



Institut für Biotechnologie

**Globale Expressionsanalysen zur
Charakterisierung der Lysin-Produktion in
*Corynebacterium glutamicum***

Georg Sindelar

**Globale Expressionsanalysen zur
Charakterisierung der Lysin-Produktion in
*Corynebacterium glutamicum***

Georg Sindelar

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 4092

ISSN 0944-2952

Institut für Biotechnologie Jül-4092

D 61 (Diss., Düsseldorf, Univ. 2003)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

☎ 02461/61-5220 · Telefax: 02461/61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
2. Material und Methoden	14
2.1. Chemikalien	14
2.2. Medien, Stammhaltung und Kultivierung	15
2.2.1. Medien	15
2.2.2. Verwendete Bakterienstämme und Plasmide	16
2.2.3. Kultivierung	18
2.3. Metabolitbestimmungen	18
2.3.1. Aminosäurebestimmung	18
2.3.2. Bestimmung von Glucose	19
2.3.3. Bestimmung von Enzymaktivitäten	19
2.3.4. Spektroskopie von Cytochrom	21
2.4. Molekularbiologische Arbeiten	21
2.4.1. Isolierung von Plasmid-DNA	21
2.4.2. Bestimmung der DNA-Konzentration	22
2.4.3. Restriktion, Modifikation und Reinigung von DNA	22
2.4.4. Agarose-Gelelektrophorese	23
2.4.5. Techniken zur Transformation von Zellen	23
2.4.6. Plasmidtransfer von <i>E. coli</i> nach <i>C. glutamicum</i> durch Transkonjugation	24
2.4.7. Polymerasekettenreaktion (PCR)	24
2.4.8. Konstruktion von Deletionsmutanten	25
2.5. Molekularbiologische Methoden für die DNA-Chip-Technologie	26
2.5.1. Präparation von RNA	26
2.5.2. Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden	26
2.5.3. Präparation von genomischer DNA	27
2.5.4. Fluoreszenzmarkierung genomischer DNA-Sonden	27
2.6. DNA-Chip-Technologie	28
2.6.1. Oberflächenbeschichtung von DNA-Chip-Trägern	28
2.6.2. Amplifizierung der <i>C. glutamicum</i> Gene	28
2.6.3. Robotergestützte Herstellung von DNA-Chips	29
2.6.4. Chemische und thermische Nachbehandlung von DNA-Chips	30
2.6.5. DNA-Chip-Hybridisierung	31
2.6.6. Messung und Quantifizierung der Fluoreszenz von DNA-Chips	31
2.6.7. Normalisierung der relativen mRNA-Spiegel	33
2.6.8. Verwaltung und Archivierung von DNA-Chip-Daten	33
2.6.9. Hierarchische Cluster Analyse	33
2.6.10. Statistik	34
3. Ergebnisse	35
3.1. Einfluß der Leucin-Auxotrophie auf die Lysinproduktion	35
3.1.1. Herstellung von Stämmen mit einer Deletion im ersten Gen der Leucin-Biosynthese <i>leuA</i>	35
3.1.2. Lysinproduktion der <i>leuA</i> -Deletionsstämme und der isogenen Ausgangsstämme	37

3.2. Etablierung und Validierung der DNA-Chip-Technologie für <i>C. glutamicum</i>	41
3.2.1. Validierung von DNA-Chip-Untersuchungen bei Vergleich der Genome unterschiedlicher <i>C. glutamicum</i> -Stämme	44
3.3. DNA-Chip-Untersuchungen zur Identifizierung Lysinbildungs-relevanter Genregulation	47
3.3.1. Wachstums- und Produktions-Phasen abhängige Regulation in Wildtyp und MH20-22B	47
3.3.2. Vergleich der Genexpression zwischen Wildtyp und MH20-22B	51
3.3.3. Vergleich der Genexpression zwischen Wildtyp und MH20-22B in der exponentiellen Phase	52
3.4. Untersuchung der Einflüsse spezifischer Unterschiede zwischen Wildtyp und MH20-22B	57
3.4.1. Differenzierung von Expressionsunterschieden als Folge der Anwesenheit einer feedbackresistenten Aspartatkinase	58
3.4.2. Differenzierung von Expressionsunterschieden als Folge unterschiedlicher Stammhintergründe	62
3.4.3. Identifizierung der Leucinauxotrophie-abhängigen Regulation	68
3.4.4. Kombinatorische Analyse der Lysinproduktions-abhängigen Expression	74
3.5. Untersuchungen zu chromosomalen Unterschieden der Modellstämme	78
3.6. Überprüfung spezifisch regulierter Gene bezüglich Einfluß auf die Lysinproduktion	81
3.6.1. Überexpression des Operons der Gruppe 1 (<i>hemU-hmuT-fepC</i>)	83
3.6.2. Überexpression der Gene und Operons der Gruppe 2	86
3.6.3. Überexpression der Gene der Gruppe 3	89
4. Diskussion	91
4.1. Unterschiede in der Genexpression zwischen Wildtyp und Produktionsstamm	91
4.2. Auswirkung MH20-22B-spezifischer Merkmale auf die Genexpression	94
4.3. Lysinproduktions-spezifische Regulation	103
4.4. Überexpression identifizierter Zielgene zur Verbesserung der Lysinproduktion	105
5. Zusammenfassung	110
6. Literaturverzeichnis	112
7. Anhang	128

Verwendete Abkürzungen

$\lambda_{\text{EX max}}$	Wellenlänge des Absorptionsmaximums
$\lambda_{\text{EM max}}$	Wellenlänge des Emissionsmaximums
μ	Wachstumsrate
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
Cm	Chloramphenicol
CoA	Coenzym A
Cy3/Cy5	Fluoreszenzfarbstoffe
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTNB	5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoesäure), Ellmans Reagenz
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FBR	feedback resistant, rückkopplungsresistent
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, Hochleistungs-Flüssigchromatographie
kbp	Kilobasenpaare
Kn	Kanamycin
kV	Kilovolt
l	Liter
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
U	Enzymeinheiten (Units in $\mu\text{mol min}^{-1}$)
n. a.	nicht auswertbar
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
OD ₆₀₀	optische Dichte ($\lambda = 600 \text{ nm}$)
ORF	open reading frame, offener Leserahmen
ori	origin of replication, Replikationsursprung
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
S/R	Signal/Rausch-Verhältnis
SDS	Sodium Dodecylsulfat
TAE	Tris-Acetate-EDTA
t_d	Verdopplungszeit [h]
TG	Trockengewicht
TNB	3-carboxylato-4-nitrothiophenolat [reduziertes DTNB]
Tricine	N-Tris-(hydroxymethyl)-methylglycin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
Tween 80	Polyoxyethylensorbitanmonooleat
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp (<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032)

1. Einleitung

Bereits 1957 wurde von Udaka und Kinoshita bei der Suche nach einem natürlich vorkommenden Glutamat-Produzenten der gram-positive, keulenförmige Actinomycet *Corynebacterium glutamicum* isoliert (Kinoshita et al., 1957). Heute ist *C. glutamicum* ein herausragender Organismus für die industrielle Aminosäureproduktion, mit dessen Hilfe mehr als 1 Mil. Tonnen L-Glutamat und 600.000 Tonnen L-Lysin pro Jahr bei steigendem Bedarf und steigender Tendenz produziert werden (Eggeling & Sahm, 2001). Genetische Veränderungen des ursprünglichen Wildtyps haben zu kommerziell nutzbaren Stämmen geführt, die nach verfahrenstechnischen Optimierungen hohe Mengen verschiedener u.a. für Säuger essentieller Aminosäuren wie Lysin, Threonin oder Isoleucin ausscheiden (Eikmanns et al. 1993). Diese biotechnologischen Verfahren ermöglichen im Vergleich zur chemischen Synthese die Produktion enantio-reiner Aminosäuren. Die gewonnenen Aminosäuren werden in der Futtermittelindustrie sowie in Pharma und Lebensmittel-Sparten benötigt (Leuchtenberger 1996).

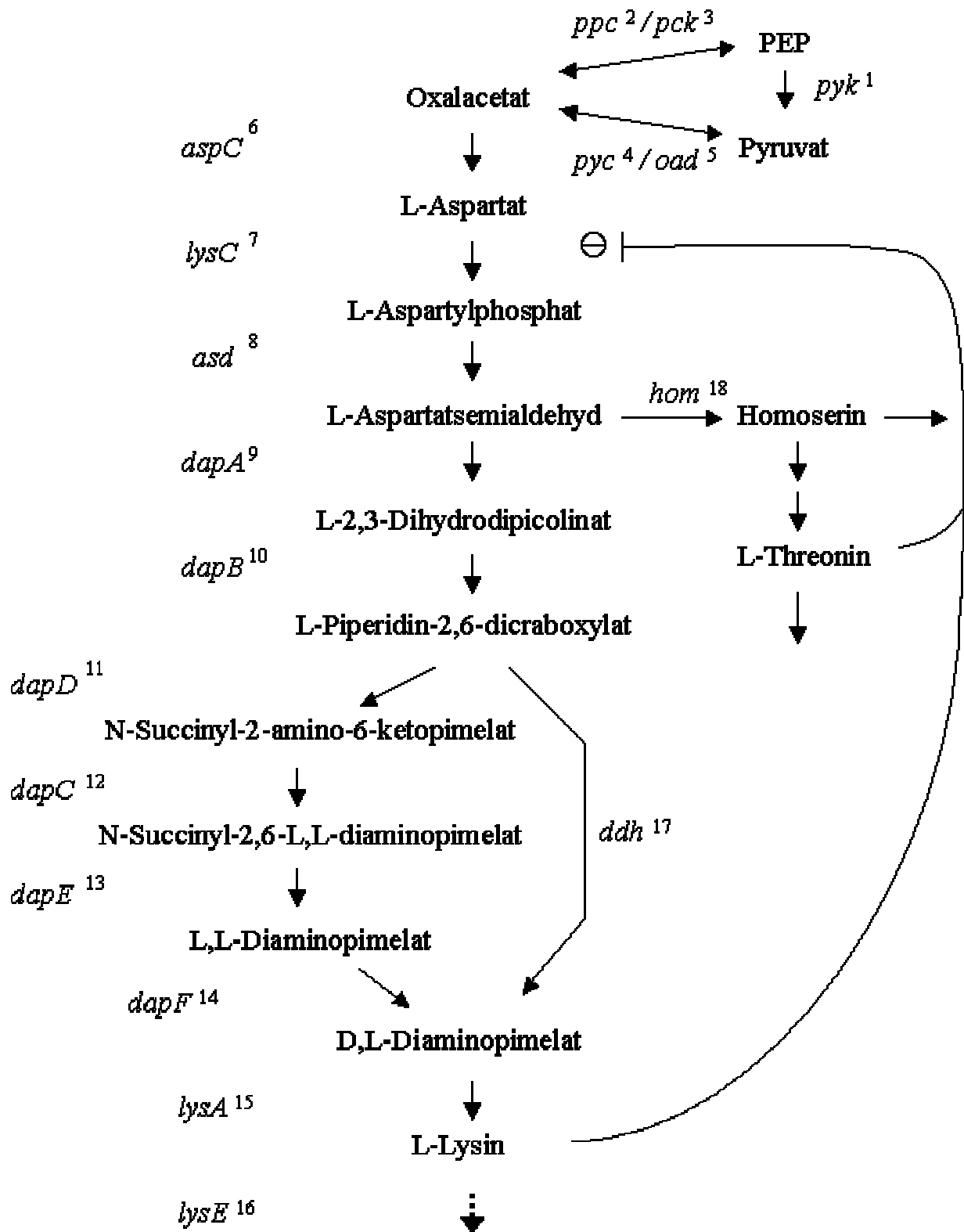
Die Lysin-Biosynthese in *C. glutamicum* verläuft analog zu anderen Bakterien über den Syntheseweg der Aminosäuren der Aspartatfamilie (Aspartat, Asparagin, Lysin, Threonin, Methionin, Isoleucin), vom Tricarbonsäurecyclus-Intermediat Oxalacetat ausgehend (Abbildung I). Glucose wird über das Glukose-Phosphotransferase-System aufgenommen (Parche et al., 2001), und über Phosphoenolpyruvat (PEP) und Pyruvat als AcetylCoA in den Tricarbonsäurecyclus (TCA) eingeführt. Bei Abfluß von TCA-Intermediaten in die Biosynthese können PEP und Pyruvat auch durch die anaplerotischen Reaktionen der PEP-Carboxylase bzw. der Pyruvat-Carboxylase als Oxalacetat den TCA auffüllen. Andererseits kann bei Wachstum auf nicht-glykolytischen Substraten wie Acetat oder Citrat aus Oxalacetat durch gluconeogenetische Reaktionen mit Hilfe der PEP-Carboxykinase bzw. der Oxalacetat-Decarboxylase auch PEP bzw. Pyruvat gebildet werden (Riedel et al., 2001, Jetten & Sinskey, 1995), ebenso verfügt *C. glutamicum* über das Malat-Enzym, welches Malat unter NADPH-Bildung zu Pyruvat decarboxyliert (Peters-Wendisch, 1996, Gourdon et al., 2000).

Nach einer Transaminierung von Oxalacetat (*aspC*) wird das Produkt Aspartat durch die Aspartatkinase zu Aspartylphosphat phosphoryliert, und unter NADPH-Verbrauch zu Aspartatsemialdehyd umgewandelt. Aspartatsemialdehyd ist das Edukt für drei weitere Aminosäuren, Methionin, Threonin und Isoleucin. Die Dihydropicolinat-Synthase (*dapA*) katalysiert die Reaktion von Aspartatsemialdehyd zu L-2,3-Dihydrodipicolinat, welches über einen verzweigten Biosyntheseweg (Sonntag *et al.*, 1993) zu D,L-Diaminopimelat umgesetzt wird. Im letzten Schritt wird mit Hilfe der Diaminopimelat-Decarboxylase L-Lysin synthetisiert, das durch den spezifischen Lysinexporter (*lysE*) exportiert wird.

Lysin wird nicht von *C. glutamicum* abgebaut, so dass bei Lysinproduktion im Batchverfahren hohe Lysin-Konzentrationen im Medium erreicht werden können. Diese können jedoch aufgrund des dann entstehenden Konzentrationsgradienten einem Transport von Lysin aus der Zelle entgegenwirken. Der Lysinefflux in *C. glutamicum* ist Carrier-vermittelt (Bröer & Krämer, 1991), und die Exportrate fällt bei steigenden Lysinkonzentrationen auf ca. 50% (Kelle, 1996).

Die Lysinbiosynthese in *C. glutamicum* wird an verschiedenen Punkten kontrolliert: So wird das für die Synthese aller Aminosäuren der Aspartat-Familie benötigte Enzym Aspartatkinase (*lysC*) konzentriert von den Endprodukten L-Lysin und L-Threonin gehemmt, jedoch nicht wie in *E. coli* auf Expressionsebene reprimiert (Richaud *et al.*, 1980, Cremer *et al.*, 1991, Kalinowski *et al.*, 1991). Das Produkt der Aspartatsemialdehyd-Dehydrogenase, Aspartatsemialdehyd, steht im Gleichgewicht mit den daraus synthetisierten Aminosäuren, und entsprechend sind die zwei Aspartatsemialdehyd-verbrauchenden Schlüsselenzyme Homoserindehydrogenase (*hom*) und Dihydropicolinat-Synthase (*dapA*) Regulationspunkte der Biosynthese. Die Homoserindehydrogenase (*hom*), welche mit der Dihydropicolinat-Synthase um Aspartatsemialdehyd konkuriert, wird durch Threonin und Isoleucin inhibiert bzw. durch Methionin reprimiert (Miyajima *et al.* 1970; 1968). Weitere Endprodukt-Inhibierung oder Reprimierung der Biosynthese der Aminosäuren der Aspartatfamilie konnte nicht gezeigt werden (Cremer *et al.*, 1988; 1991).

Abbildung I: Schema der Lysinbiosynthese in *C. glutamicum*.



⊖ : Endprodukthemmung. Enzymbezeichnungen siehe gegenüberliegende Seite

Verschiedene Verbesserungen der Lysinproduktion wurden durch Zufalls-Mutagenese und Metabolic Engineering in *C. glutamicum* erreicht: Das Schlüsselenzym der Lysinsynthese, die Aspartatkinase, unterliegt der konzentrierten Endprodukthemmung durch Lysin und Threonin (Thierbach *et al.*, 1990). Im Gegensatz zu *E. coli* und *B. subtilis*, die mehrere Aspartatkinase Isoenzyme besitzen, hat *C. glutamicum* nur ein *lysC* –Gen. Bei Wachstum in Anwesenheit des Lysin-Analogons Aminoethylcystein (AEC) lassen sich neben Mutanten der AEC-Aufnahme und AEC-Ausscheidung (Rossol *et al.*, 1992) Stämme isolieren, bei denen die Aspartatkinase nicht mehr der Endprodukthemmung unterliegt (Thierbach *et al.*, 1990). Das „feedbackresistente“ Gen *lysC*^{FBR} unterscheidet sich durch einen Aminosäure-Austausch aufgrund einer Punktmutation, (Kalinowski *et al.* 1991) und Überexpression von *lysC*^{FBR} im Wildtyp führt zu erhöhter Lysinproduktion (Cremer *et al.* 1991). Auch der am Institut benutzte Produktionsstamm MH20-22B hat eine feedbackresistente Aspartatkinase (Schrumpf *et al.* 1992), die alleine im Vorläuferstamm MH20 eine Ausscheidung von 35 mM L-Lysin ins Medium bewirkt (s.u.).

Die Aktivität der Dihydropicolinat-Synthase (*dapA*), welche in *C. glutamicum* nicht reguliert wird, ist entscheidend für den gesamten Fluß in die Aminosäuresynthese der Aspartat-Familie (Eggeling *et al.*, 1998), (de Graaf *et al.*, 2001). Eine Erhöhung der Dihydropicolinat-Synthase-Aktivität führt zu höherer Lysinproduktion bei reduzierter Threoninsynthese (Eggeling *et al.*, 1998 & 1999), und Reduktion der Aktivität des um das gleiche Edukt konkurrierenden Enzyms Homoserindehydrogenase (*hom*) erhöht ebenfalls die Lysinproduktion (Cremer *et al.*, 1988, Ohnishi *et al.*, 2002). Die Expression von *hom* kann durch Zugabe von Methionin reprimiert (Vrljic *et al.*, 1995; Eggeling *et al.*, 1998) oder die Aktivität durch Threonin gehemmt (Miyajima *et al.*, 1968) werden.

1 Pyruvatkinase - 2 PEP-Carboxylase - 3 PEP-Carboxykinase - 4 Pyruvat-Carboxylase - 5 Oxalacetat-Decarboxylase - 6 Aspartat-Aminotransferase - 7 Aspartatkinase - 8 Aspartatsemialdehyd-Dehydrogenase - 9 Dihydrodipicolinat-Synthase - 10 Dihydrodipicolinat-Reduktase - 11 Tetrahydrodipicolinat-Succinylase - 12 N-Succinyl-Aminoketopimelat-Transaminase - 13 N-Succinyl-Diaminopimelat-Desuccinylase - 14 Diaminopimelat-Epimerase - 15 Diaminopimelat-Decarboxylase - 16 Lysinexporter - 17 Diaminopimelat-Dehydrogenase - 18 Homoserin-Dehydrogenase

Steigerung der Lysinproduktion durch Überexpression, Inaktivierung oder Deregulierung weiterer Enzyme der Lysinbiosynthese oder des Exporter-Gens *lysE* sind nicht bekannt (Cremer *et al.*, 1988; 1991; Vrljic *et al.* 1996), so dass weitere Zielgene zur Erhöhung der Lysinproduktion in anderen Stoffwechselwegen, z.B. denen der Vorläufermoleküle wie Oxalacetat, zu suchen sind.

C. glutamicum ist im Gegensatz zu *E. coli* oder *B. subtilis* mit zwei PEP bzw. Pyruvat-verbrauchenden anaplerotischen Enzymen sowie mit drei PEP bzw. Pyruvat-generierenden Enzymen ausgestattet, die durch Carboxylierungs- und Decarboxylierungs-Reaktionen zum C₃ und C₄ Pool beitragen. So erhöht sich mit Überexpression des Pyruvat-Carboxylase-Gens (*pyc*) in einem Produktionsstamm die Lysinproduktion um 50%, (Peters-Wendisch *et al.*, 2001). Die Überexpression des Gens der PEP-Carboxylase (*ppc*) brachte eine um ca. 15% höhere Ausbeute (Cremer *et al.*, 1991). Die PEP-Carboxykinase (*pck*) decarboxyliert Oxalacetat zu PEP und hat einen entscheidenden Einfluß auf den internen Oxalacetat und Pyruvat-Pool (Petersen *et al.*, 2001). Entsprechend sinkt bei *pck*-Überexpression die Lysinausscheidung um 20%, bei Deletion des Gens erhöht sich die Lysinproduktion um 60% (Riedel *et al.*, 2001).

Bei einem Ansatz zur Stammverbesserung bezüglich Lysinproduktion müssen neben den reinen Biosynthese-Intermediaten auch Redox-Vorgänge betrachtet werden. Für die Biosynthese von einem Lysinmolekül werden vier NADPH-Moleküle benötigt; zwei in der unmittelbaren Biosynthese (siehe Abb III), zwei für Transaminierungen benötigten Glutamats, bei dessen Synthese aus α -Ketoglutarat je ein NADPH verbraucht wird (Marx *et al.*, 1999). Mittels ¹³C-NMR-Techniken konnten unterschiedliche Flüsse in den Pentose-Phosphat-Weg (PPW) in Abhängigkeit von NADPH-Verbrauch isogener Mutanten nachgewiesen werden (Marx *et al.*, 1999): Wurde für die Synthese von Glutamat aus α -Ketoglutarat statt NADPH aufgrund einer veränderten Glutamatdehydrogenase NADH genutzt, war der Fluß durch den PPW geringer. Die Auswirkung des NADPH-Umsatzes auf die Lysinproduktion, insbesondere bei Nutzung deregulierter Stämme und Mutanten des Lysinbiosynthesewegs, sind jedoch nicht genügend charakterisiert.

Damit ergeben sich verschiedenste Möglichkeiten, einen Produktionsstamm auf chromosomaler Ebene zu optimieren. Häufig werden jedoch zur industriellen L-Lysin-

Produktion klassisch mutierte Stämme genutzt, die neben den meist unbekannten produktbezogenen Mutationen auch unbekannte Mutationen im Vergleich zum Wildtyp aufweisen, die z.B. zu schlechterem Wachstum führen und die Raum-Zeit-Ausbeute verschlechtern. Ein Ansatz, diese Problematik zu umgehen, wurde von Ohnishi *et al.* durchgeführt, in dem in einen Wildtypstamm bekannte Mutationen eines Produzenten eingeführt wurden, womit die Lysinproduktion auf 80 g/l und die Rate auf 3 g/l h erhöht werden konnte (Ohnishi *et al.*, 2002). Bereits zuvor war in einem ähnlichen Ansatz die deregulierte Aspartatkinase ($lysC^{FBR}$) des am Institut benutzten Produktionsstamms MH20-22B in den Wildtyp ATCC 13032 eingebracht worden; der generierte Stamm KK25 produziert 30 mM Lysin, während der Wildtyp kein Lysin ausscheidet (Broer *et al.* 1993). Somit wäre die Leucinauxotrophie die Ursache für die Differenz der Produktions-Kapazität zwischen KK25 (30 mM) und MH20-22B (200 mM).

Eine generelle Verringerung der Wachstumsrate durch Limitierung eines essentiellen Substrates führt zu höherer Lysinausscheidung (Coello *et al.*, 1992). Einige der klassisch generierten *C. glutamicum* Lysin-Produzenten sind Leucin-auxotroph (Nakayama *et al.*, 1978). Auch Schrumpf und Eggeling (Schrumpf *et al.* 1992) konnten durch Selektion Leucin-auxotropher Stämme nach Mutagenese mit N-Methyl-N-Nitro-N-Nitrosoguanidin, ausgehend von einem Stamm mit feedbackresistenter Aspartatkinase, welcher ca. 80 mM L-Lysin ins Medium ausschied (MH20), den Stamm MH20-22B isolieren, welcher bis zu 240 mM L-Lysin ausscheidet aufgrund einer Mutation im zweiten Enzym der Leucin-Biosynthese, Isopropylmalat-Dehydratase (*leuCD*) (Schrumpf *et al.* 1992). Es konnten jedoch keine Hinweise auf einen regulatorischen Zusammenhang zwischen Leucin-Limitierung und Lysinproduktion gefunden werden (Schrumpf *et al.* 1992, Patek *et al.*, 1994). Der Produktionsstamm MH20-22B wächst im Produktionsmedium (Minimalmedium CGXII, 10% (w/v) Glukose, 300 mg/l Leucin) mit einer etwas geringeren maximalen Wachstumsrate als der Wildtyp von etwa $0,4 \text{ h}^{-1}$ (statt $0,5 \text{ h}^{-1}$), beginnt aber erst nach ca. 10 h, wenn das supplementierte Leucin limitierend wird und der Stamm in die stationäre Phase übergeht, nennenswerte Mengen Lysin ins Medium auszuschcheiden. Eine Wachstumslimitierung, wie hier durch Leucinauxotrophie, ist also notwendig, um hohe Lysinproduktion zu bewirken.

Zusätzlich zur langjährigen Erfahrung mit *C. glutamicum* auf physiologischer und genetischer Ebene, brachten zwei Dinge einen entscheidenden Fortschritt in der Erforschung dieses Bakteriums: Die DNA-Chip-Technologie und die Sequenzierung des *C. glutamicum* Genoms. Zunächst gelang dem Department of Biochemistry in Stanford sowie der Firma Affymetrix mit der Einführung von DNA-Chips ein technologischer Durchbruch bei der Analyse der Genexpression, mit deren Hilfe erstmals die Expression von Tausenden von Genen mit geringem Aufwand simultan erfasst und ausgewertet werden konnte (Chee *et al.*, 1996; DeRisi *et al.*, 1996; Lipshutz *et al.*, 1995;1999; Schena *et al.*, 1995; 1996; Shalon *et al.*, 1996; Wodicka *et al.*, 1997; Hayward *et al.*, 2000). Dabei werden PCR-Produkte, oligo-Nukleotide oder cDNAs auf die Oberfläche eines Trägers aufgebracht. Mittlerweile ist diese Technologie für verschiedene Bakterien etabliert, u.a. für *E. coli* (Khodursky *et al.*, 2000; Zimmer *et al.*, 2000; Wendisch *et al.*, 2001, Polen *et al.*, 2003), *B. subtilis* (Kaan *et al.*, 2002; Helman *et al.*, 2003) und das mit *C. glutamicum* verwandte *M. tuberculosis* (Wilson *et al.*, 1999). Dabei ist die DNA-Chip-Technologie vorrangig zur Identifizierung der Genexpressionsmuster eines Organismus unter verschiedenen physiologischen Bedingungen eingesetzt worden (Zimmer *et al.*, 2000; Wilson *et al.*, 1999).

Der zweite wichtige Schritt zur intensiveren Erforschung von *C. glutamicum* war die inzwischen mehrfache Entschlüsselung seiner gesamten Genomsequenz (NCBI, DDBJ), (Kalinowski *et al.*, 2003) anhand derer DNA-Fragment-Chips mit auf Glasoberflächen immobilisierten PCR-Produkten aller *C. glutamicum*-Gene hergestellt und für genomweite Expressionsanalysen eingesetzt werden können. Waren in ersten Chip-Untersuchungen Expressionsmuster von nur 52 Genen des Zentralstoffwechsels eines Lysinproduzenten in der frühen und späten exponentiellen Phase untersucht und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse getestet worden (Loos *et al.*, 2001), konnte in einer weiteren Untersuchung bereits die Acetat-induzierte Expression von 120 Genen des Zentralstoffwechsels und der Aminosäure-Biosynthese analysiert (Hayashi *et al.*, 2002) werden. Nach Etablierung der Technik und Vergleich unterschiedlicher Protokolle (Muffler *et al.*, 2002), konnten inzwischen bereits erste Ergebnisse bei Untersuchungen des Valinstress und des Phosphatregulons mit genomweiten DNA-

Chips für *C. glutamicum* erhalten werden (Lange *et al.*, 2003; Wendisch *et al.*, (in press); Ishige *et al.*, (in press)).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung der Gene, deren differenzielle Expression zu erhöhter Lysinproduktion im Produktionsstamm führt. Dazu sollte zunächst die DNA-Chip-Technologie für die genomweite Genexpressionsanalyse für *C. glutamicum* etabliert und validiert werden. Nach Identifizierung der chromosomalen Unterschiede wie Gen-Deletionen oder Amplifikationen durch vergleichende Genomanalyse sollte das Genexpressionsmuster bestimmt werden, das den Produktionsstamm bezüglich Lysinproduktion vom Wildtyp unterscheidet. Dazu sollten zum Einen die Wachstums- bzw. Produktionsphasen der beiden Stämme ATCC 13032 und MH20-22B miteinander sowie untereinander verglichen werden. Zum Anderen sollten mit Hilfe von verschiedenen Modellstämmen mit definierten Merkmalen die Expressionsunterschiede der beiden nicht-isogenen Stämme den Einflüssen der einzelnen genomischen Unterschiede deregulierte Aspartatkinase, Leucinauxotrophie und unbekannte Mutationen zugeordnet werden. Auf diese Weise sollten neue Zielgene für eine potentielle Stammverbesserung identifiziert, überexprimiert oder deletiert und auf ihren Einfluß auf die Lysinproduktion untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Im folgenden sind die verwendeten Chemikalien mit ihrer Bezugsquelle aufgeführt.

Amersham (Freiburg)

Shrimp Alkaline Phosphatase zur Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.

AppliChem GmbH (Darmstadt):

3-Morpholinopropansulfonsäure (3-MOPS), Agarose

BIOMOL (Hamburg):

N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)

Carl Roth GmbH (Karlsruhe):

Ethidiumbromid, Zink(II)-sulfat-Heptahydrat,

DIFCO (Detroit, USA):

Bacto™ Agar, Hefe-Extrakt, Trypton, BHI (Brain-Heart-Infusion-Medium)

Merck (Darmstadt):

Ammoniumchlorid	Calciumchlorid-Dihydrat
Cobalt(II)-chlorid-Hexahydrat	Dithionit
Eisen(II)-sulfat-Heptahydrat	Essigsäure
Ethanol	Formamid
Formaldehyd	Glucose-Monohydrat
Glycerin	Isoamylalkohol
Isopropanol	di-Kaliumhydrogenphosphat
Kalium-dihydrogenphosphat	Kaliumhydroxid (Plätzchen)
Kaliumsulfat	Kaliumchlorid
Kaliumgluconat	Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat
Manganchlorid	Magnesiumchlorid
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	di-Natrium-Hydrogenphosphat
Natrium-di-Hydrogenphosphat-mono-Hydrat	Natrium-D,L-Lactat
Natriumacetat	Natriumcarbonat
Natriumdodecylsulfat-Lösung (10% (w/v))	Natriumchlorid
Natriumhydroxid (Plätzchen)	tri-Natriumcitrat-Dihydrat
o-Phthalaldehyd	Salzsäure
Schwefelsäure	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

Roche (Mannheim)

Ampicillin	Chloramphenicol
Isopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG)	Kanamycinsulfat
Lysozym	Nalidixin
dNTPs	Rapid Ligation Kit
Rinderserumalbumin (BSA)	Restriktionsenzyme

Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim):

β -Mercaptoethanol	Bernsteinsäure-Anhydrid
Borsäure	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
Pyridin	1-Methyl-2-Pyrrolidinon
Poly-Adenylat (Poly-A, Kaliumsalz)	Poly-L-Lysin-Lösung (0,1% (w/v))
Pyridoxal 5'-Phosphat	Protocatechusäure (3, 4-
Triethanolamin	Dihydroxybenzoesäure)

2.2. Medien, Stammhaltung und Kultivierung**2.2.1. Medien**

Zur Kultivierung von *Escherichia coli* wurde das Vollmedium LB (*Luria Bertani*) :10 g/l Tryptone (Difco); 5 g/l Yeast Extrakt (Difco); 5 g/l NaCl) nach Sambrook *et al.* (1989) verwendet. *Corynebacterium glutamicum* wurde zur Stammhaltung und DNA-Isolierung in LB-Medium kultiviert. Als Vorkulturmedium wurde BHI-Komplexmedium (*Brain-Heart Infusion*) (Difco) oder CgIII-Medium (2,5 g/l NaCl, 10 g/l Pepton, 10 g/l Yeast Extrakt (Difco); 2% (w/v) Glukose) (Menkel *et al.*, 1989) eingesetzt. Zur Bestimmung von Wachstumskurven, RNA-Isolierung, Produktbildung und Messung von Enzymaktivitäten wurde das Minimalmedium CgXII mit 4 % (w/v) bzw. 10% (w/v) Glukose (Keilhauer *et al.*, 1993) jedoch mit 30 mg/l Protocatechuat eingesetzt. Nur bei Kultivierung der Stämme MH20-22B(pXMJ19hem) und wt(pXMJ19hem) wurde in bestimmten Versuchen Chloramphenicol zugesetzt.

Zur Selektion und zur Haltung von Stämmen, die Plasmide enthalten, wurden die in Tabelle I. angegebenen Antibiotikakonzentrationen eingesetzt. Nalidixinsäure wurde eingesetzt, um nach Konjugationsexperimenten das Wachstum von *E. coli* zu unterdrücken.

Tabelle I : Verwendete Antibiotikakonzentrationen sowie deren Stammlösungen.

Antibiotikum	<i>E. coli</i>	<i>C. glutamicum</i>		
	Selektion und Haltung	Selektion	Haltung	Stammlösung
Nalidixinsäure	50 µg/ml	-	-	50 g/l in 0,4 N NaOH
Kanamycin	50 µg/ml	15 µg/ml	50 µg/ml	50 mg/ml in H ₂ O
Chloramphenicol	30 µg/ml	3 µg/ml	10 µg/ml	25 mg/ml in 70 % Ethanol

2.2.2. Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle II aufgeführt. Der *C. glutamicum* Stamm KK25 wurde aus dem Wildtyp mit Hilfe des Plasmids pKK6 in dieser Arbeit nach Bröer hergestellt (Bröer *et al.* 1992).

Tabelle II : In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Phänotyp / Genotyp	Referenz
<u><i>Escherichia coli</i></u>		
DH5a	<i>F-thi-1 endA1 hsdR17 (r-, m-) supE44, relA1</i> <i>ΔlacU169(F80lacZΔM15) recA1 gyrA96</i>	Hanahan <i>et al.</i> 1983
S17-1	<i>thi-1 F⁻ endA1 hsdR17 supE44 λ⁻ pro</i>	Simon <i>et al.</i> , 1983
<u><i>C. glutamicum</i></u>		
ATCC13032	Wildtyp	Abe <i>et al.</i> , 1967
MH20-22B	Lysin-Produzent, AEC ^R , <i>leuD</i> ⁻	Schrumpf, <i>et al.</i> , 1992
KK25	Wildtyp-Derivat, AEC ^R , Kan ^R	Bröer <i>et al.</i> , 1992
LE4	Lysin-Produzent-Derivat, AEC ^{wt} , <i>leuD</i> ⁻	Schrumpf, <i>et al.</i> , 1992
13032Δ <i>leuA</i>	Wildtyp mit einer Deletion des Gens <i>leuA</i>	diese Arbeit
KK25Δ <i>leuA</i>	KK25 mit einer Deletion des Gens <i>leuA</i>	diese Arbeit
LE4Δ <i>leuA</i>	LE4 mit einer Deletion des Gens <i>leuA</i>	diese Arbeit
MH20-22BΔ <i>leuA</i>	MH20-22B mit einer Deletion des Gens <i>leuA</i>	diese Arbeit

AEC^R: Resistenz gegenüber dem Lysinanalogon Amino-Ethyl-Cystein

Kan^R: Resistenz gegenüber Kanamycin

Tabelle III: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Marker / Eigenschaft	Herkunft/Referenz
pK19 <i>mobsacB</i>	Kan ^R , <i>sacB</i> , <i>oriT</i>	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pK19 <i>mobsacB</i> Δ <i>leuA</i>	Kan ^R , <i>sacB</i> , <i>oriT</i> , Derivat mit <i>leuA</i> Deletionskonstrukt	diese Arbeit
pXMJ19	Cm ^R , <i>oriV_{E.c.}</i> , <i>oriV_{C.g.}</i> , <i>lacI^q</i> , <i>ptac</i>	Jakoby <i>et al.</i> , 1999
pXMJ19hem	Cm ^R ; pXMJ19-Derivat mit <i>C.glutamicum</i> ATCC13032 Genen NCgl 1964-1966 und RBS	diese Arbeit
pGEM-T	Amp ^R (Ampicillin-Resistenz)	Promega, Madison USA
pGEM-TΔ <i>leuA</i>	Amp ^R , pGEM-T-Derivat mit <i>leuA</i> Deletionskonstrukt	diese Arbeit
pKK6	Kan ^R , pSUP301 basierter Vector mit <i>lysC^{FBR}</i>	Broer <i>et al.</i> , 1993
pVWEx1	pJC1-basierter Expressionsvektor, Kan ^R , <i>lacI^q</i> , <i>ptac</i>	Wendisch <i>et. al.</i> , 1997
pVWEx1-1449	pVWEx1-Derivat mit <i>C. glutamicum</i> ATCC13032 Gen NCgl 0855 und RBS	diese Arbeit
pVWEx1-2150	pVWEx1-Derivat mit <i>C. glutamicum</i> ATCC13032 Genen NCgl 1961-1965 und RBS	diese Arbeit
pVWEx1-2450	pVWEx1-Derivat mit <i>C. glutamicum</i> ATCC13032 Genen NCgl 1500-1501 und RBS	diese Arbeit
pVWEx1-2460	pVWEx1-Derivat mit <i>C. glutamicum</i> ATCC13032 Genen NCgl 1505-1507und RBS	diese Arbeit
pVWEx1-2480	pVWEx1-Derivat mit <i>C. glutamicum</i> ATCC13032 Genen NCgl 1519-1521und RBS	diese Arbeit
pVWEx1-shiA	pVWEx1-Derivat mit <i>C. glutamicum</i> ATCC13032 Gen NCgl 1411 und RBS	diese Arbeit

Kan^R: Resistenz gegenüber Kanamycin

Cm^R: Resistenz gegenüber Chloramphenicol

oriV_{E.c.}: Replikationsursprung für *E. coli*.

oriV_{C.g.}: Replikationsursprung für *C. glutamicum*.

RBS : Ribosomen-Bindestelle

2.2.3. Kultivierung

LB-Agar-Platten (LB-Medium + 18 g/l Agar) wurden von einer Glycerinkultur beimpft, über Nacht bei 30°C inkubiert und danach bis zu 4 Wochen bei 4°C aufbewahrt. Vorkulturen (Reagenzgläser mit 5 ml Medium) wurden entweder von Platte (für Lysinproduktionsmessung und RNA-Isolierung) oder direkt von der Glycerinkultur angeimpft. Der Verlauf des Wachstums von *C. glutamicum* in Flüssigkultur wurde anhand der OD₆₀₀ photometrisch bestimmt (Shimadzu Spektralphotometer UV-1202). Für Kultivierungen zur Lysinproduktion wurde *C. glutamicum* zunächst in 5 ml CGIII-Vorkultur, nachfolgend in 50 ml CGXII-Vorkultur und schließlich in 50 ml CGXII-Hauptkultur kultiviert (modifiziert nach Schrumpf *et al.*, 1992). Bei Stämmen mit Antibiotika-Resistenz wurden die Antibiotika nur in der Vorkultur zum Medium gegeben. Alle verwendeten *C. glutamicum* Stämme wurden grundsätzlich als Glycerinkultur (30% (v/v)) bei -70°C gelagert. In regelmäßigen Abständen wurden die Kulturen mikroskopisch untersucht.

2.3. Metabolitbestimmungen

2.3.1. Aminosäurebestimmung

Die quantitative Aminosäurebestimmung im Kulturmedium erfolgte durch *Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography* (Jones & Gilligan, 1983) mittels eines HPLC-Gerätes vom Typ HP1100 (Hewlett Packard, Waldbronn) mit angeschlossenem Fluoreszenzdetektor (G1321A) und dem Programm HP Chemstation (Hewlett Packard, Waldbronn) zur Systemsteuerung und Datenauswertung. Dazu wurden 1 ml einer Kultur entnommen, für 7 min bei 9500g abzentrifugiert und der Kulturüberstand zur Analyse eingesetzt.

Die Aminosäuren wurden mit einer *o*-Phthaldialdehyd (OPA)/Mercaptoethanol-Lösung (500 mg/l OPA / 0,2% (v/v) 2-Mercaptoethanol (Pierce Europe BV, Niederlande)) derivatisiert (Lindroth *et al.* 1979, Jones *et al.* 1983) und das Gemisch mit Hilfe einer Säule (Hypersil ODS 5 µm, 120 x 4 mm) mit vorgeschalteter Vorsäule (Hypersil ODS 5 µm, 40 x 4 mm, CS-Chromatographie Service GmbH Langerwehe)

aufgetrennt. Die Trennung der Aminosäureverbindungen wurde mit einem Gradienten mit zunehmender Methanolkonzentration in polarem Laufpuffer (0,1 M Natriumacetat, pH 7,2) erzielt. Die Aminosäurekonzentration wurde durch Vergleich mit einem externen Standard und unter zusätzlicher Verwendung von L-Asparagin als internem Standard berechnet.

2.3.2. Bestimmung von Glucose

Zur Bestimmung der Glucosekonzentration im Kulturmedium wurden Proben entnommen, abzentrifugiert (4°C, 6000g, 5min) und die Glucosekonzentration mittels des Roche-Diabur-5000-Test (Roche, Mannheim) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Der Test basiert auf einer spezifischen Glucose-Oxidase - Peroxidase Reaktion bei der D-Glukose enzymatisch mit Luftsauerstoff zu δ -D-Gluconolacton oxidiert wird. Das gebildete Wasserstoffperoxid oxidiert unter Peroxidase-Katalyse den Indikator TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) zu einem blau-grünem Farbstoff. Dessen Intensität kann mit einer Konzentrations-Farbskala verglichen werden.

2.3.3. Bestimmung von Enzymaktivitäten

Zur Gewinnung von zellfreien Extrakten für die Messung der Isocitrat-Dehydrogenase, Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase-Aktivität wurden 50 ml exponentiell wachsender Kultur von *C. glutamicum* nach einmaligem Waschen mit kaltem Aufschlusspuffer (50mM Tris, 1mM DTT, 10mM MgCl₂, 1mM EDTA, 30% Glycerin, pH 7,6) in 1 ml kaltem Aufschlusspuffer aufgenommen und mittels Ultraschalldesintegration (Dr. Hielscher GmbH, UP200s, 24kHz; Zykluszeit: 0,5; Amplitude: 55%) aufgeschlossen. Nicht aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (4 °C, 1h 14000g) und der Überstand als Rohextrakt zur Messung der Enzymaktivitäten eingesetzt. Nach Fällung in 3 M Trichloressigsäure und Resuspension in 100 µl H₂O wurden die Proteinkonzentrationen der Rohextrakte mit der Biuret-Methode (Gornall *et al.*, 1949) bestimmt.

Bestimmung der Isocitrat-Dehydrogenase Aktivität

Die Isocitrat-Dehydrogenase katalysiert die NADP^+ -abhängige Reaktion von Isocitrat zu α -Ketoglutarat und CO_2 . Der Test beruht auf der Messung der Extinktionsänderung bei 340 nm aufgrund von gebildetem NADPH (Eikmanns, *et al.* 1995). Ein Testansatz (1 ml) enthielt 0,1 M Tris-Ethanol-Amin-Puffer pH 7,6, 1 mM MnSO_4 , 0,55 mM NADP, 1 mM D,L-Isocitrat und Rohextrakt. Isocitrat wird unter CO_2 - und NADPH-Bildung zu Ketoglutarat umgesetzt.

Bestimmung der Isocitrat-Lyase Aktivität

Der Nachweis der Isocitrat-Lyase Aktivität erfolgte über einen Laktat-Dehydrogenase-gekoppelten Test und beruht auf der Messung der Extinktionsänderung bei 340 nm aufgrund von verbrauchtem NADH (Wendisch *et al.*, 1997). Ein Testansatz (0,78 ml) enthielt 64 mM MOPS pH 7,3, 6,4 mM DTT, 9,6 mM MgCl_2 , 1,28 mM EDTA, 0,256 mM NADH, 15 μl (18 U) LDH, 6,4 mM D,L-Isocitrat und Rohextrakt. Isocitrat wird zu Succinat und Glyoxylat gespalten und Glyoxylat unter NADH-Verbrauch von Laktat-Dehydrogenase (Schweineherz Laktat-Dehydrogenase Isozym 1) zu Glycolat reduziert.

Bestimmung der Malat-Synthase Aktivität

Die Malat-Synthase katalysiert die Reaktion von Glyoxylat und Acetyl-CoA zu L-Malat und CoA. Der Test beruht auf der Messung der Extinktionsänderung bei 233 nm aufgrund von verbrauchtem Acetyl-CoA (Reinscheid *et al.*, 1994). Ein Testansatz (1,03 ml) enthielt 0,1 M Tris- MgCl_2 –Puffer (52,4 mM Tris, 40 mM MgCl_2) pH 7,6, 40 mM Natrium-Glyoxylat, 3 mM Acetyl-CoA und Rohextrakt.

Bestimmung der Isopropylmalat-Synthase Aktivität

Die Isopropylmalat-Synthase katalysiert die Reaktion von Ketoisovalerat und AcetylCoA zu 2-Isopropylmalat und CoA. Der Test beruht auf der Messung der Extinktionsänderung bei 412 nm aufgrund von aus DTNB durch Reduktion mit CoA gebildetem Thionitrobenzoat (TNB) (Kohlhaw, *et al.*, 1988). Ein Testansatz (0,6 ml) enthielt 10,4 mM Tris, 8,3 mM KCl, 0,42 mM DTNB, 0,2 mM Acetyl-CoA, 0,1 mM Ketoisovalerat und Rohextrakt.

Bestimmung der Chloramphenicol-Acetyltransferase-Aktivität

Die Chloramphenicol-Acetyltransferase acetyliert Chloramphenicol mit Acetyl-CoA unter Freisetzung von CoA und wurde nach Sambrook (Sambrook, *et al.*, 1989) bestimmt. Ein Testansatz (1,07 ml) enthielt 0,94 mM DTNB, 0,093 M Tris 0,093 mM AcetylCoA, 0,234 mM Chloramphenicol und Rohextrakt. Die sich mit Bildung von Thionitrobenzoat ändernde Extinktion bei 412 nm wurde photometrisch verfolgt.

