



Institut für Biotechnologie 1

Untersuchungen zum Überflussmetabolismus in *Escherichia coli*

Andrea Veit

Untersuchungen zum Überflussmetabolismus in *Escherichia coli*

Andrea Veit

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 4199

ISSN 0944-2952

Institut für Biotechnologie 1 Jül-4199

D 61 (Diss., Düsseldorf, Univ., 2005)

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

Characterization of overflow metabolism in *Escherichia coli*

In biotechnology, recombinant *E. coli* strains are used for the production of fine chemicals and heterologous proteins. During aerobic growth on glucose, *E. coli* produces acetate, a phenomenon referred to as overflow metabolism. The accumulation of acetate perturbs growth and recombinant protein production. Until now the molecular cause of aerobic acetate excretion is not fully understood. Previous work has revealed gene expression changes correlating with acetate formation. Genes coding for enzymes of both the tricarboxylic acid cycle and the respiratory chain as well as genes of unknown function (i.e. *gadE*, *actP*, *yjcH* and *yjeJ*) showed differential expression. In this work the following results were obtained:

- Deregulation of the *sdhCDAB-b0725-sucABCD*-operon in *E. coli* MG1655 was achieved by chromosomal exchange of the *Psdh*-promoter with the strong and constitutive *Ptet* promoter and brought about a fourfold increase in the specific activities of both succinate dehydrogenase and succinate thiokinase. The specific activity of 2-oxoglutarate dehydrogenase was enhanced 1.7 fold.
The constructed strain excreted significantly less acetate than the wild type while maintaining high glucose uptake rates. The reduced acetate formation was not accompanied by the formation of other incomplete oxidation products. Instead the formation of carbon dioxide increased as a likely consequence of elevated TCA cycle activity which accounts for the diminished acetate overflow. So aerobic acetate formation is primarily caused by transcriptional control of the *sdhCDAB-b0725-sucABCD* operon.
- The deletion of the genes *gadE* (*yhiE*), *actP* (*yjcG*), *yjcH* or *yjeJ* in *E. coli* MG1655 did not influence aerobic acetate excretion significantly. This shows that those genes are not essential for glucose overflow metabolism.
- Another regulator of the *sdhCDAB-b0725-sucABCD*-operon in *E. coli* MG1655 could be identified by DNA-affinity chromatography: YdcI. This regulator which belongs to the lysR family was isolated from cells grown in glucose minimal medium. YdcI is supposed to take part in the regulation of aerobic acetate formation.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	11
1. Chemikalien und Enzyme	11
2. Bakterienstämme und Plasmide	13
3. Nährmedien	14
3.1. Medienzusätze	15
4. Kultivierungsbedingungen	15
4.1. Aerobe Kultivierung von <i>E. coli</i> im Schüttelkolben	15
4.2. Aerobe Batchkultivierung von <i>E. coli</i> im 7,5 L – Laborfermenter	16
4.2.1. Apparativer Aufbau und Prozessparameter	16
4.2.2. Durchführung der Fermentation	17
4.2.3. Bestimmung der Kohlenstoffbilanz	17
4.3. Bestimmung des Bakterienwachstums	18
4.3.1. Photometrische Trübungsmessung	18
4.3.2. Trockenmassebestimmung	18
4.3.3. Zellzahlbestimmung mittels Coulter-Counter	19
4.4. Stammhaltung	19
5. Molekulargenetische Methoden	20
5.1. Isolierung von Nukleinsäuren	20
5.1.1. Isolierung von genomischer DNA	20
5.1.2. Isolierung von Plasmid-DNA	20
5.1.3. Isolierung von RNA	20
5.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	21
5.3. Reinigung und Aufkonzentrierung von DNA	21
5.4. Rekombinante DNA-Techniken	22
5.4.1. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	22
5.4.2. Ligation und Dephosphorylierung	22
5.5. Agarose-Gelelektrophorese	22
5.5.1. DNA-Agarose-Gelelektrophorese	22
5.5.2. RNA-Agarose-Gelelektrophorese	23

5.6. Polymerasekettenreaktion (PCR)	23
5.6.1. Kolonie-PCR	24
5.7. Transformationstechniken	24
5.7.1. Herstellung und Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	24
5.7.2. Herstellung und Transformation elektrokompeter <i>E. coli</i> -Zellen	25
5.8. Konstruktion von Deletionsmutanten	25
5.9. DNA-Sequenzierung und computergestützte Sequenzanalyse	26
6. Biochemische Methoden	26
6.1. Zellaufschluss und Fraktionierung	26
6.1.1. Herstellung von Enzymrohextrakten	26
6.1.2. Herstellung von Zellextrakten für die Protein-Affinitätsreinigung ..	27
6.2. Proteinbestimmung nach Bradford	27
6.3. Messung von Enzymaktivitäten	28
6.3.1. Bestimmung der Citratsynthase-Aktivität	28
6.3.2. Bestimmung der α -Ketoglutaratdehydrogenase-Aktivität	28
6.3.3. Bestimmung der Succinyl-CoA-Synthetase-Aktivität	29
6.3.4. Bestimmung der Succinatdehydrogenase-Aktivität	29
6.4. Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA)	30
6.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	30
6.5.1. Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen	30
6.5.1.1. Kolloidale Coomassie-Färbung	30
6.5.1.2. Silberfärbung	30
6.6. Reinigung von Proteinen	31
6.6.1. Affinitätschromatographie mittels Dynabeads Streptavidin	31
6.7. MALDI-TOF-Massenspektrometrie	32
6.7.1. Tryptischer in-Gel-Verdau von Proteinen	32
6.7.2. Erstellung von Peptidmassen-Fingerprints	33
6.8. HPLC (High Performance Liquid Chromatography)	33
6.8.1. Bestimmung von Aminosäuren	33
6.8.2. Bestimmung von organischen Säuren	34

6.9. Enzymatische Bestimmung von Glucose und Acetat	34
7. Spektroskopische Methoden	36
7.1. Fluoreszenzspektroskopie	36
7.2. ¹ H-NMR-Spektroskopie	36
8. DNA-Chip-Technologie	36
8.1. Herstellung von <i>E. coli</i> DNA-Chips	36
8.2. Chemische und thermische Nachbehandlung von DNA-Chips	37
8.3. Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden	38
8.4. DNA-Chip-Hybridisierung	38
8.5. Messung und Quantifizierung der Fluoreszenz von Hybridisierungssignalen	39
8.6. Archivierung von DNA-Chip-Daten	39
III. Ergebnisse	40
1. Untersuchungen zur zentralen Bedeutung des TCA-Zyklus für die aerobe Acetatbildung	40
1.1. Überexpression des <i>sdhCDAB-b0725-sucABCD</i> -Operons in <i>E. coli</i> MG1655	40
1.1.1. Austausch des chromosomalen <i>sdh</i> -Promotors gegen den <i>tetA</i> - Promotor (MG1655Δ <i>Psdh</i> :: <i>Ptet</i>)	41
1.1.2. Nachweis der Überexpression durch Transkriptomanalyse	43
1.1.3. Nachweis der Überexpression durch Enzymaktivitätsbestimmung	44
1.2. Charakterisierung des Stammes MG1655Δ <i>Psdh</i> :: <i>Ptet</i>	46
1.2.1. Wachstum und aerobe Acetatbildung	46
1.2.1.1. Aerobe Batchkultivierung im Schüttelkolben	46
1.2.1.2. Aerobe Batchkultivierung im 7,5 l – Laborfermenter	50
1.2.2. Nebenproduktbildung	51
1.2.3. Kohlenstoffbilanz	52
1.2.4. Rekombinante Proteinproduktion	54
1.3. Plasmidkodierte Überexpression des <i>lpdA</i> -Gens in MG1655Δ <i>Psdh</i> :: <i>Ptet</i> ...	57
1.4. Charakterisierung einer <i>sucCD</i> -Deletionsmutante bezüglich Wachstum und aerober Acetatbildung	60
2. Einfluß der Gene <i>actP</i> (<i>yjcG</i>), <i>yjch</i> und <i>yjeJ</i> auf die aerobe Acetat- bildung	63

2.1. Konstruktion einer <i>yjcGH</i> -Deletionsmutante und Charakterisierung bezüglich Wachstum und aerober Acetatbildung	63
2.2. Konstruktion einer <i>yjeJ</i> -Deletionsmutante und Charakterisierung bezüglich Wachstum und aerober Acetatbildung	65
3. Untersuchungen zur Regulation der aeroben Acetatbildung	67
3.1. Regulation durch das ArcA/ArcB-Zweikomponentensystem	68
3.1.1. Charakterisierung von <i>arcA</i> - und <i>arcB</i> -Deletionsmutanten bezüglich Wachstum und aerober Acetatbildung	68
3.2. Regulation durch CRP/cAMP	70
3.2.1. Charakterisierung einer <i>cyaA</i> -Deletionsmutante bezüglich Wachstum und aerober Acetatbildung	70
3.3. Regulation durch den Transkriptionsregulator GadE (YhiE)	72
3.3.1. Konstruktion einer <i>yhiE</i> -Deletionsmutante und Charakterisierung bezüglich Wachstum und aerober Acetatbildung	73
4. Untersuchungen zur Regulation des <i>sdhCDAB</i> - <i>b0725</i> - <i>sucABCD</i> - Operons	75
4.1. Identifizierung von Transkriptionsregulatoren mittels Affinitätschromatographie	75
IV. Diskussion	78
V. Zusammenfassung	88
VI. Literaturverzeichnis	89
VII. Anhang	A1

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACS	Acetyl-CoA-Synthetase
AckA	Acetatkinase
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
b _d	Cytochrom d-Oxidase
b _o	Cytochrom o-Oxidase
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C-/N-Terminus	Carboxy-/Aminoterminus von Proteinen
cm	Zentimeter
CoA	Coenzym A
DFP	Diisopropylfluorophosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
DTNB	5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure)
dUTP	Desoxyuridin-5'-Triphosphat
E	Extinktion
e	Elektronen
ε	Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
F	Farad
F ₀ /F ₁	Untereinheiten der F ₀ /F ₁ -ATPase
g	Gramm
G6PDH	Glucose-6-phosphat-dehydrogenase
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HK	Hexokinase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktosid
kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
λ	Wellenlänge
LB	Luria Bertani
LDS	Lauryldodecylsulfat
M	molar
m	milli (10 ⁻³)
μ	mikro (10 ⁻⁶)
MALDI-TOF	matrix assisted laser desorption ionisation time of flight
Min	Minute
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
n	nano (10 ⁻⁹)

NAD ⁺ / NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid, oxidiert/reduziert
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NDH I/II	NADH-Dehydrogenase I/II
Ω	Ohm
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
p	piko (10 ⁻¹²)
P _i	anorganisches Phosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMS	5-N-Methyl-Phenazoniumsulfat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTA	Phosphotransacetylase
PTS	Phosphotransferase-System
Q	Ubichinon-Pool
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
SCS	Succinyl-CoA-Synthetase
SDH	Succinatdehydrogenase
SDS	Natriumdodecylsulfat
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TA	Transaldolase
TAE	Tris-Acetat/EDTA
TCA	Trichloressigsäure, TCA-Zyklus
TK	Transketolase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
U	Unit; Einheit der Enzymaktivität (μmol min ⁻¹ (mg Protein) ⁻¹)
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	volume per volume (Volumen pro Volumen)
Vol.	Volumen
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)
z.B.	zum Beispiel

I. Einleitung

1. Das Bakterium *Escherichia coli*

Escherichia coli ist ein gramnegatives, fakultativ aerobes, stäbchenförmiges Bakterium, welches peritrich begeißelt ist und keine Sporen bildet. Es hat eine Größe von 1-1,5 x 2-6 µm. Taxonomisch gehört *E. coli* zur Familie der Enterobacteriaceae (griechisch enteron = Darm), welche u.a. auch die Gattungen Salmonella, Enterobacter, Shigella, Klebsiella und Yersinia beinhaltet. Stoffwechselphysiologisch sind die Vertreter dieser Gruppe chemoorganotroph und haben relativ einfache Nährstoffanforderungen. Die Familie der Enterobacteriaceae gehört zur Abteilung der γ -Proteobacteria. Diese ist dem Phylum Proteobacteria zugeordnet. Die Proteobacteria bilden die größte und zugleich physiologisch vielfältigste Gruppe der Bakterien. Sie beinhaltet alle gramnegativen Bakterien.

Das Bakterium *Escherichia coli* wurde erstmals im Jahre 1885 von Theodor Escherich (1857-1911) beschrieben (Escherich, 1885). Es lebt im Darm warmblütiger Tiere und des Menschen und macht etwa 1 % der physiologischen bakteriellen Darmflora aus (Bettelheim, 1992). Als chemoorganotrophes Bakterium ernährt es sich von unvollständig verdauter Nahrung, sowie Absonderungen der Darmschleimhaut und trägt durch Gärungsprozesse zur Aufrechterhaltung einer anaeroben Umgebung des Darmes bei, welche für obligate Anaerobier wie *Bifidobacterium* und *Bacteroides* essentiell ist. Diejenigen *E. coli*-Stämme, welche zum natürlichen Bestandteil der bakteriellen Darmflora gehören, sind nicht pathogen. Sie können jedoch bei Verschleppung in andere Körperregionen unter bestimmten Umständen Harnwegsinfektionen, Meningitis oder Wundinfektionen bis hin zur Sepsis hervorrufen. Demgegenüber unterscheidet man obligat pathogene *E. coli*-Stämme (EHEC, ETEC, EPEC, EIEC, EaggEC), welche für schwere Durchfallerkrankungen verantwortlich sind.

Das Bakterium *E. coli* ist physiologisch, biochemisch und genetisch sehr gut untersucht und dient aufgrund dieser Tatsache als bakterieller Modellorganismus. Das Genom von *E. coli* MG1655 ist bereits seit dem Jahre 1997 vollständig sequenziert (Blattner *et al.*, 1997).

In der Biotechnologie ist *E. coli* für die mikrobielle Herstellung rekombinanter Proteine und Feinchemikalien von Bedeutung. Im großtechnischen Maßstab werden mit *E. coli*-Stämmen z.B. die Aminosäuren L-Phenylalanin (Bongaerts *et al.*, 2001) und L-Threonin (Debabov, 2003) hergestellt. Weitere Beispiele mikrobieller Produktionsprozesse, bei denen *E. coli*-Stämme eingesetzt werden, sind die Indigo-Farbstoff-Herstellung (Ensley, 1983; Murdock, 1993) (Genencor) oder die Produktion von 1,3-Propandiol (Biebl, 1999) (DuPont), einem wichtigen Synthesebaustein für die Herstellung von Nylon. In der pharmazeutischen

Industrie werden *E. coli*-Stämme für die Herstellung von Insulin, Interferonen, sowie Wachstumsfaktoren (GCSF, GMCSF) und -hormonen (Somatotropine) eingesetzt (Schmidt, 2004).

2. Glucosestoffwechsel in *Escherichia coli*

E. coli kann ein breites Spektrum organischer Verbindungen als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen. Glucose wird dabei bevorzugt verstoffwechselt. Die Aufnahme von Glucose in die Zelle erfolgt über das Phosphotransferase (PTS)-System. Diese Art von Transportsystem ist bei Bakterien weit verbreitet. Mechanistisch handelt es sich dabei um eine Gruppentranslokation, einen energieabhängigen Transportprozess, der mit gleichzeitiger chemischer Modifizierung des Transportanten verbunden ist. Während des Transfers durch die Membran wird die Glucose zu Glucose-6-phosphat phosphoryliert und somit metabolisch aktiviert. Als Phosphatdonor fungiert hierbei Phosphoenolpyruvat.

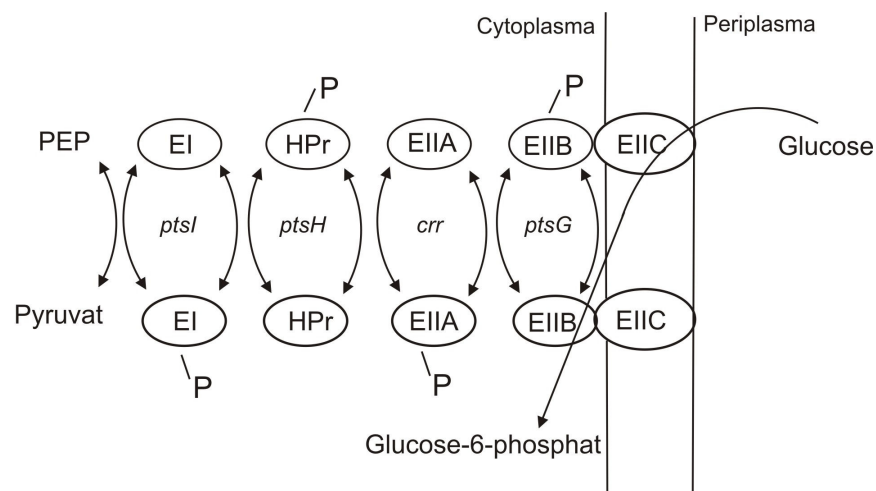


Abb. 1: Aufnahme von Glucose über das PTS-System in *E. coli* (Erklärungen s. Text) (Plumbridge, 2002)

Die Übertragung erfolgt über eine Phosphorylierungskaskade, an welcher vier verschiedene Proteine beteiligt sind (s. Abb. 1): Dies sind die beiden zuckerunspezifischen, cytoplasmatischen Proteine EI und HPr, sowie eine Glucose-spezifische Permease, die sich aus den Proteinen EIIB und EIIC zusammensetzt. Die Phosphatgruppe des Phosphoenolpyruvats wird durch das Enzym I (EI) auf das kleine, hitzestabile Protein HPr übertragen und von dort

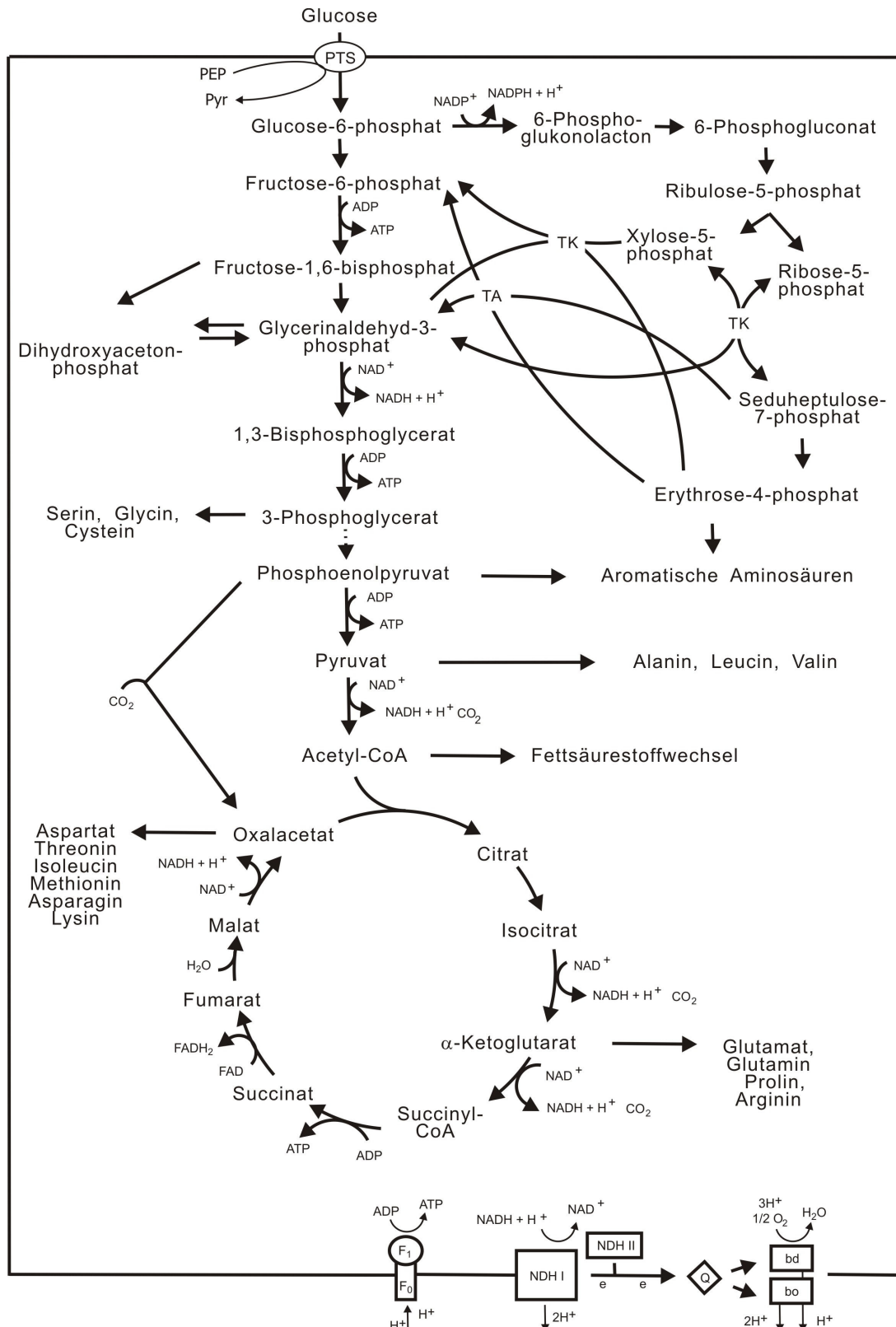


Abb. 2: Glucosestoffwechsel in *Escherichia coli* (PTS=Phosphotransferase-System, PEP=Phosphoenolpyruvat, Pyr=Pyruvat, TK=Transketolase, TA=Transaldolase, F₁, F₀= Untereinheiten der F₁/F₀-ATPase, NDH I/II= NADH-Dehydrogenase I/II, Q= Chinonpool, e= Elektronen, bo= Cytochrom-o-Oxidase, bd= Cytochrom-d-Oxidase)

auf das lösliche Protein EIIA des Glucose-spezifischen Permeasekomplexes. EIIA phosphoryliert dann die hydrophile, carboxyterminale Domäne EIIB des EIIBC-Proteins. Über dessen membrangebundene Domäne EIIC, welche einen Transportkanal ausbildet, wird die Glucose in die Zelle geschleust und dabei die Phosphatgruppe auf den Zucker übertragen (Postma *et al.*, 1993). Das PTS-System dient jedoch nicht nur dem Transport, sondern hat auch regulatorische Funktionen. Unphosphoryliertes EIIA-Protein hemmt die Aufnahmesysteme für alternative Kohlenstoffquellen (z.B. Lactose, Maltose, Melibiose, Glycerin). Dieses als "Inducer Exclusion" bezeichnete Phänomen liegt der sequenziellen Verstoffwechselung der genannten C-Quellen in Gegenwart von Glucose zugrunde und äußert sich in diauxischem Wachstum (Lengeler, 1996). Unphosphoryliertes EI-Protein reguliert Chemotaxis (Lux, 1995). Phosphoryliertes HPr-Protein aktiviert die Aufnahme β -glucosidischer Zucker und deren Verstoffwechselung (Görke, 1999), in unphosphoryliertem Zustand aktiviert es die Glycogen-Phosphorylase (Seok, 2001).

Nach Aufnahme der Glucose in die Zelle und Phosphorylierung zu Glucose-6-phosphat, wird diese Verbindung über zwei verschiedene, katabole Stoffwechselwege abgebaut: Die Glykolyse (Embden-Meyerhof-Parnas-Weg) und den oxidativen Pentosephosphatweg. Bei *E. coli* ist der Entner-Doudoroff-Weg für die Verstoffwechselung von Glucose nicht von Bedeutung (Peekhaus, 1998). Die Enzyme des Entner-Doudoroff-Weges werden dort nur in Gegenwart von C-Quellen wie z.B. Gluconat, Glucuronat, Galacturonat oder Idonat induziert (Eisenberg, 1967). Etwa 20 % der aufgenommenen Glucose werden über den oxidativen Pentosephosphatweg verstoffwechselt (Fuhrer *et al.*, 2005). Der oxidative Pentose-Phosphatweg dient der Generierung von NADPH, welches als Reduktionsäquivalent in biosynthetischen Reaktionen von Bedeutung ist und der Bereitstellung von Vorläufermolekülen für die Synthese von Nukleinsäuren und aromatischen Aminosäuren. Der Hauptanteil der aufgenommenen Glucose (80 %) wird über die Glykolyse (Embden-Meyerhof-Parnas-Weg) zu Pyruvat oxidiert, welches nach oxidativer Decarboxylierung zu Acetyl-CoA in den TCA-Zyklus eingeschleust und zur Energiegewinnung zu CO₂ oxidiert wird. Der TCA-Zyklus ist ein amphiboler Stoffwechselweg: Intermediate des TCA-Zyklus werden auch als Vorstufen für den anabolen Stoffwechsel genutzt. Diese müssen durch anaplerotische Reaktionen wieder regeneriert werden. Dafür ist bei Wachstum auf Glucose die PEP-Carboxylase verantwortlich, welche die Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat zu Oxalacetat katalysiert, so dass der TCA-Zyklus wieder aufgefüllt wird.

Unter anaeroben Bedingungen wird die Glucose nicht vollständig zu CO₂ oxidiert, sondern es werden Gärungsprodukte gebildet (s. Abb. 3).

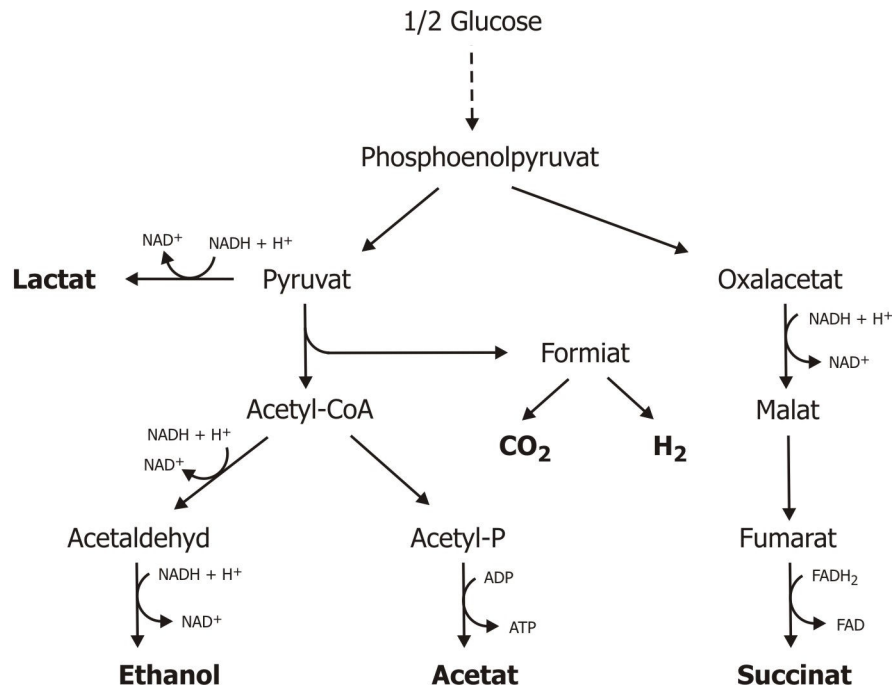


Abb. 3: Gemischte Säuregärung in *E. coli*

Die Energiegewinnung erfolgt dann ausschließlich über Substratkettenphosphorylierung. Bei *E. coli* tritt die gemischte Säuregärung auf: Als Gärungsprodukte entstehen dabei Acetat, Lactat, Succinat, Ethanol, Formiat, H_2 und CO_2 (Böck, 1996). Diese Gärungsprozesse sind wichtig für die Regenerierung von NAD^+ (Clark, 1989), welches in Abwesenheit von Sauerstoff als terminalem Elektronenakzeptor nicht über die Atmungskette regeneriert werden kann.

In Abwesenheit von Sauerstoff unterliegt die Synthese der TCA-Zyklus-Enzyme α -Ketoglutaratdehydrogenase (*sucAB*), Succinatdehydrogenase (*sdhCDAB*) und Succinyl-CoA-Synthetase (*sucCD*) der Repression durch das Zweikomponentensystem ArcA/ArcB. Die Synthese der Succinatdehydrogenase wird zusätzlich durch den anaeroben Regulator Fnr reprimiert. Darüberhinaus ist die Regulation abhängig von der Verfügbarkeit der Kohlenstoffquelle. In Gegenwart von Glucose unterliegt die Synthese der TCA-Zyklus-Enzyme der Katabolitrepression durch CRP/cAMP und Cra (FruR): Die Isocitratdehydrogenase wird durch Cra reguliert (Saier & Ramseier, 1996), CRP/cAMP ist an der Regulation der übrigen TCA-Zyklus-Enzyme beteiligt (Gosset *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2004). Darüberhinaus findet auch Regulation auf Ebene der Enzymaktivität statt.

3. Das Phänomen Überflussmetabolismus

Unter anaeroben Bedingungen wird Acetat als ein Produkt der gemischten Säuregärung gebildet (Böck, 1996). Die Bildung von Acetat ist aber auch unter aeroben Bedingungen zu beobachten (Holms, 1996) und tritt in Gegenwart hoher Glucosekonzentrationen (Holms, 1996), sowie bei hohen Wachstumsraten unter Glucose-limitierenden Bedingungen im Chemostat (Elmansi & Holms, 1989) auf. Im Allgemeinen werden 10–30 % des Kohlenstoffs der aufgenommenen Glucose zu Acetat umgesetzt (Farmer & Liao, 1997). Eine solche aerobe Ausscheidung von Metaboliten des Zentralstoffwechsels wird generell als Überflussmetabolismus bezeichnet und tritt auch bei anderen Mikroorganismen auf. Als Beispiele sind die aerobe Acetatbildung bei *Bacillus subtilis* (Tobisch, 1999), die aerobe Bildung von Citronensäure durch *Aspergillus niger* (Kubicek, 1977), die aerobe Ausscheidung von Glutamat durch *Corynebacterium glutamicum* (Kimura, 2003; Kinoshita, 1957) oder die aerobe Ethanolbildung bei der Hefe (Sonnleitner, 1986) zu nennen. Letztere ist auch als Crabtree-Effekt bekannt. Aber nicht alle Hefen sind zur Bildung von Ethanol unter aeroben Bedingungen befähigt: Zu den "Crabtree-positiven" Hefen gehören z.B. *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida glabrata* und *Zygosaccharomyces rouxii*. Beispiele für "Crabtree-negative" Hefen sind *Pichia stipitis* und *Kluyveromyces lactis*.

In *E. coli* tritt die aerobe Acetatbildung auch bei Wachstum auf den Kohlenstoffquellen Pyruvat, Lactat, Gluconat, und Glucuronat auf, nicht aber bei Wachstum auf Glycerin oder Fructose (Holms, 1996).

Die Bildung von Acetat unter aeroben Bedingungen erfolgt hauptsächlich über den Phosphotransacetylase-Acetatkinase (Pta-AckA)-Weg (s. Abb. 4). Hierbei wird Acetyl-CoA in einer reversiblen Reaktion in zwei Schritten durch die Phosphotransacetylase und Acetatkinase zu Acetat umgesetzt. Zwischenprodukt ist Acetylphosphat. Über diese Substratketten-Phosphorylierung wird ein Molekül ATP gebildet (Brown *et al.*, 1977).

Die Aktivität des Pta-AckA-Weges ist abhängig von der Verfügbarkeit von Sauerstoff, dem pH, der Temperatur und der Medienzusammensetzung (Wolfe, 2005). Außerdem wird die Phosphotransacetylase allosterisch aktiviert durch Pyruvat und inhibiert durch NADH (Suzuki, 1969).

Ein weiterer Weg der aeroben Acetatbildung ist die Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetat und CO₂, welche durch die Pyruvatoxidase katalysiert wird (Gennis, 1976). Dabei wird FAD zu FADH₂ reduziert (Gennis, 1976).

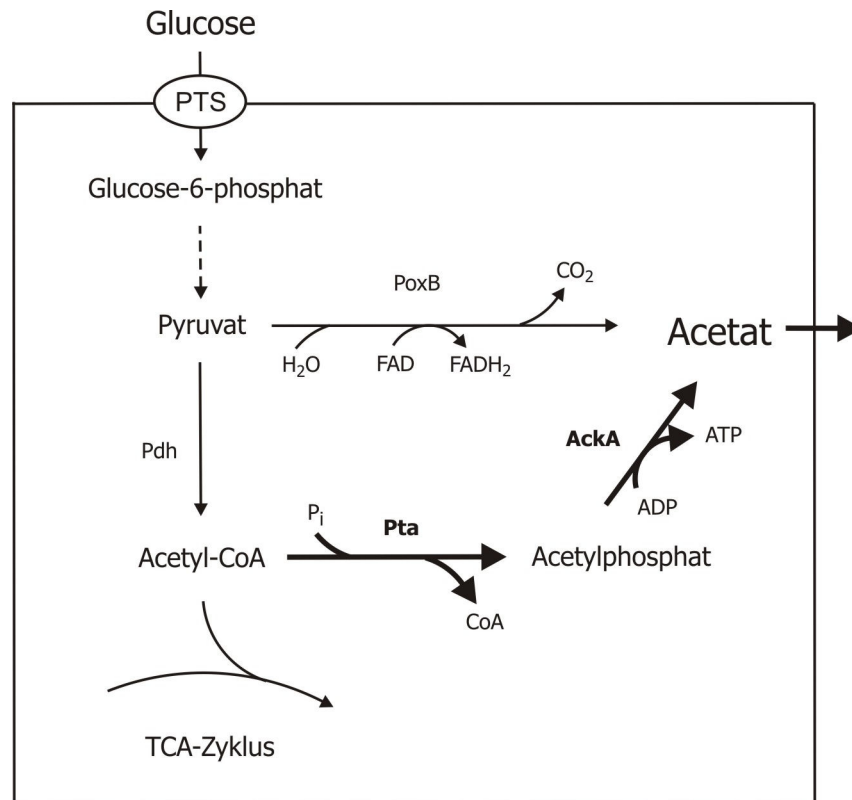


Abb. 4: Aerobe Acetatbildung in *E. coli*. Pdh = Pyruvatdehydrogenase; Pta = Phosphotransacetylase; AckA = Acetatkinase; PoxB = Pyruvatoxidase.

Die Aktivität der Pyruvatoxidase ist beim Übergang in die stationäre Phase am höchsten, ihre Expression ist RpoS- (σ^{38}) -abhängig (Chang *et al.*, 1994). In der exponentiellen Wachstumsphase spielt dieser Weg der Acetatbildung nur eine untergeordnete Rolle (Chang *et al.*, 1994; Dittrich *et al.*, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass er für die Wachstumseffizienz von Bedeutung ist, da *poxB*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp auf Glucose langsamer wachsen und weniger Biomasse bilden (Abdel-Hamid *et al.*, 2001).

3.1. Physiologische Bedeutung der aeroben Acetatbildung

Zur physiologischen Bedeutung der aeroben Acetatbildung gibt es verschiedene Hypothesen: Möglicherweise bringt eine maximale Wachstumsrate auf Kosten der Energieausbeute kompetitive Vorteile gegenüber anderen Organismen (Pfeiffer *et al.*, 2001). Stoffwechselphysiologisch könnte der Pta-AckA-Weg auch der Regenerierung von freiem CoA dienen (El-Mansi, 2004).

Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß der AckA-Pta-Weg regulatorische Funktionen besitzt: Acetylphosphat, welches als Intermediat gebildet wird, spielt bei der Signaltransduktion eine Rolle als Phosphatdonor (McCleary & Stock, 1994; McCleary *et al.*, 1993). Beispiele sind die Flagellensynthese (Pruss & Wolfe, 1994), die Expression von Membranporinen, Phosphorylierung von OmpR, die Kontrolle des Phosphatregulons (Wanner & Wilmesriesenberg, 1992) und die Stickstoffassimilierung durch Regulation der Glutaminsynthetase-Synthese (Feng, 1992). Acetylphosphat beeinflusst dabei wahrscheinlich die Feinregulation (McCleary & Stock, 1994). Außerdem ist der AckA-Pta-Weg für die Signaltransduktion des PhoP-PhoQ Zwei-Komponentensystems, welches u.a. die Mg^{2+} -Homöostase reguliert (Groisman, 2001), von Bedeutung, da die Regulation von PhoP-PhoQ in Abhängigkeit von der intrazellulären Acetyl-CoA-Konzentration erfolgt (Lesley & Waldburger, 2003).

3.2. Biotechnologische Problemstellung

Aus biotechnologischer Sicht stellt die aerobe Acetatbildung eine unerwünschte Nebenproduktbildung dar: Aufgrund seiner toxischen Wirkung (Cherrington *et al.*, 1991) stört die Acetatbildung den Fermentationsprozess (Luli & Strohl, 1990). Die Akkumulation von Acetat über 15-25 mM inhibiert das Zellwachstum und die rekombinante Proteinproduktion (Jensen, 1990).

Die toxische Wirkung dieser schwachen, organischen Säure (pK_a 4,74) beruht u.a. auf einer Entkopplung des transmembranen pH-Gradienten, welche den Energiestoffwechsel beein-

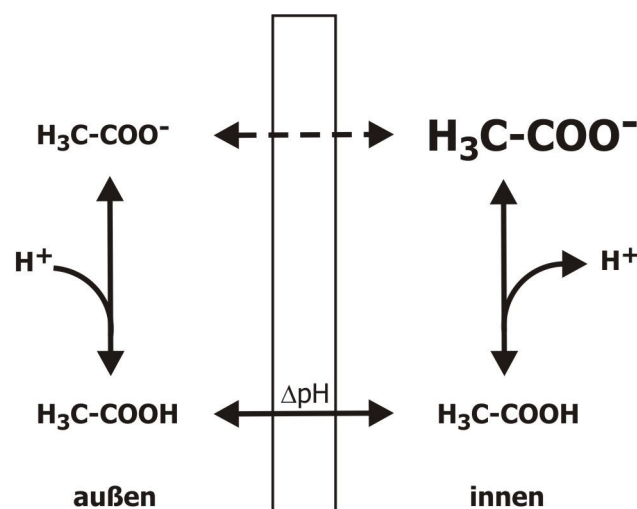


Abb. 5: Mechanismus der Entkopplung durch schwache Säuren (Russell & Diez-Gonzalez, 1998)

trächtigt (Axe, 1995) und die Aktivität ΔpH -abhängiger Transportsysteme negativ beeinflusst: Acetat kann in seiner undissoziierten Form die Zellmembran ungehindert passieren und ins Cytoplasma der Zelle gelangen. Dort kommt es dann zur vollständigen Dissoziation der Säure (s. Abb. 5). Die freigesetzten Protonen sind auch für eine partielle Acidifizierung des Cytoplasmas verantwortlich. Als sekundärer Effekt kann dies die Aktivität wichtiger Enzyme des Stoffwechsels negativ beeinflussen.

Abgesehen von den toxischen Effekten des Acetats auf den Fermentationsprozess wird durch die Nebenproduktbildung eine möglichst effiziente Umsetzung der Kohlenstoffquelle zu den gewünschten Endprodukten verhindert.

Obwohl das Phänomen des Überflussmetabolismus seit mehr als vier Jahrzehnten bekannt (Britten, 1954) ist, sind die molekularen Grundlagen der aeroben Acetatbildung und die beteiligten Regulationsmechanismen noch nicht im Detail verstanden.

