

Kontrolle des Aminosuckerstoffwechsels in  
*Corynebacterium glutamicum*

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Andreas Uhde

aus Leipzig

Köln, 2014

**Berichterstatter:** Professor Dr. Reinhard Krämer  
Professorin Dr. Ines Neundorf

Tag der Disputation 22.01.2014

## Zusammenfassung

Aminozucker, wie Glucosamin oder N-Acetylglucosamin, stellen für biotechnologische Prozesse mit *Corynebacterium glutamicum* eine alternativer Kohlenstoffquelle dar. Als Bestandteil von Chitin sind sie weit verbreitet, können jedoch von *C. glutamicum* nur sehr schlecht oder, wie im Fall von N-Acetylglucosamin, gar nicht umgesetzt werden. Diese Arbeit beschreibt die Identifikation und Charakterisierung von Proteinen des Aminozucker-katabolismus, die Wirkungsweise des an der Expression beteiligten Regulators und die Anwendung der erzielten Ergebnisse am Beispiel von L-Lysin-Produktionsstämmen.

Die Annotation des Genoms zeigte, dass die für den Katabolismus der Aminozucker notwendigen Enzyme NagA (N-Acetylglucosamin-6-phosphat-Deacetylase) und NagB (Glucosamin-6-phosphat-Deaminase) vorhanden sind. Über die Substratimporter war nichts bekannt. Durch die Aufnahmemessung radioaktiv markierter Substrate konnte der Glucose-Importer PTS<sup>Glc</sup> als Aufnahmesystem von Glucosamin ermittelt werden. PTS<sup>Glc</sup> hat zwar eine vergleichsweise geringe Affinität zu Glucosamin, der Substratimport stellt jedoch nicht den wachstumslimitierenden Schritt dar. Limitierend ist die Aktivität von NagB. Durch die Überexpression von *nagB* konnten die Wachstumsraten von *C. glutamicum* auf Glucosamin verdreifacht werden. Des Weiteren wurde der Regulator der *nag*-Gene identifiziert und der zugrunde liegende Regulationsmechanismus beschrieben. NanR ist ein Regulator der GntR-Familie, der neben den *nag*-Genen auch die Expression der unmittelbar benachbarten Gene des Sialinsäurekatabolismus (*nan*-Gene) reguliert. Die DNA-Bindedomäne von NanR erkennt ein spezifisches Motiv, bestehend aus zwei aufeinanderfolgenden Hexanukleotidsequenzen. Durch die Bindung von NanR im Promotor der *nag*- und *nan*-Gene wird deren Expression reprimiert. N-Acetylglucosamin-6-phosphat und N-Acetylmannosamin-6-phosphat sind Effektoren von NanR, durch die der Repressor wieder von der DNA gelöst wird. Die gemeinsame Regulation der *nag*- und *nan*-Gene durch den gleichen Regulator ist bei Bakterien eine Ausnahme.

In L-Lysin Produktionsstämmen wurde die Überexpression von *nagB* sowie die Deletion von *nanR* angewandt, um Glucosamin als Substrat zur Aminosäureproduktion zu nutzen. Die erzielten Ausbeuten und Produktivitäten lagen im gleichen Bereich wie bei dem gut verwertbaren Substrat Glucose. Zur Nutzung von N-Acetylglucosamin wurde der heterologe Transporter NagE aus *C. glycinophilum* eingesetzt. Dabei blieb der Substratimport trotz der Überexpression limitierend. Eine effektive Nutzung von N-Acetylglucosamin konnte jedoch mit dem Cosubstrat zu Glucose erzielt werden.

## Abstract

Amino sugars such as glucosamine or N-acetylglucosamine are potential alternative carbon sources for biotechnological processes with *Corynebacterium glutamicum*. As part of chitin they are widely distributed. However, they cannot be used efficiently for growth by *C. glutamicum*. This work describes the identification and characterization of proteins required for amino sugar catabolism, the regulator that is involved and the application of these results exemplified in L-lysine production strains.

Genome annotations showed that the enzymes necessary for the catabolism of amino sugars NagA (N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase) and NagB (glucosamine-6-phosphate deaminase) are available. Nothing was known about the substrate importers so far. Using radiolabeled substrates the glucose importer PTS<sup>Glc</sup> was identified as the sole uptake system for glucosamine. Although PTS<sup>Glc</sup> has a relatively low affinity for glucosamine, the import is not the growth-limiting step, but the activity of NagB. Over-expression of *nagB* in *C. glutamicum* tripled growth rates on glucosamine. Furthermore, the regulator of the *nag*-genes was identified and the underlying regulatory mechanism was described. NanR is a GntR-type regulator that represses the expression of the *nag*-genes and the closely adjacent *nan*-genes that are required for sialic acid catabolism. The DNA-binding domain of NanR recognizes a specific motif consisting of two consecutive hexanucleotides. Binding of NanR to the promoter of the *nag*- and *nan*-genes represses the initiation of transcription. N-acetylglucosamine-6-phosphate and N-acetylmannosamine-6-phosphate are effectors of NanR whereby the repressor is released from the DNA. The joint regulation of the *nag*- and *nan*-genes by the same regulator is an exception among bacteria.

In L-lysine production strains over-expression of *nagB* and deletion of *nanR* was applied to use glucosamine as a substrate for amino acid production in *C. glutamicum*. Yields and productivities obtained were in the same range as in glucose fermentations. For the utilization of N-acetylglucosamine the heterologous transporter NagE from *C. glycinophilum* was over-expressed. However, substrate import was limiting so that N-acetylglucosamine could only be used effectively as a co-substrate of glucose.

# Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Aminozucker</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Metabolismus der Aminozucker in Bakterien</b> .....	<b>2</b>
1.2.1	Glucosamin und N-Acetylglucosamin .....	2
1.2.2	Sialinsäuren .....	4
<b>1.3</b>	<b>Aminozuckerstoffwechsel in <i>C. glutamicum</i></b> .....	<b>6</b>
<b>1.4</b>	<b>Einsatz von Aminozuckern in der Biotechnologie</b> .....	<b>7</b>
<b>1.5</b>	<b><i>C. glutamicum</i> in der Biotechnologie.</b> .....	<b>8</b>
<b>1.6</b>	<b>Regulation des Kohlenstoffmetabolismus in <i>C. glutamicum</i></b> .....	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>Ziele der Arbeit</b> .....	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>16</b>
<b>3.1</b>	<b>Glucosamin als Substrat von <i>C. glutamicum</i></b> .....	<b>16</b>
3.1.1	Identifizierung des Aufnahmesystems für Glucosamin .....	16
3.1.2	Substratspektrum von PTS <sup>Glc</sup> .....	18
3.1.3	Untersuchung der Spontanmutante M4 .....	20
3.1.4	Glucosamin als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle .....	24
3.1.5	Nutzung von Glucosamin zur L-Lysin Produktion .....	27
<b>3.2</b>	<b>N-Acetylglucosamin als Kohlenstoffquelle von <i>C. glutamicum</i></b> .....	<b>28</b>
3.2.1	Expression von <i>nagEBA</i> aus <i>C. glycinophilum</i> .....	28
3.2.2	Nutzung von N-Acetylglucosamin zur L-Lysin Produktion .....	31
<b>3.3</b>	<b>Der Regulator NanR in <i>C. glutamicum</i></b> .....	<b>33</b>
3.3.1	Identifizierung des Regulators der <i>nag</i> -Gene .....	33
3.3.2	Charakterisierung der Deletionsmutante <i>C. glutamicum</i> $\Delta$ <i>nanR</i> .....	35
3.3.3	Reinigung des Proteins NanR .....	37
3.3.4	Identifizierung von Bindestellen für NanR .....	39
3.3.5	Promotoraktivitäten von NanR-regulierten Genen .....	43
3.3.6	Identifizierung der Effektoren von NanR .....	44
3.3.7	Einfluss von NanR auf die Verstoffwechslung von Glucosamin .....	48

<b>3.4</b>	<b>Neuraminsäure als Kohlenstoffquelle von <i>C. glutamicum</i></b> .....	<b>51</b>
3.4.1	Wachstum von <i>C. glutamicum</i> $\Delta nanR$ .....	51
3.4.2	Eigenschaften des Neuraminsäureimporters .....	53
3.4.3	Bedeutung von <i>cg2932</i> ( <i>nanK</i> ) für das Wachstum mit Neu5Ac.....	54
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>56</b>
<b>4.1</b>	<b>Kontrolle des Aminosuckerstoffwechsels in <i>C. glutamicum</i></b> .....	<b>56</b>
4.1.1	PTS <sup>Glc</sup> ist der Importer von Glucosamin .....	56
4.1.2	Die erhöhte Aktivität von NagB verbessert das Wachstum mit Glucosamin .....	58
4.1.3	Eine Punktmutation im Promotor von <i>nagAB-scrB</i> verursacht die höhere .....	59
	Expression dieses Operons. ....	
4.1.4	NanR ist Repressor des <i>nag/nan</i> -Clusters in <i>C. glutamicum</i> .....	61
4.1.5	Nutzung von Neuraminsäure in <i>C. glutamicum</i> .....	63
4.1.6	GlcNAc-6P und ManNAc-6P sind Effektoren von NanR .....	64
4.1.7	Einfluss der <i>nanR</i> -Deletion auf das Wachstum mit Glucose .....	65
<b>4.2</b>	<b>Biotechnologische Nutzung von Aminosuckern</b> .....	<b>66</b>
4.2.1	Glucosamin als Substrat zur Lysin-Produktion.....	66
4.2.2	N-Acetylglucosamin als Substrat für die Lysin-Produktion.....	67
<b>4.3</b>	<b>Schlussbetrachtung</b> .....	<b>69</b>
<b>5</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>71</b>
<b>5.1</b>	<b>Bakterienstämme, Plasmide und Kultivierung</b> .....	<b>71</b>
5.1.1	Bakterienstämme.....	71
5.1.2	Plasmide .....	71
5.1.3	Medien.....	72
5.1.4	Kultivierung von Mikroorganismen .....	73
5.1.5	Bestimmung der optischen Dichte und Biotrockenmasse.....	73
5.1.6	Zellaufschluss .....	74
<b>5.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>74</b>
5.2.1	Oligonukleotide.....	74
5.2.2	Herstellung und Transformation elektrokompenter <i>C. glutamicum</i> .....	75
5.2.3	Herstellung und Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> .....	76
5.2.4	Isolierung genomischer DNA aus <i>C. glutamicum</i> .....	76
5.2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	77

5.2.6	Klonierungen .....	77
5.2.7	Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Extraktion aus Agarosegelen.....	77
5.2.8	Isolierung von Plasmiden .....	78
5.2.9	Herstellung von Deletionsmutanten .....	78
5.2.10	Isolierung von RNA.....	78
5.2.11	RNA-Slot-Blot.....	79
<b>5.3</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden.....</b>	<b>80</b>
5.3.1	Expression und Reinigung von NanR.....	80
5.3.2	Proteinquantifizierung .....	81
5.3.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung.....	81
5.3.4	Western Blot.....	81
5.3.5	Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) .....	82
<b>5.4</b>	<b>Analytik .....</b>	<b>83</b>
5.4.1	Quantitative Glucosebestimmung .....	83
5.4.2	Quantitative Bestimmung primärer Amine .....	83
5.4.3	Bestimmung der internen Glucosamin-6-phosphat Konzentration.....	84
5.4.4	Quantitative Bestimmung von N-Acetylglucosamin.....	84
<b>5.5</b>	<b>Spezielle biochemische Methoden.....</b>	<b>85</b>
5.5.1	Bestimmung der spezifischen Promotoraktivität .....	85
5.5.2	Messung der Substrataufnahme .....	85
<b>6</b>	<b>Quellen.....</b>	<b>86</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>98</b>
<b>7.1</b>	<b>Microarrays von <i>C. glutamicum</i>.....</b>	<b>98</b>

## Abkürzungen

ABC	ATP <i>binding cassette</i>
anhMurNAc	anhydro-N-Acetylmuraminsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
BLAST	Basic local alignment search tool
bp	Basenpaar
BS	Bindestelle
BTM	Biotrockenmasse
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure
cpm	Anzahl pro Minute ( <i>counts per minute</i> )
CSPD	Disodium-3-(4-methoxyspiro(1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1]decan)-4-yl)phenyl phosphate
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMF	Dimethylformid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>
Frc	Fructose
GFP	grünes fluoreszierendes Protein
Glc	Glucose
GlcN	Glucosamin
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HTH	<i>Helix-Turn-Helix</i>
IM	Integrationsmutante
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
Mal	Maltose
NBT	p-Nitrobluetetrazolium
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure
OD	optische Dichte
P	Phosphat
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEP	Phosphoenolpyruvat
PTS	Phosphoenolpyruvat-abhängiges Phosphotransferase-System



RE	relative Einheit
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
Suc	Saccharose
SV	Säulenvolumen
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRAP	<i>Tripartite ATP-independent periplasmic transporters</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UTR	nicht translatierter Bereich
WT	Wildtyp

## Glossar

In der vorliegenden Arbeit wurden englische Begriffe entlehnt, deren strikte Übersetzung das Verständnis des Textes beeinträchtigen würde.

<i>lag-Phase</i>	Zeitraum, der die Adaptation vom Mikroorganismen an ein neues Medium beschreibt (Latenzphase)
<i>Precursor</i>	Moleküle, die als Vorstufe zur Synthese anderer Moleküle dienen
<i>Screening</i>	Systematisches Testverfahren, zur Untersuchung mehrerer Klone/Zellen
<i>Shift</i>	Laufweitenverschiebung der DNA in einer Trennmatrix als Folge einer Proteinbindung beim EMSA
<i>Tag</i>	Terminaler Anhang von Aminosäuren an ein Protein
<i>Template</i>	Matrize oder Quelle von Matrizen bei der PCR

# 1 Einleitung

## 1.1 Aminosucker

Aminosucker sind Derivate von Monosacchariden, bei denen eine oder mehrere Hydroxygruppen durch Aminogruppen ersetzt sind. In der Natur sind Aminosucker weit verbreitete Bestandteile von Makromolekülen. Dazu zählen strukturgebende Polysaccharide wie Chitin, welches aus  $\beta(1\rightarrow4)$ -verknüpften N-Acetylglucosamin besteht, Peptidoglycane, deren Rückgrat aus  $\beta(1\rightarrow4)$ -verknüpften N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure besteht und Mucopolysaccharide, wie z.B. Hyaluronsäure oder Heparin, die eine sehr variable Zusammensetzung haben. Auch Antibiotika, wie Kanamycin und Streptomycin, und Teichonsäuren enthalten Aminosucker bzw. Aminosuckerderivate. Aus der Aufzählung ist bereits zu entnehmen, dass Aminosucker hauptsächlich von Bakterien und Pilzen, aber auch Insekten und Krustentieren synthetisiert werden. In Pflanzen sind keine signifikanten Mengen Aminosucker vorzufinden (Liang, 2007). Im Boden stellen monomere Aminosucker eine wichtige Stickstoff- und Kohlenstoffquelle dar. Bis zu 12 % des organischen Stickstoffs und 3 % des organischen Kohlenstoffs des Bodens sind im Wesentlichen auf Glucosamin, Galactosamin, Mannosamin und Muraminsäure zurückzuführen (Amelung *et al.*, 2008; Joergensen und Meyer, 1990; Stevenson, 1982). Diese stammen aus den Zellwänden von Pilzen und Bakterien. Im Meerwasser ist N-Acetylglucosamin (Abb. 1.1) einer der am häufigsten vorkommenden Aminosucker. Als Bestandteil des Polymers Chitin wird er durch marine Organismen, insbesondere Zooplankton, gebildet und durch chitinolytische Mikroorganismen, z.B. solche der Gattung *Vibrio*, freigesetzt und metabolisiert (Thompson *et al.*, 2011).

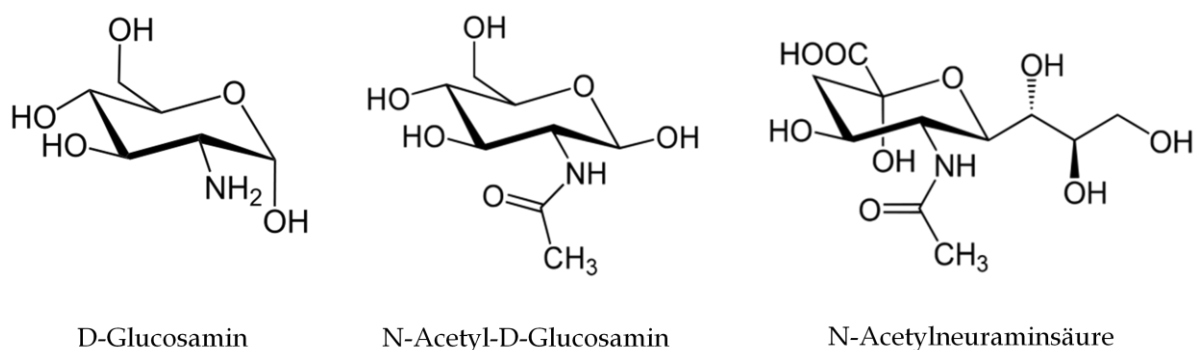


Abb. 1.1 Konformationsformeln der Aminosucker D-Glucosamin, N-Acetyl-D-Glucosamin und N-Acetylneuraminsäure

Neben den bisher genannten Hexosen stellen die Sialinsäuren eine weitere wichtige Gruppe von Aminosukzern dar. Dabei handelt es sich um Ketocarbonsäuren mit 9 Kohlenstoffatomen, die hauptsächlich von höheren Lebewesen (*Deuterostomia*) synthetisiert werden, wenngleich einige pathogene Mikroorganismen wie *Escherichia coli* K1 und *Neisseria meningitidis* auch über *de novo* Synthesewege verfügen (Vimr und Lichtensteiger, 2002). Von den über 40 bekannten Sialinsäurederivaten ist die N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac, Abb. 1.1) die am häufigsten vorkommende (Angata und Varki, 2002). In höheren Lebewesen sind Sialinsäuren hauptsächlich auf den Schleimhäuten des Gastrointestinaltraktes in Form von Glykolipiden oder Glykoproteinen zu finden. Kommensale und pathogene Mikroorganismen wiederum sind in der Lage die Sialinsäuren des Wirtes aufzunehmen und an ihrer Zelloberfläche zu präsentieren, um der Immunabwehr des Wirtes aus dem Weg zu gehen (Vimr, 2013).

## 1.2 Metabolismus der Aminosucker in Bakterien

### 1.2.1 Glucosamin und N-Acetylglucosamin

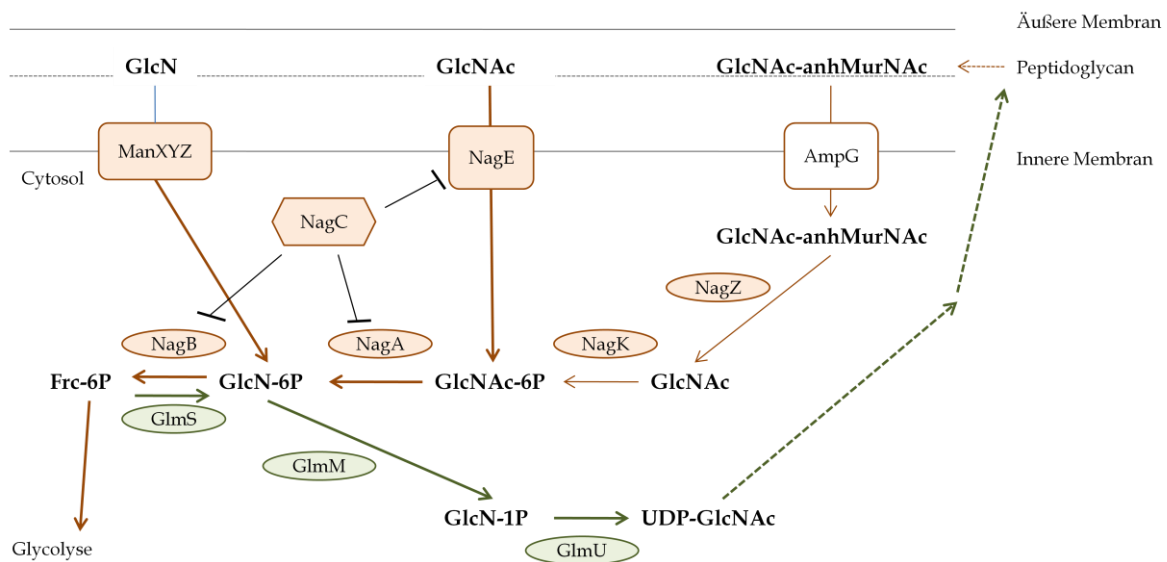
Das Verhältnis von Anabolismus und Katabolismus des Aminosuckers N-Acetylglucosamin (GlcNAc) nimmt im Lebenszyklus von Bakterien eine Schlüsselfunktion ein. Zum einen ist GlcNAc ein essentieller Bestandteil des Zellwandpolymers Peptidoglycan und zum anderen stellen Aminosucker eine wichtige Energie-, Kohlenstoff, und Stickstoffquelle dar. Die Regulation der beteiligten Stoffwechselwege muss also den jeweiligen Umständen angepasst sein. In *E. coli* sind diese Mechanismen gut untersucht. Sie dienen im Folgenden als Model, insbesondere in Hinblick auf die Verwertung von Glucosamin und GlcNAc (Abb. 1.2).

Der Ausgangspunkt für die Synthese des Peptidoglycans ist das mit UDP aktivierte GlcNAc (Park, 1996). UDP-GlcNAc kann nicht direkt aus GlcNAc oder GlcNAc-6P synthetisiert werden, sondern über Glucosamin-6-phosphat. GlcN-6P entsteht beim Abbau von GlcNAc-6P durch die N-Acetylglucosamin-6-phosphat-Deacetylase (NagA) sowie durch die Aminierung von Fructose-6-phosphat über die Aminotransferase GlnS (Dutka-Malen *et al.*, 1988). Anschließend wird GlcN-6P durch die Phosphoglucosamin-Mutase (GlnM) zu GlcN-1P isomerisiert und über das bifunktionale Enzym GlnU zu UDP-GlcNAc umgewandelt (Mengin-Lecreux und van Heijenoort, 1993). Die eigentliche Synthese des Peptidoglycans erfolgt dann über die sogenannten „Mur“-Enzyme (El Zoeiby *et al.*, 2003).

Bis zu 60 % des Peptidoglycans werden im Laufe einer Generation abgebaut und

wiederverwertet. Das dabei entstehende Disaccharid GlcNAc-anhMurNAc wird über die Permease AmpG in die Zelle transportiert und durch die  $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase (NagZ) hydrolysiert, wobei anhydro-N-Acetylmuraminsäure (ahnMurnAc) und GlcNAc entstehen (Jacobs *et al.*, 1994). Letzteres wird über die N-Acetylglucosamin-Kinase (NagK) zu GlcNAc-6P phosphoryliert. Die physiologische Bedeutung des Zellwandrecyclings ist nicht genau geklärt, da entsprechende Mutanten keinen Phänotyp hinsichtlich des Wachstums oder der Zellmorphologie aufweisen (Park und Uehara, 2008). Denkbar wäre eine Beteiligung an der Zellteilung. In Fall von Substratlimitationen kann das Peptidoglycan außerdem als Energiequelle dienen, um einen Teilungszyklus zu beenden und in die stationäre Phase einzutreten.

Der Abbau von Aminosukzern ist insbesondere beim Wachstum mit Glucosamin und GlcNAc entscheidend. In *E. coli* werden die Substrate über die PTS-Transporter ManXYZ und NagE importiert und dabei am sechsten Kohlenstoffatom phosphoryliert. GlcNAc-6P wird durch NagA deacetyliert und es entsteht GlcN-6P, welches durch die Glucosamin-6-phosphat-Deaminase (NagB) zu Fructose-6-phosphat und Ammonium deaminiert wird (Rogers *et al.*, 1988). Der weitere Abbau erfolgt dann über den Zentralstoffwechsel.



**Abb. 1.2 Übersicht zum Katabolismus von Glucosamin und GlcNAc sowie zur Zellwandsynthese / -recycling in *E. coli*.** AmpG: Permease, GlmM: Phosphoglucosamin-Mutase, GlmS: Glucosamin-6-phosphat-Synthase, GlmU: N-Acetylglucosamin-1-phosphat-Uridyltransferase, ManXYZ: PTS-Importer für Glucosamin, NagA: N-Acetylglucosamin-6-phosphat-Deacetylase, NagB: Glucosamin-6-phosphat-Deaminase, NagC: Transkriptionsrepressor der *nag*-Gene, NagE: PTS-Importer für GlcNAc, NagK: N-Acetylglucosamin-Kinase, NagZ:  $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase. Nach Plumbridge, 2009.

Diese kurze Übersicht zeigt, dass der Metabolit GlcN-6P von zentraler Bedeutung ist. In *E. coli* erfolgt die Kontrolle von Synthese und Abbau der Aminosucker im Wesentlichen über die Regulation der antagonistischen Proteine GlmS (Glucoamin-6-phosphat-Synthase) und NagB (Glucosamin-6-phosphat-Deaminase).

Die Expression von GlmS wird auf posttranskriptioneller Ebene die über smallRNAs GlmZ und GlmY reguliert (Gopel *et al.*, 2013). In Abwesenheit von GlcN-6P bindet GlmZ an eine anti-Shine-Dalgarno-Sequenz auf der *glmS*-RNA wodurch diese stabilisiert und die Translation initiiert wird. Ist die Konzentration von GlcN-6P im Cytosol hoch, wird GlmZ durch die RNaseE inaktiviert, ein Vorgang der im anderen Fall durch GlmY verhindert wird. Weiterhin steht die Transkription des *gmlUS*-Operons unter der Kontrolle des Regulators NagC. Die Besonderheit dabei ist, dass *gmlUS* zwei Promotoren hat, von denen der eine in Gegenwart von GlcNAc durch NagC inaktiviert wird und der andere leicht induziert ist (Plumbridge, 1995).

Beim Katabolismus der Aminosucker fungiert NagC ausschließlich als Repressor, indem es die Transkription des divergenten *nagE-nagBACD*-Operons durch Bindung an zwei Regionen zwischen *nagE* und *nagB* verhindert (Plumbridge, 1991). Dabei dient GlcNAc-6P als Signalmolekül. Die Bindung von GlcNAc-6P an den Repressor NagC bewirkt, dass dieser sich von der DNA löst und die Transkription der katabolen Enzyme initiiert werden kann. Neben der Funktion als Effektor von NagC nimmt GlcNAc-6P noch eine weitere entscheidende Rolle im Aminosucker-katabolismus ein. Es ist ein allosterischer Aktivator des Hexamers NagB (Alvarez-Anorve *et al.*, 2009; Calcagno *et al.*, 1984).

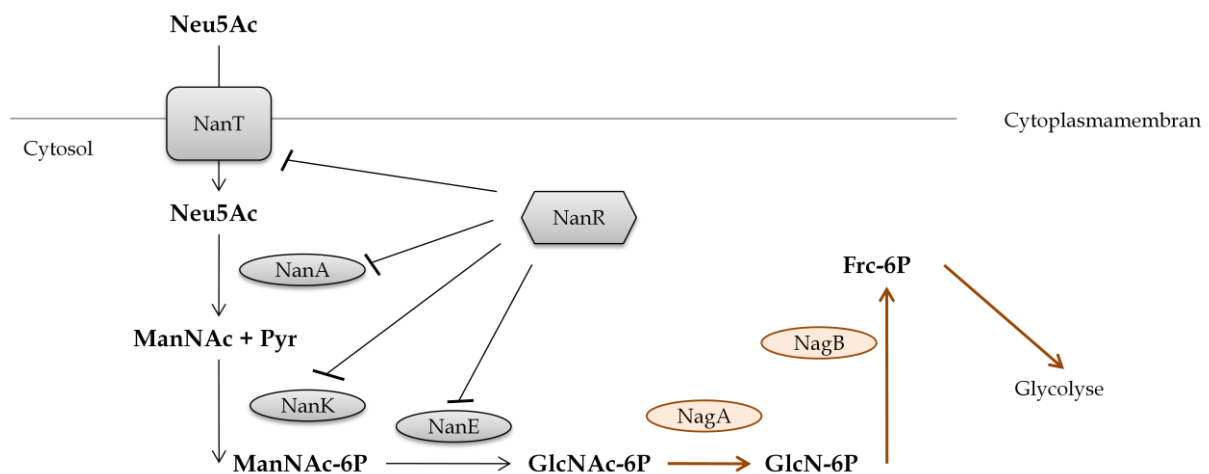
### 1.2.2 Sialinsäuren

Mikroorganismen verfügen über zwei Wege Sialinsäuren zu nutzen. Zum einen können sie importiert werden und in Form von Glykokonjugaten in die Zellwand eingebaut werden. Zum anderen dienen Sialinsäuren als Wachstumssubstrat in spezifischen Habitaten. Bei der Besiedlung von Säugetieren sind Sialinsäuren die ersten Kohlenstoffquellen, die den eindringenden Mikroorganismen zur Verfügung stehen. Ihre effektive Nutzung stellt daher einen Vorteil gegenüber konkurrierenden Organismen dar. Von den zahlreichen Derivaten der Sialinsäuren ist der Abbau der N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) am besten untersucht. Der zugrunde liegende Stoffwechselweg wird am Beispiel von *E. coli* dargestellt (Abb. 1.3).

Der Import der Neuraminsäure wird in *E. coli* durch NanT vermittelt, einem Transporter der Major-Facilitator-Superfamilie, der durch das elektrochemische Potential angetrieben wird (Mulligan *et al.*, 2012). Im Allgemeinen sind die

Aufnahmesysteme für Sialinsäurem sehr unterschiedlich. In *Haemophilus influenzae* werden sie über einen TRAP-Transporter importiert, in *Salmonella enterica* über einen Natrium-Symporter (Severi et al., 2010). Weiterhin haben Sialinsäuretransporter eine breite Substratspezifität. In *E. coli* werden neben Neu5Ac auch N-glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) und 3-Keto-3-deoxy-D-glycero-D-galactononsäure (KDN) über NanT importiert (Hopkins et al., 2013). Diese Substrate werden durch die N-Acetylneuraminatlyase (NanA) gespalten wobei im Fall von Neu5Ac N-Acetylmannosamin (ManNAc) und Pyruvat entstehen. ManNAc wird durch die Kinase NanK phosphoryliert und schließlich über die Epimerase NanE zu GlcNAc-6P umgewandelt (Vimr und Troy, 1985). Der weitere Abbau erfolgt über den im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Weg der *nag*-Gene. Außerdem wäre eine direkte Nutzung der Intermediate zur Peptidoglycan-Synthese denkbar.

In *E. coli* wird die Expression der *nan*-Gene positiv kontrolliert durch das cAMP Rezeptor Protein (CRP) und negativ reguliert durch den Repressor NanR (Kalivoda et al., 2013). Der Induktor für diesen Stoffwechselweg ist Neu5Ac, der durch Bindung an NanR den Repressor von der DNA löst und die Transkription der *nan*-Gene initiiert (Kalivoda et al., 2003).



**Abb. 1.3 Schema zum Katabolismus der N-Acetylneuraminsäure in *E. coli*.** NagA: N-Acetylglucosamin-6-phosphat-Deacetylase, NagB: Glucosamin-6-phosphat-Deaminase, NanA: N-Acetylneuraminat-Lyase, NanE: N-Acetylmannosamin-6-phosphat-Epimerase, NanK: N-Acetylmannosamin-Kinase, NanR: Transkriptionsrepressor der *nan*-Gene, NanT: Importer Neu5Ac. Nach Kalivoda et al. 2003.

### 1.3 Aminosuckerstoffwechsel in *C. glutamicum*

Über den Stoffwechsel von Aminosuckern in *C. glutamicum* ist bisher nur wenig bekannt. Sequenzvergleiche ergaben, dass *C. glutamicum* orthologe Gene für NagA und NagB besitzt. Diese sind vermutlich als Operon organisiert. Orthologe Gene der Transportproteine für Glucosamin und GlcNAc konnten allerdings nicht gefunden werden. Der Sequenzvergleich mit NagC zeigte eine hohe Ähnlichkeit zur ATP-abhängigen Glucokinase GLK, der allerdings die entsprechende DNA-Bindedomäne fehlt. Weiterhin konnten beim Sequenzvergleich in *C. glutamicum* Proteine gefunden werden, die eindeutige Ähnlichkeit zu den Proteinen der Zellwandsynthese (GlmS, GlmM und GlmU) haben, keine jedoch mit Ähnlichkeiten zu Proteinen des Zellwand-Recyclings.

Bisher existiert nur eine einzige Arbeit, in der der Stoffwechsel der Sialinsäuren in *C. glutamicum* untersucht wurde (Gruteser *et al.*, 2012). Darin wurde das Aufnahmesystem von Neu5Ac identifiziert. Es handelt sich um einen ABC-Transporter, der durch die Gene *cg2937-40* codiert ist. In deren unmittelbarer Nähe befinden sich neben den Genen des Sialinsäureabbaus auch die Gene für den Abbau der Aminosucker Glucosamin und GlcNAc (Abb. 1.4).

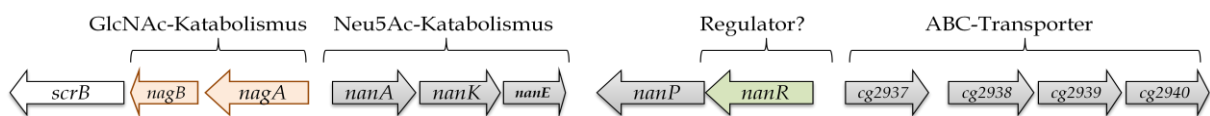


Abb. 1.4 Schematische Übersicht des *nag/nan* Genclusters in *C. glutamicum*.

In den meisten Mikroorganismen, wie z.B. auch in *E. coli*, sind die *nan*-Gene nicht in unmittelbarer Nähe der *nagAB*-Orthologen (Vimr *et al.*, 2004). Eine Ausnahme stellen diesbezüglich *Haemophilus influenzae* sowie eine Reihe von Corynebakterien dar, nämlich *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* und *C. pseudotuberculosis* (Gruteser *et al.*, 2012). Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Gene nicht nur auf funktioneller Ebene sondern auch regulatorisch miteinander verknüpft sein können. Weiterhin gibt es im *nag/nan*-Cluster von *C. glutamicum* mit *cg2936* (*nanR*) einen potentiellen Kandidaten für ein Gen, welches als Regulator fungieren könnte. Die Ähnlichkeit der Proteinsequenz zu NanR aus *E. coli* beträgt 44 %.

Für die biotechnologische Nutzung der Aminosucker Glucosamin und GlcNAc als alternative Kohlenstoffquelle in *C. glutamicum* ist die Aufklärung solcher regulatorischen Zusammenhänge von Bedeutung. Sie liefern Anhaltspunkte für das *Metabolic Engineering* bei dem neben der effektiven Substratnutzung gleichermaßen auch die Produktbildung zu berücksichtigen ist.

### 1.4 Einsatz von Aminosukern in der Biotechnologie

Von biotechnologischem Interesse sind vor allem die Aminosucker N-Acetylglucosamin und dessen deacetylierte Form Glucosamin. Sie sind die Grundbausteine des Polymers Chitin, welches nach Cellulose das weltweit zweithäufigste Polysaccharid darstellt (Kandra *et al.*, 2012). Chitin ist ein Bestandteil des Exoskeletts von *Crustaceen* und einigen Insekten und fällt z.B. bei der Shrimpsverarbeitung als Nebenprodukt an. Deacetyliertes Chitin, Chitosan, wird bereits für Nahrungsergänzungsmittel, Kosmetika, Textilien und für die Papierherstellung genutzt (Kurita, 2006). Die Nutzung von Chitin als Energie- und Kohlenstoffquelle in Fermentationsprozessen setzt die Hydrolyse des Polymers in seine Grundbausteine voraus. Eine Möglichkeit ist die chemische Hydrolyse, die bei bis zu 80 °C mit Salzsäure durchgeführt werden kann (Chen *et al.*, 2010). Dieses Vorgehen ist jedoch kostenintensiv, da die Säure anschließend wieder vom Produkt getrennt werden muss und als Abfall zurück bleibt. Bei der enzymatischen Hydrolyse treten diese Probleme nicht auf. Chitinolytische Enzyme findet man in zahlreichen Mikroorganismen wie z.B. *Streptomyces griseus* (Watanabe *et al.*, 1999), *Streptomyces coelicolor* (Nazari *et al.*, 2011), *Vibrio cholerae* (Hunt *et al.*, 2008) und *Aspergillus niger* (Brzezinska und Jankiewicz, 2012). Jedoch ist aufgrund der niedrigen physiologischen Chitinasemengen eine direkte Reinigung selbst bei genetisch veränderten Organismen sehr kostenintensiv (Chen *et al.*, 2010). Eine Alternative zur chemischen oder enzymatischen Vorbehandlung des Chitins stellt die rekombinante Expression von Chitinasen im gewünschten Produktionsorganismus selbst dar. Dies setzt die Sekretion funktioneller Chitinasen ins Fermentationsmedium voraus, wie es in *E. coli* am Beispiel von Chitinasen aus *Halobacterium salinarum* (Garcia-Fraga *et al.*, 2013) und *Chromobacterium violaceum* (Lobo *et al.*, 2013) gezeigt wurde.

Da Chitin in großen Mengen als kostengünstiges Nebenprodukt in Aquakulturen anfällt, ist seine weitere Nutzung von wirtschaftlichem Interesse. Für den Aminosäureproduzenten *Corynebacterium glutamicum* stellt dieses Substrat eine alternative Kohlenstoffquelle dar, die bisher nicht genutzt werden kann. Zum einen gibt es keine chitinolytisch wirksamen Enzyme in *C. glutamicum* und zum anderen ist die Verwertung der Aminosucker Glucosamin und N-Acetylglucosamin in diesen Organismus bisher nicht erforscht. Sialinsäuren hingegen sind als Substrat für biotechnologische Prozesse unbedeutend, da sie weder in geeigneten Mengen noch in leicht zugänglichen Quellen vorkommen. Kenntnisse über die mikrobielle Verwertung der Sialinsäuren sind allerdings von medizinischem Interesse. Ein Großteil der auf Schleimhäuten lebenden Mikroorganismen kann Sialinsäuren



metabolisieren und diese zum Wachstum bei der Besiedlung des Wirts nutzen. Als vorwiegend aerob lebendes Bodenbakterium ist für *C. glutamicum* die Nutzung von Sialinsäuren vermutlich kein Selektionsvorteil. Allerdings dient der Organismus auch als Modelorganismus für verwandte pathogene Mikroorganismen wie *Corynebacterium diphtheriae* und *Mycobacterium tuberculosis*. Des Weiteren sind die Stoffwechselwege von Glucosamin, N-Acetylglucosamin und Neuraminsäure hinsichtlich der beteiligten Enzyme und z.T. auch der Regulationsmechanismen eng miteinander verknüpft, wie sich im Folgenden zeigen wird.

### 1.5 *C. glutamicum* in der Biotechnologie.

Schon bei der ersten Isolierung von *C. glutamicum* stand die biotechnologische Nutzung im Vordergrund. Bei der Suche nach L-Glutamat Produzenten wurden zahlreiche Mikroorganismen identifiziert, bei deren Kultivierung Aminosäuren in Kulturüberstand durch Dünnschichtchromatographie nachgewiesen werden konnten (Kinoshita *et al.*, 1957). Die taxonomische Klassifizierung dieser und anderer Glutamat produzierender Stämme war zunächst divers, sodass in älterer Literatur Bezeichnungen wie *Micrococcus glutamicus*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum* oder *Corynebacterium lilium* verwendet wurden. Erst durch eine Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse konservierter Bereiche der 16S und 23S rRNA konnten diese Stämme der gleichen Art zugeordnet werden (Liebl *et al.*, 1991). Von den zahlreiche Subtypen sind derzeit die Genomsequenzen und Annotationen von *C. glutamicum* ATCC 13032 (Ikeda und Nakagawa, 2003; Kalinowski *et al.*, 2003) und *C. glutamicum* R (Yukawa *et al.*, 2007) publiziert.

Die Apathogenität, das große Substratspektrum und die einfache Kultivierbarkeit des grampositiven Organismus machen *C. glutamicum* zum idealen Werkzeug der Biotechnologie. Schon früh wurde damit begonnen Aminosäuren wie L-Glutamat oder L-Lysin mit *C. glutamicum* herzustellen, deren heutiges Produktionsvolumen mehrere Millionen Tonnen pro Jahr beträgt (Glatzer und Nikaido, 2007). Mit der Etablierung gentechnischer Methoden für *C. glutamicum* und eingehender Untersuchungen der Stoffwechselwege konnte das Produktspektrum deutlich erweitert werden. Neben den Aminosäuren wie z.B. L-Threonin, L-Isoleucin (Eikmanns *et al.*, 1993) und L-Valin (Blombach *et al.*, 2008) können auch Carbonsäuren wie Succinat (Zhu *et al.*, 2013), Carotinoide (Heider *et al.*, 2012) und Diamine wie Putrescin (Schneider und Wendisch, 2010) durch *C. glutamicum* hergestellt werden.

Die Grundlage für die Herstellung solcher Produktionsstämme sind Kenntnisse über

die jeweiligen Synthesewege. Welche Enzyme werden benötigt? Wie sind diese reguliert? Welche Schritte stellen eine Limitation dar? Am Beispiel der L-Lysin Produktion lassen sich einige Methoden des *Metabolic Engineerings* in *C. glutamicum* gut verdeutlichen. Dabei gibt es viele Ansätze die Produktausbeute zu erhöhen: (1) Verhinderung der Feedback-Inhibierung des Produktes. Bei der Lysin Synthese wird die Aktivität des Schlüsselenzyms Aspartatkinase LysC durch das Endprodukt inhibiert. Die Verwendung eines Feedback resistenten Allels von LysC konnte die Lysinausbeute erhöhen (Cremer *et al.*, 1991). (2) Erhöhung der Verfügbarkeit notwendiger Coenzyme. Für die Synthese eines Moleküls Lysin werden vier Moleküle NADPH benötigt. Die Analyse des Kohlenstoffflusses in *C. glutamicum* zeigte, dass bei der Lysinbildung ein großer Teil des NADPH durch den Pentosephosphatweg erzeugt wird (Marx *et al.*, 1996). Durch die Deletion des Gens *pgi*, welches das erste Enzym der Glycolyse (Glucose-6-phosphat-Isomerase) kodiert, konnte der Fluss durch den Pentosephosphatweg erhöht werden (Marx *et al.*, 2003). Mit dem gleichen Ergebnis wurde das Gen *zwf* überexprimiert, welches die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und damit den ersten Schritt des Pentosephosphatwegs katalysiert (Becker *et al.*, 2007). (3) Verhinderung der Entstehung von Nebenprodukten. Neben Lysin gehören auch Methionin, Isoleucin und Threonin bei der Aminosäurebiosynthese zur Aspartat-Familie. Die Synthese dieser Aminosäuren zweigt über die Homoserindehydrogenase von der Lysinsynthese ab. Durch Mutationen im zugehörigen Gen *hom* konnte der Fluss hin zum Lysin erhöht werden (Georgi *et al.*, 2005). (4) Bereitstellung von *Precursor*-Molekülen. Oxalacetat ist das Intermediat des Citratzyklus von dem die Biosynthese von Aminosäuren der Aspartat-Familie ausgeht. In *C. glutamicum* existieren zwei anabole Enzyme, die den Oxalacetatvorrat auffüllen: die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase und die Pyruvatcarboxylase. Letztere ist das primäre Enzym der anabolen Oxalacetatsynthese und konnte als limitierender Faktor der Lysinsynthese identifiziert werden (Peters-Wendisch *et al.*, 2001). Die Überexpression konnte die Ausbeute von Lysin um 50 % erhöhen. Weiterhin gibt es drei gluconeogenetische Enzyme, die Oxalacetat bzw. Malat zu Phosphoenolpyruvat oder Pyruvat umsetzen. Durch *in vivo* Flussanalysen konnte die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase als primäres Enzym identifiziert werden (Petersen *et al.*, 2000). Durch die Inaktivierung dieses Enzyms konnte die Lysinausbeute um 20 % erhöht werden (Riedel *et al.*, 2001).

