

**Untersuchung des Argininmetabolismus und
dessen Regulation in
Corynebacterium glutamicum ATCC 13032**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld

vorgelegt von

Kathrin Haasner

aus Beckum

Mai 2013

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
TABELLENVERZEICHNIS	VIII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IX
I. Zusammenfassung	1
II. Einleitung	3
1. Die Gattung der Corynebakterien	3
1.1. Taxonomie der Corynebakterien	3
1.2. Biotechnologische und wirtschaftliche Bedeutung von <i>Corynebacterium glutamicum</i>	5
2. Der Argininbiosyntheseweg in Prokaryoten	7
2.1. Biologische <i>Relevanz</i> der Aminosäure L-Arginin	7
2.2. Klassische und <i>de novo</i> Argininbiosynthese in Prokaryoten	8
2.3. Die Argininbiosynthese und -produktion mit <i>C. glutamicum</i>	10
3. Regulationsmechanismen auf transkriptioneller Ebene	13
3.1. Transkriptionelle Regulation durch Transkriptionsfaktoren	13
3.2. <i>Antisense</i> RNAs agieren als transkriptionelle Regulatoren	16
3.3. Transkriptionelle Regulation der Argininbiosynthese	19
4. Zielsetzung der Arbeit	23
III. Material und Methoden	24
1. Bakterienstämme, Plasmide und Primer	24
1.1. Bakterienstämme	24
1.2. Plasmide	25
1.3. Primer	26

2. Verwendete Chemikalien, Materialien, Geräte und Software	28
2.1. Chemikalien	28
2.2. Materialien	29
2.3. Geräte und Apparaturen	30
2.4. Software	31
3. Medien	31
3.1. Nährmedien	31
3.2. Zusätze zu den Nährmedien	33
3.3. Verwendete Puffer und Lösungen	34
3.3.1. Elektrophorese	34
3.3.2. DNA-Transfertechniken	34
3.3.3. Auftrennung der RNA im Polyacrylamidgel und Semi-Dry Elektroblot	35
3.3.4. Hybridisierung des Northern Blots	35
3.3.5. Waschung und Detektion des Northern Blots	36
3.3.6. Proteinpuffer	36
4. Kultivierung von Bakterien	37
4.1. Anzucht und Lagerung	37
4.2. Bestimmung des Bakterientiters	37
4.3. Stochertest	37
5. Allgemeine DNA-Arbeiten	38
5.1. Isolierung von Plasmid-DNA	38
5.2. Aufreinigung von PCR-Produkten	38
5.3. Agarose-Gelelektrophorese	38
5.4. Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel	39
6. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	39
6.1. Primer Design	40
6.2. PCR-Reaktionsansätze und -programme	41
6.2.1. PCR-Reaktionsansatz und -programm für die <i>taq</i> -Polymerase	41
6.2.2. PCR-Reaktionsansatz und -programm für die Phusion-Polymerase	41
7. Klonierungsexperimente	42
7.1. DNA-Restriktionsspaltung	42
7.2. DNA-Ligation	43

8. DNA-Transfertechniken	43
8.1. Elektroporation	43
8.1.1. Herstellung und Elektroporation elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	44
8.1.2. Herstellung und Elektroporation elektrokompetenter <i>C. glutamicum</i> -Zellen	44
8.2. Hitzeschocktransformation von ultrakompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	44
9. Erzeugung von Gendelektionen und -mutationen	45
9.1. Konstruktion von Deletions- und Mutationskonstrukten mittels <i>Gene Splicing by Overlap Extension (GeneSOEing)</i>	45
9.2. Integration einer Deletion bzw. Mutation im Genom	46
10. Transkriptomics	47
10.1. Ernte und Isolierung der Gesamt-RNA aus <i>C. glutamicum</i> -Zellen	47
10.2. Northern Blot für kleine RNAs (50 – 800 nt)	48
10.3. Northern Blot für größere Transkripte (500 – 10000 nt)	49
10.4. Expressionsanalyse mittels RT-qPCR	50
10.4.1. 1-Schritt RT-qPCR	51
10.4.2. 2-Schritt RT-qPCR	51
11. Proteomics	52
11.1. Herstellung des Proteinrohextrakts	52
11.2. Messung der spezifischen NAGS-Enzymaktivität	52
IV. Ergebnisse	53
1. Charakterisierung der transkriptionellen Organisation des Arginin-Operons von <i>Corynebacterium glutamicum</i>	53
1.1. Anhand von Northern Blots können Prozessierungsstellen innerhalb des <i>arg</i> -Operons identifiziert werden	53
1.2. Die Transkriptomsequenzierung von <i>C. glutamicum</i> gibt weitere Einblicke in die transkriptionelle Organisation des <i>arg</i> -Operons	56

2. Beschreibung und biologische Relevanz einer <i>antisense</i> RNA gegenüber <i>argC</i>, dem ersten Gen des Argininoperons	58
2.1. Die Transkriptomsequenzierung von <i>C. glutamicum</i> enthüllt eine <i>antisense</i> RNA gegenüber <i>argC</i>	58
2.2. Durch Einbringung einer Mutation in die Promotorregion von <i>asaC</i> wird die <i>argC</i> Transkription beeinflusst	60
2.3. Eine Überexpression der <i>antisense</i> RNA <i>in trans</i> hat keinen Einfluss auf die <i>argC</i> Transkription und validiert ‚Transkriptionelle Interferenz‘ als regulatorischen Mechanismus.....	65
3. Eine neue Variante von <i>N</i>-Acetylglutamat Synthase ist verantwortlich für den ersten Schritt der Argininbiosynthese in <i>C. glutamicum</i>	67
3.1. Die Akkumulierung von intrazellulären Arginin-Intermediaten gibt Hinweise auf eine unbekannte <i>N</i> -Acetylglutamat Synthase	67
3.2. Auffindung eines Gens, dessen Protein den ersten Argininbiosyntheseschritt durchführen kann	70
3.3. Validierung der Genfunktion von <i>cg3035</i> durch heterologe Komplementation, metabolische Analyse, Enzymassays und Gendeletion	73
3.4. <i>Cg3035</i> begründet eine neue Klasse von NAGS-Genen	76
V. Diskussion	80
1. Die basale Transkription des Argininbiosynthese-Operons von <i>C. glutamicum</i> wird durch Transkriptionsinterferenz eines <i>antisense</i> Promotors in <i>argC</i> kontrolliert	80
1.1. Die transkriptionelle Organisation des Argininoperons	80
1.2. Die transkriptionelle Interferenz wird durch die ArgR-Bindung moduliert	82
1.3. Die <i>antisense</i> RNA führt zu einer transkriptionellen Rauschunterdrückung der Argininbiosynthese	85

2. Eine neue Variante von <i>N</i>-Acetylglutamat Synthase ist für den ersten Schritt der Argininbiosynthese in <i>C. glutamicum</i> verantwortlich	86
2.1. Durch die Poolanalysen der intrazellulären Argininintermediate werden neue Einblicke in die Argininbiosynthese erhalten	86
2.2. Die putative <i>N</i> -Acetylglutamat Synthase Cg1722 ist weder in die Argininbiosynthese involviert noch besitzt sie NAGS-Enzymaktivität	87
2.3. Cg3035 – Eine neue Art von <i>N</i> -Acetylglutamat Synthase	87
3. Ausblick	90
VI. Literaturverzeichnis	91
VII. Anhang	104
Plasmidkarten	104

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. II.1:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von <i>Corynebacterium glutamicum</i>	4
Abb. II.2:	Zirkuläre Darstellung des <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 Chromosoms	6
Abb. II.3:	Strukturformel der Aminosäure L-Arginin	7
Abb. II.4:	Allgemeiner Weg der Argininbiosynthese in Prokaryoten, der die zwei bekannten Routen zur Entfernung der Acetylgruppe enthält	9
Abb. II.5:	Darstellung des <i>arg</i> -Operons von <i>C. glutamicum</i>	12
Abb. II.6:	Mechanismen mittels derer <i>antisense</i> RNAs agieren können	17
Abb. II.7:	3D-Proteinstruktur von ArgR aus <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	20
Abb. III.1:	Schematische Darstellung des <i>GeneSOE</i> ings am Beispiel einer gezielten Deletion	46
Abb. IV.1:	Visualisierung und Interpretation von Northern Blots für verschiedene Gene des Arginin-Operons von <i>C. glutamicum</i>	54
Abb. IV.2:	Akkumulierte <i>reads</i> (schwarz) des Argininoperons sowie die Promotorregionen, die anhand der cDNA-Sequenzierung von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 mit dem Solexa Genome Analyzer IIx (Illumina) identifiziert wurden	57
Abb. IV.3:	Chemilumineszenz-Scan des spezifischen Northern Blots von <i>AsaC</i>	59
Abb. IV.4:	Mittels RNAfold vorhergesagte minimale freie Energie (MFE)-Struktur von <i>AsaC</i>	60
Abb. IV.5:	Kodier- und Aminosäuresequenz der Wildtyp- und der mutierten Promotorregion von <i>asaC</i>	61
Abb. IV.6:	Wachstumstest von <i>C. glutamicum</i> $\Delta argC$ mit verschiedenen pZ8-1-Über- expressionskonstrukten auf MM1-Minimalmediumsplatten	62
Abb. IV.7:	Messung der Promotoraktivität des nativen (nat) und des mutierten (mut) <i>asaC</i> - Promotors in dem Promotortestvektor pPRIM2 mittels RT-qPCR des Chloramphenicol Acetyltransferase (<i>cat</i>) mRNA-Levels	63
Abb. IV.8:	mRNA-Mengen von <i>argC</i> und <i>asaC</i> in verschiedenen Mutanten relativ zu denen im Wildtyp (WT)	64
Abb. IV.9:	mRNA-Mengen von <i>argC</i> und <i>asaC</i> im <i>C. glutamicum</i> Wildtyp, welcher eine Plasmid- basierte Kopie von <i>asaC</i> entweder unter Kontrolle des nativen oder des mutierten <i>asaC</i> -Promotors enthält	66

Abb. IV.10:	Wachstumstest von <i>C. glutamicum</i> -Stämmen auf MM1-Minimalmediumsplatten	67
Abb. IV.11:	HPLC-ESI-qTOF Analysen von sechs Intermediaten der Argininbiosynthese in verschiedenen biosynthetischen Mutanten	69
Abb. IV.12:	Tropftest auf M9-Minimalmedium mit den Komplementationen von <i>E. coli</i> JM109 $\Delta argA$	70
Abb. IV.13:	Schematischer Ablauf zur Auffindung eines Gens mit NAGS-Aktivität aus <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032, welches eine <i>E. coli</i> $\Delta argA$ -Mutante komplementieren kann	71
Abb. IV.14:	Elektropherogramm der partiell verdauten genomischen DNA zur Quantifizierung und Größenanalyse	71
Abb. IV.15:	Genomische Karte der chromosomalen Region von <i>C. glutamicum</i> , die den durch Komplementation identifizierten <i>cg3035</i> -ORF enthält, welcher wahrscheinlich den ersten Schritt der Argininbiosynthese katalysiert	72
Abb. IV.16:	Tropftest auf M9-Minimalmedium mit den Komplementationen von <i>E. coli</i> JM109 $\Delta argA$	73
Abb. IV.17:	Normalisierte Peakflächen der intrazellulären <i>N</i> -Acetylglutamatpools in verschiedenen <i>C. glutamicum</i> -Stämmen	74
Abb. IV.18:	Tropftest auf MM1-Minimalmedium mit verschiedenen <i>C. glutamicum</i> -Stämmen	76
Abb. IV.19:	Phylogenetischer Baum der NAGS- und OAT-Proteinsequenzen von verschiedenen Bakterien	78
Abb. IV.20:	Genkontext von <i>cg3035</i> -Homologen in anderen Bakterien	79
Abb. V.1:	Interaktion von ArgR-Bindung und transkriptioneller Interferenz hinsichtlich der Transkription von <i>argC</i>	84
Abb. VII.1:	pK18 <i>mobsacB</i> -Leervektor	104
Abb. VII.2:	pZ8-1-Leervektor	104
Abb. VII.3:	pZ8-2-Leervektor	105
Abb. VII.4:	pRIM2-Leervektor	105
Abb. VII.5:	pEC-K99E-Leervektor	106

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. III.1:	Bakterienstämme	24
Tab. III.2:	Plasmide	25
Tab. III.3:	Primer	26
Tab. III.4:	Verwendete Chemikalien unter Angabe der Bezugsquelle	28
Tab. III.5:	Verwendete Materialien unter Angabe der Bezugsquelle	29
Tab. III.6:	Verwendete Geräte und Apparaturen unter Angabe des Herstellers	30
Tab. III.7:	Verwendete Computer-Software und deren Verwendungszweck	31
Tab. III.8:	Verwendete Antibiotika	33
Tab. IV.1:	Charakterisierung der ribosomalen Bindestellen stromaufwärts von <i>argJ – H</i>	58
Tab. IV.2:	Spezifische NAGS-Aktivitäten von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 und <i>C. glutamicum</i> <i>Δcg3035</i> , die verschiedene Plasmide enthalten	75

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Amp/ Ap	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AsaC	antisense RNA von argC
asRNA	antisense RNA
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BHI	<i>brain heart infusion</i>
bp	Basenpaar(e)
BPB	Bromphenolblau
C	Cytosin
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>C. glutamicum</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
CASO	Caseinpepton-Sojamehlpepton
<i>cat</i>	Chloramphenicol Acetyltransferase
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CoA	Coenzym A
CP	<i>crossing point</i>
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
DEPC	Diethyldicarbonat
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ds	doppelsträngig
DTT	1,4-Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESI	Elektrospray Ionisation
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
F	Farad (Einheit der elektrischen Kapazität)
G	Guanidin
GC-Gehalt	Guanin-Cytosin-Gehalt
<i>GeneSOEing</i>	<i>Gene-splicing by overlap extension</i>
GRAS	<i>generally regarded as safe</i>
HCl	Salzsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HTH	<i>helix-turn-helix</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	<i>kilo bases</i> (Kilobasen; 1000 Nukleotide)
kDa	Kilo Dalton; Molmasse
Km	Kanamycin
L-Arginin	<i>Levo</i> , links
LB	Luria Bertani
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>

mA	Milli-Ampere (Einheit der elektrischen Stromstärke)
max.	maximal
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MFE	minimale freie Energie
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MRM	<i>multiple reaction mode</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Massenspektrometrie
mut	mutiert
m/z	Verhältnis von Molekülmasse zu Ionenladung
NAGS	<i>N-Acetylglutamat Synthase</i>
nat	nativ
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
N-Terminus	Amino-Terminus
Nx	Nalidixinsäure
OAT	Ornithin Acetyltransferase
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
p.a.	<i>per analysis</i> (zur Analyse)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
qTOF	<i>quadrupole-Time-of-Flight</i>
r	resistent
RACE	<i>rapid amplification of cDNA-ends</i>
RBS	Ribosomen-Bindestelle
RNA	Ribonukleinsäure
RNAseq	RNA-Sequenzierung
rpm	<i>rounds per minute</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	<i>Reverse transcription-quantitative PCR</i>
SDS	<i>sodium dodecylsulfate, Natriumdodecylsulfat</i>
SOB	<i>super optimal broth</i>
sRNA	<i>small RNA</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA(-Puffer)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TLS	Translationsstart
TOF	<i>Time of flight</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i>
ün	über Nacht
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt (Einheit der elektrischen Spannung)
vs.	<i>versus</i> , gegen
wHTH	<i>winged helix-turn-helix</i>
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

I. Zusammenfassung

Arginin ist eine semi-essentielle Aminosäure und aufgrund der vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten von großem wirtschaftlichem Interesse. In *Corynebacterium glutamicum*, einem industriell bedeutsamen Produzenten von Aminosäuren, gibt es ein Argininoperon, welches aus den Genen *argCJBDFRGH* besteht und dessen Transkription ausgehend von einem Promotor stromaufwärts von *argC* durch ein *leaderless* Transkript initiiert wird. Die Argininbiosynthese besteht aus insgesamt acht aufeinanderfolgenden enzymatischen Schritten, und beginnt mit der Acetylierung von Glutamat. Reguliert wird die Biosynthese zum einen durch den transkriptionellen Regulator ArgR, der als Repressor wirkt und u.a. im Promotorbereich von *argC* bindet, und zum anderen durch eine *feedback* Inhibition von ArgB, dem zweiten Enzym der Argininbiosynthese.

Durch Northern Blots sowie durch die RNAseq-Daten konnte ein zweiter Promotor verifiziert werden, der den Transkriptionsstart eines *argGH*-Suboperons kennzeichnet. Überdies zeigten die Northern Blots, dass es viele Prozessierungsstellen innerhalb des *arg*-Operons gibt, die wahrscheinlich durch Endoribonukleasen oder andere RNA-modifizierende Enzyme gespalten werden.

Die RNAseq-Daten offenbarten die Existenz einer bislang unbekanntes *antisense* RNA (asRNA) gegenüber dem 5' Ende von *argC*, die AsaC genannt wurde. Transkriptionelle Analysen mit einer Δ *asaC* Mutante zeigten, dass die Transkription von *argC* negativ durch die asRNA beeinflusst wird und dass der Wirkmechanismus von AsaC transkriptionelle Interferenz ist. Aus diesen Ergebnissen konnte die biologische Bedeutung von AsaC abgeleitet werden: AsaC fungiert als zusätzlicher transkriptioneller Regulationsmechanismus der Argininbiosynthese und inhibiert die zufälligen Transkriptionsinitiationen am *argC*-Promotor, zu denen es kommt, wenn die RNA-Polymerase trotz der Bindung von ArgR sporadischen Zugang zur Promotorregion erhält. Bei inaktivem ArgR wird die transkriptionelle Interferenz jedoch umgekehrt. Somit ist AsaC nicht das dominierende regulatorische Element, jedoch bewirkt es durch seine Funktion als transkriptioneller Rauschunterdrücker eine Energieeinsparung für die Zelle.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde die Argininbiosynthese von *C. glutamicum* mittels Metabolom-*profiling* von definierten Deletionmutanten, die die zu erwartenden korrespondierenden intrazellulären Metabolite anstauen sollten, analysiert. Die Ergebnisse der HPLC-ESI-qTOF-Messungen gaben einen detaillierten Einblick in den Argininmetabolismus, indem sechs von sieben Intermediaten der Argininbiosynthese detektiert werden konnten. Die Akkumulation von *N*-Acetylglutamat in allen Mutanten war dabei eine Bestätigung der bislang unbekanntes NAGS-Aktivität, die für den ersten Schritt der Argininbiosynthese benötigt wird. Überdies konnte durch diese Ergebnisse herausge-

funden werden, dass das von einer anderen Gruppe vorgeschlagene NAGS-Gen *cg1722* nicht fähig ist, diese Reaktion auszuführen.

Aus anderen Organismen sind verschiedene Arten von NAGS-Genen bekannt, z.B. gibt es das "klassische" ArgA, das bifunktionelle ArgJ, ArgO und S-NAGS. Um das entsprechende Gen in *C. glutamicum* zu identifizieren, wurde eine genomische Bibliothek erzeugt und für die Komplementation einer *E. coli* Δ *argA* Mutante verwendet. Das komplementierende Plasmid enthielt einen Teil des Gens *cg3035*, dessen Protein eine Acetyltransferase-Domäne aufweist. Eingehende Untersuchungen zeigten, dass eine Deletion von *cg3035* im *C. glutamicum* Genom zu einer partiellen Auxotrophie für Arginin führt. Weiterhin verifizierte eine heterologe Überexpression des kompletten Cg3035 *in vivo* dessen Fähigkeit eine *E. coli* Δ *argA* Mutante zu komplementieren und eine homologe Überexpression führte zu einer signifikanten Erhöhung des intrazellulären *N*-Acetylglutamatpools. Zusätzlich bestätigten Enzymassays dessen *N*-Acetylglutamat Synthase-Funktion *in vitro*. Die Aminosäure-Sequenz von Cg3035 besitzt jedoch keine Ähnlichkeit zu Mitgliedern bekannter NAGS-Genfamilien, so dass Cg3035 eine neue Klasse von NAGS-Genen etabliert. Da Vertreter dieser neuen Klasse nur in Bakterien der Unterordnung *Corynebacterineae* gefunden wurden, wird der Name C-NAGS (*Corynebacterineae* NAGS) für diese Familie empfohlen.

II. Einleitung

1. Die Gattung *Corynebacterium*

1.1. Taxonomie der Corynebakterien

Die Gattung *Corynebacterium* wurde erstmals 1896 definiert und beinhaltet Gram-positive, unbewegliche, nicht-sporulierende und fakultativ anaerob bis aerob lebende Bakterien mit stäbchen- bis keulenförmiger Gestalt (griech. *coryne* = Keule), welche sich durch einen hohen G+C-Gehalt (53-65 %) der DNA auszeichnen (Liebl *et al.*, 1991). Erstmals wurde diese Gattung zur taxonomischen Einordnung des humanpathogenen Vertreters *Corynebacterium diphtheriae* in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* beschrieben (aktuelle Version: Goodfellow & Whitman, 2012). Die bisher bekannten Corynebakterien wurden sowohl aus human- und veterinärklinischen Proben isoliert, als auch aus dem Boden, aus Fäkalien, aus Käse und anderen Milchprodukten, aus Gemüse oder Früchten, sowie aus Tierfutter (Eikmanns *et al.*, 1991). Aufgrund von 16S rDNA-Analysen lassen sich Corynebakterien allerdings eindeutig als monophyletische Gruppe beschreiben. Zurzeit gibt es über 110 verschiedene und beschriebene *Corynebacterium*-Spezies von denen viele von großem medizinischen und wirtschaftlichen Interesse sind (Ventura *et al.*, 2007). Phylogenetisch gehören die Vertreter der Unterordnung *Corynebacterineae*, in die die Corynebakterien eingegliedert werden, zur Ordnung *Actinomycetales*, die wiederum in die Klasse der *Actinobacteria* integriert ist (nach Euzéby, J.P.: *List of bacterial names with standing in nomenclature*, <http://www.bacterio.cict.fr/classifphyla.html>, Stand Mai 2013).

Die Actinomyceten zeichnen sich durch eine charakteristische Zellwandstruktur aus, die neben einer etwa vier Nanometer dicken Cytoplasmamembran, eine Elektronen-transparente Schicht sowie eine weitere äußere Membran von variabler Dicke besitzt (Brennan & Nikaido, 1995). Diese äußere Schicht besteht aus einem ineinandergreifenden Peptidoglykan- und Polysaccharidmykolat-Komplex und hat typischerweise Mycolsäuren auf ihrer Oberfläche. Diese Mycolsäuren sind langkettige Fettsäuren, die einen Teil der einzigartigen Zellhülle formen, welche u.a. für die Pathogenese und das Überleben des Organismus in einem Wirt verantwortlich sind (Ramulu *et al.*, 2006). So stellt jene besondere Zellwandstruktur aufgrund der äußeren Lipidschicht eine zusätzliche Barriere dar. Die Fähigkeit zur Bildung dieser zweiten Membran ähnelt funktionell der Zellwandstruktur gramnegativer Bakterien (Puech *et al.*, 2001) und hat entscheidende Bedeutung für den Aminosäureefflux (Eggeling & Sahn, 2001). Chemotaxonomische Studien aufgrund der Mycolsäure- und Lipidzusammensetzung sowie des Zellwandaufbaus bezüglich der Peptidoglykanstruktur zeigten eine enge phylogenetische

Verwandtschaft der Corynebakterien mit den Gattungen *Mycobacterium* und *Nocardia*, weshalb diese drei Gattungen in der CMN-Gruppe zusammengefasst werden (Bansal-Mutalik & Nikaido, 2011).

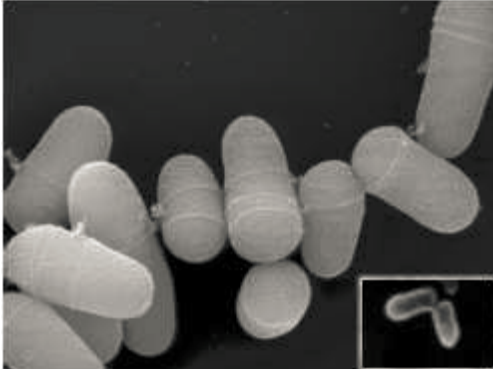


Abbildung II.1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Corynebacterium glutamicum*. Die typische Keulenform und das Abwinkeln der Zellen bei der Zellteilung (*snapping division*) sind erkennbar. Im Kästchen unten rechts sind zwei Zellen gekennzeichnet, die nach der Zellteilung noch V-förmig miteinander verbunden sind. (Quelle: (Eggeling & Bott, 2005))

Ein weiteres Merkmal ist die *snapping division*, welche durch die mehrschichtige Zellwand ermöglicht wird und während der Zellteilung auftritt. Dabei kommt es zu einem V-förmigen Abwinkeln der Zellen, verursacht durch ein asymmetrisches Aufreißen der Zellwand (Abbildung II.1), bei dem die innere Schicht an der Septumformation mitwirkt, während sich die äußere Membran aufteilt (Thanky *et al.*, 2007).

Weiterhin zeichnen sich Spezies des Genus *Corynebacterium* durch eine hohe Stabilität ihrer Genome aus, was durch eine hohe Konservierung der Genreihenfolge gekennzeichnet wird. In den nah verwandten Mycobakterien kann diese Eigenschaft nicht festgestellt werden, obwohl sich seit der evolutionären Trennung von den Mycobakterien einige der corynebakteriellen Genome kaum verändert haben (Nakamura *et al.*, 2003). Da eine Genom-Neuanordnung in einem Organismus Austausch und Verschiebungen von DNA-Segmenten im Chromosom darstellen, wurde vermutet, dass es eine Verbindung mit dem Rekombinations-Reparatursystem gibt. Und tatsächlich fehlen in den Corynebakterien die *recBCD*-Gene (Cox, 1998), was eine Erklärung für diese Syntenie sein könnte, da diese Gene normalerweise an der Entstehung chromosomaler Inversionen beteiligt sind, und somit zur Evolution der Genome beitragen (Nakamura *et al.*, 2003). Dass es innerhalb der Gattung *Corynebacterium* trotzdem zu diversen Artenbildungen gekommen ist, ist wahrscheinlich auf den Verlust und Zuegwin von Genen, sowie die Substitutionen einzelner Nukleotide in ihren Genomen zurückzuführen (Ventura *et al.*, 2007).

1.2. Biotechnologische und wirtschaftliche Bedeutung von *Corynebacterium glutamicum*

Neben den human- und tierpathogenen Vertretern der Gattung *Corynebacterium* (z.B. *C. jeikeium*, *C. diphtheriae*, *C. pseudotuberculosis*) zeichnen sich vor allem die apathogenen Mitglieder durch ihr breites Spektrum an Stoffwechselleistungen aus und sind deshalb von großem wirtschaftlichem Interesse. Die hier relevanten Spezies (wie z.B. *C. glutamicum*, *C. ammoniagenes*, *C. efficiens*) besiedeln die Habitate Boden oder Wasser und werden in die Gruppe der GRAS (*generally regarded as safe*)-Organismen eingeordnet. Zu den Einsatzgebieten, in denen Corynebakterien Verwendung finden, zählen u.a. die Herstellung und Umwandlung von Steroiden in biotechnologischen Verfahren (Decréau *et al.*, 2003), der Abbau halogenierter Kohlenwasserstoffe (Yokota *et al.*, 1987) und die Käse- reifung (Schröder *et al.*, 2011). Überwiegend finden sie jedoch Anwendung in der fermentativen Produktion von Aminosäuren, welche dann als Futter-, Nahrungs- sowie als Arzneimittelzusätze verwendet werden (Wohlleben *et al.*; Leuchtenberger, 1996). Die mikrobielle Produktion von Aminosäuren hat dabei gegenüber der chemischen Synthese den entscheidenden Vorteil, dass nur die natürliche L-Form der Aminosäure hervorgebracht wird (Kinoshita, 2005). Außerdem ist das Verfahren umweltfreundlicher und benötigt deutlich geringere Produktionskosten (Chen, 2012).

Im Jahre 1957 wurde das wohl bekannteste und produktionsrelevanteste Mitglied der Corynebakterien, *Corynebacterium glutamicum*, in einem *screening*-Verfahren für Aminosäure-produzierende Mikroorganismen identifiziert, allerdings wurde es damals zunächst unter der Bezeichnung *Micrococcus glutamicus* geführt (Kinoshita *et al.*, 1957). Im Überstand der Kultur wurden große Mengen an L-Glutamat gefunden; ein Befund der nicht nur wissenschaftliches, sondern auch wirtschaftliches Interesse weckte, denn Natrium-L-Glutamat findet zum Beispiel als Geschmacksverstärker weite Verwendung. Seither wurden für die meisten Aminosäuren fermentative Herstellungsverfahren entwickelt, in denen *C. glutamicum* als Produktionsstamm eingesetzt wird (Leuchtenberger, 1996).

C. glutamicum hat u.a. die für die Industrie wichtige Eigenschaft, hohe Wachstumsraten auch unter hohen Zuckerkonzentrationen zu besitzen (Ikeda & Takeno, 2013). Weitere relevante Eigenschaften sind die natürliche Sekretion der Aminosäuren, sowie die begrenzten katabolischen Stoffwechselwege zum Recycling überflüssiger Aminosäuren (Wohlleben *et al.*, 1993). Aufgrund der großen industriellen Bedeutung von *C. glutamicum* wurde die Forschung an diesem Bakterium in den letzten Jahren stark vorangetrieben, sodass eine kontinuierliche Entwicklung und Optimierung von gentechnischen Methoden für *C. glutamicum* stattfinden konnte, welche sowohl für die weitere Grundlagenforschung als auch für gezieltes *metabolic engineering* die Grundlagen schafften (Eikmanns *et al.*, 1991;

Cadenas *et al.*, 1991; Bardonnet & Blanco, 1991; Schäfer *et al.*, 1994; Tauch *et al.*, 2002; Kirchner & Tauch, 2003).

Im Jahr 2003 wurde die Genomsequenz von *C. glutamicum* von gleich zwei Gruppen entschlüsselt (Abbildung II.2) (Kalinowski *et al.*, 2003; Ikeda & Nakagawa, 2003). In Kombination mit rekombinanten DNA-Transfertechniken bildete dies die Grundlage für die rationale Konstruktion verbesserter Produktionsstämme von *C. glutamicum*.

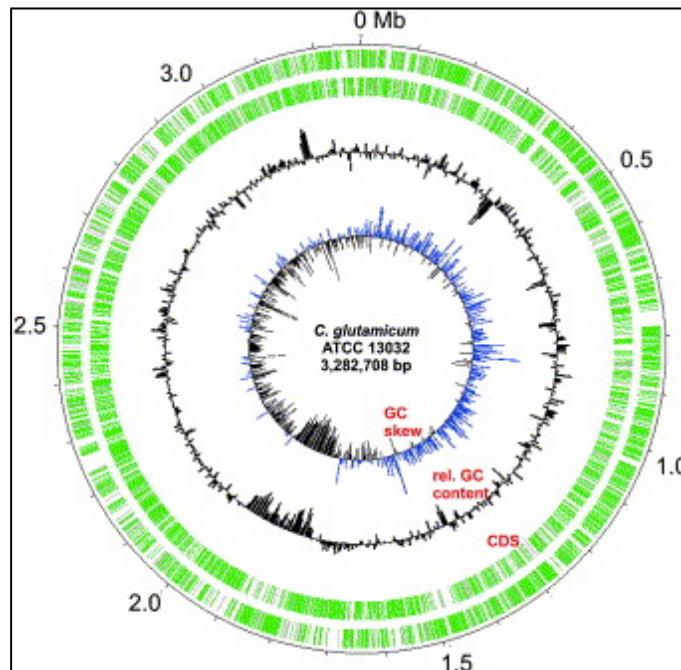


Abbildung II.2: Zirkuläre Darstellung des *C. glutamicum* ATCC13032 Chromosoms. Die Darstellung zeigt das 3,28 Mbp große Genom von *C. glutamicum* ATCC 13032, wobei die konzentrischen Kreise (von außen nach innen) Folgendes beschreiben: die auf dem positiven und negativem DNA-Strang transkribierten Kodiersequenzen (CDS), den relativen GC-Gehalt und den GC-skew, der zur Identifizierung des *leading* und des *lagging strand* der DNA-Replikation genutzt wird. Eine positive Abweichung vom Mittelwert des GC-Gehalts wird durch nach außen zeigende Säulen angezeigt, eine negative Abweichung durch nach innen gerichtete Säulen. Dasselbe gilt für den GC-skew, bei dem positive Werte blau und negative Werte schwarz dargestellt sind (aus Kalinowski *et al.*, 2003).

Gegenwärtig werden mit genetisch veränderten *C. glutamicum* Stämmen überwiegend die für die Tierzucht essentiellen Aminosäuren L-Glutamat (2,8 Mio t/a), L-Lysin (1,48 Mio t/a), L-Threonin (0,23 Mio t/a) und L-Tryptophan (4800 t/a) produziert (Ajinomoto, 2011, 2012). Die momentane Produktausbeute hinsichtlich des verbrauchten Zuckers (w/w %) kann folgendermaßen veranschlagt werden: Lysin-Hydrochlorid 45-55 %, Glutamat 45-55 %, Glutamin 35-45 %, Arginin 30-40 %, Threonin 40-50 %, Methionin 15-20 % und Histidin 20-30 % (Ikeda & Takeno).

2. Der Argininbiosyntheseweg in Prokaryoten

2.1. Biologische Relevanz der Aminosäure L-Arginin

Da im Rahmen dieser Arbeit die Aminosäure L-Arginin im Fokus steht, soll im Folgenden auf dessen Charakteristika sowie auf die bislang in der Literatur beschriebenen genetischen Modifikationen zur Erzeugung eines Argininproduzenten auf Basis von *C. glutamicum* eingegangen werden.

L-Arginin (Abbildung II.3) gehört zu den basischen Aminosäuren und ist von allen proteinogenen Aminosäuren die mit dem höchsten Massenanteil an Stickstoff. Für uns Menschen ist sie semi-essentiell und in vielen Bereichen der humanen Physiologie und des Metabolismus involviert. Sie wird als nicht essentiell betrach-

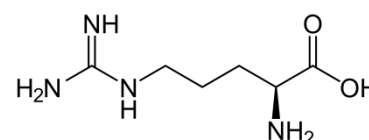


Abbildung II.3: Strukturformel der Aminosäure L-Arginin

tet, da der Mensch sie *de novo* aus L-Glutamin, L-Glutamat und L-Prolin synthetisieren kann (Appleton, 2002). Allerdings wird sie während Wachstumsphasen, schwerwiegendem Stress und Verletzungen in höheren Konzentrationen benötigt, so dass sie in diesen Phasen extern zugeführt werden muss (Tong & Barbul, 2004). Es ist bekannt, dass Arginin an der Ammoniakentgiftung, der Hormonsekretion und an der Anpassung des Immunsystems beteiligt ist. Desweiteren ist Arginin eine Vorstufe von Stickstoffmonoxid (NO), einem endogenen *messenger*-Molekül, welches u.a. eine gefäßerweiternde Wirkung auf die Blutgefäße hat, an der Signaltransduktion im Gefäß- und Nervensystem mitwirkt und als reaktive Stickstoffspezies bei der unspezifischen Immunantwort agiert (Beligni & Lamatina, 2001). Durch den NO-stimulierenden Effekt, den Arginin hat, kann es als therapeutisches Mittel gegen Angina pectoris, kongestive Herzinsuffizienz, Bluthochdruck, koronare Herzkrankheiten, Schaufensterkrankheit, und erektile Dysfunktion eingesetzt werden. In den letzten Jahren wurde Arginin außerdem hinsichtlich einer Anwendung bei HIV/AIDS, Verbrennungen und Traumata, Krebs, Diabetes und gastrointestinalen Krankheiten untersucht (Sinclair, 2000; Appleton, 2002; Sobrevia & González, 2009; Delage *et al.*, 2010). Aufmerksamkeit bei den Sportlern erregten Studien, die Arginin eine leistungssteigernde Wirkung in Bezug auf Muskelaufbau, -stärke und -regeneration nachsagten. Jedoch sind diese Ergebnisse umstritten (Álvares *et al.*, 2011).

Aufgrund der vielen Anwendungsmöglichkeiten hat das wirtschaftliche Interesse an der Aminosäure L-Arginin stark zugenommen und deshalb wurden unlängst sowohl zahlreiche Bemühungen in die Entwicklung von effizienteren Produktionsstämmen als auch in die Analyse des Argininmetabolismus gesteckt (Utagawa, 2004; Glansdorff & Ying, 2006; Lee *et al.*, 2010). Da Glutamat die Vorstufe der Argininbiosynthese darstellt, ist *C. glutamicum* als natürlicher Glutamaterzeuger besonders geeignet für die Konstruktion von L-Arginin-produzierenden Stämmen.

2.2. Klassische und *de novo* Argininbiosynthese in Prokaryoten

In Prokaryoten startet die Argininbiosynthese mit Glutamat (Abbildung II.4) und wird durch eine Abfolge von acht enzymatischen Reaktionen durchgeführt. Der initiale Schritt ist die Acetylierung des Glutamats mittels der *N*-Acetylglutamat Synthase (NAGS), wodurch verhindert wird, dass das Glutamat zyklisiert und für die Prolinbiosynthese verwendet wird (Caldovic & Tuchman, 2003). Nach der Metabolisierung des *N*-Acetylglutamats werden in den drei folgenden enzymatischen Schritten weitere acetylierte Intermediate erzeugt, bis dann im fünften Schritt die Acetylgruppe entfernt wird. Das resultierende Ornithin, ebenfalls eine nicht-proteinogene Aminosäure, wird zu Citrullin carbamoyliert. Durch den Einbau von Aspartat wird *N*-Argininosuccinat gebildet, welches schließlich zu L-Arginin umgewandelt wird (Glansdorff & Ying, 2006).

Die Enzyme, die in Prokaryoten die Entstehung von *N*-Acetylglutamat katalysieren, zeigen eine hohe Diversität. Erstmals wurde die *N*-Acetylglutamat Synthase-Aktivität in *Escherichia coli* entdeckt (Maas *et al.*, 1953). In diesem Organismus besitzt das zwei-Domänen Protein ArgA eine Carbamat Kinase-Domäne an seinem N-Terminus, welche homolog zum nächsten Enzym der Argininbiosynthese, der *N*-Acetylglutamat Kinase (NAGK, ArgB) ist (Ramón-Maiques *et al.*, 2002). Die eigentliche *N*-Acetylglutamat Synthase-Domäne sowie eine Acetyl-CoA Binderegion sind am C-Terminus von ArgA lokalisiert. Diese Domäne ist verwandt mit der großen Familie der GCN5-ähnlichen Acetyltransferasen (GNAT) (Glansdorff & Ying, 2006). Nähere Analysen haben gezeigt, dass ArgA von *E. coli* durch das Endprodukt L-Arginin stark *feedback* inhibiert wird, welches schon bei 0,02 mM eine 50 % Inhibition bewirkt (Maas, 1961). Aber auch Coenzym A (CoA) und *N*-Acetylglutamat inhibieren die Enzymaktivität: 2,5 mM CoA bzw. 25 mM *N*-Acetylglutamat resultieren in einer 50 % Inhibition (Powers-Lee, 1985). In *E. coli* wird die Entfernung der Acetylgruppe während des fünften Schrittes durch ArgE (*N*-Acetylornithin Deacetylase) katalysiert, woraus ein linearer Biosyntheseweg resultiert (Cunin *et al.*, 1986).

Für die Umwandlung der acetylierten Intermediate hat die Mehrheit der Prokaryoten jedoch einen ökonomischeren zyklischen Biosyntheseweg entwickelt, in dem ArgJ (Ornithin Acetyltransferase, OAT) die Acetylierung von Glutamat katalysiert (Sakanyan *et al.*, 1996). ArgJ fungiert dabei als bifunktionales Protein welches beide Substrate, sowohl Acetyl-CoA als auch *N*-Acetylornithin, verwerten kann, wodurch es NAGS- und OAT-Aktivität besitzt (Marc *et al.*, 2000). Im Falle des ersten Biosyntheseschrittes vollzieht NAGS durch die Vorbereitung der Argininbiosynthese diesen essentiellen Schritt, jedoch hat es insgesamt nur eine anaplerotische Funktion. Ein Großteil des *N*-Acetylglutamats wird währenddessen durch ArgJ produziert, das L-Glutamat und *N*-Acetylornithin als Substrate verwendet.

Acetyl-CoA wird dabei mittels Transacetylierung des L-Glutamats recycelt. Deshalb wird diese Reaktion generell bevorzugt, was auch die geringe Menge an NAGS-Enzymen in Organismen mit OAT-Aktivität erklärt (Caldovic & Tuchman, 2003).

Die Regulation dieses metabolischen Biosynthesewegs wird allgemein durch *feedback* Inhibition des zweiten Enzyms des Pfades, der *N*-Acetylglutamat Kinase (ArgB) durch L-Arginin (Udaka, 1966) und/oder durch *feedback* Inhibition von ArgJ durch L-Ornithin erreicht (Sakanyan *et al.*, 1996).

