-Carboxylase in einem Lysin-Produzenten durch. Dieser Stamm war zwar in der Lage, auf Minimalmedium zu wachsen, jedoch wies er eine stark beeinträchtigte Wachstumsrate sowie eine drastisch reduzierte Glucoseaufnahme und Lysinproduktion auf. Der in der damaligen Arbeit verwendete Ausgangsstamm *C. glutamicum* 21253 war allerdings ein klassisch optimierter Stamm mit Homoserin- und Leucinauxotrophie. Daher ist es wahrscheinlich, dass in diesem weitere unbekannte Mutationen vorhanden waren, die das Wachstum ermöglichten. Folglich kann nicht unterschieden werden, welche physiologischen Veränderungen auf die eingebrachten Deletionen oder auf zusätzliche Mutationen zurückzuführen waren.

Dass zusätzliche Mutationen das Wachstum von *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppc* ermöglichen können, wurde in der vorliegenden Arbeit beobachtet. Ebenso wie die Vierfach-Deletionsmutante, welche im vorangegangenen Kapitel beschrieben wurde, wuchsen die beiden Dreifach-Knockoutstämme *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpck* und *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpgi* nach einer Adaption

von ca. 100 Stunden auf Minimalmedium. Um eine Kontamination auszuschließen, wurden die Deletionen in beiden Stämmen mittels PCR überprüft. Die Tatsache, dass die beiden zusätzlich ausgeschalteten Enzyme PEP-Carboxykinase (*pck*) bzw. Glucose-6-Phosphat-Isomerase (*pgi*) an jeweils vollkommen unterschiedlichen Positionen im Stoffwechsel liegen, führte zu der Frage, welche Veränderungen diese beiden Modifikationen gemeinsam haben und weshalb diese das Wachstum ermöglichen. Aufgrund der eingefügten Gendeletionen war in beiden Stämmen mit weitreichenden Änderungen im Kohlenstofffluss zu rechnen. Die Wachstums- und Glucoseaufnahmeraten sowie die Lysin- und Nebenproduktbildung der beiden Stämme zeigten zunächst deutliche Unterschiede.

Die Wachstumsrate von *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpck* war mit  $0,28 \text{ h}^{-1}$  lediglich um 12,5 % niedriger als in *lysC<sup>fbr</sup>Δpyk*; die Glucoseaufnahmerate zeigte keine signifikanten Unterschiede. Allerdings waren die Biomasse- und Lysinausbeute in diesem Stamm deutlich reduziert. Die Biomasseausbeute sank mit  $57,8 \text{ g/mmol}$  um 16 % bzw. 23 % im Vergleich zu den beiden Ausgangsstämmen *lysC<sup>fbr</sup>Δpyk* und *lysC<sup>fbr</sup>* ab. Die Lysinausbeute war mit  $65,4 \text{ mmol/mol}$  ebenfalls stark erniedrigt. Bei Betrachtung der Nebenprodukte fiel auf, dass deren Summe von  $35,7 \text{ C-mmol/C-mol}$  in der Dreifach-Mutante ebenfalls etwas niedriger war als in *lysC<sup>fbr</sup>Δpyk* mit  $41,9 \text{ C-mmol/C-mol}$ . Ein Großteil der aufgenommenen Glucose musste somit als  $\text{CO}_2$  verloren gegangen sein. Die Trehalose-Bildung war in der Mutante gegenüber *lysC<sup>fbr</sup>Δpyk* um 35,7 % erniedrigt, was bedeutet, dass weniger Glucose-6-Phosphat zur Verfügung stand. Die Bildung von DHA war um 32,9 % gesteigert, was auf einen noch stärkeren glykolytischen Rückstau gegenüber *lysC<sup>fbr</sup>Δpyk* hinweist. Während die Lactat-Bildung in *lysC<sup>fbr</sup>Δpyk* im Vergleich zu *lysC<sup>fbr</sup>* bereits reduziert war, konnte in der Dreifach-Mutante überhaupt keine Lactatsekretion beobachtet werden. Ebenso wurde kein Glycin sekretiert.

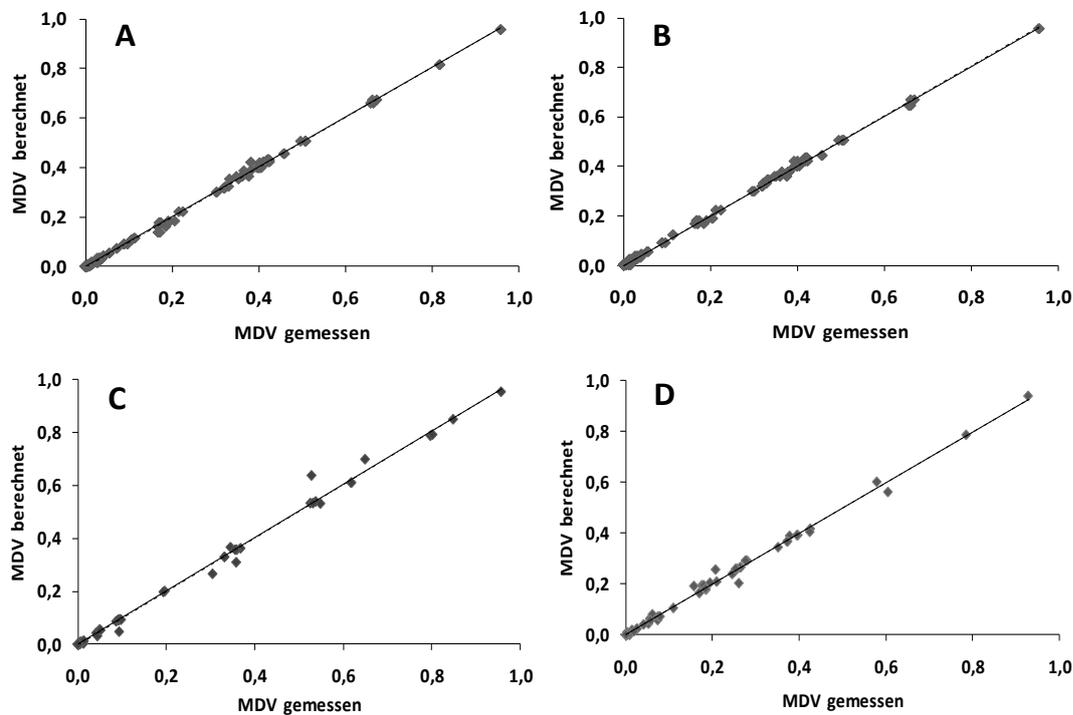
In der Mutante *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpgi* hingegen war die Wachstumsrate im Vergleich zu *lysC<sup>fbr</sup>Δpyk* auf  $0,16 \text{ h}^{-1}$  halbiert und die Glucoseaufnahmerate um 38,7 % auf  $2,85 \text{ mmol/g/h}$  erniedrigt. Durch die Deletion der Glucose-6-Phosphat-Isomerase musste die gesamte aufgenommene Glucose über den PPP geschleust werden. Die Biomasseausbeute war in diesem Stamm mit  $57,3 \text{ g/mmol}$  ebenfalls deutlich reduziert. Während die Lysinausbeute bei zusätzlicher Deletion der PEP-Carboxykinase deutlich absank, war diese bei zusätzlicher Deletion der Glucose-6-Phosphat-Isomerase mit  $110 \text{ mmol/mol}$  im Vergleich zu den beiden Ausgangsstämmen sogar erhöht. Insgesamt bildete diese Mutante mit  $28,6 \text{ C-mmol/C-mol}$  die wenigsten Nebenprodukte. Durch die *pgi*-Deletion wurde der

Kohlenstofffluss also auch hier effektiver in Richtung Lysinbiosynthese gelenkt als in der anderen Dreifach-Mutante. Die Bildung von Trehalose war höher als in *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpck* und etwa genauso hoch wie in *lysC<sup>fbr</sup>Δpyk*. Zusammen mit der geringen Glucoseaufnahmerate war dies erneut ein Hinweis auf eine unzureichende Kapazität der Enzyme des PPP. Die DHA-Bildung war in *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpgi* um 60 % im Vergleich zu *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpck* reduziert. Die geringere Bildung an DHA konnte durch die geringere Glucoseaufnahmerate erklärt werden. Wie in der anderen Dreifach-Mutante konnten weder Lactat noch Glycin in den Kulturüberständen detektiert werden. Ein ähnliches Bild zeigte sich in der Vierfach-Deletionsmutante. Die fehlende Produktion des Pyruvat-overflow-Metaboliten Lactat war in allen drei Stämmen ein Hinweis auf eine verminderte Verfügbarkeit von Pyruvat. Die fehlende Sekretion von Glycin in den beiden Dreifach-Mutanten könnte wie in der Vierfach-Mutante mit einer Umlenkung des Kohlenstoffflusses von Serin zu Pyruvat zusammenhängen.

## 4.2 <sup>13</sup>C-Metabolische Flussanalyse

Wie schon im vorangegangenen Kapitel ausführlich beschrieben, wurde auch für die hier aufgeführten Stämme eine <sup>13</sup>C-Metabolische Flussanalyse durchgeführt. Die Markierungsexperimente mit *lysC<sup>fbr</sup>Δpyk* und *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpck* erfolgten auf 99 % [1-<sup>13</sup>C]-Glucose. Die Mutante *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpgi* wurde auf 99 % [1,2-<sup>13</sup>C]-Glucose kultiviert. Die zur Flusssimulation eingesetzten Daten stammten jeweils aus zwei Parallelexperimenten. Die in den jeweiligen Stämmen deletierten Reaktionen wurden in den verwendeten Modellen zur Flussberechnung nicht integriert. In den Modellen für die beiden Stämme *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpck* und *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpgi* konnte zunächst keine gute Anpassung zwischen den experimentell bestimmten und den berechneten Markierungsverteilungen erzielt werden, was auch schon in der Vierfach-Knockoutmutante *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpckΔpgi* beobachtet wurde. In allen drei Stämmen wurde ein Adaptationsprozess beobachtet. Darüber hinaus wurden weder Lactat noch Glycin sekretiert, was eine weitere Gemeinsamkeit zwischen den beiden Dreifach-Deletionsmutanten und der Vierfach-Mutante darstellt. In der Vierfach-Mutante wurde eine Umlenkung des Kohlenstoffflusses ausgehend von 3-Phosphoglycerat zu Serin und von Serin zu Pyruvat beobachtet. Diese Reaktionen wurden auch in die Modelle zur Flussberechnung der beiden Dreifach-Deletionsmutanten aufgenommen, wodurch eine gute Anpassung erzielt werden konnte. Für *lysC<sup>fbr</sup>Δpyk* wurde auch ohne diesen Weg eine sehr gute Anpassung erreicht (Abbildung IV-33). Die exakten numerischen Werte der

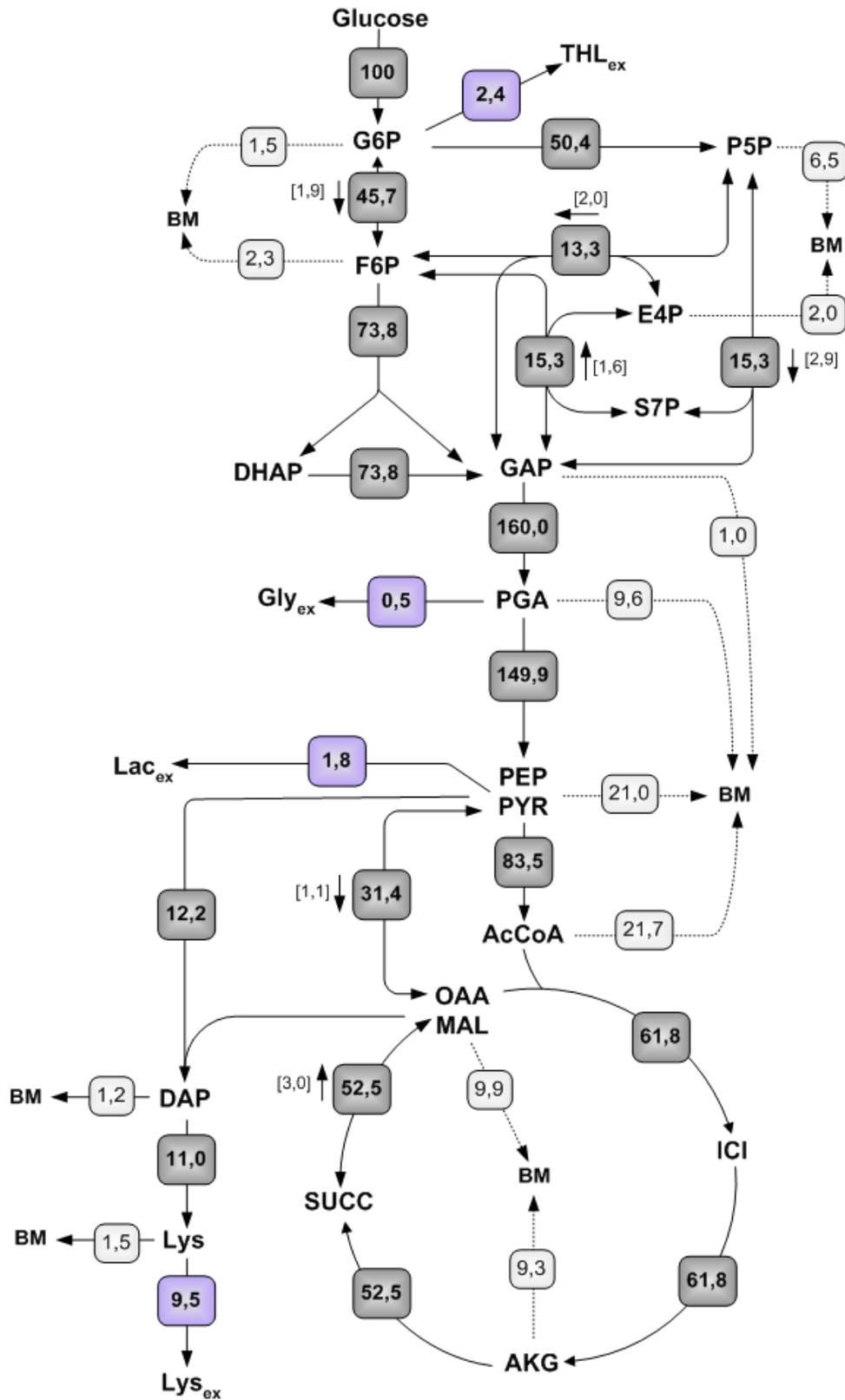
berechneten und gemessenen Massenisotopomerverteilungen befinden sich im Anhang (Tabelle VII-8 – VII-11).



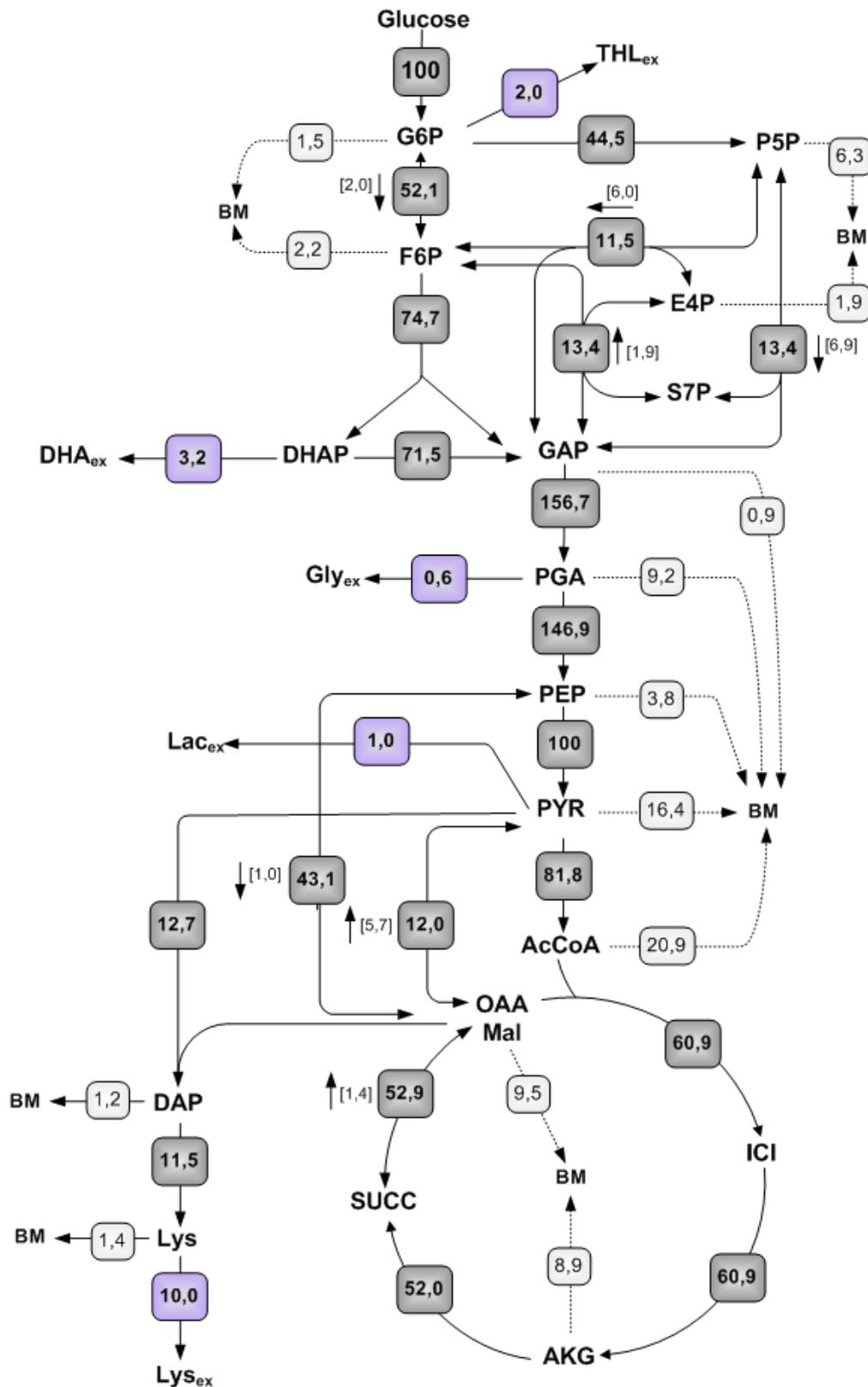
**Abb. IV-33:** Graphische Anpassung der vom Modell berechneten und mittels GC/MS gemessenen Massenisotopomerverteilungen (MDV) proteinogener Aminosäuren und Trehalose für die Kultivierung von *C. glutamicum lysC<sup>fbr</sup>* (A), *C. glutamicum lysC<sup>fbr</sup>Δpyk* (B) *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpck* (C) auf [1-<sup>13</sup>C]-Glucose und *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpgi* (D) im Schüttelkolben auf [1,2-<sup>13</sup>C]-Glucose. Die jeweils deletierten Reaktionen waren nicht in den Modellen zur Flussanalyse enthalten. In den Modellen von (C) und (D) wurden die Reaktionen von 3-Phosphoglycerat zu Serin und von Serin zu Pyruvat integriert.

#### 4.2.1 Vergleich des Fluxoms

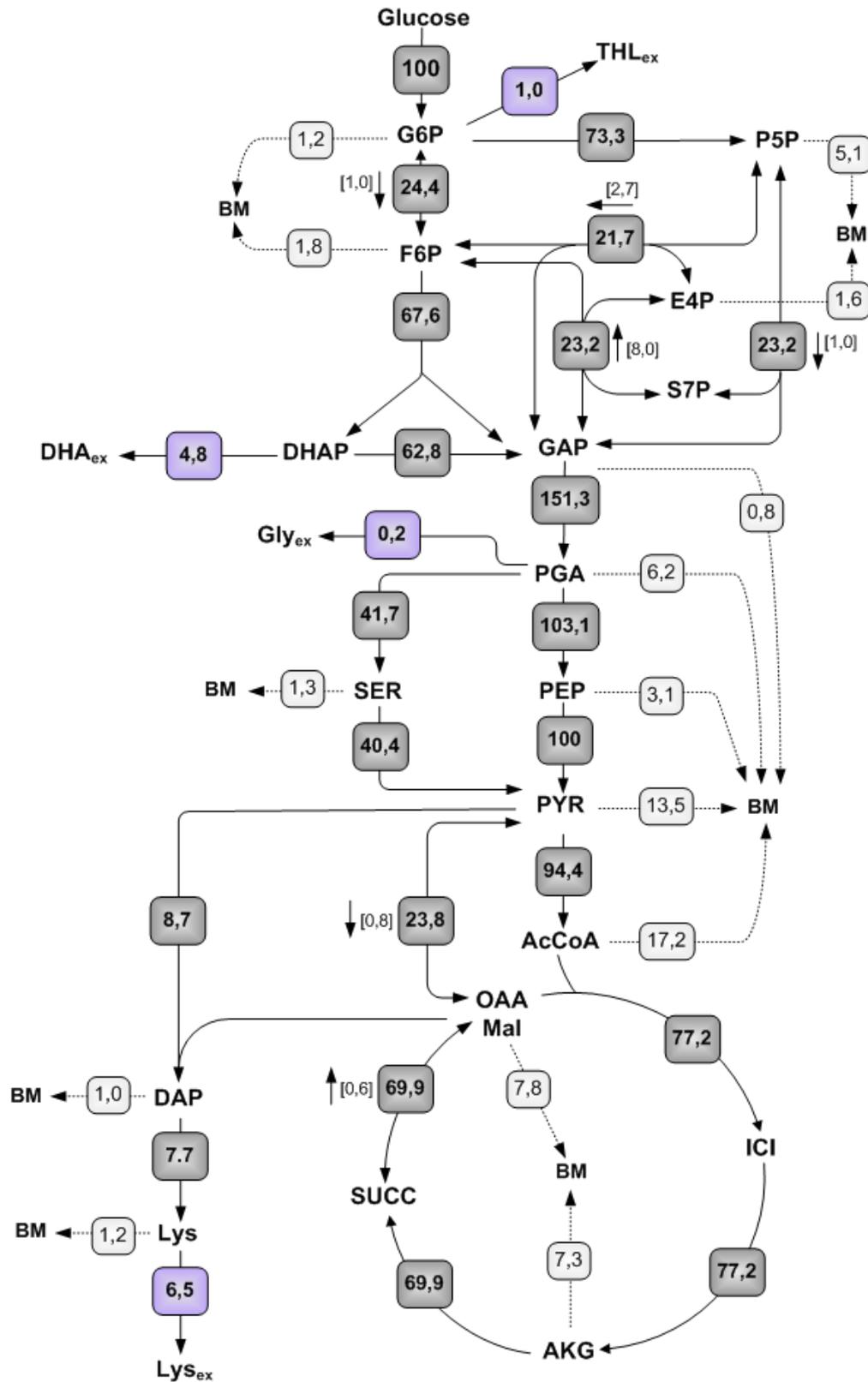
Im Folgenden wurde der Einfluss der genetischen Modifikationen auf die intrazellulären Flussverteilungen untersucht. Hierbei ist es von Interesse, Kenntnisse darüber zu erlangen, wie die eingebrachten Gendelektionen kompensiert wurden. Die erstellten Flusskarten (Abbildungen IV-34 bis IV-37) geben die Aktivitäten der einzelnen Stoffwechselwege in Form prozentualer molarer Flüsse wieder. Die spezifische Glucoseaufnahmerate ( $q_S$ ) diene dabei als Bezugsgröße mit 100 %. Die Tabellen VII-3 bis VII-6 im Anhang enthalten sämtliche berechneten intrazellulären Flüsse einschließlich der Intervalle für 90 % Konfidenz nach jeweils 100 durchgeführten Monte-Carlo-Simulationen.



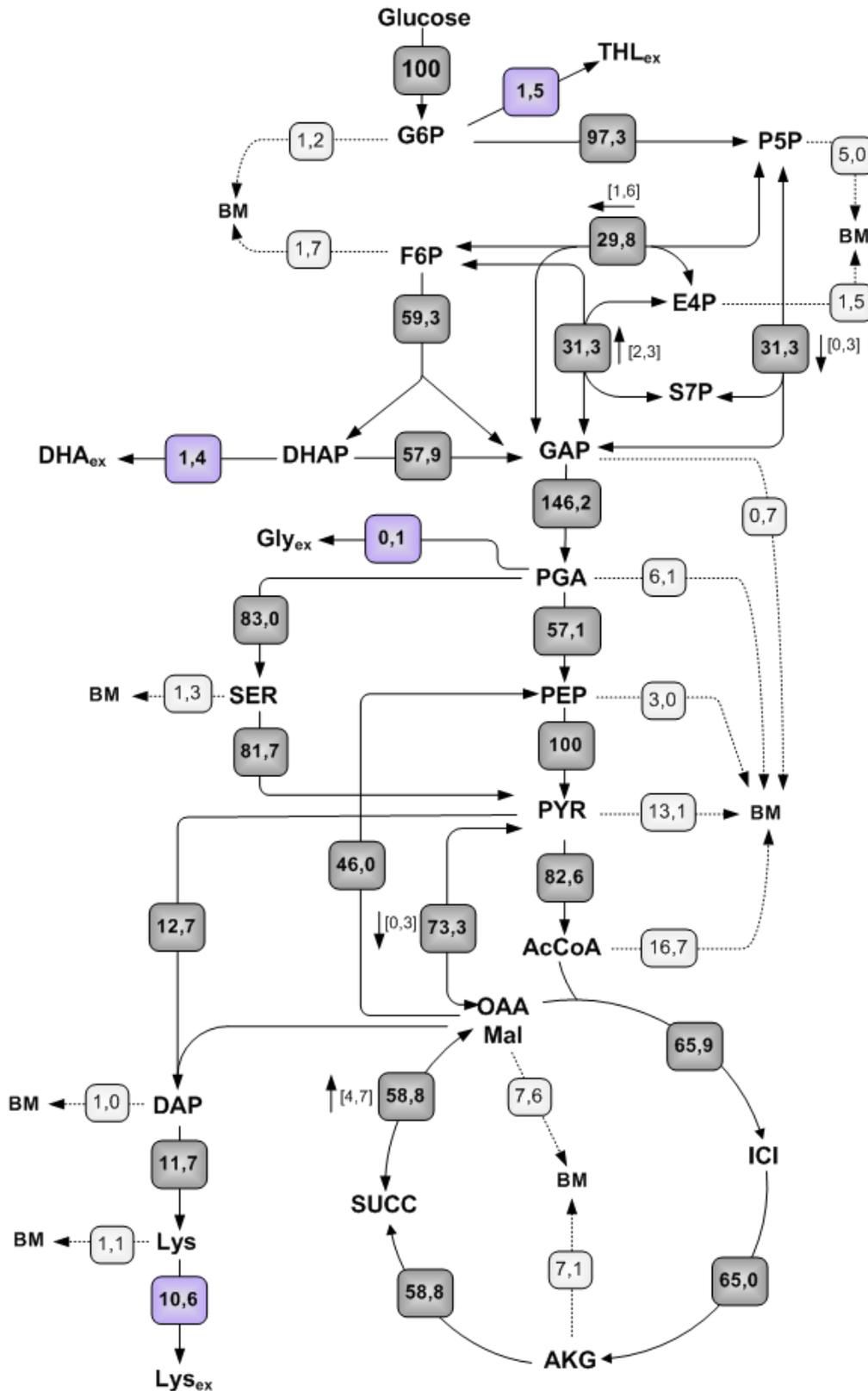
**Abb. IV-34:** Flussverteilung in *C. glutamicum lysC<sup>fbr</sup>* bei Wachstum auf CG 12 ½-Minimalmedium mit 99% [1-<sup>13</sup>C]-Glucose im Schüttelkolben. Die prozentualen molaren Flüsse wurden auf die spezifische Glucoseaufnahme ( $q_s = 5,14$  mmol/g/h) normiert, die als 100 % gesetzt wurde. Für reversible Reaktionen ist in Klammern die Reversibilität und durch einen Pfeil die Richtung der Nettoreaktion angegeben.



**Abb. IV-35:** Flussverteilung in *C. glutamicum lysC<sup>br</sup> Δpyk* bei Wachstum auf CG 12 1/2-Minimalmedium mit 99% [1-<sup>13</sup>C]-Glucose im Schüttelkolben. Die prozentualen molaren Flüsse wurden auf die spezifische Glucoseaufnahme ( $q_s = 4,5$  mmol/g/h) normiert, die als 100 % gesetzt wurde. Für reversible Reaktionen ist in Klammern die Reversibilität und durch einen Pfeil die Richtung der Nettoreaktion angegeben.



**Abb. IV-36:** Flussverteilung in *C. glutamicum lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpck* bei Wachstum auf CG 12 1/2-Minimalmedium mit 99% [1-<sup>13</sup>C]-Glucose im Schüttelkolben. Die prozentualen molaren Flüsse wurden auf die spezifische Glucoseaufnahme rate ( $q_s = 4,8$  mmol/g/h) normiert, die als 100 % gesetzt wurde. Für reversible Reaktionen ist in Klammern die Reversibilität und durch einen Pfeil die Richtung der Nettoreaktion angegeben.

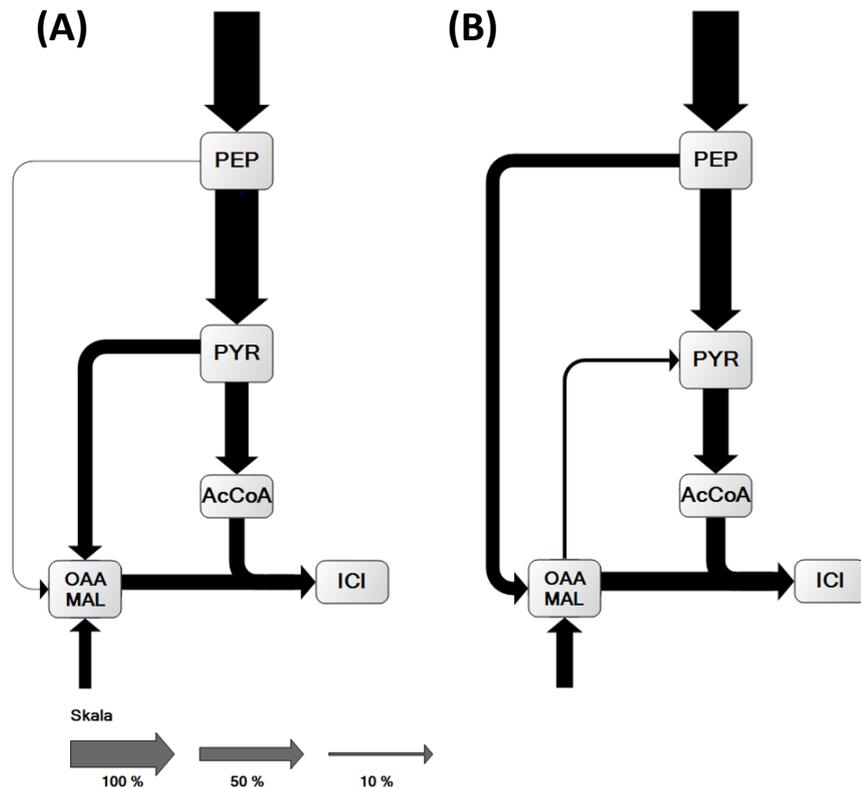


**Abb. IV-37:** Flussverteilung in *C. glutamicum lysC<sup>br</sup> ΔpykΔppcΔpgi* bei Wachstum auf CG 12 1/2-Minimalmedium mit 99% [1,2-<sup>13</sup>C]-Glucose im Schüttelkolben. Die prozentualen molaren Flüsse wurden auf die spezifische Glucoseaufnahme rate ( $q_s = 2,82 \text{ mmol/g/h}$ ) normiert, die als 100 % gesetzt wurde. Für reversible Reaktionen ist in Klammern die Reversibilität und durch einen Pfeil die Richtung der Nettoreaktion angegeben.

### ***Kompensation des Pyruvat-Kinase Knockouts***

Aufgrund der Deletion der Pyruvat-Kinase in  $lysC^{fbr} \Delta pyk$  wurden PEP und Pyruvat als getrennte Pools betrachtet. Die direkte Antwort auf die Deletion dieses Enzyms war aufgrund der gekoppelten Umwandlung von PEP zu Pyruvat an die Glucoseaufnahme eine Limitierung des Flusses von PEP zu Pyruvat auf 100 %. In  $lysC^{fbr}$  mussten PEP und Pyruvat, wie bereits beschrieben, als gemeinsamer Pool betrachtet werden. Da die intrazellulären Flussverteilungen dieses Stammes sehr gut mit denen von Becker et. al (2008) übereinstimmten und in dieser Arbeit eine Aufschlüsselung der Enzymreaktionen zwischen den C<sub>3</sub>-Körpern PEP und Pyruvat und dem OAA/Malat-Pool möglich war, wurden diese Werte für die vorliegende Arbeit herangezogen. Im Gegensatz zu  $lysC^{fbr} \Delta pyk$  betrug der direkte Fluss von PEP zu Pyruvat bei Becker et. al (2008) in  $lysC^{fbr}$  137,6 %. Obwohl in  $lysC^{fbr}$  sowohl Pyruvat- als auch PEP-Carboxylase aktiv waren, konnte die Pyruvat-Carboxylase als Hauptenzym zur anaplerotischen Versorgung des TCA-Zyklus identifiziert werden. Netto flossen hier 31,1 % des Kohlenstoffes über Pyruvat und lediglich 2,3 % über PEP in den OAA/Malat-Pool.

In  $lysC^{fbr} \Delta pyk$  war es in der vorliegenden Arbeit möglich, die Nettoreaktionen zwischen PEP bzw. Pyruvat und dem OAA/Malat-Pool zu bestimmen. Hier zeigte sich, dass es aufgrund der Deletion der Pyruvat-Kinase zu signifikanten Änderungen im relativen Beitrag von Pyruvat-Carboxylase und PEP-Carboxylase zur anaplerotischen Carboxylierung gekommen war. Netto war ein Rückfluss von 12 % vom OAA/Malat-Pool in den Pyruvat-Pool zu verzeichnen. Die Pyruvat-Carboxylase trug also nicht zum Auffüllen des TCA-Zyklus bei. Stattdessen konnte ein Nettofluss von 43 % von PEP zum OAA/Malat-Pool berechnet werden. Diese Werte sind mit den von Becker et. al (2008) angegebenen Flüssen in  $lysC^{fbr} \Delta pyk$  nahezu identisch. Insgesamt war der anaplerotische Nettofluss in beiden Stämmen gleich hoch. Jedoch führte die Deletion der Pyruvat-Kinase zu einer Verlagerung der anaplerotischen Reaktionen weg von der Pyruvat- hin zur PEP-Carboxylierung. Gleichzeitig wurde so eine Umlenkung des Kohlenstoffflusses von PEP über OAA und Malat hin zu Pyruvat, mit Beteiligung der PEP-Carboxylase, der Malat-Dehydrogenase sowie dem Malatenzym erzeugt. Abbildung IV-38 gibt einer Übersicht über die Verteilung der Nettokohlenstoffflüsse am Pyruvat-Knoten von *C. glutamicum*  $lysC^{fbr}$  (aus Becker et. al (2008)) und  $lysC^{fbr} \Delta pyk$ . Die Flusswerte entsprechen der Breite der jeweiligen Pfeile.