Schon an diesen spezifischen Beispielen lässt sich erkennen, wie vielfältig die Methoden des *Metabolic Engineerings* sein können. Mit Hilfe von mathematischen Modellen lässt sich ein solches rationales Design optimieren bzw. vorhersagen. Grundlage dieser Modelle sind die aus den Genomannotationen abgeleiteten Stoffwechselwege, die unter anderem mit kinetischen Daten der Enzyme,

regulatorischen Netzwerken, Stoffflussanalysen und Energiebilanzen ergänzt werden können. Somit ist es möglich den Stoffwechsel gezielt in Richtung Produktsynthese zu verändern.

Eine weitere Methode der Stammoptimierung, die nach wie vor angewendet wird sind Zufallsmutageneseverfahren. Durch den Einsatz von mutagenen Substanzen, Strahlung oder geeigneten Selektionsbedingungen können Produktionsstämme mit spezifischen Eigenschaften erzeugt werden. Bei diesen Methoden ist vor allem das nachfolgende *Screening* zur Identifizierung der Mutanten entscheidend. Dabei müssen Einzelklone in hohem Durchsatz analysiert werden, wobei meist chromatographische Verfahren oder enzymatische Tests genutzt werden. Eine sehr effektive Methode ist die Nutzung von produktspezifischen Sensoren. Plasmidkodierte Sensoren wurden z.B. genutzt, um in einem semirationalen Ansatz Mutantenbanken der Aspartatkinase LysC von *C. glutamicum* zu untersuchen. Die Bindung des Produktes Lysin an den Sensor führte zu einem Fluoreszenzsignal, welches mittels Durchflusszytometrie (FACS) quantitative Aussagen über die intrazelluläre Produktmenge lieferte (Schendzielorz *et al.*, 2013). Die Analyse der durch die angesprochenen Mutageneseverfahren erhalten Klone liefert wiederum neue Ziele für das rationale Design.

Ein gezielter Eingriff in den Zentralstoffwechsel kann sich jedoch auch negativ auf die Substratverwertung und damit auf das Wachstum auswirken. Trotz höherer absoluter Produktmengen oder -ausbeuten kann durch verringerte Wachstumsraten die Produktivität des gesamten Prozesses sinken. Dieser Punkt stellt den Übergang zu einem zweiten Ansatz des *Metabolic Engineering* dar, der sich nicht auf die Produktsynthese, sondern auf die effektive Verstoffwechslung der Substrate bzw. die Erschließung alternativer Substratquellen ausrichtet.

Aus wirtschaftlicher Sicht stehen bei der Auswahl der Substrate die Faktoren Distribution und Kosten im Vordergrund. Fermentationsprozesse mit *C. glutamicum*, die überwiegend im Batch- oder Fed-Batch-Verfahren erfolgen, können Prozessvolumina von 50 m<sup>3</sup> bis 500 m<sup>3</sup> erreichen (Ikeda, 2003). Daher werden kostengünstige erneuerbare Rohstoffe bevorzugt, die als Neben- oder Abfallprodukt der landwirtschaftlichen Produktion entstehen. Beispielsweise ist Melasse aus Zuckerrohr und Zuckerrüben reich an Saccharose und Raffinose. Stärkehydrolysate aus Mais und Kartoffeln enthalten Glucose. Lignocellulose aus Getreide und Holz dagegen ist ein sehr komplexes Heteropolymer welches neben den Hexosen Glucose, Galactose und Mannose auch Pentosen wie Xylose und Arabinose enthält. Der Nachteil dieser komplexen Medienbestandteile ist ihre variable Zusammensetzung sowie die Notwendigkeit der hydrolytischen Vorbehandlung. Beispielsweise kann Stärke nicht direkt von *C. glutamicum* für das Wachstum genutzt werden. Um eine

chemische Vorbehandlung der Stärke zu umgehen, wurde in einem Lysin-Produktionsstamm eine  $\alpha$ -Amylase aus *Streptomyces griseus* rekombinant exprimiert. Dadurch konnte lösliche Stärke zum Wachstum und zur Lysin-Produktion direkt genutzt werden (Seibold *et al.*, 2006). Ein ähnlicher Ansatz wurde bei der Verwertung von unbehandelter Maisstärke angewandt. Durch die Nutzung der homologen Signalsequenz *cspB* aus *C. glutamicum* wurde die rekombinante  $\alpha$ -Amylase aus *Streptococcus bovis* sekretiert und konnte die Stärke hydrolysieren (Tateno *et al.*, 2007a). Daneben gibt es auch Ansätze, bei denen die  $\alpha$ -Amylase mit einem Peptidanker aus *Bacillus subtilis* an der Zelloberfläche immobilisiert wurde (Tateno *et al.*, 2007b). Bei den genannten Beispielen reicht bereits die Hydrolyse der Stärke aus, um sie für die Fermentationsprozesse zugänglich zu machen. Die Hydrolyseprodukte Glucose und Maltose können von *C. glutamicum* aufgenommen und metabolisiert werden. Anders verhält es sich bei der Lignocellulose bzw. deren Bestandteil Hemicellulose. Die Grundeinheiten des Polymers, Xylose und Arabinose, können nicht von *C. glutamicum* umgesetzt werden. Dafür ist die Verwendung von rekombinanten Enzymen notwendig. Durch Expression des *araBAD*-Operons aus *E. coli* konnte Arabinose als einzige Kohlenstoffquelle für die Produktion von Aminosäuren in *C. glutamicum* genutzt werden (Sasaki *et al.*, 2009; Schneider *et al.*, 2011). Auch die Verstoffwechslung von Xylose wurde durch die entsprechenden Gene *xylA* und *xylB* aus *E. coli* erreicht (Kawaguchi *et al.*, 2006).

### 1.6 Regulation des Kohlenstoffmetabolismus in *C. glutamicum*

Kohlenhydrate stellen für Mikroorganismen die primären Quellen der Energiegewinnung dar und liefern Kohlenstoff für die Biosynthese von Strukturmolekülen, Enzymen, Lipiden usw. - kurz: zur Erzeugung von Biomasse. Die effektive Nutzung der zur Verfügung stehenden Kohlenstoffquellen ist daher überlebenswichtig. In den meisten Mikroorganismen gibt es Mechanismen, die eine konsekutive Verstoffwechslung verursachen, wobei leicht umsetzbare Kohlenstoffquellen bevorzugt werden. Oft handelt es sich dabei um Glucose. In den meisten Fällen erfolgt diese Regulation auf der Ebene der Transkription oder der des Transports. Die Modelle der Regulation auf Transkriptionsebene, werden unter dem Begriff Katabolitrepression zusammengefasst. Dabei wird durch die Anwesenheit einer primären Kohlenstoffquelle die Transkription von Genen unterdrückt, die für die Verstoffwechslung anderer Kohlenstoffquellen benötigt werden. In gramnegativen Mikroorganismen wie z.B. *E. coli* gibt es einen globalen cAMP-abhängigen Transkriptionsregulator (Crp, *cAMP receptor protein*) der in seiner aktiven

Form an spezifische Sequenzmotive der DNA bindet und die Transkription der nachstehenden Gene auslöst. Die Aktivierung von Crp setzt die cAMP-Synthese durch die Adenylatcyclase voraus, welche wiederum durch den Phosphorylierungszustand der cytosolischen EIIA-Domäne des glucosespezifischen PTS-Transporters gesteuert wird. In Abwesenheit von Glucose ist die EIIA-Domäne phosphoryliert, wodurch es zu Aktivierung der Adenylatcyclase und in der Folge zur Aktivierung von Crp kommt (Deutscher *et al.*, 2006). In grampositiven Mikroorganismen mit niedrigem GC-Gehalt wie z.B. *B. subtilis* wird die Katabolitrepression durch den globalen Regulator CcpA (*catabolite control protein A*) verursacht. Auch hier spielt der Substratimport über das PTS-System eine Rolle. Entscheidend für die Aktivierung von CcpA ist nämlich der Phosphorylierungszustand von HPr, einer weiteren cytosolischen PTS-Komponente, die als Corepressor fungiert (Bruckner und Titgemeyer, 2002).

Modelle, bei denen die Regulation des Kohlenstoffmetabolismus auf der Ebene des Transports stattfindet, werden unter dem Begriff *inducer exclusion* zusammengefasst. Dabei wird durch die Anwesenheit einer primären Kohlenstoffquelle der Import andere Kohlenstoffquellen (*inducer*) inhibiert und somit die Aktivierung zusätzlicher kataboler Stoffwechselwege verhindert. Ein bekanntes Beispiel ist die Lactosepermease LacY aus *E. coli*. Auch sie wird durch den Phosphorylierungszustand der cytosolischen EIIA-Domäne des glucosespezifischen PTS-Transporters reguliert. Wird Glucose aufgenommen, liegt EIIA unphosphoryliert vor und kann an LacY binden, was den Import von Lactose und damit die Transkription des *lac*-Operons verhindert (Nelson *et al.*, 1983).

*Corynebacterium glutamicum* verfügt über drei gut charakterisierte PTS-Transporter, die den Import und die gleichzeitige Phosphorylierung von Glucose (PTS<sup>Glc</sup>), Fructose (PTS<sup>Frc</sup>) und Saccharose (PTS<sup>Suc</sup>) katalysieren (Dominguez und Lindley, 1996; Dominguez *et al.*, 1998). Die Funktion eines vierten PTS-Transporters (PTS<sup>X</sup>) ist bisher unbekannt. In Gegensatz zu *E. coli* sind die EIIA-Domänen der Transporter kovalent an die Transmembrandomäne EIIC gebunden und liegen nicht frei im Cytosol vor. Die substratunspezifischen PTS-Komponenten HPr und EI sind nur einmal auf dem Genom kodiert und werden für die Phosphorylierung aller PTS-Transporter benötigt. Inwieweit diese PTS-Komponenten an der Regulation des Kohlenstoffmetabolismus beteiligt sind, ist bisher nur wenig untersucht. Anderes als in anderen Mikroorganismen werden die meisten Kohlenstoffquellen in *C. glutamicum* gemeinsam metabolisiert. Zwei beschriebene Ausnahmen einer konsekutiven Substratnutzung sind Glucose und Glutamat (Kronemeyer *et al.*, 1995) sowie Glucose und Ethanol (Arndt *et al.*, 2008). Bei diesen Substratkombinationen konnte Diauxie beobachtet werden. Momentan geht man davon aus, dass der

Regulator GlxR an der Katabolitrepression beteiligt ist. *In vivo* konnten über 200 Zielgene identifiziert werden, die durch GlxR reguliert sind (Toyoda *et al.*, 2011). GlxR hat eine hohe Ähnlichkeit zu Cpr aus *E. coli* und benötigt ebenfalls cAMP als Effektor (Kim *et al.*, 2004). Außerdem gibt es in *C. glutamicum* eine Adenylatcyclase, wodurch ein ähnlicher Mechanismus der Katabolitrepression wie in gramnegativen Mikroorganismen wahrscheinlich ist (Moon *et al.*, 2007). Die genaue Untersuchung der Funktionsweise von GlxR ist allerdings schwierig, da die entsprechende Mutante deutliche Wachstumsnachteile aufweist. Außerdem gibt es in *C. glutamicum* weitere globale Transkriptionsregulatoren, die an der Regulation des Kohlenstoffmetabolismus beteiligt sind und ein komplexes regulatorisches Netzwerk bilden, dessen konkreten Ausprägungen nur schwer zu erfassen sind (Teramoto *et al.*, 2011). Eine Plattform auf der regulatorische Interaktionen, Daten zur Genexpression und funktionelle Annotationen von Genen samt den zugehörigen Referenzen zusammengefasst werden, bietet die Datenbank CoryneRegNet (Pauling *et al.*, 2012). Auf ihr können die ständig zunehmenden Ergebnisse zu regulatorischen Netzwerken hinterlegt und eingesehen werden. Ein zusammenfassendes Bild lässt sich aus der Vielzahl der Daten kaum ableiten.

Derzeit werden 159 DNA-bindende Transkriptionsregulatoren, Sigmafaktoren und Responsregulatoren von Zweikomponentensystem zum regulatorischen Repertoire von *C. glutamicum* gezählt. Mindestens 12 davon sind globale bzw. Masterregulatoren (Schroder und Tauch, 2010). Aufgrund seines Einflusses auf alle PTS-Transporter, soll an dieser Stelle der Transkriptionsregulator SugR kurz charakterisiert werden. Der Import von Substraten stellt häufig einen Schlüsselpunkt bei der Regulation des Kohlenstoffmetabolismus dar. In *C. glutamicum* fungiert SugR als Repressor der Transkription aller PTS-Gene (Engels und Wendisch, 2007; Gaigalat *et al.*, 2007; Tanaka *et al.*, 2008b). Sobald eines der PTS-Substrate (Glc, Frc oder Suc) aufgenommen wird, werden diese Gene stärker exprimiert. Daher können bei Mischsubstraten die entsprechenden Monosaccharide gleichzeitig importiert werden. Es ist allerdings anzumerken, dass der stärkste induzierende Effekt bei Wachstum mit Fructose hervorgerufen wird. Ursache dafür ist der Effektor Fructose-1-phosphat, der den stärksten Einfluss auf die Bindung von SugR an die DNA ausübt (Gaigalat *et al.*, 2007). Fructose-1-phosphat entsteht unmittelbar nach der Aufnahme von Fructose durch Pts<sup>Frc</sup>. Außerdem sind auch Glucose-6-phosphat, Fructose-6-phosphat und Fructose-1,6-bisphosphat als Effektoren von SugR beschrieben. Ihr Einfluss auf die Transkription ist jedoch sehr unterschiedlich ausgeprägt und weicht auch in Abhängigkeit des jeweils regulierten Zielgens voneinander ab (Teramoto *et al.*, 2011).

Die Komplexität des Regulationsnetzwerkes in *C. glutamicum* kann schon anhand der Expression eines einzelnen Gens deutlich gemacht werden. Wie gerade

beschrieben, wird die Expression von *ptsG* durch SugR reprimiert. Die Regulationsfaktoren GntR1 und GntR2 hingegen sind Aktivatoren von *ptsG*, die in Gegenwart von Gluconat ihre aktivierende Wirkung verlieren (Frunzke *et al.*, 2008). Dennoch zeigt *C. glutamicum* bei Mischsubstraten mit Glucose und Gluconat ein monophasisches Wachstum. Bei der Verwendung von Glucose und Maltose als Mischsubstrat, konnte neben der gleichzeitigen Metabolisierung beider Kohlenstoffquellen eine zusätzliche Aktivierung des *ptsG*-Expression beobachtet werden (Krause *et al.*, 2010). Der zugrunde liegende Regulationsmechanismus ist bisher unbekannt. Allerdings konnte der Effekt der *ptsG*-Aktivierung durch Maltose in einem Produktionsstamm für L-Valin genutzt werden. Der Stamm war durch die Deletion des Pyruvatdehydrogenasekomplexes auf das Wachstum mit Acetat angewiesen, was zur geringen Glucoseaufnahme führte. Glucose wurde jedoch als Substrat für die Valin-Synthese benötigt. Durch Zugabe von Maltose und die dadurch erhöhte *ptsG*-Aktivität konnte die Valin-Ausbeute wieder gesteigert werden (Krause *et al.*, 2010). Dieses Beispiel zeigt eindrucksvoll, wie die Metabolisierung von Substraten miteinander verknüpft ist und, anders als z.B. in *E. coli*, sich gegenseitig begünstigt. Solche Zusammenhänge können nicht nur beim *Metabolic Engineering* von Produktionsstämmen genutzt werden, sondern auch bei der optimalen Gestaltung von Fermentationsprozessen.

## 2 Ziele der Arbeit

Im Zentrum der Arbeit steht die Nutzung von Aminosuktern als Kohlenstoffquelle für *C. glutamicum*. Der Fokus richtet sich dabei auf Glucosamin und N-Acetylglucosamin. Der im Titel verwendete Begriff *Kontrolle* des Aminosuckerstoffwechsels beschreibt im Wesentlichen drei Fragestellungen. Wie gelangen die Aminosucker in die Zelle? Welche Proteine sind an ihren Abbau beteiligt? Wie ist die Expression der beteiligten Gene reguliert? Die drei Fragen bauen aufeinander auf und liefern schlussendlich wichtige Kenntnisse für die Entwicklung von Produktionsstämmen, die Aminosucker als alternatives Substrat effektiv nutzen können. Bei dem Substrat Glucosamin musste zunächst das für den Import verantwortliche Aufnahmesystem identifiziert werden. Neben der Bestimmung der kinetischen Parameter der Substrataufnahme wurde auch der Einfluss anderer Substrate auf den Import von Glucosamin untersucht. Beide Faktoren sind relevant, wenn es um die gemeinsame Metabolisierung von Kohlenstoffquellen geht. Ziel dabei war es herauszufinden, ob bereits auf Ebene des Imports Mechanismen existieren, die eine konsekutive oder eine parallele Nutzung der Substrate bedingen. Bei N-Acetylglucosamin gab es bereits vor dieser Arbeit keine Hinweise auf ein funktionelles Aufnahmesystem in *C. glutamicum*. Zur Nutzung dieses Substrates musste daher ein heterologer Transporter verwendet werden. Die für den Abbau der Aminosucker benötigten interzellulären Enzyme werden in dieser Arbeit nur am Rande betrachtet, da deren Charakterisierung von einer kooperierenden Arbeitsgruppe vorgenommen wurde. Ziel dieser Arbeit war es jedoch, den zugrunde liegenden Mechanismus der Transkriptionsregulation der entsprechenden Gene zu ermitteln. Dazu musste der verantwortliche Regulator identifiziert werden. Weiterhin sollte untersucht werden, welche Gene durch diesen Regulator außerdem reguliert werden und welches Signal für die Initiierung der Transkription verantwortlich ist. Im Verlauf der Arbeit stellte sich heraus, dass der Stoffwechsel der Neuraminsäure sehr eng mit dem der anderen beiden Aminosucker verknüpft ist, sodass auch der Einfluss des gefundenen Regulators auf die Neuraminsäurenutzung untersucht wurde.

Schließlich sollte die Eignung von Glucosamin und N-Acetylglucosamin als alternative Kohlenstoffquellen in *C. glutamicum* untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die aus den vorrangegangenen Experimenten erzielten Kenntnisse auf L-Lysin Produzenten übertragen. Zum Vergleich wurde dabei das Substrat Glucose herangezogen.



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Glucosamin als Substrat von *C. glutamicum*

##### 3.1.1 Identifizierung des Aufnahmesystems für Glucosamin

Die Nutzung von Glucosamin als Substrat für *C. glutamicum* setzt voraus, dass es in die Zelle transportiert wird und anschließend durch entsprechende Stoffwechselwege als Energiequelle oder als Ausgangsstoff von Strukturmolekülen und funktionellen Molekülen dienen kann. Aus der Annotierung des Genoms von *C. glutamicum* (Kalinowski *et al.*, 2003) konnten die Gene *nagA* und *nagB* ermittelt werden, die Proteine des Aminozuckerstoffwechsels kodieren. Auf Gene, die Importproteine für Glucosamin kodieren, gab es keine eindeutigen Hinweise. Der Wachstumsversuch mit Glucosamin als einziger Kohlenstoffquelle zeigte jedoch, dass es mindestens einen Importer in *C. glutamicum* geben muss (Abb. 3.1). Glucosamin wird von den Zellen aufgenommen und zum Wachstum genutzt. Jedoch ist die maximale Wachstumsrate mit  $0,11 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$  nur etwa ein Drittel so hoch wie die für Glucose ( $0,34 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ ). Demzufolge ist auch die Rate des Glucosaminverbrauchs mit  $0,034 \pm 0,005 \text{ g} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  geringer als die des Glucoseverbrauchs ( $0,29 \pm 0,005 \text{ g} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ).

In Bakterien werden Mono- und Disaccharide häufig durch Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferase-Systeme (PTS) aufgenommen. *E. coli* beispielsweise importiert Glucosamin über das Mannoseaufnahme-system  $\text{PTS}^{\text{Man}}$  (Gosset, 2005). Um zu überprüfen, ob einer der vier PTS-Transporter aus *C. glutamicum* für den Import verantwortlich ist, wurde zunächst das Wachstum von *C. glutamicum*  $\Delta\text{ptsH}$  mit Glucosamin untersucht (Abb. 3.2). Das Gen *ptsH* kodiert das allgemeine cytosolische Protein HPr, welches für die Phosphatgruppen-Translokation beim PTS-Import notwendig ist. Die Mutante war nicht in der Lage Glucosamin zum

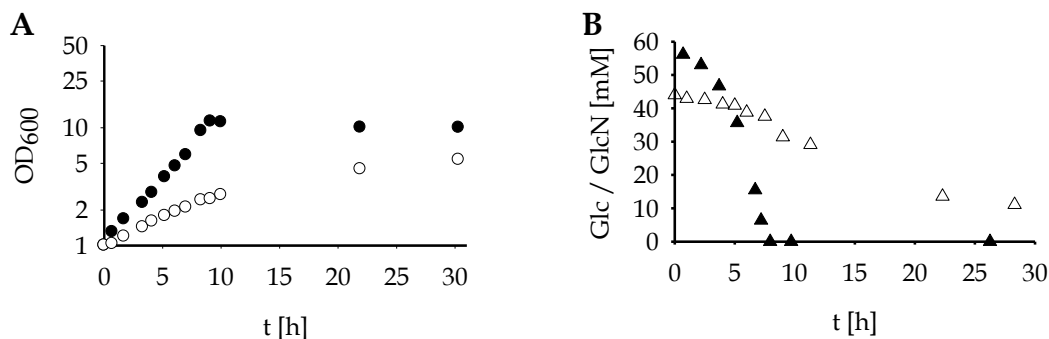
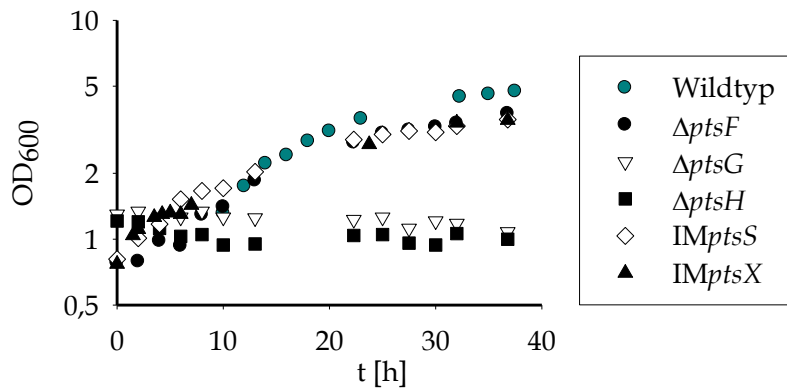


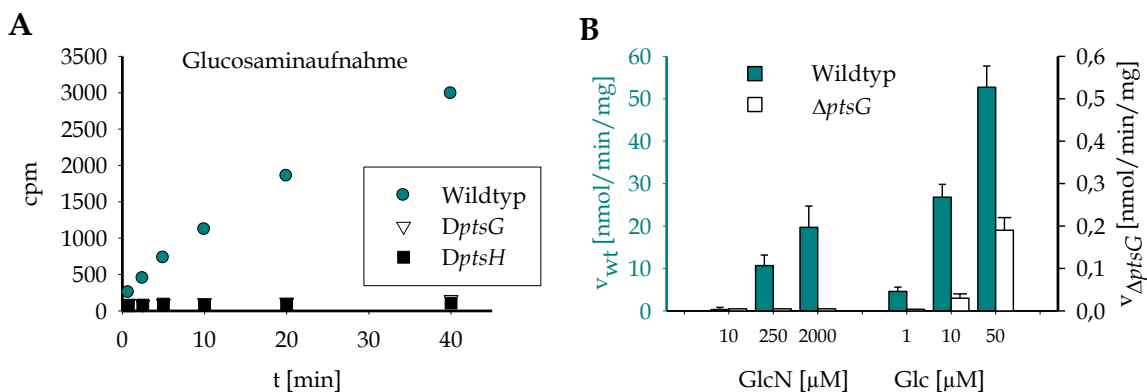
Abb. 3.1 Wachstum (A) und Substratverbrauch (B) von *C. glutamicum* ATCC 13032. Die Zellen wurden in CGXII-Medium mit 1 % Glucose (●, ▲) bzw. 1 % Glucosamin (○, △) kultiviert.

Wachstum zu verwenden. In der Folge wurde das Wachstum von Deletions-, bzw. Insertionsmutanten der vier PTS-Transporter auf Glucosamin untersucht. Während die Stämme *C. glutamicum*  $\Delta ptsF$ , *C. glutamicum* IM $ptsS$  und *C. glutamicum* IM $ptsX$  wachsen konnten, blieb die OD von *C. glutamicum*  $\Delta ptsG$  unverändert (Abb. 3.2). Demnach ist PTS<sup>Glc</sup> an der Verwertung von Glucosamin beteiligt. Die anderen drei PTS-Transporter sind nicht an der Aufnahme von Glucosamin beteiligt.



**Abb. 3.2 Wachstum von Mutanten des PTS'.** Die Deletionsmutanten *C. glutamicum*  $\Delta ptsF$ , *C. glutamicum*  $\Delta ptsF$ , *C. glutamicum*  $\Delta ptsH$  und die Insertionsmutanten *C. glutamicum* IM $ptsS$  und *C. glutamicum* IM $ptsX$  wurden in CGXII-Medium mit 1 % Glucosamin kultiviert.

Zur Messung der Substrataufnahme und der damit verbundenen Aktivität der Transporter wurden <sup>14</sup>C-markierte Substrate genutzt. Die Akkumulation der Radioaktivität in den jeweiligen Zellen wurde gemessen. So wurde die Aufnahme von Glucosamin in *C. glutamicum* Wildtyp nachgewiesen (Abb. 3.3A).

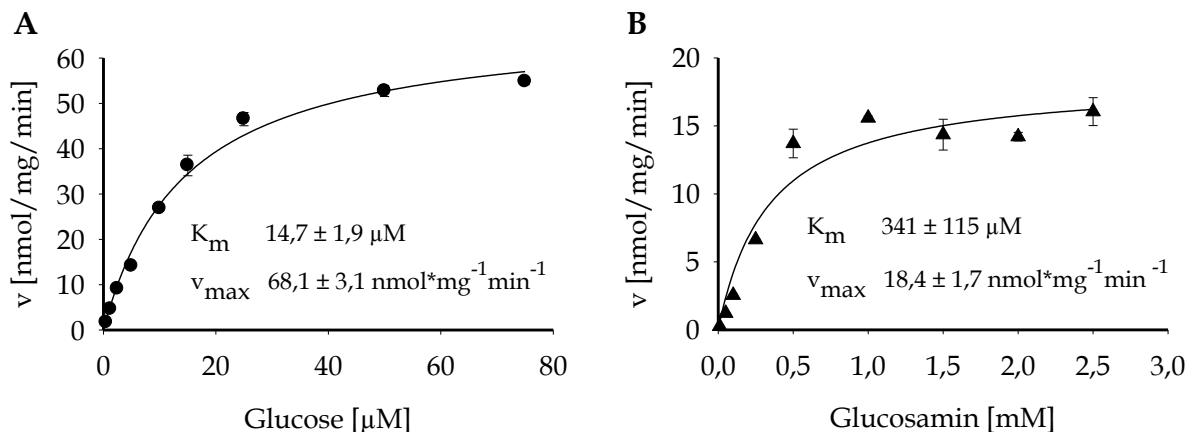


**Abb. 3.3 Substrataufnahmemessung in *C. glutamicum*.** (A) Messung der Glucosaminakkumulation im Wildtyp, *C. glutamicum*  $\Delta ptsG$  und *C. glutamicum*  $\Delta ptsH$  im Medium mit 1000  $\mu\text{M}$  GlcN. (B) Messung der Aufnahmeraten von Glucosamin und Glucose im Wildtyp und *C. glutamicum*  $\Delta ptsG$ . Hinweis: Unterschiedliche Skalen beachten!

Für die Deletionsmutanten *C. glutamicum*  $\Delta ptsG$  und *C. glutamicum*  $\Delta ptsH$  konnte auch nach 40 min Inkubation kein Anstieg der intrazellulären Radioaktivität festgestellt werden. Diese Stämme haben kein Glucosamin importiert. Dies zeigt, dass  $PTS^{Glc}$  das Hauptaufnahmesystem von Glucosamin ist. Die Ermittlung der Aufnahmeraten bei unterschiedlichen Glucosaminkonzentrationen (Abb. 3.3B) ergab ebenfalls, dass Glucosamin in *C. glutamicum*  $\Delta ptsG$  nicht aufgenommen werden kann. Allerdings konnte der Import von Glucose in *C. glutamicum*  $\Delta ptsG$  beobachtet werden, auch wenn die Raten weniger als 1 % denen des Wildtyps entsprachen. Es existiert ein weiteres Glucose-Aufnahmesystem mit geringer Substrataffinität, dessen Aktivität hier sichtbar ist (Ikeda *et al.*, 2011; Lindner *et al.*, 2011). Hinweise auf einen weiteren Glucosamin-Importer konnten nicht gefunden werden.

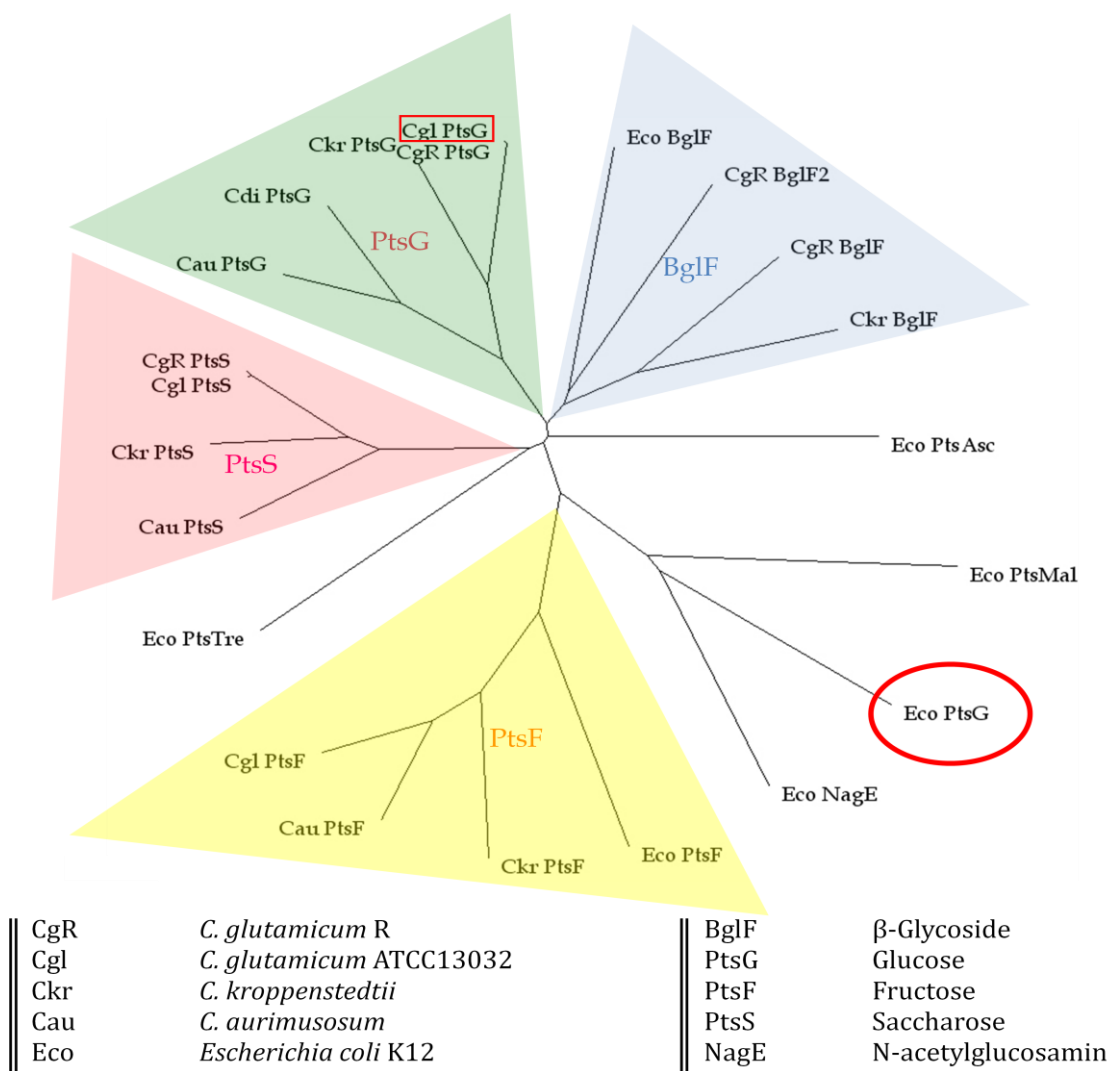
### 3.1.2 Substratspektrum von $PTS^{Glc}$

Die gemessenen Aufnahmeraten von Glucose und Glucosamin im Wildtyp unterscheiden sich sehr stark. Zur Ermittlung der zugrunde liegenden Kinetik wurden die Sättigungskurven für beide Substrate gemessen (Abb. 3.4). Mit Hilfe der Michaelis-Menten-Gleichung lässt sich die Aufnahme beider Substrate modellieren. Glucose hat eine maximale Aufnahmerate von  $v_{max}$   $68,1 \pm 3,1 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ . Für Glucosamin beträgt dieser Wert  $18,4 \pm 1,7 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ . Die Halbsättigungskonstante  $K_m$  erreicht bei Glucose  $14,7 \pm 1,9 \mu\text{M}$  und bei Glucosamin  $341 \pm 115 \mu\text{M}$ . Demnach wird Glucose mit einer über 20fach höheren Affinität und 3fach höheren maximalen Geschwindigkeit über  $PTS^{Glc}$  in die Zelle importiert als Glucosamin.



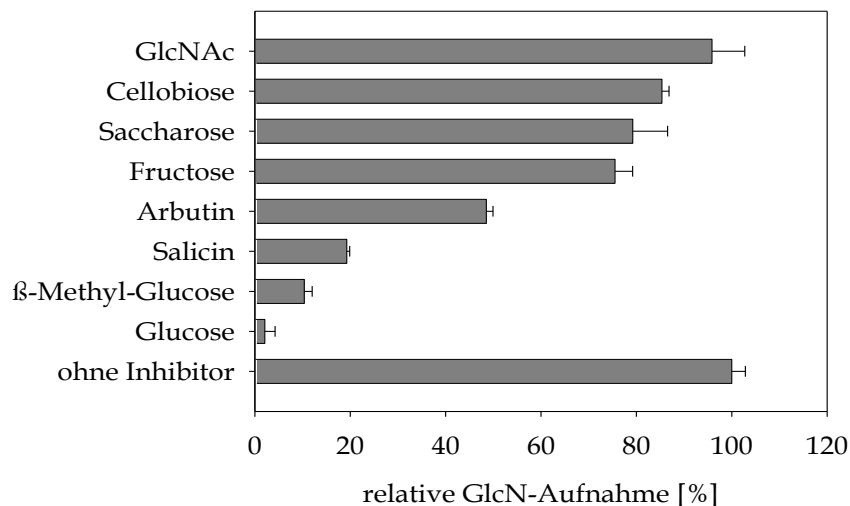
**Abb. 3.4 Kinetik des Imports von Glucose (A) und Glucosamin (B).** Die Messungen wurden mit *C. glutamicum* ATCC 13032 durchgeführt, der auf CGXII Medium mit 1 % Glucose kultiviert wurde. Kinetische Parameter wurden mittels nicht linearer Regression durch SigmaPlot® 10.0 (Systat Software, Inc. 2006) ermittelt.

Ein Vergleich der Primärstruktur des membranständigen EII-C Domänen von PTS-Transportern zeigt eine hohe Ähnlichkeit der Transporter in Abhängigkeit ihrer Substratspezifität (Abb. 3.5). Eine Ausnahme stellt jedoch die EII-C Domäne von PTS<sup>Glc</sup> aus *E. coli* dar. Dieses Protein ist nicht in der Gruppe der glucosespezifischen EII-C-Domänen aus *Corynebacterien* zu finden, woraus sich ein funktioneller Unterschied zu *C. glutamicum* begründen ließe. Weiterhin konnte in *C. glutamicum* ATCC 13032 kein analoges Protein für BglF gefunden werden, welches für den Import von  $\beta$ -Glykosiden verantwortlich ist.



**Abb. 3.5 Vergleich der EII-C Domänen von PTS-Transportern.** Transporter mit unterschiedlicher Substratspezifität (rechte Spalte) von vier Vertretern der *Corynebacteriaceae* und *E. coli* (linke Spalte) wurden miteinander verglichen. Software: ClustalX (Larkin *et al.*, 2007).

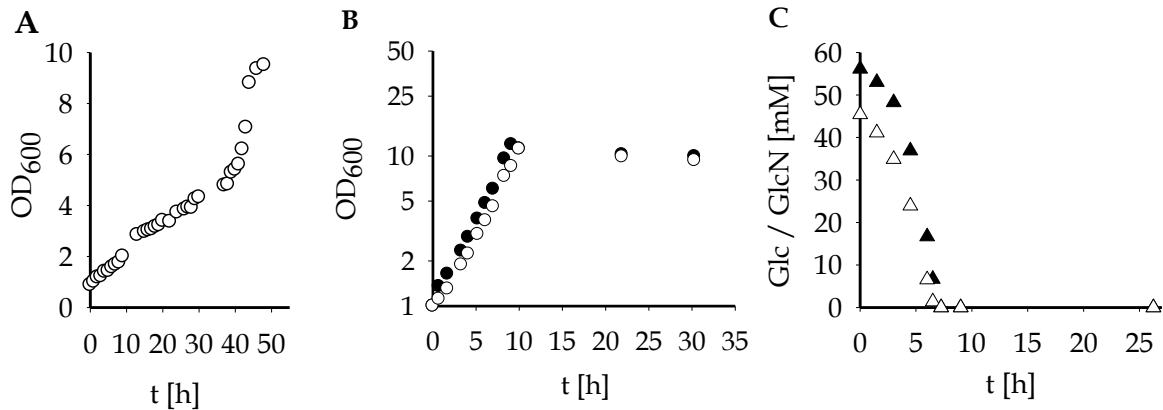
Da die Transportdomänen von  $\text{PTS}^{\text{Glc}}$  und  $\text{BglF}$  zumindest auf Primärstrukturebene nah verwandt sind, wurde im Folgenden untersucht, ob der Import von Glucosamin in *C. glutamicum* auch durch  $\beta$ -Glykoside beeinflusst werden kann (Abb. 3.6). Dabei wurde gemessen, ob der Import von Glucosamin inhibiert wird, wenn die Proben mit dem 10fachen Überschuss eines entsprechenden Substrates inkubiert wurden. Die stärkste Hemmung ist bei Glucose zu sehen. Die Aufnahme von Glucosamin wird fast vollständig inhibiert, was auf die wesentlich höhere Affinität von  $\text{PTS}^{\text{Glc}}$  zu Glucose zurückzuführen ist.  $\beta$ -Methyl-Glucose führt ebenfalls zu einer deutlichen Hemmung der Glucosaminaufnahme. Auch die  $\beta$ -Glykoside Salicin und Arbutin können den Import von Glucosamin signifikant inhibieren. Allerdings nimmt dieser Einfluss mit steigender Polarität und Größe des  $\beta$ -glykosidisch gebundenen Restes ab, sodass bei Cellobiose kaum noch eine Inhibierung zu sehen ist. In Wachstumsexperimenten mit *C. glutamicum* WT konnten die vier genannten  $\beta$ -Glykoside jedoch nicht zum Wachstum genutzt werden. Andere Saccharide wie Fructose, Saccharose und GlcNAc hatten keinen signifikanten Einfluss auf den Glucosaminimport.



**Abb. 3.6 Inhibierung der Glucosamin-Aufnahme in *C. glutamicum* ATCC 13032.** Die Aufnahme von 250  $\mu\text{M}$  GlcN wurde in Anwesenheit der 10fachen Konzentration möglicher Inhibitoren gemessen.

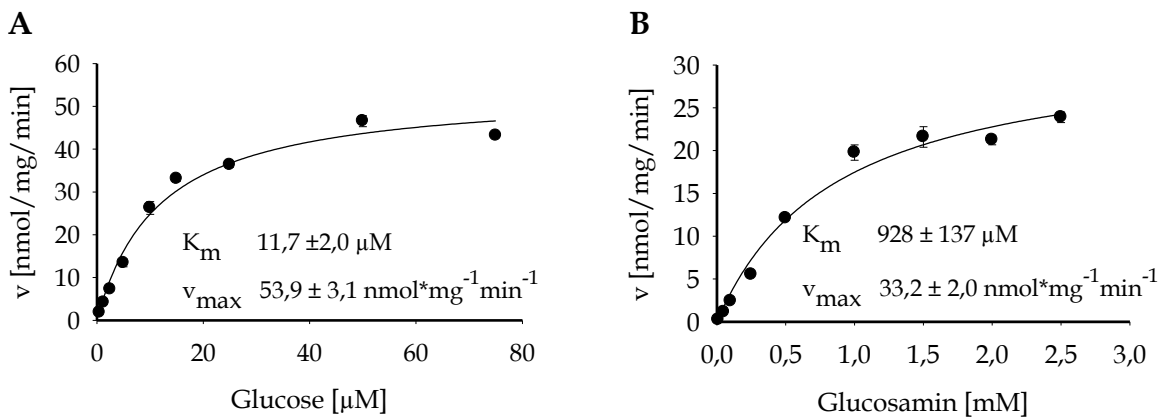
### 3.1.3 Untersuchung der Spontanmutante M4

Bei der Kultivierung von *C. glutamicum* im Minimalmedium mit Glucosamin als einziger Kohlenstoffquelle konnte regelmäßig beobachtet werden, dass es nach ca. 40 h zu einem Anstieg der Wachstumsrate kam (Abb. 3.7A, Uhde et al., 2013).



**Abb. 3.7 Spontanmutation von *C. glutamicum* beim Wachstum mit Glucosamin (A) sowie Wachstum (B) und Substratverbrauch (C) der Mutante M4.** Die Zellen wurden in CGXII-Medium mit 1 % Glucosamin ( $\circ$ ,  $\Delta$ ) bzw. 1 % Glucose ( $\bullet$ ,  $\blacktriangle$ ) als einziger Kohlenstoffquelle kultiviert. (B) und (C) zeigen das Wachstum und den Substratverbrauch der aus (A) isolierten Mutante.

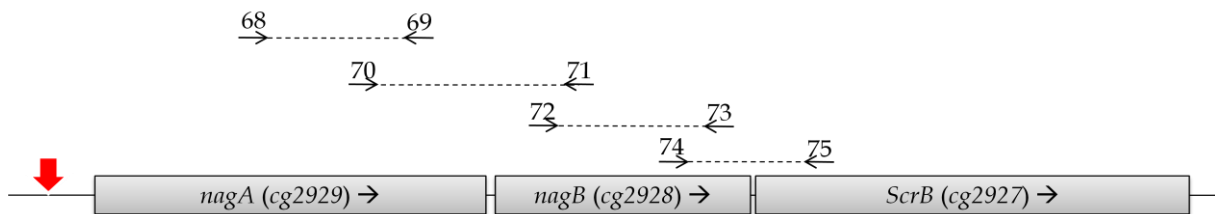
Aus diesem Versuchen konnten schließlich Mutanten isoliert werden, deren Wachstumsraten auf Glucosamin ( $0,31 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ ) genau so hoch war, wie die auf Glucose (Abb. 3.7B). Im Vergleich zum Wildtyp waren die Glucosaminverbrauchsrate der Mutante mit  $0,27 \pm 0,01 \text{ g} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  um den Faktor 8 erhöht (Abb. 3.7C). Diese Spontanmutante wird im weiteren „M4“ genannt. Abgesehen von dem verbesserten Wachstum mit Glucosamin hat M4 den gleichen Phänotyp wie der *C. glutamicum* Wildtyp. Um zu ermitteln, ob die Substrataufnahme in M4 verändert ist, wurden Sättigungskurven für Glucose und Glucosamin aufgenommen (Abb. 3.8). Bei Glucose ergeben sich kinetische Konstanten, die denen des Wildtyps entsprechen (vgl. Abb. 3.4). Für Glucosamin wurde ein ca. 60 % höherer  $K_m$ -Wert gemessen und eine ca. 30 % höhere maximale Aufnahme rate.