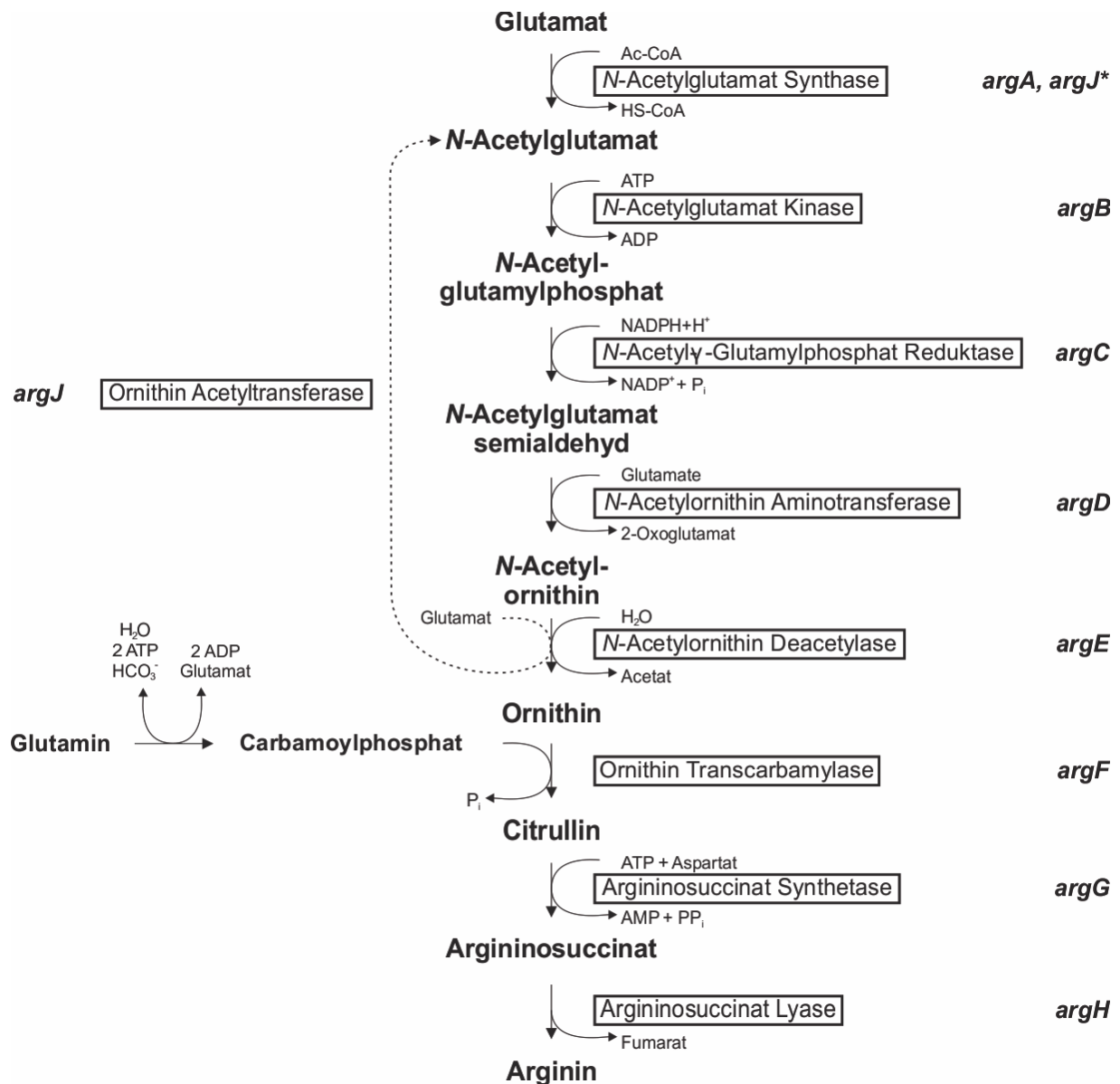


Abbildung II.4: Allgemeiner Weg der Argininbiosynthese in Prokaryoten, der die zwei bekannten Routen zur Entfernung der Acetylgruppe enthält. Die vertikalen Pfeile repräsentieren den linearen Biosyntheseweg, wohingegen der alternative zyklische Weg, in dem die Acetylgruppe durch die Ornithin Acetyltransferase (durch *argJ* kodiert) recycelt wird, durch den gestrichelten Pfeil angegeben ist. Die Intermediate und die direkten Vorstufen sind in Fettschrift dargestellt und die Enzyme in Kästchen. ArgJ* kennzeichnet das bifunktionale Protein. Abkürzungen: HS-CoA = Coenzym A; Ac-CoA = Acetyl-CoA; PP_i = Pyrophosphat; HCO₃⁻ = Bikarbonat.

In den meisten Bakterien ist entweder ein bifunktionales ArgJ oder aber ArgA verantwortlich für die Erzeugung von *N*-Acetylglutamat, dennoch existieren auch einige Organismen wie *Neisseria gonorrhoeae* (Martin & Mulks, 1992) oder *Bacillus stearothermophilus* (Sakanyan *et al.*, 1992) in denen beide Aktivitäten vorkommen, d.h. sie besitzen sowohl ein bifunktionales OAT- wie auch ein NAGS-Gen. Es gibt jedoch auch OATs, die nicht in der Lage sind, Acetyl-CoA als Substrat zu verwenden, weshalb sie 'monofunktional' genannt werden. In diesem Fall wird ein zusätzliches NAGS-Gen benötigt, aber interessanterweise kann in Organismen wie *Streptomyces coelicolor* oder *Thermus thermophilus*, die beide ein monofunktionales ArgJ besitzen, kein Ortholog von ArgA durch Sequenzähnlichkeitssuchen identifiziert werden (Errey & Blanchard, 2005). In diesen Organismen verblieb der Glutamat-Acetylierungsmechanismus lange unklar, bis im Jahr 2005 Errey *et al.* eine neues ArgA Protein in *Mycobacterium tuberculosis* entdeckten, welches nur eine einzige Domäne besitzt und lediglich aus 174 Aminosäuren besteht (Errey & Blanchard, 2005). Diese "short NAGS" (S-NAGS)-Version ist ein putatives GNAT-ähnliches Enzym und wurde später auch in anderen Gattungen wie z.B. *Thermus* und *Streptomyces* gefunden. Die Proteine dieser Familie besitzen nur 150 bis 180 Aminosäuren, was der Länge der C-terminalen Acetyl-CoA-Domäne des klassischen NAGS ähnelt, aber trotzdem sind diese fähig, *E. coli argA* Mutanten zu komplementieren (Xu *et al.*, 2006).

Neben den Einzeldomänen S-NAGS existiert noch eine weitere Gruppe von Proteinen, in denen eine S-NAGS-Domäne mit einer *N*-Argininosuccinase (ArgH)-Domäne, von dem Protein, das den letzten Schritt der Argininbiosynthese katalysiert, fusioniert ist. Diese *argH(A)* Gene wurden hauptsächlich in marinen Bakterien der *Alteromonas-Vibrio*-Gruppe gefunden (Xu *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2006). Es wird spekuliert, dass diese Form der S-NAGS immer eine Komplexbildung mit einem Proteinpartner benötigt, der eine effiziente Glutamat-Bindestelle besitzt (Glansdorff & Ying, 2006).

2.3. Die Argininbiosynthese und -produktion mit *C. glutamicum*

C. glutamicum ist, wie oben bereits erwähnt, ein natürlicher Produzent von L-Glutamat, der Vorstufe von L-Arginin, weshalb die Argininbiosynthese in diesem Organismus auch bereits intensiv erforscht wurde. Die frühesten Studien wurden im Jahre 1958 von Udaka und Kinoshita durchgeführt, die den metabolischen Pfad von L-Ornithin, einem Intermediat der Argininbiosynthese, analysierten. Sie fanden heraus, dass die acetylierten Komponenten einen Reaktionskreis formen, in dem die Acetylgruppe durch Erzeugung von *N*-Acetylglutamat regeneriert wird (Udaka & Kinoshita, 1958). Daraus wurde geschlossen, dass *C. glutamicum* OAT-Aktivität besitzt, die durch ArgJ katalysiert wird. Im Jahre 1996 konstatierten Sakanyan *et al.* das monofunktionale Verhalten von ArgJ, indem sie dessen Fähigkeit

aufdecken, *E. coli argE* Mutanten komplementieren zu können, jedoch keine *argA* Mutanten. Mittels Enzym-Inhibitionstests stellten sie fest, dass L-Arginin keinen Einfluss auf die OAT-Aktivität hat, jedoch konnte eine Produkthemmung durch Zugabe von 5 mM L-Ornithin zum ArgJ-Enzym gezeigt werden.

Nichtsdestotrotz mangelt es ArgJ an einer NAGS-Aktivität und so wurden Untersuchungen zur Auffindung einer Glutamat Acetylase, welche den ersten Schritt der Argininbiosynthese durchführen kann, unternommen. Kürzlich wurde die Publikation einer koreanischen Gruppe veröffentlicht (Hwang & Cho, 2010), welche nach *C. glutamicum* *N*-Acetyltransferase Genen gesucht hat, die in der Lage sind, eine auxotrophe $\Delta argJ$ Mutante komplementieren zu können. Sie fanden heraus, dass Cg1722 (NCgl1469) NAGS-Aktivität zeigt und dass dessen Überexpression zu einem Anstieg der Ornithin-Produktion führt.

Wie bereits oben erwähnt, gibt es im linearen Argininbiosynthesweg eine *feedback*-Inhibition durch das Endprodukt L-Arginin, die den ersten Biosyntheseschritt, folglich also die *N*-Acetylglutamat Synthase (ArgA) betrifft. In *C. glutamicum*, welches L-Arginin über den zyklischen Pfad *de novo* synthetisiert und in dem es kein *argA*-Homolog gibt, wird der zweite Schritt, welcher durch die *N*-Acetylglutamat Kinase (NAGK, ArgB) katalysiert wird, durch L-Arginin *feedback*-reguliert (Sakanyan *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 2007). Bei der Arginin-sensitiven NAGK handelt es sich um ein Ring-ähnliches Homohexamer, an dem Arginin bei jeder dimeren Untereinheit an die Stelle nahe des interdimeren Knotenpunkts binden kann. Bereits 2 mM L-Arginin führen zu einer 50 %igen Inhibition von ArgB (Sakanyan *et al.*, 1996).

Nachdem die acetylierten Intermediate metabolisiert und dann im fünften Schritt durch ArgJ L-Ornithin synthetisiert wird, folgen drei weitere Reaktionen, in denen auf das L-Ornithin die Guanidinogruppe vom Carbamoylphosphat und die Aminogruppe vom Aspartat übertragen werden (Lu, 2006). Für diese Schritte wird L-Ornithin zunächst durch die Ornithin Carbamoyltransferase (OTC, ArgF) zu Citrullin carbamoyliert, wobei das zweite Substrat dieser Reaktion, Carbamoylphosphat, in einer Nebenreaktion durch das Enzym Carbamoylphosphat Synthase (CPS) gebildet wird. Das nach der Carbamoylierung entstandene Intermediat Citrullin wird durch ArgG (Argininosuccinat Synthetase) in Argininosuccinat umgewandelt, welches anschließend durch die Argininosuccinat Lyase (ArgH) in Fumarat und das Endprodukt L-Arginin gespalten wird (Glansdorff & Ying, 2006).

Folglich besteht die Argininbiosynthese in *C. glutamicum* aus acht enzymatischen Schritten, bei der die Zwischenprodukte in konsekutiven Reaktionen synthetisiert werden. Alle Gene, die in diesen Biosyntheseweg involviert sind, sind in einem Operon organisiert. In *C. glutamicum* besteht dieses aus sieben strukturellen Genen (siehe Abbildung II.5), die alle Enzyme kodieren, die für die Umwandlung von L-Glutamat zu L-Arginin nötig sind, sowie dem transkriptionellen Regulator ArgR (Yim *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009).

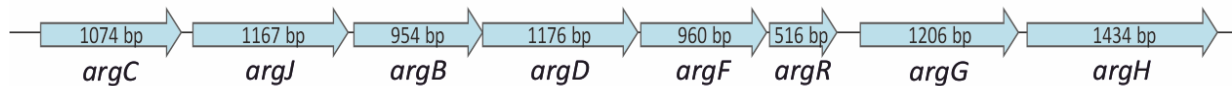


Abbildung II.5: Darstellung des *arg*-Operons von *C. glutamicum*. Das *arg*-Operon in *C. glutamicum* besteht aus acht hintereinander liegenden Genen, die im Genom einen Bereich von 8827 bp umfassen. Die Gene, in denen die jeweilige Basenanzahl vermerkt ist, sind hier durch Pfeile dargestellt, darunter ist jeweils der Name des betreffenden Gens angegeben.

Die rationale Erzeugung eines Argininproduzenten auf Basis von *C. glutamicum* wurde von Ikeda *et al.* beschrieben. Zunächst wurden dazu mehrere klassische Erzeuger sequenziert und systematisch auf Nukleotidsubstitutionen hin analysiert. Fünf spezifische Mutationen davon konnten im *arg*-Operon lokalisiert werden, davon zwei in *argB*, eine in *argR*, eine im Promotorbereich von *argG* und eine in der Kodiersequenz von *argG* (Ikeda *et al.*, 2009). Wiederum zwei von diesen wurden in verschiedene *C. glutamicum* Wildtypstämme integriert, wobei entdeckt wurde, dass *C. glutamicum* ATCC 13032 das größte Potential für die Produktion unter erhöhten Temperaturen (38 °C) hat. Durch weitere Modifizierungen des *argB* Gens, welches, wie oben beschrieben, für ein durch L-Arginin *feedback*-reguliertes Enzym kodiert, sowie der Deletion des transkriptionellen Regulators *argR*, konnte die Produktion so weit gesteigert werden, dass sie sogar die Ausbeute des klassischen Produzenten überstieg (Ikeda & Takeno, 2013).

3. Regulationsmechanismen auf transkriptioneller Ebene

Ein Großteil der prokaryotischen Komplexität und Vielseitigkeit rührt von ihrer Fähigkeit her, die Genexpression so abzustimmen, dass sie sich flexibel an die sich ständig veränderlichen Umweltbedingungen anpassen können. Durch diese adäquate Antwort auf interne und externe Stimuli ist es den Bakterien möglich, nur so viel Energie für die Synthese essentieller Proteine aufzuwenden wie zum Überleben benötigt wird. Die Evolution ist dabei sehr innovativ gewesen, indem sie aufwendige und oftmals verschlungene Mechanismen erschaffen hat, durch die verschiedene regulatorische Signale an den Promotoren operieren und interagieren, und damit die Genexpression steuern (van Hijum *et al.*, 2009).

Generell kann die Regulation der Genexpression auf verschiedene Arten gesteuert werden: durch die metabolische, transkriptionelle und/ oder translationale Regulation. Die transkriptionelle Regulation ist die erste und daher die am häufigsten genutzte Möglichkeit, die Expression eines Gens zu beeinflussen. Sie erfolgt z.B. mittels DNA-bindender Proteine, den Transkriptionsregulatoren oder durch *non-coding* RNAs (ncRNAs), die in den letzten Jahren immer größere Bedeutung erlangt haben (Raghavan *et al.*, 2012).

3.1. Transkriptionelle Regulation durch Transkriptionsfaktoren

Als Transkription wird der Prozess bezeichnet, in dem durch die RNA-Polymerase die DNA zu RNA (z.B. mRNA, tRNA, rRNA) transkribiert wird. Die Transkription besteht aus vier Phasen: (i) Präinitiation, (ii) Initiation, (iii) Elongation und (iv) Termination. Während der Präinitiation bindet die RNA-Polymerase an die Kernelemente des Promotors (-10 und -35 Region, wobei sich die Zahlen auf den Abstand zum Transkriptionsstart beziehen), die sich stromaufwärts eines Gens befinden. Beim Start der Initiation assoziieren Sigma-Faktoren an die RNA-Polymerase, wodurch die Bindewahrscheinlichkeit der RNA-Polymerase an den Promotorbereich des Zielgens noch einmal drastisch erhöht wird und die Transkription starten kann. Der Transkriptionsprozess beginnt an der DNA-Base, die als +1 gekennzeichnet ist und die mRNA wird so lange verlängert (Elongation) bis die Transkriptionstermination stattfindet. Diese Termination wird entweder durch *hairpin*-Strukturen in der DNA (transkriptionelle Terminatoren oder Rho-unabhängige Termination) oder durch Bindung des Rho-Faktors, welcher die mRNA von der DNA dissoziiert, vermittelt (Banerjee *et al.*, 2006; van Hijum *et al.*, 2009).

Einige Gene weisen hohe Transkriptmengen auf, während andere kaum oder gar nicht transkribiert werden. Dies liegt zum Großteil daran, dass die Transkriptionsregulation hauptsächlich am Anfang

der Transkription stattfindet, also zwischen der initialen Bindung der RNA-Polymerase an die DNA bis zur frühesten Phase der Elongation. Da die Versorgung mit Sigma-Faktoren und freier RNA-Polymerase in einer Zelle limitierend ist, kommt es zu einem heftigen Wettstreit zwischen den Promotoren um die Bindung des RNA-Holoenzym (RNA-Polymerase mit gebundem Sigma-Faktor) (Browning & Busby, 2004).

Die grundlegenden Bausteine eines transkriptionellen regulatorischen Netzwerkes einer Zelle sind die in *cis*-agierenden Regulator-Bindestellen (Operatoren) und die in *trans*-agierenden DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren (TFs), die zusammen die durch die RNA-Polymerase vermittelte Transkription eines bestimmten Gens regulieren. Transkriptionsfaktoren können, basierend auf der Sequenzkonservierung ihrer DNA-Bindedomäne, die spezifische Sequenzen innerhalb der Operatorregion von Zielgenen erkennen kann, in Familien eingruppiert werden (Pabo & Sauer, 1992). In Bakterien ist die weitverbreitetste DNA-Bindedomäne das *helix-turn-helix* (HTH)-Motiv, was in mehr als 80 % der Transkriptionsfaktoren vorkommt (Pérez-Rueda *et al.*, 2004). Basierend auf Variationen in der dreidimensionalen Struktur des HTH-Motivs können die DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren in unterschiedliche DNA-Bindedomänen-Typen eingeteilt werden. So gibt es beispielsweise den '*winged helix*'-Typ, der aus zwei Flügeln besteht - drei α -Helices und drei β -Faltblattstrukturen - und in vielen Familien von DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren vorkommt (Brune *et al.*, 2005). Ein interessantes Ergebnis von komparativen Studien zu DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren ist die Positions-Funktions-Korrelation, die ergab, dass Repressorproteine das HTH-Motiv innerhalb der N-terminalen Region lokalisiert haben, währenddessen Aktivatoren dazu tendieren, ihr HTH-Motiv nahe des C-terminalen Endes des Proteins zu haben (Perez-Rueda & Collado-Vides, 2000).

Die Mehrheit der Transkriptionsfaktoren besitzt mindestens eine weitere funktionale Domäne, um spezifische Signale zu sensieren (Pabo & Sauer, 1992). Diese Transkriptionsfaktor-Sensordomäne kann auf eine Vielzahl von Signalen reagieren, wobei es sich mehrheitlich um niedrig molekulare Komponenten, wie z.B. Aminosäuren handelt. Diese Moleküle bewirken eine Konformationsänderung, die die sequenzspezifische DNA-Bindung entweder erhöht oder abschwächt. So kann ein bestimmter Effektor durch Aktivierung eines Repressors dessen Bindung an die stromaufwärts gelegene Sequenz des Zielgens induzieren, was zu einer niedrigeren Transkription des Gens führt oder aber er kann einen Aktivator aktivieren (Seshasayee *et al.*, 2006; Alon, 2007). Ein Transkriptionsfaktor nimmt also ein Signal mit seiner Signalerkennungsdomäne wahr und agiert mit der DNA-Bindedomäne um optimale Konditionen in der Zelle zu gewährleisten (Janga *et al.*, 2007).

Bakterielle Transkriptionsregulatoren binden häufig als Dimere oder auch als Oligomere, die aus mehreren identischen Polypeptidketten bestehen, da so eine höhere Bindestabilität und -spezifität erreicht wird (Huffman & Brennan, 2002). Generell ist diese Oligomerisierung sinnvoll, da eine DNA-Bindedomäne nur eine kurze DNA-Sequenz von maximal 6 bp erkennen kann (Harrison & Aggarwal, 1990), wobei die statistische Wahrscheinlichkeit einer Sequenzwiederholung im Genom bei einer so kurzen Basenabfolge allerdings sehr hoch ist. Bei einem Oligomer hingegen erkennt jede DNA-Domäne einen Teil eines spezifischen Bindemotivs, was daher deutlich länger und somit spezifischer sein kann (Dong *et al.*, 1999). Daher bestehen die Bindestellen im Allgemeinen aus direkten oder invertierten *repeats* (ergeben ein sogenanntes Palindrom) und besitzen zwischen diesen Wiederholungen häufig einen Abstand von 10 bp (eine volle Umdrehung der DNA-Helix). Wenn die DNA-Bindestelle eines Transkriptionsfaktors innerhalb einer Promotorregion liegt, handelt es sich wahrscheinlich um einen Repressor, der typischerweise die Anlagerung der RNA-Polymerase verhindert. Bindestellen von Aktivatoren befinden sich allgemein stromaufwärts der Promotorregion und erleichtern der RNA-Polymerase die Binding an den Promotor (Collado-Vides *et al.*, 1991).

Häufig wird nicht nur die Expression eines einzelnen Gens oder Operons von einem transkriptionellen Regulator gesteuert, sondern der Transkriptionsfaktor kontrolliert gleichzeitig mehrere Gene oder Operons, die an unterschiedlichen Stellen im Genom lokalisiert sind. Diese konstituieren dann das sogenannte Regulon des Transkriptionsfaktors (Madan Babu *et al.*, 2006). Andersherum ist ein Gen bzw. Operon auch nicht zwingend nur der Kontrolle eines Regulators unterstellt, sondern es können auch mehrere Transkriptionsfaktoren regulatorisch einwirken. Ebenso können Transkriptionsfaktoren selbst Ziel einer transkriptionellen Regulation sein. Diese vielfältigen Interaktionen bilden das komplexe, hierarchische „Transkriptionelle Regulationsnetzwerk“ (TRN) einer Zelle (Ma *et al.*, 2004).

In dem Genom von *C. glutamicum* ATCC 13032 wurden 158 regulatorische Proteine identifiziert (Brune *et al.*, 2005; Brinkrolf *et al.*, 2007). Von diesen konnten 128 als potentielle DNA-bindende Transkriptionsfaktoren in 24 regulatorische Familien eingruppiert werden. Zusätzlich gibt es eine kleine Anzahl von unklassifizierten Proteinen. Alle bisher bekannten transkriptionellen Regulationen und das sich daraus ergebende TRN sind in der Datenbank CoryneRegNet zusammengefasst (Pauling *et al.*, 2012).

3.2. *Antisense* RNAs agieren als transkriptionelle Regulatoren

Seitdem die komplette Genomsequenz von *C. glutamicum* ATCC 13032 bekannt ist (Kalinowski *et al.*, 2003), wurden in den letzten Jahren globale Transkriptomanalysen, durch die z.B. Regulons identifiziert werden konnten, hauptsächlich mittels Microarray-Analysen durchgeführt (Sakanyan *et al.*, 1993). Hierbei wurden primär Vergleiche von verschiedenen Kultivierungsbedingungen und/ oder unterschiedlichen Stämmen, z.B. Wildtyp und Mutante, gemacht (Vertès *et al.*, 2012). Ein großer Nachteil dieser Technik ist jedoch, dass nur bekannte Transkripte analysiert werden können. Aus diesem Grund wurde die Existenz von nicht-Protein kodierenden Transkripten, wie den kleinen RNAs (*small* RNAs, sRNAs), lange Zeit nicht bzw. nur zufällig bemerkt (Altuvia, 2007). In den letzten Jahren wurden jedoch *next-generation sequencing* (NGS)-Techniken entwickelt, mit denen es nun möglich ist, neue Transkripte zu detektieren und die Transkriptabundanz direkt zu messen (Metzker, 2010; Morozova *et al.*, 2009), so dass mehr und mehr sRNAs in den Bakterien wahrgenommen werden (Raghavan *et al.*, 2012).

Seit der ersten Entdeckung von sRNAs sind mehr als 30 Jahre vergangen, so dass bereits einige Untersuchungen hinsichtlich dieser transkriptionellen Elemente gemacht wurden (Thomason & Storz, 2010). Die Mehrheit der charakterisierten sRNAs agieren mittels Basenpaarung mit ihren Ziel-mRNAs und sind in zwei Kategorien unterteilt: *trans*-kodierte und *cis*-kodierte sRNAs. *Trans*-agierende sRNAs werden an einer von der regulierten mRNA weit entfernten genomischen Position transkribiert. Sie besitzen nur eine nicht-perfekte Komplementarität mit ihren Zielen und haben deshalb häufig mehr als nur eine Ziel-mRNA (Vogel & Wagner, 2007). Die andere Kategorie, die *cis*-kodierte sRNAs, stammen vom DNA-Strang gegenüber eines Protein-kodierenden Gens und sind dementsprechend perfekt komplementär zu ihren Zielen. Solche bakteriellen *cis*-kodierte RNAs variieren in ihrer Größe und werden allgemein als *antisense* RNAs (asRNAs) bezeichnet (Sayed *et al.*, 2011). Obwohl in den meisten Fällen die biologische Rolle einer asRNA unbekannt ist, kann dennoch vermutet werden, dass die Mehrzahl eine spezifische Funktion hat, da sie für die Zelle kostspielig in der Produktion sind (Raghavan *et al.*, 2012). Für die, die einen Effekt auf die *sense*-Genexpression zeigten, gruppierten Thomason & Storz die gegenüber der asRNA liegenden Gene in drei Klassen: (i) Transposasen und toxische Proteine, die durch die asRNA reprimiert werden. (ii) Transkriptionelle Regulatoren, deren Expressionslevel durch die asRNA kontrolliert werden. (iii) Metabolische und virulente Proteine, deren Mengen durch die asRNA-Transkription moduliert werden. Dies gibt einen ersten Einblick in die Funktion von asRNAs, so dass generell gesagt werden kann, dass diese sehr wahrscheinlich einen Vorteil bieten, wenn die Proteinexpression sehr strikt unterdrückt werden muss. Oder sie sind eine

weitere Ebene der Kontrolle, besonders wenn die Zielgene bereits Gegenstand extensiver Regulation sind (Thomason & Storz, 2010).

Einige Wirkmechanismen von asRNAs konnten bereits identifiziert werden (Abbildung II.6). Wenn die asRNA die 5' UTR (untranslatierte Region) inklusive der ribosomalen Bindestelle des Zielgens überlappt, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Basenpaarung eine Ribosomenbindung verhindert und deshalb keine Expression stattfinden wird. Diese negative Regulation der Translation wird translationale Hemmung genannt (Waters & Storz, 2009). Alle anderen Mechanismen haben einen Effekt auf die Transkription der Ziel-mRNA.

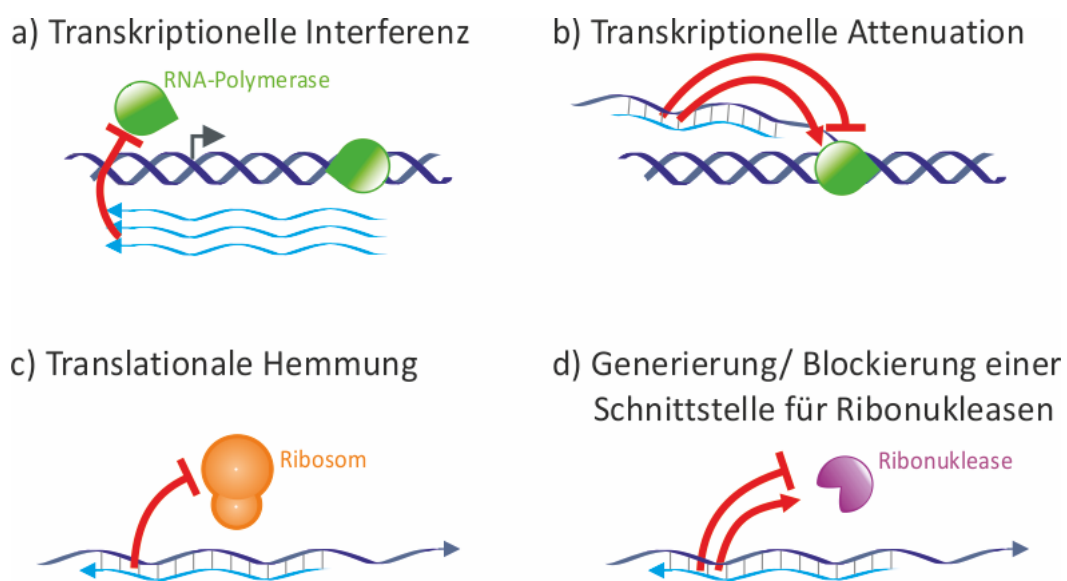


Abbildung II.6: Mechanismen mittels derer *antisense* RNAs agieren können. a) AsRNAs können eine transkriptionelle Interferenz induzieren, bei der die Transkription des einen Promotors die Transkription des zweiten, meist gegenüberliegenden Promotors blockiert. Dies kann durch Verhinderung der RNA-Polymerase-Bindung oder durch Verhinderung der Extension des Transkripts, welches auf dem anderen Strang kodiert ist, geschehen. Bei diesem Mechanismus erfolgt keine Basenpaarung von *sense*- und *antisense*-Transkript, so dass er dementsprechend nicht vorkommt, wenn die asRNA in *trans* erzeugt wird. b) Bei der Transkriptionsattenuation kommt es während des Transkriptionsvorganges zu einer Basenpaarung von *antisense* und Ziel-RNA. Dadurch wird die Faltungsstruktur der Ziel-RNA verändert, was letztendlich zu einer Haarnadelbildung führt durch die die Transkription terminiert wird. c) Befindet sich die Bindestelle der asRNA an der RBS (ribosomale Bindestelle) wird durch die Basenpaarung die Bindung des Ribosoms verhindert, so dass es zur translationalen Hemmung kommt. d) AsRNAs können aber auch die Degradation der Ziel-RNA, die von Endo- oder Exoribonukleasen durchgeführt wird, beeinflussen. In diesen Fällen kann durch die Basenpaarung von *sense* und *antisense* RNA entweder direkt eine Schnittstelle für eine Ribonuklease generiert oder blockiert werden. Die *sense* RNAs sind dunkelblau, die asRNAs hellblau gekennzeichnet. (nach Thomason & Storz, 2010)

Sollte eine asRNA mit der Kodierregion eines Gens paaren, kann es entweder zu einer Generierung oder Hemmung einer Schnittstelle für Endo- oder Exoribonukleasen kommen (Georg & Hess, 2011). So kann die Bindung der asRNA an ihr Ziel z.B. eine Schnittstelle für RNase III erzeugen, die doppel-

strängige RNA spalten kann. Im Gegensatz dazu erkennt und spaltet RNase E einzelsträngige A/U-reiche RNA-Regionen, so dass die zugehörige Erkennungssequenz durch die asRNA-mRNA Duplexbildung blockiert ist, was zu einer erhöhten Stabilität der mRNA führt (Stazic *et al.*, 2011; Thomason & Storz, 2010). Als dritte Handlungsform wurde die transkriptionelle Attenuation beschrieben. Hierbei wird die Transkription des gegenüberliegenden Stranges vorzeitig gestoppt, da die Anlagerung der asRNA an die mRNA die Ausbildung einer Rho-unabhängigen Terminatorstruktur bewirkt (Stork *et al.*, 2007).

Der letzte identifizierte Mechanismus ist die transkriptionelle Interferenz, die unabhängig von einer Duplexbildung auftritt. Bedingt durch die Existenz von zwei unterschiedlich starken Promotoren, die entweder gegenüberliegend oder überlappend angeordnet sind, wird der transkriptionelle Prozess der Ziel-RNA negativ beeinflusst. Die Transkription des Promotors mit der höheren RNA-Polymerase-Dichte inhibiert dabei die Transkription des anderen, indem sie entweder verhindert, dass die RNA-Polymerase während der Initiationsphase binden kann oder indem sie die schwächere Polymerase zwingt, nach der Kollision abzufallen, so dass der Elongationsprozess stoppt (Shearwin *et al.*, 2005; Callen *et al.*, 2004).

Alles in allem können asRNAs also entweder einen Einfluss auf die Translation oder auf die Transkription der *sense* RNA haben.

Die erste und bislang einzige chromosomal *cis*-kodierte asRNA in *C. glutamicum* wurde in 2007 von Zemanová *et al.* beschrieben (Zemanová *et al.*, 2008). Sie wurde ArnA genannt und ist inmitten der chromosomalen intergenischen Region von *cg1934-cg1935* lokalisiert. Durch Messungen der Promotoraktivitäten nach einem Hitzeshock wurde erkannt, dass der ECF-Sigmafaktor SigH in die Synthese der asRNA involviert ist. Darüber hinaus wurde herausgefunden, dass sich durch den Hitzeshock der transkriptionelle Startpunkt um 2 nt verschiebt und dass die beiden ArnA asRNA-Spezies 119 nt bzw. 131 nt lang sind. Weitere Analysen zeigten einen positiven Effekt von ArnA auf die *cg1935* Genexpression, jedoch ist der Wirkmechanismus mittels dem ArnA agiert noch unbekannt.

Während diese asRNA durch Zufall entdeckt wurde, können mittlerweile mittels Strang-spezifischer cDNA-Sequenzierungen gezielt viele sRNAs auf einmal ermittelt werden. Solch eine cDNA-Sequenzierung, hier RNAseq genannt, wurde für *C. glutamicum* ATCC 13032 durchgeführt. Neben einem Lauf, bei dem die 5' Enden der Transkripte untersucht wurden und einem für das komplette Transkriptom (Spencer *et al.*, 2012), wurde eine weitere RNAseq durchgeführt, um spezifisch sRNAs zu identifizieren (Horton *et al.*, 1989). Im letzten Fall wurde *C. glutamicum* ATCC 13032 in Minimalmedium kultiviert und verschiedenen Stressbedingungen ausgesetzt (Hitze, Kälte, Diamid, H₂O₂ und

Salz), wodurch die Transkription einer großen RNA-Menge sichergestellt werden sollte. Wie bereits für andere Bakterien bestätigt, z.B. *Pseudomonas putida* KT2440 (Frank *et al.*, 2011), konnte eine hohe Anzahl an bislang undetektierten sRNAs durch dieses Experiment identifiziert werden. Alles in allem führte die RNAseq zu der Entdeckung von *antisense*-Transkription in über 900 Genen, wobei noch nicht für alle eine Promotorregion identifiziert werden konnte (Mentz *et al.*, 2013; Pfeifer-Sancar *et al.*, 2013).

3.3. Transkriptionelle Regulation der Argininbiosynthese

Obwohl die genetische Organisation der Argininbiosynthesegene in den Mikroorganismen unterschiedlich ist – in einigen Prokaryoten wie in *Pseudomonas spp.* (Haas *et al.*, 1977) und *Cyanobacterium spp.* (Floriano *et al.*, 1994) sind sie über das gesamte Chromosom verteilt, während sie in anderen wie *C. glutamicum* ein Operon bilden – ist die transkriptionelle Regulation der Argininbiosynthese überraschend ähnlich. Zunächst einmal gibt es keinen Hinweis auf eine Transkriptionsattenuationskontrolle, wie es sonst von vielen anderen Aminosäurebiosynthesewegen bekannt ist (Cunin *et al.*, 1986). Unabhängig davon, ob es sich um einen linearen oder zyklischen Pfad handelt, gibt es jedoch immer eine *feedback*-Regulation durch das Endprodukt L-Arginin (Cunin *et al.*, 1986; Rodríguez-García *et al.*, 1997). Darüber hinaus wird die Transkription der Argininbiosynthesegene generell durch das ArgR Protein, einem L-Arginin-abhängigen DNA-bindenden Protein, welches als transkriptioneller Repressor agiert, reguliert (Lim *et al.*, 1987).

Da für die transkriptionelle Kontrolle der Expression des *arg*-Operons in erster Linie der transkriptionelle Regulator ArgR verantwortlich ist, soll im Folgenden näher darauf eingegangen werden. ArgR stellt ein regulatorisches Molekül dar, welches die Argininbiosynthese und in einigen Organismen auch den Argininkatabolismus in Abhängigkeit von der intrazellulären Argininkonzentration moduliert. Das Regulatorprotein gehört zur *winged helix-turn-helix* (WHTH) Superfamilie der DNA-bindenden Proteine und bindet an die Operatorstellen, die sich vor den jeweiligen Zielgenen befinden und führt damit in Gegenwart von L-Arginin zu einer sterischen Hinderung der RNA-Polymerase, wodurch es zu einer Repression der Argininbiosynthese kommt (Lee *et al.*, 2009). Neben der negativen Expressionsregulation kann ArgR in einigen Bakterien wie *E. coli*, *Bacillus licheniformis* oder *Pseudomonas aeruginosa* auch als Aktivator für katabolische Gene wirken, durch die L-Arginin zur Energierückgewinnung wieder in einfachere Moleküle abgebaut wird. So aktiviert es z.B. die Arginin Deiminase, die Arginin Succinyltransferase oder die Arginintransferasen, die die Verstoffwechslung

von L-Arginin einleiten (Maghnouj *et al.*, 1998; Lu, 2006). Desweiteren gibt es den Verdacht, dass ArgR zusätzlich Gene für Arginintransporter reguliert, die für den Import von L- Arginin aus einer extrazellulären Quelle zuständig sind (Schaumburg & Tan, 2006). Jedoch ist für *C. glutamicum* bislang nichts über den Argininkatabolismus bekannt und über die Existenz des Argininimporters wurden nur Vermutungen angestellt.

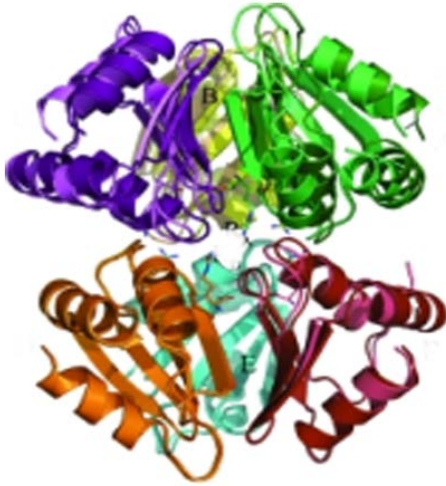


Abbildung II.7: 3D-Proteinstruktur von ArgR aus *Mycobacterium tuberculosis*. Alle sechs Untereinheiten sind in einer anderen Farbe dargestellt (aus Cherney *et al.*, 2008).

ArgR (Abbildung II.7) besteht aus einer basischen N-terminalen DNA-Domäne, die durch einen flexiblen Linker an die azidische C-terminale Domäne gekoppelt ist (Glansdorff & Ying, 2006). Die N-terminale Domäne enthält ein sogenanntes „SR“-Motiv, also ein Serin (an Aminosäure-Position 47) und ein Arginin (an Aminosäure-Position 48), welches in den bakteriellen ArgRs hochkonserviert und als DNA-Bindestelle innerhalb dieser Domäne angesehen wird (Grandori *et al.*, 1995). Bestätigt wurde dies, indem in *E. coli* einzelne Aminosäureaustausche an Position 47 oder 48 von ArgR zu einer verringerten Bindeaffinität des Repressors an die DNA führten (Tian *et al.*, 1992). Die C-terminale Domäne ist ebenfalls gut konserviert in allen Argininrepressoren und enthält das acht Aminosäuren lange Motiv „GTIAGDDTL/I“, an dem Arginin binden kann. Insbesondere von den beiden „DD“-Aminosäureresten ist bekannt, dass sie für die Oligomerisierung der ArgR-Proteine zum aktiven Hexamer erforderlich sind.

Aufgrund von Aminosäuresequenzanalysen wurde herausgefunden, dass das 171 Aminosäure lange *C. glutamicum* ArgR beide Motive besitzt: das „SR“-Motiv für die DNA-Bindung (Aminosäure-Positionen 57–58) in der N-terminalen Region und das „GTIAGDDTV“-Motiv für die Argininbindung (Aminosäure-Positionen 141–149) und die Oligomerisierung (Aminosäure-Positionen 146–147) in der C-terminalen Region (Yim *et al.*, 2011).

Das ArgR Protein ist hoch konserviert in verschiedenen Organismen, einschließlich Gram-Positiven, Gram-Negativen und Extremophilen (Lu, 2006). Durch komplexe DNA-Protein-Interaktionsstudien und strukturelle Analysen wurde gezeigt, dass es fundamentale Ähnlichkeiten zwischen dem *E. coli*

ArgR und seinem Homolog in *Bacillus subtilis* (AhrC) und *Geobacillus stearothermophilus* (van Duyne *et al.*, 1996; Sunnerhagen *et al.*, 1997; Ni *et al.*, 1999; Charlier & Glansdorff, 2004; Charlier, 2004) gibt, obwohl nur eine relative niedrige Sequenzähnlichkeit (25-30%) auftritt.

Das Hexamer ArgR besteht zunächst aus zwei Trimeren. Sechs Argininmoleküle können an die Koppelungsstelle zwischen den beiden Trimeren binden und induzieren eine Konformationsänderung, wodurch die Affinität des hexameren Repressors für die DNA erhöht wird. Außerdem orientieren sich die Erkennungshelices des wHTH-Motivs so, dass sie an die hintereinander liegenden Hauptfurchen der DNA-Helix andocken können (Ni *et al.*, 1999; Glansdorff & Ying, 2006). Das wHTH-Motiv der DNA-bindenden Domäne erkennt eine 40 bp lange Sequenz, die häufig aus zwei benachbarten imperfekten Palindromen besteht, welche durch 2-3 bp große Spacer getrennt sind (Ghochikyan *et al.*, 2002). Diese Sequenzen, die als ARG-Boxen bekannt sind, können jedoch auch als Einzelboxen, z.B. wie in *B. subtilis*, *B. licheniformis* oder *E. coli* vorkommen. Die putative Konsensussequenz ist von Makarova *et al.* (2001) beschrieben: TGMATwwwWATKCA, wobei M = A oder C, w = A oder T und K = G oder T steht (Makarova *et al.*, 2001). Weiterhin wurde bei den Untersuchungen herausgefunden, dass die ARG-Boxen nur schwach konserviert zu sein scheinen, sogar innerhalb eines Genoms, und dass die Spezifität oft durch ein kooperatives Zusammenspiel von in Reihe angeordneten Bindestellen erreicht wird. Die ARG-Boxen von verschiedenen Genomen sind jedoch einigermaßen homolog, so dass es sogar möglich ist, Argininrepressoren von verschiedenen taxonomisch ähnlichen Bakterien untereinander auszutauschen (Smith *et al.*, 1989; Soutar & Baumberg, 1996; Sanchez *et al.*, 2000). Lokalisiert sind diese Boxen meistens in der Nähe von ArgR-regulierten Promotoren bzw. überlappen die Promotorregion, da die Mehrzahl der Gene negativ durch ArgR reguliert werden und ArgR den Promotor durch seine Bindung blockiert (Schaumburg & Tan, 2006).

Die Bindestellen von ArgR in *C. glutamicum* waren in der Vergangenheit bereits mehrfach Gegenstand experimenteller Untersuchungen (Lee *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011; Yim *et al.*, 2011). Für das ArgR-Hexamer mit einer molekularen Masse von 110 kDa konnte stromaufwärts von *argC* die 32 bp lange ARG-Box „TATGCATGAATAATttgcATGATCATGCAATA“ von Yim *et al.* (2011) zunächst bioinformatisch und später auch mittels EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) identifiziert werden. Innerhalb des zweiten Promotors des *arg*-Operons, der sich *upstream* von *argG* befindet, sollte laut Lee *et al.* (2010) ebenfalls eine ArgR-Bindestelle vorhanden sein, jedoch konnte dieser Effekt während meiner Masterarbeit (Haasner, 2009) mittels EMSAs nicht bestätigt werden und wurde später auch von Anderen widerlegt (Yim *et al.*, 2011). Im Gegensatz zu *E. coli* geht ArgR in *C. glutamicum* keine ARG-Box voraus, so dass es nicht autoreguliert ist (Yim *et al.*, 2011).

Neben dem direkten Einfluss auf das *arg*-Operon hat ArgR auch eine hemmende Wirkung auf die Expression des *carABpyrF*-Operons, welches die Vorstufen für Pyrimidine und für Arginin liefert. Es wurde herausgefunden, dass dieses Operon in *E. coli* negativ durch Arginin beeinflusst wird und da die Promotorregion zwei 18 bp lange Sequenzen enthält, die homolog zu bekannten ARG-Boxen sind, wurde vermutet, dass ArgR auch hier für die negative Regulation verantwortlich ist (Lu *et al.*, 1989; Glansdorff & Ying, 2006). Es wurde angenommen, dass es in *C. glutamicum* auch eine ARG-Box an dieser Stelle gibt, wodurch ArgR den Nebenbiosyntheseweg, durch den Carbamoylphosphat synthetisiert wird, ebenfalls reprimiert. Tatsächlich konnte ich dies in meiner Masterarbeit durch EMSAs bestätigen (Haasner, 2009).