**Abb. IV-38:** Verteilung der Nettokohlenstoffflüsse am Pyruvat-Knoten von *C. glutamicum lysC<sup>fbr</sup>* (A) und *lysC<sup>fbr</sup> Δpyk* (B) bei Wachstum auf CG 12 ½ - Minimalmedium mit Glucose. Die Flusswerte entsprechen der Breite der jeweiligen Pfeile (vgl. Skala).

Die Umwandlung von OAA zu Malat in *lysC<sup>fbr</sup> Δpyk* entspricht der umgekehrten Richtung des TCA-Zyklus, in dem normalerweise Malat zu OAA wird. Folglich muss *in vivo* eine reversible Umwandlung dieser beiden Metabolite möglich sein. *In vitro* Studien konnten bereits eine gegenseitige Umwandlung dieser beiden Metabolite durch die cytoplasmatische Malat-Dehydrogenase und die membrangebundene Malat-Quinone-Oxidoreduktase (MQO) zeigen (Molenaar et al., 2000).

Auf diese Weise konnte in *lysC<sup>fbr</sup> Δpyk* eine ausreichende Versorgung mit Pyruvat ermöglicht und ein hoher Fluss durch die Pyruvat-Dehydrogenase und den TCA-Zyklus gewährleistet werden. Der Fluss durch den TCA-Zyklus war in *lysC<sup>fbr</sup>* und *lysC<sup>fbr</sup> Δpyk* somit fast identisch. Das Verzweigungsverhältnis zwischen Glykolyse und PPP zeigte nur geringfügige Änderungen mit einem etwas niedrigeren PPP von 44,46 % in *lysC<sup>fbr</sup> Δpyk* im Vergleich zu 50,4% in *lysC<sup>fbr</sup>* und hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die Gesamtphysiologie. Die flexible Nutzung der anaplerotischen Enzyme ermöglichte somit eine lokale Umlenkung des Kohlenstoffflusses, wodurch die Deletion der Pyruvat-Kinase kompensiert werden konnte.

Die Sekretion von DHA wies jedoch, wie oben erwähnt, auf einen glykolytischen Rückstau unterhalb des Glycerinaldehyd-3-Phosphats hin. Als Ursache könnte eine limitierende Aktivität der Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase in Frage kommen, welche durch ein erhöhtes Verhältnis von NADH zu  $\text{NAD}^+$  negativ beeinflusst wird (Dominguez et al., 1998). Der Fluss durch dieses Enzym war in *C. glutamicum lysC<sup>fbr</sup>Δpyk* im Vergleich zu *lysC<sup>fbr</sup>* etwas geringer, so dass diese Möglichkeit in Betracht kommen könnte. Ebenso könnte die PEP-Carboxylase, welche, wie Becker et. al (2008) zeigten, in *lysC<sup>fbr</sup>Δpyk* einen 2,5-mal höheren Fluss als in *lysC<sup>fbr</sup>* katalysiert, ihre maximale Kapazität unter diesen Bedingungen erreicht haben. In diesem Zusammenhang könnte die gesteigerte Produktion von Lysin in manchen *C. glutamicum* Stämmen mit deletierter Pyruvat-Kinase erklärt werden. Diese besaßen zusätzlich eine Feedback-resistente PEP-Carboxylase (Shiio I, 1987). Eine Limitierung durch das Malatenzym könnte gleichfalls vorliegen.

#### **Konsequenzen des PEP-Carboxylase Knockouts**

Durch die zusätzliche Deletion der PEP-Carboxylase waren die Verlagerung der anaplerotischen Carboxylierung von PEP zu OAA sowie die Aktivierung der für *lysC<sup>fbr</sup>Δpyk* beschriebenen Umleitung des Kohlenstoffflusses nicht mehr möglich. Als einziges anaplerotisches Enzym blieb somit die Pyruvat-Carboxylase, die allerdings in diesem Stammhintergrund offensichtlich nicht oder nicht ausreichend aktiv war, um den Verlust der PEP-Carboxylase zu kompensieren. *B. subtilis* besitzt als einziges anaplerotisches Enzym ebenfalls die Pyruvat-Carboxylase (Diesterhaft und Freese, 1973), weshalb auch hier bei Deletion der Pyruvat-Kinase die beschriebene Flussumleitung nicht möglich ist. Die Deletion der Pyruvat-Kinase führte daher in *B. subtilis* zu stark verringerten Wachstumsraten (Fry et al., 2000). Zamboni et. al (2004) konnten in *B. subtilis* jedoch zeigen, dass die PEP-Carboxykinase, die normalerweise in C<sub>4</sub>-decarboxylierender Richtung arbeitet, in einem *Δpyk*-Hintergrund die C<sub>3</sub>-Carboxylierung von PEP zu OAA katalysiert und somit eine anaplerotische Funktion übernimmt. Mit einem  $\Delta G$  von  $-12,4 \text{ kJ mol}^{-1}$  wird aufgrund des thermodynamischen Gleichgewichts allerdings die C<sub>4</sub>-Decarboxylierung von OAA bevorzugt. Wahrscheinlich ermöglichte jedoch die 50-fach erhöhte intrazelluläre PEP-Konzentration in *B. subtilis Δpyk* die gleichzeitige PEP-Carboxylierung und ATP-Bildung (Fry et al., 2000; Sauer, 2004). Im Gegensatz zur PEP-Carboxykinase aus *B. subtilis* oder *E. coli* ist das Enzym von *C. glutamicum* nicht ATP-, sondern GTP-abhängig und ähnelt daher eher eukaryotischen PEP-Carboxykinasen (Riedel et al., 2001), für die aber ebenfalls eine duale gluconeogenetische und anaplerotische Rolle beschrieben wurde (Schobert und Bowien,

1984). Da die Mutante *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppc* nicht dazu in der Lage war auf CG 12 ½ - Minimalmedium zu wachsen, ist eine solche duale Rolle der PEP-Carboxykinase in *C. glutamicum* jedoch auszuschließen. Die Enzymreaktion ist folglich nicht reversibel.

Die Doppelknockoutmutante *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppc* musste also eine stark erhöhte intrazelluläre PEP-Konzentration aufweisen. Mit dieser ging ein Mangel an Pyruvat zur OAA-Synthese durch die Pyruvat-Carboxylase sowie zur Acetyl-CoA-Bildung durch die Pyruvat-Dehydrogenase einher. Folglich war ein Aufrechterhalten des TCA-Zyklus nicht mehr möglich und damit einhergehend das Wachstum dieses Stammes auf Minimalmedium ausgeschlossen.

### **Konsequenzen des PEP-Carboxykinase-Knockouts**

Die PEP-Carboxykinase katalysiert den Rückfluss von OAA zu PEP unter Verbrauch von GTP und arbeitet somit in umgekehrter Richtung zur anaplerotischen PEP-Carboxylase. Trotz ihrer hauptsächlich gluconeogenetischen Funktion konnte eine PEP-Carboxykinase-Aktivität auch auf nicht-gluconeogenetischen Substraten wie Glucose nachgewiesen werden. Somit sind C<sub>3</sub>-Carboxylierung von PEP und C<sub>4</sub>-Decarboxylierung von OAA gleichzeitig aktiv (Becker et al., 2008; Sauer, 2004). Die Aktivität der PEP-Carboxykinase hat einen entscheidenden Einfluss auf die Lysinproduktion. Während die Deletion dieses Enzyms in *C. glutamicum* MH20-22B die Lysinproduktion um 20 % steigerte, führte seine Überexpression zu einer signifikant reduzierten Produktivität (Riedel et al., 2001). Aufgrund der bidirektionalen Kohlenstoffflüsse zwischen PEP und OAA lässt sich die positive Wirkung der Deletion der PEP-Carboxykinase durch eine Erhöhung des Nettokohlenstoffflusses zum OAA, eine erhöhte intrazelluläre OAA-Konzentration und eine somit verbesserte Bereitstellung dieses Vorläufers für die Lysinsynthese erklären. Becker et. al (2008) konnten in *lysC<sup>fbr</sup>Δpyk* einen durch die PEP-Carboxykinase katalysierten Rückfluss von OAA in den PEP-Pool von 32,6 % nachweisen. Eine aktive PEP-Carboxykinase in *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppc* würde somit den Mangel an OAA und die Akkumulation von PEP noch weiter verschärfen.

Die Deletion der PEP-Carboxykinase in *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpck* könnte also bewirken, dass der OAA-Pool sich nicht weiter verringert und der PEP-Pool nicht noch mehr ansteigt. Dennoch entstehen je mol aufgenommener Glucose zwei mol PEP, von denen bei gleichzeitiger Deletion von Pyruvat-Kinase und der PEP-Carboxylase auf direktem Wege nur ein mol in Pyruvat umgewandelt werden können. Die hieraus folgende Akkumulation von PEP musste in der Mutante umgangen werden. Dies geschah durch die Aktivierung

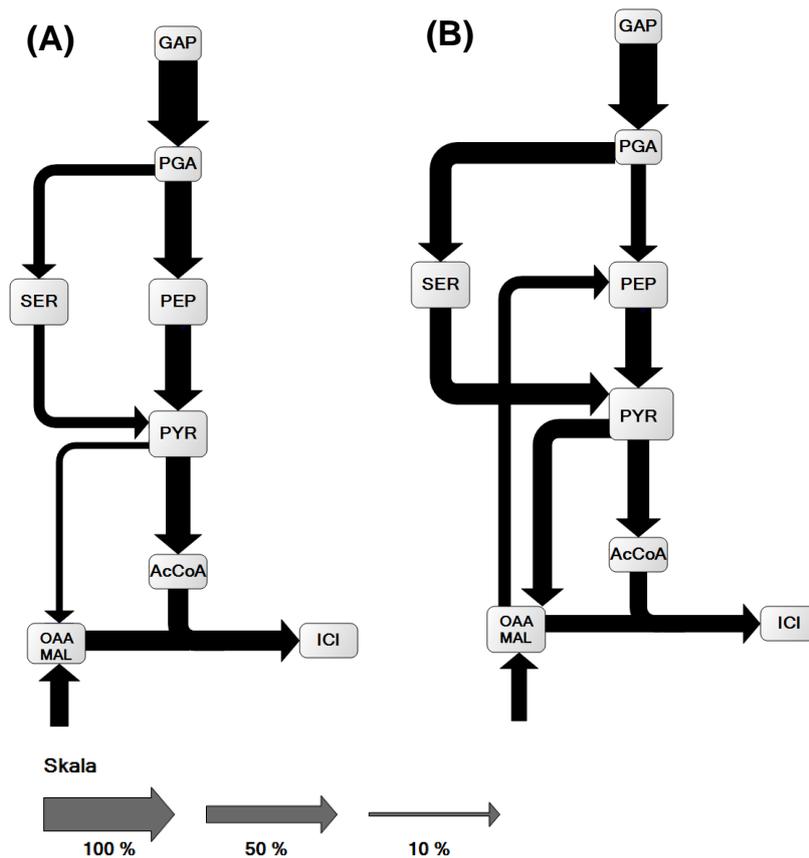
des Serinsynthese-Weges, ausgehend vom 3-Phosphoglycerat, mit anschließendem Abbau von Serin zu Pyruvat. Somit stand eine zusätzliche Pyruvat-Quelle bereit.

Gleichzeitig konnte eine Erhöhung des PPP-Flusses auf 73,3 % beobachtet werden, was im Vergleich zu *lysC<sup>fbr</sup>Δpyk* eine Steigerung um 39 % bedeutet. Der Fluss durch die Glucose-6-Phosphat-Isomerase war auf 24,4 % reduziert. Die Erhöhung des PPP-Flusses in *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpck* weist auf eine begrenzte Kapazität des Serinsynthese oder Abbauweges hin, da zusätzlich ein Teil des aufgenommenen Kohlenstoffes in Form von CO<sub>2</sub> abgegeben werden musste. In diesem Zusammenhang ist auch die verstärkte Sekretion von DHA in der Mutante zu verstehen. Durch den erhöhten PPP-Fluss war auch weniger Glucose-6-Phosphat zur Trehalose-Bildung vorhanden, was in einem geringeren Trehalose-Sekretionsfluss resultierte.

### **Konsequenzen des Glucose-6-Phosphat-Isomerase Knockouts**

In *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpgi* wurden ebenfalls der Serinsynthese-Weg und der anschließende Abbau von Serin zu Pyruvat aktiviert, um eine Akkumulation von PEP zu vermeiden und genügend Pyruvat zu bilden. Die PEP-Carboxykinase katalysierte in *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpgi* jedoch einen Rückfluss von 46 % vom OAA in den PEP-Pool. Durch eine Änderung des Verzweigungsverhältnisses am Punkt des 3-Phosphoglycerats im Vergleich zu *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpck* war es jedoch möglich, den ständigen Abzug von OAA und die zusätzliche Bildung von PEP auszugleichen. Während bei Deletion von *pck* der Fluss durch die 3-Phosphoglyceratmutase 103,1 % betrug, war dieser Fluss bei aktiver PEP-Carboxykinase auf 57,1 % reduziert. Gleichzeitig war der Fluss durch die 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase von 41,7 % auf 83 % verdoppelt. Hierdurch war auch der Fluss in den Pyruvat-Pool verdoppelt. Ausgehend von Pyruvat betrug der Fluss in den OAA/Malat-Pool 73,3 %, wodurch der Abzug von OAA durch die PEP-Carboxykinase von 46,0 % kompensiert werden konnte. Insgesamt ergab sich somit in beiden Mutanten ein annähernd gleicher Nettofluss in den OAA-Pool von 23,8 % in *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpck* und von 27,3 % in *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpgi*.

Abbildung IV-39 gibt eine Übersicht über die Verteilung der Nettokohlenstoffflüsse am Verzweigungspunkt von 3-Phosphoglycerat und am Pyruvat-Knoten der beiden Dreifach-Deletionsmutanten *C. glutamicum lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpck* und *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpgi*.



**Abb. IV-39:** Verteilung der Nettokohlenstoffflüsse am Verzweigungspunkt von 3-Phosphoglycerat (PGA) und am Pyruvat-Knoten von *C. glutamicum*  $lysC^{fbr}\Delta pyk\Delta ppc\Delta pck$  (A) und  $lysC^{fbr}\Delta pyk\Delta ppc\Delta pgi$  (B) bei Wachstum auf CG 12  $\frac{1}{2}$  - Minimalmedium mit Glucose. Die Flusswerte entsprechen der Breite der jeweiligen Pfeile (vgl. Skala).

### Gemeinsamkeiten

Die Umlenkung des Kohlenstoffflusses von 3-Phosphoglycerat über Serin zu Pyruvat sowohl in den beiden Dreifach-Mutanten als auch in der Vierfach-Deletionsmutante zeigt, dass dies eine generelle Strategie ist, um den gleichzeitigen Verlust von Pyruvat-Kinase und PEP-Carboxylase zu kompensieren. Hierbei wurde deutlich, dass der Serinsyntheseweg eine außerordentlich hohe Kapazität hat, die den Bedarf an Serin zur Proteinsynthese sowie zur Bildung von Cystein, Glycin, Tryptophan, C<sub>1</sub>-Einheiten und Phospholipiden (Netzer et al., 2004) um ein Vielfaches übersteigt. Da Serin gleichzeitig in hohem Maße zu Pyruvat abgebaut werden kann, ist es als Intermediat des Zentralstoffwechsels anzusehen. Unter bestimmten genetischen Konstitutionen leistet es einen enormen Beitrag zur Flexibilität des Zentralstoffwechsels und somit zum Wachstumspotential von *C. glutamicum*.

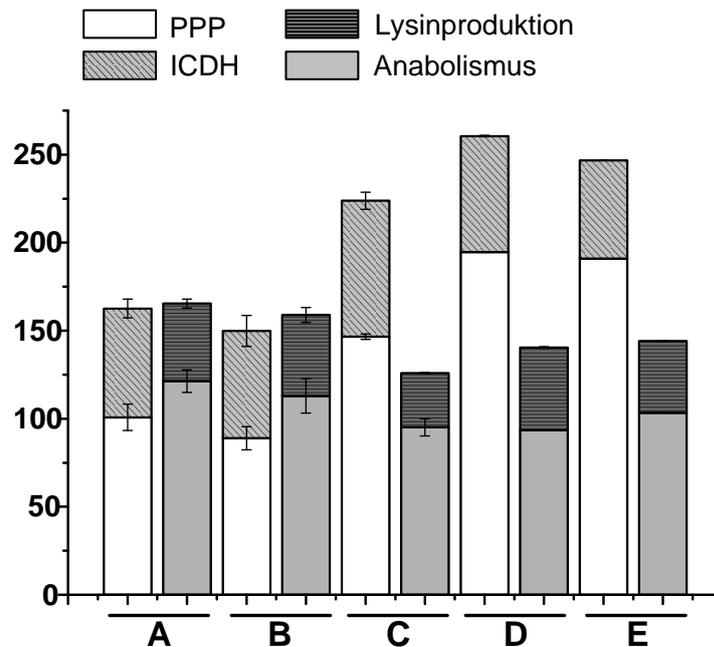
Durch die Deletion der Glucose-6-Phosphat-Isomerase in  $lysC^{fbr}\Delta pyk\Delta ppc\Delta pgi$  wurden 97,3 % der aufgenommenen Glucose über den PPP geleitet, wodurch schon im Vorhinein

ein Teil des aufgenommenen Kohlenstoffs in Form von CO<sub>2</sub> abgegeben werden konnte. Ein hoher Fluss durch den PPP konnte ebenfalls bei der Deletion der PEP-Carboxykinase verzeichnet werden und stellt somit die nächste Gemeinsamkeit zwischen den beiden Mutanten dar.

Aufgrund der unterschiedlichen Glucoseaufnahmeraten mussten in den beiden Stämmen nicht nur die relativen, sondern auch die absoluten Flüsse miteinander verglichen werden. Hierbei zeigte sich, dass die relativen Flüsse von 3-Phosphoglycerat über Serin zu Pyruvat in der *pgi*-Mutante zwar im Vergleich zur *pck*-Mutante doppelt so hoch waren. Die absoluten Flüsse wiesen mit 2,34 mmol/g/h in *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpgi* und 2 mmol/g/h in *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpck* jedoch nur geringfügige Unterschiede auf. Möglicherweise ist hiermit die maximale Kapazität dieses Weges erreicht. Daher ist eine hohe Glucoseaufnahmerate bei Deletion von Pyruvat-Kinase und PEP-Carboxylase nur möglich, wenn nicht noch ein zusätzlicher Rückfluss in den PEP-Pool vorhanden ist und gleichzeitig ein hoher Fluss durch den PPP vorliegt. Dies ist der Fall bei *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpck*. Bei niedrigen Glucoseaufnahmeraten, wie es die Deletion der Glucose-6-Phosphat-Isomerase in *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpgi* bewirkt, ist die Kapazität des Serin/Pyruvat-Wegs ausreichend, um einen Rückfluss in den PEP-Pool auszugleichen. Ein gleichzeitiger Rückfluss in den PEP-Pool zusammen mit einer hohen Glucoseaufnahmerate wäre folglich nicht möglich. Hierin könnte ein Grund liegen, weshalb die Doppelmutante *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppc* ohne zusätzliche Mutationen nicht wachsen konnte. Offensichtlich war es nicht möglich, die PEP-Carboxykinase-Aktivität zu reprimieren oder die Glucose vollständig über den PPP zu leiten und damit die Glucoseaufnahmerate entsprechend abzusenken. Die von Park et. al (1997b) beschriebene Mutante *C. glutamicum* ATCC 21253 *ΔpykΔppc* zeigte eine stark verminderte Glucoseaufnahmerate. Außerdem wurde die gesamte aufgenommene Glucose über den PPP geschleust. Dies untermauert die Vermutung, dass in diesem auf Zufallsmutagenese basierenden Stamm zusätzliche Mutationen vorlagen.

#### 4.2.2 NADPH-Bilanzen

In Abbildung IV-40 sind NADPH-Bildung und NADPH-Verbrauch der untersuchten Stämme gegenübergestellt. Für die NADPH-Bildung wurden die Reaktionen des PPP und der Isocitrat-Dehydrogenase des TCA-Zyklus herangezogen. Als NADPH-verbrauchende Reaktionen gingen die Lysinproduktion und der Anabolismus in die Berechnung ein.



**Abb. IV-40:** NADPH-Bilanzen der *C. glutamicum* Stämme *lysC<sup>fbr</sup>* (A), *lysC<sup>fbr</sup>Δpyk* (B) *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpck* (C), *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpgi* (D) und der Vierfach-Mutante *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpckΔpgi* (E). Als NADPH-bildende Reaktionen wurden die Glucose-6-Phosphat-Isomerase und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase des PPP sowie die Isocitrat-Dehydrogenase des TCA-Zyklus betrachtet; als NADPH-verbrauchende Reaktionen wurden der Anabolismus und die Lysinproduktion einbezogen.

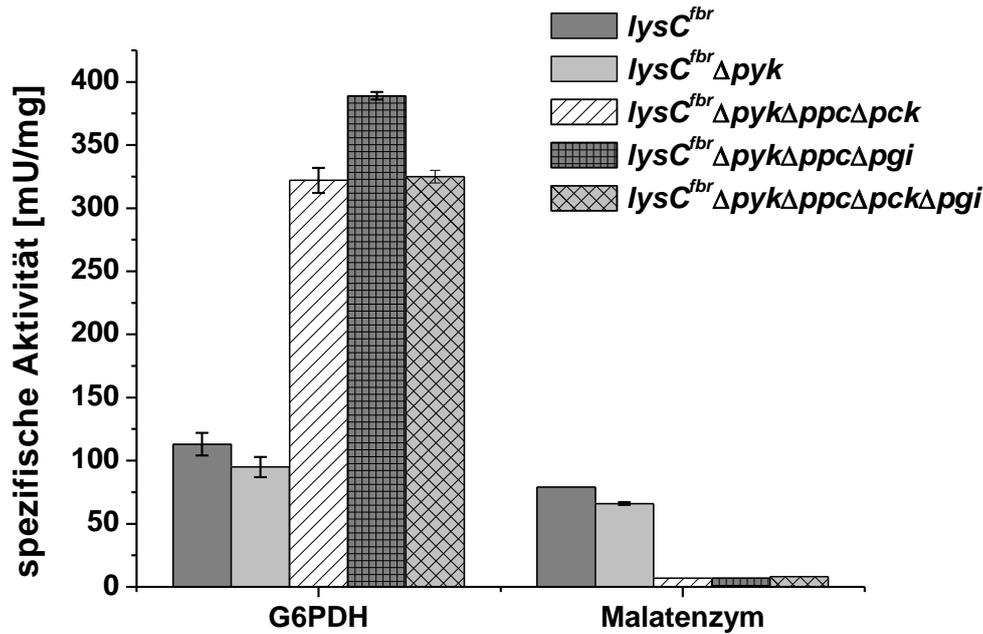
Die Berechnungen für *lysC<sup>fbr</sup>* und *lysC<sup>fbr</sup>Δpyk* ergaben eine ausgeglichene NADPH-Bilanz. In den beiden Dreifach-Deletionsmutanten war die Gesamtbereitstellung an NADPH um 44 bzw. 46 % höher als der NADPH-Verbrauch, was hauptsächlich auf den hohen Fluss durch den PPP in diesen Stämmen zurückzuführen war. Dieser apparente Überschuss an NADPH, der auch in der Vierfach-Deletionsmutante vorlag, musste durch zusätzliche Reaktionen ausgeglichen werden. Hierfür kommen prinzipiell die NADH-Dehydrogenase II der Atmungskette oder das Malatenzym, welches dann in Pyruvat-carboxylierender Richtung arbeiten müsste, in Frage.

Trotz des hohen NADPH-Überschusses war die Lysinproduktion in *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpck* von allen untersuchten Stämmen am niedrigsten, was vor allem auf den hohen Fluss in den

TCA-Zyklus von 77,2 % in dieser Mutante zurückzuführen war. Zusammen mit dem hohen Fluss in den PPP war demnach trotz der hohen Glucoseaufnahme dieses Stammes auch ein geringere Biomassebildung zu verzeichnen, da ein großer Teil des Kohlenstoffs in Form von CO<sub>2</sub> verloren ging.

#### 4.2.3 Spezifische Aktivitäten der Glucose-6-Phosphat Deyhydrogenase und des Malatenzyms

In beiden Dreifach-Mutanten konnte eine Korrelation zwischen einem erhöhten relativen Fluss in den PPP und einer erhöhten spezifischen Aktivität der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und somit einer gesteigerten Expression dieses Enzyms festgestellt werden. Im Vergleich zur *lysC<sup>fbr</sup>* mit einer spezifischen Aktivität von 113 mU/mg war diese in *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpck* auf 322 mU/mg und in *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpgi* auf 389 mU/mg erhöht (Abbildung IV-41). Gleichzeitig war in beiden Stämmen der relative Fluss in den PPP um 31% bzw. 48 % gegenüber *lysC<sup>fbr</sup>* erhöht. Betrachtet man allerdings die absoluten Flüsse durch den PPP mit 58,3 nmol/mg/min in *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpck* und 45,6 nmol/mg/min in *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpgi*, zeigte sich, dass in diesen beiden Mutanten theoretisch ein 5,5- bzw 8,5-fach höherer Fluss aufgrund der Expression der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase möglich wäre. Wie schon in der Vierfach-Deletionsmutante wurde der Fluss durch den PPP nicht durch eine unzureichende Expression, sondern durch eine Feedback-Inhibition der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase durch NADPH, von welchem in allen drei Stämmen ein apparenter Überschuss vorlag, limitiert. Da die Glucose-6-Phosphat-Isomerase in *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpck* nicht deletiert war, konnte ein Teil der Glucose auch direkt in die Glykolyse fließen, weshalb dieser Stamm dennoch eine hohe Glucoseaufnahme aufwies. Bei Deletion von *pgi* war dies nicht möglich.



**Abb. IV-41:** Spezifische Aktivität der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und des Malatenzyms [mU/mg] der Stämme *lysC<sup>fbr</sup>*, *lysC<sup>fbr</sup> Δpyk*, *lysC<sup>fbr</sup> ΔpykΔppcΔpck*, *lysC<sup>fbr</sup> ΔpykΔppcΔpgi* und der Vierfach-Mutante *lysC<sup>fbr</sup> ΔpykΔppcΔpckΔpgi*. Gezeigt sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

In den beiden Stämmen *lysC<sup>fbr</sup>* und *lysC<sup>fbr</sup> Δpyk* konnte eine spezifische Aktivität des Malatenzyms von 79 bzw. 66 mU/mg gemessen werden (Abbildung IV-39). Somit ist in beiden Stämmen neben dem PPP und der Isocitrat-Dehydrogenase eine zusätzliche NADPH-Quelle vorhanden. Außerdem ist die Aktivität des Malatenzyms für die oben beschriebene Kohlenstoffumleitung in *lysC<sup>fbr</sup> Δpyk* zur Bereitstellung von Pyruvat notwendig. In den beiden Dreifachmutanten konnte jedoch keine Aktivität des Malatenzyms nachgewiesen werden. Daher konnte sowohl dessen Beitrag zur NADPH-Bildung als auch zur NADPH-Reoxidation ausgeschlossen werden. Gleiches wurde bereits in der Vierfach-Deletionsmutante beobachtet. Eine zusätzliche NADPH-Quelle ist hier aufgrund des bereits vorhandenen apparenten Überschusses an NADPH nicht notwendig. Insgesamt besitzt *C. glutamicum* eine außerordentliche Kapazität zur Oxidation von NADPH. Ob dies tatsächlich durch die Atmungskette erfolgt, bedarf einer weiteren Überprüfung.

Insgesamt konnte in diesem Teil der Arbeit gezeigt werden, dass Einzeldelationen zur Beschreibung des gesamten Potentials eines Organismus nicht ausreichen. Ebenso können auch Doppelknockouts nur eine begrenzte Aussagekraft haben. Dies macht das Beispiel der Mutante *lysC<sup>fb</sup>ΔpykΔppc* deutlich, bei der man davon ausgehen könnte, dass eine gleichzeitige Deletion der Pyruvat-Kinase und der PEP-Carboxylase zu einem Wachstumsdefizit von *C. glutamicum* auf Minimalmedium führt. Die zusätzliche Deletion der Glucose-6-Phosphat-Isomerase bzw. der PEP-Carboxykinase in den beiden Dreifach-Mutanten führte jedoch die Aktivierung der Umleitung des Kohlenstoffflusses über den Serinsynthese-Weg zu Pyruvat, was dann das Wachstum ermöglichte. Serin kann also unter bestimmten Voraussetzungen als Intermediat des Zentralstoffwechsels angesehen werden, was ein weiteres Beispiel für die hohe Flexibilität und Robustheit des metabolischen Netzwerks von *C. glutamicum* ist. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die metabolische Flussanalyse eine leistungsfähige Methode zur quantitativen Untersuchung der Auswirkungen genetischer Modifikationen auf die intrazellulären Flussverteilungen ist. Mit ihrer Hilfe waren wertvolle Hinweise auf Reaktionen zu erlangen, die unter normalen Bedingungen nicht aktiv sind, wie der Fluss von Serin zu Pyruvat. Dies kann der Fall sein, wenn simulierte und gemessene Massenisotopomerverteilungen nicht angepasst werden können, da das Netzwerk unberücksichtigte Reaktionen enthält.

## **5. Analysen zur Verwertung von Thiosulfat als potentielle Schwefelquelle zur Methioninproduktion mit *Corynebacterium glutamicum***

In diesem Teilbereich der Arbeit wurde die Verwertung von Thiosulfat als potentielle Schwefelquelle für einen zukünftigen Methioninproduktionsprozess näher untersucht. Die Assimilation der konventionellen Schwefelquelle Sulfat ist mit dem Verbrauch von 2 ATP und 4 NADPH verbunden. *In silico* Studien von Krömer et. al (2006b) zeigten, dass besonders der hohe Bedarf an Reduktionsäquivalenten von entscheidender Bedeutung für die biotechnologische Produktion für Methionin sein wird. Je eingespartes NADPH ist ein Ausbeutezuwachs von 4,6 % zu erwarten, weshalb die Methioninausbeute stark vom Reduktionsgrad der verwendeten Schwefelquelle abhängen wird. Eine interessante Alternative zu Sulfat stellt dabei Thiosulfat dar. Elementarmodenanalysen ergaben, dass der Einsatz dieser Schwefelquelle die theoretisch maximale Methioninausbeute von 49,3 % auf 60,8 % steigert (Krömer et al., 2006b). Zur Verwertung von Thiosulfat wurde in dem Modell zur Elementarmodenanalyse eine Thiosulfat-Reduktase-Reaktion (Le Faou et al., 1990) angenommen, welche die Spaltung von Thiosulfat in Sulfit und Sulfid katalysiert und so den Gesamtbedarf an NADPH zur Methioninsynthese um 31 % verringert (Krömer et al., 2006b). Da jedoch der tatsächliche Ablauf der Verwertung von Thiosulfat in *C. glutamicum* bislang nicht geklärt ist, bestand ein Ziel dieser Arbeit darin, Erkenntnisse über die Nutzung dieser alternativen Schwefelquelle zu erlangen.

### **5.1 Beteiligung der Enzyme der assimilatorischen Sulfatreduktion an der Verwertung von Thiosulfat**

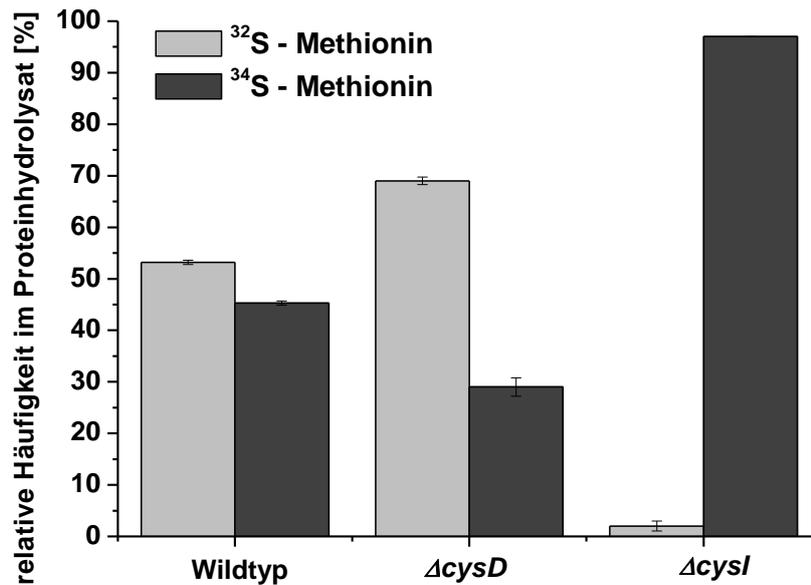
Wie bereits frühere Studien zeigten (Krömer, 2006), ist *C. glutamicum* zum Wachstum auf Thiosulfat als alleiniger Schwefelquelle fähig. Allerdings war die Wachstumsrate des Wildtyps auf Thiosulfat mit  $0,31 \text{ h}^{-1}$  niedriger im Vergleich zum Wachstum auf Sulfat mit  $0,44 \text{ h}^{-1}$ . Die Unterschiede im Wachstum könnten auf einem weniger effizienten Transport oder einer schlechteren enzymatischen Umsetzung von Thiosulfat basieren.

Um zunächst herauszufinden, inwiefern es eine Beteiligung der Enzyme der Sulfat-Assimilation bei der Verwertung von Thiosulfat gibt, wurden zwei Mutanten von *C. glutamicum* erzeugt, bei denen jeweils ein Gen des Sulfat-Operons deletiert war. Hierbei handelte es sich zum einen um die Deletion der Sulfat-Adenylyltransferase Untereinheit II, kodiert durch *cysD*, und zum anderen um die Deletion der Sulfit-Reduktase, kodiert durch *cysI*. Die Deletion von *cysD* verhindert die Sulfat-Reduktion, während die Deletion von

*cysI* dazu führt, dass Sulfit nicht weiter reduziert werden kann. Der genetische Nachweis der Deletionen erfolgte mittels PCR. Die Knockoutbande von *cysD* hatte eine Größe von 934 bp und die Wildtypbande als Kontrolle eine Größe von 1115 bp (Primerpaar: VS001/VS0004). Die Knockoutbande von *cysI* hatte eine Größe von 1283 bp und die Wildtypbande als Kontrolle eine Größe von 1686 bp (Primerpaar: HS1172/HS1173). Beide Stämme waren nicht mehr in der Lage, auf CG 12 ½ - Minimalmedium mit Sulfat als Schwefelquelle zu wachsen, wodurch auch der phänotypische Nachweis der Deletionen erbracht war.