**Abb. 3.8 Kinetik des Imports von Glucose (A) und Glucosamin (B) in der M4-Mutante.**

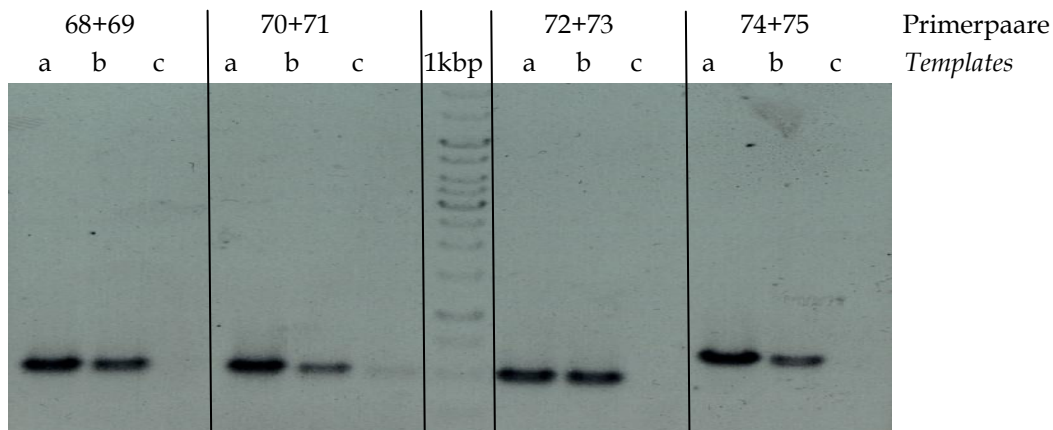
Ob diese Veränderung der Glucosaminaufnahme Ursache oder Folge des besseren Wachstums ist, lässt sich an dieser Stelle nicht zweifelsfrei klären. Weiterhin konnten durch eine Sequenzierung von *ptsG* auch keine Mutationen im Transporter gefunden werden, die für die veränderte Substrataufnahme verantwortlich sein könnten.

In Kooperation mit Volker Wendisch (Universität Bielefeld) wurde von der M4-Mutante ein Microarray erstellt (Anhang Tab. 7.1). Dabei wurden zwei Gene gefunden, deren Transkription um den Faktor 50 erhöht waren: *cg2929*, welches als N-Acetylglucosamin-Deacetylase *nagA* annotiert ist und *cg2928*, welches als Glucosamin-Deaminase *nagB* annotiert ist. Unmittelbar dahinter ist das Gen *scrB* lokalisiert, welches die Saccharose-6-phosphat-Hydrolase kodiert. Im Microarray ließ sich jedoch keine signifikante Änderung der Transkription dieses Gens ermitteln. Durch die Sequenzierung des beschriebenen Genlocus konnte eine Punktmutation in der M4-Mutante gefunden werden. Diese befindet sich im nicht-proteinkodierenden Bereich der DNA, der vermutlich die Promotorregion darstellt. Eine genauere Beschreibung dieser Mutation wird später vorgenommen. Zunächst sollte untersucht werden, ob die drei Gene durch ein gemeinsames Transkript exprimiert werden, also ein Operon darstellen und somit gemeinsam durch die Punktmutation im Promotorbereich beeinflusst werden können (Abb. 3.9).



**Abb. 3.9 Untersuchung des *nagAB-ScrB*-Operons.** Zur Untersuchung der Operonstruktur wurden Primer-Paare verwendet, deren PCR-Produkte überlappen. Angegeben sind jeweils die Nummern der verwendeten Primer. Der Rote Pfeil in markiert den Bereich der Punktmutation in der M4-Mutante.

Dazu wurde RNA aus dem *C. glutamicum* Wildtyp isoliert und mit DNaseI behandelt. Über reverse Transkription wurde cDNA synthetisiert welche als *Template* für folgende PCRs verwendet wurde. Mittels spezifisch ausgewählter Primer (Abb. 3.9) wurden PCR-Produkte erzeugt, deren Sequenzen sich gegenseitig überlappen. Der Nachweis eines PCR-Produktes, welches eine intergene Sequenz umfasst (Produkte 70+71 und 74 + 75) ist nur dann möglich, wenn die Gene ein gemeinsames Transkript haben. Als Positivkontrolle diente bei diesem Versuch genomische DNA von *C. glutamicum*. Die Negativkontrolle war DNaseI-behandelte RNA, die später auch für die reverse Transkription eingesetzt wurde (Abb. 3.10).



**Abb. 3.10 Nachweis der Operonstruktur von *nagAB-scrB*.** Positionen der Primer und der überlappenden Produkte sind Abb. 3.9 zu entnehmen. Als *Template* für die PCR wurden (a) genomische DNA (b) einzelsträngige cDNA und (c) DNaseI behandelte mRNA verwendet.

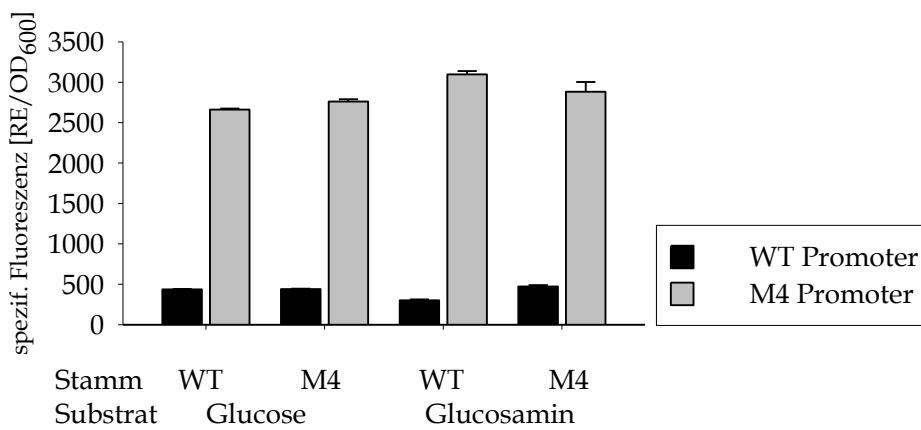
Für alle Primerpaare ließ sich nach der reversen Transkription ein PCR-Produkt nachweisen, welches dem der Positivkontrolle entsprach. In den Proben mit DNaseI behandelter RNA konnten keine PCR-Produkte identifiziert werden, was zeigt, dass diese RNA nicht mit genomischer DNA kontaminiert war. Somit existiert ein gemeinsames Transkript der Gene *nagA*, *nagB* und *scrB*. Sie bilden das Operon *nagAB-scrB*.

Welchen Einfluss die Punktmutation in M4 auf die Transkription des *nagAB-scrB*-Operons hat, wurde mit Hilfe des Reportergenvektors pEPR1 untersucht. Dabei wird der zu untersuchende Promotor vor das Reportergen *gfp* kloniert, um dessen Aktivität zu ermitteln. Verglichen wurde die Aktivität des *nagAB-scrB*-Promotors aus der M4-Mutante mit der des Wildtyps. Um zu ermitteln, ob neben der Punktmutation in M4 auch andere Faktoren eine erhöhte Transkription von *nagAB-scrB* zur Folge haben, wurde die Messung in *C. glutamicum* WT und in der M4-Mutante durchgeführt. Die Zellen wurden im Minimalmedium mit Glucose bzw. Glucosamin als einziger Kohlenstoffquelle kultiviert. In der exponentiellen Wachstumsphase bzw. nach 6 h Kultivierung wurden Proben für die Fluoreszenzmessung genommen (Abb. 3.11). Dabei ist die Aktivität des M4-Promotors im Vergleich zum WT-Promotor in allen untersuchten Proben deutlich gestiegen. Unabhängig von Stammhintergrund oder vom verwendeten Substrat ist die spezifische Fluoreszenz um den Faktor 6 bis 7 erhöht, wenn *gfp* unter der Kontrolle des *nagAB-scrB*-Promotors aus der M4-Mutante steht. Der größte Unterschied zw. WT und M4-Promotor ist zu sehen, wenn die Konstrukte im Wildtyp mit Glucosamin als Kohlenstoffquelle untersucht werden. Dabei ist



allerdings zu berücksichtigen, dass diese Zellen nur sehr langsam wachsen (vgl. Abb. 3.1A). Ein direkter Vergleich der GFP-Fluoreszenz ist daher nur möglich, wenn Stammhintergrund und Substrat zu ähnlichen Wachstumsraten führen.

Die Punktmutation im Promotorbereich des *nagAB-scrB*-Operons ist somit ausreichend, um eine deutlich höhere Transkriptionsstärke zu erreichen. Dies führt zu einem verbesserten Wachstum der M4-Mutante auf Glucosamin. Betrachtet man den Katabolismus von Glucosamin, ist dafür eine höhere Aktivität von NagB bereits ausreichen. Tatsächlich wurde auch eine höhere Aktivität dieses Enzyms in der M4-Mutante gemessen (Uhde *et al.*, 2013).



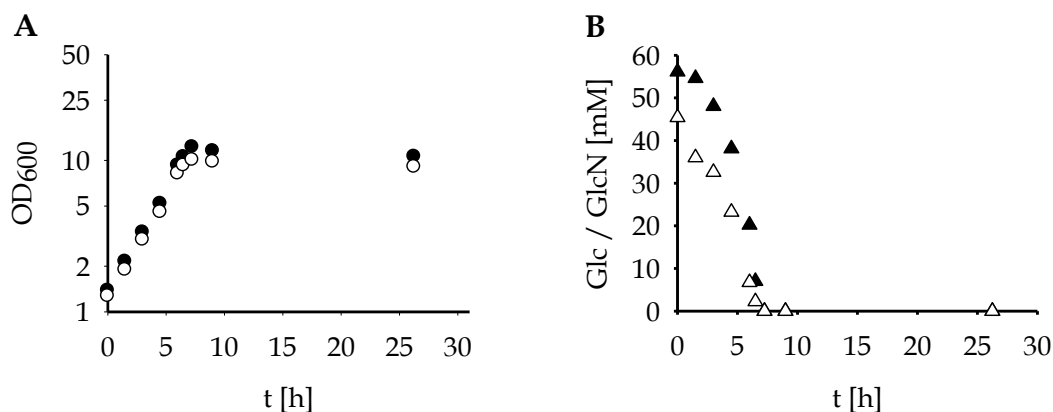
**Abb. 3.11 Aktivitäten des *nagAB-scrB*-Promotors.** *C. glutamicum* WT und M4 wurden mit *gfp*-Reporter-Genvektoren transformiert, welche unter der Kontrolle des nativen *nagAB-scrB*-Promotorbereiches (schwarze Balken) bzw. des mutierten Promotors aus M4 (graue Balken) standen. Die Kultivierung erfolgte in CGXII mit 1 % Glucose oder 1 % Glucosamin.

### 3.1.4 Glucosamin als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle

Um zu überprüfen, ob allein die höhere Expression des *nagAB-scrB*-Operons in der M4-Mutante die verbesserte Nutzung von Glucosamin bewirkt, wurde das entsprechende Operon mit dem Plasmid pVWEx1\_*nagAB-scrB* überexprimiert (Abb. 3.12). Die Wachstumsraten von *C. glutamicum* pVWEx1\_*nagAB-scrB* auf Glucose und Glucosamin liegen jeweils bei  $0,33 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$ . Das entspricht den Raten der M4-Mutante. Die zusammenfassende Übersicht zu den Wachstumsexperimenten mit Glucose bzw. Glucosamin als einziger Kohlenstoffquelle (Tab. 3.1) macht deutlich, dass die Nutzung von Glucosamin nur dann effizient abläuft, d.h. mit ähnlichen Wachstums- und Substratverbrauchsraten wie bei Glucose, wenn die Expression von *nagB* erhöht ist, wie es in der M4-Mutante und *C. glutamicum* pVWEx1\_*nagAB-scrB* der Fall ist.

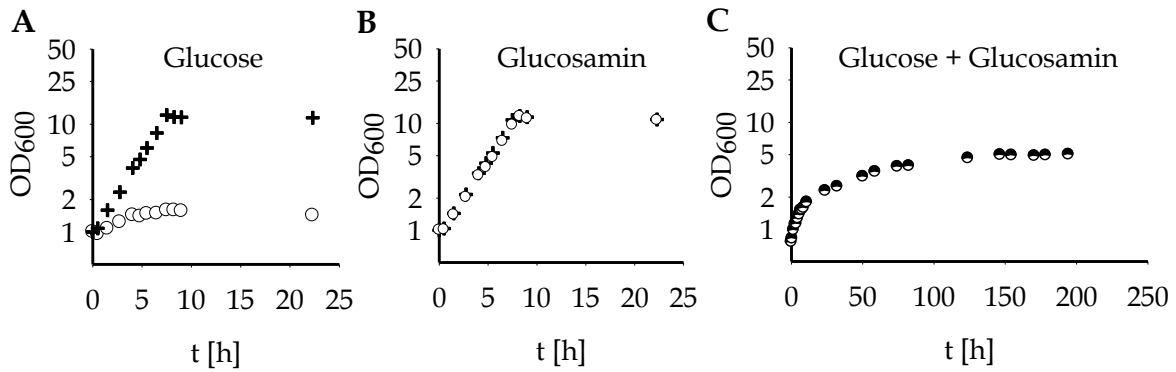
**Tab. 3.1 Wachstums- und Substratverbrauchsdaten.** Die Raten wurden für *C. glutamicum* WT, M4 und *C. glutamicum* pVWEx1\_nagAB-scrB beim Wachstum mit 1 % Glucose bzw. 1 % Glucosamin bestimmt. Messfehler von  $\mu$  liegen bei  $\pm 0,02 \text{ h}^{-1}$  und von  $q_s$  bei  $\pm 0,05 \text{ g}^* \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ .

Stamm	$\mu \text{ [h}^{-1}\text{]}$		$q_s \text{ [g}_{\text{Substrat}} \cdot \text{g}_{\text{Biomasse}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}\text{]}$	
	Glucose	Glucosamin	Glucose	Glucosamin
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	0,34	0,12	0,29	0,034
M4-Mutante	0,34	0,32	0,30	0,27
WT pVWEx1_nagAB-scrB	0,33	0,32	0,30	0,25



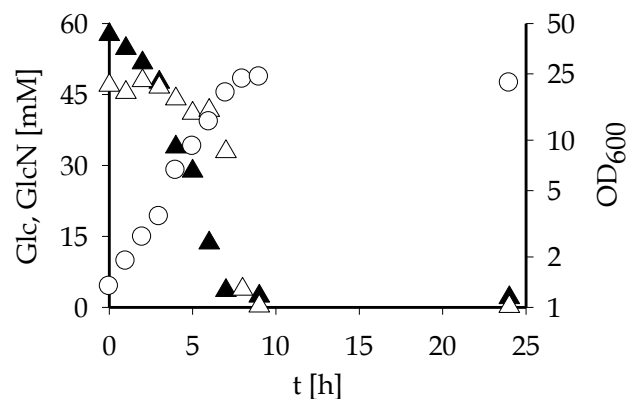
**Abb. 3.12 Wachstum (A) und Substratverbrauch (B) von *C. glutamicum* pVWEx1\_nagAB-scrB.** Die Zellen wurden in CGXII-Medium mit 1 % Glucose (●, ▲) bzw. 1 % Glucosamin (○, △) als einziger Kohlenstoffquelle kultiviert.

Bisher wurde nur die Eignung von Glucosamin als Kohlenstoffquelle untersucht. Da diese Hexose am zweiten Kohlenstoffatom eine Aminogruppe trägt, stellt sich die Frage, ob diese auch für den Stoffwechsel genutzt werden kann. Daher wurde in der M4-Mutante untersucht, ob Glucosamin eine geeignete Stickstoffquelle für *C. glutamicum* darstellt (Abb. 3.13). Die M4-Mutante ist für diesen Versuch besser geeignet als der Wildtyp, da sie Glucose und Glucosamin gleich gut metabolisiert. Glucose diente dabei als Kontrolle. Das Minimalmedium enthielt entweder überhaupt keine Stickstoffquelle oder 55 mM Ammoniumsulfat, was äquivalent zum Stickstoffanteil in 1 % Glucosamin ist. Bei Glucose als Kohlenstoffquelle reicht diese Menge bereits aus, um Wachstumsraten von  $0,34 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$  zu erreichen (Abb. 3.13A). Ist keine Stickstoffquelle im Medium, stagniert das Wachstum nach ca. 4 h. Wird Glucosamin als Kohlenstoff- und auch als Stickstoffquelle verwendet, zeigt sich in beiden Minimalmedien eine Wachstumsrate von  $0,34 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$  (Abb. 3.13B). Somit ist die durch Glucosamin bereitgestellte Menge Ammonium ausreichend für ein



**Abb. 3.13 Glucosamin als Stickstoffquelle in der M4-Mutante.** Die Kultivierung erfolgte im CGXII-Medium ohne Zugabe von Harnstoff und Ammoniumsulfat (o) bzw. mit 55 mM Ammoniumsulfat (+). Für beide Ansätze wurde 1 % Glucose (A) und 1 % Glucosamin (B) als Wachstumssubstrat verwendet. (C) zeigt das Wachstum von M4 mit einem Mischsubstrat von Glucose + Glucosamin ohne weitere Stickstoffquelle.

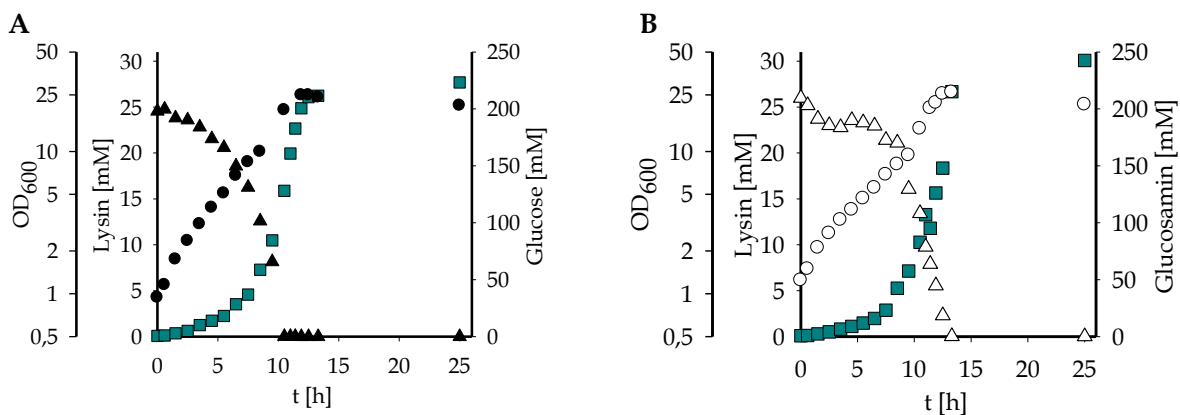
effizientes Wachstum. Ist Glucosamin die einzige Stickstoffquelle im Medium, wird durch die Zugabe von Glucose das Wachstum interessanterweise wieder inhibiert (Abb. 3.13C). Die Ursache ist in den unterschiedlichen Affinitäten des Aufnahmesystems  $PTS^{Glc}$  zu suchen. Sie zeigen sich auch, wenn die M4-Mutante im Mischsubstrat mit Glucose + Glucosamin kultiviert wurde (Abb. 3.14). Es ist deutlich zu erkennen, dass beide Substrate nacheinander aufgenommen werden: Zuerst Glucose und sobald diese verbraucht ist Glucosamin. Ein Einfluss auf das Wachstum ist im Fall der M4-Mutante trotz der konsekutiven Nutzung der Substrate nicht zu beobachten.



**Abb. 3.14 Kultivierung der M4-Mutante im Mischsubstrat.** Die Zellen (o) wurden in CGXII-Medium mit 1 % Glucose (▲) + 1 % Glucosamin (Δ) kultiviert.

### 3.1.5 Nutzung von Glucosamin zur L-Lysin Produktion

Hinsichtlich der Anwendung von Aminoszuckern als Substrat für die Produktbildung in *C. glutamicum* wurde der L-Lysin Produktionsstamm *C. glutamicum* DM1946 mit dem Plasmid pVWEx1\_nagAB-scrB transformiert, welches das nagAB-scrB-Operon induzierbar exprimieren kann. In einem Fermenter mit 1,5 l Kulturvolumen und 2 % des jeweiligen Substrates (Glucose oder Glucosamin) wurde der Produktionsstamm kultiviert. Bereits während der Vorkultivierung wurde die Expression des nagAB-scrB-Operons durch Zugabe von 0,1 mM IPTG induziert. Unabhängig vom eingesetzten Substrat ergaben sich bei den dargestellten Fermentationen annähernd gleiche Konzentrationsverläufe der gemessenen Parameter (Abb. 3.15), wobei die Wachstumsrate bei der Glucosamin-Fermentation 20 % geringer ist.



**Abb. 3.15 Fermentationen in 1,5 l Maßstab mit *C. glutamicum* DM1946 pVWEx1\_nagAB-scrB.** Die Kultivierung erfolgte in Minimalmedium mit 2 % Glucose (A) oder 2 % Glucosamin (B). Es wurden jeweils der Substratverbrauch ( $\Delta$ ,  $\blacktriangle$ ), Wachstum ( $\circ$ ,  $\bullet$ ) und Lysinbildung ( $\blacksquare$ ) gemessen.

Die Bildung von L-Lysin begann bereits während der Wachstumsphase. Nach dem vollständigen Verbrauch der Substrate und dem Erreichen der maximalen OD kam es weiterhin zu einer biomasseassoziierten Produktbildung, bei der ca. 30 % der gesamten Lysinmenge synthetisiert wurden. Zur Charakterisierung der Fermentationen wurden die Wachstumsraten, die substratbezogenen Biomasse- und Lysinausbeuten sowie maximale OD und Lysinkonzentrationen berechnet (Tab. 3.2).

**Tab. 3.2 Kennzahlen der Fermentationen im 1,5 l Maßstab.** Die Fermentationen wurden dreimal durchgeführt.

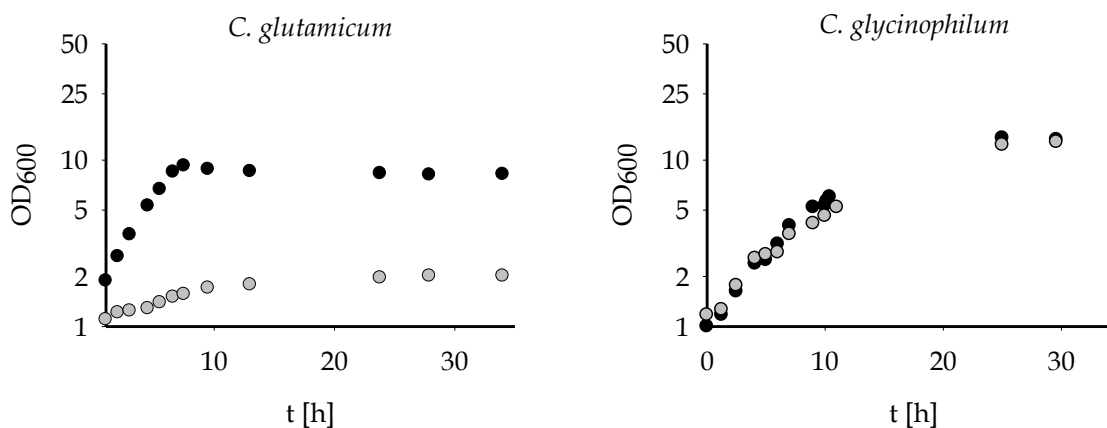
	Glucose	Glucosamin
$\mu$ [ $\text{h}^{-1}$ ]	$0,28 \pm 0,03$	$0,21 \pm 0,06$
$Y_{p/s}$ [ $\text{g}_{\text{Lys}} \cdot \text{g}_{\text{Substrat}}^{-1}$ ]	$0,10 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,02$
$q_p$ [ $\text{g}_{\text{Lys}} \cdot \text{g}_{\text{Biomasse}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ]	$0,017 \pm 0,005$	$0,014 \pm 0,006$

Die Mittelwerte für die Produktausbeute  $Y_{p/s}$  und die Produktbildungsrate  $q_p$  sind für beide Substrate etwa gleich hoch. Aufgrund unterschiedlicher Fermentationsverläufe bei den Glucosamin-Versuchen ist dort jedoch die Wachstumsrate vergleichsweise gering und mit einem hohen Standardfehler behaftet.

## 3.2 N-Acetylglucosamin als Kohlenstoffquelle von *C. glutamicum*

### 3.2.1 Expression von *nagEBA* aus *C. glycinophilum*

N-Acetylglucosamin (GlcNAc) wird von *C. glutamicum* ATCC 13032 nicht aufgenommen und genutzt. In einem dieser Arbeit vorrangegangenen Screening konnten allerdings *Corynebacteriaceae* identifiziert werden, die GlcNAc als einzige Kohlenstoffquelle zum Wachstum nutzen konnten, darunter *C. glycinophilum*. Dieser Organismus erreicht mit GlcNAc als einziger C-Quelle die gleichen Wachstumsraten wie mit Glucose. Sie ist mit  $0,16 \text{ h}^{-1}$  allerdings geringer, als die von *C. glutamicum* Wildtyp auf Glucose (Abb. 3.16)



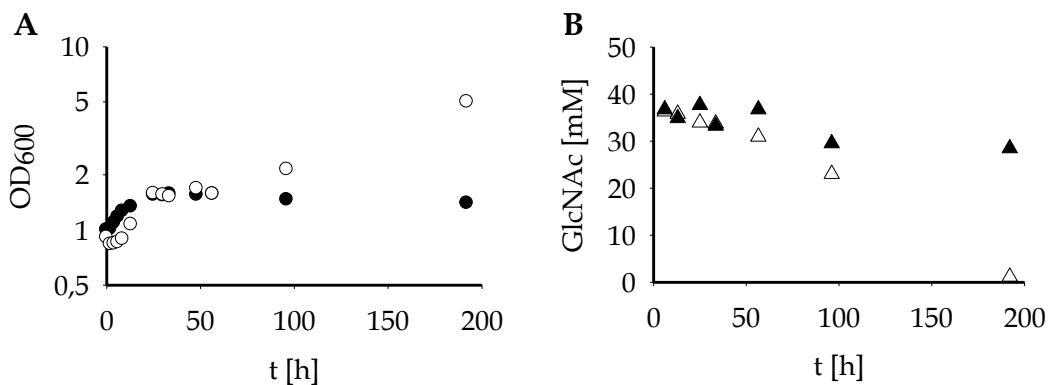
**Abb. 3.16** Wachstum von *C. glutamicum* und *C. glycinophilum*. Die Kultivierung erfolgte im CGXII-Medium mit 1 % Glucose (●) bzw. 1 % GlcNAc(○).

Das Genom von *C. glycinophilum* ist bisher nicht veröffentlicht, wurde jedoch von der kooperierenden Arbeitsgruppe um Jörn Kalinowski (Universität Bielefeld) bereits sequenziert. Durch ein Sequenzvergleich mit Hilfe von BLAST (Altschul *et al.*, 1990) konnte ein Transporter vom PTS-Typ identifiziert werden, der eine hohe Ähnlichkeit zum dem GlcNAc-Importer NagE aus *E. coli* hat (Rogers *et al.*, 1988). Außerdem befinden sich die Gene *nagA* und *nagB* in unmittelbarer Nähe von *nagE* (Abb. 3.17).



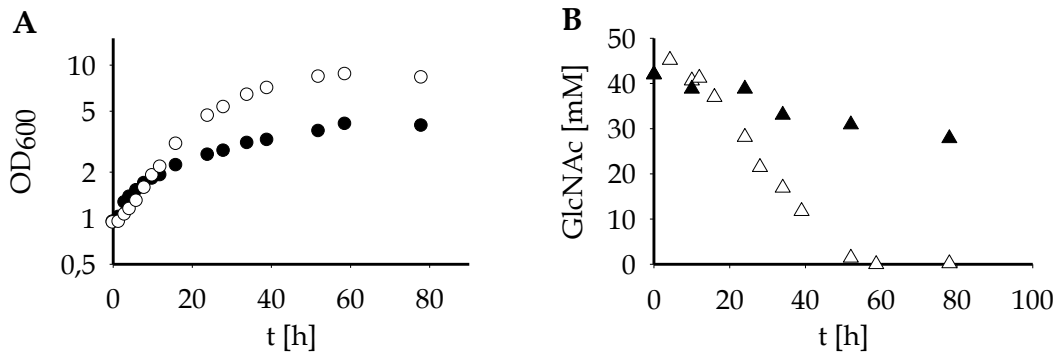
**Abb. 3.17 Locus von *nagE* in *C. glycinophilum*.** Die Pfeile markieren Primer, die zur Klonierung von *nagE* bzw. des *nagEBA*-Operons benutzt wurden.

Die drei genannten Gene werden benötigt, um GlcNAc dem Zentralstoffwechsel zuzuführen. Zunächst wurde jedoch nur der Transporter NagE heterolog in *C. glutamicum* und in der M4-Mutante exprimiert (Abb. 3.18). Dabei sind Wachstum und Substratverbrauch von *C. glutamicum* pEKEx2\_*nagE* nur sehr gering. Nach 200 h sind noch über 80 % des Substrats im Medium ( $q_s = 0,019 \pm 0,005 \text{ g}^*g_{\text{BTM}}^{-1}h^{-1}$ ). Wird der Transporter in der M4-Mutante exprimiert, ist das Wachstum etwas verbessert. Nach 200 h ist kein Substrat im Medium mehr nachweisbar. Dennoch ist der Umsatz mit  $0,042 \pm 0,005 \text{ g}^*g_{\text{BTM}}^{-1}h^{-1}$  im Vergleich zu Glucose oder Glucosamin gering.



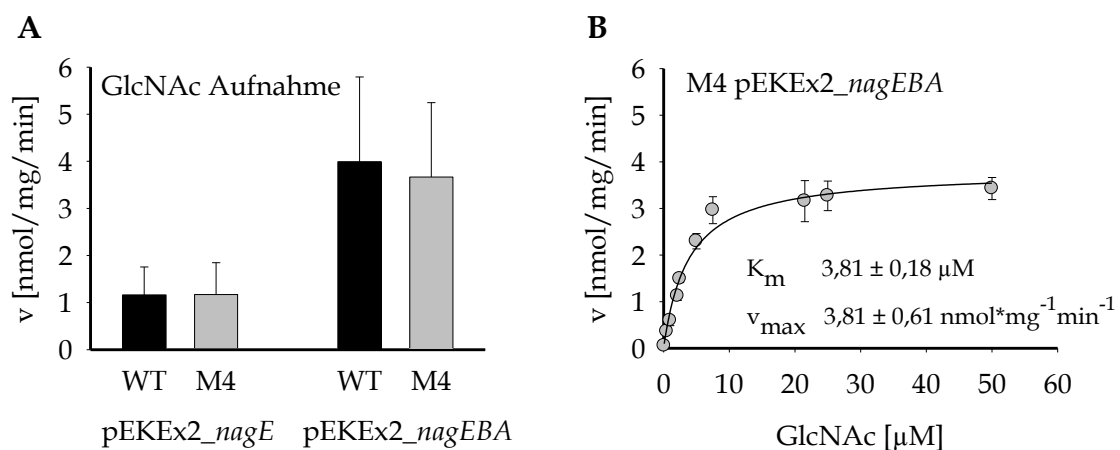
**Abb. 3.18 Wachstum (A) und Verbrauch von N-Acetylglucosamin (B) bei *nagE*-Expression.** *C. glutamicum* ATCC 13032 pEKEx2\_*nagE* (●, ▲) und M4 pEKE2\_*nagE* (○, Δ) wurden in CGXII-Medium mit 1 % GlcNAc kultiviert.

Um eine bessere Nutzung von N-Acetylglucosamin zu erreichen, wurde daher das gesamte *nagEBA*-Operon aus *C. glycinophilum* heterolog in *C. glutamicum* exprimiert (Abb. 3.19). Sowohl im Wildtyp als auch in der M4-Mutante führte das zu einer Verbesserung des Wachstums. In M4 pEKEx2\_*nagEBA* ist das Substrat mit dem Erreichen einer OD von 10 bereits nach 50 h komplett aufgebraucht. Die Substratverbrauchsrate hat sich dabei im Vergleich zu M4 pEKEx2\_*nagE* auf  $0,093 \pm 0,005 \text{ g}^*g_{\text{BTM}}^{-1}h^{-1}$  verdoppelt. Die OD von *C. glutamicum* WT pEKEx2\_*nagEBA* ist nach 50 h bei 3,5 und ca. 30 % des Substrates sind verbraucht ( $q_s = 0,024 \pm 0,005 \text{ g}^*g_{\text{BTM}}^{-1}h^{-1}$ ).



**Abb. 3.19 Wachstum (A) und Verbrauch von N-Acetylglucosamin (B) bei *nagEBA*-Expression.** *C. glutamicum* ATCC 13032 pEKE2\_nagEBA (●, ▲) und M4 pEKE2\_nagEBA (○, △) wurden in CGXII-Medium mit 1 % GlcNAc kultiviert.

Die Messung der Substrataufnahme zeigt, dass Zellen mit dem Vektor pEKE2\_nagE eine um ca. 70 % geringere Aufnahme rate erreichen, als die Zellen mit dem gesamten Operon pEKE2\_nagEBA (Abb. 3.20A). Dabei wurden für den Wildtyp und die M4-Mutante jeweils gleich hohe Aufnahme rates gemessen. Somit ist die Aufnahme rate unabhängig vom verwendeten Stammhintergrund, jedoch abhängig von dem verwendeten Expressionskonstrukt. Dennoch ist das Wachstum limitiert. Mit einem  $K_m$  von  $3,81 \pm 0,18 \mu\text{M}$  hat NagE aus *C. glycinophilum* zwar eine gute Affinität zu dem Substrat GlcNAc (Abb. 3.20B), jedoch ist die maximale Aufnahme rate mit  $3,81 \pm 0,61 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  vergleichsweise gering. Zusätzlich wird für eine effiziente Nutzung von GlcNAc eine erhöhte Expression von *nagA* und *nagB* benötigt, wie es in M4 pEKE2\_nagEBA der Fall ist.



**Abb. 3.20 GlcNAc-Aufnahmemessungen.** (A) Aufnahme rates von *C. glutamicum* ATCC 13032 und M4 mit dem Plasmiden pEKE2\_nagE bzw. pEKE2\_nagEBA bei  $50 \mu\text{M}$  GlcNAc. (B) Sättigungskurve zur Charakterisierung der GlcNAc-Aufnahme in M4 pEKE2\_nagEBA.

### 3.2.2 Nutzung von N-Acetylglucosamin zur L-Lysin Produktion

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass GlcNAc als einzige Kohlenstoffquelle für biotechnologische Anwendungen in *C. glutamicum* ungeeignet zu sein scheint, da selbst in der M4-Mutante nur Wachstumsraten von  $0,05 \text{ h}^{-1}$  erreicht wurden. Um dem Problem der langsamen Biomassebildung aus dem Weg zu gehen, wurde daher ein Mischsubstrat verwendet, in dem neben GlcNAc auch Glucose enthalten war (Abb. 3.21). Der Verlauf der Substratkonzentrationen macht deutlich, dass GlcNAc und Glucose in diesen Versuch nacheinander metabolisiert wurden. Erst nach dem

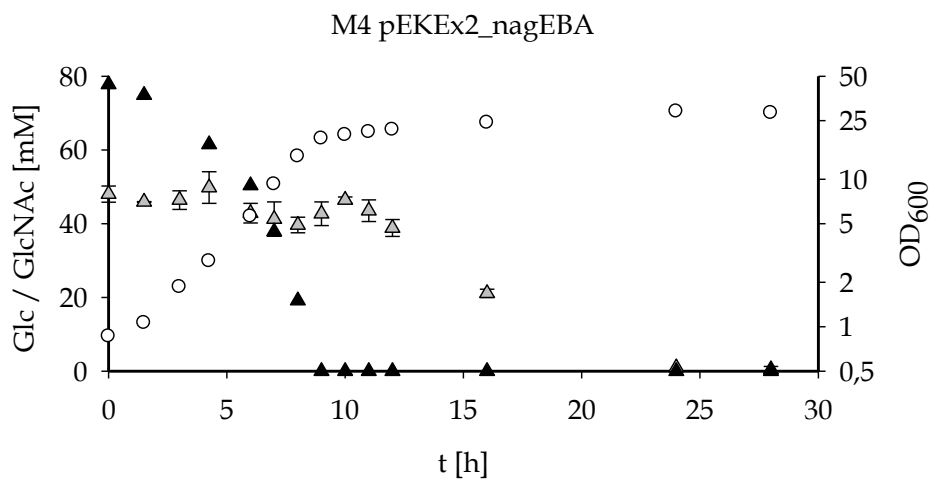
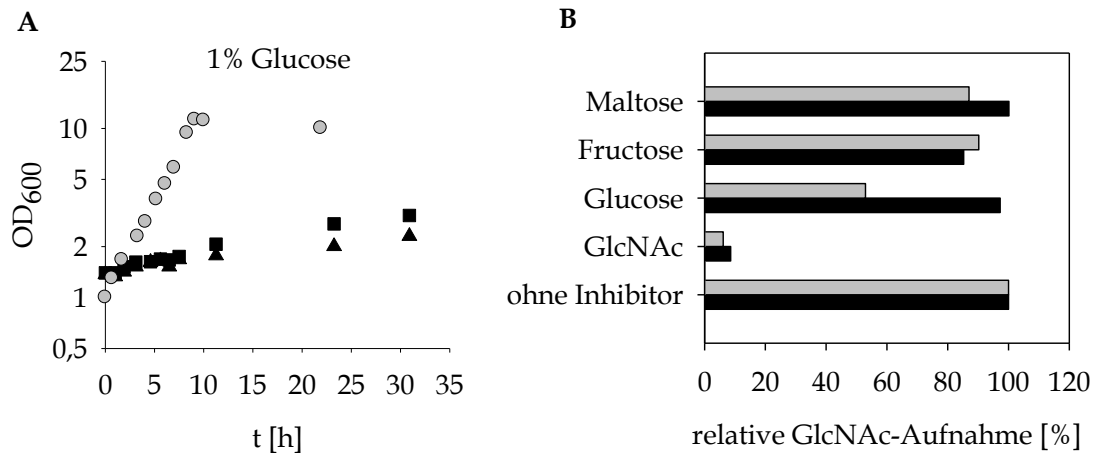


Abb. 3.21 Wachstum von M4 pEKEx2\_nagEBA (○) bei Kultivierung auf Mischsubstrat mit Glucose (▲) und N-Acetylglucosamin(▲).

Verbrauch von Glucose begann die Nutzung von GlcNAc. Die Substratverbrauchsrate liegt bei  $0,085 \pm 0,005 \text{ g} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  und ist damit in dem gleichen Bereich der Kultivierung mit GlcNAc als einziger Kohlenstoffquelle. Eine konsekutive Nutzung von Substraten wurde bereits beim Mischsubstrat mit Glucose + Glucosamin beobachtet (vgl. Abb. 3.14). Die Ursache lag darin, dass beide Substrate durch den gleichen Transporter ( $\text{PTS}^{\text{Glc}}$ ) importiert wurden, jedoch mit unterschiedlicher Affinität. Daher wurde untersucht, ob Glucose auch durch NagE Importiert werden kann und damit möglicherweise den Import von GlcNAc inhibiert. Dazu wurde der Stamm *C. glutamicum*  $\Delta\text{ptsG}$  mit pEKEx2\_nagEBA transformiert und das Wachstum mit Glucose untersucht (Abb. 3.22A). Die Expression von nagEBA führt in *C. glutamicum*  $\Delta\text{ptsG}$  jedoch nicht zu einer Verbesserung des Wachstums auf Glucose, wie der Vergleich mit dem Wildtyp zeigt. Ebenso konnte auch keine erhöhte Aufnahme radioaktiv markierter Glucose in diesem Stamm ermittelt werden. Somit kann ausgeschlossen werden, dass NagE





**Abb. 3.22 Einfluss von Glucose auf die GlcNAc-Aufnahme.** (A) Wachstum von *C. glutamicum* ATCC 13032 (○), *C. glutamicum*  $\Delta ptsG$  (▲) und *C. glutamicum*  $\Delta ptsG$  pEKEx2\_nagEBA (■) auf 1 % Glucose. (B) Inhibierung der GlcNAc-Aufnahme in M4 pEKEx2\_nagEBA (■) und *C. glutamicum*  $\Delta ptsG$  pEKEx2\_nagEBA (■) durch Zugabe eines 20x Überschusses an den genannten Substraten.

neben GlcNAc auch Glucose importiert. Allerdings konnte in M4 pEKEx2\_nagEBA eine Inhibierung der GlcNAc-Aufnahme durch Glucose um fast 50 % beobachtet werden (Abb. 3.22B). Andere Substrate wie Fructose und Maltose hatten keinen so deutlichen Einfluss. In *C. glutamicum*  $\Delta ptsG$  pEKEx2\_nagEBA war die Inhibierung der GlcNAc-Aufnahme durch Glucose wieder aufgehoben. Die Aufnahme von Glucose durch PTS<sup>Glc</sup> ist also für diese Inhibierung verantwortlich. Damit ließe sich die konsekutive Verstoffwechslung von Glucose und GlcNAc erklären, wobei der zugrunde liegende Inhibierungsmechanismus unbekannt ist. Entscheidend für die biotechnologische Anwendung ist jedoch, dass GlcNAc komplett und vergleichsweise schnell umgesetzt werden konnte, als genug Biomasse zu Verfügung stand. Zur Kultivierung des Lysin-Produktionstamms DM1868 pEKEx2\_nagEBA wurde daher ein Mischsubstrat aus 1,5 % Glucose und 1,5 % GlcNAc eingesetzt. Der direkte Vergleich zum Versuch mit 3 % Glucose zeigt, dass mit dem Mischsubstrat 30 % weniger Biomasse erzeugt wurde obwohl die eingesetzte Masse an Substrat die

**Tab. 3.3 Biomasse und Produktbildung in DM1868 pEKEx2\_nagEBA.** Die ermittelten Kennzahlen wurden aus dem Versuch in Abb. 3.23 ermittelt.

	■ 1,5 % Glc + 1,5 % GlcNAc	● 3 % Glucose	○ 1,5 % Glucose	▲ 3 % GlcNAc
OD <sub>max</sub>	21,1	31,8	15,7	1,96
L-Lysin [mM]	16,9	11,9	5,91	1,29
Y <sub>p/s</sub> [g <sub>Lys</sub> *g <sub>Substrat</sub> <sup>-1</sup> ]	0,08	0,05	0,05	0,06

gleiche war (Tab. 3.3, Abb. 3.23). Betrachtet man jedoch die Lysin-Konzentrationen bei 1,5 % Glucose, so führt die Zugabe von weiteren 1,5 % erwartungsgemäß zu einer Verdopplung des L-Lysins. Werden stattdessen 1,5 % GlcNAc hinzugefügt kommt es zu einer Verdreifachung. GlcNAc kann von DM1868 pEKEx2\_nagEBA zwar nur schlecht als Substrat für das Wachstum genutzt werden, jedoch sind höhere Produktausbeuten möglich. Für die Bildung von Biomasse muss also ein zusätzliches Substrat eingesetzt werden.