2.3.4. Spektroskopie von Cytochrom

Zum Nachweis verschiedener Cytochrome wurden Spektren von Zellsuspensionen zwischen 500 und 680 nm bei Raumtemperatur mit einem Jasco V560 Spektrophotometer aufgenommen. Die Geräteeinstellungen waren: 40 nm / min Scangeschwindigkeit, 1 nm Bandbreite, „slow response“. Das reduzierte Spektrum von 1,5 ml Zellsuspension mit einer $OD_{600} = 100$ wurde in Quarzküvetten mit 5 mm Schichtdicke nach Zugabe einiger Kristalle Dithionit aufgenommen. Zur Abschätzung des Cytochrom_d-Gehaltes wurde die Extinktion bei 627 nm eingesetzt (Kusumoto *et al.*, 2000).

2.4. Molekularbiologische Arbeiten

2.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte durch alkalische Lyse (Birnboim und Doly, 1979) und Silikatadsorption unter Verwendung des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die Plasmid-DNA wurde mit Wasser oder Niedrigsalzpuffer (TE) eluiert. Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *C. glutamicum* wurde das gleiche Prinzip verwendet jedoch mit zusätzlicher Vorbehandlung der Zellen mit Lysozym (Eikmanns *et al.*, 1994).

2.4.2. Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration einer TE-Lösung (10 mM Tris, 1 mM EDTA) wurde spektralphotometrisch durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Dabei wurden Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet, so daß eine OD₂₆₀ von 1 einer Konzentration an doppelsträngiger DNA von 50 µg/ml entspricht. (Sambrook *et al.*, 1989). Als Maß der Reinheit der DNA sollte der Quotient der Extinktionen bei 260 und 280 zwischen 1,8 und 2,0 liegen (Sambrook *et al.*, 1989). Zusätzlich wurde die DNA-Menge anhand kommerziell erhältlicher Standards (Boehringer, Mannheim) mittels Gelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung abgeschätzt.

2.4.3. Restriktion, Modifikation und Reinigung von DNA

Techniken zur Restriktion, Ligation, Klenow- und Phosphatasebehandlung erfolgten nach Sambrook *et al.* (1989). Die Verwendung der Restriktionsenzyme erfolgte nach Angaben des Herstellers. Für einen analytischen Verdau wurde ein Reaktionsansatz von 10 µl gewählt. Es wurden dabei 0,3 µg DNA und 3 U Enzym für vollständigen Verdau eingesetzt. Bei einer Restriktion im präparativen Maßstab umfasste der Ansatz 50 µl. Es wurden 1-2 µg DNA und 10-20 U Enzym eingesetzt. Die Ansätze wurden 2 h bei der für das Enzym optimalen Temperatur inkubiert.

Ligationen wurden mit der T4-DNA-Ligase (5 U/µl) des Rapid DNA-Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei jeweils 50 ng Vektor eingesetzt wurden. Zur Ligation von nicht komplementären Enden wurden mittels Klenowenzym (großes Fragment der DNA-Polymerase 1), (30min, 37°C, ca. 2 U Enzym/ 1 µg DNA) das 3'-überhängende Ende abgespalten, bzw. das 5'-überhängende Ende in Anwesenheit von 0,2 µM dNTP's aufgefüllt (Sambrook *et al.*, 1989) und die stumpfen Enden ligiert. Zur Vermeidung von Religationen wurde linearisierte Plasmid-DNA mit „Shrimp alkaline phosphatase“ (Amersham, Freiburg) dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung erfolgte in einem 50 µl-Reaktionsansatz mit 1-2 µg DNA und 1 U Enzym für 1 h bei 37°C.

PCR-Produkte wurden zur Abtrennung von Primern, Nukleotiden und der Polymerase mit einem auf Silikagel-Membran basierendem Verfahren (PCR-Purification Kit, Qiagen, Hilden) gereinigt und mit TE-Puffer pH 8,5 oder Wasser eluiert.

2.4.4. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung und Größenbestimmung von DNA-Fragmenten, sowie zur Abschätzung von DNA-Konzentrationen eingesetzt. Es wurden 1%ige (w/v) Agarose-Gele nach Sambrook (Sambrook *et al.*, 1989) verwendet. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel in einer Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg/ml) gefärbt und die DNA-Banden im UV-Licht detektiert.

2.4.5. Techniken zur Transformation von Zellen

Die Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA oder mit Ligationsansätzen erfolgte mittels der Rubidiumchlorid-Methode nach Sambrook (Sambrook *et al.*, 1989). Zur Herstellung kompetenter Zellen wurde *E. coli* in LB bis zu einer OD₆₀₀ von 0,15 kultiviert, 10-15 min auf Eis gestellt, 15 min bei 2100 g und 4°C abzentrifugiert und modifiziert nach Hanahan (Hanahan *et al.* 1983, 1985) in Rubidiumchlorid-Lösung aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen zu 200 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

Die Transformation von *C. glutamicum* erfolgte durch Elektroporation (Dunican *et al.*, 1989; Liebl *et al.*, 1989; Wolf *et al.*, 1989). Dazu wurden kompetente *C. glutamicum* Zellen nach van der Rest (van der Rest *et al.*, 1999) hergestellt, bei denen die Kultivierung stets in Anwesenheit von zellwandmodifizierenden Wachstumsinhibitoren und niedrigen Temperaturen stattfand (Haynes & Britz, 1989). Kompetente Zellen wurden in Aliquots von 100 µl bei -70°C gelagert.

Zur Elektroporation wurden 50 - 100 µl kompetenter Zellen mit 1-2 µl (ca. 250 ng/µl) DNA gemischt und nach van der Rest elektroporiert, in LBHIS-Medium (LB-

Medium, Brain-Heart-Infusion-Medium, Sorbit : 5 g/l Tryptone; 2,5 g/l Hefe-Extrakt; 5 g/l NaCl; 18 g/l Agar; 18,5 g/l Brain-Heart-Infusion; 91 g/l Sorbit) überführt und nach Hitzeschock und Regeneration auf antibiotikahaltigen LBHIS-Agar ausplattiert (van der Rest *et al.*, 1999).

2.4.6. Plasmidtransfer von *E. coli* nach *C. glutamicum* durch Transkonjugation

Die Methode der Transkonjugation wurde verwendet, um mobilisierbare Plasmide vom Donorstamm *E. coli* S17-1 zum Rezipientenstamm *C. glutamicum* zu übertragen (Schäfer *et al.*, 1990). Zur Konjugation wurden 5 ml einer *E. coli* Donorstamm-Kultur mit einer optischen Dichte von $OD_{600} = 1$ mit 3 ml einer LB-Übernachtskultur ($OD_{600} = 5-8$) des Rezipienten nach Hitzeschock (Schäfer *et al.*, 1994) gemischt. Die erhaltene Zellsuspension wurde auf ein Zellulosenitratfilter (Millipore, Typ HAWP, Porengröße 0,45 μm , Millipore S.A., Molsheim, Frankreich) aufgetragen und nach 20 stündiger Inkubation auf LB-Agar auf BHI-Agarplatten ausplattiert, die 15 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin zur Selektion auf Transkonjuganden und 50 $\mu\text{g/ml}$ Nalidixinsäure zur Unterdrückung des Wachstums von *E. coli* enthielten (Quian *et al.*, 1994).

2.4.7. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde nach Innis (Innis *et al.*, 1988) zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten, zur Klonierung ausgewählter Gene sowie zur Überprüfung von Deletionsmutanten eingesetzt. Die Durchführung erfolgte mit dem Thermocycler Gene Amp PCR System 9700 (Perkin & Elmer), Annealing-Temperatur und Elongationszeit richteten sich nach dem jeweiligen Fragment und seinen Primern (Sambrook *et al.*, 1989). Primersequenzen finden sich im Anhang. Bei Routineamplifikationen und der Überprüfung von Deletionsmutanten wurde die thermostabile Taq-Polymerase verwendet. Standardbedingungen waren wie folgt: je 500 nM Primer, je 300 μM dNTPs, 100 ng template-DNA (oder Zelllysate, s.u.), 1,5 mM MgCl_2 , 1 U Polymerase (Innis *et al.*, 1988).

Als Template (Matrize) wurden Verdünnungen genomischer DNA (100-500 ng/μl) oder alternativ auch 1-2 μl Zelllysat ganzer Zellen verwendet, welche hierzu zuvor durch Aufnahme von einer Einzelkolonie mittels eines sterilen Zahnstochers und Suspension in 100 μl Wasser 10 min bei 95°C lysiert wurden.

Zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten mit möglichst niedriger Fehlerrate wurde das Expand High Fidelity-PCR-Kit (Roche, Mannheim) mit einem Gemisch der beiden Polymerasen *Taq* und *Tgo* nach Angaben des Herstellers verwendet. Die *Tgo*-Polymerase besitzt eine Proofreading-Funktion (3'-5'-Exonukleaseaktivität), welche die Fehlerrate erheblich herabsetzt (Ling *et al.*, 1997).

Zur Vervielfältigung von sehr langen DNA-Fragmenten (bis > 20 kb) wurde das Expand Long Range-PCR-Kit (Roche, Mannheim) nach Angaben des Herstellers verwendet. Dieses Kit enthält einen für long-range-PCR optimierten Puffer (22.5 mM MgCl₂) sowie ebenfalls ein Gemisch aus *Taq*- und *Tgo*-Polymerase.

2.4.8. Konstruktion von Deletionsmutanten

Die Herstellung von Deletionsmutanten von *C. glutamicum* erfolgte nach der von Schäfer (Schäfer *et al.* 1994) etablierten Methode mit dem Plasmid pK19*mobsacB*. Dazu wurden mittels *cross-over* PCR (Link *et al.*, 1997) Deletionskonstrukte mit fusioniertem 5'- und 3'- Bereich des zu deletierenden Gens hergestellt, die so das DNA-Fragment mit der gewünschten Deletion enthielten und direkt oder über den Hilfsvektor pGEM-T (Promega) in die multiple Klonierungsstelle des in *C. glutamicum* nicht replizierbaren Plasmids pK19*mobsacB* kloniert wurden. Nach Transformation und Isolierung Kanamycin-resistenter Klone wurde ein zweites Rekombinationsereignis durch Antibiotika-freies Wachstum ermöglicht und die Kultur auf LB-Agar mit 10 % (w/v) Saccharose ausplattiert (Schäfer *et al.* 1994). Das Gen *sacB* aus *B. subtilis* kodiert die Levan-Sucrase deren Enzymaktivität letal ist (Bramucci *et al.*, 1996), wodurch nur plasmidfreie Klone wachsen können. Bei den dann Saccharose-resistenten und Kanamycin-sensitiven Klonen ist entweder die genetische Wildtyp-Situation wieder hergestellt, oder die gewünschte Deletion entstanden, was durch PCR-Analysen durch Verwendung von außerhalb des

deletierten Bereichs liegenden Primern oder wenn möglich indirekt durch geeignete Enzymtests gezeigt werden muß.

2.5. Molekularbiologische Methoden für die DNA-Chiptechnologie

2.5.1. Präparation von RNA

Die Präparation von gesamter zellulärer RNA für den Vergleich genomweiter Genexpressions-Muster erfolgte mit einem auf Silica-Gel-Membranen basierenden Verfahren (RNeasy, Qiagen), (modifiziert nach Dietrich et al., 2000). Dazu wurde ein Aliquot der Kultur (~25 ml) mit 25 g Eis abzentrifugiert (5 min, 4000 x g, 4°C) (Wendisch *et al.*, 2001), und die Pellets wurden entweder sofort zur Präparation von RNA verwendet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Präparation bei -70°C gelagert. Der Zellaufschluß erfolgte mechanisch (1 x 30 s, Silamat S5, Vivadent, Ellwangen) mit 0,5 g Zirkonium/Silica-Perlen (d=0,1mm, ROTH, Karlsruhe). Die adsorbierte RNA wurde mit 2 x 50 µl H₂O (pH 7,4) von der Membran eluiert, nachdem bei einem Zwischenschritt mit 30 U DNase I (DNA-on column Verdau, Qiagen) entsprechend den Herstellerangaben eventuell vorhandene DNA verdaut wurde. Qualität und Konzentration der RNA wurden photometrisch und mittels denaturierender Formamid-Gel-Elektrophorese bestimmt (Sambrook, *et al.*, 1989). Aus 25 ml Kultur wurden bei OD₆₀₀ ~ 8 etwa 50 µg bis 150 µg RNA erhalten. Die Lagerung von präparierter RNA erfolgte bei -20°C.

2.5.2. Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden

Für den Vergleich genomweiter Genexpressionsmuster wurden fluoreszenzmarkierte cDNA-Sonden von gleichen Mengen der zu vergleichenden RNA-Proben (15-25 µg) synthetisiert (Wendisch, *et al.*, 2001; Wendisch, *et al.*, 2003). Die Synthese erfolgte durch Umschreibung präparierter RNA in cDNA mittels Reverser Transkriptase (Superscript II, Invitrogen, Karlsruhe) mit Zufalls-Hexamer-Primern (Invitrogen) nach Wendisch (Wendisch *et al.*, 2001) im 30-µl-Ansatz. Nach

der Synthese (2 h, 42°C) wurde die RNA in 25 mM NaOH hydrolysiert (10 min, 70°C), mit 25 mM HCl neutralisiert und der Ansatz (50 µl) zum Abtrennen von nicht eingebauten Nukleotiden über Membranen (Microcon YM-30, Millipore, Schwalbach) durch Größenausschluss eingeeengt. Die in 5-15 µl H₂O vereinigten Cy3- bzw. Cy5-markierten cDNA-Sonden der zu vergleichenden RNA-Proben wurden entweder über Nacht eingefroren oder sofort in Hybridisierungsexperimenten eingesetzt.

2.5.3. Präparation von genomischer DNA

Die Isolierung genomischer DNA aus *C. glutamicum* erfolgte nach der Methode von Eikmanns (Eikmanns *et al.*, 1994). Nach enzymatischem Aufschluß der Zellen und Proteolyse wurden die Zelltrümmer durch Zugabe von 1 ml gesättigter NaCl gefällt. Nach Zentrifugation (30 min bei 5000 g) wurde die genomische DNA mit Ethanol aus dem Überstand gefällt und in TE pH 7,6 gelöst (Sambrook *et al.*, 1989).

2.5.4. Fluoreszenzmarkierung genomischer DNA-Sonden

Die Fluoreszenzmarkierung genomischer *C. glutamicum* DNA zum Einsatz in DNA-Chip-Experimenten erfolgte modifiziert nach Feinberg (Feinberg & Vogelstein, 1983; <http://cmgm.stanford.edu/pbrown/protocols>). Genomische DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* (30 U, Boehringer Mannheim) geschnitten, denaturiert (5 min 100°C) und in einem 50-µl-Ansatz mit 30 U Klenow Fragment (Invitrogen) für 2 h bei 37°C inkubiert. Nach Inaktivierung des Enzyms wurden die DNA-Sonden für die Hybridisierung über ein Gelausschluß-Chromatographiesystem (Dye-Ex-Gelfiltrations-Kit, Qiagen) entsprechend den Herstellerangaben aufgereinigt.

2.6. DNA-Chip-Technologie

Die in dieser Arbeit verwendete DNA-Chip-Technik zur Untersuchung differentieller Genexpressionsmuster und das verwendete Robotersystem zur Herstellung von DNA-Chips beruht auf dem an der Stanford University entwickelten System (Shalon *et al.*, 1996). Dabei wurden zwei unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Sonden gleichzeitig auf einem DNA-Chip hybridisiert (Shalon, *et al.*, 1996; Zimmer, *et al.*, 2000; Khodursky *et al.*, 2003; Rhodius *et al.*, 2002, Wendisch, 2003). Weitere detaillierte Information sind zusätzlich im Internet abrufbar (MGuide, <http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide>).

2.6.1. Oberflächenbeschichtung von DNA-Chip-Trägern

Für die Immobilisierung von DNA wurden die DNA-Chip-Träger zunächst mit ethanolischer Natriumhydroxid-Lösung behandelt und dann mit Poly-L-Lysin beschichtet (Shalon *et al.*, 1996; Zimmer *et al.*, 2000). Als Träger für die DNA-Chips wurden handelsübliche Objektträger aus Glas (Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen) verwendet (Zimmer *et al.*, 2000). Beschichtete Objektträger wurden mit H₂O gewaschen und nach Zentrifugation (5 min, 50 x g) und Trocknung bei 45°C (Zimmer *et al.*, 2000) in einem Exsikkator bis zu 8 Monate aufbewahrt.

2.6.2. Amplifizierung der *C. glutamicum* Gene

Zur Herstellung der PCR-Fragmente für *C. glutamicum*-Genom-Chips wurden ausgehend von genomischer DNA als Template die Gene/ORFs von *C. glutamicum* ATCC 13032 mittels PCR mit spezifischen Primerpaaren (degussa., Frankfurt; GeneScan, Freiburg) amplifiziert. Die PCR wurde in 96-well-Microtiterplatten (PE Applied Biosystems, Kalifornien, USA) im 100-µl-Ansatz mit einer PCR-Maschine (GeneAmp PCR System 9700, PE Applied Biosystems) analog der beschriebenen Methode für *E. coli* durchgeführt (Zimmer, *et al.*, 2000; Polen *et al.*, 2003). 2 µl Aliquots der PCR-Produkt-Lösung wurden durch Gelelektrophorese (1,8 % (w/v) Agarose) aufgetrennt und die Qualität und Länge der PCR-Produkte mit Hilfe eines

DNA-Längenstandards (XVI, Boehringer Mannheim) analysiert. Die PCR-Produkte wurden in der 96-well-Microtiterplatte mit Isopropanol gefällt (Sambrook et al., 1989) und nach Dekantieren des Überstandes und Lufttrocknung in der 96-well-Microtiterplatte in 20 µl H₂O resuspendiert (Zimmer, *et al.*, 2000). Für den robotergestützten Herstellungsprozess wurden die PCR-Produkte von jeweils vier 96-well-Microtiterplatten in eine 384-well-Microtiterplatte (PE Applied Biosystems) überführt (Polen *et al.*, 2003).

2.6.3. Robotergestützte Herstellung von DNA-Chips

Zur Herstellung von DNA-Chips wurde ein Computer-gesteuertes Robotersystem mit Kapillar-Pipettierhilfen verwendet (Shalon, *et al.*, 1996), (siehe auch MGuide, <http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide>) (Abbildung II) (Shalon *et al.*, 1996). Die Auftragung der PCR-Produkte auf einer Kreisfläche mit 100µm Durchmesser (Spots) auf einer 1,6 cm x 1,6 cm großen Fläche wurde nach Shalon durchgeführt (Shalon, *et al.*, 1996; Polen *et al.*, 2003). Die geometrische Anordnung der PCR-Produkte auf den DNA-Chips wurde für die spätere Daten-Auswertung dokumentiert.

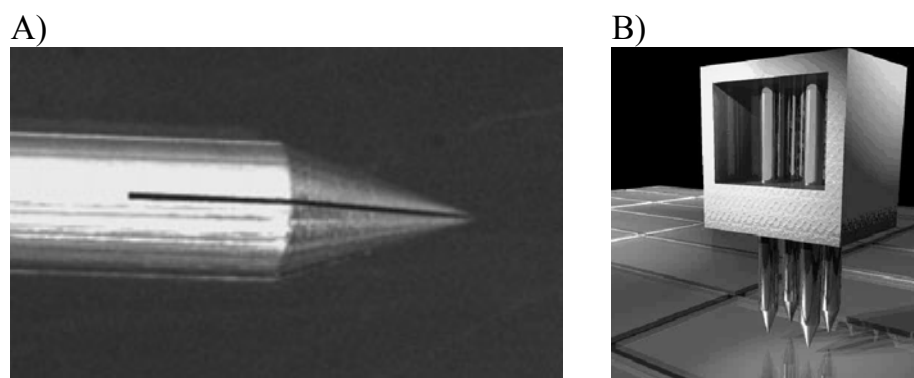


Abbildung II. Typische Pipettierhilfe mit 20-µm-Spalt zur Aufnahme von PCR-Produkt-Lösung (A) und Auftragung auf Glasoberflächen (B) bei der Herstellung von DNA-Chips (Shalon, *et al.*, 1996).

Außer den bis zu 3530 PCR-Produkten der amplifizierten *C. glutamicum*-Gene wurden zusätzlich Hybridisierungskontrollen (Lambda-DNA (16x) und PCR-Produkt eines Gens aus *E. coli*, welches kein Homologes in *C. glutamicum* besitzt (*aceK*), sowie genomische DNA von *E. coli*(16x)) und bis zu 100 mal genomische DNA von *C. glutamicum* an verschiedenen Stellen auf dem Chip angeordnet.

2.6.4. Chemische und thermische Nachbehandlung von DNA-Chips

Bevor die hergestellten DNA-Chips in Hybridisierungsexperimenten eingesetzt wurden, erfolgte zum Blockieren der Nukleinsäure-bindenden ϵ -Aminogruppe freier Seitenketten von Poly-L-Lysin und zur Immobilisierung der DNA eine chemische Nachbehandlung. Zur Generierung hybridisierungskompetenter einzelsträngiger DNA aus der doppelsträngigen DNA erfolgte eine thermische Nachbehandlung. Um eine gleichmäßigere und größere Spot-Fläche zu erzielen, wurden die DNA-Chips im ersten Schritt der Nachbehandlung durch Inkubation in einer Feuchtigkeitskammer (Sigma) über der Oberfläche einer 1 x SSC-Lösung rehydratisiert (100 ml, 15 min). Zur Fixierung der gleichmäßiger verteilten DNA-Moleküle auf der Oberfläche erfolgte nach dem Rehydratisieren eine Blitztrocknung (3 s, 90°C) sowie eine Bestrahlung mit UV-Licht (Stratalinker, 65 mJ) (Shalon, *et al.*, 1996). Die Blockierung der ϵ -Aminogruppen der freien Poly-L-Lysin-Moleküle der beschichteten Oberfläche, die nicht mit DNA bedeckt war, erfolgte durch Derivatisierung mit Succinsäureanhydrid ((Shalon *et al.*, 1996). Zur Denaturierung der DNA-Doppelstränge wurden die DNA-Chips für 2 min in 95°C heißem Wasser inkubiert und anschließend durch Inkubation in kaltem Ethanol abgekühlt (Shalon, *et al.*, 1996). Nach Trocknung durch Zentrifugation (5 min, 50 g) wurden die nachbehandelten DNA-Chips im Exsikkator gelagert.

2.6.5. DNA-Chip-Hybridisierung

Zur Bestimmung relativer mRNA-Spiegel wurden die aus den beiden zu vergleichenden RNA-Proben erhaltenen Cy3- und Cy5-fluoreszent markierten cDNA-Sonden gleichzeitig auf einem DNA-Chip hybridisiert.

Dazu wurden die vereinigten und aufgereinigten Cy3- / Cy5-markierten cDNA-Sonden in 20 µl Hybridisierungslösung bei 100°C denaturiert und für 5-10 min bei Raumtemperatur inkubiert (Zimmer, *et al.*, 2000). Zur Verringerung unspezifischer Hintergrundfluoreszenz wurde Poly-A oder Poly-dI-dC (Sigma) als Kompetitor eingesetzt. Zur Hybridisierung wurde auf dem DNA-Chip über dem Bereich mit immobilisierter DNA (1,6 cm x 1.6 cm) ein Spezialdeckgläschen platziert (LifterSlip, Erie Scientific, New Hampshire, USA) und die Hybridisierungslösung unter das Deckglas pipettiert. Nach Befeuchtung der wasserdichten Hybridisierungskammer (Die Tech Inc., USA) mit einigen Tropfen 3 x SSC-Lösung wurde der DNA-Chip 5 h bis 16 h bei 65°C im Wasserbad inkubiert (Zimmer *et al.*, 2000). Zum Entfernen der Probenlösung und unspezifisch gebundener fluoreszenzmarkierter DNA erfolgte nach der Hybridisierung ein stringentes Waschen der DNA-Chips (Zimmer *et al.*, 2000). Durch Zentrifugation (5 min, 50 g) wurde der DNA-Chip getrocknet und anschließend die Fluoreszenz auf der DNA-Chip-Oberfläche bestimmt. Die Bestimmung relativer genomischer DNA-Signalverhältnisse erfolgte analog.

2.6.6. Messung und Quantifizierung der Fluoreszenz von DNA-Chips

Zur Bestimmung relativer mRNA-Spiegel wurde die Cy3- und Cy5-Fluoreszenz der Spots ($\lambda_{EM\ max} = 570\ nm\ bzw.\ 670\ nm$, $\lambda_{EX\ max} = 532\ nm\ bzw.\ 635\ nm$) gemessen und um die Hintergrundfluoreszenz der den Spot umgebenden Fläche bereinigt. Das Verhältnis von Cy3- und Cy5-Fluoreszenz eines Spots korreliert direkt mit dem Verhältnis der Anzahl der mRNA-Moleküle in den verglichenen RNA-Proben und ist ein Maß für den relativen mRNA-Spiegel (Shalon *et al.*, 1996).

Zur Messung der orts aufgelösten Fluoreszenz auf DNA-Chips wurde der GenPix 4000 A Laser Scanner (Axon Inc., USA) verwendet. Mit Hilfe einer Software (GenePix Pro 3.0 Software, Axon Inc.) wurde die orts aufgelöste Information für die

Cy3- und Cy5-Fluoreszenz anhand der numerischen Werte als Fluorogramm graphisch dargestellt und nach Transformation in das 16-bit-Format als TIFF-Datei elektronisch gespeichert (GenePix Pro 3.0 Software).

Mit der Software wurden die Signalintensitäten der Cy3- und Cy5-Fluoreszenz der Fluorogramm-Bildpunkte (1 Bildpunkt entsprach $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ auf dem DNA-Chip) innerhalb des kreisförmig markierten Bereichs eines Spots (Abbildung III A und B)) ermittelt, daraus der Medianwert der Fluoreszenzintensitäten aller Pixel des Spots errechnet und nach Subtraktion des Medianwertes der Fluoreszenzintensitäten aller Hintergrund-Pixel das Verhältnis der Cy3- / Cy5-Netto-Fluoreszenzintensitäten berechnet (Abbildung III C)). Nach Normalisierung (siehe 2.6.7.) wurde dieses Verhältnis der Netto-Medianwerte verwendet, um den relativen mRNA-Spiegel der Gene anzugeben.

Die Berechnung von Signal/Rausch-Verhältnissen für Cy3- und Cy5-Fluoreszenzsignale erfolgte durch Bildung des Quotienten der Medianwerte Signalintensität_{Spot} / Signalintensität_{Spot-Hintergrund}. Wenn das Signal/Rausch-Verhältnis für die Cy3- und die Cy5-Fluoreszenz kleiner als drei war, wurden die Signale als zu schwach betrachtet, um zuverlässig ausgewertet werden zu können und in weiteren Analysen nicht berücksichtigt.

2.6.7. Normalisierung der relativen mRNA-Spiegel

Um die durch die Cy3- / Cy5-Fluoreszenz-Verhältnisse repräsentierten relativen mRNA-Spiegel verschiedener DNA-Chip-Experimente miteinander vergleichen zu können, d.h. gleichen mRNA-Spiegel-Verhältnissen immer den gleichen numerischen Wert zuordnen zu können, wurden die relativen Werte durch Multiplikation der numerischen Cy3- / Cy5-Fluoreszenz-Verhältnisse aller Gene mit einem konstanten Faktor normalisiert (Eisen *et al.*, 1998; Khodursky *et al.*, 2000; Wendisch *et al.*, 2001; Zimmer *et al.*, 2000), welcher anhand der Spot-Fluoreszenzen genomischer DNA (interner Standard) von *C. glutamicum* ATCC13032 so ermittelt wurde, dass nach der Multiplikation die numerischen Cy3- / Cy5-Fluoreszenz-Verhältnisse der genomischen DNA-Spots im Mittel den numerischen Wert 1 aufwiesen (Khodursky *et al.*, 2000).

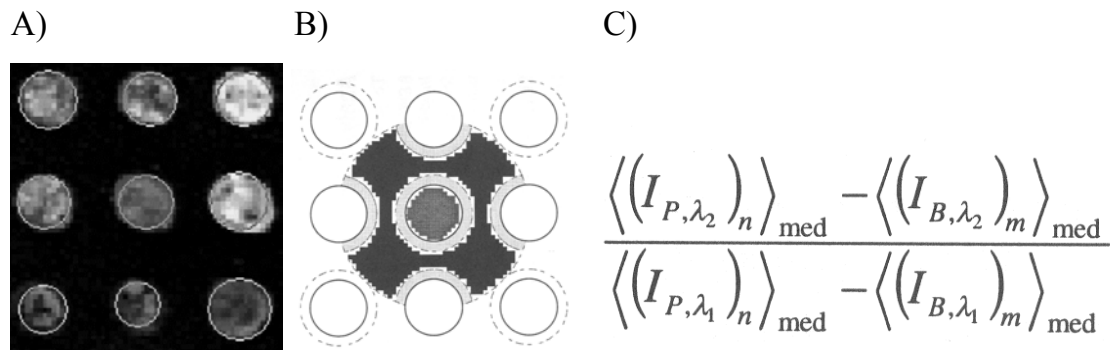


Abbildung III. Die Quantifizierung der Fluoreszenz der einzelnen Spots auf DNA-Chips erfolgte mit Hilfe der Software GenePix Pro 3.0. A) Ausschnitt aus einem Fluorogramm mit von der Software identifizierten Spots (Kreise). B) Schematische Darstellung der Quantifizierung der Spot-Fluoreszenz. Alle Bildpunkte innerhalb des mittleren Kreises (grau) gehören zum Spot. Außerhalb einer 2-Bildpunkte-breiten Kreisregion (hellgrau), deren Intensitäten nicht berücksichtigt werden, liegen die Bildpunkte des Hintergrundes (doppelter Spotdurchmesser, dunkelgrau). Jeder Bildpunkt enthält die numerische Information der orts aufgelösten Cy3- und Cy5-Fluoreszenz. C) Vor der Berechnung des Cy3-/Cy5-Netto-Fluoreszenz-Verhältnisses eines Spots wurde der Medianwert der Hintergrundfluoreszenz von dem Medianwert der Spotfluoreszenz subtrahiert (aus dem Handbuch zur GenePix Pro 3.0 Software).

2.6.8. Verwaltung und Archivierung von DNA-Chip-Daten

Zur Verwaltung und Archivierung von DNA-Chip-Daten wurde die für das Computer-Betriebssystem Linux frei erhältliche relationale Datenbank MySQL verwendet (MySQL AB Company, Uppsala, Schweden, <http://www.mysql.com>). Alle Fluorogramme und für weitere Analysen relevante DNA-Chip-Daten, sowie die relevanten Informationen zur Durchführung des Experiments wurden mit Hilfe der von T. Polen am Institut selbstentwickelten Software (Polen, 2003) erfasst und in der MySQL-Datenbank in einheitlichem Format auf dem Linux-Zentralrechner des Instituts elektronisch gespeichert, wo sie für weitere Analysen mittels der üblichen Internet-Programme zur Verfügung stehen (Polen, 2003).

2.6.9. Hierarchische Cluster Analyse

Die Hierarchische Cluster Analyse (Sokal & Michener, 1958) eignet sich zur Bestimmung von Ähnlichkeiten der Genexpression (Eisen *et al.*, 1998). Die zwei ähnlichsten Werte werden paarweise angeordnet und successive mit weiteren Pärchen graphisch als Dendogramm angeordnet, in dem die ähnlichsten Werte eines Astes örtlich nah und unterschiedliche Werte örtlich entfernt zueinander liegen (average linkage method nach Eisen *et al.*, 1998).

Für Cluster Analysen wurde ein von Polen (Polen, 2003) entwickeltes Verfahren benutzt. Dabei wurden nur Cy3-/Cy5-Fluoreszenzverhältnisse von Genen berücksichtigt, deren Spots bei der Bildauswertung von der Software automatisch erkannt wurden, deren PCR-Produkt laut Gelkontrolle einwandfrei war und deren Signalintensitäten (Cy3- oder Cy5-Fluoreszenz) mindestens dreifach über der Hintergrundfluoreszenz lag. Zur graphischen Darstellung wurden die Expressionsverhältnisse in roten (Cy5-Fluoreszenz) und grünen (Cy3-Fluoreszenz) Farbwerten angezeigt (Eisen *et al.*, 1998). Schwarz symbolisiert unveränderte relative mRNA-Spiegel, grau nicht auswertbare mRNA-Spiegel.

2.6.10. Statistik

Um die DNA-Chip-Daten statistisch auszuwerten (Arfin, *et al.*, 2000; Hommais *et al.*, 2001) wurden die Experimente unabhängig wiederholt. Beruhend auf einem von statistischen Verfahren zur Berechnung von Wahrscheinlichkeiten bezüglich Übereinstimmung oder Unterschiedlichkeit zweier Datensätze (Student/Gosset, 1908), erfolgte für Gene, deren relativer mRNA-Spiegel mehrfach bestimmt wurde, die Berechnung von p-Werten mit dem t-Test (TTEST-Tabellenfunktion, einseitiger Test, heteroskedastisch; EXCEL 2000, Microsoft). Als Vergleichsmatrix dienten die normalisierten Cy3-/Cy5-Fluoreszenzverhältnisse genomischer DNA (Lehnen *et al.*, 2002; Polen *et al.*, 2003; Polen, 2003; Wendisch, 2003). Veränderte relative mRNA-Spiegel von Genen mit p-Werten kleiner 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1. Einfluß der Leucin-Auxotrophie auf die Lysinproduktion

Um zu überprüfen, ob eine Limitierung durch Leucinmangel Lysinproduktion auslösen kann oder die Lysinproduktion in Produzenten-Stämmen maßgeblich verbessert, wurde der Einfluß einer definierten Leucinauxotrophie auf die Lysinproduktion untersucht. Dazu wurde in die vier Modellstämme ATCC13032, LE4, KK25 und MH20-22B eine definierte, stabile Leucinauxotrophie durch Deletion des ersten Gens der Leucin-Biosynthese *leuA* (Isopropylmalat-Synthase) eingeführt. Mit der durch *leuA* codierten Isopropylmalat-Synthase wurde das erste nur für die Leucin-Biosynthese benötigte Enzym des Synthesewegs gewählt, so dass zu erwarten ist, dass Vorstufen in andere Stoffwechselprodukte abfließen können und sich nicht anstauen. Die Deletion wurde gegenüber einer Insertions-Mutation aufgrund einer höheren Stabilität gewählt.

3.1.1. Herstellung von Stämmen mit einer Deletion im ersten Gen der Leucin-Biosynthese *leuA*

Um eine Deletion des Gens *leuA* zu erreichen, wurde die Methode der Vektorintegration mittels homologer Rekombination und Austausch verwendet. Zur Konstruktion eines $\Delta leuA$ -Fragments wurde in einer ersten PCR ein stromaufwärts liegender DNA-Bereich von 544 bp und ein stromabwärts liegender DNA-Bereich von 511 bp (Primer siehe Anhang, Tabelle 15) jeweils separat amplifiziert. Die beiden inneren Primer jeder PCR hatten jeweils eine zueinander komplementäre, 21 nt lange *linker*-Sequenz an ihren 5'-Enden (Link *et al.*, 1997). In einer zweiten *cross-over* PCR wurden die PCR-Produkte der ersten PCR als *template* eingesetzt und durch den Einsatz der beiden äußeren Primer amplifiziert. So wurde ein Fragment erhalten, dass aus einem stromaufwärts und stromabwärts liegenden Bereich des *leuA*-Gens besteht.

Das erhaltene 1084bp $\Delta leuA$ -Fragment wurde mit einem Zwischenschritt über den Vektor pGEM-T (Promega, Madison USA) in pK19*mobsacB* kloniert und nach *E. coli* DH5 α transformiert (Schäfer *et al.*, 1994). Der isolierte Vector pK19*mobsacB* $\Delta leuA$ wurde in den *E. coli* Transkonjugationsstamm S17-1 (Simon *et*

al., 1983) eingebracht und ein Saccharose-sensitiver, Kanamycin-resistenter Klon wurde zur Transkonjugation mit *C. glutamicum* 13032, LE4 und MH20-22B eingesetzt, wobei nach Selektion auf Kanamycinresistenz jeweils *C. glutamicum* Klone erhalten wurden, die die durch den Vektor vermittelte Saccharosesensitivität aufwiesen.

Durch Kultivierung zweier dieser Klone ohne den Zusatz von Kanamycin, jedoch mit Saccharose, wurde durch eine zweite Rekombination der Verlust des Vektors ermöglicht (Schäfer *et al.*, 1994). Das Vorliegen der gewünschten Deletion wurde durch PCR von je 8 Klonen bei etwa der Hälfte der untersuchten Klone im Gegensatz zu den Ausgangsstämmen mit intaktem *leuA*-Gen nachgewiesen. Die Klone *wtΔleuA* wurden zudem phänotypisch auf Leucinauxotrophie getestet, indem sie auf CGXII Minimalmedium-Agarplatten mit 2% (w/v) Glucose und zur Kontrolle auf dem selben Medium jedoch mit 300mg/l Leucin ausgestrichen wurden. Alle in der PCR als positiv identifizierten Klone zeigten auch phänotypische Leucin-Auxotrophie. Da die Ausgangsstämme MH20-22B und LE4 bereits Leucin-auxotroph sind, konnten sie nicht phänotypisch überprüft werden.

Da der Stamm KK25 bereits eine Kanamycinresistenz trägt, konnte er nicht mit der beschriebenen Methode als Deletionsmutante generiert werden. Deshalb wurde der Stamm *wtΔleuA* benutzt, um durch Integration des *lysC^{FBR}*-Allel-tragenden Plasmids pKK6 aus *E. coli* S17-1pKK6 den Stamm *KK25ΔleuA* zu konstruieren.

Zur weiteren Kontrolle der Deletion des Gens *leuA* wurde die Aktivität der Isopropylmalat-Synthase (Patek *et al.* 1994; Beltzer *et al.* 1988) gemessen (Tabelle 1). Als Positiv-Kontrolle wurde der Stamm *wt(pKK71)*, welcher das Gen *leuA* auf einem Expressionsplasmid trägt, mit in die Messung einbezogen. Dieser Stamm zeigte eine Aktivität von 0,108 U/mg (Protein). Der Wildtyp hatte eine Aktivität von 0,011 U/mg (Protein), in den Stämmen *wtΔleuA*, *LE4ΔleuA*, *MH20-22BΔleuA* und *KK25ΔleuA* lag die Aktivität unter der Nachweisgrenze. Alle Stämme zeigten auf LB-Medium unverändertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp.

Tabelle 1: Spezifische Aktivität der Isopropylmalat-Synthase im Rohextrakt verschiedener *C. glutamicum* Stämme.

<i>C. glutamicum</i> Stämme	IPM-Synthase-Aktivität U/mgProtein
wt ^a pKK71 ^b	0,108
wt	0,011± 0,002
wt $\Delta leuA$	< 0,003
KK25 $\Delta leuA$	< 0,003
LE4 $\Delta leuA$	< 0,003
MH20-22B $\Delta leuA$	< 0,003

^a wt bezeichnet den Wildtyp-Stamm ATCC13032

^b pKK71 ist ein *leuA*-Überexpressionsplasmid (pJC1::*leuA*)

3.1.2. Lysinproduktion der *leuA*-Deletionsstämme und der isogenen Ausgangsstämme

Um den Einfluß der Leucin-Auxotrophie bzw. der *leuA*-Deletion auf die Lysinbildung zu überprüfen, wurden die vier konstruierten Stämme sowie deren Ausgangsstämme parallel kultiviert und die Lysin- und Leucin-Konzentration im Überstand gemessen. Das supplementierte Leucin ist nach ca. 15h Wachstum verbraucht, die Lysinkonzentrationen sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

Tabelle 2 : Wachstumsraten, optische Dichte, maximale Produktionsrate ([Lys]/TG x Zeit) und Lysinkonzentrationen im Überstand bei Kultivierung verschiedener *C. glutamicum* Stämme auf CGXII-Minimalmedium mit 10% (w/v) Glukose und 300mg/l Leucin nach 72 Stunden und 200 Stunden Inkubationszeit.

Stamm	$\mu_{\max}[\text{h}^{-1}]$	OD ₆₀₀ (72h)	[Lys]mM _{72h}	[Lys] mM _{200h}	Produktionsrate _{max}
wt	0,39	60	1 ± 0,5	n.d.	n.d.
wtΔleuA	0,35	60	3 ± 0,5	n.d.	n.d.
LE4	0,35	35	7 ± 1	n.d.	n.d.
LE4ΔleuA	0,31	48	8 ± 1	n.d.	n.d.
KK25	0,36	55	22 ± 2	n.d.	n.d.
KK25ΔleuA	0,32	63	85 ± 5	81 ± 2	1,21
MH20-22B	0,29	30	100 ± 5	122 ± 12	2,14
MH20-22BΔleuA	0,28	48	117 ± 5	142 ± 3	2,25

Die Stämme mit *leuA*-Gendeletion zeigten im Vergleich zu ihren Ausgangsstämmen nur geringe Verringerung der Wachstumsrate bei Zugabe von 300 mg/l Leucin, allerdings war die erreichte End-OD der Stämme LE4Δ*leuA* und MH20-22BΔ*leuA* höher als die der Ausgangsstämme. Die Stämme ATCC13032Δ*leuA* sowie LE4Δ*leuA* zeigten nur geringe bis gar keine Veränderungen bei der Lysinkonzentration im Überstand verglichen mit ihren Ausgangsstämmen. Der Stamm MH20-22BΔ*leuA* hingegen zeigte eine leicht erhöhte Lysinproduktion gegenüber dem Produktionsstamm nach 200 h Kultivierung (142 mM statt 122 mM), sowie Ausscheidung von 18 mM Valin. Die Glukose ist zu diesem Zeitpunkt vollständig verbraucht. Den größten Einfluß auf die Lysinbildung hatte die Deletion jedoch im Stamm KK25, dem Wildtypderivat mit feedbackresistenter Aspartatkinase. Der Stamm KK25 produziert bis zu 30 mM Lysin. Durch Einführung der Leucinauxotrophie konnte die Ausscheidung auf über 80 mM fast verdreifacht werden. Allerdings nahm

die OD bei dem Stamm $KK25\Delta leuA$ vom Zeitpunkt mit maximaler OD nach 50 h etwa auf die Hälfte ab, und der Stamm verbrauchte die Glukose nur bis auf 5% Restglukose, während sein Ausgangsstamm zu diesem Zeitpunkt die Glukose vollständig verbraucht hatte. Die Restglukose im Überstand des Stamms $KK25\Delta leuA$ betrug nach 70 h immer noch 3%, während der Produktionsstamm und sein Derivat $MH20-22B\Delta leuA$ die Glukose bis zum Ende der Kultivierung verbrauchten und in der stationären Phase eine konstante OD hatten. Somit muß davon ausgegangen werden, dass der Stamm $KK25\Delta leuA$ aus anderen Gründen das Wachstum einstellt als der Produktionsstamm und zusätzlich mehr Zellen absterben. (Abbildung 1). Der Stamm $KK25\Delta leuA$ schied geringere Mengen Lysin aus, da er nach ca. 45h die Produktion einstellte, zum selben Zeitpunkt der stationären Phase also, zu dem auch die Biomasse stark abnahm von OD_{600} 60 auf 30 (dunkelgrau gestrichelte Linie in Abbildung 1). Hingegen verbrauchten die Stämme $MH20-22B$ und $MH20-22B\Delta leuA$ die gesamte Glukose und schieden weiter Lysin ins Medium aus, so dass hier nach 200h mehr Lysin im Medium akkumuliert war. Der Stamm $KK25\Delta leuA$ produzierte auch deshalb weniger Lysin, weil seine Produktionsrate ($c[Lys]/TG \times Zeit$) geringer war, insbesondere zu den Zeitpunkten, in denen der Produzent viel Lysin ausgeschieden hat. Der Stamm $MH20-22B\Delta leuA$ zeigte bei höherer Lysin-Endkonzentration verglichen mit $MH20-22B$ leicht höhere Produktionsraten als der Produzent.

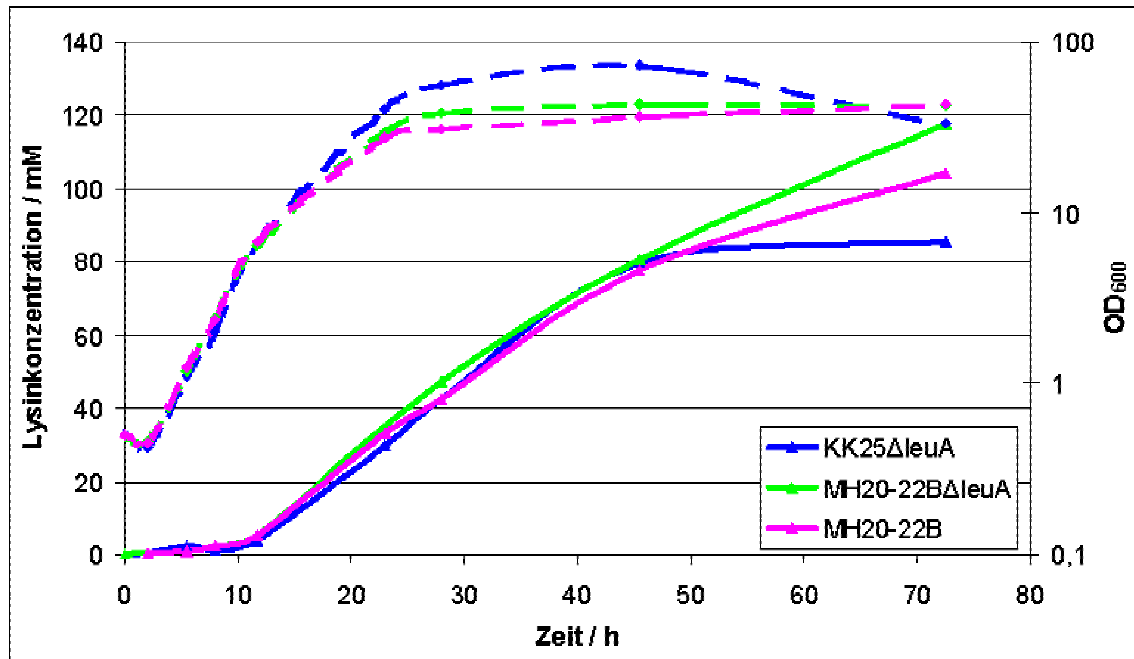


Abbildung 1: Zeitlicher Verlauf der Lysinakkumulation und des Wachstums verschiedener *C. glutamicum* Stämme in CGXII-Minimalmedium mit 10% (v/v) Glukose und 300 mg/l Leucin.

Damit konnte gezeigt werden, dass die Deletion des ersten Gens der Leucinbiosynthese, *leuA* in einem Stamm mit deregulierter Aspartatkinase (*lysC^{FBR}*) eine drastische Erhöhung der Lysinproduktion bewirkt, aber der gemeinsame Einfluß von Leucinauxotrophie und deregulierter Aspartatkinase nicht ausreichend ist, um die Produktionskapazität des Produktionsstamms MH20-22B zu erreichen. Entsprechend muß der Stamm MH20-22B noch weitere, unbekannte Merkmale aufweisen, welche die Verdoppelung der Lysinausscheidung gegenüber KK25Δ*leuA* verursachen.