Die Kultivierungen im Schüttelkolben auf CG 12 ½ - Minimalmedium mit Thiosulfat als einziger Schwefelquelle zeigten deutliche Unterschiede zwischen den beiden Stämmen. Während die Deletion von *cysD* einen leicht positiven Einfluss auf das Wachstum auf Thiosulfat hatte ( $\mu = 0,37 \text{ h}^{-1}$ ), war das Wachstum der  $\Delta\textit{cysI}$ -Mutante drastisch reduziert ( $\mu = 0,1 \text{ h}^{-1}$ ). Dies spricht dafür, dass die Sulfit-Reduktase eine Rolle bei der Thiosulfat-Verwertung in *C. glutamicum* spielt, was näher spezifiziert werden sollte. Auch Rückert et. al (2005) stellten diese Vermutung auf. In deren Arbeit war die  $\Delta\textit{cysI}$ -Mutante jedoch nicht zum Wachstum auf Thiosulfat fähig und das Wachstum der  $\Delta\textit{cysD}$ -Mutante war im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert. Allerdings wurde das Wachstum in dieser Arbeit nur qualitativ auf Minimalmedium-Platten nach einer Inkubation von 48 Stunden beurteilt, wodurch sich diese Unterschiede möglicherweise erklären lassen.

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, auf welcher Oxidationsstufe die beiden Schwefelatome des Thiosulfats in den Stoffwechsel eingeschleust werden. Hierzu wurden der Wildtyp sowie die beiden Mutanten  $\Delta\textit{cysD}$  und  $\Delta\textit{cysI}$  mit Thiosulfat, dessen äußeres Sulfan-Schwefelatom  $^{34}\text{S}$ -markiert war, kultiviert. Die Zellen wurden in der späten exponentiellen Wachstumsphase geerntet, die Biomasse hydrolysiert und das Markierungsmuster von Methionin mittels GC/MS gemessen. Das Verhältnis von  $^{34}\text{S}$ - zu  $^{32}\text{S}$ -markierter Aminosäure lässt Rückschlüsse zu, in welchem Maße das äußere, stärker reduzierte Sulfan- und das innere Sulfonat-Schwefelatom zur Methioninsynthese genutzt werden. Die Kultivierungen wurden mit frisch hergestellter, sterilfiltrierter Thiosulfatlösung durchgeführt. Die Schwefelkonzentration im Medium betrug 1,21 g/l. Abbildung IV-42 zeigt das Markierungsmuster von Methionin von *C. glutamicum* Wildtyp,  $\Delta\textit{cysD}$  und  $\Delta\textit{cysI}$  mit  $^{34}\text{S}$ -Thiosulfat.

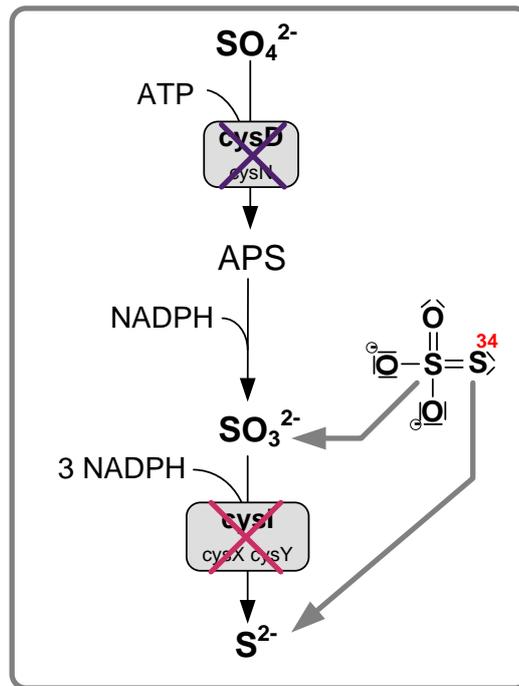


**Abb. IV-42:** Markierungsverteilung in Methionin im Proteinhydrolysat nach Kultivierung von *C. glutamicum* Wildtyp,  $\Delta cysD$  und  $\Delta cysI$  auf CG 12  $\frac{1}{2}$  - Minimalmedium mit am Sulfanschwefel  $^{34}\text{S}$ -markiertem Thiosulfat als alleiniger Schwefelquelle. Die Schwefelkonzentration im Medium betrug 1,21 g/l.

Die Markierungsverteilungen im Methionin zeigten fundamentale Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den beiden Mutanten. Im Wildtyp wurden beide Schwefelatome etwa zu gleichen Teilen genutzt, wobei der Anteil des  $^{34}\text{S}$ -Schwefel mit rund 45 % etwas niedriger war. Der Einbau der beiden Schwefelatome im Wildtyp lässt jedoch keine Rückschlüsse zu, in welcher Oxidationsstufe sie in den Stoffwechsel gelangten. Die  $\Delta cysD$ -Mutante nutzte zu rund 70 % das innere, nicht markierte Schwefelatom und nur zu 23 % das äußere, markierte Sulfanschwefelatom. Es stellte sich daher die Frage nach dem Verbleib des restlichen Sulfanschwefels, da dieser im Thiosulfat stärker reduziert ist und somit doch für die Zelle theoretisch „günstiger“ sein sollte als das andere oxidierte Schwefelatom. Eine mögliche Erklärung ist eine teilweise Oxidation des Sulfan-Schwefelatoms zu Sulfat, weshalb dieses in der  $\Delta cysD$ -Mutante nicht mehr zum Einbau in Methionin zur Verfügung stünde, da diese Sulfat nicht weiter reduzieren kann. Gleichzeitig zeigte der Einbau des  $^{32}\text{S}$ -Sulfonat-Schwefelatoms in  $\Delta cysD$ , dass dieses unterhalb der Oxidationsstufe des Sulfats in den Stoffwechsel eingeschleust wurde.

Bei Deletion der Sulfitreduktase *cysI* war nur noch die Verwertung des  $^{34}\text{S}$ -markierten Sulfan-Schwefels zur Methioninsynthese möglich. Da diese Mutante Sulfit nicht mehr reduzieren kann, muss dieses Schwefelatom auf der Oxidationsstufe des Sulfids in den Stoffwechsel fließen. Der Sulfonat-Schwefel hingegen, muss durch die Sulfitreduktase reduziert werden und steht somit nicht mehr zur Verfügung. In der  $\Delta cysI$ -Mutante musste

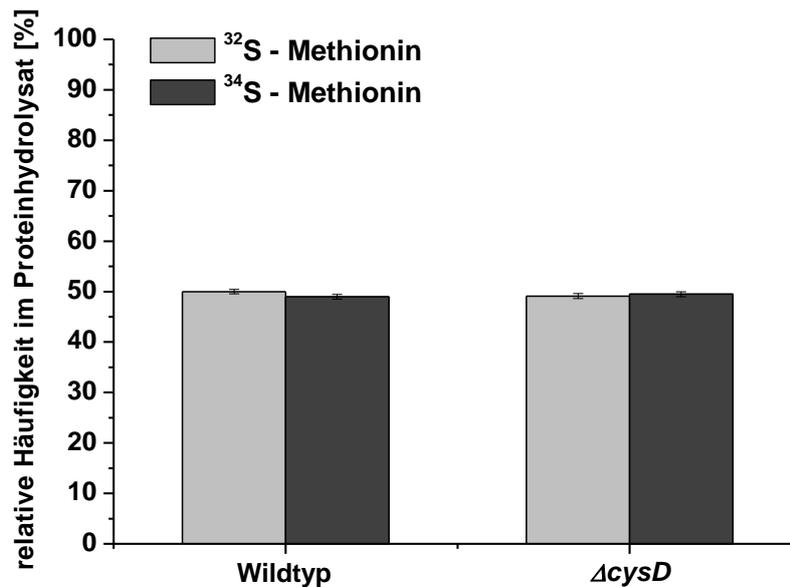
daher eine erhöhte intrazelluläre Konzentration an Schwefelverbindungen vorliegen, die womöglich das Wachstum dieser Mutante beeinträchtigte. Die Markierungsexperimente legten nahe, dass die Sulfitreduktase Thiosulfat nicht direkt verwertet, sondern das Sulfonat-Schwefelatom reduziert. Abbildung IV-43 stellt den sich aus den Markierungsexperimenten ergebenden Eintritt der Schwefelatome des Thiosulfats in den Schwefelstoffwechsel von *C. glutamicum* dar.



**Abb. IV-43:** Schematische Darstellung zum Eintritt der Schwefelatome des Thiosulfats in den Schwefelstoffwechsel von *C. glutamicum*. (Kreuze markieren Deletionen: ● =  $\Delta cysD$ , ● =  $\Delta cysI$ )

Folglich ist davon auszugehen, dass die Nutzung von Thiosulfat tatsächlich mit einer NADPH-Ersparnis gegenüber Sulfat als Schwefelquelle verbunden ist, da eines der Schwefelatome der Zelle ohne NADPH-Verbrauch zur Verfügung steht.

Um dem Verbleib des ungenutzten Sulfanschwefels im Wildtyp und in der  $\Delta cysD$ -Mutante nachzugehen, wurden beide Stämme auf Thiosulfat mit einer Schwefelkonzentration von 0,06 g/l im Medium kultiviert. Dabei zeigten der Wildtyp und die Mutante eine gleichgute Verwertung der beiden Schwefelatome, was in Abbildung IV-44 dargestellt ist.



**Abb. IV-44:** Markierungsverteilung in Methionin im Proteinhydrolysat nach Kultivierung von *C. glutamicum* Wildtyp,  $\Delta cysD$  und  $\Delta cysI$  auf CG 12  $\frac{1}{2}$  - Minimalmedium mit am Sulfanschwefel  $^{34}\text{S}$  – markiertem Thiosulfat als alleiniger Schwefelquelle. Die Schwefelkonzentration im Medium betrug 0,06 g/l.

Die Nutzung der beiden Schwefelatome erfolgte also abhängig von der eingesetzten Thiosulfat-Konzentration. Die vorliegenden Ergebnisse werfen somit weitere Fragen auf. Die Markierungsexperimente in der  $\Delta cysD$ -Mutante ergaben, dass bei hohen Schwefelkonzentrationen ein Teil des Sulfanschwefels nicht als Sulfid vorlag, da dieser nur zu 23% genutzt wurde. Mehr als die Hälfte dieses Schwefels konnte nicht zur Aminosäuresynthese verwertet werden. Eine Möglichkeit ist, dass ein Teil des Sulfanschwefels als Sulfat, elementarer Schwefel oder in einer anderen, nicht verwertbaren Form vorlag. Die leichte Bevorzugung des  $^{32}\text{S}$ -Schwefels im Wildtyp bei hoher Schwefelkonzentration könnte darauf hindeuten, dass ein Teil des  $^{34}\text{S}$ -Sulfanschwefels tatsächlich nicht zugänglich war. Dieser Effekt zeigte sich bei einer niedrigen Schwefelkonzentration nicht. Hieraus ergibt sich die Frage, ob die unterschiedliche Nutzung der beiden Schwefelatome durch die konzentrationsabhängige Beteiligung verschiedener Enzyme an der Thiosulfatverwertung bedingt ist. Eine Oxidation von Thiosulfat zu Sulfat wird normalerweise von chemolithotrophen Schwefeloxidierern wie *Thiobacillus neapolitanus* oder *Thiobacillus versutus* zur Energiegewinnung genutzt (Kelly et al., 1997) und erscheint in *C. glutamicum* eher widersinnig.

Eine Möglichkeit, die nicht außer Betracht gelassen werden darf, ist eine teilweise Zersetzung des Thiosulfats im Verlauf der Kultivierungen. Es wird beschrieben, dass sich wässrige Thiosulfat-Lösungen beim Kochen an der Luft zersetzen. Stehenlassen der

Lösung an der Luft führt allmählich zur Zersetzung unter Abscheidung von Schwefel. Eine wässrige Natriumthiosulfat-Lösung hat nach Angaben des Merck-Index einen pH-Wert zwischen 6,5 und 8. Wird die Lösung angesäuert, so erfolgt ebenfalls eine Zersetzung, wobei am häufigsten die Bildung von Schwefeldioxid und die Abscheidung von Schwefel beschrieben sind. Untersuchungen ergaben, dass auf diesem Wege auch Polythionate gebildet werden und Sulfat als Zersetzungsprodukt resultiert, wobei hier der genaue Hergang der Reaktionen und die Benennung der Primärprodukte umstritten sind. Bei der hydrolytischen Zersetzung von Thiosulfat-Lösungen konnte die Bildung von Schwefelwasserstoff beobachtet werden; im stark sauren Milieu können auch Wasserstoffpolysulfide entstehen. In alkalischen Lösungen scheinen Thiosulfate relativ stabil zu sein; erst bei höheren Temperaturen erfolgt hier die Zersetzung zu Sulfid und Sulfit. Aus den Primärprodukten der Thiosulfat-Zersetzung können wiederum eine Vielzahl von Folgereaktionen abgeleitet werden. Hierbei werden zum Teil einzelne Zerfallsprodukte wieder aus dem Gleichgewicht entfernt und verschiedene Reaktionen werden durch die Konzentration einzelner Reaktionspartner oder eine pH-Wert-Absenkung beeinflusst. Diese Vielzahl der Möglichkeiten führt zu einer großen Komplexität des Reaktionsverhaltens (Miethe, 2003).

Das in den Experimenten verwendete Natriumthiosulfat wurde in Wasser gelöst, sterilfiltriert und vor jedem Experiment frisch angesetzt. Eine thermische Zersetzung, wie sie z.B. beim Autoklavieren auftreten könnte, war somit auszuschließen. Der pH-Wert der Lösung lag bei 6,8. Die verwendeten Lösungen zeigten weder einen sichtbaren Niederschlag, der auf die Abscheidung von Schwefel hinweisen könnte, noch einen auffälligen Geruch z.B. nach Schwefelwasserstoff. Trotzdem ergaben sich, wie oben aufgeführt, Unterschiede, wenn eine hohe Thiosulfat-Konzentration zur Kultivierung eingesetzt wurde. Eine weitere Möglichkeit der Zersetzung von Thiosulfat besteht in der Einwirkung von Schwermetallionen wie z. B.  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$ . Sie wirken auch in Spuren als Initiator von Redoxreaktionen, da sie als Radikal oder Ionenübertrager fungieren können (Miethe, 2003). Dem Kulturmedium wurden die oben genannten Ionen in der Spurensalzlösung zugesetzt, weshalb eine teilweise Zersetzung von Thiosulfat während der Kultivierung nicht auszuschließen ist. Da die Kultivierungen außerdem bei 30 °C durchgeführt wurden, könnten diese Prozesse gefördert worden sein. Aufgrund der Komplexität der im Kulturmedium möglichen Reaktionen kann ohne chemische Analyse keine genaue Aussage darüber getroffen werden, in welchem Umfang eine Zersetzung stattfindet und welche Produkte entstehen. Falls Thiosulfat im Überschuss tatsächlich

oxidiert wird, wäre dies nachteilig für eine industrielle Produktion von Methionin und bedarf einer weiteren Aufklärung, etwa durch Analysen des Kulturmediums mittels Ionenchromatographie. In den nachfolgenden Experimenten wurde Thiosulfat immer mit einer Schwefelkonzentration von 0,06 g/l im Kulturmedium eingesetzt, was unter Berücksichtigung des Schwefelgehalts von *C. glutamicum* von ca. 4 mg/g Biomasse bei Kultivierung auf CG 12 - Medium (Tzvetkov et al., 2003) nicht limitierend für das Wachstum ist.

Im Rahmen dieser Arbeit stellte sich des Weiteren die Frage, welche Enzyme die direkte Umsetzung von Thiosulfat in *C. glutamicum* katalysieren. Mögliche Kandidaten hierfür sind die Thiosulfat-Sulfurtransferase (EC 2.8.1.1) und die S-Sulfocystein-Synthase (EC 2.5.1.47). Im Folgenden wurde daher die Beteiligung dieser Enzyme näher untersucht.

## 5.2 Thiosulfat-Sulfurtransferase

Die Thiosulfat-Sulfurtransferase, auch bekannt als Rhodanese, katalysiert den Transfer des Sulfan-Schwefelatoms von Thiosulfat auf Cyanid. In Abwesenheit von Cyanid können auch andere thiophile Verbindungen wie  $\alpha$ -Liponsäure oder Glutathion als Sulfan-Akzeptoren fungieren. Bei dieser Reaktion wird ein Persulfid gebildet, dessen nachfolgende Oxidation, die nicht unbedingt enzymatisch ablaufen muss, zur Freisetzung von Sulfid führt. In diesem Fall entspricht die Nettoreaktion der Thiosulfatspaltung einer Thiosulfat-Reduktase-Aktivität (Cianci et al., 2000; Le Faou et al., 1990). Eine echte Thiosulfat-Reduktase ist für *C. glutamicum* bisher nicht bekannt.



Der Mechanismus der Thiosulfat-Sulfurtransferase macht Sulfid und Sulfit verfügbar. Sulfid fließt direkt in die Synthese der schwefelhaltigen Aminosäuren ein und Sulfit nach der Reduktion durch die Sulfitreduktase. Obwohl Sulfurtransferasen in vielen verschiedenen Organismen zu finden sind, ist ihre physiologische Bedeutung weitgehend unbekannt. Möglicherweise spielen sie bei der Cyanid-Entgiftung (Vennesland et al., 1982), beim Schwefel-Metabolismus (Donadio et al., 1990) und bei der Biosynthese und Reparatur von Eisen-Schwefel-Clustern (Bonomi et al., 1985) eine Rolle. Auch *C. glutamicum* besitzt zwei Gene, die für Thiosulfat-Sulfurtransferasen kodieren. Im Folgenden wurden Kultivierungen zweier Mutanten auf Thiosulfat durchgeführt, in denen jeweils eines dieser Gene deletiert war, was in Tabelle IV-10 gezeigt ist.

**Tab. IV-10:** Spezifische Wachstumsrate  $\mu$  [ $\text{h}^{-1}$ ] der Thiosulfat-Sulfurtransferase I- und II-Deletionsmutanten im Vergleich zu *C. glutamicum* Wildtyp. Die Kultivierungen erfolgten im Schüttelkolben auf CG 12 ½ - Minimalmedium mit Thiosulfat als einziger Schwefelquelle.

Stamm	$\mu[\text{h}^{-1}]$
Wildtyp	0.31
<i>ΔthioI</i>	0.39
<i>ΔthioII</i>	0.28

Wie aus Tabelle IV-10 ersichtlich ist, führte die Deletion der Thiosulfat-Sulfurtransferase I bzw. II nicht zu einem verlangsamten Wachstum auf Thiosulfat. Es könnte sich also bei den beiden Thiosulfat-Sulfurtransferasen entweder um Isoenzyme handeln, die sich gegenseitig ersetzen, oder sie sind nicht an der Thiosulfat-Verwertung beteiligt. Der Doppelknockout beider Enzyme ist daher notwendig, um dies abschließend zu klären.

### 5.3 Cystein-/S-Sulfocystein-Synthase

*E. coli* besitzt zwei Cystein-Synthasen, CysK und CysM, die Sulfid auf O-Acetylserin übertragen und unter Abspaltung von Acetat die Bildung von Cystein katalysieren. CysM besitzt jedoch eine zusätzliche S-Sulfocystein-Synthase-Funktion, bei der Thiosulfat auf O-Acetylserin übertragen wird und unter Abspaltung von Acetat S-Sulfocystein entsteht (Claus et al., 2005; Zhao et al., 2006). Auch für *S. typhimurium* wurde bereits in früheren Arbeiten gezeigt, dass ausschließlich die S-Sulfocystein-Synthase die Verwertung von Thiosulfat ermöglicht (Nakamura et al., 1983). Die Umwandlung von S-Sulfocystein in Cystein ist in *E. coli* und *S. typhimurium* bislang nicht charakterisiert. Verschiedene Sulfonatasen könnten die Hydrolyse von S-Sulfocystein zu Cystein und Sulfat bewirken, welches dann den normalen Weg der Sulfatreduktion durchläuft (Sekowska et al., 2000). Eine weitere Möglichkeit ist die Reduktion von S-Sulfocystein zu Cystein und Sulfit mit Hilfe von Glutathion (Woodin und Segel, 1968).

Die Situation in *C. glutamicum* hingegen ist nicht eindeutig. So existiert in *C. glutamicum* wie in *E. coli* eine Cystein-Synthase CysK. In der KEGG-Datenbank ist auch eine zweite Cystein-Synthase-Sequenz mit der Gennummer *cgl2136* zu finden. Im Folgenden wurde daher das Wachstum zweier Mutanten, in denen jeweils *cysK* bzw. *cgl2136* deletiert war, auf Sulfat und Thiosulfat verglichen, um deren Rolle in *C. glutamicum* genauer zu untersuchen.

**Tab. IV-11:** Spezifische Wachstumsrate  $\mu$  [ $\text{h}^{-1}$ ] von *C. glutamicum*  $\Delta\text{cysK}$  und  $\Delta\text{cgl2136}$  im Vergleich zum Wildtyp. Die Kultivierungen erfolgten im Schüttelkolben auf CG 12 ½ - Minimalmedium auf Sulfat bzw. Thiosulfat als einziger Schwefelquelle.

Stamm	$\mu[\text{h}^{-1}]$	
	Sulfat	Thiosulfat
Wildtyp	0,40	0,32
$\Delta\text{cysK}$	0,13	kein Wachstum
$\Delta\text{cgl2136}$	0,40	0,31

Sowohl  $\Delta\text{cysK}$  als auch  $\Delta\text{cgl2136}$  waren zum Wachstum auf Sulfat fähig. Das Wachstum der  $\Delta\text{cysK}$ -Mutante war mit einer Wachstumsrate von  $\mu = 0,13 \text{ h}^{-1}$  jedoch stark beeinträchtigt. Das langsame Wachstum von  $\Delta\text{cysK}$  zeigt, dass CysK das dominierende Enzym zur Cysteinsynthese sein muss. Allerdings muss noch ein weiterer Weg zur Cysteinbildung existieren. Die  $\Delta\text{cgl2136}$ -Mutante wies die gleiche Wachstumsrate wie der Wildtyp auf Sulfat auf. Die Deletion von *cgl2136* hatte auch keinen Einfluss auf das Wachstum auf Thiosulfat, während die  $\Delta\text{cysK}$ -Mutante nicht mehr zum Wachstum auf dieser Schwefelquelle in der Lage war. Das Gen *cgl2136* in *C. glutamicum* codiert also nicht für eine S-Sulfocystein-Synthase und entspricht nicht CysM aus *E. coli* oder *S. typhimurium*. Die Tatsache, dass  $\Delta\text{cysK}$  zwar auf Sulfat langsam wachsen konnte, aber nicht auf Thiosulfat, könnte bedeuten, dass CysK neben seiner Cystein-Synthase-Funktion auch als S-Sulfocystein-Synthase wirken kann, was jedoch weiter überprüft werden muss, da dies bisher nicht beschrieben wurde (Wada et al., 2004).

### 5.4 Abbau von Methionin zu Cystein in *C. glutamicum*

Abbildung IV-45 zeigt ein Modell zur Cysteinsynthese und zum Methioninabbau in *C. glutamicum* gemäß Rückert et. al (2008).

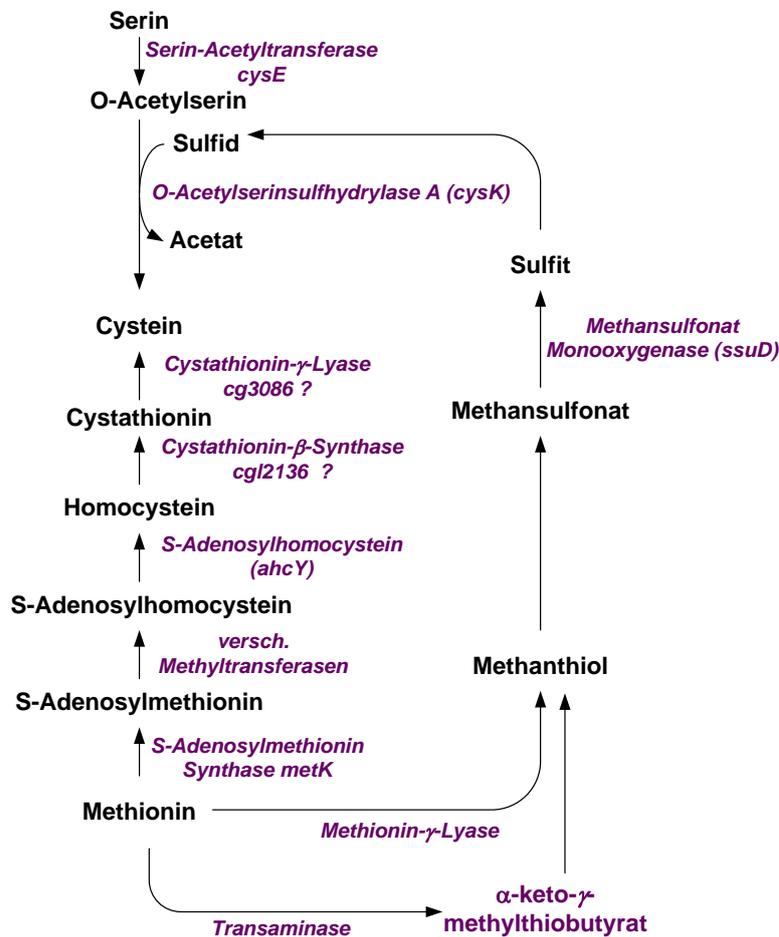
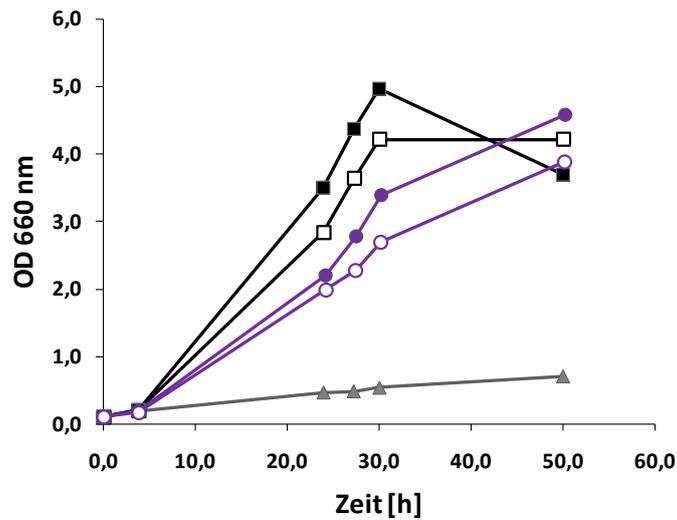


Abb. IV-45: Modell zur Cysteinsynthese und zum Methioninabbau in *C. glutamicum*.

Hier wird beschrieben, dass eine  $\Delta cysK$ -Mutante Cystein-auxotroph sei, was in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt wurde. Basierend auf Genomdaten postulieren Rückert et. al (2003) gleichzeitig die Existenz einer reversen Transsulfurierung, d.h. den Abbau von Methionin zu Cystein unter Beteiligung einer Cystathionin- $\beta$ -Synthase und einer Cystathionin- $\gamma$ -Lyase, wobei sie hier *cgl2136* die Funktion der Cystathionin- $\beta$ -Synthase zuschreiben. Wenn jedoch eine aktive Transsulfurierung vorliegt, kann eine  $\Delta cysK$ -Mutante nicht Cystein-auxotroph sein, da Cystein aus Methionin gebildet werden kann. Dies unterstützt die Beobachtung der vorliegenden Arbeit. Ebenso könnte das Wachstum der  $\Delta cysK$ -Mutante durch eine zweite Cystein-Synthase, die allerdings eine geringere

Aktivität als CysK hat, erklärt werden. Auch hierfür kommt, wie bereits beschrieben, *cgl2136* in Frage. Aus diesem Grund wurde näher untersucht, ob es sich bei *cgl2136* um eine zweite Cystein-Synthase oder um eine Cystathionin- $\beta$ -Synthase handelt. Um aufzuklären, ob *C. glutamicum* Methionin *in vivo* zu Cystein abbauen kann und ob dabei die reverse Transsulfurierung mit Beteiligung von *cgl2136* eine Rolle spielt, wurden sowohl *C. glutamicum* Wildtyp als auch die  $\Delta cgl2136$ -Mutante mit Methionin als einziger Schwefelquelle kultiviert (Abbildung IV-46).



**Abb. IV-46:** Kultivierung von *C. glutamicum* Wildtyp (■ und □) und  $\Delta cgl2136$  (● und ○) auf Methionin als einziger Schwefelquelle. Der Wildtyp wurde als Kontrolle (▲) ohne Schwefelquelle kultiviert.

Die verwendete Methionin-Lösung wurde vor der Kultivierung frisch angesetzt und sterilfiltriert, um eine Zersetzung auszuschließen. Die Kontrolle des Wildtyps ohne Schwefelquelle zeigte, wie erwartet kein Wachstum. Sowohl der Wildtyp als auch die  $\Delta cgl2136$ -Mutante konnten auf Methionin als einziger Schwefelquelle langsam wachsen, wobei sich das Wachstum von Mutante und Wildtyp nicht signifikant unterschied. Folglich besteht in *C. glutamicum* eine Möglichkeit des Abbaus von Methionin zu Cystein. Eine reverse Transsulfurierung mit Beteiligung von *cgl2136* als Cystathionin- $\beta$ -Synthase ist jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit auszuschließen. Dies steht im Einklang mit Beobachtungen von Haitani et. al (2006), welche zeigten, dass eine Deletion der Serin-Acetyltransferase *cysE* zur Cystein-Auxotrophie führt, was nicht der Fall wäre, wenn es eine aktive reverse Transsulfurierung gäbe. Die Funktion von *cg3086* als Cystathionin- $\gamma$ -Lyase erscheint daher ebenso fraglich (Abb. IV-43). Rückert et. al (2003) gaben für *cg3086* alternativ an, dass dieses Gen vormals für eine Cystathionin- $\beta$ -Lyase vom MetC-

Typ codierte, aber seine Funktion durch eine Mutation verloren hat, nachdem es durch die Cystathionin- $\beta$ -Lyase vom AecD-Typ ersetzt wurde.

Ein weiterer Weg des Methionin-Abbaus wurde durch Lee (2005) vorgeschlagen. Wie in *B. linens* (Amarita et al., 2004) könnte Methionin durch die Methionin- $\gamma$ -Lyase in Methanthiol,  $\alpha$ -Ketobutyrat und Ammonium gespalten werden. Alternativ könnten  $\alpha$ -Ketoglutarat und Methionin zunächst durch eine Transaminase zu Glutamat und  $\alpha$ -Keto- $\gamma$ -methylthiobutyrat umgewandelt werden, aus welchem anschließend auf bislang unbekannte Art ebenfalls Methanthiol und  $\alpha$ -Ketobutyrat entsteht. Über den Abbau von Methanthiol zu Sulfit liegen in *C. glutamicum* bisher jedoch keine Kenntnisse vor. Möglicherweise wird dieses wie in *P. putida* zu Methansulfonat und anschließend durch Desulfonierung zu Sulfit abgebaut (Amarita et al., 2004; Vermeij und Kertesz, 1999). Das Vorhandensein einer Methansulfonat-Monooxygenase, codiert durch *ssuD* in *C. glutamicum*, lässt einen solchen Mechanismus vermuten (Rey et al., 2003). Für den Abbau von Methionin wurde zwar eine Aktivität der Enzyme Transaminase und Methionin- $\gamma$ -Lyase beschrieben, allerdings wurden die entsprechenden Gene bislang nicht identifiziert. Der Abbau von Methansulfonat ist zudem spekulativ (Lee, 2005; Rückert, 2008). Die vorliegenden Versuche lassen die Annahme zu, dass Methionin zu Methanthiol und anschließend zu Sulfit abgebaut wird, das nach weiterer Reduktion zum Sulfid zur Cysteinsynthese genutzt werden kann.

Das Wachstum der  $\Delta$ *cysK*-Mutante auf Sulfat war daher wahrscheinlich nicht auf eine reverse Transsulfurierung zurückzuführen, sondern konnte vielmehr durch das Vorhandensein einer zweiten Cystein-Synthase-Aktivität, kodiert durch *cgl2136*, erklärt werden. Diese zweite Cysteinsynthase hat aber im Gegensatz zu *E. coli* oder *B. subtilis* keine S-Sulfocystein-Synthase-Funktion, da  $\Delta$ *cysK* auf Thiosulfat nicht wachsen konnte und da die Deletion von *cgl2136* keinen Einfluss auf die Verwertung von Thiosulfat hatte.

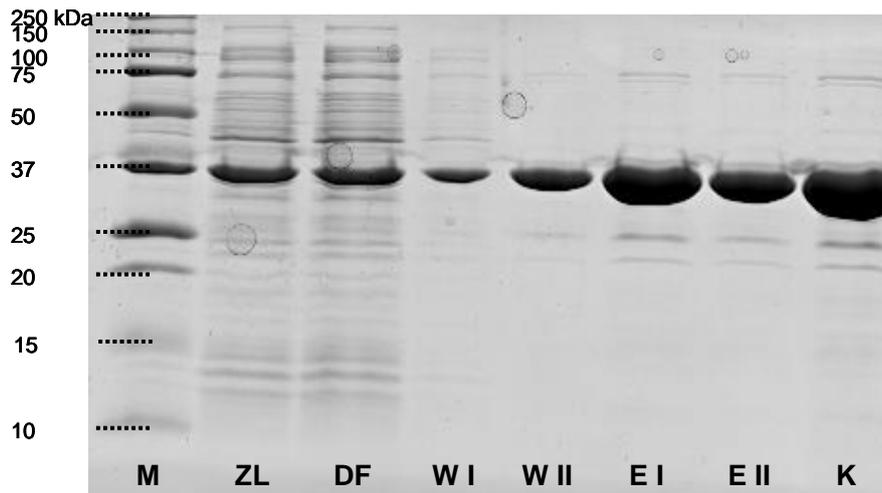
### **5.5 Aufreinigung von CysK und Cgl2136 mittels Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie**

Die im vorangehenden Abschnitt beschriebenen Wachstumsexperimente der Deletionsmutanten  $\Delta$ *cysK* und  $\Delta$ *cgl2136* legten nahe, dass CysK neben seiner Cystein-Synthase-Aktivität auch als S-Sulfocystein-Synthase fungieren kann. Dies wäre jedoch ein großer Unterschied zu den bisher untersuchten Organismen wie *E. coli* oder *S. typhimurium* und wurde auch für *C. glutamicum* bisher nicht beschrieben. Cgl2136 ist wahrscheinlich eine zweite Cystein-Synthase und keine Cystathionin- $\beta$ -Synthase, da die

Existenz einer reversen Transsulfurierung in *C. glutamicum* ausgeschlossen werden konnte. Neben den Wachstumsexperimenten mit den Deletionsmutanten wurden die beiden Enzyme überexprimiert und mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt, um die postulierten Enzymfunktionen für CysK und Cgl2136 weiter zu untermauern.