Die aerobe Acetatbildung wird auf ein Ungleichgewicht zwischen Glucoseaufnahme und der Kapazität der zentralen Stoffwechselwege zurückgeführt (Holms, 1996). Dabei werden eine limitierte Kapazität des TCA-Zyklus (Han, 1992; Majewski & Domach, 1990) oder der Atmungskette (Ingledew, 1984) diskutiert. Auf molekularer Ebene konnten bereits anhand von DNA-Chip-Analysen Genexpressionsveränderungen, die spezifisch bei aerober Acetatbildung auftreten, identifiziert werden. Diese Expressionsveränderungen betrafen u.a. Gene des TCA-Zyklus, der Atmungskette, sowie Gene unbekannter Funktion (Polen, 2002). Die verringerte Expression von Genen des TCA-Zyklus und der Atmungskette würde die Ausscheidung von Acetat als Folge einer zu geringen Kapazität des TCA-Zyklus und/oder der Atmungskette auf der Grundlage einer genetischen Regulation erklären und würde zeigen, dass die Stoffwechselkapazität nicht per se limitierend ist (Polen, 2002).

Es wurden bereits zahlreiche Ansätze zur Reduzierung der aeroben Acetatbildung verfolgt: Dies geschah durch prozesstechnische Ansätze zur Kontrolle der Glucosezufuhr (Akeson *et al.*, 2001; Konstantinov, 1990), sowie gezielte Modifikationen des bakteriellen Stoffwechsels durch "Metabolic Engineering". Die Ansätze zielten dabei hauptsächlich auf eine Verringerung der Glucoseaufnahme oder eine Umlenkung des Stoffwechsels zu weniger toxischen Nebenprodukten ab. So führten z.B. die Inaktivierung des *ptsG*-Gens (Picon *et al.*, 2005) (Chou, 1994) oder die Überexpression des *m/c*-Gens zu einer reduzierten Glucoseaufnahmerate, die eine Verringerung der Acetatbildung zur Folge hatte (Cho, 2005;

Hosono *et al.*, 1995). Ein vergleichbarer Effekt wurde durch Zusatz des nichttoxischen, metabolisch inerten Glucose-Analogons Methyl- α -glucosid erzielt, welches die Glucose-spezifische Permease EIIBC kompetitiv inhibiert (Chou *et al.*, 1994).

Die heterologe Expression des Acetolactatsynthase-Gens (*alsS*) aus *Bacillus subtilis* führte zur Bildung von Acetoin, welches im Vergleich zu Acetat weniger toxisch ist (Aristidou, 1994). Durch heterologe Expression der Pyruvatdecarboxylase und Alkoholdehydrogenase aus *Zymomonas mobilis* konnte die Bildung von Ethanol erreicht werden (Diaz-Ricci, 1991). Heterologe Expression der Gene *adc*, *ctfAB*, und *thl* aus *Clostridium acetobutylicum*, welche für die Acetoacetat-Decarboxylase, Coenzym A-Transferase und eine Thiolase kodieren, führten zur Bildung von Aceton (Bermejo *et al.*, 1998).

Darüberhinaus konnte die Acetatbildung auch durch Steigerung anaplerotischer Stoffwechselreaktionen verringert werden, beispielsweise durch heterologe Expression einer Pyruvatcarboxylase (March *et al.*, 2002), die Überexpression der PEP-Carboxylase (Chao & Liao, 1993; Farmer & Liao, 1997) oder durch Deregulation des Glyoxylatzylus (Farmer & Liao, 1997).

Die Deletion des AckA-Pta-Weges, über welchen die Acetatbildung primär erfolgt, führte ebenfalls zu reduzierter Acetatbildung (Kakuda *et al.*, 1994; Kim & Cha, 2003), war jedoch mit der Ausscheidung von Pyruvat, Lactat und Glutamat sowie einer reduzierten Wachstumsrate verbunden und ist auf Inhibierung der Pyruvatdehydrogenase infolge der Akkumulation von Acetyl-CoA zurückzuführen (Chang *et al.*, 1999).

Die genannten Ansätze haben gemeinsam, dass die Acetatbildung nur symptomatisch behoben wurde.

4. Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten die molekularen Grundlagen der aeroben Acetatbildung und die beteiligten Regulationsmechanismen näher untersucht werden. Dabei sollte ein neuer Ansatz zur Reduzierung der aeroben Acetatbildung entwickelt werden. Im Vordergrund der Untersuchungen stand dabei der Tricarbonsäurezyklus. Bei diesen Untersuchungen wurde die Expression verschiedener TCA-Zyklus-Enzyme gezielt verändert und ein möglicher Einfluss auf die aerobe Acetatbildung untersucht.

Außerdem wurde eine Beteiligung bekannter Regulatorproteine an der aeroben Acetatbildung überprüft und nach neuen Regulatorproteinen gesucht, die möglicherweise für die Regulation der aeroben Acetatbildung von Bedeutung sind.

II. Material und Methoden

1. Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Enzyme wurden von den nachfolgend aufgeführten Firmen bezogen. Die Chemikalien entsprachen in der Regel dem Reinheitsgrad "pro analysi".

Amersham (Freiburg i. Br.)

Shrimp Alkaline Phosphatase

AppliChem GmbH (Darmstadt)

Agarose, 4-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)

BIOMOL (Hamburg)

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

Difco Laboratories (Detroit, USA)

Bacto Agar, Hefeextrakt, Trypton

Fluka (Neu-Ulm)

Acetonitril, L-Cystein-Hydrochlorid, Oxalacetat, Silbernitrat, Thiosulfat-Pentahydrat, Triton X-100,

Linde AG (Unterschleißheim)

Prüfgas (0,4 % CO₂, 99,6 % N₂)

Merck (Darmstadt)

Ammoniumchlorid, Ammoniumhydrogencarbonat, Calciumchlorid-Dihydrat, Essigsäure, Formaldehyd, D-Glucose-Monohydrat, Eisen(II)-sulfat-Heptahydrat, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Glycerin, Isopropanol, Kaliumacetat, Kaliumchlorid, Kaliumcyanid, Kaliumhydroxid, Kaliumsulfat, Magnesiumchlorid-Hexahydrat, Magnesiumsulfat-Heptahydrat, Maleinsäure, Manganchlorid-Tetrahydrat, Methanol, Natriumacetat, Natriumcarbonat, Natriumchlorid, Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lsg. (10 % (v/v)), Natriumhydroxid, Rubidium-

chlorid, Salzsäure, Trichloressigsäure, Trifluoressigsäure (TFA), Tri-Natriumcitrat-Dihydrat, Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan, Triton X-100

Qiagen (Hilden)

DNase I, Taq-Polymerase

Roche (Mannheim)

Hexokinase aus Hefe, Glucose-6-phosphat-dehydrogenase aus *Leuconostoc mesenteroides*, Kanamycinsulfat, NAD, dNTPs, Proteinase K, Restriktionsenzyme, Ribonuklease A aus Schweinepankreas, Rinderserumalbumin (BSA), Trypsin ("proteomics grade", rekombinant aus Hefe)

Roth GmbH

Ethidiumbromid

Sigma Chemie (Deisenhofen)

Acetyl-CoA, 3-Acetyl-NAD, 3-Acetyl-NADH, α -Cyano-4-hydroxy-*trans*-Zimtsäure, α -Keto-glutarat, Ampicillin-Natriumsalz, Antifoam 204, Bernsteinsäure-Anhydrid, β -Mercapto-ethanol, Borsäure, Bradford-Reagenz, Coenzym A (CoA), 2,6-Dichlorphenol-indophenol (DCPIP), Diisopropylfluorophosphat (DFP), 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB), Lysozym, 5-N-Methyl-Phenazoniumsulfat (PMS), Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Poly-Adenylat (Poly-A), Poly-L-Lysin-Lösung (0,1 % w/v), 1-Methyl-2-Pyrrolidinon, Rubidiumchlorid, Succinat, Thiamin-Hydrochlorid, Tricine

2. Bakterienstämme und Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide sowie deren Eigenschaften sind in den Tabellen 1 und 2 zusammengefasst.

Tab. 1: Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp/ Phänotyp	Referenz
<i>E. coli</i>		
DH5α	<i>F⁺ thi-1 endA1 hsdR17 (r^m) supE44ΔlacU169 (Φ80/lacZΔM15) recA1 gyrA96 relA1</i>	Hanahan <i>et al.</i> , 1983
MG1655	Wildtyp	CGSC # 6300
MG1655Δ <i>Psdh::Ptet</i>	Wildtyp mit chromosomal ausgetauschtem <i>sdh</i> -Promotor gegen einen konstitutiven <i>tet</i> -Promotor	diese Arbeit
MG1655Δ <i>sucCD</i>	Wildtyp mit chromosomaler Deletion der Gene <i>sucC</i> und <i>sucD</i>	Veit, 2002
MG1655Δ <i>yhiE</i>	Wildtyp mit chromosomaler Deletion des Gens <i>yhiE</i>	diese Arbeit
MG1655Δ <i>yjeJ</i>	Wildtyp mit chromosomaler Deletion des Gens <i>yjeJ</i>	diese Arbeit
MG1655Δ <i>yjcGH</i>	Wildtyp mit chromosomaler Deletion der Gene <i>yjcG</i> und <i>yjcH</i>	diese Arbeit
BW25113	<i>laqI^q rrnB_{T14} ΔlacZ_{WJ16} hsdR514 ΔaraBAD_{AH33} ΔrhaBAD_{LD78}</i> Wildtyp	CGSC # 7636, Datsenko und Wanner, 2000
BW27422	BW25113 mit Deletion des <i>arcA</i> -Gens	Barry Wanner
BW26422	BW25113 mit Deletion des <i>arcB</i> -Gens	Barry Wanner
BW26356	BW25113 mit Deletion des <i>cyaA</i> -Gens	CGSC # 7647, Datsenko und Wanner, 2000

Tab. 2: Verwendete Plasmide

Plasmid	Charakteristika	Referenz
pGEM-T	Klonierungsvektor für PCR-Produkte, Amp ^R	Promega
pGEM-T- <i>lpdA</i>	pGEM-T mit <i>lpdA</i> - Gen aus <i>E. coli</i> MG1655, Amp ^R	diese Arbeit
pGEM-T- <i>sdh-kan</i>	pGEM-T mit FRT- flankierter Kanamycin-Resistenzkassette aus pKD4, Amp ^R	diese Arbeit
pGEM-T-P _{tet} - <i>sdh-kan</i>	pGEM-T (<i>sdh-kan</i>) mit <i>tetA</i> - Promotor, Amp ^R	diese Arbeit
pKD4	Kan ^R , <i>oriR_y</i> , Amp ^R	Datsenko und Wanner, 2000
pKD13	Kan ^R , <i>oriR_y</i>	Datsenko und Wanner, 2000
pCP20	Amp ^R , FLP-Rekombinase aus Hefe	Datsenko und Wanner, 2000
pKD46	Amp ^R , <i>repA101(ts)</i> , <i>araBP-gam-bet-exo</i> , <i>oriR101</i>	Datsenko und Wanner, 2000
pK19:: <i>clp-P</i>	pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat mit <i>tetA</i> -Promotor, Kan ^R	(Engels, 2004)
pTrc99a	Amp ^R , <i>lacI^q</i> , <i>trc</i> , ColE1	Pharmacia
pTrc99a- <i>lpdA</i>	pTrc99a mit <i>lpdA</i> -Gen aus <i>E. coli</i> MG1655, Amp ^R	diese Arbeit
pTrc99a- <i>GFPuv</i>	pTrc99a mit <i>gfp_{uv}</i> -Gen, Amp ^R	diese Arbeit

3. Nährmedien

Die verschiedenen *E. coli* -Stämme wurden in LB-Medium (Sambrook, 2001) oder MOPS-Minimalmedium (Neidhardt *et al.*, 1974; modifiziert) kultiviert. Zur Herstellung kompetenter Zellen wurde SOB-Medium verwendet. Dieses wurde auch zur Regeneration der Zellen nach Elektroporation eingesetzt. Zur Herstellung von Agarplatten wurde den Medien 18 g/l Bacto™ Agar zugesetzt. Vor Gebrauch wurden die Medien 20 min bei 120 °C autoklaviert. Glucose,

Spurensalze, Thiamin und Antibiotika wurden nach dem Autoklavieren zugegeben. Die verwendeten Medien hatten folgende Zusammensetzung:

LB-Medium

10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl

SOB-Medium

20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,6 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, pH 6,8 - 7,0; vor Gebrauch wurden 10 mM MgCl₂ und 10 mM MgSO₄ zugesetzt.

MOPS-Minimalmedium

40 mM MOPS, 4 mM Tricine, 50 mM NaCl, 9,52 mM NH₄Cl, pH 7,2; eingestellt mit KOH, nach dem Autoklavieren wurden 0,52 mM MgCl₂, 0,275 mM K₂SO₄, 0,5 µM CaCl₂, 0,01 mM FeSO₄, 0,3 mM Thiamin und 10-100 mM Glucose zugegeben.

3.1. Medienzusätze

Zur Selektion und Haltung verschiedener rekombinanter Bakterienstämme wurden den Medien Antibiotika in den folgenden Endkonzentrationen zugesetzt:

Ampicillin: 50 µg/ml

Kanamycin: 50 µg/ml bzw. 25 µg/ml nach Elektroporation

4. Kultivierungsbedingungen

4.1. Aerobe Kultivierung von *E. coli* im Schüttelkolben

Für die aerobe Kultivierung von *E. coli* wurden 500 ml Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen verwendet. Das Kulturvolumen betrug 60 ml. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 120 rpm. Für Wachstumsversuche wurde zuerst eine LB-Agarplatte von einer Glycerinkultur (s. Abschnitt 4.4.) beimpft. Diese wurde dann zum Animpfen der Vorkulturen (60 ml LB- bzw. Minimalmedium, über Nacht) verwendet. Die Vorkulturen wurden am nächsten Morgen in der exponentiellen Phase durch Zentrifugation (10 min, 2650 g, RT)

geerntet und die Hauptkulturen, welche das gleiche Medium enthielten, zu einer OD₆₀₀ von 0,04 mit den Zellen der Vorkultur angeimpft.

Für Kultivierungen im kleineren Maßstab (z.B. zur Plasmidisolierung) wurden Reagenzröhrchen mit 5 ml LB-Medium eingesetzt. Diese wurden bei 170 rpm geschüttelt.

Aerobe Batchkultivierung von *E. coli* im 7,5 L- Laborfermenter

4.2.1. Apparativer Aufbau und Prozessparameter

Zur Bestimmung von Enzymaktivitäten, Substrataufnahme- und Produktbildungsraten, sowie einer Kohlenstoffbilanz erfolgte die Kultivierung von *E. coli* unter genau definierten Bedingungen in einem 7,5 L-Laborfermenter (Labfors[®] Klein Fermenter System, Infors AG). Dabei handelt es sich um einen freistehenden Tischfermenter mit Mikroprozessor-Steuerung und einem Menü gesteuerten LCD-Display. Die Basis-Einheit (Konsole) besteht aus vier Segmenten: Temperierungsmodul mit Heizung und Wasserpumpe, Modul mit Versorgungsanschlüssen für Luft und Wasser, Signalverstärkermodule und Pumpenmodul mit vier Schlauchpumpen. Das Kulturgefäß hat ein Totalvolumen von 7,5 L. Es besteht aus Borsilikatglas und Edelstahl und besitzt einen Doppelmantel zur Wassertemperierung. Die Temperatur wurde über einen Pt-100-Sensor gemessen. Die Belüftung erfolgte mit synthetischer Luft ($1 \text{ l (l Kulturvolumen)}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Die Rührerdrehzahl betrug 500 rpm. Das Rührelement verfügte über einen Magnetantrieb. Der pH-Wert wurde mit einer pH-Elektrode (Mettler Toledo, Urbach, Schweiz) gemessen und durch automatische Steuerung mit 2 M NaOH und 1 M HCl konstant auf pH 7,2 gehalten. Vorab erfolgte eine Zwei-Punkt-Kalibrierung mit Pufferlösungen (pH 4,7 und 7,0). Der Sauerstoffpartialdruck wurde mit Hilfe einer Sauerstoffelektrode (InPro[®] 6000, Mettler Toledo, Urbach, Schweiz) erfasst. Die Kalibrierung erfolgte nach Polarisierung unmittelbar vor Inokulation des Fermenters durch Einstellung von 100 % Sättigung bei einer Drehzahl von 500 rpm und Belüftung mit $1 \text{ l (l Kulturvolumen)}^{-1} \text{ min}^{-1}$ synthetischer Luft. Der Nullwert wurde durch Begasung mit Stickstoff eingestellt. Die Festsetzung der Werte erfolgte jeweils nach Erreichen eines konstanten Signals. Der Kohlendioxidgehalt in der Abluft wurde durch nichtdispersive Infrarotabsorption (Uras 10 E NDIR-Betriebsphotometer, Hartmann & Braun AG) bestimmt. Der Nullabgleich der Abgasmessung erfolgte mit Stickstoff. Mit Prüfgas wurden 0,4 % Kohlendioxid eingestellt.

4.2.2. Durchführung der Fermentation

Die aerobe Batchkultivierung verschiedener *E. coli*-Stämme erfolgte in Minimalmedium mit 10 mM Glucose als Kohlenstoff- und Energiequelle. Die Vorkultur (6x 60 ml MOPS-Minimalmedium mit 10 mM Glucose) wurde von einer frischen LB-Platte angeimpft (s. Abschnitt 4.1.) und nach 10-12 Stunden in der exponentiellen Wachstumsphase durch Zentrifugation (10 min, 2650 g, RT) geerntet. Die Zellen wurden 1x mit Minimalmedium gewaschen und anschließend der Fermenter zu einer OD₆₀₀ von 0,04 angeimpft. Der Wachstumsverlauf der Kultur wurde über einen Zeitraum von 10 Stunden verfolgt. Es wurden stündlich Proben zur Bestimmung der Zelldichte und der Glucose- und Acetatkonzentration in den Kulturüberständen (s. Abschnitt 6.9.) entnommen. Die Probenentnahme für Enzymaktivitätsbestimmungen, für die Isolierung von RNA und für NMR-Analysen erfolgte während der mittleren exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD₆₀₀ von 0,50-0,64.

4.2.3. Bestimmung der Kohlenstoffbilanz

Zur Überprüfung der Vollständigkeit der durchgeführten Analysen (Glucose-, Acetat-, CO₂- und Biomassebestimmungen) wurde eine Kohlenstoffbilanz aufgestellt. Dabei wurde in einer Massenbilanz der Kohlenstoff aus Substraten, Biomasse und gebildeten Produkten erfasst. Wenn eine solche Bilanz nicht zu annähernd 100 % geschlossen werden kann, so bedeutet dies, dass entweder nicht alle Stoffwechselprodukte erfasst wurden oder die Analytik zu stark fehlerbehaftet war. Die allgemeine Form der Massenbilanz für einen Prozess im Batchverfahren lautet:

$$[1] \quad C_{S, t=0} - C_{S, t=n} = (C_{X, t=n} - C_{X, t=0}) + C_{P, t=n} + C_{NP, t=n} + C_{CO_2, t}$$

(C = Kohlenstoffanteil [mol]; S = Substrat; X = Biomasse; P = Produkt; NP = Nebenprodukt; CO₂ = Kohlendioxid; t = Zeit)

Die Verteilung des während der Fermentation in der exponentiellen Wachstumsphase umgesetzten Kohlenstoffs wurde durch Berechnung der integralen molaren Kohlenstoffmengen der Produkte bestimmt. Die Kohlenstoffanteile wurden dabei in % des in Form von Glucose umgesetzten Kohlenstoffs angegeben.

Die Berechnung des Kohlenstoffanteils der Biomasse erfolgte anhand der Biotrockenmasse mit Hilfe einer empirischen Annahme der Biomasse-Zusammensetzung (Nielsen, 2003).

Die Kohlendioxidbildung war über die Massenbilanz in der Gasphase bestimmbar. Da die CO₂-Konzentration in der Flüssigkeit gering war, konnte sie vernachlässigt werden. Für die Kohlenstofftransferrate (CTR) galt daher:

$$[2] \quad \text{CTR} \text{ [mol/h]} = \frac{V_g}{V_R} \cdot ([\text{CO}_2]_{\text{aus}} - [\text{CO}_2]_{\text{ein}})$$

(V_R = Volumen des Reaktors, V_g = Gasvolumenstrom; [CO₂] = Konzentration von CO₂; ein = Zuluft; aus = Abluft)

Die Kohlendioxidbildungsrate (CER) ergab sich aus Gleichung [2] (Buchholz, 1995):

$$\text{CER [mol/l/h]} = \frac{V_{g, \text{ein}}}{V_R \cdot V_n} \cdot Y_{\text{CO}_2}^{\text{aus}} - \left[\frac{1 - Y_{\text{O}_2}^{\text{ein}} - Y_{\text{CO}_2}^{\text{ein}}}{1 - Y_{\text{O}_2}^{\text{aus}} - Y_{\text{CO}_2}^{\text{aus}}} \cdot Y_{\text{CO}_2}^{\text{ein}} \right]$$

(V_R = Volumen des Reaktors; V_n = molares Normvolumen (22,414 l mol⁻¹); Y_{CO₂} = Kohlendioxidanteil; Y_{O₂} = Sauerstoffanteil)

4.3. Bestimmung des Bakterienwachstums

4.3.1. Photometrische Trübungsmessung

Das Wachstum von *E. coli* in Flüssigkultur wurde anhand der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm photometrisch erfasst (Shimadzu Spektralphotometer UV-160A). Lag die gemessene Extinktion außerhalb des linearen Bereichs (0,05-0,25), so wurde die Probe entsprechend mit Wasser verdünnt.

4.3.2. Trockenmassebestimmung

Zur quantitativen Erfassung der Biomasse einer *E. coli*-Kultur wurde die Zelltrockenmasse mittels Membranfiltration bestimmt. Dazu wurden Cellulosenitrat-Filter mit einem Porendurchmesser von 0,45 µm (Millipore, Schwalbach) benutzt. Die Filter wurden vor ihrer

Verwendung in einer Glaspetrischale im Trockenschrank bei 105 °C über Nacht getrocknet. Anschließend wurde die Schale mit den Filtern 20 min in einen Exsikkator gelegt. Nachdem die Filter abgekühlt waren, wurden sie sofort gewogen. Für die Bestimmung der Zelltrockenmasse wurden dann von den jeweiligen *E. coli*-Kulturen zu entsprechenden Zeitpunkten Proben entnommen, diese auf Eis abgekühlt und die Zellen durch Membranfiltration abgetrennt. Anschließend wurden die Filter mit 200 ml kaltem, destilliertem Wasser gewaschen, im Trockenschrank bei 105 °C über Nacht getrocknet und nach dem Abkühlen (20 min, Exsikkator) sofort gewogen. Die ermittelten Trockenmassekonzentrationen wurden ins Verhältnis zur entsprechenden OD₆₀₀ gesetzt: 1 OD₆₀₀ entsprach 0,39 g/l.

4.3.3. Zellzahlbestimmung mittels Coulter-Counter

Die Bestimmung der Zellzahl in Flüssigkulturen erfolgte mit einem elektronischen Partikelzählgerät (Multisizer 3 Coulter-Counter, Beckman). Dazu wurde ein Aliquot der Probe in einer Elektrolytlösung (Coulter Isoton II Puffer) suspendiert. Das Messprinzip beruht auf der im Vergleich zum Elektrolyten viel geringeren elektrischen Leitfähigkeit der Zellen. Während der Messung durchfließt die Probe eine Kapillaröffnung, die zwei Kammern miteinander verbindet, durch welche über zwei Elektroden ein Strom fließt. Wenn eine Zelle die Öffnung passiert, so steigt der Widerstand kurz an und der dadurch erzeugte Spannungsimpuls wird verstärkt und registriert. Da die Amplitude des Spannungsimpulses dem Zellvolumen proportional ist, kann mit dem Coulter-Counter auch die Größe der Zellen bestimmt werden (Bast, 2001). Vor der Probenmessung wurde eine Referenzmessung mit dem Elektrolyten durchgeführt, um bereits vorhandene Partikel oder elektronische Störungen zu erfassen. Die Messungen wurden zusammen mit Dr. Peter Klauth am ICG IV, Forschungszentrum Jülich, durchgeführt.

4.4. Stammhaltung

Zur Stammhaltung wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurden Aliquots von 5 ml LB-Übernachtskulturen auf eine Endkonzentration von 30 % (v/v) mit Glycerin versetzt und in Cryo-Röhrchen bei -70°C gelagert. Solche Dauerkulturen blieben in der Regel über Jahre hinweg lebensfähig.

5. Molekulargenetische Methoden

5.1. Isolierung von Nukleinsäuren

5.1.1. Isolierung von genomischer DNA

Genomische DNA aus *E. coli* wurde nach der Methode von Eikmanns *et al.* (1994) isoliert. Dabei wurden Zellen einer LB-Übernachtskultur durch Behandlung mit Lysozym und Natriumdodecylsulfat (SDS) aufgeschlossen. Nach enzymatischer Proteolyse wurden verbliebene Proteine und Membranbestandteile durch Aussalzen mit NaCl entfernt. Nach Zentrifugation (30 min, 5000 xg) wurde die DNA durch Fällung mit Ethanol aus dem Überstand isoliert und in Puffer aufgenommen.

5.1.2. Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Dabei wurden die Bakterienzellen durch alkalische Lyse aufgeschlossen, die freigesetzte Plasmid-DNA in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen an eine Silikat-Matrix gebunden, Verunreinigungen durch Waschen entfernt und anschließend die Plasmid-DNA mit Wasser oder Niedrigsalzpuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) eluiert.

5.1.3. Isolierung von RNA

Die Isolierung von RNA aus *E. coli* wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf Adsorption der RNA an eine Silikatmatrix. Es wurden 20 ml einer exponentiell wachsenden Bakterienkultur mit 20 g Eis (vorgekühlt auf -20 °C) abzentrifugiert (5 min, 3500 xg, 4 °C). Das Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -70 °C gelagert. Später wurden die Zellen in 350 µl RLT-Puffer (Qiagen, Hilden) resuspendiert und 2x 30 sec mit 0,5 g Zirkonium-/Silica-Perlen (Ø 0,1 mm; Roth, Karlsruhe) in einem Silamat S5 (Vivadent, Ellwangen) mechanisch aufgeschlossen. Nach der Abzentrifugation von Zellbestandteilen und nicht aufgeschlossenen Zellen (2 min, 14500 xg) wurde die RNA nach Angaben des Herstellers aus dem Überstand isoliert. Zusätzlich wurden die Proben auf der Säule zum Entfernen von DNA einer Behandlung mit DNase I (Qiagen) unterzogen. Dies erfolgte ebenfalls entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Qualität der RNA wurde durch denaturierende Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese überprüft (s. Abschnitt 5.5.2.)

5.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren erfolgte spektralphotometrisch mit dem Specord S 100 B Photometer (Carl Zeiss, Jena) durch Messung der Extinktion bei 260 nm. Ein Wert von $E_{260} = 1$ entspricht dabei einer Konzentration von 40 µg/ml RNA bzw. 50 µg/ml doppelsträngiger DNA (Sambrook, 2001). Für die Messungen wurden Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet. Die Reinheit der isolierten Nukleinsäuren wurde durch Bestimmung des Quotienten der Extinktionen bei 260 und 280 nm abgeschätzt. Die Werte des Quotienten sollten zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Bei einer Verunreinigung der Probe mit Proteinen, deren Absorptionsmaximum basierend auf der Absorption aromatischer Aminosäurereste bei 280 nm liegt, sind die Werte des Quotienten entsprechend niedriger.

5.3. Reinigung und Aufkonzentrierung von DNA

PCR-Produkte wurden zur Abtrennung von Primern, Nukleotiden und der Polymerase je nach Fragmentgröße entweder mit dem PCR-Purification Kit (Qiagen, Hilden) oder dem Nukleotid-Removal Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Das Reinigungsverfahren beruhte dabei auf selektiver Adsorption der PCR-Produkte an eine Silikagel-Membran. Die Elution der DNA erfolgte mit Tris-HCl, pH 8,5 oder destilliertem Wasser. DNA-Fragmente wurden auch über Agarose-Gelelektrophorese gereinigt und mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers aus dem Gel eluiert.

Die Aufkonzentrierung und Reinigung von PCR-Produkten in größerem Maßstabe wurde mit den Mikrokonzentratoren Microcon YM-30 (Millipore, Schwalbach) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden die Proben bis zum Erreichen der gewünschten Konzentration über Zentrifugation eingengt. Die Aufkonzentrierung von genomischer DNA erfolgte durch Fällung mit Isopropanol. Dazu wurde die DNA mit 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 5,2) versetzt, durch Zugabe von 1 Vol. Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt und durch Zentrifugation (30 min, 5000 xg, 4°C) sedimentiert. Anschließend wurde die DNA mit eiskaltem 70% igem (v/v) Ethanol gewaschen, in einer Vakuumzentrifuge (Concentrator 5301, Eppendorf) getrocknet und in TE-Puffer gelöst.

5.4. Rekombinante DNA-Techniken

5.4.1. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Zur Klonierung von DNA-Molekülen, Überprüfung von Plasmidkonstrukten und zur Konstruktion von Bakterienstämmen war eine Spaltung der DNA mit Restriktionsenzymen (Roche Diagnostics, Mannheim) erforderlich. Die Verwendung der Enzyme erfolgte dabei nach Angaben des Herstellers. Außerdem wurden die vom Hersteller zur Verfügung gestellten Puffer verwendet. Für einen analytischen Verdau wurde ein Ansatz von 10 µl mit 0,5 µg DNA und 5 U Enzym gewählt. Bei einer Restriktion im präparativen Maßstab umfasste das Reaktionsvolumen 50 µl und es wurden 1,5-2 µg DNA und 10-20 U Enzym eingesetzt. Die Ansätze wurden 2 h bei der für das betreffende Enzym optimalen Temperatur inkubiert.

5.4.2. Ligation und Dephosphorylierung

Ligationen wurden mit dem Rapid DNA-Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Vektor und Insert wurden dabei in einem molaren Verhältnis von 3:1 eingesetzt. Die Ansätze enthielten jeweils 50 ng Vektor-DNA und wurden 15-20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Um die Religation linearisierter Plasmide zu vermeiden, wurden diese mit alkalischer Shrimp Phosphatase (Amersham, Freiburg) am 5'-Ende dephosphoryliert. In einem Reaktionsvolumen von 50 µl wurden 1,5-2 µg DNA und 1 U Enzym eingesetzt. Die Ansätze wurden 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

5.5. Agarose-Gelelektrophorese

5.5.1. DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung und Größenbestimmung von DNA-Fragmenten, zur Abschätzung von DNA-Konzentrationen und zur Reinigung von DNA eingesetzt. Je nach Fragmentgröße wurden 0,8-4% ige (w/v) Agarosegele in TAE-Puffer (40 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,35 % (w/v) Essigsäure) hergestellt. TAE-Puffer diente auch als Elektrophorese-Puffer. Vor der elektrophoretischen Auftrennung wurden die DNA-Proben mit 6x Ladepuffer (0,25 % (w/v) Bromphenolblau in 40 % (v/v) Glycerin) versetzt. Zur Größenbestimmung und Mengenabschätzung wurden BstEII- oder HindIII-verdaute DNA des Phagen λ, sowie die DNA-Standards 100 bp DNA Ladder (GIBCO, Karlsruhe) und XVI (Roche,

Mannheim) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 75 - 85 Volt in einer horizontalen Gelapparatur des Typs Sub-Cell GT (Bio-Rad, Hercules, USA). Anschließend wurde die DNA mit Ethidiumbromid (0,5 mg/l) gefärbt, überschüssige Färbelösung mit destilliertem Wasser entfernt und das Gel unter UV-Licht mit einem Image Master VDS-System (Amersham Pharmacia, Freiburg) photographiert.

5.5.2. RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die Qualität isolierter RNA wurde mittels denaturierender Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Die Auftrennung der RNA-Proben erfolgte mit 1x MOPS-Puffer (10x MOPS-Puffer, Eppendorf, Hamburg) in 1 % (w/v) Agarose-Gelen, welche 17 % (v/v) Formaldehyd enthielten. Das eingesetzte Formaldehyd war zuvor mit Ionenaustauscher (AG 501-X8 (D) Resin 20-50mesh, Bio-Rad) deionisiert worden. Die RNA-Proben (0,5 µg) wurden vor der Elektrophorese in RNA Gel Loading Buffer (Eppendorf; versetzt mit 0,7 % (v/v) 10 mg/ml Ethidiumbromid-Lösung) aufgenommen, 10 min bei 65 °C erhitzt und danach 5 min auf Eis inkubiert. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit dem Image Master VDS-System (Amersham Pharmacia, Freiburg) unter UV-Licht photographiert.

5.6. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion wurde zur in vitro-Amplifizierung von DNA-Fragmenten und zur Überprüfung von Deletionsmutanten eingesetzt (Mullis & Faloona, 1987). Die Durchführung erfolgte mit dem Thermocycler Gene Amp PCR System 9700 (Perkin & Elmer). Das PCR-Programm bestand aus einer initialen Denaturierung (5 min, 95°C), 25-30 Zyklen mit Denaturierung (30 sec, 94°C), Primer-Anlagerung (30 sec, $T_M-4^\circ\text{C}$) und Elongation (1 min pro kb, 72°C), sowie einer abschließenden Elongation (5 min, 72°C). Die Elongationszeit richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments, wobei routinemäßig 1 min pro 1 kb berechnet wurde. Für die Primeranlagerung wurde eine Temperatur gewählt, die 4°C unter dem niedrigsten T_M -Wert der verwendeten Oligonukleotide lag. Der T_M -Wert ist abhängig von der Basenzusammensetzung der Primer und wurde anhand folgender Formel abgeschätzt: $T_M = 4x (G+C) + 2x (A+T)$. Für Routineamplifikationen wurde Taq-Polymerase (Qiagen, Hilden) verwendet. Der Standard-PCR-Ansatz enthielt 0,1 – 0,2 µg DNA; je 200 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP; je 100 pmol Oligonukleotide; 10 µl 10x-Puffer; 2,5 U DNA-Polymerase; H₂O ad 100 µl. Zur Vervielfältigung von Gensequenzen, die für weitere

Klonierungsschritte benötigt wurden und deshalb fehlerfrei sein mussten, wurde das Expand High Fidelity Kit (Roche, Mannheim) nach Angaben des Herstellers verwendet. Dieses enthält ein Gemisch aus Taq- und Pwo-Polymerase. Im Gegensatz zur Taq-Polymerase besitzt die Pwo-Polymerase aus *Thermococcus woesei* zusätzlich eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität zur Fehlerkorrektur.

5.6.1. Kolonie-PCR

Zur Überprüfung von Deletionsmutanten wurde Bakterienlysats als Matrize verwendet. Dabei wurden Zellen einer Einzelkolonie in 100 µl sterilem Wasser suspendiert. Durch 10-minütige Inkubation der Ansätze bei 95 °C wurden die Zellen aufgeschlossen und die zu analysierende DNA freigesetzt. Es wurden 1-2 µl des Bakterienlysats in der PCR-Reaktion eingesetzt.

5.7. Transformationstechniken

5.7.1. Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen (DH5α) erfolgte nach der Rubidiumchlorid-Methode (Hanahan, 1983). Dazu wurden mehrere Kolonien einer frischen LB-Platte in 1 ml SOB-Medium suspendiert und zum Animpfen einer 50 ml SOB-Kultur verwendet. Die Zellen wurden bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 kultiviert, 10-15 min auf Eis inkubiert und anschließend durch 15-minütige Zentrifugation bei 2650 g und 4 °C sedimentiert. Danach wurden die Zellen in 1/3 des ursprünglichen Volumens eiskalter RF1 Lösung (12 g/l RbCl₂; 15,6 g/l MnCl₂; 2 g/l CaCl₂; 2,9 g/l Kaliumacetat; 150 g/l Glycerin; pH 5,8; eingestellt mit Essigsäure) resuspendiert. Nach 15 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (15 min, 2650 g, 4 °C), in 1/12,5 des ursprünglichen Volumens eiskalter RF2 Lösung (2,1 g/l MOPS; 1,2 g/l RbCl₂; 11,0 g/l CaCl₂; 150 g/l Glycerin; pH 6,8; eingestellt mit NaOH) resuspendiert und 100 µl-Aliquots dieser Zellsuspension in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Zellen wurden bei -70 °C gelagert.

Zur Transformation wurden 100 µl der kompetenten Zellen mit 1-2 µl Plasmid-DNA oder einem Ligationsansatz vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach folgte ein Hitzeschock von 60 s bei 42 °C zur Unterstützung der DNA-Aufnahme. Anschließend wurden 500 µl LB-Medium zugegeben und die Zellen zur Regeneration und Ausprägung von Resistenzen für 45 min bei 37 °C regeneriert. Die Zellen wurden auf entsprechendem LB-Selektionsmedium ausplattiert.

5.7.2. Herstellung und Transformation elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen (MG1655) erfolgte nach der Methode von Dower *et al.* (1988). Dazu wurde eine 6 ml SOB-Kultur von einer frischen LB-Platte angeimpft und bis zum Erreichen von einer OD₆₀₀ von 0,5 – 0,6 kultiviert. Die Zellen wurden kurz auf Eis gekühlt, durch Zentrifugation (5 min, 2650 g, 4 °C) sedimentiert und 3x mit 10 ml eiskaltem 10 % (v/v) Glycerin gewaschen. Danach wurden die Zellen in 60 µl 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen und in 50 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Zellen wurden bis zu ihrer Verwendung bei – 70 °C gelagert.

Für die Elektroporation wurde ein Aliquot der elektrokompetenten Zellen mit der zu transformierenden DNA vermischt und in eine vorgekühlte, sterile Elektroporationsküvette (Molecular BioProducts Inc., San Diego, USA) gegeben. Die Elektroporation erfolgt in einem BioRAD GENE Pulser™ (Biorad, München) bei einem Parallelwiderstand von 200 Ω, einer Spannung von 2,5 kV und einer Kondensatorkapazität von 25 µF. Direkt nach der Elektroporation wurde 1 ml SOB-Medium auf die Zellen gegeben, die Zellsuspension in ein 1,5 µl Reaktionsgefäß überführt und zur Regeneration und Ausprägung von Resistenzen 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen auf entsprechendem LB-Selektionsmedium ausplattiert.