3.2. Etablierung und Validierung der DNA-Chip-Technologie für *C. glutamicum*

Im Rahmen der Etablierung und Validierung der DNA-Chip-Technologie für *Corynebacterium glutamicum* am Institut wurde zunächst die Qualität der selbst hergestellten DNA-Chips überprüft. Zur Validierung der DNA-Chips wurde ein bekanntes Regulationsphänomen in *C. glutamicum* anhand der mRNA-Spiegel bestimmter Gene analysiert.

Um die ausreichende Immobilisierung der PCR-Produkte durch den roboter-gestützten Auftrag auf den Chip zu überprüfen, wurden genomische DNA-Sonden unterschiedlich fluoreszent markiert und gleichzeitig auf dem Chip hybridisiert (Richmond *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu fluoreszent markierten cDNA-Sonden repräsentieren fluoreszent markierte genomische DNA-Sonden die Nukleotidsequenzen von allen ORFs, unabhängig von der Genexpression in der Zelle. Somit liegen für jedes Gen Sonden im Überschuß in der Hybridisierungslösung vor. Deshalb sollten bei erfolgreicher Immobilisierung der PCR-Produkte auf den DNA-Chips bei allen Spots ausreichende Fluoreszenzsignale messbar sein. Schwache Fluoreszenzsignale deuten auf geringe Mengen immobilisierten PCR-Produktes hin.

Signalintensitäten mit Signal/Rausch-Verhältnissen größer 3 bei rot- und grün-Fluoreszenz wurden i.d.R. bei über 95% der 3531 auf dem DNA-Chip immobilisierten PCR-Produkte gemessen. Ein typisches Beispiel ist in Abbildung 2 dargestellt. Die Daten zeigen, dass über 95% der auf den DNA-Chips immobilisierten PCR-Produkte in einer Menge vorhanden sind, die eine Hybridisierung der Sonde erlaubt, deren Fluoreszenz-Signale signifikant höher sind als das Hintergrundsignal. Somit ermöglichen die hergestellten DNA-Chips effiziente Hybridisierung mit cDNA-Sonden zur Bestimmung relativer mRNA-Spiegel.

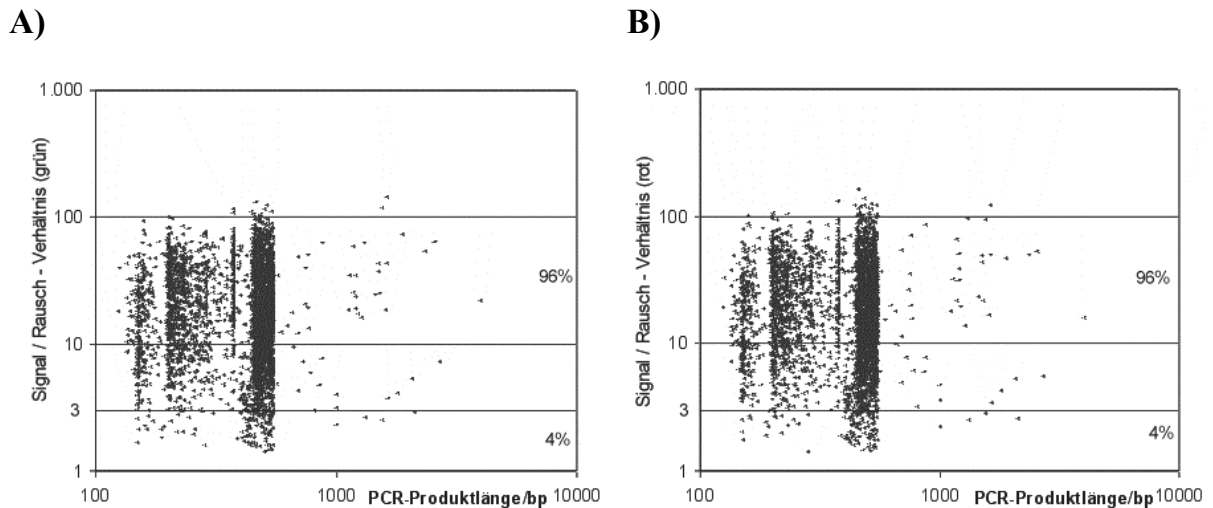


Abbildung 2: Typische Verteilung der Signalintensitäten bei Hybridisierungs-Experimenten ausgehend von genomischer DNA. Die Signal / Rausch-Verhältnisse der Hybridisierungssignale Cy3- (A) bzw. Cy5- (B) fluoreszent markierter Sonden der 3531 auf dem Chip immobilisierten PCR - Produkte von *C. glutamicum* wurden gegen die PCR-Produktlänge aufgetragen. 96 % aller Signale zeigten hierbei ein Signal / Rausch-Verhältnis > 3 .

Um zu überprüfen, ob die DNA-Chips die Expressionsverhältnisse in der Zelle widerspiegeln, wurde Acetat-abhängige Regulation untersucht (Wendisch *et al.*, 1997; Gerstmeir *et al.*, 2003 (in press)). Hierfür wurde die Genexpression bei Wachstum von *C. glutamicum* auf LB-Medium mit 1% (w/v) Kalium-Acetat mit Wachstum auf LB-Medium verglichen. Die vier Gene *ack*, *pta*, *aceA* und *aceB* des Acetat-Stimulons zeigten alle mindestens zweifach erhöhte relative mRNA-Spiegel. Um die Ergebnisse der DNA-Chip-Experimente mit anderen, biochemischen Methoden überprüfen zu können, wurden für die Gene *aceA* und *aceB* die entsprechenden Enzymaktivitäten Isocitrat-Lyase bzw. Malat-Synthase gemessen. Ferner wurde die Expression von Transkriptionsfusionen des Gens der Chloramphenicol-Acetyltransferase *cat* mit dem Promotorbereich der Gene *aceA* und *aceB* (Wendisch *et al.*, 1997) mittels Chloramphenicol-Acetyltransferase-Aktivitäts-Bestimmungen von unter gleichen Bedingungen kultivierten Stämmen bestimmt (Tabelle 3). Dabei war die Expression

der beiden Gene *aceA* und *aceB* in Zellen, die mit Acetat gewachsen waren, stets höher als in Zellen, die nur auf LB gewachsen waren.

Tabelle 3: Verhältnis der Expression der Gene *aceA* und *aceB* bei Wachstum von *C. glutamicum* ATCC 13032 auf LB-Medium mit 1% (w/v) Kaliumacetat gegenüber Wachstum auf LB-Medium, bestimmt durch Messung der spezifischen Enzymaktivität der Isocitrat-Lyase bzw. der Malat-Synthase, durch Messung der Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT)-Aktivität von Transcriptfusionen sowie durch Messung des relativen mRNA-Spiegels.

Gen / Enzym	relativer mRNA-Spiegel	relative Expression der Transkriptionsfusion	relative spezifische Enzymaktivität
<i>aceA</i> / ICL ^a	10 ± 8	6,4 ± 0,5	2 ± 0,7
<i>aceB</i> / MS ^b	8 ± 3	11,8 ± 0,6	10 ± 4

^a ICL: Isocitrat-Lyase

^b MS: Malat-Synthase

Die ermittelten Verhältnisse für das Gen *aceB* bzw. sein Produkt Malat-Synthase betrugen bei Vergleichen mit jeder der drei benutzten Methoden etwa einen Faktor von 10. Auch die ermittelten Verhältnisse für das Gen *aceA* betrugen bei der CAT-Aktivitäts-Messung sowie den Chip-Ergebnissen ähnlich hohe Werte. Aus den Messungen der Aktivität der Isocitrat-Lyase konnten mit Faktor 2 nur schwache Unterschiede berechnet werden. Dies wurde aber möglichen unerkannten Fehlern bei der Messung zugeschrieben und nicht weiter verfolgt.

Somit konnte gezeigt werden, dass die aus den DNA-Chipdaten ermittelten Verhältnisse den tatsächlichen relativen mRNA-Spiegel in der Zelle entsprechen und für eine globale Betrachtung der Genexpression geeignet sind.

3.2.1. Validierung von DNA-Chip-Untersuchungen bei Vergleich der Genome unterschiedlicher *C. glutamicum*-Stämme.

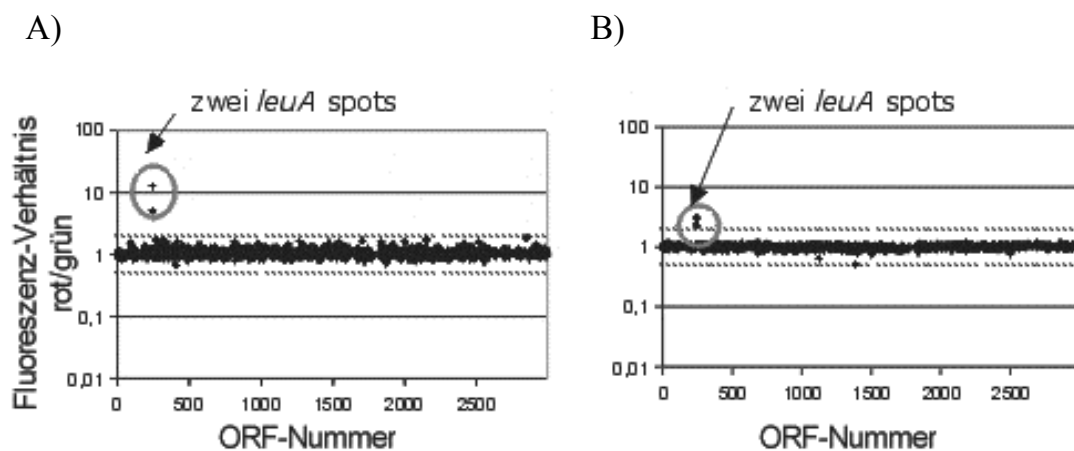
Bei Vergleichen nicht-isogener Stämme ist eine Untersuchung der genomischen DNA dieser Stämme notwendig, da chromosomale Unterschiede Expressionsdifferenzen überlagern können. Um die Anwendbarkeit der *C. glutamicum* DNA-Chips auf Vergleiche genomischer DNA bestimmen zu können, wurden Stämme mit bekannten genomischen Unterschieden miteinander verglichen. Dazu wurde gleichzeitig *EcoRV*-verdaute genomische DNA des *C. glutamicum* Stamms ATCC 13032 (wt) und *EcoRV*-verdaute genomische DNA des Stamms wt Δ *leuA* auf einem Chip hybridisiert. Analog wurde mit den Stämmen MH20-22B und MH20-22B Δ *leuA* verfahren. Die beiden Hybridisierungssignale des 1,8 kb großen Gens *leuA* waren in den Ausgangsstämmen ohne Deletion bis zu 10fach höher, die Signale aller anderen Gene waren in beiden Stämmen jeweils gleich stark. Die Ergebnisse der genomischen-DNA-Hybridisierung sind in Abbildung 3 graphisch dargestellt. Man erkennt, dass außer dem Gen *leuA*, welches mit zwei unterschiedlichen PCR-Produkten auf dem Chip repräsentiert ist, kein Gen ein Signalverhältnis größer als 2 bzw. kleiner als 0,5 aufweist und es somit keine falsch-positiven Signale gibt.

Somit konnte gezeigt werden, dass mit der Technik der „Comparative Genome Hybridisation“ mit den *C. glutamicum* DNA-Chips chromosomale Deletionen von einzelnen Genen detektierbar sind.

Abbildung 3: Verhältnisse der Fluoreszenzsignale einer Hybridisierung genomischer DNA Sonden isogener *C. glutamicum* Stämme. Es wurde das Cy5-/Cy3-Fluoreszenz-Verhältnis gegen die ORF-Nummer aufgetragen. Außerhalb der eingezeichneten Intervallgrenzen (gestrichelt) ist das Verhältnis der Cy3- und Cy5-Fluoreszenzintensitäten größer als 2 bzw. kleiner als 0,5.

A) MH20-22B / MH20-22B Δ *leuA*

B) wt / wt Δ *leuA*



Um die Anwendbarkeit der Technik der genomischen-DNA-Hybridisierung für die Detektion von Genamplifikationen zu überprüfen, wurden Experimente mit weiteren Modellstämmen durchgeführt. Der Stamm KK25 hat aufgrund einer Integration des Plasmids pKK6 (Bröer *et al.* 1992) mit dem nur durch eine Punktmutation veränderten *lysC*^{FBR}-Allel eine zusätzliche Kopie des Gens *lysC*, so dass ein doppelt so starkes Signal für dieses PCR-Produkt bei Hybridisierung genomischer DNA des Stamms KK25 und eines Wildtypstamms zu erwarten ist. In Hybridisierungen des Stamms KK25 mit dem Wildtyp oder dem Stamm LE4 ist das Verhältnis der Hybridisierungssignale für das Gen *lysC* gleich zwei, das Verhältnis der Signalintensitäten für das Gen *lysC* bei Hybridisierung genomischer DNA anderer Stämme ist eins. Andere Gene des Lysinstoffwechsels als Negativkontrollen (beispielhaft: *lysA*) zeigen keine Unterschiede (Tabelle 4).

Tabelle 4: Verhältnis der Signalintensitäten ausgewählter Gene bei Vergleichen genomischer DNA verschiedener Stämme. Das Gen *lysA* dient hier als Negativkontrolle, da es in allen Stämmen in nur einer Kopie vorkommt.

Gen	<i>lysC</i>	<i>lysA</i>
Stammvergleich	relatives Signal-Verhältnis	
KK25 / wt	2,4	0,8
KK25 / wt	2	1,1
LE4 / MH20-22B	1	0,7
LE4 / MH20-22B	1	0,8
LE4 / wt	1,3	0,9
LE4 / wt	1,3	1,1
KK25 / LE4	1,8	0,7
KK25 / LE4	1,9	0,9
wt / MH20-22B	0,8	1,4
wt / MH20-22B Δ leuA	1,3	1,1
wt / wt Δ leuA	1	0,9
MH20-22B / MH20-22B Δ leuA	1	1,1

Die Ergebnisse zeigen, dass mit den selbst hergestellten *C. glutamicum* DNA-Chips eine Untersuchung von chromosomalen Unterschieden einzelner *C. glutamicum* –Stämme mit einer Auflösung von ca. 1 kb bzw. einem Gen möglich ist (vgl. Peters et al., 2003). Die Untersuchungen mit dem Stamm KK25 zeigen, dass eine Differenzierung von nur einer Gen-Kopie Unterschied mit den Chips nachweisbar ist, ebenso belegt der mit Faktor zwei ermittelte Wert dieses Signalverhältnisses, daß die Signalintensität bei Kopiedifferenzen quantitativ ermittelt werden kann.

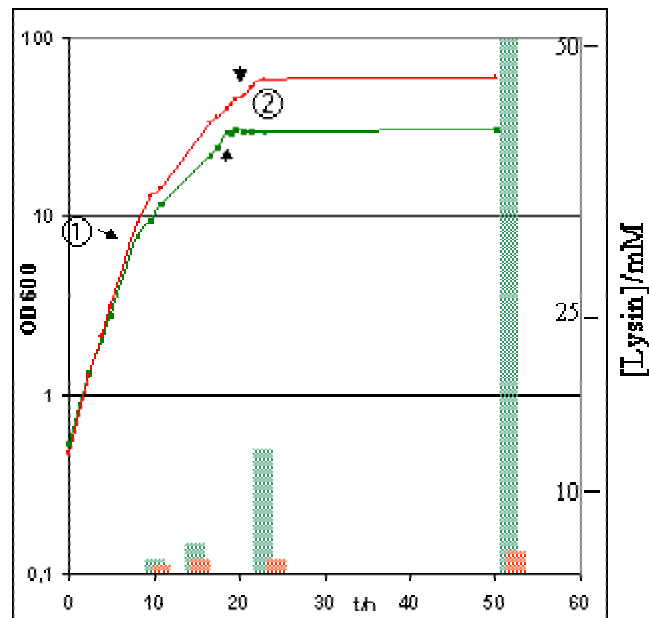
3.3. DNA-Chip-Untersuchungen zur Identifizierung Lysinbildungs-relavanter Genregulation

Die Lysinproduktion im Stamm MH20-22B beginnt bei Kultivierung in *batch*-Kultur (Schrumpf *et al.* 1992) (siehe auch Abbildung 4) erst nach mehreren Stunden bei einer OD von etwa 7-10, wenn das supplementierte Leucin verbraucht ist. Bei einer OD von 30 hat der Stamm aufgrund des Leucin-Mangels die stationäre Phase erreicht. Der Stamm produziert bei eingestelltem Wachstum weiter Lysin, bis die vorgelegte Glukose verbraucht ist. Der Wildtyp wächst bis zu einer OD von 60 und scheidet kein Lysin aus. Somit sollte es Unterschiede in der Wachstumsphasen-abhängigen Expression der einzelnen Stämme geben. Da ferner eine Leucinauxotrophie zusammen mit der feedbackresistenten Aspartatkinase nicht ausreicht, um die hohe Lysinproduktionskapazität des Produktionsstamms MH20-22B Δ *leuA* zu erreichen, sollte es weitere regulatorische Unterschiede zwischen dem Wildtyp und MH20-22B geben. Solche Unterschiede sollten mit den folgenden Untersuchungen identifiziert werden.

3.3.1. Wachstums- und Produktions-Phasen abhängige Regulation in Wildtyp und MH20-22B

Um Unterschiede in der Phasen-abhängigen Regulation zwischen *C. glutamicum* ATCC 13032 und MH20-22B zu identifizieren, welche Einfluß auf die Lysinbildung haben könnten, wurde *C. glutamicum* ATCC 13032 –mRNA in zwei verschiedenen Wachstumsphasen isoliert (vgl. Abbildung 4) und die beiden Proben gegeneinander auf einem Chip hybridisiert. Ebenso wurde mit dem Stamm MH20-22B verfahren.

Abbildung 4: Verlauf einer Lysinfermentation im Schüttelkolben mit *C. glutamicum* MH20-22B (grün) und ATCC 13032 (rot), CGXII-Minimalmedium, 10%(v/v) Glukose, 300mg/l Leucin. Die Punkte 1 und 2 markieren den Zeitpunkt der RNA-Isolierung. Balken symbolisieren die Lysin-Konzentration, Punkte symbolisieren die Optische Dichte



Bei einem Vergleich der Genexpression in *C. glutamicum* ATCC 13032 zwischen exponentieller und stationärer Phase zeigten von 214 Genen (7% des Genoms) mit veränderten relativen mRNA-Spiegeln 129 Gene erhöhte relative mRNA-Spiegel in der exponentiellen Phase und 85 Gene erhöhte relative mRNA-Spiegel in der stationären Phase (Tabelle 16, Anhang).

Im Produktionsstamm MH20-22B waren im analogen Vergleich zwischen exponentieller und stationärer Phase 200 Gene (7%) unterschiedlich exprimiert, jedoch hatten 187 Gene erhöhte relative mRNA-Spiegel in der exponentiellen Phase und nur 13 Gene erhöhte relative mRNA-Spiegel in der stationären Phase (Tabelle 17, Anhang).

Im Wildtyp und MH20-22B zeigen viele Gene ein ähnliches Expressionsmuster in der exponentiellen Phase. U.a. haben die Gene *oppABCD*, ORFs 1346-1352 (putative Eisen-ABC-Transporter) und ORFs 1168-1173 (putativer *irp*-Eisentransporter), sowie die Methionin-Biosynthesegene *metA*, *metY* erhöhte relative mRNA-Spiegel. Das zeigt, dass die Regulation der beiden Stämme für stark

kontrollierte Gene wie die des Eisen-Stoffwechsels (Herbig & Helmann 2002), für Gene sekundärer Metabolitaufnahme wie des putativen Oligopeptidaufnahmesystems *oppABCD* sowie für Gene der Biosynthese einiger Aminosäuren ähnlich ist. Die gleiche Wachstumsphasen-abhängige Regulation dreier Gene des Pentosephosphatweges (*zwf*, *tkt*, *tal*), trotz potentiell erhöhtem Fluß in den PPW für die Bereitstellung größerer NADPH-Mengen aufgrund der Lysinproduktion des Stamms MH20-22B (Moritz 2000) in der stationären Phase zeigt, dass nicht die Expression dieser Gene für Lysinproduktion verantwortlich sein kann. Aus dem gleichen Grund scheint die Regulation der Homoserin-Dehydrogenase (*hom*) keine Rolle zu spielen. Es gibt jedoch 20 Gene, die im Wildtyp in der exponentiellen Phase höhere mRNA-Spiegel haben, im MH20-22B aber unverändert sind. Dazu zählt u.a. der Glutamattransporter *gluABCD*, auf den später noch eingegangen wird. Analog wurden im MH20-22B 89 Gene, die beim Wildtyp unveränderte mRNA-Spiegel zeigten, in der exponentiellen Phase stärker exprimiert. Dazu zählten u.a. die Gene *asd* und *lysS* sowie das ATPase-Operon *atpABDEFGH*, auf das ebenfalls später noch eingegangen wird.

Die Gene mit erhöhten relativen mRNA-Spiegeln in der stationären Phase unterschieden sich sehr stark zwischen Wildtyp und Produktionsstamm. So hatten im MH20-22B nur 13 Gene erhöhte relative mRNA-Spiegel in der stationären Phase, darunter allein aufgrund der Leucinlimitierung vier Gene des Leucin-Stoffwechsels (*leuA*, *leuB*, *leuC*, *ilvB*). Nur weitere drei Gene waren exklusiv im MH20-22B reguliert (s.u.). Drei Gene bzw. Operons, u.a. ein putatives Mangan-Transportsystem, auf das später noch eingegangen wird (ORF 2807-2809), wurden gleich reguliert. Darüber hinaus waren beim Wildtyp auffällig viele Veränderungen zu beobachten, die mit dem Redoxhaushalt bzw. der Atmungskette zusammen hingen. So hatten das Succinat-Dehydrogenase Operon *sdhABCD* (Molenaar *et al.*, 2000), ein putatives Operon für die respiratorische Nitrat-Reduktase *narJHGK* (Bott & Niebisch, in press) und ein Cytochrom Cluster *cytB*, *rpt*, *qcrC*, *ctaE* (Niebisch & Bott 2001; Nakagawa *et al.*, 2002), erhöhte relative mRNA-Spiegel in der stationären Phase. Insgesamt hatten 40 Gene ausschließlich im Wildtyp in der stationären Phase erhöhte relative mRNA-Spiegel.

Obwohl aus den relativen mRNA-Spiegeln nicht auf absolute erhöhte bzw. verringerte Expression geschlossen werden kann, wiesen die Expressionsmuster darauf

hin, dass der *C. glutamicum* Wildtypstamm und der Produzent MH20-22B während der exponentiellen Wachstumsphase ähnliche regulatorische Möglichkeiten nutzten, um durch Aufnahme möglichst vieler Stoffe aus dem Medium (z.B. als Cofaktor benötigtes Eisen) eine hohe Stoffwechselrate zu erreichen. Bei Eintritt in die stationäre Phase änderte sich im Wildtyp die Regulation und verbleibende Metabolite wie z.B. Nitrat wurden zur Energiegewinnung mit Hilfe potentiell erhöhter Nitratreduktase-Gehalte genutzt. Im MH20-22B jedoch war kaum Expressionsveränderung hinsichtlich Regulierung weiterer Gene zu beobachten. Vielmehr schien es, im Vergleich mit der Situation im Wildtyp, als ob der Stamm nur die Expression der Gene der exponentiellen Phase verringert bzw. einstellt, wie z.B. die der ATPase. Auch das Gen für die PEP-Carboxykinase, welches in *E. coli* verstärkt in der stationären Phase exprimiert wird (Neidhardt *et al.*, 1996) blieb nur im MH20-22B unverändert.

Somit ließen sich die Auswirkungen der bei Lysinproduktion physiologisch beschriebenen Bedingungen mit Restglukose und geringer End-OD des Produktionsstamms im Vergleich zum Wildtyp auf Transkriptions-Ebene nachweisen. Das Expressionsmuster des MH20-22B zeigte, dass vor allem die Leucinlimitierung zum Eintritt in die Produktionsphase führt und es nicht zu stationäre-Phasen-spezifischer Genregulation kommt. Die Gene, welche in dieser Produktionsphase erhöhte relative mRNA-Spiegel hatten, könnten für Lysinproduktion von Bedeutung sein, und die Überexpression solcher Gene könnte zu erhöhter Lysinproduktion führen. Es handelt sich bei diesen Genen um die oben erwähnten drei Gene ORFs 1866, 2337 und 3152, diese werden später näher betrachtet. Des Weiteren ließ sich bereits die Regulation der Gene *zwf*, *tkt*, *tal* und *hom* als Ursache für unterschiedliche Lysinbildung ausschließen.

3.3.2. Vergleich der Genexpression zwischen Wildtyp und MH20-22B

Um differenzielle Expression zwischen *C. glutamicum* ATCC 13032 und MH20-22B zu identifizieren, die Einfluß auf Lysinbildung haben kann, wurde RNA aus beiden unter identischen Bedingungen kultivierten Stämmen zu Beginn der stationären Wachstumsphase bei einer OD von ca. 27 (MH20-22B) bzw. 55 (Wildtyp) (Abbildung 4) isoliert und auf einen DNA-Chip hybridisiert. Da die stationäre Phase im Produzenten die Hauptphase der Lysinbildung ist, sollte es Expressions-Differenzen geben, die die Ursache der Lysinbildung sind. Da die beiden Stämme zu verschiedenen End-ODs wachsen, und sich die dann herrschenden Kulturbedingungen stark unterscheiden, muß erwähnt werden, dass sich hier leider keine exakt gleichen Bedingungen einstellen ließen, wie sie für optimale Chipauswertung notwendig sind.

In der stationären Phase zeigten 329 Gene differenzielle Expression: 110 Gene hatten erhöhte relative mRNA-Spiegel im Wildtyp, 219 Gene hatten erhöhte relative mRNA-Spiegel im MH20-22B. Die vollständigen Daten finden sich in Tabelle 18 im Anhang.

Etwa 20 der im Wildtyp im Vergleich zum Stamm MH20-22B höher exprimierten Gene codieren für verschiedene Stoffwechselenzyme, u.a. der Purinbiosynthese, Histidinbiosynthese und Tyrosinbiosynthese sowie für tRNA-Synthetasen für Tyrosin und Phenylalanin. Dieses Expressionsmuster verdeutlicht die unterschiedlichen Kulturbedingungen der beiden Stämme mit einer stationäre-Phasentypischen Expression im Wildtyp (Lengler *et. al.*, 1999). Davon abweichend hatten jedoch Gene erhöhte mRNA-Spiegel im MH20-22B, die Enzyme codieren, welche z.T. Aspartat verbrauchende Reaktionen katalysieren, z.B. Biosyntheseenzyme verschiedener Aminosäuren wie Methionin (*metA*, *metY*), Isoleucin (*ilvC*), Arginin (*argC*) und Cystein (*cysK*). Auch Stoff-Flüsse des Tricarbonsäurecyclus, welche Einfluß auf den Pool des Lysinvorläufers Oxalacetat haben, könnten verändert sein, da die Gene *aceE* (Pyruvat-Dehydrogenase), *gltA* (Citrat Synthase), *mgo* (Malat-Dehydrogenase) und *mez* (malic enzyme) erhöhte mRNA-Spiegel im MH20-22B zeigten. Des Weiteren erhöht waren die relativen mRNA-Spiegel der Gene der Leucin-Biosynthese (*leuA*, *leuB*, *leuCD*) und eines putativen Oligopeptidtransporters

(ORFs2968-70). Auf dieses Expressionsmuster des Leucin-auxotrophen Stamms MH20-22B wird später noch eingegangen werden.

Aus einer erhöhten Expression des ATP-Synthase-codierenden Operons *atpABDFHG* im Wildtyp lässt sich zusammen mit dem Befund der unterschiedlichen Phasen-abhängigen Regulation (3.3.1.) schließen, dass dieses Operon im MH20-22B in der stationären Phase reprimiert wird. Ein analoger Vergleich für die Gene *metA* und *metY* zeigt, dass diese Gene bei gleicher Phasen-abhängiger Regulation (3.3.1.) im Produktionsstamm stärker exprimiert werden.

Somit konnten anhand der Expressionsmuster in der stationären Phase Unterschiede in der Regulation des Energiehaushalts sowie von Genen, deren Expression den Aspartat-Pool beeinflusst identifiziert werden. Der Großteil der differenziell exprimierten Gene ist jedoch unbekannt, Regulation, die zu verstärkter Lysinbildung führt evtl. überlagert von Sekundäreffekten, so dass sich keine direkten Rückschlüsse auf die Lysinproduktion ableiten ließen. Aus diesem Grund sollte die Genexpression der beiden Stämme in einer Wachstumsphase untersucht werden, in der bereits Lysin produziert wird, in der aber die Kulturbedingungen ähnlich sind. Die Befunde aus der Untersuchung in der stationären Phase könnten dann die so identifizierten Regulationsmechanismen bestätigen.

3.3.3. Vergleich der Genexpression zwischen Wildtyp und MH20-22B in der exponentiellen Phase

Um Unterschiede zu identifizieren, die unabhängig von der Leucinauxotrophie und einer feedbackresistenten Aspartatkinase zu verstärkter Lysinbildung führen, wurde die Genexpression der Stämme ATCC 13032 sowie MH20-22B untersucht. Da die Analyse in der stationären Wachstumsphase aufgrund starker Unterschiede der Kulturbedingungen eine zu große, nicht auswertbare Zahl von Genen mit differenzieller Expression lieferte, wurde RNA aus Kulturen mit identischen Bedingungen in der exponentiellen Wachstumsphase bei $OD_{600} = 8$ isoliert.

In der exponentiellen Phase hatten weitaus weniger Gene unterschiedliche mRNA-Spiegel als in der stationären Phase. Nach statistischer Auswertung von fünf

unabhängigen Chipuntersuchungen wurden 12 Gene identifiziert, die im Wildtyp höhere relative mRNA-Spiegel aufwiesen, sowie 34 Gene, welche höhere relative mRNA-Spiegel im MH20-22B zeigten (Tabelle 5). Die relativen mRNA-Spiegel erreichten in diesen Vergleichen Faktoren von ca. 2fach bis 5fach. Zu den Genen, welche erhöhte mRNA-Spiegel im Wildtyp aufwiesen, gehörte das *gluABCD*-Operon, und das putative Operon *thiC*, *hcnC*, *thiS*, *thiG*, *thiF*.

- 1) Das *gluABCD*-Operon codiert für ein Glutamat-Aufnahmesystem (Kronmeyer *et al.*, 1995) in Form eines ABC-Transporters. Die Aktivität des Glutamat-Aufnahmesystem *gluABCD* unterliegt der Katabolit-Repression (mit schwacher Restaktivität bei Wachstum mit Glukose) und ist proportional abhängig von Kalium-Konzentration und internem pH (Krämer *et al.*, 1990).
- 2) Die Gene des putativen Operons *thiC*, *hcnC*, *thiS*, *thiG*, *thiF* codieren in *E. coli* und *B. subtilis* für Enzyme der Thiamin-Biosynthese. Thyaminpyrophosphat ist ein wichtiger Cofaktor vieler Kohlenstoff-Metabolismus-Enzyme und die Regulation seiner Biosynthese mit der Regulation solcher metabolischen Enzyme verknüpft (White & Spencer, 1996).

Außer einem putativen Eisen- bzw. Mangan-Transporter (ORFs2807-09) sind alle weiteren Gene nicht beschrieben.

Im MH20-22B zeigten u.a. folgende Gene erhöhte Expression: Eine putative Katalase, *oxyR*, *sdhABCD*, *acn*, *nadAC* und *cydABCD*.

- 1) Die ORFs 830-833 codieren für die Succinat-Dehydrogenase (Molenaar *et al.*, 2000) des TCA-Cyklus. Ihre Expression erfolgt in Abhängigkeit von der C-Quelle und ihre Aktivität wird kompetitiv durch Oxalacetat gehemmt.
- 2) Das Gen *acn* codiert für die putative Aconitase in *C. glutamicum*, welche den zweiten Schritt des TCA-Cyklus codiert. In *E. coli* sind drei Aconitasen bekannt (Blank *et al.*, 2002), in *M. tuberculosis* wird die einzige bekannte Aconitase Eisenabhängig reguliert (Wong *et al.*, 1999).
- 3) Die ORFs 1734-37 codieren für die putative alternative Cytochrom_{bd}-Oxidase (*cydAB*) der verzweigten *C. glutamicum* Atmungskette (Niebisch & Bott, 2001), sowie für einen putativen Transporter, der in *E. coli* für den Cytochromaufbau (Poole *et al.*, 1993) notwendig ist. Die Cytochrom_{bd}-Oxidase

hat eine geringere Energieausbeute als der primär genutzte Cytochrom c-aa₃ – Komplex (Bott & Niebisch, in press).

- 4) ORFs 1645-48 codieren für putative Enzyme der Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Biosynthese (Cysteindesulphurase, Nicotinat-Nucleotid-Pyrophosphatase (*nadC*), Quinolatsynthase (*nadA*) und ADP-Ribose Pyrophosphatase (vermutlich *nadB*)). In *B. subtilis* besteht dieses Operon nur aus drei Genen (*nadBCA*). Das Gen für die putative Cysteindesulphurase liegt divergent zu dem Operon.
- 5) ORFs 670/671 codieren für die putative Katalase, welche Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff umwandelt. In *E. coli* wird die Expression der zwei Katalase-Gene *catG* bzw. *catE* von zwei Redoxstreß-Modulons in Abhängigkeit von H₂O₂ und Sauerstoffradikalen bzw. C-Limitierung reguliert (Neidhardt *et al.*, 1996). In *C. glutamicum* existiert vermutlich nur eine Katalase (Nakagawa 2002).
- 6) Der putative Transkriptionsregulator, der von ORF 2008 codiert wird, hat starke Ähnlichkeit zu verschiedenen Wasserstoffperoxyd-induzierbaren Gen-Regulatoren wie *oxyR* aus *S. coelicolor*, *C. diptheriae* oder *E. coli*.

71 % der Gene, die in der exponentiellen Phase differenziell exprimiert wurden, fanden sich auch in der stationären Phase unter den Genen mit veränderter Expression wieder. Diese hohe Übereinstimmung der Genexpression zwischen stationärer und exponentieller Phase zeigt, dass es generelle Unterschiede in der Regulation zwischen den beiden Stämmen gibt, von denen ein Teil Einfluß auf die Lysinproduktion haben sollte. Somit ist der Ansatz, die beiden Stämme in der exponentiellen Phase zu untersuchen, geeignet, um neue Zielgene zu finden. Die Anzahl der Gene mit differenzieller Expression konnte von 329 auf 46 reduziert werden. Es konnten Gene identifiziert werden, die im Produktionsstamm auf Unterschiede in der Atmungskette hinweisen (*cydABCD*, *sdhABCD*, *oxyR*, Katalase). Ob die Regulation dieser Gene direkt mit Lysinproduktion zusammenhängt, konnte an dieser Stelle noch nicht beurteilt werden. Eine Untersuchung der einzelnen genomischen Unterschiede zwischen ATCC 13032 und MH20-22B mittels definierter Modellstämme sollte die

nach wie vor hohe Anzahl der Gene mit differenzieller Expression, die Einfluß auf die Lysinproduktion haben, eingrenzen.

Zur stichprobenartigen Verifizierung der Ergebnis dieser DNA-Chip-Analyse wurde die erhöhte Expression ausgesuchter Gene in einem unabhängigen Experiment überprüft. Dafür wurde das Gen für die Cytochrom_{b_d}-Oxidase (*cydAB*) gewählt und das reduzierte Absorptionsspektrum von Wildtyp und MH20-22B-Zellsuspensionen zwischen 500 und 680 nm zur Abschätzung des Cytochrom_d-Gehaltes des Cytochrom_{b_d}-Komplexes aufgenommen. Dabei zeigte das Spektrum nur bei der für das Cytochrom_d-typischen Wellenlänge von 627 nm eine deutliche Zunahme der Absorption für den Stamm MH20-22B relativ zum Wildtyp und bestätigte somit das DNA-Chip-Ergebnis.

Tabelle 5: Gene mit unterschiedlicher Expression bei Vergleich der Stämme ATCC 13032 und MH20-22B. Aufgelistet sind die durchschnittlichen Werte von Genen, die mindestens 2-fach ($p < 0,05$ mit * markiert) veränderte Expression zeigten. Bei putativen Operons (grau hinterlegt) sind alle Gene aufgelistet. Die Annotation entspricht der NCBI-Annotation (NCgl-Nummer) oder Homologievergleichen aus Datenbankrecherchen (ERGO).
n.a.: nicht auswertbar

*: thiS ist Teil des putativen thi-Operons 2149-52

ORF	NCgl- Nummer	relativer mRNA- Spiegel MH20-22B /wt	Protein / Funktion (NCBI)
355	2851	0,6	* (transposase 5564)
1091	2284	0,3	* (transposase (insertion sequence IS31831))
2040	1875	n.a.	glutamate transport ATP-binding protein (gluA)
2041	1876	0,5	* glutamate ABC-type transporter, periplasmic comp. (gluB)
2042	1877	0,5	* glutamate ABC-type transporter, permease comp. (gluC)
2043	1878	0,6	* glutamate ABC-type transporter, permease comp. (gluD)
2146	1959	0,6	* ABC-type transport systems, periplasmic component
2149	1961	n.a.	thiamine monophosphate synthase (thiC)
2150	1962	0,7	* glycine/D-amino acid oxidases (hcnC)
2151	1964	n.a.	thiamin biosynthesis protein (thiG)
2152	1965	0,4	* dinucleotide-utilizing enzyme (thiF)
2581		0,2	(hypothetical protein)
2807	2541	n.a.	ABC-type transporter, permease component
2808	2540	0,5	* ABC-type transporter, ATPase component
2809	2539	0,6	ABC-type transporter, periplasmic component
2825	2523	0,5	* transcriptional regulator
3044	1021	0,2	* (IS31831 transposase)
3317*		0,5	* sulfur transfer protein (thiS)
194	2714	1,9	hypothetical protein
225	2737	1,8	* putative membrane protease subunit
670	251	5,5	* catalase
671	251	8,4	catalase
830	359	1,8	* succinate dehydrogenase C or D (sdhCD)
831	360	2,2	* succinate dehydrog./fumarate reduct., flavoprotein SU (sdhA)
832	361	2,1	* succinate dehydrog./fumarate reductase Fe-S protein (sdhB)
833	362	1,6	questionable ORF /[part of sdhB]
1117	593	1,8	* hypothetical protein
1381	798	2,7	uncharacterized membrane protein
1382	799	1,2	putative sodium:solute symporter protein
1645	1022	2,3	* cysteine sulfinate desulfinate (nifS)
1646	1023	2,7	* nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase (nadC)
1647	1024	3,0	* quinolinate synthase (nadA)
1648	1025	2,4	* ADP-ribose pyrophosphatase

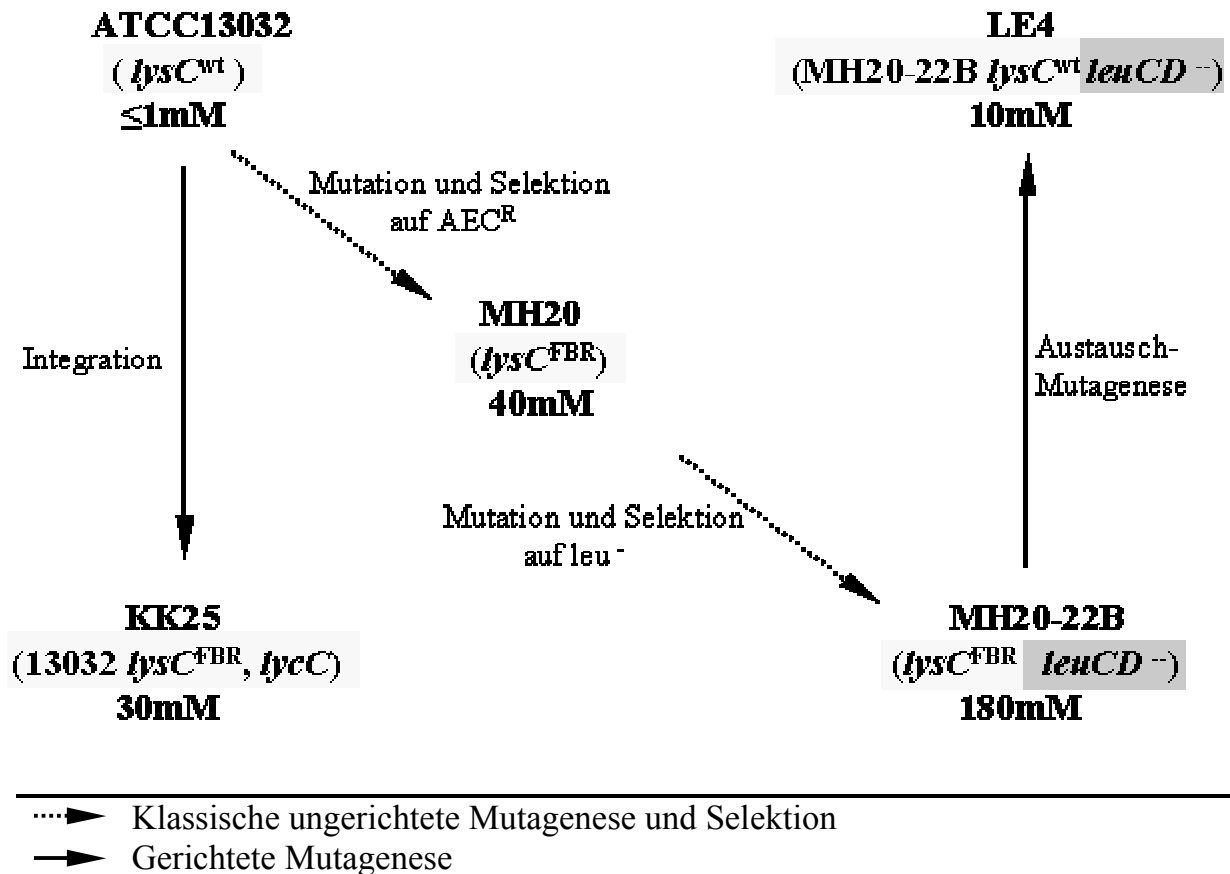
ORF	NCgl- Nummer	relativer mRNA-Spiegel MH20-22B /wt	Protein / Funktion (NCBI)
1727		2,6	* hypothetical protein
1728	1096	2,4	* predicted flavoprotein involved in K ⁺ transport
1734	1101	n.a.	ABC-type transport protein (cydC)
1735	1102	1,7	* ABC-type transport protein (cydD)
1736	1103	4,1	cytochrome bd-type quinol oxidase, subunit (cydB/A)
1737	1104	n.a.	cytochrome d complex terminal oxidase chain I (cydB/A)
1751	1114	1,8	* hypothetical membrane protein
1752	1115	1,6	* hypothetical protein (Rv2972c)
1753	1116	1,3	Na ⁺ /proline transporter putP
1881	2897	3,8	* starvation-inducible DNA-binding protein (Dps)
2000	1844	2,0	* DNA-directed RNA polymerase sigma subunit SigB
2008	1850	2,7	transcriptional regulator (oxyR)
2092	1915	1,9	* ABC-type transporter, periplasmic component (oppA)
2093	1915	2,1	* oligopeptide-binding protein (oppA)
2094	1916	1,6	* oligopeptide transport system permease protein (oppB)
2095	1918	1,7	* oligopeptide ABC transporter (permease) (oppC)
2096	1918	1,4	* oligopeptide transport ATP-binding protein (oppD)
2367	1435	2,2	* predicted transcriptional regulator
2419	1479	1,8	* protoheme ferro-lyase
2425	1482	2,2	* aconitase A (acn)
2436	1490	1,9	* hypothetical protein
2449	1498	1,9	* putative aromatic ring hydroxylating enzyme
2450	1499	2,1	* 2/4Fe-2/4S-cluster-biogenesis
2452	1501	1,5	ABC-type transporter, ATPase component
2453	1502	3,1	* predicted iron-regulated ABC-type transporter SufB
2455	1503	2,8	* predicted iron-regulated ABC-type transporter SufB
2456	1504	2,7	* predicted transcriptional regulator
2754		2,4	* hypothetical protein
2919	2451	3,1	* hypothetical protein
2920	2450	3,7	* hypothetical protein
3002	2376	2,0	* hypothetical protein

3.4. Untersuchung der Einflüsse spezifischer Unterschiede zwischen Wildtyp und MH20-22B

Die unterschiedlichen Merkmale zwischen Wildtyp und MH20-22B lassen sich in drei Gruppen einteilen: veränderte Aspartatkinase, Leucinauxotrophie und nicht identifizierte Mutationen. Um die große Zahl der Genexpressions-Unterschiede zwischen dem Wildtyp und dem Produktionsstamm auf eine geringere Anzahl von Genen zu reduzieren, deren Expression nur von einem Merkmal abhängt und möglichst nicht von Sekundäreffekten wie z.B. unterschiedlicher Lysinkonzentration im Kulturmedium beeinflusst wird, sollten definierte Modellstämme hinsichtlich ihrer Genexpression untersucht werden. Diese Modellstämme sollten sich dabei jeweils nur in einem Merkmal unterscheiden. Aus diesem Grund wurden die Expressionsmuster isogener Stämme mit unterschiedlichem *lysC*-Allel (Aspartatkinase) sowie unterschiedlicher Stämme mit gleicher Aspartatkinase analysiert (vgl. Abbildung 5).

Der Vergleich der Lysinproduktionskapazitäten der in Abbildung 5 dargestellten Stämme zeigt, dass *lysC*^{FBR} wichtig, jedoch nicht ausreichend für die hohe Produktionskapazität des MH20-22B ist. Mit Hilfe des Stamms KK25 Δ *leuA* und MH20-22B Δ *leuA* sollte zusätzlich der Einfluß der Leucin-Auxotrophie auf die Lysinbildung analysiert werden.

Abbildung 5: Relation verschiedener Modellstämme zueinander. Angegeben ist der bekannte Genotyp sowie die Lysinproduktionskapazität. Die Pfeile bezeichnen die gerichtete und ungerichtete Mutation.