### 5.5.1 Überexpression und Aufreinigung von CysK aus *C. glutamicum* in *E. coli* XL1 Blue

Zur Untersuchung der enzymatischen Verwertung von Thiosulfat durch die Cystein-Synthase CysK aus *C. glutamicum* wurde diese heterolog in *E. coli* XL1 Blue als N-terminale 6xHistidin-Fusion exprimiert und anschließend über eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Das *cysK*-Gen wurde hierzu über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Sal*I in den Expressionsvektor pQE30 kloniert. Der pQE30-Vektor beinhaltet u.a. eine Kombination aus dem sehr starken T5-Promotor und dem *lac*-Operator, um eine Überexpression des rekombinanten Proteins in *E. coli* sicherzustellen. Die Protein-Synthese wird durch die Bindung des *lac*I-Repressors an den *lac*-Operator unterdrückt und durch Zugabe von Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Daneben erlaubt der Vektor die Markierung des heterologen Proteins mit sechs Histidin-Resten am N-terminalen Ende. Die Klonierung erfolgte extern bei der BASF SE (Ludwigshafen, Deutschland). Das Plasmid wurde in den *E. coli* Stamm XL1 Blue transformiert. Transformanten konnten aufgrund ihrer Ampicillin-Resistenz selektiert werden. *E. coli* XL1 Blue besitzt auf dem F-Plasmid die *lacI*<sup>d</sup> – Mutation, welche zu einer Überproduktion des LacI-Repressors führt. Die Kultur wurde mit einer OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft. Die Induktion mit IPTG erfolgte bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6. Nach der Induktion wurden die Zellen für weitere 4,5 Stunden inkubiert und anschließend geerntet. Dann wurden die Zellen mittels Lysozym aufgeschlossen und CysK 6xHis mittels Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen aufgereinigt. Abbildung IV-47 zeigt die Analyse der Aufreinigungsfractionen mittels SDS-PAGE.

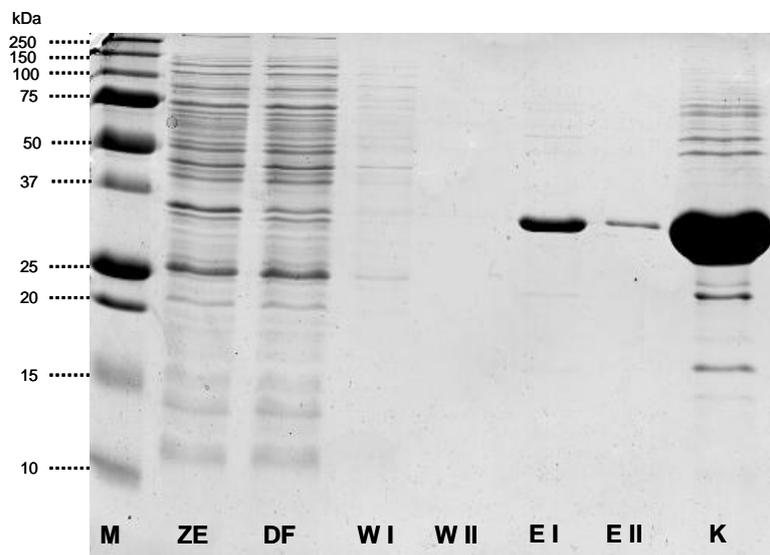


**Abb. IV-47:** Mit Coomassie Brilliant Blue gefärbtes SDS-PAGE Gel. *C. glutamicum* CysK 6xHis, aufgereinigt mittels  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen. M = Marker, ZL = Zellysate, DF = Durchflussfraktion, WI und WII = Waschfraktionen, EI und EII = Elutionsfraktionen, K = Konzentrat. Von jeder Fraktion wurden 5  $\mu\text{l}$  zusammen mit 5  $\mu\text{l}$  SDS-Probenpuffer auf das Gel aufgetragen.

Das Molekulargewicht von CysK (32518 Da, Cgl2562, <http://www.brenda-enzymes.org>) war aufgrund der im Vektor enthaltenen N-terminalen Antikörper-Bindestelle sowie der sechs Histidin-Reste etwas schwerer als das des natürlich vorkommenden Proteins. In der Durchfluss-Fraktion war die CysK-Bande genauso stark sichtbar wie im Zellysate, was bedeutet, dass hier etwa die Hälfte des Proteins verloren ging. Auch in den beiden Waschfraktionen zeigten sich deutliche Proteinverluste. Ein möglicher Grund ist eine nicht ausreichende Kapazität der Säule ( $V = 0,5 \text{ ml}$ ). In den Elutionsfraktionen und im Konzentrat war fast ausschließlich die gesuchte Protein-Bande zu finden, deren Identität als CysK mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestätigt wurde (Durchführung durch M. Lasaosa, Technische Biochemie). Die Konzentration der Proteinlösung nach dem Umpuffern und Aufkonzentrieren betrug 8,5 mg/ml. Die gereinigte Proteinlösung hatte aufgrund des gebundenen Pyridoxal-5'-Phosphates eine gelbe Farbe, wie auch in der Literatur beschrieben (Wada et al., 2004). Somit war die Anreicherung des CysK-Fusionsproteins erfolgreich.

### 5.5.2 Überexpression und Aufreinigung von Cgl2136 aus *C. glutamicum*

Die Überexpression von Cgl2136 aus *C. glutamicum* erfolgte mit Hilfe des Expressions-Plasmids H574/575 PG Psod cgl2136 6xHis in *C. glutamicum*  $\Delta$ cysK. Die Überexpression wurde homolog in *C. glutamicum* durchgeführt, da die heterologe Expression in *E. coli* nicht möglich war (mündliche Information, Hartwig Schröder, BASF SE). Der natürliche Promotor des Gens wurde durch den konstitutiven Psod-Promotor der Superoxid-Dismutase ersetzt (Becker et al., 2005). Nach Ernte der Zellen wurden diese mittels Ultraschall aufgeschlossen und Cgl2136 6xHis mittels  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen aufgereinigt. Abbildung IV-48 zeigt die Analyse der Aufreinigungsfractionen mittels SDS-PAGE.



**Abb. IV-48:** Mit Coomassie Brilliant Blue gefärbtes SDS-PAGE Gel. *C. glutamicum* Cgl2136 6xHis aufgereinigt mittels  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen. M = Marker, ZE = Zellextrakt, DF = Durchflussfraktion, WI und WII = Waschfraktionen, EI und EII = Elutionsfraktionen, K = Konzentrat. Von jeder Fraktion wurden 5  $\mu\text{l}$  zusammen mit 5  $\mu\text{l}$  SDS Probenpuffer auf das Gel aufgetragen.

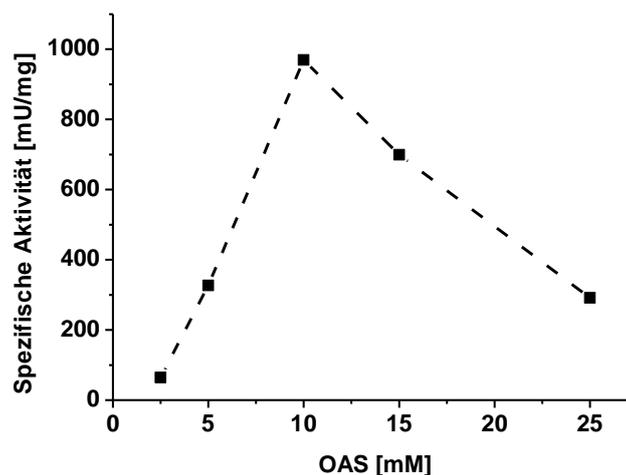
Das Molekulargewicht von Cgl2136 (34025 Da, Cgl 2136, <http://www.brenda-enzymes.org>) war aufgrund der sechs N-terminalen Histidin-Reste etwas schwerer als das des natürlich vorkommenden Proteins. Auch bei dieser Aufreinigung ging ein Teil des Proteins in der Durchfluss-Fraktion verloren. In den beiden Waschfraktionen war keine Bande vorhanden. In den Elutions-Fractionen und im Konzentrat war fast ausschließlich die gesuchte Protein-Bande zu sehen, deren Identität als Cgl2136 mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestätigt werden konnte (Durchführung durch M. Lasaosa,

Technische Biochemie). Die Konzentration der umgepufferten Proteinlösung betrug 8,3 mg/ml. Die gereinigte Proteinlösung hatte eine gelbe Farbe, was auch hier die Bindung von Pyridoxal-5'-Phosphat an das Protein zeigt. Somit war die Anreicherung des Cgl2136-Fusionsproteins ebenfalls erfolgreich.

### 5.5.3 Enzymaktivitäten der aufgereinigten Proteine

#### *Bestimmung der Enzymaktivität von CysK*

Zunächst sollte überprüft werden, ob die gereinigte Cystein-Synthase CysK aktiv war. Hierzu wurde die bereits für CysK beschriebene Aktivität mit O-Acetylserin und Sulfid untersucht. Es wurden verschiedene Konzentrationen des Substrates O-Acetylserin eingesetzt. Die Konzentration des gebildeten Cysteins wurde durch HPLC anhand eines Aminosäurestandards ermittelt. Dabei wurden die Proben unverdünnt eingespritzt und auf ABU als internen Standard verzichtet.



**Abb. IV-49:** Spezifische Aktivität von CysK 6xHis in [mU/mg] bei verschiedenen O-Acetylserin-Konzentrationen.

Das gereinigte Enzym war aktiv und katalysierte die Synthese von Cystein aus Sulfid und O-Acetylserin. Die höchste spezifische Aktivität von 969 mU/mg war bei einer O-Acetylserin Konzentration von 10 mM zu verzeichnen (Abbildung IV-49). Höhere O-Acetylserin-Konzentrationen führten zu einer Substrathemmung des Enzyms. In den folgenden Versuchen wurde daher eine O-Acetylserin Konzentration von 10 mM eingesetzt. Bei der Durchführung des Enzymassays mit Thiosulfat anstelle von Sulfid konnte allerdings kein S-Sulfocystein in der HPLC detektiert werden. Somit wurde ein direkter Nachweis der Funktion von CysK als S-Sulfocystein-Synthase nicht erbracht.

### ***Bestimmung der Enzymaktivität von Cgl2136***

Auch für Cgl2136 wurde die Enzymaktivität mit den Substraten Sulfid und Thiosulfat bestimmt. Dabei konnte mit keinem der beiden Substrate eine Aktivität verzeichnet werden. Die Überexpression von Cgl2136 in  $\Delta cysK$  sollte theoretisch zu einem verbesserten Wachstum auf CG 12 ½ - Minimalmedium mit Sulfat als Schwefelquelle führen. Die Wachstumsrate der mit dem Expressionsplasmid transformierten  $\Delta cysK$ -Mutante war mit  $\mu = 0,15 \text{ h}^{-1}$  im Vergleich zu  $\Delta cysK$  mit  $\mu = 0,13 \text{ h}^{-1}$  jedoch nicht signifikant verbessert. Eine mögliche Ursache hierfür könnte in einer Inaktivierung des Enzyms durch den N-terminalen His-Tag liegen, weshalb das Enzym auch im Assay keine Aktivität zeigte. Außerdem könnte das Enzym während der Aufreinigungsprozedur inaktiviert worden sein. Somit konnte die Funktion von Cgl2136 als zweite Cystein-Synthase nicht eindeutig geklärt werden. Möglicherweise codiert Cgl2136 überhaupt nicht für ein aktives Enzym, sondern ist eine zweite Cystein-Synthase, die durch Mutation ihre Aktivität verloren hat. Das Wachstum von  $\Delta cysK$  war unter Umständen auf eine Restaktivität von CysK zurückzuführen. Um dies zu untersuchen, sollte eine Doppelknockout-Mutante  $\Delta cysK\Delta cgl2136$  erzeugt werden, die Cystein-auxotroph ist, wenn die Deletionen zur vollständigen Inaktivierung der Enzymaktivitäten führen. Die Funktion des aufgereinigten CysK-Enzyms als S-Sulfocystein-Synthase konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Auch hier könnte möglicherweise der N-terminale His-Tag mit dieser Aktivität interferieren. Da das Enzym mit Sulfid allerdings die bekannte Cystein-Synthase-Funktion aufwies, erscheint dies eher fraglich.

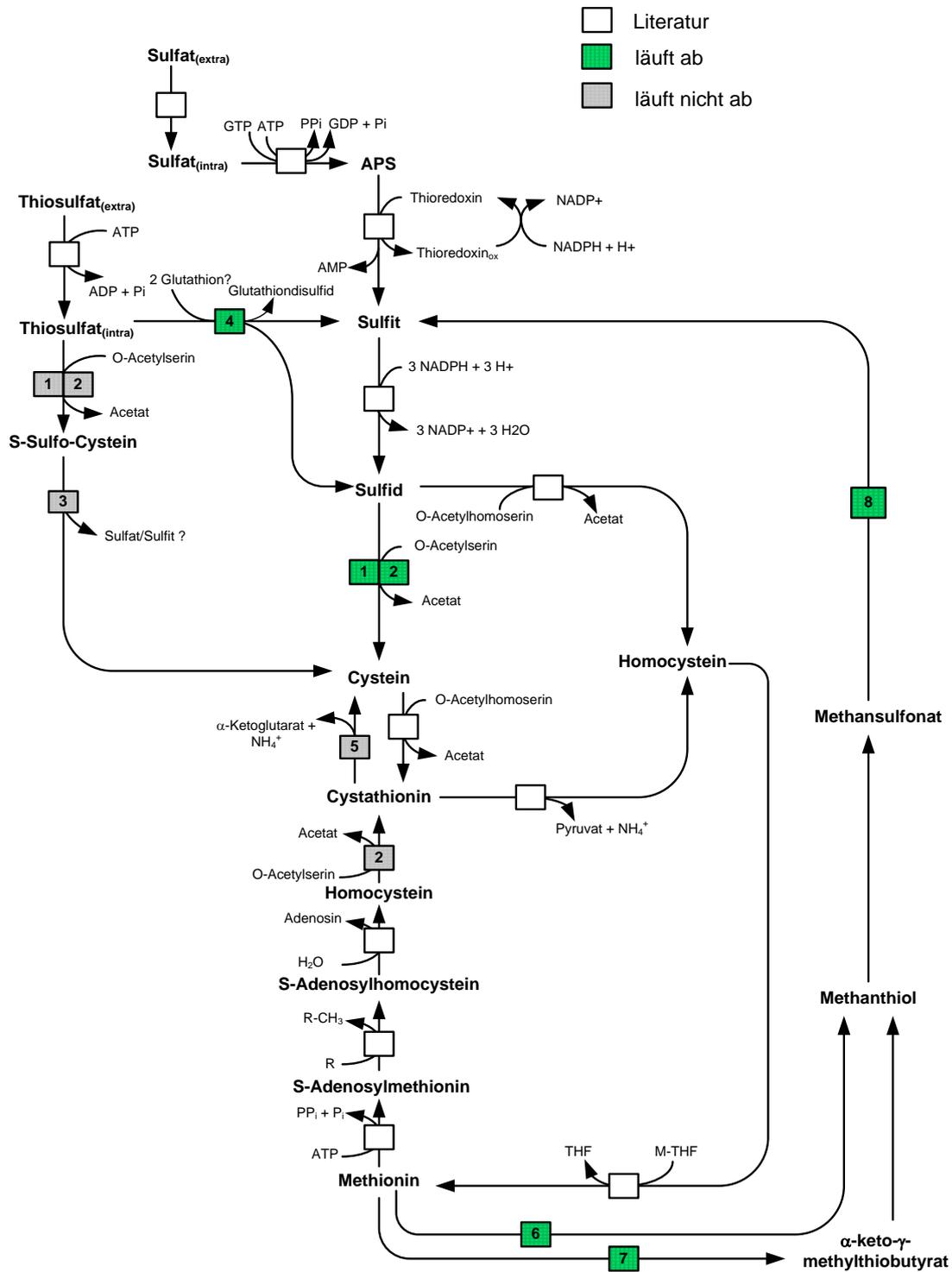
Insgesamt haben die Untersuchungen zur Thiosulfat-Verwertung gezeigt, dass der Einsatz von Thiosulfat als Schwefelquelle zur industriellen Methioninproduktion, bei einer äquivalenten Nutzung beider Schwefelatome, mit einer Einsparung an Reduktionsäquivalenten gegenüber der Sulfatassimilation verbunden ist. Dies ist möglich, da der äußere, stärker reduzierte Sulfan-Schwefel auf der Oxidationsstufe von Sulfid und der innere Sulfonat-Schwefel auf der Oxidationsstufe von Sulfit in den Schwefelstoffwechsel gelangt. Daher werden bei der Verwertung von Thiosulfat je Schwefelatom lediglich 1,5 mol NADPH verbraucht, während dies bei der Reduktion von Sulfat vier mol sind. Somit kann Thiosulfat in einem zukünftigen Produktionsprozess zur Steigerung der Methioninausbeute beitragen. Allerdings erfolgte die Nutzung der beiden Schwefelatome des Thiosulfats konzentrationsabhängig. Ob die Bevorzugung des Sulfonat-Schwefels bei hohen Thiosulfat-Konzentrationen auf die Beteiligung unterschiedlicher Enzyme bei der Thiosulfat-Verwertung zurückzuführen ist oder auf eine

chemische Zersetzung, etwa durch im Medium enthaltene Komponenten, bedarf weiterer Untersuchungen. Hierzu kommt die Analyse der im Medium enthaltenen Schwefelspezies mit  $^{34}\text{S}$ -markiertem Thiosulfat mit und ohne Zellen in Betracht. Eine teilweise Oxidation des Sulfan-Schwefels würde die NADPH-Ersparnis zur Methioninproduktion schmälern.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche Enzyme an der Thiosulfat-Verwertung beteiligt sind. Hierbei wurde deutlich, dass sich die Thiosulfat-Assimilation in *C. glutamicum* von der in *E. coli* unterscheidet. Die gemäß KEGG-Datenbank putative zweite Cystein-Synthase Cgl2136 ist nicht, wie die zweite Cystein-Synthase CysM aus *E. coli*, gleichzeitig eine S-Sulfocystein-Synthase, die Thiosulfat umsetzt. Die Wachstumsversuche ließen eher vermuten, dass die Cystein-Synthase CysK in *C. glutamicum* gleichzeitig als S-Sulfocystein-Synthase fungiert. Enzymtests mit dem aufgereinigten Protein bestätigten dies jedoch nicht. Die Einzeldelation der beiden Thiosulfat-Sulfurtransferasen hatte keinen Einfluss auf das Wachstum auf Thiosulfat. Da es sich aber um redundante Enzyme handeln könnte, sollte ein Doppelknockout der beiden Gene erzeugt werden, um ihre Rolle bei der Thiosulfat-Assimilation abschließend zu klären. Die Thiosulfat-Sulfurtransferase-Reaktion setzt Sulfit und Sulfid frei, was mit dem beobachteten Eintritt der beiden Schwefelatome von Thiosulfat in den Schwefelstoffwechsel im Einklang stünde.

Neben den Erkenntnissen zur Thiosulfat-Verwertung konnte auch nachgewiesen werden, dass es sich bei Cgl2136 nicht, wie durch Rückert et al. (2008) postuliert, um eine Cystathionin- $\beta$ -Synthase handeln kann, da die Zellen auch nach Deletion dieses Gens auf Methionin als einziger Schwefelquelle wachsen konnten. Daher ist davon auszugehen, dass Methionin über die Zwischenprodukte Methanthiol und Methansulfonat zu Sulfit abgebaut wird. Eine  $\Delta\text{cysK}$ -Mutante wäre somit nur bei der Existenz einer zweiten Cystein-Synthase nicht auxotroph für Cystein und könnte auf Sulfat wachsen. Da im Enzymtest diese Funktion für die putative zweite Cystein-Synthase Cgl2136 jedoch nicht bestätigt wurde, muss eine Doppelknockoutmutante beider Gene erzeugt werden, um eine Restaktivität von CysK in der  $\Delta\text{cysK}$ -Mutante auszuschließen. Wenn eine Restaktivität von CysK für das langsame Wachstum dieser Mutante auf Sulfat verantwortlich wäre, hätte dies auch Konsequenzen für die Aussagekraft des Wachstumsversuchs dieser Mutante auf Thiosulfat. Da die Verwertung von Thiosulfat langsamer erfolgt als die von Sulfat, könnte es sein, dass die Restaktivität von CysK nicht ausreichend war, um das Wachstum auf Thiosulfat zu ermöglichen. Abbildung IV-50 zeigt einen Modellvorschlag zur Verwertung

von Thiosulfat und Methionin in *C. glutamicum* basierend auf den Erkenntnissen dieser Arbeit.



**Abb. IV-50:** Modell zur Verwertung von Thiosulfat und Methionin in *C. glutamicum*. Vorhandene Enzyme: (1) Cystein-Synthase CysK, (2) Cgl2136 (putative zweite Cystein-Synthase oder Cystathionin- $\beta$ -Synthase), (3) Sulfonatasen, (4) Thiosulfat-Sulfurtransferasen, (5) Cg3068 (Cystathionin- $\gamma$ -Lyase), (6) Methionin- $\gamma$ -Lyase, (7) Transaminase, (8) Methansulfonat-Monooxygenase.

## V. SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK

---

### 1. Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit wurde ein vollkommen neuer Ansatz zur rationalen Erzeugung eines Methioninproduzenten von *C. glutamicum* verfolgt. Dabei wurden zunächst, basierend auf der Elementarmodenanalyse des metabolischen Netzwerks von *C. glutamicum*, Kombinationen von Gendelektionen selektiert, durch die Wachstum und Methioninproduktion zwingend aneinander gekoppelt sein müssen.

Unter den erhaltenen möglichen Kombinationen wurden diejenigen mit der höchsten minimalen Produktausbeute und der geringsten Anzahl an notwendigen Deletionen herausgesucht. Zur endgültigen Auswahl der Deletionen zur Implementierung in *C. glutamicum* wurden außerdem bisherige Studien in Bezug auf Deletionsmutanten berücksichtigt. Letztendlich wurden zwei verschiedene Kombinationen mit jeweils vier Deletionen ausgewählt. Die Betrachtung der theoretischen Flussverteilungen zeigte, dass in beiden Kombinationen durch die Deletion von Pyruvat-Kinase (*pyk*), PEP-Carboxylase (*ppc*) und PEP-Carboxykinase (*pck*) ein glykolytischer Rückstau erzeugt wird. Sowohl durch die zusätzliche Deletion des oxidativen Teils des PPP in Kombination 1 als auch durch die Deletion der Glucose-6-Phosphat-Isomerase (*pgi*) in Kombination 2 kann dieser nicht durch einen Rückfluss in den PPP und der damit verbundenen Abgabe von Kohlenstoff in Form von CO<sub>2</sub> ausgeglichen werden. Somit ist in beiden Kombinationen eine ausgeglichene Kohlenstoffbilanz und Wachstum nur dann möglich, wenn der Kohlenstofffluss auf Höhe von 3-Phosphoglycerat in Richtung Serin und anschließend zur Methioninsynthese umgeleitet wird. Wichtig ist, dass die Methioninsynthese in allen Elementarmoden beider Kombinationen über die Transsulfurierung, bei der durch die Cystathionin-β-Lyase (*aecD/metC*) Pyruvat freigesetzt wird, verlaufen muss.

Die *in silico* identifizierten Gendelektionen wurden anschließend *in vivo* kombiniert. Während es möglich war, die Mutante *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpckΔpgi* (Kombination 2) zu erzeugen, wurde allerdings auch deutlich, dass nicht jede der theoretisch möglichen Deletionen auch tatsächlich eingebracht werden kann. So war die Deletion des oxidativen Teils des PPP nicht durchführbar, was im Fall der Deletion der 6-Phosphogluconat Dehydrogenase (*gnd*) wahrscheinlich auf eine Akkumulation toxischer Konzentrationen von 6-Phosphogluconolacton zurückzuführen war. Die Deletion der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (*zwf*) in *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpck* scheiterte zwar schon

an der 1. Rekombination. Aufgrund des sehr langsamen Wachstums von *C. glutamicum*  $\Delta_{zwf}$  ( $\mu = 0,007 \text{ h}^{-1}$ ) ist es jedoch fraglich, ob die Vierfach-Mutante überhaupt hätte wachsen können. Möglicherweise sind Malatenzym und Isocitrat-Dehydrogenase *in vivo* nur unzureichend dazu in der Lage, den Ausfall des PPP als NADPH-Quelle zu kompensieren. Hier zeigte sich eine Einschränkung der Elementarmodenanalyse, da sie ausschließlich auf stöchiometrischen und thermodynamischen Informationen beruht. Die Möglichkeit, dass eine Reaktion ablaufen kann, sagt jedoch nichts über ihre Reaktionsgeschwindigkeit aus. Hierfür sind kinetische und regulatorische Faktoren verantwortlich, die jedoch in der Elementarmodenanalyse nicht berücksichtigt werden.

Die Mutante *lysC<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpckΔpgi* war nach einer mehrtägigen Adaptionsphase dazu in der Lage, mit einer Wachstumsrate von  $\mu = 0,15 \text{ h}^{-1}$  auf Minimalmedium zu wachsen. Allerdings produzierte sie kein Methionin. Die Metabolom- und Fluxomanalyse des erzeugten Stammes legte jedoch eine Umleitung des Kohlenstoffflusses vom 3-Phosphoglycerat zur Serinsynthese nahe. Allerdings wurde Serin anschließend nicht in den Methionin-Syntheseweg geschleust, sondern direkt zu Pyruvat abgebaut. Die Vorhersage der Elementarmodenanalyse kann nur dann eintreffen, wenn in dem zugrundegelegten Netzwerk alle entscheidenden Reaktionen berücksichtigt wurden. Durch den Serinabbau waren weiterhin Elementarmoden möglich, die Wachstum ohne Methioninproduktion erlaubten. Eines der Enzyme, das für diese Abbaureaktion in Frage kommt, ist die Serin-Dehydratase, von der zu vermuten ist, dass sie im Wildtyp ohne gleichzeitige Fütterung von Serin nicht aktiv ist. Daher war diese Reaktion zuvor in dem Netzwerk zur Elementarmodenanalyse nicht vorhanden. Die zusätzliche Deletion dieses Enzyms führte jedoch auch nicht zur Methioninproduktion. Die Mutante konnte weiterhin mit unverminderter Wachstumsrate und ohne nochmaligen Adaptionsprozess wachsen. Dies könnte auf eine Nebenreaktion der Cystathionin- $\beta$ -Lyase (*aecD/metC*), durch die Serin ebenfalls direkt zu Pyruvat desaminiert werden kann, zurückzuführen sein. Dies würde auch die Deletion dieses Gens erfordern. Jedoch ist die Cystathionin- $\beta$ -Lyase, im Rahmen der Transsulfurierung, Teil aller Elementarmoden, die notwendig sind, um Wachstum und Methionin-Produktion zu koppeln. Sie kann daher nicht ausgeschaltet werden. Solche unerwünschten Nebenreaktionen zeigen die prinzipielle Problematik bei der Analyse von metabolischen Netzwerken zum rationalen Design von Produktionsstämmen. Die Datenbanken, auf die dabei zurückgegriffen wird, führen oftmals Nebenreaktionen von Enzymen nicht auf. Außerdem können Nebenreaktionen auch erst unter bestimmten extremen Bedingungen überhaupt in Erscheinung treten. Des Weiteren ist es bei sehr

großen Netzwerken kaum realisierbar, jedes Enzym in der Literatur auf etwaige Nebenreaktionen zu überprüfen. Eine iterative Vorgehensweise aus *in silico*-Design, Stammkonstruktion und detaillierter physiologischer Analyse, wie in dieser Arbeit, kann das Wissen über die Flexibilität des Stoffwechsels jedoch erweitern und so das zugrundegelegte metabolische Netzwerk entscheidend verbessern. Da die Cystathionin- $\gamma$ -Lyase selbst nicht ausgeschaltet werden kann, muss in Zukunft ein Weg gefunden werden, ihre Serin-desaminierende Nebenaktivität zu eliminieren. Auch müssen die Threonin-Dehydratase und die Tryptophan-Synthase auf Serin-desaminierende Nebenaktivitäten untersucht werden. Ebenso ist es wichtig, die Nebenreaktion der Cystathionin- $\beta$ -Synthase, durch die Homolanthionin gebildet werden kann, auszuschalten. Da der Kohlenstofffluss, wie durch die Elementarmodenanalyse vorhergesagt, zur Serinsynthese umgeleitet wurde, stellt der Ansatz dieser Arbeit dennoch einen vielversprechenden Schritt zur rationalen Erzeugung eines Methioninproduzenten von *C. glutamicum* dar.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Einfach-, Zweifach- und Dreifach-Deletionsmutanten der in der Vierfach-Knockoutmutante ausgeschalteten Gene analysiert. Hiermit konnten schrittweise die durch die Deletionen hervorgerufenen Veränderungen im Stoffwechsel verfolgt werden. Die Deletion der Pyruvat-Kinase, die eine Limitierung des direkten Flusses von PEP zu Pyruvat auf 100 % verursachte, konnte durch eine flexible Nutzung der anaplerotischen Enzyme kompensiert werden. Es fand eine vollständige Verlagerung der anaplerotischen Carboxylierung von der Pyruvat-Carboxylase hin zur PEP-Carboxylase statt. Gleichzeitig wurde eine Umleitung des Kohlenstoffflusses über die Malat-Dehydrogenase und das Malat-Enzym hin zum Pyruvat aktiviert, wodurch genügend Pyruvat zur Aufrechterhaltung des TCA-Zyklus und anaboler Reaktionen zur Verfügung stand. Die Doppelknockoutmutante *lysC<sup>fbr</sup> $\Delta$ pyk $\Delta$ ppc*, in der die Umleitung der anaplerotischen Carboxylierung auf die PEP-Carboxylase nicht möglich war, konnte nicht auf Minimalmedium wachsen. Die PEP-Carboxykinase ist in *C. glutamicum* also nicht reversibel und kann keine duale gluconeogenetische und anaplerotische Funktion, wie etwa in *B. subtilis*, übernehmen. Die zusätzliche Deletion von *pgi* bzw. *pck* in *lysC<sup>fbr</sup> $\Delta$ pyk $\Delta$ ppc* ermöglichte jedoch das Wachstum. Die Untersuchung der beiden Dreifach-Deletionsmutanten *lysC<sup>fbr</sup> $\Delta$ pyk $\Delta$ ppc $\Delta$ pck* und *lysC<sup>fbr</sup> $\Delta$ pyk $\Delta$ ppc $\Delta$ pgi* zeigte, dass auch bei diesen, wie in der Vierfach-Deletionsmutante beobachtet, eine Umleitung des Kohlenstoffflusses über die Serinsynthese zu Pyruvat stattfindet. Dieser Weg kann unter bestimmten genetischen Konstitutionen folglich als Teil des Zentralstoffwechsels angesehen werden und trägt erheblich zur Flexibilität und Robustheit des metabolischen

Netzwerks von *C. glutamicum* bei. Auch konnte gezeigt werden, dass erst durch Mehrfachdeletionsmutanten bestimmte Stoffwechselwege, die aber entscheidend zum Wachstumspotential eines Organismus beitragen, aufgedeckt werden können. Hierbei war die  $^{13}\text{C}$ -Metabolische Flussanalyse von maßgeblicher Bedeutung.

Zur Verbesserung der Kohlenstoffausbeute erfordert die Methioninproduktion mit *C. glutamicum* den Einsatz stärker reduzierter Schwefelquellen als Sulfat. Thiosulfat könnte eine mögliche Alternative darstellen. Durch Erzeugung von Mutanten mit Deletionen im Sulfat-Operon und durch Tracer-Experimente mit  $^{34}\text{S}$ -markiertem Thiosulfat konnte gezeigt werden, dass die Nutzung dieser Schwefelquelle tatsächlich mit einer Einsparung an Reduktionsäquivalenten gegenüber Sulfat verbunden ist. Jedoch ist dies nur bei gleichwertiger Nutzung der beiden Schwefelatome der Fall. Die durchgeführten Markierungsexperimente zeigten hingegen eine konzentrationsabhängige Verwertung der beiden Schwefelatome und wiesen auf eine teilweise Oxidation des für die Zelle günstigeren Sulfan-Schwefelatoms hin. Dies wäre nachteilig für den Einsatz von Thiosulfat in einem Produktionsprozess und muss Gegenstand zukünftiger wissenschaftlicher Arbeit sein. Des Weiteren ergaben die Untersuchungen, dass die Thiosulfat-Verwertung in *C. glutamicum* anders verläuft als in *E. coli*, wo die zweite Cystein-Synthase CysM essentiell zum Wachstum auf Thiosulfat ist. Ob *C. glutamicum* überhaupt eine zweite Cystein-Synthase besitzt, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Die Deletion der Cystein-Synthase CysK führte zum Wachstumsdefizit auf Thiosulfat. Enzymtests bestätigten die Funktion von CysK als S-Sulfocystein-Synthase jedoch nicht. Im Hinblick auf die industrielle Methioninproduktion mit Thiosulfat als Schwefelquelle sollten sowohl die Rolle von CysK als auch die Funktion der beiden Thiosulfat-Sulfurtransferasen weiter untersucht werden.