4. Zielsetzung der Arbeit

Unter natürlichen Bedingungen produzieren die meisten Mikroorganismen von einer Aminosäure nicht mehr als sie zum Überleben benötigen, was z.T. durch komplexe Regulationsvorgänge, z.B. auf Transkriptions- oder Enzymaktivitätsebene erreicht wird. Für die industrielle Gewinnung von Aminosäuren muss daher der Metabolismus durch gentechnische Eingriffe optimiert werden. Für eine stetige Verbesserung der Produktionsstämme sind das Verständnis der Stoffwechselwege, sowie deren Transkriptionsregulation von besonderem Interesse. Dabei bieten die Genomsequenz von *Corynebacterium glutamicum* und die Verfügbarkeit von verschiedenen Transkriptomsequenzierungsdaten die Möglichkeit der globalen Genom- und Transkriptionsanalyse.

Zunächst soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob es neben der bekannten Regulation durch den Repressor ArgR noch weitere Regulationsmechanismen der Argininbiosynthese auf transkriptioneller Ebene gibt. Um diese Frage zu klären, soll u.a. die transkriptionelle Organisation des Argininoperons aufgeklärt werden, wobei die Daten der Transkriptomsequenzierung miteinbezogen werden sollen.

Im zweiten Teil soll eine Charakterisierung aller metabolischen Intermediate der Argininbiosynthese durchgeführt werden. Hierzu sind Mutanten jedes einzelnen Arginins zu generieren und hinsichtlich ihrer angestauten Metabolite zu analysieren.

In weiteren Experimenten soll geklärt werden, ob bereits alle Argininbiosynthesegene bekannt sind. Insbesondere für den ersten Schritt der Biosynthese, der durch eine *N*-Acetylglutamat Synthase (NAGS) katalysiert wird, wurden Ergebnisse für ein neu identifiziertes Gen publiziert, die näher untersucht werden sollen. Sollten sich die veröffentlichten Resultate als fehlerhaft erweisen, soll im Rahmen dieser Dissertation nach dem „wahren“ NAGS-Gen gesucht und dies nachfolgend analysiert werden.

III. Material und Methoden

1. Bakterienstämme, Plasmide und Primer

1.1. Bakterienstämme

Folgende Bakterienstämme kamen zum Einsatz bzw. wurden im Rahmen dieser Arbeit konstruiert.

Tab. III.1: Bakterienstämme

Stamm	relevante Eigenschaften	Referenz
<i>Corynebacterium glutamicum</i>		
ATCC 13032	Wildtyp, Nx ^f	ATCC
$\Delta argR$	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 mit deletiertem <i>argR</i> Gen	I. Wiegräbe, Universität Bielefeld
$\Delta argC$	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 mit deletiertem <i>argC</i> Gen	diese Arbeit
$\Delta asaC$	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 mit Mutationen in der Promoteorregion von <i>asaC</i> , was in einem Knock-out der <i>antisense</i> RNA resultierte	diese Arbeit
$\Delta argR \Delta asaC$	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 mit deletiertem <i>argR</i> Gen und mit Mutationen in der Promoteorregion von <i>asaC</i>	diese Arbeit
$\Delta argRC$	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 mit deletiertem <i>argR</i> und <i>argC</i> Gen	diese Arbeit
$\Delta argRJ$	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 mit deletiertem <i>argR</i> und <i>argJ</i> Gen	diese Arbeit
$\Delta argRB$	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 mit deletiertem <i>argR</i> und <i>argB</i> Gen	diese Arbeit
$\Delta argRD$	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 mit deletiertem <i>argR</i> und <i>argD</i> Gen	diese Arbeit
$\Delta argFR$	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 mit deletiertem <i>argR</i> und <i>argF</i> Gen	diese Arbeit
TrpM <i>argG</i>	Transposonmutante von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 mit Insertion im <i>argG</i> Gen	Mormann <i>et al.</i> , 2006
$\Delta argRG$	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 mit deletiertem <i>argR</i> und <i>argG</i> Gen	diese Arbeit
$\Delta argH$	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 mit deletiertem <i>argH</i> Gen	diese Arbeit
$\Delta argRH$	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 mit deletiertem <i>argR</i> und <i>argH</i> Gen	diese Arbeit
$\Delta argR \Delta cg3035$	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 mit deletiertem <i>argR</i> und <i>cg3035</i> Gen	diese Arbeit
$\Delta cg3035$	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 mit deletiertem <i>cg3035</i> Gen	diese Arbeit
$\Delta cg1722$	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 mit deletiertem <i>cg1722</i> Gen	diese Arbeit

<i>Cg</i> pRIM2:: <i>P_{asaC}_nat</i>	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 mit pRIM2 welcher die native Promotorregion von <i>asaC</i> enthält	diese Arbeit
<i>Cg</i> pRIM2:: <i>P_{asaC}_mut</i>	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 mit pRIM2 welcher die mutierte Promotorregion von <i>asaC</i> enthält	diese Arbeit

<i>Escherichia coli</i>		
JM109	F' <i>traD36, proA⁺B⁺, lacI^q Δ(lacZ), M15/ Δ(lac-proAB,) glnV44, e14⁻, gyrA96, recA1, relA1, endA1, thi, hsdR17</i>	New England Biolabs
JM109 Δ <i>argA</i>	JM109 mit deletiertem <i>argA</i> Gen	diese Arbeit

1.2. Plasmide

Folgende Plasmide kamen im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz. Die Plasmidkarten der Leervektoren befinden sich im Anhang.

Tab. III.2: Plasmide

Plasmid	relevante Eigenschaften	Referenz
pK18 <i>mobsacB</i>	Mobilisierbarer <i>E. coli</i> -Klonierungsvektor pK18 <i>mob</i> , ermöglicht die Selektion auf Doppel-Crossover in <i>C. glutamicum</i> , beinhaltet zusätzlich ein <i>sacB</i> -Derivat, <i>lacZα</i> , <i>mcs</i> , Km ^R	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pK18::Δ <i>argC</i>	pK18 <i>mobsacB</i> mit einem 1044 bp Deletionskonstrukt des Gens <i>argC</i> von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	diese Arbeit
pK18::Δ <i>asaC</i>	pK18 <i>mobsacB</i> mit Mutationen in der -10 Promotorregion von <i>AsaC</i>	diese Arbeit
pK18::Δ <i>argJ</i>	pK18 <i>mobsacB</i> mit einem 1166 bp Deletionskonstrukt des Gens <i>argJ</i> von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	diese Arbeit
pK18::Δ <i>argB</i>	pK18 <i>mobsacB</i> mit einem 953 bp Deletionskonstrukt des Gens <i>argB</i> von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	diese Arbeit
pK18::Δ <i>argD</i>	pK18 <i>mobsacB</i> mit einem 1175 bp Deletionskonstrukt des Gens <i>argD</i> von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	diese Arbeit
pK18::Δ <i>argFR</i>	pK18 <i>mobsacB</i> mit einem Deletionskonstrukt der Gene <i>argFR</i> von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	Schneider <i>et al.</i> , 2011
pK18::Δ <i>argR</i>	pK18 <i>mobsacB</i> mit einem 346 bp Deletionskonstrukt des Gens <i>argR</i> von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	diese Arbeit
pK18::Δ <i>argRG</i>	pK18 <i>mobsacB</i> mit einem 1889 bp Deletionskonstrukt der Gene <i>argRG</i> von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	diese Arbeit
pK18::Δ <i>argH</i>	pK18 <i>mobsacB</i> mit einem 1434 bp Deletionskonstrukt des Gens <i>argH</i> von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	diese Arbeit
pK18::Δ <i>cg3035</i>	pK18 <i>mobsacB</i> mit einem 829 bp Deletionskonstrukt des Gens <i>cg3035</i> von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	diese Arbeit
pK18::Δ <i>cg1722</i>	pK18 <i>mobsacB</i> mit einem 612 bp Deletionskonstrukt des Gens <i>cg1722</i> von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	diese Arbeit
pZ8-1	konstitutiver Überexpressionsvektor mit P _{tac} , Km ^r	Dusch <i>et al.</i> , 1999
pZ8-2	modifizierter pZ8-1 dessen <i>multiple cloning site</i> durch eine einzige <i>Bam</i> HI-Erkennungsstelle und eine Konsensus-RBS ausgetauscht wurde	diese Arbeit

pZ8-1::argC	pZ8-1 mit dem strukturellen <i>argC</i> Gen von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	diese Arbeit
pZ8-1::argC ^{T70V,cta71ttg}	pZ8-1 mit dem mutierten strukturellen <i>argC</i> ^{T70V,cta71ttg} Gen von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	diese Arbeit
pZ8-1::argJ	pZ8-1 mit dem strukturellen <i>argJ</i> Gen von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	diese Arbeit
pZ8-1::cg3035	pZ8-1 mit dem strukturellen <i>cg3035</i> Gen von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	diese Arbeit
pZ8-1::cg1722	pZ8-1 mit dem strukturellen <i>cg1722</i> Gen von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	diese Arbeit
pZ8-1::argA	pZ8-1 mit dem strukturellen <i>argA</i> Gen von <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pEC-XK99E	<i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> Shuttle-Expressionsvektor, der auf der mittleren Kopienzahl des Plasmids pGA1 und auf P _{trc} basiert, Km ^r	Kirchner & Tauch, 2003
pEC-K99E	modifizierter pEC-XK99E ohne P _{trc} Promotor und <i>lacl_q</i>	diese Arbeit
pEC-K99E::asaC_P _{nat}	pEC-K99E mit <i>asaC</i> incl. ihres nativen Promotors von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	diese Arbeit
pEC-K99E::asaC_P _{mut}	pEC-K99E mit <i>asaC</i> incl. des mutierten Promotors von <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	diese Arbeit
pRIM2	Promotorloses <i>cat</i> , Km ^r , Δ <i>ppc</i>	Vašicová <i>et al.</i> , 1998
pRIM2::asaC_P _{nat}	pRIM2 mit der nativen Promotorregion von <i>asaC</i>	diese Arbeit
pRIM2::asaC_P _{mut}	pRIM2 mit der mutierten Promotorregion von <i>asaC</i>	diese Arbeit

1.3. Primer

Tab. III.3: Verwendete Primer (hergestellt von Invitrogen)

Primer	Sequenz ^a
Deletions- und Mutationsprimer für das <i>GeneSOEing</i>	
<i>argC</i> _d1	GGTGGTCTCGAATTACCGTAAGCTTGC GGCTTCC
<i>argC</i> _d2	CGCCGCTTTAAGGGCTACTTGCAAATTATTCATGCATAAA
<i>argC</i> _d3	AGTAGCGCCTTAAAGCGGCG
<i>argC</i> _d4	GGTGGTCTCGGATCCTGCACCATTGTCACCCAAA
<i>argC</i> ^{T70V, L71L} _1	GGTGGTCTCGAATTTGTCGTGGAGCAAGCTCCAG
<i>argC</i> ^{T70V, L71L} _2	AAATACGACATCATGACCGGCCAAGACTTCAGCTGTGGTG
<i>argC</i> ^{T70V, L71L} _3	CACCACAGCTGAAGTCTTGGCCGGTCATGATGTCGTATTTTC
<i>argC</i> ^{T70V, L71L} _4	GGTGGTCTCGGATCCCGCGAGGTAACGGTGCAAG
<i>argJ</i> _d1	GGTCAATTGCGCCACACCCGGAAATTGC
<i>argJ</i> _d2	AGTTGGAGTGCTGTTTCTTTGTGGAACCTCTACTGAATT
<i>argJ</i> _d3	AAAGAAAACAGCACTCCAACCT
<i>argJ</i> _d4	GGTAGATCTAGTGGGTACGCCATCGATGT
<i>argB</i> _d1	GGTGGTCTCGAATTCAACTCAGGATGAACTCAACG
<i>argB</i> _d2	CAAGTTTCAGCGTGCTCATTGCCTGTGCCCTTTCCCTG
<i>argB</i> _d3	ATGAGCACGCTGGAAACTTG
<i>argB</i> _d4	GGTGGTCTCGGATCGGGTAGAACTCCACACCGCT
<i>argD</i> _d1	GGTGAATTCTTGGTTTGGTCGGAGACATC
<i>argD</i> _d2	AAGTCATAAGTTTGAGTCCTTTTACAGTTCCTCCATCCTTG
<i>argD</i> _d3	AGGACTCAAACCTTATGACTT
<i>argD</i> _d4	GGTAGATCTCAGCCTTCTTACCCTTAAGG

<i>argR_d1</i>	GATCTAGAATTCTCGTGCGGAATTCGTGGA
<i>argR_d2</i>	TTACCTGTGAGCGGATCATGTACCTGGCTGGTGACT
<i>argR_d3</i>	TGATCCGCTCACAGGTAA
<i>argR_d4</i>	GATCTAGGATCCCTCAACGAGGTGCTTGAC
<i>argRG_d1</i>	GGTGGTCTCGAATTCAGGCCTTAAGGGTAAGAAG
<i>argRG_d2</i>	TGGATGCTTGAAAAGGTGGCGTCTTACCTCGGCTGGTTGG
<i>argRG_d3</i>	GCCACCTTTTCAAGCATCCA
<i>argRG_d4</i>	GGTGGTCTCGGATCGAGGGCGTCGACAAGCTCGG
<i>argH_d1</i>	GGTGGTCTCGAATTTCAAGTCCCGCGAAATCTAC
<i>argH_d2</i>	AAGCAGCACAGGCCATAAACGTTCCATGTGGTGTCTTCT
<i>argH_d3</i>	GTTTATGGCCTGTGCTGCTT
<i>argH_d4</i>	GGTGGTCTCGGATCTCGGTGATGGTCCGAATGT
<i>cg3035_d1</i>	GGTGGTCAATTGGAAATCCAGAGACCATGCC
<i>cg3035_d2</i>	TACCCTAGCTGTTTTGGATTTCCGCATCAGACGGCATCCC
<i>cg3035_d3</i>	AATCCAAAACAGCTAGGGTA
<i>cg3035_d4</i>	GGTGGTAGATCTTGAAGTCGCCGAGCAACACC
<i>cg1722_d1</i>	GGTCAATTGTGTTTCTCTACGGCTGCTC
<i>cg1722_d2</i>	CCCTTAAATCGCCTTCAGGGGGATACCAGAATAGCGAAAT
<i>cg1722_d3</i>	CCCTGAAGGCGATTTAAGGG
<i>cg1722_d4</i>	GGTAGATCTGAGGCGGGGAGTTCGACAG
Primer für die Deletion von <i>argA</i> in <i>E. coli</i> mittels RedET-System	
<i>argA_RedET1</i>	AACAGAATAAAAAACACTAATTTCAATAATCATGCAA-
<i>argA_RedET2</i>	GAGGTGTGCCAACCCCTCACTAAAGGGCGGC GGATGCGACGTACGAGTGTACGCATGTCGCATCCGACGAT- TTTCATCGCCGACTCACTATAGGGCTCGA
Primer für Überexpressionen mittels pZ8-1	
<i>argC_OvEx_1</i>	AGGTCTCGAATTGAAAGGAGGACAACCATGACAATCAAGGTTGCAATC
<i>argC_OvEx_2</i>	AGGTCTCGGATCGTTAAGGTGCGACGCCGACCT
<i>argJ_OvEx_1</i>	GGGTCTCTAATTAAAGGAGGACAACCATATGGCAGAAAAAGGCATTAC
<i>argJ_OvEx_2</i>	GGGTCTCCTCGATTACCCGGGAGAGCTGTACGCGGAGTTGA
<i>cg3035_e1</i>	AGGTCTCGAATTGAAAGGAGGACAACCATGACGCCTAGTCTTCCCCG
<i>cg3035_e2</i>	AGGTCTCGGATCGTTAGAATTTCCGTTCCGGCGT
<i>cg1722_e1</i>	GGTGGTGAATTCGAAAGGAGGACAACCATGAGTCCCACCGTTTTGCC
<i>cg1722_e2</i>	GGTGGTAGATCTGCAGGAATCACATCTGACCC
<i>argA_e1</i>	AGGTCTCGAATTGAAAGGAGGACAACCGTGGTAAAGGAACGTAAAC
<i>argA_e2</i>	AGGTCTCGGATCGTTACCCTAAATCCGCCATCA
Primer für <i>cat</i> Fusionen im pRIM2	
<i>asaC_P_{nat}1 (pRIM2)</i>	GGTAGATCTAGCTGAAACTCTAGCCGGTCATG
<i>asaC_P_{mut}1 (pRIM2)</i>	GGTAGATCTAGCTGAAGTCTTGCCGGTCATG
<i>asaC_2 (pRIM2)</i>	GGTGCTAGCCAATCACTGTGACATCTGGT
Primer für die Erzeugung von pEC-K99E::<i>asaC</i> (P_{nat}/ mut)	
<i>asaC_1 (pEC-K99E)</i>	GGTGGTGCATGCTCCTAGAAATACGACATCATG
<i>asaC_2 (pEC-K99E)</i>	GGTGGTGCATGCACCATGACAATCAAGGTTG
Primer für die Erzeugung von Northern Blot-Sonden	
<i>asaC_NB1</i>	GAATAACACGATCCGCCAAC
<i>asaC_NB2+T7-Pr</i>	GAAATTAATACGACTCACTATAGGGTGCATCTGGTGAAGTAGAAA
<i>argC_NB1</i>	AGGCCATCCAGCTTATGC
<i>argC_NB2+T7-Pr</i>	GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGCCTCGCGGTGTCTGG
<i>argJ_NB1</i>	CGTTGCTGATGGCCAGAT
<i>argJ_NB2+T7-Pr</i>	GAAATTAATACGACTCACTATAGGGGGCATACTGCTTGACCATTG

<i>argB</i> _NB1	AACGCCATGGTGGATGAT
<i>argB</i> _NB2+T7-Pr	GAAATTAATACGACTCACTATAGGGTCTCCGACCAAACCAATATC
<i>argF</i> _NB1	TCGTA ^a CTCGCTTCTCCTT
<i>argF</i> _NB2+T7-Pr	GAAATTAATACGACTCACTATAGGGTAGGAGTTGGCCATGTTGTT
<i>argR</i> _NB1	CAACCCCGTCAACACCGGAA
<i>argR</i> _NB2+T7-Pr	GAAATTAATACGACTCACTATAGGGGCGCAGCTTCTCCGACGGAC
<i>argG</i> _NB1	TGCAGCTGAGTCCATCGT
<i>argG</i> _NB2+T7-Pr	GAAATTAATACGACTCACTATAGGGGCCTTGTGCGGGTCCATGC
<i>argH</i> _NB1	GATGTGTTGGCCTCCAAG
<i>argH</i> _NB2+T7-Pr	GAAATTAATACGACTCACTATAGGGCCTGCATGTGCCTTAGCTTG
Primer für RT-qPCR-Messungen	
LC_cat_1	AAGACGGT GAGCTGGTGATA
LC_cat_2	TTCACCGTAACACGCCACAT
LC_argC/asaC_1	AGGCCATCCAGCTTATGC
LC_argC/asaC_2	GAATAACACGATCCGCCAAC

^a Unterstrichene Bereiche kennzeichnen die Restriktionsschnittstellen für das Klonieren. Kursivschrift gibt die Annealing-Regionen der GeneSOeing-PCR Primer bzw. im Falle des RedET-Rekombinationssystems den Überhang der Kassette an. Die artifizielle RBS ist fett geschrieben.

2. Verwendete Chemikalien, Materialien, Geräte und Software

2.1. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren vom Reinheitsgrad p.a.

Tab. III.4: Verwendete Chemikalien unter Angabe der Bezugsquelle

Produkt	Bezugsquelle
Acrylamid / Bisacrylamid-Lösung	Roth
Agar	Invitrogen
Agarose	PeqLab
Ammoniumhydrogencarbonat	Merck
Antibiotic Medium No.3 (PA-Medium)	Oxoid
Antibiotika	Roth
Arginin	Sigma
Biotin	Sigma
Brain-Heart-Infusion (BHI)	Roth
Borsäure	VWR
Bromphenolblau (BPB)	Serva
5-Brom-4-chlor-indolylphosphat-Toluidinsalz (X-Gal)	GIBCO-BRL
CASO-Boullion	Roth
DEPC-Wasser	Roth
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
DNTB (5,5-Dithiobis-2-nitrobenzoat)	Roth
dNTPs	MBI Fermentas/ Thermo Scientific
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Serva

Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Amersham
Formaldehydlösung 37 %	Merck
Formamid	Merck
Glucose	Merck
Glutamat	Roth
Glycerin	Roth
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
LB Broth Base	Invitrogen
Maleinsäure	Merck
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	Merck
MOPS	Roth
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natrium-Citrat Dihydrat	Merck
Natriumdodecylphosphat (SDS)	Serva
Natronlauge	Merck
N-Laurolylsarcosin Natriumsalz	Serva
PIPES (Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure))	Merck
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Roth
Sorbitol	Sigma
Sucrose	Merck
Thiamin	Sigma
Tris-HCl	Serva
Trypton	Oxoid
Tween-20	Fluka

2.2. Materialien

Tab. III.5: Verwendete Materialien unter Angabe der Bezugsquelle

Produkt	Bezugsquelle
2 mL-Schraubgefäße	Starlab
BlueCaps (50 mL)	Greiner Bio-One
Elektroporations-Küvetten	Peqlab
Eppis	Sarstedt
Filterspitzen	Biozym
Gasperlen (Ø 0,1 mm)	Sigma
Glaswaren	Schott
Greiner-Röhrchen (13 mL)	Sarstedt
Hybond-N ⁺ Membran	GE Healthcare
Küvetten	Brand
Mikrotiterplatten	Greiner Bio-One
Nitrilhandschuhe	VWR
Parafilm	American National Can Company
PCR-Stripes	VWR
Petrischalen	Greiner Bio-One

Pipettenspitzen	Starlab
Polycarbonat-Kapillaren für den LightCycler	Roche
Ribotubes	MP Biomedicals
Spritzen	Sarstedt/ Starlab
Sterilfilter (Whatman)	GE Healthcare

2.3. Geräte und Apparaturen

Tab. III.6: Verwendete Geräte und Apparaturen unter Angabe des Herstellers

Produkt	Hersteller
Brutschränke	Memmert
Elektrophoresekammern für Agarosegele	Eigenbau
Elektroporationsanlage Gene Pulser II mit Pulse Controller Plus	Bio-Rad
Feinwaagen	Sartorius
Gefrierschränke (-80 °C)	Sanyo
Geldokumentationsanlage Alphamager HP	Alphainnotech
Hybridisierungsöfen (Roller)	Bachofer
Hybridisierungsstation HS 4800	Tecan
Kühlfalle RVT400-230	Thermo Savant
Kühlschrank	Privileg / Siemens
Kühltischzentrifuge 5417R	Eppendorf
Kühlzentrifuge groß (4K 15)	Sigma
LightCycler	Roche
Magnetrührer mit Heizplatte	Heidolph, IKA
NanoDrop ND-1000 Photospektrometer	NanoDrop
PCR-Cycler Mastercycler proS	Eppendorf
pH-Meter	Schott
Photometer	Eppendorf
Pipetten	Eppendorf
Reinraumwerkbank	Heraus HeraSafe
Reinstwasseranlage	TKA
Ribolyser Precellys	PEQLAB Biotechnology
ScanArray 4000	Perkin Elmer
Scanner Fusion FX7 scanner	PEQLAB Biotechnology
Schnellschüttler	New Brunswick Scientific
Semi-Dry Elektrobloetter 'Perfect Blue TM '	PEQLAB Biotechnology
Spannungsgeber	BioRAD
Spektrophotometer LKB Biochrom 4060	Amersham Pharmacia Biotech
Speed-Vac SPD 111V	Thermo Savant
Thermomixer	Eppendorf
Vertikales Gel System 'Perfect Blue TM '	PEQLAB Biotechnology
Videoprinter P67E	Mitsubishi
Vortex-Genie 1 und 2	Scientific Industries
Wasserbäder	GFL
Zentrifugen	Eppendorf

2.4. Software

Tab. III.7: Verwendete Computer-Software und deren Verwendungszweck

Programm	Verwendungszweck	Version	Referenz
BLAST	Sequenzvergleich auf Aminosäure- und Nukleotidebene	2.2	Altschul <i>et al.</i> , 1997
CloneManager	Restriktionskarten und Primerdesign	8.0 & 9.0	Scientific & Education Software
Clustal X2	Multiples Alignment von Nukleinsäure- und Proteinsequenzen	X2	Larkin <i>et al.</i> , 2007
Corel Draw	Erstellung und Bearbeitung von vektorbasierten Graphiken	X5	Corel Corp.
EMMA	Normalisierung von Microarray-Daten	2.2	Dondrup <i>et al.</i> , 2009
Excel TM	Tabellenkalkulation	2010	Microsoft Corp.
GenDB	Datenbank von <i>C. glutamicum</i>	2.4	Meyer <i>et al.</i> , 2003
ImaGene	Spoterkennung und Quantifizierung	5.0	Bio Discovery
LightCycler Software	Aufnahme und Auswertung der RT-qPCR-Läufe	3.5	Roche Diagnostics
ND-1000	Nanodropmessung	3.1.0	NanoDrop Technologies Inc.
Scan & Quant Array	Scannen der Microarrays		Gsi Lumonics Inc.
Word TM	Textverarbeitung	2010	Microsoft Corp.

3. Medien

3.1. Nährmedien

Soweit nicht anders vermerkt, beziehen sich die Mengenangaben auf 1 Liter deionisiertes Wasser (Endvolumen).

CASO-Bouillon

- CASO-Bouillon 30,0 g

PA-Medium (Penassay Broth)

- Antibiotic Medium No. 3 17,5 g

SOC (Regenerationsmedium) (Hanahan, 1983)

- Trypton 20,0 g
- Hefeextrakt 5,0 g
- D(+)-Glucose-Monohydrat 4,0 g
- NaCl 580 mg
- KCl 180 mg
- MgCl₂ x 6 H₂O 2,0 g
- MgSO₄ x 7 H₂O 2,4 g

BHIS-Medium (Liebl 1992)

- Brain-Heart-Infusion 37,0 g
- Sorbitol 91,0 g

LB-Vollmedium (Luria-Bertani) (Sambrook & Russell, 2001)

- LB Broth Base 20,0 g

SOB-Medium

- Hefeextrakt 5,0 g
- Trypton 20,0 g
- NaCl 10 mM
- KCl 2,5 mM
- MgCl₂ 10 mM
- MgSO₄ 10 mM

Minimalmedium 1 (MM1) für *C. glutamicum*

- (NH₄)₂SO₄ 10,0 g
- Harnstoff 3,0 g
- K₂HPO₄ 1,0 g
- MgSO₄ x 7 H₂O 0,4 g

→ in 960 mL deionisiertem H₂O lösen, pH = 7,2 mit NaOH (10 M) einstellen und autoklavieren.
nach dem Autoklavieren Zugabe von:

- Biotin (Stammlösung: 0,2 mg/mL) 1,0 mL
- D-Glucose, autoklaviert 20,0 g
- Spurenelemente MM1 1,0 mL

Minimalmedium 9 (M9) für *E. coli* (Sambrook & Russell, 2001)

- Na₂HPO₄ x 7 H₂O 12,0 g
- KH₂PO₄ 3,0 g
- NaCl 0,5 g
- NH₄Cl 1,0 g

→ in 950 mL deionisiertem H₂O lösen, pH = 7,4 mit NaOH (10 M) einstellen und autoklavieren.
nach dem Autoklavieren Zugabe von:

- D-Glucose, autoklaviert 10 g
- Thiamin (Stammlösung 0,42 mg/mL) 1 mL
- Spurenelemente MME
 - MgSO₄ x 7 H₂O 0,5 g
 - CaCl₂ x 2 H₂O 0,02 g
 - FeSO₄ x 7 H₂O 0,01 g

→ in 30 mL deionisiertem H₂O lösen und steril filtrieren

CGXII (Keilhauer *et al.*, 1993)

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20,0 g
- K_2HPO_4 1,0 g
- KH_2PO_4 1,0 g
- $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,25 g
- MOPS 42,0 g

→ in 960 mL deionisiertem H_2O lösen, pH = 7,2 mit NaOH (10 M) einstellen und autoklavieren.

nach dem Autoklavieren Zugabe von:

- D-Glucose, autoklaviert 40 g
- Harnstoff, sterilfiltriert 5,0 g
- Thiamin (Stammlösung 0,42 mg/mL) 1 mL
- Protokatechuat (Stammlsg.: 30 mg/L) 1 mL
- CGXII-Spurenelemente 1 mL
- Biotin (Stammlösung: 0,2 mg/mL) 1 mL

3.2. Zusätze zu den Nährmedien**Agar**

- 1,5 % (w/v) für Festmedium

Antibiotika

Antibiotika werden als sterile Stammlösungen angesetzt (Sterilfiltration).

Tab. III.8: Verwendete Antibiotika

Antibiotikakonzentrationen zur Primärselektion [mg/L Medium]				
Antibiotikum	Abkürzung	Lösungsmittel	<i>C. glutamicum</i>	<i>E. coli</i>
Ampicillin	Ap	H_2O bidest.	-	100
Kanamycin	Km	H_2O bidest.	25	50
Nalidixin	Nx	0,1N NaOH	50	-

Arginin

Stammlösung mit 800 mM Arginin in deionisiertem H_2O herstellen und steril filtrieren (Lagerung bei -20 °C). Wenn nicht anders angegeben, wird den Medien eine Arginin-Konzentration von 1 mM zugegeben.

MM1-Spurenelemente

- $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,2 g
- $\text{MnSO}_4 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,2 g
- NaCl 5,0 g

→ in 100 mL deionisiertem H_2O lösen, autoklavieren.

CGXII-Spurenelemente (Keilhauer *et al.* 1993)

- $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ 10 g/L
- $\text{MnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ 10 g/L
- $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ 1 g/L
- CuSO_4 0,2 g/L
- $\text{NiCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ 0,02 g/L

→ in 100 mL deionisiertem H_2O lösen, autoklavieren.

5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactosid (X-Gal)

- Stammlösung mit 40 mg/mL X-Gal in Dimethylformamid herstellen und steril filtrieren (Lagerung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$) → 1 mL Stammlösung auf 1 L Medium

3.3. Verwendete Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, werden alle Puffer und Lösungen mit deionisiertem H_2O angesetzt.

3.3.1. Elektrophorese

a) Agarose

- 0,8 oder 2,0 % in TA-Elektrophoresepuffer
- aufkochen und bei $60\text{ }^\circ\text{C}$ lagern

b) Bromphenolblau-Xylencyanol-Ladepuffer (BPB-Ladepuffer)

- EDTA 1 mM
- Glycerin 50 % (w/v)
- Bromphenolblau 0,1 % (w/v)
- Xylencyanol FF 0,1 % (w/v)

→ mit HCl bis zum Umschlagpunkt (dunkelgrün) titrieren

c) Ethidiumbromid Färbelösung

- EtBr in H_2O bidest. 10 mg/mL

d) TAE-Elektrophoresepuffer (50x)

- Tris 2 M
- Natriumacetat 500 mM
- EDTA 50 mM

→ mit Eisessig auf pH 7,8 einstellen.

3.3.2. DNA-Transfertechniken

a) TG (Tris Glycerin)-Puffer (pH 7,5)

- Tris 1 mM
- Glycerin 10 % (w/v)

b) TB-Puffer

- PIPES 10 mM
- CaCl₂ 15 mM
- KCl 250 mM
- in ≈ 800 mL H₂O lösen und auf pH = 6,7 einstellen (mit KOH oder HCl)
- MnCl₂ 55 mM
- CoCl₂ 5 mM
- auf 1 L Endvolumen auffüllen und steril filtrieren (Filter: 0,2 µm); Lagerung bei 4 °C

3.3.3. Auftrennung der RNA im Polyacrylamidgel und Semi-Dry Elektroblot

a) 10x TBE

- Tris 108 g
- Borsäure 55 g
- in 960 mL H₂O lösen und 40 mL 0,5 M EDTA hinzufügen, 2x autoklavieren

b) 0,5 M EDTA

- EDTA 93,05 g
- in ca. 400 mL H₂O lösen und pH mit NaOH auf 8,0 einstellen. Auf 500 mL auffüllen, 2x autoklavieren

3.3.4. Hybridisierung des Northern Blots

a) (Prä-) Hybridisierungslösung

- RNase-freies H₂O 1,5 mL
- 20 % SDS 40 µL
- 10 % N-Lauroylsarcosin Natriumsalz 400 µL
- Blocking Reagenz 8 mL
- 20 x SSC 10 mL
- Formamid 20 mL

b) Blocking Reagenz

- Blocking Pulver (Roche) 10 g
- Puffer I 1x 100 mL

c) 20x SSC

- Natrium-Citrat Dihydrat 88,2 g
- NaCl 175,3 g
- mit RNase-freiem H₂O auf 1 L auffüllen, pH=7 einstellen. 2x autoklavieren.

d) 10x Puffer I

- NaCl 87,7 g
- Maleinsäure 116 g
- NaOH ca. 72 g

→ mit RNase-freiem H₂O auf 1 L auffüllen und mit NaOH pH=7,5 einstellen, 2x autoklavieren.

3.3.5. Waschung und Detektion des Northern Blots

a) Waschlösung I

- 20x SSC 12,5 mL
- 10 % SDS 250 µL
- RNase-freies H₂O 37,25 mL

b) Waschlösung II

- 20x SSC 2,5 mL
- 10 % SDS 250 µL
- RNase-freies H₂O 47,25 mL

c) Waschlösung III

- 20x SSC 1,25 mL
- 10 % SDS 250 µL
- RNase-freies H₂O 48,5 mL

d) Waschpuffer

- 10x Puffer I 100 mL
- Tween20 3 mL
- RNase-freies H₂O 897 mL

e) Puffer II (immer frisch ansetzen)

- Puffer I (1x) 25 mL
- Blocking Reagenz 25 mL
- RNase-freies H₂O 200 mL

f) Detection Buffer

- Tris-HCl 0,1 M
- NaCl 0,1 M

→ pH auf 9,5 einstellen und 2x autoklavieren

3.3.6. Proteinpuffer

Tris-HCl-Proteinpuffer

- Tris-HCl 100 mM

→ pH auf 7,5 einstellen

4. Kultivierung von Bakterien

4.1. Anzucht und Lagerung

Die Kultivierung von *Corynebacterium glutamicum* und *Escherichia coli* auf Festmedium erfolgt durch Einzelkolonieausstrich auf den entsprechenden Medien und anschließender Inkubation im Brutschrank. *C. glutamicum* wird für 1 - 3 Tage bei 30 °C und *E. coli* über Nacht bei 37 °C angezogen. Bei der Anzucht rekombinanter und plasmidtragender Stämme sind grundsätzlich die entsprechenden selektiven Bedingungen durch Antibiotikazugabe (siehe Tab. III.8) herzustellen. Die kultivierten Platten können anschließend bei 4 °C gelagert werden.

Zur Stammkonservierung werden Glycerinkulturen angelegt und bei -80 °C gelagert. Dazu werden Bakterien einer frischen Festmediumsplatte mit einer sterilen Glaspipette abgenommen, in einem Eppendorfgefäß in 400 µL LB-Medium resuspendiert und mit 600 µL 87 %igem Glycerin vermischt. Die so hergestellten Kulturen sind bei -80 °C gelagert mehrere Jahre haltbar.

Die Anzucht in Flüssigmedium erfolgt durch Animpfung mit einer Einzelkolonie von einer frischen Festmediumsplatte oder durch Zugabe von 30 µL einer Glycerinkultur. *E. coli* Kulturen werden in Erlenmeyerkolben im Luftschüttler bei 180 U/min und 37 °C angezogen; *C. glutamicum* Kulturen werden in Erlenmeyerkolben im Schnellschüttler bei 300 U/min und 30 °C inkubiert.

4.2. Bestimmung des Bakterientiters

Durch die Bestimmung der optischen Dichte einer Flüssigkultur bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem Spektralphotometer kann das Wachstum von Bakterien verfolgt werden. Als Referenz dient das Nährmedium oder H₂O. Eine OD₆₀₀ von 0,1 entspricht etwa $2 \cdot 10^7$ *E. coli*-Zellen bzw. $1 \cdot 10^7$ *C. glutamicum*-Zellen. Es ist zu beachten, dass mit dieser Methode der Gesamt-Bakterientiter aus lebenden und bereits abgestorbenen Zellen ermittelt wird.

4.3. Stochertest

Für den Stochertest wird etwas Zellmasse einer zu prüfenden Einzelkolonie mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen und auf verschiedene Festmedien-Platten nacheinander durch strichförmiges Ausstreichen überimpft. Nach Inkubation der Platten über Nacht im Brutschrank können diese ausgewertet werden.

5. Allgemeine DNA-Arbeiten

5.1. Isolierung von Plasmid-DNA

Dieses Verfahren bietet die Möglichkeit der Isolierung besonders reiner Plasmid-DNA und basiert auf der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (Birnboim & Doly, 1979). Im Anschluss an die Zelllyse erfolgt eine Neutralisierung, um passende Bindungen für die Bindung der Plasmid-DNA an die Quarzmembran der Säule zu schaffen. Vor der Beladung der Säule wird das neutralisierte Lysat zentrifugiert, um Zelltrümmer zu pelletieren. Der Überstand wird auf die Säule geladen und zur Entfernung von Proteinen, Polysacchariden, Metaboliten und kurzkettigen Oligonukleotiden gewaschen. Anschließend wird die DNA eluiert.

Die genaue Durchführung der einzelnen Schritte ist der dem Kit beiliegenden Beschreibung zu entnehmen.

- GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, Waltham, USA)

5.2. Aufreinigung von PCR-Produkten

Bevor ein PCR-Amplifikat zur Restriktionsspaltung oder Ligation eingesetzt werden kann, ist die Entfernung von überschüssigen (Oligo-) Nukleotiden, Primern und Salzen nötig, da sie die folgende Reaktion behindern könnten. Bei Verwendung kommerziell erhältlicher Kits werden DNA-Makromoleküle (> 80 Nukleotide) an eine Säulenmatrix gebunden und mit einem ethanolhaltigen Puffer gewaschen. Anschließend wird die DNA mit einem schwach basischen Puffer oder alternativ mit H₂O (pH 8) eluiert. Die genaue Durchführung der einzelnen Schritte ist der dem Kit beiliegenden Beschreibung zu entnehmen.

- NucleoSpin® Extract II (Macherey Nagel, Düren, Deutschland)

5.3. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist das Standard Verfahren zur Auftrennung unterschiedlich großer DNA-Fragmente (Sambrook & Russell, 2001). Die Trennung erfolgt in einem elektrischen Feld, wobei sich die DNA-Moleküle aufgrund ihrer negativen Nettoladung zur Anode bewegen. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist abhängig von verschiedenen Faktoren, wie Molekulargewicht, DNA-Konformation (ccc, oc oder linear), Konzentration des Agarose-Gels und der Stärke des angelegten elektrischen Feldes. Durch Vergleiche mit einem Längenstandard mit DNA-Fragmenten definierter Größe kann auf die Größe von unbekanntem DNA-Fragmenten zurückgeschlossen werden.

Vor dem Auftragen auf das Gel wird die Probe mit einem glycerinhaltigem Ladepuffer (BPB) versetzt, um die Dichte der Proben zu erhöhen und somit das Einsinken dieser in die Geltaschen zu ermöglichen. Gleichzeitig dient die BPB-Bande als Marker für die zurückgelegte Laufstrecke während der Elektrophorese, wobei die Laufstrecke dieser Bande etwa der zweier 500 bp-Fragments entspricht. Schließlich werden die Banden mit dem DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (EtBr) gefärbt und unter der UV-Lampe bei 320 nm sichtbar gemacht.

1-2 %ige Agarose wird mit TAE-Puffer angesetzt, aufgeköcht und in eine Gelkammer gegossen. Nach dem Erkalten wird das Gel mit TAE-Puffer überschichtet, die Proben werden aufgetragen und innerhalb von 30-45 min bei 80-100 V aufgetrennt. Anschließend wird das Gel in einem Ethidiumbromid-Bad (1 µg/mL EtBr) gefärbt und im UV-Licht fotografiert.

- 100 bp-DNA Leiter (MBBL, Bielefeld, Deutschland)
- 250 bp-DNA Leiter (MBBL, Bielefeld, Deutschland)

5.4. Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen ermöglicht zum einen die Extraktion eines DNA-Fragments definierter Größe aus einem Fragment-Gemisch, zum anderen stellt sie eine Möglichkeit der DNA-Reinigung dar. Die DNA-haltige Probe wird dazu in mehreren Spuren auf ein Agarosegel aufgetragen und mittels Elektrophorese aufgetrennt. Um Mutationen durch Ethidiumbromid oder UV-Licht vorzubeugen, werden die außenliegenden Spuren des Gels mit einem Skalpell herausgeschnitten. Nur diese Spuren werden in EtBr gefärbt und die entsprechende Bande unter UV-Licht mit dem Skalpell möglichst genau ausgeschnitten. Das mittlere Gelstück wird schließlich wieder zwischen die Randstücke gelegt. Die ausgeschnittenen Bereiche dienen nun als Orientierung um das DNA-Fragment der gewünschten Größe ohne UV-Licht auszuschneiden. Die Aufreinigung aus dem Gel erfolgt mittels Kit.

- NucleoSpin[®] Extract II (Macherey Nagel, Düren, Deutschland)

6. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode zur enzymatischen *in vitro* Amplifikation definierter DNA-Abschnitte, deren flankierende Sequenzen zur Konstruktion geeigneter Primer bekannt sein müssen (Saiki *et al.*, 1988). Ein PCR-Zyklus beginnt mit der Denaturierung der Matrizen-DNA (*template*) bei 95 – 98 °C, damit im zweiten Schritt (*annealing*) die Primer über Wasserstoffbrückenbindungen an komplementäre, ein-

zelsträngige DNA-Bereiche binden können. Aufbau und Länge der Primer bestimmen die Annealing-Temperatur, die etwa 5 °C unter der Schmelztemperatur T_m [°C] der Primer liegt und von Länge und GC-Gehalt beeinflusst wird. Die 3'-OH-Enden der Primer dienen im letzten Schritt (Polymerisation) einer thermostabilen DNA-Polymerase als Ausgangspunkte für die Komplementierung der DNA-Einzelstränge zu Doppelsträngen. Voraussetzung für diese Reaktion ist neben einem geeigneten pH-Wert und Mg^{2+} -Ionen, die optimale Temperatur (72 °C), sowie das Vorhandensein von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs).