3.4.1. Differenzierung von Expressionsunterschieden als Folge der Anwesenheit einer feedback-resistenten Aspartatkinase

Um den Effekt der feedbackresistenten Aspartatkinase auf die Genexpression zu bestimmen, wurden die Expressionsmuster der isogenen Stämme Wildtyp und KK25 bzw. LE4 und MH20-22B untersucht. Dazu wurde mRNA aus dem Wildtyp sowie aus KK25 in der exponentiellen Phase isoliert und gegeneinander auf einem Chip hybridisiert. Dabei zeigten nur 4 Gene erhöhte relative mRNA-Spiegel im Wildtyp, wobei es sich hier abgesehen vom Methyl-Citrat-Operon (ORFs 1160-1162) ausschließlich um IS-Elemente handelte. Das *prp2*-Operon codiert für Enzyme des

Methylcitrat-Zyklus und dient dem Propionatabbau (Claes *et al.*, 2002). Sechs Gene zeigten erhöhte relative mRNA-Spiegel im KK25 (Tabelle 6). Dabei handelte es sich u.a. um ein putatives Schwefel- und ein Eisen-Aufnahmesystem sowie die Leucin-Biosynthesegene *leuCD*. Der erhöhte Spiegel dieses Operons war überraschend.

Analog wurde mRNA aus MH20-22B sowie aus LE4 isoliert und gegeneinander auf einem DNA-Chip hybridisiert. In diesem Vergleich zeigte ebenfalls nur ein Strukturgen um Faktor 2 erhöhte relative mRNA-Spiegel im *lysC^{wt}*-Stamm LE4. Im MH20-22B hatten 15 Gene höhere relative mRNA-Spiegel (Tabelle 7).

Somit wurde als Folge der Deregulierung der Aspartat-Kinase eine erhöhte Expression einer begrenzten Zahl an Genen induziert, nur jeweils ein Gen zeigte erniedrigte mRNA-Spiegel. In den Stämmen mit deregulierter Aspartatkinase war die Regulation von Genen für die putative Aufnahme und Verwertung von Eisen, z B. als Cofaktor in Fe-S-Clustern, verändert (*ssuC*, *ssuB* (van der Ploeg *et al.*, 2001), *hmuT*, *fepC* (Drazek *et al.*, 2000), *sufB* (Nachin *et al.*, 2003)). Nur im Stamm MH20-22B zeigte sich zudem wie bereits im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Expression von Atmungsketten-Genen (*cydABCD*, Flavoprotein (ORF 1728)) und der Katalase.

Tabelle 6: Gene mit unterschiedlicher Expression bei Vergleich der Stämme ATCC 13032 und KK25. Erläuterungen siehe Tabelle 5.

n: Anzahl der Bestimmungen

ORF	NCgl-Nummer	Relativer mRNA-Spiegel KK25 / wt	n	Protein / Funktion (NCBI)
1589	968	3,8	2*	Flavin / FMN reductase
1821	1173	n.a.		coenzyme F420-depend. Reductase
1822	1174	2,26	2	ABC-type transporter, permease component (<i>ssuC</i>)
1823	1175	2,6	1	ABC-type transporter, ATPase component (<i>ssuB</i>)
1824	1176	1,51	3	ABC-type transporter, periplasmic component (<i>ssuA</i>)
2533	1564	1,2	2	ABC-type transporter, permease component (<i>hemU</i>)
2534	1565	2,26	2*	ABC-type transporter, periplasmic component (<i>hmuT</i>)
2535	1566	2,12	2	ABC-type transporter, ATPase component (<i>fepC</i>)
2736	1263	2,75	2*	3-isopropylmalate dehydratase small chain (<i>leuD</i>)
2737	1262	1,3	2	3-isopropylmalate dehydratase large chain (<i>leuC</i>)
1160	628	0,62	3*	methyloaconitase <i>prpD2</i>
1161	629	0,69	3*	methylosuccinate lyase <i>prpB2</i>
1162	630	0,48	2*	methylo citrate synthase <i>prpC2</i>

Tabelle 7: Gene mit unterschiedlicher Expression bei Vergleich der Stämme MH20-22B und LE4. Erläuterungen siehe Tabelle 6.

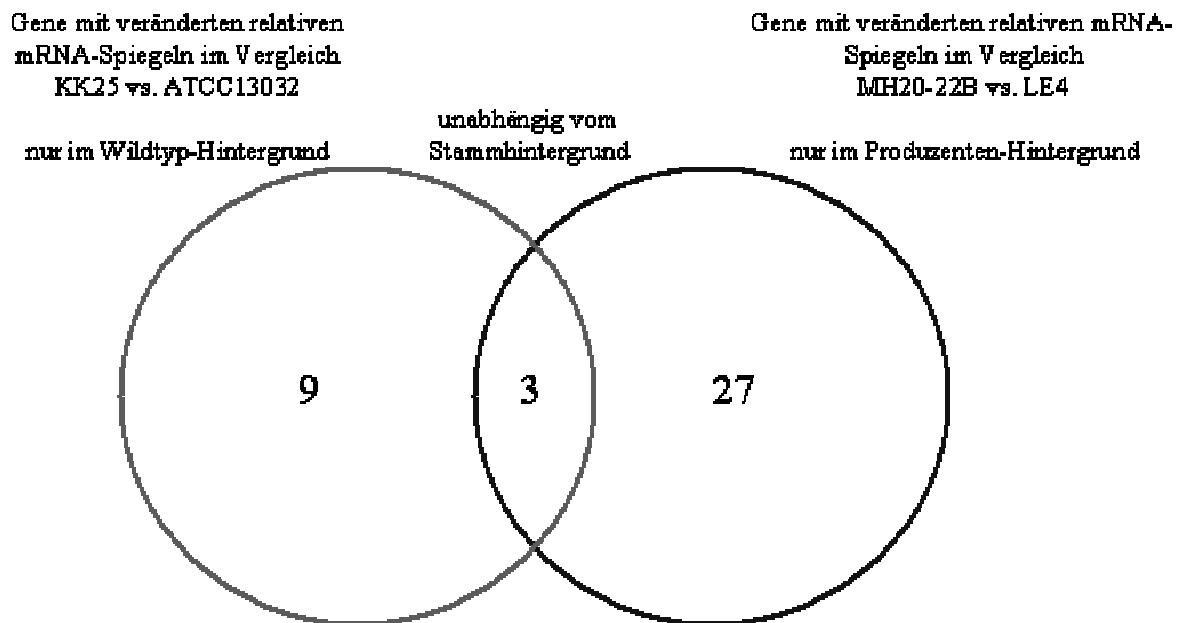
ORF	NCgl- Nummer	relativer mRNA- Spiegel MH20- 22B / LE4	n	Protein / Funktion (NCBI)
1169	636	0,68	1	ABC-type transporter, ATPase component (irp1D)
1170	637	n.d.		ABC-type transporter, permease component (irp1C)
1171	638	0,93	2	ABC-type transporter, permease component (irp1B)
1173	639	0,47	2*	ABC-type transp., peripl. comp. (DtxR/ Fe- reg. lipoprot. precursor)

ORF	NCgl- Nummer	relativer mRNA- Spiegel MH20- 22B / LE4	n	Protein / Funktion (NCBI)
573	181	n.d.		glutamine 2-oxoglutarate aminotransf. large SU gltB (GOGAT)
575	182	2,06	2	glutamine 2-oxoglutarate aminotransf. small SU gltD (GOGAT)
670/671	251	3,9/7,9	2/2*	catalase
1727		5,92	2*	hypothetical protein
1728	1096	2,54	1	predicted flavoprotein involved in K ⁺ transport
1729	1097	2,26	2*	hypothetical membrane protein
1730	1098	2,38	1	predicted esterase of the alpha-beta hydrolase superfamily
1733		2,54	1	hypothetical protein
1734	1101	3,46	1	ABC-type transport protein cydC
1735	1102	2,88	1	ABC-type transport protein cydD
1736	1103	3,69	1	cytochrome d ubiquinol oxidase chain II cydA/B
1737	1104	n.d.		cytochrome d complex terminal oxidase chain I cydA/B
1881	2897	10,93	2	starvation-inducible DNA-binding protein
1882	2898	7,81	2	formamidopyrimidine-DNA glycosylase
1883	2899	3,96	1	hypothetical protein (RTCB-protein)
1884	2900	2,04	1	hypothetical protein
1963	1816	2,09	2	hypothetical protein
2008	1850	2,57	2	transcriptional regulator (oxyR)
2221		2,34	2	hypothetical protein
2435	1489	3,27	2	questionable ORF
2436	1490	2,15	2	hypothetical protein
2452	1501	1,25	1	ABC-type transporter, ATPase component
2453	1502	2,09	2	predicted iron-regulated ABC-type transporter SufB
2455	1503	2,43	1	predicted iron-regulated ABC-type transporter SufB
2478	1519	n.d.		sarcosine oxidase
2479	1520	2,54	2	predicted ornithine cyclodeaminase
2480	1521	1,92	1	ammonium transporter amt
2533	1564	n.d.		ABC-type transporter, permease component (<i>hemU</i>)
2534	1565	3,47	2	ABC-type transporter, periplasmic component (<i>hmuT</i>)
2535	1566	n.d.		ABC-type transporter, ATPase component (<i>fepC</i>)

Vergleichende Expressionsanalysen der beiden Stammvergleiche ergaben eine Schnittmenge von Genen, deren Expression unabhängig ist vom jeweiligen Stamm, sondern auf das in beiden parallelen Vergleichen gleiche Merkmal, nämlich die Differenz des *lysC*-Allels, zurück zu führen ist. Nur das Operon *hemU*, *hmuT*, *fepC*, das in *C. ulcerans* und *C. diphteriae* für einen Siderophor-Eisen-Importer codiert und die Nutzung von Häm und Hämin als Eisenquelle ermöglicht (Schmitt & Drazek, 2000; Drazek *et al.*, 2000), konnte als unabhängig vom Stammhintergrund exprimiert identifiziert werden. Die Schnittmenge mit der Anzahl der differenziell exprimierten Gene ist in Abbildung 6 dargestellt. Man erkennt, dass in den Produktionsstamm-Derivaten LE4 und MH20-22B mehr Gene in ihrer Expression vom *lysC*-Allel beeinflusst werden als in den Wildtypstämmen.

Damit konnte der Anteil der differenziellen Expression zwischen Wildtyp und MH20-22B, der auf die deregulierte Aspartatkinase zurück zu führen ist, identifiziert werden. Da dieses Gen im Vergleich Wildtyp zu MH20-22B nur leicht erhöhte mRNA-Spiegel hatte (1,6fach erhöht im MH20-22B), könnte der Effekt in diesem Stammvergleich überlagert sein von Sekundäreffekten.

Abbildung 6: Darstellung der Anzahl der Gene mit differenzieller Expression in jeweils zwei Stammvergleichen isogener Stämme. Gene, die in die Schnittmenge der beiden Vergleiche (Kreise) fallen, wiesen in beiden Stammvergleichen differenzielle Expression auf. IS-Elemente wurden nicht betrachtet.



3.4.2. Differenzierung von Expressionsunterschieden als Folge unterschiedlicher Stammhintergründe

Um den Effekt der durch Zufallsmutagenese entstandenen unterschiedlichen Stammhintergründe auf die Genexpression zu bestimmen, wurden die Expressionsmuster der Stämme Wildtyp und LE4 bzw. KK25 und MH20-22B untersucht. Der Wildtyp und Stamm LE4 besitzen beide die feedbacksensitive Aspartatkinase, wohingegen Stamm KK25 und der Produzent beide das Allel für die deregulierte Aspartatkinase ($lysC^{FBR}$) tragen. In einem Ansatz wurde mRNA aus dem Wildtyp sowie aus LE4 isoliert und gegeneinander auf einem Chip hybridisiert. Dabei hatten 8 Gene sowie 5 IS-Elemente erhöhte relative mRNA-Spiegel im Wildtyp, 21 Gene hatten erhöhte relative mRNA-Spiegel im LE4. Die Daten sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Gene mit unterschiedlicher Expression bei Vergleich der Stämme Wildtyp (ATCC 13032) und LE4 während des exponentiellen Wachstums. Erläuterungen siehe Tabelle 6.

ORF	NCgl- Nummer	relativer mRNA - Spiegel LE4 / ATCC13032	n	Protein / Funktion (NCBI)
2040	1875	n.a.		glutamate transport ATP-binding protein <i>gluA</i>
2041	1876	0,37	2 *	glutamate-binding protein <i>gluB</i> precursor
2042	1877	0,27	2 *	glutamate transport syst. permease prot. <i>gluC</i>
2043	1878	0,45	2 *	glutamate transport syst. permease prot. <i>gluD</i>
2149	1961	0,73	2	thiamin-phosphate pyrophosphorylase (<i>thiC</i>)
2150	1962	0,7	2	hydrogen cyanide synthase [THIO]/(<i>hcnC</i>)
2151	1964	n.a.		thiamin biosynthesis protein thiG
2152	1965	0,4	1	dinucleotide-utilizing enzyme (<i>thiF</i>)
3054	2278	0,37	2	hypothetical protein
3317	1963	0,46	2 *	sulfur transfer protein (<i>thiS</i>)
1091	2284	0,24	2 *	transposase (insertion sequence IS31831)
3021	2284	0,26	2 *	transposase (insertion sequence IS31831)
3044	1021	0,25	2 *	IS31831 transposase
1644	2284	0,26	2 *	transposase (insertion sequence IS31831)
2806	2542	0,3	2 *	ISA0963-5 transposase homolog

ORF	NCgl- Nummer	relativer mRNA - Spiegel LE4 / ATCC13032	n	Protein / Funktion (NCBI)
312	2816	5,14	2 *	putative integral membrane transport protein
313	2817	7,93	1	L-lactate dehydrogenase (FMN-dependent)
380	2864	1,75	2	hypothetical protein
381	2865	2	2	putative multicopper oxidase
1449	855	2,26	2 *	predicted methyltransferase
1559	944	2,07	2 *	hypothetical membrane protein
1916*	2928	3,16	2	anthranilate synthase component II
1917- 1920	2929- 2932	0,9±0,1		[Tryptophan-Biosynthese related ORFs]
2241	2034	3,03	2 *	predicted transcriptional regulator
2353	1423	2,27	2	glycosyltransferase
2435	1489	2,08	2	questionable ORF
2451	1500	2,02	1	selenocysteine lyase / cystein desulfhydrase
2458	1505	1,34	2	hypothetical membrane protein
2459	1506	0,93	2	ABC transport protein
2460	1507	2,29	2 *	ABC-type transporter, permease component
2478	1519	1,1	2	sarcosine oxidase
2479	1520	3,51	2	predicted ornithine cyclodeaminase
2480	1521	2	1	ammonium transporter amt
2621	1348	2,06	2 *	hypothetical protein
3027	2396	3,18	2	transcriptional regulator (<i>malI</i>)
3038	2290	2,73	2	questionable ORF
3507	2411	2,5	2 *	metalloendopeptidases-like protein

Es wurden, relativ zum Vergleich Wildtyp und MH20-22B, nur wenige Unterschiede in der Genexpression zwischen den beiden Stämmen Wildtyp und LE4 beobachtet, was darauf zurück zu führen sein dürfte, dass aufgrund der Wildtyp-Aspartat-Kinase nur geringe Unterschiede in der Lysinproduktion vorhanden sind (1 mM bzw. 10 mM). Wie bereits im Vergleich Wildtyp zu MH20-22B zeigten das Glutamat-Aufnahmesystem und das putative Thiamin-Operon im Wildtyp erhöhte Expression. Im LE4 war die Expression des Anthranilat-Synthase-Gens, welches ein Enzym des Biosynthesewegs der Erythrose-4-Phosphat-Aminosäure-Familie codiert, erhöht, die anderen Gene des Clusters zeigten aber keine differenzielle Expression. ORF 2480 codiert für den Ammoniumtransporter Amt in *C. glutamicum* (Siewe *et al.*, 1996), welcher (Methyl)-Ammonium protonengetrieben in die Zelle transportiert (Meier-Wagner *et al.*, 2001). ORF 2478 war ebenfalls von Siewe als Sarcosin-Oxidase erkannt worden.

Somit konnte in diesem Vergleich für zwei Gene, die im Vergleich Wildtyp und MH20-22B differenzielle Expression gezeigt hatten, das gleiche Expressionsmuster gefunden werden.

In einem parallelen Ansatz wurde analog zu den Stämmen mit *lysC^{wt}*-Allel mRNA aus den Stämmen mit *lysC^{FBR}*-Allel KK25 und MH20-22B isoliert und gegeneinander auf einem Chip hybridisiert. In diesem Vergleich hatten 21 Gene sowie 4 IS-Elemente erhöhte relative mRNA-Spiegel im KK25, 34 Gene hatten erhöhte relative mRNA-Spiegel im Produzenten. Die Daten sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Gene mit unterschiedlicher Expression bei Vergleich der Stämme MH20-22B und KK25 während des exponentiellen Wachstums. Erläuterungen siehe Tabelle 6.

ORF	NCgl- Nummer	relativer mRNA- Spiegel MH20-22B / KK25	n	Protein / Funktion (NCBI)
1160	628	0,48	2 *	2-methylisocitrate synthase
1161	629	0,71	2	methyl-isocitrate lyase
1162	630	0,5	2	methyl-citrate synthase
1349	776	0,49	1	ABC-type CobAm/Fe+-sidero. transp. syst., peripl. comp.
1350	777	0,67	1	ABC-type CobAm/Fe+-sidero. transp. syst., perm. comp.(<i>ceuB</i>)
1351	778	0,48	1	ABC-type CobAm/Fe+-sidero. transp. syst., perm. comp.(<i>ceuC</i>)
1352	779	0,63	2	ABC-type CobAm/Fe+-sidero. transp. syst., ATPase. c. (<i>ceuD</i>)
1353		0,49	2	hypothetical protein
1817	1169	0,5	2	hypothetical protein
1818	1170	0,45	2 *	lactoylglutathione lyase
1888	2904	0,35	2 *	malic enzyme (mez)
2040	1875	n.a.		glutamate transport ATP-binding protein gluA
2041	1876	0,38	2 *	glutamate-binding protein gluB precursor
2042	1877	0,39	2 *	glutamate transport system permease protein gluC
2043	1878	0,38	2 *	glutamate transport system permease protein gluD
2146	1959	0,47	2	ABC-type transport systems, periplasmic component (<i>fecB</i>)
2149	1961	0,49	1	thiamine monophosphate synthase (<i>thiC</i>)
2150	1962	0,46	1	hydrogen cyanide synthase [THIO]/(<i>hcnC</i>)
2151	1964	n.d.		thiamin biosynthesis protein thiG
2152	1965	0,38	2 *	Dinucleotide-utilizing enzyme (<i>thiF</i>)
2477	1518	0,46	2 *	hypothetical protein
2807	2541	0,59	2	ABC-type transporter, permease component
2808	2540	0,66	2	ABC-type transporter, ATPase component
2809	2539	0,33	2 *	ABC-type transporter, periplasmic component
2825	2523	0,48	1	transcriptional regulator
2826	2522	0,41	2 *	permease of the major facilitator superfamily
3317	1963	0,41	2 *	sulfur transfer protein (<i>thiS</i>)
diverse		0,4±0,05	9 *	transposasen (insertion sequence IS31831)/ <i>tnpA</i>
670/			2	
671	251	4,86 / 3,67	/ *	catalase
1449	855	2,36	1	predicted methyltransferase
1468	870	2,19	2	hypothetical membrane protein
1646	1023	2	2 *	nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase (<i>nadC</i>)
1647	1024	2,25	2 *	quinolinate synthase (<i>nadA</i>)
1648	1025	2,4	2	ADP-ribose pyrophosphatase

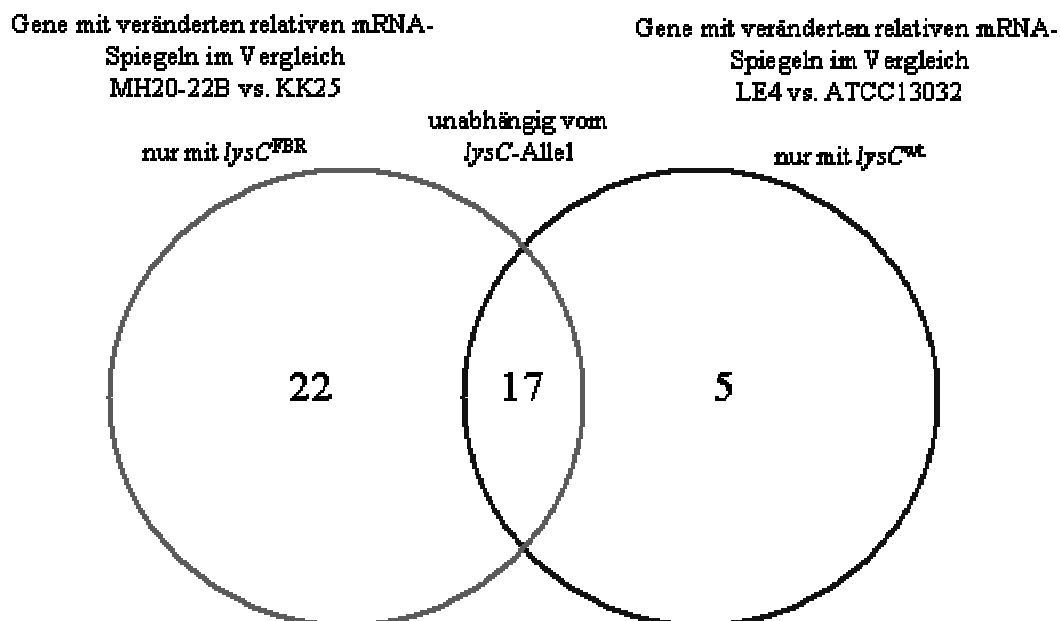
ORF	NCgl- Nummer	relativer mRNA- Spiegel MH20-22B / KK25	n	Protein / Funktion (NCBI)
1727		3,92	2 *	hypothetical protein
1728	1096	2,19	1	predicted flavoprotein involved in K+ transport / monooxygenase
1729	1097	3,02	2 *	hypothetical membrane protein
1730	1098	2,09	2	predicted esterase of the alpha-beta hydrolase superfamily/serine
1734	1101	n.d.		ABC-type transport protein (<i>cydC</i>)
1735	1102	1,97	2	ABC-type transport protein (<i>cydD</i>)
1736	1103	2,37	2	cytochrome d ubiquinol oxidase chain II (<i>cydA/B</i>)
1737	1104	n.d.		cytochrome d complex terminal oxidase chain I (<i>cydA/B</i>)
1881	2897	6,2	2 *	starvation-inducible DNA-binding protein
1883	2899	3,49	2	hypothetical protein (RTCB-protein)
2008	1850	3,63	2 *	transcriptional regulator (<i>oxyR</i>)
2365	1433	2,18	2 *	Sec-independent protein secretion pathway component TatC
2367	1435	2,2	1	predicted transcriptional regulator
2376	1444	3,48	2 *	plasmid maintenance system antidote protein
2436	1490	2,12	2 *	hypothetical protein
2451	1500	2,77	1	selenocysteine lyase / cystein desulfhydrase
2452	1501	2,33	1	ABC-type transporter, ATPase component
2453	1502	2,46	2 *	predicted iron-regulated ABC-type transporter SufB
2455	1503	2,43	2 *	predicted iron-regulated ABC-type transporter SufB
2456	1504	3,08	2 *	predicted transcriptional regulator of ArsR family (DeoR)
2457	1504	2,59	2 *	questionable ORF (DeoR)
2458	1505	1,12	1	hypothetical membrane protein
2459	1506	1,36	2	ABC-type transporter, ATPase component
2460	1507	2,24	1	ABC-type transporter, permease component
2479	1520	2,1	2	predicted ornithine cyclodeaminase
2480	1521	2,35	1	ammonium transporter amt
2920	2450	2,32	2 *	hypothetical protein
2965	2350	1,47	2	ABC-type transporter, duplicated ATPase component
2968	2351	1,7	2	ABC-type transporter, permease component
2969	2352	2	2 *	ABC-type transporter, permease component
2970	2353	2,08	2 *	ABC-type transporter, periplasmic component
3452	2965	2,01	2 *	hypothetical membrane protein
3472	2439	6,4	2 *	ferritin-like protein
3476	2437	2,03	2 *	heme/copper-type cytochrome/quinol oxidase, subunit

Bei dem Vergleich dieser beiden Stämme mit deregulierter Aspartatkinase zeigte sich im Wildtypderivat (KK25) ein ähnliches Expressionsmuster wie im Vergleich LE4 zu Wildtyp: Das Glutamataufnahmesystem und die Gene der Thiaminbiosynthese waren höher exprimiert als im Produzentenstamm. Das Gen *mez* codiert für das Malatenzym, welches die NADP-abhängige Reaktion von Malat zu Pyruvat katalysiert (Gourdon *et al.*, 2000).

Für den Stamm MH20-22B zeigte sich im Vergleich mit KK25 ein ähnliches Expressionsmuster wie im Vergleich LE4 zu MH20-22B: Die Gene der Cytochrom-_{bd}-Familie wurden erhöht exprimiert, ebenso Gene der putativ Eisen-Sulfat-bezogenen Transporter und Enzyme (ORFs 2451-2455 (Nachin *et al.*, 2003), ORFs 3472, 3476) sowie das Katalase-codierende Gen. Analog dem Vergleich Wildtyp zu MH20-22B hatten die Gene der Nicotinamid-Nukleotid-Synthese (ORFs 1646-1648 (*nadA*, *nadC*)) erhöhte relative mRNA-Spiegel.

Vergleichende Expressionsanalysen der zwei parallelen Stammuntersuchungen ergaben eine Schnittmenge von 17 Genen, die in beiden Vergleichen differenziell exprimiert wurden. Diese Gene werden aufgrund der genomischen Unterschiede (Stammhintergrund) zwischen Wildtypstämmen und Produktionsstamm-Derivaten differenziell exprimiert und ihre Regulation kann eine Ursache für verstärkte Lysinbildung sein. Die Expression ist unabhängig von der Differenz des *lysC*-Allels. Die Schnittmenge mit der Anzahl der differenziell exprimierten Gene ist in Abbildung 7 dargestellt, die Gene werden später eingehend betrachtet. Man erkennt, dass im Stammvergleich Wildtyp zu LE4 nur wenige (5) Unterschiede der Genexpression nicht auf die unbekannten Mutationen (sowie die Leucin-Auxotrophie) zurück zu führen sind.

Abbildung 7: Darstellung der Gene mit differenzieller Expression in jeweils zwei Stammvergleichen von Stämmen mit gleichem *lysC*-Allel. Gene, die in beiden Stammvergleichen differenzielle Expression aufwiesen, sind in der Schnittmenge der beiden Vergleiche (Kreise) dargestellt. IS-Elemente wurden nicht betrachtet.



Somit konnte die Anzahl der Gene mit differenzieller Expression des Vergleichs Wildtyp zu MH20-22B, welche für erhöhte Lysinbildung verantwortlich sein können, von 46 auf 20 reduziert sowie der Einfluß der einzelnen Merkmale deregulierte Aspartatkinase und unbekannte Mutationen identifiziert werden. Zusätzlich wurden Genexpressions-Differenzen identifiziert, die im Vergleich Wildtyp zu MH20-22B womöglich von Sekundäreffekten überlagert waren, und deren Einfluß auf die Lysinbildung mit dem zunächst gewählten Ansatz nicht identifiziert worden wäre.

3.4.3. Identifizierung der Leucinauxotrophie-abhängigen Regulation

Die Leucinauxotrophie ist ein für die Lysinproduktion wichtiges Merkmal des Stamms MH20-22B (Schrumpf *et al.* 1992). Um den Einfluß der Leucin-Auxotrophie auf die Genexpression zu untersuchen, wurden DNA-Chip-Vergleiche mit den Stämmen KK25 und KK25 Δ *leuA* durchgeführt, welche in Leucin-supplementiertem Minimalmedium kultiviert worden waren. Bei Hybridisierung markierter cDNA dieser Stämme hatten 55 Gene veränderte relative mRNA-Spiegel, davon 17 mit erhöhten mRNA-Spiegeln im KK25 und mit 38 doppelt so viele im isogenen Stamm KK25 Δ *leuA*. Die interne Kontrolle ORF 662 (*leuA*) hatte einen Faktor von 28. Wie bereits im Vergleich Wildtyp zu MH20-22B hatten die ORFs 2807-2809 erhöhte mRNA-Spiegel im Stamm mit geringer Lysinbildung. Dieses putative Operon codiert in *B. subtilis* für einen Mangantransporter. Ebenso hatten die *cydAB*-Gene erhöhte mRNA-Spiegel im Stamm mit höherer Lysinbildung. Interessant in Verbindung mit für die Lysinbildung höherem NADPH-Bedarf ist der im Stamm KK25 Δ *leuA* stark verringerte relative mRNA-Spiegel der Gene für Thioredoxin und besonders für die Thioredoxin Reduktase (Nakagawa *et al.*, 2002), die ubiquitär in allen Organismen vorkommt und eine NADPH-verbrauchende Reduktion von Thioredoxin katalysiert (Arner & Holmgren 2000). Die Daten sind in Tabelle 10 dargestellt. Keines der als Stammhintergrund-abhängig identifizierten Gene wurde aufgrund der Leucin-Auxotrophie differenziell exprimiert. Hingegen konnten mit ORFs 2807-09 sowie dem Cytochrom_{bd}-Oxidase-Operon zwei weitere Operons, die im Vergleich Wildtyp zu MH20-22B differenziell exprimiert waren, vorläufig einem spezifischen Merkmal (Leucin-Auxotrophie) zugeordnet werden.

Tabelle 10: Gene mit unterschiedlicher Expression bei Vergleich der Stämme KK25 und KK25 Δ leuA. Erläuterungen siehe Tabelle 5.

ORF	NCgl Nummer	relativer mRNA-Spiegel KK25 / KK25 Δ leuA	Protein / Funktion (NCBI)
3	2572	0,30	two-component system, response regulator CgtR5
4	2573	n.a.	two-component system, sensory transduction histidine kinase CgtS5
5	2574	0,45	hypothetical protein
8	2576	0,46	* predicted nucleic-acid-binding protein
160	2689	0,45	predicted transcriptional regulator
219	2734	0,46	* hypothetical protein
223		0,46	* hypothetical protein
229	2742	0,44	hypothetical protein
258	2766	0,45	hypothetical membrane protein
259	2766	0,48	* hypothetical membrane protein
260	2767	0,46	predicted S-adenosylmethionine-dependent methyltransf.
321	2823	0,48	* putative metal-dependent hydrolase/carboxypeptidase
328	2827	0,49	* transcriptional regulator; lysR2 protein (LysR family)
404	36	0,50	ABC-type transporter, permease component (<i>fepG</i>)
405	37	n.a.	ABC-type transporter, ATPase component (<i>fepC</i>)
423	50	0,81	phenol hydroxylase related protein
424	51	0,50	* Zn-dependent hydrolase
425	52	0,48	* hypothetical membrane permease protein
673	252	0,36	* hypothetical protein
1009	508	0,42	* hypothetical protein
1034	527	0,44	dehydrogenase
1035	528	n.a.	PEP synthase/pyruvate phosphate dikinase-like protein
1091	2392	0,49	* putative transposase
1359	783	0,48	hypothetical protein
1724	1095	0,44	hypothetical membrane protein

ORF	NCgl Nummer	relativer mRNA-Spiegel KK25 / KK25 Δ leuA	Protein / Funktion (NCBI)
1734	1101	n.a.	ABC-type transp., ATPase comp. and permease comp. (<i>cydC</i>)
1735	1102	n.a.	ABC-type transp., ATPase comp. and permease comp. (<i>cydD</i>)
1736	1103	0,56	cytochrome bd-type quinol oxidase, subunit 2 (<i>cydA/B</i>)
1737	1104	0,49	cytochrome bd-type quinol oxidase, subunit 1 (<i>cydA7B</i>)
1758	1121	0,43	esterase/lipase
1759	1122	n.a.	short chain fatty acids transporter
1792	1147	0,46	* hypothetical protein
1815	1167	0,50	hypothetical protein
1822	1174	n.a.	ABC-type transporter, permease component (<i>ssuC</i>)
1823	1175	0,46	ABC-type transporter, ATPase component (<i>ssuB</i>)
1824	1176	0,63	ABC-type transporter, periplasmic component (<i>ssuA</i>)
1954	1770	0,45	* hypothetical protein
1955	1771	0,62	uncharacterized low-complexity protein
2047	1882	0,49	* hypothetical protein
2234	2028	0,50	* hydroxypyruvate isomerase
2235	2029	n.a.	predicted dehydrogenase
2238	2031	0,47	* ABC-type transporter, ATPase component {Fe related}
2239	2032	n.a.	ABC-type transporter, permease component {Fe related}
2240	2033	n.a.	ABC-type transporter, periplasmic component {Fe related}
2715	1281	0,38	integrase
2719	1278	0,45	ABC-type transporter, periplasmic component
2720	1277	n.a.	ABC-type transporter, permease component
2795	1221	0,44	small-conductance mechanosensitive channel
3021	1021	0,48	* transposase
3044	2284	0,44	* transposase
3110	2233	n.a.	FAD/FMN-containing DH. (D-lactate dehydrogenase dld1)
3111	2233	0,36	* FAD/FMN-containing DH. (D-lactate dehydrogenase dld1)
3112	2232	n.a.	predicted permease
3164		0,40	questionable ORF
3262	1593	0,50	preprotein translocase subunit SecF
3263	1592	0,49	dipeptide-binding protein DciAE

ORF	NCgl Nummer	relativer mRNA- Spiegel KK25 / KK25Δ leuA	Protein / Funktion (NCBI)
190		2,60	hypothetical protein
432	57	2,03	hypothetical protein
451	72	11,84	hypothetical protein
661	245	n.a.	isopropylmalate/homocitrate synthase (<i>leuA</i>)
662	245	27,94	* isopropylmalate/homocitrate synthase (<i>leuA</i>)
1200	660	4,23	Thioredoxin
1201	661	2,01	* hypothetical protein
1203	663	23,12	thioredoxin reductase
1349	776	n.a.	ABC-type cobalamin/Fe3+-sideroph. transp. syst., periplasm. comp.
1350	777	n.a.	ABC-type cobalamin/Fe3+-sideroph. transp. syst., perm. comp. (<i>ceuB</i>)
1351	778	n.a.	ABC-type cobalamin/Fe3+-sideroph. transp. syst., perm. comp. (<i>ceuC</i>)
1352	779	2,34	ABC-type cobalam./Fe3+-sideroph. transp. syst., ATPase comp. (<i>ceuD</i>)
1504	899	2,56	Dioxygenase
1671	1045	n.a.	hypothetical protein
1672	1045	2,16	hypothetical protein
2807	2541	3,98	ABC-type transporter, permease component {Fe/Mn related}
2808	2540	7,81	ABC-type transporter, ATPase component {Fe/Mn related}
2809	2539	5,90	ABC-type transporter, periplasmic component {Fe/Mn related}
3347	1646	2,08	hypothetical protein
3428	1708	2,52	hypothetical protein
	28	n.a.	ABC-type transp., ATPase comp. (High-affinity zinc uptake system)
67005	27	13,19	* ABC-type transp., permease comp. (High-affinity zinc uptake system)
67007	26	41,96	ABC-type transp., periplasmic comp. (High-affinity zinc uptake system)

Um die Genregulation, die allein auf erhöhte Lysinproduktion zurück zu führen ist, eindeutig charakterisieren zu können, wurde analog zum oben beschriebenen Vergleich KK25 und KK25 Δ *leuA* cDNA der Stämme MH20-22B und MH20-22B Δ *leuA* mit DNA-Chips analysiert (Tabelle 11). Auch bei Stamm MH20-22B Δ *leuA* kommt es, wohl aufgrund erhöhter Kohlenstoffverfügbarkeit gegenüber Stamm MH20-22B, zu leicht erhöhter Lysinproduktion. Wie bereits im Vergleich des KK25-Stammpaares waren im Expressionsvergleich dieser beiden Stämme auch die Gene *cydA* und *cydB* erhöht. Nur ein weiteres Gen wurde parallel zum Vergleich KK25 und KK25 Δ *leuA* reguliert (ORF 223, hypothetisches Protein), und kann daher als rein Lysinproduktions-abhängig betrachtet werden.

Erhöhte mRNA-Spiegel der Gene für die Katalase wiesen wie in Vergleichen des Produktionsstammes mit dem Wildtyp, mit KK25 und mit LE4 auf veränderte Redoxvorgänge bei erhöhter Lysinproduktion hin, schienen aber eine spezifische Eigenschaft des Produktionsstammes zu sein. Einer solchen Regulation unterlag auch das Gen für Ferritin.

Im Stamm MH20-22B Δ *leuA*, der mehr Lysin produziert, war der relative mRNA-Spiegel des Gens der Glucose-6-Phosphat-Isomerase (*pgi*) erniedrigt. Ob dies Grund oder Folge eines für die Lysinbiosynthese gesteigerten NADPH-Verbrauchs aus dem PPW ist, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Jedoch deutete eine verringerte Expression der Gene der Tryptophan-Biosynthese in diesem Stamm zum ersten Mal im Verlauf der DNA-Chip-Untersuchungen der Modellstämme auf eine Regulation am Verzweigungspunkt zwischen Glycolyse und PPW hin (das Gen *aro*, das für das Enzym für den Kondensationsschritt von Erythrose-4-Phosphat mit PEP codiert, konnte bei keinem Chip ausgewertet werden). Flussuntersuchungen (mit einer ungerichteten Mutante) zeigen einen verstärkten Fluß durch den PPW bei Lysinproduktion (Ishino *et al.*, 1991; Marx 1997).

Tabelle 11: Gene mit veränderter Expression (relativem mRNA-Spiegel) bei Hybridisierung von aus MH20-22B und MH20-22B Δ *leuA* isolierter RNA. Erläuterungen siehe Tabelle 5.

ORF	NCgl Nummer	relativer mRNA- Spiegel '22B / '22Bdelta leuA	Protein / Funktion (NCBI)
215	2731	0,34	hypothetical membrane protein
223		0,29	hypothetical protein
244	2754	0,50	beta-N-acetylglucosaminidase-like protein
537		0,34	questionable ORF
670/671	251	0,41/0,24	*/ catalase
1495	891	0,43	hypothetical protein
1529	918	0,43	hypothetical protein
1554	940	0,28	hypothetical protein
1644	2284	0,32	* transposase
1727		0,28	* hypothetical protein
1734	1101	n.d.	ABC-type transp., ATPase comp. and perm. comp. (<i>cydC</i>)
1735	1102	n.d.	ABC-type transp., ATPase comp. and perm. comp. (<i>cydD</i>)
1736	1103	0,42	cytochrome bd-type quinol oxidase, subunit 2 (<i>cydA/B</i>)
1737	1104	0,40	cytochrome bd-type quinol oxidase, subunit 1 (<i>cydA/B</i>)
1881	2897	0,30	* starvation-inducible DNA-binding protein
1952		0,45	hypothetical protein
2010	1851	0,45	hypothetical membrane protein
2418	1478	0,44	hypothetical protein
2801		0,49	hypothetical protein
2920	2450	0,24	hypothetical protein
2974	2356	0,48	hypothetical protein
3021	2284	0,49	transposase
3044	1021	0,44	transposase
3248	1703	0,37	site-specific DNA methylase or
3249	1704	0,35	stress-sensitive restriction system protein 1
3250	1705	0,36	stress-sensitive restriction system protein 2
3472	2439	0,27	* ferritin-like protein
3607	1615	0,15	* hypothetical protein
3654	1734	0,33	* hypothetical protein
3666	1748	0,31/0,27	*/ periplasmic serine protease
219	2734	2,53	hypothetical protein
268	2775	2,67	hypothetical protein
313	2817	12,35	L-lactate dehydrogenase

ORF	NCgl Nummer	relativer mRNA- Spiegel '22B / '22Bdelta leuA	Protein / Funktion (NCBI)
389	2869	2,16	copper chaperone
423	50	2,04	phenol hydroxylase related protein
424	51	2,92	Zn-dependent hydrolase
425	52	3,51	hypothetical membrane permease protein
518	123	2,21	hypothetical protein
662	245	18,52	2-isopropylmalate-synthase leuA
673	252	2,22	hypothetical protein
854	377	2,26	* hypothetical membrane protein
856	379	2,02	ABC-type transporter, permease component
981	470	2,16	hypothetical membrane protein
1388	802	2,25	fatty-acid synthase
1402	817	2,10	glucose-6-phosphate isomerase
1468	870	2,18	hypothetical membrane protein
1711	1083	2,38	hypothetical protein
1797	1150	2,05	molybdenum cofactor biosynthesis enzyme
1916	2928	2,07	anthranilate synthase component II
1917	2929	2,28	anthranilate phosphoribosyltransferase
1918	2930	2,23	indole-3-glycerol phosphate synthase
1919	2931	2,68	tryptophan synthase beta chain
2005	1847	2,02	hypothetical protein
2012	1853	2,16	predicted transcriptional regulator,
2018	1858	2,12	phosphoenolpyruvate-protein kinase (<i>ptsI</i>)
2047	1882	2,99	hypothetical protein
2369	1437	2,12	hypothetical protein
2629	1340	2,16	acetylglutamate semialdehyde dehydrogenase (<i>argC</i>)
2663	1312	2,15	transcriptional regulator
2703	1289	2,08	hypothetical protein
2769	1240	2,36	DNA polymerase III epsilon subunit
2772	1237	2,70	isocitrate/isopropylmalate dehydrogenase (<i>leuB</i>)
2773	1236	2,19	* hypothetical protein
2805	2544	2,45	3-ketosteroid 1-dehydrogenase
3140	2211	2,26	transcriptional regulator of heat shock gene
3261	1593	2,12	preprotein translocase subunit SecF
3543	381	3,98	hypothetical membrane protein

Um zu überprüfen, ob unter den unter 3.4.2. identifizierten Genen mit stammspezifischem Expressionsmuster Gene waren, deren Regulation auf den Stammunterschied der Leucinauxotrophie zurück zu führen war, wurden DNA-Chip-Untersuchungen mit den Stämmen KK25 Δ *leuA* und MH20-22B Δ *leuA* durchgeführt. Hierbei sollten Gene, welche im Vergleich der Ausgangsstämme ohne Deletion aufgrund der Leucinauxotrophie differenziell exprimiert waren, keine unterschiedlichen mRNA-Spiegel mehr aufweisen. Das Expressionsmuster dieses Vergleichs war dem Expressionsmusters des Vergleichs der Ausgangsstämme KK25 und MH20-22B sehr ähnlich. Tatsächlich lassen sich einige Gene nicht mehr als differenziell exprimiert identifizieren (ORF 1888 (*mez*), ORFs 1349-53). Die Gene, deren Expression unter 3.4.2. als Stammhintergrund-spezifisch angesehen worden war (u.a. *gluABCD*, Thiamin-Biosynthese-Gene, ORFs 2479-80 (*amt*)), zeigten aber nach wie vor veränderte Expressionsmuster.

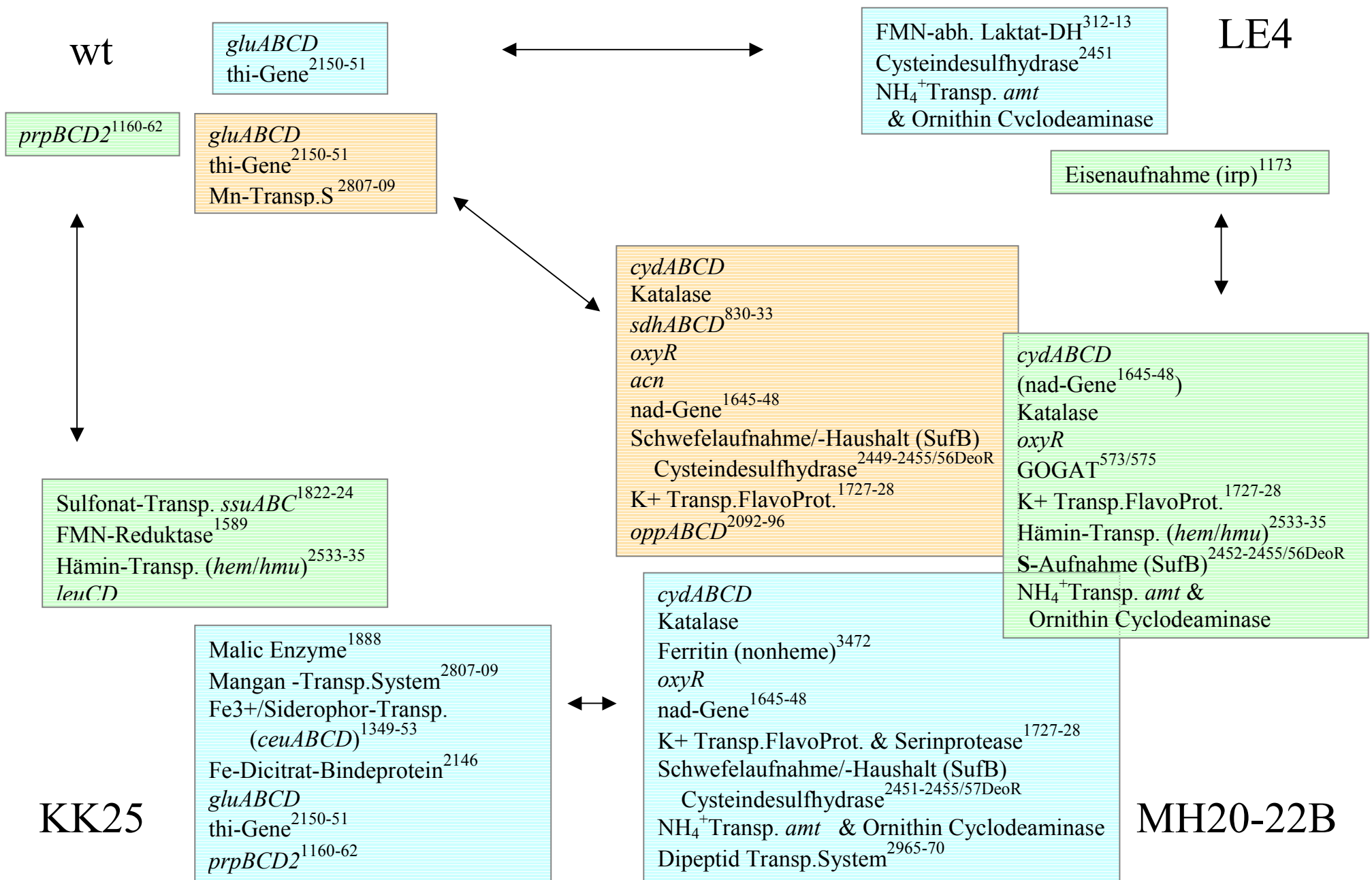
Damit konnten die Ergebnisse des „Schnittmengen-Models“ für die Stammhintergrund-spezifischen sowie für die Leucin-Auxotrophie-spezifischen Expressionsänderungen bestätigt werden.