## 2. Ausblick

Eines der wichtigsten Ziele der systembiologischen Forschung ist es, das Verhalten von Organismen mit Hilfe von Computermodellen vorausberechnen zu können. Das Konzept der Elementarmodenanalyse stellt hierzu ein wichtiges Werkzeug dar. In Zukunft gilt es die Frage zu beantworten, ob sich die Selektion von Gendeletion zur Kopplung von Wachstum und Produktbildung basierend auf der Elementarmodenanalyse, tatsächlich umsetzen lässt. Eines der Selektionskriterien war eine möglichst hohe minimale Produktausbeute. Wie für die Selektion von Gendeletionen zur Kopplung von Wachstum

und Lysinproduktion mit *C. glutamicum* gezeigt werden konnte (Salas, 2007), lag die höchste minimale Lysinausbeute lediglich bei 1,07 %. Es lassen sich somit nicht für jedes Produkt Kombinationen finden, die dieses Kriterium erfüllen. Am Beispiel von Methionin konnte zwar eine Kombination mit einer sehr hohen minimalen Methioninausbeute von 40,54 % identifiziert werden, jedoch ließ sich diese *in vivo* nicht realisieren. Da jedem Elementarmodus eine bestimmte Gewichtung aufgrund kinetischer oder regulatorischer Einschränkungen zukommt, könnte es sein, dass bei einer rein stöchiometrischen Betrachtungsweise Moden selektiert werden, die *in vivo* nicht auftreten können. Interessant ist hierbei die von Wlaschin et. al (2006) gefundene umgekehrte Korrelation zwischen der Gewichtung der Elementarmoden und der Entropie, die durch diese erzeugt wird. Diese Feststellung konnte untermauert werden durch die gute Übereinstimmung zwischen experimentell bestimmten und berechneten intrazellulären Flussverteilungen, die mit Hilfe der Elementarmodenanalyse unter Einbeziehung von Reaktionsentropien bestimmt wurden. Möglicherweise wurden in der Evolution Regulationsmechanismen, die Wege mit geringer Entropiebildung erlauben, bevorzugt (Wlaschin et al., 2006). Eine Einbeziehung von Gewichtungsfaktoren bei der Elementarmodenanalyse könnte somit zu besseren Vorhersagen führen. Allerdings sind die hierzu notwendigen Berechnungen nicht trivial. In dieser Arbeit konnten neue Erkenntnisse über die Flexibilität des Stoffwechsels von *C. glutamicum* gewonnen und das metabolische Netzwerk zur Elementarmodenanalyse entscheidend verbessert werden. Eine Herausforderung zur Verwirklichung des rationalen Ansatzes zur Methioninproduktion mit *C. glutamicum* wird unter anderem in der Eliminierung von Nebenaktivitäten der beteiligten Enzyme liegen. Auch sollte der eng mit der Methioninsynthese verbundene Schwefelstoffwechsel, insbesondere die Verwertung von Thiosulfat, im Mittelpunkt zukünftiger Studien stehen.

Ist es möglich, systembiologische Daten in geeigneten mathematischen Modellen zu integrieren, könnte in Zukunft eine Vielzahl biotechnologischer Entwicklungen maßgeblich beschleunigt und in wirtschaftliche Prozesse umgesetzt werden. Auch die biotechnologische Produktion von Methionin sollte so früher oder später erfolgreich sein.

---

## VI. LITERATUR

---

- Al Zaid Siddiquee, K., Arauzo-Bravo, M. J. and Shimizu, K. (2004). Metabolic flux analysis of pykF gene knockout Escherichia coli based on <sup>13</sup>C-labeling experiments together with measurements of enzyme activities and intracellular metabolite concentrations. *Appl Microbiol Biotechnol* **63**, 407-17.
- Amarita, F., Yvon, M., Nardi, M., Chambellon, E., Delettre, J. and Bonnarme, P. (2004). Identification and functional analysis of the gene encoding methionine-gamma-lyase in *Brevibacterium linens*. *Appl Environ Microbiol* **70**, 7348-54.
- Antoniewicz, M. R., Kelleher, J. K. and Stephanopoulos, G. (2007). Elementary metabolite units (EMU): a novel framework for modeling isotopic distributions. *Metabolic engineering* **9**, 68-86.
- Bailey, J. E. (1991). Toward a science of metabolic engineering. *Science* **252**, 1668-75.
- Baker, D. H. (1986). Utilization of isomers and analogs of amino acids and other sulfur-containing compounds. *Prog Food Nutr Sci* **10**, 133-78.
- Baker, D. H. (2009). Advances in protein-amino acid nutrition of poultry. *Amino Acids* **37**, 29-41.
- Becker, J., Klopprogge, C. and Wittmann, C. (2008). Metabolic responses to pyruvate kinase deletion in lysine producing *Corynebacterium glutamicum*. *Microb Cell Fact* **7**, 8.
- Becker, J., Klopprogge, C., Zelder, O., Heinzle, E. and Wittmann, C. (2005). Amplified expression of fructose 1,6-bisphosphatase in *Corynebacterium glutamicum* increases in vivo flux through the pentose phosphate pathway and lysine production on different carbon sources. *Appl Environ Microbiol* **71**, 8587-96.
- Behre, J., Wilhelm, T., von Kamp, A., Ruppin, E. and Schuster, S. (2008). Structural robustness of metabolic networks with respect to multiple knockouts. *J Theor Biol* **252**, 433-41.
- Bell, J. K., Pease, P. J., Bell, J. E., Grant, G. A. and Banaszak, L. J. (2002). De-regulation of D-3-phosphoglycerate dehydrogenase by domain removal. *Eur J Biochem* **269**, 4176-84.
- Bonamy, C., Labarre, J., Cazaubon, L., Jacob, C., Le Bohec, F., Reyes, O. and Leblon, G. (2003). The mobile element IS1207 of *Brevibacterium lactofermentum* ATCC21086: isolation and use in the construction of Tn5531, a versatile transposon for insertional mutagenesis of *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* **104**, 301-9.
- Bonarius, H. P. J., Schmid, G. and Tramper, J. (1997). Flux analysis of underdetermined metabolic networks: the quest for the missing constraints. *Trends in Biotechnology* **15**, 308-314.
- Bonnassie, S., Burini, J. F., Oreglia, J., Trautwetter, A., Patte, J. C. and Sicard, A. M. (1990). Transfer of plasmid DNA to *Brevibacterium lactofermentum* by electrotransformation. *J Gen Microbiol* **136**, 2107-12.
- Bonomi, F., Pagani, S. and Kurtz, D. M., Jr. (1985). Enzymic synthesis of the 4Fe-4S clusters of *Clostridium pasteurianum* ferredoxin. *Eur J Biochem* **148**, 67-73.
- Born, T. L. and Blanchard, J. S. (1999). Enzyme-catalyzed acylation of homoserine: mechanistic characterization of the *Escherichia coli* metA-encoded homoserine transsuccinylase. *Biochemistry* **38**, 14416-23.

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Brigidi, P., Matteuzzi, D. and Fava, F. (1988). Use of protoplast fusion to introduce methionine overproduction into *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **28**, 268-271.
- Brinkrolf, K., Schroder, J., Puhler, A. and Tauch, A. (2009). The transcriptional regulatory repertoire of *Corynebacterium glutamicum*: Reconstruction of the network controlling pathways involved in lysine and glutamate production. *J Biotechnol*.
- Brown, E. A., D'Ari, R. and Newman, E. B. (1990). A relationship between L-serine degradation and methionine biosynthesis in *Escherichia coli* K12. *J Gen Microbiol* **136** ( Pt 6), 1017-23.
- Burkovski, A. (2003). I do it my way: Regulation of ammonium uptake and ammonium assimilation in *Corynebacterium glutamicum*. *Arch Microbiol* **179**, 83-8.
- Canonaco, F., Hess, T. A., Heri, S., Wang, T., Szyperski, T. and Sauer, U. (2001). Metabolic flux response to phosphoglucose isomerase knock-out in *Escherichia coli* and impact of overexpression of the soluble transhydrogenase UdhA. *FEMS Microbiol Lett* **204**, 247-52.
- Carlson, R., Fell, D. and Sreenc, F. (2002). Metabolic pathway analysis of a recombinant yeast for rational strain development. *Biotechnol Bioeng* **79**, 121-34.
- Carlson, R. and Sreenc, F. (2004). Fundamental *Escherichia coli* biochemical pathways for biomass and energy production: identification of reactions. *Biotechnol Bioeng* **85**, 1-19.
- Carpenter, A. E. and Sabatini, D. M. (2004). Systematic genome-wide screens of gene function. *Nat Rev Genet* **5**, 11-22.
- Cianci, M., Gliubich, F., Zanotti, G. and Berni, R. (2000). Specific interaction of lipoate at the active site of rhodanese. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1481**, 103-108.
- Clarke, D. M. and Bragg, P. D. (1985). Cloning and expression of the transhydrogenase gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **162**, 367-73.
- Claus, M. T., Zocher, G. E., Maier, T. H. and Schulz, G. E. (2005). Structure of the O-acetylserine sulfhydrylase isoenzyme CysM from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **44**, 8620-6.
- Cocaign-Bousquet, M. and Lindley, N. D. (1995). Pyruvate overflow and carbon flux within the central metabolic pathways of *Corynebacterium glutamicum* during growth on lactate. *Enzyme Microb Technol* **17**, 260-267.
- D'Mello, J. P. F. and Lewis, D. (1978). Effect of Nutrient Deficiencies in Animals: Amino Acids. *Rechigl, M. (Ed), CRC Handbook Series in Nutrition and Food*, 441-490.
- Dauner, M., Bailey, J. E. and Sauer, U. (2001). Metabolic flux analysis with a comprehensive isotopomer model in *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Bioeng* **76**, 144-56.
- de Graaf, A. A., Eggeling, L. and Sahl, H. (2001). Metabolic engineering for L-lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **73**, 9-29.
- Deshpande, R., Yang, T. H. and Heinzle, E. (2009). Towards a metabolic and isotopic steady state in CHO batch cultures for reliable isotope-based metabolic profiling. *Biotechnol J* **4**, 247-63.

- Deutscher, D., Meilijson, I., Schuster, S. and Ruppin, E. (2008). Can single knockouts accurately single out gene functions? *BMC Syst Biol* **2**, 50.
- Diesterhaft, M. D. and Freese, E. (1973). Role of pyruvate carboxylase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, and malic enzyme during growth and sporulation of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **248**, 6062-70.
- Dominguez, H. and Lindley, N. D. (1996). Complete Sucrose Metabolism Requires Fructose Phosphotransferase Activity in *Corynebacterium glutamicum* To Ensure Phosphorylation of Liberated Fructose. *Appl Environ Microbiol* **62** (10), 3878-3880.
- Dominguez, H., Rollin, C., Guyonvarch, A., Guerin-Kern, J. L., Cocaign-Bousquet, M. and Lindley, N. D. (1998). Carbon-flux distribution in the central metabolic pathways of *Corynebacterium glutamicum* during growth on fructose. *Eur J Biochem* **254**, 96-102.
- Donadio, S., Shafiee, A. and Hutchinson, C. R. (1990). Disruption of a rhodaneselike gene results in cysteine auxotrophy in *Saccharopolyspora erythraea*. *J Bacteriol* **172**, 350-60.
- Eggeling, L. and Sahm, H. (1999). L-Glutamate and L-lysine: traditional products with impetuous developments. *Appl Microbiol Biotechnol* **52**, 146-153.
- Eggeling L., B. M. E. (2005). *Handbook of Corynebacterium glutamicum*. CRC Press, Taylor and Francis Group.
- Emmerling, M., Dauner, M., Ponti, A., Fiaux, J., Hochuli, M., Szyperski, T., Wuthrich, K., Bailey, J. E. and Sauer, U. (2002). Metabolic flux responses to pyruvate kinase knockout in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**, 152-64.
- Fanous, A., Weiss, W., Gorg, A., Jacob, F. and Parlar, H. (2008). A proteome analysis of the cadmium and mercury response in *Corynebacterium glutamicum*. *Proteomics* **8**, 4976-86.
- Flavin, M. and Slaughter, C. (1964). Cystathionine Cleavage Enzymes of *Neurospora*. *J Biol Chem* **239**, 2212-9.
- Follmann, M., Ochrombel, I., Kramer, R., Trotschel, C., Poetsch, A., Ruckert, C., Huser, A., Persicke, M., Seiferling, D., Kalinowski, J. and Marin, K. (2009). Functional genomics of pH homeostasis in *Corynebacterium glutamicum* revealed novel links between pH response, oxidative stress, iron homeostasis and methionine synthesis. *BMC Genomics* **10**, 621.
- Fong, S. S. and Palsson, B. O. (2004). Metabolic gene-deletion strains of *Escherichia coli* evolve to computationally predicted growth phenotypes. *Nat Genet* **36**, 1056-8.
- Fry, B., Zhu, T., Domach, M. M., Koepsel, R. R., Phalakornkule, C. and Ataai, M. M. (2000). Characterization of growth and acid formation in a *Bacillus subtilis* pyruvate kinase mutant. *Appl Environ Microbiol* **66**, 4045-9.
- Funfstuck, R., Straube, E., Schildbach, O. and Tietz, U. (1997). [Prevention of reinfection by L-methionine in patients with recurrent urinary tract infection]. *Med Klin (Munich)* **92**, 574-81.
- Gerstmeir, R., Wendisch, V. F., Schnicke, S., Ruan, H., Farwick, M., Reinscheid, D. and Eikmanns, B. J. (2003). Acetate metabolism and its regulation in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* **104**, 99-122.

- Gourdon, P. and Lindley, N. D. (1999). Metabolic analysis of glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*. *Metab Eng* **1**, 224-31.
- Gourdon, P., Raherimandimby, M., Dominguez, H., Coccain-Bousquet, M. and Lindley, N. D. (2003). Osmotic stress, glucose transport capacity and consequences for glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* **104**, 77-85.
- Gubler, M., Jetten, M., Lee, S. H. and Sinskey, A. J. (1994). Cloning of the pyruvate kinase gene (pyk) of *Corynebacterium glutamicum* and site-specific inactivation of pyk in a lysine-producing *Corynebacterium lactofermentum* strain. *Appl Environ Microbiol* **60**, 2494-500.
- H.S.-Lee (2005). Sulfur Metabolism and its Regulation in Eggeling L., B. M. (Ed), *Handbook of Corynebacterium glutamicum*, CRC Press, Taylor and Francis. Boca Raton, FL, USA, pp. 351-376.
- Haitani, Y., Awano, N., Yamazaki, M., Wada, M., Nakamori, S. and Takagi, H. (2006). Functional analysis of L-serine O-acetyltransferase from *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett* **255**, 156-63.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-80.
- Hausmann, U., Qi, S. W., Wolters, D., Rogner, M., Liu, S. J. and Poetsch, A. (2009). Physiological adaptation of *Corynebacterium glutamicum* to benzoate as alternative carbon source - a membrane proteome-centric view. *Proteomics* **9**, 3635-51.
- Hinkle, P. C. (2005). P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1706**, 1-11.
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K. and Pease, L. R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51-9.
- Holms, W. H. and Bennett, P. M. (1971). Regulation of isocitrate dehydrogenase activity in *Escherichia coli* on adaptation to acetate. *J Gen Microbiol* **65**, 57-68.
- Hua, Q., Yang, C., Baba, T., Mori, H. and Shimizu, K. (2003). Responses of the central metabolism in *Escherichia coli* to phosphoglucose isomerase and glucose-6-phosphate dehydrogenase knockouts. *J Bacteriol* **185**, 7053-67.
- Hwang, B. J., Kim, Y., Kim, H. B., Hwang, H. J., Kim, J. H. and Lee, H. S. (1999). Analysis of *Corynebacterium glutamicum* methionine biosynthetic pathway: isolation and analysis of metB encoding cystathionine gamma-synthase. *Mol Cells* **9**, 300-8.
- Hwang, B. J., Yeom, H. J., Kim, Y. and Lee, H. S. (2002). *Corynebacterium glutamicum* utilizes both transsulfuration and direct sulfhydrylation pathways for methionine biosynthesis. *J Bacteriol* **184**, 1277-86.
- Ihnen, E. D. and Demain, A. L. (1969). Glucose-6-phosphate dehydrogenase and its deficiency in mutants of *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **98**, 1151-8.
- Ikeda, M., Okamoto, K. and Katsumata, R. (1998). A transketolase mutant of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* **50**, 375-378.
- Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-8.

- Inui, M., Suda, M., Okino, S., Nonaka, H., Puskas, L. G., Vertes, A. A. and Yukawa, H. (2007). Transcriptional profiling of *Corynebacterium glutamicum* metabolism during organic acid production under oxygen deprivation conditions. *Microbiology* **153**, 2491-504.
- Ishii, N., Nakahigashi, K., Baba, T., Robert, M., Soga, T., Kanai, A., Hirasawa, T., Naba, M., Hirai, K., Hoque, A., Ho, P. Y., Kakazu, Y., Sugawara, K., Igarashi, S., Harada, S., Masuda, T., Sugiyama, N., Togashi, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Yugi, K., Arakawa, K., Iwata, N., Toya, Y., Nakayama, Y., Nishioka, T., Shimizu, K., Mori, H. and Tomita, M. (2007). Multiple high-throughput analyses monitor the response of *E. coli* to perturbations. *Science* **316**, 593-7.
- Jager, W., Schafer, A., Puhler, A., Labes, G. and Wohlleben, W. (1992). Expression of the *Bacillus subtilis* *sacB* gene leads to sucrose sensitivity in the gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* but not in *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol* **174**, 5462-5.
- Jakoby, M., Tesch, M., Sahm, H., Kramer, R. and Burkovski, A. (1997). Isolation of the *Corynebacterium glutamicum* *glnA* gene encoding glutamine synthetase I. *FEMS Microbiol Lett* **154**, 81-8.
- Jakubowski, H. (1999). Protein homocysteinylation: possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels. *Faseb J* **13**, 2277-83.
- Jetten, M., Pitoc, G. A., Follettie, M. T. and Sinskey, A. J. (1994). Regulation of phospho(enol)-pyruvate- and oxaloacetate-converting enzymes in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* **41**, 47-52.
- Jetten, M. and Sinskey, A. J. (1993). Characterization of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett* **111**, 183-188.
- Juhnke, H., Krems, B., Kotter, P. and Entian, K. D. (1996). Mutants that show increased sensitivity to hydrogen peroxide reveal an important role for the pentose phosphate pathway in protection of yeast against oxidative stress. *Mol Gen Genet* **252**, 456-64.
- Kalinowski, J., Bathe, B., Bartels, D., Bischoff, N., Bott, M., Burkovski, A., Dusch, N., Eggeling, L., Eikmanns, B. J., Gaigalat, L., Goesmann, A., Hartmann, M., Huthmacher, K., Kramer, R., Linke, B., McHardy, A. C., Meyer, F., Mockel, B., Pfefferle, W., Puhler, A., Rey, D. A., Ruckert, C., Rupp, O., Sahm, H., Wendisch, V. F., Wiegrabe, I. and Tauch, A. (2003). The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J Biotechnol* **104**, 5-25.
- Kalinowski, J., Cremer, J., Bachmann, B., Eggeling, L., Sahm, H. and Puhler, A. (1991). Genetic and biochemical analysis of the aspartokinase from *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol* **5**, 1197-204.
- Kase, H. and Nakayama, K. (1974a). Production of O-acetyl-L-homoserine by methionine analog-resistant mutants and regulation of homoserine-O-transacetylase in *Corynebacterium glutamicum*. *Agric Biol Chem* **38** (10), 2010-2030.
- Kase, H. and Nakayama, K. (1974b). 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.
- Katz, R. S. and Baker, D. H. (1975). Efficacy of D-, L- and DL-methionine for growth of chicks fed crystalline amino acid diets. *Poult Sci* **54**, 1667-74.
- Kelly, D. P., Shergill, J. K., Lu, W. P. and Wood, A. P. (1997). Oxidative metabolism of inorganic sulfur compounds by bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **71**, 95-107.

- Kiefer, P., Heinzle, E. and Wittmann, C. (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**, 338-43.
- Kim, H. M., Heinzle, E., Wittmann, C. (2006). Deregulation of Aspartokinase by Single Nucleotide Exchange Leads to Global Flux Rearrangement in the Central Metabolism of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Microbiol. Biotechnol.* (2006) **16**, 1174-1179.
- Kim, J. W., Kim, H. J., Kim, Y., Lee, M. S. and Lee, H. S. (2001). Properties of the *Corynebacterium glutamicum* metC gene encoding cystathionine beta-lyase. *Mol Cells* **11**, 220-5.
- Kimura, E. (2003). Metabolic Engineering of Glutamate Production. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **79**, 37-57.
- Kinoshita, S., Shigezo, U. and Shimono, M. (1957). Studies on the amino acid fermentation: Part I: Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol* **3**, 193-205.
- Kirchner, O. and Tauch, A. (2003). Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* **104**, 287-99.
- Kjeldsen, K. R. and Nielsen, J. (2009). In silico genome-scale reconstruction and validation of the *Corynebacterium glutamicum* metabolic network. *Biotechnol Bioeng* **102**, 583-97.
- Klapa, M. I., Aon, J. C. and Stephanopoulos, G. (2003). Systematic quantification of complex metabolic flux networks using stable isotopes and mass spectrometry. *Eur J Biochem* **270**, 3525-42.
- Koch, D. J., Ruckert, C., Rey, D. A., Mix, A., Puhler, A. and Kalinowski, J. (2005). Role of the ssu and seu genes of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 in utilization of sulfonates and sulfonate esters as sulfur sources. *Appl Environ Microbiol* **71**, 6104-14.
- Krömer, J. O. (2006). Systembiotechnologische Studien an *Corynebacterium glutamicum* zur Charakterisierung der Methioninsynthese., *Technische Biochemie*, Universität des Saarlandes.
- Krömer, J. O., Bolten, C. J., Heinzle, E., Schröder, H. and Wittmann, C. (2008). Physiological response of *Corynebacterium glutamicum* to oxidative stress induced by deletion of the transcriptional repressor McbR. *Microbiology* **154**, 3917-30.
- Krömer, J. O., Fritz, M., Heinzle, E. and Wittmann, C. (2005). In vivo quantification of intracellular amino acids and intermediates of the methionine pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Anal Biochem* **340**, 171-3.
- Krömer, J. O., Heinzle, E., Schroder, H. and Wittmann, C. (2006a). Accumulation of homolanthionine and activation of a novel pathway for isoleucine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum* McbR deletion strains. *J Bacteriol* **188**, 609-18.
- 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**, 1769-84.
- Krömer, J. O., Wittmann, C., Schroder, H. and Heinzle, E. (2006b). Metabolic pathway analysis for rational design of L-methionine production by *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*. *Metab Eng* **8**, 353-69.

- Kumar, D., Garg, S., Bisaria, V. S., Sreekrishnan, T. R. and Gomes, J. (2003). Production of L-methionine by a multi-analogue resistant mutant of *Corynebacterium lilium*. *Process Biochem* **38**, 1165-1171.
- Kumar, D. and Gomes, J. (2005). Methionine production by fermentation. *Biotechnol Adv* **23**, 41-61.
- Lasaosa, M., Delmotte, N., Huber, C. G., Melchior, K., Heinzle, E. and Tholey, A. (2009). A 2D reversed-phase x ion-pair reversed-phase HPLC-MALDI TOF/TOF-MS approach for shotgun proteome analysis. *Anal Bioanal Chem* **393**, 1245-56.
- Le Faou, A., Rajagopal, B. S., Daniels, L. and Fauque, G. (1990). Thiosulfate, polythionates and elemental sulfur assimilation and reduction in the bacterial world. *FEMS Microbiol Rev* **6**, 351-81.
- Lee, H. S. (2005). Sulfur Metabolism and its Regulation in Eggeling L., B. M. (Ed), *Handbook of Corynebacterium glutamicum*, CRC Press, Taylor and Francis. Boca Raton, FL, USA, pp. 351-376.
- Lee, H. S. and Hwang, B. J. (2003). Methionine biosynthesis and its regulation in *Corynebacterium glutamicum*: parallel pathways of transsulfuration and direct sulfhydrylation. *Appl Microbiol Biotechnol* **62**, 459-67.
- 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., Huthmacher, K. and Drauz, K. (2005). Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* **69**, 1-8.
- Lüssling, T., Müller, K. P., Schreyer, G. and Theissen, F. (1975). Verfahren zur Wiedergewinnung von Methionin und Kalium aus den im Kreislauf geführten Lösungen des Kaliumcarbonat-Methioninverfahrens. *German Patent 24 21 167*.
- Malloy, C. R., Sherry, A. D. and Jeffrey, F. M. (1988). Evaluation of carbon flux and substrate selection through alternate pathways involving the citric acid cycle of the heart by <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *J Biol Chem* **263**, 6964-71.
- Mampel, J., Schroder, H., Haefner, S. and Sauer, U. (2005). Single-gene knockout of a novel regulatory element confers methionine resistance and elevates methionine production in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* **68**, 228-36.
- Marx, A., de Graaf, A., Wiechert, W., Eggeling, L. and Sahm, H. (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., Hans, S., Mockel, B., Bathe, B. and de Graaf, A. A. (2003). Metabolic phenotype of phosphoglucose isomerase mutants of *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* **104**, 185-97.
- Matsushita, K., Otofujii, A., Iwahashi, M., Toyama, H. and Adachi, O. (2001). NADH dehydrogenase of *Corynebacterium glutamicum*. Purification of an NADH dehydrogenase II homolog able to oxidize NADPH. *FEMS Microbiol Lett* **204**, 271-6.
- McCoy, R. H., Meyer, C. E. and Rose, W. C. (1974). Nutrition classics from The Journal of Biological Chemistry 112:283-302, 1935-1936. Feeding experiments with mixtures of

- highly purified amino acids. 8. Isolation and identification of a new essential amino acid. By Richard H. McCoy, Curtis E. Meyer, and William C. Rose. *Nutr Rev* **32**, 16-8.
- Merrick, M. J. and Edwards, R. A. (1995). Nitrogen control in bacteria. *Microbiol Rev* **59**, 604-22.
- Messner, K. R. and Imlay, J. A. (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**, 10119-28.
- Metropolis, N. and Ulam, S. (1949). The Monte Carlo Method. *Journal of the American Statistical Association* **44**, 335-341.
- Miethe, G. (2003). Untersuchungen zum Zerfall und zur Analytik der Zersetzungsprodukte von Natriumthiosulfat-Injektionslösungen, *Pharmazie*, Humboldt-Universität zu Berlin.
- Molenaar, D., van der Rest, M. E., Drysch, A. and Yucel, R. (2000). Functions of the membrane-associated and cytoplasmic malate dehydrogenases in the citric acid cycle of *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **182**, 6884-91.
- Mollney, M., Wiechert, W., Kownatzki, D. and de Graaf, A. A. (1999). Bidirectional reaction steps in metabolic networks: IV. Optimal design of isotopomer labeling experiments. *Biotechnol Bioeng* **66**, 86-103.
- Moon, M. W., Park, S. Y., Choi, S. K. and Lee, J. K. (2007). The phosphotransferase system of *Corynebacterium glutamicum*: features of sugar transport and carbon regulation. *J Mol Microbiol Biotechnol* **12**, 43-50.
- Moritz, B., Striegel, K., De Graaf, A. A. and Sahm, H. (2000). Kinetic properties of the glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases from *Corynebacterium glutamicum* and their application for predicting pentose phosphate pathway flux in vivo. *Eur J Biochem* **267**, 3442-52.
- Nakamori, S., Kobayashi, S., Nishimura, T. and Takagi, H. (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**, 179-85.
- Nakamura, T., Kon, Y., Iwahashi, H. and Eguchi, Y. (1983). Evidence that thiosulfate assimilation by *Salmonella typhimurium* is catalyzed by cysteine synthase B. *J Bacteriol* **156**, 656-62.
- Neidhardt, F. C., Ingraham J.L., Schaechter, M. (1990). Physiology of the Bacterial Cell - a molecular approach. *Sinauer Ass. Inc., Sunderland, MA, USA*.
- Netzer, R., Peters-Wendisch, P., Eggeling, L. and Sahm, H. (2004). Cometabolism of a nongrowth substrate: L-serine utilization by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol* **70**, 7148-55.
- Niklas, J., Noor, F. and Heinzle, E. (2009). Effects of drugs in subtoxic concentrations on the metabolic fluxes in human hepatoma cell line Hep G2. *Toxicol Appl Pharmacol* **240**, 327-36.
- Nor 'Aini A.R., S., Y., Hassan M.A., Shimizu, K. (2006). Investigation on the Metabolic Regulation of *pgi* Gene Knockout *Escherichia coli* by Enzyme Activities and Intracellular Metabolite Concentrations. *Malaysian Journal of Microbiology* **2**, pp.24-31.
- Nowak, M. A., Boerlijst, M. C., Cooke, J. and Smith, J. M. (1997). Evolution of genetic redundancy. *Nature* **388**, 167-171.

- Ohnishi, J., Mitsuhashi, S., Hayashi, M., Ando, S., Yokoi, H., Ochiai, K. and Ikeda, M. (2002). A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine-producing mutant. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**, 217-23.
- Ostrowski, J., Barber, M. J., Rueger, D. C., Miller, B. E., Siegel, L. M. and Kredich, N. M. (1989). Characterization of the flavoprotein moieties of NADPH-sulfite reductase from *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. Physicochemical and catalytic properties, amino acid sequence deduced from DNA sequence of *cysJ*, and comparison with NADPH-cytochrome P-450 reductase. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 15796-15808.
- Ozaki, H. and Shiio, I. (1982). Methionine biosynthesis in *Brevibacterium flavum*: properties and essential role of O-acetylhomoserine sulphydrylase. *J Biochem (Tokyo)* **91**, 1163-71.
- Papin, J. A., Stelling, J., Price, N. D., Klamt, S., Schuster, S. and Palsson, B. O. (2004). Comparison of network-based pathway analysis methods. *Trends Biotechnol* **22**, 400-5.
- Parche, S., Burkovski, A., Sprenger, G. A., Weil, B., Kramer, R. and Titgemeyer, F. (2001). *Corynebacterium glutamicum*: a dissection of the PTS. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**, 423-8.
- Park, S. D., Lee, J. Y., Kim, Y., Kim, J. H. and Lee, H. S. (1998). Isolation and analysis of *metA*, a methionine biosynthetic gene encoding homoserine acetyltransferase in *corynebacterium glutamicum*. *Mol Cells* **8**, 286-94.
- Park, S. D., Lee, J. Y., Sim, S. Y., Kim, Y. and Lee, H. S. (2007). Characteristics of methionine production by an engineered *Corynebacterium glutamicum* strain. *Metab Eng* **9**, 327-36.
- Park, S. M., Shaw-Reid, C., Sinskey, A. J. and Stephanopoulos, G. (1997a). Elucidation of anaplerotic pathways in *Corynebacterium glutamicum* via <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy and GC-MS. *Appl Microbiol Biotechnol* **47**, 430-440.
- Park, S. M., Sinskey, A. J. and Stephanopoulos, G. (1997b). Metabolic and Physiological Studies of *Corynebacterium glutamicum* Mutants. *Biotechnol Bioeng* **55**, 864-879.
- Park, S. Y., Kim, H. K., Yoo, S. K., Oh, T. K. and Lee, J. K. (2000). Characterization of *glk*, a gene coding for glucose kinase of *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett* **188**, 209-15.
- Peters-Wendisch, P., Eikmanns, B., Thierbach, G., Bachmann, B. and Sahm, H. (1993). Phosphoenolpyruvate carboxylase in *Corynebacterium glutamicum* is dispensible for growth and lysine production. *FEMS Microbiol Lett* **112**, 269-274.
- Peters-Wendisch, P., Netzer, R., Eggeling, L. and Sahm, H. (2002). 3-Phosphoglycerate dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum*: the C-terminal domain is not essential for activity but is required for inhibition by L-serine. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**, 437-41.
- Petersen, S., de Graaf, A. A., Eggeling, L., Mollney, M., Wiechert, W. and Sahm, H. (2000). In vivo quantification of parallel and bidirectional fluxes in the anaplerosis of *Corynebacterium glutamicum*. *J Biol Chem* **275**, 35932-41.
- Petersen, S., Mack, C., de Graaf, A. A., Riedel, C., Eikmanns, B. J. and Sahm, H. (Eds) (2001). *Metabolic consequences of altered phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in Corynebacterium glutamicum reveal anaplerotic regulation mechanisms in vivo*.

- Pfefferle, W., Mockel, B., Bathe, B. and Marx, A. (2003). Biotechnological manufacture of lysine. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **79**, 59-112.
- Pfeiffer, T., Sanchez-Valdenebro, I., Nuno, J. C., Montero, F. and Schuster, S. (1999). METATOOL: for studying metabolic networks. *Bioinformatics* **15**, 251-7.
- Polen, T., Schluesener, D., Poetsch, A., Bott, M. and Wendisch, V. F. (2007). Characterization of citrate utilization in *Corynebacterium glutamicum* by transcriptome and proteome analysis. *FEMS Microbiol Lett* **273**, 109-19.
- Quek, L. E., Dietmair, S., Kromer, J. O. and Nielsen, L. K. (2009). Metabolic flux analysis in mammalian cell culture. *Metab Eng*.
- Reinscheid, D. J., Schnicke, S., Rittmann, D., Zahnow, U., Sahm, H. and Eikmanns, B. J. (1999). Cloning, sequence analysis, expression and inactivation of the *Corynebacterium glutamicum* pta-ack operon encoding phosphotransacetylase and acetate kinase. *Microbiology* **145** ( Pt 2), 503-13.
- Rey, D. A., Nentwich, S. S., Koch, D. J., Ruckert, C., Puhler, A., Tauch, A. and Kalinowski, J. (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**, 871-87.
- Rey, D. A., Puhler, A. and Kalinowski, J. (2003). The putative transcriptional repressor McbR, member of the TetR-family, is involved in the regulation of the metabolic network directing the synthesis of sulfur containing amino acids in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* **103**, 51-65.
- Riedel, C., Rittmann, D., Dangel, P., Mockel, B., Petersen, S., Sahm, H. and Eikmanns, B. J. (2001). Characterization of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene from *Corynebacterium glutamicum* and significance of the enzyme for growth and amino acid production. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**, 573-83.
- Ronsch, H., Kramer, R. and Morbach, S. (2003). Impact of osmotic stress on volume regulation, cytoplasmic solute composition and lysine production in *Corynebacterium glutamicum* MH20-22B. *J Biotechnol* **104**, 87-97.
- Rossol, I. and Pühler, A. (1992). The *Corynebacterium glutamicum* aecD gene encodes a C-S lyase with alpha, beta-elimination activity that degrades aminoethylcysteine. *J Bacteriol* **174**, 2968-77.
- Rückert, C., Koch, D. J., Rey, D. A., Albersmeier, A., Mormann, S., Puhler, A. and Kalinowski, J. (2005). Functional genomics and expression analysis of the *Corynebacterium glutamicum* fpr2-cysIXHDNYZ gene cluster involved in assimilatory sulphate reduction, *BMC Genomics*, pp. 121.
- Rückert, C., Puhler, A. and Kalinowski, J. (2003). Genome-wide analysis of the L-methionine biosynthetic pathway in *Corynebacterium glutamicum* by targeted gene deletion and homologous complementation. *J Biotechnol* **104**, 213-28.
- Rückert, C. K., J. (2008). Sulfur Metabolism in *Corynebacterium glutamicum* in Burkovski, A. (Ed), *Corynebacteria Genomics and Molecular Biology*, Caister Academic Press, Norfolk UK.
- Sahm, H., Eggeling, L. and de Graaf, A. A. (2000). Pathway analysis and metabolic engineering in *Corynebacterium glutamicum*. *Biol Chem* **381**, 899-910.