5.8. Konstruktion von Deletionsmutanten

Die Konstruktion von Deletionsmutanten erfolgte nach der Methode von Datsenko & Wanner (2000). Die Strategie dieser Methode beruht auf dem Austausch chromosomaler Sequenzen gegen eine Antibiotikaresistenzkassette, welche zuvor mittels PCR generiert wurde. Der Austausch erfolgt dabei über homologe Rekombination und wird durch das Rekombinationssystem des Phagen λ ermöglicht, welches zu diesem Zweck in dem entsprechenden *E. coli*-Stamm plasmidkodiert (pKD46) exprimiert wird. Zur Deletion eines Gens oder Operons in *E. coli* MG1655 wurde zunächst die Kanamycinresistenzkassette des pKD13-Plasmids, welche von zwei FRT-Bindestellen (FLP recognition target) begrenzt wird, mittels PCR amplifiziert. Dazu wurden Primer verwendet, die eine etwa 50 bp lange Sequenz homolog zu den 5'- und 3'-flankierenden Bereichen der zu deletierenden Gene enthielten (s. Anhang). Die PCR-Produkte wurden mit dem PCR-Purification-Kit (Qiagen, Hilden) gereinigt, zum Entfernen nicht amplifizierter DNA mit *DpnI* verdaut und anschließend über ein präparatives Agarosegel erneut gereinigt. Anschließend erfolgte die Transformation elektrokompetenter MG1655 (pKD46)-Zellen mit dem linearen Deletionskonstrukt. Die

Ansätze wurden auf LB-Medium mit Kanamycin ausplattiert. Positive Klone wurden selektioniert und der Austausch der chromosomalen Gensequenz gegen die Antibiotikaresistenzkassette mittels Kolonie-PCR überprüft. Später wurde die Resistenz-kassette in einem zweiten Rekombinationsschritt wieder entfernt. Dieser erfolgte mit Hilfe einer FLP-Rekombinase der Hefe, welche ebenfalls plasmidkodiert (pCP20) exprimiert wurde. Dazu wurden die *E. coli*-Stämme mit dem pCP20-Plasmid transformiert und zur Selektion positiver Klone auf LB-Medium mit Ampicillin ausplattiert. Die Eliminierung der Resistenz-kassette wurde ebenfalls mittels PCR nachgewiesen. Zur Entfernung der Plasmide pCP20 und pKD46, welche einen temperatursensitiven Replikationsursprung besitzen, wurden die Deletionsmutanten nochmals bei 37 °C kultiviert. Die Eliminierung der Plasmide wurde dadurch bestätigt, dass die Mutanten nicht mehr in der Lage waren, auf Medium zu wachsen, welches Ampicillin enthielt.

5.9. DNA-Sequenzierung und computergestützte Sequenzanalyse

Die Sequenzierung von PCR-Produkten und klonierter DNA erfolgte nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* (1977) und wurde von der Firma AGOWA GmbH durchgeführt.

Zum Editieren der Sequenzdaten, zur Erstellung von Plasmidkarten und zur Analyse von Restriktionsschnittstellen wurde das Programm Clone Manager für Windows (Version 5.02, Scientific & Educational Software, Durham, USA) verwendet. Sequenzalignments wurden mit dem Programm BLAST2 des National Center of Biotechnology Information (NCBI, Washington, USA) durchgeführt.

6. Biochemische Methoden

6.1. Zellaufschluss und Fraktionierung

6.1.1. Herstellung von Enzymrohextrakten

Zur Bestimmung von Enzymaktivitäten wurden die verschiedenen *E. coli*-Stämme unter aeroben Bedingungen im Fermenter kultiviert (s. Abschnitt 4.2.), die Zellen während der exponentiellen Phase (OD_{600} 0,50-0,64) durch Zentrifugation geerntet, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -70 °C gelagert. Später wurden Zellen aus 50 – 200 ml Kultur 2x mit dem jeweiligen Aufschlusspuffer gewaschen und anschließend in 1,5 ml

Aufschlusspuffer resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch 1-2malige Passage durch eine French-Press-Zelle (FA-003, Thermo Spectronic Corp., Cambridge, UK) bei 10000 Psi. Anschließend wurden nicht aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer durch Zentrifugation (1 h, 4 °C, 13230 g) sedimentiert und die Überstände direkt zur Enzymaktivitätsbestimmung eingesetzt.

6.1.2. Herstellung von Zellextrakten für die Protein-Affinitätsreinigung

Für die Affinitätsreinigung von Proteinen mit Dynabeads (DynaL A. S., Oslo) wurde der *E. coli* Wildtyp-Stamm MG1655 unter aeroben Bedingungen im Fermenter kultiviert (s. Abschnitt 4.2.), die Zellen während der exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{600}=0,6$) durch Zentrifugation geerntet, bei -70 °C tiefgefroren und bis zu ihrer Verwendung bei dieser Temperatur gelagert. Später wurden Zellen aus insgesamt 10 l Kultur (ca. 8 g Feuchtgewicht) mit 100 ml TGED-Puffer (20 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,5; 1 mM EDTA; 10 % (v/v) Glycerin, 0,01 % (v/v) Triton X-100; 1mM DTT (frisch zugesetzt); 100 mM NaCl) gewaschen, danach in 10 ml TGED-Puffer resuspendiert und 1 mM PMSF und DFP (Proteaseinhibitoren) zugegeben. Der Aufschluss erfolgte durch zweimalige Passage durch eine French-Press-Zelle (FA-003, Thermo Spectronic Corp., Cambridge, UK) bei 10000 Psi. Nicht aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (1 h, 4 °C, 27000 g) abgetrennt. Der Überstand wurde unmittelbar für die Affinitätsreinigung eingesetzt.

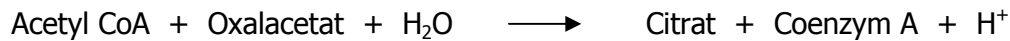
6.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Zellextrakten erfolgte nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976) mit dem Bradford-Reagenz von Sigma, welches den Farbstoff Coomassie Brilliantblau G250 gelöst in Methanol und Phosphorsäure enthält. Coomassie Brilliantblau G250 bindet unspezifisch sowohl an kationische als auch an nichtpolare, hydrophobe Seitenketten von Proteinen. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm zu 595 nm. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 50 µl Probe (evtl. vorverdünnt) mit 1,5 ml Bradford-Reagenz versetzt, die Ansätze 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und die entstandenen Brilliantblau G-Komplexe photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm detektiert. Zur Quantifizierung wurde eine Eichgerade mit Rinderserumalbumin erstellt.

6.3. Messung von Enzymaktivitäten

6.3.1. Bestimmung der Citratsynthase-Aktivität

Die Citratsynthase katalysiert die Kondensation von Acetyl-CoA und Oxalacetat zu Citrat. Der Nachweis der Enzymaktivität erfolgte nach einer Methode von Weitzman (1969).



Bei dieser Methode wurde das in der Citratsynthase-Reaktion gebildete Coenzym A mit 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB, Ellman's Reagenz) unter Freisetzung eines gelben NTB-Anions zu einem thioveresterten CoA-Derivat umgesetzt. Die Bildung des NTB-Anions wurde bei 412 nm photometrisch erfasst. Der Testansatz enthielt 100 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM Acetyl-CoA; 10 mM Oxalacetat; 10 mM DTNB und Rohextrakt in einem Volumen von 1 ml. Die Reaktion wurde mit Oxalacetat gestartet. Die Durchführung des Enzymtests erfolgte bei 37 °C. Folgender Extinktionskoeffizient wurde verwendet: $\epsilon_{412\text{nm}} = 13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

6.3.2. Bestimmung der α -Ketoglutaratdehydrogenase-Aktivität

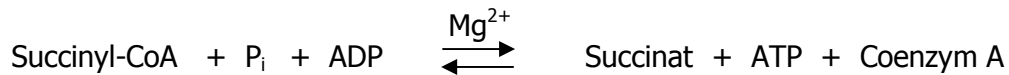
Die α -Ketoglutaratdehydrogenase katalysiert die Decarboxylierung von α -Ketoglutarat zu Succinyl-CoA. Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurde eine Methode von Guest & Creaghan (1973) angewendet.



Der Testansatz enthielt 120 mM Tris-HCl pH 8,5; 15 mM α -Ketoglutarat; 3 mM L-Cystein-HCl; 1,8 mM Thiamindiphosphat (TPP); 0,2 mM CoA; 1,6 mM 3-Acetyl-NAD und Zellextrakt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von α -Ketoglutarat gestartet und die Bildung des NADH-Analogons 3-Acetyl-NADH durch Messung der Extinktionszunahme bei 363 nm verfolgt. Der Enzymtest wurde bei 37 °C durchgeführt. Der Extinktionskoeffizient für 3-Acetyl-NADH wurde experimentell bestimmt und betrug $\epsilon_{363\text{nm}} = 6,19 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

6.3.3. Bestimmung der Succinyl-CoA-Synthetase-Aktivität

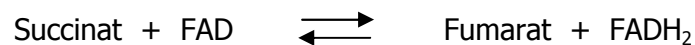
Die Succinyl-CoA-Synthetase katalysiert die Umsetzung von Succinyl-CoA zu Succinat. Die Enzymaktivitätsbestimmung erfolgte nach der Methode von Bridger (1969).



Dabei wird die Rückreaktion gemessen und die Bildung von Succinyl-CoA durch photometrische Detektion der Thioester-Bindungsbildung bei 230 nm erfaßt. Der Testansatz enthielt: 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,2; 100 mM KCl; 0,1 mM MgCl₂; 40 mM Succinat; 0,4 mM ATP und Zellextrakt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von CoA gestartet. Die Durchführung des Enzymtests erfolgte bei 37 °C. Folgender Extinktionskoeffizient wurde verwendet: $\epsilon_{230\text{nm}} = 4,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

6.3.4. Bestimmung der Succinatdehydrogenase-Aktivität

Die Succinatdehydrogenase katalysiert die Oxidation von Succinat zu Fumarat. Die Enzymaktivität wurde nach der Methode von Spencer & Guest (1973) bestimmt.



Hierbei erfolgte der Nachweis der Succinatdehydrogenase-Aktivität durch Reduktion des künstlichen Elektronenakzeptors 2,6-Dichlorphenolindophenol (DCPIP) zur farblosen Form. In oxidiertem Zustand liegt DCPIP als blauer Farbstoff vor. Die Farbveränderung konnte durch photometrische Messung der Extinktionsabnahme bei einer Wellenlänge von 600 nm erfasst werden. PMS fungierte als intermediärer Elektronenüberträger. Der Testansatz enthielt 100 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,4; 20 mM Succinat; 2,2 mM PMS; 3,3 mM KCN; 0,23 mM DCPIP und Zellextrakt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von DCPIP gestartet. Die Durchführung des Enzymtests erfolgte bei 37°C. Der Extinktionskoeffizient von DCPIP war $\epsilon_{600\text{nm}} = 21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

6.4. Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA)

Die TCA-Fällung wurde zur Aufkonzentrierung von Proteinen eingesetzt. Die Proben wurden ad 20% (v/v) mit Trichloressigsäure versetzt und die Ansätze zum Fällern der Proteine 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die gefällten Proteine durch Zentrifugation (13230 g, 15 min, 4 °C) sedimentiert, das Pellet mit 0,5 ml Aceton gewaschen, und nach erneuter Zentrifugation (15 min, 13230 g, 4 °C) in der Vakuumzentrifuge (Concentrator 5301, Eppendorf AG, Hamburg) getrocknet. Danach wurden die Proteine in 20 µl TE-Puffer gelöst.

6.5. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen mittels denaturierender SDS-Gelelektrophorese wurde das NuPAGE Bis-Tris Gelsystem (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Es handelt sich dabei um ein diskontinuierliches System ähnlich dem von Laemmli (1970). Die Proben wurden mit DTT (NuPAGE Reducing Agent, Invitrogen) und Probenpuffer (NuPAGE LDS Sample Buffer Invitrogen) versetzt, 10 min bei 70 °C denaturiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in einer Xcell SureLock Mini-Cell (Invitrogen) bei einer konstanten Stromstärke von maximal 35 mA durchgeführt. Der Laufpuffer enthielt 50 mM MOPS; 50 mM Tris; 0,1 % (w/v) SDS, 1 mM EDTA). Zur Größenabschätzung wurde der vorgefärbte Standard See Blue II (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

6.5.1 Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen

6.5.1.1 kolloidale Coomassie-Färbung

Zur Färbung von Proteinen mit kolloidalem Coomassie wurde die Fertiglösung Gel Code[®] Blue Stain Reagent (Pierce, Rockford, USA) verwendet. Die SDS-Gele wurden nach der Elektrophorese dreimal 15 min in destilliertem Wasser gewaschen, 1 h in der Färbelösung inkubiert und anschließend überschüssiger Farbstoff wieder durch Waschen mit destilliertem Wasser (4-16 h) entfernt.

6.5.1.2 Silberfärbung

Bei Anwendung der Silberfärbung, welche deutlich empfindlicher als die Coomassie-Färbung ist, wurden die Proteine zunächst im Gel fixiert. Dazu wurden die SDS-Gele 30 min in

Fixierlösung (40 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Eisessig und 0,02 % (v/v) Formaldehyd) inkubiert und anschließend zweimal 10 min mit 40 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach 1-minütiger Inkubation in Thiosulfat-Lsg. (0,02 % (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$) und kurzem Waschen mit destilliertem Wasser (3x 20 sec) wurden die Gele dann 15 min in einer Silbernitrat-Lsg. (0,2 % (w/v) AgNO_3 , 0,03 % (v/v) Formaldehyd) inkubiert. Die Entwicklung erfolgte in 6 % (w/v) NaCO_3 , 0,0004 % (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ und 0,02 % (v/v) Formaldehyd. Nach ausreichender Färbung wurden die Gele 2x kurz mit destilliertem Wasser gespült und sofort 10 min in einer Stopplösung (50 mM EDTA) inkubiert.

6.6. Reinigung von Proteinen

6.6.1. Affinitätschromatographie mittels Dynabeads® Streptavidin

Zur Identifizierung von DNA-bindenden Proteinen, die mit der Promotorregion des *sdhC* Gens interagieren, wurde die Ziel-DNA-Sequenz über Biotin an Streptavidin-beschichtete paramagnetische Beads gebunden und eine Affinitätsreinigung durchgeführt. Dabei wurden Dynabeads® M-280 Streptavidin (DynaL A. S., Oslo) verwendet. Die Biotinylierung der *sdh*-Promotorregion erfolgte mittels PCR. Dazu wurden die Primer *sdh*-pr-for (biotinyliert) und *sdh*-pr-rev (s. Anhang) verwendet. Die PCR-Produkte wurden anschließend mit Hilfe von Microcon YM-30 Mikrokonzentratoren gereinigt und aufkonzentriert (s. Abschnitt 5.3.). Zur Kopplung der biotinylierten *sdh*-Promotorregion an die Dynabeads wurden 5 mg der Streptavidin-beschichteten Beads (Bindungskapazität: ~ 110 pmol eines 100 bp langen DNA-Fragments pro mg Beads) und 160 pmol des biotinylierten Promotor-Fragments eingesetzt. Die Dynabeads wurden zweimal mit einem Ausgangsvolumen B+W-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 2 M NaCl) gewaschen. Dies erfolgte durch Sedimentation in einem Dynal MPC-1 Magnethalter und anschließende Resuspension bei Raumtemperatur. Auch alle nachfolgenden Waschschrte wurden auf diese Weise durchgeführt. Danach wurden die Dynabeads in einem Volumen B+W-Puffer resuspendiert, welches demjenigen der biotinylierten DNA-Fragmente entsprach, in ein 15 ml Falcon überführt, die DNA-Fragmente zugesetzt und der Ansatz 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert, so dass die Dynabeads nicht sedimentierten. Anschließend wurde der Ansatz in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, dreimal mit je einem Ausgangsvolumen (bezogen auf die eingesetzte Menge Dynabeads M-280 Streptavidin) B+W-Puffer gewaschen und schließlich in einem Ausgangsvolumen TGED-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA; 10 % (v/v)

Glycerin; 1 mM DTT (frisch zugesetzt); 0,01 % (v/v) Triton X-100; 100 mM NaCl) aufgenommen.

Für die Affinitätsreinigung wurde ein *E. coli*-Proteinextrakt (s. Abschnitt 6.1.) mit den DNA-beladenen Dynabeads und 500 µg chromosomaler *E. coli*-DNA als Kompetitor in einem 50 ml Falcon gemischt und 45 min unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Ansatz schrittweise in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, einmal mit TGED-Puffer, zweimal mit TGED-Puffer und jeweils 400 µg chromosomaler *E. coli*-DNA als Kompetitor und anschließend ein weiteres Mal mit TGED-Puffer gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden dann in zwei Schritten mit jeweils 350 µl Elutionspuffer (TGED-Puffer mit 2 M NaCl) eluiert. Die Eluate wurden vereint, die Proteine mit Trichloressigsäure gefällt (s. Abschnitt 6.4.) und anschließend in 30 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,6) gelöst.

Die DNA-beladenen Dynabeads wurden zur Regeneration zweimal mit 500 µl Elutionspuffer und dreimal mit 500 µl B+W-Puffer gewaschen, abschließend in TGED-Puffer (10 mg/ml Dynabeads Endkonzentration) aufgenommen und bei 4 °C gelagert.

6.7. MALDI-TOF-Massenspektrometrie

6.7.1. Tryptischer in-Gel-Verdau von Proteinen

Die Identifizierung von Proteinen erfolgte mittels Peptidmassen-"Fingerprint"-Analyse (Schaffer, 2001). Dazu wurden Banden aus SDS-Gelen mit einem Skalpell ausgeschnitten, in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und die Proteine anschließend im Gel mit Trypsin verdaut (Fountoulakis & Langen, 1997). Die Gelstücke wurden durch mehrmaliges Waschen mit 750 µl 30 % (v/v) Acetonitril in 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat entfärbt und anschließend 20 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Dann wurden die Gelstücke 30 min in 5 µl 3 mM Tris-HCl, pH 8,8 mit Trypsin (10 ng/µl Endkonzentration) rehydratisiert und nach Zugabe von 6 µl 3 mM Tris-HCl, pH 8,8 über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die zu unterschiedlich großen Peptidfragmenten abgebauten Proteine wurden durch Zugabe von 12 µl H₂O, 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur, Zugabe von 10 µl 30 % (v/v) Acetonitril mit 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure und weitere 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur aus den Gelstücken eluiert. Die Proben wurden direkt analysiert.

6.7.2. Erstellung von Peptidmassen-Fingerprints

Die Analyse der Proben erfolgte in einer Voyager-DE STR Biospektrometry Workstation (Applied Systems, Weiterstadt). Für die Messung wurden 0,5 µl der Peptidlösung zusammen mit 0,5 µl einer gesättigten α -Cyano-4-hydroxy-trans-Zimtsäurelösung (Matrix) in 50 % (v/v) Acetonitril und 0,25 % (v/v) Trifluoressigsäure auf eine Probenplatte gegeben. Eine externe Kalibrierung erfolgte mit den Calibration Mixtures 1 und 2 des Sequazyme Peptide Mass Standard Kits (Applied Biosystems, Weiterstadt). Die Analyse wurde im positiven Reflektormodus mit 20 kV Beschleunigungsspannung, 63 % Gitterspannung und einer Verzögerungszeit von 125 ns durchgeführt. Zur Steuerung der Voyager-DE STR Biospektrometry Workstation und zur Datenanalyse wurden die Voyager Control Panel Software 5.0 und die Voyager Data Explorer Software 3.5 (Applied Biosystems, Weiterstadt) verwendet. Die erhaltenen Peptidmassen wurden mit einer Datenbank abgeglichen: Eine sichere Identifizierung konnte angenommen werden, wenn mindestens vier Peptidmassen mit den vorhergesagten Peptidmassen übereinstimmten und die Unterschiede zwischen gemessener und theoretischer Masse maximal 100 ppm betrugen.

6.8. HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

6.8.1. Bestimmung von Aminosäuren

Die quantitative Bestimmung von Aminosäuren in Kulturüberständen erfolgte mittels reversed-phase HPLC. Dafür wurden von den jeweiligen Kulturen zu entsprechenden Zeitpunkten Proben entnommen und die Zellen durch Zentrifugation abgetrennt. (10 min, 13230 g). Die Überstände wurden zur Inaktivierung noch eventuell vorhandener Enzymaktivitäten für 15 min bei 80 °C inkubiert und entweder direkt zur Analyse eingesetzt oder bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C tiefgefroren. Für die Messungen wurde ein HPLC-Gerät der Serie HP1100 (Hewlett Packard, Waldbronn) mit angeschlossenem Fluoreszenzdetektor (G1321A) eingesetzt. Vor der chromatographischen Auftrennung wurden die zu bestimmenden Aminosäuren mit *ortho*-Phthaldialdehyd derivatisiert (Lindroth & Mopper, 1979), indem 1 µl der Probe mit 20 µl *ortho*-Phthaldialdehyd/2-Mercaptoethanol-Fertigreagenz (Pierce, Rockford, USA) in einem automatisierten Vorgang gemischt und 1 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Die entstandenen, fluoreszierenden, thio-substituierten Isoindole, wurden über einen Gradienten mit zunehmender Methanolkonzentration (unpolare Phase) in einer hintereinandergeschalteten Kombination aus Vorsäule (LiChrospher 100RP18EC- 5 µm, 40 x 4 mm) und Hauptsäule (LiChrospher

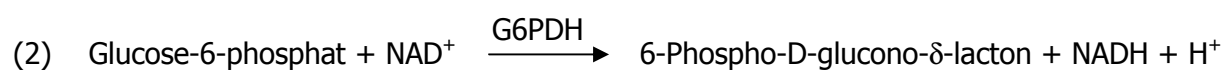
100RP18EC- 5 μm , 125 x 4 mm, CS-Chromatographie Service GmbH Langerwehe) aufgetrennt. Das polare Eluent war Natriumacetat (0,1 M, pH 7,2). Die Flussrate betrug 0,3-0,8 ml/min. Die Detektion der derivatisierten Aminosäuren erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 230 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm. Systemsteuerung und Datenauswertung wurden mit dem Programm HP Chemstation (Hewlett Packard, Waldbronn) durchgeführt. Die Aminosäurekonzentration der analysierten Probe wurde über den Vergleich mit einem externen Standard und Asparagin als internem Standard berechnet.

6.8.2. Bestimmung von organischen Säuren

Zur Bestimmung organischer Säuren in Kulturüberständen wurde ein HPLC-System der Serie 1100 von Agilent (Waldbronn) eingesetzt. Die Probenauftrennung erfolgte isokratisch über eine Aminex HPX-87-H-Säule (300 x 7,8 mm, BioRad, München) nach dem Ionenausschlußprinzip. Als mobile Phase wurde 6 mM Schwefelsäure verwendet. Die Systemsteuerung und Datenauswertung wurden mit der HP-Chem-Station Software (Agilent, Waldbronn) ausgeführt.

6.9. Enzymatische Bestimmung von Glucose und Acetat

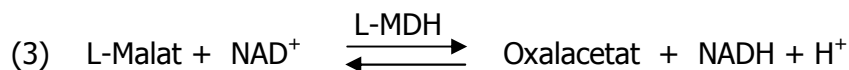
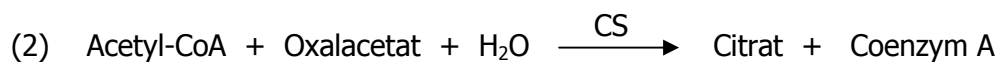
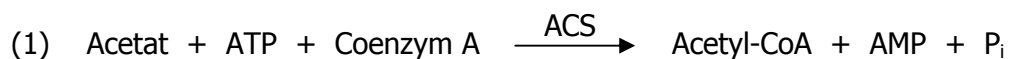
Die enzymatische Bestimmung der Glucosekonzentration in Kulturüberständen erfolgte modifiziert nach Bergmeyer (Bergmeyer, 1985). Die Glucose wurde dabei in einem gekoppelten Test zuerst durch eine Hexokinase (HK) aus Hefe (Roche, Mannheim) in Gegenwart von ATP zu Glucose-6-phosphat umgesetzt (1). In Gegenwart der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (G6PDH) aus *Leuconostoc mesenteroides* (Roche, Mannheim) und NAD^+ erfolgte dann die Oxidation von Glucose-6-phosphat zu 6-Phospho-D-glucono- δ -lacton (2).



Die dabei gebildete Menge an NADH war der umgesetzten Glucosemenge direkt proportional und konnte photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm erfasst werden. Der Test

wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt und mit dem Mikrotiterplattenphotometer Spectra Max Plus (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) gemessen. Ein Testansatz enthielt 50 mM Tris-Maleat-Puffer (12,1 g/l Tris; 11,6 g/l Maleinsäure, pH 6,8; eingestellt mit NaOH); 1 mM ATP; 1 mM NAD^+ ; 1,5 U Hexokinase; 0,75 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und 40 μl Probe in einem Reaktionsvolumen von 300 μl . Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit Hilfe einer Eichgeraden, die anhand verschiedener Glucose-Standardkonzentrationen (0,1-1,5 mM) und für jede Mikrotiterplatten-Messung neu erstellt wurde.

Die enzymatische Bestimmung der Essigsäurekonzentration in Kulturüberständen erfolgte unter Verwendung eines Essigsäure-Testkits (R-Biopharm AG, Darmstadt) nach Beutler (1984). Der Test beruht auf der Umsetzung von Essigsäure zu Acetyl-CoA durch das Enzym Acetyl-CoA-Synthetase (ACS) in Gegenwart von ATP und Coenzym A (1). In einer nachgeschalteten Reaktion wird das gebildete Acetyl-CoA in Gegenwart von Oxalacetat durch die Citratsynthase (CS) unter Freisetzung von CoA zu Citrat kondensiert (2). Das für diese Reaktion benötigte Oxalacetat wird von der L-Malatdehydrogenase (L-MDH) aus L-Malat in Anwesenheit von NAD^+ gebildet (3).



Dabei wird NAD^+ zu NADH reduziert, welches photometrisch bei 340 nm detektiert werden kann und proportional zur Essigsäurekonzentration ist. Der Test wurde ebenfalls in Mikrotiterplatten durchgeführt und mit dem Mikrotiterplattenphotometer Spectra Max Plus (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) gemessen. Dementsprechend wurde das Testvolumen angepasst und auf 0,323 ml reduziert. Die einzelnen Testkomponenten wurden in den vom Hersteller vorgegebenen Konzentrationen eingesetzt. Für den Test wurden die benötigten Enzym- und Substratlösungen mit dem Puffer vermischt, auf die Mikrotiterplatte verteilt und die Reaktion durch Zugabe von 40 μl Probe gestartet. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit Hilfe einer Eichgeraden, die anhand mehrerer Essigsäure-Standardkonzentrationen (0,02-0,15 g/l) und für jede Mikrotiterplatten-Messung neu erstellt wurde.

7. Spektroskopische Methoden

7.1. Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektroskopie wurde zur quantitativen Bestimmung des "Grün fluoreszierenden Proteins" (GFP_{uv}, Clontech Inc., Mountain View, USA) eingesetzt, welches in verschiedenen *E. coli*-Stämmen als Modellprotein heterolog exprimiert wurde. Dazu wurden Kulturproben zu entsprechenden Zeitpunkten entnommen und deren Fluoreszenz bestimmt. Die Messungen erfolgten mit einem LS50 B Lumineszenz Spektrometer (Perkin Elmer) bei einer Excitations- und Emissionswellenlänge von 395 nm bzw. 509 nm und wurden von Dr. Peter Klauth am ICG IV (Forschungszentrum Jülich) durchgeführt. Die für eine Probe erhaltenen Fluoreszenzwerte wurden ins Verhältnis zur Zellzahl (s. Abschnitt 4.3.3.) gesetzt, um die Werte miteinander vergleichen zu können.

7.2. ¹H-NMR-Spektroskopie

Zur Identifizierung organischer Säuren und anderer Stoffwechselprodukte in Kulturüberständen wurde die ¹H-NMR-Spektroskopie eingesetzt. Dafür wurden 40 ml der jeweiligen *E. coli*-Kulturen zu entsprechenden Zeitpunkten entnommen und die Zellen durch Zentrifugation (4 °C, 10 min, 2650 g) abgetrennt. Die Kulturüberstände wurden sterilfiltriert, bei -70 °C tiefgefroren und lyophilisiert. Die NMR-Analysen wurden von Frau Dr. S. Willbold (Zentralabteilung für chemische Analysen, Forschungszentrum Jülich) durchgeführt. Die Aufnahme der Spektren erfolgte mit einem AMX-400 WB NMR-Spektrometer (Bruker, Karlsruhe), welches mit einer Varian Inova Konsole und einem 5 mm Auto-X-PFG ¹H-NMR-Probenkopf ausgestattet war. Die Messungen wurden bei einer Frequenz von 400 MHz durchgeführt. Es wurden 5 mm Probenröhrchen (Norell, Mays Landing, USA) verwendet, welche die lyophilisierten Proben in 700 µl D₂O resuspendiert enthielten.

8. DNA-Chip-Technologie

8.1. Herstellung von *E. coli* DNA-Chips

Die zur globalen Genexpressionsanalyse verwendete DNA-Chip-Technologie und das Robotersystem zur Herstellung der DNA-Chips beruhten auf dem an der Stanford-Universität entwickelten System (Shalon *et al.*, 1996), welches am Institut für Biotechnologie etabliert worden ist (Polen & Wendisch, 2004). Detaillierte Protokolle sind im Internet verfügbar

(Brown, The Mguide; <http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide/index.html>). Zur Herstellung der DNA-Chips wurden PCR-Produkte von 4108 *E. coli* - Genen und verschiedene Kontrollen (genomische DNA von *E. coli*, λ -DNA, PCR-Produkte von Genen aus *C. glutamicum*) auf polylysinbeschichtete Glasobjektträger aufgebracht. Die Amplifizierung der *E.coli* -Gene wurde von D. Rittmann durchgeführt. Sie erfolgte mittels PCR in 96-well Mikrotiterplatten ausgehend von genomischer DNA aus *E. coli* MG1655 mit spezifischen Primerpaaren (ORFmer Primer Set, Genosys Biotechnologies, Cambridgeshire, England). Die Qualität der PCR-Produkte wurde durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Die Glasobjektträger (Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen), welche für die Immobilisierung der DNA bestimmt waren, wurden mit einer Mischung aus 57 % (v/v) Ethanol und 25 % (w/v) Natriumhydroxid gereinigt, mit 17 % (w/v) Poly-L-Lysin beschichtet, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Die PCR-Produkte wurden mit Isopropanol gefällt, in 3x SSC (20x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0) resuspendiert, in 384-well Mikrotiterplatten transferiert und mit Hilfe eines computergesteuerten Robotersystems (<http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide/index.html>) an definierten Positionen auf die beschichteten Objektträger aufgebracht. Anschließend wurden die DNA-Chips im Exsikkator gelagert, um Alterungsprozesse zu verlangsamen.

8.2. Chemische und thermische Nachbehandlung von DNA-Chips

Die DNA-Chips wurden vor ihrer Verwendung chemisch und thermisch nachbehandelt, um freie ϵ -Aminogruppen der mit Poly-L-Lysin beschichteten Oberfläche abzusättigen sowie die DNA auf dem Chip zu immobilisieren und zu denaturieren (Khodursky *et al.*, 2003). Dazu wurde die aufgebrachte DNA zunächst in einer Feuchtigkeitskammer über einer 1x SSC-Lösung rehydratisiert und anschließend bei 100 °C für mehrere Sekunden getrocknet, so dass bei der Hybridisierung gleichmäßigere und größere Signale erzielt werden konnten. Danach wurde die DNA durch UV-Bestrahlung mit 650 μ J (Stratalinker, Stratagene, La Jolla, USA) kovalent mit der Poly-L-Lysinbeschichtung vernetzt. Freie ϵ -Aminogruppen von Poly-L-Lysinmolekülen wurden durch Derivatisierung mit 180 mM Bernsteinsäureanhydrid blockiert, um eine unspezifische Bindung der fluoreszenzmarkierten Sonden zu verhindern. Zur Denaturierung der DNA-Doppelstränge wurden die DNA-Chips für 1,5 min in 95 °C heißem Wasser inkubiert und die einzelsträngige DNA durch kurze Inkubation in kaltem 96% igem (v/v) Ethanol fixiert. Nach der Trocknung durch Zentrifugation (5 min, 50 xg) wurden die DNA-Chips bis zur Hybridisierung in einem Exsikkator gelagert.

8.3. Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden

Zum Vergleich globaler Genexpressionsmuster wurden fluoreszenzmarkierte cDNA-Sonden ausgehend von gleichen Mengen der zu analysierenden RNA-Proben synthetisiert. Die reverse Transkription erfolgte mit Hilfe der RNA-abhängigen DNA-Polymerase Superscript II (Invitrogen, Karlsruhe). Für die Fluoreszenzmarkierung wurden die dUTP-Analoga FluoroLink Cy3-dUTP oder Cy5-dUTP ($\lambda_{\text{Ex max}}$ 550 nm, $\lambda_{\text{EM max}}$ 570 nm, grünfluoreszierend oder $\lambda_{\text{Ex max}}$ 649 nm, $\lambda_{\text{EM max}}$ 670 nm, rotfluoreszierend; Amersham Pharmacia, Freiburg) verwendet. Der Reaktionsansatz enthielt 20-25 µg RNA, 500 ng Zufalls-Hexamerprimer (Invitrogen), 1 mM Cy3-dUTP oder Cy5-dUTP, dNTPs (500 µM dATP, dGTP, dCTP, 200 µM dTTP; Invitrogen), Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT) und 400 Units reverse Transkriptase Superscript II. Nach Synthese der cDNA wurde die RNA durch Zugabe von NaOH (33 mM) hydrolysiert und die Probe mit HCl (33 mM) wieder neutralisiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden mit Hilfe von Microcon YM-30-Säulen (Millipore, Schwalbach) abgetrennt. Bei zwei weiteren Reinigungsschritten mit den Microcon-Säulen wurden die fluoreszenzmarkierten Sonden vereinigt, aufkonzentriert und konnten direkt zur DNA-Chip-Hybridisierung eingesetzt werden (Khodursky *et al.*, 2003).

8.4. DNA-Chip-Hybridisierung

Zur Bestimmung relativer mRNA-Spiegel wurden die fluoreszenzmarkierten Sonden (siehe 8.3.) auf einem DNA-Chip hybridisiert. Zur Verringerung unspezifischer Hintergrundfluoreszenz wurde 1,2 µg poly(A) als Kompetitor zu den vereinigten Sonden gegeben (Khodursky *et al.*, 2003). Danach wurde der Sondenmix zur Sicherung stringenter Bedingungen in 3x SSC mit 30 mM HEPES (pH 7,0) aufgenommen und zur Verringerung der Oberflächenspannung 0,3 % (w/v) SDS zugegeben. Der Ansatz wurde 2 min bei 100 °C denaturiert und nach dem Abkühlen (5-10 min) zur Hybridisierung eingesetzt. Um eine gleichmäßige Verteilung der Sonde auf dem DNA-Chip zu gewährleisten, wurde vor der Hybridisierung ein Spezialdeckgläschen auf dem DNA-Chip über dem Bereich der immobilisierten DNA platziert. Die vorbereitete Sonde wurde unter das Deckglas pipettiert und der DNA-Chip in einer Hybridisierungskammer (Die Tech, Inc., USA) für 12-16 h bei 65 °C inkubiert (Zimmer *et al.*, 2000). Nach der Hybridisierung wurden die DNA-Chips in 1x SSC mit 0,03 % SDS und anschließend in 0,05x SSC gewaschen, um unspezifisch gebundene, fluoreszenzmarkierte DNA zu entfernen. Die DNA-Chips wurden durch Zentrifugation getrocknet (5 min, 50 xg) und konnten dann ausgewertet werden (s. Abschnitt 8.5.).

8.5. Messung und Quantifizierung der Fluoreszenz von Hybridisierungssignalen

Zur Bestimmung relativer mRNA-Spiegel wurden die Cy3- und Cy5-Fluoreszenz der Hybridisierungssignale auf dem DNA-Chip gemessen. Diese korrelierte direkt mit der Menge gebundener, fluoreszenzmarkierter Sonde. Die Messung orts aufgelöster Fluoreszenzintensitäten erfolgte mit einem GenePix 4000 Laserscanner (Axon, Inc., Union City, Kalifornien, USA). Die Anregung von Cy3-dUTP und Cy5-dUTP erfolgte mit monochromatischem Licht von 532 nm (Messung der Emission bei 570 nm) bzw. 635 nm (Emission bei 670 nm). Die emittierte Fluoreszenz wurde mit lichtempfindlichen Kathoden detektiert, in einen elektrischen Strom umgewandelt und weiter verstärkt. Mit Hilfe der GenePix Pro 3.0. Software wurde die Information für die Cy3- und Cy5-Fluoreszenzen anhand der numerischen Werte als Fluorogramm bildlich dargestellt und im 16-bit-TIFF-Format elektronisch gespeichert. Die Fluorogramme wurden anschließend mit der Software GenePix Pro 3.0. quantitativ analysiert. Für jedes detektierbare Hybridisierungssignal wurde dabei die Hintergrundfluoreszenz von der Signalfluoreszenz subtrahiert und das Verhältnis der mittleren Cy5- (rot) / Cy3- (grün) Nettofluoreszenz bestimmt. Die auf diese Weise ermittelten Quotienten stellten ein Maß für die relativen mRNA-Spiegel dar. Um Unterschiede bei Einbau und Stabilität der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe ausgleichen zu können, wurden die Daten durch Multiplikation mit einem konstanten Faktor so normiert, dass der durchschnittliche Quotient der Cy5- und Cy3-Fluoreszenzen der genomischen DNA von *E. coli* den Wert 1 erhielt. Außerdem wurden für alle Berechnungen nur solche Signale berücksichtigt, deren Fluoreszenzintensität für wenigstens eine Wellenlänge mindestens dreifach über dem Hintergrund lag. Zusätzlich mussten die Signale optisch deutlich zu erkennen sein.

8.6. Archivierung von DNA-Chip-Daten

Alle DNA-Chip-Daten, Fluorogramme und relevanten Informationen zur Durchführung der DNA-Chip-Experimente wurden mit Hilfe einer von Dr. T. Polen entwickelten Software (Polen & Wendisch, 2004) erfasst und auf dem Linux-Zentralrechner des Instituts in einer MySQL-Datenbank (frei erhältliche relationale Datenbank; MySQL AB Company, Uppsala, Schweden, <http://www.mysql.com>) gespeichert. Auf diese Weise standen die Daten über das institutsinterne Computernetzwerk für weitere Analysen zur Verfügung.

III. Ergebnisse

1. Untersuchungen zur zentralen Bedeutung des TCA-Zyklus für die aerobe Acetatbildung

Die aerobe Acetatbildung in *E. coli* ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Glucoseaufnahme die Kapazität zentraler Stoffwechselwege, wie z.B. diejenige des TCA-Zyklus, übersteigt (Holms, 1996). DNA-Chip-Analysen haben gezeigt, dass unter anderem die Expression von TCA-Zyklus-Genen und der Atmungskette bei aerober Acetatbildung verringert war. Dies würde bedeuten, dass die Kapazität nicht per se limitiert wäre, sondern aufgrund einer Transkriptionsregulation reduziert wäre (Polen, 2002). Folgende TCA-Zyklus-Gene zeigten verringerte Expression: die Gene *acnB*, *sucABCD*, *sdhCDAB* und *fumC*, welche für die Aconitase, α -Ketoglutaratdehydrogenase, Succinyl-CoA-Synthetase, Succinatdehydrogenase und Fumarase kodieren. Es stellte sich die Frage, ob die verringerte Synthese von TCA-Zyklus-Enzymen und eine damit verbundene, herabgesetzte Aktivität des TCA-Zyklus ursächlich für die aerobe Acetatbildung sein könnte. Wenn dies der Fall ist, sollte eine Erhöhung der *in vivo* TCA-Zyklus-Aktivität entsprechend zu verringerter Acetatbildung führen.