Die in dieser Arbeit eingesetzten *taq*- und Phusion-Polymerasen zeichnen sich durch unterschiedliche Eigenschaften aus. Im Gegensatz zur *taq*-Polymerase verfügt die Phusion-Polymerase über eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität (*proof-reading*), die zu einer geringeren Fehlerrate bei der Amplifikation führt. Die *taq*-Polymerase fügt unabhängig vom Aufbau der Matrizen-DNA ein Adenosintriphosphat als letztes Nukleotid an, sodass Amplifikate mit 3'-Überhängen (*sticky ends*) entstehen. Bei der Phusion handelt es sich um eine *hot start*-Polymerase, bei der die Polymerase bis zum ersten Denaturierungsschritt durch gebundene Antikörper blockiert wird. Unspezifische Amplifikationen, die durch falsches Binden der Primer im Temperaturanstieg des ersten Zyklus entstehen können, werden somit verhindert. Ebenso werden Primerdegradation und die Exonuklease-Aktivität der Polymerase bei Raumtemperatur unterbunden.

6.1. Primer Design

Für den Erfolg einer PCR spielt die Qualität der Primer eine wesentliche Rolle, weshalb bei der Primer-Auswahl einige Regeln beachtet werden sollten. Für eine ausreichende Spezifität der PCR sollte die Mindestlänge der Primer 20 Nukleotide betragen. Der GC-Gehalt der Primer sollte bei 50 - 60 % liegen und die *annealing*-Temperaturen eines Primerpaares sollten möglichst nicht mehr als 2 °C auseinanderliegen. Erweiterungen wie Restriktionsschnittstellen, Überlappungsbereiche für *Gene-SOEing* oder chemische Modifikationen (z. B. Cy3) werden stets an das 5'-Ende eines Primers angehängt. Da neben diesen noch eine Reihe weiterer Kriterien wie Bildung von Haarnadelstrukturen, Dimerisierung, etc. zu beachten sind, empfiehlt sich der Einsatz spezieller Computerprogramme, wie beispielsweise der im Rahmen dieser Arbeit verwendete „Clone Manager“.

6.2. PCR-Reaktionsansätze und -programme

6.2.1. PCR-Reaktionsansatz und -programm für die *taq*-Polymerase

Für einen 50 µL-Reaktionsansatz werden folgende Komponenten zusammengegeben:

- 10x NH₄ Reaction Buffer (Polymerase-Puffer) 5 µL
- 50 mM MgCl₂ 2 µL
- dNTPs (je 2,5 mM) 4 µL
- Primermix aus a+b (10 µM) 2,5 µL
- Template 1 µL
- Polymerase 1 µL

→ mit deionisiertem H₂O auf 50 µL auffüllen

Das 3-Step-PCR-Programm für die *taq*-Polymerase wird mit folgenden Einstellungen durchgeführt:

Zyklen	Temperatur	Zeit	Schritt
1	95 °C	2 min	1. Denaturierung
35	95 °C	30 s	Denaturierung
	58 °C (*)	30 s	<i>annealing</i>
	72 °C	30-90 s (**)	Elongation
1	72 °C	7 min	Abschlusselongation
	8 °C	∞	Endlos-Schleife

* abhängig von den verwendeten Primern

** abhängig von der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments und der Reaktionsgeschwindigkeit der verwendeten Polymerase (*taq*-Polymerase: 15-30 s/kb)

- BIOTAQ DNA Polymerase (Bioline, Luckenwalde, Deutschland)

6.2.2. PCR-Reaktionsansatz und -programm für die Phusion-Polymerase

Für einen 50 µL Reaktionsansatz werden folgende Komponenten zusammengegeben:

- 10x Phusion GC-Buffer (Polymerase-Puffer) 10 µL
- dNTPs (je 2,5 mM) 4 µL
- Primermix aus a+b (10 µM) 2,5 µL
- DMSO 1,5 µL
- Template 1 µL
- Phusion-Polymerase 1 µL

→ mit deionisiertem H₂O auf 50 µL auffüllen

Das 3-Step-PCR-Programm für die Phusion-Polymerase wird mit folgenden Einstellungen durchgeführt:

Zyklen	Temperatur	Zeit	Schritt
1	98 °C	1 min	1. Denaturierung
35	98 °C	5-10 s	Denaturierung
	45-72 °C (*)	40 s	<i>annealing</i>
	72 °C	30-90 s (**)	Elongation
1	72 °C	5-10 min	Abschlusselongation
	4 °C	∞	Endlos-Schleife

* abhängig von den verwendeten Primern

** abhängig von der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments und der Reaktionsgeschwindigkeit der verwendeten Polymerase (Phusion-Polymerase: 15-30 s/kb)

- Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific, Waltham, USA)

7. Klonierungsexperimente

7.1. DNA-Restriktionsspaltung

Die DNA-Restriktionsspaltung ist eine Methode zur Analyse von DNA bzw. ein vorbereitender Schritt für eine anschließende Ligation, bei der das Pentose-Phosphat-Rückgrat der DNA an charakteristischen palindromischen Sequenzen mit Restriktionsendonukleasen vom Typ II hydrolysiert wird. Je nach verwendetem Enzym entstehen dabei entweder versetzt einzelsträngige Enden (*sticky ends*) oder glatte Enden (*blunt ends*). Es ist zu beachten, dass einige Restriktionsendonukleasen „methylierungsanfällig“ sind. Das bedeutet, dass diese Enzyme ihre Zielsequenzen nicht oder nur mit einer geringeren Effizienz erkennen, wenn eine Base darin im Rahmen einer zelltypischen Modifikation methyliert wurde.

Vorbereitend für den Restriktionsansatz werden die Konzentrationen von Fragment und Vektor am Nanodrop bestimmt. Die Klonierung sollte mit 250 ng Vektor und 5fach molaren Überschuss Fragment erfolgen.

Spaltungsansatz (20 µL):

- 2 µL Puffer
- 0,5 µL je Restriktionsenzym
- x µL Vektor (3-15 µL) bzw. Fragment (~ 15 µL)

mit deionisiertem H₂O auf 20 µL auffüllen.

Die Restriktionsspaltung erfolgt analog den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen (in der Regel für mindestens 1 h bei 37 °C im Brutschrank) unter Verwendung des mitgelieferten Puffers.

Die Restriktionsenzyme sollten nach der Reaktion mittels Phenol-Chloroform-Extraktion inaktiviert und anschließend mittels PCR-Aufreinigung (Macherey Nagel) entfernt werden.

- Konventionelle Restriktionsendonukleasen (Thermo Scientific, Waltham, USA), nach Herstellerangabe verwendet
- NucleoSpin[®] Extract II (Macherey Nagel, Düren, Deutschland)

7.2. DNA-Ligation

Bei der DNA-Ligation werden die endständigen 5'-Phosphatgruppen und 3'-Hydroxylgruppen des Pentose-Phosphat-Rückgrats der DNA mit Hilfe der ATP-abhängigen T4-DNA-Ligase unter Ausbildung von Phosphodiesterbindungen miteinander verknüpft. Auf diese Weise können durch Restriktionsenzyme modifizierte DNA-Fragmente miteinander kondensieren (Sambrook & Russell, 2001). Nachfolgend ist ein Ligationsansatz zur Integration eines DNA-Fragments in ein Plasmid aufgeführt.

50 µL-Ansatz:	Fragment	20 µL
	Vektor	20 µL
	Ligase-Puffer	5 µL
	Ligase	0,5 µL
	H ₂ O	4,5 µL

Die Inkubation des Ansatzes erfolgt 1 h bei RT.

- T4 DNA-Ligase (Fermentas, Vilnius, Litauen); nach Herstellerangabe verwendet

8. DNA-Transfertechniken

8.1. Elektroporation

Die Elektroporation ist eine hoch effiziente Methode zur Transformation von freier DNA in Bakterienzellen. Die Aufnahme der DNA in entsprechend vorbehandelte (kompetente) Zellen wird durch einen elektrischen Puls von 10 kV/cm möglich, wobei kurzzeitig Poren in der Cytoplasmamembran erzeugt werden. Durch diese Öffnungen können Makromoleküle wie Fremd-DNA in die Zelle eindringen. Anschließend muss die Membran wieder hergestellt werden, um das Überleben der elektroporierten Zelle zu sichern. Dabei müssen für jeden Zelltyp die richtigen Bedingungen, wie Temperatur und Zusammensetzung der Lösungen zum Wiederverschließen der Poren herausgefunden werden. Eine besondere Bedeutung kommt der Vorbehandlung der Bakterien- und DNA-Suspensionen zu, die beide weitestgehend deionisiert werden sollten. Eine zu hohe Ionenkonzentration im Reaktionsansatz führt zu einem verstärkten Stromfluss und infolgedessen zu einer deutlichen Abnahme der Elektroporationseffizienz.

8.1.1. Herstellung und Elektroporation elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Eine *E. coli*-Kultur wird bis zur frühlogarithmischen Phase in CASO mit 10 % (w/v) Sorbitol angezogen und anschließend durch rasche Abkühlung in diesem Zustand „arretiert“. Durch mehrfaches Waschen mit deionisiertem H₂O und 15 % Glycerin wird die Suspension deionisiert. Die kompetenten Zellen werden in 150 µL Aliquots aufgeteilt und können für mehrere Monate bei -80 °C gelagert werden (Tauch *et al.*, 1994).

Für die Elektroporation mit dem Gene Pulser werden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. Nachdem die DNA-Lösung hinzupipettiert wurde, werden folgende Pulsbedingungen eingestellt: 25 µF Kapazität; 400 Ω Parallelwiderstand; 2,5 kV Spannung (bei 0,2 cm Küvetten). Die Zellen werden sofort in ein Eppi mit 0,5 mL SOC-Medium überführt und zur Regeneration 1 h im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden sie auf geeignetes Selektionsmedium ausplattiert.

8.1.2. Herstellung und Elektroporation elektrokompetenter *C. glutamicum*-Zellen

Die Herstellung kompetenter *C. glutamicum*-Zellen erfolgt größtenteils analog zu der für *E. coli*-Zellen: Eine Kultur *C. glutamicum*-Zellen wird in CASO mit 10 % (w/v) Sorbitol bis zur frühlogarithmischen Phase angezogen und auf Eis schnell abgekühlt. Für das Waschen der Kultur wird zunächst TG-Puffer verwendet, dann 10 % Glycerin. Die Stringenz des Waschens wird durch mehrfache Wiederholung erreicht. Auch hier werden die kompetenten Zellen in 150 µL Aliquots aufgeteilt und können für mehrere Monate bei -80 °C gelagert werden (Tauch *et al.*, 2002).

Für die Elektroporation wird das gewünschte Plasmid zu der aufgetauten Zellsuspension gegeben und folgende Pulsbedingungen eingestellt: 25 µF Kapazität; 200 Ω Parallelwiderstand; 2,5 kV Spannung (bei 0,2 cm Küvetten). Die Zellen werden sofort in die auf 46 °C vorgewärmten 4 mL BHIS-Medium überführt und für 6 min bei 46 °C im Wasserbad inkubiert (Inaktivierung des Restriktionsmodifikationssystems). Anschließend erfolgt eine Regeneration der Zellen für 60 min im 30 °C-Roller. Nach Ablauf dieser Zeit werden die Zellen auf geeignetes Selektionsmedium ausplattiert (Tauch *et al.*, 2002).

8.2. Hitzeschocktransformation von ultrakompetenten *E. coli*-Zellen

Eine weitere Methode zur Transformation ist der sogenannte Hitzeschock (Inoue *et al.*, 1990). Die Bakterienzellen werden hierbei mit Calciumchlorid behandelt, so dass zwischen der negativ geladenen DNA und der negativ geladenen Zellmembran weniger abstoßende Kräfte bestehen (Palchevskiy

& Finkel, 2006). Bei einem kurzen Hitzeschock (41-43 °C für 45 - 90 sek) entstehen Poren in der Membran, so dass die DNA in die Zellen gelangen kann.

Für die Herstellung der ultrakompetenten *E. coli*-Zellen wird der gewünschte Stamm bei 19 °C bis zur frühlogarithmischen Phase ($OD_{600} = 0,5$) kultiviert. Nach Abkühlung der Zellen, erfolgt ein einmaliges Waschen mit TB-Puffer. Die Zellen werden danach in TB-Puffer mit DMSO (Endkonzentration 7 %) resuspendiert, aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Für die Hitzeschocktransformation werden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und 1 bis 25 µL Plasmid-DNA wird hinzugegeben (bei einem isolierten Vektor 1 µL, bei einem Ligationsansatz 25 µL). Nachdem die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert wurden, erfolgt der Hitzeschock für ca. 45 s bei 42,5 °C. Die Zellen werden anschließend kurz auf Eis gestellt, dann werden 0,5 mL SOC-Medium zur Regeneration zugeben und die Zellen 1 h bei 37 °C gelagert. Die Zellen werden auf Selektionsmedium ausplattiert.

9. Erzeugung von Gendelektionen und -mutationen

9.1. Konstruktion von Deletions- und Mutationskonstrukten mittels *Gene Splicing by Overlap Extension (GeneSOEing)*

Das *Gene Splicing by Overlap Extension (GeneSOEing)* ist eine Methode, bei der *in vitro* DNA-Fragmente mittels PCR neu kombiniert werden können, ohne dass Restriktionsschnittstellen vorhanden sein müssen (Abbildung III.1). Eine mögliche Anwendung ist das Erzeugen von Deletions- oder Mutationskonstrukten mit denen dann im Weiteren definierte Mutanten generiert werden können. Zunächst werden zwei PCR-Produkte mit einer Größe von je ca. 500 bp erzeugt, die den zu deletierenden Bereich flankieren. Bei den dafür verwendeten Primern (Primer d1-d4) ist darauf zu achten, dass der Primer d2 am 5'-Ende einen Überhang trägt, der komplementär zur Sequenz von Primer d3 ist. In einer nachfolgenden PCR-Reaktion werden die beiden Produkte im gleichen Verhältnis zur Erstellung des Fusionsprodukts eingesetzt. Durch den Überhang am zweiten Produkt und mit Hilfe der Primer d1 und d4 können die beiden PCR-Produkte fusioniert werden.

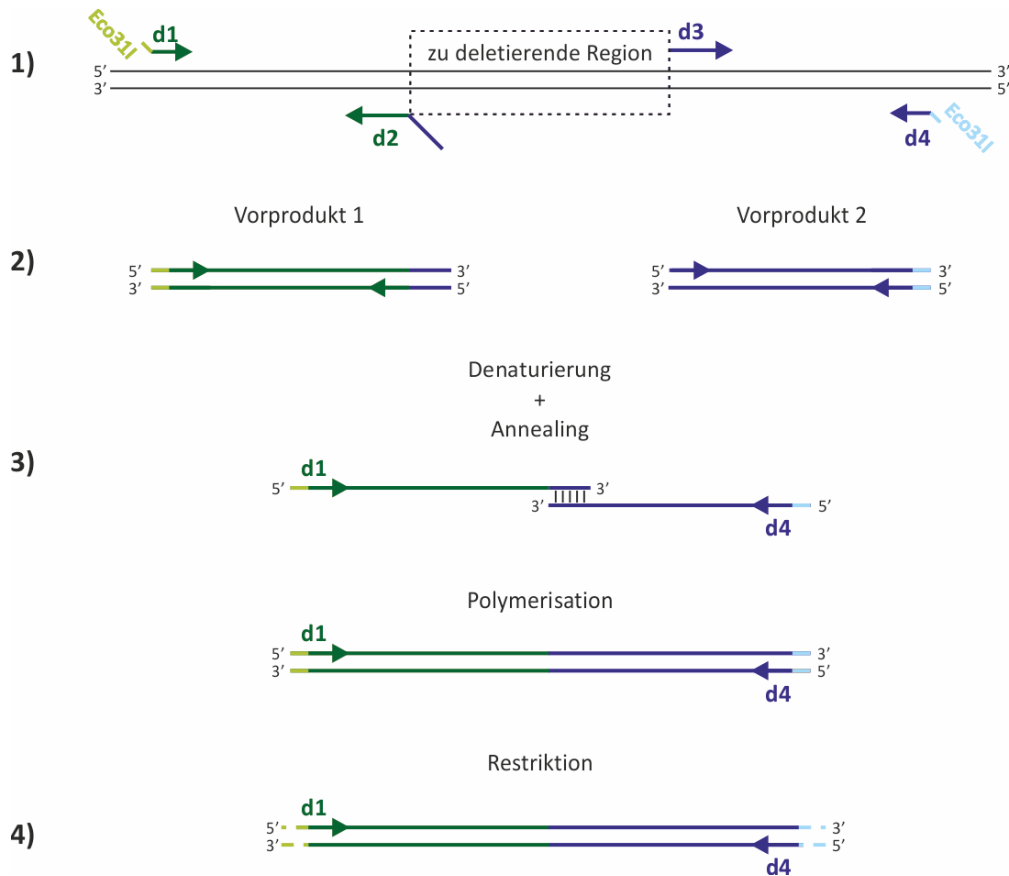


Abb. III.1: Schematische Darstellung des GeneSOEings am Beispiel einer gezielten Deletion. 1) Lage und Richtung der Primer d1 bis d4 (grüne und blaue Pfeile); an den Primern d1 und d4 sind Schnittstellen für Restriktionsenzyme angehängt, um die Klonierung des Produkts zu ermöglichen (hellgrüner bzw. -blauer Bereich symbolisieren hier beispielhaft die Erkennungssequenz von *Eco31I*). Der Primer d2 trägt einen komplementären Überhang zum d3 Primer. Die zu deletierende Region ist durch ein Rechteck eingefasst. 2) In zwei PCR-Ansätzen werden die flankierenden Regionen (Vorprodukt 1 und 2) des zu deletierenden Bereichs amplifiziert. 3) In einer anschließenden PCR erlaubt der Überhang des d2 Primers ein *annealing* der Vorprodukte. Durch die Polymerisation mit Hilfe der Primer d1 und d4 werden die Produkte fusioniert. 4) Die an die Primer d1 und d4 angehängten Schnittstellen erlauben nun eine gezielte Restriktion. Die so entstehenden *sticky ends* vereinfachen die Klonierung in den *pK18mobsacB*.

9.2. Integration einer Deletion bzw. Mutation im Chromosom

Zur Etablierung einer Deletion oder Mutation im Genom von *C. glutamicum* wird das GeneSOEing-Produkt mittels des *pK18mobsacB*-Systems gegen den intakten Abschnitt im Chromosom des gewünschten Stammes ausgetauscht. Durch die auf dem Vektor kodierte Kanamycin-Resistenz können die Bakterienzellen hinsichtlich der Integration des Vektors selektiert werden. Gleichzeitig führt der integrierte *pK18mobsacB* zu einer Sucrose-Sensitivität, welche auf die Expression des ursprünglich aus *Bacillus subtilis* stammenden Gens *sacB* (Levansucrase) zurückzuführen ist. Die Levansucrase katalysiert die Umwandlung von Sucrose in das für *C. glutamicum* toxische Levan wodurch auf Sucro-

se-haltigem Nährmedium eine anschließende Selektion hinsichtlich des Verlusts des Vektors ermöglicht wird. Können die Zellen auf Sucrose wachsen, fand eine zweite homologe Rekombination statt, durch die der Vektor verloren wurde (Schäfer *et al.*, 1994). Diese Exzision kann auf zwei Arten stattfinden: entweder erfolgt eine homologe Rekombination über dieselbe Flanke wie bei der Integration, oder über die andere, zweite Flanke. Im ersten Fall revertiert der Genotyp, das heißt, der Wildtyp ist wieder hergestellt. Im zweiten Fall verbleibt das Deletionskonstrukt im Chromosom, während das native Gen mit dem Vektor verloren geht.

Die möglichen Deletionsmutanten können in einer PCR-Reaktion auf den gewünschten Verlust hin untersucht werden. Dazu wird der DNA-Abschnitt, in dem die Deletion liegt, mittels außenliegender Primer amplifiziert. Das so entstehende PCR-Produkt ist für die Mutante um die Größe der Deletion verkürzt. Der Wildtyp dient hierbei als Kontrolle.

Für den Nachweis von eingebrachten Mutationen muss der Bereich, der die Mutation tragen soll, mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert werden.

10. Transkriptomics

10.1. Ernte und Isolierung der Gesamt-RNA aus *C. glutamicum*-Zellen

Für die RNA-Untersuchungen wurden die *C. glutamicum*-Zellen in CGXII-Medium bis zur exponentiellen Phase ($OD_{600} = \sim 10$) angezogen, durch 15 sek Zentrifugation pelletiert und nach Entfernung des Übersandes in flüssigem Stickstoff inaktiviert. Die Schritte erfolgen zügig, damit es zu keinen Veränderungen im Transkriptom kommt. Die Zellen wurden anschließend bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Gefrierschrank gelagert.

Für die Isolierung der Gesamt-RNA aus *C. glutamicum*-Zellen wurde das RNeasy Mini Kit von Qiagen verwendet. Zunächst muss die stabile Zellhülle mechanisch in sandgefüllten Ribotubes im Ribolyser aufgebrochen werden. Dazu werden zu den gefrorenen Zellpellets 800 μL RLT-Puffer gegeben, einem Guanidin-Isothiocyanat-haltigen Lyse-Puffer. Dieser sorgt für die Inaktivierung von RNasen und verhindert so den Abbau der RNA im Zelllysate. Der Aufschluss erfolgt in Ribotubes im Precellys Ribolyser für 20 sek bei einem Speed-Level von 6,5. Durch Ethanolzugabe zum Lysat werden ideale Bindebedingungen geschaffen. Das Lysat wird auf die Silica-Membran der im Kit befindlichen Säulen geladen und in mehreren Waschschrritten werden Verunreinigungen wie Proteine, DNA und andere Zellbestandteile größtenteils entfernt. Um die RNA später für Experimente einsetzen zu können, bei denen sich schon kleinste Mengen DNA als störend erweisen würden (z.B. RT-qPCR und Microarray-Experimente), muss zur Entfernung verbliebener DNA-Reste eine Behandlung mit DNase I erfolgen.

Abweichend vom Isolierungsprotokoll werden die Proben jeweils zwei DNase I-Behandlungen (1. DNase-Verdau mit Roche-DNase im Eppi, 2. DNase-Verdau mit Qiagen-DNase I auf der Säule) unterzogen. Die Elution erfolgt in 100 μ L RNase-freiem H₂O.

Am Ende wird 1 μ L je Isolat in ein PCR-Tube pipettiert. Für die Kontroll-PCR, bei der die Proben auf DNA-Rückstände untersucht werden, wird ein beliebiger Primer-Mix verwendet, der zwei Amplifikate unterschiedlicher Größe - nach Möglichkeit zwischen 200 und 1000 bp - liefern soll. Die PCR wird mit einer *taq*-Polymerase durchgeführt. Vor dem Auftragen auf ein Agarosegel wird den Proben RNase zugesetzt und sie werden für ca. 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Das Ergebnis wird anschließend mittels einer Agarosegelelektrophorese untersucht. Wird mit den Testprimern ein Amplifikat erhalten, muss ein erneuter DNase-Verdau und eine weitere Aufreinigung der RNA durchgeführt werden. Als Positiv-Kontrolle dient Wildtyp DNA, als Negativ-Kontrolle H₂O.

Wenn die isolierten RNA-Proben DNA-frei sind, wird ihre Konzentration mit dem Nanodrop 2000 bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Einen Hinweis auf mögliche Verunreinigungen der RNA-Proben gibt der Quotient der Absorptionen bei 260 und 280 nm (A_{260}/A_{280}). Ein Wert von $> 0,15$ deutet auf eine reine Probe hin.

- DNase I recombinant, RNase-free (Roche, Mannheim, Deutschland):
10 μ L DNase I + 10 μ L Puffer; 60 min bei 37 °C
- RNase-free DNase Set (Qiagen, Hilden, Deutschland); 90 min bei 30 °C
- RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland); Manual: Version April 2006

10.2. Northern Blot für kleine RNAs (50 – 800 nt)

10 μ g isolierte Gesamt-RNA werden zur Größenauftrennung auf ein 10 % denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen. Für das Gel werden 16,7 mL 30 % Acrylamid, 5 mL 10x TBE und 21 g Harnstoff mit DEPC-behandeltem H₂O auf 50 mL aufgefüllt. Wenn sich der Harnstoff komplett aufgelöst hat, werden 50 μ L TEMED und 500 μ L 10 % Ammoniumpersulphat (APS) hinzugefügt und das Gel muss sofort gegossen werden. Das polymerisierte Gel wird in der vertikalen Gelkammer fixiert und die Kammer wird mit 0,5x TBE befüllt. Nach 30 min Vorlauf bei 300 V werden die RNA-Proben auf das Gel geladen und nachfolgend für 75 min bei 300 V aufgetrennt. Zur Überprüfung, ob die Auftrennung erfolgreich war, wird das Gel in Ethidiumbromid gefärbt und gescannt. Der Transfer der separierten RNA auf eine Hybond-N⁺ Membran erfolgt durch Semi-Dry Elektroblothing. Anschließend wird die RNA durch Backen bei 120 °C für 0,5 h fixiert. Die Membran wird danach unter stringenten Bedingungen bei 37 °C für 1 h in Prähybridisierungslösung (ohne Sonde) inkubiert, um reaktive Membranbindstellen zu blockieren.

Die für die Transkriptanalyse benötigte DIG-*gelabelte* RNA-Sonde für die *antisense* RNA von *argC* wird durch *in vitro* Transkription mittels T7 RNA-Polymerase, DIG RNA Labeling-Mix und genspezifischen Primern, bei denen der reverse Primer die T7 Promotorsequenz (GAAATTAATACGACTCACTATAGGG) angehängt bekam, erzeugt. Vor der Hybridisierung werden 200 ng der Sonde durch Inkubation bei 95 °C für 10 min denaturiert. Die Digoxigenin-(DIG-) *gelabelte* RNA-Sonde wird zu frischer Hybridisierungslösung gegeben und bei 37 °C üN im Roller inkubiert. Um die Hybridisierungslösung zu entfernen wird die hybridisierte Membran am nächsten Tag zweimal für je 10 min mit Waschlösung I (2× SSC und 0,1 % SDS) bei RT gewaschen und dann dreimal für 15 min bei 68 °C mit Waschlösung II (0,1× SSC und 0,1 % SDS). Um die Hybridisierungssignale immunologisch zu detektieren werden die Blots zunächst mit einem Anti-Digoxigenin Antikörper, der mit Alkalischer Phosphatase konjugiert ist, behandelt. Anschließend wird für den Chemilumineszenz-Scan CDP-*Star* zugegeben, welches durch die Alkalische Phosphatase enzymatisch dephosphoryliert wird, was wiederum zu einer Lichtemission bei 466 nm führt. Die Signale werden mittels eines Fusion FX7 Scanners aufgenommen. Die Größe der detektierten Signale wird mit dem zuvor Ethidiumbromid-gefärbten SRA *ladder* von Illumina verglichen, der auf der Membran markiert wurde.

- Blocking Reagent for Nucleic acid Hybridization and Detection (Roche, Mannheim, Deutschland)
- DIG RNA Labeling-Mix, 10x conc. (Roche, Mannheim, Deutschland)
- T7 RNA-Polymerase (Roche, Mannheim, Deutschland)
- Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments (Roche, Mannheim, Deutschland): 2 µL
- CDP-*Star* (Roche, Mannheim, Deutschland)
- SRA ladder (Illumina, San Diego, USA)

10.3. Northern Blot für größere Transkripte (500 – 10000 nt)

Wenn größere RNA-Fragmente zu erwarten sind, wird die RNA mittels eines denaturierenden Agarosegels aufgetrennt. Dazu werden 0,8 g Agarose mit 53 mL RNase-freiem H₂O und 6,5 mL 10x MOPS in der Mikrowelle aufgekocht und 30 min bei 65 °C im Wasserbad inkubiert. 11 mL vorgewärmtes Formaldehyd werden mittels Einmalpipette unter dem Abzug hinzugegeben und die Lösung wird für weitere 30 min bei 65 °C gelagert. Nachdem das Gel gegossen wurde, soll es 1 h unter dem Abzug polymerisieren und aushärten, dann wird es mit 1x MOPS überschichtet. Anschließend findet für 10 min ein Vorlauf bei 100 V statt.

Das Gel wird pro Spur mit fünf bis zehn Mikrogramm RNA beladen, danach wird für ca. 150 min eine Spannung von 80 V angelegt. Zur Überprüfung, ob die Auftrennung erfolgreich war, wird auch hier

das Gel in Ethidiumbromid gefärbt und anschließend eingescannt. Der Transfer der separierten RNA auf die Nylonmembran erfolgt über Vakuum-Blotting. Nach kurzer Inkubation mit Denaturierungs- und nachfolgend Neutralisierungslösung wird für 5 h ein Vakuum von 66 mbar angelegt. Die Fixierung der RNA wird auch hier durch Backen bei 120 °C für 0,5 h durchgeführt. Die Prähybridisierung, die eigentliche Hybridisierung mit der spezifischen DIG-gelabelten Sonde, das Waschen und schließlich das Scannen des Blots erfolgen identisch zu der small RNA (siehe 10.2.). Die Größe der detektierten Signale wird mit dem zuvor Ethidiumbromid-gefärbten High range RiboRuler von Fermentas verglichen, der auf der Membran markiert wurde.

- Blocking Reagent for Nucleic acid Hybridization and Detection (Roche, Mannheim, Deutschland)
- DIG RNA Labeling Mix, 10x conc. (Roche, Mannheim, Deutschland)
- T7 RNA Polymerase (Roche, Mannheim, Deutschland)
- Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments (Roche, Mannheim, Deutschland): 2 µL
- CDP-*Star* (Roche, Mannheim, Deutschland)
- High range RiboRuler (Fermentas, Vilnius, Litauen)

10.4. Expressionsanalyse mittels RT-qPCR

Mit dem LightCycler der Firma Roche Diagnostics und dem „SensiMix™ SYBR One-Step Kit“ wird eine Echtzeit-reverse-Transkription (RT-) PCR (*real-time reverse transcription* PCR) durchgeführt. Der im Kit enthaltene RT-Mastermix enthält ein Gemisch einer Sensi-Skript Reversen Transkriptase zur reversen Transkription des Targets. Nachdem durch einen 15-minütigen Inkubationsschritt bei 95 °C die HotStart SensiTaq-DNA-Polymerase aktiviert wird, wird die quantitative PCR (qPCR) durchgeführt. Zudem werden die Enzyme zur reversen Transkription während dieser Hitzebehandlung inaktiviert. Der Farbstoff SYBR Green I bindet während der Elongation an die kleine Furche der doppelsträngigen DNA, wodurch das Fluoreszenzsignal deutlich verstärkt wird. Während der verschiedenen Schritte der PCR können verschiedene Fluoreszenz-Intensitäten von dem Gerät detektiert werden, jeweils abhängig von der Menge der vorhandenen Doppelstrang-DNA. Die Fluoreszenz wird am Ende der Elongationsphase gemessen (*real-time*), so dass die ansteigende Menge an PCR-Produkt am Bildschirm verfolgt werden kann.

Unterschiede in den Transkriptmengen werden durch Vergleiche der *crossing points* (CP-Wert) zwischen mindestens zwei biologischen Replikaten in jeweils zwei technischen Replikaten ermittelt. Die *crossing points* geben die Schwelle an, bei der sich die Fluoreszenzsignale des PCR-Produkts statistisch signifikant von denen des Hintergrunds abheben und sind somit ein direktes Maß für die Menge

an cDNA (und damit auch RNA) in der zu untersuchenden Probe. Sie werden durch die LightCycler Software 3.5 ermittelt. Anschließend können die ermittelten CP-Werte in relative Expressionsstärken umgerechnet werden, welche jeweils die Änderung der Transkriptionsstärke eines Gens verglichen mit der eines Referenzstammes (meist WT) beschreibt.

- PCR Applications Manual, 2nd Edition
- SensiMix™ SYBR One-Step Kit (Bioline, Luckenwalde, Deutschland), nach Datenblatt

10.4.1. 1-Schritt RT-qPCR

Bei der 1-Schritt RT-qPCR werden die reverse Transkription (RT) und die qPCR in einem Reaktionsgefäß durchgeführt. Es wird 1 µL der RNA-Probe (300 ng/µL) in die Polycarbonatkapillaren vorgelegt und anschließend werden 19 µL des Master-Mixes zu dem RNA-Template pipettiert. Nach Ablauf der RT und der initialen Denaturierung, bei der zugleich die Aktivierung der Polymerase stattfindet, folgen 40 PCR-Zyklen (95 °C für 15 sek, 58 °C für 20 sek und 72 °C für 15 sek).

10.4.2. 2-Schritt RT-qPCR

Bei einer 2-Schritt RT-qPCR laufen die reverse Transkription und die qPCR in zwei verschiedenen Reaktionsgefäßen ab. Da bei der RT nur ein Primer hinzugegeben wird, erlaubt diese Methode eine Strang-spezifische Messung der Transkriptmengen.

Zunächst wird die cDNA-Synthese des ersten Stranges mit einem Mix aus 300 ng RNA, einem Primer und dem SensiMix in einem Volumen von 19,5 µL erzeugt. Der RT-Schritt wird in RNase-freien PCR-tubes für 20 min bei 50 °C in einem Thermocycler durchgeführt. Zusätzlich wird am Ende eine 2-minütige Inkubation bei 95 °C durchgeführt, um die RT-Reaktion zu stoppen (wie vom Hersteller empfohlen). Der Proben-Mix wird quantitativ in LightCycler Kapillaren überführt und 0,5 µL des zweiten Primers werden hinzugefügt. Bei der Transkriptmengenbestimmung von *argC* und *asaC* wird jeweils dasselbe Primerpaar verwendet, um Unterschiede während der PCR-Amplifikation zu vermeiden. Der initialen Denaturierung für 10 min bei 95 °C folgen ebenfalls 40 PCR-Zyklen (wie in 10.4.1 beschrieben).

11. Proteomics

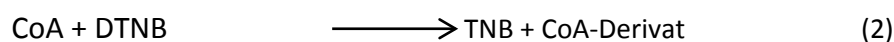
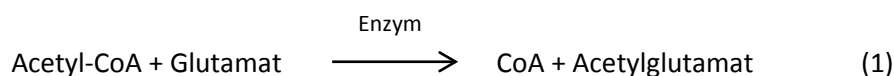
11.1. Herstellung des Proteinrohextrakts

Zur Gewinnung des Proteinrohextrakts von *C. glutamicum* werden die gewünschten Stämme bis zur mittleren exponentiellen Phase ($OD_{600} = 20 - 25$) in CGXII-Medium kultiviert. Die gesamte Kultur (25 mL) wird durch 10 min Zentrifugation bei 4 °C und 4500 $\times g$ geerntet. Die Zellpellets werden in 25 mL Tris-HCl-Proteinpuffer + 20 μ M PMSF gewaschen und nach Entfernung des Überstandes in 5 mL Tris-HCl-Proteinpuffer + 20 μ M PMSF resuspendiert. Die Zellsuspension wird auf vier 2 mL Schraubgefäße, welche mit Silica-*beads* befüllt sind, aufgeteilt. Der nachfolgende Zellaufschluss wird im Ribolyser bei einer Geschwindigkeit von 6,5 in drei Zeitintervallen á 30 sek durchgeführt. Durch Zentrifugation für 20 min bei 4 °C und 14000 U/min werden die Zelltrümmer entfernt. Die Proteinkonzentration des kruden Extraktes wird mittels Roti-Nanoquant, einem modifizierten Bradford-Assay, nach Anleitung in fünffach-Bestimmung gemessen.

- Roti-Nanoquant (Roth, Karlsruhe, Germany)

11.2. Messung der spezifischen NAGS-Enzymaktivität

Die NAGS-Aktivität der gewonnenen Zellextrakte wird spektrophotometrisch bestimmt. Bei einer Wellenlänge von 412 nm wird dabei der Absorptionsanstieg, der durch die Bildung von 5-Thio-2-Nitrobenzoat hervorgerufen wird, gemessen. Während der Reaktion (siehe Gleichungen 1 & 2) reagiert die freie Sulfhydryl-Gruppe des CoA-SH, welches durch die Acetylierungsaktivität des Enzyms entsteht, mit dem zugegebenen 5,5-Dithiobis-2-nitrobenzoat (DTNB) (Errey & Blanchard, 2005).



Die Reaktion läuft bei 25 °C in einem Volumen von 500 μ L ab und wird kontinuierlich spektrophotometrisch überwacht. Ein Assay-Mix enthält 500 mM L-Glutamat, 0,2 mM Acetyl-CoA und 0,2 mM DTNB. Alle Substanzen werden in Tris-HCl-Proteinpuffer gelöst. Die Reaktionen werden durch die Zugabe von 10 μ L Proteinextrakt initiiert. Eine Unit enzymatische Aktivität entspricht der Menge an Enzym, welches die Bildung von 1 μ mol N-Acetylglutamat/ min katalysiert und die spezifische NAGS-Aktivität wird als Enzymaktivität pro Milligramm Proteinrohextrakt angegeben.

IV. Ergebnisse

1. Charakterisierung der transkriptionellen Organisation des Arginin-Operons von *Corynebacterium glutamicum*

1.1. Anhand von Northern Blots können Prozessierungsstellen innerhalb des *arg*-Operons identifiziert werden

Das Arginin-Operon (*arg*-Operon) in *C. glutamicum* besteht aus den sieben Argininenen *argC*, *argJ*, *argB*, *argD*, *argF*, *argG* und *argH*, sowie dem Gen für den transkriptionellen Regulator *argR* und weist eine Gesamtgröße 8827 bp auf (Sakanyan *et al.*, 1996; Glansdorff & Xu, 2006). Um zu untersuchen, ob dieses große Operon als eine lange polycistronische mRNA transkribiert wird, wurden Northern Blots von jedem Argininenen (außer *argD*) durchgeführt.

Für diese Untersuchungen wurden verschiedene *C. glutamicum*-Stämme in Minimalmedium kultiviert. Für die Detektion von *argC*, *argJ*, *argB* und *argF* wurde die RNA der $\Delta argH$ -Mutante verwendet. Der Arginin-auxotrophe Stamm wurde dafür bis zur exponentiellen Wachstumsphase in CGXII-Medium plus 0,5 mM Arginin angezogen. Dann wurden die Zellen mit CGXII gewaschen und anschließend in un-supplementiertem Minimalmedium für 3 h weiter inkubiert. Dies sollte gewährleisten, dass ausreichend mRNA der Argininenen synthetisiert wird. Für die Northern Blots von *argG* und *argH* wurde RNA der $\Delta argR$ -Mutante isoliert. Die Detektion von *argR* wurde mit der isolierten RNA der Transposonmutante von *argG* (TpM *argG*) durchgeführt (Mormann *et al.*, 2006), welche genauso behandelt wurde, wie die oben beschriebene $\Delta argH$ -Mutante.

Die isolierten RNA-Proben wurden auf einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nylon-Membran mittels Vakuum-Blotting wurden die spezifischen Digoxigenin-gelabelten RNA-Sonden mit der jeweiligen RNA hybridisiert und schließlich per Chemilumineszenz-Scan visualisiert (Abbildung IV.1). Der detaillierte Ablauf ist im Material und Methoden-Teil beschrieben.

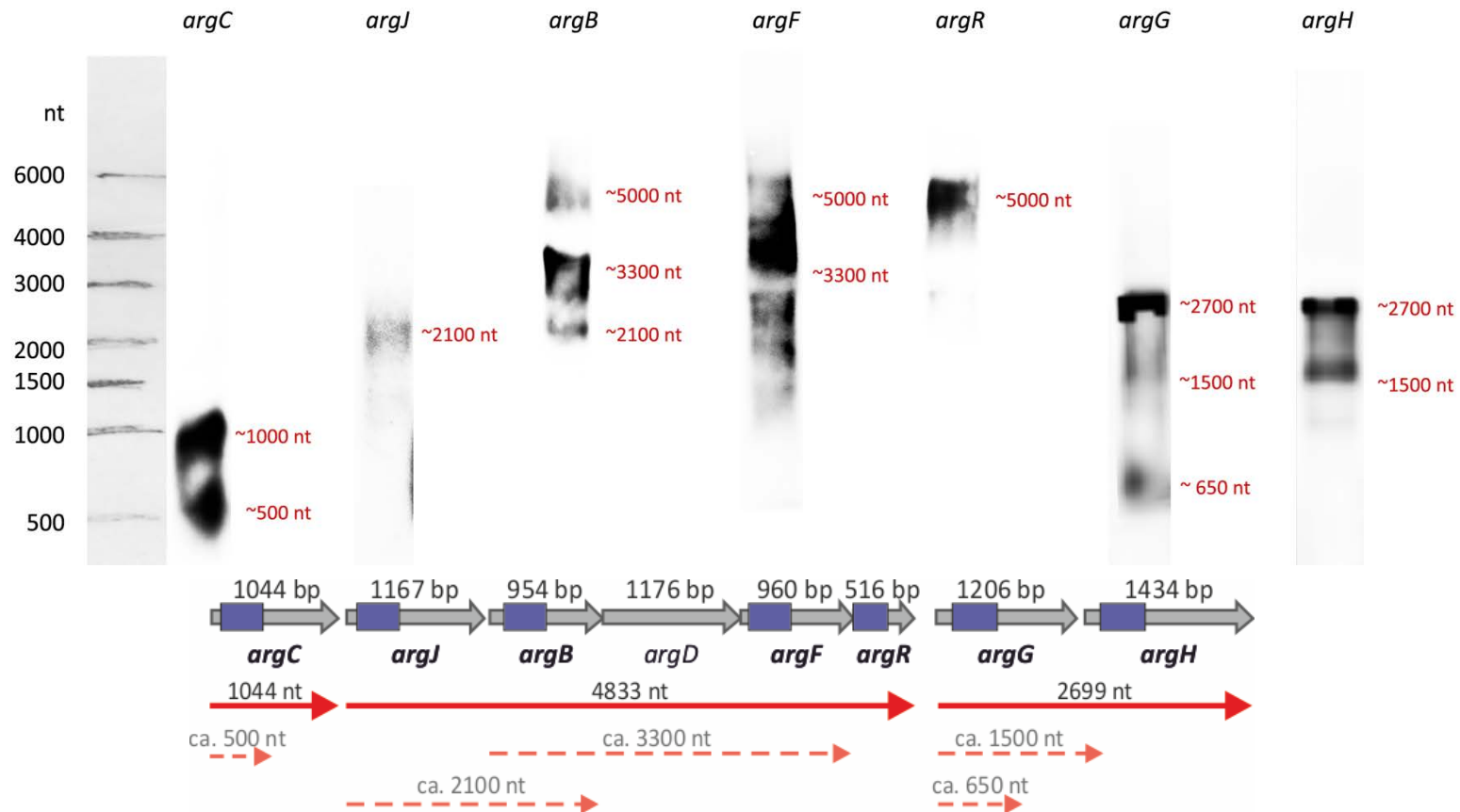


Abbildung IV.1: Visualisierung und Interpretation von Northern Blots für verschiedene Gene des Arginin-Operons von *C. glutamicum*. Für die Detektion von *argC*, *argJ*, *argB* und *argF* wurde RNA der $\Delta argH$ -Mutante verwendet, für *argG* und *argH* die RNA der $\Delta argH$ -Mutante und für den Blot von *argR* isolierte RNA der Transposonmutante *argG* (TpM *argG*). Die Stämme wurden jeweils in Minimalmedium kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{600} = 10$) geerntet. Die Hybridisierung erfolgte jeweils mit spezifischen DIG-gelabelten Sonden, deren Name über den jeweiligen Blot geschrieben wurde. Zur Größenabschätzung wurde in jedem Lauf ein RNA-Marker (High range Riboruler von Fermentas) verwendet, der parallel mitlief. Dessen Banden wurden nach der Färbung im Ethidiumbromid-Bad im UV-Licht sichtbar gemacht und sind auf der linken Seite dargestellt. Die roten Nummern neben jedem Blot geben die ungefähre Größe der Banden an. Unterhalb der Northern Blot-Visualisierungen befindet sich eine Darstellung des *arg*-Operons mit allen acht Genen sowie deren Größe. Die Positionen der Sonden, die jeweils eine Größe von ca. 300 nt haben, sind durch dunkelblaue Boxen markiert. Die roten Pfeile stellen eine Interpretation der Transkriptproportionen dar, wobei die nicht unterbrochenen Pfeile die längsten Transkripte anzeigen und die gestrichelten Pfeile prozessierte RNA Moleküle.