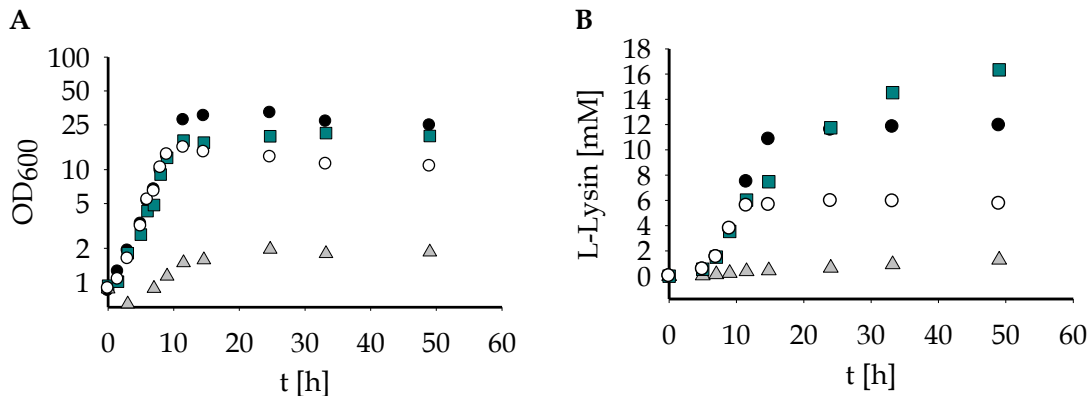


Abb. 3.23 Wachstum (A) und L-Lysinproduktion (B) von *C. glutamicum* DM1868 pEKEx2\_nagEBA. Die Kultivierung erfolgte in CGXII Medium mit 3 % Glucose (●), 1,5 % Glucose (○), 3 % GlcNAc (▲) und 1,5 % Glucose + 1,5 % GlcNAc (■).

### 3.3 Der Regulator NanR in *C. glutamicum*

#### 3.3.1 Identifizierung des Regulators der nag-Gene

Durch die Punktmutation im 5'UTR des *nagAB-scrB*-Operons wurde die Transkription der entsprechenden Gene in der M4-Mutante erhöht. Offenbar ist durch die Mutation ein regulatorischer Bereich betroffen, der in *C. glutamicum* Wildtyp die Genexpression reprimiert. Möglich wäre z.B. die Bindestelle eines Regulatorproteins oder der Promotor des Operons selbst.

In *E. coli* ist die Regulation der *nag*-Gene gut untersucht. NagC ist in diesem Beispiel der Repressor der divergierenden Operone *nagBACD* und *nagE* (Plumbridge, 1991). Der Vergleich von NagC aus *E. coli* mit dem translatierten Genom von *C. glutamicum* mittels BLAST (Altschul *et al.*, 1990) ergab zwei nennenswerte Treffer. Zum einen das Gen *cg2399* (*glk*), welches die ATP-abhängige Glucosekinase kodiert und zum anderen *cg2932*, welches als Transkriptionsregulator der ROK Familie bzw. Zuckerkinase annotiert ist. Da NagC aus *E. coli* ebenfalls zu Familie der ROK Regulatoren gerechnet wird, ist die hohe Ähnlichkeit zu Zuckerkinasen nicht

überraschend. Im Falle von *glk* kann jedoch ausgeschlossen werden, dass es sich um den Regulator der *nag*-Gene handelt. Das Protein verfügt nicht über eine DNA-Bindedomäne und wurde hinsichtlich seiner Funktion als Glucosekinase bereits charakterisiert (Park *et al.*, 2000). Bei *cg2932* konnte ebenfalls keine DNA-Bindedomäne identifiziert werden, allerdings ist die Lokalisation des Gens interessant (Abb. 3.24). Es befindet sich in unmittelbarer Nähe zu den *nag*-Genen, in einem Bereich, der Gene des Neuraminsäure-Katabolismus kodiert (*nan*-Gene).

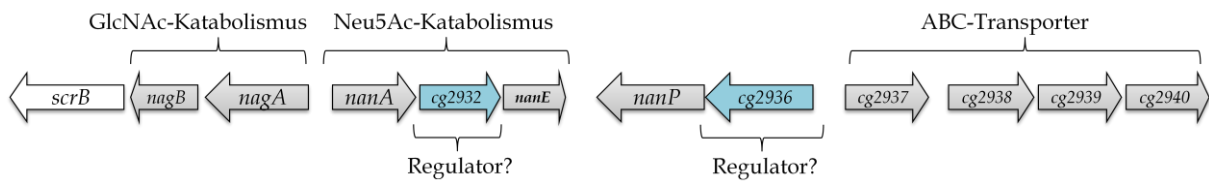


Abb. 3.24 Lokalisation von *cg2932* und *cg2936* im Genom von *C. glutamicum*.

Um zu überprüfen, ob eine regulatorische Funktion von *cg2932* auf die Stoffwechslung von Glucosamin ausgeht, wurde das Gen deletiert. Weiterhin wurde es in *C. glutamicum* WT mit dem Vektor pEKEx2\_*cg2932* überexprimiert. Da im *nagAB-scrB* Operon neben den *nag*-Genen auch das für die Saccharoseverwertung essentielle Gen *scrB* kodiert ist, wurden im Wachstumsversuch Glucose, Glucosamin und Saccharose als Kohlenstoffquellen verwendet (Abb. 3.25). Dabei hat sich gezeigt, dass weder die Deletion von *cg2932* noch dessen Überexpression einen Einfluss auf das Wachstum haben. Mit allen drei verwendeten Kohlenstoffquellen wurden die gleichen Wachstumsraten erzielt, wie beim Wildtyp ( $\mu = 0,33 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$ ). Zusammen mit dem fehlenden DNA-Bindemotiv kann somit ein regulatorischer Einfluss von

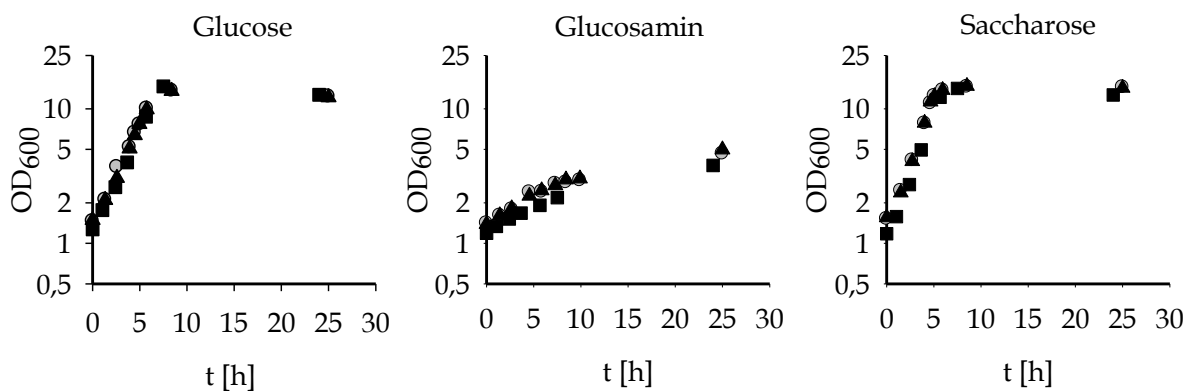


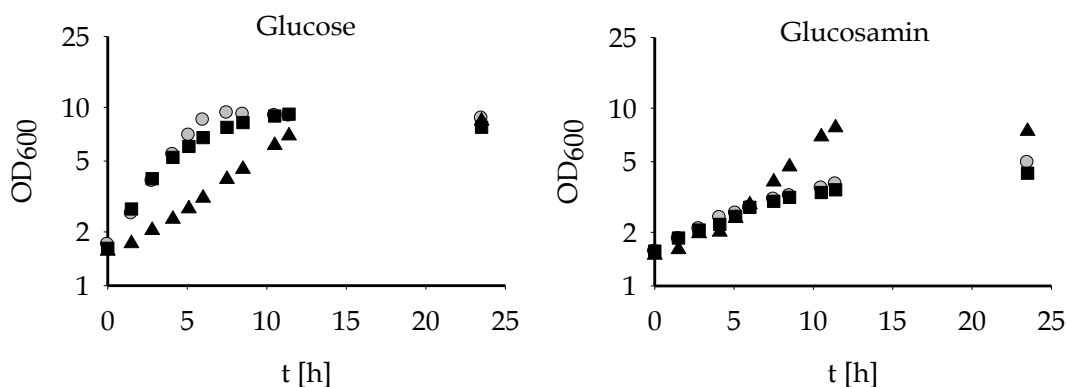
Abb. 3.25 Wachstum der  $\Delta$ *cg2932*-Mutante. Die Kultivierung erfolgt in CGXII Medium mit 1 % des jeweiligen Substrates. ● *C. glutamicum* ATCC 13032, ▲ *C. glutamicum*  $\Delta$ *cg2932*, ■ *C. glutamicum* pEKEx2\_*cg2932*

*cg2932* auf die Expression des *nagAB-scrB*-Operons ausgeschlossen werden. Durch den Proteinsequenz-Vergleich mit NagC aus *E. coli* konnte der gesuchte Regulator also nicht identifiziert werden.

Ein weiterer interessanter Kandidat für einen Regulator konnte aufgrund der Annotationen des *nag/nan*-Genclusters ermittelt werden. Wie bereits in Abb. 3.24 zu erkennen war, liegen die Gene des Neuraminsäure-Katabolismus in unmittelbarer Nähe zu den *nag*-Genen. Da letztere auch für den Abbau von Neuraminsäure benötigt werden, ist ein regulatorischer Zusammenhang wahrscheinlich. Das Gen *cg2936* ist als GntR Regulator annotiert (Abb. 3.24) und befindet sich direkt neben den Genen des ABC-Importers der Neuraminsäure, welche zusammen mit den Genen aus Abb. 3.24 das *nag/nan*-Gencluster bilden. Weiterhin hat *cg2936* eine Ähnlichkeit von 44 % zum Regulator NanR aus *E. coli*, welcher ebenfalls zur GntR Familie gehört. Daher wird *cg2936* im Folgenden *nanR* genannt.

### 3.3.2 Charakterisierung der Deletionsmutante *C. glutamicum* $\Delta nanR$

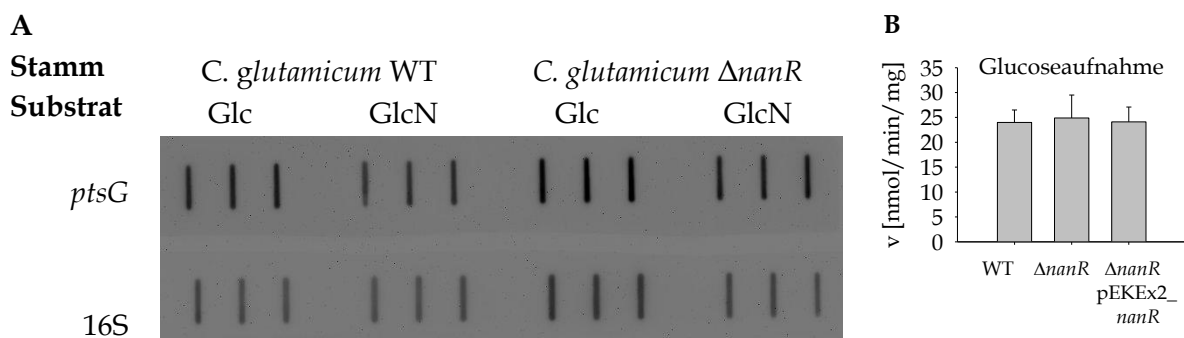
Zur phänotypischen Charakterisierung von *C. glutamicum*  $\Delta nanR$  wurden zunächst Wachstumsexperimente durchgeführt (Abb. 3.26). Wurde Glucosamin als Substrat verwendet, konnte im Vergleich zum Wildtyp ( $\mu = 0,12 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ ) eine Erhöhung der Wachstumsrate auf  $\mu = 0,19 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$  beobachtet werden. Durch die Überexpression von *nanR* in *C. glutamicum*  $\Delta nanR$  pEKE<sub>x2</sub>*\_nanR* wurde der Phänotyp der Deletionsmutante komplementiert und die gleiche Wachstumsrate ( $\mu = 0,11 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ ) wie beim Wildtyp erzielt. NanR wirkt offenbar als Repressor, da in dessen Abwesenheit die Verstoffwechslung von Glucosamin beschleunigt ist. Wird Glucose als Kohlenstoffquelle verwendet, so führt die Deletion von *nanR* zu einer Abnahme der



**Abb. 3.26 Wachstum der  $\Delta nanR$ -Mutante.** Die Kultivierung erfolgt in CGXII Medium mit 1 % des jeweiligen Substrates. ● *C. glutamicum* WT, ▲ *C. glutamicum*  $\Delta nanR$ , ■ *C. glutamicum* pEKE<sub>x2</sub>*\_nanR*

Wachstumsrate ( $\mu = 0,17 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ ) um ca. 50 % im Vergleich zum Wildtyp ( $0,34 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ ). Auch dieser Effekt konnte durch die Expression von *nanR* komplementiert werden.

Beim Wachstum von *C. glutamicum*  $\Delta nanR$  auf anderen Substraten wie Saccharose, Maltose, Fructose oder Komplexmedien konnte keine veränderte Wachstumsrate im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden. Dies ist ein Hinweis auf einen spezifischen Einfluss der *nanR*-Deletion auf die Glucoseverwertung. Welcher könnte das sein? Da die oben genannten Substrate meist direkt in den Zentralstoffwechsel gelangen und zum Teil auch Glucose oder Glucose-6-phosphat als Zwischenprodukt haben, blieb aus rationalen Überlegungen nur das Glucoseaufnahmesystem  $PTS^{Glc}$ . Mittels Northern Blot wurde untersucht, ob die Deletion von *nanR* einen Einfluss auf die Transkription von *ptsG* hat (Abb. 3.27A). Dabei konnte allerdings kein wesentlicher Unterschied zwischen *C. glutamicum* Wildtyp und *C. glutamicum*  $\Delta nanR$  ermittelt werden, der das schlechtere Wachstum mit Glucose erklärt. Die Intensität der nachgewiesenen *ptsG*-RNA ist bei Wachstum mit Glucosamin geringfügig niedriger als mit Glucose. Jedoch ist unabhängig vom eingesetzten Substrat kein Unterschied zwischen beiden Stämmen erkennbar. Zudem wurde untersucht, ob die Glucoseaufnahme in *C. glutamicum*  $\Delta nanR$  auf funktioneller Ebene inhibiert wird (Abb. 3.27B). Die Aufnahmemessungen in dieser Mutante ergaben jedoch keine veränderten Raten im Vergleich zum Wildtyp. Auch bei der Überexpression von *nanR* in *C. glutamicum*  $\Delta nanR$  wurden gleich hohe Aufnahmeraten für Glucose ermittelt ( $v = 24,9 \pm 4,6 \text{ nmol} \cdot \text{mg}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ). Somit konnte kein Einfluss der Deletion von *nanR* auf die Transkription von *ptsG* und auf die Glucoseaufnahme im Allgemeinen nachgewiesen werden.

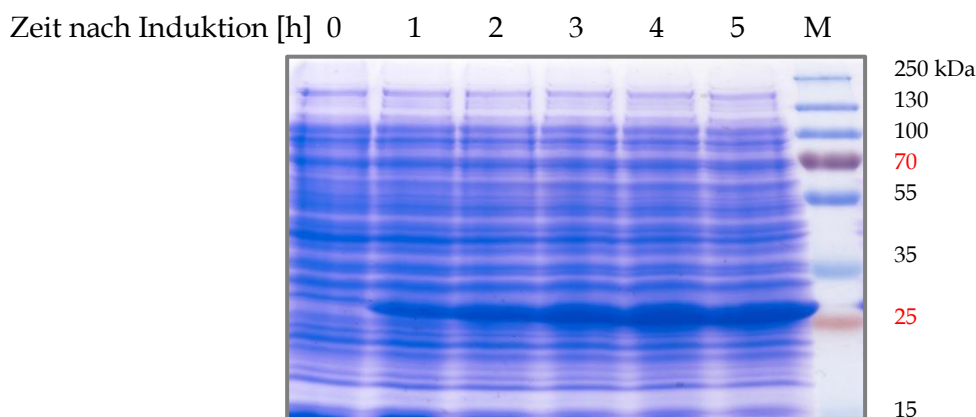


**Abb. 3.27 Einfluss der *nanR*-Deletion auf *ptsG*.** (A) Northern Blot von *ptsG*. Als RNA-Sonden wurde eine *ptsG*-spezifische und eine Sonde für die 16S RNA als Kontrolle bzw. zur Normalisierung der Ergebnisse verwendet. Gezeigt sind jeweils drei RNA-Proben aus *C. glutamicum* WT oder  $\Delta nanR$ , die mit Glucose oder Glucosamin als einziger Kohlenstoffquelle kultiviert wurden. (B) Messung der Aufnahme von Radioaktiv markierter Glucose (50  $\mu\text{M}$ ). Die untersuchten Stämme wurden mit Glucose als einziger Kohlenstoffquelle kultiviert.

Um zu ermitteln, von welchen Genen die Transkription in der  $\Delta nanR$ -Mutante dereguliert ist, wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Volker Wendisch (Universität Bielefeld) ein Microarray erstellt. Dabei wurde die differenzielle Genexpression von *C. glutamicum* WT und *C. glutamicum*  $\Delta nanR$  bei Wachstum in LB-Medium gemessen (Anhang Tab. 7.2). Neben dem bereits erwarteten *nagAB-scrB*-Operon (*cg2927-29*) sind in der  $\Delta nanR$ -Mutante auch die Gene des *nan*-Clusters (*cg2931-40*) deutlich höher exprimiert. Die Transkripte wurden 10- bis 200fach häufiger in *C. glutamicum*  $\Delta nanR$  nachgewiesen als im Wildtyp. Somit sind alle Gene, die den Abbau der Aminosäuren Glucosamin, N-Acetylglucosamin und Neuraminsäure katalysieren, betroffen. Weiterhin ist die Expression beider Operone des Propionat-Abbaus (*cg0759-62* und *cg0796-98*) erhöht. Deutlich reduziert ist die Expression von Genen des Trehalose-Aufnahmesystems TUS (*cg0830-32*) sowie der Gene *cg0811* und *cg0812*, die an der Fettsäuresynthese beteiligt sind. Aus diesen und weiteren deregulierten Genen ließ sich jedoch kein Kandidat ermitteln, der für das schlechte Wachstum von *C. glutmaicum*  $\Delta nanR$  mit Glucose als einziger Kohlenstoffquelle verantwortlich ist. Der mit Abstand stärkste Einfluss der *nanR*-Deletion ist für die Expression der *nag*- und *nan*-Gene zu konstatieren. Diese stehen vermutlich unter der direkten Kontrolle von NanR.

### 3.3.3 Reinigung des Proteins NanR

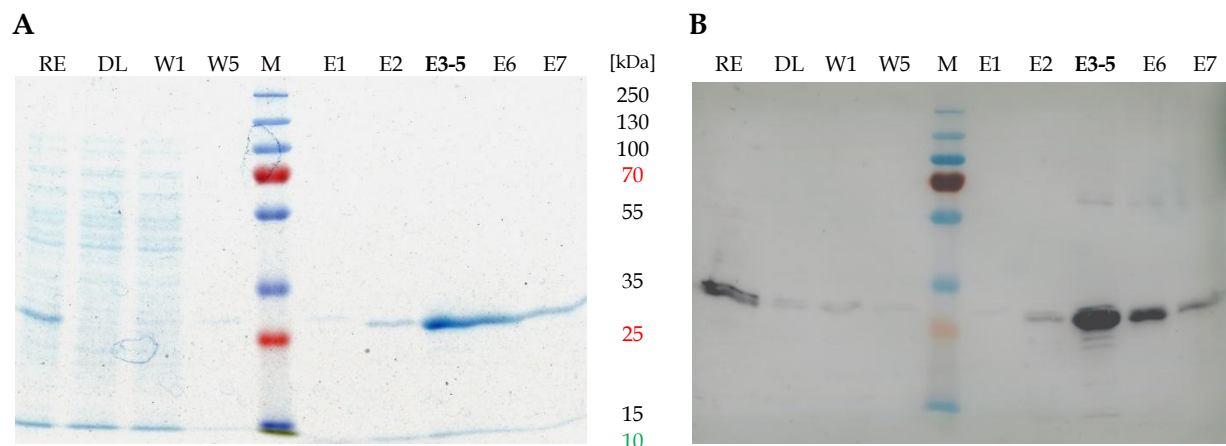
Zur Durchführung proteinbiochemischer Untersuchungen an NanR musste das Protein zunächst gereinigt werden. Dazu wurde das entsprechende Gen in den Expressionsvektor pASK\_IBA3 kloniert, welcher einen C-terminalen Strep-Tag vermittelt. Das Protein wurde rekombinant in *E. coli* DH5 $\alpha$  überexprimiert. Im ersten



**Abb. 3.28 Rekombinante Überexpression von *nanR*.** Jede Stunde nach Induktion von *E. coli* pASK\_IBA3\_*nanR* wurden Proben von die SDS-Gelelektrophorese genommen.

Schritt wurde untersucht, ob die Expression überhaupt erfolgreich war und welcher Zeitpunkt für die Zellernte am geeignetsten ist (Abb. 3.28). Auf dem SDS-Gel ist bereits eine Stunde nach der Induktion mit Anhydrotetracyclin war eine deutliche Bande zwischen 25 kDa und 35 kDa zu erkennen. Aus der Primärstruktur des mit einem Strep-Tag versehenen NanR lässt sich ein Molekulargewicht von 29,39 kDa berechnen. Somit kann die Bande NanR zugerechnet werden. Nach 4 h ist diese Bande am stärksten ausgeprägt, so dass eine weitere Kultivierung nicht zur Steigerung der Proteinausbeute führen würde.

Die eigentliche Reinigung des Proteins erfolgte mittels einer Strep-Tactin®-Säule. Der Erfolg der Proteinreinigung lässt sich anhand der Reinigungsfraktionen ablesen (Abb. 3.29).

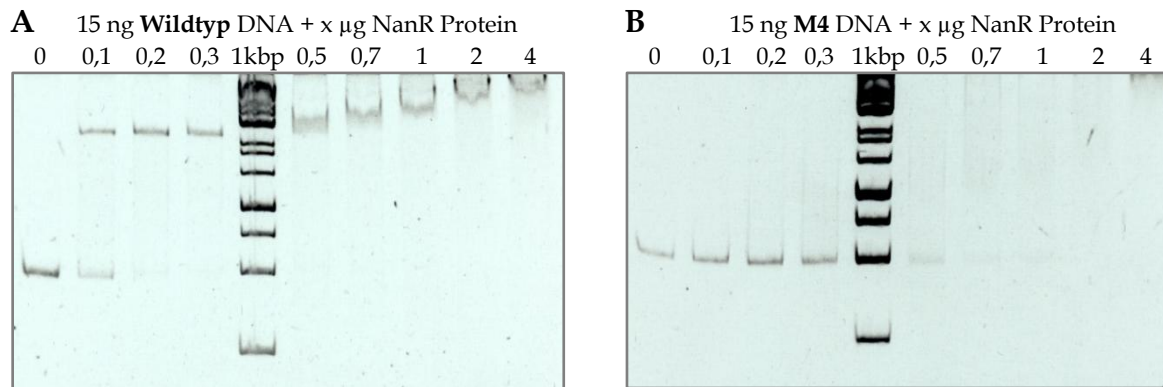


**Abb. 3.29 Reinigung von NanR.** (A) SDS-Gel und (B) Western-Blot von Fraktionen der Strep-Tactin®-Reinigung von NanR mit Strep-Antikörper. Legende: RE: Rohextrakt, DL: Durchlauf, W1: erste Waschfraktion, W5: letzte Waschfraktion, M: Marker (PageRuler Plus Prestained, Thermo Scientific), E: Elutionsfraktionen.

Das an die Säule gebundene Protein hat die erwartete Größe von ~ 30 kDa. Im Western Blot wird die Identität des gereinigten Proteins durch den Nachweis des Strep-Tags außerdem bestätigt. Die vereinigten Elutionsfraktionen E3 - E5 zeigen eine deutliche Anreicherung von NanR. Diese Fraktion wurde für die weiteren Untersuchungen verwendet.

### 3.3.4 Identifizierung von Bindestellen für NanR

Wie bereits gezeigt wurde, führt die Deletion von *nanR* zur besseren Umsetzung von Glucosamin (Abschnitt. 3.3.2). Dieser Phänotyp war auch in der M4-Mutante zu beobachten, die eine Punktmutation im Promotorbereich des *nagAB-scrB*-Operons hat (Abschnitt 3.1.3). Daher wurde zunächst untersucht, ob NanR an diesen Bereich bindet und damit die Transkription von *nagAB-scrB* in *C. glutamicum* WT beeinflusst.

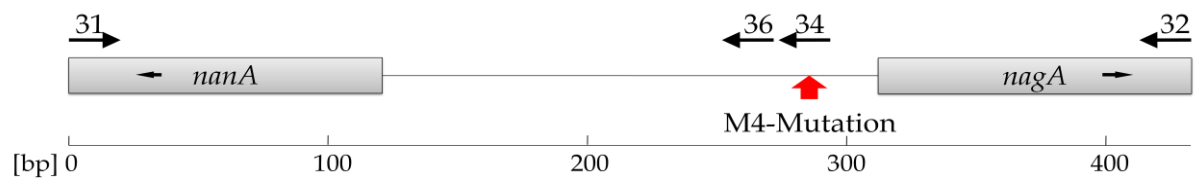


**Abb. 3.30 EMSA mit der DNA des *nagAB-scrB*-Promotorbereiches.** Die DNA wurde (A) aus *C. glutamicum* ATCC 13032 und (B) aus der M4-Mutante amplifiziert. Pro 10 µl wurden 15 ng DNA des *nagAB-scrB*-Promotorbereiches und steigende Mengen an NanR (0 µg- 4 µg) eingesetzt.

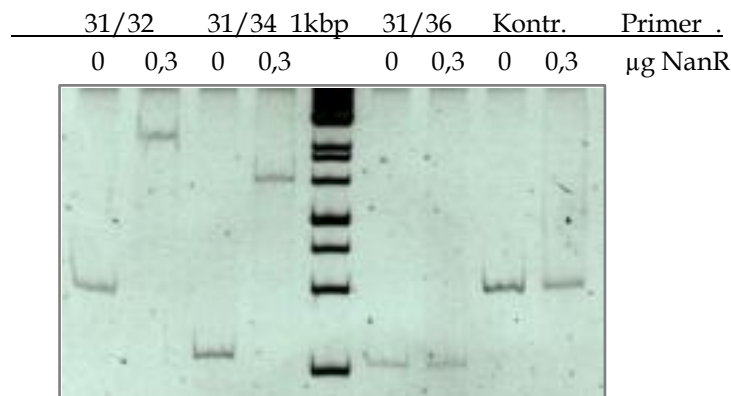
Für den *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) wurde der *nagAB-scrB*-Promotorbereich von *C. glutamicum* WT und der M4-Mutante mittels PCR amplifiziert. Steigende Mengen an gereinigtem NanR führten bei der DNA des Wildtyps zu einem deutlichen *Shift* der DNA-Bande (Abb. 3.30A). Bei der DNA der M4-Mutante konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden (Abb. 3.30B). NanR interagiert offenbar nur mit der DNA vom *nagAB-scrB*-Promotor des Wildtyps.

In einem weiteren Versuch wurde die genaue Bindestelle von NanR durch Auswahl geeigneter Primer weiter eingengt (Abb. 3.31). Bei den drei PCR-Ansätzen wurde immer der gleiche *fwd*-Primer (31) genutzt aber unterschiedliche *rev*-Primer (32, 34 oder 36). Als *Template* diente die DNA des Wildtyps. Somit wurden für den folgenden EMSA (Abb. 3.32) zwei PCR-Produkte verwendet, die den Locus der M4-Mutation enthielten (31+32 und 31+34) und ein PCR-Produkt, dass diesen Bereich nicht enthielt (31+36).





**Abb. 3.31 Schema von Primerbindestellen für den EMSA mit NanR.** Für die Amplifikation von Wildtyp-DNA wurden drei PCRs durchgeführt, wobei der Primer 31 jeweils der Forward-Primer war. Die Primer 32, 34 bzw. 36 waren die Reverse-Primer. Die in der M4-Mutante identifizierte Mutation ist mit einem roten Pfeil gekennzeichnet.



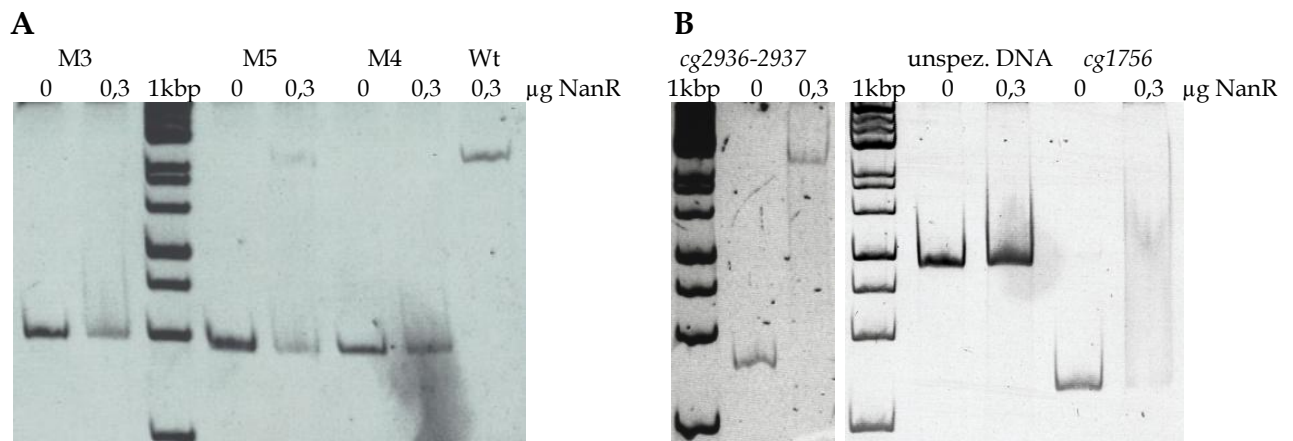
**Abb. 3.32 EMSA von Wildtyp-DNA.** Zur Amplifikation der DNA des Wildtyps wurden die Primerkombinationen aus (Abb. 3.31) verwendet. Als Kontrolle diente M4-DNA.

Der *Shift* der Wildtyp-DNA erfolgt nur dann, wenn der Locus der M4-Mutation im PCR-Produkt enthalten ist. Fehlt dieser Bereich, so kommt es, genau wie bei der M4-DNA, nicht zum *Shift*. Somit lässt sich die Bindestelle von NanR auf diesen 18 bp umfassenden Bereich festlegen (Tab. 3.4). Beim Wachstum mit Glucosamin, konnten neben der Spontanmutante M4 auch weitere Spontanmutanten isoliert werden, die ebenfalls Punktmutationen in Bereich der NanR-Bindestelle des *nagAB-scrB*-Promotors aufwiesen (Tab. 3.4). Der EMSA mit den entsprechenden PCR-Produkten zeigte, dass auch diese Mutationen zum Verlust bzw. zu einer wesentlich schwächeren Bindung von NanR an die DNA zur Folge hatten (Abb. 3.33A). Anhand der 18 bp umfassenden Nukleotidsequenz der NanR-Bindestelle wurden über eine nicht stringente BLAST-Suche weitere Bindestellen in Genom von *C. glutamicum* WT ermittelt. Zwei davon (BS1 und BS2) befinden sich zwischen den Genen *cg2936* (*nanR*) und *cg2937* (Importer der Neuraminsäure) und eine weitere (BS3) befindet sich unmittelbar vor dem Gen *cg1756* (*nanH*), welches als putative Sialidase annotiert ist (Tab. 3.4).

**Tab. 3.4 Sequenzmotive für (putative) NanR-Bindestellen.** Die obere Sequenz zeigt die Bindestelle von NanR im *nagAB-scrB*-Promotorbereich. Darunter sind drei entsprechende Sequenzen von Spontanmutanten, die beim Wachstum mit Glucosamin auftraten. Mittels nicht stringenter BLAST-Suche konnten im Promotor-Bereich der drei unteren Gene, weitere Sequenzen mit hoher Ähnlichkeit zur *nagAB-scrB*-Bindestelle gefunden werden. Rot markiert sind Nukleotide, die von der *nagAB-scrB*-Sequenz des Wildtyps abweichen.

Bindestelle	Sequenz	Bindung?
<i>nagAB-scrB</i>	TAG ACA TAA GAC ATC ATA CGT	Ja
Spontanmutationen in <i>nagAB-scrB</i>		
M3	TAG ACA TAA G <b>CC</b> ATC ATA CGT	Nein
M4	TAG ACA TAA CAC <b>AGC</b> ATA CGT	Nein
M5	TAG ACA TAA <b>AAC</b> ATC ATA CGT	schwach
putative Bindestellen (BS)		
<i>cg2936</i> - BS1	<b>TTT CCA TCA GAC CCC ATC CGT</b>	Nein
<i>cg2937</i> - BS2	<b>TAT ACA TCA GAC ATC AGA CGT</b>	Ja
<i>cg1756</i> - BS3	TAG ACA <b>TCT</b> GAC ATC ATG <b>CTT</b>	schwach

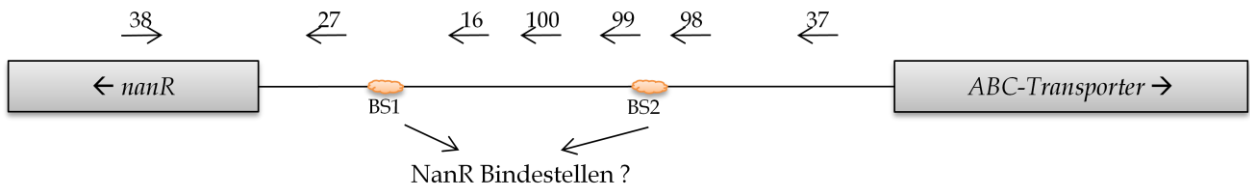
Der EMSA zeigt, dass NanR an den DNA-Bereich zwischen *cg2936*-*2397* bindet (Abb. 3.33B). Nur eine schwache Wechselwirkung ist für den Promotorbereich von *cg1756* festzustellen. Wird unspezifische DNA eingesetzt, die nicht die Sequenz des Bindemotivs enthält, kommt es nicht zur Bindung.



**Abb. 3.33 EMSA mit (A) *nagAB-scrB*-Promotorbereich der Spontanmutanten und (B) dem Promotorbereich weiterer Kandidaten für die NanR-Bindung.** Das Konstrukt *cg2936-2397* umfasst den gesamten intergenen Bereich um somit auch beide putative Bindestellen BS1 und BS2. *Cg1756* enthält die putative Bindestelle BS3. Negativkontrolle ist die unspezifische DNA, die keine Sequenz enthält, die dem Bindemotiv ähnelt.

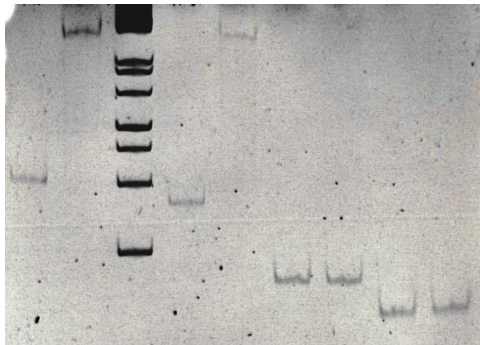
Um die genauen Bindestellen zwischen *cg2936-2397* zu verifizieren, wurden wie schon im Beispiel der *nagAB-scrB*-Bindestelle, geeignete Primerkombinationen für die PCR-Produkte des EMSAs ausgewählt (Abb. 3.34). Dabei konnte ermittelt werden, dass die putative Bindestelle BS1 nicht mit NanR interagiert. Die Primerkombination 16+38 enthält zwar die entsprechende Bindestelle, allerdings kommt es nicht zum *Shift* des PCR-Produktes durch Zugabe von NanR (Abb. 3.34B). Im Gegensatz dazu konnte die Bindestelle BS2 durch den EMSA bestätigt werden. Ein *Shift* durch NanR konnte nur für jene PCR-Produkte beobachtet werden, die die Bindestelle BS2 enthielten (Abb. 3.34C).

**A**



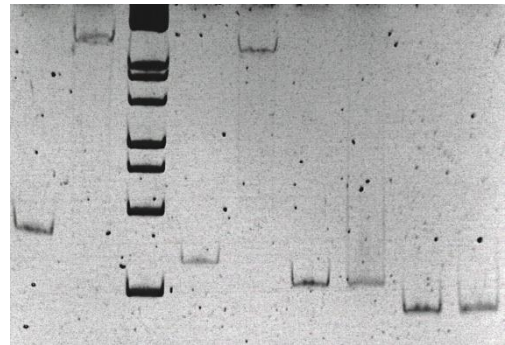
**B**

PCR	<i>nagAB-scrB</i>	37/38	16/38	27/38
NanR [ $\mu$ g]	0 0,3 1kbp	0 0,3	0 0,3	0 0,3



**C**

37/38	98/38	99/38	100/38
0 0,3 1kbp	0 0,3	0 0,3	0 0,3

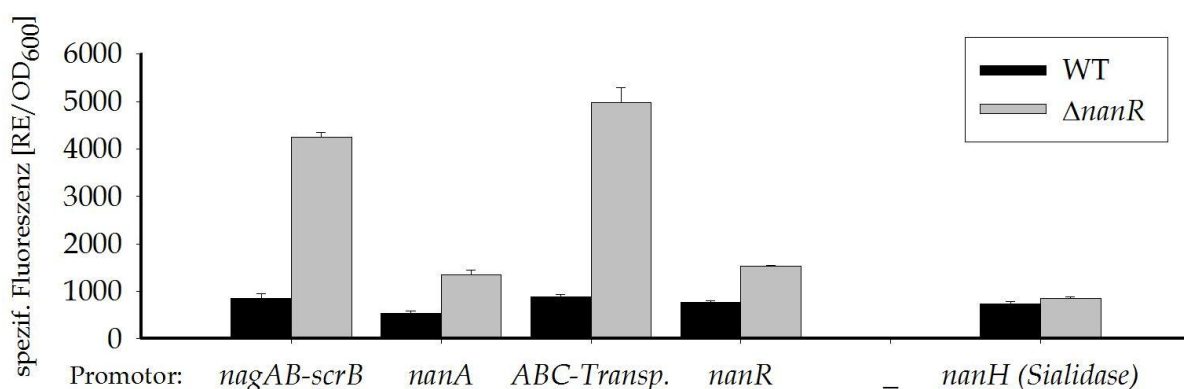


**Abb. 3.34 Ermittlung der NanR-Bindestellen zw. *cg2936* (*nanR*) und *cg2937* (Importer).** (A) Schema für Primerbindestellen, die zur der Amplifikation der DNA für die folgenden EMSAs genutzt wurden. Eingezeichnet sind die Positionen der putativen Bindestellen von NanR. (B) EMSA zur Untersuchung der NanR-Bindung an die Bindestelle BS1. Der *nagAB-scrB*-Promotorbereich wurde als Positivkontrolle mitgeführt. (C) EMSA zur Untersuchung der NanR-Bindung an die Bindestelle BS2.

### 3.3.5 Promotoraktivitäten von NanR-regulierten Genen

Die Aktivität von NanR konnte durch die spezifische Bindung an zwei Regionen des Genoms von *C. glutamicum* gezeigt werden. Beide befinden sich im *nag/nan*-Cluster jeweils zwischen zwei divergierenden Operons (vgl. Abb. 3.31 und Abb. 3.34). Weiterhin wurde eine Bindestelle im Bereich von *nanH* (putative Sialidase) ermittelt. Das Gen befindet sich nicht im *nag/nan*-Cluster und die Bindung von NanR war nur sehr schwach. Ob die Transkription dieser Gene durch NanR beeinflusst wird, wurde mit Hilfe des Reportergens GFP ermittelt. Dazu wurde der Promotorbereich inklusive der Bindestellen der fünf Gene vor das promotorlose *gfp* kloniert und die Fluoreszenz von GFP in *C. glutamicum* WT und in *C. glutamicum*  $\Delta nanR$  gemessen (Abb. 3.35). Da ein Vergleich der spezifischen (biomassebezogenen) Fluoreszenz nur sinnvoll ist, wenn die Zellen ähnlich hohe Wachstumsraten haben, wurden in der Hauptkultur Fructose als Kohlenstoffquelle verwendet.

Die Deletion von *nanR* beeinflusst die Transkription aller Operone des *nag/nan*-Clusters. Der stärkste Einfluss ist für das *nagAB-scrB*-Operon und die Gene des Neuraminsäureimporters zu konstatieren. In beiden Fällen ist die spezifische Fluoreszenz um den Faktor 5 erhöht, wenn *nanR* deletiert wurde. Auch die Gene, die in der Gegenrichtung kodiert sind (*nanA* und *nanR*) weisen in *C. glutamicum*  $\Delta nanR$  eine höhere Transkription auf. Die spezifische Fluoreszenz ist ca. zweimal stärker als die im Wildtyp. Kein Einfluss war auf die Transkription von *nanH* nachzuweisen, da im Wildtyp und in *C. glutamicum*  $\Delta nanR$  die gleichen Werte gemessen wurden. Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass NanR das Gen-Cluster *nag/nan* als Repressor reguliert.

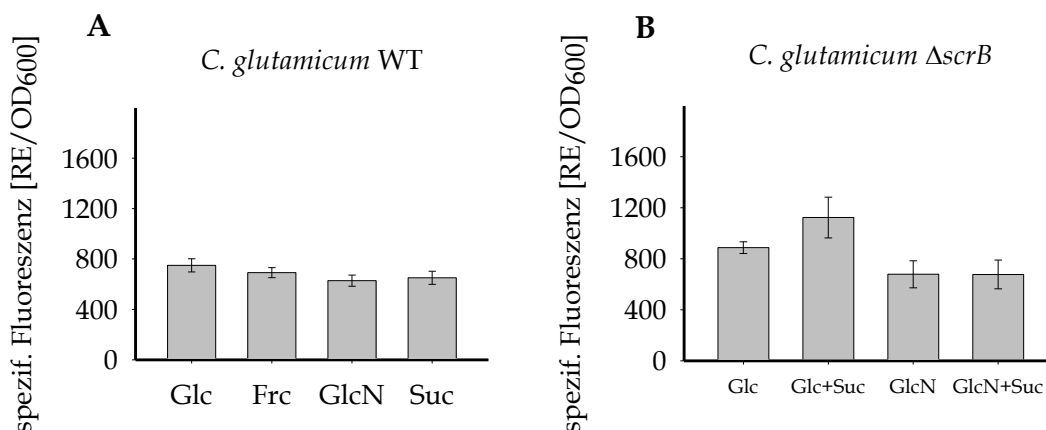


**Abb. 3.35 Promotoraktivitäten von Genen mit (putativen) NanR-Bindestellen im Promotorbereich.** *C. glutamicum* WT und *C. glutamicum*  $\Delta nanR$  mit den pEPR1-*gfp* Konstrukten transformiert, bei denen die Expression von *gfp* unter der Kontrolle der angegebenen Promotorbereiche stand. Die Zellen wurden in CGXII Medium mit 1 % Fructose kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase wurde die Fluoreszenz gemessen.

### 3.3.6 Identifizierung der Effektoren von NanR

Als Repressor bindet NanR an regulatorische Elemente der DNA und verhindert dadurch die Transkription der nachfolgenden Gene. Diese Repression kann durch die Bindung von Effektoren an NanR aufgehoben werden. Bei der Suche nach Effektoren stand zunächst das *nagAB-scrB*-Operon im Mittelpunkt. Da Effektoren häufig Substrate der durch sie aktivierten Gene sind, kamen zunächst Glucosamin-6-phosphat (GlcN-6P), N-Acetylglucosamin-6-phosphat (GlcNAc-6P) und Saccharose-6-phosphat (Suc-6P) in Frage.