1.1. Überexpression des *sdhCDAB-b0725-sucABCD*-Operons in *E. coli* MG1655

Zur Erhöhung der TCA-Zyklus-Aktivität war es notwendig, diejenigen Gene zu überexprimieren, welche für das oder die Enzyme kodieren, welche geschwindigkeitsbestimmend für den TCA-Zyklus-Fluss sind. In *E. coli* wird vermutet, daß bei aerobem Wachstum auf Glucose die Aktivität der α -Ketoglutaratdehydrogenase limitierend für die Aktivität des TCA-Zyklus ist (Amarasingham & Davis, 1965; El-Mansi, 2004; Lee *et al.*, 2002; Majewski & Domach, 1990). Diejenigen Gene, welche für die Succinatdehydrogenase (*sdhCDBAB*) und Succinyl-CoA-Synthetase (*sucCD*) kodieren und deren Expression bei DNA-Chip-Analysen ebenfalls spezifisch mit steigender Acetatbildung korrelierte, sind in einem Operon mit den Genen *sucAB* lokalisiert, welche für die E1o und E2o-Untereinheiten der α -Ketoglutaratdehydrogenase (Knapp *et al.*, 1998) kodieren und unterliegen einer gemeinsamen Regulation. Daher ist es sinnvoll, nicht nur einzelne, sondern alle diese Gene zu überexprimieren.

In Abb. 6 ist die Anordnung der einzelnen Gene in diesem Operon dargestellt. Es gibt zwei Promotoren, die für die Transkription dieser Gene verantwortlich sind: *P_{suc}*, welcher sich innerhalb des Operons befindet (Spencer & Guest, 1985) und *P_{sdh}* (Wilde & Guest, 1986). Hauptsächlich erfolgt die Initiation der Transkription und Regulation des *sdhCDAB-b0725-sucABCD*-Operons jedoch ausgehend von dem stromaufwärts gelegenen *sdh*-Promotor (Cunningham & Guest, 1998).

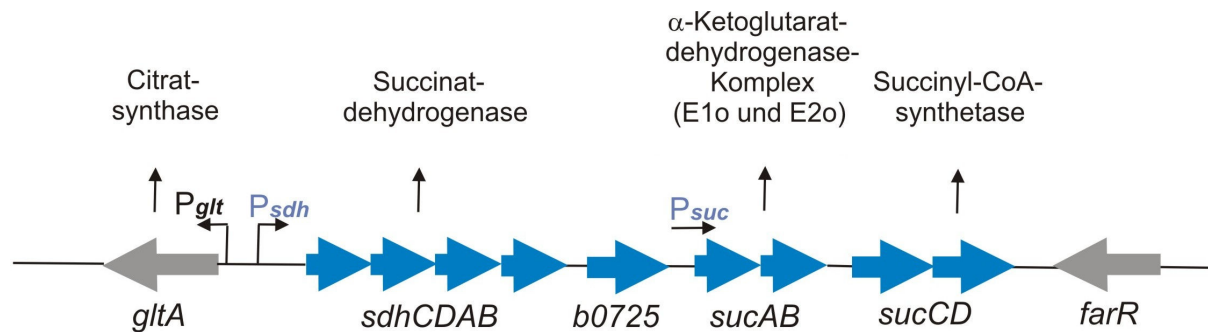


Abb. 6: *sdhCDAB-b0725-sucABCD* - Operon in *Escherichia coli* (*P_{glt}* = Citratsynthase-Promotor, *P_{sdh}* = *sdh*-Promoter, *P_{suc}* = *suc*-Promoter, E1o und E2o = Decarboxylase- und Transacylase-Komponenten des α -Ketoglutaratdehydrogenase-Enzymkomplexes, siehe auch Text).

1.1.1. Austausch des chromosomalen *sdh*-Promotors gegen den *tet*-Promotor (MG1655 Δ *P_{sdh}::P_{tet}*)

Um alle Gene des *sdhCDAB-b0725-sucABCD*-Operons überzuexprimieren, sollte der chromosomale Promotor *P_{sdh}* gegen einen starken, konstitutiven Promotor ausgetauscht werden. Dazu wurde der *tetA*-Promotor des Transposons Tn10 gewählt (Skerra, 1994), welches in Bakterien die Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Tetracyclin, einem Inhibitor der Proteinsynthese (Chopra, 1985), vermittelt. Der *tetA*-Promotor ist für die Transkription des *tetA*-Gens verantwortlich, welches für das Tetracyclin-Resistenzprotein TetA, einen Tetracyclin/Metall-Proton-Antiporter kodiert. Die Resistenz wird durch aktiven Efflux des Antibiotikums erzielt (Hillen & Berens, 1994). Der *tetA*-Promotor ist ein starker Promotor, dessen Sequenz beinahe identisch zur Consensus-Sequenz von *E. coli*-Promotoren ist (Hillen & Schollmeier, 1983). Der *tetA*-Promotor ist dabei mehr als doppelt so stark wie der vollständig induzierte *lac*-Promotor (Bertrand *et al.*, 1984).

Der chromosomale Austausch des *sdh*-Promotors erfolgte nach der Methode von Datsenko und Wanner (2000), welche im Allgemeinen zur Deletion von Genen in *E. coli* angewendet

wird. Um den *sdh* - Promotor durch den *tetA* - Promotor austauschen zu können, wurde der *tetA* - Promotor zunächst in die Deletionskassette integriert. Dazu wurde die Kanamycin-Resistenzkassette des Plasmids pKD4 mit den Primern *sdh*-up-for und *sdh*-up-rev (s. Anhang) mittels PCR amplifiziert. Die Primer enthielten je eine 44 bzw. 50 bp lange Sequenz homolog zu den 5'- und 3'-flankierenden Bereichen der auszutauschenden Promotorregion und eine *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle. Das PCR-Produkt wurde in den pGEM-T-Vektor kloniert. Der *tetA* - Promotor wurde dann ausgehend von dem Plasmid pk19::*clpP* mittels PCR amplifiziert, wobei die Primer *tet*-for und *tet*-rev verwendet wurden und über die Restriktionsschnittstelle *EcoRI* in den Vektor pGEM-T-*sdh* - *kan* ligiert. Diese Antibiotikaresistenzkassette, welche nun den *sdh* - Promotor enthielt, wurde über PCR amplifiziert, gereinigt, der *E. coli* MG1655 Wildtypstamm mit diesem Konstrukt transformiert und die Zellen auf LB-Medium mit Kanamycin ausplattiert, um diejenigen Klone zu selektieren, bei denen ein Rekombinationsereignis stattgefunden hat. Der Austausch der chromosomalen Sequenz gegen die Antibiotikaresistenzkassette wurde über PCR nachgewiesen (s. Abb. 7, Spur 3). Anschließend wurde die Antibiotikaresistenzkassette wieder entfernt (s. Abschnitt II. 5.8.). Der Promotoraustausch konnte über PCR nachgewiesen werden, wie auf dem SDS-Gel in Abb. 7, Spur 4, zu erkennen ist.

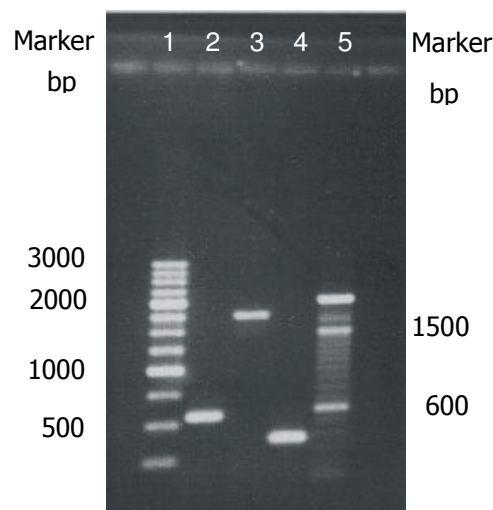


Abb. 7: Nachweis des Promotoraustauschs in *E. coli* MG1655 mittels PCR (0,8 % (w/v) Agarose-Gel). Spur 1 u. 5: Marker (Boehringer XVI u. 100 bp-Leiter); Spur 2: Wildtyp-Kontrolle; Spur 3: *sdh* - Promotor ausgetauscht gegen Antibiotikaresistenzkassette mit *tetA*-Promotor; Spur 4: *sdh* - Promotor ausgetauscht gegen *tetA* - Promotor, Antibiotikaresistenzkassette eliminiert.

Um Punktmutationen ausschließen zu können, wurde der Promotoraustausch zusätzlich mittels DNA-Sequenzanalyse überprüft. Dazu war die Promotorregion ausgehend von chromosomaler DNA mit den Primern *sdhC-1* und *sdhC-2* (s. Anhang) über PCR amplifiziert und das PCR-Produkt dann der Sequenzanalyse unterzogen worden. Die Sequenz war einwandfrei.

1.1.2. Nachweis der Überexpression durch Transkriptomanalyse

Zum Nachweis der Überexpression der Gene des *sdhCDAB-b0725-sucABCD*-Operons in *E. coli* MG1655 auf Transkriptebeine wurden die Transkriptome von MG165 Δ *Psdh::Ptet* und MG1655 WT bei exponentiellem Wachstum auf Minimalmedium mit 10 mM Glucose mittels DNA-Chip-Analyse miteinander verglichen. Dabei konnte, wie in Tab. 3 dargestellt, für fünf der insgesamt neun Gene des *sdhCDAB - b0725 - sucABCD* - Operons gezeigt werden, dass deren mRNA-Spiegel in der Mutante MG1655 Δ *Psdh::Ptet* gegenüber dem Wildtyp um den Faktor 3-5 erhöht waren. Die betreffenden Gene kodieren für Untereinheiten der Succinatdehydrogenase und Succinyl-CoA-Synthetase, sowie ein hypothetisches Protein. Diejenigen Gene des *sdhCDAB - b0725 - sucABCD* - Operons, welche nicht in der Tabelle 3 aufgelistet sind, waren in der DNA-Chip-Analyse nicht auswertbar.

Tab. 3: Vergleich der Expression der Gene des *sdhCDAB - b0725 - sucABCD* - Operons bei MG1655 WT und MG1655 Δ *Psdh::Ptet* mittels DNA-Chip-Analyse

Gen	ORF	Annotation	relativer mRNA - Spiegel MG1655 Δ <i>Psdh::Ptet</i> / WT
<i>sdhD</i>	b0722	Succinatdehydrogenase: hydrophobe, membrangebundene Untereinheit	3,1
<i>sdhA</i>	b0723	Succinatdehydrogenase: hydrophile Untereinheit, Flavoprotein	3,9
<i>sdhB</i>	b0724	Succinatdehydrogenase: hydrophile Untereinheit, Eisen-Schwefel-Protein	3,1
<i>b0725</i>	b0725	hypothetisches Protein	3,2
<i>sucC</i>	b0728	Succinyl-CoA-Synthetase: α -Untereinheit	4,8
<i>sucD</i>	b0729	Succinyl-CoA-Synthetase: β -Untereinheit	1,6

1.1.3. Nachweis der Überexpression durch Enzymaktivitätsbestimmung

Um die Überexpression der Gene *sucAB*, *sucCD* und *sdhCDAB* in dem Stamm MG1655 Δ *Psdh::Ptet* auf Proteinebene nachzuweisen, wurden die Enzymaktivitäten von α -Ketoglutaratdehydrogenase, Succinyl-CoA-Synthetase und Succinatdehydrogenase bestimmt. Dazu wurden die Stämme MG1655 WT und MG1655 Δ *Psdh::Ptet* in Minimalmedium + 10 mM Glucose kultiviert, während der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und die Rohextrakte zur Bestimmung der Enzymaktivitäten verwendet. Zusätzlich wurde auch die Aktivität der Citratsynthase bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Die Werte stammen aus zwei unabhängigen Kultivierungen jeweils beider Stämme.

Tab. 4: Spezifische Aktivitäten von TCA-Zyklus-Enzymen in Rohextrakten von *E. coli* MG1655 und MG1655 Δ *Psdh::Ptet* aus der exponentiellen Phase bei aerober Batch-Kultivierung (Fermenter) in Minimalmedium + 10 mM Glucose im Fermenter

Stamm	Spezifische Aktivität [nmol min ⁻¹ (mg Protein) ⁻¹]			
	α -Ketoglutarat-Dehydrogenase	Succinyl-CoA-Synthetase	Succinat-Dehydrogenase	Citrat-synthase
MG1655 WT	31 +/- 1	350 +/- 17	90 +/- 25	90 +/- 21
MG1655 Δ <i>Psdh::Ptet</i>	53 +/- 2	1460 +/- 35	380 +/- 7	270 +/- 14

In den Rohextrakten des Stammes MG1655 Δ *Psdh::Ptet* konnten gegenüber dem Wildtyp deutlich erhöhte spezifische Aktivitäten der α -Ketoglutaratdehydrogenase, der Succinyl-CoA-Synthetase und der Succinatdehydrogenase nachgewiesen werden. Die spezifischen Aktivitäten von Succinyl-CoA-Synthetase und Succinatdehydrogenase waren um den Faktor 4 erhöht. Diese Werte liegen in der gleichen Größenordnung, wie beim Vergleich der Expression auf Transkriptebeine (s. Abschnitt 1.1.2.). Die α -Ketoglutaratdehydrogenase zeigte 1,7-fach erhöhte Aktivität gegenüber dem Wildtyp (s. Tab. 4 und Abb. 8).

In den Rohextrakten des Stammes MG1655 Δ *Psdh::Ptet* konnte außerdem eine gegenüber dem Wildtyp um den Faktor 3 erhöhte spezifische Aktivität der Citratsynthase nachgewiesen werden.

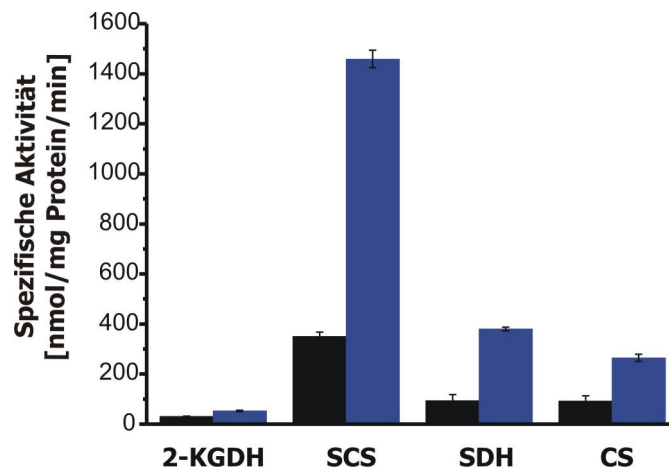


Abb. 8: Spezifische Aktivitäten verschiedener TCA-Zyklus-Enzyme der Stämme MG1655 WT und MG1655Δ*Psdh::Ptet* während der exponentiellen Phase bei aerober Batchkultivierung in Minimalmedium + 10 mM Glucose im Fermenter. (SCS=Succinyl-CoA-Synthetase, 2-KGDH=α-Ketoglutaratdehydrogenase, SDH=Succinatdehydrogenase, CS=Citratsynthase).

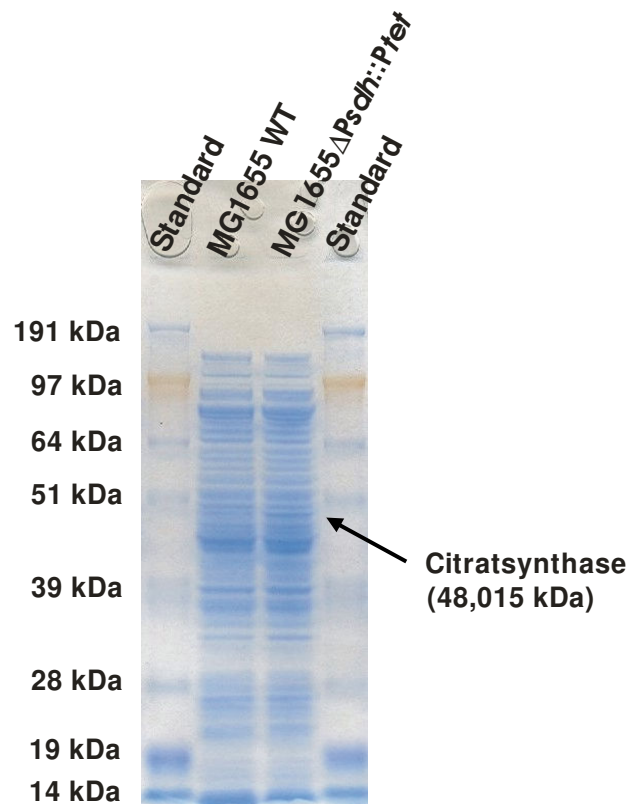


Abb. 9: Auftrennung von Rohextrakten der Stämme MG1655 WT und MG1655Δ*Psdh::Ptet* über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.

Bei gelelektrophoretischer Auftrennung der Rohextrakte in einem SDS-Gel war dementsprechend eine verstärkte Citratsynthase-Bande sichtbar, wie in Abb. 9 zu erkennen ist. Die im Vergleich zum Wildtyp - Stamm erhöhte Synthese des Citratsynthase-Enzyms ist vermutlich eine direkte Folge des *sdh* - Promotoraustauschs, da der Promotor des Citratsynthasegens *gltA* dem *sdh* - Promotor direkt benachbart ist (Hull *et al.*, 1983).

Die Banden der übrigen Enzyme sind nicht sichtbar, da sie von anderen Proteinen überlagert werden.

Die Enzymaktivitätsbestimmungen zeigen, dass der chromosomale Austausch des *Psdh* - Promotors gegen den *tetA* - Promotor erfolgreich war. Für die Succinatdehydrogenase, Succinyl-CoA-Synthetase, α -Ketoglutaratdehydrogenase und darüberhinaus die Citratsynthase konnten in den Rohextrakten des Stammes MG1655 Δ *Psdh::Ptet* gegenüber dem Wildtyp-Stamm deutlich erhöhte spezifische Aktivitäten nachgewiesen werden.

1.2. Charakterisierung des Stammes MG1655 Δ *Psdh::Ptet*

1.2.1. Wachstum und aerobe Acetatbildung

Um zu überprüfen, welchen Einfluss die Überexpression des *sdhCDAB* - *b0725* - *sucABCD* - Operons auf die aerobe Acetatbildung in *E. coli* hat, wurden Wachstumsexperimente durchgeführt. Dazu wurden die Stämme MG1655 Δ *Psdh::Ptet* und MG1655 WT in LB-Medium und Minimalmedium mit jeweils unterschiedlich hohem Angebot an Glucose kultiviert. Es wurden Glucosekonzentrationen von 10 mM und 100 mM gewählt. Die aerobe Acetatbildung wurde in regelmäßigen Zeitabständen durch Bestimmung der Acetatkonzentration in den Kulturüberständen verfolgt.

1.2.1.1. Aerobe Batchkultivierung im Schüttelkolben

In Abb. 10 ist das Wachstum der Stämme MG1655 Δ *Psdh::Ptet* und MG1655 WT bei Kultivierung in Minimalmedium und LB-Medium mit jeweils 100 mM Glucose dargestellt. Generell wuchsen die Stämme in LB-Medium schneller als in Minimalmedium und erreichten höhere optische Dichten (s. Tab. 5). Dies ist darauf zurückzuführen, dass in Komplexmedium die für Biosynthesen benötigten Vorläufermoleküle enthalten sind und nicht erst synthetisiert werden müssen. Dies wird auch anhand der Genexpression deutlich, wie mit Hilfe von DNA-Chip-Analysen gezeigt wurde (Tao *et al.*, 1999). Beide Stämme verhielten sich bezüglich des

Wachstums sehr ähnlich. Sie wuchsen gleich schnell, wie anhand der Wachstumsraten zu erkennen ist (s.Tab. 5). Bei Kultivierung in LB-Medium mit 100 mM Glucose bildete der Stamm MG1655 Δ *Psdh*:*Ptet* etwas mehr Biomasse als der Wildtyp.

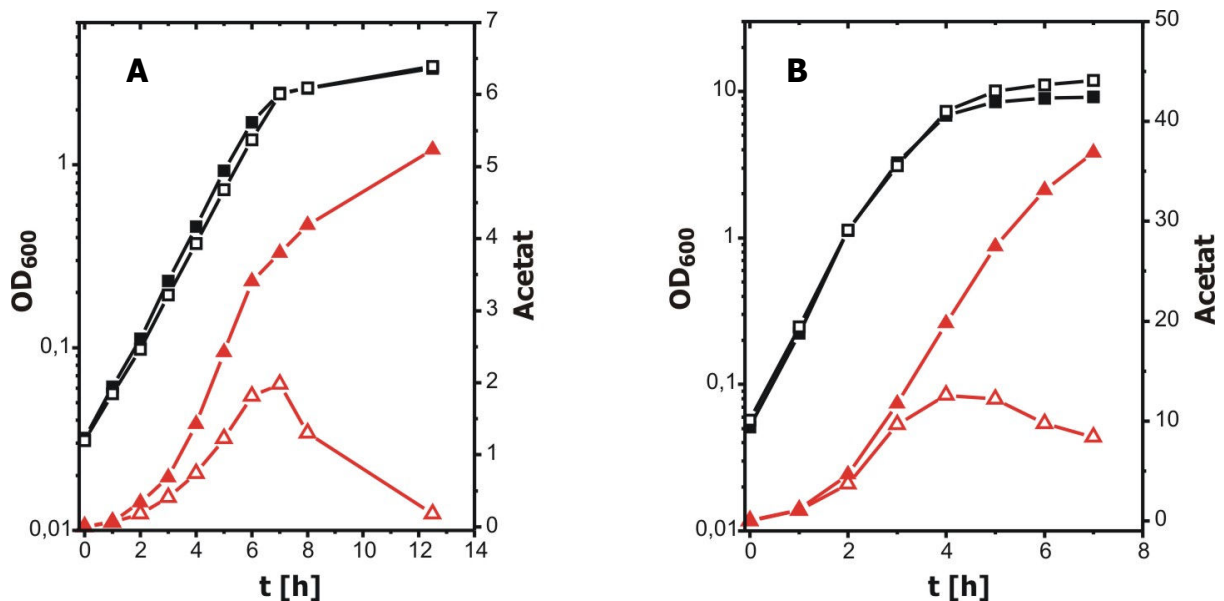


Abb. 10: Wachstum (■, □) und aerobe Acetatbildung (▲, △) der Stämme MG1655 WT (geschlossene Symbole) und MG1655 Δ *Psdh*:*Ptet* (offene Symbole) bei Wachstum in Minimalmedium + 100 mM Glucose (A) bzw. LB-Medium + 100 mM Glucose (B) im Schüttelkolben

In Minimalmedium waren diesbezüglich keine Unterschiede zu erkennen. Die Acetatbildung war bei der Mutante MG1655 Δ *Psdh*:*Ptet* unter beiden Kultivierungsbedingungen im Vergleich zum Wildtyp, über den Verlauf der gesamten Kultivierung betrachtet, deutlich niedriger. Dabei war auffällig, dass die Mutante das gebildete Acetat bei Übergang in die stationäre Phase im Gegensatz zum Wildtyp wiederaufnahm. Bei Kultivierung in LB-Komplexmedium setzte die Mutante darüber hinaus höhere Mengen an Glucose um. Bei Verwendung von LB-Medium bzw. Minimalmedium mit jeweils 100 mM Glucose, war die Glucose während der gesamten Kultivierung im Überschuss und wurde nie vollständig verbraucht.

Tab. 5: Wachstum, Acetatbildung und Glucoseaufnahme der Stämme MG1655 WT und MG1655 Δ *Psdh::Ptet* bei Wachstum in LB-Medium mit 100 mM Glucose bzw. Minimalmedium mit 100 mM Glucose

Stamm	Wachstumsrate	gebildete Biomasse	Acetat-Bildung	Glucose-Verbrauch
	μ [h ⁻¹]	[Δ OD ₆₀₀]	[mM]	[mM]
LB-Medium mit 100 mM Glucose				
MG1655WT	1,56 +/- 0,03	9,0 +/- 0,1	39 +/- 2	29 +/- 2
MG1655 Δ <i>Psdh::Ptet</i>	1,55 +/- 0,05	12,0 +/- 0,2	8 +/- 3	48 +/- 4
Minimalmedium mit 100 mM Glucose				
MG1655WT	0,70 +/- 0,03	3,5 +/- 0,1	6 +/- 1	20 +/- 4
MG1655 Δ <i>Psdh::Ptet</i>	0,65 +/- 0,03	3,5 +/- 0,1	0 +/- 0	21 +/- 3

Bei Kultivierung der Stämme MG1655 Δ *Psdh::Ptet* und MG1655 WT in LB-Medium bzw. Minimalmedium mit jeweils 10 mM Glucose war die Glucose zwar auch im Überschuss, wurde aber gegen Ende der Kultivierung vollständig verbraucht (s. Abb. 11).

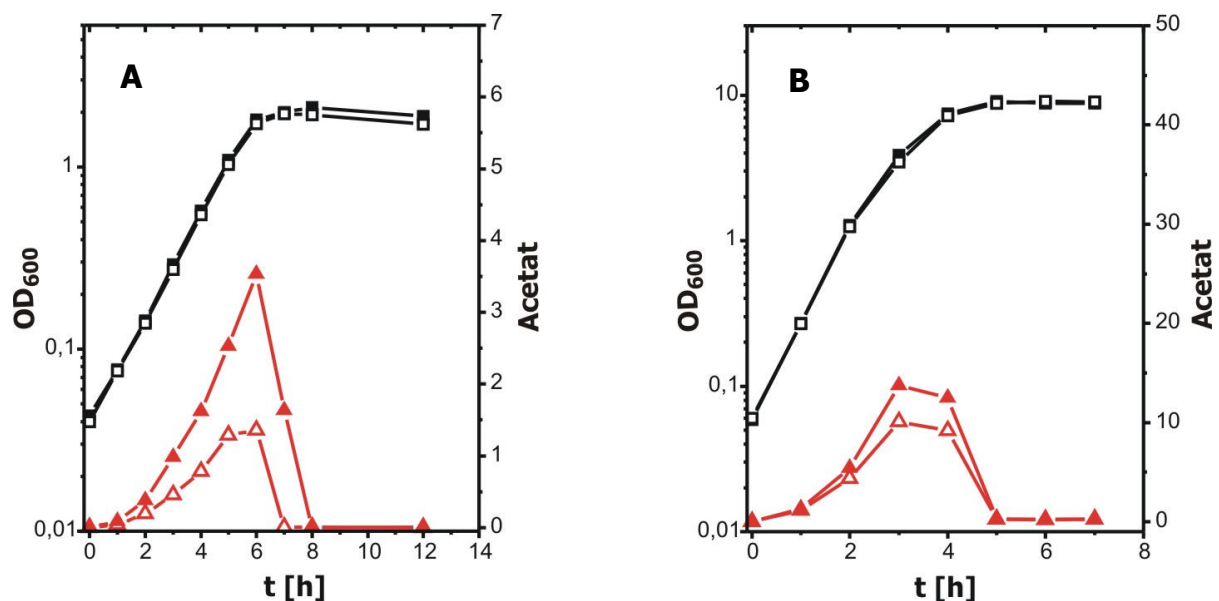


Abb. 11: Wachstum (—■—, —□—) und aerobe Acetatbildung (—▲—, —△—) der Stämme MG1655 WT (geschlossene Symbole) und MG1655 Δ *Psdh::Ptet* (offene Symbole) bei Wachstum in Minimalmedium + 10 mM Glucose (A) und LB-Medium + 10 mM Glucose (B) im Schüttelkolben

Es konnten keine Unterschiede im Wachstum festgestellt werden (s. Tab. 6).

Die Acetatbildung war in der Mutante gegenüber dem Wildtyp deutlich reduziert, wobei sich der Unterschied auf Minimalmedium noch stärker bemerkbar machte. Die Acetatbildung erfolgte in der Mutante darüberhinaus mit niedrigerer Geschwindigkeit (s. Abb. 11).

Im Verlauf der Kultivierungen wurde die Glucose vollständig umgesetzt. Es konnte beobachtet werden, dass in der stationären Phase das gebildete Acetat wieder verstoffwechselt wird. Die Aufnahme erfolgt über die Acetatpermease *actP* (*yjcG*) und das Acetat wird über die Acetyl-CoA-Synthetase zu Acetyl-CoA umgesetzt (Gimenez *et al.*, 2003). Die Crp-abhängige Aktivierung der Acetyl-CoA-Synthetase ist beim Übergang von exponentieller zu stationärer Phase maximal (Browning *et al.*, 2004).

Tab. 6: Wachstum und Acetatbildung der Stämme MG1655 WT und MG1655 Δ *Psdh::Ptet* bei Wachstum in LB-Medium mit 10 mM Glucose bzw. Minimalmedium mit 10 mM Glucose

Stamm	Wachstumsrate	Biomasse	maximal ge- bildetes Acetat
	μ [h ⁻¹]	[Δ OD ₆₀₀]	[mM]
LB-Medium mit 10 mM Glucose			
MG1655WT	1,56 +/- 0,03	8,5 +/- 0,7	15 +/- 2
MG1655 Δ <i>Psdh::Ptet</i>	1,52 +/- —	9,0 +/- —	10 +/- —
Minimalmedium mit 10 mM Glucose			
MG1655WT	0,65 +/- 0,0	2,0 +/- 0,1	4 +/- 0
MG1655 Δ <i>Psdh::Ptet</i>	0,65 +/- —	2,0 +/- —	1 +/- —

Es ist festzustellen, dass unabhängig von der Kultivierungsbedingung die aerobe Acetatbildung in dem Stamm MG1655 Δ *Psdh::Ptet* gegenüber dem Wildtyp deutlich reduziert war.

1.2.1.2. Aerobe Batchkultivierung im 7,5-L Laborfermenter

Um die Eigenschaften des Stammes MG1655 Δ *Psdh::Ptet* auch unter genau definierten Bedingungen zu charakterisieren, wurden dieser Stamm und der Wildtyp als Kontrolle in einem 7,5-L-Laborfermenter in 5L Minimalmedium mit 10 mM Glucose unter aeroben Bedingungen mehrmals kultiviert. Dabei wurden konstante Kultivierungsparameter garantiert (pH, Temperatur, Sauerstoffversorgung). In Abb. 12 ist das Wachstum, die Glucoseaufnahme und die aerobe Acetatbildung der beiden Stämme exemplarisch dargestellt. Die in den Tabellen 7 und 8 zusammengefassten Ergebnisse stellen die Mittelwerte von jeweils drei unabhängigen Kultivierungen dar.

Wachstum und aerobe Acetatbildung der beiden Stämme waren vergleichbar mit den entsprechenden Schüttelkolbenexperimenten in Glucoseminimalmedium mit 10 mM Glucose. Die beiden Stämme wuchsen gleich schnell und bildeten gleich viel Biomasse (s. Tab. 7 und Abb. 12). Die maximale aerobe Acetatbildung war in der Mutante MG1655 Δ *Psdh::Ptet* im Vergleich zum Wildtyp um mehr als die Hälfte reduziert.

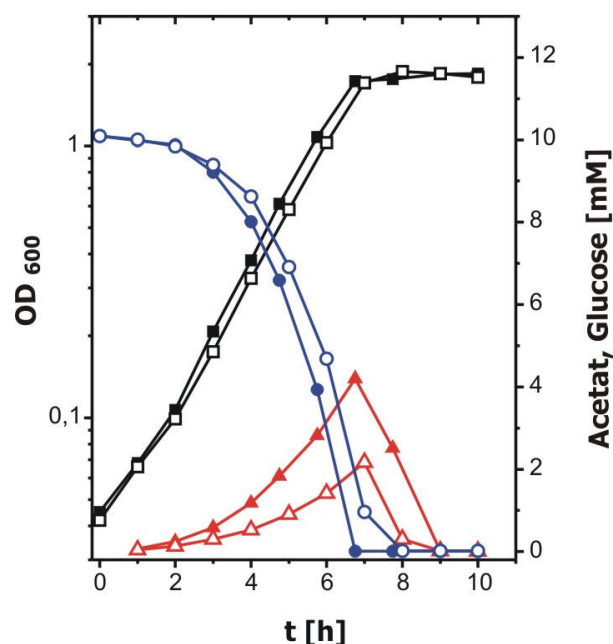


Abb. 12: Wachstum (■, □), Acetatbildung (▲, △) und Glucoseverbrauch (●, ○) der Stämme MG1655 WT (geschlossene Symbole) und MG1655 Δ *Psdh::Ptet* (offene Symbole) bei aerober 5-L Batchkultivierung im Laborfermenter.

Tab. 7: Wachstum und Acetatbildung der Stämme MG1655 WT und MG1655 Δ *Psdh::Ptet* bei aerober Batchkultivierung in Minimalmedium + 10 mM Glucose im Fermenter

Stamm	Wachstumsrate	Biomasse	maximal gebildetes Acetat
	μ [h ⁻¹]	[Δ OD ₆₀₀]	[mM]
MG1655WT	0,64 +/- 0,03	1,9 +/- 0,1	5 +/- 1
MG1655 Δ <i>Psdh::Ptet</i>	0,61 +/- 0,02	1,8 +/- 0,1	2 +/- 0

Entsprechend war die Acetatbildungsrate, welche für die exponentielle Wachstumsphase bestimmt wurde, in dem Stamm MG1655 Δ *Psdh::Ptet* im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls um mehr als die Hälfte reduziert (s. Tab. 8). Die Glucoseaufnahmerate war in beiden Stämmen jedoch gleich (s. Tab. 8). Die Werte stammen aus jeweils drei unabhängigen Kultivierungen.

Tab. 8: Acetatbildung und Glucoseaufnahme der Stämme MG1655 WT und MG1655 Δ *Psdh::Ptet* bei aerober Batchkultivierung in Minimalmedium + 10 mM Glucose im Fermenter

Stamm	Acetatbildungsrate	Glucoseaufnahmerate
	[nmol (mgDW) ⁻¹ min ⁻¹]	[nmol (mgDW) ⁻¹ min ⁻¹]
MG1655WT	100 +/- 15	147 +/- 7
MG1655 Δ <i>Psdh::Ptet</i>	39 +/- 1	149 +/- 5

1.2.2. Nebenproduktbildung

Der Stamm MG1655 Δ *Psdh::Ptet* bildete deutlich weniger Acetat als der Wildtyp. Um zu überprüfen, ob dieser Stamm stattdessen andere, zu Acetat alternative Nebenprodukte bildete, wurden Kulturüberstände aus der exponentiellen Wachstumsphase mittels HPLC und ¹H-NMR analysiert.

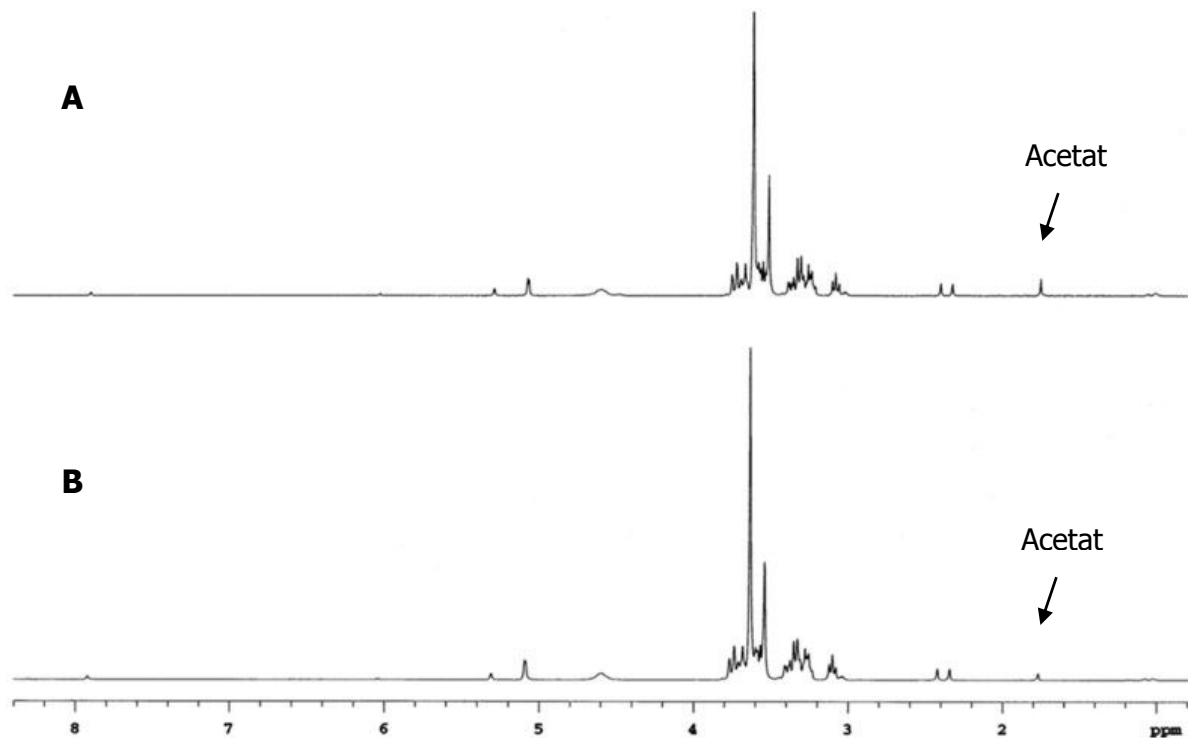


Abb. 13: ^1H -NMR-Spektren der Kulturüberstände einer aeroben Batchkultivierung der Stämme MG1655 WT (A) und MG1655 $\Delta\text{Psdh}::\text{Ptet}$ (B) im Fermenter (MOPS-Minimalmedium + 10 mM Glucose, exponentielle Wachstumsphase)

Dazu wurden die Stämme MG1655 $\Delta\text{Psdh}::\text{Ptet}$ und der Wildtyp als Kontrolle in Minimalmedium + 10 mM Glucose kultiviert. Mittels HPLC-Analysen konnten keine zu Acetat alternative organische Säuren in den Kulturüberständen nachgewiesen werden. Auch der Nachweis von Aminosäuren blieb negativ. Mittels ^1H -NMR-Messungen, welche von Frau Dr. S. Willbold (ZCH, Forschungszentrum Jülich) durchgeführt wurden, konnten ebenfalls keine Metabolite identifiziert werden, die alternativ zu Acetat gebildet wurden. In Abb. 13 sind die entsprechenden ^1H -NMR-Spektren des Wildtyps und der Mutante gezeigt, die sich nur bezüglich des Acetatsignals unterscheiden.