- Salas, M. (2007). In-silico Design of Mutant Strains of *Corynebacterium glutamicum* for the Production of Industrially Important Amino Acids Using Elementary Mode Analysis, *Technische Biochemie*, Universität des Saarlandes.
- Sano, K., Ito, K., Miwa, K. and Nakamori, S. (1987). Amplification of the Phosphoenol Pyruvate Carboxylase Gene of *Brevibacterium lactofermentum* to improve Amino Acid Production. *Agric Biol Chem* **51** (2), 597-599.
- Sauer, U., Eikmanns, B.J. (2004). The PEP–pyruvate–oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **29** (2005) 765–794.
- Schafer, A., Tauch, A., Droste, N., Puhler, A. and Kalinowski, J. (1997). The *Corynebacterium glutamicum* cglIM gene encoding a 5-cytosine methyltransferase enzyme confers a specific DNA methylation pattern in an McrBC-deficient *Escherichia coli* strain. *Gene* **203**, 95-101.
- Schilling, C. H., Schuster, S., Palsson, B. O. and Heinrich, R. (1999). Metabolic pathway analysis: basic concepts and scientific applications in the post-genomic era. *Biotechnol Prog* **15**, 296-303.
- Schmidt, K., Carlsen, M., Nielsen, J. and Villadsen, J. (1997). Modeling Isotopomer Distributions in Biochemical Networks Using Isotopomer Mapping Matrices. *Biotechnol Bioeng* **55** (6), 831-840.
- Schmidt, K., Marx, A., de Graaf, A. A., Wiechert, W., Sahm, H., Nielsen, J. and Villadsen, J. (1998). <sup>13</sup>C tracer experiments and metabolite balancing for metabolic flux analysis: comparing two approaches. *Biotechnol Bioeng* **58**, 254-7.
- Schobert, P. and Bowien, B. (1984). Unusual C3 and C4 metabolism in the chemoautotroph *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* **159**, 167-72.
- Schrumpf, B., Schwarzer, A., Kalinowski, J., Puhler, A., Eggeling, L. and Sahm, H. (1991). A functionally split pathway for lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **173**, 4510-6.
- Schuster, S., Dandekar, T. and Fell, D. A. (1999). Detection of elementary flux modes in biochemical networks: a promising tool for pathway analysis and metabolic engineering. *Trends Biotechnol* **17**, 53-60.
- Schuster, S., Fell, D. A. and Dandekar, T. (2000). A general definition of metabolic pathways useful for systematic organization and analysis of complex metabolic networks. *Nat Biotechnol* **18**, 326-32.
- Sekowska, A., Kung, H. F. and Danchin, A. (2000). Sulfur metabolism in *Escherichia coli* and related bacteria: facts and fiction. *J Mol Microbiol Biotechnol* **2**, 145-77.
- Shiio I, Y. A., Sugimoto S. (1987). Effect of Pyruvate Kinase Deficiency on L-Lysine Productivities of Mutants with Feedback-resistant Aspartokinases. *Agric Biol Chem* **51**, 2485-2495.
- Shirai, T., Fujimura, K., Furusawa, C., Nagahisa, K., Shioya, S. and Shimizu, H. (2007). Study on roles of anaplerotic pathways in glutamate overproduction of *Corynebacterium glutamicum* by metabolic flux analysis. *Microb Cell Fact* **6**, 19.
- Shirai, T., Nakato, A., Izutani, N., Nagahisa, K., Shioya, S., Kimura, E., Kawarabayasi, Y., Yamagishi, A., Gojobori, T. and Shimizu, H. (2005). Comparative study of flux redistribution of metabolic pathway in glutamate production by two coryneform bacteria. *Metab Eng* **7**, 59-69.

- Simic, P., Willuhn, J., Sahn, H. and Eggeling, L. (2002). Identification of glyA (encoding serine hydroxymethyltransferase) and its use together with the exporter ThrE to increase L-threonine accumulation by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol* **68**, 3321-7.
- Sirko, A., Hryniewicz, M., Hulanicka, D. and Bock, A. (1990). Sulfate and thiosulfate transport in *Escherichia coli* K-12: nucleotide sequence and expression of the *cysTWAM* gene cluster. *J Bacteriol* **172**, 3351-7.
- Sonntag, K., Schwinde, J., de Graaf, A., Marx, A., Eikmanns, B., Wiechert, W. and Sahn, H. (1995). <sup>13</sup>C 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.
- Sugimoto, E. and Pizer, L. I. (1968). The mechanism of end product inhibition of serine biosynthesis. II. Optical studies of phosphoglycerate dehydrogenase. *J Biol Chem* **243**, 2090-8.
- Sundaram, S., Karakaya, H., Scanlan, D. J. and Mann, N. H. (1998). Multiple oligomeric forms of glucose-6-phosphate dehydrogenase in cyanobacteria and the role of OpcA in the assembly process. *Microbiology* **144** (Pt 6), 1549-56.
- Tauch, A., Homann, I., Mormann, S., Ruberg, S., Billault, A., Bathe, B., Brand, S., Brockmann-Gretza, O., Ruckert, C., Schischka, N., Wrenger, C., Hoheisel, J., Mockel, B., Huthmacher, K., Pfefferle, W., Puhler, A. and Kalinowski, J. (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.
- Teramoto, H., Inui, M. and Yukawa, H. (2009). Regulation of expression of genes involved in quinate and shikimate utilization in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol* **75**, 3461-8.
- Terzer, M. and Stelling, J. (2008). Large-scale computation of elementary flux modes with bit pattern trees. *Bioinformatics* **24**, 2229-35.
- Trinh, C. T., Carlson, R., Wlaschin, A. and Sreenc, F. (2006). Design, construction and performance of the most efficient biomass producing *E. coli* bacterium. *Metab Eng* **8**, 628-38.
- Trinh, C. T., Unrean, P. and Sreenc, F. (2008a). Minimal *Escherichia coli* cell for the most efficient production of ethanol from hexoses and pentoses. *Appl Environ Microbiol* **74**, 3634-43.
- Trinh, C. T., Wlaschin, A. and Sreenc, F. (2008b). Elementary mode analysis: a useful metabolic pathway analysis tool for characterizing cellular metabolism. *Appl Microbiol Biotechnol*.
- Trotschel, C., Deutenberg, D., Bathe, B., Burkovski, A. and Kramer, R. (2005). Characterization of methionine export in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **187**, 3786-94.
- Trudel, P., Provost, S., Massie, B., Chartrand, P. and Wall, L. (1996). pGATA: a positive selection vector based on the toxicity of the transcription factor GATA-1 to bacteria. *Biotechniques* **20**, 684-93.
- Tzvetkov, M., Klopprogge, C., Zelder, O. and Liebl, W. (2003). Genetic dissection of trehalose biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*: inactivation of trehalose production leads to impaired growth and an altered cell wall lipid composition. *Microbiology* **149**, 1659-73.

- Vallino, J. J. and Stephanopoulos, G. (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**, 872-85.
- van der Ploeg, J. R., Barone, M. and Leisinger, T. (2001). Functional analysis of the *Bacillus subtilis* *cysK* and *cysJI* genes. *FEMS Microbiol Lett* **201**, 29-35.
- Vennesland, B., Castric, P. A., Conn, E. E., Solomonson, L. P., Volini, M. and Westley, J. (1982). Cyanide metabolism. *Fed Proc* **41**, 2639-48.
- Vermeij, P. and Kertesz, M. A. (1999). Pathways of assimilative sulfur metabolism in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* **181**, 5833-7.
- Vertes, A. A., Inui, M. and Yukawa, H. (2005). Manipulating corynebacteria, from individual genes to chromosomes. *Appl Environ Microbiol* **71**, 7633-42.
- Wada, M., Awano, N., Haisa, K., Takagi, H. and Nakamori, S. (2002). Purification, characterization and identification of cysteine desulfhydrase of *Corynebacterium glutamicum*, and its relationship to cysteine production. *FEMS Microbiol Lett* **217**, 103-7.
- Wada, M., Awano, N., Yamazawa, H., Takagi, H. and Nakamori, S. (2004). Purification and characterization of O-Acetylserine sulfhydrylase of *Corynebacterium glutamicum*. *Biosci Biotechnol Biochem* **68**, 1581-3.
- Wei, J., Tang, Q. X., Varlamova, O., Roche, C., Lee, R. and Leyh, T. S. (2002). Cysteine biosynthetic enzymes are the pieces of a metabolic energy pump. *Biochemistry* **41**, 8493-8.
- Wendisch, V. F., Spies, M., Reinscheid, D. J., Schnicke, S., Sahm, H. and Eikmanns, B. J. (1997). Regulation of acetate metabolism in *Corynebacterium glutamicum*: transcriptional control of the isocitrate lyase and malate synthase genes. *Arch Microbiol* **168**, 262-9.
- Wiechert, W. (2001). <sup>13</sup>C metabolic flux analysis. *Metab Eng* **3**, 195-206.
- Wiechert, W. and de Graaf, A. (1997). Bidirectional Reaction Steps in Metabolic Networks: I. Modeling and Simulation of Carbon Isotope Labeling Experiments. *Biotechnol Bioeng* **55** (1), 102-117.
- Wiechert, W., Siefke, C., de Graaf, A. and Marx, A. (1997). Bidirectional Reaction Steps in Metabolic Networks: II. Flux Estimation and Statistical Analysis. *Biotechnol Bioeng* **55** (1), 118-135.
- Winzeler, E. A., Shoemaker, D. D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J. D., Bussey, H., Chu, A. M., Connelly, C., Davis, K., Dietrich, F., Dow, S. W., El Bakkoury, M., Foury, F., Friend, S. H., Gentalen, E., Giaever, G., Hegemann, J. H., Jones, T., Laub, M., Liao, H., Liebundguth, N., Lockhart, D. J., Lucau-Danila, A., Lussier, M., M'Rabet, N., Menard, P., Mittmann, M., Pai, C., Rebischung, C., Revuelta, J. L., Riles, L., Roberts, C. J., Ross-MacDonald, P., Scherens, B., Snyder, M., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R. K., Veronneau, S., Voet, M., Volckaert, G., Ward, T. R., Wysocki, R., Yen, G. S., Yu, K., Zimmermann, K., Philippsen, P., Johnston, M. and Davis, R. W. (1999). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* **285**, 901-6.
- Wittmann, C. (2002). Metabolic flux analysis using mass spectrometry. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **74**, 39-64.

- Wittmann, C., de Graaf, A. (2005). Metabolic flux analysis in *Corynebacterium glutamicum*. in Eggeling, L., Bott, M. (Ed), *Handbook of Corynebacterium glutamicum*. , CRC Press, Taylor and Francis, pp. 277-304.
- Wittmann, C., Hans, M. and Heinzle, E. (2002). In vivo analysis of intracellular amino acid labelings by GC/MS. *Anal Biochem* **307**, 379-82.
- Wittmann, C. and Heinzle, E. (1999). Mass spectrometry for metabolic flux analysis. *Biotechnol Bioeng* **62**, 739-750.
- Wittmann, C. and Heinzle, E. (2001a). Application of MALDI-TOF MS to lysine-producing *Corynebacterium glutamicum*: a novel approach for metabolic flux analysis. *Eur J Biochem* **268**, 2441-55.
- Wittmann, C. and Heinzle, E. (2001b). Modeling and experimental design for metabolic flux analysis of lysine-producing *Corynebacteria* by mass spectrometry. *Metab Eng* **3**, 173-91.
- Wittmann, C. and Heinzle, E. (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**, 5843-59.
- Wittmann, C., Kiefer, P. and Zelder, O. (2004a). Metabolic fluxes in *Corynebacterium glutamicum* during lysine production with sucrose as carbon source. *Appl Environ Microbiol* **70**, 7277-87.
- Wittmann, C., Kromer, J. O., Kiefer, P., Binz, T. and Heinzle, E. (2004b). Impact of the cold shock phenomenon on quantification of intracellular metabolites in bacteria. *Anal Biochem* **327**, 135-9.
- Wittmann, C. H., E. (2008). *Metabolic Network Analysis and Design in Corynebacterium glutamicum*. . Caister Academic Press, Norfolk UK ISBN: 978-1-904455-30-1, p. 79-112.).
- Wlaschin, A. P., Trinh, C. T., Carlson, R. and Sreenc, F. (2006). The fractional contributions of elementary modes to the metabolism of *Escherichia coli* and their estimation from reaction entropies. *Metab Eng* **8**, 338-52.
- Wolf, A., Kramer, R. and Morbach, S. (2003). Three pathways for trehalose metabolism in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 and their significance in response to osmotic stress. *Mol Microbiol* **49**, 1119-34.
- Woodin, T. S. and Segel, I. H. (1968). Glutathione reductase-dependent metabolism of cysteine-S-sulfate by *Penicillium chrysogenum*. *Biochim Biophys Acta* **167**, 78-88.
- Xu, H., Zhang, Y., Guo, X., Ren, S., Staempfli, A. A., Chiao, J., Jiang, W. and Zhao, G. (2004). Isoleucine biosynthesis in *Leptospira interrogans* serotype lai strain 56601 proceeds via a threonine-independent pathway. *J Bacteriol* **186**, 5400-9.
- Yang, T. H., Bolten, C. J., Coppi, M. V., Sun, J. and Heinzle, E. (2009). Numerical bias estimation for mass spectrometric mass isotopomer analysis. *Anal Biochem* **388**, 192-203.
- Yang, T. H., Frick, O. and Heinzle, E. (2008). Hybrid optimization for <sup>13</sup>C metabolic flux analysis using systems parametrized by compactification. *BMC Syst Biol* **2**, 29.
- Yang, T. H., Heinzle, E. and Wittmann, C. (2005). Theoretical aspects of <sup>13</sup>C metabolic flux analysis with sole quantification of carbon dioxide labeling. *Comput Biol Chem* **29**, 121-33.

- Yang, T. H., Wittmann, C. and Heinzle, E. (2006). Respirometric  $^{13}\text{C}$  flux analysis--Part II: in vivo flux estimation of lysine-producing *Corynebacterium glutamicum*. *Metab Eng* **8**, 432-46.
- Yang, T. H., Wittmann, C. and Heinzle, E. E. (2004). Metabolic network simulation using logical loop algorithm and Jacobian matrix. *Metab Eng* **6**, 256-67.
- Yokota, A. a. L., N.D. (2005). *Central Metabolism: Sugar Uptake and Conversion, Handbook of Corynebacterium glutamicum*. Eggeling L., Bott, M. (Eds), pp 215-240, CRC Press, Taylor and Francis, Boca Raton, FL, USA.
- Zamboni, N., Maaheimo, H., Szyperski, T., Hohmann, H. P. and Sauer, U. (2004). The phosphoenolpyruvate carboxykinase also catalyzes C3 carboxylation at the interface of glycolysis and the TCA cycle of *Bacillus subtilis*. *Metab Eng* **6**, 277-84.
- Zhao, C., Kumada, Y., Imanaka, H., Imamura, K. and Nakanishi, K. (2006). Cloning, overexpression, purification, and characterization of O-acetylserine sulphydrylase-B from *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **47**, 607-13.
- Zupke, C. and Stephanopoulos, G. (2002). Modeling of Isotope Distributions and Intracellular Fluxes in Metabolic Networks Using Atom Mapping Matrixes. *Biotechnology Progress* **10**, 489-498.

## Eigene Publikationen

- Schneider K., **Schütz V.**, John GT., Heinzle E. (2009). Optical Device for Parallel Online Measurement of Dissolved Oxygen and Ph in Shake Flask Cultures. *Bioproc Biosyst Eng*, DOI 10.1007/s00449-009-0367-0.
- Wittmann, C., **Schütz, V.**, John, G., Heinzle, E. (2004). Quantification of oxygen transfer in test tubes by integrated optical sensing. *J. Microbiol. Biotechnol*, **14**:991-995.

---

## VII. ANHANG

---

### 1. Das stöchiometrische Netzwerk von *C. glutamicum* zur Elementarmodenanalyse

Das folgende Modell (vgl. Abbildung III.3) kann als txt.-Datei gespeichert und zur Elementarmodenanalyse mittels „METATOOL“ (Version: M4.3-double.exe) genutzt werden. Durch Gebrauch der Schreibweise „reaction formulas“ (rformulas) kann dieses Modell an das „efm-tool“ angepasst werden (<http://www.csb.ethz.ch/tools/efmtool>).

#R1: 215hosphor-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

#R27r: SUCC-CoA-synthase

#R28r: SUCC-DH

#R29r: FUMARASE

#R30r: MAL-DH

#R31: ICI-lyase  
#R32: MAL-synthase  
#R33: PYR-carboxylase  
#R34: PEP-carboxylase  
#R35r: 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 sulphhydriylase  
#R50: ACETAT-kinase  
#R51: phosphotransacetylase  
#R52: MET-synthase (MetE/H)  
#R53: methionine exporter  
#R54: cystathionine-g-lyase  
#R55: ATP-sulfurylase  
#R56: ATP-hydrolysis  
#R57r: malic enzyme  
#R58: sulfite-reductase  
#R59: respiratory chain 1  
#R60: respiratory chain 2  
#R61: biomass formation  
#R62: adenylate kinase  
#R63: sulfate uptake (ABC-Transporter)  
#R64: dapA  
#R65r: dapB  
#R66r: ddh  
#R67: dapD  
#R68r : succinyldiaminopimelate transaminase  
#R69: dapE  
#R70: lysA  
#R71: lysE  
#R72: glucose uptake system

-ENZREV

R2r R6r R7r R8r R9r R10r R13r R14r R15r R17r R18r R22r R23r R27r R28r R29r R30r R35r R37r R41r R42r R57r  
R65r R66r R68r

-ENZIRRE

R1 R3 R4 R5 R11 R12 R16 R19 R20 R21 R24 R25 R26 R31 R32 R33 R34 R36 R38 R39 R40 R43 R44 R45 R46 R47  
R48 R49 R50 R51 R52 R53 R54 R55 R56 R58 R59 R60 R61 R62 R63 R64 R67 R69 R70 R71 R72

-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 DHP PDC SAK SDP  
DMP LYS

-METEXT

BIOMASS GLC METex O2 NH3 CO2 SO4ex GLYCIN LYSex

-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 .

R27r : SUCC-CoA + ADP = SUCC + H-CoA + ATP .

- R28r :  $\text{SUCC} + \text{FAD} = \text{FUM} + \text{FADH}$  .
- R29r :  $\text{FUM} = \text{MAL}$  .
- R30r :  $\text{MAL} + \text{NAD} = \text{OAA} + \text{NADH}$  .
- R31 :  $\text{ICI} = \text{GLYOXY} + \text{SUCC}$  .
- R32 :  $\text{GLYOXY} + \text{AC-CoA} = \text{MAL} + \text{H-CoA}$  .
- R33 :  $\text{PYR} + \text{ATP} + \text{CO}_2 = \text{OAA} + \text{ADP}$  .
- R34 :  $\text{PEP} + \text{CO}_2 = \text{OAA}$  .
- R35r :  $\text{OAA} + \text{ATP} = \text{PEP} + \text{ADP} + \text{CO}_2$  .
- R36 :  $\text{OAA} + \text{ADP} = \text{PYR} + \text{CO}_2 + \text{ATP}$  .
- R37r :  $\text{OAA} + \text{GLU} = \text{ASP} + 2\text{-OXO}$  .
- R38 :  $\text{THF} + \text{SER} = \text{MTHF} + \text{GLYCIN}$  .
- R39 :  $\text{ASP-SA} + \text{NADPH} = \text{HOM} + \text{NADP}$  .
- R40 :  $\text{HOM} + \text{AC-CoA} = \text{O-AC-HOM} + \text{H-CoA}$  .
- R41r :  $3\text{-PG} + \text{NAD} = 3\text{-PHP} + \text{NADH}$  .
- R42r :  $3\text{-PHP} + \text{GLU} = \text{SER-P} + 2\text{-OXO}$  .
- R43 :  $\text{SER-P} = \text{SER}$  .
- R44 :  $\text{SER} + \text{AC-CoA} = \text{O-AC-SER} + \text{H-CoA}$  .
- R45 :  $\text{O-AC-SER} + \text{H}_2\text{S} = \text{CYS} + \text{ACETAT}$  .
- R46 :  $\text{CYS} + \text{O-AC-HOM} = \text{CYSTA} + \text{ACETAT}$  .
- R47 :  $\text{ASP} + \text{ATP} = \text{ASP-P} + \text{ADP}$  .
- R48 :  $\text{ASP-P} + \text{NADPH} = \text{ASP-SA} + \text{NADP}$  .
- R49 :  $\text{O-AC-HOM} + \text{H}_2\text{S} = \text{HOMOCYS} + \text{ACETAT}$  .
- R50 :  $\text{ATP} + \text{ACETAT} = \text{ADP} + \text{acetyl-phosphate}$  .
- R51 :  $\text{acetyl-phosphate} + \text{H-CoA} = \text{AC-CoA}$  .
- R52 :  $\text{HOMOCYS} + \text{MTHF} = \text{MET} + \text{THF}$  .
- R53 :  $\text{MET} = \text{MET}_{\text{ex}}$  .
- R54 :  $\text{CYSTA} = \text{HOMOCYS} + \text{NH}_3 + \text{PYR}$  .
- R55 :  $\text{SO}_4 + 2 \text{ATP} + \text{NADPH} = \text{H}_2\text{SO}_3 + \text{ADP} + \text{AMP} + \text{NADP}$  .
- R56 :  $\text{ATP} = \text{ADP}$  .
- R57r :  $\text{MAL} + \text{NADP} = \text{PYR} + \text{CO}_2 + \text{NADPH}$  .
- 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 :  $6231 \text{NH}_3 + 233 \text{SO}_4 + 205 \text{G6P} + 308 \text{F6P} + 879 \text{RIBO-5P} + 268 \text{E-4P} + 129 \text{GA3P} + 1295 \text{3-PG} + 652 \text{PEP} + 2604 \text{PYR} + 3177 \text{AC-CoA} + 1680 \text{OAA} + 1224 \text{2-OXO} + 16429 \text{NADPH} + 17002 \text{ATP} + 3111 \text{NAD} = \text{BIOMASS} + 16429 \text{NADP} + 3177 \text{H-CoA} + 1227 \text{CO}_2 + 17002 \text{ADP} + 3111 \text{NADH}$  .
- R62 :  $\text{AMP} + \text{ATP} = 2 \text{ADP}$  .
- R63 :  $\text{SO}_{4\text{ex}} + \text{ATP} = \text{SO}_4 + \text{ADP}$  .
- R64 :  $\text{ASP-SA} + \text{PYR} = \text{DHP}$  .
- R65r :  $\text{DHP} + \text{NADPH} = \text{NADP} + \text{PDC}$  .
- R66r :  $\text{PDC} + \text{NH}_3 + \text{NADPH} = \text{DMP} + \text{NADP}$  .
- R67 :  $\text{PDC} + \text{SUCC-CoA} = \text{SAK} + \text{H-CoA}$  .
- R68r :  $\text{SAK} + \text{GLU} = \text{SDP} + 2\text{-OXO}$  .
- R69 :  $\text{SDP} = \text{DMP} + \text{SUCC}$  .

R70 : DMP = LYS + CO<sub>2</sub> .

R71 : LYS = LYSex .

R72 : ATP + GLC = ADP + G6P .

## 2. Theoretische Flussverteilungen

**Tab.VII-1:** Theoretische Flussverteilung in *C. glutamicum* Kombination 1 mit Deletion der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (R5), der Pyruvat-Kinase (R19), der PEP-Carboxylase (R34) sowie der PEP-Carboxykinase (R35r). Die Flüsse sind auf die Kohlenstoffaufnahme normiert und in mol mol<sup>-1</sup> x 100 angegeben.

		Familie 1			Familie 1
<b>Glucose-Aufnahme</b>			<b>Serin- und C1-Stoffwechsel</b>		
Phosphotransferase-System	R1	100,0	PG-DH	R41r	97,3
Glucose-Kinase	R72	0,0	Phosphoserin-Transaminase	R42r	97,3
<b>Glykolyse</b>			Phosphoserin-Phosphatase	R43	97,3
G6P-Isomerase	R2r	99,9	M-THF Synthesis 1	R38	48,6
Phosphofruktokinase	R11	99,3	<b>Met-, Cys- und Lys-Stoffwechsel</b>		
Fructosebisphosphatase	R12	0,0	ASP-Transaminase	R37r	48,6
Fructosebisphosphate-Aldolase	R13r	99,3	Aspartokinase	R47	48,6
Triosephosphate-Isomerase	R14r	99,3	ASP-P-DH	R48	48,6
Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Kinase	R15r	198,4	HOM-DH	R39	48,6
PG-Kinase	R16	198,4	HOM-Transacetylase	R40	48,6
PG-Mutase	R17r	100,4	Serine-Transacetylase	R44	48,6
PEP-Hydrolase	R18r	100,4	Cysteine-Synthase	R45	48,6
Pyr-Kinase	R19	/	Cystathionine-Synthase	R46	48,6
PYR-DH	R20	97,0	O-Ac-HOM Sulphydrylase	R49	0,0
<b>PPW</b>			MET-Synthase (MetE/H)	R52	48,6
G6P-DH	R3	0,0	Methionine Exporter	R53	48,6
Lactonase	R4	0,0	Cystathionine-g-Lyase	R54	48,6
Gluconate-DH	R5	/	dapA	R64	0,0
Ribose-5-P-Epimerase	R6r	-0,4	dapB	R65r	0,0
Ribose-5-P-Isomerase	R7r	0,4	ddh	R66r	0,0
Transketolase 1	R8r	0,1	dapD	R67	0,0
Transaldolase	R9r	-0,1	Succinyldiaminopimelate Transaminase	R68r	0,0
Transketolase 2	R10r	0,3	dapE	R69	0,0
<b>TCA-Zyklus</b>			lysA	R70	0,0
CIT-Synthase	R21	95,2	lysE	R71	0,0
ACO-Hydrolase	R22r	95,2	<b>Schwefelstoffwechsel</b>		
Aconitase	R23r	95,2	Sulfate uptake (ABC-Transporter)	R63	48,8
Isocitrate-DH	R24	95,2	ATP-Sulfurylase	R55	48,6
Glutamate-DH	R25	145,9	Sulfite-Reductase	R58	48,6
2-OXO-DH	R26	94,6	<b>Atmung</b>		
SUCC-CoA-Synthase	R27r	94,6	Respiratory chain 1	R59	115,9
SUCC-DH	R28r	94,6	Respiratory chain 2	R60	47,3
FUMARASE	R29r	94,6	<b>Biomasse-Bildung</b>		
MAL-DH	R30r	-257,1	Biomass Formation	R61	0,001
<b>Glyoxylat-Zyklus</b>			<b>ATP und Acetat</b>		
ICI-Lyase	R31	0,0	ACETAT-kinase	R50	97,3
MAL-Synthase	R32	0,0	Phosphotransacetylase	R51	97,3
<b>Anaplerotische Reaktionen</b>			ATP-Hydrolysis	R56	0,0
PYR-Carboxylase	R33	401,9	Adenylate Kinase	R62	48,6
PEP-Carboxylase	R34	/			
PEP-Carboxykinase	R35r	/			
OAA-Decarboxylase	R36	0,0			
Malic-Enzyme	R57r	351,6			

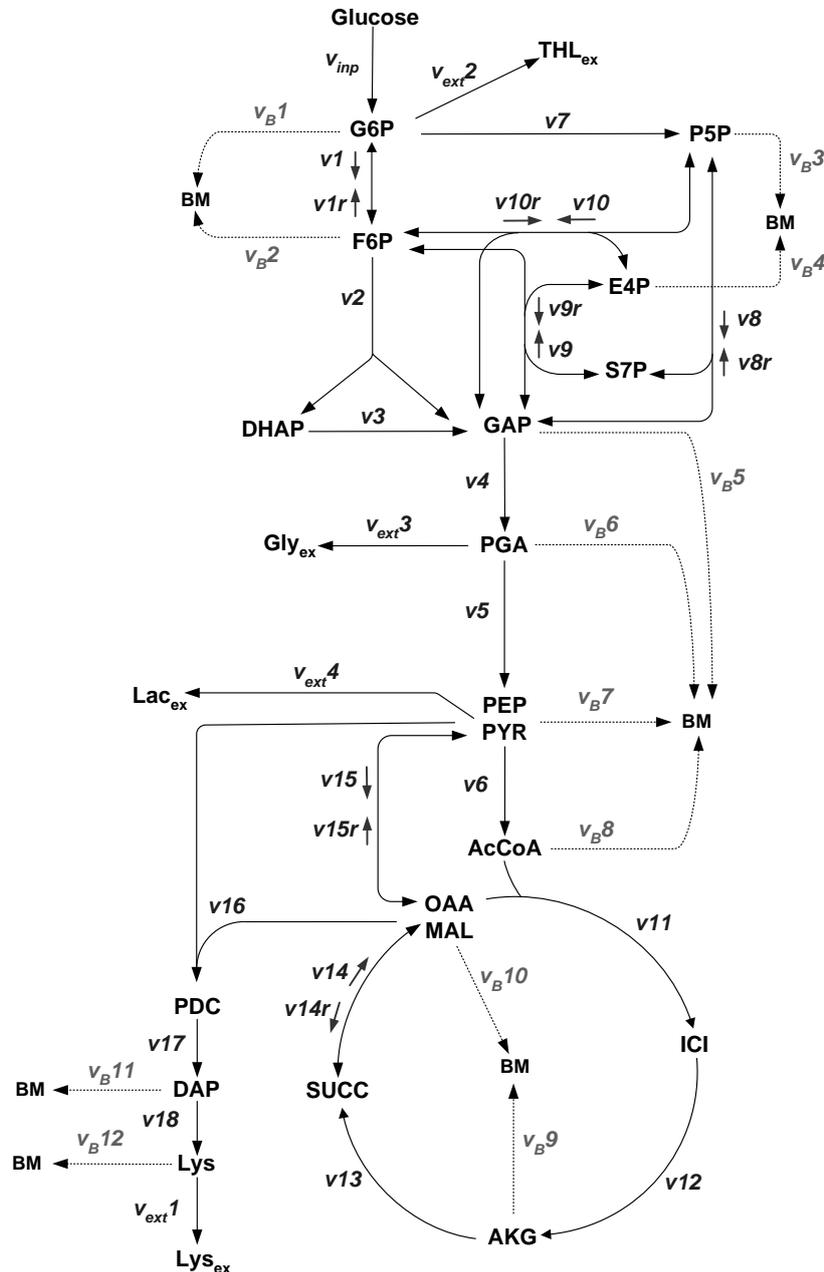
**Tab.VII-2:** Theoretische Flussverteilung in *C. glutamicum* Kombination 2 mit Deletion der Glucose-6-Phosphat-Isomerase (R2r), der Pyruvat-Kinase (R19), der PEP-Carboxylase (R34) sowie der PEP-Carboxykinase (R35r). Die Flüsse sind auf die Kohlenstoffaufnahme normiert und in mol mol<sup>-1</sup> x 100 angegeben.