3.4.4. Kombinatorische Analyse der Lysinproduktions-abhängigen Expression

Bei allen Stammvergleichen war stets beobachtet worden, dass mit erhöhter Lysinbildung auch eine höhere Anzahl von Genen erhöhte relative mRNA-Spiegel hatte. Somit sollten sich Gene identifizieren lassen, die in Abhängigkeit von durch regulatorische oder chromosomale Unterschiede hervorgerufener Lysinproduktion differenziell exprimiert werden. Um ein Modell zur Lysin-abhängigen Regulation im Produktionsstamm aufstellen zu können, wurden die Expressionsmuster aller Stammvergleiche ATCC 13032 - MH20-22B, ATCC 13032 – KK25, ATCC 13032 – LE4, MH20-22B – KK25, und MH20-22B – LE4 miteinander verglichen. Dabei wurden Gene in die Modellbetrachtung mit einbezogen, deren Expression in mehreren Stammvergleichen ein charakteristisches Muster aufwies, die Genlisten wurden anschließend um Gene ergänzt, deren Expression laut Literatur in anderen Organismen

oder in *C. glutamicum* mit den zuvor identifizierten Genen zusammenhängen könnte. Auf diese Weise konnten folgende Expressionsmuster identifiziert werden: Die Gene des Glutamatimporters *gluABCD* sowie eines Thiamin-Biosynthese-Clusters hatten in allen Stammvergleichen mit MH20-22B bzw. LE4 erhöhte relative mRNA-Spiegel. Die Gene der alternativen Oxidase *cydABCD* hatten in allen Stammvergleichen erhöhte relative mRNA-Spiegel im Stamm MH20-22B, ebenso das Gen für die Katalase und *oxyR*, ein Kalium-Transport-Flavoprotein, Gene des Schwefelhaushalts (Cysteindesufhydrase, *SufB*) und das *nad*-Operon (letzteres mit durchschnittlichem Faktor von 1,6). Diese Gene wurden also nur im Produktionsstamm aber nur bei Lysinproduktion exprimiert. Für die Stämme LE4 und KK25 konnte kein eindeutiges Expressionsmuster gefunden werden, jedoch zeigte der Stamm KK25 mit erhöhten relativen mRNA-Spiegeln einiger Schwefel- und Eisen-bezogener Proteine ein analoges Expressionsmuster wie MH20-22B. Die Ergebnisse sind graphisch in Abbildung 8 dargestellt.

Abbildung 8: Darstellung ausgewählter Gene mit veränderter Expression bei Vergleichen der vier Modellstämme. Die durch Pfeile verbundenen Farbfelder stellen jeweils das Ergebnis eines Stammvergleiches dar. Bei einem Stamm dargestellt sind jeweils die Gene mit erhöhten relativen mRNA-Spiegeln. Hochgestellte Zahlen bezeichnen die ORF-Nummer.



Um in dem Modell zur Lysin-abhängigen Regulation alle Gene mit möglichst wenig Informationsverlust berücksichtigen zu können, und somit eine detailliertere und globalere Analyse der spezifischen Expressionsmuster zu erhalten, wurde die hierarchische Clusteranalyse nach Eisen genutzt (Eisen *et al.*, 1998). Zu diesem Zweck wurden die Daten aus den Chipexperimenten aller fünf Stammvergleiche gemeinsam mittels der Clusteranalyse analysiert. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden nur solche Gene berücksichtigt, die in mindestens 10 von 12 Experimenten zuverlässig bestimmbar waren. 101 von 138 Genen erfüllten dieses Kriterium, die graphische Auswertung der Analyse ist in Abbildung 12 dargestellt. Es ließen sich auch mit dieser Analysemethode zwei Gruppen von Genen identifizieren. Der untere Abschnitt des Clusterbildes (grün, Cluster 1) zeigte dabei 27 Gene, deren Expression immer im Wildtyp erhöht war. Dieser Cluster teilt sich in zwei Untercluster. Der erste Untercluster umfasst bei 18 Genen neben einem IS-Element (ORF 1091) und dem ORF 1816 eine Genregion der ORFs 1211-1249, auf die in 3.5. näher eingegangen wird. Der zweite Untercluster mit 9 Genen zeichnet sich dadurch aus, dass im Vergleich KK25 zu Wildtyp kaum veränderte Expression identifiziert werden konnte. In diesen Cluster fallen die Gene *gluABCD* sowie die Thiamin-Biosynthese-Gene (ORF 3317; die ORFs 2149-52 sind im in Abbildung 9 gezeigten Cluster nicht dargestellt).

Cluster 2 im oberen Drittel (rot) besteht aus 32 Genen, welche im Produktionsstamm erhöhte Expression zeigten, z.B. *sdhABCD* oder ein Eisenaufnahme-System (*hemU*, *hmuT*, *fepC*). Dieser Cluster enthält Gene, welche ausschließlich im Produktionsstamm MH20-22B erhöhte Expression zeigten, darunter das Gen für die Katalase (ORFs 670/671), die putativen Gene für Schwefelaufnahme (SufB, NifU; ORFs 2449-2456) eine Protohäm Ferrolyase (ORF 2419) (Bott & Niebisch, in press) und das Operon der NAD-Biosynthesegene (ORFs 1645-1648). Im Vergleich LE4 zu Wildtyp zeigten diese Gene keine differenzielle Expression. Diese Gene wurden somit abhängig von höherer Lysinbildung reguliert.

Somit konnten mit dem Ansatz der kombinatorischen Stammvergleiche und der Cluster-Analyse Gene identifiziert werden, welche in Abhängigkeit von starker Lysinbildung reguliert werden. Die Clusteranalyse erlaubte dabei die Zuordnung von Genen in diese Gruppe, die manuell nicht hätten identifiziert werden können. Aus diesen Daten können ein Modell für die regulatorischen Vorgänge bei Lysinproduktion im MH20-22B hergeleitet und weitere Zielgene zur Verbesserung der Lysinproduktion bestimmt werden (siehe Diskussion).

3.5. Untersuchungen zu chromosomalen Unterschieden der Modellstämme

Da der Produktionsstamm MH20-22B aus dem Wildtyp durch ungerichtete Mutagenese hervorgegangen war und zu diesem nicht isogen ist, kann es außer Punktmutationen, wie im Falle des Gens für die Aspartatkinase, auch größere chromosomale Veränderungen wie Gen-Amplifikation oder Deletion geben. Solche Rearrangements sind in verschiedenen Eukaryoten (Wang *et al.*, 2002; Sierra *et al.*, 2001) und Prokaryoten (Broschard *et al.*, 1998) beschrieben. Unentdeckt können solche Veränderungen die Genexpressionsdaten verfälschen.

Um die gewonnenen Expressionsmuster auf den Einfluß von Gen-Amplifikation oder Deletion zu untersuchen, wurden die vier benutzten Stämme auf chromosomaler Ebene mit Hilfe der DNA-Chips und der Methode der *comparative genome hybridization* untersucht. Die Mehrzahl der Gene sowie die genomische DNA-Kontrolle sollte dabei ein Signalverhältnis von 1 haben, was einer gleichen Anzahl von Kopien des jeweiligen Gens entspricht.

Bei allen durchgeführten Stammvergleichen hatten nur zwei Genregionen von eins signifikant verschiedene Fluoreszenzsignal-Verhältnisse. ORFs 1616-1619 (NCgl 994-996), welche für putative Membranproteine codieren und von zwei IS-Elementen flankiert werden, sowie ein größerer Bereich der ORFs 1211-1252 (NCgl 670-702), welcher u.a. Gene wie *accBC*, *dsrR1* und *dsrR2*, sowie ein Maltose-Aufnahme-codierendes Operon *malEFG*, *msiK* beinhaltet und etwa in der Mitte der Region ein IS-Element aufweist. Bei diesem Vergleich zeigte der Wildtyp gegenüber den anderen drei Stämmen (KK25, LE4, MH20-22B) immer erhöhte Signale für die Region 1211-

52. Das gleiche Ergebnis wurde im Vergleich mit dem gleichen Wildtypstamm (ATCC 13032) aus einem anderen Labor (Patek M., Institut für Mikrobiologie, Akademie der Wissenschaften der Tschechischen Republik, Prag, Tschechien) gefunden und zeigte somit eine Amplifikation der Region ORFs 1211-52 (NCBI Abschnitt 718577 – 758280) im von mir verwendeten Wildtypstamm auf. Eine mögliche Deletion des Bereichs ORFs 1211-52 im MH20-22B wurde durch wiederholte, unterschiedliche PCR- und Restriktions-Ansätze widerlegt (Abbildung 10). Gleichzeitig sind in diesem Stamm sowie in Stamm KK25 die Gene 1616-1619 (NCBI Abschnitt 1090163-1094914) deletiert, worauf die hohen Signalrelationen (ca. Faktor 8) hinwiesen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Gene mit mindestens 2fachem Signalunterschied in genomischen Stammvergleichen. Dargestellt ist jeweils das durchschnittliche Signalverhältnis der Gene in dem angegebenen Genabschnitt ORFs 1211-1252 bzw. ORFs 1615-1619.

Gen	'22B/wt	KK25/wt	LE4/wt	LE4/KK25	LE4/'22B	wt'"Prag"/wt
1211 1252	0,3	0,3	0,3	1	1	0,3
1615 1619	5	1	8	8	1	9

Der Stamm KK25 war zu Beginn der Arbeiten aus dem Stamm ATCC 13032 (wie im Abschnitt Material & Methoden beschrieben) konstruiert worden. Er zeigte somit die selbe Kopienzahl der Gene 1616-19 wie der Wildtyp. Jedoch hatte er nur eine Kopie der Region 1211-52. Somit muß die Amplifikation dieser Gene im Wildtyp erst nach der Konstruktion des Stammes stattgefunden haben.

Abbildung 10: A) Gelkontrolle der PCR zur Überprüfung einer Deletion der Genregion ORFs 1211-52. PCR-Produkt aus Stamm ATCC 13032 (2) und aus Stamm MH20-22B(3); DNA-Größenstandard (1).

B) Gelkontrolle einer Restriktion der PCR-Produkte aus A) mit den Restriktionsenzymen EcoR1 (1)&(5) und Hind3 (2)&(4). Fragmentbanden aus ATCC 13032 (4, 5) und MH20-22B (1, 2); DNA-Größenstandard (3).

Als Größenstandard wurde Hind3-geschnittene Lambda-DNA benutzt. Die Bandengrößen in kb von oben nach unten sind: 23; 9,4; 6,55; 2,30; 2,02; 0,56.

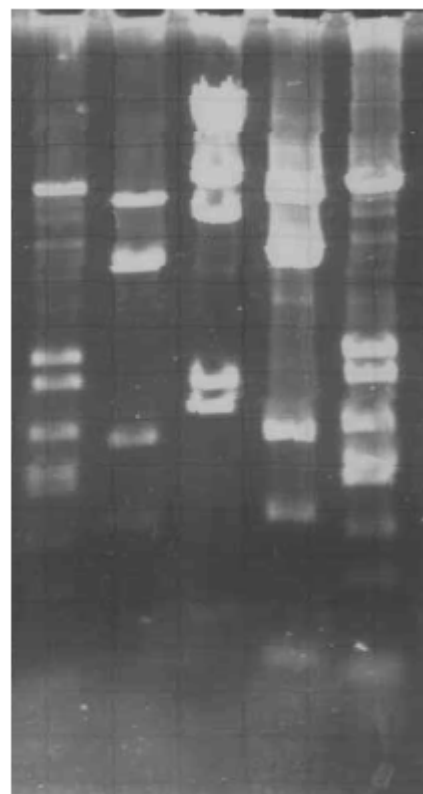
A)

1 2 3



B)

1 2 3 4 5



Die Ausstattung mit mehreren Kopien der Gene der Region ORFs 1211-52 erwies sich jedoch im Vergleich der Lysinproduktions-Kapazitäten der untersuchten Stämme als nicht relevant für Lysinproduktion, da der Prager Wildtypstamm ebenfalls kaum Lysin produzierte (3 mM). Ebenso irrelevant war die Deletion der Gene 1616-1619, wie der Vergleich mit dem Prager Stamm, der ohne eine Deletion kein Lysin produziert, und Stamm KK25, der trotz Deletion gewohnte Mengen Lysin produziert, zeigt. Andererseits unterscheiden sich die beiden Stämme LE4 und MH20-22B trotz gleicher Kopienzahl dieser beiden Genregionen stark in ihrer Lysinproduktion.

Andere chromosomale Unterschiede wurden nicht gefunden.

Somit konnte der Einfluß genomischer Differenzen zwischen den verschiedenen Modellstämmen auf die Expressionsdaten bestimmt werden. Die scheinbar veränderte Expression der ORFs 1616-19 sowie ORFs 1211-52 des ersten Unterclusters des Clusters 1 der hierarchischen Clusteranalyse konnte als Auswirkung der chromosomalen Unterschiede identifiziert und durch Vergleich mit bekannten Lysinproduktionsdaten ein möglicher Einfluß auf die Lysinproduktion ausgeschlossen werden (In den Tabellen 5,6,8,9 und 18 wurden die Werte nicht aufgeführt).

3.6. Überprüfung spezifisch regulierter Gene bezüglich Einfluß auf Lysinproduktion

Um die Gene zu identifizieren, welche im Lysin-Produktionsstamm MH20-22B in Abhängigkeit von der Lysinproduktion differenziell exprimiert werden, waren die Unterschiede zwischen Wildtyp und Produktionsstamm nach ihren einzelnen, bekannten Faktoren aufgelöst worden (vgl. 3.4.1., 3.4.2. & 3.4.3.). Aus diesen Vergleichen waren zwei Gruppen von Genen durch vergleichende Analysen der Daten identifiziert worden (Tabelle 13). Eine dritte Gruppe von Genen war aus den Untersuchungen zu Wachstumsphasen-abhängiger Genexpression (3.3.1.) identifiziert worden.

- Gruppe 1: *hmuT*-Operon (ORFs 2533-35) mit höherem mRNA-Spiegel in Stämmen mit *lysC*^{FBR}-Allel im Vergleich zu solchen mit *lysC*^{wt}, aber unabhängig vom Stammhintergrund
- Gruppe 2: Sieben Gene bzw. Operons (IS-Elemente wurden nicht berücksichtigt) mit veränderter Expression in Abhängigkeit vom Stammhintergrund, aber unabhängig vom *lysC*-Allel.
- Gruppe 3: Vier Gene mit erhöhten mRNA-Spiegeln ausschließlich im Stamm MH20-22B in der stationären Phase im Vergleich mit der exponentiellen Phase.

Diese Gene sollten nun in den Stämmen ATCC 13032 bzw. MH20-22B überexprimiert oder deletiert werden, um ihren Einfluß auf die Lysinproduktion zu untersuchen.

Tabelle 13: Gene mit unterschiedlicher Expression in jeweils zwei analogen Stammvergleichen. Erläuterungen siehe Tabelle 6.

relativer mRNA-Spiegel KK25 / wt			relativer mRNA-Spiegel LE4 / MH20-22B			Protein / Funktion (NCBI)
ORF	wt	n	ORF	MH20-22B	n	
2533	1,84	2	2533	n.a.		hemin permease hemU
2534	2,26	2*	2534	3,47	2	hmuT protein
2535	2,12	2	2535	n.a.		ferric enterobactin transport ATP-binding protein fepC

relativer mRNA-Spiegel ATCC13032 / LE4			relativer mRNA-Spiegel KK25 / MH20-22B			Protein / Funktion / Ähnlichkeit
ORF	LE4	n	ORF	MH20-22B	n	
2040	n.a.		2040	n.a.		glutamate transport ATP-binding protein gluA
2041	0,37	2*	2041	0,38	2*	glutamate-binding protein gluB precursor
2042	0,27	2*	2042	0,39	2*	glutamate transport system permease protein gluC
2043	0,45	2*	2043	0,38	2*	glutamate transport system permease protein gluD
2149	0,74	2	2149	0,49	1	thiamine monophosphate synthase (<i>thiC</i>)
2150	0,71	2	2150	0,46	1	glycine/D-amino acid oxidases (<i>hcnC</i>)
2151	n.a.		2151	n.a.		thiamin biosynthesis protein (<i>thiG</i>)
2152	0,4	1	2152	0,38	2*	Dinucleotide-utilizing enzyme (<i>thiF</i>)
3317	0,46	2*	3317	0,41	2*	sulfur transfer protein (<i>thiS</i>)
1449	2,26	2*	1449	2,36	1	predicted methyltransferase
2435	2,08	2	2435	1,83	2	questionable ORF
2451	2,02	1	2451	2,77	1	selenocysteine lyase / cystein desulphydrase
2452	1,93		2452	2,33	1	ABC-type transporter, ATPase component
2458	1,34	2	2458	1,12		membrane protein
2459	1,1	2	2459	1,38	2	ABC-type transporter, ATPase component
2460	2,29	2*	2460	2,24	1	ABC-type transporter, permease component
2479	3,51	2	2479	2,1	2	predicted ornithine cyclodeaminase
2480	2	1	2480	2,35	1	ammonia permease amt

3.6.1. Überexpression des Operons der Gruppe 1 (*hemU-hmuT-fepC*)

Bei den Expressionsvergleichen der Stämme Wildtyp und KK25 sowie LE4 und MH20-22B zeigten die ORFs 2533-2535 (NCgl1564-1566) etwa dreifach erhöhte relative mRNA-Spiegel im Produktionsstamm bzw. dem Stamm KK25 (beide *lysC^{FBR}*). Die möglicherweise zugrunde liegende Regulation war somit unabhängig vom Stammhintergrund aber abhängig vom *lysC*-Allel. Das Gen, das als *hmuT* annotiert ist und zusammen mit *hemU* und *fepC* in einem Operon in den Stämmen mit *lysC^{FBR}*-Allel erhöhte mRNA-Spiegel aufwies, ist ein Kandidat für ein Gen, dessen Regulation spezifisch die Lysin-Produktion beeinflusst. Das Operon codiert für einen putativen Eisen/Cobalamin-Siderophor ähnlichen ABC-Typ Transporter, mit *hemU* als Permease, *hmuT* als periplasmatischem Anteil (in *E. coli*) und *fepC* als ATPase. Um eine mögliche Erhöhung der Lysinbildung aufgrund der erhöhten Expression dieses Operons zu untersuchen, sollte das *hemU-hmuT-fepC*-Operon in beiden *C. glutamicum* Stämmen Wildtyp und MH20-22B überexprimiert werden.

Zur IPTG-induzierbaren Überexpression wurde ein durch PCR mit den Primern *geo_hmuT_frwd* und *geo_hmuT_rev* mittels einer *proofreading*-Polymerase erhaltenes, *XbaI-EcoRI* geschnittenes 2831bp Fragment mit einer geeigneten Ribosomen-Bindestelle (RBS) in den Vektor pXMJ19 kloniert und nach *E. coli* DH5 α transformiert. Aus 7 Klonen wurde das Plasmid pXMJ19hem isoliert und nach *C. glutamicum* ATCC 13032 und MH20-22B elektroporiert, wobei nach Selektion auf Kanamycinresistenz jeweils *C. glutamicum* Klone wt(pXMJ19hem) bzw. MH20-22B(pXMJ19hem) erhalten wurden, die das gewünschte Plasmid enthielten. Diese wurden bezüglich des Wachstumsverhaltens und der Lysinproduktion untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 sowie in Tabelle 14 dargestellt.

Abbildung 11: Verlauf einer Lysinfermentation mit *C. glutamicum* MH20-22B bzw. MH20-22B(pXJ19hem) in CGXII-Minimalmedium mit 10%(w/v) Glukose und 300mg/l Leucin sowie alternativ IPTG und/oder Chloramphenicol (CAM).

Balken symbolisieren die Lysinkonzentrationen.

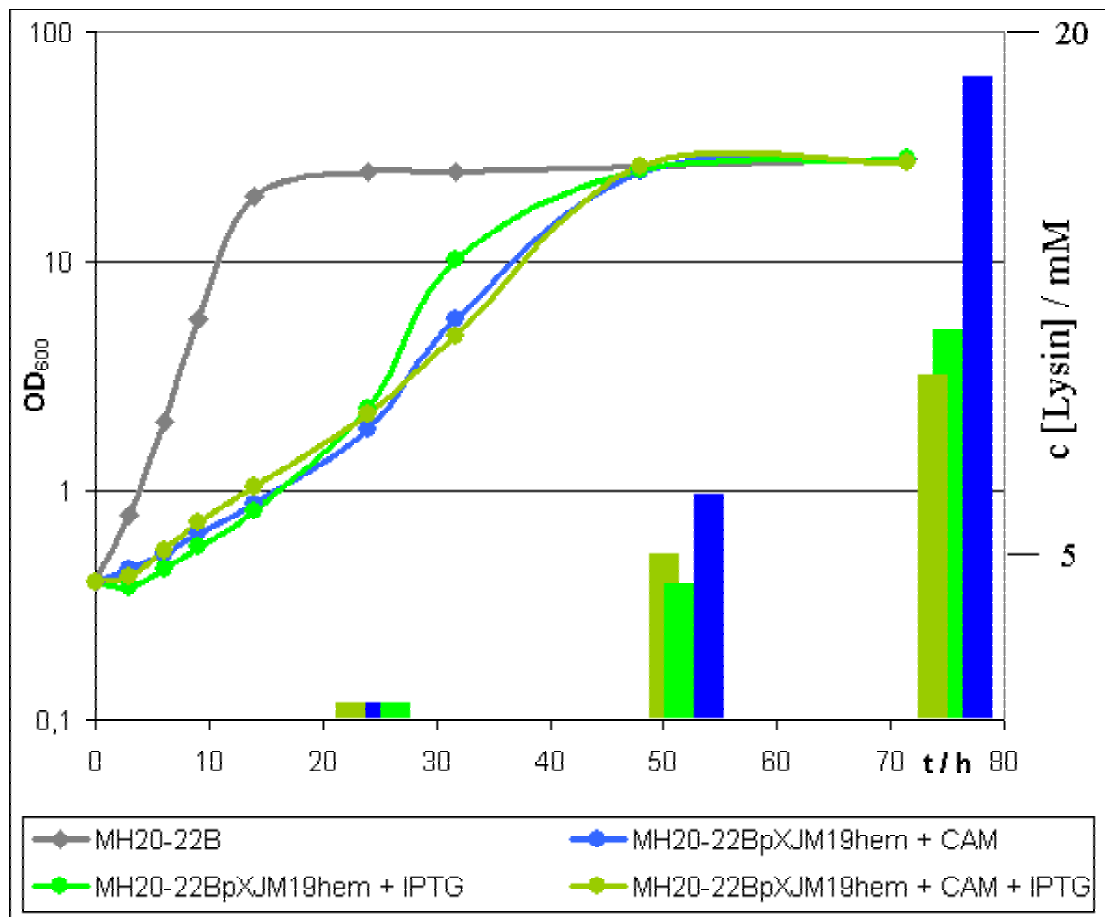


Tabelle 14: Lysinkonzentrationen im Überstand einer Kultivierung von MH20-22B(pXMJ19hem) und MH20-22B mit und ohne Zugabe von Chloramphenicol (CAM) und IPTG.

Stamm	CAM	IPTG	c [Lysin] / mM
MH20-22BpXMJ19hem	--	+	11 ± 0,9
	+	+	12 ± 0,6
	+	--	18 ± 1,2
MH20-22B	--	--	140 ± 40

Im Wildtyp hatte die Expression des *hemU-hmuT-fepC*-Operons keinen Einfluß auf das Wachstum oder die Lysinbildung. Im Produktionsstamm hingegen zeigte sich eine Veränderung der Wachstumsrate wie auch der Lysinbildung. Der Stamm MH20-22B mit dem Leerplasmid pXMJ19 wuchs mit gleicher Wachstumsrate wie der Stamm ohne Plasmid, jedoch zu höheren ODs (ca. $OD_{600} = 40$). Es ist bekannt, daß das Plasmid *per se* die Lysinproduktion herabsetzt. Mit dem Konstrukt pXMJhem erreichte der Stamm wieder die End-OD des plasmidfreien Stamms, und die reine Anwesenheit des Konstruktes verringerte die Wachstumsrate um ca. ein Drittel. Weitere Wachstumseffekte durch Induktion und Expression des *hemU-hmuT-fepC*-Operons gab es nicht, jedoch zeigten der Stamm MH20-22B(pXMJ19) mit steigender Kultivierungszeit eine sinkende Ausplattierungseffizienz auf LB-Chloramphenicol-Agar im Vergleich zu LB-Agar ohne Antibiotikum, was auf Plasmidverlust schließen ließ. Bei IPTG-Induktion wurde die bereits durch das Konstrukt sehr stark verringerte Lysinproduktion noch einmal auf ca. 60% des uninduzierten Wertes verringert. Während der Produzent mit dem Plasmid pXMJ19 nur 2 mM Lysin ausschied, waren mit dem Konstrukt pXMJ19hem immerhin 18 mM Lysin im Überstand messbar (statt 140 mM ohne Plasmid). Allerdings sank die Lysinproduktion im Stamm MH20-22B (pXMJ19hem) nach IPTG-Induktion noch weiter von $18 \pm 1,7$ mM auf $11 \pm 0,9$ mM. Somit konnte die Aktivität des Konstruktes gezeigt werden.

Demnach hatte die Überexpression der Gene *hemU-hmuT-fepC* keinen positiven Einfluß auf die Lysinproduktion im *C. glutamicum* Produktionsstamm. Der Vergleich „nicht induziert“ – „induziert“ zeigt, dass sogar eine Verringerung der Lysinproduktion durch die Expression des Konstrukts erreicht wurde. Möglicherweise ist die erhöhte Expression des *hemU-hmuT-fepC*-Operons nicht wie vermutet eine positive Anpassung an einen stärkeren Stofffluß in Richtung Lysin ist, sondern im Gegenteil der Versuch, die Effekte des deregulierten Stoffflusses zu kompensieren. Die Überexpression verstärkt diesen Effekt noch. Demnach wäre eine Deletion des Genes in MH20-22B besser geeignet, die Lysinproduktion zu steigern. Diese ist nicht gelungen.

3.6.2. Überexpression der Gene und Operons der Gruppe 2

Bei den Expressionsvergleichen der Stämme ATCC 13032 vs. LE4 und KK25 vs. MH20-22B zeigten sieben Gene oder Operons zwei- bis dreifach erhöhte bzw. erniedrigte relative mRNA-Spiegel unabhängig vom *lysC*- Allel aber abhängig vom Stammhintergrund. Diese wurden mittels PCR mitsamt einer geeigneten Ribosomenbindestelle amplifiziert und zur Klonierung in den entsprechend verdauten Vektor pVWEx1 eingesetzt.

Nach Transformation der Konstrukte in *E. coli* DH5 α und Restriktionskontrolle der daraus isolierten Plasmide wurden diese zur Transformation nach ATCC 13032 sowie MH20-22B mittels Elektroporation benutzt. Die erhaltenen *C. glutamicum*-Klone ATCC 13032(pVWEx1-1449), ATCC 13032(pVWEx1-2150), ATCC 13032(pVWEx1-2450), ATCC 13032(pVWEx1-2460), ATCC 13032(pVWEx1-2480), MH20-22B(pVWEx1-1449), MH20-22B(pVWEx1-2150), MH20-22B(pVWEx1-2450), MH20-22B(pVWEx1-2460) und MH20-22B(pVWEx1-2480) wurden bezüglich des Wachstumsverhaltens und der Lysinproduktion untersucht.

Bei Gen ORF 1449 handelt es sich um eine putative Methyltransferase aus einer Gruppe von Uroporphyrin-III-C-Methyltransferasen (EC: 2.1.1.107), welche den Transfer von zwei Methylgruppen von S-Adenosyl-L-Methionin auf Uroporphyrinogen III katalysiert. Das Produkt, Precorrin-2 ist ein Intermediat in der Biosynthese von Korrinoiden wie Vitamin B12, Sirohäm oder Coenzym F430.

Die Gene des Clusters ORFs 2149-52 codieren für verschiedene Thiaminbiosynthese-Gene.

Gen ORF 2451 codiert für eine putative Selenocysteinylase/Cysteindesulphydrase, die an der Biosynthese von Eisen-Schwefel-Clustern beteiligt ist.

Gen ORF 2452 ist Teil eines uncharakterisierten ABC-Transporters. Leider wurde dies zum Zeitpunkt der Klonierung aufgrund mangelnder Annotation nicht erkannt, so dass dieser Teil mitkloniert wurde.

Die Gene der ORFs 2458-60 codieren ebenfalls für einen uncharakterisierten ABC-Transporter. Interessanterweise zeigte immer nur der Permease-Anteil erhöhte mRNA-Spiegel.

Gen ORF 2478 ist eine Sarkosinoxidase, Gen ORF 2479 eine Ornithin-Cyclodecarboxylase und ORF 2480 codiert für den Ammonium-Transporter Amt. Diese drei Proteine scheinen damit mit dem Stickstoffhaushalt verknüpft zu sein, die ersten zwei evtl. durch Ammonium-Abspaltung von NH_3 -haltigen Intermediaten.

Das putative Operon ORF 2434/35 ist nicht charakterisiert.

Das *gluABCD*-Operon wurde nicht in die Klonierung einbezogen, da am Institut langjährige Erfahrungen mit diesem Glutamat-Importer existieren und es als Lysin-irrelevant eingestuft werden konnte. Die Klonierung des ORFs 2434/35 gelang nicht.

Im Wildtyp bewirkte weder die Genexpression von Plasmiden pVWEX1 -2150 / -2450 / -2460 / -2480 eine Auslösung der Lysinausscheidung, ebenso wurde keine signifikante Veränderung der Wachstumsrate oder der End-OD festgestellt.

Im Stamm MH20-22B hatte die Genexpression von den Plasmiden pVWEX1-1449 / -2150 / -2450 / -2460 / -2480 keinen Einfluß auf das Wachstum. Der Kontrollstamm MH20-22BpVWEx1 (Leerplasmid) produzierte mit 80 mM gleiche, wenn auch geringe Mengen Lysin wie der Stamm MH20-22B ohne Plasmid. Ohne Einfluß auf Lysinproduktion blieb die Expression vom Plasmid pVWEX1-2450. Die Stämme MH20-22BpVWEX1-2150 und MH20-22BpVWEX1-2460 schieden ca 10% mehr Lysin aus, jedoch lagen die ermittelten Werte im Rahmen der Standardabweichung und wurden nach Berechnung einer Vertrauenswahrscheinlichkeit ($p\text{-Wert}_{\text{T-Test}} > 0,05$) als nicht signifikant verändert eingestuft. Mit den Stämmen MH20-22BpVWEX1-1449 und MH20-22BpVWEX1-2480 ließ sich hingegen die ausgeschiedene Lysinmenge um 45% steigern. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 dargestellt.

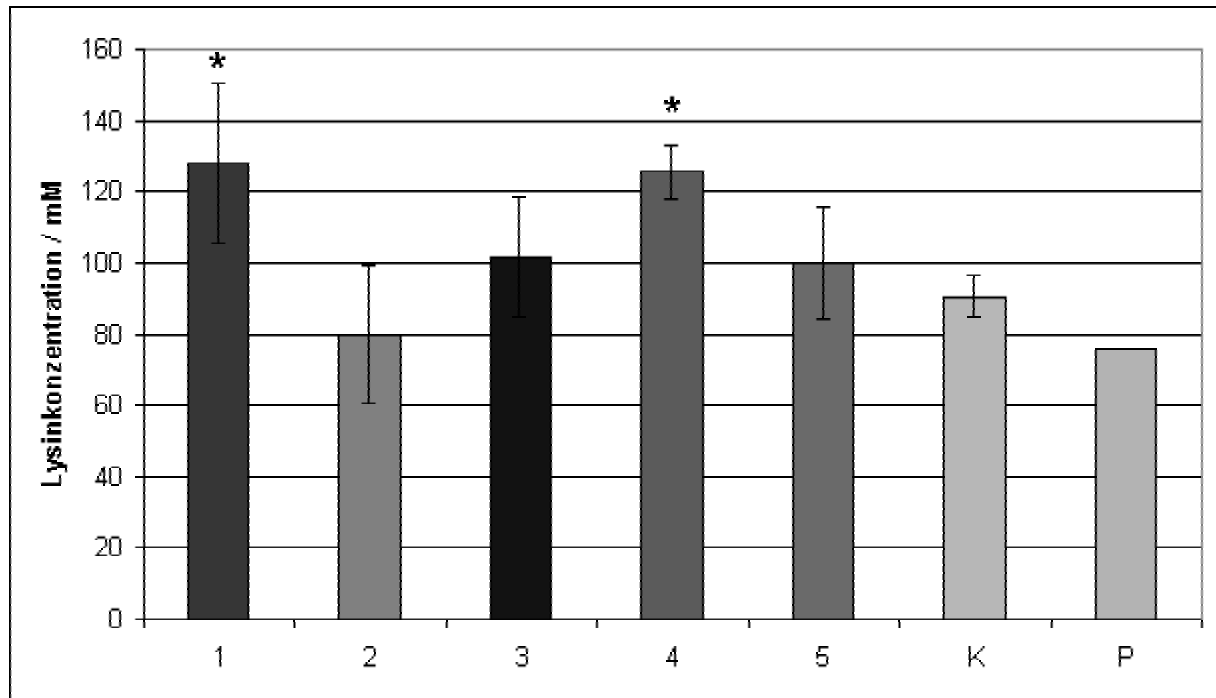


Abbildung 12: Mittlere Lysinkonzentrationen im Überstand einer Kultivierung der Stämme MH20-22BpVWEx1-1449 **(1)**, MH20-22BpVWEx1-2450 **(2)**, MH20-22BpVWEx1-2460 **(3)**, MH20-22BpVWEx1-2480 **(4)**, MH20-22BpVWEx1-2150 **(5)**, MH20-22BpVWEx1 **(K)** und MH20-22B **(P)**. Mittelwerte mit einem p-Wert < 0,05 sind mit (*) gekennzeichnet (T-Test der Excel Tabellenkalkulation, zweiseitig, homoskedastisch, als Vergleichsmatrix wurden die Werte der Menge (K) benutzt).

Somit konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von zwei der durch die kombinatorischen Genexpressions-Analysen identifizierten Gene im Produktions-Stamm zu einer Erhöhung der Lysinproduktion führt, und sich die DNA-Chip-Analyse eignet, potentielle Gene für eine Stammverbesserung zu identifizieren. Jedoch lässt sich im Wildtyp keine Lysinproduktion durch Expression MH20-22B-spezifischer Gene auslösen, was erneut auf die Notwendigkeit einer deregulierten Aspartatkinase hindeutet.

3.6.3. Überexpression der Gene der Gruppe 3

Um Gene zu identifizieren, die nur spezifisch in der Lysinproduktionsphase im MH20-22B exprimiert werden und somit für Lysinproduktion verantwortlich sein können, waren DNA-Chip-Analysen in verschiedenen Wachstumsphasen der Stämme ATCC 13032 und MH20-22B durchgeführt worden. Dabei wurden Gene identifiziert, die gleichsinnig in beiden Stämmen reguliert werden und solche, die unterschiedlicher Regulation zu unterliegen scheinen. Dabei fanden sich wenige Gene, die nur in der stationären Phase und zusätzlich nur im MH20-22B exprimiert werden (siehe 3.3.2.). Von diesen wurden die Gene ORFs 2337 (NCgl1411)[similar to shikimate transport protein (*shiA*)] und 3152 (NCgl2199) [transcription regulator of the *arsR*-family] mittels PCR mit einer *proofreading*-Polymerase mit einer geeigneten Ribosomen-Bindestelle (RBS) amplifiziert, in den Vektor pVWEx1 kloniert und nach *E. coli* DH5 α transformiert. Anschließend wurden die aus *E. coli* DH5 α isolierten und Restriktions-kontrollierten Plasmide zur Transformation nach ATCC 13032 sowie MH20-22B genutzt. Die Amplifizierung des Operons 1865/66 (NCgl1209/10) [DtxR/iron regulated lipoprotein] sowie Klonierung des Gens ORF 3152 war leider nicht gelungen.

Bei Gen ORF 2337 handelt es sich um einen putativen Zucker/Prolin/Citrat-Transporter mit unbekanntem Substrat.

Die Gene ORFs 1865/66 codieren für ein putativ Eisen-reguliertes Lipoprotein und einen Natriumtransporter, die Gene scheinen nicht zu einem ABC-Transporter zu gehören. Interessanterweise liegen sie in Nachbarschaft zu *lysG* und *lysE* (getrennt durch drei Gene (Glutamyl-t-RNA-Amidotransferase, Dehydrogenase, Aldo-Keto-Oxidoreduktase)).

Gen ORF 3152 codiert einen Transkriptionsregulator der *ArsR*-Familie, welcher möglicherweise Metallion- (z.B. Zn-) abhängig DNA bindet.

Im Wildtyp bewirkte die Expression vom Plasmid pVWEX1-2337 keine Änderung der Lysinausscheidung oder der Wachstumsrate. Jedoch wuchs der Stamm zu höherer OD (80 ± 8 statt 60). Eine Erklärung für dieses Verhalten konnte nicht gefunden werden, evtl. ermöglicht die Überexpression des putativen

Zuckeraufnahmesystems Energiegewinnung aus einem sonst nicht verstoffwechselbaren Produkt.

Im MH20-22B bewirkte die Expression vom Plasmid pVWEx1-2337 keine Änderung des Wachstums und eine keine signifikante Erhöhung der Lysinproduktion von 90 ± 6 mM auf 92 ± 18 mM.

Somit konnte gezeigt werden, dass die Überexpression eines Gens, welches Wachstumsphasen-spezifisch im Stamm MH20-22B anders reguliert wird als im Wildtyp, keinen Einfluß auf die Lysinproduktion haben muß. Ebenso wie bei Überexpression der Gene der Gruppe 2, läßt sich im Wildtyp keine Lysinproduktion durch Expression MH20-22B-spezifischer Gene auslösen, jedoch scheint das getestete Gen Einfluß auf das Wachstum zu haben.

4. Diskussion

Mit Hilfe der DNA-Chip Technik konnten die globalen Expressions-Unterschiede zwischen zwei verschiedenen *C. glutamicum* Stämmen untersucht werden, die sich in ihrer Lysinproduktion unterscheiden. Die unterschiedliche Regulation der beiden Stämme Wildtyp und MH20-22B bei Eintritt in die stationäre Phase bzw. die Lysin-Produktionsphase konnte analysiert werden, erlaubte aber aufgrund starker Expressionsdifferenzen (7% des Genoms) keine eindeutige Aussage über Gene, die zu erhöhter Lysinbildung führen. Auch die Untersuchung der Expressionsunterschiede zwischen den zwei Stämmen in der Produktionsphase identifizierte eine sehr große Zahl (329) von differenziell exprimierten Genen, so dass die Expressionsmuster beider Stämme in der exponentiellen Phase untersucht wurden. In dieser Phase war mit 46 Genen nach wie vor eine große Gruppe von Genen in ihrer Expression verändert und zudem beeinflusst von den unterschiedlichen Merkmalen des Produktionsstamms “deregulierte Aspartatkinase“, “Leucin-Auxotrophie“ und “unbekannte Mutationen“. Um den Einfluß dieser Merkmale auf die Expression zu bestimmen, und die Zahl der differenziell exprimierten Gene weiter einzuschränken, wurden DNA-Chip-Analysen von Modellstämmen mit spezifischem Unterschied in je einem dieser Merkmale durchgeführt. Dabei konnte ein Operon identifiziert werden, das in Abhängigkeit vom *lysC*-Allel reguliert wird. Ein Operon konnte als Leucin-Auxotrophie-abhängig reguliert identifiziert werden, 17 Gene konnten als differenziell exprimiert in Abhängigkeit des Stammhintergrundes, d.h. der unbekannten Mutationen im Produktionsstamm identifiziert werden.

4.1. Unterschiede in der Genexpression zwischen Wildtyp und Produktionsstamm

Zur Identifizierung von Genen, deren Genexpression im MH20-22B zu Lysinbildung führt, wurde die Wachstums- bzw. Produktionsphasen-abhängige Regulation der Stämme Wildtyp und MH20-22B untersucht. Dabei wurde im Wildtyp Gen-Regulation beobachtet, wie sie auch für andere Prokaryoten beschrieben ist (Lengeler *et al.*, 1999; Neidhardt *et al.*, 1996). Die Regulation im MH20-22B hatte jedoch nur

die verstärkte Expression der Gene der Leucin-Biosynthese und neun anderer Gene zur Folge. Für einen anderen Lysinproduzenten (ATCC 21253) ist eine ähnliche Untersuchung der Lysinproduktion beschrieben (Loos et al., 2001), jedoch wurde die mRNA zu früheren Zeitpunkten extrahiert, zu Beginn und zu Ende der exponentiellen Phase. Es wurden hierbei nur 52 Gene des Zentralstoffwechsels untersucht von denen 9 (17%) veränderte mRNA-Spiegel hatten. Nur das Gen *gltA* hatte in diesem Vergleich ebenfalls verringerte mRNA-Spiegel in der (frühen) exponentiellen Phase. Insgesamt ist aber ein Chip mit ausgewählten 52 Genen nicht repräsentativ und die Ergebnisse aufgrund eines anderen Stammes und anderer Zeitpunkte der mRNA-Isolierung nicht vergleichbar.

Die Untersuchungen der Expressionsunterschiede zwischen den beiden Stämmen in der stationären und exponentiellen Phase zeigten, dass die Stämme sich zwar in der exponentiellen Phase, in der Wachstum und Metabolismus ähnlich sind, nur wenig in ihrer Expression unterscheiden, dass aber in der stationären Phase starke Unterschiede in der Genexpression vorhanden sind. Zusammen mit den Befunden der Phasen-abhängigen Regulation kann für den Wildtyp eine für die stationäre Phase typische Expression beobachtet werden: Erhöhte Expression der putativen Nitrat-Reduktase-Gene (*narGHJK*) in der stationären Phase sind auch in *Staphylococci* und *E. coli* beschrieben (Talon et al., 1999; Chang et al., 1999), ebenso die verstärkte Expression des Gens der Pyruvat-Carboxykinase in *E. coli* (Lengler et al., 1999). Die im Vergleich zum Wildtyp (vgl. 3.3.2., Lengler et al., 1999) geringere Expression von Genen der Purin-, Histidin- und Tyrosin-Biosynthese im MH20-22B, und das Fehlen der stationäre Phase-typischen Expression in diesem Stamm zeigen jedoch für den Produzenten ein anderes, für die stationäre Phase untypisches Expressionsmuster bei Eintritt in die Produktionsphase. Im MH20-22B waren aufgrund der Leucinlimitierung die Gene der Leucin-Biosynthese und eines putativen Oligopeptidtransporters erhöht exprimiert. Die verstärkte Expression von Oligopeptid-Aufnahmesystemen zur Aufnahme von Peptiden aus dem Medium ist für Aminosäure-auxotrophe *Lysteria*-Stämme beschrieben (Verheul et al., 1995). Aus Analysen der Expressionsunterschiede zwischen Wildtyp und MH20-22B in der stationären Phase konnte zudem eine schwache Expression des ATPase-Operons *atpABDEFGH* (Sekine et al., 2001) bestimmt werden. Eine *C. glutamicum* ATPase-Mutante mit verringerter

ATPase-Aktivität ist beschrieben, die verstärkt Pyruvat und Aminosäuren der Pyruvatfamilie ausscheidet (Sekine *et al.*, 2001), so dass die Aktivität der ATPase im MH20-22B relevant für die Lysinbildung sein könnte.

Die Zahl der differenziell exprimierten Gene im Vergleich Wildtyp zu MH20-22B in der stationären Phase war zu groß und die Unterschiede zu unspezifisch/heterogen, um Gene identifizieren zu können, die zu verstärkter Lysinbildung führen. Aus diesem Grund wurde die Genexpression in der exponentiellen Phase untersucht, zu einem Zeitpunkt, zu dem bereits Lysin vom Produzenten in das Kulturmedium ausgeschieden wurde.

In der exponentiellen Phase hatte 1% der Gene mindestens 2fach veränderte Expression. Abgesehen von *sdhABCD* und *acn* zeigten keine Gene des Zentralstoffwechsels und der Lysinbiosynthese veränderte mRNA-Spiegel in der exponentiellen Phase. Der Stamm MH20-22B ist zwar hinsichtlich veränderter Enzymaktivitäten verschiedener Enzyme des Zentralstoffwechsels und der Lysinbiosynthese untersucht worden (Schrumpf *et al.*, 1992), die Aktivität der Succinat-Dehydrogenase (*sdhABCD*) und der Aconitase (*acn*) waren in dieser Publikation aber nicht getestet worden. Für die Homoserin-Dehydrogenase stimmt der Befund gleicher Aktivitäten zwischen Wildtyp und MH20-22B (Schrumpf *et al.*, 1992) mit den Expressionsdaten überein (vgl. 3.3.). Die erhöhte Expression des Gens *acn* muß keine erhöhte Aktivität der Aconitase widerspiegeln, da in *E. coli* eine der drei Aconitasen durch Redoxstress induziert (Gruer & Guest, 1994) wird. Für *B. subtilis* wird die Aconitase A aufgrund ihres 4Fe-4S-Zentrums als „Iron Responsive Element“ (IRP)-Bindprotein diskutiert (Alen & Sonenshein, 1999), welches die Eisen-Homöostase und evtl. auch Teile der Redoxstress-Antwort reguliert und auch in *M. tuberculosis* wird die Aconitase Eisen-abhängig reguliert (Wong *et al.*, 1999).

Im Wildtyp hatten drei näher charakterisierte Operons erhöhte relative mRNA-Spiegel: Das Glutamat-Aufnahmesystem *gluABCD* (Siewe *et al.*, 1996), ein putatives Thiamin-Biosynthese-Operon, sowie ein putativer ABC-Transporter mit Homologie zu dem *B. subtilis* Mangan-Transporter MntAB (Sonenshein *et al.*, 2002). Die Aktivität des Glutamat-Aufnahmesystem *gluABCD* unterliegt der Katabolit-Repression (mit

schwacher Restaktivität bei Wachstum mit Glukose) und ist proportional abhängig von Kalium-Konzentration und internem pH (Krämer *et al.*, 1990). Der Glutamaimporter hatte im Wildtyp ebenfalls erhöhte mRNA-Spiegel in der exponentiellen Phase im Vergleich zur stationären Phase und unterliegt somit im Wildtyp einer spezifischen Regulation, die nicht mit Lysinproduktion zusammen hängen sollte.

Im MH20-22B weist die erhöhte Expression der Gene der alternativen Oxidase (Kusumoto *et al.*, 2000) und der Succinat-Dehydrogenase (Molenaar *et al.*, 2000) auf veränderte Aktivität der Enzyme der Atmungskette hin. Da solche Atmungsketten-Enzyme Fe-S-Cluster enthalten (Lehninger *et al.*, 2001), ist es plausibel, dass gleichzeitig Gene für Enzyme und Transporter im MH20-22B erhöht exprimiert werden, die Eisen und Schwefel zur Fe-S-Cluster Bildung zur Verfügung stellen wie *sufB* (Ellis *et al.*, 2001; Nachin *et al.*, 2003) und das Gen für die putative Ferrolyase, ein Enzym der Häm-Biosynthese (Dailey *et al.*, 2000; Bott & Niebisch, in press).