1.2.3. Kohlenstoffbilanz

Es wurde bereits gezeigt, dass der Stamm MG1655 $\Delta\text{Psdh}::\text{Ptet}$ im Vergleich zum Wildtyp bei unverändertem Wachstum deutlich weniger Acetat bildete. Mittels NMR-Analysen und HPLC-Messungen konnte jedoch keine zu Acetat alternative Nebenproduktbildung nachgewiesen werden. Um Näheres über den Verbleib des Kohlenstoffs zu erfahren, wurde eine

Kohlenstoffbilanz erstellt. Dazu wurde auch die CO₂-Bildung analysiert. In Abb. 14 ist die Kohlenstoffverteilung wiedergegeben, welche durch Berechnung der molaren integralen Kohlenstoffmengen bestimmt wurde und sich auf die exponentielle Wachstumsphase bezieht. Die Kohlenstoffanteile von Biomasse, Acetat und CO₂ sind dabei in Prozent des in Form von Glucose umgesetzten Kohlenstoffs angegeben (siehe auch Tabelle 27, Anhang). Die Werte wurden aus drei unabhängigen Fermentationen jeweils für den Wildtyp und die Mutante bestimmt und gemittelt. Die Kohlenstoffbilanz konnte zu 91-94 % geschlossen werden. Die Abweichungen von 100 % sind dabei auf kleinere Messungenauigkeiten zurückzuführen, die sich bei der Berechnung der molaren Anteile aufsummieren (Schell, 2002), so dass die Kohlenstoffbilanz als geschlossen angesehen werden kann. Bei beiden Stämmen wurden 43 % des Kohlenstoffs des Substrats Glucose zur Bildung von Biomasse genutzt. Beim Wildtyp wurden 18 % des Kohlenstoffs der aufgenommenen Glucose zu Acetat umgesetzt. Dies ist charakteristisch bei Wachstum auf Glucose-Minimalmedium (Chang *et al.*, 1999). Bei der Mutante MG1655Δ*Psdh*::*Ptet* wurden dagegen nur 9 % der aufgenommenen Glucose zu Acetat umgesetzt. Demgegenüber konnte bei der Mutante eine deutlich gesteigerte Kohlendioxidproduktion beobachtet werden: Sie lag bei 39 % gegenüber 32 % im Wildtyp.

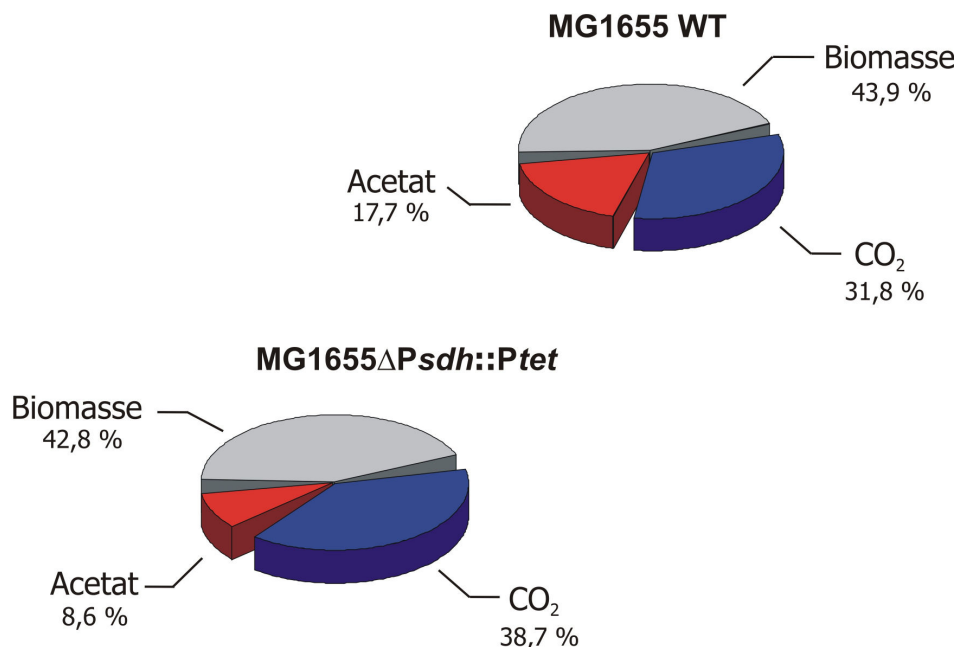


Abb. 14: Kohlenstoffbilanz von *E. coli* MG1655 WT und MG1655Δ*Psdh*::*Ptet* bei aerober 5 L-Batch - Kultivierung in Minimalmedium + 10 mM Glucose im Laborfermenter für die exponentielle Wachstumsphase.

Die Kohlendioxidbildung war dabei in dem gleichen Maße erhöht, wie die Acetatbildung reduziert war. Die erhöhte Kohlendioxidbildung in dem Stamm MG1655 Δ *Psdh*:*Ptet* ist vermutlich auf eine erhöhte *in-vivo* -TCA-Zyklus-Aktivität zurückzuführen, welche durch die Deregulation des *sdhCDAB* - *b0725* - *sucABCD* - Operons erzielt wurde.

1.2.4. Rekombinante Proteinproduktion

Durch den Austausch des *Psdh* - Promotors in *E. coli* MG1655 konnte die aerobe Acetatbildung um mehr als 50 % reduziert werden. Es blieb zu überprüfen, ob sich diese Veränderung auch positiv auf die rekombinante Proteinproduktion auswirkt. Als Modellprotein wurde das "Grün fluoreszierende Protein" (GFP) gewählt.

Das "Grün Fluoreszierende Protein" eignet sich als Reporterprotein zur quantitativen Bestimmung der Proteinexpression, da eine lineare Korrelation zwischen Fluoreszenzintensität und der gebildeten Proteinmenge besteht (Cha *et al.*, 2000; Kim & Cha, 2003). Das Gen des GFP-Proteins wurde in den Vektor pTrc99a kloniert und in den Stämmen MG1655 WT und MG1655 Δ *Psdh*:*Ptet* plasmidkodiert überexprimiert. Die Kultivierung der Stämme erfolgte sowohl in Minimalmedium + 10 mM Glucose als auch in LB-Medium + 100 mM Glucose jeweils im Schüttelkolben. Die GFP-Produktion wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. In Abb. 15 ist das Wachstum dieser Kulturen dargestellt.

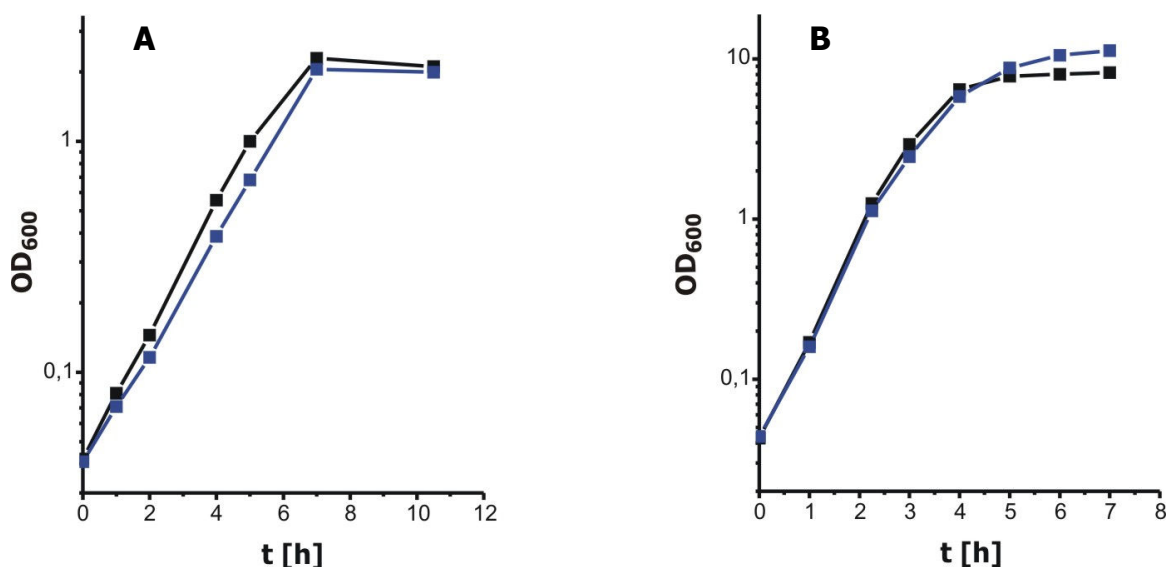


Abb. 15: Wachstum der Stämme MG1655 WT (pTrc99a *gfp_{uv}*) (—■—) und MG1655 Δ *Psdh*:*Ptet* (pTrc99a *gfp_{uv}*) (—■—) bei Überexpression des GFP - Proteins und Kultivierung in Minimal - medium + 10 mM Glucose (A) oder LB-Medium + 100 mM Glucose (B) im Schüttelkolben.

Das Wachstum des Stammes MG1655 Δ *Psdh::Ptet* (pTrc99a *gfp_{uv}*) und des Wildtyps MG1655 (pTrc99a *gfp_{uv}*) bei Kultivierung in Minimalmedium mit 10 mM Glucose bzw. LB-Medium mit 100 mM Glucose und Überexpression des GFP-Proteins ist vergleichbar mit den Kultivierungen, bei denen die Stämme keine Überexpressionsplasmide enthielten (vgl. Wachstumskurven in Abschnitt 1.2.1.1.). Die beiden Stämme wuchsen unter den gewählten Kultivierungsbedingungen jeweils mit der gleichen Rate, wie anhand der Wachstumsraten in den Tabellen 9 und 10 zu erkennen ist. Bei Kultivierung in LB-Medium mit 100 mM Glucose bildet die Mutante MG1655 Δ *Psdh::Ptet* mehr Biomasse als der Wildtyp (s. Tab. 9 und 10).

Tab. 9: Wachstum und Acetatbildung der Stämme MG1655 WT und MG1655 Δ *Psdh::Ptet* bei Überexpression des GFP-Proteins in LB-Medium + 100 mM Glucose im Schüttelkolben

Stamm	Wachstumsrate	Biomasse	Acetat
	μ [h ⁻¹]	[Δ OD ₆₀₀]	[mM]
MG1655 WT(pTrc99a <i>gfp_{uv}</i>)	1,50	8,2	37
MG1655 Δ <i>Psdh::Ptet</i> (pTrc99a <i>gfp_{uv}</i>)	1,45	11,2	4

Tab. 10: Wachstum und Acetatbildung der Stämme MG1655 WT und MG1655 Δ *Psdh::Ptet* bei Überexpression des GFP-Proteins in Minimalmedium + 10 mM Glucose im Schüttelkolben

Stamm	Wachstumsrate	Biomasse	Acetat
	μ [h ⁻¹]	[Δ OD ₆₀₀]	[mM]
MG1655 WT(pTrc99a <i>gfp_{uv}</i>)	0,64	2,25	2
MG1655 Δ <i>Psdh::Ptet</i> (pTrc99a <i>gfp_{uv}</i>)	0,56	2,01	1

Um die rekombinante Proteinproduktion der Stämme zu bestimmen und zu vergleichen, wurden während der exponentiellen bzw. stationären Wachstumsphase Proben entnommen und die Fluoreszenz der Zellen bestimmt. Ein Zellaufschluss war dazu nicht erforderlich. Die ermittelten Fluoreszenzintensitäten wurden in Relation zur Zellzahl gesetzt (normierte, relative Fluoreszenzintensität), welche zuvor mit Hilfe eines Coulter-

Counters bestimmt wurde. Die unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen ermittelten Fluoreszenzintensitäten, welche durch die Normierung direkt vergleichbar und proportional zur Proteinproduktion waren, sind in Abb. 16 wiedergegeben. Weder bei Kultivierung in Minimalmedium noch in LB-Komplexmedium konnte für den Stamm MG1655 Δ *Psdh*::*Ptet* eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Fluoreszenzintensität gemessen werden. Bei Kultivierung in LB-Komplexmedium war sogar die Fluoreszenz der Wildtypzellen geringfügig höher. Diese im Vergleich zum Wildtyp niedrigere Fluoreszenz der Zellen des Stammes MG1655 Δ *Psdh*::*Ptet* war überraschend und könnte auf Bildung von Inclusion-Bodies zurückzuführen sein. Um dies zu überprüfen, wurden von beiden Stämmen Zellen, die zuvor durch Erhitzen aufgeschlossen worden waren, gelelektrophoretisch in einem SDS-Gel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Das Bandenmuster zeigte jedoch keine Unterschiede. Daher konnte die Bildung von Inclusion-Bodies ausgeschlossen werden.

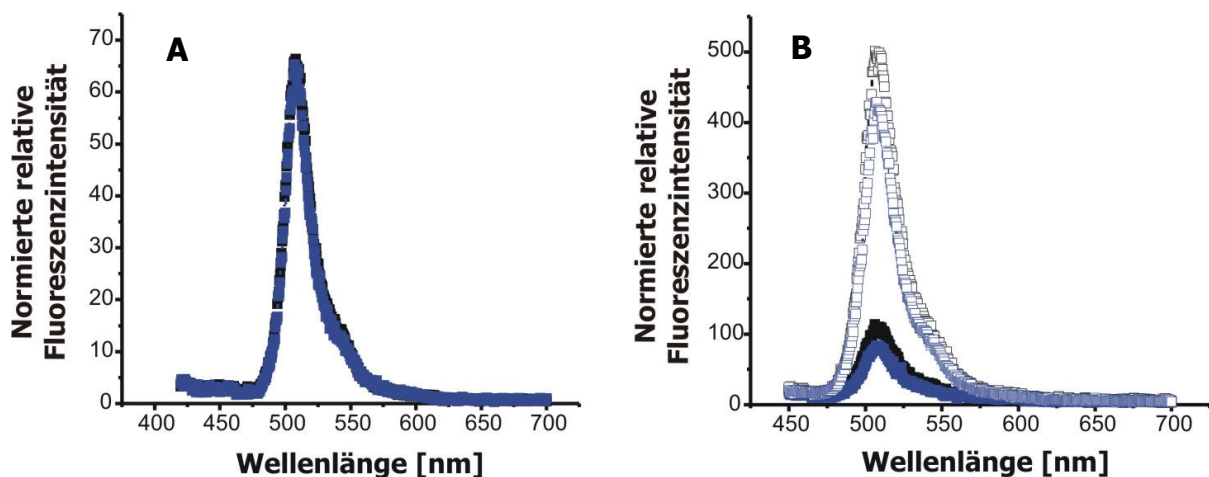


Abb. 16: Normierte relative GFP-Fluoreszenzintensitäten der Stämme MG1655 pTrc99a (*gfp_{uv}*) (—■—, —□—) und MG1655 Δ *Psdh*::*Ptet* pTrc99a (*gfp_{uv}*) (—■—, —□—) während der exponentiellen Wachstumsphase bei Kultivierung in Minimalmedium + 10 mM Glucose (A) und während exponentieller (geschlossene Symbole) und stationärer (offene Symbole) Wachstumsphase bei Kultivierung in LB-Medium + 100 mM Glucose (B) im Schüttelkolben.

Dies bedeutet, dass unter den gewählten Kultivierungsbedingungen, unter welchen die aerobe Acetatbildung zwar deutlich reduziert war, der Stamm MG1655 Δ *Psdh*::*Ptet* keine erhöhte Mengen an Protein bildete. Offen bleibt jedoch, ob unter anderen Kultivierungsbedingungen, wie z.B. der Hochzelllichtfermentation, bei welcher die Acetatbildung problematisch ist, der Stamm MG1655 Δ *Psdh*::*Ptet* gegenüber dem Wildtyp Vorteile bringt.

1.3. Plasmidkodierte Überexpression des *lpdA*-Gens in MG1655 Δ *Psdh::Ptet*

Die α -Ketoglutaratdehydrogenase ist ein Multienzymkomplex, der aus insgesamt drei verschiedenen Komponenten zusammengesetzt ist, welche nichtkovalent miteinander verbunden sind und zusammen die oxidative Decarboxylierung von α -Ketoglutarat zu Succinyl-CoA katalysieren (Knapp *et al.*, 1998). Der Kern des Komplexes besteht aus 24 Untereinheiten der E2o-Komponente, die in oktaedrischer Symmetrie angeordnet sind, welche mit den E1o und E3-Komponenten, die untereinander nicht wechselwirken, in einer Stöchiometrie von 0,5:1:0,5 (Reed, 1974) angeordnet sind. Die einzelnen Komponenten werden von den Genen *sucAB*, *sucCD* und *lpdA* kodiert.

Die Überexpression der Gene *sucA* und *sucB*, welche für die α -Ketoglutaratdehydrogenase-Komponente (E1o) und die Dihydrolipoyl-Transacylase-Komponente (E2o) kodieren (Darlison *et al.*, 1984; Spencer *et al.*, 1984), hatte bereits eine Steigerung der Aktivität um den Faktor 1,7 bewirkt (s. Tab. 4). Es stellte sich die Frage, ob durch zusätzliche Überexpression des *lpdA*-Gens die Aktivität der α -Ketoglutaratdehydrogenase noch erhöht werden und die aerobe Acetatbildung möglicherweise noch stärker reduziert werden kann.

Das Lipoamiddehydrogenase-Gen (*lpdA*), welches für die E3-Untereinheit des α -Ketoglutaratdehydrogenase-Komplexes kodiert (Guest, 1974), ist in dem *pdh*-Operon lokalisiert, welches die Gene *pdhR*, *aceE*, *aceF* und *lpdA* enthält. Die Transkription des *lpdA*-Gens erfolgt von zwei verschiedenen Promotoren, *Ppdh*, welcher stromaufwärts des Operons lokalisiert ist, und *Ppd*, welcher nur das *lpdA*-Transkript generiert (Quail, 1994; Spencer & Guest, 1985). Die Regulation erfolgt koordiniert mit den *sucCD*-Genen durch gemeinsame Regulation der Promotoren *Ppd* und *Psdh* durch das Zweikomponentensystem ArcA/ArcB (Cunningham *et al.*, 1998).

Zur Überexpression wurde das *lpdA*-Gen ausgehend von chromosomaler DNA von *E. coli* MG1655 mittels PCR amplifiziert, in den pGEM-T-Vektor subkloniert und anschließend über die Schnittstellen *EcoRI* und *XbaI* in den Vektor pTrc99a ligiert. Die Überexpression des *lpdA*-Gens in dem Stamm MG1655 Δ *Psdh::Ptet* wurde durch 0,5 mM IPTG induziert. Dieses wurde unmittelbar zu Beginn der Kultivierung, auch bei den Kontrollstämmen, zugegeben. Die Überexpression des *lpdA*-Gens in dem Stamm MG1655 Δ *Psdh::Ptet* hatte bei Kultivierung in LB-Medium und Minimalmedium jeweils mit 100 mM Glucose eine deutliche Beeinträchtigung des Wachstums zur Folge: Bei Kultivierung in LB-Medium war die Wachstumsrate von 1,55 auf 1,23 verringert, außerdem war die Biomassebildung entsprechend dem niedrigeren Glucoseumsatz um mehr als 50 % reduziert. Die Acetatbildung war zwar niedriger als im

Wildtyp-Stamm MG1655, gegenüber dem Ausgangstamm MG1655 Δ *Psdh::Ptet* aber deutlich erhöht (s. Tab. 11).

Tab. 11: Wachstum und Acetatbildung des Stammes MG1655 Δ *Psdh::Ptet* bei Überexpression des *lpdA*-Gens und Kultivierung in LB-Medium + 100 mM Glucose. Dargestellt ist die Acetatkonzentration im Kulturüberstand und die aufgenommene Glucosemenge nach 8-stündiger Kultivierung.

Stamm	Wachstumsrate	Biomasse	Acetat	Glucose
	μ [h ⁻¹]	[Δ OD ₆₀₀]	[mM]	[mM]
MG1655 WT	1,58	9,0	37	28
MG1655 Δ <i>Psdh::Ptet</i>	1,55	11,7	4	45
MG1655 Δ <i>Psdh::Ptet</i> (pTrc99a)	1,51	11,7	—	—
MG1655 Δ <i>Psdh::Ptet</i> (pTrc99a <i>lpd</i>)	1,23	4,8	18	24

Tab. 12: Wachstum und Acetatbildung des Stammes MG1655 Δ *Psdh::Ptet* bei Überexpression des *lpdA*-Gens und Kultivierung in Minimalmedium + 100 mM Glucose. Dargestellt ist die Acetatkonzentration im Kulturüberstand und die aufgenommene Glucosemenge nach 12,5-stündiger Kultivierung.

Stamm	Wachstumsrate	Biomasse	Acetat	Glucose
	μ [h ⁻¹]	[Δ OD ₆₀₀]	[mM]	[mM]
MG1655 WT	0,72	3,5	5	22
MG1655 Δ <i>Psdh::Ptet</i>	0,67	3,6	0	23
MG1655 Δ <i>Psdh::Ptet</i> (pTrc99a)	0,68	3,3	0	25
MG1655 Δ <i>Psdh::Ptet</i> (pTrc99a <i>lpd</i>)	0,22	0,2	1	2

Bei Kultivierung in Minimalmedium hatte die Überexpression des *lpdA*-Gens eine noch stärkere Beeinträchtigung des Wachstums zur Folge, wie anhand der Wachstumsrate und

Biomassebildung in Tab. 12 zu erkennen ist. Außerdem blieb der Stamm MG1655 Δ *Psdh*::*Ptet* (pTrc99a *lpdA*) bei längerer Kultivierung nicht stabil. Bei geringerer Überexpression des *lpdA*-Gens, welche durch niedrigere IPTG-Konzentrationen im Medium eingestellt wurde, war das Wachstum entsprechend weniger stark beeinträchtigt und der Stamm stabil, gegenüber dem Kontrollstamm konnte aber trotzdem keine Verringerung der Acetatbildung erzielt werden (s. Tab. 13).

Tab. 13: Wachstum und Acetatbildung des Stammes MG1655 Δ *Psdh*::*Ptet* bei unterschiedlich hoher Überexpression des *lpdA*-Gens und Kultivierung in Minimalmedium + 100 mM Glucose

Stamm	IPTG	Wachstumsrate	Biomasse	Acetat
		μ [h ⁻¹]	[Δ OD ₆₀₀]	[mM]
MG1655Δ <i>Psdh</i> :: <i>Ptet</i> (pTrc99a)				
	0,25 mM	0,63	1,9	2
MG1655Δ <i>Psdh</i> :: <i>Ptet</i> (pTrc99a <i>lpd</i>)				
	0,25 mM	0,19	0,1	—
	0,10 mM	0,23	0,2	—
	0,05 mM	0,50	2,1	2
	0,01 mM	0,62	2,0	2

Die Überexpression des *lpdA*-Gens beeinflusst den Stoffwechsel offenbar drastisch. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die durch das *lpdA*-Gen kodierte Lipoamid-dehydrogenase nicht nur Bestandteil des α -Ketoglutaratdehydrogenase-Komplexes, sondern auch Bestandteil des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes (Mattevi *et al.*, 1992) und des Glycin-Abbau-Systems (Steiert *et al.*, 1990) ist.

1.4. Charakterisierung einer *sucCD*-Deletionsmutante bezüglich Wachstum und aerober Acetatbildung

Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Genen des TCA-Zyklus zu verringerter Acetatbildung führte. Dies bestätigt die Hypothese, dass primär eine limitierte Aktivität des TCA-Zyklus ursächlich für die aerobe Acetatbildung ist. Umgekehrt sollte dementsprechend die Deletion von Genen des TCA-Zyklus eine erhöhte Acetatbildung zur Folge haben. Um dies zu überprüfen, wurde eine *sucCD*-Deletionsmutante, welche keine Succinyl-CoA-Synthetase besitzt, bezüglich der aeroben Acetatbildung charakterisiert. Dazu wurden die Stämme MG1655 Δ *sucCD* (Veit, 2002) und MG1655 WT als Kontrolle in LB-Medium und Minimalmedium mit jeweils unterschiedlichen Glucosekonzentrationen kultiviert und die Acetatkonzentration in den Kulturüberständen in regelmäßigen Abständen bestimmt.

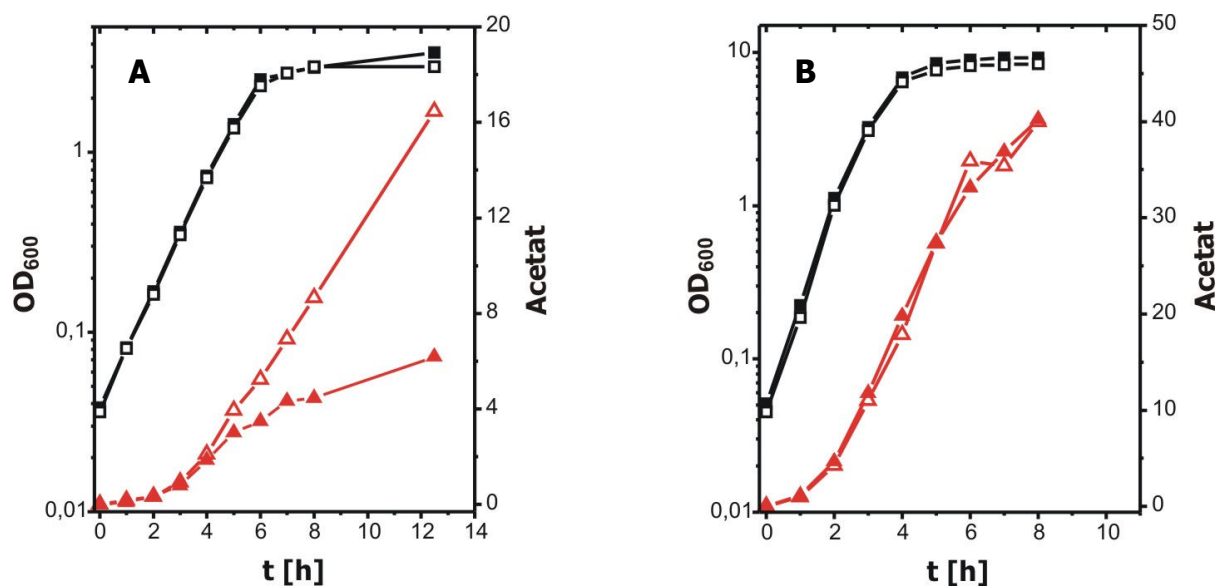


Abb. 17: Wachstum (■, □) und Acetatbildung (▲, △) der Stämme MG1655 WT (geschlossene Symbole) und MG1655 Δ *sucCD* (offene Symbole) bei Wachstum in Minimalmedium + 100 mM Glucose (A) oder LB-Medium + 100 mM Glucose (B) im Schüttelkolben

Bei Kultivierung in LB-Medium bzw. Minimalmedium mit 100 mM Glucose verhielten sich die Stämme MG1655 Δ *sucCD* und MG1655 WT sehr ähnlich in Bezug auf das Wachstum. Unter beiden Kultivierungsbedingungen konnten keine Unterschiede bezüglich der Wachstumsraten festgestellt werden. Bei Kultivierung in Minimalmedium, nicht aber in LB-Medium erreichte die *sucCD*-Mutante eine im Vergleich zum Wildtyp etwas höhere End-OD₆₀₀. Bei Kultivierung

in LB-Medium war die Acetatbildung bei beiden Stämmen gleich, bei Kultivierung in Minimalmedium bildet die *sucCD* - Mutante im Vergleich zum Wildtyp deutlich mehr Acetat (s. Abb. 17 und Tab. 14). Bei Wachstum in Komplexmedium mit Glucose ist die Repression von TCA-Zyklus-Enzymen wesentlich stärker ausgeprägt als bei Wachstum in Minimalmedium mit Glucose (Gray *et al.*, 1966), der TCA-Zyklus läuft nicht vollständig ab, wobei Succinat ausgehend von Oxalacetat gebildet wird und α -Ketoglutarat über die Oxidation von Acetyl-CoA (Fischer & Sauer, 2003). Dementsprechend macht sich die Deletion der Succinyl-CoA-Synthetase-Gene bei Kultivierung in LB-Medium mit 100 mM Glucose nicht bemerkbar. Bei Kultivierung in Minimalmedium mit 100 mM Glucose führt die Blockierung des TCA-Zyklus entsprechend dem Modell eines limitierten TCA-Zyklus als primäre Ursache für den Überflussmetabolismus zu erhöhter Acetatbildung. Eine Wiederaufnahme der Glucose konnte nicht beobachtet werden, denn *sucCD* - Mutanten können Acetat nicht verstoffwechseln (Mat-Jan *et al.*, 1989). Bei Kultivierung in LB-Medium ist die Acetatbildung entsprechend höher als in Minimalmedium, da der Glucoseumsatz auch höher ist (s. Tab 14).

Tab. 14: Wachstum, Acetatbildung und Glucoseaufnahme der Stämme MG1655 WT und MG1655 Δ *sucCD* bei Wachstum in LB-Medium mit 100 mM Glucose bzw. Minimalmedium mit 100 mM Glucose

Stamm	Wachstumsrate	Biomasse	Acetat	Glucose
	μ [h ⁻¹]	[Δ OD ₆₀₀]	[mM]	[mM]
LB-Medium mit 100 mM Glucose				
MG1655WT	1,56 +/- 0,03	9,0 +/- 0,1	39 +/- 2	29 +/- 2
MG1655 Δ <i>sucCD</i>	1,53 +/- 0,03	8,6 +/- 0,5	42 +/- 3	30 +/- 3
Minimalmedium mit 100 mM Glucose				
MG1655WT	0,70 +/- 0,03	3,5 +/- 0,1	6 +/- 1	20 +/- 3
MG1655 Δ <i>sucCD</i>	0,71 +/- 0,02	3,0 +/- 0,1	16 +/- 1	17 +/- 1

Bei Kultivierung in LB-Medium bzw. Minimalmedium mit jeweils 10 mM Glucose verhielten sich die *sucCD*-Mutante und der Wildtyp bezüglich des Wachstums gleich. Es konnten keine

Unterschiede bei der Wachstumsrate und der Biomassebildung beobachtet werden (s. Tab. 15). Unter diesen Bedingungen wurde die im Medium vorhandene Glucose vollständig umgesetzt.

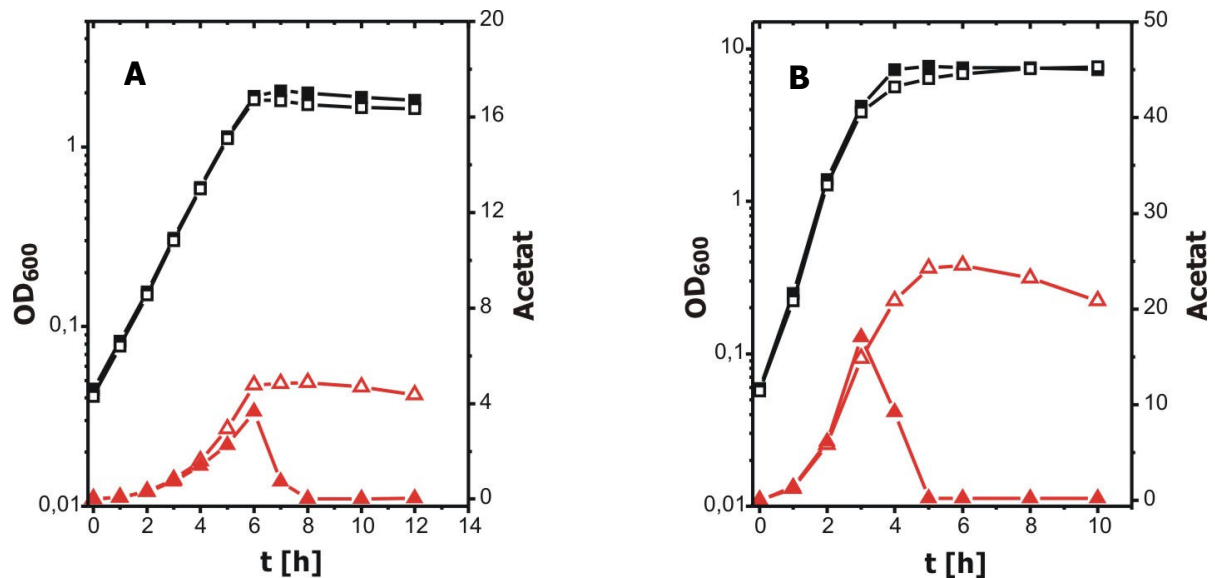


Abb. 18: Wachstum (■, □) und Acetatbildung (▲, △) der Stämme MG1655 WT (geschlossene Symbole) und MG1655Δ*sucCD* (offene Symbole) bei Kultivierung in Minimalmedium + 10 mM Glucose (A) und LB-Medium + 10 mM Glucose (B) im Schüttelkolben

Die Acetatbildung fiel bei Kultivierung der Stämme MG1655 WT und MG1655Δ*sucCD* in Minimalmedium bzw. LB-Medium mit jeweils 10 mM Glucose insgesamt niedriger aus als bei entsprechender Kultivierung mit höheren Glucosekonzentrationen. Außerdem bildete die Succinyl-CoA-Synthetase-Deletionsmutante mehr Acetat als der Wildtyp (s. Tab. 15). Der Wildtyp-Stamm konnte im Gegensatz zur *sucCD* - Deletionsmutante bei Übergang in die stationäre Phase das ausgeschiedene Acetat wieder verstoffwechseln (s. Abb. 18). Dies war zu erwarten, da Succinyl-CoA-Synthetase-Mutanten Acetat nicht als alleinige C-Quelle nutzen können (Mat-Jan *et al.*, 1989).

Tab. 15: Wachstum und Acetatbildung der Stämme MG1655 WT und MG1655 Δ *sucCD* bei Wachstum in LB-Medium mit 10 mM Glucose bzw. Minimalmedium mit 10 mM Glucose

Stamm	Wachstumsrate	Biomasse	maximal gebildetes Acetat
	μ [h ⁻¹]	[Δ OD ₆₀₀]	[mM]
LB-Medium mit 10 mM Glucose			
MG1655WT	1,56 +/- 0,0	9 +/- 1	15 +/- 2
MG1655 Δ <i>sucCD</i>	1,56 +/- —	8 +/- —	25 +/- —
Minimalmedium mit 10 mM Glucose			
MG1655WT	0,65 +/- 0,0	2 +/- 0	4 +/- 0
MG1655 Δ <i>sucCD</i>	0,66 +/- —	2 +/- —	5 +/- —

2. Einfluss der Gene *actP* (*yjcG*), *yjch* und *yjeJ* auf die aerobe Acetatbildung

In Chemostat-Kulturen von *E. coli* MG1655 wurden mit Hilfe der DNA-Chiptechnologie Genexpressionsveränderungen bestimmt, die spezifisch bei Glucose-Überflussmetabolismus auftraten (Polen, 2002). Darunter befanden sich auch die Gene *actP* (*yjcG*), *yjch* und *yjeJ*. Die Bedeutung dieser Gene für die aerobe Acetatbildung sollte näher untersucht werden.

2.1. Konstruktion einer *yjcGH*-Deletionsmutante und Charakterisierung bezüglich Wachstum und aerober Acetatbildung

Das Gen *actP* (*yjcG*) kodiert für eine Acetatpermease, ein hydrophobes Protein mit 14 putativen Transmembransegmenten und einer molekularen Masse von 59,1 kDa, welches den aktiven Transport von Acetat in die Zelle ermöglicht, jedoch nicht für Acetattransport essentiell ist (Gimenez *et al.*, 2003). Das Gen *actP* bildet mit den Genen *yjch* und *acs* eine Transkriptionseinheit. Das Gen *yjch* kodiert für ein kleines, putatives, integrales

Membranprotein, welches bei vielen Bakterienarten hoch konserviert auftritt, dessen Funktion aber unbekannt ist (Gimenez *et al.*, 2003).

Um zu überprüfen, ob die Expression der Gene *actP* (*yjcG*) und *yjcH* für die aerobe Acetatbildung von Bedeutung ist, wurden diese Gene, welche unmittelbar benachbart sind, in *E. coli* MG1655 nach der Methode von Datsenko und Wanner (2000) deletiert (s. Abschnitt II, 5.8.), die Deletion mittels PCR verifiziert und der Stamm bezüglich der aeroben Acetatbildung charakterisiert. Dazu wurden die Stämme MG1655 Δ *yjcGH* und MG1655 WT in Minimalmedium und LB-Medium mit jeweils 100 mM Glucose kultiviert und in regelmäßigen Abständen Proben für die Acetatbestimmung entnommen.

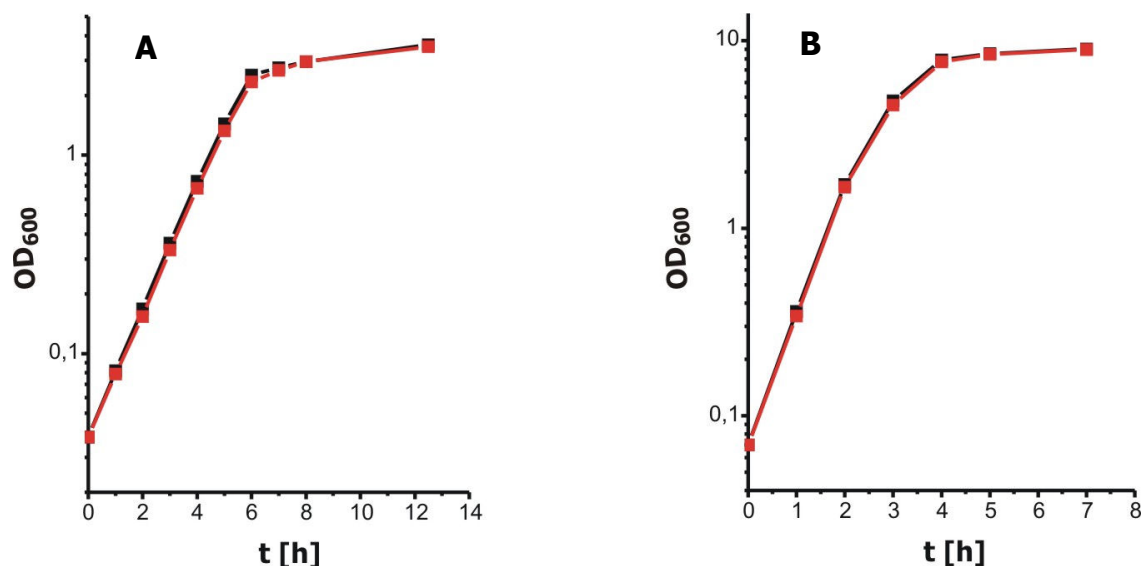


Abb. 19: Wachstum der Stämme MG1655 WT (—■—) und MG1655 Δ *yjcGH* (—■—) bei aerober Kultivierung in Minimalmedium + 100 mM Glucose (A) oder LB-Medium + 100 mM Glucose (B) im Schüttelkolben

Die Stämme MG1655 WT und MG1655 Δ *yjcGH* zeigten keine Unterschiede im Wachstum, unabhängig von der gewählten Kultivierungsbedingung. Wachstumsrate und Biomassebildung waren bei beiden Stämmen gleich (s. Abb. 19; Tab. 16 und Tab. 17). Die aerobe Acetatbildung unterschied sich in der Mutante MG1655 Δ *yjcGH* ebenfalls nicht signifikant vom Wildtyp. Beide Stämme haben im Verlauf der Kultivierung gleiche Mengen Glucose umgesetzt.

Tab. 16: Wachstum, Acetatbildung und Glucoseaufnahme der Stämme MG1655 WT und MG1655 $\Delta yjcGH$ bei aerober Kultivierung in Minimalmedium mit 100 mM Glucose. Dargestellt ist die Acetatkonzentration im Kulturüberstand und die aufgenommene Glucosemenge nach 12,5-stündiger Kultivierung.

	Wachstumsrate	Biomasse	Acetat	Glucose
Stamm	μ [h ⁻¹]	[Δ OD ₆₀₀]	[mM]	[mM]
MG1655 WT	0,7 +/- 0,0	3,5 +/- 0,1	6 +/- 1	22 +/- 4
MG1655 $\Delta yjcGH$	0,7 +/- 0,0	3,5 +/- 0,0	7 +/- 1	23 +/- 4

Tab. 17: Wachstum, Acetatbildung und Glucoseaufnahme der Stämme MG1655 WT und MG1655 $\Delta yjcGH$ bei aerober Kultivierung in LB-Medium mit 100 mM Glucose. Dargestellt ist die Acetatkonzentration im Kulturüberstand und die aufgenommene Glucosemenge nach 8-stündiger Kultivierung.