		Familie 5	Familie 3	Familie 1	Familie 4								Familie 6	Familie 7	Familie 2		
<b>Glucose-Aufnahme</b>																	
Phosphotransferase-System	R1	100,0	91,2	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	
Glucose-Kinase	R72	0,0	8,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
<b>Glykolyse</b>																	
G6P-Isomerase	R2r	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
Phosphofruktokinase	R11	61,5	56,4	56,4	58,4	444,4	58,4	471,4	58,4	444,4	58,4	58,4	57,5	57,3	55,4	213,8	55,4
Fructosebisphosphatase	R12	0,0	0,0	0,0	0,0	386,0	0,0	413,0	0,0	386,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	158,5	0,0
Fructosebisphosphate-Aldolase	R13r	61,5	56,4	56,6	58,4	58,4	58,4	58,4	58,4	58,4	58,4	58,4	57,5	57,3	55,4	55,4	55,4
Triosephosphate-Isomerase	R14r	61,5	56,4	56,6	58,4	58,4	58,4	58,4	58,4	58,4	58,4	58,4	57,5	57,3	55,4	55,4	55,4
Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Kinase	R15r	153,3	139,9	140,4	145,2	145,2	145,2	145,2	145,2	145,2	145,2	145,2	142,7	142,4	137,3	137,3	137,3
PG-Kinase	R16	103,0	139,9	140,4	145,2	145,2	145,2	145,2	145,2	145,2	145,2	145,2	142,7	142,4	137,3	137,3	137,3
PG-Mutase	R17r	103,0	97,2	105,9	104,8	104,8	104,8	104,8	104,8	104,8	104,8	104,8	105,4	105,4	106,6	106,6	106,6
PEP-Hydrolase	R18r	103,0	97,2	105,9	104,8	104,8	104,8	104,8	104,8	104,8	104,8	104,8	105,4	105,4	106,6	106,6	106,6
Pyr-Kinase	R19	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
PYR-DH	R20	38,0	40,5	39,7	86,5	86,5	59,4	59,4	59,4	59,4	59,4	86,5	36,2	36,7	44,4	44,4	44,4
<b>PPW</b>																	
G6P-DH	R3	99,1	98,1	98,1	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5	98,3	98,3	97,9	97,9	97,9
Lactonase	R4	99,1	98,1	98,1	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5	98,3	98,3	97,9	97,9	97,9
Glucuronate-DH	R5	99,1	98,1	98,1	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5	98,5	98,3	98,3	97,9	97,9	97,9
Ribose-5-P-Epimerase	R6r	62,9	59,2	59,3	60,7	60,7	60,7	60,7	60,7	60,7	60,7	60,7	60,0	59,9	58,5	58,5	58,5
Ribose-5-P-Isomerase	R7r	36,1	38,9	38,8	37,8	37,8	37,8	37,8	37,8	37,8	37,8	37,8	38,3	38,4	39,5	39,5	39,5
Transketolase 1	R8r	-32,1	-30,8	-30,9	-31,3	-31,3	-31,3	-31,3	-31,3	-31,3	-31,3	-31,3	-31,1	-31,1	-30,6	-30,6	-30,6
Transaldolase	R9r	32,1	30,8	30,9	31,3	31,3	31,3	31,3	31,3	31,3	31,3	31,3	31,1	31,1	30,6	30,6	30,6
Transketolase 2	R10r	-30,8	-28,4	-28,5	-29,4	-29,4	-29,4	-29,4	-29,4	-29,4	-29,4	-29,4	-28,9	-28,8	-27,9	-27,9	-27,9
<b>TCA-Zyklus</b>																	
CIT-Synthase	R21	23,7	11,3	11,1	36,1	36,1	36,1	36,1	36,1	36,1	36,1	36,1	10,1	10,2	12,4	12,4	12,4
ACO-Hydrolase	R22r	23,7	11,3	11,1	36,1	36,1	36,1	36,1	36,1	36,1	36,1	36,1	10,1	10,2	12,4	12,4	12,4
Aconitase	R23r	23,7	11,3	11,1	36,1	36,1	36,1	36,1	36,1	36,1	36,1	36,1	10,1	10,2	12,4	12,4	12,4
Isocitrate-DH	R24	23,7	11,3	11,1	9,0	9,0	36,1	36,1	36,1	36,1	36,1	9,0	10,1	10,2	12,4	12,4	12,4
Glutamate-DH	R25	102,6	46,1	39,5	46,4	46,4	46,4	46,4	73,4	73,4	459,4	432,4	49,3	56,8	26,5	26,5	184,9
2-OXO-DH	R26	18,1	0,0	0,0	0,0	0,0	27,0	27,0	27,0	27,0	27,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
SUCC-CoA-Synthase	R27r	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	27,0	27,0	0,0	0,0	-386,0	-386,0	0,0	-8,7	0,0	0,0	-158,5
SUCC-DH	R28r	18,1	0,0	0,0	27,0	27,0	27,0	27,0	27,0	27,0	27,0	27,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
FUMARASE	R29r	18,1	0,0	0,0	27,0	27,0	27,0	27,0	27,0	27,0	27,0	27,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
MAL-DH	R30r	-107,4	-82,0	-80,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-85,6	-82,9	-37,1	-37,1	-37,1
<b>Glyoxylat-Zyklus</b>																	
ICI-Lyase	R31	0,0	0,0	0,0	27,0	27,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	27,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
MAL-Synthase	R32	0,0	0,0	0,0	27,0	27,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	27,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Anaplerotische Reaktionen</b>																	
PYR-Carboxylase	R33	179,2	124,1	123,3	63,9	63,9	63,9	63,9	63,9	63,9	63,9	63,9	132,1	128,9	75,2	75,2	75,2
PEP-Carboxylase	R34	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
PEP-Carboxykinase	R35r	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
OAA-Decarboxylase	R36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Malic-Enzyme	R57r	125,5	82,0	80,4	54,1	54,1	27,0	27,0	27,0	27,0	27,0	54,1	85,6	82,9	37,1	37,1	37,1

		Familie 5	Familie 3	Familie 1	Familie 4								Familie 6	Familie 7	Familie 2			
<b>Serin- und C1-Stoffwechsel</b>																		
PG-DH	R41r	44,3	30,7	22,8	30,9	30,9	30,9	30,9	30,9	30,9	30,9	30,9	26,7	26,2	17,7	17,7	17,7	
Phosphoserin-Transaminase	R42r	44,3	30,7	22,8	30,9	30,9	30,9	30,9	30,9	30,9	30,9	30,9	26,7	26,2	17,7	17,7	17,7	
Phosphoserin-Phosphatase	R43	44,3	30,7	22,8	30,9	30,9	30,9	30,9	30,9	30,9	30,9	30,9	26,7	26,2	17,7	17,7	17,7	
M-THF Synthesis 1	R38	22,1	15,4	16,7	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	13,4	13,1	8,8	8,8	8,8	
<b>Met-, Cys- und Lys-Stoffwechsel</b>																		
ASP-Transaminase	R37r	40,2	15,4	16,7	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	22,6	21,8	8,8	8,8	8,8	
Aspartokinase	R47	40,2	15,4	16,7	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	22,6	21,8	8,8	8,8	8,8	
ASP-P-DH	R48	40,2	15,4	16,7	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	22,6	21,8	8,8	8,8	8,8	
HOM-DH	R39	22,1	15,4	16,7	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	13,4	13,1	8,8	8,8	8,8	
HOM-Transacetylase	R40	22,1	15,4	16,7	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	13,4	13,1	8,8	8,8	8,8	
Serine-Transacetylase	R44	22,1	15,4	6,2	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	13,4	13,1	8,8	8,8	8,8	
Cysteine-Synthase	R45	22,1	15,4	6,2	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	13,4	13,1	8,8	8,8	8,8	
Cystathionine-Synthase	R46	22,1	15,4	6,2	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	13,4	13,1	8,8	8,8	8,8	
O-Ac-HOM Sulphydrylase	R49	0,0	0,0	10,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
MET-Synthase (MetE/H)	R52	22,1	15,4	16,7	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	13,4	13,1	8,8	8,8	8,8	
Methionine Exporter	R53	22,1	15,4	16,7	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	13,4	13,1	8,8	8,8	8,8	
Cystathionine-g-Lyase	R54	22,1	15,4	6,2	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	13,4	13,1	8,8	8,8	8,8	
dapA	R64	18,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	9,2	8,7	0,0	0,0	0,0	
dapB	R65r	18,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	9,2	8,7	0,0	0,0	0,0	
ddh	R66r	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-27,0	-27,0	-413,0	-386,0	9,2	0,0	0,0	-158,5	
dapD	R67	18,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	27,0	27,0	413,0	386,0	0,0	8,7	0,0	0,0	158,5	
Succinylidiaminopimelate Transaminase	R68r	18,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	27,0	27,0	413,0	386,0	0,0	8,7	0,0	0,0	158,5	
dapE	R69	18,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	27,0	27,0	413,0	386,0	0,0	8,7	0,0	0,0	158,5	
lysA	R70	18,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	9,2	8,7	0,0	0,0	0,0	
lysE	R71	18,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	9,2	8,7	0,0	0,0	0,0	
<b>Schwefelstoffwechsel</b>																		
Sulfate uptake (ABC-Transporter)	R63	23,2	17,5	18,8	17,2	17,2	17,2	17,2	17,2	17,2	17,2	17,2	15,3	15,0	11,2	11,2	11,2	
ATP-Sulfurylase	R55	22,1	15,4	16,7	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	13,4	13,1	8,8	8,8	8,8	
Sulfite-Reductase	R58	22,1	15,4	16,7	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	13,4	13,1	8,8	8,8	8,8	
<b>Atmung</b>																		
Respiratory chain 1	R59	80,5	78,9	75,3	142,8	142,8	142,8	142,8	142,8	142,8	142,8	142,8	72,8	74,2	96,9	96,9	96,9	
Respiratory chain 2	R60	9,1	0,0	0,0	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
<b>Biomasse-Bildung</b>																		
Biomass Formation	R61	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	
<b>ATP und Acetat</b>																		
ACETAT-kinase	R50	30,9	30,7	22,8	30,9	30,9	30,9	30,9	30,9	30,9	30,9	30,9	26,7	26,2	17,7	17,7	17,7	
Phosphotransacetylase	R51	30,9	30,7	22,8	30,9	30,9	30,9	30,9	30,9	30,9	30,9	30,9	26,7	26,2	17,7	17,7	17,7	
ATP-Hydrolysis	R56	0,0	0,0	0,0	386,0	0,0	413,0	0,0	386,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	158,5	0,0	0,0	
Adenylate Kinase	R62	22,1	15,4	16,7	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	13,4	13,1	8,8	8,8	8,8	

### 3. Stöchiometrische Netzwerke zur Flussanalyse

#### 3.1 Stöchiometrisches Netzwerk zur Metabolischen Flussanalyse von *C. glutamicum lysC<sup>fbr</sup>*



**Abb.VII-1:** Stöchiometrisches Netzwerk des Zentralstoffwechsels zur Metabolischen Flussanalyse von *C. glutamicum lysC<sup>fbr</sup>*. Das Netzwerk beinhaltet für 16 intrazelluläre Metabolite Stoffbilanzen, welche insgesamt 24 mittels Parameterschätzung bestimmbare Flüsse ( $v$ ,  $v_r$ ), 4 extrazelluläre Flüsse ( $v_{inp}$ ,  $v_{ext}$ ) und 12 anobole ( $v_B$ ) Flüsse umfassen.

Die stöchiometrischen Bilanzen für die 16 in Abbildung VII-1 dargestellten Metabolite sind wie folgt definiert:

$$\mathbf{G6P:} \quad (v_1+v_7+2*v_{\text{ext}2}+v_{B1})-(v_{1r}+v_{\text{inp}}) = 0$$

$$\mathbf{F6P:} \quad (v_{1r}+v_2+v_9r+v_{10r}+v_{B2})-(v_1+v_9+v_{10}) = 0$$

$$\mathbf{DHAP:} \quad (v_3+v_{\text{ext}3})-(v_2) = 0$$

$$\mathbf{GAP:} \quad (v_4+v_8r+v_9+v_{10r}+v_{B5})-(v_2+v_3+v_8+v_9r+v_{10}) = 0$$

$$\mathbf{PGA:} \quad (v_5+v_{\text{ext}4}+v_{B6})-(v_4) = 0$$

$$\mathbf{PEP/PYR:} \quad (v_6+v_{15}+v_{16}+v_{\text{ext}5}+v_{B7})-(v_5+v_{15r}) = 0$$

$$\mathbf{P5P:} \quad (2*v_8+v_{10}+v_{B3})-(v_7+2*v_8r+v_{10r}) = 0$$

$$\mathbf{S7P:} \quad (v_8r+v_9)-(v_8+v_9r) = 0$$

$$\mathbf{E4P:} \quad (v_9r+v_{10}+v_{B4})-(v_9+v_{10r}) = 0$$

$$\mathbf{OAA:} \quad (v_{11}+v_{14r}+v_{15r}+v_{16}+v_{B10})-(v_{14}+v_{15}) = 0$$

$$\mathbf{AcCoA:} \quad (v_{11}+v_{B8})-(v_6) = 0$$

$$\mathbf{ICI:} \quad (v_{12})-(v_{11}) = 0$$

$$\mathbf{AKG:} \quad (v_{13}+v_{B9})-(v_{12}) = 0$$

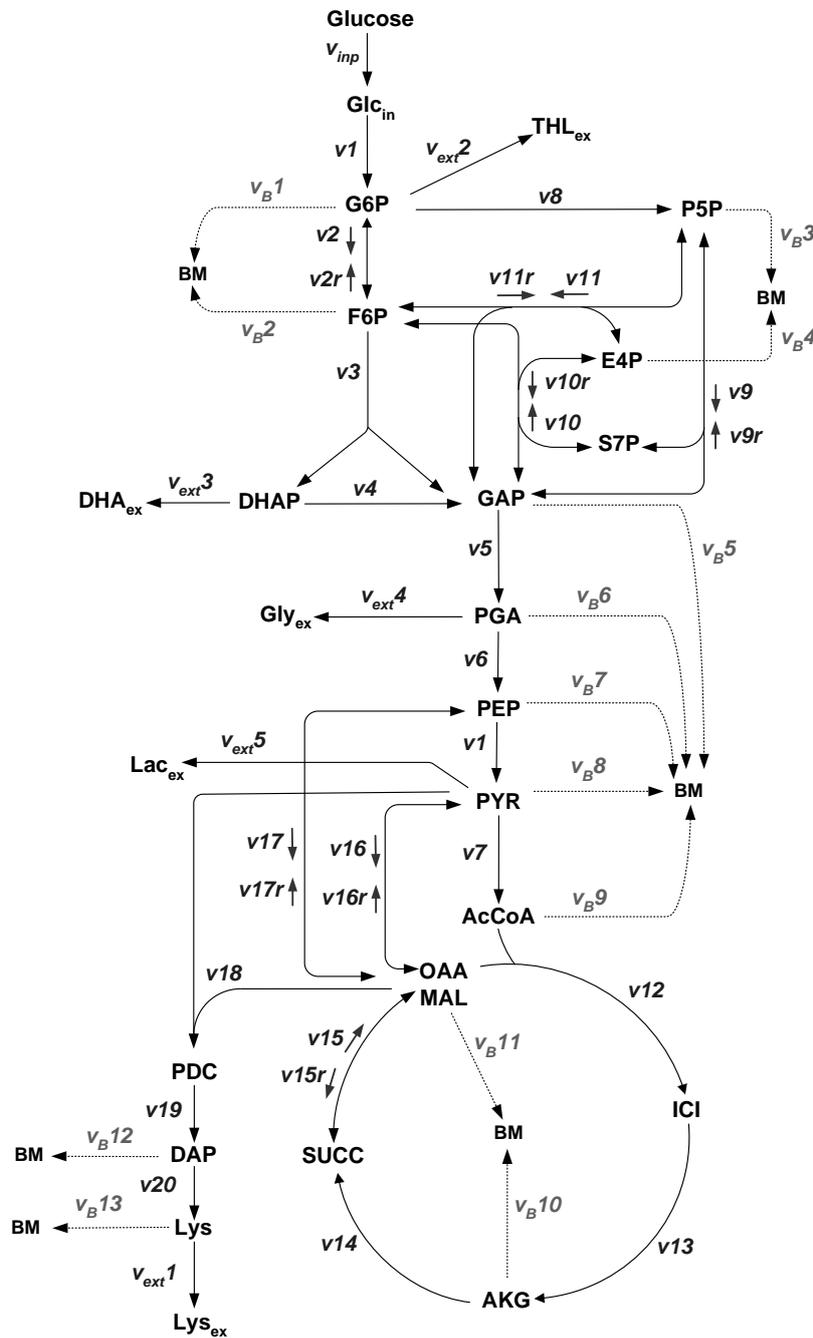
$$\mathbf{SUCC:} \quad (v_{14})-(v_{13}+v_{14r}) = 0$$

$$\mathbf{PDC:} \quad (v_{17})-(v_{16}) = 0$$

$$\mathbf{DAP:} \quad (v_{18}+v_{B11})-(v_{17}) = 0$$

$$\mathbf{LYS:} \quad (v_{\text{ext}1}+v_{B12})-(v_{18}) = 0$$

### 3.2 Stöchiometrisches Netzwerk zur Metabolischen Flussanalyse von *C. glutamicum lysC<sup>fbr</sup>Δpyk*



**Abb.VII-2:** Stöchiometrisches Netzwerk des Zentralstoffwechsels zur Metabolischen Flussanalyse von *C. glutamicum lysC<sup>fbr</sup>Δpyk*. Das Netzwerk beinhaltet für 18 intrazelluläre Metabolite Stoffbilanzen, welche insgesamt 27 mittels Parameterschätzung bestimmbare Flüsse ( $v$ ,  $v_r$ ), 5 extrazelluläre Flüsse ( $v_{inp}$ ,  $v_{ext}$ ) und 13 anobole ( $v_B$ ) Flüsse umfassen.

Die stöchiometrischen Bilanzen für die 18 in Abbildung VII-2 dargestellten Metabolite sind wie folgt definiert:

$$\mathbf{GLCin:} \quad (v_1) - (v_{inp}) = 0$$

$$\mathbf{PEP:} \quad (v_1 + v_{17} + v_{B7}) - (v_6 + v_{17r}) = 0$$

$$\mathbf{G6P:} \quad (v_2 + v_8 + 2 \cdot v_{ext2} + v_{B1}) - (v_1 + v_{2r}) = 0$$

$$\mathbf{F6P:} \quad (v_{2r} + v_3 + v_{10r} + v_{11r} + v_{B2}) - (v_2 + v_{10} + v_{11}) = 0$$

$$\mathbf{DHAP:} \quad (v_4 + v_{ext3}) - (v_3) = 0$$

$$\mathbf{GAP:} \quad (v_5 + v_{9r} + v_{10} + v_{11r} + v_{B5}) - (v_3 + v_4 + v_9 + v_{10r} + v_{11}) = 0$$

$$\mathbf{PGA:} \quad (v_6 + v_{ext4} + v_{B6}) - (v_5) = 0$$

$$\mathbf{PYR:} \quad (v_7 + v_{16} + v_{18} + v_{ext5} + v_{B8}) - (v_1 + v_{16r}) = 0$$

$$\mathbf{P5P:} \quad (2 \cdot v_9 + v_{11} + v_{B3}) - (v_8 + 2 \cdot v_{9r} + v_{11r}) = 0$$

$$\mathbf{S7P:} \quad (v_{9r} + v_{10}) - (v_9 + v_{10r}) = 0$$

$$\mathbf{E4P:} \quad (v_{10r} + v_{11} + v_{B4}) - (v_{10} + v_{11r}) = 0$$

$$\mathbf{OAA:} \quad (v_{12} + v_{15r} + v_{16r} + v_{17r} + v_{18} + v_{B11}) - (v_{15} + v_{16} + v_{17}) = 0$$

$$\mathbf{ACA:} \quad (v_{12} + v_{B9}) - (v_7) = 0$$

$$\mathbf{ICT:} \quad (v_{13}) - (v_{12}) = 0$$

$$\mathbf{AKG:} \quad (v_{14} + v_{B10}) - (v_{13}) = 0$$

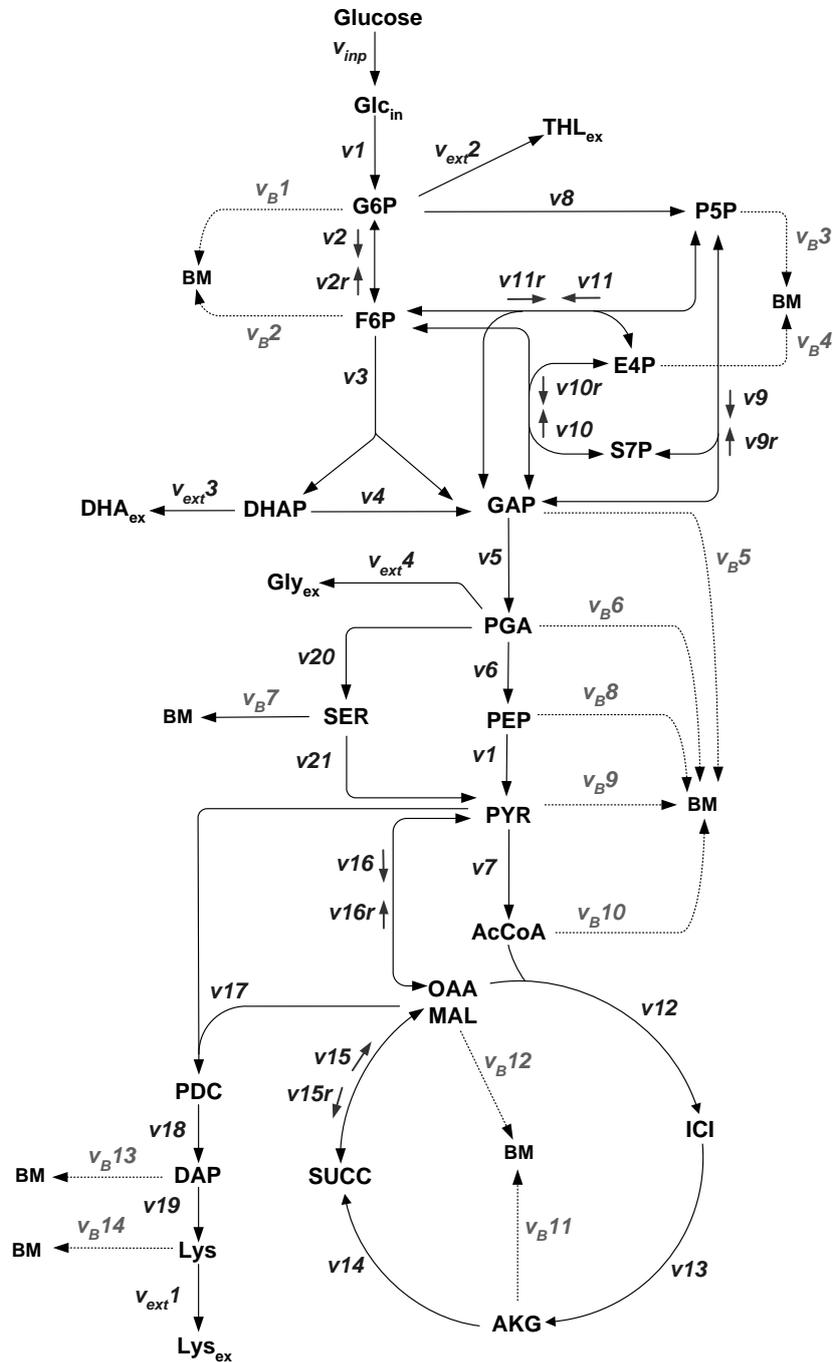
$$\mathbf{SUCC:} \quad (v_{15}) - (v_{14} + v_{15r}) = 0$$

$$\mathbf{PDC:} \quad (v_{19}) - (v_{18}) = 0$$

$$\mathbf{DAP:} \quad (v_{20} + v_{B12}) - (v_{19}) = 0$$

$$\mathbf{LYS:} \quad (v_{ext1} + v_{B13}) - (v_{20}) = 0$$

### 3.3 Stöchiometrisches Netzwerk zur Metabolischen Flussanalyse von *C. glutamicum lysC<sup>fbr</sup> Δpyk Δppc Δpyk*



**Abb.VII-3:** Stöchiometrisches Netzwerk des Zentralstoffwechsels zur Metabolischen Flussanalyse von *C. glutamicum lysC<sup>fbr</sup> Δpyk Δppc Δpyk*. Das Netzwerk beinhaltet für 19 intrazelluläre Metabolite Stoffbilanzen, welche insgesamt 27 mittels Parameterschätzung bestimmbare Flüsse ( $v$ ,  $v_r$ ), 4 extrazelluläre Flüsse ( $v_{inp}$ ,  $v_{ext}$ ) und 14 anobole ( $v_B$ ) Flüsse umfassen.

Die stöchiometrischen Bilanzen für die 19 in Abbildung VII-3 dargestellten Metabolite sind wie folgt definiert:

$$\mathbf{GLCin:} \quad (v_1) - (v_{inp}) = 0$$

$$\mathbf{PEP:} \quad (v_1 + v_{B8}) - (v_6) = 0$$

$$\mathbf{G6P:} \quad (v_2 + v_8 + 2 \cdot v_{ext2} + v_{B1}) - (v_1 + v_{2r}) = 0$$

$$\mathbf{F6P:} \quad (v_{2r} + v_3 + v_{10r} + v_{11r} + v_{B2}) - (v_2 + v_{10} + v_{11}) = 0$$

$$\mathbf{DHAP:} \quad (v_4 + v_{ext3}) - (v_3) = 0$$

$$\mathbf{GAP:} \quad (v_5 + v_{9r} + v_{10} + v_{11r} + v_{B5}) - (v_3 + v_4 + v_9 + v_{10r} + v_{11}) = 0$$

$$\mathbf{PGA:} \quad (v_6 + v_{20} + v_{ext4} + v_{B6}) - (v_5) = 0$$

$$\mathbf{PYR:} \quad (v_7 + v_{16} + v_{17} + v_{B9}) - (v_1 + v_{16r} + v_{21}) = 0$$

$$\mathbf{P5P:} \quad (2 \cdot v_9 + v_{11} + s_3 \cdot Y_{XS}) - (v_8 + 2 \cdot v_{9r} + v_{11r}) = 0$$

$$\mathbf{S7P:} \quad (v_{9r} + v_{10}) - (v_9 + v_{10r}) = 0$$

$$\mathbf{E4P:} \quad (v_{10r} + v_{11} + v_{B4}) - (v_{10} + v_{11r}) = 0$$

$$\mathbf{OAA:} \quad (v_{12} + v_{15r} + v_{16r} + v_{17} + v_{B12}) - (v_{15} + v_{16}) = 0$$

$$\mathbf{AcCoA:} \quad (v_{12} + v_{B10}) - (v_7) = 0$$

$$\mathbf{ICT:} \quad (v_{13}) - (v_{12}) = 0$$

$$\mathbf{AKG:} \quad (v_{14} + v_{B11}) - (v_{13}) = 0$$

$$\mathbf{SUCC:} \quad (v_{15}) - (v_{14} + v_{15r}) = 0$$

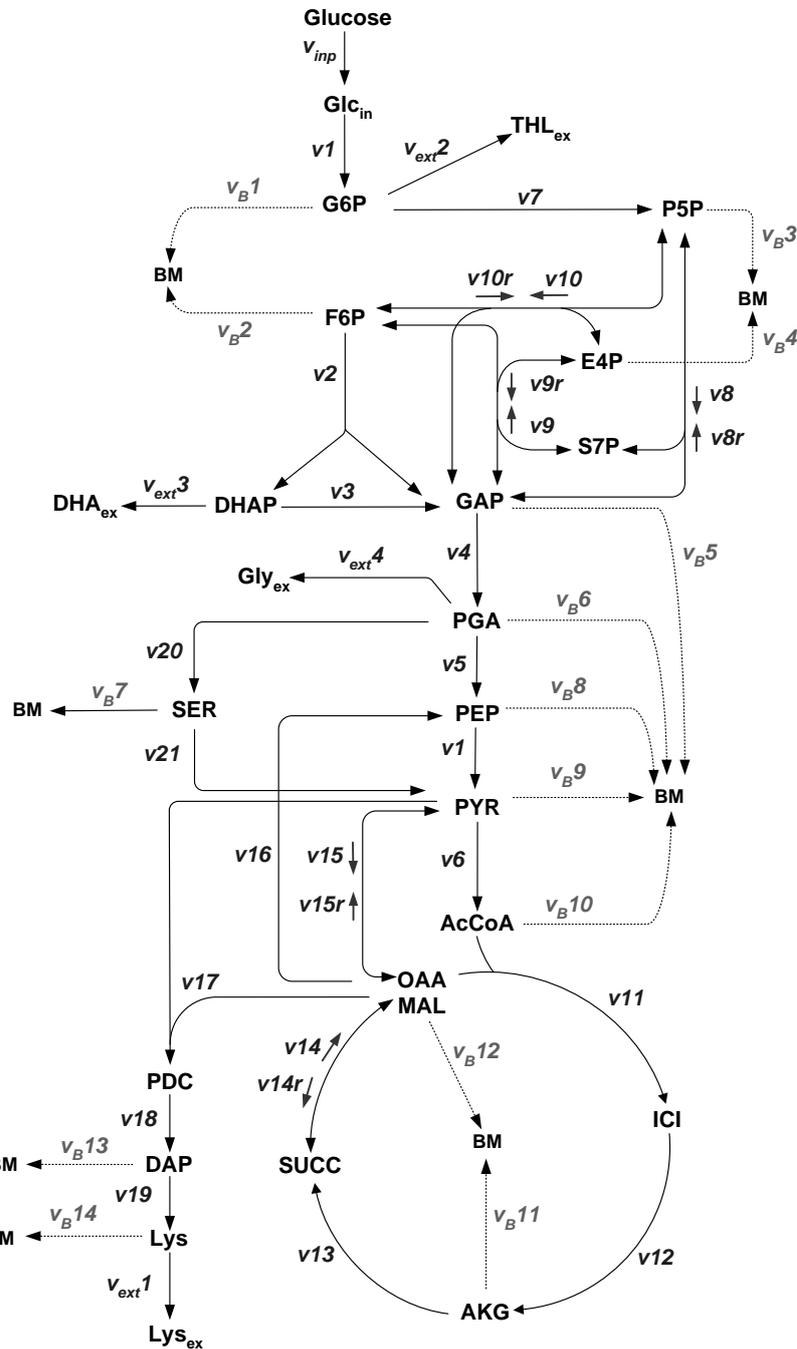
$$\mathbf{PDC:} \quad (v_{18}) - (v_{17}) = 0$$

$$\mathbf{DAP:} \quad (v_{19} + v_{B13}) - (v_{18}) = 0$$

$$\mathbf{SER:} \quad (v_{21} + v_{B7}) - (v_{20}) = 0$$

$$\mathbf{LYS:} \quad (v_{ext1} + v_{B14}) - (v_{19}) = 0$$

### 3.4 Stöchiometrisches Netzwerk zur Metabolischen Flussanalyse von *C. glutamicum lysC<sup>fbr</sup> Δpyk Δppc Δpgi*



**Abb.VII-4:** Stöchiometrisches Netzwerk des Zentralstoffwechsels zur Metabolischen Flussanalyse von *C. glutamicum lysC<sup>fbr</sup> Δpyk Δppc Δpgi*. Das Netzwerk beinhaltet für 19 intrazelluläre Metabolite Stoffbilanzen, welche insgesamt 26 mittels Parameterschätzung bestimmbare Flüsse ( $v$ ,  $v_r$ ), 4 extrazelluläre Flüsse ( $v_{inp}$ ,  $v_{ext}$ ) und 14 anobole ( $v_B$ ) Flüsse umfassen.

Die stöchiometrischen Bilanzen für die 19 in Abbildung VII-4 dargestellten Metabolite sind wie folgt definiert:

$$\mathbf{GLCin:} \quad (v_1) - (v_{inp}) = 0$$

$$\mathbf{PEP:} \quad (v_1 + v_{B8}) - (v_5 + v_{16}) = 0$$

$$\mathbf{F6P:} \quad (v_2 + v_{9r} + v_{10r} + v_{B2}) - (v_9 + v_{10}) = 0$$

$$\mathbf{DHAP:} \quad (v_3 + v_{ext3}) - (v_2) = 0$$

$$\mathbf{GAP:} \quad (v_4 + v_{8r} + v_9 + v_{10r} + v_{B5}) - (v_2 + v_3 + v_8 + v_{9r} + v_{10}) = 0$$

$$\mathbf{PGA:} \quad (v_5 + v_{20} + v_{ext4} + v_{B6}) - (v_4) = 0$$

$$\mathbf{PYR:} \quad (v_6 + v_{15} + v_{17} + v_{B9}) - (v_1 + v_{15r} + v_{21}) = 0$$

$$\mathbf{G6P:} \quad (v_7 + 2 \cdot v_{ext2} + v_{B1}) - (v_1) = 0$$

$$\mathbf{P5P:} \quad (2 \cdot v_8 + v_{10} + v_{B3}) - (v_7 + 2 \cdot v_{8r} + v_{10r}) = 0$$

$$\mathbf{S7P:} \quad (v_{8r} + v_9) - (v_8 + v_{9r}) = 0$$

$$\mathbf{E4P:} \quad (v_{9r} + v_{10} + v_{B4}) - (v_9 + v_{10r}) = 0$$

$$\mathbf{OAA:} \quad (v_{11} + v_{14r} + v_{15r} + v_{16} + v_{17} + v_{B12}) - (v_{14} + v_{15}) = 0$$

$$\mathbf{AcCoA:} \quad (v_{11} + v_{B10}) - (v_6) = 0$$

$$\mathbf{ICT:} \quad (v_{12}) - (v_{11}) = 0$$

$$\mathbf{AKG:} \quad (v_{13} + v_{B11}) - (v_{12}) = 0$$

$$\mathbf{SUCC:} \quad (v_{14}) - (v_{13} + v_{14r}) = 0$$

$$\mathbf{PDC:} \quad (v_{18}) - (v_{17}) = 0$$

$$\mathbf{DAP:} \quad (v_{19} + v_{B13}) - (v_{18}) = 0$$

$$\mathbf{SER:} \quad (v_{21} + v_{B7}) - (v_{20}) = 0$$

$$\mathbf{LYS:} \quad (v_{ext1} + v_{B14}) - (v_{19}) = 0$$



Die stöchiometrischen Bilanzen für die 19 in Abbildung VII-5 dargestellten Metabolite sind wie folgt definiert:

$$\mathbf{GLCin:} \quad (v_1) - (v_{inp}) = 0$$

$$\mathbf{PEP:} \quad (v_1 + v_{B8}) - (v_5) = 0$$

$$\mathbf{F6P:} \quad (v_2 + v_{9r} + v_{10r} + v_{B2}) - (v_9 + v_{10}) = 0$$

$$\mathbf{DHAP:} \quad (v_3 + v_{ext3}) - (v_2) = 0$$

$$\mathbf{GAP:} \quad (v_4 + v_{8r} + v_9 + v_{10r} + v_{B5}) - (v_2 + v_3 + v_8 + v_{9r} + v_{10}) = 0$$

$$\mathbf{3PG:} \quad (v_5 + v_{20} + v_{ext4} + v_{B6}) - (v_4) = 0$$

$$\mathbf{PYR:} \quad (v_6 + v_{15} + v_{16} + v_{B9}) - (v_1 + v_{15r} + v_{21}) = 0$$

$$\mathbf{G6P:} \quad (v_7 + 2 \cdot v_{ext2} + v_{B1}) - (v_1) = 0$$

$$\mathbf{P5P:} \quad (2 \cdot v_8 + v_{10} + v_{B3}) - (v_7 + 2 \cdot v_{8r} + v_{10r}) = 0$$

$$\mathbf{S7P:} \quad (v_{8r} + v_9) - (v_8 + v_{9r}) = 0$$

$$\mathbf{E4P:} \quad (v_{9r} + v_{10} + v_{B4}) - (v_9 + v_{10r}) = 0$$

$$\mathbf{OAA:} \quad (v_{11} + v_{14r} + v_{15r} + v_{16} + v_{B12}) - (v_{14} + v_{15}) = 0$$

$$\mathbf{AcCoA:} \quad (v_{11} + v_{B10}) - (v_6) = 0$$

$$\mathbf{ICI:} \quad (v_{12}) - (v_{11}) = 0$$

$$\mathbf{AKG:} \quad (v_{13} + v_{19} + v_{B11}) - (v_{12}) = 0$$

$$\mathbf{SUCC:} \quad (v_{14}) - (v_{13} + v_{14r}) = 0$$

$$\mathbf{PDC:} \quad (v_{17}) - (v_{16}) = 0$$

$$\mathbf{DAP:} \quad (v_{18} + v_{B13}) - (v_{17}) = 0$$

$$\mathbf{SER:} \quad (v_{21} + v_{B7}) - (v_{20}) = 0$$

$$\mathbf{LYS:} \quad (v_{ext1} + v_{B14}) - (v_{18}) = 0$$

$$\mathbf{GLU:} \quad (v_{ext5} + v_{B15}) - (v_{19}) = 0$$

#### 4. Metabolische Flüsse

**Tab.VII-3:** Relative Werte der intrazellulären sowie der gemessenen extrazellulären Stoffflüsse als Dezimalzahl bezogen auf die Glucoseaufnahme (1,000) sowie berechnete Reversibilitäten ( $\zeta$ ) bei Wachstum von *C. glutamicum lysC<sup>fb</sup>* auf CG 12 ½ - Minimalmedium mit Glucose. Die Reversibilität wurde definiert als Quotient aus Rückfluss und Nettofluss. Die Intervalle für 90 % Konfidenz wurden aus 100 Monte-Carlo Simulation ermittelt. Die spezifische Glucoseaufnahme  $q_s$  betrug 5,14 mmol/g/h.

<b>Nettofluss</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Intervall für 90 % Konfidenz</b>	
v1	0,457	0,483	0,432
v2	0,738	0,740	0,736
v3	0,738	0,740	0,736
v4	1,600	1,601	1,598
v5	1,499	1,502	1,497
v6	0,835	0,842	0,829
v7	0,504	0,510	0,498
v8	0,153	0,295	0,011
v9	0,153	0,190	0,116
v10	0,133	0,249	0,017
v11	0,618	0,627	0,609
v12	0,618	0,627	0,609
v13	0,525	0,535	0,516
v14	0,525	0,691	0,360
v15	0,314	0,385	0,242
vext1	0,095	0,096	0,094
vext2	0,012	0,012	0,012
vext3	0,005	0,005	0,005
vext4	0,018	0,018	0,017
Y <sub>xs</sub>	0,074	0,075	0,073
<b>Reversibilität</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Intervall für 90 % Konfidenz</b>	
$\zeta$ v1	1,930	2,044	1,817
$\zeta$ v8	2,880	5,630	0,130
$\zeta$ v9	1,649	2,082	1,217
$\zeta$ v10	1,968	3,789	0,147
$\zeta$ v14	3,013	4,036	1,991
$\zeta$ v15	1,111	1,411	0,810

**Tab.VII-4:** Relative Werte der intrazellulären sowie der gemessenen extrazellulären Stoffflüsse als Dezimalzahl bezogen auf die Glucoseaufnahme (1,000) sowie berechnete Reversibilitäten ( $\zeta$ ) bei Wachstum von *C. glutamicum lysC<sup>fab</sup> Δpyk* auf CG 12 ½ - Minimalmedium mit Glucose. Die Reversibilität wurde definiert als Quotient aus Rückfluss und Nettofluss. Die Intervalle für 90 % Konfidenz wurden aus 100 Monte-Carlo Simulation ermittelt. Die spezifische Glucoseaufnahme  $q_s$  betrug 4,5 mmol/g/h.