Mit keiner der verwendeten Sonden konnte ein großes Transkript von ca. 8800 nt, welches alle Arginogene abdecken würde, detektiert werden. Es konnten allerdings viele kleinere RNA Moleküle gefunden werden. Im Falle von *argC*, bei dem eine 500 nt sowie eine 1000 nt große Bande visualisiert wurde, kann vermutet werden, dass es entweder allein transkribiert wird oder es durch eine Prozessierungsstelle zu einem posttranskriptionalen Abbruch kommt. Bei *argB*, *argF* und *argR* konnte jeweils ein großes Transkript mit einer Länge von ungefähr 5000 nt ermittelt werden, was bedeuten würde, dass *argJBDFR* zusammen ein Transkript formen. Allerdings konnte bei dem Blot von *argJ* keine Bande dieser Größe gefunden werden, jedoch könnte dies auch an der insgesamt schwächeren Detektion bzw. Hybridisierung bei dieser Sonde liegen. Weiterhin lassen die Blots erkennen, dass es zusätzlich auch noch kürzere RNA-Fragmente gibt, was auf Prozessierungsstellen hindeutet, bei denen wahrscheinlich Endoribonukleasen wirken. So gibt es bei *argB* und *argF* bei ca. 3300 nt eine Bande, die ungefähr der Größe von *argBDF* entspricht. Bei *argJ* und *argB* deutet das 2100 nt große RNA-Fragment an, dass auch diese beiden Gene nach der Prozessierung ein gemeinsames Transkript bilden. Bei mehreren Hybridisierungen ist neben distinkten Banden auch eine Akkumulierung von Fragmenten nahezu gleicher Größe zu sehen, die vermutlich ähnlich lange Transkripte darstellt, die beispielsweise durch mRNA-Degradation entstehen.

Auch bei den hinteren beiden Genen, *argGH*, sind jeweils mehrere unterschiedlich lange Transkripte sichtbar. Bei beiden Blots gibt es ein 2700 nt langes Transkript, welches die Operonstruktur der beiden Gene verifiziert, und einen Promotor stromaufwärts von *argG* vermutet lässt. Dieses Resultat bestätigt die in der Literatur beschriebenen Daten, welche zwei Promotoren innerhalb des *arg*-Operons konstatieren (Hänßler *et al.*, 2007). Zusätzlich konnte in beiden Experimenten, bei *argG* allerdings nur relativ schwach, eine kürzere RNA von ca. 1500 nt Länge identifiziert werden. Daneben weist *argG* noch ein ca. 650 nt großes RNA-Fragment auf, dessen Existenz wahrscheinlich wieder auf eine Prozessierungsstelle zurückzuführen ist.

1.2. Die Transkriptomsequenzierung von *C. glutamicum* gibt weitere Einblicke in die transkriptionelle Organisation des *arg*-Operons

Das Transkriptom von *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde in Bielefeld sequenziert und konnte infolgedessen, inklusive der 5' Enden der Transkripte, analysiert werden (Pfeifer-Sancar *et al.*, 2013). Bezüglich der Argininbiosynthesegene war bereits vorher bekannt, dass diese in zwei Operons organisiert sind, jedoch wurde bislang nur eine bioinformatische Suche nach den jeweiligen Promotorregionen durchgeführt (Yim *et al.*, 2011). Da nun die Sequenzierergebnisse von der mit 5' Enden angereicherten cDNA-Library vorlagen, existierten zusätzliche experimentelle Fakten. Diese wurden mit der publizierten bioinformatischen Analyse verglichen, wobei einige Diskrepanzen zwischen den *in silico* und den experimentellen Daten gefunden wurden.

Die Analyse der Promotorregion von *argC* (Abbildung IV.2a + b) zeigte, dass es sich um ein *leaderless* Transkript mit TATGGT als -10 Motiv und TTTGCA als -35 Motiv handelt. Verglichen mit der *C. glutamicum* Promotorkonsensussequenz (für das -10 Motiv TA(c/t)aaT und für das -35 Motiv ttGcca) (Pátek *et al.*, 2003) zeigen beide Hexamere signifikante Ähnlichkeiten. Dieses Ergebnis konnte bereits vorher im Rahmen meiner Masterarbeit durch eine 5' RACE erzielt werden (Haasner, 2009) und bestätigt das Resultat der RNAseq. Hinsichtlich der Bindestelle des transkriptionellen Regulators ArgR wurde von Yim *et al.* (2011) eine 32 bp lange Sequenz *upstream* von *argC* publiziert. Da dieser Abschnitt die -35 Region vollständig überlappt, konnte hierdurch bestätigt werden, dass ArgR als Repressor agiert und die Transkriptionsinitiation durch Blockierung des Promotors inhibiert, da die RNA Polymerase hierdurch keinen Zugang erhält.

Da die akkumulierten *reads* der Gesamt-Transkriptomsequenzierung ein langes primäres *argCJBDFRGH*-Transkript aufweisen und die strukturelle Sequenzanalyse des Operons nur eine Terminatorstruktur *downstream* von *argH* angibt, scheint es, als ob der *argC* Promotor eine lange polycistronische mRNA mit dem gesamten Set der Arginogene transkribiert. Dennoch konnte durch die RNAseq auch die Existenz eines zweiten Promotors innerhalb des *upstream*-Bereichs von *argG* verifiziert werden. Diese mRNA enthält eine 107 nt lange 5' UTR (untranslatierte Region) bei der ein "G" den Transkriptionsstart markiert (Abbildung IV.2c). Das Motiv der -10 Promotorregion ist TAAGGT und das der -35 Region TAATCG. Damit sieht es so aus, als ob dieser zusätzliche Promotor ein alternatives *argGH*-Operon transkribiert. Durch Vergleich der *argG*-Promotorsequenz mit dem bekannten Konsensusmotiv von ArgR (Makarova *et al.*, 2001) konnte hier keine Bindestelle für ArgR identifiziert werden, was die bekannten Daten bestätigt (Yim *et al.*, 2011).

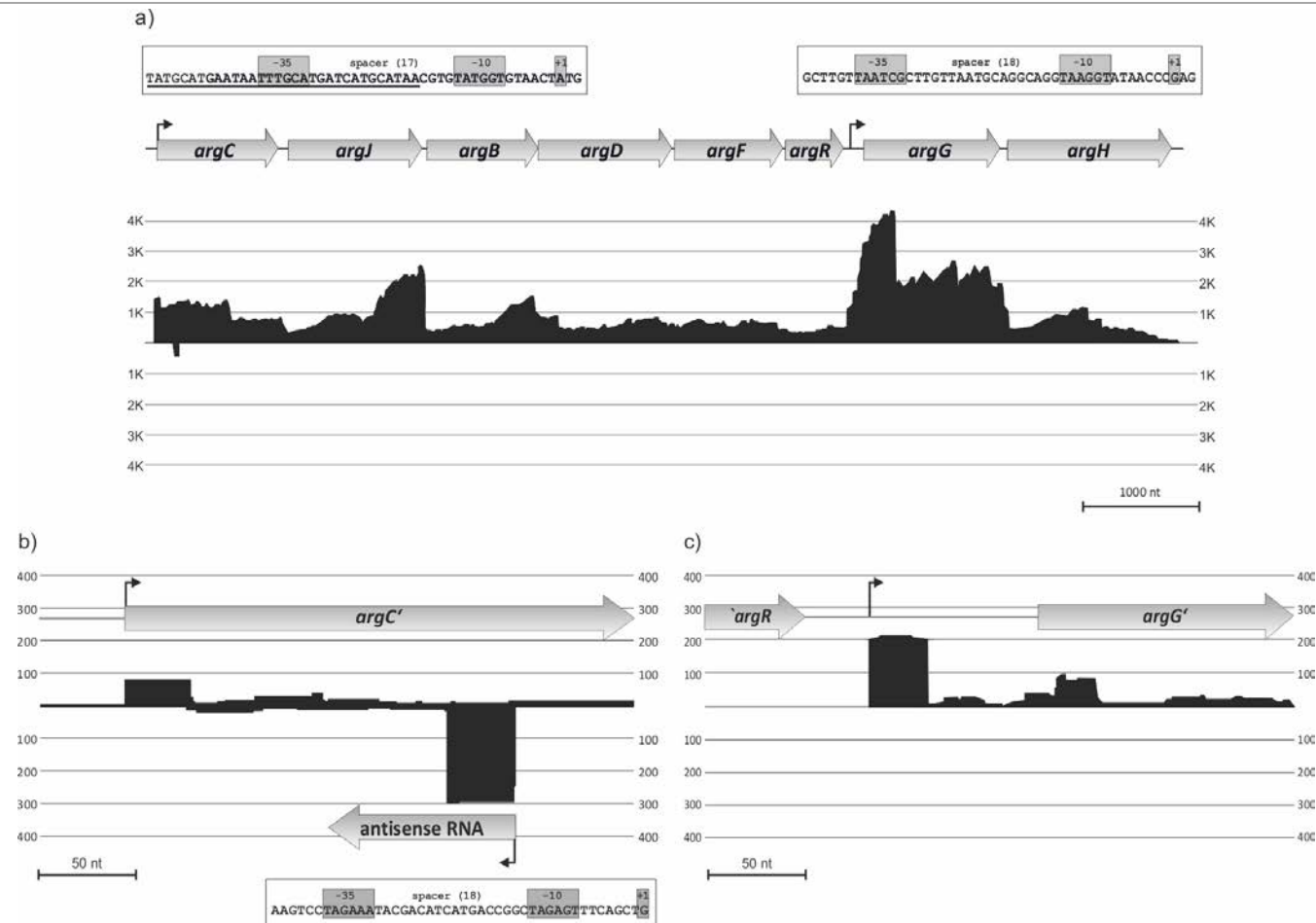


Abbildung IV.2: Akkumulierte reads (schwarz) des Argininoperons sowie die Promotorregionen, die anhand der cDNA-Sequenzierung von *C. glutamicum* ATCC 13032 mit dem Solexa Genome Analyzer IIx (Illumina) identifiziert wurden. Der obere Teil jeder Darstellung zeigt die akkumulierten reads des Hinstranges, die unteren reads die des Rückstranges. Die grauen Pfeile markieren die Position der korrespondierenden Gene, wobei die dünnen schwarzen Pfeile jeweils den Transkriptionsstart repräsentieren. Die Boxen über und unter den Grafiken enthalten die Sequenzen der jeweiligen Promotorregionen. a) Das komplette Argininoperon, bei dem das vollständige Transkriptom sequenziert wurde. Innerhalb der Promotorsequenz von *argC* ist die Bindestelle von ArgR unterstrichen. b) Das Sequenzierungsergebnis der 5' angereicherten cDNA-Library weist ein *leaderless* Transkript von *argC* und zusätzlich die Existenz einer asRNA auf. c) Position des Transkriptionsstarts von *argG*, der bei der Transkriptomsequenzierung der 5' Enden gefunden wurde.

Gemäß des Konsensusmotivs für die ribosomale Bindestelle (RBS), welche für *C. glutamicum* durch Pfeifer-Sancar (Pfeifer-Sancar *et al.*, 2013) identifiziert wurde, wurde eine Suche nach dem AGGag Pentamer durchgeführt. Diese ergab, dass vier bis acht Nukleotide stromaufwärts jedes translationalen Genstarts, außer bei *argC*, eine RBS zu finden ist (Tabelle IV.1). In keinem der Fälle konnte eine Überlappung von Stop- und Startcodon detektiert werden, so dass keine translationale Kopplung zwischen zwei Genen vorkommt (Oppenheim & Yanofsky, 1980).

Tabelle IV.1: Charakterisierung der ribosomalen Bindestellen stromaufwärts von *argJ – H*.

Gen	Abstand zum TLS [Anzahl der Basen] ^{a)}	Sequenz der RBS ^{b)}	Start- codon	Gesamtlänge des intergenischen Bereichs stromaufwärts des Gens [Anzahl der Basen]
<i>argJ</i>	6	AGGAG	ATG	83
<i>argB</i>	6	AGGGC	ATG	45
<i>argD</i>	6	GGGAA	ATG	0
<i>argF</i>	8	AGGAC	ATG	13
<i>argR</i>	4	AGGTA	ATG	3
<i>argG</i>	8	AGGAG	ATG	167
<i>argH</i>	8	AGAAG	ATG	60

a) TLS = Translationstart, b) RBS = Ribosomale Bindestelle

2. Beschreibung und biologische Relevanz einer *antisense* RNA gegenüber *argC*, dem ersten Gen des Argininoperons

2.1. Die Transkriptomsequenzierung von *C. glutamicum* enthält eine *antisense* RNA gegenüber *argC*

Eine weitere Sequenzierbibliothek für die Detektion von überwiegend kleinen *non-coding* RNAs (sRNA) wurde durch Mentz *et al.* (Mentz *et al.*, 2013) generiert und deckte die Existenz vieler neuer kleiner Transkripte auf. Ein Beispiel für eine spezielle Klasse von sRNA, die *antisense* RNAs (asRNA), wurde im Argininoperon gefunden, nämlich gegenüber des 5' Endes von *argC* (kodiert für die *N*-Acetyl- γ -Glutamyl-Phosphatreduktase), dem ersten Gen des *arg*-Operons. Basierend auf dem RNAseq-Ergebnis befindet sich der Transkriptionsstart an Position 1.465.750, wobei die +1 Stelle dementsprechend 200 bp *downstream* des *argC* Translationsstarts liegt. Die Analyse der Promotorregion stromaufwärts von +1 enthüllt je ein Hexamer für die -10 (TAGAGT) und -35 (TAGAAA) Region,

die durch einen 18 bp *spacer* getrennt sind (Abbildung IV.2b) und eine hohe Ähnlichkeit zu der *C. glutamicum Housekeeping*-Promotorkonsensussequenz aufweisen (Pátek *et al.*, 2003, siehe oben). Es wurde beschlossen, diese asRNA AsaC zu nennen, was für *antisense* RNA von *argC* steht.

Um die Transkription von *asaC* unter nicht-gestressten Bedingungen zu verifizieren, wurde ein Northern Blot-Experiment mit einer Strang-spezifischen RNA-Sonde durchgeführt. *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde in Minimalmedium angezogen, in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und nach der Extraktion wurden die RNA mittels Northern Blot analysiert. Zusätzlich wurde bei dieser Methode die Länge dieses kurzen Transkripts mitbestimmt, da die Transkriptgröße für solche sRNAs anhand des RNAseq-Ergebnisses nur schwer abschätzbar ist.

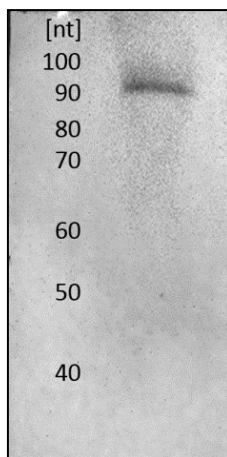


Abbildung IV.3: Chemilumineszenz-Scan des spezifischen Northern Blots von AsaC. Die Gesamt-RNA von *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde extrahiert, auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt, geblottet und als Ziel für eine DIG-gelabelte *asaC*-Sonde eingesetzt. Die Größen der RNA-Marker-Fragmente sind zur Größenabschätzung durch Nummern auf der linken Seite angegeben.

Bei dem Northern Blot wurde ein einzelnes Transkript detektiert (Abbildung IV.3). Eine distinkte Bande wurde nach dem Chemilumineszenz-Scan der asRNA bei einer Größe von ~90 nt sichtbar. Basierend auf ihrer Position, kann AsaC nun grob als eine intern lokalisierte asRNA klassifiziert werden.

Nach der Bestimmung der asRNA-Länge wurde ihre Form *in silico* analysiert, da bekannt ist, dass die Funktion eines strukturellen RNA-Moleküls zu einem Großteil durch seine Struktur bestimmt wird (Ding, 2005). Aus diesem Grund wurde die frei verfügbare Software RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>) verwendet, um die sekundäre RNA-Struktur auf der Basis von 94 nt vorherzusagen. Die prognostizierte Struktur lässt einen *stem* erkennen - eine lange Haarnadel mit terminalen Schlaufen an jedem Ende, einigen internen *loops*, und einer Ausbuchtung (Abbildung IV.4). Die minimale freie Energie (MFE) wurde aus den Summen der Energien von ‚übereinandergestapelten‘ Basenpaaren (*stacked base pairs*) und *loops* berechnet (Zuker, 1989) und beträgt -42,30 kcal/mol. Dieser ziemlich hohe MFE-Wert und die hauptsächlich Baumstamm-ähnliche Struktur deuten auf eine sehr stabile Sekundärstruktur hin. Bezüglich der Termination der *asaC*-Transkription konnte eine bioinformatische Suche mit ARNold (<http://rna.igmors.u-psud.fr/toolbox/arnold/index.php>) keine klassische *rho*-unabhängige Struktur aufdecken.

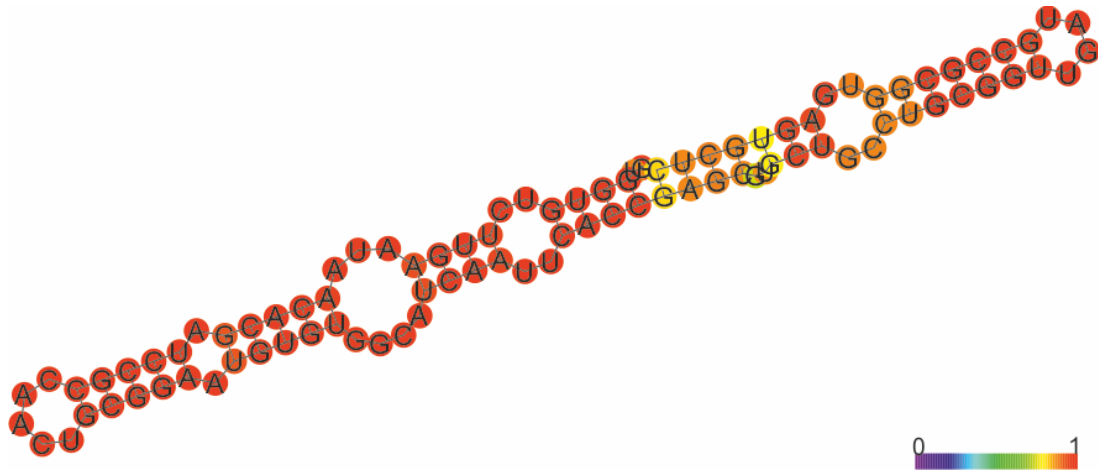


Abbildung IV.4: Mittels RNAfold vorhergesagte minimale freie Energie (MFE)-Struktur von AsaC. Die minimale freie Energie beträgt laut Vorhersage -42,30 kcal/mol. Die Farben geben die Basenpaar-Wahrscheinlichkeit an, die von violett =0 bis rot =1 geht.

2.2. Durch Einbringung einer Mutation in die Promotorregion von *asaC* wird die *argC* Transkription beeinflusst

Nach der Untersuchung der asRNA-Transkriptstruktur stellte sich die Frage, ob AsaC eine biologische Funktion hat und ob es die Argininbiosynthese beeinflusst. Normalerweise würde für so eine Analyse die gewünschte Region deletiert und anschließend würden phänotypische oder komparative Transkriptomstudien der Mutante durchgeführt werden, um die Funktion daraus ableiten zu können (Möker *et al.*, 2004). Dies ist augenscheinlich nicht möglich, da eine Deletion das in *sense* Richtung lokalisierte *argC*-Gen zerstören und den Stamm Arginin-auxotroph werden lassen würde. Das würde es nahezu unmöglich machen, zwischen Effekten, die durch den Verlust von AsaC und solchen, die durch den Verlust von ArgC bedingt sind, zu unterscheiden.

Um dieses Problem zu umgehen, wurde eine Mutation der konservierten -10 Region als geeignete Lösung erachtet. Die Konsensussequenz der -10 Region von *C. glutamicum* ist TA(c/t)aaT (Pátek *et al.*, 2003) und weist eine hohe Ähnlichkeit zu dem Hexamer, welches die -10 Region von *asaC* repräsentiert, nämlich TAGAGT, auf. Wird darauf Rücksicht genommen, dass die durch Großbuchstaben gekennzeichneten Basen hoch konserviert sind und in mehr als 70% aller Promotoren vorkommen, ist es für die Beseitigung des Promotors von besonderer Wichtigkeit, die beiden T's am Start bzw. am Ende zu ändern. Um gleichzeitig die Aktivität des *argC sense* Transkripts zu gewährleisten, wurde zunächst versucht, jeweils ein anderes Codon, welches dieselbe Aminosäure repräsentiert, zu finden.

Die Aminosäurepositionen der *asaC* -10-Promotorregion in *argC* sind 70 (kodiert für ein Threonin) und 71 (kodiert für ein Leucin) (Abbildung IV.5).

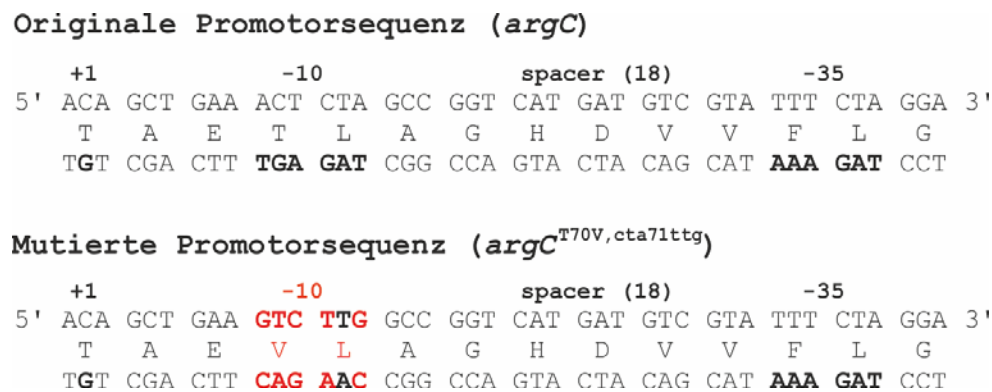


Abbildung IV.5: Kodier- und Aminosäuresequenz der Wildtyp- und der mutierten Promotorregion von *asaC*. Die Sequenz der originalen Promotorsequenz ist oben abgebildet, die des mutierten Promotors unten. Die obere Kodiersequenz kennzeichnet den Hinstrang (*argC*), die untere den Rückstrang (*asaC*) und die Aminosäuresequenz von *argC* ist in der Mitte angegeben. Änderungen in der mutierten Promotorsequenz sind rot markiert. Die Promotorregionen (Transkriptionsstart = +1, -10 und -35 Region) sind durch Fettschrift kenntlich gemacht.

Aufgrund der Redundanz des genetischen Codes, war es im Falle des Leucins möglich, einfach ein anderes Triplet zu verwenden. Durch Änderung von CTA gegen TTG in *argC* konnte zumindest das erste T in dem Promotor der asRNA gegen ein C ausgetauscht werden, allerdings verblieb dadurch das ebenfalls hoch konservierte A an der zweiten Position. Obwohl die Aminosäure an Position 70 vierfach degeneriert ist, war kein einfacher Wechsel des Threonin-Codons möglich, denn das A des ACT, welches das letzte T in der -10 Region markiert, ist in allen vier Triplets konserviert. Deshalb wurde ein *alignment* mit ArgC-Proteinen von anderen Corynebakterien durchgeführt. In *Corynebacterium efficiens*, einem nahen phylogenetischen Verwandten von *C. glutamicum* (Goodfellow & Whitman, 2012), für den die Genomsequenz vorhanden ist (Nishio *et al.*, 2003), befindet sich ein Valin an der entsprechenden Stelle. Infolgedessen wurde die -10 Region der asRNA zu CAAGAC geändert, wodurch ein mutiertes *argC*^{T70V,cta71ttg} generiert wurde.

Um zu bestätigen, dass das mutierte *argC* immer noch funktional ist, wurde eine definierte *argC* Deletionsmutante konstruiert, die in einer Arginin-auxotrophen Mutante ($\Delta argC$) resultierte. Darüber hinaus wurde jeweils das native und das mutierte *argC*^{T70V,cta71ttg} in den konstitutiven Überexpressionsvektor pZ8-1 kloniert. Der Arginin-auxotrophe Stamm $\Delta argC$ wurde mit diesen beiden Konstrukten transformiert. In beiden Fällen konnte das jeweilige Plasmid die Auxotrophie komplementieren, was zu einem nahezu identischen Wachstumsverhalten der beiden Stämme führte (Abbildung IV.6). Dies ließ schlussfolgern, dass das mutierte ArgC^{T70V,cta71ttg} funktional ist.

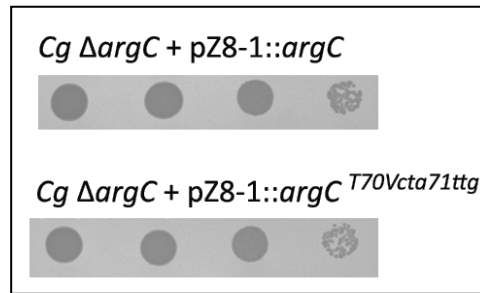


Abbildung IV.6: Wachstumstest von *C. glutamicum* $\Delta argC$ mit verschiedenen pZ8-1-Überexpressionskonstrukten auf MM1-Minimalmediumsplatten. Zehnfach serielle Verdünnungen wurden hergestellt und auf Minimalmediumsplatten getropft. Als Positivkontrolle wurde das überexprimierte native ArgC genutzt, um das Wachstum von *Cg* $\Delta argC$ plus das des mutierten ArgC^{T70V,cta71ttg} zu analysieren.

Um zu testen, ob diese Mutationen wirklich zu einer verringerten Promotoraktivität führen, wurde sowohl der native als auch der mutierte Promotorbereich in den Promotortestvektor pPRIM2 kloniert (Vašicová *et al.*, 1999). Dieser Vektor erlaubt die Bestimmung der Promotoraktivität durch Transkription des promotorlosen *cat*-Gens, welches für die Chloramphenicol Acetyltransferase kodiert, und dessen mRNA-Level durch RT-qPCR gemessen werden kann.

Beide Plasmide wurden in das *C. glutamicum* ATCC 13032 Chromosom integriert. Das Wachstum der sich daraus ergebenden Stämme, die RNA Präparation und die relative Quantifizierung des mRNA-Levels mittels RT-qPCR wurde, wie im Material und Methoden-Teil beschrieben, durchgeführt. Durch Vergleich der Menge an *cat*-mRNA in den Stämmen mit nativem *asaC* Promotor mit den Stämmen, die den mutierten Promotor enthielten, konnte gezeigt werden, dass die fünf Nukleotidaustausche die Promotoraktivität um ca. 90 % reduzieren (Abbildung IV.7). Dieser Rückgang wurde als ausreichend für weitere Untersuchungen angesehen.

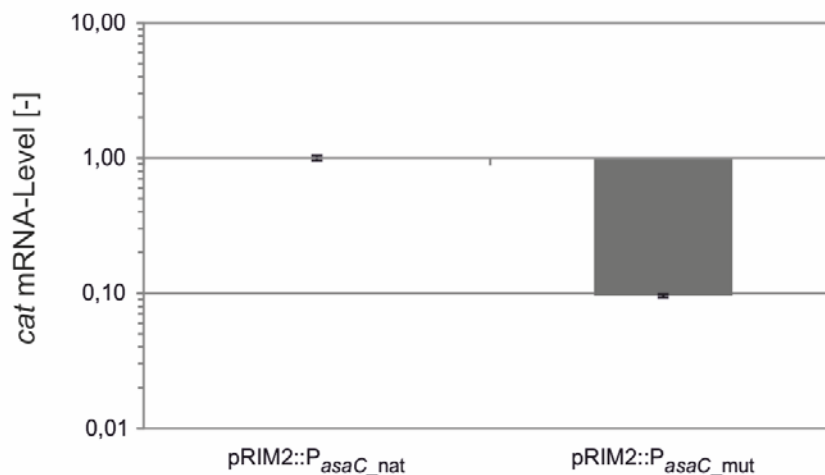


Abbildung IV.7: Messung der Promotoraktivität des nativen (nat) und des mutierten (mut) *asaC* Promotors in dem Promotortestvektor pPRIM2 mittels RT-qPCR des Chloramphenicol Acetyltransferase (*cat*) mRNA-Levels. Die transkriptionellen Fusionen der Promotor-tragenden Fragmente (*asaC* Promotor ± Mutation) mit dem promotorlosen *cat*-Gen wurden generiert, um die jeweilige Promotorstärke in einem Einzelkopiersystem (pPRIM2) zu untersuchen. Alle Konstrukte wurden in das *C. glutamicum* ATCC 13032 Chromosom integriert. Die resultierenden Stämme wurden in Minimalmedium kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{600} = 10$) geerntet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von zwei biologischen und zwei technischen Replikaten an

Infolgedessen wurden die fünf Nukleotidaustausche in das Chromosom von *C. glutamicum* ATCC 13032 und von $\Delta argR$ integriert. Die resultierenden Stämme $\Delta asaC$ und $\Delta argR \Delta asaC$, sowie der Wildtyp (*C. glutamicum* ATCC 13032) und die Einzelmutante $\Delta argR$ wurden in CGXII-Minimalmedium kultiviert und während der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Nach der RNA-Isolierung wurde eine strangspezifische 2-Schritt RT-qPCR durchgeführt. Hierbei wurde für die cDNA-Synthese des ersten Stranges nur ein Primer zugegeben und erst anschließend, bevor die qPCR startete, der zweite Primer dem Ansatz hinzugefügt. Um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurde in beiden Fällen dasselbe Primerpaar für die PCR benutzt. Für die Auswertung der Ergebnisse wurde die extrahierte RNA von *C. glutamicum* ATCC 13032 als Referenz verwendet. Wie bei dem Experiment mit dem *cat*-Gen, resultierte die Mutation des Promotors in einer reduzierten asRNA-Menge in der $\Delta asaC$ Mutante im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung IV.8). Im Gegensatz dazu war die *argC* mRNA-Menge in dieser Mutante angestiegen, was darauf hindeutet, dass AsaC normalerweise die *sense* Transkription reduziert.

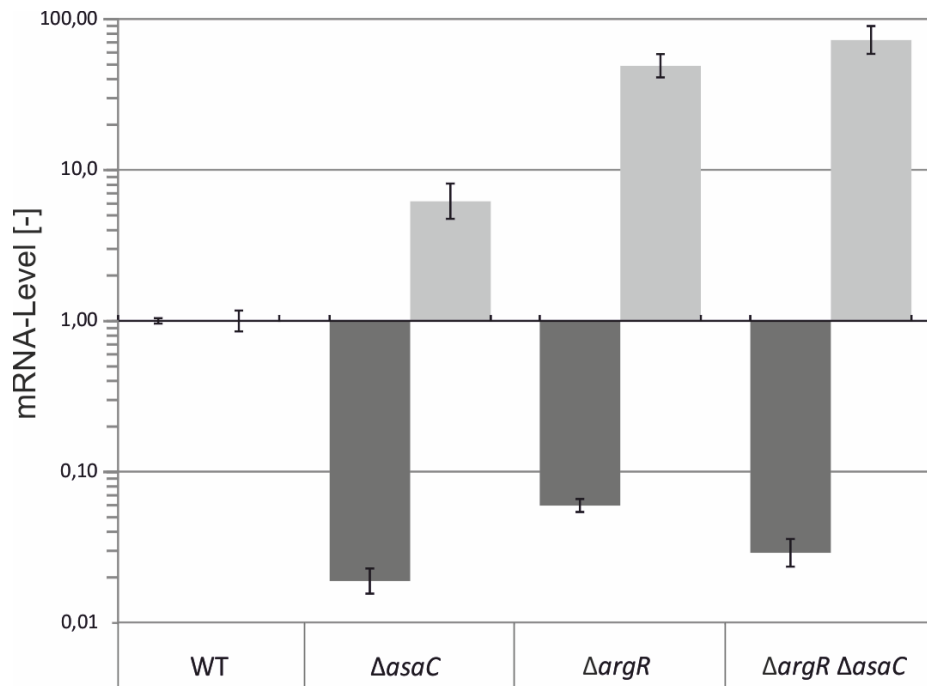


Abbildung IV.8: mRNA-Mengen von *asaC* und *argC* in verschiedenen Mutanten relativ zu denen im Wildtyp (WT). Die vier Stämme (Wildtyp (WT), $\Delta asaC$, $\Delta argR$ und $\Delta argR \Delta asaC$) wurden in Minimalmedium angezogen und in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Dieselben Primer wurden für die Messungen der mRNA-Mengen mittels RT-qPCR verwendet, wobei die Strangspezifität dabei durch ein 2-Schritt Protokoll erreicht wurde. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von mindestens zwei biologischen und zwei technischen Replikaten an. Alle Level sind relativ zur mRNA-Menge des Wildtyps *C. glutamicum* ATCC 13032 (WT) angegeben, wobei die Transkription von *asaC* in dunkelgrau und die von *argC* Richtung in hellgrau dargestellt ist.

Wie erwartet ist der mRNA-Pool von *argC* in der $\Delta argR$ Mutante höher als in der Referenz, dem Wildtyp, da der Verlust des Repressors in einer erhöhten Transkriptionsrate resultiert. Interessant ist, dass das *asaC*-Level in dieser Mutante ebenfalls geringer ist. Dies könnte ein Titrationseffekt sein, der durch die höhere Menge an *sense* mRNA hervorgerufen wurde. In der Doppelmutante ist die Abnahme der *antisense* Transkription ähnlich wie die in der $\Delta asaC$ Einzelmutante, währenddessen ist die *argC* mRNA-Menge etwas erhöht im Vergleich zu der $\Delta argR$ Mutante. Zusammengefasst demonstrieren diese Ergebnisse eindeutig, dass AsaC einen Einfluss auf die Transkriptmenge von *argC* hat.

2.3. Eine Überexpression der *antisense* RNA *in trans* hat keinen Einfluss auf die *argC* Transkription und validiert ‚Transkriptionelle Interferenz‘ als regulatorischen Mechanismus

Der beobachtete Einfluss auf *argC* durch die entdeckte asRNA warf die Frage nach der mechanistischen Wirkungsweise von AsaC auf. Da diese sRNA in der Mitte von *argC* transkribiert wird und einen Einfluss auf dessen Transkriptionslevel hat, kamen zwei unterschiedliche Mechanismen als Ursache in Frage: eine transkriptionelle Interferenz oder ein *annealing* an die *sense* mRNA, wodurch eine Schnittstelle für eine Endoribonuklease generiert wird. Im ersten Fall würde es zu keiner Paarung von *sense* und *antisense* Transkripten kommen, sondern durch die gegenüberliegend angeordneten Promotoren würde die RNA-Polymerase von *asaC* die Transkriptionselongation von *argC* blockieren (Shearwin *et al.*, 2005). Dabei würde die *argC*-Polymerase abgelöst werden und es gäbe dadurch weniger *argC*-Transkripte in der Zelle. Im zweiten Fall würde AsaC einen direkten Einfluss auf die *argC*-Stabilität haben, indem es an die *argC*-mRNA bindet und z.B. eine RNase III vermittelte Spaltung der doppelsträngigen RNA induziert, was wiederum zu einer Degradation der *argC*-Transkripte führen würde (Thomason & Storz, 2010).

Um zu testen, welcher dieser beiden Mechanismen verwendet wird, wurde die asRNA *in trans* auf einem Vektor überexprimiert. Der *E. coli* / *C. glutamicum* Shuttlevektor pEC-XK99E wurde für dieses Experiment umkonstruiert, indem die Kodierregion für den *lac*-Repressor und die *trc*-Promotorregion entfernt wurden, was zu dem promotorlosen nicht-induzierbaren Konstrukt pEC-K99E führte. In dieses Grundgerüst wurde AsaC eingefügt, entweder inklusive des nativen oder des mutierten Promotors. Die verwendeten PCR-Produkte endeten am Transkriptionsstart von *argC*, wodurch ein 235 bp großes Amplifikat entstand. *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde jeweils mit dem Leervektor, pEC-K99E::*asaC*_P_{nat}, oder pEC-K99E::*asaC*_P_{mut} transformiert. Die resultierenden Stämme wurden in Minimalmedium angezogen, in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und dann wurde die RNA isoliert. Um die Mengen an *sense* und *antisense* Transkripten separat zu bestimmen, wurde abermals eine 2-Schritt RT-qPCR durchgeführt.

Der asRNA-Pool war in den Stämmen, die die *asaC*-Region entweder unter Kontrolle des nativen oder des mutierten Promotors enthielten, im Vergleich zu dem Stamm mit dem Leervektor erhöht (Abbildung IV.9). Wie nach den Ergebnissen des Promotortestvektors erwartet, betrug der AsaC-Pool in dem Stamm, der *asaC* unter Kontrolle des mutierten Promotors trägt, nur ca. 15% von dem mit dem nativen Promotor. Im Gegensatz dazu ist die relative mRNA-Menge der *argC* Transkripte in beiden

Fällen sehr ähnlich, was bedeutet, dass das *in trans* exprimierte *asaC* keinen Einfluss hat. Dieses Ergebnis lieferte den Beleg, dass AsaC mittels Transkriptionsinterferenz agiert.

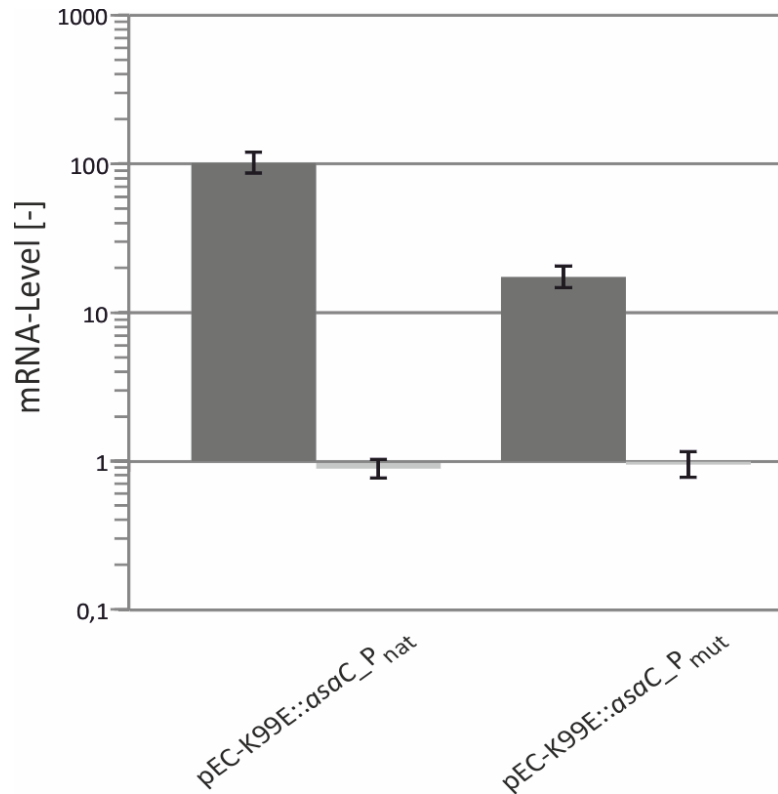


Abbildung IV.9: mRNA-Mengen von *asaC* und *argC* im *C. glutamicum* Wildtyp, welcher eine Plasmid-basierte Kopie von *asaC* entweder unter Kontrolle des nativen oder des mutierten *asaC*-Promotors enthält. Die *asaC*-Region wurde in den pEC-K99E kloniert, entweder unter Kontrolle des nativen (nat) oder des mutierten (mut) Promotors. Die relativen RNA-Pools sind relativ zu denen in dem Stamm mit dem Leervektor angegeben. Alle Konstrukte wurden in *C. glutamicum* ATCC 13032 eingebracht, welcher anschließend bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase in Minimalmedium kultiviert wurde. Nach der Extraktion der RNA wurde die *argC* Transkription (hellgrau) sowie die von *asaC* (dunkelgrau) strangspezifisch mittels 2-Schritt RT-qPCR bestimmt.

3. Eine neue Variante von *N*-Acetylglutamat Synthase ist verantwortlich für den ersten Schritt der Argininbiosynthese in *C. glutamicum*

3.1. Die Akkumulierung von intrazellulären Arginin-Intermediaten gibt Hinweise auf eine unbekannte *N*-Acetylglutamat Synthase

Die Argininbiosynthese von *C. glutamicum* war bereits ein wesentlicher Bestandteil von zahlreichen vorangegangenen Forschungen, wodurch ein detailliertes Wissen über die genetische und enzymatische Organisation des Stoffwechselweges (Sakanyan *et al.*, 1996), seiner Regulation durch den transkriptionellen Regulator ArgR, sowie der *feedback*-Inhibition von ArgB durch das Endprodukt (Ikeda *et al.*, 2009) vorlag. Um das Bild zu komplementieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Charakterisierung der metabolischen Intermediate des Argininmetabolismus mit definierten Mutanten aller bekannten Argininbiosynthesegene, die im Argininoperon lokalisiert sind (Sakanyan *et al.*, 1996), durchgeführt. Zusätzlich wurde das putative NAGS-codierende Gen *cg1722* (Hwang & Cho, 2010) mituntersucht.

Für diese systematische metabolische Studie wurden auxotrophe Mutanten von jedem Argininbiosynthesegen mit einer zusätzlichen Deletion des transkriptionellen Regulators ArgR (z.B. $\Delta argRC$, $\Delta argRJ$) konstruiert. Die Eliminierung des Repressors ArgR sollte die Transkription der Arginogene sicherstellen. Da kein Effekt von ArgR auf die Transkription von *cg1722* erwartet wurde, wurde in diesem Stamm nur eine Einzeldelation vorgenommen. Kultivierung, Zellernte, Extraktion der intrazellulären Metabolite und LC-MS Analyse der unterschiedlichen Stämme erfolgte wie in Haasner *et al.* beschrieben (Haasner *et al.*, 2013).

Um gleichmäßige Konditionen sicherzustellen, wurden *C. glutamicum* ATCC 13032 und alle Mutanten in Minimalmedium mit supplementiertem Arginin angezogen. Dies galt auch für die $\Delta cg1722$ -Mutante, obwohl ein Wachstumstest einen prototrophen Phänotypen zeigte (Abbildung IV.10).