Die im MH20-22B erhöht exprimierten ORFs 1645-48 codieren für ein putatives Operon der Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Biosynthese. NAD kann u.a. in *B. subtilis* und *E. coli* in drei Schritten mit den durch *nadABC* codierten Enzymen *de novo* aus Aspartat zu dem Zwischenprodukt Nicotinsäure-Mononukleotid, das ebenfalls ein Zwischenprodukt der Nukleotid-Regenerierung ist, synthetisiert werden (Neidhardt *et al.*, 1996; Sonenshein *et al.*, 2002). Die Transkription der Gene *nadAB* wird in *E. coli* und *S. typhimurium* von dem NadR-Repressor reguliert: NAD⁺-Bindung (jedoch nicht NADH-Bindung) ermöglicht die Repression der Transkription, Bindung von ATP andererseits verhindert die Repression (Neidhardt *et al.*, 1996; Penfound & Foster 1999). Zusammen mit dem Befund verringerter ATPase-Genexpression und erhöhter *cydABCD*-Expression deutet dies auf eine veränderte Energieladung des Produktionsstamms relativ zum Wildtyp hin. Die aufgenommene Glukose wird scheinbar schnell oxidiert, jedoch können die Metabolite aufgrund der Wachstumslimitierung nicht weiter verstoffwechselt werden. Es kommt somit zu einer Limitierung der NADH-Regenerierung durch die Atmungskette, zu NADH und ATP Überschuß und zu einem Überflußmetabolismus-ähnlichen Zustand (Walshaw *et al.*, 1997; Gallmetzer & Burgstaller, 2001), in dem MH20-22B aufgrund der deregulierten Aspartatkinase Lysin ausscheidet.

Die Lysinbildung im Produktionsstamm konnte durch den Vergleich mit dem Wildtyp zum Teil charakterisiert werden und die Gruppe der durch differenzielle Expression für erhöhte Lysinproduktion verantwortlichen Gene eingegrenzt werden. Weitere Untersuchungen waren aber aufgrund der hohen Zahl an differenziell exprimierten Genen notwendig.

4.2. Auswirkung MH20-22B-spezifischer Merkmale auf die Genexpression

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Stamm KK25 Δ *leuA* geringere Mengen Lysin bildet als der Produktionsstamm MH20-22B. Es muß also im Produzenten außer des veränderten Gens der (deregulierten) Aspartatkinase und der Leucin-Auxotrophie weitere, unbekannte Mutationen geben. Der Stamm KK25 scheidet weniger Lysin aus, als der Leucin-prototrophe Stamm MH20, der im ersten Mutations-Selektion-Schritt isoliert wurde (Schrumpf *et al.*, 1992). Somit ist es im ersten Mutationsschritt bereits zu weiteren Mutationen außer der zu *lysC*^{FBR} gekommen. Der Stamm MH20::*leuA*⁻ scheidet wiederum weniger Lysin als der Produzent MH20-22B aus (Patek *et al.*, 1994). Somit ist es auch im zweiten Mutationsschritt zu zusätzlichen Veränderungen außer der Leucin-Auxotrophie gekommen. Die spezifische Auswirkung der bekannten Merkmale sowie die Auswirkung der Summe der unbekannten Merkmale auf die Genexpression konnte mit den zur Verfügung stehenden Modellstämmen identifiziert werden, indem Wildtyp-Derivate und Produzenten-Derivate mit jeweils gleichem *lysC*-Allel sowie mit jeweils gleichem Stammhintergrund untersucht wurden. Dadurch war es möglich, die hohe Zahl an differenziell exprimierten Genen des Vergleichs MH20-22B zu Wildtyp zu reduzieren und die mögliche Auswirkung von unspezifischen Sekundäreffekten auf die Expression zu reduzieren.

Effekt des *lysC*-Allels auf die Genexpression

Wildtyp und Produzent unterscheiden sich aufgrund der Zufalls-Mutagenese, die zur selektiven Erzeugung des Produktionsstamms genutzt wurde, in verschiedenen Merkmalen. Nur das Merkmal der deregulierten Aspartatkinase und die Leucin-Auxotrophie sind bekannt. Um den Einfluß der einzelnen bekannten und unbekannten Mutationen auf die Transkriptions-Regulation zu untersuchen, wurden Genexpressionsstudien mit jeweils isogenen Wildtyp- bzw. Produzentenstamm-Derivaten, KK25 bzw. LE4, durchgeführt (Abbildung 6). Der genetische Unterschied zwischen den Stämmen ATCC 13032 und KK25 ist lediglich eine zweite Kopie des *lysC* Gens. Dieses aus MH20-22B isolierte *lysC*^{FBR}-Allel codiert jedoch für eine feedbackresistente Aspartatkinase. Im Vergleich zu MH20-22B ist in Stamm LE4 das *lysC*^{FBR}-Allel analog gegen das *lysC*^{wt}-Allel ausgetauscht.

Die Expression des Operons ORFs 2533-35 (NCgl1564-1566), welches für ein putatives Eisen- bzw. Hämin-ABC-Aufnahmesystem codiert (Drazek *et al.*, 2000) war erhöht in Stämmen mit *lysC*^{FBR}. Da die *lysC*^{FBR}-tragenden Stämme MH20-22B und KK25 mehr Lysin produzieren als die Vergleichsstämme, konnte man vermuten, dass eine verstärkte Expression dieses Operons zu erhöhter Lysinproduktion beiträgt. Eisen ist essentiell für alle Organismen (Herbig & Helmann 2002) und *C. ulcerans* und *C. diptheriae* Mutanten, die Hämin nicht als Eisenquelle nutzen können, können mit dem zu ORFs 2533-35 homologen (Schmitt & Drazek, 2001) *hmuTUV*-Operon aus *C. diptheriae* komplementiert werden (Schmitt & Drazek, 2001). Im Gegensatz zu *C. ulcerans* hat *C. diptheriae* aber noch mindestens ein weiteres Hämin-Aufnahmesystem. Ob dies für *C. glutamicum* der Fall ist, ist nicht bekannt, auch konnte keine Beschreibung des Einflusses von Eisen-Stoffwechsel auf Aminosäureproduktion gefunden werden.

Alle anderen Gene, deren Expression in den zwei Vergleichen jeweils isogener Stämme (ATCC 13032 und KK25) bzw. (LE4 und MH20-22B) verändert ist, sind als nicht rein vom *lysC*-Allel abhängig anzusehen. Der Unterschied des *lysC*-Allels bewirkt somit direkt nur eine geringe spezifische differenzielle Regulation. Die veränderte Expression dieses Operons war im Vergleich MH20-22B zu Wildtyp nicht aufgefallen, da hier der ORF 2534 nur 1,6fach höhere mRNA-Spiegel hatte.

Möglicherweise wurde die Expression in diesem Vergleich von Sekundäreffekten wie der internen oder externen Lysinkonzentration beeinflusst, ebenso muß insbesondere bei Einzelvergleichen zweier Stämme auch immer eine mögliche Auswirkung unterschiedlicher Wachstumsraten in Betracht gezogen werden.

Effekt der unterschiedlichen Stammhintergründe auf die Genexpression

Zur Identifizierung Stammhintergrund-abhängiger Regulation wurden die gleichen Modellstämme ATCC 13032, KK25, LE4 und MH20-22B benutzt, wie zur Bestimmung des *lysC*-Effektes, jedoch wurden jeweils Stämme mit gleichem *lysC*-Allel verglichen. Es konnten Genexpressions-Muster identifiziert werden, die nicht auf die Anwesenheit einer deregulierten Aspartatkinase zurück zu führen sind, sondern auf die Leucin-Auxotrophie und/oder unbekannte Mutationen (Abbildung 7). 17 Gene/Operons hatten differenzielle Genexpression im Vergleich der *lysC*^{wt}-Stämme ATCC 13032 zu LE4. Im analogen Vergleich der zwei *lysC*^{FBR}-Stämme KK25 zu MH20-22B sind etwa doppelt so viele Gene differenziell exprimiert wie im Vergleich der *lysC*^{wt}-Stämme.

Nur sieben Gene bzw. putative Operons zeigten in beiden parallelen Stammvergleichen gleiche Expressionsmuster. Wie bereits im Vergleich Wildtyp zu MH20-22B hatten das *gluABCD*-Operon (ORFs 2040-43) sowie das Thiamin-Operon (ORFs 2149-52) erhöhte relative mRNA-Spiegel in den Wildtyp-Stämmen. Da mit dem *gluABCD*-Operon bereits viele Arbeiten am Institut durchgeführt worden waren (Burkovski & Krämer, 1995; Kronemeyer *et al.*, 1995), die keine Relevanz für die Lysinproduktion nachweisen konnten, sowie bei Untersuchungen der Wachstumsphasen-abhängigen Expression eine Wildtyp-spezifische Regulation festgestellt wurde, wurde das Operon nicht in die weiteren Untersuchungen mit einbezogen.

Gene mit erhöhten relativen mRNA-Spiegeln in den Stämmen LE4 und MH20-22B waren ORF 1449, ORFs 2434/2435, ORF 2451, ORFs 2458-60 und ORFs 2479-80. Bei diesen Genen wurde davon ausgegangen, dass Mutationen in den Genomen der isogenen Stämme MH20-22B und LE4 die Ursache der differenziellen Expression

sind. Damit stellen diese Gene potentielle Zielgene zur Lysin-Produktionsverbesserung dar. Auffällig ist, dass vier der identifizierten Operons in relativer Nachbarschaft zueinander liegen

ORF 1449 ist eine putative S-Adenosyl-Methionin-Methyltransferase im Tetrapyrrol-Stoffwechsel. Ihr Substrat, Uroporphyrinogen III ist u.a. Edukt verschiedener Häm und Baktriochlorophyll-Moleküle (Raux *et. al.*, 2000). Methylierung durch die Methyltransferase generiert jedoch Precorrin-2, welches abhängig vom später chelatisierten Metallion in *B. megaterium* und anderen Organismen zu Cobalamin (Vit B₁₂), Coenzym F₄₃₀, Sirohäm oder Häm_d synthetisiert wird (Raux *et. al.*, 2003). Cobalamin ist das Coenzym verschiedener Enzyme u.a. in *C. glutamicum* (Vikhanskii 1978), welche komplexe Reaktionen, Methylierungen und Redoxreaktionen durchführen (Raux *et. al.*, 2000). Sirohäm ist die prosthetische Gruppe in Sulfit-Reduktasen z.B. in *C. vinosum* (Pott & Dahl 1998) und in *E. coli* (Crane *et al.*, 1997) und Nitrit-Reduktasen (Lin & Stewart 1998) und Häm_d wird ebenfalls als Cofaktor in denitrifizierenden Reaktionen sowie im Cytochrom_{b_d}-Komplex benötigt. Coenzym F₄₃₀ dient in Methan-Bakterien der Reduzierung von Coenzym M bei der Methanogenese (Pelmenschikov & Siegbahn 2003), welche jedoch in Eubakterien nicht vorkommt. Die Methylierung an Uroporphyrinogen III wird in *E. coli* durch CysG katalysiert, welches ein multifunktionales Enzym darstellt und zwei weitere Reaktionen zu Sirohäm katalysiert (Warren *et al* 1990). Der Mechanismus der S-Adenosyl-Methionin-abhängigen Methylierung ist aber konserviert (Woodcock & Warren 1996). In *B. subtilis* fehlen die Enzyme, Vitamin B₁₂ *de novo* zu synthetisieren (Raux *et. al.*, 2003), die Methylierung ist aber in *B. megaterium* (*cobA*) beschrieben (Robin *et. al.*, 1991).

Die Genregion von ORF 2450-2461 weist in zwei Corynespezies und drei Mycobacteriumspecies sehr hohe Protein-Sequenz-Ähnlichkeit auf (Abbildung 13), mit einem NifU-ähnlichen Protein (ORF 2450), einer putativen Cystein-Desulphydrase (ORF 2451), einem ABC-Transporter (ORF 2452-55) gefolgt von einem Regulator der DeoR-Familie. Divergent dazu liegt der ABC-Transporter ORFs 2458-2460 gefolgt von einem Cytochrom aa₃-assembly-Protein CtaA (ORF 2461). NifU, bzw. sein Homologes IscU wird in der Eisen-Schwefel-Cluster-Biogenese der Nitrogenase benötigt (Frazzon *et al.*, 2002) und ist konserviert in vielen Organismen (*A. fulgidus*,

E. coli, *B. subtilis*, *S. cerevisiae* u.a.). Bei ORF 2451 handelt es sich um ein putatives Enzym mit einer Cysteindesulhydrase-Aktivität, welches homolog ist zu der Cystathion- β -Lyase (*aecD*) (Wada *et al.*, 2002; Rossol & Pühler 1992). Dieses Enzym erlaubt das Wachstum auf verschiedenen Substraten als alternative Stickstoffquelle (Rossol & Pühler 1992). Die Hauptfunktion des Clusters mit den ORFs 2450-2555 ist die Eisen-Schwefel-Cluster-Biogenese (Ellis *et al.*, 2001), so dass die erhöhte Expression dieser Gene in den Stämmen LE4 und MH20-22B auf starke Veränderungen des Cytochrom- oder Eisen-Stoffwechsels schließen läßt. Die Anordnung des Clusters sowie Funktionsvergleiche mit *E. coli* (Takahashi & Nakamura 1999) oder *M. leprae* (Ellis *et al.*, 2001) identifizieren die Genregion ORFs 2450-2555 als das Operon *sufBCDS-nifU* (Ellis *et al.*, 2001). Aufgrund der Anordnung des unbekannten ABC-Transporters ORFs 2458-60 zwischen dem *sufBCDS*-Operon und *ctaA* kann man vermuten, dass auch diese Gene mit Cytochrom- oder Eisen-Stoffwechsel zusammen hängen.

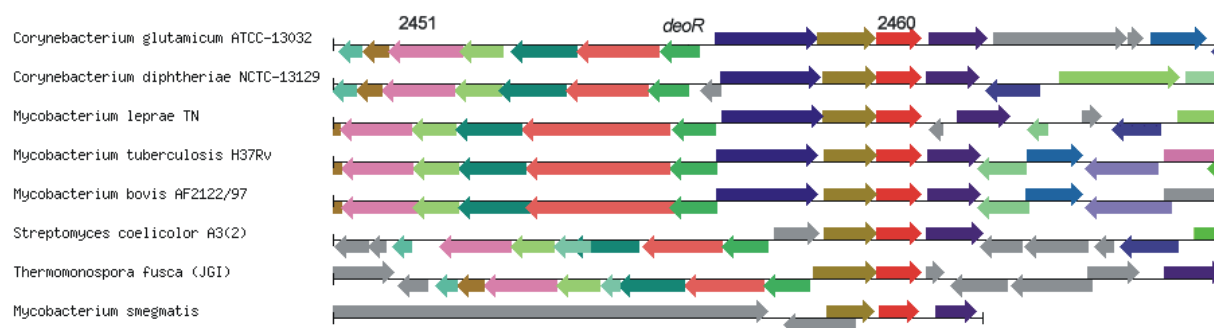


Abbildung 13: Genomische Anordnung der ORFs 2450-2461 in *C. glutamicum* und relativ zu anderen Bakterienspezies. Die Annotation von links nach rechts ist: [*paaD* (türkis)], *IscU/NifU* (braun), *aecD2* (pink), ABC-Transporter (grün, rot), DeoR (grün), ABC-Transporter (blau, braun, rot), Cytochrom aa_3 -assembly-Protein (blau).

Bei ORF 2480 handelt es sich um den Ammoniumtransporter Amt (Siewe *et al.*, 1996). Zwar konnten Siewe *et al.* keine Operon-Struktur für *amt* erkennen, jedoch identifizierten sie als nächstes Gen in Transkriptionsrichtung eine Sarkosinoxidase (Siewe *et al.*, 1996), wohingegen neuere Annotationen zwischen diesen beiden Genen ein ORF identifizieren, dessen erstes Triplet mit den letzten drei Basen des *amt*-Gens sowie mit dem Gen der Sarkosinoxidase überlappt und für eine putative Ornithin-Cyclodeaminase codiert (Jakoby *et al.*, 1999). Ornithin-Cyclodeaminasen katalysieren in Pseudomonaden den Abbau von Citrullin und Arginin zu Ornithin und setzen somit Ammonium in Form von Harnstoff bzw. Carbamoyl-Phosphat frei (Stalon *et al.*, 1987). Sarkosinoxidasen gehören zu einer Gruppe von flavinhaltigen Oxidasen, die oxidative Reaktionen mit tertiären und sekundären Aminosäuren katalysieren und in *B. subtilis* und *Corynebacterium* sp. P-1 ebenfalls Ammonium durch Deaminierung freisetzen (Job *et al.*, 2002; Chlumsky *et al.* 1993). Möglicherweise ist dieses putative Operon Teil des Stickstoff-Metabolismus, eine in *C. glutamicum* vorgefundene genomische Anordnung der drei Gene in einem putativen Operon konnte aber in keinem anderen Organismus identifiziert werden.

Die unbekannten Mutationen im Produktionsstamm-Hintergrund führen somit zur Änderung der Genexpression einer größeren Zahl an Genen. Ein Teil dieser differenziellen Expression ist jedoch zusätzlich abhängig vom *lysC*-Allel bzw. der Lysinkonzentration. Nur 17 Gene bzw. 7 Operons werden unabhängig vom *lysC*-Allel differenziell exprimiert. Drei dieser putativen Operons (*gluABCD*, Thiamin-Biosynthesegene, ORFs 2449-51) zeigten bereits im Vergleich ATCC 13032 zu MH20-22B differenzielle Genexpression und können somit der Stammhintergrund-spezifischen Regulation zugeordnet werden. Die weiteren vier Gene und Operons sind zwar Stammhintergrund-spezifisch reguliert, ihre Transkriptionsstärke wird aber offenbar noch von weiteren Einflüssen bestimmt, da sie im Vergleich Wildtyp zu MH20-22B keine differenzielle Expression aufwiesen. So zeigt z.B. das Stammhintergrund-spezifisch regulierte, putative Operon ORFs 2478-80 (u.a. *amt*), auch differenzielle Expression im Vergleich LE4 zu MH20-22B. (ORF 1449 war im Vergleich Wildtyp zu MH20-22B nicht auswertbar)

Effekt der Leucinauxotrophie als Teil der unterschiedlichen Stammhintergründe auf die Genexpression

Mit *leuCD*⁻ ist eine der Mutationen der Produktionsstammderivate bekannt. Um innerhalb der Gruppe der Gene, deren Expression mit dem unterschiedlichen Stammhintergrund zusammen hängt, die Gene identifizieren zu können, deren differenzielle Expression die Leucin-Auxotrophie bedingt, wurden Stämme mit einer Deletion des ersten Gens der Leucinbiosynthese (*leuA*) konstruiert. Diese Deletion hatte physiologisch unterschiedliche Effekte auf die Lysinproduktion der vier verwendeten Modellstämme (ATCC 13032, KK25, LE4, MH20-22B). ATCC 13032 und ATCC 13032 Δ *leuA* sowie LE4 und LE4 Δ *leuA* unterschieden sich nicht bezüglich der Lysinproduktion, was zeigt, dass eine deregulierte Aspartatkinase notwendig für Leucin-Auxotrophie-verstärkte Lysinproduktion ist, wohingegen Leucin-Auxotrophie selbst zwar notwendig, aber nicht hinreichend für maximale Produktionskapazität ist und allein keine Lysinproduktion auslösen kann.

Im MH20-22B Δ *leuA* kommt es dagegen zu einer leichten Erhöhung der ausgeschiedenen Lysinmenge. Da sich der Parentalstamm MH20-22B von seinem Δ *leuA*-Konstrukt physiologisch primär nur im Anstau des Intermediates 2-Isopropylmalat unterscheidet, dürfte es sich bei der erhöhten Lysinausscheidung jedoch nicht um ein regulatorisches Phänomen handeln. Vielmehr steht dem Stamm MH20-22B Δ *leuA* durch Vermeidung von Isopropylmalat-Bildung (Moritz 2000; Kelle 1996) mehr Pyruvat zur Verfügung, welches z.T. als Valin und Lysin ausgeschieden wird.

Im Stamm KK25 bewirkt die Einführung einer Leucin-Auxotrophie eine Verdreifachung der Lysinproduktion auf einen Wert (85 mM), der etwa einem Drittel des maximalen Wertes des Stamms MH20-22B beträgt (240 mM). Diese Steigerung um den Faktor 3 (von 30 mM auf 85 mM) ist geringer, als die nach Mutation und Screening auf Leucin-Auxotrophie des AEC-resistenten Stamms MH20 zum MH20-22B erreichte (Schrumpf *et al.*, 1992) (von ca. 40mM auf max. 240 mM).

Mittels DNA-Chip-Untersuchung der konstruierten Stämme wurden die Konsequenzen der Leucin-Auxotrophie auf die Genexpression untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Expressionsmuster der Stämme KK25 und KK25 Δ *leuA* untersucht.

Um Effekte auszuschließen, die nur durch den verstärkten Fluß in die Lysinbiosynthese verursacht sind, wurde ein analoger Expressionsvergleich MH20-22B zu MH20-22B Δ *leuA* durchgeführt. Da der Produktionsstamm bereits Leucin-auxotroph ist, können die in diesem Stammvergleich beobachteten Expressionsunterschiede nicht als direkte regulatorische Antwort auf Leucin-Auxotrophie gelten. Somit scheidet das Operon *cydABCD* sowie das Gen für Ferritin (ORF 3472) und die Katalase als Leucin-Auxotrophie-reguliert aus.

Somit konnten mit diesem Vergleich ein putativer Mangantransporter (ORFs 2807-09) (Sonenshein *et al.*, 2002) identifiziert werden, der verringerte Expression mit Leucin-Auxotrophie zeigte. In *B. subtilis* wird die Expression dieses Operons unter niedrigen Mangankonzentrationen induziert (Que & Helmann 2000), in *N. crassa* wird Mangan für die Biogenese des NADH:Ubichinon Oxidoreduktase Komplex 1 benötigt (Prömper *et al.*, 1993), welcher dem bakteriellen NDH I Komplex (*nuo*-Operon) entspricht. In *C. glutamicum* findet man jedoch diese NADH-Dehydrogenase nicht, sondern nur eine NDH II (Bott & Niebisch, 2003, in press), so dass ein Zusammenhang zwischen Mangankonzentration und möglicher unterschiedlicher Aktivität der Atmungsketten-Enzyme bei Leucinlimitierung nicht belegt werden kann. Alle unter 3.4.2. als Stammhintergrund-spezifisch reguliert identifizierten Gene zeigen hingegen in einem Vergleich KK25 Δ *leuA* zu MH20-22B Δ *leuA* nach wie vor differenzielle Expression, so dass darunter tatsächlich Zielgene zur Lysin-Produktionssteigerung zu finden sind.

4.3. Lysinproduktions-spezifische Regulation

Bei allen Stammvergleichen war stets beobachtet worden, dass mit erhöhter Lysinbildung auch eine höhere Anzahl von Genen erhöhte relative mRNA-Spiegel hatte. Die Beobachtung, dass es hierbei eine Gruppe von Genen gab, die stets ähnliche Expressionsmuster zeigten, lässt darauf schließen, dass es sich bei den relativen mRNA-Spiegeln um tatsächlich erhöhte Expression im jeweiligen Stamm handelt. Damit würden die chromosomalen Unterschiede, die zu Lysinproduktion führen, nicht einfach eine Änderung der physiologischen Parameter bewirken (wie z.B. (hypothetisch) das Wachstum mit Glukose im Vergleich mit Wachstum mit Fruktose), sondern zusätzliche Induktion bzw. Derepression von Genen bewirken. Mit Hilfe der Clusteranalyse ließen sich Gene identifizieren, die in Abhängigkeit von durch andere regulatorische oder chromosomale Unterschiede hervorgerufener Lysinproduktion differenziell exprimiert werden (Cluster 2). Sie zeigen stets erhöhte mRNA-Spiegel im Produktionsstamm und z.T. im KK25 bei Vergleich mit dem Wildtyp. Im Vergleich der Stämme LE4 zu Wildtyp, die beide wenig Lysin produzieren, ist der relative mRNA-Spiegel solcher Gene unverändert. In diese Kategorie fallen u.a. die Gene für Sulfattransporter (SufB, ORFs 2452-55), eine Protohäm-Ferrolase der Cytochrom-Biosynthese (ORF 2419, *hemH*) (Bott & Niebisch, in press) und ein putatives Lipocalin (ORF 1127). Auch die über FAD Protonen-übertragende Succinat-Dehydrogenase (ORFs 830-833) (Molenaar *et al.*, 2000) sowie das *cydABCD*-Operon (im Cluster nicht gezeigt) zeigen Regulation in Abhängigkeit von hoher Lysinproduktion. Die *cydAB*-Gene hatten auch erhöhte relative mRNA-Spiegel in den Vergleichen KK25 zu KK25 Δ *leuA* bzw. MH20-22B zu MH20-22B Δ *leuA* im jeweils mehr Lysin produzierenden Stamm. Die Expression dieser Gene ist also abhängig von der Lysinkonzentration bzw. einer hohen Lysinproduktion. Daneben lassen sich aber auch Gene identifizieren, deren Regulation zwar ebenfalls abhängig ist von der Lysinkonzentration, jedoch nur im Produktionsstamm. In diesem scheint die verstärkte Lysinproduktion zu Redoxstress zu führen, wie die erhöhte Expression der Gene für OxyR und die Katalase zeigt. Transkription von *oxyR* wird in *E. coli* und anderen Bakterien durch Sauerstoffradikale bzw. H₂O₂ induziert (Pomposiello & Demple 2001; Lengeler *et al.*, 1999), die bei den Reaktionen in der Atmungskette entstehen

(Lengeler *et al.*, 1999). OxyR wiederum induziert die Transkription des Gens der Katalase und anderer Gene, u.a. eines DNA-bindenden putatives Redoxstress-Proteins Dps in *A. tumefaciens* und *E. coli* (Ceci *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2000; Pomposiello & Demple 2001) sowie des Transkriptions-Faktors SigB, zu welchen ORF 1881 bzw. ORF 2000 homolog sind. (Die Expression für das Gen der Superoxid-Dismutase, welche Sauerstoffradikale abfängt, war unverändert.) Auch diese Gene liegen im gleichen Untercluster und zeigen, dass es aufgrund hoher Lysinbildung im Produktionsstamm zu erhöhter Atmungsketten-Aktivität kommt, welche Redoxstress auslöst.

In *E. coli* konnte ein Zusammenhang zwischen Cytochrom-d Gehalt und Eisen-Schwefel-Cluster-Gehalt festgestellt werden (McHugh *et al.*, 2003), so dass es durch die erhöhte Expression der alternativen Oxidase und evtl. anderer Eisen-Schwefel-Proteine in *C. glutamicum* MH20-22B zu verstärkter Expression von Eisen- und Schwefel-Aufnahmesystemen kommt. Die verstärkte Expression von Genen, die für solche Proteine codieren, geschieht in MH20-22B offenbar in Abhängigkeit von verstärkter Lysinproduktion.

Somit führt allein die verstärkte Biosynthese von Lysin zu einer Änderung der Regulation, insbesondere im Stamm MH20-22B, der aufgrund der Leucin-Auxotrophie und weiterer, z.T. unbekannter Mutationen mit Hilfe der deregulierten Aspartatkinase einen hohen Stofffluß zu Lysin hat (Sonntag *et al.*, 1993 & 1995). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass es in *C. glutamicum* MH20-22B zu Überflußmetabolismus kommt, der durch Leucin-Limitierung oder eine generelle Wachstumslimitierung ausgelöst wird. Dies wird durch verschiedene Befunde bestätigt: In Chemostat-Kultur erhöht sich bei Verringerung der Wachstumsrate von $0,25 \text{ h}^{-1}$ auf $0,075 \text{ h}^{-1}$ die Lysinausbeute mit *C. glutamicum* MH20-22B (trotz einsetzender Glukoselimitierung bei $D = 0,075 \text{ h}^{-1}$) (Petersen, 2000). Analog zum Befund der verringerten Expression der F_0F_1 -ATPase bei Überflußmetabolismus in *E. coli* (Polen, 2003) zeigt auch der Stamm MH20-22B verringerte Expression der ATPase-Gene (*atpABDEFGH*) in der Produktionsphase. Da bei Eintritt in die stationäre Phase/Produktionsphase noch nicht die gesamte Glukose verbraucht ist, aber mit Lysin und Trehalose (Wittmann *et al.*, 2001) bereits Metabolite ausgeschieden

werden, muss man von einem Glukose-/Fruktose-1,6-bis-Phosphat-Überschuß (Moritz, 2000) ausgehen, der zu erhöhten ATP/ADP (Moritz, 2000) und NADH/NAD⁺-Verhältnissen führt (Dominguez *et al.*, 1998). Die erhöhte Expression des *nadABC*-Operons, welches nur bei niedriger NAD⁺-und hoher ATP-Konzentration transkribiert wird (Penfound & Foster, 1999), verdeutlicht die Energiezustände in der Zelle. Hohe NADH/NAD⁺-Verhältnisse inhibieren in *C. glutamicum* ATCC 17965 die Pyruvat-Dehydrogenase, so daß es zu einer Ausscheidung von Lactat kommt (Dominguez *et al.*, 1998), in MH20-22B dagegen kann der Pyruvat-Überschuß zu Lysin verstoffwechselt werden. In *A. niger* ist eine Mutante beschrieben, welche bei Glukoseüberschuß hohe Mengen Citrat ausscheidet, da es aufgrund einer Mutation in der Atmungskette zur Limitierung von Elektronenakzeptoren kommt (Prömper *et al.*, 1993). Für *E. coli* ist beschrieben, dass eine Akkumulierung von energiereichen Verbindungen über das Chinol/Chinon-Verhältnis einen positiven Einfluss auf den Regulator ArcB hat (Georgellis *et al.*, 2001). Dieser wiederum aktiviert u.a. eine terminale Oxidase (*cydAB*) (Govantes *et al.*, 2000). (In *C. glutamicum* ist jedoch ein Zweikomponenten-System ArcAB nicht beschrieben.). Solchen alternativen Oxidasen wird in *A. niger* eine "Ventilfunktion" bei überschüssigen Redoxequivalenten zugeschrieben (Weiss *et al.*, 1991).

4.4. Überexpression identifizierter Zielgene zur Verbesserung der Lysinproduktion

Durch kombinatorische Analysen der DNA-Chip-Ergebnisse war es gelungen, aus einer hohen Zahl von differenziell exprimierten Genen potentiell Lysinproduktions-relevante Gengruppen zu identifizieren, deren Expression weitgehend unbeeinflusst von Sekundäreffekten wie Stammhintergrund und Allel-Unterschiede eines Schlüsseligens (*lysC*) oder physiologischen Unterschieden wie unterschiedlichen Lysinkonzentrationen war. Es ist jedoch nicht zwingend möglich, aus dem relativen mRNA-Spiegel eines Gen seine Expression als Ursache oder Folge eines physiologischen oder genetischen Unterschieds zweier Stämme zu bestimmen,

weshalb eine Überexpression eines potentiellen Zielgens nicht zwangsläufig zu erhöhter Lysinbildung führen muß.

Die Überexpression des Operons *hemU-hmuT-fepC* war durchgeführt worden, da es in Abhängigkeit von *lysC^{FBR}* erhöhte mRNA-Spiegel aufwies und somit möglicherweise notwendig war für die Lysinproduktion bei deregulierter Aspartatkinase. Überexpression des Operons im MH20-22B verringerte jedoch die Lysinausscheidung, so dass davon ausgegangen werden muß, dass die Expression dieser Gene Folge der Auswirkungen der deregulierten Aspartatkinase ist, und evtl. physiologische Änderungen, die zu höherem Fluß in die Lysinbiosynthese führen, kompensieren soll. Der ist Befund verwunderlich, da die DNA-Chip-Ergebnisse eines Vergleichs ATCC 13032 zu MH20-22B und weiterer Vergleiche auf einen erhöhten Eisenbedarf im MH20-22B hinweisen. Aufgrund der erhöhten Expression der alternativen Oxidase (*cydAB*) könnte auf eine Limitierung des Metabolismus durch verbrauchte Elektronenakzeptoren (s.o.) in der Atmungskette bei Glukoseüberschuß geschlossen werden. Die Überexpression des Hämintransporters würde diese Limitierung z.T. aufheben. Es ist zu vermuten, dass eine Deletion des *hemU-hmuT-fepC*-Operons diese Kompensation unterbinden und zu mehr Lysin führen würde. Allerdings ist die Konzentration von Häm oder Hämin, insbesondere aber von Eisen aufgrund des toxischen Potentials von Eisen bei gleichzeitiger Essentialität generell einer starken Kontrolle unterworfen, und mehrere Eisenaufnahmesysteme existieren in allen Organismen (Herbig & Helmann 2002). Ein Eingriff in die Eisen-Homöostase könnte also auch indirekt über eine Änderung des Wachstumsverhaltens, wie sie bei Anwesenheit des Plasmids pXJM19hem im MH20-22B beobachtet wurde, Einfluß auf die Lysinproduktion haben und somit die differentielle Expression des *hemU-hmuT-fepC*-Operons auf einem sekundären Effekt beruhen, anstatt direkt mit dem *lysC^{FBR}*-Allel verknüpft zu sein.

Für die Überexpression des *hemU-hmuT-fepC*-Operons wurde ein Plasmid verwendet, dessen Anwesenheit die Lysinproduktion aufhebt. Somit konnte der durch *hemU-hmuT-fepC*-Expression erzielte Effekt der Lysinproduktions-Verminderung nicht bei den für MH20-22B üblich hohen Lysinkonzentrationen beobachtet werden. Dennoch war der Effekt mit einer 33%igen Abnahme nach Induktion eindeutig nachweisbar.

Die Überexpression des ORF 2337, welches für einen putativen Zucker/Prolin/Citrat-Transporter mit unbekanntem Substrat codiert, war durchgeführt worden, da dieses Gen im MH20-22B in der stationären Phase erhöhte mRNA-Spiegel zeigte, im Wildtyp hingegen nicht. Somit hätte es sich hierbei um ein Gen handeln können, das für Lysinproduktion notwendig ist. Diese Annahme konnte jedoch nicht durch Überexpression verifiziert werden. Die zahlreichen Unterschiede in den Expressionsmustern von Wildtyp und MH20-22B in der stationären Phase wie auch die unterschiedlichen Wachstumsverhalten und Glukoseverbräuche zeigen, dass es große physiologische Unterschiede zwischen der Wildtyp-Kultur und MH20-22B-Kultur gibt, so dass die erhöhten mRNA-Spiegel des ORF 2337 auch durch andere, unbekannte Einflüsse, die nur in der MH20-22B-Kultur wirken, bedingt sein können.

Die Überexpression des ORF 1449 bewirkte eine signifikante Steigerung der Lysinproduktion. Hohe Lysinkonzentrationen waren während der DNA-Chip-Untersuchungen stets begleitet von Änderungen von Genen der Eisenhomöostase und der Redox-Haushaltsgene, hauptsächlich derer der Atmungskette. Da ORF 1449 eine Methyltransferase codiert, deren Funktion eine Rolle in der Coenzym-Biosynthese wie der von Vitamin B12, Sirohäm oder Häm_d spielt, ist ein Einfluß auf die Lysinproduktion aufgrund eines Eingriffs in die Biosynthese/Biogenese von Enzymen bzw. Cofaktoren der Atmungskette vorstellbar. Divergent zu ORF 1449 liegt eine putative Mannosyltransferase. In Transkriptionsrichtung befindet sich 193bp entfernt ein putativer Glycin/Betain-Transporter sowie eine putative Methionin-tRNA-Synthetase. Diese Gen-Anordnung findet sich leicht verändert nur noch im verwandten *C. diphtheriae* und lässt keinen Schluß auf die Verbindung zu erhöhter Lysinbildung zu. In zukünftigen Versuchen müsste das codierte Enzym näher charakterisiert werden, oder *knock-out* Mutanten könnten auf ihren Phänotyp hin untersucht werden.

Auch die Überexpression des putativen Operons ORFs 2478-80 hatte eine Steigerung der Lysinproduktion zur Folge. Alle drei Gene des Operons sind dem Stickstoffhaushalt zuzurechnen, ORF 2480 ist als Ammoniumtransporter Amt beschrieben (Siewe *et al.*, 1996), welcher abhängig von der internen Glutamin-, Glutaminanalog- und NH_4^+ -Konzentration exprimiert wird und Protonengradient-getrieben arbeitet (Meier-Wagner *et al.*, 2001). Damit wäre die Ammonium bzw. Stickstoffverfügbarkeit in der Zelle entscheidend für erhöhte Lysinproduktion. Aus

Flussuntersuchungen ist bekannt, dass bei Lysinproduktion vorrangig der Succinylase-Weg des verzweigten Lysin-Biosynthesewegs benutzt wird und die Stickstoffquelle ebenfalls Einfluß auf die Flussverteilung hat (Sonntag *et al.*, 1993). Gleichzeitig ist aber der Dehydrogenase-Weg essentiell für eine hohe Lysinbildung (Schrumpf *et al.*, 1991; Shaw-Reid *et al.*, 1999). Somit sind Art und Verfügbarkeit der Stickstoffquelle wichtige Faktoren der Lysinproduktion in MH20-22B. Zwar ist bekannt, dass Ammonium ein limitierender Faktor im verwendeten Medium sein kann (Eggeling, persönliche Kommunikation), jedoch spricht die Stammhintergrund-spezifische Regulation und das Fehlen differenzieller Expression in anderen Stammvergleichen mit unterschiedlicher Lysinproduktion (z.B. KK25 und KK25 Δ leuA) gegen einen rein physiologischen Effekt. In *C. glutamicum* gibt es mit AmtB noch mindestens einen weiteren Ammonium-Transporter (Meier-Wagner *et al.*, 2001). AmtB ist eine Permease (Meier-Wagner *et al.*, 2001), wohingegen Amt ein Protonen-getriebener Transporter ist (Meier-Wagner *et al.*, 2001). Nur das Gen für Amt hatte aber erhöhte mRNA-Spiegel. Kultivierungen in Medium mit unterschiedlichen Stickstoffgehalten und Stickstoffquellen könnten hier weitere Informationen liefern.

Somit konnte mit Überexpression zweier identifizierter Gene die Lysinproduktion im MH20-22B gesteigert werden. Dies zeigt, dass mit dem Ansatz der vergleichenden Chip-Analysen von unterschiedlichen Stämmen mit definierten Analogien genomischer Merkmale Gene identifiziert werden können, die im Produktionsstamm zu erhöhter Lysinproduktion führen. Das Thiamin-Operon führte wie erwartet nicht zu erhöhter Produktion, da es im Wildtyp erhöht exprimiert wurde und nur als Kontrolle getestet wurde. Daß das im Vergleich der Wachstumsphasen identifizierte Gen ORF 2337 nicht zu erhöhter Lysinproduktion führte, schließt nicht aus, dass nicht auch mit diesem Ansatz geeignete Zielgene identifiziert werden können. Insbesondere der Regulator, dessen Klonierung nicht gelang, stellt einen interessanten Kandidaten dar.

Für eine weitere Steigerung der Lysinbildung muß auch die Überexpression mehrerer Gene gleichzeitig in Betracht gezogen werden. Idealerweise könnte die Überexpression zusätzlich in einem definierten Modellstamm wie KK25 Δ leuA erfolgen. In diesem müssten jedoch zusätzlich alle für die Lysinproduktion vorteilhaften Mutationen nachvollzogen werden. So besitzt der Produktionsstamm,

unabhängig vom erhöhten Fluß in die Lysin-Biosynthese, einen höheren Fluß durch den PPW (Sonntag *et al.*, 1995; Marx, 1997; Moritz, 2000). Dennoch weisen die verringerten mRNA-Spiegel der Glukose-6-Phosphat-Isomerase und einiger Anthranilat-Biosynthesegene des Vergleichs MH20-22B zu MH20-22B Δ leuA auf eine mögliche NADPH-Limitierung hin. Der Stamm KK25 besitzt aufgrund seines Wildtyp-Stammhintergrundes vermutlich einen schwächeren Fluß durch den PPW (Moritz, 2000), worauf erhöhte relative mRNA-Spiegel des Malat-Enzyms im KK25 im Vergleich mit MH20-22B hindeuten. Da der Fluß von Malat/Oxaloacetat zu Pyruvat sowohl im Wildtyp als auch im Produzenten vernachlässigbar klein ist (Petersen, 2000), muß der Stamm KK25 mittels der durch das Malat-Enzym katalysierten Reaktion NADPH generieren (vgl. Domiguez *et al.*, 1995). Diese Problematik müsste zunächst im Stamm KK25 Δ leuA gelöst werden. Dazu eignet sich möglicherweise die Expression einer in *C. glutamicum* nicht vorkommenden Transhydrogenase, welche die potentiell hohen NADH-Gehalte zu NADPH konvertiert (Boonstra *et al.*, 1999 & 2000; Anderlund *et al.*, 1999).

5. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung globaler Genexpressions-Veränderungen bei der Lysinproduktion in *C. glutamicum* durch Nutzung der DNA-Chip-Technik. Dazu sollten die Genexpressions-Muster von Modellstämmen untersucht werden, die sich bezüglich der Lysinproduktions-Kapazität unterscheiden, und mit ihrer Hilfe neue Zielgene zur Stammverbesserung in der Lysinproduktion identifiziert werden.

1. Die DNA-Chip-Technologie konnte erfolgreich etabliert und für die genomweite Genexpressions-Analyse validiert werden. Außerdem wurde die Technologie auf den Vergleich von Genomen unter Nutzung bekannter Stamm-Unterschiede übertragen.
2. Mit dem Wildtypderivat KK25 Δ leuA wurde gezielt ein Modellstamm konstruiert, der neben der Leucin-Auxotrophie nur eine deregulierte Aspartatkinase aufweist und 85 mM Lysin ausscheidet. Damit konnte gezeigt werden, dass die Leucin-Auxotrophie notwendig für eine hohe Lysinproduktions-Kapazität ist, jedoch nicht ausreicht, um die Kapazität des durch ungerichtete Mutagenese erhaltenen Produktionsstamms MH20-22B zu erklären.
3. Für den Stamm MH20-22B konnte ein für die Lysinproduktion typisches Genexpressionsmuster identifiziert werden. Die Gene für die alternative Oxidase (*cydABCD*), für den putativen Redoxstress-Regulator OxyR, für Ferritin, für die Katalase sowie für putative Gene des Eisen- und Schwefel-Stoffwechsels zeigten erhöhte Expression.

4. *C. glutamicum* MH20-22B weist gegenüber dem Wildtyp-Stamm Genexpressions-Unterschiede auf, die entweder auf die deregulierte Aspartatkinase, auf die Leucin-Auxotrophie oder auf weitere, unbekannte Mutationen zurückzuführen sind. Durch Untersuchung verschiedener Modellstämme mit definierten Merkmalen ist es gelungen, die Expressionsunterschiede der nicht-isogenen Stämme Wildtyp und MH20-22B diesen drei Klassen zuzuordnen. Dabei wurden die Gene eines putativen Siderophor-Aufnahme-System in Anwesenheit der deregulierten Aspartatkinase stärker exprimiert, während das Operon eines putativen Mangan-Aufnahmesystems bei Leucin-Auxotrophie verringerte Expression zeigte. 17 Gene wiesen abhängig von weiteren unbekannten Mutationen differenzielle Genexpression auf.
5. Sieben der identifizierten möglichen Zielgene/Operons zur Stammverbesserung wurden in *C. glutamicum* MH20-22B überexprimiert. Die Überexpression des Gens einer Methyl-Transferase der Uroporphyrin-II-C-Methyl-Transferase-Klasse sowie eines putativen Operons mit dem Ammoniumtransporter Amt, einer putativen Ornithin-Cyclodecarboxylase und einer putativen Sarcosin-Oxidase führten zu einer etwa 45%igen Erhöhung der Lysinproduktion im Stamm MH20-22B. Damit gelang es, durch genomweite Genexpression-Analysen mit DNA-Chips neue Zielgene bzw. Operons für die Stammverbesserung der Lysinproduktion mit *C. glutamicum* zu identifizieren.

6. Literaturverzeichnis

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

Alen C, Sonenshein AL. (1999). "Bacillus subtilis aconitase is an RNA-binding protein." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(18):10412-7.

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

Andrews SC. (1998). "Iron storage in bacteria." Adv Microb Physiol. **40**: 281-351. Review.

Arner ES, Holmgren A. (2000). „Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase." Eur J Biochem.; **267**(20):6102-9. Review.

Arnold, C. N., J. McElhanon, et al. (2001). "Global analysis of Escherichia coli gene expression during the acetate-induced acid tolerance response." J Bacteriol **183**(7): 2178-86.

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

Beltzer JP, Morris SR, Kohlhaw GB. (1988). "Yeast LEU4 encodes mitochondrial and nonmitochondrial forms of alpha-isopropylmalate synthase." J Biol Chem. **5**;263(1):368-74.

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

Blank L, Green J, Guest JR. (2002). "AcnC of Escherichia coli is a 2-methylcitrate dehydratase (PrpD) that can use citrate and isocitrate as substrates." Microbiology.; **148**(Pt 1):133-46.

Boonstra B, Rathbone DA, French CE, Walker EH, Bruce NC. (2000). "Cofactor regeneration by a soluble pyridine nucleotide transhydrogenase for biological production of hydromorphone." Appl Environ Microbiol.; **66**(12):5161-6.

Boonstra B, French CE, Wainwright I, Bruce NC. (1999). "The udhA gene of Escherichia coli encodes a soluble pyridine nucleotide transhydrogenase." J Bacteriol.; **181**(3):1030-4.

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

Broer, S. and et al. (1993). "Strains of *Corynebacterium glutamicum* with different lysine productivities may have different lysine excretion systems." Appl. Env. Microbiol. **59**:316-321.

Broschard TH, Lebrun-Garcia A, Fuchs RP. (1998). "Mutagenic specificity of the food mutagen 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in *Escherichia coli* using the yeast URA3 gene as a target. Carcinogenesis.; **19**(2):305-10.

Burkovski A, Kramer R. (1995). "Functional expression of the glutamate uptake system from *Corynebacterium glutamicum* in *Escherichia coli*." FEMS Microbiol Lett.; **127**(3):263-6.

Ceci P, Ilari A, Falvo E, Chiancone E. (2003). "The Dps protein of *Agrobacterium tumefaciens* does not bind to DNA, but protects it towards oxidative cleavage. X-ray crystal structure, iron binding and hydroxyl-radical scavenging properties." J Biol Chem (in press)

Chang L, Wei LI, Audia JP, Morton RA, Schellhorn HE. (1999). "Expression of the *Escherichia coli* NRZ nitrate reductase is highly growth phase dependent and is controlled by RpoS, the alternative vegetative sigma factor. Mol Microbiol.; **34**(4):756-66.