<b>Nettofluss</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Intervall für 90 % Konfidenz</b>	
v1	1,000	n.b.	n.b.
v2	0,521	0,563	0,479
v3	0,747	0,749	0,745
v4	0,715	0,717	0,713
v5	1,567	1,571	1,564
v6	1,469	1,474	1,464
v7	0,818	0,830	0,806
v8	0,445	0,450	0,439
v9	0,134	0,373	-0,105
v10	0,134	0,223	0,045
v11	0,115	0,323	-0,094
v12	0,609	0,624	0,595
v13	0,609	0,624	0,595
v14	0,520	0,536	0,504
v15	0,520	0,692	0,348
v16	-0,120	0,039	-0,279
v17	0,431	0,562	0,301
v18	0,127	0,129	0,125
v19	0,127	0,129	0,125
v20	0,115	0,117	0,113
vext1	0,100	0,102	0,099
vext2	0,010	0,010	0,010
vext3	0,032	0,033	0,032
vext4	0,006	0,006	0,006
vext5	0,010	0,011	0,010
Y <sub>xs</sub>	0,071	0,072	0,070
<b>Reversibilität</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Intervall für 90 % Konfidenz</b>	
$\zeta$ v2	1,963	2,132	1,794
$\zeta$ v9	6,855	19,183	-5,474
$\zeta$ v10	1,929	3,297	0,561
$\zeta$ v11	6,013	17,026	-5,000
$\zeta$ v15	1,391	1,905	0,877
$\zeta$ v16	-5,685	1,890	-13,259
$\zeta$ v17	1,072	1,461	0,684

**Tab.VII-5:** Relative Werte der intrazellulären sowie der gemessenen extrazellulären Stoffflüsse als Dezimalzahl bezogen auf die Glucoseaufnahme (1,000) sowie berechnete Reversibilitäten ( $\zeta$ ) bei Wachstum von *C. glutamicum lysC<sup>br</sup> $\Delta$ pyk $\Delta$ ppc $\Delta$ pck* auf CG 12 ½ - Minimalmedium mit Glucose. Die Reversibilität wurde definiert als Quotient aus Rückfluss und Nettofluss. Die Intervalle für 90 % Konfidenz wurden aus 100 Monte-Carlo Simulation ermittelt. Die spezifische Glucoseaufnahmerate  $q_s$  betrug 4,8 mmol/g/h.

<b>Nettofluss</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Intervall für 90 % Konfidenz</b>	
v1	1,000	n.b.	n.b.
v2	0,245	0,247	0,242
v3	0,676	0,677	0,675
v4	0,628	0,629	0,626
v5	1,513	1,516	1,510
v6	1,031	1,031	1,031
v7	0,944	0,951	0,938
v8	0,733	0,734	0,732
v9	0,232	0,688	-0,223
v10	0,232	0,446	0,019
v11	0,217	0,245	0,188
v12	0,773	0,781	0,765
v13	0,773	0,781	0,765
v14	0,700	0,708	0,691
v15	0,700	0,767	0,632
v16	0,238	0,282	0,194
v17	0,087	0,087	0,087
v18	0,087	0,087	0,087
v19	0,077	0,077	0,077
v20	0,417	0,421	0,414
v21	0,404	0,408	0,400
vext1	0,065	0,065	0,065
vext2	0,005	0,006	0,005
vext3	0,048	0,048	0,048
vext4	0,002	0,002	0,002
Y <sub>xs</sub>	0,058	0,059	0,058
<b>Reversibilität</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Intervall für 90 % Konfidenz</b>	
$\zeta$ v2	0,972	0,982	0,961
$\zeta$ v9	7,927	23,533	-7,679
$\zeta$ v10	2,620	5,117	0,123
$\zeta$ v11	1,797	2,053	1,542
$\zeta$ v15	0,270	0,341	0,198
$\zeta$ v16	0,465	0,623	0,308

**Tab.VII-6:** Relative Werte der intrazellulären sowie der gemessenen extrazellulären Stoffflüsse als Dezimalzahl bezogen auf die Glucoseaufnahme (1,000) sowie berechnete Reversibilitäten ( $\zeta$ ) bei Wachstum von *C. glutamicum lysC<sup>fb</sup> $\Delta$ pyk $\Delta$ ppc $\Delta$ pgi* auf CG 12 ½ - Minimalmedium mit Glucose. Die Reversibilität wurde definiert als Quotient aus Rückfluss und Nettofluss. Die Intervalle für 90 % Konfidenz wurden aus 100 Monte-Carlo Simulation ermittelt. Die spezifische Glucoseaufnahmerate  $q_s$  betrug 2,82 mmol/g/h.

Nettofluss	Mittelwert	Intervall für 90 % Konfidenz	
v1	1,000	n.b.	n.b.
v2	0,593	0,593	0,593
v3	0,579	0,579	0,579
v4	1,462	1,462	1,462
v5	0,571	0,588	0,554
v6	0,826	0,826	0,825
v7	0,973	0,973	0,973
v8	0,313	0,322	0,304
v9	0,313	0,503	0,122
v10	0,298	0,308	0,287
v11	0,659	0,659	0,658
v12	0,659	0,659	0,658
v13	0,588	0,588	0,587
v14	0,588	0,768	0,408
v15	0,733	0,758	0,709
v16	0,460	0,477	0,442
v17	0,127	0,127	0,127
v18	0,127	0,127	0,127
v19	0,117	0,117	0,117
v20	0,830	0,847	0,813
v21	0,817	0,834	0,800
vext1	0,106	0,106	0,106
vext2	0,008	0,008	0,008
vext3	0,014	0,014	0,014
vext4	0,001	0,001	0,001
Y <sub>xs</sub>	0,057	0,057	0,057
Reversibilität	Mittelwert	Intervall für 90 % Konfidenz	
$\zeta$ v8	0,267	0,289	0,245
$\zeta$ v9	2,288	3,746	0,831
$\zeta$ v10	1,644	1,706	1,583
$\zeta$ v14	4,728	6,194	3,263
$\zeta$ v15	0,325	0,358	0,292

**Tab.VII-7:** Relative Werte der intrazellulären sowie der gemessenen extrazellulären Stoffflüsse als Dezimalzahl bezogen auf die Glucoseaufnahme (1,000) sowie berechnete Reversibilitäten ( $\zeta$ ) bei Wachstum von *C. glutamicum lysC<sup>fb</sup> $\Delta$ pyk $\Delta$ ppc $\Delta$ pck $\Delta$ pgi* auf CG 12 ½ - Minimalmedium mit Glucose. Die Reversibilität wurde definiert als Quotient aus Rückfluss und Nettofluss. Die Intervalle für 90 % Konfidenz wurden aus 100 Monte-Carlo Simulation ermittelt. Die spezifische Glucoseaufnahmerate  $q_s$  betrug 2,54 mmol/g/h.

Nettofluss	Mittelwert	Intervall für 90 % Konfidenz	
v1	1.000	n.b.	n.b.
v2	0,575	0,575	0,575
v3	0,560	0,560	0,560
v4	1,416	1,416	1,416
v5	1,033	1,033	1,033
v6	0,741	0,741	0,741
v7	0,955	0,955	0,955
v8	0,305	0,353	0,258
v9	0,305	0,309	0,302
v10	0,289	0,411	0,166
v11	0,557	0,557	0,557
v12	0,557	0,557	0,557
v13	0,478	0,478	0,478
v14	0,478	0,479	0,476
v15	0,679	0,681	0,676
v15r	0,390	0,392	0,388
v16	0,126	0,126	0,126
v17	0,126	0,126	0,126
v18	0,115	0,115	0,115
v19	0,024	0,024	0,024
v20	0,315	0,315	0,315
v21	0,301	0,301	0,301
vext1	0,102	0,102	0,102
vext2	0,016	0,016	0,016
vext3	0,014	0,015	0,014
vext4	0,001	0,001	0,001
vext5	0,001	0,001	0,001
Y <sub>xs</sub>	0,063	0,063	0,063
Reversibilität	Mittelwert	Intervall für 90 % Konfidenz	
$\zeta$ v8	2.297	2.667	1.926
$\zeta$ v9	0,296	0,304	0,288
$\zeta$ v10	16,761	23,884	9,639
$\zeta$ v14	0,013	0,015	0,010

## 5. Massenisotopomerverteilungen

**Tab.VII-8:** In den Simulationen berechnete sowie experimentell bestimmte Markierungsverteilungen proteinogener Aminosäuren aus Biomassehydrolysaten sowie von extrazellulärer Trehalose von *C. glutamicum lysc<sup>fb</sup>*, bei Wachstum auf CG 12 ½ - Minimalmedium im Schüttelkolben mit 99 % [1-<sup>13</sup>C]-Glucose. Die experimentellen Daten stammen aus 2 Parallelkolben.

Analysierte Metabolite	relative Massenisotopomerfraktionen						
	M <sub>0</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>	M <sub>6</sub>
<b>Ala(m/z 260)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0.659	0.323	0.018	0.000			
gemessen <sup>b</sup>	0.661	0.322	0.016	0.001			
	0.663	0.323	0.014	0.001			
<b>Ser (m/z 390)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0.672	0.317	0.012	0.000			
gemessen <sup>b</sup>	0.670	0.318	0.012	0.001			
	0.671	0.318	0.010	0.001			
<b>Glu (m/z 432)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0.387	0.429	0.160	0.023	0.001	0.000	
gemessen <sup>b</sup>	0.381	0.424	0.165	0.026	0.003	0.002	
	0.380	0.424	0.166	0.026	0.002	0.001	
<b>Val (m/z 288)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0.453	0.424	0.115	0.008	0.000	0.000	
gemessen <sup>b</sup>	0.458	0.421	0.114	0.007	0.000	0.000	
	0.459	0.423	0.112	0.006	0.000	0.000	
<b>Thr (m/z 404)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0.506	0.398	0.091	0.006	0.000		
gemessen <sup>b</sup>	0.507	0.400	0.089	0.003	0.000		
	0.508	0.400	0.089	0.004	0.000		
<b>Gly (m/z 246)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0.956	0.043	0.001				
gemessen <sup>b</sup>	0.956	0.042	0.003				
	0.956	0.041	0.003				
<b>Asp (m/z 418)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0.506	0.398	0.091	0.006	0.000		
gemessen <sup>b</sup>	0.503	0.394	0.089	0.010	0.004		
	0.506	0.396	0.089	0.008	0.002		
<b>Leu (m/z 200)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0.351	0.432	0.185	0.031	0.001	0.000	
gemessen <sup>b</sup>	0.334	0.420	0.204	0.039	0.003	0.001	
	0.353	0.420	0.190	0.034	0.002	0.001	
<b>Phe (m/z 336)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0.360	0.422	0.179	0.035	0.004	0.000	0.000

gemessen <sup>b</sup>	0,361	0,415	0,174	0,032	0,005	0,004	0,003
	0,361	0,418	0,174	0,032	0,004	0,003	0,002
<b>Tyr (<i>m/z</i> 466)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0,360	0,422	0,179	0,035	0,004	0,000	0,000
gemessen <sup>b</sup>	0,351	0,401	0,168	0,040	0,008	0,012	0,006
	0,359	0,410	0,172	0,032	0,006	0,006	0,004
<b>Arg (<i>m/z</i> 442)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0,302	0,420	0,219	0,053	0,006	0,000	0,000
gemessen <sup>b</sup>	0,297	0,393	0,213	0,057	0,018	0,016	0,007
	0,302	0,401	0,215	0,055	0,013	0,009	0,004
<b>THL (<i>m/z</i> 361)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0,112	0,815	0,069	0,004	0,000	0,000	0,000
gemessen <sup>b</sup>	0,106	0,817	0,072	0,004	0,000	0,000	0,000
	0,107	0,815	0,072	0,005	0,000	0,000	0,000

<sup>a</sup> Simulierte Werte enthalten die zu den berechneten Flüssen korrespondierenden Markierungsverteilungen.

<sup>b</sup> Gemessene Werte wurden aus der GC/MS Analytik der TBDMS-Derivate der Aminosäuren und des TMS-Derivates von Trehalose erhalten.

M<sub>0</sub> repräsentiert die unmarkierte Massenisotopomerfraktion, M<sub>1</sub> die einfach-markierte Massenisotopomerfraktion usw.

**Tab.VII-9:** In den Simulationen berechnete sowie experimentell bestimmte Markierungsverteilungen proteinogener Aminosäuren aus Biomassehydrolysaten von *C. glutamicum lysc<sup>br</sup>Δpyk*, bei Wachstum auf CG 12 ½ - Minimalmedium im Schüttelkolben mit 99 % [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ]. Die experimentellen Daten stammen aus 2 Parallelkolben.

Analysierte Metabolite	relative Massenisotopomerfraktionen						
	M <sub>0</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>	M <sub>6</sub>
<b>Ala(m/z 260)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0.645	0.327	0.027	0.001			
gemessen <sup>b</sup>	0.677	0.310	0.013	0.001			
	0.676	0.310	0.014	0.001			
<b>Ser (m/z 390)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0.668	0.314	0.017	0.000			
gemessen <sup>b</sup>	0.677	0.308	0.013	0.001			
	0.677	0.309	0.014	0.001			
<b>Glu (m/z 432)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0.390	0.429	0.159	0.022	0.001	0.000	
gemessen <sup>b</sup>	0.385	0.421	0.167	0.026	0.001	0.000	
	0.388	0.422	0.164	0.026	0.000	0.000	
<b>Val (m/z 288)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0.527	0.383	0.084	0.007	0.000	0.000	
gemessen <sup>b</sup>	0.471	0.415	0.108	0.006	0.000	0.000	
	0.473	0.415	0.106	0.006	0.000	0.000	
<b>Thr (m/z 404)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0.512	0.394	0.088	0.005	0.000		
gemessen <sup>b</sup>	0.510	0.397	0.089	0.004	0.000		
	0.520	0.392	0.085	0.004	0.000		
<b>Gly (m/z 246)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0.946	0.053	0.001				
gemessen <sup>b</sup>	0.955	0.043	0.002				
	0.955	0.043	0.002				
<b>Asp (m/z 418)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0.512	0.394	0.088	0.005	0.000		
gemessen <sup>b</sup>	0.508	0.396	0.090	0.005	0.000		
	0.517	0.392	0.087	0.004	0.000		
<b>Leu (m/z 200)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0.362	0.429	0.178	0.029	0.001	0.000	
gemessen <sup>b</sup>	0.351	0.419	0.189	0.035	0.004	0.003	
	0.350	0.420	0.189	0.034	0.004	0.003	
<b>Phe (m/z 336)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0.350	0.416	0.186	0.042	0.005	0.000	0.000
gemessen <sup>b</sup>	0.370	0.417	0.172	0.030	0.003	0.002	0.001
<b>Tyr (m/z 466)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0.350	0.416	0.186	0.042	0.005	0.000	0.000

gemessen <sup>b</sup>	0,375	0,413	0,170	0,029	0,008	0,001	0,001
	0,376	0,415	0,166	0,029	0,009	0,002	0,001
<b>THL <math>m/z</math> 361 )</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0,114	0,803	0,076	0,007	0,000	0,000	0,000
gemessen <sup>b</sup>	0,124	0,804	0,069	0,003	0,000	0,000	0,000
	0,125	0,804	0,067	0,003	0,001	0,000	0,000

<sup>a</sup> Simulierte Werte enthalten die zu den berechneten Flüssen korrespondierenden Markierungsverteilungen.

<sup>b</sup> Gemessene Werte wurden aus der GC/MS Analytik der TBDMS-Derivate der Aminosäuren und des TMS-Derivates von Trehalose erhalten.

$M_0$  repräsentiert die unmarkierte Massenisotopomerfraktion,  $M_1$  die einfach-markierte Massenisotopomerfraktion usw.

**Tab.VII-10:** In den Simulationen berechnete sowie experimentell bestimmte Markierungsverteilungen proteinogener Aminosäuren aus Biomassehydrolysaten von *C. glutamicum* *lysc<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpck*, bei Wachstum auf CG 12 ½ - Minimalmedium im Schüttelkolben mit 99 % [1-<sup>13</sup>C]-Glucose. Die experimentellen Daten stammen aus 2 Parallelkolben.

Analysierte Metabolite	relative Massenisotopomerfraktionen						
	M <sub>0</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>	M <sub>6</sub>
<b>Ala (m/z 260)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0,790	0,201	0,008	0,000			
gemessen <sup>b</sup>	0,797	0,196	0,006	0,000			
	0,793	0,201	0,006	0,000			
<b>Ser (m/z 390)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0,795	0,198	0,007	0,000			
gemessen <sup>b</sup>	0,802	0,193	0,005	0,000			
	0,798	0,197	0,004	0,000			
<b>Glu (m/z 432)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0,541	0,363	0,087	0,008	0,000	0,000	
gemessen <sup>b</sup>	0,538	0,368	0,086	0,008	0,000	0,000	
	0,527	0,375	0,090	0,008	0,000	0,000	
<b>Val (m/z 288)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0,701	0,267	0,031	0,001	0,000	0,000	
gemessen <sup>b</sup>	0,649	0,304	0,044	0,002	0,000	0,000	
	0,641	0,310	0,046	0,002	0,000	0,000	
<b>Thr (m/z 404)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0,612	0,331	0,054	0,003	0,000		
gemessen <sup>b</sup>	0,618	0,331	0,049	0,001	0,000		
	0,608	0,340	0,051	0,001	0,000		
<b>Gly (m/z 246)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0,957	0,043	0,001				
gemessen <sup>b</sup>	0,957	0,041	0,002				
<b>Asp (m/z 418)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0,612	0,331	0,054	0,003	0,000		
gemessen <sup>b</sup>	0,618	0,332	0,049	0,001	0,000		
	0,607	0,340	0,051	0,001	0,000		
<b>Leu (m/z 200 )</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0,533	0,367	0,090	0,009	0,000	0,000	
gemessen <sup>b</sup>	0,548	0,345	0,092	0,012	0,002	0,002	
	0,537	0,352	0,095	0,012	0,002	0,002	
<b>Phe (m/z 336)</b>							

simuliert <sup>a</sup>	0,535	0,358	0,094	0,013	0,001	0,000	0,000
gemessen <sup>b</sup>	0,526	0,359	0,096	0,013	0,002	0,002	0,001
	0,519	0,363	0,098	0,014	0,002	0,002	0,001
<b>Tyr (m/z 466)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0,535	0,358	0,094	0,013	0,001	0,000	0,000
gemessen <sup>b</sup>	0,531	0,356	0,092	0,013	0,002	0,001	0,001
	0,524	0,362	0,095	0,012	0,002	0,001	0,001
<b>THL(m/z 361 )</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0,093	0,853	0,053	0,002	0,000	0,000	0,000
gemessen <sup>b</sup>	0,097	0,848	0,051	0,001	0,001	0,001	0,000
	0,092	0,853	0,053	0,001	0,001	0,001	0,000

<sup>a</sup> Simulierte Werte enthalten die zu den berechneten Flüssen korrespondierenden Markierungsverteilungen.

<sup>b</sup> Gemessene Werte wurden aus der GC/MS Analytik der TBDMS-Derivate der Aminosäuren und des TMS-Derivates von Trehalose erhalten.

M<sub>0</sub> repräsentiert die unmarkierte Massenisotopomerfraktion, M<sub>1</sub> die einfach-markierte Massenisotopomerfraktion usw.

**Tab.VII-11:** In den Simulationen berechnete sowie experimentell bestimmte Markierungsverteilungen proteinogener Aminosäuren aus Biomassehydrolysaten von *C. glutamicum lysc<sup>fbr</sup>ΔpykΔppcΔpgi*, bei Wachstum auf CG 12 ½ - Minimalmedium im Schüttelkolben mit 99 % [1,2-<sup>13</sup>C]-Glucose. Die experimentellen Daten stammen aus 2 Parallelkolben.

Analysierte Metabolite	relative Massenisotopomerfraktionen						
	M <sub>0</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>	M <sub>6</sub>
<b>Ala (m/z 260)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0,562	0,257	0,178	0,004			
gemessen <sup>b</sup>	0,605	0,207	0,185	0,003			
	0,604	0,207	0,186	0,003			
<b>Ser (m/z 390)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0,602	0,203	0,192	0,003			
gemessen <sup>b</sup>	0,579	0,261	0,157	0,003			
	0,577	0,264	0,156	0,003			
<b>Glu (m/z 432)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0,267	0,417	0,248	0,063	0,004	0,000	
gemessen <sup>b</sup>	0,266	0,426	0,251	0,056	0,003	0,000	
	0,262	0,425	0,252	0,057	0,003	0,000	
<b>Val (m/z 288)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0,389	0,345	0,205	0,058	0,003	0,000	
gemessen <sup>b</sup>	0,378	0,351	0,194	0,074	0,002	0,000	
	0,377	0,352	0,195	0,074	0,002	0,000	
<b>Thr (m/z 404)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0,367	0,392	0,195	0,045	0,001		
gemessen <sup>b</sup>	0,373	0,397	0,176	0,053	0,001		
	0,368	0,402	0,177	0,053	0,001		
<b>Gly (m/z 246)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0,787	0,209	0,004				
gemessen <sup>b</sup>	0,785	0,210	0,005				
	0,779	0,215	0,006				
<b>Asp (m/z 418)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0,367	0,392	0,195	0,045	0,001		
gemessen <sup>b</sup>	0,372	0,395	0,180	0,052	0,000		
	0,367	0,399	0,179	0,054	0,000		
<b>Leu (m/z 200)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0,240	0,405	0,265	0,080	0,010	0,000	
gemessen <sup>b</sup>	0,246	0,425	0,264	0,062	0,003	0,001	
	0,245	0,426	0,264	0,062	0,003	0,000	
<b>Phe (m/z 336)</b>							

simuliert <sup>a</sup>	0,181	0,292	0,259	0,165	0,072	0,024	0,005
gemessen <sup>b</sup>	0,184	0,280	0,256	0,170	0,075	0,026	0,005
	0,184	0,278	0,256	0,170	0,076	0,026	0,006
<b>Tyr (m/z 466)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0,181	0,292	0,259	0,165	0,072	0,024	0,005
gemessen <sup>b</sup>	0,184	0,276	0,254	0,170	0,079	0,026	0,006
	0,187	0,276	0,252	0,167	0,079	0,026	0,007
<b>THL (m/z 361)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0,000	0,019	0,940	0,041	0,001	0,000	0,000
gemessen <sup>b</sup>	0,009	0,015	0,928	0,041	0,002	0,003	0,002
	0,007	0,014	0,932	0,041	0,002	0,002	0,002

<sup>a</sup> Simulierte Werte enthalten die zu den berechneten Flüssen korrespondierenden Markierungsverteilungen.

<sup>b</sup> Gemessene Werte wurden aus der GC/MS Analytik der TBDMS-Derivate der Aminosäuren und des TMS-Derivates von Trehalose erhalten.

M<sub>0</sub> repräsentiert die unmarkierte Massenisotopomerfraktion, M<sub>1</sub> die einfach-markierte Massenisotopomerfraktion usw.

**Tab.VII-12:** In den Simulationen berechnete sowie experimentell bestimmte Markierungsverteilungen proteinogener Aminosäuren aus Biomassehydrolysaten von *C. glutamicum* *lysc<sup>fbr</sup> Δpyk Δppc Δpck Δpgi*, bei Wachstum auf CG 12 ½ - Minimalmedium im Schüttelkolben mit 99 % [2-<sup>13</sup>C]-Glucose. Die experimentellen Daten stammen aus 2 Parallelkolben.

Analysierte Metabolite	relative Massenisotopomerfraktionen						
	M <sub>0</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>	M <sub>6</sub>
<b>Ala (m/z 260)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0.596	0.226	0.174	0.004			
gemessen <sup>b</sup>	0.617	0.205	0.176	0.003			
	0.618	0.206	0.174	0.002			
<b>Ser (m/z 390)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0.612	0.201	0.183	0.004			
gemessen <sup>b</sup>	0.592	0.251	0.155	0.003			
	0.589	0.254	0.155	0.003			
<b>Glu (m/z 432)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0.339	0.448	0.186	0.026	0.002	0.000	
gemessen <sup>b</sup>	0.355	0.437	0.181	0.026	0.001	0.000	
	0.353	0.436	0.183	0.027	0.001	0.000	
<b>Val (m/z 288)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0.420	0.329	0.193	0.055	0.003	0.000	
gemessen <sup>b</sup>	0.393	0.349	0.188	0.067	0.002	0.000	
	0.390	0.350	0.190	0.068	0.002	0.000	
<b>Thr (m/z 404)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0.498	0.323	0.170	0.010	0.000		
gemessen <sup>b</sup>	0.511	0.309	0.166	0.015	0.000		
	0.510	0.310	0.165	0.015	0.000		
<b>Gly (m/z 246)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0.793	0.201	0.007				
gemessen <sup>b</sup>	0.794	0.202	0.004				
	0.792	0.203	0.005				
<b>Asp (m/z 418)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0.498	0.323	0.170	0.010	0.000		
gemessen <sup>b</sup>	0.509	0.308	0.168	0.016	0.000		
	0.511	0.311	0.162	0.015	0.001		
<b>Leu (m/z 200)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0.285	0.407	0.242	0.063	0.003	0.000	
gemessen <sup>b</sup>	0.264	0.425	0.249	0.057	0.004	0.002	
	0.253	0.424	0.259	0.059	0.004	0.001	
<b>Phe (m/z 336)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0.132	0.268	0.271	0.195	0.095	0.032	0.007
gemessen <sup>b</sup>	0.172	0.276	0.259	0.177	0.081	0.026	0.006
	0.183	0.286	0.256	0.168	0.074	0.025	0.006
<b>Tyr (m/z 466)</b>							

simuliert <sup>a</sup>	0,132	0,268	0,271	0,195	0,095	0,032	0,007
gemessen <sup>b</sup>	0,174	0,278	0,257	0,175	0,080	0,026	0,006
	0,176	0,283	0,256	0,174	0,078	0,025	0,006
<b>Ile (m/z 200)</b>							
simuliert <sup>a</sup>	0,402	0,392	0,162	0,043	0,002	0,000	
gemessen <sup>b</sup>	0,348	0,434	0,183	0,030	0,003	0,002	
	0,343	0,435	0,188	0,030	0,003	0,001	

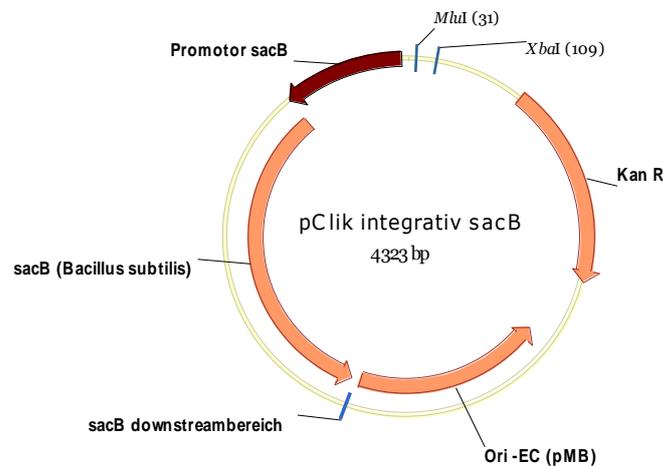
<sup>a</sup> Simulierte Werte enthalten die zu den berechneten Flüssen korrespondierenden Markierungsverteilungen.

<sup>b</sup> Gemessene Werte wurden aus der GC/MS Analytik der TBDMS-Derivate der Aminosäuren erhalten.

$M_0$  repräsentiert die unmarkierte Massenisotopomerfraktion,  $M_1$  die einfach-markierte Massenisotopomerfraktion usw.

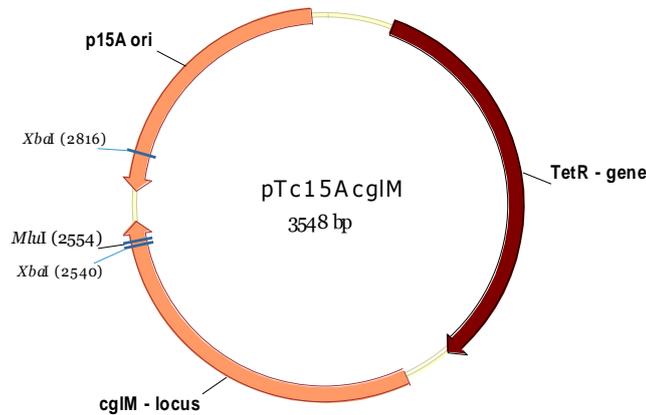
## 6. Verwendete Vektoren

### 6.2 pClik-int-sacB-Vektor zur homologen Rekombination in *C. glutamicum*



**Abb.VII-6:** Aufbau des in dieser Arbeit verwendeten Vektors pClik-int-sacB zur Einführung von Gendelektionen mittels homologer Rekombination.

### 6.3 pTC-Vektor zur corynespezifischen Methylierung von pClik-int-sacB



**Abb.VII-7:** Aufbau des in dieser Arbeit verwendeten Vektors pTC corynespezifischen Methylierung von pClik-int-sacB in *E. coli* NM522.

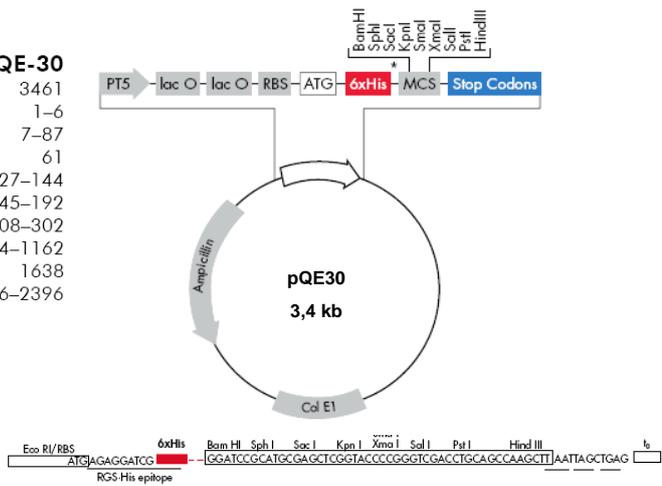
### 6.4 pQE30-Expressionsvektor

**Positions of elements in bases**

Vector size (bp)	3461
Start of numbering at XhoI (CTCGAG)	1-6
T5 promoter/lac operator element	7-87
T5 transcription start	61
6xHis-tag coding sequence	127-144
Multiple cloning site	145-192
Lambda <i>t<sub>0</sub></i> transcriptional termination region	208-302
<i>rnnB</i> T1 transcriptional termination region	1064-1162
ColE1 origin of replication	1638
$\beta$ -lactamase coding sequence	3256-2396

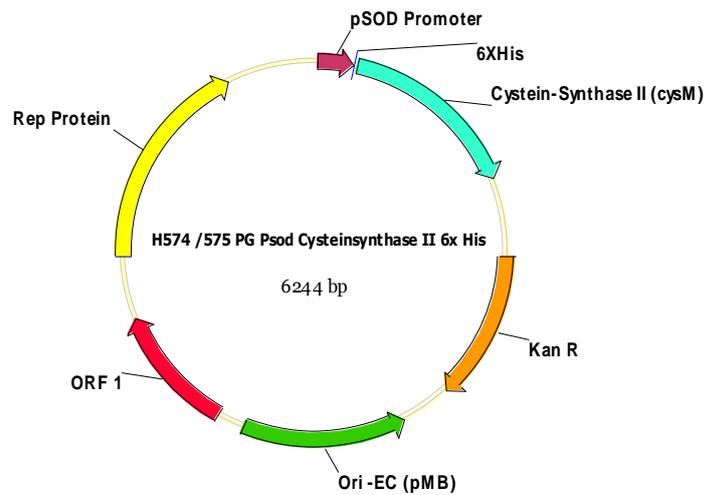
**pQE-30**

Vector size (bp)	3461
Start of numbering at XhoI (CTCGAG)	1-6
T5 promoter/lac operator element	7-87
T5 transcription start	61
6xHis-tag coding sequence	127-144
Multiple cloning site	145-192
Lambda <i>t<sub>0</sub></i> transcriptional termination region	208-302
<i>rnnB</i> T1 transcriptional termination region	1064-1162
ColE1 origin of replication	1638
$\beta$ -lactamase coding sequence	3256-2396



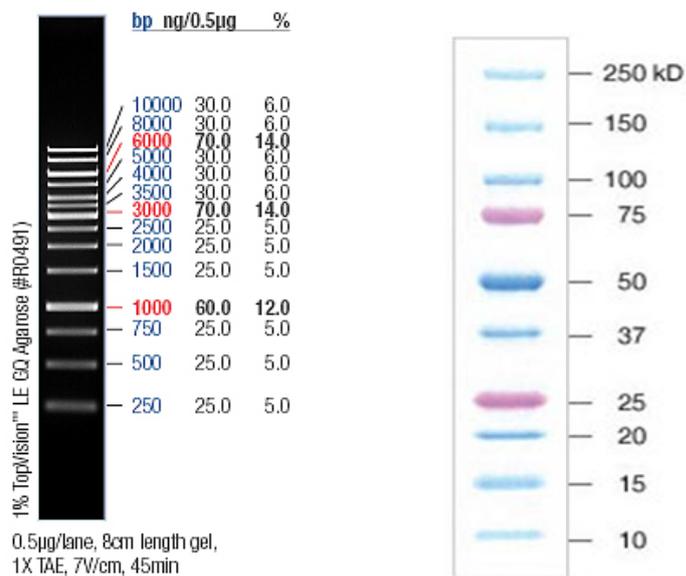
**Abb.VII-8:** Aufbau des pQE30 Vektors von Qiagen (Hilden, Deutschland) zur Überexpression von Proteinen mit N-terminalem 6xHis-Tag in *E. coli*.

## 6.5 PG-basierender Expressionsvektor



**Abb.VII-9:** Aufbau des PG-Vektors zur Überexpression von Cgl2136) als N-terminale 6x Histidin Fusion in *C. glutamicum*  $\Delta$ cysK.

## 7. DNA- und Protein-Molekulargewichtsmarker



**Abb.VII-10:** DNA-Molekulargewichtsmarker: 1 kb-DNA-Leiter, GeneRuler™, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland (A), Protein-Molekulargewichtsmarker (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Hercules, USA (B).