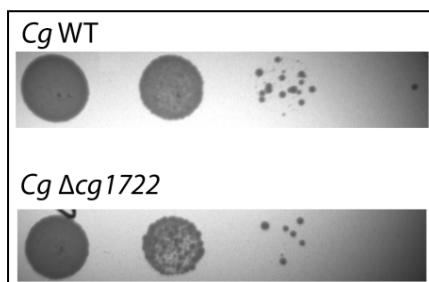


Abbildung IV.10: Wachstumstest von *C. glutamicum*-Stämmen auf MM1-Minimalmediumsplatten. Zehnfach serielle Verdünnungen wurden hergestellt und auf Minimalmediumsplatten getropft. *C. glutamicum* ATCC 13032 (*Cg* WT) wurde als Positivkontrolle genutzt, um das Wachstum von *Cg* $\Delta cg1722$ zu analysieren.

Durch Waschung der exponentiell wachsenden Zellen und anschließendem Transfer in unsupplementiertes CGXII-Medium sollten die auxotrophen Stämme hungern, während ihr Wachstum arretiert und das direkte Substrat des jeweiligen deletierten Enzyms angestaut wird, so wie es auch schon in anderen Untersuchungen gezeigt wurde (Barsch *et al.*, 2004; Fuhrer *et al.*, 2011). Für die Detektion der Argininbiosynthese-Intermediate wurden hydrophile Extrakte angefertigt und im positiven Ionisierungsmodus per HPLC-ESI-qTOF analysiert. Die Erzeugung der Extrakte, die Detektion sowie die Auswertung der Daten wurden von Frederick Walter durchgeführt. Die Mittelwerte der normalisierten Peakflächen der identifizierten $[M+H]^+$ -Ionen von *N*-Acetylglutamat, *N*-Acetylglutamat Semialdehyd, *N*-Acetylornithin, Ornithin, Citrullin und Argininosuccinat sind in Abbildung IV.11 dargestellt. *N*-Acetylglutamyl Phosphat konnte in keiner Probe detektiert werden, was auf eine unzureichende Ionisierung dieser Komponente im Positivmodus zurückzuführen sein könnte. Ebenso konnte Arginin in keiner Probe gefunden werden, aber dies war für die Deletionsmutanten zu erwarten. Mit Ausnahme von *N*-Acetylglutamat war die Sensitivität der gewählten Methode nicht ausreichend genug, um die Metabolite der Argininbiosynthese in *C. glutamicum* ATCC 13032 (Wildtyp, WT) zu detektieren. Weiterhin war für *N*-Acetylglutamat Semialdehyd keine Referenzsubstanz erhältlich, daher wurde das jeweilige $[M+H]^+$ -Ion ($m/z = 174,0761$) durch Anwendung von automatisierter MS/MS fragmentiert und verifiziert.

Durch den Vergleich der Metabolitprofile der verschiedenen Arginin-auxotrophen Stämme konnte gezeigt werden, dass die intrazellulären Intermediate *N*-Acetylglutamat Semialdehyd, Ornithin und *N*-Argininosuccinat jeweils nur in ihrer korrespondierenden Mutante, nämlich in $\Delta argRD$, $\Delta argRF$ und $\Delta argRH$, akkumuliert wurden. Citrullin hingegen konnte sowohl in den Proben der Stämme $\Delta argRG$ und $\Delta argRH$ detektiert werden. Letzteres könnte bedeuten, dass es zu einem Rückstau von *N*-Argininosuccinat zu Citrullin kommt oder dass die Argininosuccinat Synthetase nur eine geringe Umsetzungsgeschwindigkeit besitzt. *N*-Acetylornithin wurde ebenfalls in zwei der Mutanten gefunden. Eine höhere Poolgröße dieser Komponente wurde in $\Delta argRJ$ und eine geringe Poolgröße in $\Delta argFR$ beobachtet, was erneut einen Rückstau impliziert. Die Akkumulierung von *N*-Acetylornithin in der $\Delta argRJ$ -Mutante liefert einen eindeutigen *in vivo* Hinweis auf die NAGS-Aktivität in *C. glutamicum*, die durch mindestens ein anderes Enzym als ArgJ katalysiert wird. Frühere *in vitro* und *in vivo* Experimente, die von Sakanyan *et al.* 1996 durchgeführt wurden, enthüllten bereits die nur monofunktionale Enzymaktivität von ArgJ in *C. glutamicum* (Sakanyan *et al.*, 1996).

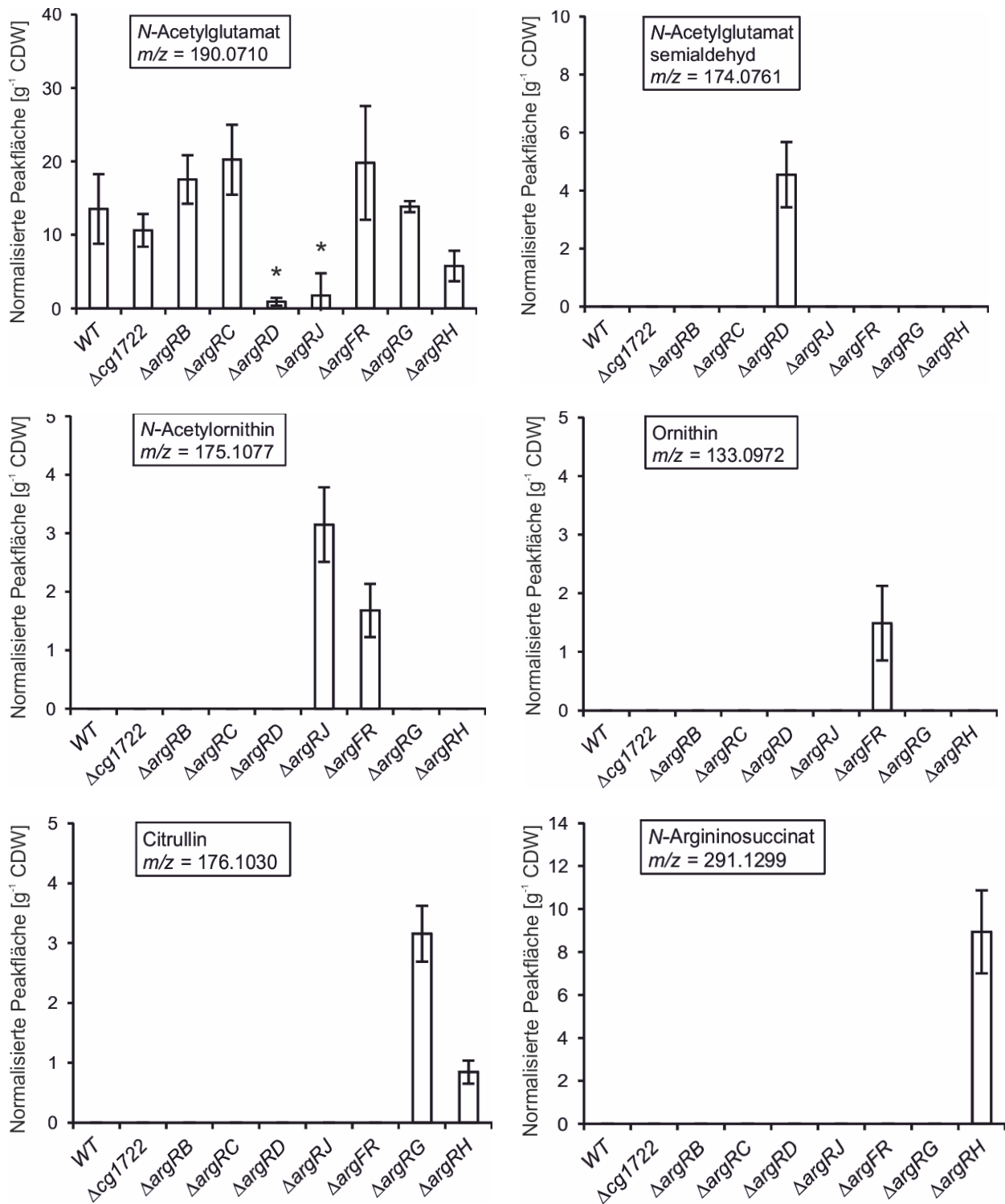


Abbildung IV.11: HPLC-ESI-qTOF Analysen von sechs Intermediaten der Argininbiosynthese in verschiedenen biosynthetischen Mutanten. Dargestellt sind die normalisierten Peakflächen von *C. glutamicum* ATCC 13032 (WT) und acht Einzel- bzw. Doppeldelentionsmutanten, die mit Arginin bis zur exponentiellen Phase kultiviert wurden. Das Arginin wurde durch Waschung entfernt und die Zellen wurden weiter inkubiert, damit sie die intrazellulären Metabolite anstauen. Der Kasten in jedem Diagramm gibt die jeweilige intrazelluläre Komponente und ihr Masse-zu-Ladungs-Verhältnis an. Die Peakdetektion und -integration wurde mittels der *base peak*-Chromatogramme (BPC) von den m/z-Werten der [M+H]⁺-Ionen durchgeführt. Werte, die signifikant unterschiedlich vom Wildtyp-Level (Student's T-Test p<0,05) sind, wurden mit einem Sternchen markiert. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von vier biologischen Replikaten.

N-Acetylglutamat konnte bei den hier durchgeführten Experimenten als einziges Intermediat sowohl im Wildtyp als auch in allen Mutanten detektiert werden. Wie in der $\Delta argRJ$ Mutante ist der *N*-Acetylglutamat-Pool ebenfalls signifikant in dem $\Delta argRD$ -Stamm reduziert, was wahrscheinlich an dem fehlenden Substrat für die Transacetylierung von ArgJ liegt. Der relative hohe *N*-Acetylglutamat-Pool in der $\Delta argRC$ Mutante lässt sich hierdurch jedoch nicht erklären.

Bei dem Vergleich des intrazellulären *N*-Acetylglutamat-Pools zwischen *C. glutamicum* WT und der Mutante $\Delta cg1722$ konnte keine signifikante Änderung verzeichnet werden. Dementsprechend muss die Acetylierung des Glutamats durch ein anderes Enzym ausgeführt werden.

3.2. Auffindung eines Gens, dessen Protein den ersten Argininbiosyntheseschritt durchführen kann

Für die Identifizierung eines Gens, welches für die gesuchte *N*-Acetylglutamat Synthase in *C. glutamicum* ATCC 13032 kodiert, wurde eine *E. coli* JM109 $\Delta argA$ Mutante mittels des Red/ET Rekombinationssystem erzeugt. Nach der erfolgreichen Integration der Gendeletionskassette wurde der Selektionsmarker durch FLP-Rekombination entfernt. Die konstruierte Mutante wurde auf M9-Minimalmediumsplatten ausgestrichen und es konnte kein Wachstum ohne Arginin-Supplementation beobachtet werden. Wachstumstests (Abbildung IV.12) verifizierten, dass die Argininauxotrophie dieser Mutante weder durch ArgJ von *C. glutamicum* (in der Literatur von Sakanyan *et al.* (1996) beschrieben) noch durch Cg1722 komplementiert werden kann, wobei letzteres der Beschreibung von Hwang *et al.* (Hwang & Cho, 2010) widerspricht.

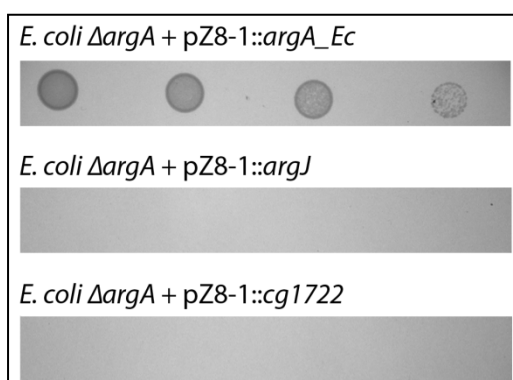


Abbildung IV.12: Tropftest auf M9-Minimalmedium mit den Komplementationen von *E. coli* JM109 $\Delta argA$. Zehnfach serielle Verdünnungen wurden hergestellt und auf die Minimalmediumsplatten getropft. Für die Komplementationen wurde der konstitutive Expressionsvektor pZ8-1 verwendet, der (von oben nach unten) *argA* aus *E. coli*, *argJ* aus *C. glutamicum* und *cg1722* aus *C. glutamicum* enthält.

Zur Auffindung des Gens, welches in der Lage ist, die auxotrophe *E. coli* $\Delta argA$ Mutante zu komplementieren, wurde zunächst der pZ8-1 Vektor modifiziert. Um die Translation der inserierten ORFs in *E. coli* zu gewährleisten, wurde die multiple Klonierregion (*multiple cloning site, mcs*) gegen eine einzige *Bam*HI-Schnittstelle ausgetauscht. Des Weiteren wurde stromaufwärts dieser Restriktions-

schnittstelle eine Konsensus-RBS (ribosomale Bindestelle) von hoch exprimierten Genen (identisch zu der komplementären mRNA-Bindestelle der 16S rRNA von Amador *et al.*, 1999) eingefügt. Der resultierende Vektor wurde pZ8-2 genannt. Anschließend wurde eine genomische Bibliothek von *C. glutamicum* ATCC 13032 erzeugt. Die Prozedur zur Herstellung dieser DNA-Bibliothek und die Klonierung in den pZ8-2 Vektor sind in Abbildung IV.13 dargestellt.

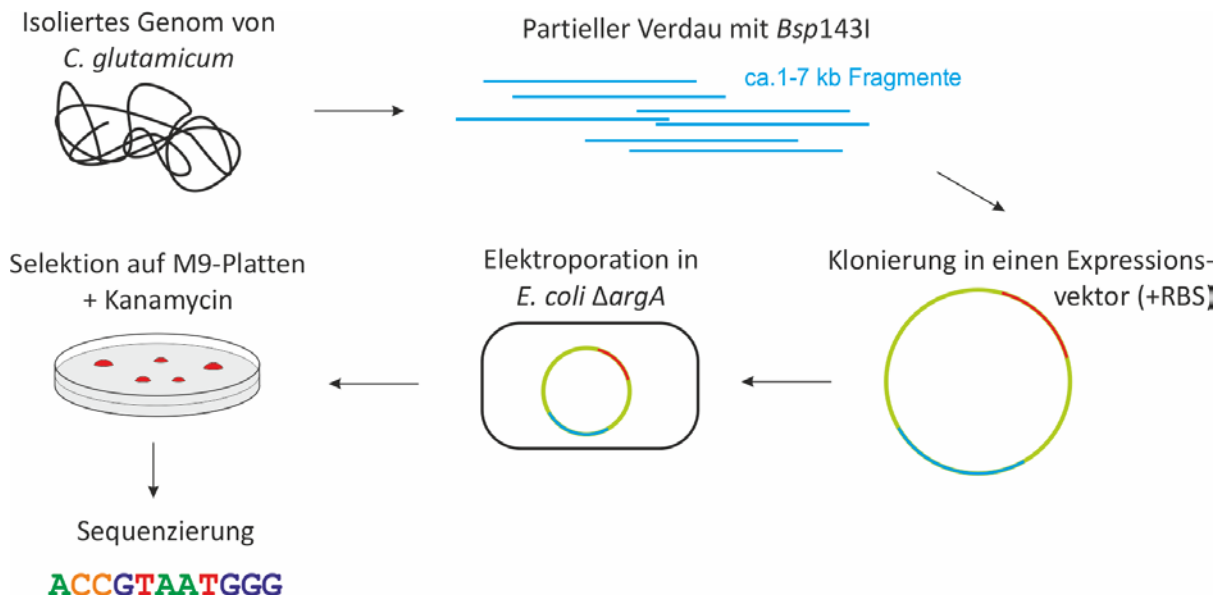


Abbildung IV.13: Schematischer Ablauf zur Auffindung eines Gens mit NAGS-Aktivität aus *C. glutamicum* ATCC 13032, welches eine *E. coli* $\Delta argA$ -Mutante komplementieren kann. Das isolierte Gesamtgenom von *C. glutamicum* wurde mittels des Restriktionsenzym *Bsp143I* fragmentiert. Die erzeugten Fragmente wurden in den modifizierten Expressionsvektor pZ8-2 kloniert, in *E. coli* $\Delta argA$ elektroporiert und selektiv auf Minimalmediumsplatten ausgestrichen. Das Insert der gewachsenen Kolonien wurde anschließend sequenziert.

Fünf Mikrogramm des isolierten Gesamtgenoms von *C. glutamicum* wurden mittels des Restriktionsenzym *Bsp143I* (*Sau3AI*) für vier Minuten bei 37 °C partiell fragmentiert. Da in diesem Schritt *sticky ends* komplementär zu einer *Bam*HI-Schnittstelle generiert wurden, war ein anschließendes Klonieren in einen Vektor möglich. Die Größe der genomischen Fragmente wurde mittels DNA High Sensitivity Chip auf dem Agilent 2100 Bioanalyzer bestimmt (Abbildung IV.14).

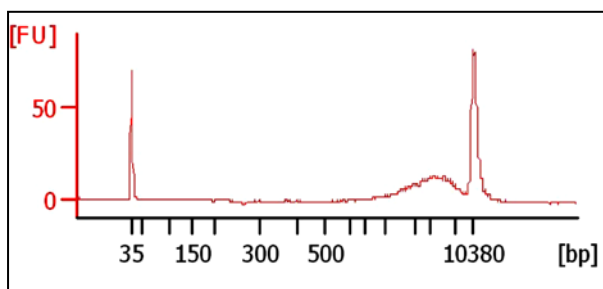


Abbildung IV.14: Elektropherogramm der partiell verdauten genomischen DNA zur Quantifizierung und Größenanalyse. 1 μ L der verdünnten Fragmente wurde mittels eines DNA High Sensitivity Chips des Agilent Bioanalyzers untersucht. Im Größenbereich von 700-9000 bp betrug die mittlere Größe der DNA 4,2 kb und sie hatte eine Konzentration von 41,75 ng/ μ L.

Anschließend wurde die Klonierung in den konstitutiven Überexpressionsvektor pZ8-2 mit einem 5-fach molaren Überschuss der Fragmente durchgeführt. Das partiell verdaute Genom und der linearisierte pZ8-2 Vektor wurden ligiert und in *E. coli* $\Delta argA$ Mutanten elektroporiert. Vor dem Ausplattieren auf die M9-Minimalmediumsplatten mit Kanamycin wurde der Transformationsansatz mit TE-Puffer gewaschen, um die komplexen Bestandteile des Regenerationsmediums, z.B. Aminosäuren, zu entfernen. Die M9-Minimalmediumsplatten wurden für 48 h bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Zeit konnte eine Kolonie auf den Platten identifiziert werden. Das Plasmid wurde isoliert und das Insert sequenziert. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein 1631 bp großes genomisches Insert von *C. glutamicum* ATCC 13032 (Kalinowski *et al.*, 2003) (Abbildung IV.15).

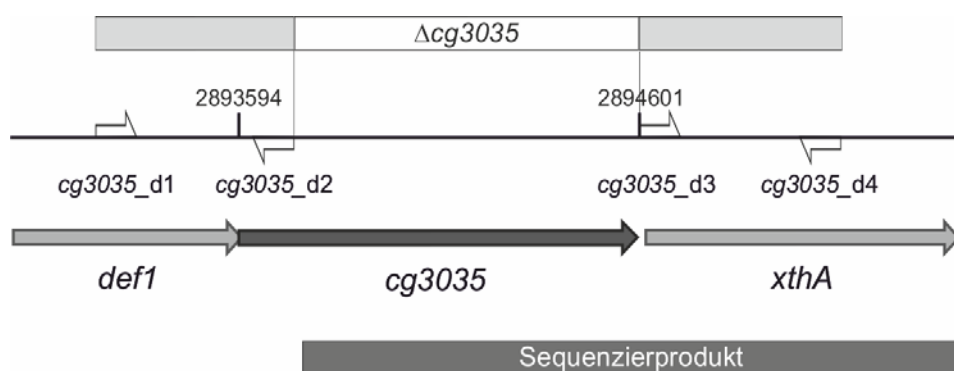


Abbildung IV.15: Genomische Karte der chromosomalen Region von *C. glutamicum*, die den durch Komplementation identifizierten *cg3035*-ORF enthält, welcher wahrscheinlich den ersten Schritt der Argininbiosynthese katalysiert. *Cg3035* ist als dunkelgrauer Pfeil dargestellt, benachbarte ORFs als hellgraue Pfeile. Die klonierte Region des Komplementationsplasmids konnte durch ein *alignment* mit dem Gesamtgenom identifiziert werden und ist als dunkelgrauer Kasten dargestellt. Die Bindestellen der für die Deletion von *cg3035* verwendeten Primer (kleine offene Halbpfeile), sowie das Deletionskonstrukt (hellgraue Kästchen), sind ebenfalls angegeben. Der deletierte Bereich ist als leere Box illustriert.

Das Insert enthält den 3' Bestandteil von *cg3035*, welches für eine putative Acetyltransferase der GCN5-Familie kodiert, sowie das komplette *xthA*-Gen (*cg3036*), kodierend für die Exodeoxyribonuklease III. Da nach einem Protein mit *N*-Acetylglutamat Synthase-Aktivität (NAGS) gesucht wurde, war *Cg3035* mit seiner GNAT (Glutamat *N*-Acetyltransferase)-Domäne ein vielversprechender Kandidat. Obwohl das DNA-Fragment nur ca. 800 bp des 1008 bp großen *cg3035*-Gens enthielt, zeigte eine Pfam Databanksuche (UniProt Eintrag Q8NM40_CORGL), dass die Acetyltransferase-Domäne dieses Proteins auf dem klonierten DNA-Fragment vorlag.

Die genomische Organisation von *cg3035* deutet auf eine Operonstruktur zusammen mit dem Gen *cg3034* hin, da die Kodierregionen der beiden Gene einen 11 bp langen Überhang aufweisen. Darüber hinaus impliziert dies eine Co-Regulation der beiden Proteine durch translationale Kopplung. *Cg3034* kodiert für *def1*, einer putativen Peptiddeformylase, welche die Formylgruppe der während

der Translation eingebauten ersten Aminosäure, *N*-Formylmethionin, wieder entfernt (Meinzel & Giglione, 2008). Das Genprodukt von *cg3035* hat eine Größe von 37,2 kDa, besitzt eine *Acetyltransf_1* (PF00583)-Domäne und gehört damit zur *N*-Acetyltransferase Superfamilie. Diese beinhalten GCN5-verwandte *N*-Acetyltransferasen (GNAT) wie Histon *N*-Acetyltransferase (HAT) Enzyme, die den Transfer einer Acetylgruppe auf das Substrat katalysieren (Marchler-Bauer *et al.*, 2009).

Suchen, die auf Sequenzähnlichkeiten basieren, wurden für die Cg3035 Proteinsequenz mittels *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Altschul *et al.*, 1997) durchgeführt. Neben einer Coenzym A-Bindetasche stromaufwärts der Acetyltransferase-Domäne, ergab diese Suche, dass orthologe Proteine von Cg3035 in vielen Vertretern der *Corynebacterineae* gefunden werden können.

Zusätzlich wurde mittels Clustal X die Sequenz von Cg3035 mit der von *E. coli* ArgA verglichen, wobei keine Ähnlichkeiten zwischen den beiden *N*-Acetyltransferasen ermittelt werden konnte. Bedingt durch dieses Ergebnis waren weitere experimentelle Validierungen der Cg3035 Proteinfunktion nötig.

3.3. Validierung der Genfunktion von *cg3035* durch heterologe Komplementation, metabolische Analyse, Enzymassays und Gendeletion

Der offene Leserahmen von *cg3035* wurde anhand des *C. glutamicum* WT-Genoms mittels PCR amplifiziert und die native ribosomale Bindestelle (RBS) wurde gegen die Konsensus-RBS von hoch exprimierten Genen (identisch zu der komplementären mRNA-Bindestelle der 16S rRNA von Amador *et al.*, 1999) ausgetauscht. Des Weiteren wurden Restriktionsschnittstellen angehängt, um eine Klonierung der DNA-Region in den konstitutiven Expressionsvektor pZ8-1 durchführen zu können. *ArgA* von *E. coli* diente als Positivkontrolle und wurde in der gleichen Weise behandelt. Die resultierenden Plasmide (pZ8-1::*argA*, pZ8-1::*cg3035*) wurden in *E. coli* Δ *argA* transformiert. Wie zu erwarten, führte die Expression von *argA* aus *E. coli* zum Wachstum der Arginin-auxotrophen Mutante auf Minimalmediumsplatten ohne L-Arginin. Ebenfalls zum Wachstums auf Minimalmedium führte *cg3035*, was dessen Fähigkeit zur Durchführung des ersten Argininbiosyntheseschrittes *in vivo* durch eine vorhandene NAGS-Aktivität belegt (Abbildung IV.16).

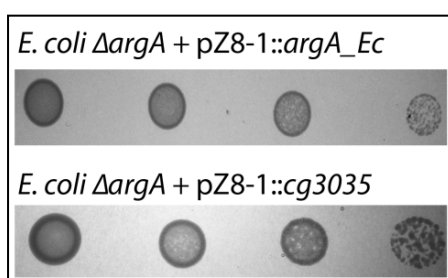


Abbildung IV.16: Tropftest auf M9-Minimalmedium mit den Komplementationen von *E. coli* JM109 Δ *argA*. Zehnfach serielle Verdünnungen wurden hergestellt und auf die Minimalmediumsplatten getropft. Für die Komplementationen wurde der konstitutive Expressionsvektor pZ8-1 verwendet, der *argA* aus *E. coli* und *cg3035* aus *C. glutamicum* enthält.

Zusätzlich wurde ein metabolisches *profiling* in *C. glutamicum* durchgeführt, um die Akkumulierung von *N*-Acetylglutamat nachzuweisen. Dazu wurden der *C. glutamicum* WT und die abgeleiteten $\Delta cg3035$ und $\Delta cg1722$ Mutanten verwendet. Die Gene *cg3035* und *cg1722* wurden zudem parallel auf dem pZ8-1 Shuttle-Expressionsvektor überexprimiert. Die Stämme *C. glutamicum* ATCC 13032 (WT), $\Delta cg3035$, $\Delta cg1722$, WT pZ8-1 (Leervektor), WT pZ8-1::*cg3035* und WT pZ8-1::*cg1722* wurden wie zuvor beschrieben kultiviert, jedoch ohne Zugabe von L-Arginin und Durchführung des Waschschritts. Nach der Metabolitextraktion wurden die Analysen mittels HPLC-ESI-qTOF im MRM-Modus (*multiple reaction mode*) durchgeführt, um die Identität der *N*-Acetylglutamat-Peaks sicherzustellen. Auf der einen Seite ergaben die Messungen einen starken Abfall (76,6 %) der normalisierten Peakfläche in der Deletionsmutante $\Delta cg3035$ im Vergleich zum Wildtyp. Auf der anderen Seite führte die Überexpression von *Cg3035* zu einem mehr als vierfachen (442%) Anstieg (Abbildung IV.17), was ein klarer Beleg für die Eignung von *Cg3035* zur Durchführung des ersten Argininbiosyntheseschrittes ist. Im Gegensatz dazu zeigte die Überexpression von *cg1722* keinen Effekt hinsichtlich des intrazellulären *N*-Acetylglutamatpools.

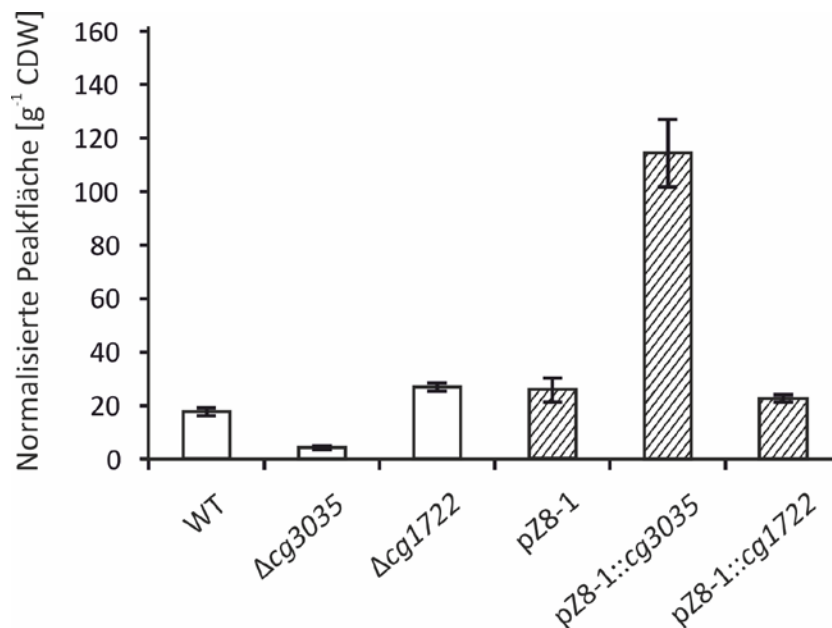


Abbildung IV.17: Normalisierte Peakflächen der intrazellulären *N*-Acetylglutamatpools in verschiedenen *C. glutamicum* Stämmen. Die hydrophilen Metabolite wurden sowohl aus *C. glutamicum* ATCC 13032 (WT), $\Delta cg3035$, $\Delta cg1722$ (weiße Säulen) als auch aus WT pZ8-1 (Leervektor), WT pZ8-1::*cg3035* und WT pZ8-1::*cg1722* (gestreifte Säulen) extrahiert. Die Peakdetektion und -integration wurde anhand der *m/z*-Werte der $[M+H]^+$ -Ionen durchgeführt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von vier biologischen Replikaten.

Da *N*-Acetylglutamat Synthasen von unterschiedlichen Spezies, sowohl in Eukaryoten als auch in Prokaryoten, einen hohen Grad an Spezifität für Acetyl-CoA und L-Glutamat als Substrate aufweisen (Errey & Blanchard, 2005), wurden zusätzlich Enzymassays mit dem kruden Proteinextrakt durchge-

führt, um die spezifische NAGS-Aktivität von Cg3035 zu messen. Nach der Gewinnung der Proteinrohextrakte wurde die NAGS-Aktivität anhand der Bildung von 5-Thio-2-Nitrobenzoat bei 412 nm spektrophotometrisch bestimmt. Um die Spezifität der NAGS-Messung zu gewährleisten, wurde in einem Vorversuch Acetyl-CoA als einziges Substrat in den Ansatz gegeben wobei keine Absorptionsänderung festgestellt werden konnte. Anschließend wurden zunächst *C. glutamicum* ATCC 13032 und die Deletionsmutante $\Delta cg3035$ mit jeweils dem leeren Expressionsvektor pZ8-1 sowie dem gentragenen Vektor pZ8-1::*cg3035* transformiert, wobei der Leervektor als Referenz diente. Die endogene spezifische NAGS-Aktivität von Cg3035 wurde berechnet, indem die jeweilige NAGS-Aktivität der Deletionsmutante von der des Wildtyps subtrahiert wurde. Dies war separat sowohl für die Stämme, die den Leervektor enthielten als auch für die Stämme mit dem überexprimierten Cg3035 möglich. Die *in vivo* spezifische NAGS-Aktivität beträgt 0,011 bzw. 0,013 U/ mg Protein. Des Weiteren korreliert die verbliebene NAGS-Aktivität mit der Aktivität, die in der Deletionsmutante mit Leervektor gemessen wurde und hat einen Wert von 0,014 U/ mg Protein (Tabelle IV.2).

Tabelle IV.2: Spezifische NAGS-Aktivitäten von *C. glutamicum* ATCC 13032 und *C. glutamicum* $\Delta cg3035$, die verschiedene Plasmide enthalten.

Stamm ^a	Plasmid	Spezifische NAGS-Aktivität [U/ mg Protein] ^b
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	pZ8-1	0,025
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	pZ8-1:: <i>argJ</i>	+ 0,000
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	pZ8-1:: <i>argA</i>	+ 0,019
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	pZ8-1:: <i>cg3035</i>	+ 0,207
<i>C. glutamicum</i> $\Delta cg3035$	pZ8-1	0,014
<i>C. glutamicum</i> $\Delta cg3035$	pZ8-1:: <i>cg3035</i>	+ 0,194

^a Die Plasmid enthaltenden Zellen wurden in CGXII Medium mit Kanamycin kultiviert. ^b Die Daten für jeden Stamm wurden auf den Leervektor normalisiert, so dass hier nur die zusätzliche NAGS-Aktivität angegeben wurde. Die Werte entsprechen dreifach Messungen, bei denen die Standardabweichung in allen Fällen unter 8% lag.

Die NAGS-Aktivität der Überexpressionsplasmide pZ8-1::*argA* und pZ8-1::*argJ* wurde im Anschluss im Wildtyp Hintergrund gemessen. Wie erwartet, besaß ArgJ keine spezifische NAGS-Aktivität, was dessen Unvermögen, eine *E. coli* $\Delta argA$ Mutante zu komplementieren, bestätigt. Jedoch hat auch das im *C. glutamicum* Wildtyp überexprimierte *E. coli* ArgA nur eine spezifische NAGS-Aktivität von 0,019 U/ mg Protein. Wird von diesem Wert noch die *in vivo* Aktivität von Cg3035 subtrahiert, reduziert sich diese auf 0,007 U/ mg Protein. Eine mögliche Erklärung für die geringe Aktivität des heterolog exprimierten Enzyms liefert jedoch die unterschiedliche *Codon Usage* und die damit verbundene tRNA Verfügbarkeit in *C. glutamicum* und *E. coli* (Spencer *et al.*, 2012).

Für eine große Anzahl von Mikroorganismen, zu denen *E. coli* (Vyas & Maas, 1963), (Haas & Leisinger, 1974), *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Abdelal & Nainan, 1979), *Pseudomonas aeruginosa* (Haas *et al.*, 1972) und *Saccharomyces cerevisiae* (Wipe & Leisinger, 1979) gehören, konnte eine starke Feedback-Inhibition der NAGS-Aktivität durch L-Arginin gefunden werden. Deshalb wurden Inhibitionstests von Cg3035 mit L-Arginin sowie dem Intermediat L-Ornithin durchgeführt. Es wurde in dem Proteinrohextrakt von *C. glutamicum* ATCC 13032 pZ8-1::cg3035 jedoch kein Unterschied in der spezifischen NAGS-Aktivität festgestellt, wenn 50 mM L-Ornithin oder L-Arginin zu dem Reaktionsansatz hinzugeben wurden.

Als nächstes wurde der Frage nachgegangen, ob Cg3035 das einzige Protein in *C. glutamicum* ist, welches eine Acetylierung von Glutamat durchführen kann. Dazu wurde das Wachstumsverhalten der Deletionsmutante $\Delta cg3035$ auf Minimalmediumsplatten ohne L-Argininsupplementation mit dem *C. glutamicum* Wildtyp verglichen (Abbildung IV.18a). Nach 48 h bei 30 °C zeigte die Mutante $\Delta cg3035$ im Vergleich zur Referenz nur geringes Wachstum auf den unsupplementierten MM1-Platten, was auf eine Bradytrophie der Mutante durch Argininlimitation hindeutet. Da das Wachstumsverhalten durch die Zugabe von 0,5 mM L-Arginin wieder prototroph wurde (Abbildung IV.18b), kann geschlossen werden, dass Cg3035 für eine vollständige Aktivität der Argininbiosynthese in *C. glutamicum* nötig aber nicht essentiell ist.

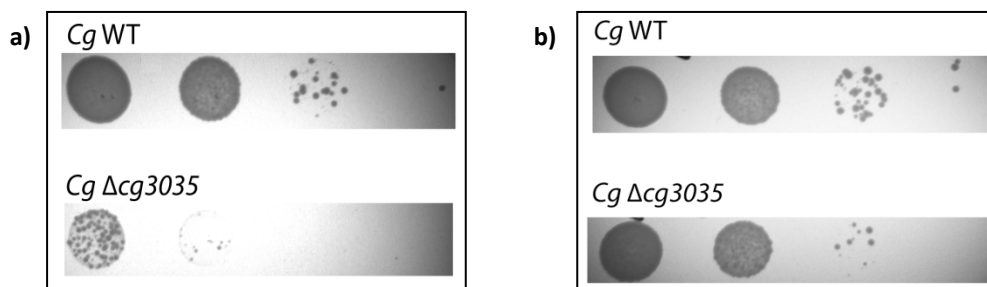


Abbildung IV.18: Tropftest auf MM1-Minimalmedium mit verschiedenen *C. glutamicum*-Stämmen. Zehnfach serielle Verdünnungen wurden hergestellt und auf die Minimalmediumsplatten getropft, beginnend mit einer $OD_{600} = 1$. Der *C. glutamicum* Wildtyp (*Cg* WT) diente hierbei als Referenz für das Wachstum der Deletionmutante *Cg* $\Delta cg3035$. a) Minimalmedium ohne L-Arginin. b) Minimalmedium mit 0,5 mM L-Arginin.

3.4. Cg3035 begründet eine neue Klasse von NAGS-Genen

Um festzustellen, wie verwandt Cg3035 mit anderen bekannten NAGS-Genen ist, wurde mittels multiplem *alignment* ein Vergleich zwischen den Proteinsequenzen von "klassischen" ArgA Proteinen,

bifunktionalen und monofunktionalen ArgJ Varianten, S-NAGS, ArgO von *Campylobacter jejuni* (Hani *et al.*, 1999) und Homologen von Cg3035 durchgeführt. Das *alignment* wurde mit DIALIGN-TX (Subramanian *et al.*, 2008) durchgeführt, der zugehörige phylogenetische Baum mittels der *Neighbor Joining*-Methode implementiert in Clustal X (Larkin *et al.*, 2007) erstellt und anschließend mit SeaView (Gouy *et al.*, 2010) visualisiert (Abbildung IV.19).

Der phylogenetische Baum zeigt fünf verschiedene NAGS- bzw. OAT (Ornithin Acetyltransferase)-Klassen. Die beiden ArgJ Proteine bilden einen eigenen Stamm, der dann weiter in mono- und bifunktionale Proteine aufgeteilt wird. Für ArgO aus *C. jejuni*, welches ehemals ArgA hieß und später durch Hani *et al.* (Hani *et al.*, 1999) umbenannt wurde, bestätigt der Baum, dass ArgO einen einzelnen Ast darstellt. Die S-NAGS Proteine sind scheinbar dem klassischen ArgA ähnlicher als es die Proteine der Cg3035 Familie sind. Interessant ist zudem, dass *Mycobacterium tuberculosis* Proteine in drei verschiedenen Gruppen zu finden sind. *M. tuberculosis* scheint sowohl ein monofunktionales ArgJ, ein S-NAGS und ein Protein mit großer Ähnlichkeit zu Cg3035 zu haben. In *C. glutamicum* ist die Situation dieselbe, da es ebenfalls ein monofunktionales ArgJ, Cg3035 und mindestens ein weiteres Protein mit NAGS-Aktivität besitzen muss. Letzteres kann aus der verbliebenen NAGS-Enzymaktivität der Deletionsmutante $\Delta cg3035$, sowie dem Wachstum dieser Deletionsmutante geschlossen werden.

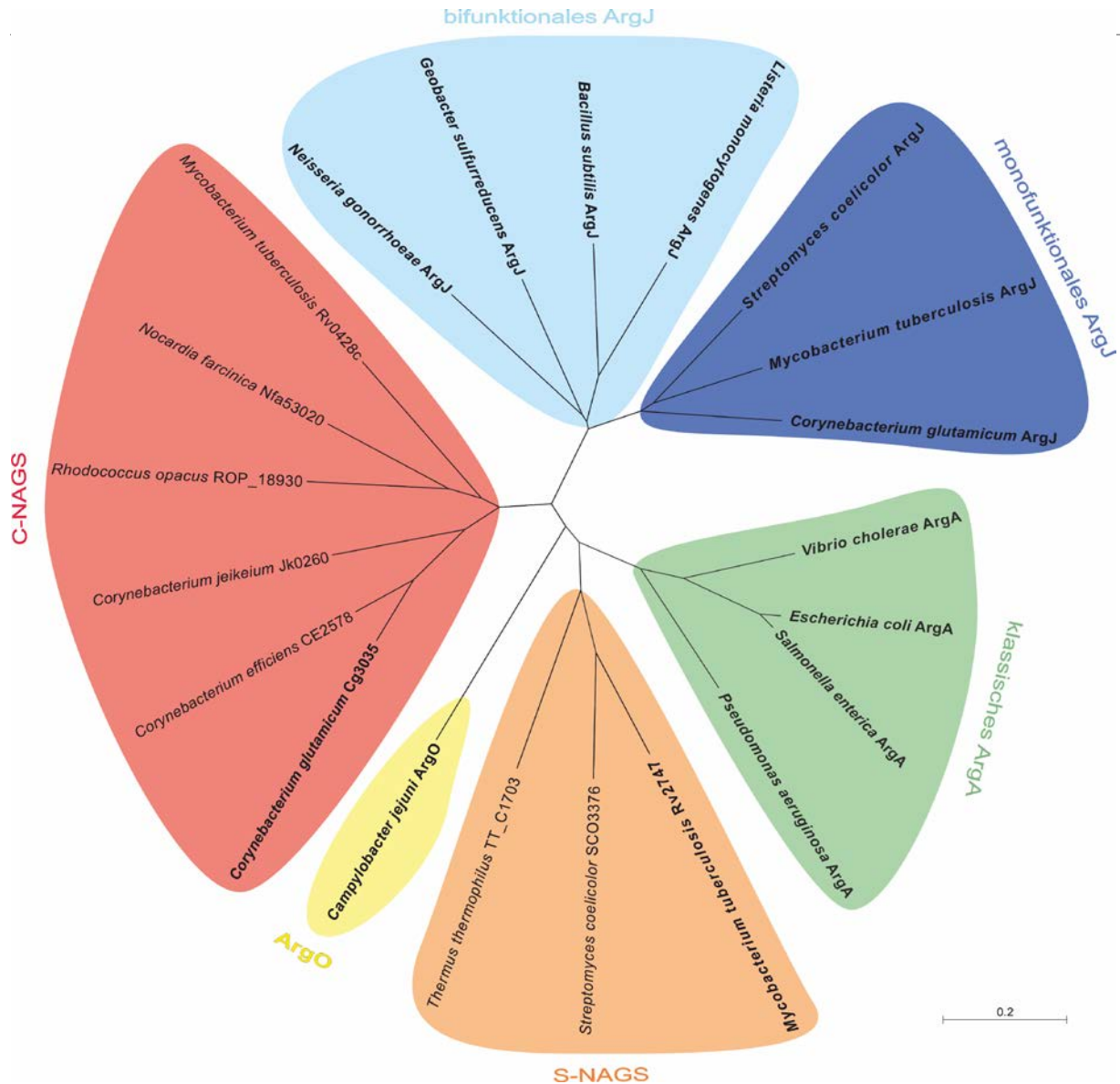


Abbildung IV.19: Phylogenetischer Baum der NAGS- und OAT-Proteinsequenzen von verschiedenen Bakterien. Der phylogenetische Baum basiert auf dem multiplen *alignment* diverser ArgA, ArgJ, S-NAGS, ArgO von *Campylobacter jejuni* und Homologen von Cg3035. Dieses multiple *alignment* wurde mittels der DIALIGN-TX Software (Subramanian *et al.*, 2008) durchgeführt und der Baum anschließend mittels des 'Neighbor Joining-Algorithmus' implementiert in Clustal X (Larkin *et al.*, 2007) kalkuliert. Die Visualisierung des phylogenetischen Baums wurde mit SeaView (Gouy *et al.*, 2010) gemacht. Ein Bootstrapping mit 1000 Iterationen bestätigte jeden Knotenpunkt in mindestens 700 davon (hier nicht gezeigt). In Fettschrift sind Stämme mit experimentell validierten Proteinen dargestellt. Die verwendeten GenBank Zugangsnummern für bifunktionale ArgJ sind: NEIG1 YP_208266, GEOSL NP_953098, BACST YP_004207137, LISML YP_005926644; für monofunktionale ArgJ: STRCH NP_733539, MYCTA NP_216169, CORGL NP_600614; für klassische ArgA: VIBCM YP_002810991, ECOW3 AAB40465, SALTY NP_461909, PSEA7 YP_001351265; für S-NAGS: MYCTA NP_217263, STRCH NP_627584, THETH AAS82045; für ArgO: CAMJS YP_005658820; für Cg3035 und Orthologe: CORGL NP_601935, COREC NP_739188, CORJE YP_250030, RHOOP YP_002779085, NOCFR YP_121518, MYCTA NP_214942.