Chee, M., R. Yang, et al. (1996). "Accessing genetic information with high-density DNA arrays." Science **274**(5287): 610-4.

Chen S, Zheng L, Dean DR, Zalkin H. (1997). "Role of NifS in maturation of glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase." J Bacteriol. ; **179**(23):7587-90.

Chen, X *et al* (2003). "Variation in gene expression patterns in human gastric cancers" Mol. Biol. Cell **10**.1091/mbc.E02-12-0833.

Chen ZY, Corey DP. (2002). "Understanding inner ear development with gene expression profiling." J Neurobiol.; **53**(2):276-85. Review.

Chlumsky LJ, Zhang L, Ramsey AJ, Jorns MS. (1993). "Preparation and properties of recombinant corynebacterial sarcosine oxidase: evidence for posttranslational modification during turnover with sarcosine." Biochemistry.; **32**(41):11132-42.

Choi SH, Baumler DJ, Kaspar CW. (2000). "Contribution of dps to acid stress tolerance and oxidative stress tolerance in *Escherichia coli* O157:H7." Appl Environ Microbiol. ; **66**(9):3911-6.

Claes WA, Puhler A, Kalinowski J. (2002). "Identification of two prpDBC gene clusters in *Corynebacterium glutamicum* and their involvement in propionate degradation via the 2-methylcitrate cycle." J Bacteriol. **184**(10):2728-39.

Coello, N. and et al. (1992). "Physiological aspects of L-lysine production: effect of nutritional limitations on a producing strain of *Corynebacterium glutamicum*." Appl. Microbiol. Biotechnol. **38**:259-262.

Cole, S.T., Eiglmeier, K., Parkhill, J., James, K.D., Thomson, N.R., Wheeler, P.R. , et al. (2001). "Massive gene decay in the leprosy bacillus." Nature **409**: 1007-1011

Crane BR, Siegel LM, Getzoff ED. (1997). "Structures of the siroheme- and Fe₄S₄-containing active center of sulfite reductase in different states of oxidation: heme activation via reduction-gated exogenous ligand exchange." Biochemistry; **36**(40):12101-19.

Cremer J, Treptow C, Eggeling L, Sahm H. (1988). "Regulation of enzymes of lysine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*." J Gen Microbiol. **134** (Pt 12):3221-9.

Cremer J, Eggeling L, Sahm H. (1991). "Control of the lysine biosynthesis sequence in *Corynebacterium glutamicum* as analyzed by overexpression of the individual corresponding genes Appl Environ Microbiol **57**: 1746-1752

Dailey HA, Dailey TA, Wu CK, Medlock AE, Wang KF, Rose JP, Wang BC. (2000). "Ferrochelatase at the millennium: structures, mechanisms and [2Fe-2S] clusters." Cell Mol Life Sci.; **57**(13-14):1909-26. Review.

de Graaf AA, Eggeling L, Sahm H. (2001). "Metabolic engineering for L-lysine production by *Corynebacterium glutamicum*." Adv Biochem Eng Biotechnol. **73**:9-29. Review.

De Risi, J., L. Penland, et al. (1996). "Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer." Nat Genet **14**(4): 457-60.

Dietrich G, Schaible UE, Diehl KD, Mollenkopf H, Wiek S, Hess J, Hagens K, Kaufmann SH, Knapp B. (2000). „Isolation of RNA from mycobacteria grown under in vitro and in vivo conditions." FEMS Microbiol Lett.; **186**(2):177-80.

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

Drazek ES, Hammack CA, Schmitt MP.(2000). „*Corynebacterium diphtheriae* genes required for acquisition of iron from haemin and haemoglobin are homologous to ABC haemin transporters." Mol Microbiol.; **36**(1):68-84.

Dunican, L. K. and Shirvnan, E. (1989). « High frequency transformation of whole cells of amino acid producing coryneform bacteria using high voltage electroporation.” Biotechnology **7**: 1067-70

Eichhorn E, van der Ploeg JR, Leisinger T. (1999). ”Characterization of a two-component alkanesulfonate monooxygenase from *Escherichia coli*.” J Biol Chem. **274**(38):26639-46.

Eikmanns, B. J., L. Eggeling, et al. (1993). “Molecular aspects of lysine, threonine, and isoleucine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*.” Antonie Van Leeuwenhoek **64**(2): 145-63.

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

Eikmanns, B. J., Thum-Schmitz, N., Eggeling, L., Lüdtke, K. and Sahm, H. (1994) „Nucleotid sequence, expression and transcriptional analysis of *gltA* gene encoding citrate synthase.” Microbiology **140**: 1817-28

Eggeling L, Oberle S, Sahm H. (1998). “Improved L-lysine yield with *Corynebacterium glutamicum*: use of *dapA* resulting in increased flux combined with growth limitation.” Appl Microbiol Biotechnol. **49**(1):24-30.

Eggeling, L. and H. Sahm (1999). “L-glutamate and L.lysine: traditional products with impetuous developments.” Appl Microbiol Biotechnol **52**: 146-153.

Eggeling, L. and H. Sahm (2001). “The cell wall barrier of *Corynebacterium glutamicum* and amino acid efflux.” J Biosc Bioengin **92**(3): 201-13.

Ellis KE, Clough B, Saldanha JW, Wilson RJ.(2001) “Nifs and Sufs in malaria. Mol Microbiol. **41**(5):973-81. Review.

Frazzon J, Fick JR, Dean DR. (2002). ”Biosynthesis of iron-sulphur clusters is a complex and highly conserved process.” Biochem Soc Trans.; **30**(4):680-5. Review.

Feinberg AP, Vogelstein B.(1983) “A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity.” Anal Biochem. **132**(1):6-13.

Gallmetzer M, Burgstaller W. (2001). „Citrate efflux in glucose-limited and glucose-sufficient chemostat culture of *Penicillium simplicissium*.” Antonie Van Leeuwenhoek; **79**(1):81-7.

Georgellis D, Kwon O, Lin EC. (2001). “Quinones as the redox signal for the *arc* two-component system of bacteria.” Science ;**292**(5525):2314-6.

Gornall A.G., Bardawill C.J., David M.M. (1949). "Determination of serum proteins by means of biuret reaction." J. Biol. Chem.; **177**: 751-766.

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

Govantes F, Orjalo AV, Gunsalus RP. (2000). "Interplay between three global regulatory proteins mediates oxygen regulation of the *Escherichia coli* cytochrome d oxidase (cydAB) operon." Mol Microbiol.; **38**(5):1061-73.

Grant, S.G.N., Jessee, J., Bloom, F.R. and Hanahan, D. (1990). "Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**: 4645-49

Gruer MJ, Guest JR. (1994). "Two genetically-distinct and differentially-regulated aconitases (AcnA and AcnB) in *Escherichia coli*." Microbiology.; **140** (Pt 10):2531-41.

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

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

Hanahan, D. (1985). "Techniques for transformation of *Escherichia coli*" pp. 109-136; in: Glover, D.M. (Ed.); DNA cloning, Vol. 1, IRL Press, Oxford

Haynes, J. A. and Britz, M. L. (1989). "Electrotransformation of *Brevibacterium lactofermentum* and *Corynebacterium glutamicum*: growth in tween 80 increases transformation frequencies." FEMS Microbiol. Lett. **61**: 329-34

Hayward RE, Derisi JL, Alfadhli S, Kaslow DC, Brown PO, Rathod PK. (2000). "Shotgun DNA microarrays and stage-specific gene expression in *Plasmodium falciparum* malaria." Mol Microbiol.; **35**(1):6-14.

Helmann JD, Wu MF, Gaballa A, Kobel PA, Morshedi MM, Fawcett P, Paddon C. (2003). "The global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to peroxide stress is coordinated by three transcription factors." J Bacteriol.; **185**(1):243-53.

Herbig A.F. & Helmann J.D. (2002). "Metal Ion Uptake and Oxidative Stress" in: *Bacillus subtilis* and its closest relatives. ASM Press, Washington D.C.

Hermann K., Somerville R., (1983). "Amino Acids. Biosynthesis and Genetic Regulation." Addison Wesley Publishing

Innis MA, Myambo KB, Gelfand DH, Brow MA. (1988). "DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA." Proc Natl Acad Sci; **85**(24):9436-40.

Ishino, S. Shimomura-Nishimuta, J. Yamaguchi, K. Shirahata, K. Araki, K. (1991). "13C NMR studies of glucose metabolism in L-glutamic acid and L-lysine fermentation by *Corynebacterium glutamicum*." J. Gen. Appl. Microbiol. **37**; 157-165

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

Jetten MS, Sinskey AJ. (1995). "Purification and properties of oxaloacetate decarboxylase from *Corynebacterium glutamicum*." Antonie Van Leeuwenhoek. 1995;**67**(2):221-7.

Job V, Marcone GL, Pilone MS, Pollegioni L. (2002). "Glycine oxidase from *Bacillus subtilis*. Characterization of a new flavoprotein." J Biol Chem.; **277**(9):6985-93.

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

Kaan T, Homuth G, Mader U, Bandow J, Schweder T. (2002). „Genome-wide transcriptional profiling of the *Bacillus subtilis* cold-shock response." Microbiology; **148** (Pt 11):3441-55.

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

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

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

Kelle R.. (1996). "Substratgeregelte Aminosäureproduktion mit *Corynebacterium glutamicum*." Dissertation Technische Hochschule Aachen

Kiefer P, Heinzle E, 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**(6):338-43.

King ND, O'Brian MR. (2001) "Evidence for direct interaction between enzyme I(Ntr) and aspartokinase to regulate bacterial oligopeptide transport." J Biol Chem. **276**(24):21311-6.

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

Kohlhaw GB. (1988). "Isopropylmalate dehydratase from yeast." Methods Enzymol. **166**:423-9

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

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

Krubasik,P., Kobayashi,M. and Sandmann,G. (2001). "Expression and functional analysis of a gene cluster involved in the synthesis of decaprenoxanthin reveals the mechanisms for C50 carotenoid formation." Eur. J. Biochem. **286** (13), 3702-3708

Kusumoto K, Sakiyama M, Sakamoto J, Noguchi S, Sone N. (2000). „Menaquinol oxidase activity and primary structure of cytochrome bd from the amino-acid fermenting bacterium *Corynebacterium glutamicum*." Arch Microbiol.; **173**(5-6):390-7.

Lange C., D. Rittmann, V. F. Wendisch, M. Bott, and H. Sahm (2003). „Global Expression Profiling and Physiological Characterization of *Corynebacterium glutamicum* Grown in the Presence of L-Valine." Appl. Env. Microb., **69**, (5): 2521–2532.

Lehninger, Nelson, Cox (2001). „Biochemie“ Springer-Verlag

Lengeler, Drews, Schlegel (1999). „Biology of the prokaryotes“ Thieme-Verlag

Leuchtenberger, W. (1996). "Amino acids - technical production and use (pp. 465-502)." Biotech. Vol.6 Products of primary metabolism.

Liebl, W., Bayerl, A., Schein, B., Stillner, U. and Schleifer, K.H. (1989). "High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells." FEMS Microbiol. Lett. **65**: 299-304

Lin JT, Stewart V. (1998). „Nitrate assimilation by bacteria." Adv Microb Physiol.; **39**:1-30, 379. Review.

Lindroth, P. and Mopper, K. (1979). "High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthalaldehyde." Anal. Chem. **51**: 1167-74

Link, A. J., Phillips, D. and Church, G. M. (1997). "Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization." J. Bacteriol. **179**: 6228-37

Ling MM, Robinson BH.(1997). "Approaches to DNA mutagenesis: an overview." Anal Biochem.;**254**(2):157-78. Review.

Lipshutz, R. J., Morris, D., Chee, M., Hubbell, E., Kozal, M. J., Shah, N., Shen, N., Yang, R. and Fodor, S. P. (1995). Using oligonucleotide probe arrays to access genetic diversity. Biotechniques **19**, 442-7.

Loos A, Glanemann C, Willis LB, O'Brien XM, Lessard PA, Gerstmeir R, Guillouet S, Sinskey AJ. (2001) "Development and validation of corynebacterium DNA microarrays." Appl Environ Microbiol. 67(5):2310-8.

Malumbres M, Mateos LM, Guerrero C, Martin JF. (1995). "Molecular cloning of the hom-thrC-thrB cluster from *Bacillus* sp. ULM1: expression of the thrC gene in *Escherichia coli* and corynebacteria, and evolutionary relationships of the threonine genes." Folia Microbiol (Praha) **40**(6): 595-606.

Marx, A. et al. (1996). "Determination of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* by nuclear magnetic resonance spectroscopy combined with metabolite balancing." Biotechnol. Bioeng. **49**:111-129.

Marx, A. (1997). "Bestimmung des Kohlenstoffflusses im Zentralstoffwechsel von *Corynebacterium glutamicum* mittels ¹³C-Isotopenanalyse." Dissertation Universität Düsseldorf

Matsushita K, Otofujii A, Iwahashi M, Toyama H, Adachi O. (2001). "NADH dehydrogenase of *Corynebacterium glutamicum*. Purification of an NADH dehydrogenase II homolog able to oxidize NADPH." FEMS Microbiol Lett. **204**(2):271-6.

Matsushita K., Yamamoto T., Toyama H, Adachi O. (1998). "NADPH Oxidase System as a Superoxide-generating Cyanide-Resistant Pathway in the Respiratory chain of *C. glutamicum*." Biosci. Biotechnology. Biochem., **62** (10):1968-1977

McHugh JP, Rodriguez-Quinones F, Abdul-Tehrani H, Svistunenko DA, Poole RK, Cooper CE, Andrews SC. (2003). "Global iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli*: A new mechanism for iron homeostasis." J Biol Chem **13**; (in press)

- Meier-Wagner J, Nolden L, Jakoby M, Siewe R, Kramer R, Burkovski A. (2001). "Multiplicity of ammonium uptake systems in *Corynebacterium glutamicum*: role of Amt and AmtB." Microbiology. **147**(Pt 1):135-43.
- Menkel, E., Thierbach, G., Eggeling, L. and Sahm, H. (1989). "Influence of increased aspartate availability on lysine formation by a recombinant strain of *Corynebacterium glutamicum* and utilization of fumarate." App. Environ. Microbiol. **55**: 684-88
- Miranda-Rios J, Navarro M, Soberon M. (2001) "A conserved RNA structure (thi box) is involved in regulation of thiamin biosynthetic gene expression in bacteria." Proc Natl Acad Sci U S A. **14**;98(17):9736-41.
- Miranda-Rios J, Morera C, Taboada H, Davalos A, Encarnacion S, Mora J, Soberon M. (1997) "Expression of thiamin biosynthetic genes (thiCOGE) and production of symbiotic terminal oxidase cbb3 in *Rhizobium etli*." J Bacteriol. **179**(22):6887-93.
- Miyajima, R., S. Otsuka, Shio I. (1968). "Regulation of aspartate family amino acid biosynthesis in *Brevibacterium flavum*. I. Inhibition by amino acids of the enzymes in threonine biosynthesis." J Biochem (Tokyo) **63**(2): 139-48.
- Miyajima R, Shio I. (1970). "Regulation of aspartate family amino acid biosynthesis in *Brevibacterium flavum*. 3. Properties of homoserine dehydrogenase." J Biochem **68**(3):311-9.
- Molenaar D, van der Rest ME, Drysch A, Yucel R. (2000). "Functions of the membrane-associated and cytoplasmic malate dehydrogenases in the citric acid cycle of *Corynebacterium glutamicum*." J Bacteriol. ;**182**(24):6884-91.
- Moritz B. (2000). "Untersuchungen zur Regulation des Pentosephosphatweges in *Corynebacterium glutamicum*." Dissertation Universität Düsseldorf
- Moritz B, Striegel K, de Graaf AA, Sahm H. (2002). "Changes of Pentose Phosphate Pathway Flux in Vivo in *Corynebacterium glutamicum* during Leucine-Limited Batch Cultivation as Determined from Intracellular Metabolite Concentration Measurements." Metab Eng.;4(4):295-305.
- Muffler A, Bettermann S, Haushalter M, Horlein A, Neveling U, Schramm M, Sorgenfrei O. (2002) "Genome-wide transcription profiling of *Corynebacterium glutamicum* after heat shock and during growth on acetate and glucose." J Biotechnol. **25**;98(2-3):255-68. Review.
- Nachin L, Loiseau L, Expert D, Barras F. (2003) "SufC: an unorthodox cytoplasmic ABC/ATPase required for [Fe-S] biogenesis under oxidative stress." EMBO J. **22**(3):427-37.
- Nakagawa,S. (2002). "Complete genomic sequence of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032" Unpublished. ACCESSION NC_003450

Nakayama K, Araki K, Kase H. (1978). "Microbial production of essential amino acid with *Corynebacterium glutamicum* mutants." Adv Exp Med Biol. **105**:649-61.

Ohnishi, J., S. Mitsuhashi, et al. (2002). "A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine-producing mutant." Appl Microbiol Biotechnol **58**(2): 217-23.

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

Patek, M., K. Krumbach, et al. (1994). "Leucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: enzyme activities, structure of leuA, and effect of leuA inactivation on lysine synthesis." Appl Environ Microbiol **60**(1): 133-40.

Patzner S.I., Hantke K. (1999). "SufS is a NifS-like protein, and SufD is necessary for stability of the 2Fe-2S FhuF protein in *Escherichia coli*." J. Bacteriol. **181**:3307-3309

Pelmenschikov V, Siegbahn PE. (2003). "Catalysis by methyl-coenzyme M reductase: a theoretical study for heterodisulfide product formation. J Biol Inorg Chem. [in press]

Penfound T, Foster JW. (1999). "NAD-dependent DNA-binding activity of the bifunctional NadR regulator of *Salmonella typhimurium*." J Bacteriol. ;**181**(2):648-55.

Peters JE, Thate TE, Craig NL. (2003). "Definition of the *Escherichia coli* MC4100 genome by use of a DNA array." J Bacteriol. **185**(6):2017-21.

Peters-Wendisch, P.G. (1996). „Anaplerotische Reaktionen in *C. glutamicum* : Untersuchungen zur Bedeutung der PEP-Carboxylase und der Pyruvat-Carboxylase im Zentralstoffwechsel und bei der Aminosäure-Produktion.“ Dissertation Universität Düsseldorf

Peters-Wendisch, P. G., B. Schiel, et al. (2001). "Pyruvate carboxylase is a major bottleneck for glutamate and lysine production by *Corynebacterium glutamicum*." J Mol Microbiol Biotechnol **3**(2): 295-300.

Petersen, S. (2000). "Untersuchungen zur *in vivo* Aktivität anaplerotischer Stoffwechselwege in *C. glutamicum* mittels ¹³C-Markierungstechnik." Dissertation, Universität Düsseldorf

Petersen, S., A. A. de Graaf, et al. (2000). "In Vivo Quantification of Parallel and Bidirectional Fluxes in the Anaplerosis of *Corynebacterium glutamicum*." J Biol Chem **275**(46): 35932-35941.

Petersen, S., C. Mack, et al. (2001). "Metabolic Consequences of Altered PhosphoenolpyruvateCarboxykinase Activity in *Corynebacterium glutamicum* Reveal Anaplerotic Regulation Mechanisms in Vivo." Metab Eng **3**(4): 344-361.

Polen T. (2003). „Genomweite Genexpressionsanalysen mit DNA-Chips zur Charakterisierung des Glucose-Überflußmetabolismus von *Escherichia coli*.“ Dissertation, Universität Düsseldorf

Polen T, Rittmann D, Wendisch VF, Sahm H. (2003). „DNA Microarray Analyses of the Long-Term Adaptive Response of *Escherichia coli* to Acetate and Propionate.” Appl Environ Microbiol.; **69**(3):1759-74.

Pomposiello PJ, Demple B. (2001). “Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors.” Trends Biotechnol. **19**(3):109-14. Review.

Poole RK, Hatch L, Cleeter MW, Gibson F, Cox GB, Wu G. (1993). “Cytochrome bd biosynthesis in *Escherichia coli*: the sequences of the *cydC* and *cydD* genes suggest that they encode the components of an ABC membrane transporter. Mol Microbiol.; **10**(2):421-30.

Pott AS, Dahl C. (1998). “Sirohaem sulfite reductase and other proteins encoded by genes at the *dsr* locus of *Chromatium vinosum* are involved in the oxidation of intracellular sulfur.” Microbiology.; **144** (Pt 7):1881-94.

Promper C, Schneider R, Weiss H. (1993). „The role of the proton-pumping and alternative respiratory chain NADH:ubiquinone oxidoreductases in overflow catabolism of *Aspergillus niger*.“ Eur J Biochem.; **216**(1):223-30.

Que Q, Helmann JD. (2000). “Manganese homeostasis in *Bacillus subtilis* is regulated by MntR, a bifunctional regulator related to the diphtheria toxin repressor family of proteins.” Mol Microbiol.; **35**(6):1454-68.

Qian H, Fan W, Wu J, Zheng Z. (1994). “Plasmid transfer from *Escherichia coli* to coryneform bacteria by conjugation.” Chin J Biotechnol.; **10**(1):55-60.

Raux E, Leech HK, Beck R, Schubert HL, Santander PJ, Roessner CA, Scott AI, Martens JH, Jahn D, Thermes C, Rambach A, Warren MJ. (2003). “Identification and functional analysis of enzymes required for precorrin-2 dehydrogenation and metal ion insertion in the biosynthesis of sirohaem and cobalamin in *Bacillus megaterium*.“ Biochem J.; **370**(Pt 2):505-16.

Raux E, Schubert HL, Warren MJ. (2000). “Biosynthesis of cobalamin (vitamin B12): a bacterial conundrum.” Cell Mol Life Sci.; **57**(13-14):1880-93. Review.

Reinscheid, D. J., B. J. Eikmanns, et al. (1994). “Malate synthase from *Corynebacterium glutamicum*: sequence analysis of the gene and biochemical characterization of the enzyme.” Microbiology **140**(Pt 11): 3099-108.

Rest van der, M. E., Lange, C. und Molenaar, D. (1999). “A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* xenogenic plasmid DNA.” Appl. Microbiol. Biotechnol. **52**: 541-5

Rhodium V, Van Dyk TK, Gross C, LaRossa RA. (2002) "Impact of genomic technologies on studies of bacterial gene expression." Annu Rev Microbiol. **56**:599-624. Review.

Richaud F, Phuc NH, Cassan M, Patte JC. (1980). "Regulation of aspartokinase III synthesis in *Escherichia coli*: isolation of mutants containing *lysC-lac* fusions." J Bacteriol. **143**(1):513-5.

Riedel C, Rittmann D, Dangel P, Mockel B, Petersen S, Sahm H, Eikmanns BJ (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**(4):573-83.

Robin C, Blanche F, Cauchois L, Cameron B, Couder M, Crouzet J. (1991). "Primary structure, expression in *Escherichia coli*, and properties of S-adenosyl-L-methionine:uroporphyrinogen III methyltransferase from *Bacillus megaterium*." J Bacteriol.; **173**(15):4893-6.

Rollin, C. and et al. (1995). "13C-NMR studies of *Corynebacterium melassecola* metabolic pathways." Eur. J. Biochem. **227**:488-493.

Rossol, I. and A. Pühler (1992). "The *Corynebacterium glutamicum aecD* gene encodes a C-S lyase with alpha,beta-elimination activity that degrades aminoethylcysteine." J. Bacteriol. **174**:2968-2977.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a Laboratory manual, 2nd ed.. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Schäfer, A., Kalinowski, J., Simon, R., Seep-Feldhaus, A. H. and Pühler, A. (1990). "High-frequency conjugal plasmid transfer from gram-negative *Escherichia coli* to various gram-positive coryneform bacteria." J. Bacteriol. **172**: 1663-66

Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. and Pühler, A. (1994). "Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*." Gene **145**: 69-73

Schena, M., Shalon, D., Heller, R., Chai, A., Brown, P. O. and Davis, R. W (1998). "Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics [see comments]." Trends Biotechnol **16**(7): 301-6.

Schena, M., D. Shalon, Davis, R. W. and Brown, P. O. (1996). "Parallel human genome analysis: Microarray-based expression monitoring of 1000 genes." PNAS USA **93**: 10614-9.

Schmitt MP, Drazek ES. (2001). "Construction and consequences of directed mutations affecting the hemin receptor in pathogenic *Corynebacterium* species." J Bacteriol.; **183**(4):1476-81.

Schneider D., Bruton C.J., Chater K.F.(2000). "Duplicated gene clusters suggest an interplay of glycogen and trehalose metabolism during sequential stages of aerial mycelium development in *Streptomyces coelicolor* A3(2)." Mol. Gen. Genet. **263**:543-553

Schrumpf, B., A. Schwarzer, Kalinowski J, Puhler A., Eggeling, L. and H. Sahm. (1991). "A functionally split pathway for lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*." J Bacteriol **173**(14): 4510-6.

Schrumpf, B. , Eggeling, L. and H. Sahm (1992). "Isolation and prominent characteristics of an L-lysine hyperproducing strain of *Corynebacterium glutamicum*." Appl. Microbiol. Biotechnol. **37**:566-571.

Sekine H, Shimada T, Hayashi C, Ishiguro A, Tomita F, Yokota A. (2001). "H⁺-ATPase defect in *Corynebacterium glutamicum* abolishes glutamic acid production with enhancement of glucose consumption rate." Appl Microbiol Biotechnol.; **57**(4):534-40.

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

Shaw-Reid CA, McCormick MM, Sinskey AJ, Stephanopoulos G. (1999). "Flux through the tetrahydrodipicolinate succinylase pathway is dispensable for L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum*." Appl. Microbiol. Biotechnol. **51**(3):325-33.

Sierra LM, Tosal L, Nivard MJ, Comendador MA, Vogel EW. (2001). "The importance of distinct metabolites of N-nitrosodiethylamine for its in vivo mutagenic specificity." Mutat Res.; **483**(1-2):95-104.

Siewe RM, Weil B, Burkovski A, Eikmanns BJ, Eikmanns M, Kramer R. (1996). "Functional and genetic characterization of the (methyl)ammonium uptake carrier of *Corynebacterium glutamicum*." J Biol Chem.; **271**(10):5398-403.

Simon LD, Randolph B, Irwin N, Binkowski G. (1983). "Stabilization of proteins by a bacteriophage T4 gene cloned in *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A. **80**(7):2059-62.

Sokal, R. R. & Michener, C. D. (1958) „A statistical method evaluating systematic relationships“ Univ. Kans. Sci. Bull., **38**; 1409-1438

Sonenshein , Abraham L. (Hrsg.) (2002). "Bacillus subtilis and its closest relatives : from genes to cells" Washington, D.C. : ASM Press

Sonntag, K. Schwinde, J. de Graaf, A.A *et al.* (1995). „¹³C NMR studies of the fluxes in the central metabolism of *C. glutamicum* during growth and overproduction of amino acids in batch cultures.” Appl. Microbiol. Biotechnology; **44**, 489-495

Sonntag, K., L. Eggeling, et al. (1993). “Flux partitioning in the split pathway of lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. Quantification by ¹³C- and ¹H-NMR spectroscopy.” Eur J Biochem **213**(3): 1325-31.

Stalon V, Vander Wauven C, Momin P, Legrain C.(1987). “Catabolism of arginine, citrulline and ornithine by *Pseudomonas* and related bacteria.” J Gen Microbiol.; **133** (Pt 9):2487-95.

Student (Gosset, W. S.) (1908) “The probable error of a mean.” Biometrika, **6**, 1-25

Takahashi, Y. & Nakamura, M. (1999). “Functional assignment of the ORF2-iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx-ORF3 gene cluster involved in the assembly of Fe-S clusters in *Escherichia coli*.” J Biochem **126**: 917-926

Talon R, Walter D, Chartier S, Barriere C, Montel MC. (1999). “Effect of nitrate and incubation conditions on the production of catalase and nitrate reductase by staphylococci.” Int J Food Microbiol.; **52**(1-2):47-56.

Tang Y, Guest JR. (1999) “Direct evidence for mRNA binding and post-transcriptional regulation by *Escherichia coli* aconitases.” Microbiology. **145** (Pt 11):3069-79.

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, 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**(1):25-38.

Thierbach, G., J. Kalinowski, et al. (1990). “Cloning of a DNA fragment from *Corynebacterium glutamicum* conferring aminoethyl cysteine resistance and feedback resistance to aspartokinase.” Appl Microbiol Biotechnol **32**(4): 443-8.

van der Ploeg JR, Barone M, Leisinger T.(2001). „Expression of the *Bacillus subtilis* sulphonate-sulphur utilization genes is regulated at the levels of transcription initiation and termination.” Mol Microbiol.; **39**(5):1356-65.

Vanoni MA, Curti B. (1999) “Glutamate synthase: a complex iron-sulfur flavoprotein.” Cell Mol Life Sci. **55**(4):617-38. Review.

Vikhanskii IuD. (1978). “Formation of B12 auxotrophs among spontaneous streptomycin-resistant mutants of *Corynebacterium glutamicum*” Genetika.; **14**(12):2209-11.

- Verheul, A., A. Hagting, M. R. Amezaga, I. R. Booth, F. M. Rombouts, and T. Abee. (1995). "A di- and tripeptide transport system can supply *Listeria monocytogenes* Scott A with amino acids essential for growth." Appl. Environ. Microbiol. **61**:226-233
- Vrljic, M., W. Kronemeyer, et al. (1995). "Unbalance of L-lysine flux in *Corynebacterium glutamicum* and its use for the isolation of excretion-defective mutants." J Bacteriol **177**(14): 4021-7.
- Vrljic, M., H. Sahm, et al. (1996). "A new type of transporter with a new type of cellular function: L-lysine export from *Corynebacterium glutamicum*." Mol Microbiol **22**(5): 815-26.
- Wada M, Awano N, Haisa K, Takagi H, Nakamori S. (2002). „Purification, characterization and identification of cysteine desulhydrase of *Corynebacterium glutamicum*, and its relationship to cysteine production." FEMS Microbiol Lett. **19**;217(1):103-7.
- Walshaw DL, Wilkinson A, Mundy M, Smith M, Poole PS. (1997). "Regulation of the TCA cycle and the general amino acid permease by overflow metabolism in *Rhizobium leguminosarum*." Microbiology.; **143** (Pt 7):2209-21.
- Wang P, Lee JW, Yu Y, Turner K, Zou Y, Jackson-Cook CK, Povirk LF. (2002). "Gene rearrangements induced by the DNA double-strand cleaving agent neocarzinostatin: conservative non-homologous reciprocal exchanges in an otherwise stable genome." Nucleic Acids Res. ;**30**(12):2639-46.
- Warren MJ, Roessner CA, Santander PJ, Scott AI. (1990). "The *Escherichia coli* cysG gene encodes S-adenosylmethionine-dependent uroporphyrinogen III methylase." Biochem J.; **265**(3):725-9
- Wendisch, V. F., M. Spies, et al. (1997). "Regulation of acetate metabolism in *Corynebacterium glutamicum*: transcriptional control of the isocitrate lyase and malate synthase genes." Arch Microbiol **168**(4): 262-9.
- Weiss H, Friedrich T, Hofhaus G, Preis D. (1991). „The respiratory-chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondria." Eur J Biochem.; **197**(3):563-76. Review.
- Wessendorf S, Schwaenen C, Kohlhammer H, Kienle D, Wrobel G, Barth TF, Nessling M, Moller P, Dohner H, Lichter P, Bentz M. (2003). "Hidden gene amplifications in aggressive B-cell non-Hodgkin lymphomas detected by microarray-based comparative genomic hybridization." Oncogene.; **22**(9):1425-9.
- White, R. L. & Spencer, I. D. (1996); in "Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology"; Editors. Neidhardt, F. C., Curtiss III, R., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M. & Umberger, H. E. Am. Soc. Microbiol., Washington, DC, **Vol. 1**, 2nd Ed., pp. 680–686.

Wilson M, DeRisi J, Kristensen HH, Imboden P, Rane S, Brown PO, Schoolnik GK. (1999). „Exploring drug-induced alterations in gene expression in *Mycobacterium tuberculosis* by microarray hybridization.” Proc Natl Acad Sci USA.; **96** (22):12833-8.

Wittmann C, Heinzle E. (2001). „Modeling and experimental design for metabolic flux analysis of lysine-producing *Corynebacteria* by mass spectrometry.” Metab Eng.; **3**(2):173-91.

Wodicka L, Dong H, Mittmann M, Ho MH, Lockhart DJ. (1997). “Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*.” Nat Biotechnol. (13):1359-67.

Wolf, H., Pühler, A. and Neumann, E. (1989). ”Electrotransformation of intact and osmotically sensitive cells of *Corynebacterium glutamicum*.” Appl. Microbiol. Biotechnol. **30**: 283-289

Wong DK, Lee BY, Horwitz MA, Gibson BW.(1999). “Identification of fur, aconitase, and other proteins expressed by *Mycobacterium tuberculosis* under conditions of low and high concentrations of iron by combined two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. Infect Immun.; **67**(1):327-36.

Woodcock SC, Warren MJ. (1996). “Evidence for a covalent intermediate in the S-adenosyl-L-methionine-dependent transmethylation reaction catalysed by sirohaem synthase.” Biochem J.; **313** (Pt 2):415-21

Yumoto I I, Iwata H, Sawabe T, Ueno K, Ichise N, Matsuyama H, Okuyama H, Kawasaki K. (1999). “Characterization of a facultatively psychrophilic bacterium, *Vibrio rumoiensis* sp. nov., that exhibits high catalase activity.” Appl Environ Microbiol.; **65**(1):67-72.

Zimmer, D. P., Soupene, E., Lee, H. L., Wendisch, V. F., Khodursky, A. B., Peter, B. J., Bender, R. A. and Kustu, S. (2000). ”Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: Scavenging as a defense against nitrogen limitation. ” Proc Natl Acad Sci U S A **97**, 14674-14679

7. Anhang

Tabelle 15: Oligonukleotidsequenzen, die zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten benutzt wurden.

Primer	Oligonukleotid 5' → 3'	Verwendung
georg1(down_ex)	GCG TGA TCT TGT GAT TCC GAA G	Deletion von <i>leuA</i>
georg2(down_int)	CCC ATC CAC TAA ACT TAA ACA GGA CGT CAA CCA CGA GGC AGT	
georg3(up_int)	TGT TTA AGT TTA GTG GAT GGG AGT CAT GTG GTG AAG CAT ACA AC	
georg4(up_ex)	GC TCT AGA GAC AAA GCC CTC ATC CTT GGT C	
geo_hmuT_frwd	GC TCT AGA AAG GAG A TTT CTC ATG CTT CTT TCC G	Überexpression der Gene 2533-2535 (<i>hemU, hmuT, fepC</i>)
geo_hmuT_rev	CG GAA TTC AA CAA AAC TCC TAG TGA C	
1449 frw	GC TCTAG AAGGAGATTCTCC ATG CAT GTT GCT GAA TTA TC	Überexpression des Gens 1449
1449neu rev	cg GGATC CGAT TAA TTT TCC CTG GCA G	
2435 frw	AACTGCAGAAGGAGATTCTCCGTGAAAAC ATCCCCTTTGAGC	Überexpression des Gens 2434,2435
2435 rev	CGGGATCCTTAAGGTTTCAGCCCCTCAAG	
2451/52c frw	ACGC GTCGAC AAGGAGAAGGGCA ATG AGC ACT CTT GAA ATC CG	Überexpression der Gene 2451, 2452
2451/52c rev	GC TCTAGA TCA ACT CCA AAG AAT TGC TTG G	
2478/79/80c frw	AC GC GTCGAC AAGGAGAAGGGC C ATG GAC CCC TCA GAT CTA G	Überexpression der Gene 2478-2480
2478/79/80c rev	ACGC GTCGA CAC CGA GGG CAC ATC GGT G	
2458/60 frw	GC TCTAG AAGGAGAAGGGCA GTG AAC AAC GTG GTA AAA AG	Überexpression der Gene 2458-2460
2458/60 rev	CG GGATC CTA GCG GCT CGC AGA GAA G	
2149/50/51/52 frw	GC TCTAG AAGGAGATTCTC C GTG TTT GAA AAT CGT TTT G	Überexpression der Gene 2149-2152 (<i>thi</i>)
2149/50/51/52 rev	GC TCTAGA CCC CAC CGG GAA GAT TCA C	
3577c_(shiA) frw	GC TCTAG AAGGAGATT CTC GTG ACC ACA ACT GAT CAC	Überexpression des Gens 3577
3577c_(shiA) rev	CG GGATCC TAG ACC TCT CGG AGG TCG TGG	

Tabelle 16: Gene mit veränderter Expression (relativem mRNA-Spiegel) bei Hybridisierung von aus ATCC 13032 in unterschiedlichen Wachstums-Phasen isolierter RNA. Aufgelistet sind die durchschnittlichen Werte von Genen, die mindestens 2-fach ($p < 0,05$ mit * markiert) veränderte Expression zeigten. Die Annotation entspricht der NCBI-Annotation. Bei bekannten Genen wurde deren Kürzel in Klammern angegeben. Bei kryptischen oder unbekannten Genen wurden Homologievergleiche aus Datenbank-Recherchen (ERGO) zu Hilfe genommen.

stat. Phase: stationäre Wachstumsphase

exp. Phase: exponentielle Wachstumsphase

ORF	NCgl-Nummer	Wildtyp relativer mRNA- Spiegel stat. Phase / exp. Phase	Protein / Funktion (NCBI)
228	2741	2,27	hypothetical protein Rv0048c
242	2753	2,59	conserved hypothetical protein
313	2817	3,59	L-lactate dehydrogenase
390	2870	2,16	hypothetical protein
398	2876	2,08	L-arabinose transport permease araE
399	2877	4,99	* hypothetical protein b3071
575	182	4,48	* glutamine 2-oxoglutarate aminotransferase small subunit gltD
671	251	2,39	questionable ORF
678	256	2,54	hypothetical protein
748	308	3,43	* hypothetical protein uu033
749		2,06	hypothetical protein
830	359	4,68	* succinate dehydrogenase C or D sdhCD
831	360	3,65	* succinate dehydrogenase A sdhA
832	361	4,25	succinate dehydrogenase B sdhB
833	362	2,41	* questionable ORF
842	369	2,39	* multidrug-efflux transporter SC9C7.19
971	465	2,60	copper-transporting ATPase copB
1059	549	2,23	putative membrane protein
1202	662	2,95	* cobW protein
1203	663	9,21	* thioredoxin reductase
1516	909	2,48	* nodulation related ABC transporter, ATP-binding protein
1517	910	2,22	* hypothetical 28.3K protein
1519	912	2,26	two-component transcription regulator uhpa
1565	949	2,00	hypothetical protein u1740e
1567	950	5,56	* 2-dehydro-3-deoxyphosphoheptonate aldolase aro
1568	951	3,45	undecaprenyl diphosphate synthase upps
1569	952	2,36	hypothetical protein
1602	982	2,33	* lytB protein
1631	1011	2,25	* hypothetical protein Rv0959
1632	1012	2,87	* magnesium-protoporphyrin chelatase bchl
1640	1018	2,03	* phnA protein
1643	1020	2,52	* biocyclomycin resistance protein bcr
1645	1022	2,55	cysteine desulphurase
1646	1023	3,14	* nicotinate-nucleotide pyrophosphatase nadC

ORF	NCgl- Nummer	Wildtyp relativer mRNA- Spiegel stat. Phase / exp. Phase	Protein / Funktion (NCBI)
1647	1024	4,92	* quinolate synthase A nadA
1711	1083	3,44	hypothetical protein
1718	1090	2,23	* hypothetical protein
1751	1114	3,31	* putative integral membrane protein scf42.06c
1757	1120	2,72	hypothetical protein Rv1278
1766	1127	2,98	electron transport regulator A etrA- Shewanella putrefaciens
1784	1140	2,65	* nitrate reductase delta chain narJ
1785	1141	7,17	nitrate reductase beta chain narH
1786	1142	4,60	nitrate reductase alpha chain narG
1787	1143	5,21	nitrite extrusion protein narK2
1788	1143	7,48	nitrite extrusion protein narK
1818	1170	2,57	lactoylglutathione lyase
1831	1180	2,06	hypothetical protein Rv3040c
1881	2897	2,26	* DNA protection during starvation protein
1925	2936	2,09	hypothetical protein Rv1217c
1927	2936	2,47	* hypothetical protein Rv1217c
1961	1815	2,04	* PS1 protein
1972	1823	3,02	hypothetical protein Rv2674
2006	1848	2,29	* hypothetical protein Rv2714
2038	1874	2,77	* methylthioadenine synthetase
2164	1974	2,36	* hypothetical protein rimM
2224	2019	2,48	imidazoleglycerol-phosphate dehydratase hisBd
2225	2020	2,06	histidinol-phosphate transaminase hisC
2226	2021	2,62	histidinol dehydrogenase hisD
2261	2052	2,29	* zinc/cadmium cation efflux system protein MTH1893
2262	2053	2,23	* dehydrogenase / general stress protein 39 ydaD
2332	2109	3,16	* probable cytochrome B cytB
2333	2110	2,86	* rieske iron-sulfur protein rpt
2334	2111	2,59	probable diheme cytochrome-c qcrC
2335	2112	2,20	* cytochrome-c oxidase subunit III ctaE
2377	1445	2,44	bicyclomycin resistance protein
2425	1482	19,89	* aconitase acn
2427	1484	3,12	* GMP synthase guaA
2534	1565	2,45	* hmuT protein

ORF	NCgl- Nummer	Wildtyp relativer mRNA- Spiegel stat. Phase / exp. Phase	Protein / Funktion (NCBI)
2578	1383	2,52	* 2-hydroxy-6-oxohepta-2,4-dienoate hydrolase homolog
2579	1382	2,21	* conserved hypothetical protein
2583	1379	2,27	putative integral membrane protein
2617	1352	2,28	tyrosine--tRNA ligase tyrS
2646	1326	2,09	50S ribosomal protein L20
2754		6,50	* hypothetical protein
2807	2541	2,62	* hydrophobic membrane protein ZurM
2808	2540	2,58	ABC transporter, ATP-binding protein homolog
2809	2539	3,17	* hypothetical protein Rv2059
2871	2486	3,39	phosphate-binding protein S-3 precursor pstS3
2873	2485	2,25	phosphate transport system permease protein pstC2
2885	2478	2,13	frenolicin biosynthetic protein frmE
3243	2128	2,48	* lipoic acid synthetase lipA
3245	2127	2,42	lipoprotein-ligase B lipB
3307	13	2,86	* hypothetical protein Rv0007
3308	14	20,25	hypothetical 36.9 kD protein
3317	1963	2,07	hypothetical protein SC6E10.02
195	2715	0,11	* sulfate adenylyltransferase, large chain
197	2717	0,35	3-phosphoadenosine 5-phosphosulfate reductase cysH
198	2718	0,06	* putative nitrite reductase
203	2722	0,49	phnB protein
412	42	0,36	penicillin-binding protein (pcbR)
458	77	0,42	* hypothetical protein
489	101	0,33	hippurate hydrolase hipO
517	123	0,15	* hypothetical protein
518	123	0,25	hypothetical protein
522	127	0,39	* hypothetical protein
534	138	0,30	* hypothetical protein
561	160	0,43	* mocC protein
562	161	0,48	myo-inositol 2-dehydrogenase iolG
591	193	0,30	* probable proton/oligopeptide symporter yjdL
592	194	0,44	hypothetical protein Rv1864c
780	329	0,48	* iron(III) dicitrate transport system permease protein fecB

ORF	NCgl- Nummer	Wildtyp relativer mRNA- Spiegel stat. Phase / exp. Phase	Protein / Funktion (NCBI)
818		0,45	hypothetical protein
828	358	0,46	* probable transcription regulator Rv0465c
853		0,45	questionable ORF
854	377	0,17	* hypothetical protein SCC75A.17c
856	379	0,45	heme uptake ABC-type transporter permease hmuU
857	380	0,23	ATP-binding protein of haemin ABC-transport system hmuV
870	391	0,37	* phosphate response regulator histidine kinase phoR
976	468	0,45	50s ribosomal protein L10
1120	596	0,43	* hypothetical protein
1121	597	0,27	* phytoene dehydrogenase carB
1123	598	0,47	* phytoene synthase crtB
1125	600	0,39	* geranylgeranyl pyrophosphate synthase
1127	602	0,34	* outer membrane lipoprotein
1134	608	0,32	ABC-type transporter, permease component
1135	609	0,47	ABC-type transporter, ATPase component
1136	610	0,10	* ABC-type transporter, periplasmic component
1147	619		probable rRNA methylase
1153	624	0,35	* homoserine O-acetyltransferase metA
1154	625	0,09	* O-acetylhomoserine sulfhydrylase metY
1156	626	0,36	carbon starvation protein A cstA
1162	630	0,48	* citrate (si)-synthase
1168	635	0,30	vibriobactin utilization protein viuB
1169	636	0,22	* iron transport ATP-binding protein irp1D
1170	637	0,08	* iron transport membrane protein irp1C
1171	638	0,26	* iron transport membrane protein irp1B
1173	639	0,04	* DtxR/iron regulated lipoprotein precursor
1208	668	0,49	* hypothetical protein Rv1129c
1223	678	0,18	* dtsR1 protein
1235	689	0,36	* glucose 1-dehydrogenase A / dehydrogenase/oxidoreductase
1236	689	0,42	questionable ORF
1245	697	0,14	* trehalose/maltose binding protein malE
1297	737	0,49	* ATP-dependent RNA helicase DEAD
1303	742	0,48	ATP-dependent DNA-helicase
1339	770	0,40	* probable small protein B

ORF	NCgl- Nummer	Wildtyp relativer mRNA- Spiegel stat. Phase / exp. Phase	Protein / Funktion (NCBI)
1346	773	0,05	* vibriobactin utilization protein viuB
1347	774	0,10	* iron(III) dicitrate transport permease
1349	776	0,07	* membrane-associated 40K protein precursor
1350	777	0,28	enterochelin uptake permease ceuB
1352	779	0,27	enterochelin uptake ATP-binding protein ceuD
1376		0,50	hypothetical protein
1381	798	0,28	putative integral membrane protein
1382	799	0,42	* putative sodium:solute symporter protein
1385	801	0,38	* hypothetical protein Rv2525c
1386	802	0,30	* fatty-acid synthase
1388	802	0,29	* fatty-acid synthase
1451	856	0,43	glycine betaine transporter betP
1546	933	0,21	* hypothetical protein
1558	943	0,09	probable transcription regulator Rv3833
1559	944	0,48	* hypothetical membrane protein Rv1072
1562	946	0,46	transcription elongation factor greA
1583	964	0,47	branched chain amino acids transporter homolog ycsG
1654	1031	0,36	benzoate transport protein benK
1655	1032	0,38	* 4-hydroxybenzoate 3-monooxygenase pobA
1658	1033	0,43	hypothetical protein ykoE
1678	1052	0,48	* hypothetical protein Rv1157c
1722	1094	0,41	* cobalamin-independent methionine synthase ATCIMS
1727		0,29	* hypothetical protein
1734	1101	0,29	ABC-type transport protein cydC
1753	1116	0,44	* Na ⁺ /proline transporter putP gene
1780	1136	0,20	* homoserine dehydrogenase hom
1809	1161		H ⁺ -transporting ATP synthase chain b atpF
1855	1200	0,26	* vibriobactin utilization protein viuB
1857	1201	0,41	putative membrane protein SCE6.24
1866	1210	0,10	ileal sodium-dependent bile acid transporter SLC10A2
1873	2893	0,45	* efflux system protein
1888	2904	0,46	malic enzyme mez
1907	2919	0,49	* 2-hydroxyhept.-2,4-diene-1,7-dioateisomerase/-dioatedecarboxyl.
1909	2921	0,49	probable transcription regulator