	Wachstumsrate	Biomasse	Acetat	Glucose
Stamm	μ [h ⁻¹]	[Δ OD ₆₀₀]	[mM]	[mM]
MG1655 WT	1,6 +/- 0,1	9,0 +/- 0,0	41 +/- —	31 +/- —
MG1655 $\Delta yjcGH$	1,6 +/- 0,1	8,9 +/- 0,0	42 +/- —	32 +/- —

Die Deletion der Gene *actP* (*yjcG*) und *yjcH* in *E. coli* MG1655 hatte also keinen Einfluss auf die aerobe Acetatbildung. Dies bedeutet, dass die Expressionsveränderung dieser Gene für den Überflusmetabolismus nicht ursächlich war, sondern als Folge der aeroben Acetatbildung auftrat.

2.2. Konstruktion einer *yjeJ*-Deletionsmutante und Charakterisierung bezüglich Wachstum und aerober Acetatbildung

Das Gen *yjeJ* (b4145) kodiert für ein Protein mit einer molekularen Masse von 32,9 kDa, dessen Funktion unbekannt ist. Um zu überprüfen, ob die Expression von *yjeJ* für die aerobe Acetatbildung von Bedeutung ist, wurde dieses Gen in *E. coli* MG1655 nach der Methode von

Datsenko und Wanner (2000) deletiert, die Deletion mittels PCR verifiziert und der Stamm bezüglich der aeroben Acetatbildung charakterisiert. Dazu wurde der Stamm MG1655 $\Delta yjeJ$ und der isogene Wildtyp als Kontrolle in LB-Medium bzw. Minimalmedium mit jeweils 100 mM Glucose im Schüttelkolben kultiviert (s. Abb.20; Tab. 18 und 19) und Proben für die Acetat- und Glucosebestimmung entnommen.

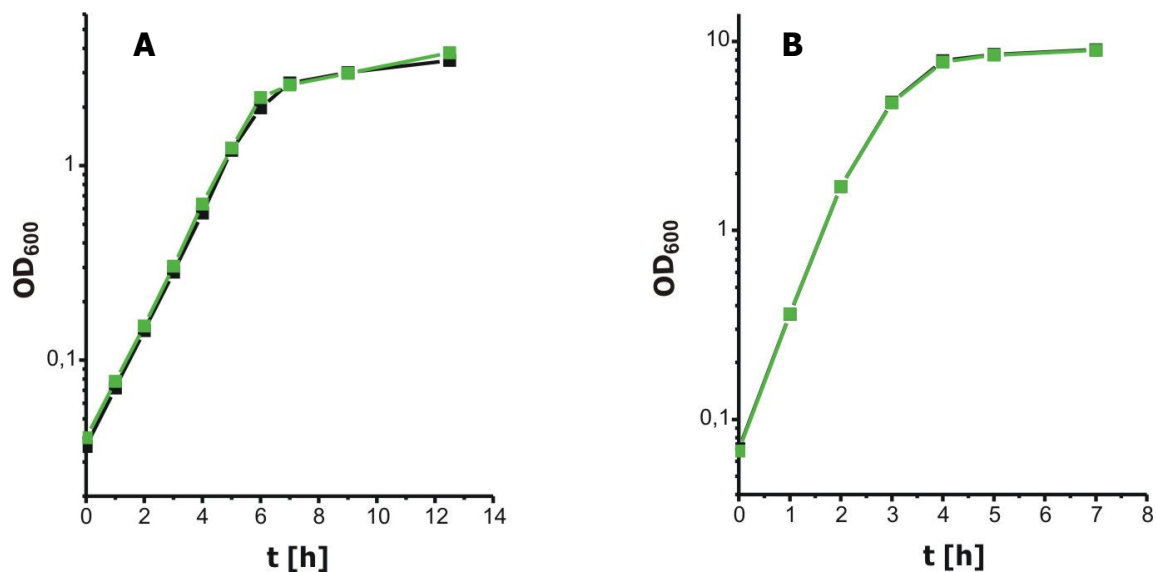


Abb. 20: Wachstum der Stämme MG1655 WT (—■—) und MG1655 $\Delta yjeJ$ (—■—) bei aerober Kultivierung in Minimalmedium + 100 mM Glucose (A) und LB-Medium + 100 mM Glucose (B) im Schüttelkolben

Tab. 18: Wachstum, Acetatbildung und Glucoseaufnahme der Stämme MG1655 WT und MG1655 $\Delta yjeJ$ bei aerober Kultivierung in Minimalmedium mit 100 mM Glucose. Dargestellt ist die Acetatkonzentration im Kulturüberstand und die aufgenommene Glucosemenge nach 12,5-stündiger Kultivierung.

Stamm	Wachstumsrate	Biomasse	Acetat	Glucose
	μ [h ⁻¹]	[Δ OD ₆₀₀]	[mM]	[mM]
MG1655 WT	0,7 +/- 0,0	3,50 +/- 0,1	6 +/- 1	22 +/- 4
MG1655 $\Delta yjeJ$	0,7 +/- 0,0	3,7 +/- 0,1	6 +/- 1	18 +/- 1

Der Stamm MG1655 $\Delta yjeJ$ zeigte unter beiden Kultivierungsbedingungen das gleiche Wachstumsverhalten wie der Wildtyp. Es konnten keine Unterschiede bei der Wachstumsrate oder der Biomassebildung festgestellt werden. Darüberhinaus war die aerobe Acetatbildung in der Mutante unverändert im Vergleich zum Wildtyp. Beide Stämme haben gleiche Mengen an Glucose umgesetzt (s. Tab. 18 und 19).

Tab. 19: Wachstum, Acetatbildung und Glucoseaufnahme der Stämme MG1655 WT und MG1655 $\Delta yjeJ$ bei aerober Kultivierung in LB-Medium mit 100 mM Glucose. Dargestellt ist die Acetatkonzentration im Kulturüberstand und die aufgenommene Glucosemenge nach 8-stündiger Kultivierung.

Stamm	Wachstumsrate	Biomasse	Acetat	Glucose
	μ [h ⁻¹]	[Δ OD ₆₀₀]	[mM]	[mM]
MG1655 WT	1,6 +/- 0,1	9,0 +/- 0,0	41 +/- —	31 +/- —
MG1655 $\Delta yjeJ$	1,6 +/- 0,1	8,9 +/- 0,0	39 +/- —	31 +/- —

Das Ergebnis zeigt, dass die Expression des Gens *yjeJ* für die aerobe Acetatbildung nicht von Bedeutung ist. Dies bedeutet, dass die veränderte Expression des *yjeJ*-Gens, welche bei Überflusmetabolismus beobachtet wurde (Polen, 2002), nicht ursächlich für die aerobe Acetatbildung ist, sondern wahrscheinlich als Folge der aeroben Acetatbildung auftrat.

3. Untersuchungen zur Regulation der aeroben Acetatbildung

Die Überexpression des *sdhCDAB* - *b0725* - *sucABCD* - Operons, die durch chromosomalen Austausch des *Psdh* - Promotors in *E. coli* MG1655 erzielt wurde, hatte eine deutliche Reduktion der aeroben Acetatbildung zur Folge. Es ist daher zu vermuten, dass Regulatorproteine, welche in der *sdh* - Promotorregion binden, auch für die Regulation der aeroben Acetatbildung von Bedeutung sind. In der *sdh* - Promotorregion gibt es eine ArcA-Bindestelle (Lynch & Lin, 1996) und eine putative CRP-/cAMP-Bindestelle, welche aufgrund ihrer Sequenzhomologie identifiziert wurde (Wilde & Guest, 1986). Beide Bindestellen wurden durch den chromosomalen Promotoraustausch entfernt, so dass man auch von einer Deregulation sprechen kann.

3.1. Regulation durch das ArcA/ArcB-Zweikomponentensystem

Das ArcA/ArcB-Zweikomponentensystem in *E. coli*, welches aus der transmembranen Sensorkinase ArcB und dem cytosolischen Antwortregulator ArcA besteht, moduliert die Expression zahlreicher Gene in Abhängigkeit vom Redoxzustand der Zelle über das Chinon/Chinol-Verhältnis. Ubichinon und Menachinon inhibieren die Autophosphorylierung der Sensorkinase ArcB, so dass die Phosphorylierung des Antwortregulators ArcA und die Repression der Zielgene unterbleibt (Georgellis *et al.*, 2001). Die Sensorkinase ArcB besitzt drei katalytische Domänen: Eine primäre Transmitterdomäne, eine Empfängerdomäne und eine sekundäre Transmitterdomäne, über welche die Phosphorylierung und Aktivierung von ArcA erfolgt (Kwon *et al.*, 2000). Der Promotor des *sdhCDAB* - b0725 - *sucABCD* - Operons enthält eine ArcA-Bindestelle (Lynch & Lin, 1996).

3.1.1. Charakterisierung von *arcA* - und *arcB* - Deletionsmutanten bezüglich Wachstum und aerober Acetatbildung

Um zu überprüfen, ob das ArcA/ArcB - Zweikomponentensystem an der Regulation der aeroben Acetatbildung beteiligt ist, wurden *arcA* - und *arcB* - Deletionsmutanten hinsichtlich der aeroben Acetatbildung charakterisiert. Dazu wurden die Stämme BW25113 Δ *arcA*, BW25113 Δ *arcB* und der Wildtyp als Kontrolle in LB-Medium bzw. Minimalmedium mit jeweils 100 mM Glucose im Schüttelkolben kultiviert (s. Abb. 21).

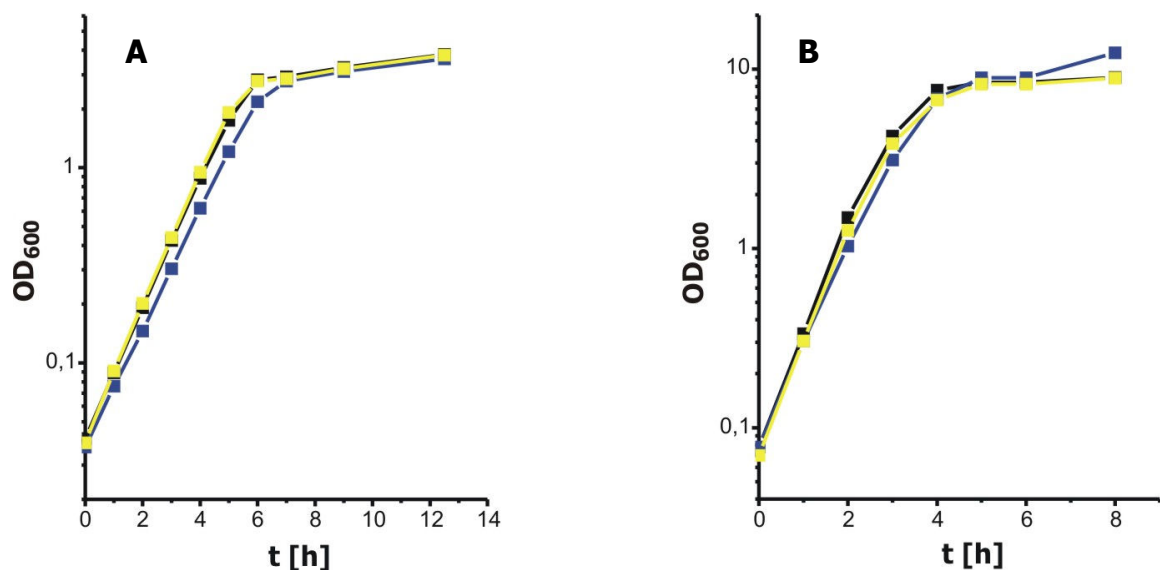


Abb. 21: Wachstum der Stämme BW25113 (■), BW25113 Δ *arcA* (■) und BW25113 Δ *arcB* (■) bei aerober Kultivierung in Minimalmedium + 100 mM Glucose (A) oder LB-Medium + 100 mM Glucose (B) im Schüttelkolben.

Bei Kultivierung in Minimalmedium mit 100 mM Glucose verhielten sich die *arcA*- und die *arcB*-Deletionsmutante ähnlich wie der Wildtyp in Bezug auf Wachstum, Glucoseaufnahme und Acetatbildung. Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, wie anhand der Daten in Tab. 21 zu erkennen ist.

Tab. 20: Wachstum, Acetatbildung und Glucoseaufnahme der Stämme BW25113, BW25113 Δ *arcA* und BW25113 Δ *arcB* bei aerober Kultivierung in LB-Medium mit 100 mM Glucose. Dargestellt ist die Acetatkonzentration im Kulturüberstand und die aufgenommene Glucosemenge nach 8-stündiger Kultivierung.

Stamm	Wachstumsrate	Biomasse	Acetat	Glucose
	μ [h ⁻¹]	[Δ OD ₆₀₀]	[mM]	[mM]
BW25113	1,53 +/- 0,08	9,0 +/- 0,2	44 +/- —	32 +/- —
BW25113 Δ <i>arcA</i>	1,36 +/- 0,09	12,3 +/- 0,1	18 +/- —	44 +/- —
BW25113 Δ <i>arcB</i>	1,48 +/- 0,04	8,9 +/- 0,0	40 +/- —	32 +/- —

Tab. 21: Wachstum, Acetatbildung und Glucoseaufnahme der Stämme BW25113, BW25113 Δ *arcA* und BW25113 Δ *arcB* bei aerober Kultivierung in Minimalmedium mit 100 mM Glucose. Dargestellt ist die Acetatkonzentration im Kulturüberstand und die aufgenommene Glucosemenge nach 12,5-stündiger Kultivierung.

Stamm	Wachstumsrate	Biomasse	Acetat	Glucose
	μ [h ⁻¹]	[Δ OD ₆₀₀]	[mM]	[mM]
BW25113	0,77 +/- 0,0	3,8 +/- 0,0	6 +/- 0	21 +/- 0
BW25113 Δ <i>arcA</i>	0,70 +/- 0,0	3,2 +/- 0,0	6 +/- 1	19 +/- 3
BW25113 Δ <i>arcB</i>	0,80 +/- 0,0	3,4 +/- 0,1	5 +/- 1	22 +/- 2

Bei Kultivierung in LB-Medium dagegen waren deutliche Unterschiede zwischen Wildtyp und der *arcA*-Deletionsmutante zu erkennen. Die *arcA*-Mutante wuchs zwar mit vergleichbarer Geschwindigkeit, bildete aber deutlich mehr Biomasse als der Wildtypstamm und setzte auch

dementsprechend mehr Glucose um. Demgegenüber bildet die *arcA*-Deletionsmutante 50% weniger Acetat als der Wildtyp. Die deutlichen Unterschiede in der Acetatbildung machten sich aber erst bei Übergang in die stationäre Phase bemerkbar. Dies deutet darauf hin, dass das ArcA/ArcB-Zweikomponentensystem unter bestimmten Wachstumsbedingungen Einfluss auf die aerobe Acetatbildung hat. Die *arcB*-Deletionsmutante dagegen zeigte den gleichen Phänotyp wie der Wildtyp. Möglicherweise wird ArcA in diesem Fall via "cross talk" durch andere Sensorkinasen phosphoryliert (Wanner, 1992) oder es gibt einen basalen Anteil an phosphoryliertem ArcA unter aeroben Bedingungen, so dass eine Bindung an Zieloperons mit hochaffinen Bindestellen möglich ist (Lynch, 1996).

3.2. Regulation durch CRP/cAMP

CRP (catabolite regulatory protein) ist ein wichtiger Regulator in *E. coli*, welcher an der Regulation von mehr als 100 Promotoren beteiligt ist (Kolb *et al.*, 1993). CRP kann sowohl als Aktivator als auch als Repressor der Transkription fungieren und benötigt für seine Aktivität cAMP als Cofaktor (Kolb *et al.*, 1993). Bei CRP-abhängigen Promotoren der Klasse I aktiviert CRP die Transkription durch Interaktion mit der carboxyterminalen Domäne der α -Untereinheit der RNA-Polymerase. CRP/cAMP erhöht so wahrscheinlich die Affinität der Polymerase zum Promotor (Busby, 1999). Der Promotor des *sdhCDAB - b0725 - sucABCD* - Operons *Psdh* enthält eine putative CRP/cAMP-Bindestelle (Wilde & Guest, 1986).

3.2.1. Charakterisierung einer *cyaA*-Deletionsmutante bezüglich Wachstum und aerober Acetatbildung

Um zu überprüfen, in welcher Weise CRP/cAMP für die Regulation der aeroben Acetatbildung von Bedeutung ist, wurde eine *cyaA*-Deletionsmutante hinsichtlich der aeroben Acetatbildung charakterisiert. Dieser Mutante fehlt die Adenylatcyclase, welche die Synthese von cAMP katalysiert. Dementsprechend kann diese Mutante keinen CRP/cAMP-Regulationskomplex mehr bilden, welcher für die Aktivierung der Transkription des *sdhCDAB - b0725 - sucABCD* - Operons erforderlich wäre. Die Kultivierung der *cyaA* - Mutante (BW26356) und des isogenen Wildtypstammes als Kontrolle erfolgte in LB-Medium + 10 mM Glucose und in Minimal-medium + 10 mM Glucose.

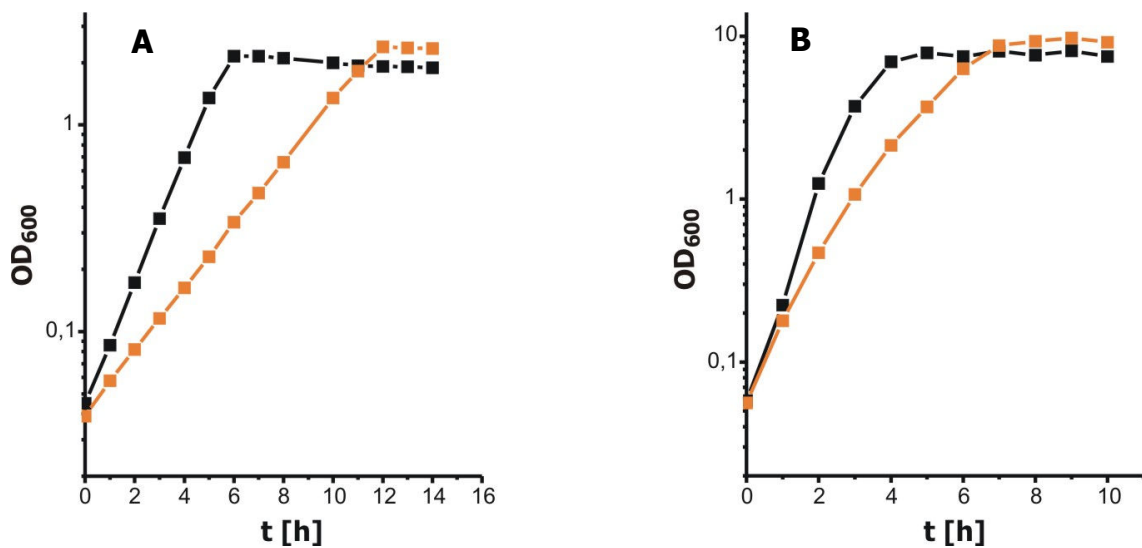


Abb. 22: Wachstum der Stämme BW25113 (■) und BW25113Δ*cyaA* (□) bei aerober Kultivierung in Minimalmedium + 10 mM Glucose (A) und LB-Medium + 10 mM Glucose (B) im Schüttelkolben

Die Wachstumsrate der *cyaA*-Mutante war sowohl bei Kultivierung in Minimalmedium mit Glucose als auch in LB-Medium mit Glucose deutlich reduziert (s. Tab. 22 und 23). Dies bestätigt Kumar (1976) und ist auf eine langsamere Glucoseaufnahme zurückzuführen, da die Transkription des für die Glucose-spezifische Permease EIICB^{Glc} kodierenden *ptsG*-Gens der positiven Kontrolle durch CRP/cAMP unterliegt (Kimata *et al.*, 1997; Postma *et al.*, 1993). Außerdem konnte beobachtet werden, dass die *cyaA*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp mehr Biomasse bildete.

Tab. 22: Wachstum und Acetatbildungskoeffizienten der Stämme BW25113 und BW25113Δ*cyaA* bei aerober Kultivierung in LB-Medium + 10 mM Glucose. Die Acetatausbeute bezieht sich auf die aufgenommene Glucosemenge und wurde am Ende der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt.

Stamm	Wachstumsrate	Biomasse	Acetat
	μ [h ⁻¹]	[Δ OD ₆₀₀]	Y _{P/S}
BW25113	1,53	8,1	1,42
BW25113Δ <i>cyaA</i>	1,06	9,7	1,12

Tab. 23: Wachstum und Acetatbildungskoeffizienten der Stämme BW25113 und BW25113 Δ *cyaA* bei aerober Kultivierung in Minimalmedium + 10 mM Glucose. Die Acetatausbeute bezieht sich auf die aufgenommene Glucosemenge und wurde am Ende der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt

Stamm	Wachstumsrate	Biomasse	Acetat
	μ [h ⁻¹]	[Δ OD ₆₀₀]	Y _{P/S}
BW25113	0,69	2,1	0,15
BW25113 Δ <i>cyaA</i>	0,35	2,3	0,17

Bei Kultivierung in LB-Medium + 10 mM Glucose war die Acetatausbeute in der *cyaA*-Deletionsmutante niedriger als im Wildtyp. Bei Kultivierung in Minimalmedium + 10 mM Glucose zeigten Wildtyp und die *cyaA*-Deletionsmutante vergleichbare Ausbeuten.

Darüberhinaus konnte die *cyaA*-Deletionsmutante das gebildete Acetat nicht wiederverwerten (hier nicht gezeigt). Acetat wird über die Acetatpermease ActP (*yjcG*) in die Zelle aufgenommen (Gimenez *et al.*, 2003) und von der Acetyl-CoA-Synthetase zu Acetyl-CoA umgesetzt (Brown *et al.*, 1977; Kumari *et al.*, 1995), welches dann im Zentralstoffwechsel metabolisiert werden kann. Da die Transkription der Acetyl-CoA-Synthetase aber abhängig von der Aktivierung durch CRP/cAMP ist (Kumari *et al.*, 2000), kann das gebildete Acetat nicht wieder verstoffwechselt werden.

3.3. Regulation durch den Transkriptionsregulator GadE (YhiE)

GadE ist ein essentielles Regulatorprotein des Glutamat-abhängigen Säureresistenzsystems von *E. coli*. GadE, ein Regulator vom LuxR-Typ, fungiert als direkter Aktivator der Gene *gadA*, *gadB* und *gadC*, welche für die glutamatabhängigen Decarboxylasen GadA und GadB, sowie den γ -Aminobuttersäure/Glutamat-Antiporter GadC kodieren (Ma *et al.*, 2003).

In Chemostat-Kulturen von *E. coli* MG1655 waren mit Hilfe der DNA-Chiptechnologie Genexpressionsveränderungen bestimmt worden, die spezifisch bei Glucose-Überfluss-metabolismus auftraten. Das Gen *yhiE* (*gadE*) zeigte dort ebenfalls erhöhte Expression (Polen, 2002).

3.3.1. Konstruktion einer *yhiE*-Deletionsmutante und Charakterisierung bezüglich Wachstum und aerober Acetatbildung

Um zu überprüfen, ob der Regulator GadE (YhiE) auch für die Regulation der aeroben Acetatbildung von Bedeutung ist, wurde das Gen *yhiE* (*gadE*) in *E. coli* MG1655 nach der Methode von Datsenko und Wanner (2000) deletiert, die Deletion mittels PCR verifiziert und der Stamm bezüglich der aeroben Acetatbildung charakterisiert.

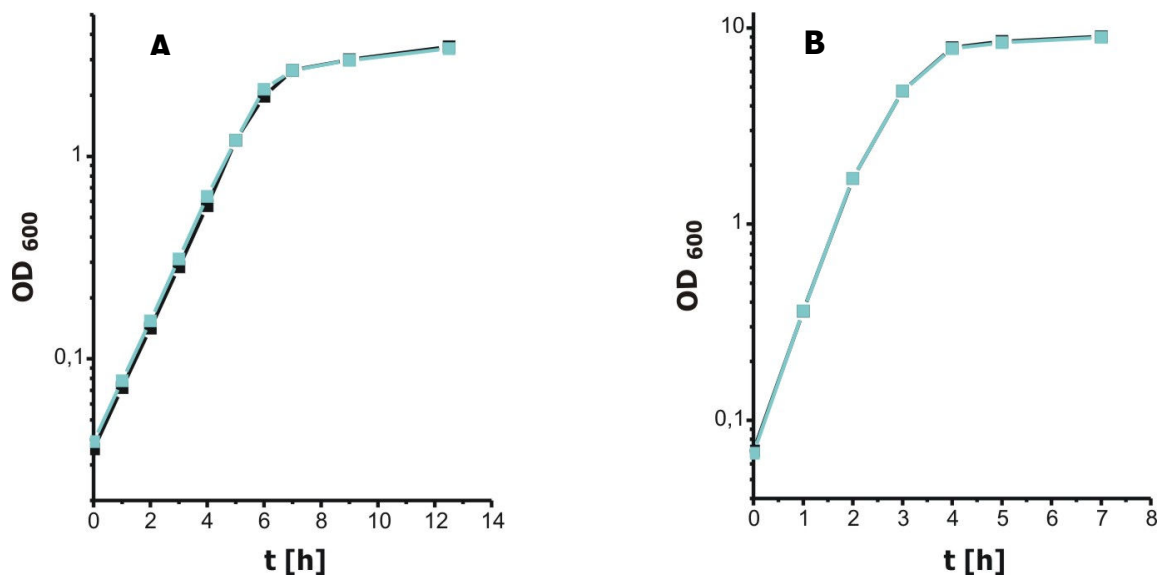


Abb. 23: Wachstum der Stämme MG1655 (—■—) und MG1655Δ*yhiE* (—■—) bei aerober Kultivierung in Minimalmedium + 100 mM Glucose (A) und LB-Medium + 100 mM Glucose (B) im Schüttelkolben

Die Kultivierung von MG1655Δ*yhiE* und dem Wildtyp als Kontrolle erfolgte in Minimalmedium bzw. LB-Medium + 100 mM Glucose im Schüttelkolben (s. Abb. 23). Unter beiden Kultivierungsbedingungen verhielt sich die Mutante wie der Wildtyp. Die Stämme unterschieden sich nicht im Wachstum. Wachstumsrate, Biomassebildung und Glucoseverbrauch waren vergleichbar. Außerdem konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der aeroben Acetatbildung festgestellt werden (s. Tab. 24 und 25).

Tab. 24: Wachstum, Acetatbildung und Glucoseaufnahme der Stämme MG1655 WT und MG1655 $\Delta yhiE$ bei aerober Kultivierung in Minimalmedium + 100 mM Glucose. Dargestellt ist die Acetatkonzentration im Kulturüberstand und die verbrauchte Glucosemenge nach 12,5-stündiger Kultivierung.

Stamm	Wachstumsrate	Biomasse	Acetat	Glucose
	μ [h ⁻¹]	[Δ OD ₆₀₀]	[mM]	[mM]
MG1655 WT	0,7 +/- 0,0	3,5 +/- 0,1	6 +/- 1	22 +/- 4
MG1655 $\Delta yhiE$	0,7 +/- 0,0	3,4 +/- 0,1	8 +/- 2	21 +/- 2

Tab. 25: Wachstum, Acetatbildung und Glucoseaufnahme der Stämme MG1655 WT und MG1655 $\Delta yhiE$ bei aerober Kultivierung in LB-Medium + 100 mM Glucose. Dargestellt ist die Acetatkonzentration im Kulturüberstand und die verbrauchte Glucosemenge nach 8-stündiger Kultivierung.

Stamm	Wachstumsrate	Biomasse	Acetat	Glucose
	μ [h ⁻¹]	[Δ OD ₆₀₀]	[mM]	[mM]
MG1655 WT	1,6 +/- 0,1	9,0 +/- 0,0	41 +/- —	31 +/- —
MG1655 $\Delta yhiE$	1,6 +/- 0,1	9,0 +/- 0,1	45 +/- —	39 +/- —

Da die Deletion des Gens *yhiE* (*gadE*) in *E. coli* MG1655 keinen signifikanten Einfluß auf die aerobe Acetatbildung hat, ist die mit steigender Acetatbildung korrelierende erhöhte Expression von *yhiE* (*gadE*), welche in Chemostatexperimenten beobachtet wurde (Polen, 2002), wahrscheinlich eine Folge, nicht aber Ursache der aeroben Acetatbildung. Möglicherweise wird der bei Acetatbildung auftretenden intrazellulären Acidifizierung des Cytoplasmas durch die Decarboxylierung von Glutamat zu γ -Aminobutyrat, wobei ein Proton gebunden wird, entgegengewirkt. Für die Regulation der aeroben Acetatbildung ist GadE (YhiE) nicht von Bedeutung.

4. Untersuchungen zur Regulation des *sdhCDAB-b0725-sucABCD*-Operons

4.1. Identifizierung von Transkriptionsregulatoren mittels Affinitätschromatographie

Die Transkription des *sdhCDAB - b0725 - sucABCD* - Operons wird hauptsächlich am stromaufwärts gelegenen *Psdh* - Promotor initiiert und reguliert (Cunningham & Guest, 1998). Darüberhinaus enthält das Operon noch einen schwächeren, internen Promotor (*Psuc*), welcher zusätzlich die Transkription der Gene *sucABCD* unterstützt (Cunningham & Guest, 1998; Park *et al.*, 1997). Der interne *Psuc* - Promotor wird durch IHF reprimiert (Park *et al.*, 1997). Die vom *Psdh* - Promotor ausgehende Transkription wird durch FNR und ArcA reprimiert (Lynch & Lin, 1996; Park *et al.*, 1995; Park *et al.*, 1997; Shen & Gunsalus, 1997) und wahrscheinlich durch CRP/cAMP aktiviert (Gosset *et al.*, 2004).

Es stellte sich die Frage, ob es noch weitere Regulatorproteine gibt, welche an den *Psdh* - Promotor binden, die Transkription des *sdhCDAB - b0725 - sucABCD* - Operons beeinflussen und an der Regulation der aeroben Acetatbildung beteiligt sind.

Die Identifizierung weiterer Transkriptionsregulatoren sollte mittels DNA-Affinitätschromatographie erfolgen. Dazu wurde die *sdh* - Promotorregion über PCR amplifiziert und über einen Biotin-Tag an Streptavidin-beschichtete paramagnetische Beads gekoppelt (s. Abb. 24). Diese wurden dann mit Proteinrohextrakten inkubiert, welche von *E. coli* - Zellen des Wildtyps stammten, die in Glucose-Minimalmedium kultiviert und während der exponentiellen Wachstumsphase geerntet worden waren.

Spezifisch gebundene Proteine wurden eluiert und über SDS-PAGE aufgetrennt (s. Abb. 25). Die Proteine wurden anschließend über MALDI-TOF-Massenspektrometrie identifiziert.

Auf diese Weise konnte eine Interaktion der Proteine Dps, ArcA, YdcI und einer dGTP-Triphosphohydrolase (EC 3.1.5.1.) mit der *sdh* - Promotorregion nachgewiesen werden. Die Bindung der dGTP-Triphosphohydrolase ist unspezifisch. Das Protein Dps ist ein DNA-bindendes Protein und spielt eine Rolle bei unterschiedlichen Stress-Antworten (Nair, 2004). Es schützt durch unspezifische Bindung die DNA z.B. vor oxidativer Schädigung durch Peroxide oder UV-Strahlung (Martinez, 1997).

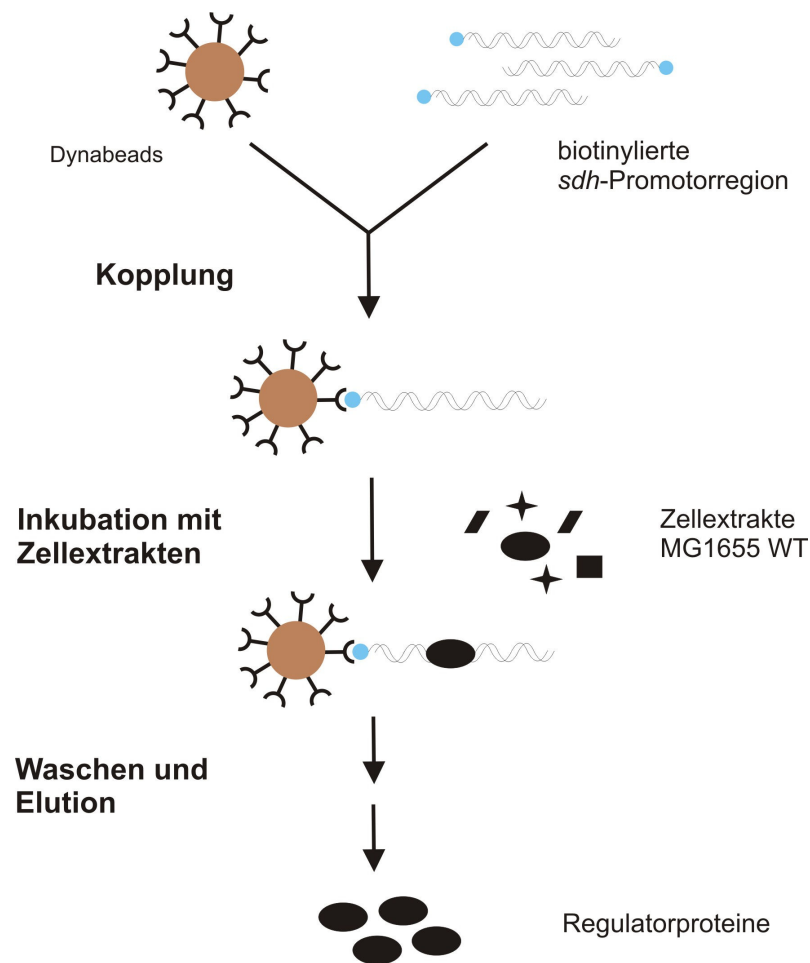


Abb. 24: Identifizierung von Regulatorproteinen, die mit der *sdh*-Promotorregion interagieren, mit Hilfe von Dynabeads® Streptavidin.

Darüberhinaus wird die Expression von Dps durch kurzkettige, schwache, organische Säuren wie Acetat in exponentiell wachsenden Zellen bei neutralem pH induziert (Arnold *et al.*, 2001). Für die Regulation der aeroben Acetatbildung erscheint Dps daher nicht von Bedeutung.

Desweiteren wurde der Regulator ArcA identifiziert. Es konnte jedoch bereits in Abschnitt III, 3.1. gezeigt werden, dass die Deletion des *arcA*-Gens in *E. coli* MG1655 bei Kultivierung in Minimalmedium mit Glucose ohne Einfluss auf die aerobe Acetatbildung blieb und daher die Regulation durch das ArcA/ArcB Zweikomponentensystem keine Rolle für die aerobe Acetatbildung unter diesen Bedingungen spielt.

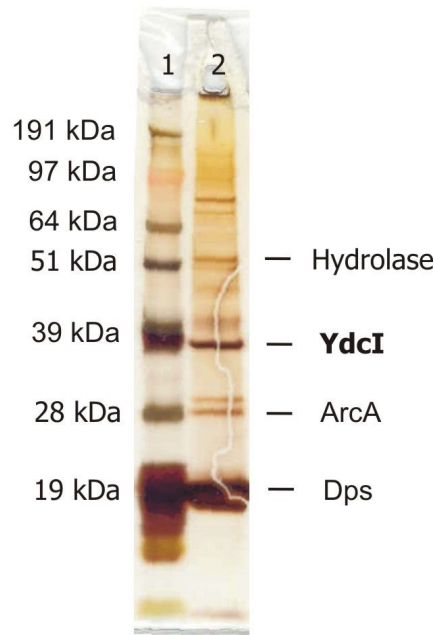


Abb. 25: Silbergefärbtes SDS - Gel der Proteine, die durch DNA - Affinitätschromatographie aus einem Proteinextrakt von *E. coli* MG1655 angereichert wurden. Spur 1: Proteinstandard See BlueII; Spur 2: Proteinprobe.

Abgesehen von diesen Proteinen konnte noch ein weiteres DNA-bindendes Protein identifiziert werden: YdcI, ein putatives Regulatorprotein vom LysR-Typ mit einer Helix-Turn-Helix (HTH) - DNA-Bindedomäne (<http://www.expasy.ch>; Swiss-Prot entry P77171) (s. Abb. 26). Die Interaktion dieses Proteins mit der *sdh* - Promotorregion war bisher nicht bekannt und könnte auch für die aerobe Acetatbildung von Bedeutung sein.

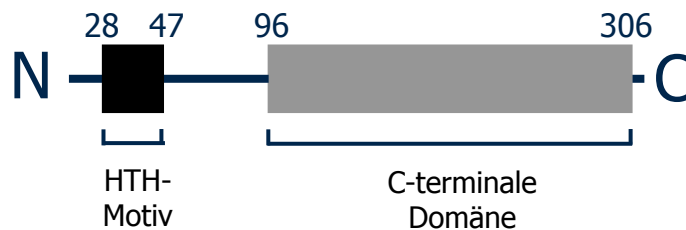


Abb. 26: Schematische Darstellung des putativen Regulatorproteins YdcI aus *E. coli*

IV. Diskussion

Das Phänomen der aeroben Acetatbildung ist seit mehr als vier Jahrzehnten bekannt. Dennoch war es bisher nicht gelungen, die molekularen Grundlagen aufzuklären. Die aerobe Acetatbildung wird auf ein Ungleichgewicht zwischen Glucoseaufnahme und der Kapazität der zentralen Stoffwechselwege zurückgeführt (Holms, 1996). Dabei werden eine limitierte Kapazität des TCA-Zyklus (Han, 1992; Majewski & Domach, 1990) oder der Atmungskette (Ingledew, 1984) diskutiert. Die verringerte Expression von Genen des TCA-Zyklus und der Atmungskette, die spezifisch bei aerober Acetatbildung auftraten, würde die Ausscheidung von Acetat als Folge einer zu geringen Kapazität des TCA-Zyklus und/oder der Atmungskette auf der Grundlage einer genetischen Regulation erklären (Polen, 2002).

1. Der TCA-Zyklus ist von zentraler Bedeutung für die aerobe Acetatbildung

Durch gezielte Deregulation der Expression des *sdhCDAB-b0725-sucABCD*-Operons, welches für die TCA-Zyklus-Enzyme Succinatdehydrogenase, Succinyl-CoA-Synthetase und α -Ketoglutaratdehydrogenase kodiert, konnte die aerobe Acetatbildung in *E. coli* beträchtlich reduziert werden. Der chromosomale Austausch des *Psdh* - Promotors in *E. coli* MG1655 gegen den *tetA*-Promotor hatte dabei eine vierfache Erhöhung der spezifischen Aktivität von Succinatdehydrogenase und Succinyl-CoA-Synthetase zur Folge. Die spezifische Aktivität der α -Ketoglutaratdehydrogenase war um den Faktor 1,7 erhöht. Die im Vergleich zu den anderen beiden Enzymen weniger stark erhöhte Aktivität der α -Ketoglutaratdehydrogenase ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass durch den Promotoraustausch die Gene *sucA* und *sucB*, welche für die Decarboxylase- und Transacylase-Komponenten des Multi-Enzymkomplexes der α -Ketoglutaratdehydrogenase kodieren, überexprimiert wurden, nicht aber die von dem *lpdA*-Gen kodierte Lipoamiddehydrogenase-Komponente. Da letztere in der Zelle unter den entsprechenden Bedingungen jedoch im Überschuss vorliegt (Smith & Neidhardt, 1983), reicht die Überexpression der Gene *sucA* und *sucB* bereits aus, um eine 1,7-fache Steigerung der Enzymaktivität zu erzielen. Auf Transkriptebene waren die mRNA-Level in dem Stamm MG1655 Δ *Psdh::Ptet* gegenüber dem Wildtyp entsprechend in der gleichen Größenordnung erhöht.