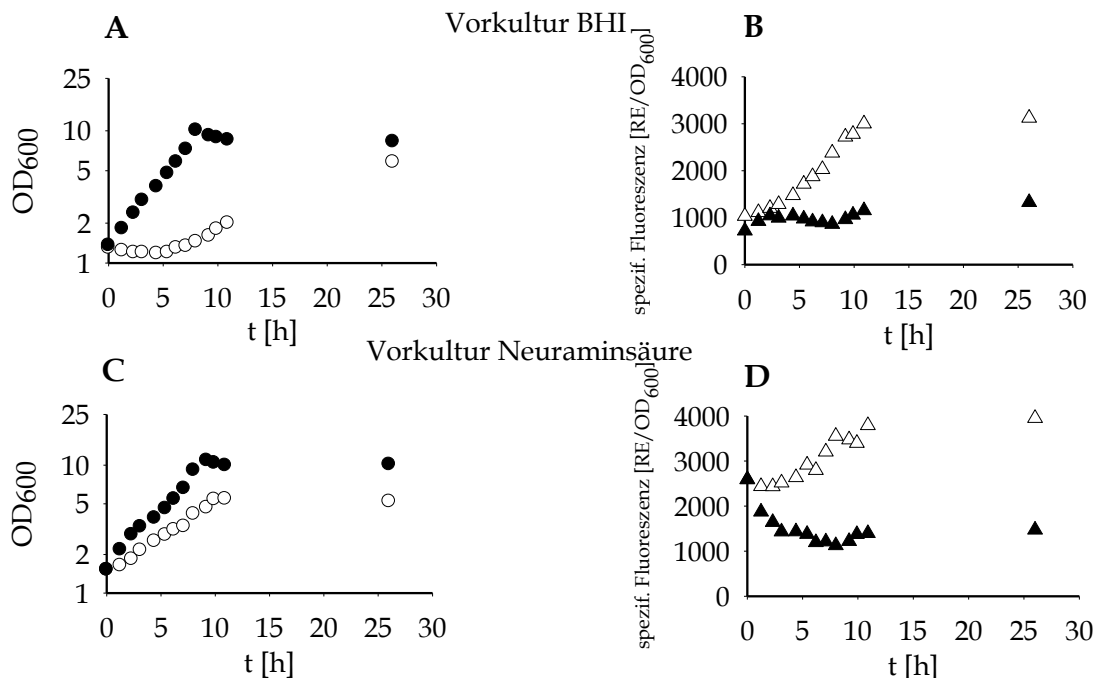
GlcN-6P und Suc-6P sind Intermediate, die direkt nach dem Import von Glucosamin bzw. Saccharose im Cytosol vorliegen. Die Kultivierung von *C. glutamicum* mit diesen Substraten führte allerdings nicht zu einer erhöhten Aktivität des *nagAB-scrB*-Promotors im Vergleich zu den Kontrollen mit Glucose oder Fructose. Die spezifische Fluoreszenz von GFP lag bei den vier Kohlenstoffquellen jeweils im Bereich von ca.  $750 \pm 50$  RE/OD<sub>600</sub> (Abb. 3.36A). Wenn GlcN-6P und Suc-6P sehr schnell umgesetzt werden, ist eine erhöhte Promotoraktivität auch nicht zu erwarten. Im Falle von Glucosamin ist allerdings bereits gezeigt worden, dass der Umsatz aufgrund der geringen NagB-Aktivität nur sehr langsam ist. Folglich kommt es zu Akkumulation von GlcN-6P. Da diese Akkumulation keinen Einfluss auf die Aktivität des Promotors hat, spricht das gegen GlcN-6P als Effektor von NanR. Im Falle von Saccharose ist die Wachstumsrate in Wildtyp sehr hoch, sodass eine Akkumulation von Suc-6P unwahrscheinlich ist. Daher wurde die Mutante *C. glutamicum*  $\Delta$ *scrB* verwendet, die Suc-6P nicht mehr umsetzen kann (Abb. 3.36B). Sie wächst daher auch nicht mit Saccharose als einziger Kohlenstoffquelle, so dass Glucose bzw. Glucosamin als Substrat zum Wachstum



**Abb. 3.36 Aktivität des *nagAB-scrB*-Promotors.** Gemessen wurde die Fluoreszenz von GFP, dessen Expression unter der Kontrolle des *nagAB-scrB*-Promotors stand. **(A)** *C. glutamicum* Wildtyp und **(B)** *C. glutamicum*  $\Delta$ *scrB* wurden in CGXII Medium mit jeweils 1 % des angegebenen Substrats kultiviert.

hinzugegeben wurden. Ein Vergleich der Aktivität des *nagAB-scrB*-Promotors in *C. glutamicum*  $\Delta scrB$  zeigt, dass die Zugabe von Saccharose im Falle von Glucosamin als Wachstumssubstrat keinen Einfluss hat. Hier ist allerdings zu berücksichtigen, dass die Zellen nur mit einer Wachstumsrate von  $0,1 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$  wuchsen (nicht dargestellt). Wird Glucose als Wachstumssubstrat verwendet ( $\mu = 0,31 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ ) führt die Zugabe von Saccharose in ebenfalls zum Sinken der Wachstumsrate ( $\mu = 0,09 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ ) und zu einer Erhöhung der Promotoraktivität um den Faktor 1,2. (vgl. Faktor 6 in *C. glutamicum*  $\Delta nanR$ , Abb. 3.35). Somit wird die Transkription des *nagAB-scrB*-Operons durch die Anwesenheit von Suc-6P nur geringfügig beeinflusst. Eine wesentliche Beteiligung von Suc-6P an der Regulation des *nagAB-scrB*-Operons kann ausgeschlossen werden. Die gemessenen Aktivitätsänderungen sind möglicherweise auch auf die unterschiedlichen Wachstumsraten zurückzuführen.

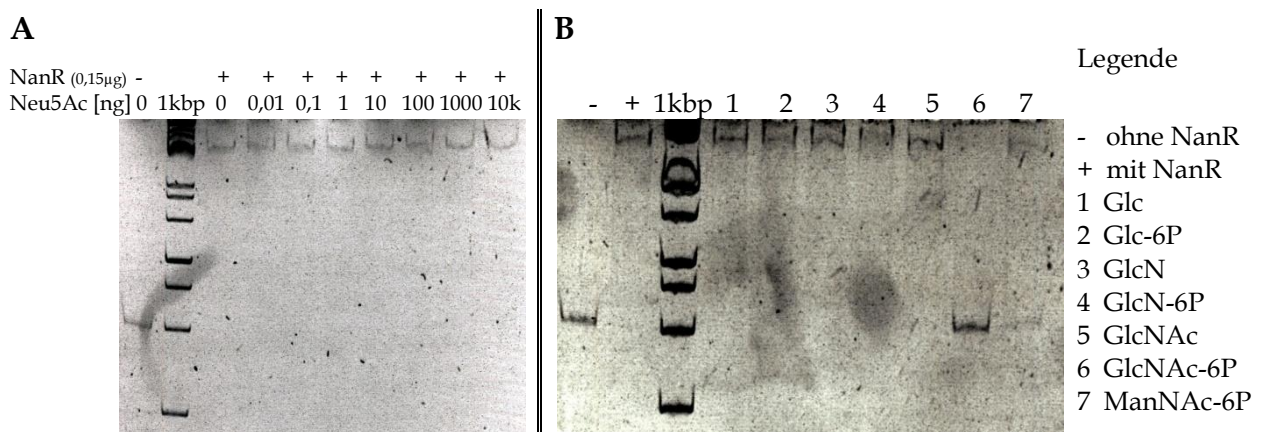
Ausgehend von den anderen Genen, die durch NanR reguliert werden, kamen als weitere Effektoren Abbauprodukte von Neuraminsäure in Frage. Neben den bereits genannten, GlcN-6P und GlcNAc-6P, zählen dazu auch N-Acetylmannosamin (ManNAc), N-Acetylmannosamin-6-phosphat (ManNAc-6P), Pyruvat und die Neuraminsäure selbst. Zunächst wurde untersucht, ob in *C. glutamicum* WT eine Induktion des *nagAB-scrB*-Operons hervorgerufen werden kann, wenn die Zellen auf Neuraminsäure (Neu5Ac) kultiviert werden (Abb. 3.37)



**Abb. 3.37** Wachstum (A, C) und Aktivität des *nagAB-scrB*-Promotors (B, D). *C. glutamicum* *pEPR1\_nagAB-scrB* in BHI-Medium (A, B) oder CGXII-Medium mit 0,3 % Neu5Ac (C, D) vorkultiviert. Die Hauptkultur erfolgte in CGXII-Medium mit 1 % Glucose (●, ▲) oder 0,3 % Neuraminsäure (○, △).

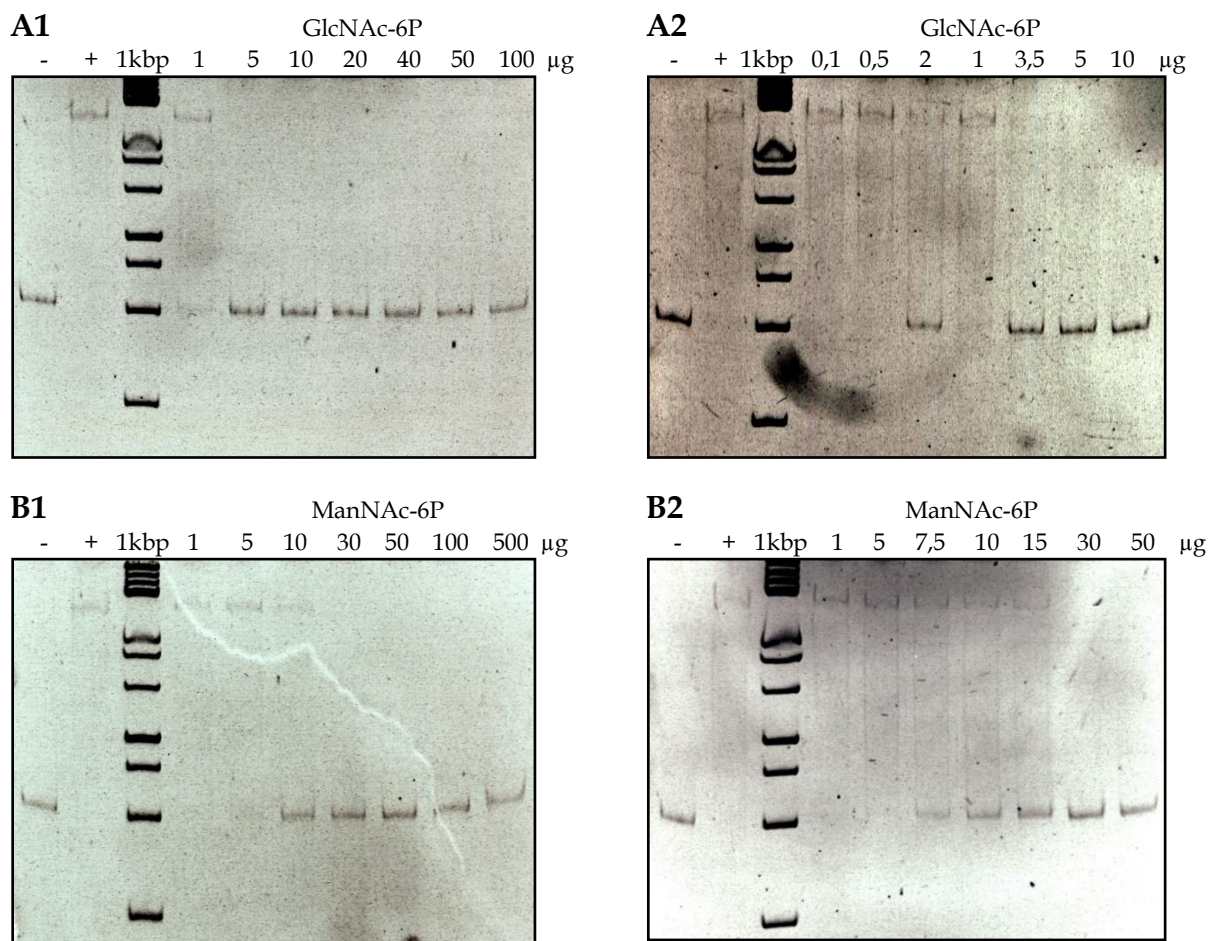
Die Kultivierung mit Neu5Ac als einziger Kohlenstoffquelle ist durch eine ca. fünfstündige *lag*-Phase gekennzeichnet (Abb. 3.37A). Danach beginnt das Wachstum mit einer Rate von  $0,13 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ . Wurden die Zellen mit Neu5Ac vorkultiviert tritt keine *lag*-Phase auf und die Wachstumsrate liegt bei  $0,14 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$  (Abb. 3.37C). Die Fluoreszenz von GFP, welches unter der Kontrolle des *nagAB-scrB*-Promotors steht, steigt bereits während der *lag*-Phase deutlich. Im Vergleich zu Zellen, die auf Glucose gewachsen sind, wird eine bis zu 3,5 fach höhere Fluoreszenz gemessen (Abb. 3.37B). Damit konnte die Aktivierung des *nagAB-scrB*-Operons im Wildtyp zum ersten Mal gezeigt werden. Die Neuraminsäure oder eines ihrer Abbauprodukte verursacht diese Aktivierung. Weiterhin zeigt der Versuch, dass Zellen, die auf Neu5Ac vorkultiviert wurden, nach dem Transfer auf Glucose wieder eine geringere Promotoraktivität aufweisen (Abb. 3.37D).

Mit einem EMSA sollte nun gezeigt werden, ob die möglichen Effektoren den *Shift* der DNA des *nagAB-scrB*-Promotors aufheben und somit die Bindung von NanR an diese DNA. In *E. coli* ist die Neuraminsäure der Effektor von NanR (Kalivoda *et al.*, 2003). In *C. glutamicum* jedoch wird das gereinigte NanR selbst bei einem 6.000fachen molaren Überschuss an Neu5Ac nicht von der DNA des *nagAB-scrB*-Promotors gelöst (Abb. 3.38A). Bei dem Abbauprodukt der Neuraminsäure, GlcNAc-6P, ist die Aufhebung des *Shifts* zu beobachten. Zu einem wesentlich geringen Ausmaß ist dies auch bei ManNAc-6P der Fall (Abb. 3.38B). Keinen Einfluss haben die Zuckerphosphate GlcN-6P und Glc-6P sowie die nicht phosphorylierten Monomere. Letztere sind zwar keine Zwischenprodukte des Neu5Ac-Abbaus, wurden aber aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit getestet.



**Abb. 3.38 EMSA mit Effektorkandidatien für NanR.** (A) Einfluss von Neu5Ac auf den *Shift* der DNA des *nagAB-scrB*-Promotors. (B) Einfluss der Abbauprodukte von Neu5Ac auf den *Shift*. Eingesetzt wurden 15 ng DNA des *nagAB-scrB*-Promotors, 0,3 µg gereinigtes NanR und jeweils 50 µg des Effektors im Gesamtansatz von 10 µl.

Zur Ermittlung des molaren Verhältnisses von Effektor zur NanR, welches nötig ist, um die Bindung von NanR an die DNA zu inhibieren, wurden EMSAs mit steigenden Konzentrationen des jeweiligen Effektors durchgeführt (Abb. 3.39). Dabei stellte sich heraus, dass NanR hat eine höhere Affinität zu GlcNAc-6P als zu ManNAc-6P. Bereits bei der Zugabe von 2 µg des Effektors ist zu erkennen, dass der DNA-Shift aufgehoben wird. Das entspricht einem ca. 600fachen molaren Überschuss an GlcNAc-6P gegenüber NanR. In Fall von ManNAc-6P kommt es dagegen erst bei einem 3.000fachen molaren Überschuss (10 µg) zur Aufhebung des Shifts.

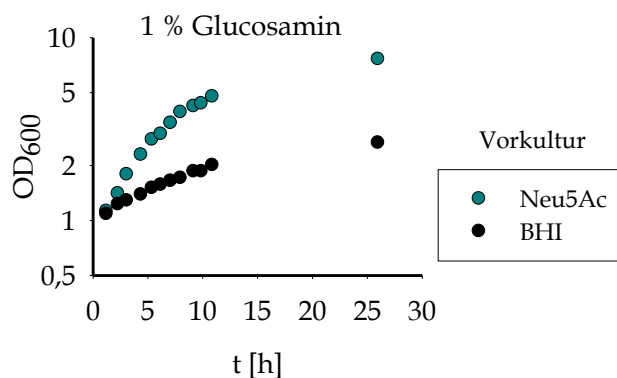


**Abb. 3.39 Ermittlung der molaren Verhältnisse von GlcNAc-6P und ManNAc-6P zu NanR.** Mit gleich bleibenden Mengen der *nagAB-scrB*-DNA (15 ng) und dem gereinigten NanR (0,3 µg) wurde die Bindung von NanR an die DNA mit steigenden Mengen an GlcNAc-6P (A1 und A2) und ManNAc-6P (B1 und B2) in 10 µl Ansätzen ermittelt.

Bisher konnte der Einfluss von GlcNAc-6P bzw. ManNAc-6P auf die Bindung von NanR an die DNA gezeigt werden, sowie auf die Promotoraktivität der durch NanR regulierten Gene. Um auch eine höhere Aktivität der regulierten Proteine nachzuweisen, wurde ein indirekter Ansatz durchgeführt. Dazu wurde untersucht,



welchen Einfluss die Vorkultivierung von *C. glutamicum* WT auf das Wachstum mit Glucosamin als einziger Kohlenstoffquelle hat. Glucosamin kann nur dann schnell umgesetzt werden, wenn die Aktivität der durch NanR regulierten Glucosamin-6P-Deaminase (NagB) erhöht ist (Abschnitt 3.1.4). Die Vorkultivierung des Wildtyps mit Neu5Ac als einziger Kohlenstoffquelle führte dazu, dass die Zellen auf Glucosamin eine Wachstumsrate von  $0,15 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$  erzielten (Abb. 3.40). Diese ist ca. 50 % höher als bei Zellen, die mit BHI vorkultiviert wurden ( $\mu = 0,10 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$ ). Die zuvor gezeigte Aktivierung des *nagAB-scrB*-Promotors durch die Kultivierung von *C. glutamicum* WT auf Neu5Ac ist offenbar für die höheren Wachstumsraten auf Glucosamin verantwortlich. Auch in *C. glutamicum*  $\Delta nanR$  konnte eine höhere *nagAB-scrB*-Promotoraktivität und eine höhere Wachstumsrate auf Glucosamin beobachtet werden. Dies war jedoch unabhängig von der Vorkultur (Abschnitt 3.3.2) Dadurch wird deutlich, dass NanR auch *in vivo* durch die von der Neuraminsäure abgeleiteten Effektoren inaktiviert wird. Dadurch kommt es zur stärkeren Expression des *nagAB-scrB*-Operons und, wie das verbesserte Wachstum mit Glucosamin zeigt, auch zur höheren Aktivität der katabolischen Enzyme.



**Abb. 3.40 Einfluss der Vorkultur auf das Wachstum mit Glucosamin.** *C. glutamicum* WT wurde in CGXII-Medium mit 0,3 % Neu5Ac bzw BHI-Medium vorkultiviert und anschließend in CGXII-Medium mit 1 % Glucosamin kultiviert.

### 3.3.7 Einfluss von NanR auf die Verstoffwechslung von Glucosamin

Die Deletion von *nanR* in *C. glutamicum* führt zu höheren Wachstumsraten, wenn Glucosamin als einzige Kohlenstoffquelle verwendet wird (Abschnitt 3.3.2). Daher ist *nanR* hinsichtlich der biotechnologischen Anwendung ein interessantes *Target* bei der Nutzung von Aminosukern. Am Beispiel des L-Lysin Produktionsstammes DM1868 wurde untersucht, ob die Deletion von *nanR* zum besseren Wachstum mit Glucosamin und zu einer effizienteren Produktbildung führt (Abb. 3.41).

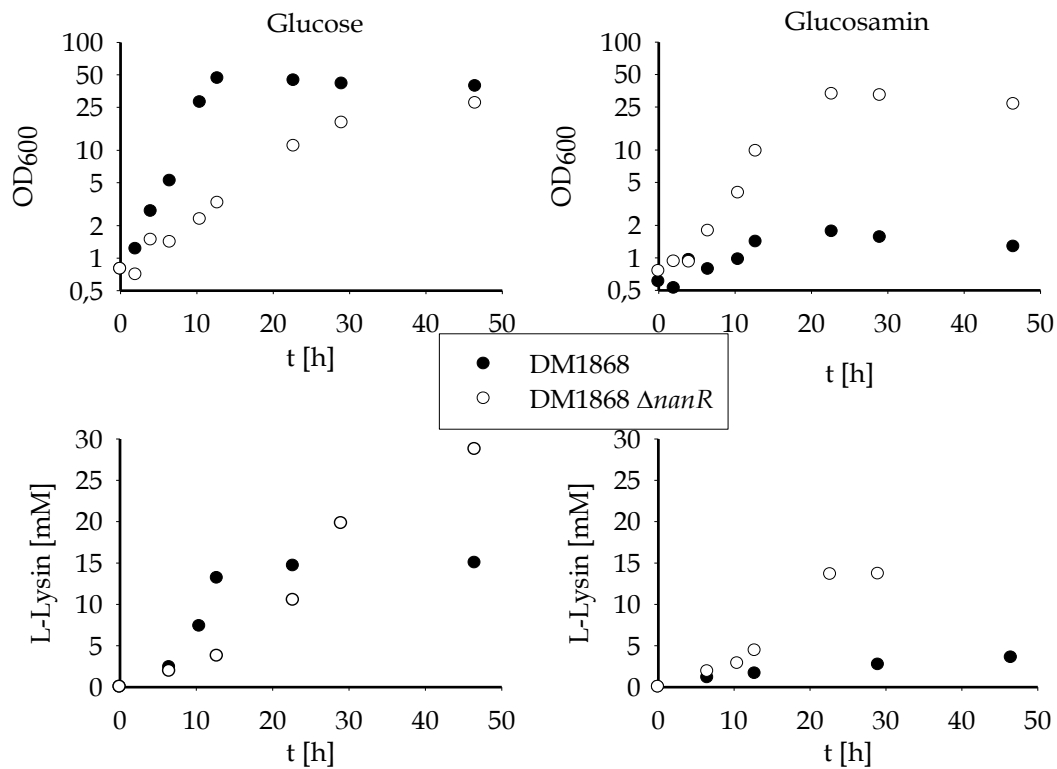
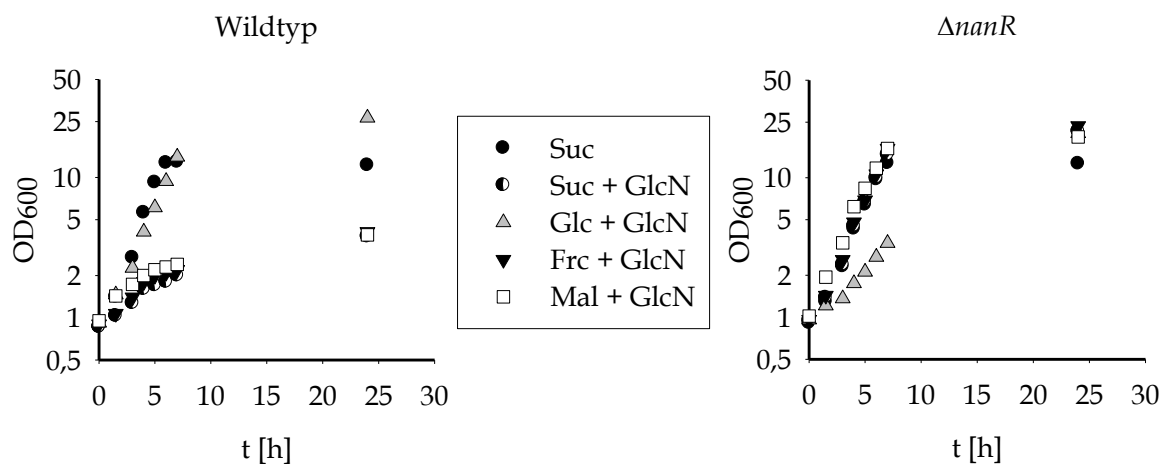


Abb. 3.41 Wachstum und L-Lysinbildung von DM1868 und DM1868  $\Delta nanR$ . Die Zellen wurden in CGXII-Medium mit 3 % Glucose bzw. Glucosamin kultiviert.

DM1868 erreicht mit Glucosamin als einziger Kohlenstoffquelle eine Wachstumsrate von  $0,09 \text{ h}^{-1}$ . Nach zwei Tagen wurden  $3,54 \text{ mM}$  Lysin im Kulturüberstand gemessen. Die Deletion von *nanR* führt in DM1868 zum besseren Wachstum mit Glucosamin. Die Wachstumsrate ist mit  $0,28 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$  fast genau so hoch wie die des Ausgangsstammes auf Glucose ( $0,32 \text{ h}^{-1}$ ). Nach 23 h sind die gebildeten Mengen Lysin mit  $14,1 \pm 0,56 \text{ mM}$  (DM1868  $\Delta nanR$ , GlcN) und  $14,6 \text{ mM}$  (DM1868, Glc) etwa gleich hoch. Somit kann Glucosamin von DM1868  $\Delta nanR$  genau so effizient zur Produktbildung genutzt werden wie Glucose von DM1868. Ein deutlicher Wachstumsnachteil entsteht jedoch, wenn der Deletionsmutante Glucose als einzige Kohlenstoffquelle zur Verfügung steht. Die Wachstumsrate ist gegenüber der des Ausgangsstammes deutlich verringert ( $\mu = 0,1 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$ ). Dieser Effekt wurde bereits für *C. glutamicum*  $\Delta nanR$  beschrieben und konnte bisher nicht erklärt werden. Interessanterweise führt das langsamere Wachstum dazu, dass mit  $28 \text{ mM}$  L-Lysin fast doppelt so viel Produkt entstanden ist, wie im Ausgangsstamm. Dieser Vorteil geht allerdings zu Lasten der Produktivität, da der gesamte Prozess doppelt so lang dauert. Für die Nutzung von Glucosamin lässt sich also ein deutlicher Vorteil der Deletion von *nanR* feststellen, der dadurch erzeugte Phänotyp auf Glucose stellt allerdings einen Nachteil dar.

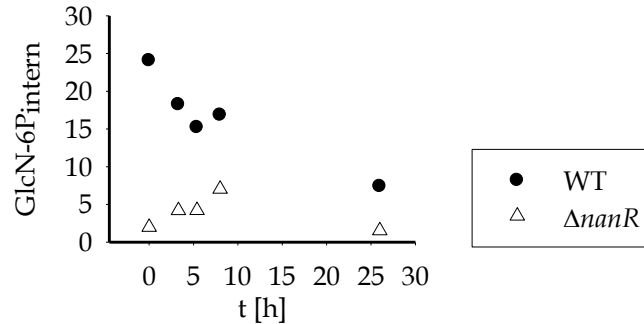
In der biotechnologischen Produktion mit *C. glutamicum* ist der Einsatz von chemisch reinen Substraten eher unüblich, da er insbesondere bei großen Volumina sehr kostenintensiv ist. Häufig werden Mischsubstrate unterschiedlicher Zusammensetzung verwendet. Da *C. glutamicum* die meisten Substrate cometabolisieren kann, ist dieses Vorgehen gut geeignet. Wie bereits gezeigt, stellt die gemeinsame Verstoffwechslung von Glucose und Glucosamin eine Ausnahme dar, da die Substrate um den gleichen Transporter (PTS<sup>Glc</sup>) konkurrieren und Glucose mit höherer Affinität importiert wird, was zu einer konsekutiven Verstoffwechslung zur Folge hat (vgl. Abschnitt 3.1.4). Unerwarteterweise führten Mischsubstrate mit Glucosamin und Fructose, Saccharose oder Maltose zu deutlich verringerten Wachstumsraten in *C. glutamicum* WT ( $\mu \sim 0,1 \text{ h}^{-1}$ , Abb. 3.42). Eine Konkurrenz um den gleichen Transporter oder im Falle der PTS-Substrate Fructose und Saccharose um die substratunspezifischen Komponenten des PTS-Systems konnte als Ursache ausgeschlossen werden, da auch die Verstoffwechslung von Maltose, welches über einen ABC-Transporter importiert wird (Henrich *et al.*, 2013), beeinträchtigt war.



**Abb. 3.42 Coverstoffwechslung von Glucosamin.** *C. glutamicum* WT und  $\Delta nanR$  wurden in CGXII-Medium mit 1 % Glucosamin + 1 % Saccharose, Glucose, Fructose oder Maltose kultiviert. Als Kontrolle diente Medium mit Saccharose als einziger Kohlenstoffquelle.

Weiterhin wurde dieser Phänotyp durch die Deletion von *nanR* wieder aufgehoben (Abb. 3.42). Eine mögliche Ursache für das schlechte Wachstum des Wildtyps könnte die Akkumulation von Glucosamin-6-phosphat sein. Zuckerphosphatstress wirkt sich im Allgemeinen negativ auf das Wachstum von Mikroorganismen aus (Kadner *et al.*, 1992). Am Beispiel der Coverstoffwechslung von Saccharose und Glucosamin konnte gezeigt werden, dass es im Wildtyp, gerade zu Beginn der Kultivierung, zu einer erhöhten intrazellulären Konzentration von GlcN-6P kommt. Sie ist mit  $24 \pm 5 \text{ mM}$  mehr als 20mal höher als in der  $\Delta nanR$ -

Mutante (Abb. 3.43). Letztere kann GlcN-6P wesentlich schneller umsetzen, wodurch es nicht zu Akkumulation kommt. Das bessere Wachstum ist die Folge.

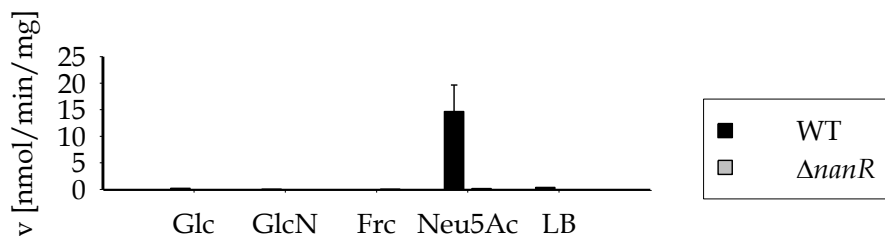


**Abb. 3.43 Messung der internen Konzentration von Glucosamin-6-phosphat.** *C. glutamicum* WT und *C. glutamicum*  $\Delta nanR$  wurden in CGXII-Medium mit 1 % Glucosamin + 1 % Saccharose kultiviert.

### 3.4 Neuraminsäure als Kohlenstoffquelle von *C. glutamicum*

#### 3.4.1 Wachstum von *C. glutamicum* $\Delta nanR$

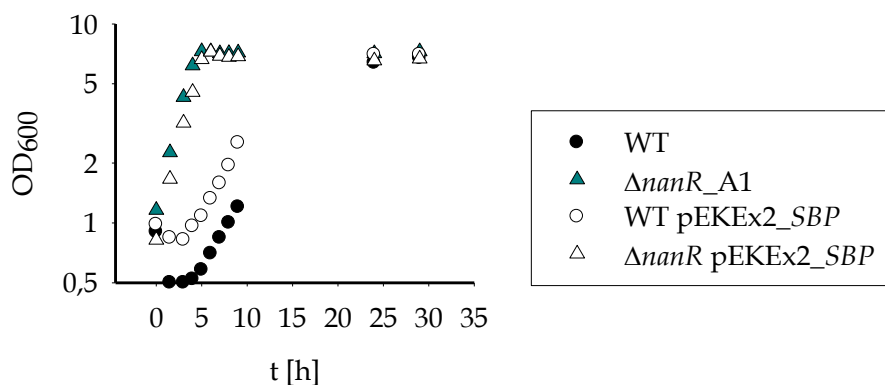
In *C. glutamicum*  $\Delta nanR$  ist die Expression aller Gene, die für den Katabolismus der Neuraminsäure notwendig sind, hochreguliert (Abschnitt 3.3.5). Daher war davon auszugehen, dass diese Mutante Neu5Ac besser nutzen kann als der Wildtyp insbesondere in Hinblick auf die *lag*-Phase. In den ersten Wachstumsexperimenten konnte *C. glutamicum*  $\Delta nanR$  jedoch überhaupt nicht mit Neu5Ac als einziger Kohlenstoffquelle wachsen. Daher wurde die Substrataufnahme in diesem Stamm gemessen und mit der des Wildtyps verglichen. Dazu wurden die beiden Stämme mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen kultiviert (Abb. 3.44).



**Abb. 3.44 Messung der Neu5Ac-Aufnahme in *C. glutamicum* WT und in *C. glutamicum*  $\Delta nanR$ .** Die Zellen wurden in CGXII-Medium mit jeweils 1 % der angegebenen Kohlenstoffquelle (0,3 % bei Neu5Ac) inkubiert. Nach 5-7 h wurde die Aufnahme von 50  $\mu$ M Neu5Ac gemessen.

Einzig beim *C. glutamicum* Wildtyp, der mit Neu5Ac kultiviert wurde, konnte die Aufnahme von Neu5Ac beobachtet werden. Glucose, Glucosamin, Fructose und Komplexmedium führen offenbar nicht zu einer funktionellen Expression des Transporters und somit auch nicht zur Substrataufnahme. In *C. glutamicum*  $\Delta nanR$  wurde unter keiner der genannten Kultivierungsbedingungen die Aufnahme von Neu5Ac gemessen. Daher wurden Suppressormutanten von *C. glutamicum*  $\Delta nanR$  erzeugt, indem der Stamm in LB-Medium mit 0,3 % Neu5Ac über mehrere Passagen kultiviert wurde. Schließlich konnte ein Klon isoliert werden, der Neu5Ac ohne lag-Phase direkt für das Wachstum nutzen konnte ( $0,38 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$ ). Er erhielt die Bezeichnung *C. glutamicum*  $\Delta nanR\_A1$  (Abb. 3.45). Die Sequenzierung der Gene des Neuraminsäureimporters ergab, dass in *C. glutamicum*  $\Delta nanR$  eine Punktmutation im Substratbindeprotein des ABC-Transporters vorhanden war. In *C. glutamicum*  $\Delta nanR\_A1$  war diese Mutation nicht mehr vorhanden. Die Sequenz der Spontanmutante entsprach der des Wildtyps. Durch die Überexpression des Substratbindeproteins in *C. glutamicum*  $\Delta nanR$  pEKEx2\_SBP konnte schließlich ein Wachstumsphänotyp auf Neu5Ac erzeugt werden, der dem der Suppressormutante entsprach ( $\mu = 0,41 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ ). Im Gegensatz dazu kommt es in *C. glutamicum* WT pEKEx2\_SBP zu Wachstumsraten von  $0,18 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ , die nur geringfügig höher sind als in *C. glutamicum* WT ( $\mu = 0,14 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$ ).

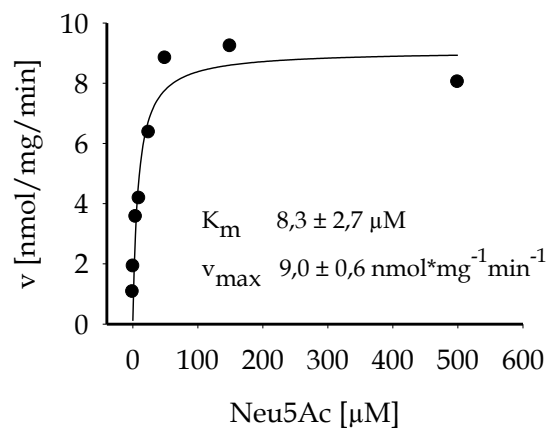
Die Ergebnisse zeigen, dass die Deletion von *nanR* durchaus ausreicht, um das Wachstum auf Neuraminsäure zu verbessern. In der ursprünglichen Deletionsmutante  $\Delta nanR$  konnte dieser Phänotyp nur aufgrund einer zusätzlichen Mutation im Substratbindeprotein des Neuraminsäureimporters nicht beobachtet werden.



**Abb. 3.45 Wachstum mit 0,3 % Neu5Ac als einziger C-Quelle.** Neben dem *C. glutamicum* WT und der Suppressormutante  $\Delta nanR\_A1$  wurde auch WT und  $\Delta nanR$  kultiviert, die das Substratbindeprotein des Neuraminsäureimporters auf dem Plasmid pEKEx2\_SBP überexprimieren.

### 3.4.2 Eigenschaften des Neuraminsäureimporters

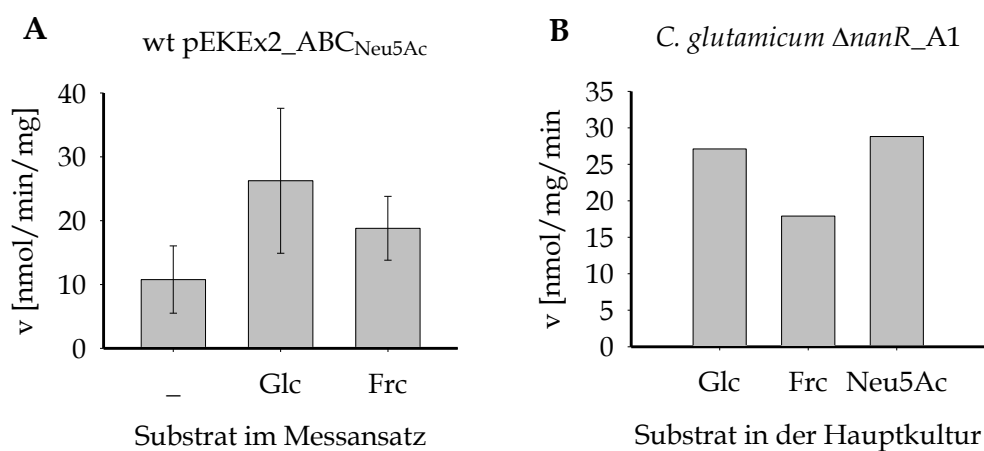
Anhand der Annotationen des Genoms ist erkennbar, dass der Neuraminsäureimporter ein ABC-Transporter ist, der durch vier Gene *cg2937-40* kodiert ist. Die Bedeutung dieses Transporters für die Neuraminsäureaufnahme wurde bereits an anderer Stelle gezeigt (Gruteser *et al.*, 2012). Durch die Aufnahme einer Sättigungskurve lässt sich erkennen, dass der Import von Neu5Ac mit einer sehr hohen Affinität des Transporters verbunden ist (Abb. 3.46). Legt man eine Michaelis-Menten-Kinetik zugrunde, ergibt sich ein  $K_m$ -Wert von  $8,3 \pm 2,7 \mu\text{M}$ .



**Abb. 3.46 Sättigungskurve der Neuraminsäureaufnahme in *C. glutamicum* ATCC 13032.** Vorkultur und Hauptkultur wurden in CGXII-Medium mit 0,3 % Neu5Ac durchgeführt. Die Hauptkultur wurde nach 5 h gemessen.

Die maximalen Aufnahmeraten bei der Neu5Ac-Aufnahmemessung waren je nach Wachstumsphase der Zellen oder Wachstumsgeschwindigkeit recht unterschiedlich. Sie schwankten zw. 8 und  $25 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ . Unter den in Abb. 3.46 beschriebenen Wachstumsbedingungen, wurden  $v_{\text{max}}$ -Werte von  $9,0 \pm 0,6 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  gemessen. Im Wildtyp konnte die Neu5Ac-Aufnahme bisher nur gemessen werden, wenn die Zellen mit Neu5Ac vorkultiviert wurden (vgl. Abb. 3.44). Bei der Kultivierung mit Mischsubstrat mit Glucose und Neu5Ac hingegen gab es keine Aufnahme (Gruteser *et al.*, 2012). Um zu ermitteln, ob Glucose den Import von Neu5Ac direkt inhibiert, wurde der gesamte Neuraminsäureimporter in *C. glutamicum* WT überexprimiert und die Aufnahme von Neu5Ac in Anwesenheit eines Überschusses von Glucose gemessen (Abb. 3.47A). Als Kontrolle wurde Fructose eingesetzt. Dabei konnte *kein* negativer Einfluss auf die Neu5Ac-Aufnahmerate gemessen werden. Vielmehr waren die Raten bei Fructose um ca. 80 % und bei Glucose um 150 % erhöht, wenn das zusätzliche Substrat im Ansatz war. Dies spricht für eine Energetisierung des Imports über den ABC-Transporter.

Weiterhin wurde untersucht, ob neben NanR weitere Regulationsfaktoren die Neu5Ac-Aufnahme bei Wachstum mit Glucose oder Fructose beeinträchtigen. Dazu wurde die Mutante  $\Delta nanR\_A1$  verwendet, der der Regulator NanR fehlt und die über einen funktionellen Neu5Ac-Importer verfügt. Die Zellen wurden mit Glucose, Fructose und Neu5Ac als einziger Kohlenstoffquelle kultiviert (Abb. 3.47B). Im Gegensatz zur Situation im Wildtyp wurde Neu5Ac von *C. glutamicum*  $\Delta nanR\_A1$  aufgenommen, auch wenn der Stamm auf anderen Kohlenstoffquellen als Neu5Ac kultiviert wurde.



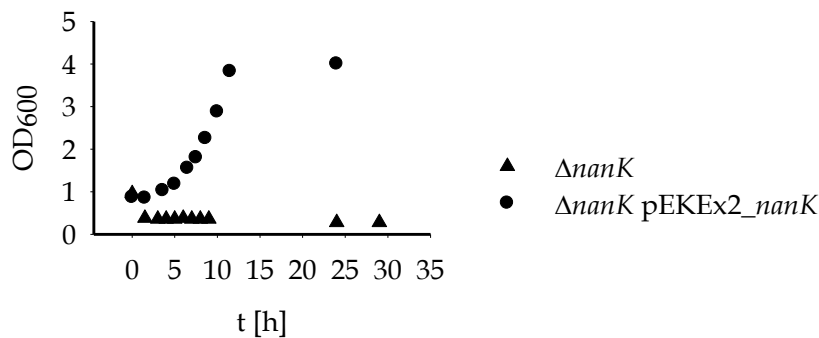
**Abb. 3.47 Einfluss anderer Substrate auf die Neu5Ac-Aufnahme.** (A) Der Neu5Ac-Importer wurde in *C. glutamicum* pEKEx2\_ABCNeu5Ac überexprimiert. Die Zellen wurden auf Neu5Ac als einziger Kohlenstoffquelle kultiviert. Die Neu5Ac-Aufnahme (50  $\mu$ M) wurde nach 3min Inkubation mit einem 10fachen Überschuss an Glucose oder Fructose gemessen. (B) Die Suppressormutante *C. glutamicum*  $\Delta nanR\_A1$  wurde mit auf drei verschiedenen Kohlenstoffquellen kultiviert (Einfachbestimmung). Dabei wurde die Aufnahme von 50  $\mu$ M Neu5Ac gemessen.

Daraus lässt sich schließen, dass nur der Repressor NanR einen direkten Einfluss auf die Transkription und die Aktivität des Neuraminsäureimporters hat. Die Tatsache, dass der Wildtyp bei Kultivierung mit Fructose oder Glucose keine Neuraminsäure aufnimmt, lässt sich also auf den aktiven Repressor NanR zurückführen, der die Expression des Neuraminsäureimporters verhindert.

### 3.4.3 Bedeutung von *cg2932* (*nanK*) für das Wachstum mit Neu5Ac

Bei der Suche nach Regulationsfaktoren des *nag/nan*-Clusters konnte das Gen *cg2932* bereits als Regulator ausgeschlossen werden (Abschnitt 3.3.1). Für das Wachstum mit

Neu5Ac ist das Gen jedoch essentiell, da die Deletionsmutante das Substrat nicht nutzen kann (Abb. 3.48). Durch Überexpression von *cg2932* in der Deletionsmutante konnte *C. glutamicum* Neu5Ac wieder zum Wachstum nutzen. Das Gen ist als Transkriptionsregulator der ROK-Familie bzw. als putative Zuckerkinase annotiert (Kalinowski *et al.*, 2003). Durch die Position des Gens im *nan*-Gencluster und die beschriebenen Wachstumsversuche, ist davon auszugehen, dass *cg2932* die N-Acetylmannosamin-Kinase (NanK) kodiert, welche bei Katabolismus der Neuraminsäure essentiell ist.



**Abb. 3.48 Einfluss von *cg2932* (*nanK*) auf das Wachstum mit Neu5Ac.** *C. glutamicum*  $\Delta nanK$  und *C. glutamicum*  $\Delta nanK$  pEKEx2\_nanK wurden in CGXII-Medium mit 0,3 % Neu5Ac kultiviert.