Zusätzlich wurde das kostenlos im Internet zur Verfügung gestellte Programm GeConT II (<http://bioinfo.ibt.unam.mx/gecont/index.cgi>) benutzt (Martinez-Guerrero *et al.*, 2008), um den genomischen Kontext von Cg3035 und dessen Orthologen in vollständig sequenzierten prokaryotischen Genomen zu untersuchen (Abbildung IV.20). Wieder wurden nur Spezies der Unterordnung *Coryne-*

bacterineae gefunden, die zudem eine bemerkenswerte Konservierung der Genreihenfolge besitzen. Es gibt eine konservierte Dreier-Sequenz, bei der das erste Gen die Peptiddeformylase darstellt, die durch *def* (bzw. *def1* oder *defA*) kodiert wird, gefolgt von einem Cg3035-Ortholog und schließlich *xthA*, der Exodeoxyribonuklease III.

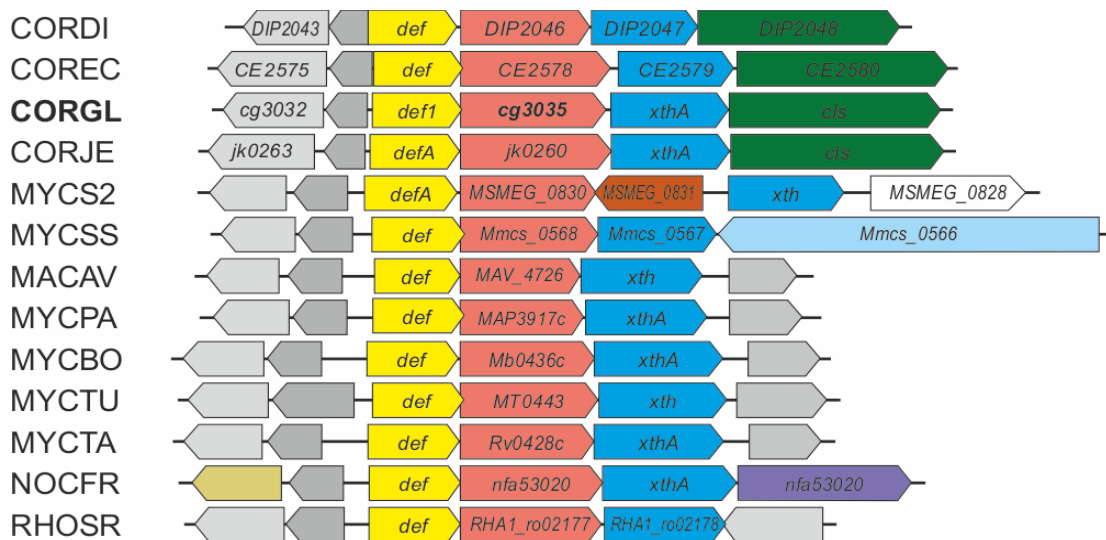


Abbildung IV.20: Genkontext von *cg3035*-Homologen in anderen Bakterien. Die Online-Software GeConT II (<http://bioinfo.ibt.unam.mx/gecont/index.cgi>) wurde verwendet, um den genetischen Kontext von *cg3035* und seinen orthologen Verwandten in anderen komplett sequenzierten bakteriellen Genomen zu untersuchen und zu visualisieren (Martinez-Guerrero *et al.*, 2008). Die Speziesnamen wurden anhand der Liste auf <http://www.expasy.ch/cgi-bin/specolist> abgekürzt.

V. Diskussion

1. Die basale Transkription des Argininbiosynthese-Operons von *Corynebacterium glutamicum* wird durch Transkriptionsinterferenz eines antisense Promotors in *argC* kontrolliert

1.1. Die transkriptionelle Organisation des Argininoperons

Eine Untersuchung zur Größenanalyse der polycistronischen mRNA des *arg*-Operons wurde zunächst mittels Northern Blots durchgeführt. Dabei wurde jedoch keine RNA-Bande detektiert, die das komplette *arg*-Operon abgedeckt und dementsprechend eine Größe von ca. 8800 nt hätte haben müssen. Da die im Folgenden diskutierten RNAseq-Daten jedoch darauf hinweisen, dass es ein durchgehendes *argCJBDFRGH*-Transkript gibt, wird dieses wahrscheinlich durch die gewählte Methode (Northern Blot) nicht nachweisbar gewesen sein oder diese mRNA ist instabil und wird daher *in vivo* recht zügig prozessiert. In jedem Fall scheint es, als ob sie nur in sehr geringen Mengen in der Zelle vorkommt. Dementsprechend gibt es viele durch Prozessierung entstandene RNA-Fragmente.

Besonders im 5' Bereich des *arg*-Operons (*argC-R*) wurden viele kleinere Banden detektiert, so dass es hier gehäuft zu Prozessierungsereignissen zu kommen scheint. Für *argC* wurde beispielweise nur ein 500 nt und ein 1000 nt großes RNA-Molekül gefunden, was darauf hindeutet, dass die Prozessierung hier besonders effektiv ist. Im 3' Bereich (*argGH*) wurde für beide Gene eine distinkte und klar definierte Bande detektiert, so dass dieses gemeinsame bicistronische Transkript eine höhere Stabilität aufzuweisen scheint. Zwar gibt es auch hier Prozessierungsfragmente, jedoch sind diese nicht so zahlreich vertreten wie im 3' Bereich des Operons.

Die Prozessierungsstellen wurden mit hoher Wahrscheinlichkeit durch Endoribonukleasen oder andere RNA-modifizierende Enzyme gespalten. Bislang ist bekannt, dass *C. glutamicum* u.a. Endoribonukleasen des Typs RNase E/G (*cg2579*), RNase III (*cg2273*) und RNase J (*cg2160*) besitzt (Martín *et al.*, 2003; Maeda & Wachi, 2012), welche die interne hydrolytische Spaltung von Phosphodiester-Bindungen in Ribonukleinsäure-Moleküle katalysieren. Einzelsträngige RNA kann sowohl von RNase E als auch von RNase J prozessiert werden (Mackie, 2012), so dass diese beiden als Kandidaten, die die synthetisierte polycistronische mRNA effektiv in kleinere Fragmente spalten können, in Frage kämen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass es bei diesem über 8800 nt langen RNA-Molekül zu internen Rückfaltungen kommt, durch die doppelsträngige RNA entsteht, welche dann z.B. durch RNase III prozessiert werden könnte. Da in der Literatur zu diesen Prozessierungsmechanismen kaum etwas

beschrieben ist, und wenn hauptsächlich monocistronische RNAs als Modelle untersucht wurden (Mackie, 2012), kann hier allerdings nur spekuliert werden.

Basierend auf den Transkriptom-Sequenzierungsdaten von *C. glutamicum* ATCC 13032, die von Pfeifer-Sancar *et al.* (Pfeifer-Sancar *et al.*, 2012) vorgelegt werden, wurde die transkriptionelle Struktur des Argininoperons analysiert. Es wurde entdeckt, dass die Transkription des *arg*-Operons (*argCJBD-FRGH*) mit einem *leaderless* translatierten *argC* beginnt, welches über ein AUG als Initiationscodon verfügt. Solchen *leaderless* Transkripten fehlt eine 5' untranslatierte *leader*-Region sowie ein ribosomales Rekrutierungssignal, stattdessen beginnt die Translation direkt am Startcodon (Moll *et al.*, 2002). In der Literatur wird vermutet, dass so eine *leaderless* Translationsinitiation die primitivste Lösung für die schwierige Startcodon-Identifizierung repräsentiert (Slupska *et al.*, 2001). Da dieser Weg der Translationsinitiation effektiv in archaebakteriellen, eukaryotischen und prokaryotischen Translationssystemen funktioniert (Nakagawa *et al.*, 2010; Grill *et al.*, 2003), wird angenommen, dass es bereits bei dem letzten gemeinsamen Vorfahren existierte. Überdies zeigt die Verteilung von *leaderless* Genen in Genomen, dass phylogenetisch nah verwandte Spezies, wie z.B. die Actinobakterien, sich ähnlich bezüglich des Vorhandenseins von *leaderless* Genen zu verhalten, sogar, wenn sie eine unterschiedliche Genomgröße und ein anderes Habitat besitzen (Zheng *et al.*, 2011). Ein Vorteil, den eine *leaderless* Translationsinitiation bietet, ist die striktere Kontrolle der Gene, so dass eine fehlerhafte Transkription der Gene, z.B. bei einer Undichtigkeit des stromaufwärts liegenden Operons (Moseley & Mattingly, 1971), nicht zu einer Translation führt (Zheng *et al.*, 2011). Aber im Gegensatz zu weiterentwickelten Maschinerien, die eine RBS oder einen *capping*-Mechanismus besitzen, ist hier keine von der Transkription unabhängige Modulation der Translation möglich (Slupska *et al.*, 2001). Da bekannt ist, dass in einer polycistronischen mRNA nur das erste Gen *leaderless* sein kann und die anderen nachfolgenden Gene eine RBS benötigen, um die Translationsinitiation zu ermöglichen (Zheng *et al.*, 2011), konnten RBSs stromaufwärts von *argB-H* identifiziert werden, als eine Suche auf der Basis des bekannten Konsensusmotivs von *C. glutamicum* durchgeführt wurde (Pfeifer-Sancar *et al.*, 2013). Es wird vermutet, dass es zuerst nur einzeln transkribierte und *leaderless* translatierte Gene gab und sich der Mechanismus der Translationsinitiation während der prokaryotischen Genomentwicklung dynamisch entwickelte. Darauf basierend wird spekuliert, dass das Auftreten von verschiedenen translationalen Initiationsmechanismen in einem Operon, also sowohl ein *leaderless* Start als auch eine RBS, durch die Co-Evolution von translationalen Initiationsignalen und den Operonstrukturen ermöglicht worden sein könnte (Londei, 2005; Zheng *et al.*, 2011).

Ein zweiter Promotor stromaufwärts von *argG*, der nicht durch ArgR beeinflusst wird, wurde bereits früher beschrieben (Hänßler *et al.*, 2007), (Yim *et al.*, 2011). Die RNAseq-Daten enthüllten eine 107 nt lange 5'-UTR *upstream* des Translationsstarts. Da das Resultat der Gesamt-Transkriptomsequenzierung eindeutig zeigt, dass es keinen transkriptionellen Abbruch stromabwärts von *argR* gibt und eine zusätzlich durchgeführte Terminatoranalyse kein Vorkommen eines solchen Elements anzeigte, scheint es, als ob *argGH* als Suboperon innerhalb des großen *argCJBDFRGH* Primäroperons transkribiert wird. Vielleicht entwickelte sich dieser zusätzliche Promotor, um unter bestimmten Bedingungen vermehrt Argininosuccinat Synthetase und Argininosuccinat Lyase, die letzten beiden Enzyme der Argininbiosynthese, bereitzustellen. So ein Bedarf könnte erforderlich sein, wenn die Zellen eine große Menge an Arginin benötigen. Hinsichtlich der Position eines bestimmten Gens in einem Operon wurde nämlich herausgefunden, dass die Genexpression in einem Operon mit steigender Entfernung vom Transkriptionsstart schwächer wird ("Transkriptionsdistanz" genannt). Dieser Mechanismus entsteht durch eine verkürzte Translationszeit für die proximalen Gene des Operons (Lim *et al.*, 2011). Für die Translation von *argGH* besagt dies, dass weniger Zeit für deren Expression vorhanden ist als z.B. für *argC*, was in einer niedrigeren Proteinkonzentration resultiert. Dementsprechend könnte die verstärkte Expression durch einen zweiten Promotor sicherstellen, dass genügend Citrullin zu Arginin metabolisiert wird. Ein anderer möglicher Zustand, bei dem eine höhere Expression von *argGH* benötigt wird, könnte auftreten, wenn sich eine große Menge an Citrullin in der Zelle angestaut hat, z.B. wenn dieses aus der Umgebung aufgenommen wurde.

Insgesamt zeigen die hier vorgestellten RNAseq-Daten, dass weitere transkriptionelle Untersuchungen nötig sind, um z.B. die Transkriptionsaktivität der beiden Promotoren zu erforschen und um festzustellen, wann die zusätzliche Expression des Suboperons *argGH* innerhalb des primären Argininoperons von *C. glutamicum* benötigt wird.

1.2. Die transkriptionelle Interferenz wird durch die ArgR-Bindung moduliert

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Transkription der neu entdeckten *antisense* RNA AsaC die *argC*-Transkription beeinflusst. Die Promotoren von *argC* und von *asaC* sind entgegengesetzt (*face-to-face*) und mit 200 nt Distanz zwischen ihnen arrangiert. Ihre Transkripte haben eine Überlappung von ungefähr 90 nt, der Größe der asRNA. Durch die Zerstörung des *antisense* Promotors und der nachfolgenden Messung der *argC*-Transkripte konnte gezeigt werden, dass die Transkription von *argC* durch die AsaC-Transkription beeinträchtigt wird. Die Überexpression von AsaC *in*

trans auf einem Vektor deckte auf, dass der Mechanismus dahinter „Transkriptionelle Interferenz“ ist (siehe Shearwin *et al.*, 2005 für einen Review). In der Natur wird dieser Mechanismus oft zur Regulation der Genexpression genutzt (Callen *et al.*, 2004). Es gibt bereits viele Beispiele für transkriptionelle Interferenz, die ein breites Organismen-Spektrum abdecken, incl. Bakteriophagen (Dodd & Egan, 2002), Prokaryoten (Wang *et al.*, 1998), Hefen (Hongay *et al.*, 2006) und Säugetieren (Martianov *et al.*, 2007). Es ereignet sich, wenn die simultane *in vivo* Aktivität von zwei konvergierenden Promotoren zu einer Repression des einen Promotors führt, so dass schließlich die Transkription des schwächeren Promotors durch die des Stärkeren *in cis* unterdrückt wird (Callen *et al.*, 2004).

Hinsichtlich der Situation hier existieren zwei unterschiedliche Zustände, die abhängig sind von der Bindung des transkriptionellen Repressors ArgR (Abbildung V.1). Sollte ArgR die ARG-Box stromaufwärts von *argC* besetzen, dann wird die RNA-Polymerase sterisch an einer Bindung gehindert und keine oder nur wenige *argC*-Transkripte werden synthetisiert. Dennoch wird es, sogar wenn ArgR aktiv ist, sicherlich eine Hintergrund-Expression von *argC* geben, so wie es z.B. vom *lac*-Operon bekannt ist (Oehler *et al.*, 1994). Nichtsdestotrotz wird in diesem Fall die RNA-Polymerasendichte stromaufwärts von *argC* niedrig sein, währenddessen ist die Dichte am gegenüberliegenden Promotor von *asaC* relativ hoch und kann dadurch die transkriptionelle Interferenz induzieren: es kommt zu einer Kollision zwischen den beiden konvergierenden Elongationskomplexen, die in der Transkriptionstermination des *argC*-Transkripts resultiert.

Der alternative Zustand tritt ein, wenn die intrazelluläre Argininkonzentration nicht ausreichend ist. Unter dieser Bedingung ist ArgR inaktiv und es kommt zu keiner Bindung im Promotorbereich von *argC* (Glansdorff & Ying, 2006). Die RNA-Polymerasen haben nun uneingeschränkten Zugriff auf den *argC*-Promotor, so dass infolgedessen die Transkription initiiert und mRNA synthetisiert wird. Zu diesem Zeitpunkt wird hier die RNA-Polymerasendichte mit großer Wahrscheinlichkeit höher sein als am *antisense* Promotor, so dass es zur Inversion der transkriptionellen Interferenz kommt. Da der *antisense* Promotor schwächer ist als der Promotor von *argC*, wird die Transkription von *AsaC* durch die Kollision der zwei RNA-Polymerasen terminiert. Jedoch ist bis jetzt noch nicht präzise untersucht worden, was exakt passiert, wenn es zu dieser Kollision kommt. Es existieren zwei Theorien: entweder reißen beide Polymerasen durch dieses Ereignis einfach ab und werden freigesetzt oder es kommt zu einem unterstützenden „Anstoß“ durch nachfolgenden Polymerasen (höchstwahrscheinlich von dem stärkeren Promotor), wodurch die andere, entgegengesetzt laufende, Polymerase entfernt wird (Shearwin *et al.*, 2005).

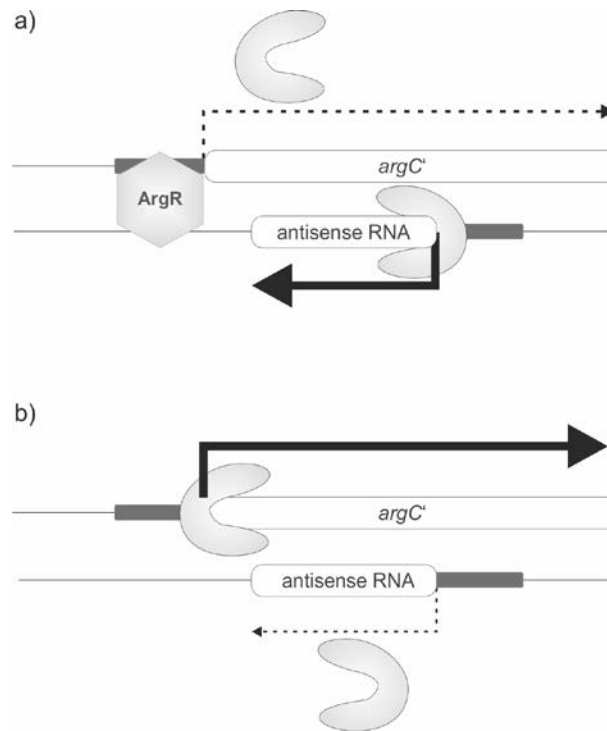


Abbildung V.1: Interaktion von ArgR-Bindung und transkriptioneller Interferenz hinsichtlich der Transkription von *argC*. Die *argC*-Kodierregion und die der *antisense* RNA sind als weiße Kästen und deren zugehörige Promotorregionen sind als dunkelgraue Kästen abgebildet. Der transkriptionelle Regulator ArgR ist als graues Hexagon dargestellt. a) ArgR bindet an die Promotorregion von *argC*. Trotzdem könnten einige *argC*-Transkripte synthetisiert werden, jedoch führt dann die Transkription von *asaC* zur Transkriptionsinterferenz, wodurch die *argC* RNA-Polymerase abgelöst wird. b) Hier kommt es zu keiner Bindung von ArgR an die ARG-Box. Der starke aktive Promotor von *argC* hat eine hohe RNA-Polymerasendichte, die nun umgekehrt eine Transkriptionsinterferenz hervorruft, bei der die RNA-Polymerase von *asaC* abfällt und dadurch die *antisense* Transkription reduziert wird.

Da die transkriptionelle Interferenz vielmehr mittels des Transkriptionsprozesses selbst als über die transkribierte Sequenz agiert (Mazo *et al.*, 2007), ist ein Mechanismus zur Minimierung der RNA-RNA Hybridisierung zu erwarten. Und tatsächlich weist *AsaC* eine sehr stabile Sekundärstruktur auf. Dies impliziert eine hohe Affinität zur Rückfaltung, was eine intermolekulare Interaktion mit der komplementären Region von *argC* möglicherweise verhindert. Deshalb ist nur der *cis*-Effekt, die transkriptionelle Interferenz, von biologischer Relevanz während *AsaC* als Nebenprodukt angesehen werden kann.

1.3. Die *antisense* RNA führt zu einer transkriptionellen Rauschunterdrückung der Argininbiosynthese

Mit dem Wissen um den Wirkmechanismus von AsaC kam die Frage auf, warum diese zusätzliche transkriptionelle Regulation auftritt. Die bereits vorher bekannte Regulation durch ArgR erscheint als ausreichende Kontrolle der Transkription des *leaderless* Transkripts *argCJBDFRGH*. Jedoch kann es, sogar wenn es durch einen starken Repressor kontrolliert wird, zu einer zufälligen Transkriptionsinitiation kommen, wenn die RNA-Polymerase sporadisch Zugang zur Promotorregion erhält. Der Grad dieses „transkriptionellen Rauschens“ (Paulsson, 2004) hängt von mehreren Faktoren ab, wie der lokalen Repressorkonzentration, der Spezifität der Protein–DNA-Erkennung und der Bindungsaffinität (Daber & Lewis, 2009; Becker *et al.*, 2012).

Aufgrund der hohen Energiekosten, die mit der Transkription, Translation und Prozessierung (Elledge & Davis, 1989) von mindestens sechs Genen (*argCJBDFR*), gefolgt von der ATP- und NADH-konsumierenden Argininbiosynthese (Sakanyan *et al.*, 1996) verbunden sind, ist es sinnvoll, die Kontrolle direkt auf dem Level der Transkription und für das erste Gen anzuwenden. Durch Verwendung der *antisense* Transkription als zweite negative Regulation kann die Höhe der *sense* Transkription des kompletten Argininoperons während der ArgR vermittelten Repression weiter durch die frühzeitige Termination der wenigen synthetisierten *argC* mRNAs reduziert werden. Dadurch werden letztendlich zelluläre Ressourcen und Energie eingespart.

Im Großen und Ganzen dient die neu entdeckte asRNA gegenüber von *argC*, AsaC, also als zusätzliche transkriptionelle Kontrolle, die die Transkription von *argC* beeinflusst und durch diese gleichzeitig auch beeinflusst wird. Dieses reziproke Zusammenspiel war auch in verschiedenen anderen RNAseq Bibliotheken sichtbar – entweder hatten die *argC*-Transkripte oder die der asRNA eine höhere Abundanz.

Obwohl die asRNA für die Argininbiosynthese ein wichtiges Element zur transkriptionellen Rauschunterdrückung ist, welches die negative Repression durch ArgR intensiviert, wird sie bedeutungslos, wenn *argR* zerstört wird, da die transkriptionelle Interferenz dann invertiert wird. Deshalb ist AsaC nicht das dominierende regulatorische Prinzip, sondern ein zusätzliches transkriptionelles Element zur Unterdrückung von transkriptionellem Rauschen.

2. Eine neue Variante von *N*-Acetylglutamat Synthase ist für den ersten Schritt der Argininbiosynthese in *Corynebacterium glutamicum* verantwortlich

2.1. Durch die Poolanalysen der intrazellulären Argininintermediate werden neue Einblicke in die Argininbiosynthese erhalten

In den hier beschriebenen Experimenten wurde ein systematischer Versuchsansatz mit definierten Deletionsmutanten von *C. glutamicum* durchgeführt, die intrazelluläre Argininmetabolite anstauen sollten, um diese dann relativ quantifizieren zu können. Sechs von sieben Intermediaten der Argininbiosynthese wurden mit der hier angewendeten HPLC-ESI-qTOF Methode gefunden, und die Resultate gaben neue Einblicke in die Argininbiosynthese. Interessant dabei ist, dass zwei Metabolite jeweils in zwei verschiedenen Mutanten detektiert werden konnten – *N*-Acetylnithin wurde in den Mutanten $\Delta argRJ$ und $\Delta argRF$ gefunden und Citrullin in $\Delta argRG$ und $\Delta argRH$. In beiden Fällen ist nicht nur eine Akkumulation in der Mutante mit einem Defekt in der folgenden metabolischen Reaktion, sondern auch in dem Stamm mit einer Hemmung in der Reaktion dahinter. Dies könnte auf einen Rückstau der akkumulierten Metabolite zu ihrem jeweiligen Vorprodukt hindeuten.

Desweiteren wurde *N*-Acetylnithin in dem Stamm $\Delta argRJ$ angestaut, was die erwartete Rolle von ArgJ, nämlich die Funktion als Ornithin Acetyltransferase (OAT,) bestätigt. Die Messungen des intrazellulären *N*-Acetylglutamats bekräftigen diese Aussage, da auch hier ein stark verringerter Pool in der $\Delta argRJ$ Mutante detektiert wurde. Für Organismen, wie *C. glutamicum*, die einen zyklischen Argininbiosyntheseweg haben, weist dieser Rückgang generell auf eine Präferenz für die Transacetylierung durch ArgJ hin, die im Gegensatz zu der weniger ökonomischen ArgA Aktivität zur Erzeugung von *N*-Acetylglutamat bevorzugt wird (Sakanyan *et al.*, 1996).

Da in den Mutanten vor ArgJ, also die, die normalerweise den zweiten bis vierten Schritt katalysieren, keine Transacetylierung vorkommen sollte, ist das Verhalten der $\Delta argRD$ Mutante, die ebenfalls einen geringen intrazellulären *N*-Acetylglutamat Pool aufweist, einfach zu erklären. Überraschend ist jedoch, dass in der $\Delta argRC$ Mutante der *N*-Acetylglutamat Pool ähnlich zu dem in der $\Delta argRB$ Mutante und dem Wildtyp ist. In $\Delta argRB$ kann diese Akkumulation des *N*-Acetylglutamats mit der Unterbrechung der Biosynthese erklärt werden. Die unerwartet hohe Poolgröße in $\Delta argRC$ kann entweder dadurch erklärt werden, dass das Gleichgewicht der durch ArgB katalysierten Reaktion auf der Seite

des *N*-Acetylglutamats liegt, oder durch eine mögliche Instabilität des phosphorylierten *N*-Acetylglutamats und dessen Zerfall zu *N*-Acetylglutamat. Im Wildtyp ist wahrscheinlich die *feedback* Inhibition von ArgB für die Akkumulation des *N*-Acetylglutamats verantwortlich.

2.2. Die putative *N*-Acetylglutamat Synthase Cg1722 ist weder in die Argininbiosynthese involviert noch besitzt sie NAGS-Enzymaktivität

In 2010 publizierten Hwang und Cho die Identifizierung eines *open reading frames* (ORF), der NAGS Aktivität besitzt und welcher in der Lage war, die Arginin-auxotrophe *C. glutamicum* $\Delta argJ$ Mutante zu komplementieren. Die Enzymassays, die mit dem überexprimierten Cg1722 (NCgl1469) durchgeführt wurden, zeigten allerdings nur eine sehr niedrige spezifische NAGS Aktivität (Hwang & Cho, 2010). Die Ergebnisse wurden dennoch so interpretiert, dass sie die gedeutete NAGS Funktion von Cg1722 unterstützten.

Cg1722 war hier Gegenstand weitere Untersuchungen auf dem genetischen und metabolischen Level. Eine Deletion von *cg1722* bewirkte keinen Wachstumsphänotyp auf Minimalmedium und bei einem Komplementationsexperiment mit *E. coli* $\Delta argA$ konnte *cg1722* keine Komplementation durchführen. Desweiteren zeigten weder der intrazelluläre Pool der $\Delta cg1722$ Mutante noch der des Überexpressionskonstrukts eine Veränderung in den *N*-Acetylglutamat Pools, als dieser mit dem des Wildtyps verglichen wurde. Dies war nicht überraschend, da Hwang und Cho mit dem *argJ* Gen den fünften und nicht ersten Schritt der Argininbiosynthese deletierten. Daher kann dies nur so interpretiert werden, als dass Cg1722 zwar möglicherweise in der Lage ist, die fehlende OAT Funktion zu komplementieren, jedoch hat es keine NAGS Aktivität in *C. glutamicum*.

2.3. Cg3035 – Eine neue Art von *N*-Acetylglutamat Synthase

Das Protein welches durch *cg3035* kodiert wird, wurde mit bekannten NAGS Enzymklassen verglichen. Vier verschiedene Arten von NAGS Enzymfamilien wurden bislang beschrieben (Glansdorff & Ying, 2006), allerdings passt Cg3035 in keine von diesen. Anders als die klassische *N*-Acetylglutamat Synthase, die z.B. in *E. coli* gefunden wurde, hat es nur eine einzige Proteindomäne und ist außerdem mit 335 Aminosäuren kürzer als dieses, aber immer noch größer als das 150-180 Aminosäuren lange *S*-NAGS aus z.B. *M. tuberculosis*.

Durch Alignments der unterschiedlichen NAGS Varianten konnte diese Hypothese bestätigt werden. Dazu wurde die evolutionäre Verwandtschaft zwischen "klassischen" ArgAs, mono- und bifunktionalen ArgJs, S-NAGS, ArgO von *C. jejuni* und Cg3035 inklusive seinen Homologen in anderen Spezies in einem phylogenetischen Baum arrangiert. Dieser Ansatz zeigte deutlich, dass jeder NAGS Typ in einem eigenen Zweig zusammengefasst wird und dass diese Zweige deutlich voneinander getrennt sind.

Homologe des Cg3035 Protein wurden sowohl in anderen Corynebakterien als auch in diversen Mitgliedern der Untergruppe der *Corynebacterineae*, wie *Rhodococcus* spp., *Nocardia* spp. oder *Mycobacterium* spp. gefunden. Die Analyse des genomischen Zusammenhangs wies in den komplett sequenzierten Genomen dieser bakteriellen Untergruppe auf ein konserviertes Arrangement von drei Genen hin, und zwar der Peptiddeformylase, gefolgt von der *N*-Acetylglutamat Synthase und der Exodeoxyribonuklease III. Obwohl keine funktionale Beziehung dieser Gene ersichtlich ist, verstärkt dieser konservierte genomische Kontext die Ansicht, dass Cg3035 und seine eng verwandten Sequenzen in den anderen Spezies der *Corynebacterineae* wirkliche Orthologe darstellen (Martinez-Guerrero *et al.*, 2008).

Es ist unklar, welches die evolutionären Antriebskräfte waren, durch die die verschiedenen NAGS Proteinfamilien erzeugt wurden. Diese Unterschiedlichkeit wurde bereits vorher festgestellt und einer unabhängigen Evolution bzw. einer schnelleren Evolution zugeschrieben, durch die die NAGS Gene eine höhere Divergenz aufweisen als andere Argininbiosynthese-Proteine (Caldovic & Tuchman, 2003).

Da das Wachstumsverhalten der $\Delta cg3035$ Mutante auf Minimalmedium nur eine Bradytrophie erkennen ließ, deutete dies darauf hin, dass mindestens ein weiteres Enzym ebenfalls in der Lage ist, die Acetylierung des Glutamats in *C. glutamicum* ATCC 13032 durchzuführen. Kandidaten hierfür sind Proteine mit Acetyltransferase-Domäne, von deren Genen es in *C. glutamicum* insgesamt noch acht putative Paraloge gibt, nämlich *cg0627*, *cg0659*, *cg0686*, *cg1393*, *cg1893*, *cg2382*, *cg2605* bzw. *cg2835*. Bislang wurde allerdings noch keines dieser Gene näher charakterisiert.

Die hier durchgeführten Experimente konnten sowohl auf dem genetischen und dem enzymatischen, wie auch auf dem metabolomischen Level demonstrieren, dass Cg3035 die Fähigkeit besitzt, als NAGS zu agieren und somit Acetyl-CoA für die Acetylierung des Glutamats zu nutzen. Diese Entdeckungen tragen signifikant zu dem Wissen über den Argininmetabolismus in *C. glutamicum* bei. Das

NAGS-Enzym Cg3035 begründet eine neue Klasse von *N*-Acetylglutamat Synthasen, deren Orthologe exklusiv in Vertretern der Untergruppe *Corynebacterineae* gefunden werden. Deshalb wird vorgeschlagen, diese neue NAGS-Klasse, die durch Cg3035 und seine offensichtlich Orthologen in C-NAGS (*Corynebacterineae*-Typ NAGS) umzubenennen. Da dies nur ein Vorschlag ist, wäre es für kommende Studien interessant, zu untersuchen, ob die anderen Kandidaten funktional sind und dieselbe Reaktion ausführen können.

3. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Argininbiosynthese von *C. glutamicum* ein neuer transkriptioneller Regulationsmechanismus entdeckt sowie das Gen identifiziert und charakterisiert, welches den ersten Schritt der Argininbiosynthese katalysiert.

Für die Entdeckung der *antisense* RNA lieferten insbesondere die RNAseq-Daten einen großen Beitrag. Da dabei für insgesamt über 900 Gene von *C. glutamicum antisense* Transkription festgestellt werden konnte, wird es zukünftig sinnvoll sein, den Regulations- und Wirkmechanismus weiterer asRNAs von interessanten Kandidatengenomen experimentell zu untersuchen. Die hier vorliegende Arbeit kann dabei gewissermaßen als Anleitung genutzt werden, um die Analysen zielgerichtet aufzubauen. In den meisten Fällen wird es unerlässlich sein, die Promotorregion der asRNA zu mutieren, um die Aktivität des *sense* Gens zu gewährleisten und gleichzeitig die Transkriptmenge der asRNA für weitere Aufklärungen zu reduzieren. Interessant wäre dabei auch eine zusätzliche Untersuchung, wie sich die Promotoraktivität der asRNA unter verschiedenen Bedingungen verändert, z.B. bei Stress. Generell werden diese Forschungen das Wissen über das komplexe transkriptionelle Regulationsnetzwerk erweitern und das Verständnis des Metabolismus dieses Organismus verbessern. Auf dieser Grundlage können dann u.a. bessere rational erzeugte Produktionsstämme generiert werden.

Für die Konstruktion von Argininproduzenten auf Basis von *C. glutamicum* ist die Identifizierung von Cg3035, welches die Acetylierung des Glutamats durchführen kann, ebenfalls von großer Bedeutung. Da bislang unbekannt war, welches Gen für den ersten Schritt verantwortlich ist, können nun Experimente mit konstitutiv bzw. induziert überexprimiertem NAGS durchgeführt werden, um zu testen, ob dies einen positiven Einfluss auf die Produktausbeute hat. Neben Arginin können über diesen Biosyntheseweg viele wirtschaftlich interessante Produkte synthetisiert werden, wie z.B. die beiden Aminosäuren Citrullin und Ornithin, aber auch z.B. mittels heterologer Genexpression Putrescin, Spermidin oder Kreatin, so dass die erzeugten Produkte vielfach industriell genutzt werden können. Überdies gibt es jedoch auch noch viele offene Fragen, die näherer Analyse bedürfen. Zum Beispiel ist nicht geklärt, warum es das Suboperon *argGH*, das hier aufgezeigt werden konnte, gibt und wie dieses reguliert wird. Detaillierte Untersuchungen der 5' UTR von *argG* sollten zukünftig durchgeführt werden, um zu erforschen, ob regulatorische Proteine an diese Region binden und die mRNA-Stabilität bzw. die Translation beeinflussen oder es sich hierbei z.B. um einen Riboswitch handelt. Die daraus gewonnen Erkenntnisse werden unter Umständen ebenfalls der Stammentwicklung dienlich sein können.

VI. Literaturverzeichnis

- Abdelal, A. & Nainan, O.** (1979): Regulation of *N*-acetylglutamate synthesis in *Salmonella typhimurium*. In: *J. Bacteriol.* **137** (2), pp. 1040–1042.
- Ajinomoto** (2011): *Fact sheet: Feed-Use Amino Acids Business*. <http://www1.aminovital.com/en/ir/pdf/Feed-useAA-Oct2011.pdf>
- Ajinomoto** (2012): *Fact sheet: Food Products Business*. <http://www1.aminovital.com/en/ir/pdf/Food-Oct2012.pdf>
- Alon, U.** (2007): Network motifs: theory and experimental approaches. In: *Nature reviews. Genetics* **8** (6), pp. 450–461.
- Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schäffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W. & Lipman, D. J.** (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. In: *Nucleic acids research* **25** (17), pp. 3389–3402.
- Altuvia, S.** (2007): Identification of bacterial small non-coding RNAs: experimental approaches. In: *Curr. Opin. Microbiol.* **10** (3), pp. 257–261.
- Álvares, T. S.; Meirelles, C. M.; Bhambhani, Y. N.; Paschoalin, V. M. & Gomes, P. S.** (2011): L-Arginine as a Potential Ergogenic Aid in Healthy Subjects. In: *Sports Medicine* **41** (3), pp. 233–248.
- Amador, E.; Castro, J.; Correia, A. & Martin, J.** (1999): Structure and organization of the *rrnD* operon of '*Brevibacterium lactofermentum*': analysis of the 16S rRNA gene. In: *Microbiology* **145** (4), pp. 915–924.
- Appleton, J.** (2002): Arginine: Clinical potential of a semi-essential amino. In: *Alternative medicine review a journal of clinical therapeutic* **7** (6), pp. 512–522.
- Banerjee, S.; Chalissery, J.; Bandey, I. & Sen, R.** (2006): Rho-dependent transcription termination: more questions than answers. In: *Journal of microbiology (Seoul, Korea)* **44** (1), pp. 11–22.
- Bansal-Mutalik, R. & Nikaido, H.** (2011): Quantitative lipid composition of cell envelopes of *Corynebacterium glutamicum* elucidated through reverse micelle extraction. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108** (37), pp. 15360–15365.
- Bardonnnet, N. & Blanco, C.** (1991): Improved vectors for transcriptional signal screening in corynebacteria. In: *FEMS microbiology letters* **68** (1), pp. 97–102.
- Barsch, A.; Patschkowski, T. & Niehaus, K.** (2004): Comprehensive metabolite profiling of *Sinorhizobium meliloti* using gas chromatography-mass spectrometry. In: *Funct. Integr. Genomics* **4** (4), pp. 219–230.
- Becker, N. A.; Peters, J. P. & Maher, L. J.** (2012): Mechanism of promoter repression by Lac repressor-DNA loops. In: *Nucleic Acids Research* **41** (1), pp. 156–166.
- Beligni, M. V. & Lamattina, L.** (2001): Nitric oxide in plants: the history is just beginning. In: *Plant, Cell and Environment* **24** (3), pp. 267–278.
- Birnboim, H. & Doly, J.** (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. In: *Nucleic Acids Res.* **7** (6), pp. 1513–1523.

- Brennan, P. J. & Nikaido, H.** (1995): The Envelope of Mycobacteria. In: *Annual Review of Biochemistry* **64** (1), pp. 29–63.
- Brinkrolf, K.; Brune, I. & Tauch, A.** (2007): The transcriptional regulatory network of the amino acid producer *Corynebacterium glutamicum*. In: *Journal of biotechnology* **129** (2), pp. 191–211.
- Browning, D. F. & Busby, S. J.** (2004): The regulation of bacterial transcription initiation. In: *Nature reviews. Microbiology* **2** (1), pp. 57–65.
- Brune, I.; Brinkrolf, K.; Kalinowski, J.; Pühler, A. & Tauch, A.** (2005): The individual and common repertoire of DNA-binding transcriptional regulators of *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium efficiens*, *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium jeikeium* deduced from the complete genome sequences. In: *BMC Genomics* **6** (1), p. 86.
- Busche, T.; Šilar, R.; Pičmanová, M.; Pátek, M. & Kalinowski, J.** (2012): Transcriptional regulation of the operon encoding stress-responsive ECF sigma factor SigH and its anti-sigma factor RshA, and control of its regulatory network in *Corynebacterium glutamicum*. In: *BMC Genomics* **13** (1), p. 445.
- Cadenas, R. F.; Martín, J. F. & Gil, J. A.** (1991): Construction and characterization of promoter-probe vectors for Corynebacteria using the kanamycin-resistance reporter gene. In: *Gene* **98** (1), pp. 117–121.
- Caldovic, L. & Tuchman, M.** (2003): N-Acetylglutamate and its changing role through evolution. In: *Biochemical Journal* **372** (2), p. 279.
- Callen, B. P.; Shearwin, K. E. & Egan, J.** (2004): Transcriptional Interference between Convergent Promoters Caused by Elongation over the Promoter. In: *Molecular Cell* **14** (5), pp. 647–656.
- Charlier, D.** (2004): Arginine regulation in *Thermotoga neapolitana* and *Thermotoga maritima*. In: *Biochemical Society transactions* **32** (2), pp. 310–313.
- Charlier, G. & Glansdorff, N.** (2004): Biosynthesis of Arginine and Polyamines. In: *R. Curtiss III et al. (Hrsg.), EcoSal—Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, Module 3.6.1.10, American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Chen, G.-Q.** (2012): New challenges and opportunities for industrial biotechnology. In: *Microbial Cell Factories* **11** (1), p. 111.
- Cherney, L. T.; Cherney, M. M.; Garen, C. R.; Lu, G. J. & James, M. N. G.** (2008): Structure of the C-terminal domain of the arginine repressor protein from *Mycobacterium tuberculosis*. In: *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* **64** (9), pp. 950–956.
- Collado-Vides, J.; Magasanik, B. & Gralla, J. D.** (1991): Control site location and transcriptional regulation in *Escherichia coli*. In: *Microbiological reviews* **55** (3), pp. 371–394.
- Cox, M. M.** (1998): A broadening view of recombinational DNA repair in bacteria. In: *Genes to Cells* **3** (2), pp. 65–78.
- Cunin, R.; Glansdorff, N.; Piérard, A. & Stalon, V.** (1986): Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. In: *Microbiological reviews* **50** (3), pp. 314–352.
- Daber, R. & Lewis, M.** (2009): Towards evolving a better repressor. In: *Protein Engineering Design and Selection* **22** (11), pp. 673–683.