Durch zusätzliche, plasmidkodierte Überexpression des *lpdA*-Gens in dem Stamm MG1655 Δ *Psdh::Ptet* konnte keine weitere Reduzierung der aeroben Acetatbildung erzielt

werden. Darüberhinaus war das Wachstum bei diesem Stamm erheblich beeinträchtigt. Dieser drastische Einfluß auf den Stoffwechsel ist nicht direkt erklärbar. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass die durch das *lpdA*-Gen kodierte Lipoamiddehydrogenase-Untereinheit auch Bestandteil des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes ist und deren Synthese einer komplexen, koordinierten Regulation unterliegt (Cunningham *et al.*, 1998; Quail, 1994; Spencer & Guest, 1985). Darüberhinaus ist die Lipoamiddehydrogenase-Untereinheit auch Bestandteil des Glycin-Abbau-Systems in *E. coli* (Steiert *et al.*, 1990). Es ist daher möglich, dass die Überexpression des *lpdA*-Gens den Stoffwechsel stark durcheinanderbringt.

Der Promotoraustausch hatte zusätzlich eine erhöhte Citratsynthase-Aktivität in dem Stamm MG1655 Δ *Psdh*::*Ptet* zur Folge. Der Promotor des *gluA*-Gens, welches für die Citratsynthase kodiert, ist dem *Psdh* - Promotor direkt benachbart. Die Transkription erfolgt in gegenläufiger Orientierung. Möglicherweise wurde durch den Promotoraustausch gleichzeitig die Transkription des *gluA*-Gens dereguliert. Dies erklärt die erhöhte Citratsynthase-Proteinkonzentration, wie auf dem SDS-Gel in Abb. 9 zu erkennen ist und entsprechend die erhöhte spezifische Enzymaktivität (s. Tab. 4).

Die Charakterisierung des Stammes MG1655 Δ *Psdh*::*Ptet* bezüglich der aeroben Acetatbildung hatte gezeigt, dass der Austausch des chromosomalen *Psdh* - Promotors mit einer deutlichen Reduzierung der aeroben Acetatbildung verbunden war. Dieser Effekt war eindeutig und konnte sowohl bei Kultivierung in LB-Medium als auch in Minimalmedium mit jeweils unterschiedlich hohem Angebot an Glucose beobachtet werden.

Bei aerober Batchkultivierung im Fermenter in Minimalmedium mit 10 mM Glucose konnten die Eigenschaften des Stammes darüber hinaus unter genau definierten Bedingungen charakterisiert werden: Bei unveränderter Glucoseaufnahmerate und unverändertem Wachstum war die Acetatbildungsrate gegenüber dem Wildtyp um etwa 50 % reduziert. Es konnte keine Nebenproduktbildung beobachtet werden. Stattdessen war die CO₂-Bildung in dem Maße erhöht, in welchem die Acetatbildung reduziert war. Dies deutet auf eine gesteigerte *in-vivo* - Aktivität des gesamten TCA-Zyklus hin.

Umgekehrt konnte bei Blockierung des TCA-Zyklus in einer Succinyl-CoA-Synthetase-Deletionsmutante bei Kultivierung in Minimalmedium mit Glucose entsprechend eine erhöhte Acetatbildung beobachtet werden.

Bei einer erhöhten TCA-Zyklus-Aktivität ist zu erwarten, dass auch die Energiegewinnung durch oxidative Phosphorylierung erhöht ist. Der Stamm MG1655 Δ *Psdh*::*Ptet* zeigt jedoch das gleiche Wachstumsverhalten wie der Wildtyp bei Kultivierung in Minimalmedium mit 10 mM Glucose. Diese zusätzliche Energie kann nicht für zusätzliches Wachstum genutzt

werden, da der Biomasseertrag unverändert bleibt. Möglicherweise treten Entkopplungsmechanismen oder "Futile cycling" auf (Russell & Cook, 1995), um den Energieüberschuss zu reduzieren. Vorstellbar wären Entkopplungsmechanismen: *E. coli* besitzt z.B. zwei verschiedene NADH-Dehydrogenasen, die mit unterschiedlicher energetischer Effizienz arbeiten (Calhoun *et al.*, 1993).

Die Deregulation des *sdhCDAB-b0725-sucABCD*-Operons in *E. coli* MG1655 und die dadurch erzielte Reduzierung der aeroben Acetatbildung zeigen, dass primär die begrenzte Kapazität des TCA-Zyklus und nicht etwa der Atmungskette ursächlich für die aerobe Acetatbildung ist. Die erhöhte Aktivität der α -Ketoglutaratdehydrogenase, Succinyl-CoA-Synthetase, Succinatdehydrogenase und Citratsynthase bewirken eine Steigerung der *in vivo* -TCA-Zyklus-Aktivität, die eine Verringerung der Acetatbildung zur Folge hat. Dies ist auch in Übereinstimmung mit Stoffflussmodellen, die anhand von Berechnungen unter Bezug auf experimentelle Daten erstellt wurden (Delgado & Liao, 1997; Lee *et al.*, 2002; Majewski & Domach, 1990).

Dies bedeutet außerdem, dass bei aerober Acetatbildung nicht in erster Linie die Verfügbarkeit von freiem CoA oder die NAD^+ -Regenerierung eine Begrenzung darstellen.

Da die Überexpression der Gene *sdhCDAB*, *sucAB* und *sucCD* die TCA-Zyklus-Aktivität erhöht, bedeutet dies umgekehrt, dass eines der durch diese Gene kodierten drei TCA-Zyklus Enzyme (Succinatdehydrogenase, Succinyl-CoA-Synthetase oder α -Ketoglutaratdehydrogenase) oder mehrere zusammen den Stofffluss durch den TCA-Zyklus bei Wachstum auf Glucose limitieren. Die Citratsynthase konnte als limitierendes Enzym ausgeschlossen werden (Walsh & Koshland, 1985). Die Überexpression der Citratsynthase erhöht nicht den Kohlenstofffluss durch den TCA-Zyklus (Walsh *et al.*, 1987). Es wird vermutet, dass in *E. coli* bei aerobem Wachstum in Glucose-Minimalmedium die α -Ketoglutaratdehydrogenase limitierend ist (Amarasingham & Davis, 1965; Lee *et al.*, 2002; Majewski & Domach, 1990).

2. MG1655 Δ *Psdh::Ptet* – Biotechnologische Aspekte

Bei biotechnologischen Fermentationsprozessen stellt die aerobe Acetatbildung ein Problem dar, da sie sowohl Wachstum als auch Produktbildung negativ beeinflusst (Luli und Strohl, 1990). Der Stamm MG1655 Δ *Psdh::Ptet* bildete im Vergleich zum Wildtyp deutlich weniger

Acetat bei unverändertem Wachstum und es konnte keine Nebenproduktbildung beobachtet werden. Ob sich dieser Stamm für biotechnologische Anwendungen eignet, wurde am Beispiel der rekombinanten Proteinproduktion getestet. Als Modellprotein wurde das "Grün Fluoreszierende Protein" (GFP) verwendet.

Die Untersuchungen zur Expression des GFP-Modellproteins haben jedoch gezeigt, dass die rekombinante Proteinproduktion in dem Stamm MG1655 Δ *Psdh::Ptet* im Vergleich zum Wildtyp nicht verbessert war. Dies ist dadurch zu erklären, dass der Kohlenstoff, welcher nicht in die Acetatbildung fließt, in Form von CO₂ ausgeschieden wird und damit nicht für zusätzliche Proteinproduktion zur Verfügung steht. Eine Verbesserung der Proteinproduktion aufgrund der Tatsache, dass sich weniger toxisches Nebenprodukt im Kulturmedium angesammelt hat, konnte auch nicht beobachtet werden. Die toxische Wirkung von Acetat macht sich erst bemerkbar, wenn Konzentrationen von mehr als 15-25 mM erreicht werden (Jensen, 1990). Bei den Kultivierungen in Minimalmedium waren aber die Acetatkonzentrationen im Medium wesentlich niedriger. Bei Kultivierung in LB-Medium mit 100 mM Glucose erreichte die Acetatkonzentration zwar toxische Konzentrationen von 37 mM, jedoch erst in der stationären Phase. Unter diesen Bedingungen war die GFP-Fluoreszenz überraschenderweise in der Mutante sogar etwas niedriger als im Wildtyp. Dieser Effekt konnte nicht erklärt werden. Die Bildung von Inclusion-Bodies wurde ausgeschlossen. Möglicherweise macht sich eine Verbesserung der rekombinanten Proteinproduktion aber bemerkbar unter anderen Fermentationsbedingungen, bei denen Acetat in höheren Konzentrationen gebildet wird (Hochzelldichte-Fermentationen). Unter solchen Bedingungen ist dann die Inhibierung durch Acetat in dem Stamm MG1655 Δ *Psdh::Ptet* vielleicht weniger stark ausgeprägt und die Produktausbeute entsprechend höher. Zukünftige Arbeiten sollen klären, ob in Hochzelldichte-Fermentationen höhere Produktausbeuten mit dem Stamm MG1655 Δ *Psdh::Ptet* erzielt werden können.

3. Regulation der aeroben Acetatbildung

Die Deregulation der Expression des *sdhCDAB - b0725 - sucABCD*-Operons in *E. coli* MG1655 durch Austausch des *Psdh* - Promotors führte zu verringerter Acetatbildung. Daher ist es wahrscheinlich, dass die Regulation des *Psdh* - Promotors wesentlich für die aerobe Acetatbildung von Bedeutung ist. In Abb. 27 sind die verschiedenen bekannten Regulationen, die unter entsprechenden Bedingungen wirksam sind, dargestellt. Für die Regulation der aeroben Acetatbildung sind diejenigen Regulationsmechanismen von

Interesse, welche unter aeroben Bedingungen in Anwesenheit hoher Glucosekonzentrationen wirksam, bzw. nicht wirksam sind und die Regulation des *Psdh* - Promotors betreffen. In diesem Zusammenhang wurde die Regulation durch das Zweikomponentensystem ArcA/ArcB und die Regulation durch CRP/cAMP untersucht.

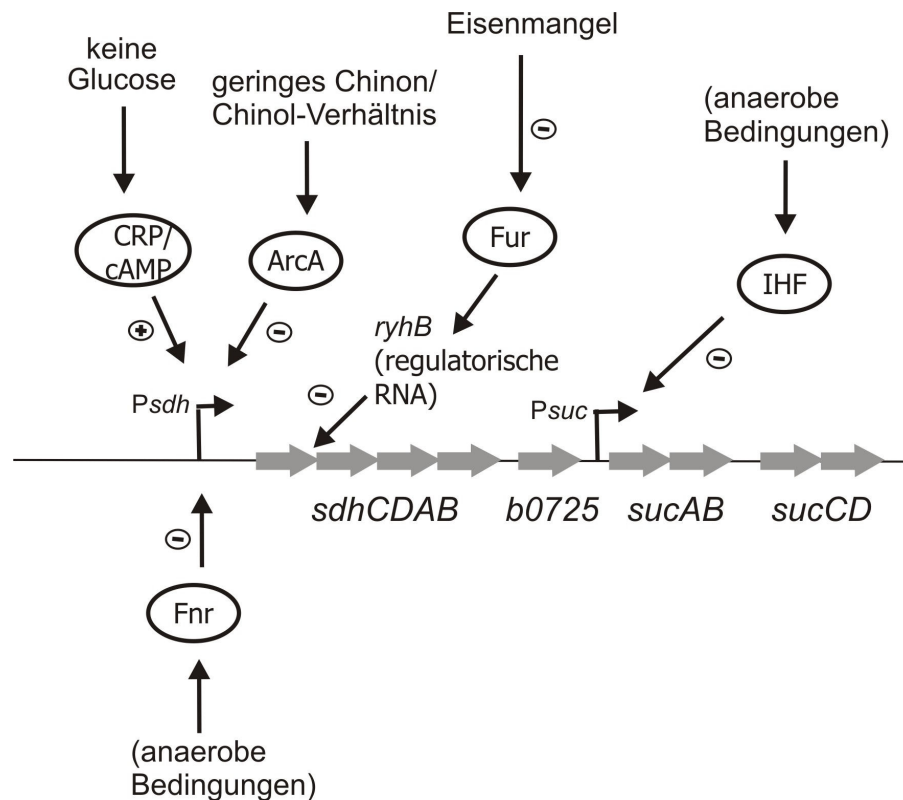


Abb. 27: Regulation des *sdhCDAB-b0725-sucABCD*-Operons in *E. coli* ($\oplus$ = Aktivierung, $\ominus$ = Repression) (Gosset *et al.*, 2004; Masse & Gottesman, 2002; Park *et al.*, 1995; Park *et al.*, 1997; Zheng *et al.*, 2004).

Die Deletion der Gene des ArcA/ArcB-Zweikomponentensystems hatte bei Kultivierung in Glucose-Minimalmedium keine Auswirkungen auf die aerobe Acetatbildung. Es konnte bereits früher durch Kultivierung von ArcA-Deletionsmutanten in Glucose-Minimalmedium gezeigt werden, dass diese sich nicht vom Wildtyp bezüglich der aeroben Acetatbildung unterscheiden. (Prohl *et al.*, 1998). Im Widerspruch dazu stehen Untersuchungen, bei denen die Deletion des *arcA*-Gens zu reduzierter Acetatbildung, erhöhter TCA-Zyklus-Enzymaktivität und gleichzeitig einem erhöhten Stofffluss durch den TCA-Zyklus bei aerober Kultivierung in Glucose-Minimalmedium führte (Perrenoud & Sauer, 2005).

Bei Kultivierung in LB-Medium mit 100 mM Glucose bildete die *arcA*-Deletionsmutante im Verlauf der Kultivierung weniger Acetat als der Wildtyp. Dies machte sich aber erst bei Übergang in die stationäre Phase bemerkbar. Aus diesen Ergebnissen ist zu schließen, dass eine Regulation durch das ArcA/ArcB-Zweikomponentensystem die Acetatbildung beeinflusst, aber nicht ursächlich für die aerobe Acetatbildung in der exponentiellen Wachstumsphase ist.

DNA-Chip-Analysen haben gezeigt, dass die Expression der Gene des *sdhCDAB* - *b0725* - *sucABCD* - Operons der positiven Kontrolle durch CRP/cAMP unterliegt (Gosset *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2004). Die Deletion des *cyaA*-Gens hatte bei Kultivierung in Glucose-Minimalmedium keine Veränderung der aeroben Acetatbildung zur Folge. Diese *cyaA*-Mutante kann infolge der Deletion der Adenylatcyclase keinen cAMP/CRP-Komplex mehr synthetisieren. In Gegenwart von Glucose ist jedoch die Aktivierung der Adenylatcyclase unterbunden, so dass eine Aktivierung der Transkription des *sdhCDAB* - *b0725* - *sucABCD* - Operons wie in der *cyaA*-Deletionsmutante unterbleibt und die aerobe Acetatbildung unverändert bleibt. Die im Vergleich zum Wildtyp etwas verringerte aerobe Acetatbildung der *cyaA*-Deletionsmutante bei Kultivierung in LB-Medium mit Glucose ist nicht erklärbar. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Deletion des Adenylatcyclase-Gens vielfältige Auswirkungen auf den Stoffwechsel haben kann.

Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass der Regulator GadE (YhiE), welcher die glutamatabhängige Säureresistenz aktiviert (Ma *et al.*, 2003), für die Regulation der aeroben Acetatbildung nicht von Bedeutung ist. Die in Chemostat-Experimenten beobachtete erhöhte Expression des *gadE* (*yhiE*)-Gens, die mit steigender Acetatbildung korrelierte (Polen, 2002), ist wahrscheinlich eine Folge der aeroben Acetatbildung.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte darüber hinaus eine weitere Regulation des *sdhCDAB* - *b0725* - *sucABCD*-Operons identifiziert werden. Mittels DNA-Affinitätschromatographie konnte die Interaktion des Proteins YdcI mit der *sdh* - Promotorregion nachgewiesen werden. YdcI wurde aus Zellen angereichert, welche unter aeroben Bedingungen in Glucose-Minimalmedium kultiviert wurden.

Das Protein YdcI wird von dem Gen *ydcI* (b1422) kodiert, hat eine Länge von 307 Aminosäuren und besitzt entsprechend eine molekulare Masse von 33,4 kDa. Eine Datenbankrecherche (<http://www.expasy.ch>; Swiss-Prot entry P77171) ergab, dass YdcI ein putatives Regulatorprotein der LysR-Familie ist: Es besitzt eine für diesen Regulator-Typ charakteristische N-terminale Helix-Turn-Helix-DNA-Bindedomäne. Ansonsten ist wenig

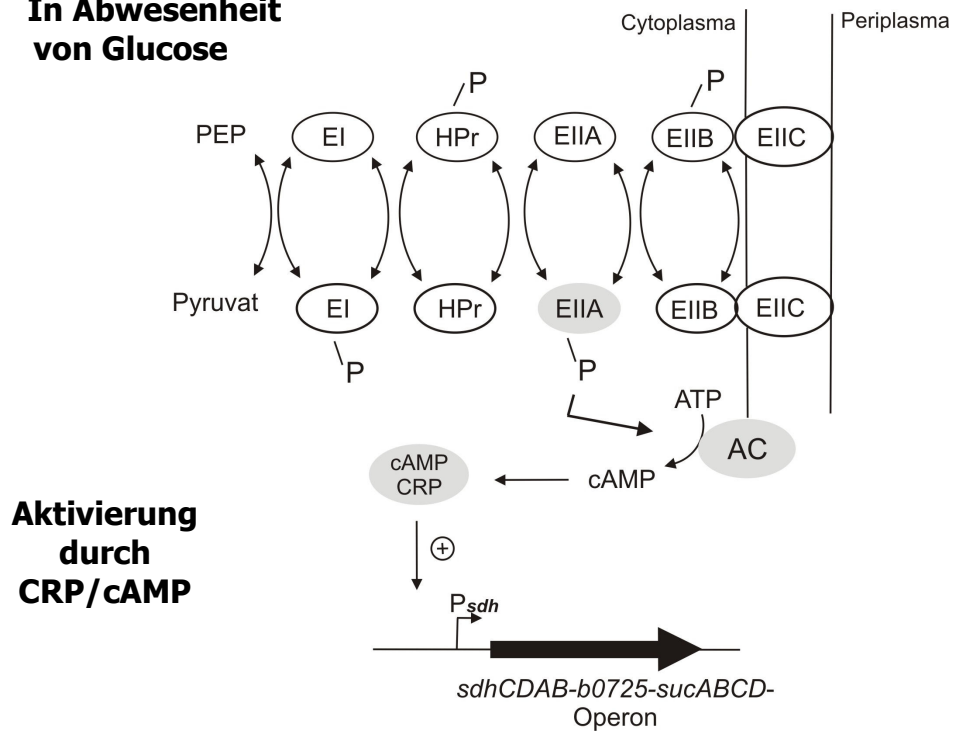
charakteristisches T-N₁₁-A-Motiv, welches ohne Ausnahme bei allen lysR-Typ-Regulatoren auftritt. Die übrigen Nukleotide der partiell palindromischen Sequenz sind variabel, so dass eine spezifische Erkennung gewährleistet ist.

Solch ein typisches T-N₁₁-A-Bindemotiv konnte auch in der *sdh* - Promotorregion an Position – 67 bis – 81 stromaufwärts des Transkriptionsstartpunkts des *sdhC* - Gens gefunden werden (s. Abb. 28). Es ist vorstellbar, dass YdcI dort bindet.

Die meisten lysR-Typ-Regulatoren aktivieren die Transkription ihrer Zielgene. Oft sind Regulator- und Zielgen direkt benachbart und in divergenter Orientierung angeordnet: Bei gleichzeitiger Aktivierung des Zielgens reprimiert der Regulator dann seine eigene Synthese. Es gibt aber auch Beispiele, bei denen das nicht so ist (OxyR). Das *ydcI* - Gen ist nicht in der Nähe des *sdhCDAB* - *b0725* - *sucABCD* - Operons lokalisiert.

DNA-Chip-Analysen hatten gezeigt, dass CRP/cAMP die Expression der Gene des *sdhCDAB* - *b0725* - *sucABCD* - Operons positiv reguliert (Zheng *et al.*, 2004). Bei Kultivierung in LB-Medium war die Expression der Gene des *sdhCDAB* - *b0725* - *sucABCD* - Operons in einer *crp*-Mutante gegenüber dem Wildtyp um den Faktor 2 reduziert. In Gegenwart von Glucose war die Expression der Gene des *sdhCDAB* - *b0725* - *sucABCD* - Operons in der *crp*-Mutante nochmals um den Faktor 2 reduziert. Dieser Effekt ist CRP/cAMP-unabhängig und bestätigt die Forderung von Park und Gunsalus (1995) nach einer CRP/cAMP-unabhängigen Katabolitrepression des *sdhCDAB* - *b0725* - *sucABCD* - Operons, bei welcher der Regulator Cra (FruR) ausgeschlossen werden konnte. Möglicherweise ist YdcI für diese CRP/cAMP-unabhängige Katabolitrepression verantwortlich. Entsprechend der Expressionsveränderung im DNA-Chip-Experiment, sollte YdcI dann als Repressor fungieren. Obwohl die meisten LysR-Typ-Regulatoren Aktivatoren sind, sind auch mehrere Lys-R-Typ-Regulatoren bekannt, welche die Transkription ihrer Zielgene reprimieren: Dies sind CcpC aus *B. subtilis* (Jourlin-Castelli, 2000), HexA aus *Erwinia carotovora* (Harris, 1998) und NodD2 aus *Rhizobium* (Fellay, 1998). Ein Beispiel für einen negativen lysR-Typ-Regulator in *E. coli* ist LrhA (Blumer, 2005; Lehnen, 2002). Es ist also nicht auszuschließen, dass YdcI ebenfalls ein Repressor ist und es ist folgendes Modell zur Glucose-abhängigen Regulation der Expression der Gene des *sdhCDAB* - *b0725* - *sucABCD* - Operons in *E. coli* vorstellbar, welches in Abb. 29 skizziert ist:

A In Abwesenheit von Glucose



B In Anwesenheit von Glucose

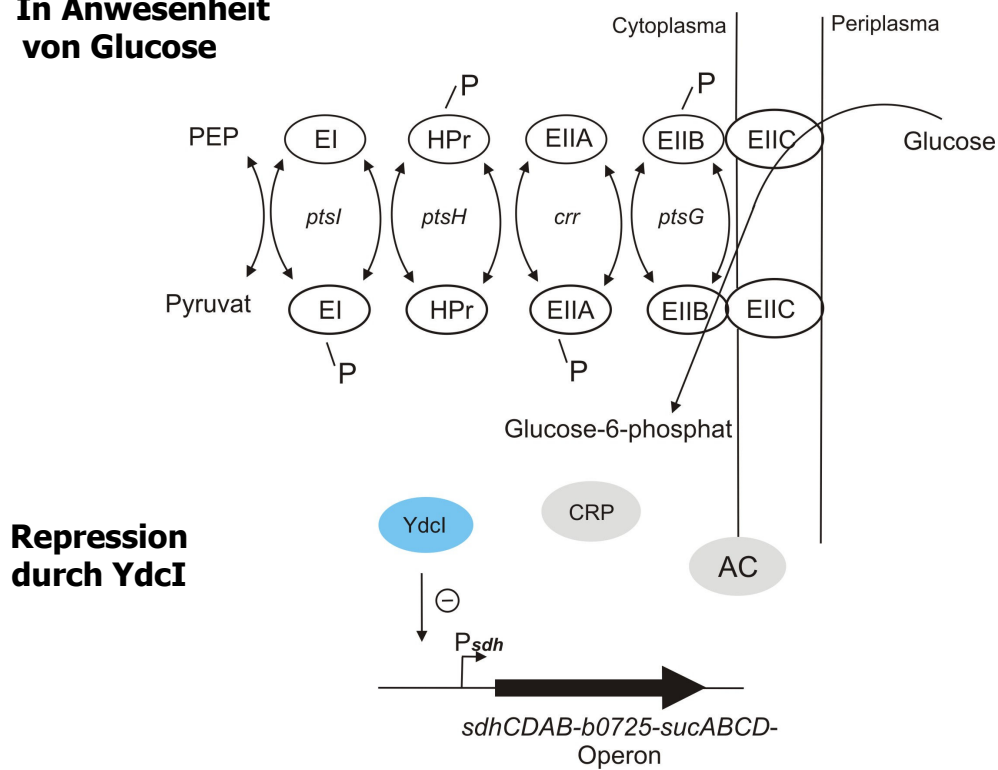


Abb. 29: Modell zur Glucose-abhängigen Regulation des *sdhCDAB-b0725-sucABCD*-Operons in *E. coli* MG1655 (Erklärung s. Text).

In Abwesenheit von Glucose wird die Adenylatcyclase (AC) durch das phosphorylierte PTS-Protein EI_{IIA} aktiviert und cAMP gebildet. Unter diesen Bedingungen aktiviert cAMP/CRP die Transkription der Gene des *sdhCDAB-b0725-sucABCD*-Operons. In Anwesenheit von Glucose wird die Transkription der Gene des *sdhCDAB-b0725-sucABCD*-Operons nicht durch CRP/cAMP aktiviert. Stattdessen reprimiert YdcI die Transkription dieser Gene.

Es ist vorstellbar, dass der Regulator YdcI eine entscheidende Rolle bei der Regulation der aeroben Acetatbildung spielt, indem er in Gegenwart von Glucose wahrscheinlich die Transkription der Gene des *sdhCDAB-b0725-sucABCD*-Operons reprimiert. In dieses Regulationsmodell (s. Abb. 29) würde auch die Beteiligung des Regulators Mlc passen, dessen Überexpression zu reduzierter Acetatbildung führte (Hosono *et al.*, 1995), denn Mlc fungiert als Repressor des *ptsG*-Gens, welches für das EIIBC-Protein des Glucose-PTS-Systems kodiert, und als Repressor des *pts*-Operons, welches für die allgemeinen PTS-Proteine kodiert (Kim *et al.*, 1999; Kimata *et al.*, 1998; Nam *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2000).

Die Expression des *gltA*-Gens unterliegt, wie die Expression des *sdhCDAB-b0725-sucABCD*-Operons, der positiven Kontrolle durch CRP/cAMP (Gosset *et al.*, 2004). Darüberhinaus wird auch eine CRP/cAMP-unabhängige Katabolitrepression gefordert (Park *et al.*, 1994). Der Austausch des *Psdh*-Promotors war wahrscheinlich auch mit einer Deregulation des *gltA*-Promotors verbunden, welche eine erhöhte Citratsynthase-Aktivität zur Folge hatte. Dieser Effekt lässt sich nicht durch CRP/cAMP erklären. Der Promotoraustausch führte jedoch möglicherweise zur Aufhebung der CRP/cAMP-unabhängigen Katabolitrepression. Es ist vorstellbar, dass das Citratsynthasegen *gltA* auch durch YdcI reguliert wird.

Zukünftige Arbeiten sollen zeigen, welche Bedeutung YdcI für die Regulation der aeroben Acetatbildung hat. Möglicherweise erfolgt die Ausscheidung von Acetat als Folge einer zu geringen Kapazität des TCA-Zyklus, ähnlich wie in *B. subtilis* (Tobisch, 1999), auf der Basis von Katabolitrepression. Es ist vorstellbar, dass YdcI dabei eine entscheidende Rolle spielt.

V. Zusammenfassung

E. coli ist für die mikrobielle Herstellung von Feinchemikalien und rekombinanten Proteinen von Bedeutung. Während des Fermentationsprozesses tritt häufig eine als Überflussmetabolismus bezeichnete aerobe Acetatbildung auf. Diese ist aufgrund der Toxizität des Acetats problematisch. Die Kenntnis der molekularen Ursachen der aeroben Acetatbildung, welche für eine effiziente Problembeseitigung erforderlich ist, war bisher nicht vorhanden. Vorarbeiten haben gezeigt, dass die aerobe Acetatbildung mit Genexpressionsveränderungen korrelierte, welche sowohl Gene des Tricarbonsäurezyklus als auch der Atmungskette sowie weitere Gene (u.a. *gadE*, *actP*, *yjcH* und *yjeJ*) betrafen. In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- Die Deregulation des *sdhCDAB-b0725-sucABCD*-Operons durch chromosomalen Austausch des *sdh*-Promotors in *E. coli* MG1655 hatte eine vierfach erhöhte Aktivität der Succinatdehydrogenase und Succinyl-CoA-Synthetase sowie eine 1,7-fach erhöhte Aktivität der α -Ketoglutaratdehydrogenase zur Folge.
Die aerobe Acetatbildung des konstruierten Stammes war im Vergleich zum Wildtypstamm bei unverändertem Wachstum und unverändertem Glucoseumsatz um mehr als 50 % reduziert. Es konnte keine Bildung von Nebenprodukten beobachtet werden. Stattdessen trat eine gegenüber dem Wildtyp-Stamm erhöhte CO₂-Bildung auf, welche durch eine erhöhte *in-vivo*-Aktivität des TCA-Zyklus erklärt werden kann. Die Deletion der *sucCD*-Gene führte demgegenüber zur Verringerung der TCA-Zyklus-Aktivität und zu erhöhter Acetatbildung.
Dies zeigte, dass die bei Glucoseüberflussmetabolismus auftretende verringerte Synthese der TCA-Zyklus-Enzyme α -Ketoglutaratdehydrogenase, Succinyl-CoA-Synthetase und Succinatdehydrogenase und eine damit verbundene, herabgesetzte Aktivität des TCA-Zyklus primär ursächlich für die aerobe Acetatbildung ist.
- Die Deletion der Gene *gadE* (*yhiE*), *actP* (*yjcG*), *yjcH* und *yjeJ* in *E. coli* MG1655 hatte keinen Einfluss auf den Überflussmetabolismus. Dies zeigte, dass die Expressionsveränderung dieser Gene nicht ursächlich für die aerobe Acetatbildung ist. Die Expressionsveränderung dieser Gene trat möglicherweise als Folge der aeroben Acetatbildung auf.
- Durch DNA-Affinitätschromatographie mit der *sdh*-Promotorregion konnte ein weiterer Transkriptionsregulator des *sdhCDAB-b0725-sucABCD*-Operons identifiziert werden: YdcI. Dieser Regulator, welcher aufgrund seiner Sequenz der LysR-Familie zugeordnet wird, konnte aus Zellen angereichert werden, die auf Glucose-Minimalmedium kultiviert wurden. Es ist anzunehmen, dass YdcI an der Regulation der aeroben Acetatbildung beteiligt ist.

VI. Literaturverzeichnis

Abdel-Hamid, A. M., Attwood, M. M. & Guest, J. R. (2001). Pyruvate oxidase contributes to the aerobic growth efficiency of *Escherichia coli*. *Microbiology* **147**, 1483-1498.

Akesson, M., Hagander, P. & Axelsson, J. P. (2001). Avoiding acetate accumulation in *Escherichia coli* cultures using feedback control of glucose feeding. *Biotechnol Bioeng* **73**, 223-230.

Amarasingham, C. R. & Davis, B. D. (1965). Regulation of alpha-ketoglutarate dehydrogenase formation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **240**, 3664-3668.

Aristidou, A. A., San, K-Y and Bennett, G. (1994). Modification of central metabolic pathway in *Escherichia coli* to reduce acetate accumulation by heterologous expression of the *Bacillus subtilis* acetolactate synthase gene. *Biotechnol Bioeng* **44**, 944-951.

Arnold, C. N., McElhanon, J., Lee, A., Leonhart, R. & Siegele, D. A. (2001). Global analysis of *Escherichia coli* gene expression during the acetate-induced acid tolerance response. *J Bacteriol* **183**, 2178-2186.

Axe, D. D. and Bailey, J. E. (1995). Transport of lactate and acetate through the energized cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **47**, 8-19.

Bergmeyer, H. (1985). In *Methods of Enzymatic Analysis*.

Bermejo, L. L., Welker, N. E. & Papoutsakis, E. T. (1998). Expression of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 genes in *Escherichia coli* for acetone production and acetate detoxification. *Appl Environ Microbiol* **64**, 1079-1085.

Bertrand, K. P., Postle, K., Wray, L. V., Jr. & Reznikoff, W. S. (1984). Construction of a single-copy promoter vector and its use in analysis of regulation of the transposon Tn10 tetracycline resistance determinant. *J Bacteriol* **158**, 910-919.

Bettelheim, K. A. (1992). The genus *Escherichia*. In *The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria*, pp. 2701. Edited by A. Balows, Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.-H.: Springer-Verlag.

Beutler, H.-O. (1984). In *Methods of Enzymatic Analysis*, pp. 639-645.

Biebl, H., Menzel, K., Zeng, A. P., Deckwer, W.D. (1999). Microbial production of 1,3-propanediol. *Appl Microbiol Biotechnol* **52**, 289-297.

Blattner, F. R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B. & Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**, 1453-1474.

Blumer, C., Kleefeld, A., Lehnen, D., Heintz, M., Dobrindt, U., Nagy, G., Michaelis, K., Emödy, L., Polen, T., Rachel, R., Wendisch, V. F., Uden, G. (2005). Regulation of

type 1 fimbriae synthesis and biofilm formation by the transcriptional regulator LrhA of *Escherichia coli*. *Microbiology* **151**, 3287-3298.

Böck, A., Sawers, G. (1996). Fermentation. In *Escherichia coli and Salmonella*, pp. 262-282. Edited by Neidhardt, F. C. *et al.* Washington, D.C.: American Society for Microbiology Press.

Bongaerts, J., Kramer, M., Muller, U., Raeven, L. & Wubbolts, M. (2001). Metabolic engineering for microbial production of aromatic amino acids and derived compounds. *Metabolic Engineering* **3**, 289-300.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.

Bridger, W. A., R.F. Ramaley, and P.D. Boyer. (1969). Succinyl coenzyme A synthetase from *Escherichia coli*. In *Methods in Enzymology*, pp. 70-75.

Britten, R. (1954). Extracellular metabolic products of *Escherichia coli* during rapid growth. *Science* **119**, 578.

Brown, T. D., Jones-Mortimer, M. C. & Kornberg, H. L. (1977). The enzymic interconversion of acetate and acetyl-coenzyme A in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* **102**, 327-336.

Browning, D. F., Beatty, C. M., Sanstad, E. A., Gunn, K. E., Busby, S. J. & Wolfe, A. J. (2004). Modulation of CRP-dependent transcription at the *Escherichia coli* *acsP2* promoter by nucleoprotein complexes: anti-activation by the nucleoid proteins FIS and IHF. *Mol Microbiol* **51**, 241-254.

Buchholz, R. (1995). Bioverfahrenstechnik I. Unterlagen zur Vorlesung. TU Berlin.

Busby, S., Ebright, R. (1999). Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J Mol Biol* **293**, 199-213.

Calhoun, M. W., Oden, K. L., Gennis, R. B., Demattos, M. J. T. & Neijssel, O. M. (1993). Energetic Efficiency of *Escherichia coli* - Effects of Mutations in Components of the Aerobic Respiratory-Chain. *Journal of Bacteriology* **175**, 3020-3025.

Cha, H. J., Wu, C. F., Valdes, J. J., Rao, G. & Bentley, W. E. (2000). Observations of green fluorescent protein as a fusion partner in genetically engineered *Escherichia coli*: monitoring protein expression and solubility. *Biotechnol Bioeng* **67**, 565-574.

Chang, D. E., Shin, S., Rhee, J. S. & Pan, J. G. (1999). Acetate metabolism in a *pta* mutant of *Escherichia coli* W3110: importance of maintaining acetyl coenzyme A flux for growth and survival. *J Bacteriol* **181**, 6656-6663.

Chang, Y. Y., Wang, A. Y. & Cronan, J. E., Jr. (1994). Expression of *Escherichia coli* pyruvate oxidase (PoxB) depends on the sigma factor encoded by the *rpoS* (*katF*) gene. *Mol Microbiol* **11**, 1019-1028.

- Chao, Y. P. & Liao, J. C. (1993).** Alteration of growth yield by overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **59**, 4261-4265.
- Cherrington, C. A., Hinton, M., Mead, G. C. & Chopra, I. (1991).** Organic-Acids - Chemistry, Antibacterial Activity and Practical Applications. *Advances in Microbial Physiology* **32**, 87-108.
- Cho, S., Shin, D., Ji, G.E., Heu, S., Ryu, S. (2005).** High-level recombinant protein production by overexpression of Mlc in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* **In Press**.
- Chopra, I. (1985).** Mode of action of tetracyclines and the nature of bacterial resistance to them. In *The tetracyclines*, pp. 317-392. Edited by Boothe, J. H. and Hlavka, J. J. Heidelberg: Springer-Verlag.
- Chou, C. H., Bennett, G. N. & San, K. Y. (1994).** Effect of modulated glucose uptake on high-level recombinant protein production in a dense *Escherichia coli* culture. *Biotechnol Prog* **10**, 644-647.
- Chou, C. H., Bennett, G. N. and San K. Y. (1994).** Effect of modified glucose uptake using genetic engineering techniques on high-level recombinant protein production in *Escherichia coli* dense culture. *Biotechnol Bioeng* **44**, 952-960.
- Clark, D. P. (1989).** The fermentation pathways of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* **63**, 223-234.
- Cunningham, L. & Guest, J. R. (1998).** Transcription and transcript processing in the *sdhCDAB-sucABCD* operon of *Escherichia coli*. *Microbiology* **144**, 2113-2123.
- Cunningham, L., Georgellis, D., Green, J. & Guest, J. R. (1998).** Co-regulation of lipoamide dehydrogenase and 2-oxoglutarate dehydrogenase synthesis in *Escherichia coli* : characterization of an ArcA binding site in the *lpd* promoter. *FEMS Microbiol Lett* **169**, 403-408.
- Darlison, M. G., Spencer, M. E. & Guest, J. R. (1984).** Nucleotide sequence of the *sucA* gene encoding the 2-oxoglutarate dehydrogenase of *Escherichia coli* K12. *Eur J Biochem* **141**, 351-359.
- Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. (2000).** One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6640-6645.
- Debabov, V. G. (2003).** The threonine story. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **79**, 113-136.
- Delgado, J. & Liao, J. C. (1997).** Inverse flux analysis for reduction of acetate excretion in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* **13**, 361-367.
- Diaz-Ricci, J. C., Regan, L., Bailey, J. E. (1991).** Effect of alteration of the acetic acid synthesis pathway on the fermentation pattern of *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* **38**, 1318-1324.