## 4 Diskussion

### 4.1 Kontrolle des Aminosuckerstoffwechsels in *C. glutamicum*

#### 4.1.1 PTS<sup>Glc</sup> ist der Importer von Glucosamin

*C. glutamicum* ist in der Lage Glucosamin als einzige Kohlenstoffquelle zu nutzen. Die Wachstumsrate ist dabei allerdings nur ein Drittel so hoch wie bei den Substraten Glucose, Fructose, Maltose oder Saccharose. Die Verstoffwechslung von Glucosamin ist folglich einer Limitation unterworfen, die entweder den Substratimport und/oder den nachfolgenden Katabolismus betrifft. Zur Identifizierung des Glucosamintransporters wurden Mutanten des Phosphoenolpyruvat-abhängigen Phosphotransferase-Systemes (PTS) eingesetzt. Ihnen fehlten entweder einer der vier substratspezifischen membrangebundenen Transporter oder die unspezifische cytosolische Kinase HPr, die an der Phosphorylierung der Substrate aller vier Transporter beteiligt ist. Wachstumsversuche (Abb. 3.2) und Transportmessungen (Abb. 3.3) zeigten, dass der Import von Glucosamin in *C. glutamicum* über das glucosespezifische PTS<sup>Glc</sup> erfolgt. Es konnte kein Hinweis auf weitere Importer gefunden werden, da ausschließlich *C. glutamicum*  $\Delta ptsG$  nicht in der Lage war, Glucosamin zu nutzen und in dieser Mutante selbst nach 40 min keine Aufnahme des radioaktiv markierten Substrates messbar war. Somit ist PTS<sup>Glc</sup> der einzige Importer von Glucosamin in *C. glutamicum*.

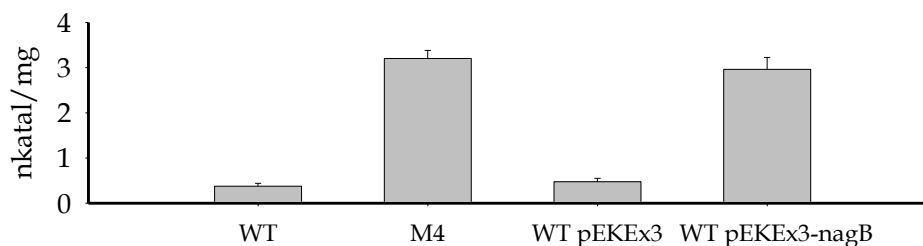
Auch in *E. coli* wird Glucosamin über einen PTS-Transporter importiert, der durch die Gene *manXYZ* kodiert ist. Der Transporter hat ein sehr breites Substratspektrum und nimmt neben Glucosamin auch Glucose, 2-deoxy-Glucose, Mannose und Mannosamine auf (Curtis und Epstein, 1975). *ManXYZ* wird positiv reguliert durch einen cAMP abhängiges Aktivatorprotein CAP und negativ reguliert durch Mlc (Plumbridge, 1998). Mlc ist ein Regulator ROK-Familie und hat hinsichtlich seiner Struktur und des DNA-Bindemotivs eine hohe Ähnlichkeit zum Regulator der *NagC*, der die in *E. coli* die Gene des Aminosuckermetabolismus reguliert (Plumbridge, 2001). Import und Katabolismus von Glucosamin werden in *E. coli* also durch homologe Proteine reguliert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in *E. coli* auch PTS<sup>Glc</sup> den Import von Glucosamin katalysieren kann (Jones-Mortimer und Kornberg, 1980). Durch Überexpression von *ptsG* in *E. coli*  $\Delta manXYZ$  konnte Glucosamin als Kohlenstoffquelle genutzt werden. Außerdem traten in *E. coli*  $\Delta manXYZ$  Spontanmutationen auf, die ebenfalls zur höheren Expression von *ptsG* damit zum Glucosaminimport führten. Wie sich erst später herausstellte, betrafen diese Mutationen die EIIA-Domäne von PTS<sup>Glc</sup>. Sie führten zu einer höheren Affinität der EIIA-Domäne zu Mlc. Da Mlc auch die Expression von *ptsG* reprimiert, kam es

durch die stärkere Bindung an die EIIA-Domäne nicht mehr zur Reprimierung von *ptsG*, wodurch der Importer stärker exprimiert wurde und Glucosamin aufgenommen werden konnte (Seitz *et al.*, 2003). PTS-Transporter sind auch in *B. subtilis* an der Aufnahme von Glucosamin beteiligt. Durch eine Analyse des Membranproteoms konnte ein PTS-Transporter gefunden werden, der den Import von Glucosamin katalysiert (Hahne *et al.*, 2008). Das Gen des Transporters GamP ist zusammen mit dem Gen der Glucosamin-6-phosphat-Deaminase GamA auf einem Operon lokalisiert, dessen Expression durch Glucosamin induziert wird. Der an der Regulation beteiligte Repressor YbgA ist divergent von *gamAP* lokalisiert (Gaugue *et al.*, 2013). In der gleichen Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass PTS<sup>Glc</sup> ebenfalls in der Lage ist Glucosamin zu importieren, wenngleich GamP das Hauptaufnahme-system darstellt.

Die glucosespezifischen PTS-Transporter können Glucosamin also auch in anderen Organismen als Substrat akzeptieren, wobei dieser Import eher eine Nebenaktivität darstellt. Die primären Aufnahmesysteme gehören ebenfalls zur PTS-Familie, die im Fall von *B. subtilis* durch einen spezifischen Repressor reguliert werden und in *E. coli* der Katabolitrepression unterworfen sind. In *C. glutamicum* ist PTS<sup>Glc</sup> allerdings das einzige Aufnahmesystem. Es ist davon auszugehen, dass der Import von Glucosamin in *C. glutamicum* nicht durch einen spezifischen Regulationsmechanismus kontrolliert wird. Vielmehr wird die Expression von *ptsG* generell erhöht wenn PTS-Substrate aufgenommen werden (Tanaka *et al.*, 2008a). Die Regulation erfolgt dabei über den globalen Repressor SugR, der in Anwesenheit von Effektoren nicht mehr an der DNA Binden kann. Die Effektoren sind Zuckerphosphate wie Fructose-6-phosphat, Glucose-6-phosphat, Fructose-1,6-bisphosphat und Fructose-1-phosphat, die bei der Aufnahme und dem Katabolismus der PTS-Substrate als Zwischenprodukte vorliegen (Engels und Wendisch, 2007). Im Fall von Glucosamin entsteht Fructose-6-phosphat (vgl. Abb. 1.2), das als Effektor von SugR die *ptsG*-Expression verstärkt. Eine schnellere Umsetzung von Glucosamin könnte dadurch zu einer höheren PTS<sup>Glc</sup>-Aktivität führen. Die M4-Mutante kann Glucosamin genau so schnell umsetzen wie Glucose (Abb. 3.7). Vergleicht man die Glucosamin-Aufnahmeraten von WT und M4 (Abb. 3.4 und Abb. 3.8), so ist die der M4-Mutante um 30 % erhöht. Allerdings ist die Glucosamin-Aufnahme im Wildtyp mit  $\sim 20 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  bereits in einem Bereich, der nicht limitierend ist. Die höhere Aufnahmerate in M4 ist höchstwahrscheinlich eine Folge der besseren Substratumsetzung, die mit einer höheren Verfügbarkeit des SugR-Effektor Fructose-6-phosphat und schließlich einer stärkeren *ptsG*-Expression einhergeht. Die Glucose-Aufnahme ist in beiden Stämmen gleich hoch. Da der Katabolismus von Glucose in M4 nicht verändert ist, war ein regulatorischer Einfluss auf *ptsG* bei diesem Substrat auch nicht zu erwarten.

#### 4.1.2 Die erhöhte Aktivität von NagB verbessert das Wachstum mit Glucosamin

Um die Ursache des verbesserten Wachstums der M4-Mutante auf Glucosamin zu ermitteln, wurde ein Microarray erstellt, bei dem die differentielle Genexpression von *C. glutamicum* WT und M4 bestimmt wurde (Anhang Tab. 7.1). In der M4-Mutante war die Expression von zwei Genen deutlich erhöht: *nagA*, welches die N-Acetylglucosamine-6-phosphat-Deacetylase kodiert und *nagB*, welches die Glucosamin-6-phosphat-Deaminase kodiert. Beide Enzyme sind essentiell für den Katabolismus von Aminoszuckern (vgl. Abb. 1.2). Eine veränderte Expression von *ptsG* wurde nicht gemessen, wobei zu beachten ist, dass der Microarray mit RNA aus Zellen durchgeführt wurde, die auf Komplexmedium kultiviert wurden. Substratspezifische Regulationen sind dadurch nicht detektierbar. Der Einfluss der Expressionsunterschiede auf die Aktivität von NagB wurde durch Enzymtests mit Rohextrakten aus unterschiedlichen *C. glutamicum* Stämmen ermittelt (Abb. 4.1). Im Vergleich zum Wildtyp konnte in der M4-Mutante eine um den



**Abb. 4.1 Messung der NagB-Aktivität in vier verschiedenen Stämmen.** Die Messungen wurden von Jung-Won Youn aus der AG Wendisch (Bielefeld) durchgeführt (Uhde *et al.*, 2013).

Faktor 6 erhöhte Aktivität von NagB gemessen werden. Der gleiche Unterschied, der auch bei der ektopischen Expression von *nagB* mit Hilfe des Vektors pEKEx3-*nagB* im Wildtyp zu sehen war. Somit ist davon auszugehen, dass NagB in der M4-Mutante die maximale Aktivität erreicht hat. In Wachstumsexperimenten, bei denen das *nagAB-scrB*-Operon oder *nagB* allein im Wildtyp überexprimiert wurden, konnten die gleichen Wachstumsraten auf Glucosamin gemessen werden wie in der M4-Mutante (Abb. 3.12 und Tab. 3.1). Somit reicht allein die höhere Aktivität von NagB aus, um das Wachstum von *C. glutamicum* auf Glucosamin zu verbessern. Die geringe Aktivität von NagB im Wildtyp ist demnach die Ursache für die geringen Wachstumsraten und stellt den limitierenden Schritt dar.

In *E. coli* wird das Wachstum mit Glucosamin sowohl durch die Substrataufnahme, als auch durch die Aktivität von NagB bestimmt. Die Deletion des Repressors *mlc*, der die Expression von *manXYZ* reguliert, führte zu einer verbesserten

Substrataufnahme und zu 40 % höheren Wachstumsraten (Alvarez-Anorve *et al.*, 2005). Die Deletion von *nagC*, dem Repressor des *nagE-nagBACD*-Operons, führte zu 60 % höheren Wachstumsraten, die durch die größere Menge an NagB in der Zelle verursacht wurden (Alvarez-Anorve *et al.*, 2005). In *C. glutamicum* konnten keine Proteine gefunden werden, die hohe Ähnlichkeiten zur *mlc* oder *nagC* aus *E. coli* aufwiesen. Die ermittelten Kandidaten hatten entweder keine DNA-Bindedomäne bzw. hatte ihre Deletion keinen Einfluss auf das Wachstum mit Glucosamin (Abschnitt 3.3.1). Weiterhin ist NagB aus *E. coli* ein allosterisches Homohexamer, welches heterotrop durch GlcNAc-6P und homotrop durch GlcN-6P aktiviert wird (Calcagno *et al.*, 1984). Die Aktivierung durch GlcNAc-6P stellt beim Wachstum mit Glucosamin allerdings keinen limitierenden Faktor dar, da die Aktivierung durch GlcN-6P bereits ausreichend ist (Alvarez-Anorve *et al.*, 2009). In *C. glutamicum* wurde durch Gelfiltrations-Chromatographie gezeigt, das NagB ein Homotetramer bildet, bei dem keine Aktivierung oder Inhibierung durch GlcN, GlcN-1P, GlcN-6 oder GlcNAc-6P gemessen werden konnte (Uhde *et al.*, 2013). In anderen Mikroorganismen liegen NagB-Orthologe als Homodimere (z.B. *Candida albicans*) oder Monomere (z.B. *B. subtilis*) vor, die ebenfalls nicht allosterisch reguliert werden (Natarajan und Datta, 1993; Vincent *et al.*, 2005).

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen den Schluss zu, dass es für die Kontrolle des Glucosamin-Katabolismus in *C. glutamicum* keine substratspezifischen Regulationsmechanismen gibt. Der Import unterliegt der Kontrolle globaler Regulatoren der PTS-Transporter und die Aktivität von NagB ist nur von der Menge des Enzyms abhängig. Da keine Orthologen zu NagC oder Mlc in *C. glutamicum* existieren, konnte von einem unspezifischerem Regulator ausgegangen werden, der die Expression von NagB steuert. Wie sich herausstellte, handelt es sich dabei um den Regulator NanR, der am Sialinsäure-Katabolismus beteiligt ist.

### **4.1.3 Eine Punktmutation im Promotor von *nagAB-scrB* verursacht die höhere Expression dieses Operons.**

Die Ergebnisse der RT-PCR zeigen, dass die drei Gene *nagA*, *nagB* und *scrB* zusammen transkribiert werden und somit das Operon *nagAB-scrB* bilden (Abb. 3.10). Dies stimmt mit dem Ergebnis einer früheren Arbeit überein, in der mittels RACE-PCR nur vor dem Gen *nagA* Transkriptionsstartpunkte gefunden werden konnten. (Engels *et al.*, 2008). Zu den beiden Transkriptionsstartpunkten TS1 und TS2 konnten weiterhin die zugehörigen -10 und -35 Regionen identifiziert werden. Zusammen bilden sie jeweils einen Promotor, dessen Transkription vom Sigmafaktor

$\sigma^A$  abhängig ist (Pátek und Nešvera, 2011). Gene, bei denen die RNA-Polymerase durch  $\sigma^A$  an den Promotor bindet, werden in der Regel konstitutiv exprimiert.

Bei der Sequenzierung des *nagAB-scrB*-Operons von M4 aber auch anderen Spontanmutanten, die Glucosamin besser nutzen konnten, wurden Punktmutationen gefunden, die genau im Promotorbereich auftraten (Abb. 4.2). Proteinkodierende Regionen waren unverändert.

-35	-10	TS1	<i>nagA</i>
5 'TCCGAAGATAATTAACCTAAATCCGT <b>TAGACATAA</b> <i>GACA</i> <b>T*</b> CATACGTCCT <b>TATGCTT</b> <u>GCT</u> TGGAAGGAAGCAAATAACCTCAGAAAG <b>ATG</b> -3 '			
5 'TCCG <b>AAGATA</b> ATTAACCTAAATCCGT <b>TAGACATAA</b> <i>GACA</i> <b>T*</b> <u>CA</u> TACGTCCTATGCTT <b>GCT</b> TGGAAGGAAGCAAATAACCTCAGAAAG <b>ATG</b> -3 '			
-35	-10	TS2	<i>nagA</i>

**Abb. 4.2 Punktmutationen in den Spontanmutanten des *nagAB-scrB*-Promotors.** Die Transkriptionsstartpunkte TS1 und TS2 sind unterstrichen, die dazugehörigen **-10 und -35 Regionen** des Promotors sind fett gedruckt. Die Positionen der *Mutationen* in den Spontanmutanten sind kursiv, wobei die M4-Mutation mit einem (\*) gekennzeichnet ist. Rechts ist das Startcodon von *nagA*.

Die Mutation in M4 beispielsweise befindet sich -18 bzw. -3 Nukleotide vom Transkriptionsstart TS1 bzw. TS2. Die hexameren Erkennungssequenzen von  $\sigma^A$  sind durch diese Mutationen nicht betroffen. In Bereich der Mutationen befindet sich offenbar ein weiteres regulatorisches Element, dass die Expression von *nagAB-scrB* beeinflusst. Durch Messung der Promotoraktivität mit Hilfe des Reportergens *gfp* konnte gezeigt werden, dass die Mutationen in M4 zu einer 6 bis 7fach höheren spezifischen GFP-Fluoreszenz führten als beim Wildtypkonstrukt (Abb. 3.11). Dieser Einfluss war unabhängig vom verwendeten Substrat (Glucose oder Glucosamin). Zusammenfassend führt die Punktmutation im *nagAB-scrB* Promotor zu einer höheren Aktivität dieses Promotors und in der Folge zu einer stärkeren Expression von *nagA* und *nagB*. Durch die höhere NagB-Aktivität kann Glucosamin schneller von *C. glutamicum* M4 umgesetzt werden. Die Tatsache, dass *scrB* im Microarray mit der M4-Mutante nicht gefunden wurde, lässt auf weitere Faktoren schließen, die die Transkription von *scrB* beeinflussen. Möglicherweise bricht die Transkription vorzeitig ab oder die mRNA wird schnell abgebaut. *ScrB* kodiert die Saccharose-6-phosphat-Hydrolase, die für den Katabolismus von Saccharose essentiell ist. Bisher konnte kein Regulationsmechanismus gefunden werden, der die mRNA-Level von *scrB* erhöht. Weder der Regulator SugR, der das unmittelbar benachbarte Saccharoseaufnahme-system *ptsS* reprimiert, noch die Anwesenheit von Saccharose im Medium hatten Einfluss auf die *scrB*-Transkription (Engels *et al.*, 2008). Offenbar

ist eine schwache konstitutive Expression von *scrB* ausreichend für die schnelle Umsetzung von Saccharose. Im Fall von *nagB* und Glucosamin ist sie es offensichtlich nicht. Vergleicht man die Enzymaktivitäten von NagB und ScrB in *C. glutamicum* WT, der auf LB-Medium kultiviert wurde, lässt sich eine Erklärung ableiten. Im Rohextrakt liegt die Aktivität von ScrB bei ca. 5 nkat\*mg<sup>-1</sup> (Engels *et al.*, 2008) und die von NagB bei ca 0,4 nkat\*mg<sup>-1</sup> (Abb. 4.1). Erst durch Überexpression von NagB wurde der Wert auf 4 nkat\*mg<sup>-1</sup> gesteigert. Trotz schwacher Expression hat ScrB eine deutlich höhere Aktivität als NagB.

#### 4.1.4 NanR ist Repressor des *nag/nan*-Clusters in *C. glutamicum*

Im Gegensatz zu *E. coli* oder *B. subtilis* konnte durch den Vergleich von Primärstrukturen in *C. glutamicum* kein Regulator gefunden werden, der die Expression der *nag*-Gene spezifisch reguliert. Ein Vergleich der Genomsequenzen unterschiedlicher *Corynebacteriaceae* ergab jedoch, dass die *nag*-Gene häufig in unmittelbarer Nähe zu den Genen des Sialinsäurestoffwechsels (*nan*-Gene) lokalisiert sind. Dies ist neben *C. glutamicum* z.B. auch bei *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* und *C. pseudotuberculosis* der Fall (Gruteser *et al.*, 2012). In dem *nag/nan*-Clustern der genannten Mikroorganismen befindet sich jeweils ein Regulatorprotein der GntR-Familie (*nanR*), welches vermutlich die Transkription des gesamten Clusters beeinflusst. Eine Ausnahme stellt *C. efficiens* dar, in dem nur *nanR* und *nagB* in einem Operon kodiert sind und sonst keines der anderen Gene des *nag/nan*-Clusters vorkommt.

Die Deletion von *nanR* in *C. glutamicum* führte zu einer Verdopplung der Wachstumsrate auf Glucosamin im Vergleich zum Wildtyp. Ein Phänotyp, der durch die Überexpression von *nanR* wieder aufgehoben wurde (Abb. 3.26). Die Aktivität des *nagAB-scrB*-Promotors wurde durch die Deletion um den Faktor 5 erhöht (Abb. 3.35). Damit hat *C. glutamicum*  $\Delta nanR$  den gleichen Phänotyp wie die M4-Mutante. Durch EMSAs konnte gezeigt werden, dass NanR an die Promotorregion von *nagAB-scrB* bindet (Abb. 3.30). Die Bindestelle konnte genau auf dem Bereich eingegrenzt werden, in dem bei der M4-Mutante die Punktmutationen identifiziert wurden (Abb. 3.32). In der M4-Mutante konnte NanR nicht mehr an diesen Bereich binden. Damit wird die Funktionsweise von NanR deutlich. Das Protein agiert als Repressor, der direkt im Promotor der regulierten Gene bindet und dadurch die Formation des Transkriptions-Initiationskomplexes inhibiert. Diese werden folglich nur schwach exprimiert. Die Deletion des Repressors (*C. glutamicum*  $\Delta nanR$ ) oder das Aufheben der Bindung an die DNA (M4-Mutante) verhindern die Inhibierung und *nagAB-scrB* wird stärker exprimiert.

Ausgehend von der gefunden NanR-Bindestelle wurde untersucht, ob die im Microarray hochregulierten Gene eine ähnliche Nukleotidsequenz im Promotorbereich aufweisen. Nur für eine der untersuchten Regionen konnte eine Bindung von NanR nachgewiesen werden (Abb. 3.33). Diese weitere Bindestelle befindet sich im Promotorbereich der Gene des Neuraminsäureimporters (*cg2937-40*). Die Aktivität des entsprechenden Promotors war in *C. glutamicum*  $\Delta$ *nanR* um den Faktor 5 erhöht (Abb. 3.35).

Aus den DNA-Bindestellen von NanR lässt sich das gemeinsame Bindemotiv 5'-TANACATNAGACATCANACGT-3' ableiten, welches durch die Wiederholung einer Hexanukleotidsequenz gekennzeichnet ist. Auch in *E. coli* bindet NanR an eine konservierte Hexanukleotidsequenz, wobei es sich in diesem Fall um drei Wiederholungen handelt: 5'-TCTGGTATAACAGGTATAAAGGTNNA-3' (Kalivoda *et al.*, 2013). In *Vibrio vulnificus* dagegen, ist die Erkennungssequenz von NanR ein *inverted repeat*: 5'-TGIGANNNNNNICACA-3' (Kim *et al.*, 2011).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Promotoraktivität der zu *nagAB-scrB* und *cg2937-40* divergenten Gene *nanAKE* und *nanRP* in *C. glutamicum* ebenfalls erhöht war, wenn auch nur um den Faktor 2. Somit werden durch NanR neben den *nag*-Genen auch alle Gene des Sialinsäurekatabolismus reprimiert. NanR steuert dabei seine eigene Expression. Auf weitere Gene, die direkt durch NanR reprimiert werden, konnte kein Hinweis gefunden werden. Zwar sind im Microarray von *C. glutamicum*  $\Delta$ *nanR* die Gene des Propionat-Stoffwechsels *prpD1B1C1* und *prpD2B2C2* stärker exprimiert, allerdings fehlt im jeweiligen Promotorbereich eine entsprechende Bindestelle für NanR. Somit handelt es sich bei NanR um einen lokalen Transkriptionsregulator, der alle Gene des Sialinsäurekatabolismus beeinflusst. Dazu zählen auch *nagAB*, die für den Abbau von Glucosamin bzw. GlcNAc bereits ausreichend sind. Diese Form der gemeinsamen Regulation ist für Mikroorganismen, die Sialinsäure umsetzen können, eine Ausnahme. In *E. coli*, *Vibrio vulnificus* und *Staphylococcus aureus* wird die Expression der *nag*- und *nan*-Gene durch unterschiedliche Regulatoren und im Übrigen auch durch unterschiedliche Signale gesteuert (Kalivoda *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2011; Olson *et al.*, 2013). In *Haemophilus influenzae* dagegen werden die Gencluster durch den gemeinsamen Repressor SiaR reguliert (Johnston *et al.*, 2007).

Eine gemeinsame Regulation des *nag/nan*-Clusters legt den Schluss nahe, dass der Aminozuckerstoffwechsel von *C. glutamicum* nur auf die Nutzung der Sialinsäuren ausgerichtet ist. Dafür spricht die fehlende Induktion des *nagAB-scrB*-Operons beim Wachstum mit Glucosamin sowie die niedrige Affinität des Glucosaminimporters, die offenbar nur eine Nebenaktivität darstellt. Weiterhin gibt es in *C. glutamicum* wie auch in *H. influenzae* kein Aufnahmesystem für GlcNAc.

#### 4.1.5 Nutzung von Neuraminsäure in *C. glutamicum*

Bei phylogenetischen Untersuchungen von 1.902 Mikroorganismen, deren Genomsequenz bekannt war, konnten 46 identifiziert werden, die über alle nötigen Gene des Sialinsäurekatabolismus verfügen (Almagro-Moreno und Boyd, 2009). Die meisten davon sind kommensale oder pathogene Stämme, die Säugetiere kolonisieren. Bei den *Corynebacteriaceae* gibt es bisher nur eine Arbeit, in der das Wachstum mit Neu5Ac untersucht wurde. Dabei konnte der ABC-Transporter für Neu5Ac in *C. glutamicum* identifiziert werden (Gruteser *et al.*, 2012). Arbeiten über *C. diphtheriae* beschäftigen sich in diesem Zusammenhang ausschließlich mit der Sialidase NanH, die für die Kolonisierung des Wirts essentiell ist (Kim *et al.*, 2010; Warren und Spearing, 1963).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Regulator des *nag/nan*-Clusters in *C. glutamicum* identifiziert. In der ursprünglichen Deletionsmutante *C. glutamicum*  $\Delta nanR$  kam es gleichzeitig zu einer spontanen Mutation in *cg2937*, dem Gen des Substratbindeproteins (SBP) des Neuraminsäureimporters. Daher konnte der Stamm das Substrat nicht aufnehmen und zum Wachstum nutzen (Abb. 3.44). Durch Überexpression von *cg2937* in *C. glutamicum*  $\Delta nanR$  pEKE<sub>x2</sub>\_SBP bzw. die Rückmutation in *C. glutamicum*  $\Delta nanR$ \_A1 konnten die Stämme auf Neu5Ac wachsen (Abb. 3.45). Dies entspricht dem erwarteten Phänotyp bei der Deletion eines Repressors. Das Auftreten der Spontanmutation in *C. glutamicum*  $\Delta nanR$  ist jedoch schwer zu erklären. In Arbeiten mit *E. coli* konnte durch ein theoretisches Modell gezeigt werden, dass die Deletion von *nanR* zu einer transienten Toxizität von Neu5Ac führt (Chu *et al.*, 2008). Ursache dafür ist die Akkumulation von GlcNAc-6P, die zur Unterdrückung zentraler metabolischer Funktionen in der Zelle führt. Durch die zusätzliche Deletion des *nagAB*-Repressorgens *nagC* in konnte die Akkumulation von GlcNAc-6P und die transiente Toxizität von Neu5Ac in *E. coli* aufgehoben werden (Chu *et al.*, 2008). Da in *C. glutamicum*  $\Delta nanR$  die *nan*- und *nag*-Gene stärker exprimiert werden, ist eine Akkumulation von GlcNAc-6P unwahrscheinlich. Weiterhin konnte kein Hinweis auf eine Toxizität von Neu5Ac in den  $\Delta nanR$ -Stämmen gefunden werden, die wieder einen funktionsfähigen Importer exprimierten. Die Mutation in *cg2937* von *C. glutamicum*  $\Delta nanR$  könnte daher durchaus zufällig aufgetreten sein.

Die Messungen des Neu5Ac-Imports haben ergeben, dass der spezifische ABC-Transporter eine sehr hohe Affinität zum Substrat hat. Der  $K_m$ -Wert liegt bei  $\sim 8 \mu\text{M}$ . (Abb. 3.46). In *C. glutamicum* WT konnte eine Neu5Ac-Aufnahme jedoch nur dann gemessen werden, wenn die Zellen auf Neu5Ac vorkultiviert wurden (Abb. 3.44). Bei Kultivierungen auf anderen Substraten war keine Aktivität messbar. Daher wurde



untersucht, ob der Import durch andere Substrate inhibiert wird. Einige Minuten vor Neu5Ac-Aufnahmemessungen wurden 10fache Mengen Glucose oder Fructose zum Ansatz gegeben. Dabei konnte jedoch kein negativer Einfluss auf die Aufnahme beobachtet werden. Vielmehr kam es zu einer Energetisierung des ATP-abhängigen Imports durch die Zugabe der beiden Kohlenstoffquellen (Abb. 3.47). Somit ist ein Regulationsmechanismus nach dem Prinzip *inducer exclusion* auszuschließen. In *C. glutamicum*  $\Delta nanR\_A1$  hingegen, konnte auch bei Wachstum mit Glucose und Fructose die Aufnahme von Neu5Ac gemessen werden (Abb. 3.47). Dies ist ein Hinweis darauf, dass NanR der einzige Regulator der Neu5Ac-Aufnahme ist und dass es in diesem Zusammenhang auch nicht zur Katabolitrepression kommt.

Dennoch ist das Wachstum von *C. glutamicum* WT auf Neu5Ac als einziger Kohlenstoffquelle, durch eine fünfstündige *lag*-Phase gekennzeichnet (Abb. 3.37). Auch durch die Überexpression des ABC-Transporters im WT konnte keine wesentliche Verkürzung der *lag*-Phase erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Somit kann eine geringe Aktivität des Importers als Ursache ausgeschlossen werden. Erst wenn alle Gene des *nan/nag*-Clusters stärker exprimiert werden, wie z.B. in *C. glutamicum*  $\Delta nanR\_A1$ , kann Neu5Ac sofort umgesetzt werden (Abb. 3.45). Die *lag*-Phase im Wildtyp ist also auf die langsame Induktion dieses Gen-Clusters zurückzuführen.

#### 4.1.6 GlcNAc-6P und ManNAc-6P sind Effektoren von NanR

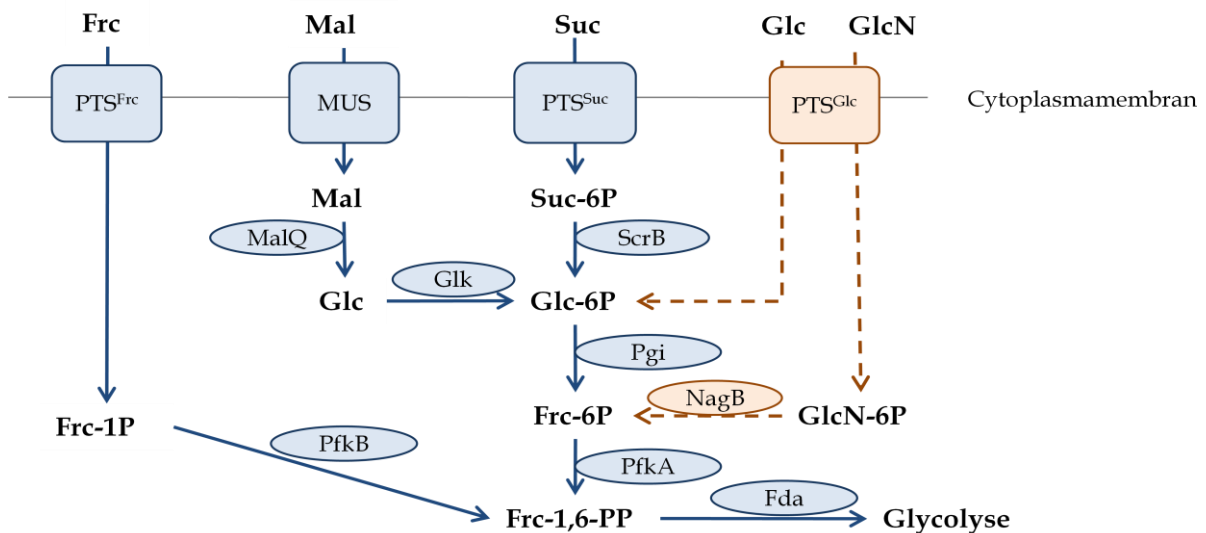
Die Induktion des *nagAB-scrB*-Operons sowie die höhere Aktivität von NagB beim Wachstum von *C. glutamicum* WT auf Neu5Ac waren die Basis zur Identifizierung eines Effektors von NanR (Abb. 3.37 und Abb. 3.40). Im EMSA wurden alle Stoffwechselintermediate von Neu5Ac getestet. Dabei konnten nur GlcNAc-6P und ManNAc-6P die Bindung von NanR an die DNA aufheben. Somit sind beide Moleküle Effektoren von NanR, wobei GlcNAc-6P eine fünfmal höhere Affinität ausweist (Abb. 3.38 und Abb. 3.39). Über einen EMSA konnte auch in *S. aureus* ManNAc-6P als Effektor von NanR identifiziert werden (Olson *et al.*, 2013). Für NanR aus *V. vulnificus* existiert eine Kristallstruktur, in der die Bindung von ManNAc-6P an das Protein sehr anschaulich dargestellt ist (Hwang *et al.*, 2013). Auch dort wird die Transkription der *nan*-Gene durch ManNAc-6P induziert (Kim *et al.*, 2011). In *E. coli* dagegen ist Neu5Ac als Effektor von NanR beschrieben (Kalivoda *et al.*, 2003).

Die Tatsache, dass in *C. glutamicum* zwei Effektoren von NanR gefunden wurden lässt sich wie folgt erklären: Zum einen sind GlcNAc-6P und ManNAc-6P strukturell sehr ähnliche Diastereomere, wodurch eine Bindung an das gleiche

Molekül wahrscheinlich ist. Der andere Grund ist in den von NanR regulierten Genen zu suchen. Für den Abbau von GlcNAc-6P sind die Gene *nagAB* essentiell. Da es in *C. glutamicum* neben NanR keinen anderen Regulator dieser Gene gibt, ist deren Induktion durch GlcNAc-6P nötig, wenn dieses Substrat nicht durch den Abbau von Neuraminsäure in die Zelle gelangt. In *E. coli* oder *S. coelicolor* werden die *nag*-Gene durch einen spezifischen Repressor (NagC bzw. DasR) reguliert, dessen Effektor ebenfalls GlcNAc-6P ist (Plumbridge, 1991; Swiatek *et al.*, 2012). In *C. glutamicum* übernimmt NanR diese Funktion, die durch GlcNAc-6P kontrolliert wird. Der Effektor ManNAc-6P ist vor allem dann von Bedeutung, wenn Neuraminsäure umgesetzt wird, wozu auch die *nan*-Gene benötigt werden.

#### 4.1.7 Einfluss der *nanR*-Deletion auf das Wachstum mit Glucose

Die Deletion von *nanR* führt in *C. glutamicum* zu einer ca. 30 % geringeren Wachstumsrate auf Glucose als im Wildtyp. Andere Substrate, deren Katabolismus über die gleichen Stoffwechselintermediate führt, zeigten keinen veränderten Phänotyp. Die Wachstumsraten mit Fructose, Saccharose und Maltose waren in *C. glutamicum*  $\Delta nanR$  genau so hoch wie im Wildtyp (Abschnitt 3.3.2). Die Aktivität der zentralen Stoffwechsellzyme ist daher nicht von der Deletion betroffen (Abb. 4.3).



**Abb. 4.3 Übersicht zentraler Stoffwechselwege in *C. glutamicum* (Blombach und Seibold, 2010).** Die durchgezogenen Linien zeigen Reaktionen, die in *C. glutamicum*  $\Delta nanR$  aufgrund eines unveränderten Wachstumsphänotyps auf den jeweiligen Substraten nicht beeinflusst sind. Die gestrichelten Linien stellen die verbleibenden Reaktionen dar, die für Glucose und Glucosamin spezifisch sind. Fda: Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase, Glk: Glucose-Kinase, MalQ: 4 $\alpha$ -Glucanotransferase, MUS: ABC-Transporter für Maltose, NagB: Glucosamin-6-phosphat-Deaminase, PfkA: 6-Phosphofructo-Kinase-1, PfkB: 6-Phosphofructo-Kinase-2, Pgi: Glucose-6-phosphat-Isomerase, ScrB: Saccharose-6-phosphat-Hydrolase.

So kann nur der gemeinsame Importer  $\text{PTS}^{\text{Glc}}$  der limitierende Faktor beim Wachstum mit Glucose sein. Diese Hypothese konnte allerdings durch Messung der Glucoseaufnahme und durch die unveränderte Expression von *ptsG* im Northern Blot (Abb. 3.27) nicht bestätigt werden. In Anwesenheit von Glucose liegt die EIIA-Domäne von  $\text{PTS}^{\text{Glc}}$  im unphosphorylierten Zustand vor. Der Einfluss des Phosphorylierungszustandes von  $\text{EIIA}^{\text{Glc}}$  auf die Regulation des Kohlenstoffmetabolismus in *C. glutamicum* ist bisher nicht gut untersucht. In gramnegativen Mikroorganismen hingegen ist er ein entscheidendes Signal für die Katabolitrepression (Deutscher *et al.*, 2006). In *C. glutamicum* gibt es Hinweise darauf, dass phosphoryliertes  $\text{EIIA}^{\text{Glc}}$  die Aufnahme anderer PTS-Substrate inhibiert (Petrov, 2011). Der zugrunde liegende Mechanismus wird derzeit untersucht.

In *C. glutamicum*  $\Delta\text{nanR}$  sind die Gene des Neuraminsäureimporters hochreguliert. Interessanterweise führte die Überexpression dieser Gene im Wildtyp ebenfalls zu einem schlechteren Wachstum mit Glucose (Daten nicht gezeigt). Ein Zusammenhang zwischen der Neuraminsäure- und der Glucoseaufnahme konnte bisher nicht gefunden werden. Dass andere Gene des Zentralstoffwechsels betroffen sind, ist jedoch unwahrscheinlich, da *C. glutamicum*  $\Delta\text{nanR}$  keinen veränderten Phänotyp beim Wachstum mit anderen Substraten zeigte. Ein Microarray könnte Aufschluss über das schlechte Wachstum von *C. glutamicum*  $\Delta\text{nanR}$  auf Glucose geben. Die vorhandenen Daten stammen jedoch aus Zellen, die im Komplexmedium kultiviert wurden (Tab. 7.2). Daraus konnte kein Kandidat ermittelt werden, der Einfluss auf den Stoffwechsel von Glucose nimmt. Allerdings sind in *C. glutamicum*  $\Delta\text{nanR}$  zwei putative Transkriptionsregulatoren hochreguliert (*cg2746* und *cg2942*), deren Funktion bisher unbekannt ist. Letzterer befindet sich in unmittelbarer Nähe zum *nag/nan*-Cluster.

## 4.2 Biotechnologische Nutzung von Aminosuktern

### 4.2.1 Glucosamin als Substrat zur Lysin-Produktion

In *C. glutamicum* WT konnten zwei Faktoren bestimmt werden, die zum besseren Wachstum mit Glucosamin als einziger Kohlenstoffquelle führten: Die plasmidvermittelte Überexpression von *nagB* und die Deletion von *nanR*. Beide Faktoren wurden in Lysin-Produktionsstämmen angewandt, um gezielt eine verbesserte Nutzung von Glucosamin zu erreichen. In beiden Fällen konnte der Umsatz von Glucosamin und die Produktivität des Prozesses verbessert werden. Die Produktausbeute war jeweils genau so hoch, wie bei den Fermentationen, in denen

zum Vergleich Glucose als Kohlenstoffquelle verwendet wurde (Tab. 3.2 und Abb. 3.41). Durch den gezielten Eingriff in den Aminoszuckermetabolismus konnte die Aktivität von NagB gesteigert werden, wodurch eine effektive Nutzung der alternativen Kohlenstoffquelle Glucosamin möglich wurde. Außerdem konnte gezeigt werden, dass auch die Aminogruppe von Glucosamin direkt in den Stoffwechsel eingeht und sogar als einzige Stickstoffquelle für das Wachstum ausreichend war (Abb. 3.13). Ein Vorteil, der insbesondere bei der Produktion von Aminosäuren zum Tragen kommt, da für deren Synthese Stickstoff benötigt wird. Die Coverstoffwechslung von Glucosamin mit anderen Kohlenstoffquellen war ebenfalls durch die geringe Aktivität von NagB limitiert, wobei die Ursache offenbar die Akkumulation von GlcN-6P war. Dieses Problem konnte durch die Deletion von *nanR* umgangen werden (Abb. 3.42). Dennoch gibt es Beschränkungen bei der gemeinsamen Verstoffwechslung von Glucosamin und Glucose. Beide Substrate konkurrieren um den gleichen Transporter, PTS<sup>Glc</sup>, wobei dieser gegenüber Glucose eine wesentlich höhere Affinität zeigt. Die Folge ist eine konsekutive Verstoffwechslung, bei der Glucose zuerst aufgenommen wird. Dies stellt insbesondere bei Fed-Batch-Fermentationen ein Problem dar, weil in diesem Fall große Mengen an Glucosamin ungenutzt im Medium zurück blieben. Bei Fermentationen im Batch-Verfahren stellt die konsekutive Verstoffwechslung kein Problem dar, da keine Diauxie beobachtet werden konnte (Abb. 3.16). Ohne ein anderes Aufnahmesystem ist das Batch-Verfahren daher die beste Lösung zur gemeinsamen Nutzung von Glucosamin und Glucose als Kohlenstoffquellen.

### 4.2.2 N-Acetylglucosamin als Substrat für die Lysin-Produktion

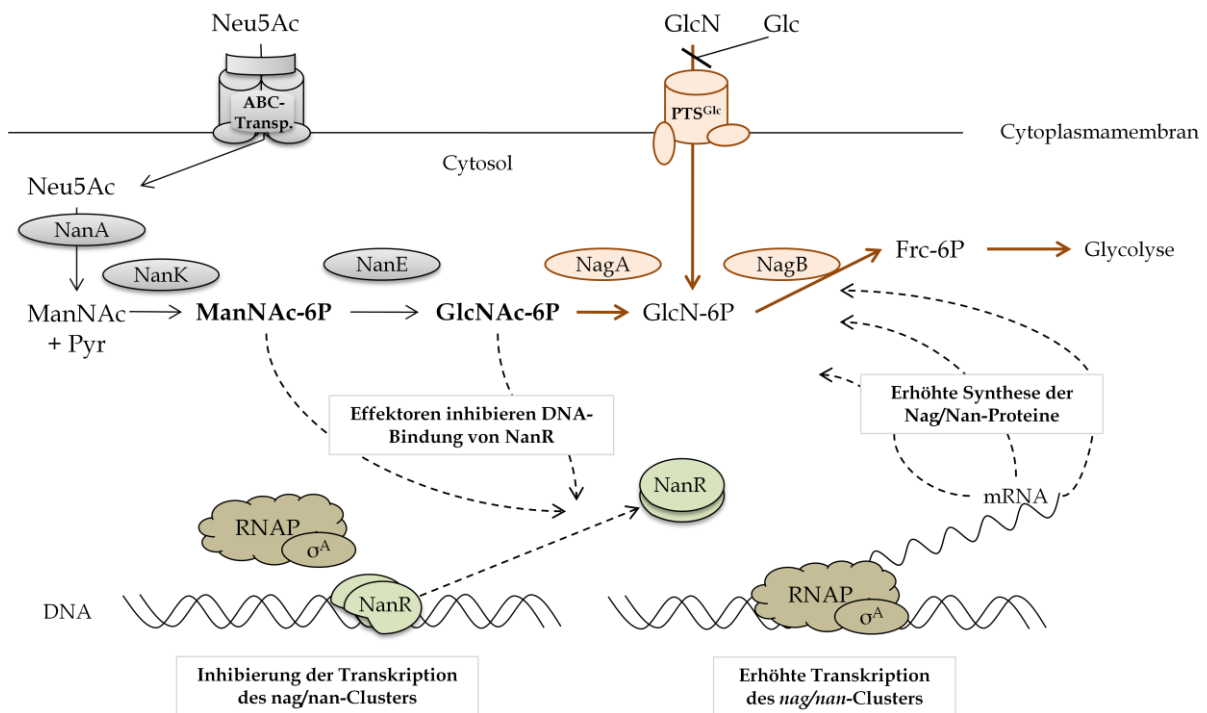
Durch den fehlenden Transporter für GlcNAc in *C. glutamicum* kann der Organismus dieses Substrat nicht zum Wachstum nutzen. Aus diesem Grund wurde der GlcNAc-Transporter aus *C. glycinophilum* heterolog exprimiert, der auch später in einem Lysin-Produktionsstamm zur Anwendung kam. Dabei handelt es sich um NagE, einem Transporter vom PTS-Typ. Die Aufnahmeraten von NagE waren mit ca.  $1 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  sehr gering, wodurch auch nur geringe Wachstumsraten erzielt werden konnten. Die Expression des gesamten *nagEBA*-Operons führte zwar zu einer viermal höheren Aufnahmerate, die dennoch wachstumslimitierend ist (Abb. 3.20). Der Grund für die schnellere Aufnahme von GlcNAc ist die enge Verknüpfung von Zentralstoffwechsel und PTS-abhängiger Substrataufnahme. Die Energie dieses aktiven Imports stammt von Phosphoenolpyruvat (PEP), dessen Phosphatgruppe über die Enzyme EI und HPr auf den Transporter und schließlich auf das importierte

Substrat übertragen wird. Durch die Expression des *nagEBA*-Operons wurden auch die Enzyme NagA und NagB stärker exprimiert, die GlcNAc in den Zentralstoffwechsel einspeisen, wodurch PEP schneller wieder erzeugt werden kann. Ein weiterer Grund für die vergleichsweise geringe Aktivität des rekombinanten NagE kann auf die Phosphorylierung durch die Enzyme EI und HPr zurückzuführen sein. Es wurden nicht die heterologen Enzyme aus *C. glycinophilum* verwendet. Möglicherweise haben EI und HPr aus *C. glutamicum* eine geringere Affinität zum heterologen NagE als zu den homologen PTS-Varianten, wodurch die Aufnahme nur gering ist. Weiterhin kann auch ein unterschiedlicher Codongebrauch von *C. glutamicum* und *C. glycinophilum* die Aktivität des heterologen NagE beeinflussen. Das Startcodon von *nagE* ist GTG. In *C. glutamicum* wird dieses Codon häufig in schwach exprimierten Genen gefunden, während ATG eher in stark exprimierten Genen vorkommt (Liu *et al.*, 2010). Momentan wird daran gearbeitet das Startcodon von *nagE* durch ATG zu ersetzen. Damit konnten bereits bessere Wachstumsraten erzielt werden (Christian Matano, persönliche Mitteilung).