ORF	NCgl- Nummer	Wildtyp relativer mRNA- Spiegel stat. Phase / exp. Phase	Protein / Funktion (NCBI)
1921	2933	0,46	probable integral membrane protein
1933	2940	0,18	hypothetical protein SCI11.36c
1936	2942	0,33	NADH:flavin oxidoreductase
1992	1837	0,43	* conserved hypothetical protein DR2253
1993	1837	0,50	* questionable ORF
2041	1876	0,23	* glutamate-binding protein gluB precursor
2042	1877	0,22	* glutamate transport system permease protein gluC
2043	1878	0,42	* glutamate transport system permease protein gluD
2048	1883	0,43	* bioY protein
2092	1915	0,22	* oligopeptide-binding protein oppA
2093	1915	0,19	* oligopeptide-binding protein oppA
2094	1916	0,40	oligopeptide transport system permease protein oppB
2095	1918	0,21	* oligopeptide ABC transporter (permease) oppC
2097	1919	0,47	* proline-tRNA ligase proS
2146	1959	0,10	* iron(III) dicitrate-binding periplasmic protein fecB
2153	1966	0,47	* tex protein
2205	2001	0,31	* hypothetical protein
2255	2047	0,17	* hypothetical protein ytlA
2280	2068	0,46	* isoleucine-tRNA ligase ils1
2399	1463	0,40	hypothetical protein
2504	1541	0,47	S-adenosylmethionine synthetase
2536	1567	0,37	* ARO1 protein / shikimate -dehydrogenase
2632	1337	0,38	esterase precursor estA
2671	1305	0,45	* glucose-phosphotransf.-syst. enzyme II (glucose-permease) ptsM
2672	1305	0,46	* questionable ORF
2881	2480	0,27	* succinyl-CoA: Coenzyme A transferase cat1
2890	2473	0,16	* cysteine synthase cysK
2920	2450	0,37	* hypothetical protein APE2147
2935	2327	0,47	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit 2
2936	2328	0,46	* ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit 1
2939	2330	0,25	hypothetical protein SCD25.17
2969	2352	0,46	nickel transport system permease protein nikB
2970	2353	0,33	strimilarity to oligopeptide ABC transporter protein appA
2978	2360	0,31	cystathionine gamma-synthase metB

ORF	NCgl- Nummer	Wildtyp relativer mRNA- Spiegel stat. Phase / exp. Phase	Protein / Funktion (NCBI)
2979	2361	0,43	membrane-bound iron(III) dicitrate transport protein fecE
2998	2373	0,25	* L-arabinose transport protein araQ
2999	2374	0,30	* maltose transport protein amyD
3004	2377	0,43	* ABC-type sugar transporter ATP-binding component msik
3059	2274	0,43	gamma-glutamyl kinase proB
3061	2272	0,40	* glutamate-5-semialdehyde dehydrogenase proA
3092	2248	0,34	isocitrate lyase aceA
3191	2170	0,41	* hypothetical protein RP367
3224	2146	0,41	questionable ORF
3286	2991	0,35	* hypothetical protein Rv3921c
3287		0,44	* conserved hypothetical protein DR2150
3292	1	0,41	replication initiation protein dnaA
3303	9	0,31	probable transcriptional regulator Rv0485

Tabelle 17: Gene mit veränderter Expression (relativem mRNA-Spiegel) bei Hybridisierung von aus MH20-22B in unterschiedlichen Wachstumsphasen isolierter RNA. Aufgelistet sind die durchschnittlichen Werte von Genen, die mindestens 2-fach ($p < 0,05$ mit * markiert) veränderte Expression zeigten. Die Annotation entspricht der NCBI-Annotation. Bei bekannten Genen wurde deren Kürzel in Klammern angegeben. Bei kryptischen oder unbekannten Genen wurden Homologievergleiche aus Datenbank-Recherchen (ERGO) zu Hilfe genommen.

stat. Phase: stationäre Wachstumsphase

exp. Phase: exponentielle Wachstumsphase

ORF	NCgl- Nummer	MH20-22B relativer mRNA-Spiegel stat. Phase / exp. Phase	Protein / Funktion (NCBI)
662	245	4,82	2-isopropylmalate-synthase leuA
1866	1210	2,14	* ileal sodium-dependent bile acid transporter SLC10A2
2006	1848	2,86	hypothetical protein Rv2714
2259	2051	2,18	arginine-binding periplasmic protein lapT
2337	1411	2,09	* shikimate transport protein shiA
2736	1263	48,44	3-isopropylmalate dehydratase small chain
2754		2,44	* hypothetical protein
2772	1237	3,42	3-isopropylmalate dehydrogenase leuB
2793	1222	2,29	acetolactate synthase large chain ilvB
2809	2539	5,68	* ABC-type transporter, periplasmic component
3152	2199	2,36	probable transcription regulator of the arsR-family Rv2358
3211		2,49	questionable ORF
9	2577	0,50	hypothetical protein Rv3587c
32	2594	0,38	lysine-tRNA ligase lysS
36	2597	0,39	* hypothetical protein Rv3604c
51	2611	0,28	* hypothetical protein Rv2599
94	2635	0,45	* NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 13
96	2637	0,26	* phaF protein involved in pH adaptation
112	2650	0,43	* probable ABC-type transport system integral membrane
164	2692	0,41	hypothetical protein Rv0837c
193	2713	0,37	hypothetical protein ytnM
195	2715	0,30	* sulfate adenylyltransferase, large chain
197	2717	0,42	* 3-phosphoadenosine 5-phosphosulfate reductase cysH
198	2718	0,27	hypothetical protein
309	2813	0,50	transcription activator of glc operon glcC
458	77	0,40	* hypothetical protein
484	98	0,38	proline dehydrogenase / 1-pyrroline-5-carboxylate
517	123	0,26	* hypothetical protein
518	123	0,47	hypothetical protein
550	151	0,39	endopeptidase endothelin converting enzyme 1
588	191	0,38	* questionable ORF
609	206	0,41	* molybdopterin-converting factor 16K chain moaE
628	223	0,38	prephenate dehydrogenase tyrA
657	242	0,46	* probable cobyrinic acid synthase protein cobQ2

ORF	NCgl- Nummer	MH20-22B relativer mRNA-Spiegel stat. Phase / exp. Phase	Protein / Funktion (NCBI)
658	243	0,21	UDP-N-acetylmuramyl tripeptide synthetase related protein
666	248	0,47 *	aspartate-semialdehyde dehydrogenase asd
716	286	0,35 *	transcription factor dnrS
755	313	0,48	alcohol dehydrogenase FDH1
775	326	0,22	dTDP-4-keto-6-deoxyglc-3,5-epim. & dTDP-L-rhamn. synthase
776	327	0,35 *	dTDP-glucose-4,6-dehydratase cps19fN
777	328	0,42	NADH oxidase nox / nitroreductase
798	341	0,35	put. aminotransf. of the polysaccharide B biosynthesis wcgP
803	346	0,46 *	UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase murB
817	351	0,49 *	UDP-glucose 6-dehydrogenase ugd
820	352	0,40	putative lipid A core:surface polymer ligase waaL
862	385	0,50	hypothetical protein Rv0481c
869	390	0,37 *	phosphoglycerate mutase gpm
870	391	0,16	phosphate response regulator histidine kinase phoR
949	448	0,28	pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase
976	468	0,33	50s ribosomal protein L10
989	477	0,49 *	30S ribosomal protein S7
990	479	0,43	translation elongation factor EF-G fusa
992	493	0,38 *	ribosomal protein S3
993	494	0,40 *	ribosomal protein L16
994	495	0,36 *	ribosomal protein L29
999	499	0,39	ribosomal protein L14
1000	500	0,46	ribosomal protein L24
1022	518	0,31 *	ribosomal protein S5
1045	537	0,20	questionable ORF
1047	538	0,13 *	30s ribosomal protein S11
1048	539	0,28 *	30s ribosomal protein S4
1050	541	0,31 *	50s ribosomal protein L17
1088	572	0,45	10Kd chaperonin groES
1108	586	0,48	nitrate/nitrite response regulator protein narL
1121	597	0,46	phytoene dehydrogenase carB
1125	600	0,44	geranylgeranyl pyrophosphate synthase
1127	602	0,49	outer membrane lipoprotein / lipocalin
1136	610	0,28	ABC-type transporter, periplasmic component
1147	619	0,48	probable rRNA methylase

ORF	NCgl- Nummer	MH20-22B relativer mRNA-Spiegel stat. Phase / exp. Phase	Protein / Funktion (NCBI)
1153	624	0,47 *	homoserine O-acetyltransferase metA
1154	625	0,16	O-acetylhomoserine sulfhydrylase metY
1169	636	0,35	iron transport ATP-binding protein irp1D
1170	637	0,08	iron transport membrane protein irp1C
1173	639	0,26 *	DtxR/iron regulated lipoprotein precursor
1179	644	0,42	probable iron ABC transporter
1223	678	0,38 *	dtsR1 protein
1226	681	0,39	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase ATPase subunit
1235	689	0,46 *	glucose 1-dehydrogenase A / dehydrogenase/oxidoreductase
1245	697	0,29 *	trehalose/maltose binding protein malE
1249	700	0,33	probable RNA helicase
1251		0,50	hypothetical protein
1253	703	0,50	hypothetical protein jhp0462
1258	706	0,33	hypothetical protein H1130
1274	719	0,44	adenosylhomocysteinase
1315	754	0,48 *	pyridoxine biosynthesis enzyme
1316	755	0,38	predicted glutamine amidotransferase
1339	770	0,45	probable small protein B
1340	771	0,27	hypothetical protein b1792
1346	773	0,30 *	vibriobactin utilization protein viuB
1347	774	0,34 *	iron(III) dicitrate transport permease
1349	776	0,22 *	membr.-associat. 40K prot. precurs. / cobalamin/Fe+-sideroph.
1350	777	0,34	enterochelin uptake permease ceuB
1351	778	0,37 *	enterochelin uptake permease ceuC
1352	779	0,26	enterochelin uptake ATP-binding protein ceuD
1377	795	0,46 *	citrate synthase gltA
1382	799	0,48 *	putative sodium:solute symporter protein
1385	801	0,25	hypothetical protein Rv2525c
1388	802	0,49	fatty-acid synthase
1399	814	0,45 *	hypothetical protein Rv0870c
1400	815	0,31 *	probable alkaline phosphatase
1413	826	0,49	phosphoribosylglycinamide formyltransferase purN
1428	838	0,47	probable 50S ribosomal protein
1452	857	0,45	methionine-tRNA ligase, cytosolic
1477	878	0,41	hypothetical protein SCF1.02

ORF	NCgl- Nummer	MH20-22B relativer mRNA-Spiegel stat. Phase / exp. Phase	Protein / Funktion (NCBI)
1497	892	0,43 *	peptide chain release factor prfC
1503	898	0,48	aminoacyl-tRNA hydrolase
1505	900	0,34	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gap2
1512	905	0,35 *	phosphoribosyl pyrophosphate synthase prs1
1513	906	0,22 *	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase gcaD
1558	943	0,29 *	probable transcription regulator Rv3833
1562	946	0,47 *	transcription elongation factor greA
1564	948	0,38 *	lincomycin-production gene cluster lmbE protein
1587	967	0,39	fumarase fum
1596	976	0,46	glpX
1654	1031	0,43	benzoate transport protein benK
1658	1033	0,39 *	hypothetical protein ykoE
1667	1041	0,35 *	thioredoxin peroxidase tpx
1678	1052	0,45	hypothetical protein Rv1157c
1712	1084	0,25 *	2-oxoglutarate-dehydrogenase sucA
1727		0,19	hypothetical protein
1780	1136	0,36 *	homoserine dehydrogenase hom
1795	1149	0,47	molybdopterin biosynthesis protein moeA
1800	1152	0,47	transcription termination factor rho
1807	1159	0,20	H ⁺ -transporting ATP synthase protein 6 atpB
1808	1160	0,17	H ⁺ -transporting ATP synthase lipid-binding protein atpE
1809	1161	0,41 *	H ⁺ -transporting ATP synthase chain b atpF
1810	1162	0,25 *	H ⁺ -transporting ATP synthase delta chain atpH
1811	1163	0,15	H ⁺ -transporting ATP synthase alpha chain atpA
1812	1164	0,38	H ⁺ -transporting ATP synthase gamma chain atpG
1813	1165	0,18	H ⁺ -transporting ATP synthase beta chain atpD
1873	2893	0,26	efflux system protein
1875	2894	0,19	myo-inositol--phosphate synthase
1933	2940	0,39	hypothetical protein SC111.36c
1977	1826	0,41	hypothetical protein Rv2681
1986	1834	0,50	extragen. suppressor prot. suhB / archaeal fruct.-1,6-
1992	1837	0,37 *	conserved hypothetical protein DR2253
1993	1837	0,35	questionable ORF
2092	1915	0,21 *	oligopeptide-binding protein oppA
2093	1915	0,23 *	oligopeptide-binding protein oppA

ORF	NCgl- Nummer	MH20-22B relativer mRNA-Spiegel stat. Phase / exp. Phase	Protein / Funktion (NCBI)
2094	1916	0,24	oligopeptide transport system permease protein oppB
2095	1918	0,18 *	oligopeptide ABC transporter (permease) oppC
2096	1918	0,22	oligopeptide transport ATP-binding protein oppD
2097	1919	0,37	proline-tRNA ligase proS
2106	1926	0,44	malate-quinone oxidoreductase mqo
2146	1959	0,37 *	iron(III) dicitrate-binding periplasmic protein fecB
2152	1965	0,28	thiF protein
2205	2001	0,16	hypothetical protein
2207	2003	0,44 *	hippurate hydrolase hipO
2224	2019	0,43 *	imidazoleglycerol-phosphate dehydratase hisBd
2253	2045	0,28 *	trehalose trehalohydrolase MTHase
2255	2047	0,48	hypothetical protein ytlA
2280	2068	0,24	isoleucine-tRNA ligase ils1
2341	1413	0,40	putative integral membrane protein
2395	1460	0,30	probable lipoprotein lppL
2396	1461	0,36 *	dihydroorotate oxidase
2403	1466	0,42 *	hypothetical protein Rv2140c
2409	1470	0,38	hypothetical protein Rv1496
2415	1475	0,35 *	membrane associated protein SLP-2
2418	1478	0,35 *	hypothetical protein Rv1486c
2419	1479	0,39 *	ferrochelataase hemH
2470	1512	0,43	transketolase tkt
2471	1513	0,37	transaldolase
2472	1514	0,48	glucose-6-phosphate-1-dehydrogenase zwf2
2508	1543	0,48	hypothetical protein Rv1390
2512	1547	0,48	carbamoyl-phosphate synthase large chain
2516	1550	0,48 *	aspartate carbamoyltransferase pyrB
2520	1552	0,33	hypothetical protein Rv2216
2521	1553	0,36 *	hypothetical protein
2525	1556	0,50	transcription termination factor nusB
2536	1567	0,43 *	ARO1 protein
2546	1576	0,25	phage infection protein
2547	1577	0,33 *	ABC transporter-like protein
2549	1407	0,33 *	transcription activator tenA
2573	1386	0,45	transcription regulator scgR

ORF	NCgl- Nummer	MH20-22B relativer mRNA-Spiegel stat. Phase / exp. Phase	Protein / Funktion (NCBI)
2634	1336	0,38	phenylalanine--tRNA ligase beta chain pheT
2635	1335	0,32	* phenylalanine--tRNA ligase alpha chain pheS
2648	1324	0,47	translation initiation factor IF-3
2652	1321	0,48	* probable hydrolase
2705	1288	0,46	hypothetical protein
2725	1274	0,45	* probable methylase
2726	1273	0,45	biotin carboxyl carrier protein
2750	1251	0,31	hypothetical protein
2801		0,40	* hypothetical protein
2811	2537	0,43	trehalose-phosphatase otsB
2857	2497	0,45	palmitoyl-CoA hydrolase brain type -Rattus norvegicus
2867	2490	0,33	hypothetical protein Rv0813c
2881	2480	0,17	succinyl-CoA: Coenzyme A transferase cat1
2918	2452	0,46	* hypothetical protein
2935	2327	0,47	* ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit 2
2947	2336	0,49	hypothetical protein SC1C2.11
2976	2358	0,46	acetoacetyl-CoA reductase
2978	2360	0,26	cystathionine gamma-synthase metB
2998	2373	0,36	* L-arabinose transport protein araQ
2999	2374	0,36	maltose transport protein amyD
3025	2395	0,49	* glutaminase glsK
3061	2272	0,33	glutamate-5-semialdehyde dehydrogenase proA
3092	2248	0,37	isocitrate lyase aceA
3208	2157	0,46	hypothetical protein Rv2230c
3286	2991	0,40	* hypothetical protein Rv3921c
3317	1963	0,37	hypothetical protein SC6E10.02

Tabelle 18: Gene mit veränderter Expression (relativem mRNA-Spiegel) bei Hybridisierung von aus ATCC 13032 und MH20-22B in der stationären Phase isolierter RNA. Aufgelistet sind die durchschnittlichen Werte von Genen, die mindestens 2-fach ($p < 0,05$ mit * markiert) veränderte Expression zeigten. Die Annotation entspricht der NCBI-Annotation. Bei bekannten Genen wurde deren Kürzel in Klammern angegeben. Bei kryptischen oder unbekannten Genen wurden Homologievergleiche aus Datenbankrecherchen (ERGO) zu Hilfe genommen. Die Gene sind aufgrund der Datenfülle zunächst sortiert nach erhöhtem bzw. erniedrigtem mRNA-Spiegel, weiter wurden die Gene aufgrund ihrer bekannten Annotation in genetisch oder funktionell zusammengehörige Gruppen gegliedert, welche die Nummern 1 bis 7 nach folgendem Schlüssel erhielten.

#1: Gene des Zentralstoffwechsels

#2: Gene des Redox-Haushalts und der Energiegenerierung

#3: Transporter

#4: Regulatoren

#5: Gene ribosomaler Proteine und des Translationsapparates

#6: Gene charakterisierter Enzyme unbekannter Stoffwechselwege oder Funktion

#7: Gene, die nicht zu Gruppen 1-6 gehören aber im experimentellen Kontext für wichtig erachtet wurden
keine Nummer: unbekannte, hypothetische und schlecht charakterisierte Gene

ORF	NCgl-Nummer	relativer mRNA-Spiegel MH20-22B/ATCC13032	Protein / Funktion (NCBI)	
306	2810	0,34 *	L-lactate dehydrogenase	1
628	223	0,38 *	prephenate dehydrogenase	1
1712	1084	0,46 *	2-oxoglutarate dehydrogenases, E component (sucA)	1
1919	2931	0,45 *	tryptophan synthase beta chain	1
2150	1962	0,33 *	glycine/D-amino acid oxidases	1
2152	1965	0,12 *	dinucleotide-utilizing enzyme (thiF?)	1
2225	2020	0,12 *	histidinol-phosphate aminotransf./tyrosine aminotransferase	1
2226	2021	0,16 *	histidinol dehydrogenase	1
2425	1482	0,38 *	aconitase A	1
2859	2495	0,42 *	glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase	1
124	2658	0,5	putative ferredoxin/ferredoxin-NADP reductase	2
777	328	0,4 *	nitroreductase	2
922	427	0,39	cytochrome C assembly protein	2
1807	1159	0,24 *	FF-type ATP synthase a subunit	2
1809	1161	0,38 *	FF-type ATP synthase b subunit	2
1810	1162	0,15 *	FF-type ATP synthase delta subunit	2
1811	1163	0,2 *	FF-type ATP synthase alpha subunit	2
1812	1164	0,18 *	FF-type ATP synthase gamma subunit	2
1813	1165	0,18 *	FF-type ATP synthase beta subunit	2
1929	2938	0,39 *	NADH:flavin oxidoreductase	2
1282	726	0,49	preprotein translocase subunit SecA	3
1516	909	0,23 *	ABC-type transporter, ATPase component	3
1643	1020	0,47 *	permease of the major facilitator superfamily	3
1828	1179	0,32 *	ABC-type transporter, ATPase component	3
2583	1379	0,3 *	predicted divalent heavy-metal cations transporter	3
2826	2522	0,35	permease of the major facilitator superfamily	3
2871	2486	0,11 *	ABC-type transporter, periplasmic component	3
2873	2485	0,15 *	ABC-type transporter, permease component	3
2876	2483	0,25 *	ABC-type transporter, ATPase component	3
3271	2977	0,48	predicted branched-chain amino acid permease	3
841	368	0,49 *	transcriptional regulator	4
927	430	0,47 *	predicted arsR family transcriptional regulator	4
2573	1386	0,38 *	predicted transcriptional regulator	4
965	460	0,37 *	ribosomal protein L1	5
1044	536	0,39 *	translation initiation factor IF-1	5

ORF	NCgl- Nummer	relativer mRNA- Spiegel MH20-22B/ ATCC13032	Protein / Funktion (NCBI)		ORF	NCgl- Nummer	relativer mRNA- Spiegel MH20-22B/ ATCC13032	Protein / Funktion (NCBI)	
1048	539	0,34 *	ribosomal protein S4	5	1091	2284	0,46 *	(transposase (IS31831))	
1050	541	0,36 *	ribosomal protein L17	5	1127	602	0,41 *	lipocalin	
1070	557	0,4 *	ribosomal protein S9	5	1202	662	0,32 *	putative G3E family GTPases	
2617	1352	0,33 *	tyrosyl-tRNA synthetase	5	1315	754	0,46 *	pyridoxine biosynthesis enzyme	
2634	1336	0,44 *	phenylalanyl-tRNA synthetase beta subunit	5	1325	760	0,45 *	hypothetical protein	
2635	1335	0,45 *	phenylalanyl-tRNA synthetase alpha subunit	5	1515	908	0,45 *	putative multicopper oxidase	
3034	2293	0,4 *	valyl-tRNA synthetase	5	1565	949	0,44 *	hypothetical protein	
16	2582	0,38 *	L-.butanediol dehydrogenase	6	1569	952	0,35 *	hypothetical protein	
38	2599	0,48	7,8-dihydro-6-hydroxymethylpterin-pyrophosphokinase	6	1631	1011	0,37 *	hypothetical protein	
888	400	0,21 *	phosphoserine phosphatase	6	1649	1026	0,45 *	hypothetical protein	
1081	566	0,45 *	putative aminopeptidase	6	1711	1083	0,26 *	hypothetical protein	
1083	568	0,41 *	acetyltransferase	6	1961	1815	0,45 *	hypothetical protein	
1274	719	0,42 *	S-adenosylhomocysteine hydrolase	6	1971	1822	0,48 *	hypothetical membrane protein	
1335	766	0,49 *	archaeal fructose-, -bisphosphatase	6	1996	1839	0,49 *	hypothetical protein	
1596	976	0,24 *	put. fructose-bisphosphatase/sedoheptulose -, -bisphosphatase	6	2037	1873	0,47	hypothetical membrane protein	
1818	1170	0,5 *	lactoylglutathione lyase	6	2252	2044	0,3 *	hypothetical protein	
1875	2894	0,28 *	myo-inositol--phosphate synthase	6	2447	1496	0,42 *	(IS1628 transposase tnpB)	
2224	2019	0,15 *	imidazoleglycerol-phosphate dehydratase	6	2547	1577	0,39 *	hypothetical protein	
3035	2292	0,48	folylpolyglutamate synthase	6	2673		0,49 *	(questionable ORF)	
3188	2173	0,35 *	predicted hydrolase/acyltransferase	6	2705	1288	0,46 *	hypothetical protein	
3205	2159	0,5 *	protein-tyrosine-phosphatase	6	2830	2519	0,47 *	predicted transcriptional regulator	
242	2753	0,21 *	hypothetical protein		2930	2444	0,44 *	ribonucleotide reduction protein	
262	2769	0,42 *	putative integral membrane protein		3044	1021	0,37 *	(IS31831 transposase)	
278	2784	0,48 *	hypothetical membrane protein		3217	2150	0,48 *	hypothetical protein	
320	2822	0,34 *	hypothetical protein		3234	2135	0,46 *	hypothetical protein	
353	2849	0,4	hypothetical protein		3241	2130	0,48 *	predicted permease	
399	2877	0,17 *	hypothetical protein		3300	6	0,47 *		
543	145	0,49	lactoylglutathione lyase-like protein		3308	14	0,32 *	uncharacterized membrane protein	
609	206	0,44 *	molybdopterin converting factor, large subunit		3317	1963	0,26 *	sulfur transfer protein	
611	208	0,46 *	molybdenum cofactor biosynthesis enzyme						
716	286	0,42 *			129	2663	2,33 *	phosphoribosylglycinamide formyltransferase	1
928	431	0,35 *	hypothetical protein		484	98	2,18 *	proline dehydrogenase	1
936	439	0,44 *	transcriptional regulator		529	133	2,41 *	aspartate -decarboxylase	1
1077	562	0,41 *	hypothetical protein		661	245	3,48 *	2-isopropylmalate/homocitrate/citramalate synthase (leuA)	1
1082	567	0,38 *	conserved hypothetical protein		662	245	16,87	2-isopropylmalate/homocitrate/citramalate synthase (leuA)	1

ORF	NCgl- Nummer	relativer mRNA- Spiegel MH20-22B/ ATCC13032	Protein / Funktion (NCBI)		ORF	NCgl- Nummer	relativer mRNA- Spiegel MH20-22B/ ATCC13032	Protein / Funktion (NCBI)	
1153	624	2,84	homoserine O-acetyltransferase	1	1887	2903	5,57	sugar transporter family protein	3
1154	625	2,02	O-acetylhomoserine sulfhydrylase	1	1912	2924	5,01	putative transmembrane symporter	3
1162	630	3,45 *	citrate synthase (gltA)	1	1944	2949	4,31	dipeptide/tripeptide permease	3
1206	666	3,67 *	methyl citrate synthase	1	2041	1876	2,93	glutamate ABC-type transporter, periplasmic component	3
1888	2904	2,53	malic enzyme	1	2092	1915	16,61	ABC-type transporter, periplasmic component (oppA)	3
2204	2000	2,19	glycerate kinase	1	2093	1915	7,59	ABC-type transporter, periplasmic component (oppA)	3
2530	1561	3,08	chorismate synthase	1	2094	1916	2,31	ABC-type transporter, permease component (oppB)	3
2536	1567	4,41 *	shikimate -dehydrogenase	1	2095	1918	2,36	ABC-type transporter, permease component (oppC)	3
2629	1340	2,55 *	acetylglutamate semialdehyde dehydrogenase (argC)	1	2096	1918	2,19	ABC-type transporter, duplicated ATPase component (oppD)	3
2737	1262	9,94	-isopropylmalate dehydratase large subunit (leu)	1	2118	1936	4,95 *	ABC-type transporter, permease component	3
2748	1253	5,48	thiamine biosynthesis protein ThiC	1	2126	1943	2,39 *	ABC-type transporter, ATPase component	3
2772	1237	8,55	isocitrate/isopropylmalate dehydrogenase (leuB)	1	2337	1411	3,28 *	permease of the major facilitator superfamily	3
2790	1224	3,31 *	ketol-acid reductoisomerase (ilvC)	1	2483	1522	2,7	preprotein translocase subunit	3
2792	1223	9,52	acetolactate synthase, small subunit	1	2552	1404	2,22 *	ABC-type transporter, ATPase component	3
2881	2480	4,12 *	acetyl-CoA hydrolase	1	2720	1277	2,73	ABC-type transporter, permease component	3
2890	2473	5,23 *	cysteine synthase	1	2968	2351	13,72	ABC-type transporter, permease component	3
3025	2395	2,29 *	glutaminase	1	2969	2352	9,33	ABC-type transporter, permease component	3
3090	2249	2,49	thiamine biosynthesis protein x	1	2970	2353	10,15 *	ABC-type transporter, periplasmic component	3
3194	2167	3,57 *	pyruvate dehydrogenase, decarboxylase component (aceE)	1	2999	2374	5,13	ABC-type transporter, permease component	3
3246	2126	2,75 *	dihydrolipoamide acyltransferase (sucB)	1	3004	2377	4,68	ABC-type transporter, ATPase component	3
198	2718	3,19	putative nitrite reductase	2	3103	2240	2 *	ABC-type transporter, permease component	3
199	2718	2,45 *	putative nitrite reductase nirA	2	701	275	3,03 *	putative regulatory protein	4
531	135	2,12 *	putative ammonia monooxygenase	2	828	358	18	predicted transcriptional regulator	4
65		2,3 *	(porA)	3	894	405	4,44	transcriptional regulator	4
1135	609	3,44 *	ABC-type transporter, ATPase component	3	1208	668	4,4	predicted transcriptional regulator	4
1173	639	3,78	ABC-type transporter, periplasmic component	3	1867	1215	3,26 *	transcriptional regulator	4
1347	774	11,48	ABC-type cobalamin/Fe+-sideroph. transp. syst., peripl. comp.	3	2008	1850	6,92	transcriptional regulator	4
1350	777	3,31	ABC-type cobalamin/Fe+-sideroph. transp. syst, perm. comp.	3	2241	2034	2,68 *	predicted transcriptional regulator	4
1371	790	2,12 *	permease	3	2456	1504	2,68 *	predicted transcriptional regulator	4
1382	799	5,19 *	Na+/proline, Na+/panthothenate symporter or related perm.	3	2556	1401	2,72	transcriptional regulator	4
1451	856	2,96 *	choline-glycine betaine transporter	3	2825	2523	2,35	transcriptional regulator	4
1659	1034	2,3 *	ABC-type transporter, duplicated ATPase component	3	3303	9	2,02	hypothetical transcriptional regulator	4
1660	1034	2,23 *	(glutamate transport ATP-binding protein gluA)	3	1562	946	2,22 *	transcription elongation factor	5
1753	1116	5,12	putative Na+/proline, Na+/panthothenate symporter	3	1703	1075	2,73 *	sigma factor E sigE	5
1865	1209	3,92 *	ABC-type transport system, periplasmic component	3	1902	2915	3,75 *	leucyl-tRNA synthetase	5

ORF	NCgl- Nummer	relativer mRNA- Spiegel MH20-22B/ ATCC13032	Protein / Funktion (NCBI)		ORF	NCgl- Nummer	relativer mRNA- Spiegel MH20-22B/ ATCC13032	Protein / Funktion (NCBI)
2076	1904	2,44	pseudouridine synthase	5	577	183	2,01 *	hypothetical protein
2592	1371	2,49	S rRNA uridine- pseudouridylate synthase	5	591	193	2,29 *	hypothetical membrane protein
2832	2517	2,03 *	two-component system, sensory transduction histidine kinase	5	615	212	2,02	hypothetical protein
57	2616	8,75	rhodanese-related sulfurtransferase	6	671	251	9,38	(questionable ORF)
119	2655	2,27 *	serine/threonine protein kinase	6	814		2	(questionable ORF)
195	2715	6,56	sulfate adenylate transferase subunit	6	854	377	2,94 *	hypothetical membrane protein
478	94	3,06 *	nucleoside phosphorylase	6	860	384	2,37	hypothetical protein
1130	605	2,22 *	cell wall biogenesis glycosyltransferase	6	862	385	2,73 *	hypothetical protein
1378	796	3,23	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	6	910	415	3,87	hypothetical protein
1483	882	2,3	enoyl-CoA hydratase/carnithine racemase	6	949	448	2,19	
1648	1025	2,34 *	ADP-ribose pyrophosphatase	6	973	467	3 *	hypothetical protein
1655	1032	6,04	-polyprenyl--methoxyphenol hydroxylase	6	1027	522	2,13	hypothetical membrane protein
1662	1036	2,2	putative adenylate kinase	6	1111	589	2,68	hypothetical protein
1697	1071	4,4 *	beta-fructosidase	6	1160	628	3,44 *	hypothetical protein
1948	2951	3,31	putative hydroxyquinol/catechol ,-dioxygenase	6	1253	703	2,18 *	hypothetical protein
2298	2083	2,16 *	UDP-N-acetylmuramyl tripeptide synthase	6	1293	734	3,09 *	hypothetical protein
2336	1410	3,78	cyclopropane fatty acid synthase	6	1346	773	6,41	siderophore-interacting protein
2631	1338	2,41	predicted acyltransferase	6	1362	785	9,94	hypothetical protein
2742	1255	5,1	glucan phosphorylase	6	1380		2,43	hypothetical protein
2938	2329	3,32 *	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	6	1381	798	4,87	uncharacterized membrane protein
3061	2272	3,67	gamma-glutamyl phosphate reductase	6	1385	801	2,88 *	hypothetical protein
670	251	3,94 *	catalase	7	1388	802	5,25 *	
2000	1844	3,92 *	DNA-directed RNA polymerase sigma subunit SigB	7	1389	803	2,98 *	hypothetical protein
2671	1305	3,79 *	PTS IIC comp., gluc./maltose/N-acetylglcsamine-specif. (ptsM)	7	1410	824	2,35 *	metalloendopeptidase-like membrane protein
66		3,2 *	hypothetical protein		1411	824	2,57	(questionable ORF)
98		3	hypothetical protein		1412	825	2,04	hypothetical membrane protein
188	2708	2,03	(questionable ORF)		1433		2,91	hypothetical protein
212	2731	2,49 *	hypothetical membrane protein		1434	843	3,6 *	large-conductance mechanosensitive channel
225	2737	3,65 *	putative membrane protease subunit		1443	851	2,06 *	predicted membrane protein
272	2779	2,7 *	putative esterase		1444	852	2,08	hypothetical membrane protein
348		2,8 *	hypothetical membrane protein		1471	872	4,58	hypothetical protein
458	77	3,31 *	hypothetical protein		1527	917	2,96 *	hypothetical protein
517	123	2,49 *	hypothetical protein		1531	1496	3,68 *	(IS1628 transposase TnpB)
519	124	2,45 *	hypothetical membrane protein		1546	933	4,04	hypothetical protein
561	160	2,34	hypothetical protein		1559	944	3,23 *	hypothetical membrane protein

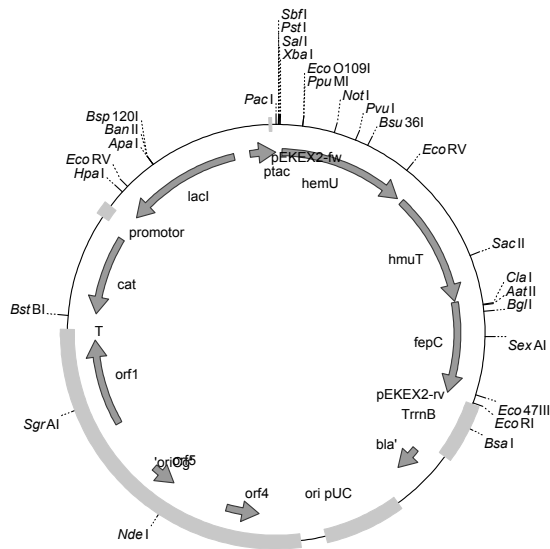
ORF	NCgl- Nummer	relativer mRNA- Spiegel MH20-22B/ ATCC13032	Protein / Funktion (NCBI)
1584	964	9	(questionable ORF)
1658	1033	4,3	hypothetical protein
1666	1040	2,16	excinuclease ATPase subunit
1668	1042	3,2	hypothetical membrane protein
1675	1049	2,44	arsenate reductase
1677	1051	3,78	hypothetical protein
1727		4,36	hypothetical protein
1728	1096	4,33 *	predicted flavoprotein involved in K ⁺ transport
1751	1114	3,17	hypothetical membrane protein
1752	1115	2,78 *	hypothetical protein
1760	1123	2,19 *	hypothetical protein
1782	1138	3,53 *	hypothetical protein
1855	1200	3 *	siderophore-interacting protein
1878	2896	2,25 *	hypothetical protein
1879	2896	2,12 *	(questionable ORF)
1881	2897	3,27 *	starvation-inducible DNA-binding protein
1921	2933	2,44 *	hypothetical protein
1954	1770	2,52	hypothetical protein
1992	1837	2,38 *	hypothetical membrane protein
2026	1863	2,11 *	hypothetical protein
2029	1866	2,32 *	hypothetical protein
2065	1894	2,13 *	hypothetical protein
2111	1929	2,05 *	hypothetical membrane protein
2115	1933	2,59	cell division protein FtsI
2124	1941	2,07 *	hypothetical membrane protein
2153	1966	2,28	predicted RNA binding protein,
2190	1988	4,23	hypothetical protein
2255	2047	12,82	hypothetical membrane protein
2257	2049	2,03 *	DNA polymerase III alpha subunit
2329	2108	9,83	cell wall-associated hydrolase
2330	2108	4,61 *	(questionable ORF)
2331		2,32 *	hypothetical protein
2338	1412	2,15	predicted phosphoribosyltransferase
2420	1480	3,11 *	cell wall-associated hydrolase
2435	1489	3,97	(questionable ORF)

ORF	NCgl- Nummer	relativer mRNA- Spiegel MH20-22B/ ATCC13032	Protein / Funktion (NCBI)
2438		2,81	(questionable ORF)
2439		2,14	hypothetical protein
2521	1553	2,25 *	hypothetical protein
2543	1573	2,09	(questionable ORF)
2544	1574	5,06	predicted metalloprotease
2545	1575	3,2	hypothetical helicase
2580	1381	2,16	hypothetical protein
2581		2,93	hypothetical protein
2587	1375	2,1 *	hypothetical protein
2588	1374	2 *	uncharacterized low-complexity protein
2614		3,14	hypothetical protein
2619	1350	2,85 *	hypothetical protein
2621	1348	2,45 *	hypothetical protein
2632	1337	3,14 *	hypothetical protein
2672	1305	2,23 *	(questionable ORF)
2713	1283	2,19 *	hypothetical protein
2722		2,12	hypothetical protein
2735		2,83	hypothetical protein
2749	1252	3,03 *	hypothetical protein
2750	1251	2,08	hypothetical protein
2784		2,43	(questionable ORF)
2787	1227	2,01	(questionable ORF)
2789		2,64	hypothetical protein
2827	2521	2,56	thiamine pyrophosphate-requiring enzyme
2895		2,55 *	hypothetical protein
2919	2451	2,99 *	hypothetical protein
2920	2450	4,71 *	hypothetical protein
2996	2372	2,18 *	hypothetical membrane protein
3002	2376	2,45 *	hypothetical protein
3045	2283	2,37 *	pirin-related protein
3058	2275	2,51 *	predicted GTPase
3086	2252	3,98 *	hypothetical protein
3191	2170	3,12	hypothetical protein
3223	2146	3,37 *	hypothetical protein
3225	2145	2,1	hypothetical protein

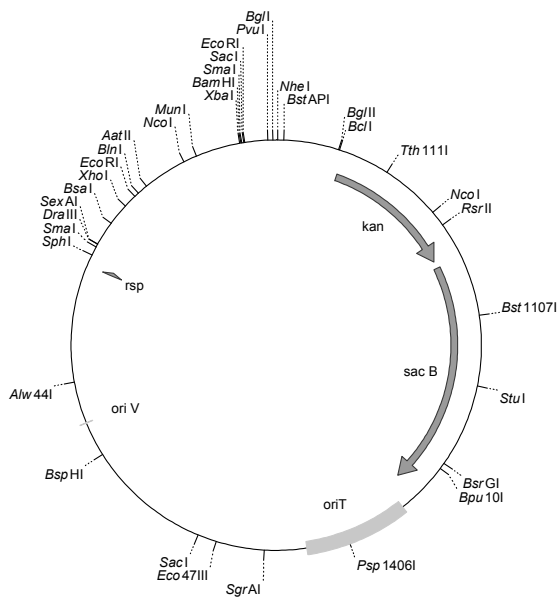
ORF	NCgl- Nummer	relativer mRNA- Spiegel MH20-22B/ ATCC13032	Protein / Funktion (NCBI)
3231	2140	2,01 *	hypothetical protein
3253	1600	2,41	acyl-CoA thioesterase
3268	1588	2,48 *	hypothetical protein
3286	2991	2,16 *	hypothetical protein

Plasmidkarten

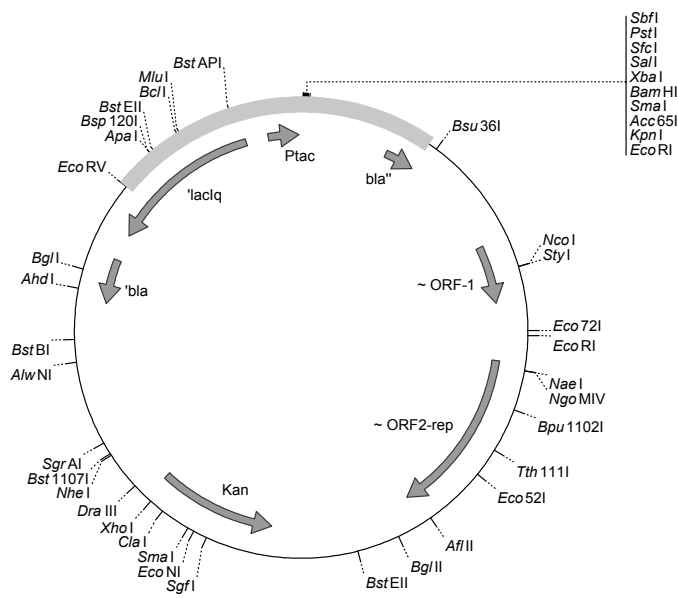
pXMJ19hem



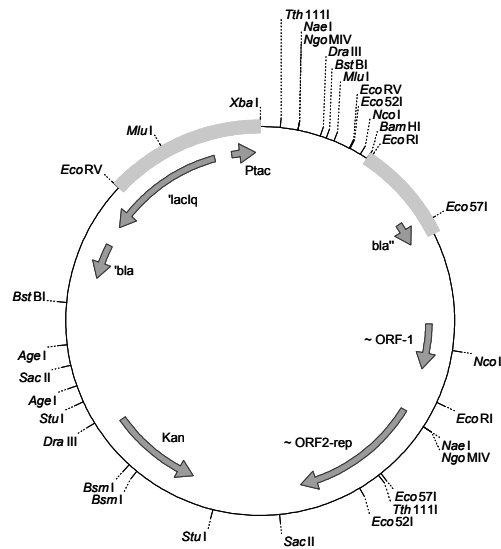
pK19mobsacBΔleuA



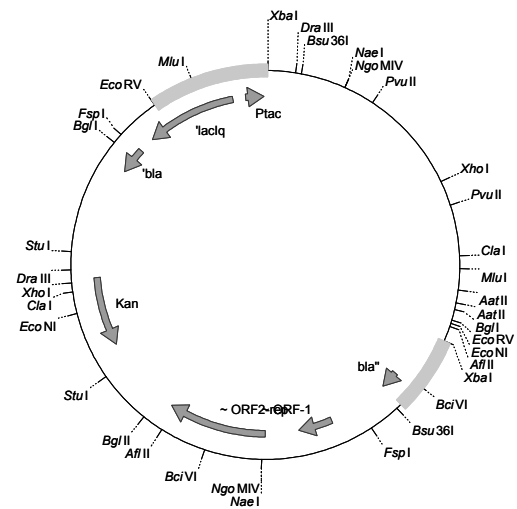
pVWEx1



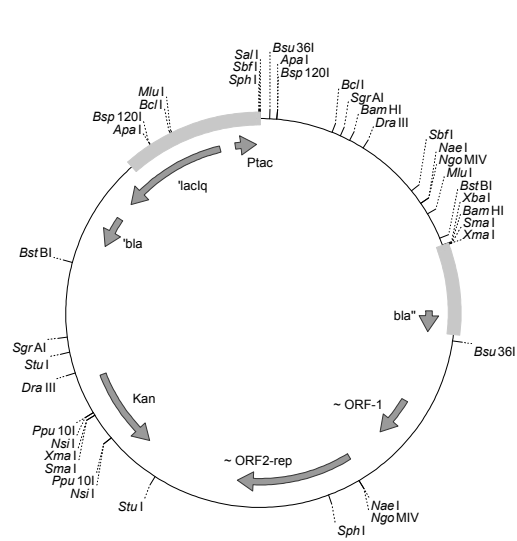
pVWEx1-1449



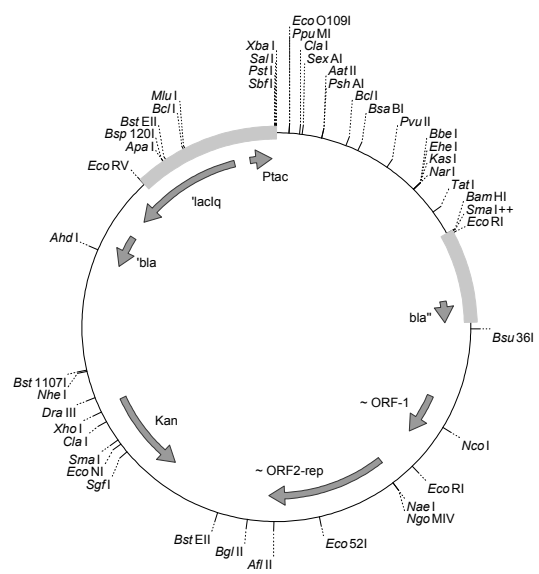
pVWEx1-2150



pVWEx1-2450



pVWEx1-2460



Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Biotechnologie 1 im Forschungszentrum Jülich angefertigt.

Bei Herrn Prof. Dr. Hermann Sahm möchte ich mich für die Überlassung des Themas, das besondere Interesse an der DNA-Chip-Technik und sein unbürokratisches Engagement zur Durchführung der Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Hegemann danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Bei Dr. Volker Wendisch bedanke ich mich besonders für die ständige Unterstützung, Diskussionsbereitschaft und Geduld.

Bei Dr. Tino Polen und Doris Rittmann möchte ich mich für die nette Arbeitsatmosphäre bedanken, bei Doris ausdrücklich für die freundliche Übernahme der Durchführung der *C. glutamicum* Genom-PCR, bei Tino besonders für die herzliche Kollegialität während unserer gemeinsamen Zeit am FZ.

Vielen Dank auch all meinen Fahrern!

Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Jül-4092
Oktober 2003
ISSN 0944-2952