- Dittrich, C. R., Bennett, G. N. & San, K. Y. (2005).** Characterization of the Acetate-Producing Pathways in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* **21**, 1062-1067.
- Dower, W. J., Miller, J. F. & Ragsdale, C. W. (1988).** High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**, 6127-6145.
- Eikmanns, B. J., Thum-Schmitz, N., Eggeling, L., Ludtke, K. U. & Sahm, H. (1994).** Nucleotide sequence, expression and transcriptional analysis of the *Corynebacterium glutamicum gltA* gene encoding citrate synthase. *Microbiology* **140**, 1817-1828.
- Eisenberg, R. C., Dobrogosz, W. J. (1967).** Gluconate metabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **93**, 941-949.
- Elmansi, E. M. T. & Holms, W. H. (1989).** Control of Carbon Flux to Acetate Excretion During Growth of *Escherichia coli* in Batch and Continuous Cultures. *Journal of General Microbiology* **135**, 2875-2883.
- El-Mansi, M. (2004).** Flux to acetate and lactate excretions in industrial fermentations: physiological and biochemical implications. *J Ind Microbiol Biotechnol*.
- Engels, S., Schweitzer, J. E., Ludwig, C., Bott, M., Schaffer, S. (2004).** *clpC* and *clpP1P2* gene expression in *Corynebacterium glutamicum* is controlled by a regulatory network involving the transcriptional regulators ClgR and HspR as well as the ECF sigma factor sigma(H). *Molecular Microbiology* **52**, 285-302.
- Ensley, B. D., B. J. Ratzkin, T. D. Osslund, M. J. Simon, L. P. Wackett, and D. T. Gibson (1983).** Expression of naphthalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in the biosynthesis of indigo. *Science* **222**, 167-169.
- Escherich, T. (1885).** Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings. *Fortschritte Med.* **3**, 515-554.
- Farmer, W. R. & Liao, J. C. (1997).** Reduction of aerobic acetate production by *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **63**, 3205-3210.
- Fellay, R., Hanin, M., Montorzi, G., Frey, J., Freiberg, C., Golinowski, W., Staehelin, C., Broughton, W. J. , Jabbouri, S. (1998).** NodD2 of *Rhizobium* sp. NGR234 is involved in the repression of the *nod ABC* operon. *Mol Microbiol* **27**.
- Feng, J., M. R. Atkinson, W. McCleary, J. B. Stock, B. L. Wanner, and A. J. Ninfa (1992).** Role of phosphorylated metabolic intermediates in the regulation of glutamine synthetase synthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **174**, 6061-6070.
- Fischer, E. & Sauer, U. (2003).** Metabolic flux profiling of *Escherichia coli* mutants in central carbon metabolism using GC-MS. *European Journal of Biochemistry* **270**, 880-891.
- Fountoulakis, M. & Langen, H. (1997).** Identification of proteins by matrix-assisted laser desorption ionization-mass spectrometry following in-gel digestion in low-salt, nonvolatile buffer and simplified peptide recovery. *Anal Biochem* **250**, 153-156.

- Fuhrer, T., Fischer, E. & Sauer, U. (2005).** Experimental identification and quantification of glucose metabolism in seven bacterial species. *Journal of Bacteriology* **187**, 1581-1590.
- Gennis, R. B. and Hager, L. P. (1976).** Pyruvate oxidase. In *The Enzymes and Biological Membranes*, pp. 493-504. Edited by A. Martonosi. New York: Plenum.
- Georgellis, D., Kwon, O. & Lin, E. C. (2001).** Quinones as the redox signal for the arc two-component system of bacteria. *Science* **292**, 2314-2316.
- Gimenez, R., Nunez, M. F., Badia, J., Aguilar, J. & Baldoma, L. (2003).** The gene *yjcG*, cotranscribed with the gene *acs*, encodes an acetate permease in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**, 6448-6455.
- Goethals, K., van Montagu, M., Holsters, M. (1992).** Conserved motifs in a divergent nod box of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 reveal a common structure in promoters regulated by LysR-type. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 1646-1650.
- Görke, B., Rak, B. (1999).** Catabolite control of *Escherichia coli* regulatory protein BglG activity by antagonistically acting phosphorylations. *Embo J* **18**, 3370-3379.
- Gosset, G., Zhang, Z. G., Nayyar, S. N., Cuevas, W. A. & Saier, M. H. (2004).** Transcriptome analysis of Crp-dependent catabolite control of gene expression in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **186**, 3516-3524.
- Gray, C. T., Wimpenny, J. W. & Mossman, M. R. (1966).** Regulation of Metabolism in Facultative Bacteria. 2. Effects of Aerobiosis, Anaerobiosis and Nutrition on Formation of Krebs Cycle Enzymes in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta* **117**, 33-41.
- Groisman, E. A. (2001).** The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *Journal of Bacteriology* **183**, 1835-1842.
- Guest, J. R. (1974).** Gene-protein relationships of the α -ketoacid dehydrogenase complexes of *E. coli*: chromosomal location of the *lpd* gene. *J Gen Microbiol* **80**, 523-531.
- Guest, J. R. & Creaghan, I. T. (1973).** Gene-Protein Relationships of Alpha-Keto Acid Dehydrogenase Complexes of *Escherichia coli* K12 - Isolation and Characterization of Lipoamide Dehydrogenase Mutants. *Journal of General Microbiology* **75**, 197-210.
- Han, K., Lim, H. C. and Hong J. (1992).** Acetic acid formation in *Escherichia coli* fermentation. *Biotechnol Bioeng* **39**, 663-671.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Harris, S. J., Shih, Y. L., Bentley, S. D., Salmond, G. P. (1998).** The *hexA* gene of *Erwinia carotovora* encodes a LysR homologue and regulates motility and the expression of multiple virulence determinants. *Mol Microbiol* **28**, 705-717.
- Hillen, W. & Schollmeier, K. (1983).** Nucleotide sequence of the Tn10 encoded tetracycline resistance gene. *Nucleic Acids Res* **11**, 525-539.

- Hillen, W. & Berens, C. (1994).** Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu Rev Microbiol* **48**, 345-369.
- Holms, H. (1996).** Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* **19**, 85-116.
- Hosono, K., Kakuda, H. & Ichihara, S. (1995).** Decreasing accumulation of acetate in a rich medium by *Escherichia coli* on introduction of genes on a multicopy plasmid. *Biosci Biotechnol Biochem* **59**, 256-261.
- Hull, E. P., Spencer, M. E., Wood, D. & Guest, J. R. (1983).** Nucleotide sequence of the promoter region of the citrate synthase gene (*gltA*) of *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **156**, 366-370.
- Ingledew, W. J., Poole, R. K. (1984).** The respiratory chains of *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **48**, 222-271.
- Jensen, E. B., and S. Carlsen (1990).** Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*: Expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate and salts. *Biotechnol Bioeng* **36**, 1-11.
- Jourlin-Castelli, C., Mani, N., Nakano, M. M., Sonenshein, A. L. (2000).** CcpC, a novel regulator of the lysR family required for glucose repression of the *citB* gene in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* **295**, 865-878.
- Kakuda, H., Shiroishi, K., Hosono, K. & Ichihara, S. (1994).** Construction of Pta-Ack Pathway Deletion Mutants of *Escherichia coli* and Characteristic Growth Profiles of the Mutants in a Rich Medium. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **58**, 2232-2235.
- Kang, Y., Weber, K. D., Qiu, Y., Kiley, P. J. & Blattner, F. R. (2005).** Genome-wide expression analysis indicates that FNR of *Escherichia coli* K-12 regulates a large number of genes of unknown function. *J Bacteriol* **187**, 1135-1160.
- Khodursky, A. B., Bernstein, J. A., Peter, B. J., Rhodius, V., Wendisch, V. F. & Zimmer, D. P. (2003).** *Escherichia coli* spotted double-strand DNA microarrays: RNA extraction, labeling, hybridization, quality control, and data management. *Methods Mol Biol* **224**, 61-78.
- Kim, J. Y. & Cha, H. J. (2003).** Down-regulation of acetate pathway through antisense strategy in *Escherichia coli*: improved foreign protein production. *Biotechnol Bioeng* **83**, 841-853.
- Kim, S. Y., Nam, T. W., Shin, D., Koo, B. M., Seok, Y. J. & Ryu, S. (1999).** Purification of Mlc and analysis of its effects on the *pts* expression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **274**, 25398-25402.
- Kimata, K., Inada, T., Tagami, H. & Aiba, H. (1998).** A global repressor (Mlc) is involved in glucose induction of the *ptsG* gene encoding major glucose transporter in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **29**, 1509-1519.

Kimata, K., Takahashi, H., Inada, T., Postma, P. & Aiba, H. (1997). cAMP receptor protein-cAMP plays a crucial role in glucose-lactose diauxie by activating the major glucose transporter gene in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 12914-12919.

Kimura, E. (2003). Metabolic engineering of glutamate production. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **79**, 37-57.

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

Knapp, J. E., Mitchell, D. T., Yazdi, M. A., Ernst, S. R., Reed, L. J. & Hackert, M. L. (1998). Crystal structure of the truncated cubic core component of the *Escherichia coli* 2-oxoglutarate dehydrogenase multienzyme complex. *J Mol Biol* **280**, 655-668.

Kolb, A., Busby, S., Buc, H., Garges, S. & Adhya, S. (1993). Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annu Rev Biochem* **62**, 749-795.

Konstantinov, K. B., Nichio, N. and Yoshida, T. (1990). Glucose feeding strategy accounting for the decreasing oxidative capacity of recombinant *Escherichia coli* in fed-batch cultivation for phenylalanine production. *J Ferment Bioeng* **70**, 253-260.

Kubicek, C. P. and Röhr, M. (1977). Influence of manganese on enzyme synthesis and citric acid accumulation in *Aspergillus niger*. *European Journal of applied Microbiology* **4**, 167-175.

Kumar, S. (1976). Properties of adenyl cyclase and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate receptor protein-deficient mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **125**, 545-555.

Kumari, S., Tishel, R., Eisenbach, M. & Wolfe, A. J. (1995). Cloning, characterization, and functional expression of *acs*, the gene which encodes acetyl coenzyme A synthetase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **177**, 2878-2886.

Kumari, S., Beatty, C. M., Browning, D. F., Busby, S. J., Simel, E. J., Hovel-Miner, G. & Wolfe, A. J. (2000). Regulation of acetyl coenzyme A synthetase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **182**, 4173-4179.

Kwon, O., Georgellis, D. & Lin, E. C. (2000). Phosphorelay as the sole physiological route of signal transmission by the arc two-component system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **182**, 3858-3862.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lee, J., Goel, A., Ataai, M. M. & Domach, M. M. (2002). Flux regulation patterns and energy audit of *E. coli* B/r and K-12. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **12**, 258-267.

Lehnen, D., Blumer, C., Polen, T., Wackwitz, B., V. F. Wendisch, and Uden, G. (2002). LrhA as a new transcriptional key regulator of flagella, motility and chemotaxis genes in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **45**, 521-532.

- Lengeler, J. W. (1996).** The phosphoenolpyruvate-dependent carbohydrate: phosphotransferase system (PTS) and control of carbon source utilization. In *Regulation of gene expression in Escherichia coli*, pp. 231-254. Edited by E. C. C. Lin, Lynch, A. S.: R. G. Landes Company.
- Lesley, J. A. & Waldburger, C. D. (2003).** Repression of *Escherichia coli* PhoP-PhoQ signaling by acetate reveals a regulatory role for acetyl coenzyme A. *J Bacteriol* **185**, 2563-2570.
- Lindroth, P. & Mopper, K. (1979).** High-Performance Liquid-Chromatographic Determination of Subpicomole Amounts of Amino-Acids by Precolumn Fluorescence Derivatization with Ortho-Phthaldialdehyde. *Analytical Chemistry* **51**, 1667-1674.
- Luli, G. W. & Strohl, W. R. (1990).** Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Appl Environ Microbiol* **56**, 1004-1011.
- Lux, R., Jahreis, K., Bettenbrock, K., Parkinson, J. S., Lengeler, J. W. (1995).** Coupling the phosphotransferase system and the methyl-accepting chemotaxis protein-dependent chemotaxis signaling pathways of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11583-11587.
- Lynch, A. S. & Lin, E. C. (1996).** Transcriptional control mediated by the ArcA two-component response regulator protein of *Escherichia coli*: characterization of DNA binding at target promoters. *J Bacteriol* **178**, 6238-6249.
- Lynch, A. S., Lin, E. C. C. (1996).** Responses to molecular oxygen. In *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, pp. 1526-1538. Edited by F. C. Neidhardt, Curtiss, R., Ingram, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M. and Umbarger, H. E. Washington, D. C.: ASM Press.
- Ma, Z., Gong, S., Richard, H., Tucker, D. L., Conway, T. & Foster, J. W. (2003).** GadE (YhiE) activates glutamate decarboxylase-dependent acid resistance in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* **49**, 1309-1320.
- Majewski, R. A. & Domach, M. M. (1990).** Simple Constrained-Optimization View of Acetate Overflow in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* **35**, 732-738.
- March, J. C., Eiteman, M. A. & Altman, E. (2002).** Expression of an anaplerotic enzyme, pyruvate carboxylase, improves recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **68**, 5620-5624.
- Martinez, A. a. K., R. (1997).** Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps. *Journal of Bacteriology* **179**, 5188-5194.
- Masse, E. & Gottesman, S. (2002).** A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 4620-4625.
- Mat-Jan, F., Williams, C. R. & Clark, D. P. (1989).** Anaerobic growth defects resulting from gene fusions affecting succinyl-CoA synthetase in *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet* **215**, 276-280.

- Mattevi, A., Obmolova, G., Schulze, E., Kalk, K. H., Westphal, A. H., de Kok, A. & Hol, W. G. (1992).** Atomic structure of the cubic core of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. *Science* **255**, 1544-1550.
- McCleary, W. R. & Stock, J. B. (1994).** Acetyl phosphate and the activation of two-component response regulators. *J Biol Chem* **269**, 31567-31572.
- McCleary, W. R., Stock, J. B. & Ninfa, A. J. (1993).** Is acetyl phosphate a global signal in *Escherichia coli*? *J Bacteriol* **175**, 2793-2798.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987).** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-350.
- Murdock, D., Ensley, B. D., Serdar, C., Thalen, M. (1993).** Construction of metabolic operons catalyzing the de novo biosynthesis of indigo in *Escherichia coli*. *Biotechnology* **11**, 381-386.
- Nair, S. and Finkel, N. (2004).** DPS protects cells against multiple stresses during stationary phase. *Journal of Bacteriology* **186**, 4192-4198.
- Nam, T. W., Cho, S. H., Shin, D., Kim, J. H., Jeong, J. Y., Lee, J. H., Roe, J. H., Peterkofsky, A., Kang, S. O., Ryu, S. & Seok, Y. J. (2001).** The *Escherichia coli* glucose transporter enzyme IICB(Glc) recruits the global repressor Mlc. *Embo J* **20**, 491-498.
- Neidhardt, F. C., Bloch, P. L. & Smith, D. F. (1974).** Culture medium for enterobacteria. *J Bacteriol* **119**, 736-747.
- Nielsen, J., Villadsen, J. und Liden, G. (2003).** *Bioreaction engineering principles*, 2. Auflage edn. New York: N.Y. Kluwer Academical Plenum Publ.
- Park, S. J., Tseng, C. P. & Gunsalus, R. P. (1995).** Regulation of succinate dehydrogenase (*sdhCDAB*) operon expression in *Escherichia coli* in response to carbon supply and anaerobiosis: role of ArcA and Fnr. *Mol Microbiol* **15**, 473-482.
- Park, S. J., Chao, G. & Gunsalus, R. P. (1997).** Aerobic regulation of the *sucABCD* genes of *Escherichia coli*, which encode alpha-ketoglutarate dehydrogenase and succinyl coenzyme A synthetase: roles of ArcA, Fnr, and the upstream *sdhCDAB* promoter. *J Bacteriol* **179**, 4138-4142.
- Park, S. J., McCabe, J., Turna, J. & Gunsalus, R. P. (1994).** Regulation of the citrate synthase (*gltA*) gene of *Escherichia coli* in response to anaerobiosis and carbon supply: role of the *arcA* gene product. *J Bacteriol* **176**, 5086-5092.
- Peekhaus, N., Conway, T. (1998).** What's for dinner?: Entner-Doudoroff metabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **180**, 3495-3502.
- Perrenoud, A. & Sauer, U. (2005).** Impact of Global Transcriptional Regulation by ArcA, ArcB, Cra, Crp, Cya, Fnr, and Mlc on Glucose Catabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**, 3171-3179.

- Pfeiffer, T., Schuster, S. & Bonhoeffer, S. (2001).** Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science* **292**, 504-507.
- Picon, A., Teixeira de Mattos, M. J. & Postma, P. W. (2005).** Reducing the glucose uptake rate in *Escherichia coli* affects growth rate but not protein production. *Biotechnol Bioeng* **90**, 191-200.
- Plaman, M., Stauffer, G. V. (1989).** Regulation of the *Escherichia coli glyA* gene by the *metR* gene product and homocysteine. *J Bacteriol* **171**, 4958-4962.
- Plumbridge, J. (2002).** Regulation of gene expression in the PTS in *Escherichia coli*: the role and interactions of Mlc. *Curr Opin Microbiol* **5**, 187-193.
- Polen, T. (2002).** Dissertation: Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Polen, T. & Wendisch, V. F. (2004).** Genomewide expression analysis in amino acid-producing bacteria using DNA microarrays. *Appl Biochem Biotechnol* **118**, 215-232.
- Postma, P. W., Lengeler, J. W. & Jacobson, G. R. (1993).** Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev* **57**, 543-594.
- Prohl, C., Wackwitz, B., Vlad, D. & Uden, G. (1998).** Functional citric acid cycle in an *arcA* mutant of *Escherichia coli* during growth with nitrate under anoxic conditions. *Arch Microbiol* **170**, 1-7.
- Pruss, B. M. & Wolfe, A. J. (1994).** Regulation of Acetyl Phosphate Synthesis and Degradation, and the Control of Flagellar Expression in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **12**, 973-984.
- Quail, M. A., Haydon, D. J. and Guest, J. R. (1994).** The *pdhR-aceEF-lpd* operon of *Escherichia coli* expresses the pyruvate dehydrogenase complex. *Mol Microbiol* **12**, 95-104.
- Reed, L. J. (1974).** Multienzyme complexes. *Acc Chem Res* **7**, 40-46.
- Russell, J. B. & Cook, G. M. (1995).** Energetics of bacterial growth: balance of anabolic and catabolic reactions. *Microbiol Rev* **59**, 48-62.
- Russell, J. B. & Diez-Gonzalez, F. (1998).** The effects of fermentation acids on bacterial growth. *Advances in Microbial Physiology, Vol 39* **39**, 205-234.
- Saier, M. H., Jr. & Ramseier, T. M. (1996).** The catabolite repressor/activator (Cra) protein of enteric bacteria. *J Bacteriol* **178**, 3411-3417.
- Sambrook, J., Russell, D.W. (2001).** *Molecular cloning: A laboratory manual*. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Lab. Press.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.

- Schaffer, S., Weil, B., Nguyen, V. D., Dongmann, G., Günther, K., Nickolaus, M., Hermann, T., Bott, M. (2001).** A high-resolution reference map for cytoplasmatic and membrane-associated proteins of *Corynebacterium glutamicum*. *Electrophoresis* **22**, 4404-4422.
- Schell, D. J., Saez, J. C., Hamilton, J., Tholudur, A., Millan, J. D. M. (2002).** Use of measurement uncertainty analysis to assess accuracy of carbon mass balance closure for a cellulose production process. *Appl Biochem Biotechnol* **98**, 509-523.
- Schell, M. A. (1993).** Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* **47**, 597-626.
- Schmidt, F. R. (2004).** Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Applied Microbiology and Biotechnology* **65**, 363-372.
- Seok, Y. J., Koo, B. M., Sondej, M., Peterkofsky, A. (2001).** Regulation of *E. coli* glycogen phosphorylase activity by HPr. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**, 385-393.
- Shalon, D., Smith, S. J. & Brown, P. O. (1996).** A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res* **6**, 639-645.
- Shen, J. & Gunsalus, R. P. (1997).** Role of multiple ArcA recognition sites in anaerobic regulation of succinate dehydrogenase (*sdhCDAB*) gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **26**, 223-236.
- Skerra, A. (1994).** Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* **151**, 131-135.
- Smith, M. W. & Neidhardt, F. C. (1983).** 2-Oxoacid dehydrogenase complexes of *Escherichia coli*: cellular amounts and patterns of synthesis. *J Bacteriol* **156**, 81-88.
- Sonnleitner, B., Käppeli, O. (1986).** Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity, formulation and verification of a hypothesis. *Biotechnol Bioeng* **28**, 927-937.
- Spencer, M. E. & Guest, J. R. (1973).** Isolation and properties of fumarate reductase mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **114**, 563-570.
- Spencer, M. E. & Guest, J. R. (1985).** Transcription analysis of the *sucAB*, *aceEF* and *lpd* genes of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **200**, 145-154.
- Spencer, M. E., Darlison, M. G., Stephens, P. E., Duckenfield, I. K. & Guest, J. R. (1984).** Nucleotide sequence of the *sucB* gene encoding the dihydrolipoamide succinyltransferase of *Escherichia coli* K12 and homology with the corresponding acetyltransferase. *Eur J Biochem* **141**, 361-374.
- Steiert, P. S., Stauffer, L. T. & Stauffer, G. V. (1990).** The *lpd* gene product functions as the L protein in the *Escherichia coli* glycine cleavage enzyme system. *J Bacteriol* **172**, 6142-6144.

- Storz, G., Tartaglia, L. A., Ames, B. N. (1990).** Transcriptional regulator of oxidative-stress inducible genes: direct activation by oxidation. *Science* **248**, 189-194.
- Stragier, P., Danos, O., Patte, J. (1983).** Regulation of diaminopimelate decarboxylase synthesis in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **168**, 307-350.
- Sung, Y., Fuchs, J. A., (1992).** The *Escherichia coli* K-12 *cyn* operon is positively regulated by a member of the LysR family. *J Bacteriol* **174**, 3645-3650.
- Suzuki, T. (1969).** Phosphotransacetylase of *Escherichia coli* B, activation by pyruvate and inhibition by NADH and certain nucleotides. *Biochim Biophys Acta* **191**, 559-569.
- Tanaka, Y., Kimata, K. & Aiba, H. (2000).** A novel regulatory role of glucose transporter of *Escherichia coli*: membrane sequestration of a global repressor Mlc. *Embo J* **19**, 5344-5352.
- Tao, H., Bausch, C., Richmond, C., Blattner, F. R. & Conway, T. (1999).** Functional genomics: expression analysis of *Escherichia coli* growing on minimal and rich media. *J Bacteriol* **181**, 6425-6440.
- Tartaglia, L. A., Gimenez, C. J., Storz, G., Ames, B. N. (1991).** Multi-degenerate DNA recognition by the OxyR transcriptional regulator. *J Biol Chem* **267**, 2038-2045.
- Tartaglia, L. A., Storz, G., Ames, B. N. (1989).** Identification and molecular analysis of *oxyR*-regulated promoters important for the bacterial adaption to oxidative stress. *J Mol Biol* **210**, 709-719.
- Tobisch, S., Zühlke, D., Bernhardt, J., Stülke, J., Hecker, M. (1999).** Role of CcpA in regulation of the central pathways of carbon catabolism in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **181**, 696-7004.
- Walsh, K. & Koshland, D. E., Jr. (1985).** Characterization of rate-controlling steps in vivo by use of an adjustable expression vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 3577-3581.
- Walsh, K., Schena, M., Flint, A. J. & Koshland, D. E., Jr. (1987).** Compensatory regulation in metabolic pathways-responses to increases and decreases in citrate synthase levels. *Biochem Soc Symp* **54**, 183-195.
- Wanner, B. L. (1992).** Is Cross Regulation by Phosphorylation of 2-Component Response Regulator Proteins Important in Bacteria. *Journal of Bacteriology* **174**, 2053-2058.
- Wanner, B. L. & Wilmesriesenberg, M. R. (1992).** Involvement of Phosphotransacetylase, Acetate Kinase, and Acetyl Phosphate Synthesis in Control of the Phosphate Regulon in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **174**, 2124-2130.
- Weitzman, P. D. J. (1969).** Citrate synthase from *Escherichia coli*. In *Methods in Enzymology*, pp. 22-26.
- Wek, R. C., Hatfield, G. W. (1986).** Nucleotide sequence and in vivo expression of the *ilvY* and *ilvC* genes in *Escherichia coli* K12. *J Biol Chem* **261**, 2441-2450.

Wek, R. C., Hatfield, G. W. (1988). Transcriptional activation at adjacent operators in the divergent-overlapping *ilvY* and *ilvC* promoters of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **203**, 643-663.

Wilde, R. J. & Guest, J. R. (1986). Transcript analysis of the citrate synthase and succinate dehydrogenase genes of *Escherichia coli* K12. *J Gen Microbiol* **132**, 3239-3251.

Wolfe, A. J. (2005). The acetate switch. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**, 12-50.

Zheng, D. L., Constantinidou, C., Hobman, J. L. & Minchin, S. D. (2004). Identification of the CRP regulon using in vitro and in vivo transcriptional profiling. *Nucleic Acids Research* **32**, 5874-5893.

Zimmer, D. P., Soupene, E., Lee, H. L., Wendisch, V. F., Khodursky, A. B., Peter, B. J., Bender, R. A. & 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.

VII. Anhang

1. Oligonukleotide

Tab. 26: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide. Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen und das entsprechende Enzym in Klammern aufgeführt. Ribosomenbindestellen (T7 gene 10 mit Linker) sind doppelt unterstrichen. Die entsprechende *E. coli* – Genomsequenz (<http://genolist.pasteur.fr/Colibri>) ist ebenfalls in Klammern angegeben und gegebenenfalls gekennzeichnet (.....).

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Eigenschaft
Primer zum Austausch des chromosomalen <i>sdh</i> -Promoters in <i>E. coli</i> MG1655		
tet-for	CGGAATTCTTTTGTGACACTCTATCATG	(<i>EcoRI</i>)
tet-rev	CGGAATTCTTTCTCTATCACTGATAGGG	(<i>EcoRI</i>)
sdh-up-for	TTTGTAACAACCTTTGTTGAATGATTGTCAAATT AGATGATTAAAGAATTTCGTGTAGGCTGGAGCTG CTTC	(<i>EcoRI</i>) (754026-754069)
sdh-up-rev	ATGGTCTGTAGGTCCAGATTAAACAGGTCTTTGT TTTTTCACATATGAATATCCTCCTTA	(754452-754400)
pak-for	ATGGTCTGTAGGTCCAGATTAAACAGGTCTTTGT TTTTCACATTTCTTATCATATGAATATCCTCCTT AG	(754452-754400)
pak-rev	TTTGTAACAACCTTTGTTGAATGATTGTCAAATTA GATGATAAG	(754026-754065)
Primer zum Nachweis des chromosomalen Promoteraustauschs in <i>E. coli</i> MG1655		
sdhC-1	GTGAAATACCGACTTCATAAC	(753974-753994)
sdhC-2	ACTGCAACAAAGGTGATCAC	(754523-754503)
Primer zur Deletion von <i>yhiE</i> in <i>E. coli</i> MG1655		
yhiE-for	TATTCGAAACGATAACGGCTAAGGAGCAAGTTAT GATTTTTCTCATGACGGTGTAGGCTGGAGCTGCT TCG	(3655964-3656013)
yhiE-rev	GTTGCTTATGTCCTGACTAAAAATAAGATGTGAT ACCCAGGGTGACGATGATTCCGGGGATCCGTCGA CC	(3656539-3656490)
Primer zum Nachweis der Deletion von <i>yhiE</i> in <i>E. coli</i> MG1655		
yhiE-1	GAACAACGATTCCGACAAGG	(3655920-3655939)
yhiE-2	CATCTGCATCCCTCGTCATG	(3656575-3656556)

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Eigenschaft
Primer zur Deletion von <i>yjcGH</i> in <i>E. coli</i> MG1655		
yjcGH-for	CCCTACATTACCTCTGGAGAATCTGTGATGAATG GCACGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	(4282819-4282782)
yjcGH-rev	GGGAGAGATTAAATGCGCGCGGCCTTGCTCAACGC CAAAATTCCGGGGATCCGTCGACC	(4280824-4280861)
Primer zum Nachweis der Deletion von <i>yjcGH</i> in <i>E. coli</i> MG1655		
yjcGH-1	GTTTGTAGGCCTGATAAGAC	(4282861-4282842)
yjcGH-2	AGGCATATTCTCTGCATTATC	(4280685-4280705)
Primer zur Deletion von <i>yjeJ</i> in <i>E. coli</i> MG1655		
yjeJ-for	ATTTAATTGAGAAATGGTTAGGGAGAACCTACAT GGCCATAAGCATCAAGGTGTAGGCTGGAGCTGCT TCG	(4371844-4371795)
yjeJ-rev	ATTAGCAAAGATGAGATTATTTTCGCCTGTGGTGC AGTTTTGCTGGTGGATATTCCGGGGATCCGTCGA CC	(4370927-4370976)
Primer zum Nachweis der Deletion von <i>yjeJ</i> in <i>E. coli</i> MG1655		
yjeJ-1	GAGTGAGTACGGCTATTTATG	(4371924-4371904)
yjeJ-2	CAACGATCACGTTATCAGTC	(4370879-4370898)
Primer zur heterologen Expression von <i>gfp</i> in <i>E. coli</i> MG1655		
gfp-1	GCGAATTCAAGGAGATATAGATATGAGTAAAGGA GA	(<i>EcoRI</i>)
gfp-2	GCTCTAGATTATTTGTAGAGCTCATCCATGCC	(<i>XbaI</i>)
Primer zur Überexpression von <i>lpd</i> in <i>E. coli</i> MG1655		
lpd-for	GGAATTCAAGGAGATATAGATATGAGTACTGAA ATCAAAAC	(<i>EcoRI</i>) (127912-127921)
lpd-rev	GCTCTAGATTACTTCTTCTTCGCTTTTCGGGTTTC	(<i>XbaI</i>) (129336-129312)
Primer für die DNA-Affinitätschromatographie		
sdh-pr-for	AATTAAATAAATGTTGTTATCGTGAC	5'-Biotin (754070-754095)
sdh-pr-rev	ATGGAGAATGGACGCTATCGC	(754489-754469)

2. Kohlenstoffbilanz

Tab. 27: Kohlenstoffverteilung des während der exponentiellen Wachstumsphase (6-7 h) in Form von Glucose umgesetzten Kohlenstoffs bei aerober Kultivierung der Stämme MG1655 WT und MG1655 Δ *Psdh::Ptet* im Fermenter. Berechnet wurden die integralen, molaren Kohlenstoffmengen [mmol C], die dann für jede Fermentation in % des in Form von Glucose umgesetzten Kohlenstoffs wiedergegeben wurden. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte aus drei unabhängigen Fermentationen des Wildtyps und der Mutante (Δ *Psdh::Ptet*).

	MG1655 WT		MG1655 Δ <i>Psdh::Ptet</i>	
	[mmol C]	[%]	[mmol C]	[%]
Glucose	139 +/- 7	100	154 +/- 27	100
Biomasse	61 +/- 1	44 +/- 2	66 +/- 10	43 +/- 2
Acetat	25 +/- 2	18 +/- 2	13 +/- 2	9 +/- 0
CO ₂	44 +/- 1	32 +/- 3	59 +/- 11	39 +/- 0
Summe		94 +/- 7		91 +/- 2

3. Plasmidkarten

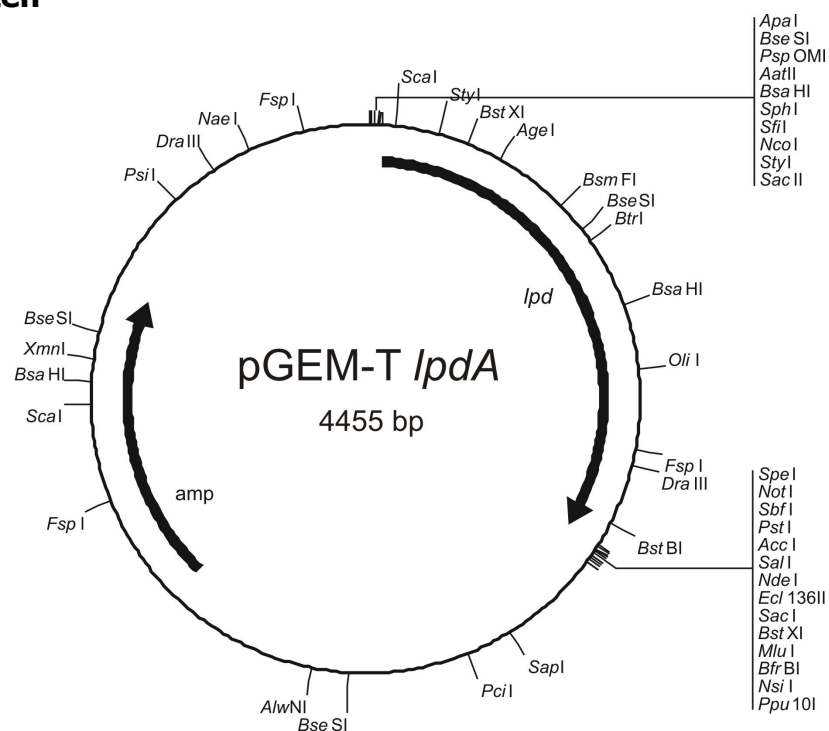


Abb. 30: Subklonierung des *lpdA* - Gens in den Vektor pGEM-T



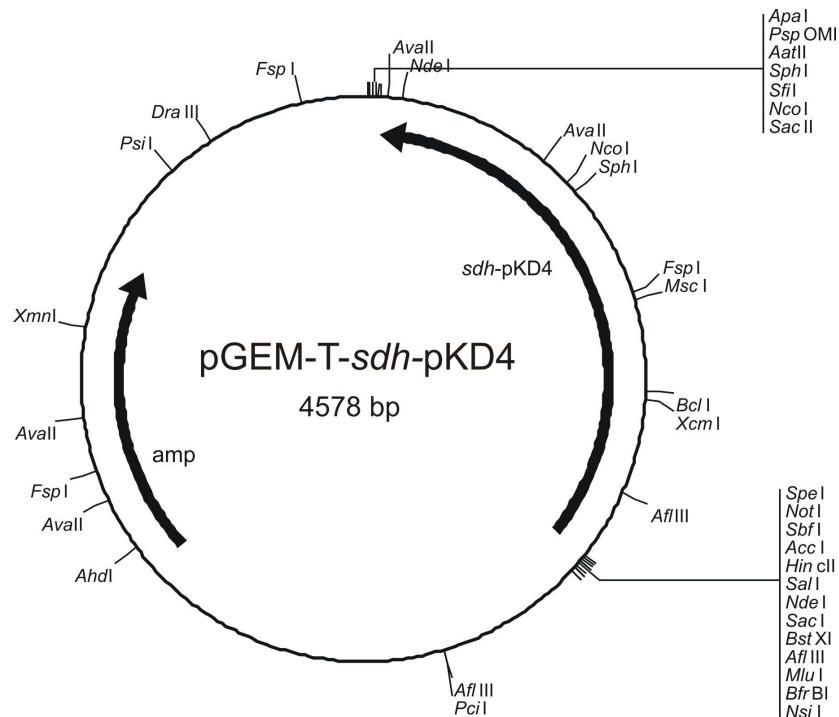


Abb. 33: Plasmid pGEM-T-*sdh*-pKD4 zur Konstruktion der Promotoraustauschkassette für den chromosomalen Austausch des *sdh*-Promotors in *E. coli* MG1655

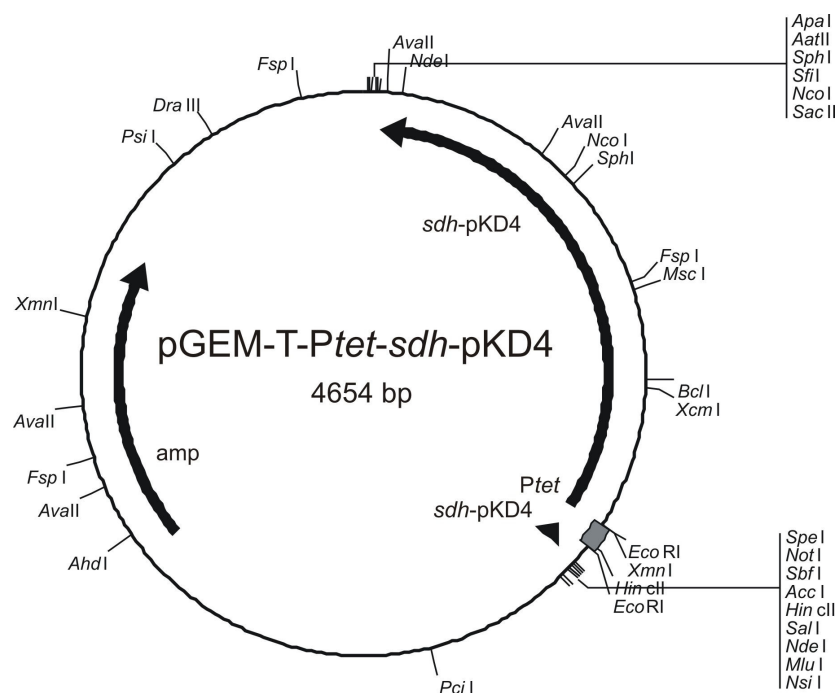


Abb. 34: Plasmid pGEM-T-Ptet-*sdh*-pKD4 mit Promotoraustauschkonstrukt für den chromosomalen Austausch des *sdh* - Promotors in *E. coli* MG1655

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie 1 des Forschungszentrums Jülich angefertigt.

Herrn Prof. Dr. H. Sahm danke ich für die Überlassung des Themas, seine Unterstützung, sein Interesse, welches er meiner Arbeit entgegengebracht hat und die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen, insbesondere was die Laborausrüstung betraf.

Herrn Priv.-Doz. Dr. V. F. Wendisch danke ich für die Übernahme des Korreferats sowie für die Unterstützung und Betreuung meiner Arbeit.

Frau Dr. S. Willbold (ZCH) danke ich für die NMR-Analysen.

Herrn Dr. P. Klauth (ICG IV) danke ich für die Coulter-Counter-Messungen und Fluoreszenzspektroskopie.

Matthias Moch und H.-J. Brandt (IBT2) danke ich für den "Crash-Kurs" in Sachen Fermenter und Datenauswertung.

Roland Gande danke ich für die Unterstützung bei der MALDI-TOF-Massenspektrometrie.

Der Arbeitsgruppe Wendisch danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Corinna Stansen, Christian Lange, Tanja Gerharz, Andreas Krug, Sabine Engels, Eva Radmacher, Roland Gande, Axel Niebisch und Daniel Meissner danke ich für die nette Freizeitgestaltung.

Für alle Hilfestellungen und Unterstützung im Zusammenhang mit dem Computer danke ich Horst Kiehl, Andreas Franz und Jürgen Burghardt.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts danke ich ganz herzlich für ihre ständige Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Meiner Tischtennis-Mannschaft Langerwehe (Andrea Mürkens, Diana Jungen, Andrea Bartz), sowie den Spielerinnen und Spielern der BSG danke ich für die schönen Mannschaftsspiele und sportliche Abwechslung. Es war eine wunderbare Zeit.

Ganz besonders danke ich meiner Familie, die mich immer in jeder Hinsicht unterstützt und ermutigt hat.

Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Jül-4199
Januar 2006
ISSN 0944-2952