Bei der Anwendung des heterologen Transporters in Lysin-Produktionsstämmen wurde allerdings mit dem ursprünglichen Startcodon gearbeitet. Um das Problem der geringen Wachstumsraten zu umgehen, wurde GlcNAc nicht als einzige Kohlenstoffquelle verwendet, sondern zusätzlich die gleiche Menge Glucose. Die Wachstumsraten auf dem Mischsubstrat sind genau so hoch, wie bei Zellen, die allein auf Glucose kultiviert wurden. Nach dem Glucoseverbrauch stagnierte das Wachstum, wobei anschließend interessanterweise deutlich mehr Lysin gebildet wurde. Im Mischsubstrat war die Lysin-Ausbeute um 30 % erhöht, die Biomasse hingegen um 30 % niedriger. GlcNAc wird also deutlich besser dem Syntheseweg des Produktes zugeführt und weniger zum Wachstum genutzt. Stagnierende Wachstumsraten haben häufig einen positiven Einfluss auf die Produktbildung. Der in der vorliegenden Arbeit erzeugte Stamm DM1868  $\Delta nanR$  hatte bei ebenfalls geringeren Wachstumsraten auf Glucose eine höhere Lysinausbeute als vor der Deletion von *nanR*. Dieser Effekt wird in biotechnologischen Prozessen zum Teil gezielt herbeigeführt. Beispielsweise wurde in einem Valin-Produktionsstamm von *C. glutamicum* durch die Inaktivierung des Pyruvatdehydrogenasekomplexes das Wachstum auf Glucose inhibiert. Als Wachstumssubstrat konnte nur Acetat eingesetzt werden. Glucose stellte das Substrat für die Produktsynthese dar (Blombach *et al.*, 2007). Im Fall der Lysin-Produktion mit GlcNAc stellt Glucose das Substrat zur Biomassebildung dar, während GlcNAc hauptsächlich zur Produktbildung genutzt wird.

### 4.3 Schlussbetrachtung

*C. glutamicum* ATCC 13032 kann die Aminosucker Glucosamin und Neuraminsäure als Kohlenstoffquellen zum Wachstum nutzen. Damit Glucosamin in den Zentralstoffwechsel gelangt, ist die Expression von *ptsG*, *ptsI* und *ptsH* nötig, deren Genprodukte den Substratimport und die gleichzeitige Phosphorylierung katalysieren, sowie die Expression von *nagB*, dessen Genprodukt die Deaminierung zu Fructose-6-phosphat katalysiert. Der Import der Neuraminsäure ist von der Expression der Gene *cg2937-40* abhängig, die einen ABC-Transporter kodieren (Gruteser *et al.*, 2012). Außerdem werden die Genprodukte von *nanAKE* und *nagAB* benötigt, damit Neuraminsäure ebenfalls über Fructose-6-phosphat in den Zentralstoffwechsel gelangt (Abb. 4.4). Die Regulation der Gene des PTS-Importers erfolgt über Masterregulatoren wie z.B. SugR (Engels und Wendisch, 2007), GlxR (Kohl und Tauch, 2009), GntR1 und GntR2 (Frunzke *et al.*, 2008). Sie stellte beim Wachstum mit Glucosamin allerdings keinen limitierenden Faktor dar. Jedoch konnte in Anwesenheit von Glucose der Glucosamin-Import signifikant inhibiert



**Abb. 4.4 Schema zur Regulation des Aminosuckermetabolismus in *C. glutamicum*.**

NagA: N-Acetylglucosamin-6-phosphat-Deacetylase, NagB: Glucosamin-6-phosphat-Deaminase, NanA: N-Acetylneuraminat-Lyase, NanE: N-Acetylmannosamin-6-phosphat-Epimerase, NanK: N-Acetylmannosamin-Kinase, NanR: Transkriptionsrepressor der *nan*-Gene, PTS<sup>Glc</sup>: PTS-Importer für Glucosamin, RNAP: RNA-Polymerase mit Sigma-Faktor  $\sigma^A$ .

werden, was auf die höhere Affinität von PTS<sup>Glc</sup> zur Glucose zurückzuführen ist. Limitiert wurde das Wachstum mit Glucosamin durch die geringe Expression von *nagB*. Der Regulator des *nagAB-scrB*-Operons ist NanR. Aufgrund seiner Primärstruktur konnte NanR zu den Transkriptionsregulatoren der GntR-Familie zugeordnet werden. Diese Regulatoren haben ein konserviertes *Helix-Turn-Helix*-DNA-Bindemotiv im N-terminalen Bereich (Rigali *et al.*, 2002). Transkriptionsfaktoren mit einem HTH-Motiv binden in der Regel als Dimere an die DNA (Pabo und Sauer, 1992). In *C. glutamicum* konnten zwei Bindestellen von NanR identifiziert werden, die sich im Promotorbereich von *nagAB-scrB* und *cg2937-40* befinden. Dadurch wird die Bindung der RNA-Polymerase an die DNA und die darauf folgende Initiierung der Transkription inhibiert. Auch die Expression der divergenten Operone *nanAKE* und *nanRP* wird durch NanR inhibiert. Der C-terminale Bereich von NanR enthält eine Substratbindedomäne, an die Effektoren binden können. Dadurch wird die Bindung von NanR an die DNA inhibiert und die Transkription wird initiiert. In *C. glutamicum* sind diese Effektoren GlcNAc-6P und ManNAc-6P. Sie entstehen bei Abbau der Neuraminsäure. Daher ist die Expression des *nag/nan*-Clusters nur beim Wachstum mit Neuraminsäure erhöht, nicht aber beim Wachstum mit Glucosamin. Die Regulation der *nan*- und *nag*-Gene durch den gleichen Transkriptionsfaktor ist in Bakterien eine Ausnahme. Dieser Regulationsmechanismus erklärt jedoch, warum in *C. glutamicum* die Expression von *nagB* beim Wachstum mit Glucosamin nicht induziert wird und die Zellen nur langsam wachsen. Außerdem lässt sich der Grund für die *lag*-Phase beim Wachstum mit Neuraminsäure ableiten. Die Effektoren ManNAc-6P und GlcNAc-6P entstehen erst nach der Aufnahme und zwei bzw. drei enzymatischen Umwandlungen von Neuraminsäure. In *E. coli* ist die Neuraminsäure selbst der Effektor von NanR (Kalivoda *et al.*, 2003).

## 5 Methoden

### 5.1 Bakterienstämme, Plasmide und Kultivierung

#### 5.1.1 Bakterienstämme

Tab. 5.1 Verwendete Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle
<i>E. coli</i>		
DH5 $\alpha$	<i>endA1 supE44 thi-1 <math>\lambda</math>-recA1 gyrA96 relA1 deoR <math>\Delta</math>(lacZYA-argF) U196 <math>\phi</math>80DlacZ <math>\Delta</math>M15mcrA <math>\Delta</math>(mmr hsdRMS mcrBC)</i>	(Grant <i>et al.</i> , 1990)
<i>C. glutamicum</i>		
ATCC 13032	Wildtyp	
DM1868	<i>lysCT311I</i>	Evonik, Halle
DM1868 $\Delta$ <i>nanR</i>	DM1868 mit Deletion von <i>cg2936 (nanR)</i>	diese Arbeit
DM1946	Patentstamm, Zufallsmutagenese	(Nakayama, 1973)
$\Delta$ <i>hpr</i>	Wildtyp mit Deletion von <i>hpr</i>	(Lindner <i>et al.</i> , 2011)
$\Delta$ <i>nanK</i>	Wildtyp mit Deletion von <i>cg2932 (nanK)</i>	diese Arbeit
$\Delta$ <i>nanR</i>	Wildtyp mit Deletion von <i>cg2936 (nanR)</i>	diese Arbeit
$\Delta$ <i>nanR</i> _A1	Suppressormutante von $\Delta$ <i>nanR</i> (Wachstum Neu5Ac)	diese Arbeit
$\Delta$ <i>ptsF</i>	Stamm RES167 mit Deletion von <i>ptsF</i>	(Gaigalat, 2001)
$\Delta$ <i>ptsG</i>	Wildtyp mit Deletion von <i>ptsG</i>	(Henrich <i>et al.</i> , 2013)
$\Delta$ <i>scrB</i>	Wildtyp mit Deletion von <i>scrB</i>	(Engels <i>et al.</i> , 2008)
IM <i>ptsS</i>	Wildtyp mit Insertion in <i>ptsS</i>	(Uhde <i>et al.</i> , 2013)
IM <i>ptsX</i>	Wildtyp mit Insertion in <i>ptsX</i>	(Uhde <i>et al.</i> , 2013)
M4	Spontanmutation des WT beim Wachstum mit GlcN	(Uhde <i>et al.</i> , 2013)
<i>C. glycinophilum</i>		
ATCC 21346	Wildtyp	

#### 5.1.2 Plasmide

Tab. 5.2 Verwendete Plasmide

Name	Beschreibung	Quelle
pASK_IBA3	Expressionsvektor: <i>ColE1;ApR;pTET</i>	(Skerra, 1994)
pASK_IBA3_ <i>nanR</i>	kodiert <i>nanR</i> aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pDrive	Shuttlevektor: <i>KanR, lacZ</i>	Qiagen, Hilden
pDrive_IM <i>ptsS</i>	kodiert ~ 500 bp von <i>ptsS</i> aus <i>C. glutamicum</i>	(Uhde <i>et al.</i> , 2013)
pDrive_IM <i>ptsX</i>	kodiert ~ 500 bp von <i>ptsX</i> aus <i>C. glutamicum</i>	(Uhde <i>et al.</i> , 2013)
pEKEx2	Expressionsvektor: <i>KanR, oriVE. c., oriVC. g., Ptac, laqIq</i>	(Eikmanns <i>et al.</i> , 1991)
pEKEx2_ <i>nagEBA</i>	kodiert <i>nagEBA</i> aus <i>C. glycinophilum</i>	diese Arbeit
pEKEx2_ <i>nagE</i>	kodiert <i>nagE</i> aus <i>C. glycinophilum</i>	diese Arbeit
pEKEx2_ <i>nanK</i>	kodiert <i>nanK (cg2932)</i> aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pEKEx2_ <i>nanR</i>	kodiert <i>nanR (cg2936)</i> aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pEKEx2_ <i>SBP</i>	kodiert <i>cg2937</i> aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pEKEx2_ <i>ABC<sub>Neu5Ac</sub></i>	kodiert <i>cg2937-cg2940</i> aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pEPR1	Reportergenvektor; <i>KanR, gfp, oriVE, oriVC</i>	(Knoppova <i>et al.</i> , 2007)
pEPR1_ <i>nagAB</i> _wt	enthält Promotorbereich von <i>nagA</i> aus <i>C. glutamicum</i>	(Uhde <i>et al.</i> , 2013)
pEPR1_ <i>nagAB</i> _M4	enthält Promotorbereich von <i>nagA</i> aus <i>C. glut.</i> M4	(Uhde <i>et al.</i> , 2013)



## Methoden

---

pEPR1_ <i>nanR</i>	enthält Promotorbereich von <i>nanR</i> aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pEPR1_ABC <sub>Neu5Ac</sub>	enthält Promotorbereich von <i>cg2937</i> aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pEPR1_ <i>nanA</i>	enthält Promotorbereich von <i>nanA</i> aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pEPR1_ <i>nanH</i>	enthält Promotorbereich von <i>nanH</i> aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pK19mobsacB	Deletionsvektor, KanR, oriVE.c., oriT, mob, sacB	(Schafer <i>et al.</i> , 1994)
pK19mobsacB_ <i>nanK</i>	Zur Deletion von <i>cg2932 (nanK)</i> aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pK19mobsacB_ <i>nanR</i>	Zur Deletion von <i>cg2936 (nanR)</i> aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pVWEx1	Expressionsvektor: <i>SpecR, oriVE. c., oriVC. g., Ptac, laqlq</i>	(Peters-Wendisch <i>et al.</i> , 2001)
pVWEx1_ <i>nagAB</i>	kodiert <i>nagAB-scrB</i> Operon aus <i>C. glutamicum</i>	dieser Arbeit

### 5.1.3 Medien

Die angegebenen Medien und Medienzusätze wurden durch autoklavieren oder mikrofiltrieren sterilisiert. Für die Herstellung von Agar-Platten wurden dem Medium 15 g/l Agar zugesetzt.

#### LB

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

#### BHI

37	g/l	Brain Heart Infusion (Bacto™, Hamburg)
----	-----	--

#### CGXII

20	g/l	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
5	g/l	Harnstoff
1	g/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1	g/l	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
42	g/l	MOPS (3-[ <i>N</i> -Morpholino]-Propansulfonsäure)

Einstellen eines pH-Wertes von 7,0 mit NaOH

Zu 1 Liter Medium wurden vor der Verwendung folgende Lösungen hinzugegeben.

10	ml	MgSO <sub>4</sub> (25 g/l)
10	ml	CaCl <sub>2</sub> (1 g/l)
1	ml	Biotin (0,2 g/l)
1	ml	Protocatechuate (300 g/l, gelöst in 10 N NaOH)
1	ml	Spurenelemente CGXII

#### Spurenelemente CGXII (1000 x Stammlösung)

10	g/l	FeSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O
10	g/l	MnSO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O
1	g/l	ZnSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O
200	mg/l	CuSO <sub>4</sub>
20	mg/l	NiCl <sub>2</sub> × 6 H <sub>2</sub> O

Einstellen eines pH-Wertes von 1,0 mit konzentrierter HCl

### Antibiotika und IPTG (Endkonzentrationen)

25 mg/l	Kanamycin
50 mg/l	Chloramphenicol
50 mg/l	Carbenicillin
0,1 mM	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)

### 5.1.4 Kultivierung von Mikroorganismen

Einzelkolonien von *C. glutamicum* wurden über Nacht in BHI-Medium bei 30 °C kultiviert. Diese Vorkultur wurde mit dem Medium der Hauptkultur (CGXII-Salze ohne Zusätze) gewaschen. Anschließend wurde die Hauptkultur inokuliert und im Schüttelkolben bei 30 °C kultiviert.

Fermentationen von *C. glutamicum* im 1,5l Maßstab wurden Bioreaktor Biostat B (Sartorius BBI Systems, Melsungen) bei 30 °C durchgeführt. Dabei wurde ein modifiziertes CGXII-Medium verwendet, welches kein MOPS, die doppelte Menge Kaliumphosphatpuffer und nur 5g/l Ammoniumsulfat enthielt. Der pH-Wert wurde während der Fermentation mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und KOH bei 7,0 gehalten. Die Begasung erfolgte mit sterilfiltrierter Raumluft bei konstanten 1,3 l/min. Für eine minimale Gelöstsauerstoffkonzentration von 20 % wurde die Drehzahl des Rührers sukzessive erhöht.

*E. coli* wurde in LB-Medium bei 37 °C im Reagenzglas kultiviert.

### 5.1.5 Bestimmung der optischen Dichte und Biotrockenmasse

Die Messung der optischen Dichte erfolgte am Spektrophotometer (Ultraspec 2100 pro, GE Healthcare, Cambridge) bei einer Wellenlänge von 600 nm. Die Proben wurden entsprechend mit 0,9 % NaCl verdünnt.

Die Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) erfolgte mittels einer Standardreihe. Von Standards mit unterschiedlichen optischen Dichten wurden die Biotrockenmasse bestimmt. Dazu wurden die Proben mit Glasfaserfiltern (Typ F, Millipore, Eschborn) filtriert. Der Filter wurde in einer Mikrowelle bei maximaler Leistung getrocknet und anschließend 1 h in einem Exikator gelagert. Aus der Gewichts Differenz des Filters vor und nach dem Auftragen der Probe, wurde die Biotrockenmasse pro Volumen ermittelt. Aus der Standardreihe ergab sich für *C. glutamicum* der Faktor 0,42 mg\*ml<sup>-1</sup>\*OD<sub>600</sub><sup>-1</sup>.

### 5.1.6 Zellaufschluss

Vor dem Zellaufschluss wurden die Zellpellets (*E. coli* oder *C. glutamicum*) in einem der Anwendung entsprechenden Puffer resuspendiert.

Der Zellaufschluss von *C. glutamicum* erfolgte mittels French Press (SLM Aminco, Rochester). Die Zellen wurden in drei Durchläufen bei ca. 4°C und einem konstanten Druck von 1200 psi desintegriert.

*E. coli* wurde mittels Ultraschall aufgeschlossen (Branson Sonifier 250, G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd). Dabei wurden die Zellen permanent auf Eis gehalten. Im Abstand von 2 min wurden drei Zyklen á 30 s bei maximaler Leistung durchgeführt.

Nach dem jeweiligen Zellaufschluss wurden die Suspensionen 10 min bei 15000xg, 4°C zentrifugiert (Avanti Centrifuge J25 Rotor JA25.50, Beckman Coulter, Krefeld).

## 5.2 Molekularbiologische Methoden

### 5.2.1 Oligonukleotide

Tab. 5.3 Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz 5' → 3'	Beschreibung
16	TGCCGTCTAGAAACTTGACG	Bindestelle v. NanR
27	GCTTCAGGATCCACGACAGTCGATATGATCAG	Bindestelle v. NanR
31	TCGACGCCACCATTGATGAG	Bindestelle v. NanR
32	GAGAAAGCCATCAATCACCC	Bindestelle v. NanR
34	AGGACGTATGATGTCTTATG	Bindestelle v. NanR
36	CGGATTTAGGTTAATTATCTTC	Bindestelle v. NanR
37	GCCATGCATAGGCCGTGAGTTGAATTGTG	Bindestelle v. NanR
38	GCGGGATCCTTAGTCGCGCACTGCTTCTTGAG	Bindestelle v. NanR
68	CAACAGATCTTGCCCAGGTG	<i>nagAB-scrB</i> -Operon
69	CACGAACTGACTCGCTAGTG	<i>nagAB-scrB</i> -Operon
70	GATGGAACGGTCGATCTAGC	<i>nagAB-scrB</i> -Operon
71	CAAGGTTCCGCCCTTAGTTG	<i>nagAB-scrB</i> -Operon
72	GAGCAAGAAGTCGGCAAAGC	<i>nagAB-scrB</i> -Operon
73	TCGAGCGTTGTCCTCCACAG	<i>nagAB-scrB</i> -Operon
74	GAGCCATCATCTTCTCTGTC	<i>nagAB-scrB</i> -Operon
75	AGCATCCATCCAGGTCATAG	<i>nagAB-scrB</i> -Operon
98	GCGGTGTCATTGAATTGCTG	Bindestelle v. NanR
99	ATCAGACATCAGACGTTTAG	Bindestelle v. NanR
100	CAGAAAATGCACATTTACTTACC	Bindestelle v. NanR
ABC_fwd_SbfI	GCTACCTGCAGGAGGAGATATAACCATGAGCACCACGATTACTC	Klonierung <i>cg2937-40</i>
ABC_rev_HIS	CTAATGGTGATGATGGTGATGCAAACGAGTTTTGTTTCAGCAG	Klonierung <i>cg2937-40</i>
ABC_SBP_fwd	GGCGAATTCATCAAGCTGGCGCCACCTGGGAAGTCTCGGTTTCAGTAGTTGCAACACCTG	Klonierung <i>cg2937</i>
<i>cg2937_fwd_BamHI</i>	GCTGGATCCGGTTGCTCGGAGGAAATTGC	<i>Cg2937</i> GFP
<i>cg2937_rev_NsiI</i>	GCTCATGCATCGTCTGATGTCTGATGTA	GFP mit Promotor
<i>cg2937_rev2_NsiI</i>	GCTCATGCATACCTGCAAGTTTCTAGACGG	GFP ohne Promotor
D_nanR_P1	CGTATGCTGCAGTGGTGGTCATTGGGTCGTAG	Deletion <i>nanR</i>
D_nanR_P2	TGTTTAAAGTTTAGTGGATGGGGTTCACITCCTAATCTGGAG	Deletion <i>nanR</i>
D_nanR_P3	CCCATCCACTAAACTTAAACAGCTCACTACGCGCCGTTTCG	Deletion <i>nanR</i>
D_nanR_P4	CTTGACCCGGGAATATCGGTGATGTGGCCATCG	Deletion <i>nanR</i>
D_nanR_fwd	TGCCGTCTAGAAACTTGACG	Kontrolle $\Delta nanR$

## Methoden

---

D_nanR_rev	AATGAGGCTAGTGCGCATCG	Kontrolle $\Delta nanR$
D_ROK_P1	GCCTTGATGCATATCCCAGTGTGCGGTCACCT	Deletion <i>nanK</i>
D_ROK_P2	TGTTTAAAGTTTAAAGTGGATGGGTGAGGTGTGGGCCTTAAGCGG	Deletion <i>nanK</i>
D_ROK_P3	CCCATCCACTAAACTTAAACAGTTCTCAACACAGGAGTTTC	Deletion <i>nanK</i>
D_ROK_P4	GTTAGCCCGGGTTCGCGGAGGCAATCGAAATC	Deletion <i>nanK</i>
D_ROK_fwd	CTTTCTACACCCGCACCCAC	Kontrolle $\Delta nanK$
D_ROK_rev	CGCGTTGGCACCAATGAGAC	Kontrolle $\Delta nanK$
IBA_nanR_BamHI_fwd	GCTTCAGGATCCACGACAGTCGATATGATCAG	Reinigung NanR
IBA_nanR_PstI_rev	GCTTACTGCAGGTGCGCATCGAGCATGTTGG	Reinigung NanR
nagEA-Glycino-fo	ATGCATCGGTCTGCCACGATCCTC	Klonierung <i>nagEBA</i>
nagEA-Glycino-re	GAATTCGTGCCGCGTTCGTTGTCC	Klonierung <i>nagEBA</i>
nagE_rev_EcoRI	GCACTGAATTCCGCTGCCTACTTCTTCTTGG	Klonierung <i>nagE</i>
nanA_fwd_BamHI	GGTAGGATCCGATCACGCCGGTCAAAGTTG	nanH GFP
nanA_rev_Nsil	GGTAATGCATTAGGACGTATGATGCTTATG	nanH GFP
nanR_fwd_SbfI_AU	GCTACCTGCAGGACGACAGTCGATATGATCAG	Expression <i>nanR</i>
nanR_rev_BamHI_AU	CTCAGGATCCAATGAGGCTAGTGCATCG	Expression <i>nanR</i>
nanR_shift_fwd	TCGACGCCACCATGATGAG	EMSA <i>nagAB-scrB</i>
nanR_shift_rev	GAGAAAGCCATCAATCACCC	EMSA <i>nagAB-scrB</i>
pROK_PstI_fwd	GGTGCTGCAGTAAGGCCACACCTCATGAC	Expression <i>nanK</i>
pROK_BglII_rev	GCTCAGATCTACTCCTGTGTTGAGAACAGC	Expression <i>nanK</i>
Sial_Shift_fwd	GCCTCTAGATTCCACGCCGTTCTTCTAC	EMSA
Sial_Shift_rev	CGCGGATCCTTATTCGCTGATGCTTGCTGTTG	EMSA <i>nanH</i>

### 5.2.2 Herstellung und Transformation elektrokompenter *C. glutamicum*

#### BHIS

BHI-Medium + 0,5 M Sorbitol

#### TG-Puffer

1 mM Tris pH 7,5

in 10 % Glycerol

Für die Vorkultur wurden 50 ml BHIS mit einem Einzelklon des jeweiligen *C. glutamicum*-Stammes inokuliert und über Nacht bei 30 °C und 125 rpm inkubiert. Die Hauptkultur (100 ml BHIS) wurde mit einer OD<sub>600</sub> von ~ 0,2 gestartet und unter denselben Bedingungen kultiviert. Nach dem Erreichen einer OD<sub>600</sub> von ~ 1,8 wurden die Zellen auf 4 °C abgekühlt. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis bzw. bei 4 °C. Die Zellen wurden geerntet (4000 rpm, 10 min, Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg), zweimal mit TG-Puffer und anschließend zweimal mit 10 % Glycerol gewaschen. Schließlich wurden die Zellen in 1,5 ml 10 % Glycerol resuspendiert und zu 150 µl aliquotiert. Nach dem Einfrieren in flüssigem Stickstoff erfolgte die Lagerung bei -80 °C.

Zur Transformation von *C. glutamicum* wurden 1,5 µg Plasmid-DNA zu einem Zell-Aliquot gegeben. Die Transformation erfolgte in 2 mm Elektroporations-Küvetten (Bio-Budget, Krefeld) bei 2,5 kV; 600 Ω und 2,5 µF im Micro Pulser™ (Bio-Rad, München). Anschließend wurden die Zellen mit 800 µl BHIS aus den Küvetten gespült und 6 min bei 46 °C inkubiert. Nach weiteren 90 min bei 30 °C und 125 rpm wurden die Zellen auf entsprechenden Agar-Platten ausplattiert.

### 5.2.3 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

<b>SOB-Medium</b>	<b>TB-Puffer</b>
20 g/l Trypton	10 mM 1,4-Piperazindiethansulfonsäure (PIPES)
5 g/l Hefeextrakt	15 mM CaCl <sub>2</sub>
0,5 g/l NaCl	250 mM KCl
2,5 mM KCl	55 mM MnCl <sub>2</sub>
10 mM MgCl <sub>2</sub>	

1 ml einer 8 h in LB-Medium gewachsenen Kultur von *E. coli* DH5 $\alpha$  wurden zum Inokulieren von 250 ml SOB-Medium verwendet. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei RT inkubiert und am nächsten Tag bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6 auf 4 °C abgekühlt. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis bzw. bei 4 °C. Die Zellen wurden geerntet (2500 rpm, 10 min, Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg) und in TB-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 20 ml TB-Puffer resuspendiert. Tropfenweise wurden 1,4 ml DMSO hinzugegeben und zu 200  $\mu$ l aliquotiert. Die Lagerung der chemisch kompetenten Zellen erfolgte bei -80 °C.

Zur Transformation wurden zu einem aufgetauten Aliquot ca. 50 ng DNA hinzugegeben. Die Zellen wurden 1 min bei 42 °C inkubiert, anschließend 5 min auf Eis gelagert und mit 400  $\mu$ l LB-Medium versetzt. Nach 1 h bei 37 °C im Schüttler wurden die Zellen auf entsprechenden Selektivmedien ausplattiert.

### 5.2.4 Isolierung genomischer DNA aus *C. glutamicum*

#### **TE-Puffer**

10 mM TRIS  
1 mM EDTA           pH 8,6 mit HCl

10 ml einer dicht gewachsenen Kultur wurden geerntet und in 1 ml TE-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 70  $\mu$ l Lysozym (200 mg/ml) und 100  $\mu$ l RNaseA (2 mg/ml) wurden die Zellen 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach der weiteren Zugabe von 200  $\mu$ l 10 % SDS, 150  $\mu$ l Proteinase K (20 mg/ml) und 3 ml TE-Puffer wurden die Zellen 3 h bei 37 °C inkubiert. Zu der Suspension wurden anschließend 2 ml NaCl (6 M) gegeben. Nach der Zentrifugation (35 min, 4000 rpm, RT, Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg) wurde der Überstand mit dem 2,5fachen Volumen an Ethanol versetzt und über Nacht bei -20 °C gelagert. Das Präzipitat wurde 20 min bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und in 1 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen. Zur Entfernung der verbliebenen Proteine wurde eine Phenol-Chloroform-Reinigung (Roti Phenol/Chloroform, Roth, Karlsruhe) durchgeführt. Die DNA wurde schließlich in 250  $\mu$ l H<sub>2</sub>O gelöst.

### 5.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Polymerase-Kettenreaktionen wurden im Thermocycler TProfessional Basis (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Die Synthese der Oligonukleotide (Primer) wurde bei Eurofins MWG Operon (Ebersberg) in Auftrag gegeben.

Für *präparative Zwecke* wurde die PCR mit der Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) durchgeführt. Als *Template* diente dabei ~0,1 ng/µl gereinigte chromosomale DNA. Hybridisierung-Temperaturen und Elongationszeiten wurden je nach Zielprodukt und verwendetem Primerpaar, nach Angaben des Herstellers berechnet.

Für *analytische Zwecke* wurde eine Kolonie-PCR mit der EconoTaq® PLUS GREEN 2X Master Mix (BioCat GmbH, Heidelberg) durchgeführt. Als *Template* dienten 1 µl einer Einzelkolonie von *E. coli* oder *C. glutamicum*, die in 50 µl Wasser 10 min bei 95 °C inkubiert wurden. Die weitere Durchführung der PCR erfolgte nach Angaben des Herstellers.

### 5.2.6 Klonierungen

Klonierungen wurden mit Hilfe von spezifischen Restriktionsendonukleasen von der Firma Thermo Scientific durchgeführt. PCR-Produkte und entsprechende Vektoren wurden mit diesen Enzymen geschnitten und mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (ebenfalls Thermo Scientific) ligiert. Mit diesen Konstrukten wurden kompetente *E. coli* DH5α transformiert. Die Kontrolle der Klonierung erfolgte über eine Kolonie-PCR mit Vektor-spezifischen Primern und mittels Sequenzierung der Plasmide (GATC Biotech AG, Konstanz).

### 5.2.7 Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Extraktion aus Agarosegelen

#### TAE-Puffer

40 mM TRIS

1 mM Na-EDTA

pH 8,0 mit Essigsäure

Für Nukleinsäuren mit mehr als 500 bp wurden 0,8 % Agarose (Agarose NEEO Ultra-Qualität, Roth, Karlsruhe) in TAE gelöst. Für kleinere Nukleinsäuren wurde ein 2 %iges Gel in TAE hergestellt. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit einem Ladepuffer (6x DNA Loading Dye, Thermo Scientific) versetzt. Die Elektrophorese

erfolgte mit bei einer Spannung von 85 V. Anschließend wurden die Gele in TAE-Puffer mit 2  $\mu$ M Ethidiumbromid gefärbt und unter einem UV-Tisch dokumentiert. Die Extraktion von DNA aus dem Agarosegel erfolgte nach den Angaben eines Kits (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche, Mannheim).

### 5.2.8 Isolierung von Plasmiden

Aus 4 ml einer Kultur von *E. coli* wurden Plasmide nach Angaben eines Kits (High Pure Plasmid Isolation Kit, Roche, Mannheim, Deutschland) isoliert. Bei der Isolierung von Plasmiden aus *C. glutamicum* wurde der Resuspensionspuffer des Kits mit 20 mg/ml Lysozym (Sigma-Aldrich, Stammheim, Deutschland) versetzt und die Probe 2 h bei 37 °C inkubiert. Die anschließende Isolierung erfolgte wieder nach den Angaben des Herstellers.

### 5.2.9 Herstellung von Deletionsmutanten

Deletionsmutanten wurden mit Hilfe des Vektors pK18mobsacB (Schafer *et al.*, 1994) hergestellt. Er vermittelt eine Kanamycinresistenz sowie den zusätzlichen negativen Selektionsmarker Levansucrase (*sacB*), der Saccharose zum toxischen Levan umsetzt. Etwa 500 bp der flankierenden Regionen des zu deletierenden Bereiches wurden mittels overlap extension PCR (Horton *et al.*, 1990) zusammengefügt und in den Vektor kloniert. *C. glutamicum* wurde damit transformiert und auf Kanamycinplatten selektiert (erstes Rekombinationsereignis). Einzelklone wurden anschließend in LB-Medium ohne Selektionsdruck ca. 16 h kultiviert und danach auf LB-Platten mit 10 % Saccharose selektiert (zweites Rekombinationsereignis). Die Kontrolle der Deletion erfolgte mit Primern, die noch außerhalb des Bereiches der zuvor amplifizierten PCR-Produkte lagen, sowie über den Verlust der Kanamycinresistenz.

### 5.2.10 Isolierung von RNA

Die Isolierung von RNA aus *C. glutamicum* erfolgte mit dem Kit Nucleo Spin RNA II (Macherey Nagel, Düren). Abweichend von den Herstellerangaben wurden zum Zellaufschluss, die Zellpellets in 350  $\mu$ l Puffer RA1 und 3,5  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol resuspendiert. Nach der Zugabe von ca. 200  $\mu$ l feinen Glas-Beads (0,1 mm, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) erfolgte der Zellaufschluss im Precellys® 24 (Peqlab

Biotechnologie GmbH, Erlangen) für dreimal 30 s bei 4 °C und 5000 rpm. Der Überstand wurde mit 350 µl 70 % Ethanol versetzt. Die weitere Reinigung der RNA erfolgte analog dem Protokoll des Herstellers.

Zur Kontrolle der Reinheit der Proben, wurde eine PCR durchgeführt mit Primern des jeweiligen Ziel-Gens. Falls noch ein Produkt nachweisbar war, wurde der Ansatz mit 4 U DNaseI (RNase free, Thermo Scientific) behandelt und die RNA über Phenol-Chloroformextraktion mit anschließender Ethanolfällung isoliert.

### 5.2.11 RNA-Slot-Blot

#### *Herstellung der RNA-Sonden*

Es wurden ca. 500 bp lange PCR-Produkte erzeugt, welche spezifisch für die nachzuweisende RNA sind. Die gereinigten PCR-Produkte wurden mit dem T7 Transcriptions Kit (Thermo Scientific) und dem DIG-RNA Labeling Mix (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) zu RNA transkribiert. Anschließend folgte ein DNaseI-Verdau (45 min 37 °C). Die Sonden wurden bei -80 °C gelagert.

#### *Durchführung RNA Nachweises*

<b>20x SSC</b>	<b>Waschpuffer</b>	<b>Detektionspuffer</b>
3 M NaCl	100 mM Maleinsäure	100 mM TRIS
300 mM Na-Citrat	150 mM NaCl	100 mM NaCl
pH 7,0	0,3 % Tween 20	pH 9,5
	pH 7,5 mit NaOH	
<b>10x Blockierungslösung</b>		<b>Prähybridisierungslösung</b>
100 mM Maleinsäure		6 ml 10x Blockierungslösung
100 mM NaCl		7,5 ml 20x SSC
10 % Blockierungsreagenz		15 ml Formamid
(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)		1,5 ml H <sub>2</sub> O
pH 7,5		60 µl 10 % SDS
		300 µl 10 % Na-Lauroylsarcosinat

Eine positiv geladene Nylonmembran (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) wurde auf der Vakuumanlage SHM-48 (Fisher Scientific, Loughborough) mit 2 µg bis 4 µg RNA beladen. Die RNA wurde zuvor in 10x SSC gelöst, und mit Bromphenolblau gefärbt. Nach dem Auftragen der Proben wurde die RNA durch 90 s UV-Bestrahlung an der Membran fixiert. Die beladene Membran wurde 2 h bei 50 °C in der



Prähybridisierungslösung inkubiert. Anschließend wurde 1 µl der RNA-Sonde hinzugegeben und die Membran über Nacht bei 65 °C inkubiert. Es folgten zwei 15minütige Waschschrte mit 2x SSC + 0,1 % SDS bei RT sowie zwei 25minütige Waschschrte mit 0,2x SSC + 0,1 % SDS bei 65 °C. Alle folgenden Schritte wurden bei RT durchgeführt. Die Membran wurde 2 min im Waschpuffer inkubiert und anschließend für 1 h in der 1x Blockierungslösung. Nach der Zugabe vom AntiDig-Alkalische Phosphatase Konjugat (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) im Verhältnis 1:1000 folgte eine Inkubationszeit von 30 min. Danach wurde die Membran dreimal 20 min im Waschpuffer gewaschen und zuletzt 5 min im Detektionspuffer äquilibriert. Für die Detektion wurde 1 ml einer im Detektionspuffer 1:100 verdünnten CSPD-Lösung (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) auf die Membran gegeben und 15 min bei 37 °C inkubiert. Die eigentliche Detektion erfolgte im Luminescent Image Analyzer LAS-1000 (Fuji Photo Film Co., Ltd).

### 5.3 Proteinbiochemische Methoden

#### 5.3.1 Expression und Reinigung von NanR

<b>Waschpuffer</b>	<b>Elutionspuffer</b>
100 mM TRIS	wie Waschpuffer
150 mM NaCl	2,5 mM Desthiobiotin
1 mM EDTA	
pH 8,0 mit HCl	

*NanR* wurde mit Hilfe des Plasmids pASK\_IBA3 in DH5α exprimiert. Dazu wurde aus einer Vorkultur 50 ml LB-Medium inokuliert (Start-OD ~ 0,1). Beim Erreichen einer OD von ca. 0,4 wurde die Expression durch Zugabe von 25 µl Anhydrotetracyclin (2 mg/ml gelöst in Dimethylformamid) induziert. Nach 4 h wurden die Zellen geerntet. Alle weiteren Schritte erfolgten bei 4 °C. Die Zellen wurden in 10 ml Waschpuffer resuspendiert und mit Ultraschall aufgeschlossen.

Zur Reinigung des Proteins wurde der Überstand auf eine mit Waschpuffer äquilibrierte Strep-Tactin® Sepharose® Säule (IBA GmbH, Göttingen) gegeben. Das Säulenvolumen (SV) betrug 1 ml. Die Säule wurde mit 10 SV des Waschpuffers gewaschen. Anschließend wurden das Protein in 6 Fraktionen á 0,5 SV mit dem Elutionpuffer eluiert. Zur Lagerung wurden die gereinigten Fraktionen mit 10 % Glycerol versetzt und bei -20 °C eingefroren.

Die Regeneration der Säule erfolgte mit 5 SV Waschpuffer, dem 1 mM 4-

Hydroxyazobenzene-2-carboxylsäure (HABA) zugesetzt wurde. Schließlich wurde die Säule wieder mit dem Waschpuffer äquilibriert.

### 5.3.2 Proteinquantifizierung

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde die gebrauchsfertige Roti®-Nanoquant-Lösung (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) verwendet. Die Proben wurden nach Angaben des Herstellers vermessen und mittels einer Kalibriergeraden mit definierten Mengen Rinderserumalbumin quantifiziert.

### 5.3.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung

<b>Trenngel</b>	<b>Sammelgel</b>	<b>Laufpuffer</b>	<b>4xSDS-Probenpuffer</b>
12-16 % PAA	5 % PAA	14,4 g/l Glycin	40 % Glycerin
375 mM TRIS	125 mM TRIS	3 g/l TRIS	200 mM TRIS
0,1 % SDS	0,1 % SDS	0,1 % SDS	8 % TRIS
1 ‰ TEMED	1 ‰ TEMED	pH 8,2 mit HCl	4 % $\beta$ -Mercaptoethanol
0,05 % APS	0,05 % APS		0,04 % Bromphenolblau
pH 8,8 mit HCl	pH 6,8 mit HCl		pH 6,8 mit HCl

Die Gelelektrophorese zur Auftrennung von Proteinen erfolgte mit Minigel-Twin-Kammern (Biometra, Göttingen). Je nach Anwendung wurden im Trenngel unterschiedlich Konzentrationen von Polyacrylamid (PAA) verwendet. Vor dem Auftragen der Proben wurde diese mit dem Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95 °C inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte bei maximal 30 mA pro Gel.

Zum Anfärben der Proteine, wurde das Gel zunächst dreimal in der Mikrowelle mit deionisiertem Wasser erhitzt. Beim vierten Mal wurde das Gel mit der Färbelösung (60 mg/l Coomassie Brilliant Blau in 35 mM HCl) erhitzt und 30 min bei RT inkubiert. Zum Entfärben wurde das Gel in kaltem Wasser bei RT inkubiert.

### 5.3.4 Western Blot

<b>Blotpuffer</b>	<b>Waschpuffer</b>	<b>Detektionspuffer</b>
10 mM CAPS	4 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$	100 mM NaCl
10 % Metanol	16 mM $\text{Na}_2\text{PO}_4$	5 mM $\text{MgCl}_2$
pH 11 mit NaOH	115 mM NaCl	100 mM TRIS
	0,1 % Tween 20	pH 9,5 mit HCl

Elektrophoretisch getrennte Proteine wurde mit einer Blotapparatur (Biometra, Göttingen) von PAA-Gelen auf mit Methanol aktivierte PVDF-Membranen (Porengröße 0,45 µm, Millipore, Bedford) übertragen. Bei diesen semi-dry-Verfahren wurden Gel und Membran zwischen Whatmann-Filter gelegt, welche mit Blotpuffer getränkt waren. Nach dem Transfer wurde die Membran 30 min in Waschpuffer mit 3 % BSA inkubiert. Anschließend wurde der Strep-Antikörper (Quiagen, Hilden) im Verhältnis 1:1000 hinzugegeben und die Membran 1 h damit inkubiert. Es folgten vier Waschschrte mit dem Waschpuffer. Danach wurde die Membran in Waschpuffer + 3 % BSA und dem darin 1:10000 verdünnten AP-Maus-Antikörper (Sigma, Deisenhofen) für 1 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen im Waschpuffer wurde die Membran in 10 ml Detektionspuffer äquilibriert. Die Visualisierung der Proteine erfolgte durch Zugabe von 60 µl NBT (0,5 g in 10 ml 70 % DMF) und 60 µl BCIP (0,5 g in 10 ml DMF). Die Reaktion wurde mit H<sub>2</sub>O gestoppt.

### 5.3.5 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

<b>10x TBE</b>	<b>5x Ladepuffer</b>	<b>Trenngel</b>
890 mM TRIS	200 mM TRIS	9 % Polyacrylamid
890 mM Borsäure	1 M KCl	0,1 % APS
20 mM EDTA	20 mM DTT	1 ‰ TEMED
pH 8,0 mit HCl	50 % Glycerol	in 1x TBE
	pH 7,5 mit HCl	

Für den EMSA wurden gereinigte PCR-Produkte mit einer Größe von ca. 500 bp verwendet. Davon wurden zw. 15 ng und 30 ng pro Geltasche eingesetzt. Die DNA wurde mit dem Ladepuffer und dem DNA-bindenden Protein in 10 µl Ansätzen 20 min bei 30 °C inkubiert. Bei der Identifizierung von Effektormolekülen wurden diese noch vor dem Protein in den Ansatz gegeben. Die Elektrophorese wurde bei 4 °C und 30 mA durchgeführt. Als Laufpuffer wurde 0,5x TBE verwendet. Schließlich wurden die Gele in TAE-Puffer mit 2 µM Ethidiumbromid gefärbt und unter einem UV-Tisch dokumentiert

## 5.4 Analytik

### 5.4.1 Quantitative Glucosebestimmung

TRIS-Puffer	NADP	ATP
200 mM TRIS	6 mM NADP	18 mM ATP
2 mM MgCl <sub>2</sub>	im TRIS-Puffer	im TRIS-Puffer
pH 7,7 mit HCl		

#### Hexokinase/Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (Roche, Mannheim)

1:20 verdünnen in TRIS-Puffer

Die Bestimmung der Glucose erfolgte photometrisch mittels eines gekoppelten Enzymtests. Dabei wurde die Bildung von NADPH am Plattenlesegerät Infinite® M200 (Tecan, Männedorf) bei 340 nm gemessen. In eine Mikrotiterplatte wurden zunächst folgende Lösungen pipettiert und der Startwert E1 gemessen:

- 60 µl TRIS-Puffer
- 10 µl NADP (6 mM)
- 10 µl ATP (18 mM)
- 10 µl Probe (z.B Standard oder Kulturüberstand)

Nach der Zugabe von 10 µl Enzymlösung (1:20) und einer Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur wurde der Messwert (E2) bestimmt. Über eine Standardreihe lässt sich aus der Differenz E2 - E1 die Glucosekonzentration in den Proben bestimmen. Der Test eignet sich für Konzentrationen zwischen 200 µM und 5000 µM.

### 5.4.2 Quantitative Bestimmung primärer Amine

HPLC-Puffer A	HPLC-Puffer B
50 % Methanol	40 mM Natriumacetat
50 % Acetonitril	0,06 % Natriumazid
	2,5 % Methanol
	2,5 % Acetonitril    pH: 6,6

Lysin, Glucosamin und Glucosamin-6-phosphat wurden mit der HPLC (HP 1100, Hewlett-Packard, Waldbronn) quantifiziert. Die Amine wurden mit *o*-Phthalaldehyde (OPA) derivatisiert (Fluoraldehyde Reagenz, Thermo Scientific, Rockfort, USA). Nach Anregung im Fluoreszenzdetektor (Serie HP 1100, Hewlett-

Packard, Waldbronn) bei 230 nm wurde die Emission bei 455 nm gemessen. Die Chromatographie erfolgte über eine reversed phase Säule RP-18 (Vorsäule Multospher: 40 x 4 mm, CS Chromatographie, Langerwehe; Trennsäule Nucleodur RP-18: 125 x 4 mm, Macherey-Nagel, Düren) bei 35 °C und einem Fluss von 0,8 ml/min. Während des Laufs wurde der Gradient der mobilen Phase (Puffer A und Puffer B) von 0 % Puffer A auf 100 % erhöht.

### 5.4.3 Bestimmung der internen Glucosamin-6-phosphat Konzentration

Zur Bestimmung der Konzentration von internen Metaboliten wurden Zellpellets 2 min mit 500 µl 0,1 % Cetyltrimethylammoniumbromid resuspendiert. Die Suspension wurde anschließend zentrifugiert (1 min, 11000 rpm) und der Überstand wurde 15 min bei 95 °C inaktiviert. Anschließend wurde der Überstand 30 min bei 11000 rpm zentrifugiert und in entsprechenden Verdünnungen zur Messung in der HPLC gemessen. Zur Ermittlung des internen Zellvolumens wurde der Faktor 1,6 ml/g<sub>BTM</sub> verwendet (Botzenhardt, 2004).

### 5.4.4 Quantitative Bestimmung von N-Acetylglucosamin

#### Ehrlichs-Reagenz

1 g p-dimethylaminobenzaldehyd

1,25 ml HCl (10M)

Ad. 100 ml Essigsäure

Zur Bestimmung von GlcNAc wurden 200 µl Probe (0,025 bis 0,25 mM) mit 30 µl gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und 30 µl H<sub>2</sub>O versetzt und 5 min bei RT, 3 min bei 95 °C und 3 min bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 50 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1M) wurde die Probe 3 min bei 95 °C und 3 min bei RT inkubiert. Schließlich wurde die Probe mit 1,5 ml Ehrlichs-Reagenz versetzt, 1 h bei 37 °C inkubiert und die Absorption bei 585 nm gemessen.

## 5.5 Spezielle biochemische Methoden

### 5.5.1 Bestimmung der spezifischen Promotoraktivität

Die spezifische Aktivität von Promotoren wurden mit Hilfe des Reporter-genvektors pEPR1 (Knoppova *et al.*, 2007) ermittelt. Vor das Reporter-gen *gfp* wurde der zu untersuchende Promotorbereich kloniert. Zur Messung wurden die Zellen in CGXII-Medium mit entsprechender Kohlenstoffquelle kultiviert. Je 200  $\mu$ l einer Verdünnung mit einer OD<sub>600</sub> von 0,1 bis 0,3 wurden in die Kavität einer schwarzen 96 Well Assay Platte (Corning Inc., Corning) pipettiert und im Plattenlesegerät Infinite® M200 (Tecan, Männedorf) bei 395 nm angeregt und bei 510 nm gemessen.

### 5.5.2 Messung der Substrataufnahme

Die Aufnahmemessung von Substraten erfolgte mit Hilfe radioaktiv markierter Substrate (Tab. 5.4). Die zu vermessenden *C. glutamicum* Stämme wurde in CGXII-Medium mit entsprechenden Kohlenstoffquellen kultiviert. In der exponentiellen Wachstumsphase wurde die Zellen mit einer OD von ca. 6 für 15 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden sie zweimal mit kaltem CGXII-Medium (ohne Substrate) gewaschen und zu einer OD von ca. 2 resuspendiert. Bis zur Messung wurden die Zellen auf Eis gelagert. 3 min vor dem Beginn der Messung wurden die Zellen in einem gerührten Gefäß auf 30 °C temperiert. Nach der Zugabe einer definierten Konzentration an radioaktiv markiertem Substrat wurde sukzessive 200  $\mu$ l Proben entnommen, die durch Glasfaserfilter (Typ F, Millipore, Eschborn) gefiltert und mit 2,5 ml 0,1 M LiCl gewaschen wurden. Die Filter wurden in 3,8 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint® eco plus, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) inkubiert und im Szintillationszähler LS 6500 (Beckman Instruments GmbH, München) vermessen. Als Bezugswert wurden 200  $\mu$ l der nicht filtrierte Zellsuspension vermessen.

Tab. 5.4 Verwendete <sup>14</sup>C-markierte Substrate

<sup>14</sup> C markiertes Substrat	Spezifische Aktivität [mCi/mmol]	Hersteller
Glucose	59	Amersham Life Science
Glucosamin	55	American Radiolabeled Chemicals, St. Louis
N-Acetylglucosamin	45	Hartmann Analytik, Braunschweig
N-Acetylneuraminsäure	55	American Radiolabeled Chemicals, St. Louis

## 6 Quellen

**Almagro-Moreno, S., and Boyd, E.F. (2009).** Insights into the evolution of sialic acid catabolism among bacteria. *BMC Evol Biol* **9**: 118.

**Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990).** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410.

**Alvarez-Anorve, L.I., Bustos-Jaimes, I., Calcagno, M.L., and Plumbridge, J. (2009).** Allosteric regulation of glucosamine-6-phosphate deaminase (NagB) and growth of *Escherichia coli* on glucosamine. *J Bacteriol* **191**: 6401-6407.

**Alvarez-Anorve, L.I., Calcagno, M.L., and Plumbridge, J. (2005).** Why does *Escherichia coli* grow more slowly on glucosamine than on N-acetylglucosamine? Effects of enzyme levels and allosteric activation of GlcN6P deaminase (NagB) on growth rates. *J Bacteriol* **187**: 2974-2982.

**Amelung, W., Brodowski, S., Sandhage-Hofmann, A., and Bol, R. (2008).** Combining biomarker with stable isotope analyses for assessing the transformation and turnover of soil organic matter. *Adv Agron* **100**: 155-250.

**Angata, T., and Varki, A. (2002).** Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective. *Chem Rev* **102**: 439-469.

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

**Becker, J., Klopprogge, C., Herold, A., Zelder, O., Bolten, C.J., and Wittmann, C. (2007).** Metabolic flux engineering of L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum*--over expression and modification of G6P dehydrogenase. *J Biotechnol* **132**: 99-109.

**Blombach, B., Schreiner, M.E., Bartek, T., Oldiges, M., and Eikmanns, B.J. (2008).** *Corynebacterium glutamicum* tailored for high-yield L-valine production. *Appl Microbiol Biotechnol* **79**: 471-479.

**Blombach, B., Schreiner, M.E., Holatko, J., Bartek, T., Oldiges, M., and Eikmanns, B.J. (2007).** L-valine production with pyruvate dehydrogenase complex-deficient *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol* **73**: 2079-2084.

**Blombach, B., and Seibold, G.M. (2010).** Carbohydrate metabolism in *Corynebacterium glutamicum* and applications for the metabolic engineering of L-lysine production strains. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**: 1313-1322.

- Botzenhardt, J. (2004).** Regulation des Betaintransporters BetP aus *Corynebacterium glutamicum* während der Anpassung an hyperosmotischen Stress. *Doktorarbeit Universität zu Köln*.
- Bruckner, R., and Titgemeyer, F. (2002).** Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiol Lett* **209**: 141-148.
- Brzezinska, M.S., and Jankiewicz, U. (2012).** Production of antifungal chitinase by *Aspergillus niger* LOCK 62 and its potential role in the biological control. *Curr Microbiol* **65**: 666-672.
- Calcagno, M., Campos, P.J., Mulliert, G., and Suastegui, J. (1984).** Purification, molecular and kinetic properties of glucosamine-6-phosphate isomerase (deaminase) from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **787**: 165-173.
- Chen, J.K., Shen, C.R., and Liu, C.L. (2010).** N-acetylglucosamine: production and applications. *Mar Drugs* **8**: 2493-2516.
- Chu, D., Roobol, J., and Blomfield, I.C. (2008).** A theoretical interpretation of the transient sialic acid toxicity of a *nanR* mutant of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **375**: 875-889.
- Cremer, J., Eggeling, L., and Sahm, H. (1991).** Control of the Lysine Biosynthesis Sequence in *Corynebacterium glutamicum* as Analyzed by Overexpression of the Individual Corresponding Genes. *Appl Environ Microbiol* **57**: 1746-1752.
- Curtis, S.J., and Epstein, W. (1975).** Phosphorylation of D-glucose in *Escherichia coli* mutants defective in glucosephosphotransferase, mannosephosphotransferase, and glucokinase. *J Bacteriol* **122**: 1189-1199.
- Deutscher, J., Francke, C., and Postma, P.W. (2006).** How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 939-1031.
- Dominguez, H., and Lindley, N.D. (1996).** Complete Sucrose Metabolism Requires Fructose Phosphotransferase Activity in *Corynebacterium glutamicum* To Ensure Phosphorylation of Liberated Fructose. *Appl Environ Microbiol* **62**: 3878-3880.
- Dominguez, H., Rollin, C., Guyonvarch, A., Guerquin-Kern, J.L., Cocaign-Bousquet, M., and Lindley, N.D. (1998).** Carbon-flux distribution in the central metabolic pathways of *Corynebacterium glutamicum* during growth on fructose. *Eur J Biochem* **254**: 96-102.



- Dutka-Malen, S., Mazodier, P., and Badet, B. (1988).** Molecular cloning and overexpression of the glucosamine synthetase gene from *Escherichia coli*. *Biochimie* **70**: 287-290.
- Eikmanns, B.J., Eggeling, L., and Sahm, H. (1993).** Molecular aspects of lysine, threonine, and isoleucine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **64**: 145-163.
- Eikmanns, B.J., Metzger, M., Reinscheid, D., Kircher, M., and Sahm, H. (1991).** Amplification of three threonine biosynthesis genes in *Corynebacterium glutamicum* and its influence on carbon flux in different strains. *Appl Microbiol Biotechnol* **34**: 617-622.
- El Zoeiby, A., Sanschagrin, F., and Levesque, R.C. (2003).** Structure and function of the *Mur* enzymes: development of novel inhibitors. *Mol Microbiol* **47**: 1-12.
- Engels, V., Georgi, T., and Wendisch, V.F. (2008).** ScrB (Cg2927) is a sucrose-6-phosphate hydrolase essential for sucrose utilization by *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett* **289**: 80-89.
- Engels, V., and Wendisch, V.F. (2007).** The DeoR-type regulator SugR represses expression of *ptsG* in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **189**: 2955-2966.
- Frunzke, J., Engels, V., Hasenbein, S., Gatgens, C., and Bott, M. (2008).** Coordinated regulation of gluconate catabolism and glucose uptake in *Corynebacterium glutamicum* by two functionally equivalent transcriptional regulators, GntR1 and GntR2. *Mol Microbiol* **67**: 305-322.
- Gaigalat, L. (2001).** Masterarbeit. *Universität Bielefeld*.
- Gaigalat, L., Schluter, J.P., Hartmann, M., Mormann, S., Tauch, A., Puhler, A., and Kalinowski, J. (2007).** The DeoR-type transcriptional regulator SugR acts as a repressor for genes encoding the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system (PTS) in *Corynebacterium glutamicum*. *BMC Mol Biol* **8**: 104.
- Garcia-Fraga, B., da Silva, A.F., Lopez-Seijas, J., and Sieiro, C. (2013).** Functional expression and characterization of a chitinase from the marine archaeon *Halobacterium salinarum* CECT 395 in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*.
- Gaugue, I., Oberto, J., Putzer, H., and Plumbridge, J. (2013).** The use of amino sugars by *Bacillus subtilis*: presence of a unique operon for the catabolism of glucosamine. *PLoS One* **8**: e63025.
- Georgi, T., Rittmann, D., and Wendisch, V.F. (2005).** Lysine and glutamate production by *Corynebacterium glutamicum* on glucose, fructose and sucrose: roles of malic enzyme and fructose-1,6-bisphosphatase. *Metab Eng* **7**: 291-301.

- Glatzer, A.N., and Nikaido, H. (2007).** In *Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology* (New York, Cambridge University Press).
- Gopel, Y., Papenfort, K., Reichenbach, B., Vogel, J., and Gorke, B. (2013).** Targeted decay of a regulatory small RNA by an adaptor protein for RNase E and counteraction by an anti-adaptor RNA. *Genes Dev* **27**: 552-564.
- Gosset, G. (2005).** Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *Microb Cell Fact* **4**: 14.
- Grant, S.G., Jessee, J., Bloom, F.R., and Hanahan, D. (1990).** Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 4645-4649.
- Gruteser, N., Marin, K., Krämer, R., and Thomas, G.H. (2012).** Sialic acid utilization by the soil bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett* **336**: 131-138.
- Hahne, H., Wolff, S., Hecker, M., and Becher, D. (2008).** From complementarity to comprehensiveness - targeting the membrane proteome of growing *Bacillus subtilis* by divergent approaches. *Proteomics* **8**: 4123-4136.
- Heider, S.A., Peters-Wendisch, P., and Wendisch, V.F. (2012).** Carotenoid biosynthesis and overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. *BMC Microbiol* **12**: 198.
- Henrich, A., Kuhlmann, N., Eck, A.W., Kramer, R., and Seibold, G.M. (2013).** Maltose uptake by the novel ABC transport system MusEFGK2I causes increased expression of ptsG in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **195**: 2573-2584.
- Hopkins, A.P., Hawkhead, J.A., and Thomas, G.H. (2013).** Transport and catabolism of the sialic acids N-glycolylneuraminic acid and 3-keto-3-deoxy-D-glycero-D-galactononic acid by *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol Lett* **347**: 14-22.
- Horton, R.M., Cai, Z.L., Ho, S.N., and Pease, L.R. (1990).** Gene splicing by overlap extension: tailor-made genes using the polymerase chain reaction. *Biotechniques* **8**: 528-535.
- Hunt, D.E., Gevers, D., Vahora, N.M., and Polz, M.F. (2008).** Conservation of the chitin utilization pathway in the *Vibrionaceae*. *Appl Environ Microbiol* **74**: 44-51.
- Hwang, J., Kim, B.S., Jang, S.Y., Lim, J.G., You, D.J., Jung, H.S., Oh, T.K., Lee, J.O., Choi, S.H., and Kim, M.H. (2013).** Structural insights into the regulation of sialic acid catabolism by the *Vibrio vulnificus* transcriptional repressor NanR. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: E2829-2837.

- Ikeda, M. (2003).** Amino acid production processes. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **79**: 1-35.
- Ikeda, M., Mizuno, Y., Awane, S., Hayashi, M., Mitsuhashi, S., and Takeno, S. (2011).** Identification and application of a different glucose uptake system that functions as an alternative to the phosphotransferase system in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* **90**: 1443-1451.
- Ikeda, M., and Nakagawa, S. (2003).** The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol* **62**: 99-109.
- Jacobs, C., Huang, L.J., Bartowsky, E., Normark, S., and Park, J.T. (1994).** Bacterial cell wall recycling provides cytosolic muropeptides as effectors for beta-lactamase induction. *Embo J* **13**: 4684-4694.
- Joergensen, R.G., and Meyer, B. (1990).** Chemical change in organic matter decomposing in and on a forest Rendzina under beech (*Fagus sylvatica* L.). *Soil Sci* **41**: 17-27.
- Johnston, J.W., Zaleski, A., Allen, S., Mootz, J.M., Armbruster, D., Gibson, B.W., Apicella, M.A., and Munson, R.S., Jr. (2007).** Regulation of sialic acid transport and catabolism in *Haemophilus influenzae*. *Mol Microbiol* **66**: 26-39.
- Jones-Mortimer, M.C., and Kornberg, H.L. (1980).** Amino-sugar transport systems of *Escherichia coli* K12. *J Gen Microbiol* **117**: 369-376.
- Kadner, R.J., Murphy, G.P., and Stephens, C.M. (1992).** Two mechanisms for growth inhibition by elevated transport of sugar phosphates in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* **138**: 2007-2014.
- Kalinowski, J., Bathe, B., Bartels, D., Bischoff, N., Bott, M., Burkovski, A., Dusch, N., Eggeling, L., Eikmanns, B.J., Gaigalat, L., et al. (2003).** The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J Biotechnol* **104**: 5-25.
- Kalivoda, K.A., Steenbergen, S.M., and Vimr, E.R. (2013).** Control of the *Escherichia coli* Sialoregulon by Transcriptional Repressor NanR. *J Bacteriol* **195**: 4689-4701.
- Kalivoda, K.A., Steenbergen, S.M., Vimr, E.R., and Plumbridge, J. (2003).** Regulation of sialic acid catabolism by the DNA binding protein NanR in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**: 4806-4815.
- Kandra, P., Challa, M.M., and Jyothi, H.K. (2012).** Efficient use of shrimp waste: present and future trends. *Appl Microbiol Biotechnol* **93**: 17-29.

- Kawaguchi, H., Vertes, A.A., Okino, S., Inui, M., and Yukawa, H. (2006).** Engineering of a xylose metabolic pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol* **72**: 3418-3428.
- Kim, B.S., Hwang, J., Kim, M.H., and Choi, S.H. (2011).** Cooperative regulation of the *Vibrio vulnificus nan* gene cluster by NanR protein, cAMP receptor protein, and N-acetylmannosamine 6-phosphate. *J Biol Chem* **286**: 40889-40899.
- Kim, H.J., Kim, T.H., Kim, Y., and Lee, H.S. (2004).** Identification and characterization of *glxR*, a gene involved in regulation of glyoxylate bypass in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **186**: 3453-3460.
- Kim, S., Oh, D.B., Kwon, O., and Kang, H.A. (2010).** Identification and functional characterization of the NanH extracellular sialidase from *Corynebacterium diphtheriae*. *J Biochem* **147**: 523-533.
- Kinoshita, S., Udaka, S., and Shimono, M. (1957).** Studies on the amino acid fermentation. Part 1. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J Gen Appl Microbiol* **50**: 331-343.
- Knoppova, M., Phensaijai, M., Vesely, M., Zemanova, M., Nešvera, J., and Pátek, M. (2007).** Plasmid vectors for testing in vivo promoter activities in *Corynebacterium glutamicum* and *Rhodococcus erythropolis*. *Curr Microbiol* **55**: 234-239.
- Kohl, T.A., and Tauch, A. (2009).** The GlxR regulon of the amino acid producer *Corynebacterium glutamicum*: Detection of the corynebacterial core regulon and integration into the transcriptional regulatory network model. *J Biotechnol* **143**: 239-246.
- Krause, F.S., Henrich, A., Blombach, B., Krämer, R., Eikmanns, B.J., and Seibold, G.M. (2010).** Increased glucose utilization in *Corynebacterium glutamicum* by use of maltose, and its application for the improvement of L-valine productivity. *Appl Environ Microbiol* **76**: 370-374.
- Kronemeyer, W., Peekhaus, N., Krämer, R., Sahm, H., and Eggeling, L. (1995).** Structure of the *gluABCD* cluster encoding the glutamate uptake system of *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **177**: 1152-1158.
- Kurita, K. (2006).** Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Mar Biotechnol (NY)* **8**: 203-226.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., et al. (2007).** Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947-2948.

- Liang, C., Zhang, X., Basler, T.C. (2007).** Net microbial amino sugar accumulation process in soil as influenced by different plant material inputs. *Biol Fertil Soils* **44**: 1-7.
- Liebl, W., Ehrmann, M., Ludwig, W., and Schleifer, K.H. (1991).** Transfer of *Brevibacterium divaricatum* DSM 20297T, "*Brevibacterium flavum*" DSM 20411, "*Brevibacterium lactofermentum*" DSM 20412 and DSM 1412, and *Corynebacterium glutamicum* and their distinction by rRNA gene restriction patterns. *Int J Syst Bacteriol* **41**: 255-260.
- Lindner, S.N., Seibold, G.M., Henrich, A., Krämer, R., and Wendisch, V.F. (2011).** Phosphotransferase system-independent glucose utilization in *Corynebacterium glutamicum* by inositol permeases and glucokinases. *Appl Environ Microbiol* **77**: 3571-3581.
- Liu, G., Wu, J., Yang, H., and Bao, Q. (2010).** Codon Usage Patterns in *Corynebacterium glutamicum*: Mutational Bias, Natural Selection and Amino Acid Conservation. *Comp Funct Genomics* **2010**: 343569.
- Lobo, M.D., Silva, F.D., Landim, P.G., da Cruz, P.R., de Brito, T.L., de Medeiros, S.C., Oliveira, J.T., Vasconcelos, I.M., Pereira, H.D., and Grangeiro, T.B. (2013).** Expression and efficient secretion of a functional chitinase from *Chromobacterium violaceum* in *Escherichia coli*. *BMC Biotechnol* **13**: 46.
- Marx, A., de Graaf, A.A., Wiechert, W., Eggeling, L., and Sahm, H. (1996).** Determination of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* by nuclear magnetic resonance spectroscopy combined with metabolite balancing. *Biotechnol Bioeng* **49**: 111-129.
- Marx, A., Hans, S., Mockel, B., Bathe, B., de Graaf, A.A., McCormack, A.C., Stapleton, C., Burke, K., O'Donohue, M., and Dunican, L.K. (2003).** Metabolic phenotype of phosphoglucose isomerase mutants of *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* **104**: 185-197.
- Mengin-Lecreulx, D., and van Heijenoort, J. (1993).** Identification of the *glmU* gene encoding N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**: 6150-6157.
- Moon, M.W., Park, S.Y., Choi, S.K., and Lee, J.K. (2007).** The phosphotransferase system of *Corynebacterium glutamicum*: features of sugar transport and carbon regulation. *J Mol Microb Biotech* **12**: 43-50.
- Mulligan, C., Leech, A.P., Kelly, D.J., and Thomas, G.H. (2012).** The membrane proteins SiaQ and SiaM form an essential stoichiometric complex in the sialic acid tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporter SiaPQM (VC1777-1779) from *Vibrio cholerae*. *J Biol Chem* **287**: 3598-3608.

- Nakayama, K., Sagamihara, K., Araki, K. (1973).** Process for producing L-lysine. In. **US Patent Nr. 3, 395(ed).** pp.
- Natarajan, K., and Datta, A. (1993).** Molecular cloning and analysis of the NAG1 cDNA coding for glucosamine-6-phosphate deaminase from *Candida albicans*. *J Biol Chem* **268**: 9206-9214.
- Nazari, B., Saito, A., Kobayashi, M., Miyashita, K., Wang, Y., and Fujii, T. (2011).** High expression levels of chitinase genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2) grown in soil. *FEMS Microbiol Ecol* **77**: 623-635.
- Nelson, S.O., Wright, J.K., and Postma, P.W. (1983).** The mechanism of inducer exclusion. Direct interaction between purified III of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system and the lactose carrier of *Escherichia coli*. *Embo J* **2**: 715-720.
- Olson, M.E., King, J.M., Yahr, T.L., and Horswill, A.R. (2013).** Sialic acid catabolism in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **195**: 1779-1788.
- Pabo, C.O., and Sauer, R.T. (1992).** Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu Rev Biochem* **61**: 1053-1095.
- Park, J.T. (1996).** The Murein Sacculus. In *Escherichia coli* and *Salmonella* Cellular and Molecular Biology, F.C. Neidhardt, ed. (Washington D.C., American Society for Microbiology), pp. 48-57.
- Park, J.T., and Uehara, T. (2008).** How bacteria consume their own exoskeletons (turnover and recycling of cell wall peptidoglycan). *Microbiol Mol Biol Rev* **72**: 211-227, table of contents.
- Park, S.Y., Kim, H.K., Yoo, S.K., Oh, T.K., and Lee, J.K. (2000).** Characterization of *glk*, a gene coding for glucose kinase of *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett* **188**: 209-215.
- Pátek, M., and Nešvera, J. (2011).** Sigma factors and promoters in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* **154**: 101-113.
- Pauling, J., Rottger, R., Tauch, A., Azevedo, V., and Baumbach, J. (2012).** CoryneRegNet 6.0--Updated database content, new analysis methods and novel features focusing on community demands. *Nucleic Acids Res* **40**: D610-614.
- Peters-Wendisch, P.G., Schiel, B., Wendisch, V.F., Katsoulidis, E., Mockel, B., Sahn, H., and Eikmanns, B.J. (2001).** Pyruvate carboxylase is a major bottleneck for glutamate and lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. *J Mol Microb Biotech* **3**: 295-300.

- Petersen, S., de Graaf, A.A., Eggeling, L., Mollney, M., Wiechert, W., and Sahm, H. (2000).** In vivo quantification of parallel and bidirectional fluxes in the anaplerosis of *Corynebacterium glutamicum*. *J Biol Chem* **275**: 35932-35941.
- Petrov, D.P. (2011).** Masterarbeit. *Universität zu Köln*.
- Plumbridge, J. (1995).** Co-ordinated regulation of amino sugar biosynthesis and degradation: the NagC repressor acts as both an activator and a repressor for the transcription of the *glmUS* operon and requires two separated NagC binding sites. *Embo J* **14**: 3958-3965.
- Plumbridge, J. (1998).** Control of the expression of the *manXYZ* operon in *Escherichia coli*: Mlc is a negative regulator of the mannose PTS. *Mol Microbiol* **27**: 369-380.
- Plumbridge, J. (2001).** DNA binding sites for the Mlc and NagC proteins: regulation of *nagE*, encoding the N-acetylglucosamine-specific transporter in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **29**: 506-514.
- Plumbridge, J.A. (1991).** Repression and induction of the *nag* regulon of *Escherichia coli* K-12: the roles of *nagC* and *nagA* in maintenance of the uninduced state. *Mol Microbiol* **5**: 2053-2062.
- Riedel, C., Rittmann, D., Dangel, P., Mockel, B., Petersen, S., Sahm, H., and Eikmanns, B.J. (2001).** Characterization of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene from *Corynebacterium glutamicum* and significance of the enzyme for growth and amino acid production. *J Mol Microb Biotech* **3**: 573-583.
- Rigali, S., Derouaux, A., Giannotta, F., and Dusart, J. (2002).** Subdivision of the helix-turn-helix GntR family of bacterial regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA subfamilies. *J Biol Chem* **277**: 12507-12515.
- Rogers, M.J., Ohgi, T., Plumbridge, J., and Soll, D. (1988).** Nucleotide sequences of the *Escherichia coli* *nagE* and *nagB* genes: the structural genes for the N-acetylglucosamine transport protein of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system and for glucosamine-6-phosphate deaminase. *Gene* **62**: 197-207.
- Sasaki, M., Jojima, T., Kawaguchi, H., Inui, M., and Yukawa, H. (2009).** Engineering of pentose transport in *Corynebacterium glutamicum* to improve simultaneous utilization of mixed sugars. *Appl Microbiol Biotechnol* **85**: 105-115.
- Schafer, A., Tauch, A., Jager, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., and Puhler, A. (1994).** Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73.

**Schendzielorz, G., Dippong, M., Grunberger, A., Kohlheyer, D., Yoshida, A., Binder, S., Nishiyama, C., Nishiyama, M., Bott, M., and Eggeling, L. (2013).** Taking Control over Control: Use of Product Sensing in Single Cells to Remove Flux Control at Key Enzymes in Biosynthesis Pathways. *ACS Synth Biol.*

**Schneider, J., Niermann, K., and Wendisch, V.F. (2011).** Production of the amino acids l-glutamate, l-lysine, l-ornithine and l-arginine from arabinose by recombinant *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* **154**: 191-198.

**Schneider, J., and Wendisch, V.F. (2010).** Putrescine production by engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* **88**: 859-868.

**Schroder, J., and Tauch, A. (2010).** Transcriptional regulation of gene expression in *Corynebacterium glutamicum*: the role of global, master and local regulators in the modular and hierarchical gene regulatory network. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 685-737.

**Seibold, G., Auchter, M., Berens, S., Kalinowski, J., and Eikmanns, B.J. (2006).** Utilization of soluble starch by a recombinant *Corynebacterium glutamicum* strain: growth and lysine production. *J Biotechnol* **124**: 381-391.

**Seitz, S., Lee, S.J., Pennetier, C., Boos, W., and Plumbridge, J. (2003).** Analysis of the interaction between the global regulator Mlc and EIIBGlc of the glucose-specific phosphotransferase system in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **278**: 10744-10751.

**Severi, E., Hosie, A.H., Hawkhead, J.A., and Thomas, G.H. (2010).** Characterization of a novel sialic acid transporter of the sodium solute symporter (SSS) family and in vivo comparison with known bacterial sialic acid transporters. *FEMS Microbiol Lett* **304**: 47-54.

**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.

**Stevenson, F.J. (1982).** Organic forms of soil nitrogen. *Nitrogen in agricultural soils American Society of Agronomy*: 101-107.

**Swiatek, M.A., Tenconi, E., Rigali, S., and van Wezel, G.P. (2012).** Functional analysis of the N-acetylglucosamine metabolic genes of *Streptomyces coelicolor* and role in control of development and antibiotic production. *J Bacteriol* **194**: 1136-1144.

**Tanaka, Y., Okai, N., Teramoto, H., Inui, M., and Yukawa, H. (2008a).** Regulation of the expression of phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system (PTS) genes in *Corynebacterium glutamicum* R. *Microbiology* **154**: 264-274.

**Tanaka, Y., Teramoto, H., Inui, M., and Yukawa, H. (2008b).** Regulation of expression of general components of the phosphoenolpyruvate: carbohydrate



phosphotransferase system (PTS) by the global regulator SugR in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* **78**: 309-318.

**Tateno, T., Fukuda, H., and Kondo, A. (2007a)**. Direct production of L-lysine from raw corn starch by *Corynebacterium glutamicum* secreting *Streptococcus bovis* alpha-amylase using *cspB* promoter and signal sequence. *Appl Microbiol Biotechnol* **77**: 533-541.

**Tateno, T., Fukuda, H., and Kondo, A. (2007b)**. Production of L-Lysine from starch by *Corynebacterium glutamicum* displaying alpha-amylase on its cell surface. *Appl Microbiol Biotechnol* **74**: 1213-1220.

**Teramoto, H., Inui, M., and Yukawa, H. (2011)**. Transcriptional regulators of multiple genes involved in carbon metabolism in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* **154**: 114-125.

**Thompson, F.L., Neto, A.A., Santos Ede, O., Izutsu, K., and Iida, T. (2011)**. Effect of N-acetyl-D-glucosamine on gene expression in *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbes Environ* **26**: 61-66.

**Toyoda, K., Teramoto, H., Inui, M., and Yukawa, H. (2011)**. Genome-wide identification of in vivo binding sites of GlxR, a cyclic AMP receptor protein-type regulator in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **193**: 4123-4133.

**Uhde, A., Youn, J.W., Maeda, T., Clermont, L., Matano, C., Krämer, R., Wendisch, V.F., Seibold, G.M., and Marin, K. (2013)**. Glucosamine as carbon source for amino acid-producing *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**: 1679-1687.

**Vimr, E., and Lichtensteiger, C. (2002)**. To sialylate, or not to sialylate: that is the question. *Trends Microbiol* **10**: 254-257.

**Vimr, E.R. (2013)**. Unified theory of bacterial sialometabolism: how and why bacteria metabolize host sialic acids. *ISRN Microbiol* **2013**: 816713.

**Vimr, E.R., Kalivoda, K.A., Deszo, E.L., and Steenbergen, S.M. (2004)**. Diversity of microbial sialic acid metabolism. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 132-153.

**Vimr, E.R., and Troy, F.A. (1985)**. Identification of an inducible catabolic system for sialic acids (*nan*) in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **164**: 845-853.

**Vincent, F., Davies, G.J., and Brannigan, J.A. (2005)**. Structure and kinetics of a monomeric glucosamine 6-phosphate deaminase: missing link of the NagB superfamily? *J Biol Chem* **280**: 19649-19655.

**Warren, L., and Spearing, C.W. (1963)**. Sialidase (Neuraminidase) of *Corynebacterium Diphtheriae*. *J Bacteriol* **86**: 950-955.

**Watanabe, T., Kanai, R., Kawase, T., Tanabe, T., Mitsutomi, M., Sakuda, S., and Miyashita, K. (1999).** Family 19 chitinases of *Streptomyces* species: characterization and distribution. *Microbiology* **145 ( Pt 12)**: 3353-3363.

**Wendisch, V.F. (2003).** Genome-wide expression analysis in *Corynebacterium glutamicum* using DNA microarrays. *J Biotechnol* **104**: 273-285.

**Yukawa, H., Omumasaba, C.A., Nonaka, H., Kos, P., Okai, N., Suzuki, N., Suda, M., Tsuge, Y., Watanabe, J., Ikeda, Y., et al. (2007).** Comparative analysis of the *Corynebacterium glutamicum* group and complete genome sequence of strain R. *Microbiology* **153**: 1042-1058.

**Zhu, N., Xia, H., Yang, J., Zhao, X., and Chen, T. (2013).** Improved succinate production in *Corynebacterium glutamicum* by engineering glyoxylate pathway and succinate export system. *Biotechnol Lett*.

## 7 Anhang

### 7.1 Microarrays von *C. glutamicum*

Die Microarrays wurden in der Arbeitsgruppe von Volker Wendisch, wie früher beschrieben, durchgeführt (Wendisch, 2003).

**Tab. 7.1 Differenzielle Genexpression von *C. glutamicum* WT und M4.** Die mRNA-Level ergeben sich aus einer Kultivierungen in LB-Medium.

Gen	Annotation	mRNA (M4/WT)
cg3237	<i>sodA</i> , superoxidedismutase	2.3
cg3207	<i>pheA</i> , prephenatedehydratase	0.4
cg3169	<i>pck</i> , phosphoenolpyruvatecarboxykinase (GTP)	2.3
cg3009	hypotheticalprotein	2.4
cg3008	<i>porA</i> , Porin	2.5
cg2958	<i>butA</i> , L-2.3-butanediol dehydrogenase	2.2
cg2929	<i>nagA</i> , putative N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase	55.3
cg2928	<i>nagB</i> , glucosamine-6-phosphate deaminase	57.2
cg2256	ABC-type transporter, ATPase component	0.4
cg1931	putative secretedprotein	2.4
cg1821	hypotheticalprotein	2.2
cg1791	<i>gapA</i> , glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2.3
cg1685	<i>tatX</i> , Sec-independent protein secretion pathway component	2.4
cg1682	trypsin-likeserineprotease	2.2
cg1368	<i>atpD</i> , F0F1-type ATP synthase beta subunit	2.6
cg1341	<i>narI</i> , nitrate reductase gamma subunit	0.2
cg0990	<i>rpmG</i> , ribosomalprotein L33	2.8
cg0949	<i>gltA</i> , citratesynthase	2.4
cg0821	Hypotheticalprotein	2.5
cg0810	Hypotheticalprotein	3.0
cg0768	ABC-type transporter, ATPase component	2.1
cg0631	<i>rpsE</i> , ribosomalprotein S5	3.2
cg0628	<i>rpsH</i> , ribosomalprotein S8	2.2
cg0602	<i>rplP</i> , ribosomalprotein L16/L10E	2.3
cg0601	<i>rpsC</i> , ribosomalprotein S3	2.5
cg0589	ABC-type transporter, ATPase component	2.4
cg0563	<i>rplK</i> , ribosomalprotein L11	2.6
cg0478	Hypotheticalprotein	0.3
cg0477	Hypotheticalprotein	0.1
cg0476	<i>murB2</i> , putative UDP-N-acetylmuramatedehydrogenase	0.4

**Tab. 7.2 Differenzielle Genexpression von *C. glutamicum* WT und  $\Delta$ nanR.** Die mRNA-Level ergeben sich aus drei unabhängigen Kultivierungen in LB-Medium.

Gen	Annotation	mRNA ( $\Delta$ nanR/WT)
cg0809	Septum formation protein Maf-like protein	0.14
cg0810	Conserved hypothetical protein	0.23
cg0811	AccD2, acetylCoAcarboxylase $\alpha$ -subunit	0.16
cg0812	AccD1, acetylCoAcarboxylase $\alpha$ -subunit	0.22
cg0814	BirA, biotinproteinligase	0.19
cg0815	putative membrane protein	0.19
cg0816	PurK, phosphoribosylaminoimidazolecarboxylase ATPase subunit	0.25
cg0817	Kup, potassiumtransporter	0.45
cg0819	hypotheticalprotein	0.23
cg0820	PurE, phosphoribosylaminoimidazole carboxylase catalytic subunit	0.25
cg0821	hypothetical protein	n.d.
cg0828	putativedihydrofolatereductase	0.16
cg0829	hypothetical protein	0.13
cg0830	putative membrane protein	0.12
cg0831	Sugar ABC transport system, permease protein	n.d.
cg0832	Sugar ABC transport system, transmembrane protein	0.40
cg1139	putative allophanatehydrolasesubunit 2	0.15
cg1140	putative allophanatehydrolasesubunit 1	0.16
cg1141	putative LamB-family lactam utilization protein	0.19
cg1142	putative sodium/proline, sodium/panthothenate symporter	0.31
cg3226	putative L-lactate permease	0.16
cg3227	LldD, quinone-dependent L-lactatedehydrogenase	0.36
ISCg1	ISCg1 (cg0692   cg2600   cg1213   cg2725)	0.23
cg0043	ABC transporter ATP-bindingprotein	19.7
cg0395	hypotheticalprotein	4.9
cg0759	PrpD2, methylcitratdehydratase	14.9
cg0760	PrpB2, methylisocitratelase	4.0
cg0762	PrpC2, methylcitratessynthase	8.5
cg0796	PrpD1, methylcitratdehydratase	1.4
cg0797	PrpB1, methylisocitratelase	4.0
cg0798	PrpC1, methylcitratessynthase	1.5
cg1295	putative alpha/beta superfamily hydrolase/acyltransferase	6.1
cg1420	GatB, aspartyl/ glutamyl-tRNA amidotransferase subunit B	9.9
cg1590	Putative secreted magnesiumchelataase subunit	6.5
cg1612	Putative acetyltransferase	6.1
cg2430	Hypothetical protein	4.0
cg2479	Hypothetical protein	14.0
cg2622	PcaJ, acyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase subunit	n.d.
cg2623	PcaI, acyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase subunit	4.3

## Anhang

---

<i>cg2746</i>	Putative transcriptional regulator	6.5
<i>cg2916</i>	putative3-ketosteroid 1-dehydrogenase	n.d.
<i>cg2917</i>	Conserved hypothetical protein	6.1
<i>cg2927</i>	ScrB, sucrose 6-phosphate hydrolase	2.0
<i>cg2928</i>	NagB, glucosamine-6-phosphatedeaminase	10.6
<i>cg2929</i>	NagA1, N-acetylglucosamine-6-phosphatedeacetylase	337.8
<i>cg2931</i>	NanA, N-acetylneuraminatylase (aldolase)	147.0
<i>cg2932</i>	ROK family transcriptional regulator	168.9
<i>cg2933</i>	NanE, N-acetylmannosamine-6-phosphate 2-epimerase	97.0
<i>cg2937</i>	dipeptide/oligopeptideABC transport system, substrate-binding lipoprotein	9.9
<i>cg2938</i>	dipeptide/oligopeptideABC transport system, permease subunit	78.8
<i>cg2939</i>	dipeptide/oligopeptideABC transport system, ATPase subunit	25.2
<i>cg2940</i>	dipeptide/oligopeptideABC transport system, ATPase subunit	274.4
<i>cg2941</i>	LysE-type permease	2.3
<i>cg2942</i>	putative AsnC-family transcriptional regulator	7.5
<i>cg3185</i>	Conserved hypothetical protein	4.6
<i>cg3252</i>	putative membrane proteintranslocase subunit	4.0
<i>cg3407</i>	putative membrane protein	12.1
<i>cg3419</i>	hypothetical protein	4.3

## Danksagung

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Krämer für das Vertrauen, das er in mich gesetzt hat. Sein stetes Interesse an meinem Thema und sein unermüdliches Engagement für mich und meine Kollegen optimale Arbeitsvoraussetzungen zu schaffen, haben wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Ich bedanke mich bei Frau Prof. Neundorf und Frau Prof. Schnetz, die sich beide sofort bereit erklärt haben, das Koreferat bzw. den Prüfungsvorsitz meiner Promotion zu übernehmen.

Ausdrücklich möchte ich bei den direkten Betreuern meiner Arbeit bedanken: Kay Marin, der mich in die Arbeitsgruppe geholt hat und mich in das Thema einführte sowie Gerd Seibold, der meine Arbeit durch intensive Diskussionen, experimentelle und konzeptionelle Vorschläge bereichert hat.

Für die Arbeiten an NagB und die Durchführung von Microarrays bedanke ich mich bei den Kollegen Jung-Won Youn und Christian Matano der kooperierenden Arbeitsgruppen um Herrn Prof. Wendisch.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Benjamin Roenneke und Ute Meyer, die mir zahlreiche experimentelle Methoden dieser Arbeit näher gebracht haben. Natalie Brühl bin ich besonders dankbar für Zeit, die sie sich für die Korrektur meiner Arbeit genommen hat.

Für die organisatorische und technische Hilfe bedanke ich mich bei Judith Pinger, Gabriele Sitek, Arthur Reuter und Eva Glees.

Mein ganz besonderer Dank gilt allen Kollegen, die mir während meiner Zeit hier in Köln auch zu Freunden geworden sind. Mit Anna Bartsch, Markus Becker, Michael Becker, Natalie Brühl, Alexander Eck, Katja Kirsch, Carolin Lange, Stanislav Maksimov, Dimitar Petrov und Benjamin Roenneke hatte ich nicht nur eine schöne Zeit im Labor und bei gemeinsamen Tagungen und Betriebsausflügen, sondern auch bei unseren zahlreichen Unternehmungen sportlicher, kultureller, kulinarischer und gesellschaftlicher Natur.

## Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit –einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie –abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen –noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt.

Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. Reinhard Krämer am Institut für Biochemie der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln betreut worden.

Teilpublikationen:

**Uhde, A., Youn, J.W., Maeda, T., Clermont, L., Matano, C., Krämer, R., Wendisch, V.F., Seibold, G.M., and Marin, K. (2013).** Glucosamine as carbon source for amino acid-producing *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**: 1679-1687.

**Uhde, A. (2012)** Improved Glucosamin Utilization by *C. glutamicum* and its application for L-Lysine production. *Vortrag bei der Jahrestagung der VAAM (20.03.2012) in Tübingen*

Ort, Datum

Unterschrift