- Decréau, R. A.; Marson, C. M.; Smith, K. E. & Behan, J. M.** (2003): Production of malodorous steroids from androsta-5,16-dienes and androsta-4,16-dienes by Corynebacteria and other human axillary bacteria. In: *Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **87** (4-5), pp. 327–336.
- Delage, B.; Fennell, D. A.; Nicholson, L.; McNeish, I.; Lemoine, N. R.; Crook, T. & Szlosarek, P. W.** (2010): Arginine deprivation and argininosuccinate synthetase expression in the treatment of cancer. In: *Int. Journal of Cancer*, **126** (12), pp. 2762–2772
- Ding, Y.** (2005): RNA secondary structure prediction by centroids in a Boltzmann weighted ensemble. In: *RNA* **11** (8), pp. 1157–1166.
- Dodd, I. B. & Egan, J. B.** (2002): Action at a distance in CI repressor regulation of the bacteriophage 186 genetic switch. In: *Molecular microbiology* **45** (3), pp. 697–710.
- Dondrup, M.; Albaum, S.; Griebel, T.; Henckel, K.; Jünemann, S.; Kahlke, T.; Kleindt, C. K.; Küster, H.; Linke, B.; Mertens, D.; Mittard-Runte, V.; Neuweiger, H.; Runte, K. J.; Tauch, A.; Tille, F.; Pühler, A. & Goesmann, A.** (2009): EMMA 2 – A MAGE-compliant system for the collaborative analysis and integration of microarray data. In: *BMC Bioinformatics* **10** (1), p. 50.
- Dong, F.; Spott, S.; Zimmermann, O.; Kisters-Woike, B.; Müller-Hill, B. & Barker, A.** (1999): Dimerisation mutants of Lac repressor. I. A monomeric mutant, L251A, that binds Lac operator DNA as a dimer. In: *Journal of molecular biology* **290** (3), pp. 653–666.
- Dusch, N.; Pühler, A. & Kalinowski, J.** (1999): Expression of the *Corynebacterium glutamicum panD* gene encoding L-aspartate-alpha-decarboxylase leads to pantothenate overproduction in *Escherichia coli*. In: *Appl. Environ. Microbiol.* **65** (4), pp. 1530–1539.
- Eggeling, L. & Sahm, H.** (2001): The cell wall barrier of *Corynebacterium glutamicum* and amino acid efflux. In: *Journal of Bioscience and Bioengineering* **92** (3), pp. 201–213.
- Eikmanns, B. J.; Kleinertz, E.; Liebl, W. & Sahm, H.** (1991): A family of *Corynebacterium glutamicum/Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing. In: *Gene* **102** (1), pp. 93–98.
- Elledge, S. J. & Davis, R. W.** (1989): Position and density effects on repression by stationary and mobile DNA-binding proteins. In: *Genes and development* **3** (2), pp. 185–197.
- Errey, J. & Blanchard, J.** (2005): Functional Characterization of a Novel ArgA from *Mycobacterium tuberculosis*. In: *Journal of Bacteriology* **187** (9), pp. 3039–3044.
- Floriano, B.; Herrero, A. & Flores, E.** (1994): Analysis of expression of the *argC* and *argD* genes in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. In: *Journal of bacteriology* **176** (20), pp. 6397–6401.
- Frank, S.; Klockgether, J.; Hagendorf, P.; Geffers, R.; Schöck, U.; Pohl, T.; Davenport, C. F. & Tümmler, B.** (2011): *Pseudomonas putida* KT2440 genome update by cDNA sequencing and microarray transcriptomics. In: *Environmental microbiology* **13** (5), pp. 1309–1326.
- Fuhrer, T.; Heer, D.; Begemann, B. & Zamboni, N.** (2011): High-throughput, accurate mass metabolome profiling of cellular extracts by flow injection-time-of-flight mass spectrometry. In: *Anal. Chem.* **83** (18), pp. 7074–7080.
- Georg, J. & Hess, W. R.** (2011): *cis*-Antisense RNA, Another Level of Gene Regulation in Bacteria. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **75** (2), pp. 286–300.

- Ghochikyan, A.; Karaivanova, I. M.; Lecocq, M.; Vusio, P.; Arnaud, M.-C.; Snapyan, M.; Weigel, P.; Guével, L.; Buckle, M. & Sakanyan, V.** (2002): Arginine operator binding by heterologous and chimeric ArgR repressors from *Escherichia coli* and *Bacillus stearothermophilus*. In: *Journal of bacteriology* **184** (23), pp. 6602–6614.
- Glansdorff, N. & Ying, X.** (2006): Microbial Arginine Biosynthesis: Pathway, Regulation and Industrial Production. In: V. F. Wendisch (ed.), *Amino acid biosynthesis: pathways, regulation and metabolic engineering*. Microbiology monographs, vol. 5, Springer Verlag, Berlin, pp. 219–257.
- Goodfellow, M.; Whitman, W.B.; Kämpfer, P.; Busse, H.-J.; Ludwig, W.; Trujillo, M. E. & Suzuki, K.** (2012): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: *Volume 5: The Actinobacteria*, 2nd edition, Springer Verlag, New York.
- Gouy, M.; Guindon, S. & Gascuel, O.** (2010): SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building. In: *Molecular Biology and Evolution* **27** (2), pp. 221–224.
- Grandori, R.; Lavoie, T. A.; Pflumm, M.; Tian, G.; Niersbach, H.; Maas, W. K.; Fairman, R. & Carey, J.** (1995): The DNA-binding domain of the hexameric arginine repressor. In: *Journal of molecular biology* **254** (2), pp. 150–162.
- Grill, S.; Gualerzi, C.; Londei, P. & Bläsi, U.** (2000): Selective stimulation of translation of leaderless mRNA by initiation factor 2: evolutionary implications for translation. In: *EMBO J.* **19** (15), pp. 4101–4110.
- Haas, D.; Kurer, V. & Leisinger, T.** (1972): *N*-acetylglutamate synthetase of *Pseudomonas aeruginosa*. An assay *in vitro* and feedback inhibition by arginine. In: *Eur. J. Biochem.* **31** (2), pp. 290–295.
- Haas, D. & Leisinger, T.** (1974): *In vitro* assay and some properties of *N*-acetylglutamate synthetase from *Escherichia coli*. In: *Pathol Microbiol (Basel)* **40** (3), pp. 140–141.
- Haas, D.; Holloway, B. W.; Schamböck, A. & Leisinger, T.** (1977): The genetic organization of arginine biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Molecular and general genetics* **154** (1), pp. 7–22.
- Haasner, K.** (2009): Rationale Stammentwicklung zur Konstruktion von Aminosäure-Produzenten auf Basis von *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. Masterarbeit an der Universität Bielefeld, CeBiTec.
- Haasner, K.; Walter, F.; Persicke, M. & Kalinowski, J.** (2013): A novel type of *N*-acetylglutamate synthase is responsible for the first step of arginine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. In: *BMC Genomics*, submitted
- Hanahan, D.** (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. In: *J. Mol. Biol.* **166** (4), pp. 557–580.
- Hani, E.; Ng, D. & Chan, V.** (1999): Arginine biosynthesis in *Campylobacter jejuni* TGH9011: determination of the *argCOBD* cluster. In: *Can. J. Microbiol.* **45** (11), pp. 959–969.
- Hänßler, E.; Müller, T.; Jeßberger, N.; Völzke, A.; Plassmeier, J.; Kalinowski, J.; Krämer, R. & Burkovski, A.** (2007): FarR, a putative regulator of amino acid metabolism in *Corynebacterium glutamicum*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* **76** (3), pp. 625–632.
- Harrison, S. C. & Aggarwal, A. K.** (1990): DNA recognition by proteins with the helix-turn-helix motif. In: *Annual Review of Biochemistry* **59**, pp. 933–969.

- Hongay, C. F.; Grisafi, P. L.; Galitski, T. & Fink, G. R.** (2006): Antisense Transcription Controls Cell Fate in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Cell* **127** (4), pp. 735–745.
- Horton, R.; Hunt, H.; Ho, S.; Pullen, J. & Pease, L.** (1989): Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. In: *Gene* **77** (1), pp. 61–68.
- Huffman, J. L. & Brennan, R. G.** (2002): Prokaryotic transcription regulators: more than just the helix-turn-helix motif. In: *Current Opinion in Structural Biology* **12** (1), pp. 98–106.
- Hwang, G.H. & Cho, J.Y.** (2010): Identification of a suppressor gene for the arginine-auxotrophic *argJ* mutation in *Corynebacterium glutamicum*. In: *J Ind Microbiol Biotechnol* **37** (11), pp. 1131–1136.
- Ikeda, M.; Mitsuhashi, S.; Tanaka, K. & Hayashi, M.** (2009): Reengineering of a *Corynebacterium glutamicum* L-Arginine and L-Citrulline Producer. In: *Applied and Environmental Microbiology* **75** (6), pp. 1635–1641.
- Ikeda, M. & Nakagawa, S.** (2003): The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes. In: *Applied microbiology and biotechnology* **62** (2-3), pp. 99–109.
- Ikeda, M. & Takeno, S.** (2013): Amino Acid Production by *Corynebacterium glutamicum*: Biology and Biotechnology. In: *Microbiology Monographs*, pp. 107–147.
- Inoue, H.; Nojima, H. & Okayama, H.** (1990): High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. In: *Gene* **96** (1), pp. 23–28.
- Janga, S. C.; Salgado, H.; Martínez-Antonio, A. & Collado-Vides, J.** (2007): Coordination logic of the sensing machinery in the transcriptional regulatory network of *Escherichia coli*. In: *Nucleic acids research* **35** (20), pp. 6963–6972.
- Kalinowski, J.; Bathe, B.; Bartels, D.; Bischoff, N.; Bott, M.; Burkovski, A.; Dusch, N.; Eggeling, L.; Eikmanns, B. J.; Gaigalat, L.; Goesmann, A.; Hartmann, M.; Huthmacher, K.; Krämer, R.; Linke, B.; McHardy, A. C.; Meyer, F.; Möckel, B.; Pfeifferle, W.; Pühler, A.; Rey, D. A.; Rückert, C.; Rupp, O.; Sahm, H.; Wendisch, V. F.; Wiegräbe, I. & Tauch, A.** (2003): The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. In: *J. Biotechnol.* **104** (1-3), pp. 5–25.
- Keilhauer, C.; Eggeling, L. & Sahm, H.** (1993): Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon. In: *J. Bacteriol.* **175** (17), pp. 5595–5603.
- Kinoshita, J.; Udaka, S. & Shimono, M.** (1957): Amino acid fermentation. Part 1. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. In: *Appl. Microbiol* **3**, pp. 193–205.
- Kinoshita, S.** (2005): A Short History of the Birth of the Amino Acid Industry in Japan. In: *Eggeling, L. and Bott, M. (Hrsg.) Handbook of Corynebacterium glutamicum*. Taylor & Francis Group, Florida, USA.
- Kirchner, O. & Tauch, A.** (2003): Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. In: *J. Biotechnol.* **104** (1-3), pp. 287–299.
- Larkin, M.; Blackshields, G.; Brown, N.; Chenna, R.; McGettigan, P.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J.; Gibson, T. & Higgins, D.** (2007): Clustal W and Clustal X version 2.0. In: *Bioinformatics* **23** (21), pp. 2947–2948.

- Lee, S. Y.; Kim, Y.-H. & Min, J.** (2009): The Effect of ArgR–DNA Binding Affinity on Ornithine Production in *Corynebacterium glutamicum*. In: *Current Microbiology* **59** (4), pp. 483–488.
- Lee, S. Y.; Park, J.-M.; Lee, J. H.; Chang, S.-T.; Park, J.-S.; Kim, Y.-H. & Min, J.** (2011): Interaction of Transcriptional Repressor ArgR with Transcriptional Regulator FarR at the *argB* Promoter Region in *Corynebacterium glutamicum*. In: *Applied and Environmental Microbiology* **77** (3), pp. 711–718.
- Lee, S. Y.; Shin, H. S.; Park, J.-S.; Kim, Y.-H. & Min, J.** (2010): Proline reduces the binding of transcriptional regulator ArgR to upstream of *argB* in *Corynebacterium glutamicum*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* **86** (1), pp. 235–242.
- Leuchtenberger, W.** (1996): Amino Acids– Technical Production and Use. In: *Rehm, H.-J., Reed, G., Pühler, A., Stadler, P. (Hrsg.) Products of primary metabolism*. 2nd edition, vol 6., VCH Weinheim, pp. 465–502.
- Liebl, W.; Ehrmann, M.; Ludwig, W. & Schleifer, K.** (1991): Transfer of *Brevibacterium divaricatum* DSM 20297T, "*Brevibacterium flavum*" DSM 20411, "*Brevibacterium lactofermentum*" DSM 20412 and DSM 1412, and *Corynebacterium lilium* DSM 20137T to *Corynebacterium glutamicum* and Their Distinction by rRNA Gene Restriction Patterns. In: *International Journal of Systematic Bacteriology* **41** (2), pp. 255–260.
- Liebl, W.** (1992): The genus *Corynebacterium* -nonmedical. In: *A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, K. H. Schleifer (Hrsg.) The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria*. Vol 2, Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Lim, D. B.; Oppenheim, J. D.; Eckhardt, T. & Maas, W. K.** (1987): Nucleotide sequence of the *argR* gene of *Escherichia coli* K-12 and isolation of its product, the arginine repressor. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84** (19), pp. 6697–6701.
- Lim, H. N.; Lee, Y. & Hussein, R.** (2011): Fundamental relationship between operon organization and gene expression. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108** (26), 10626–10631.
- Londei, P.** (2005): Evolution of translational initiation: new insights from the archaea. In: *FEMS microbiology reviews* **29** (2), pp. 185–200.
- Lu, C.-D.** (2006): Pathways and regulation of bacterial arginine metabolism and perspectives for obtaining arginine overproducing strains. In: *Applied microbiology and biotechnology* **70** (3), pp. 261–272.
- Ma, H.-W.; Kumar, B.; Ditges, U.; Gunzer, F.; Buer, J. & Zeng, A.-P.** (2004): An extended transcriptional regulatory network of *Escherichia coli* and analysis of its hierarchical structure and network motifs. In: *Nucleic acids research* **32** (22), pp. 6643–6649.
- Maas, W. K.** (1961): Studies on Repression of Arginine Biosynthesis in *Escherichia coli*. In: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **26** (1), pp. 183–191.
- Maas, W. K.; Novelli, G. D. & Lipmann, F.** (1953): Acetylation of Glutamic Acid by Extracts of *Escherichia coli*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **39** (10), pp. 1004–1008.
- Mackie, G. A.** (2012): RNase E: at the interface of bacterial RNA processing and decay. In: *Nature Reviews Microbiology* **11** (1), pp. 45–57.

- Madan Babu, M.; Teichmann, S. A. & Aravind, L.** (2006): Evolutionary dynamics of prokaryotic transcriptional regulatory networks. In: *Journal of molecular biology* **358** (2), pp. 614–633.
- Maeda, T. & Wachi, M.** (2012): *Corynebacterium glutamicum* RNase E/G-type endoribonuclease encoded by NCgl2281 is involved in the 5' maturation of 5S rRNA. In: *Archives of Microbiology* **194** (2), pp. 65–73.
- Maghnouj, A.; de Sousa Cabral, T. F.; Stalon, V. & Vander Wauven, C.** (1998): The *arcABDC* gene cluster, encoding the arginine deiminase pathway of *Bacillus licheniformis*, and its activation by the arginine repressor *argR*. In: *Journal of bacteriology* **180** (24), pp. 6468–6475.
- Makarova, K.; Mironov, A. & Gelfand, M.** (2001): Conservation of the binding site for the arginine repressor in all bacterial lineages. In: *Genome Biol.* **2** (4), pp. Research/0013.1.
- Marchler-Bauer, A.; Anderson, J. B.; Chitsaz, F.; Derbyshire, M. K.; DeWeese-Scott, C.; Fong, J. H.; Geer, L. Y.; Geer, R. C.; Gonzales, N. R.; Gwadz, M.; He, S.; Hurwitz, D. I.; Jackson, J. D.; Ke, Z.; Lanczycki, C. J.; Liebert, C. A.; Liu, C.; Lu, F.; Lu, S.; Marchler, G. H.; Mullokandov, M.; Song, J. S.; Tasneem, A.; Thanki, N.; Yamashita, R. A.; Zhang, D.; Zhang, N. & Bryant, S. H.** (2009): CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. In: *Nucleic Acids Research* **37** (Database), pp. 205.
- Marc, F.; Weigel, P.; Legrain, C.; Almeras, Y.; Santrot, M.; Glansdorff, N. & Sakanyan, V.** (2000): Characterization and kinetic mechanism of mono- and bifunctional ornithine acetyltransferases from thermophilic microorganisms. In: *European Journal of Biochemistry* **267** (16), pp. 5217–5226.
- Martianov, I.; Ramadass, A.; Serra Barros, A.; Chow, N. & Akoulitchev, A.** (2007): Repression of the human dihydrofolate reductase gene by a non-coding interfering transcript. In: *Nature* **445** (7128), pp. 666–670.
- Martín, J. F.; Barreiro, C.; González-Lavado, E. & Barriuso, M.** (2003): Ribosomal RNA and ribosomal proteins in corynebacteria. In: *Journal of biotechnology* **104** (1-3), pp. 41–53.
- Martin, P. R. & Mulks, M. H.** (1992): Sequence analysis and complementation studies of the *argJ* gene encoding ornithine acetyltransferase from *Neisseria gonorrhoeae*. In: *Journal of bacteriology* **174** (8), pp. 2694–2701.
- Martinez-Guerrero, C.; Ciria, R.; Abreu-Goodger, C.; Moreno-Hagelsieb, G. & Merino, E.** (2008): GeConT 2: gene context analysis for orthologous proteins, conserved domains and metabolic pathways. In: *Nucleic Acids Research* **36**, pp. W176.
- Mazo, A.; Hodgson, J. W.; Petruk, S.; Sedkov, Y. & Brock, H. W.** (2007): Transcriptional interference: an unexpected layer of complexity in gene regulation. In: *Journal of cell science* **120** (16), pp. 2755–2761.
- Meinzel, T. & Giglione, C.** (2008): Tools for analyzing and predicting N-terminal protein modifications. In: *Proteomics* **8** (4), pp. 626–649.
- Mentz, A.; Neshat, A.; Pfeifer-Sancar, K.; Pühler, A.; Rückert, C. & Kalinowski, J.** (2013): Comprehensive identification and characterization of small RNAs in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *In preparation*.
- Metzker, M. L.** (2010): Sequencing technologies - the next generation. In: *Nature reviews. Genetics* **11** (1), pp. 31–46.

- Meyer, F.; Goesmann, A.; McHardy, A.; Bartels, D.; Bekel, T.; Clausen, J.; Kalinowski, J.; Linke, B.; Rupp, O.; Giegerich, R. & Pühler, A.** (2003): GenDB - an open source genome annotation system for prokaryote genomes. In: *Nucleic Acids Res.* **31** (8), pp. 2187–2195.
- Möker, N.; Brocker, M.; Schaffer, S.; Krämer, R.; Morbach, S. & Bott, M.** (2004): Deletion of the genes encoding the MtrA-MtrB two-component system of *Corynebacterium glutamicum* has a strong influence on cell morphology, antibiotics susceptibility and expression of genes involved in osmoprotection. In: *Molecular Microbiology* **54** (2), pp. 420–438.
- Moll, I.; Grill, S.; Gualerzi, C. O. & Bläsi, U.** (2002): Leaderless mRNAs in bacteria: surprises in ribosomal recruitment and translational control. In: *Molecular microbiology* **43** (1), pp. 239–246.
- Mormann, S.; Lömker, A.; Rückert, C.; Gaigalat, L.; Tauch, A.; Pühler, A. & Kalinowski, J.** (2006): Random mutagenesis in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 using an IS6100-based transposon vector identified the last unknown gene in the histidine biosynthesis pathway. In: *BMC Genomics* **7** (1), p. 205
- Morozova, O.; Hirst, M. & Marra, M. A.** (2009): Applications of new sequencing technologies for transcriptome analysis. In: *Annual review of genomics and human genetics* **10**, pp. 135–151.
- Moseley, B. & Mattingly, A.** (1971): Repair of irradiation transforming deoxyribonucleic acid in wild type and a radiation-sensitive mutant of *Micrococcus radiodurans*. In: *J. Bacteriol.* **105** (3), pp. 976–983.
- Nakagawa, S.; Niimura, Y.; Miura, K.-I. & Gojobori, T.** (2010): Dynamic evolution of translation initiation mechanisms in prokaryotes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107** (14), pp. 6382–6387.
- Nakamura, Y.; Nishio, Y.; Ikeo, K. & Gojobori, T.** (2003): The genome stability in *Corynebacterium* species due to lack of the recombinational repair system. In: *Gene* **317**, pp. 149–155.
- Ni, J.; Sakanyan, V.; Charlier, D.; Glansdorff, N. & van Duyne, G. D.** (1999): Structure of the arginine repressor from *Bacillus stearothermophilus*. In: *Nature structural biology* **6** (5), pp. 427–432.
- Nishio, Y.; Nakamura, Y.; Kawarabayasi, Y.; Usuda, Y.; Kimura, E.; Sugimoto, S.; Matsui, K.; Yamagishi, A.; Kikuchi, H.; Ikeo, K. & Gojobori, T.** (2003): Comparative complete genome sequence analysis of the amino acid replacements responsible for the thermostability of *Corynebacterium efficiens*. In: *Genome Res.* **13** (7), pp. 1572–1579.
- Oehler, S.; Amouyal, M.; Kolkhof, P.; Wilcken-Bergmann, B. von & Müller-Hill, B.** (1994): Quality and position of the three lac operators of *E. coli* define efficiency of repression. In: *The EMBO journal* **13** (14), pp. 3348–3355.
- Oppenheim, D.S. & Yanofsky, C.** (1980): Translational coupling during expression of the tryptophan operon of *Escherichia coli*. In: *Genetics* **95** (4), pp. 785–795.
- Pabo, C. O. & Sauer, R. T.** (1992): Transcription Factors: Structural Families and Principles of DNA Recognition. In: *Annual Review of Biochemistry* **61** (1), pp. 1053–1095.
- Palchevskiy, V. & Finkel, S.** (2006): *Escherichia coli* competence gene homologs are essential for competitive fitness and the use of DNA as a nutrient. In: *J. Bacteriol.* **188** (11), pp. 3902–3910.
- Pátek, M.; Nešvera, J.; Guyonvarch, A.; Reyes, O. & Leblon, G.** (2003): Promoters of *Corynebacterium glutamicum*. In: *Journal of Biotechnology* **104** (1-3), pp. 311–323.

- Pauling, J.; Röttger, R.; Tauch, A.; Azevedo, V. & Baumbach, J.** (2012): CoryneRegNet 6.0 - Updated database content, new analysis methods and novel features focusing on community demands. In: *Nucleic acids research* **40**, pp. 610-4.
- Paulsson, J.** (2004): Summing up the noise in gene networks. In: *Nature* **427** (6973), pp. 415–418.
- Perez-Rueda, E. & Collado-Vides, J.** (2000): The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K-12. In: *Nucleic Acids Research* **28** (8), pp. 1838–1847.
- Pérez-Rueda, E.; Collado-Vides, J. & Segovia, L.** (2004): Phylogenetic distribution of DNA-binding transcription factors in bacteria and archaea. In: *Computational biology and chemistry* **28** (5-6), pp. 341–350.
- Pfeifer-Sancar, K.; Mentz, A.; Rückert, C. & Kalinowski, J.** (2013): Comprehensive analysis of the *Corynebacterium glutamicum* transcriptome using an improved RNAseq technique. *In preparation*.
- Powers-Lee, S. G.** (1985): N-Acetylglutamate synthase. In: *Methods in enzymology* **113**, pp. 27–35.
- Puech, V.; Chami, M.; Lemassu, A.; Lanéelle, M. A.; Schiffler, B.; Gounon, P.; Bayan, N.; Benz, R. & Daffé, M.** (2001). Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non-covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane. *Microbiology (Reading, England)* **147**, 1365–1382.
- Raghavan, R.; Sloan, D. B. & Ochman, H.** (2012): Antisense Transcription Is Pervasive but Rarely Conserved in Enteric Bacteria. In: *mBio* **3** (4), pp. 00156-12.
- Ramón-Maiques, S.; Marina, A.; Gil-Ortiz, F.; Fita, I. & Rubio, V.** (2002): Structure of acetylglutamate kinase, a key enzyme for arginine biosynthesis and a prototype for the amino acid kinase enzyme family, during catalysis. In: *Structure* **10** (3), pp. 329–342.
- Ramulu, H. G.; Adindla, S. & Guruprasad, L.** (2006): Analysis and modeling of mycolyl-transferases in the CMN group. In: *Bioinformatics* **1** (5), pp. 161–169.
- Rodríguez-García, A.; Ludovice, M.; Martín, J. F. & Liras, P.** (1997): Arginine boxes and the *argR* gene in *Streptomyces clavuligerus*: evidence for a clear regulation of the arginine pathway. In: *Molecular microbiology* **25** (2), pp. 219–228.
- Rückert, C.; Milse, J.; Albersmeier, A.; Koch, D.; Pühler, A. & Kalinowski, J.** (2008): The dual transcriptional regulator CysR in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 controls a subset of genes of the McbR regulon in response to the availability of sulphide acceptor molecules. In: *BMC Genomics* **9** (1), p. 483.
- Saiki, R.; Gelfand, D.; Stoffel, S.; Scharf, S.; Higuchi, R.; Horn, G.; Mullis, K. & Erlich, H.** (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. In: *Science* **239** (4839), pp. 487–491.
- Sakanyan, V.; Kochikyan, A.; Mett, I.; Legrain, C.; Charlier, D.; PieRard, A. & Glansdorff, N.** (1992): A re-examination of the pathway for ornithine biosynthesis in a thermophilic and two mesophilic *Bacillus* species. In: *Journal of General Microbiology* **138** (1), pp. 125–130.
- Sakanyan, V.; Charlier, D.; Legrain, C.; Kochikyan, A.; Mett, I.; PieRard, A. & Glansdorff, N.** (1993): Primary Structure, Partial Purification and Regulation of Key Enzymes of the Acetyl Cycle of Arginine Biosynthesis in *Bacillus Stearothermophilus*: Dual Function of Ornithine Acetyltransferase. In: *Journal of General Microbiology* **139** (3), pp. 393–402.

- Sakanyan, V.; Petrosyan, P.; Lecocq, M.; Boyen, A.; Legrain, C.; Demarez, M.; Hallet, J.-N. & Glansdorff, N.** (1996): Genes and enzymes of the acetyl cycle of arginine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*: enzyme evolution in the early steps of the arginine pathway. In: *Microbiology* **142** (1), pp. 99–108.
- Sambrook, J. & Russell, D.** (2001): Molecular cloning. A laboratory manual. 3. Aufl. Cold Spring Harbor Press, New York.
- Sanchez, R.; Roovers, M. & Glansdorff, N.** (2000): Organization and expression of a *Thermus thermophilus* arginine cluster: presence of unidentified open reading frames and absence of a Shine-Dalgarno sequence. In: *Journal of bacteriology* **182** (20), pp. 5911–5915.
- Sayed, N.; Jouselin, A. & Felden, B.** (2011): A *cis*-antisense RNA acts in *trans* in *Staphylococcus aureus* to control translation of a human cytolytic peptide. In: *Nature Structural and Molecular Biology* **19** (1), pp. 105–112.
- Schäfer, A.; Tauch, A.; Jäger, W.; Kalinowski, J.; Thierbach, G. & Pühler, A.** (1994): Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. In: *Gene* **145** (1), pp. 69–73.
- Schaumburg, C. S. & Tan, M.** (2006): Arginine-Dependent Gene Regulation via the ArgR Repressor Is Species Specific in *Chlamydia*. In: *Journal of Bacteriology* **188** (3), pp. 919–927.
- Schneider, J.; Niermann, K. & Wendisch, V.** (2011): Production of the amino acids L-glutamate, L-lysine, L-ornithine and L-arginine from arabinose by recombinant *Corynebacterium glutamicum*. In: *Journal of Biotechnology* **154** (2-3), pp. 191–198.
- Schröder, J.; Maus, I.; Trost, E. & Tauch, A.** (2011): Complete genome sequence of *Corynebacterium variabile* DSM 44702 isolated from the surface of smear-ripened cheeses and insights into cheese ripening and flavor generation. In: *BMC Genomics* **12** (1), p. 545.
- Seshasayee, A. S. N.; Bertone, P.; Fraser, G. M. & Luscombe, N. M.** (2006): Transcriptional regulatory networks in bacteria: from input signals to output responses. In: *Current opinion in microbiology* **9** (5), pp. 511–519.
- Shearwin, K.; Callen, B. & Egan, J.** (2005): Transcriptional interference – a crash course. In: *Trends in Genetics* **21** (6), pp. 339–345.
- Sinclair, S.** (2000): Male infertility: nutritional and environmental considerations. In: *Alternative medicine review a journal of clinical therapeutic* **5** (1), pp. 28–38.
- Slupska, M. M.; King, A. G.; Fitz-Gibbon, S.; Besemer, J.; Borodovsky, M. & Miller, J. H.** (2001): Leaderless transcripts of the crenarchaeal hyperthermophile *Pyrobaculum aerophilum*. In: *Journal of Molecular Biology* **309** (2), pp. 347–360.
- Smith, M. C.; Czaplowski, L.; North, A. K.; Baumberg, S. & Stockley, P. G.** (1989). Sequences required for regulation of arginine biosynthesis promoters are conserved between *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. In: *Molecular microbiology* **3** (1), pp. 23–28.
- Sobrevia, L. & González, M.** (2009): A role for insulin on L-arginine transport in fetal endothelial dysfunction in hyperglycaemia. In: *Current vascular pharmacology* **7** (4), pp. 467–474.

- Soutar, A. & Baumberg, S.** (1996): Implication of a repression system, homologous to those of other bacteria, in the control of arginine biosynthesis genes in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular and general genetics* **251** (2), pp. 245–251.
- Spencer, P.; Siller, E.; Anderson, J. & Barral, J.** (2012): Silent Substitutions Predictably Alter Translation Elongation Rates and Protein Folding Efficiencies. In: *Journal of Molecular Biology* **422** (3), pp. 328–335.
- Stazic, D.; Lindell, D. & Steglich, C.** (2011): Antisense RNA protects mRNA from RNase E degradation by RNA-RNA duplex formation during phage infection. In: *Nucleic Acids Research* **39** (11), pp. 4890–4899.
- Stork, M.; Di Lorenzo, M.; Welch, T. J. & Crosa, J. H.** (2007): Transcription Termination within the Iron Transport-Biosynthesis Operon of *Vibrio anguillarum* Requires an Antisense RNA. In: *Journal of Bacteriology* **189** (9), pp. 3479–3488.
- Subramanian, A.; Kaufmann, M. & Morgenstern, B.** (2008): DIALIGN-TX: greedy and progressive approaches for segment-based multiple sequence alignment. In: *Algorithms Mol Biol* **3** (1), p. 6.
- Sunnerhagen, M.; Nilges, M.; Otting, G. & Carey, J.** (1997): Solution structure of the DNA-binding domain and model for the complex of multifunctional hexameric arginine repressor with DNA. In: *Nature structural biology* **4** (10), pp. 819–826.
- Tauch, A.; Kirchner, O.; Wehmeier, L.; Kalinowski, J. & Pühler, A.** (1994): *Corynebacterium glutamicum* DNA is subjected to methylation-restriction in *Escherichia coli*. In: *FEMS Microbiol. Lett.* **123** (3), pp. 343–347.
- Tauch, A.; Kirchner, O.; Löffler, B.; Götter, S.; Pühler, A. & Kalinowski, J.** (2002): Efficient electrotransformation of *Corynebacterium diphtheriae* with a mini-replicon derived from the *Corynebacterium glutamicum* plasmid pGA1. In: *Curr. Microbiol.* **45** (5), pp. 362–367.
- Thanky, N. R.; Young, D. B. & Robertson, B. D.** (2007): Unusual features of the cell cycle in mycobacteria: Polar-restricted growth and the snapping-model of cell division. In: *Tuberculosis* **87** (3), pp. 231–236.
- Thomason, M. & Storz, G.** (2010): Bacterial Antisense RNAs: How Many Are There, and What Are They Doing? In: *Annu. Rev. Genet.* **44** (1), pp. 167–188.
- Tian, G.; Lim, D.; Carey, J. & Maas, W. K.** (1992): Binding of the arginine repressor of *Escherichia coli* K12 to its operator sites. In: *Journal of molecular biology* **226** (2), pp. 387–397.
- Tong, B. C. & Barbul, A.** (2004): Cellular and physiological effects of arginine. In: *Mini reviews in medicinal chemistry* **4** (8), pp. 823–832.
- Udaka, S.** (1966): Pathway-specific pattern of control of arginine biosynthesis in bacteria. In: *Journal of bacteriology* **91** (2), pp. 617–621.
- Udaka, S. & Kinoshita, S.** (1958): Studies on L-ornithine fermentation. I. The biosynthetic pathway of L-ornithine in *Micrococcus glutamicum*. In: *J. Gen. Appl. Microbiol.* **4**, pp. 272–282.
- Utagawa, T.** (2004): Production of arginine by fermentation. In: *The Journal of nutrition* **134** (10), pp. 2854S–2857S.

- van Duyne, G. D.; Ghosh, G.; Maas, W. K. & Sigler, P. B.** (1996): Structure of the oligomerization and L-arginine binding domain of the arginine repressor of *Escherichia coli*. In: *Journal of molecular biology* **256** (2), pp. 377–391.
- van Hijum, S. A. F. T.; Medema, M. H. & Kuipers, O. P.** (2009): Mechanisms and Evolution of Control Logic in Prokaryotic Transcriptional Regulation. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **73** (3), pp. 481–509.
- Vašicová, P.; Abrahámová, Z.; Nešvera, J.; Pátek, M.; Sahm, H. & Eikmanns, B.** (1998): Integrative and autonomously replicating vectors for analysis of promoters in *Corynebacterium glutamicum*. In: *Biotechnology Techniques* **12** (10), pp. 743–746(4).
- Vašicová, P.; Pátek, M.; Nešvera, J.; Sahm, H. & Eikmanns, B.** (1999): Analysis of the *Corynebacterium glutamicum* *dapA* promoter. In: *J. Bacteriol.* **181** (19), pp. 6188–6191.
- Ventura, M.; Canchaya, C.; Tauch, A.; Chandra, G.; Fitzgerald, G. F.; Chater, K. F. & van Sinderen, D.** (2007): Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **71** (3), pp. 495–548.
- Vertès, A. A.; Inui, M. & Yukawa, H.** (2012): Postgenomic approaches to using corynebacteria as biocatalysts. In: *Annual review of microbiology* **66**, pp. 521–550.
- Vogel, J. & Wagner, E. G. H.** (2007): Target identification of small noncoding RNAs in bacteria. In: *Current Opinion in Microbiology* **10** (3), pp. 262–270.
- Vyas, S. & Maas, W.** (1963): Feedback inhibition of acetylglutamate synthetase by arginine in *Escherichia coli*. In: *Arch. Biochem. Biophys.* **100**, pp. 542–546.
- Wang, P.; Yang, J.; Ishihama, A. & Pittard, A. J.** (1998): Demonstration that the TyrR protein and RNA polymerase complex formed at the divergent P3 promoter inhibits binding of RNA polymerase to the major promoter, P1, of the *aroP* gene of *Escherichia coli*. In: *Journal of bacteriology* **180** (20), pp. 5466–5472.
- Waters, L. S. & Storz, G.** (2009): Regulatory RNAs in Bacteria. In: *Cell* **136** (4), pp. 615–628.
- Wipe, B. & Leisinger, T.** (1979): Regulation of activity and synthesis of N-acetylglutamate synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. In: *J. Bacteriol.* **140** (3), pp. 874–880.
- Wohlleben, W.; Muth, G. & Kalinowski, J.** (1993): Genetic Engineering of Gram Positive Bacteria. In: *Genetic Engineering of Microorganisms; A. Pühler, Ed*, pp. 83–133.
- Xu, Y.; Glansdorff, N. & Labedan, B.** (2006): Bioinformatic analysis of an unusual gene-enzyme relationship in the arginine biosynthetic pathway among marine gamma proteobacteria: implications concerning the formation of N-acetylated intermediates in prokaryotes. In: *BMC Genomics* **7** (1), p. 4.
- Xu, Y.; Labedan, B. & Glansdorff, N.** (2007): Surprising arginine biosynthesis: a reappraisal of the enzymology and evolution of the pathway in microorganisms. In: *Microbiology and molecular biology reviews* **71** (1), pp. 36–47.
- Xu, Y.; Liang, Z.; Legrain, C.; Rüger, H. J. & Glansdorff, N.** (2000): Evolution of arginine biosynthesis in the bacterial domain: novel gene-enzyme relationships from psychrophilic *Moritella* strains (*Vibrionaceae*) and evolutionary significance of N-alpha-acetyl ornithinase. In: *Journal of bacteriology* **182** (6), pp. 1609–1615.

-
- Yim, S. H.; Jung, S.; Lee, S. K.; Cheon, C. I.; Song, E.; Lee, S. S.; Shin, J. & Lee, M. S.** (2011): Purification and characterization of an arginine regulatory protein, ArgR, in *Corynebacterium glutamicum*. In: *J Ind Microbiol Biotechnol* **38** (12), pp. 1911–1920.
- Yim, S.; Park, M.; Lee, H.; Song, E. & Lee, M.** (2008): Analysis of Gene Expression in Arginine Biosynthetic Gene Cluster of *Corynebacterium glutamicum*. In: *Gene and Genomics* **30** (3), pp. 261–270.
- Yokota, T.; Omori, T. & Kodama, T.** (1987): Purification and properties of haloalkane dehalogenase from *Corynebacterium* sp. strain m15-3. In: *Journal of bacteriology* **169** (9), pp. 4049–4054.
- Zemanová, M.; Kadeřábková, P.; Pátek, M.; Knoppová, M.; Šílar, R. & Nešvera, J.** (2008): Chromosomally encoded small antisense RNA in *Corynebacterium glutamicum*. In: *FEMS Microbiology Letters* **279** (2), pp. 195–201.
- Zheng, X.; Hu, G.-Q.; She, Z.-S. & Zhu, H.** (2011): Leaderless genes in bacteria: clue to the evolution of translation initiation mechanisms in prokaryotes. In: *BMC Genomics* **12** (1), p. 361.
- Zuker, M.** (1989): Computer prediction of RNA structure. In: *Methods in Enzymology, Academic Press* **180**, pp. 262–288.

VII. Anhang

Plasmidkarten:

HindIII
SphI
PstI
SalI
HincII
XbaI
BamHI
XmaI
SmaI
KpnI
SacI
EcoRI

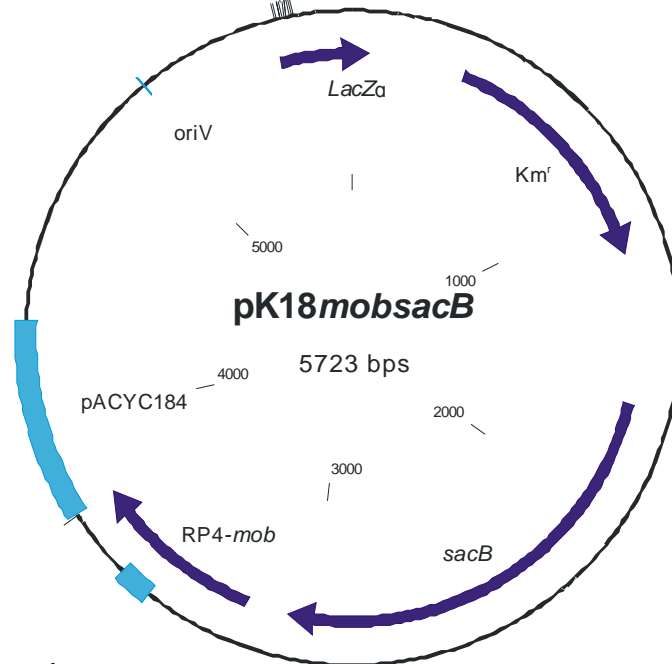


Abb. VII.1: pK18mobsacB-Leervektor

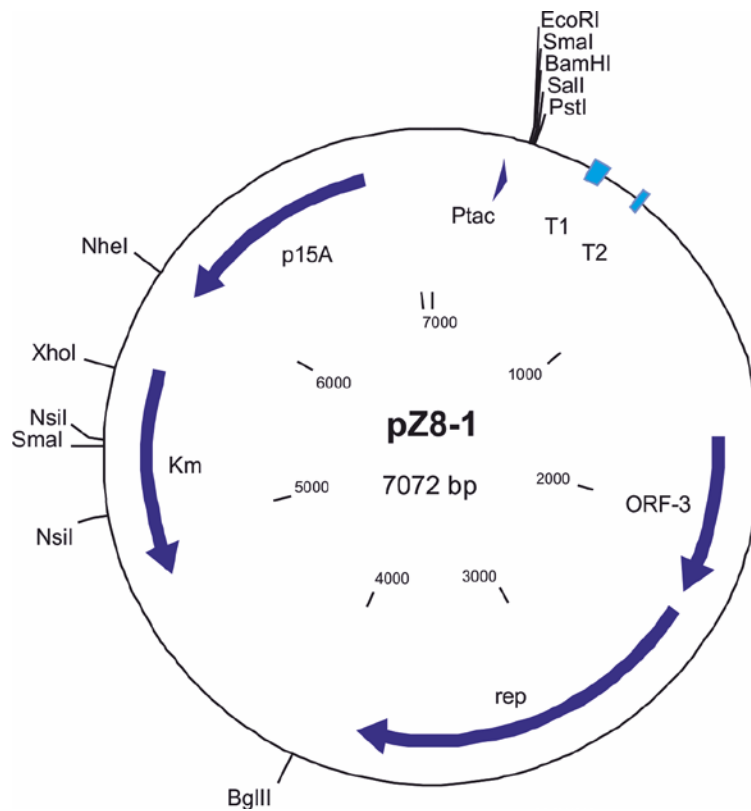


Abb. VII.2: pZ8-1-Leervektor

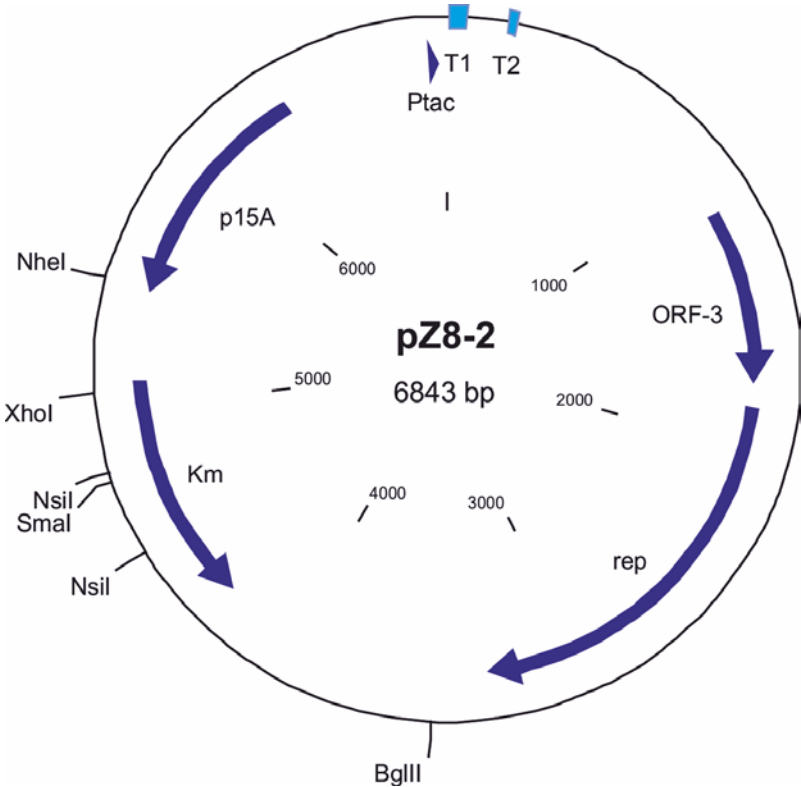


Abb. VII.3: pZ8-2-Leervektor

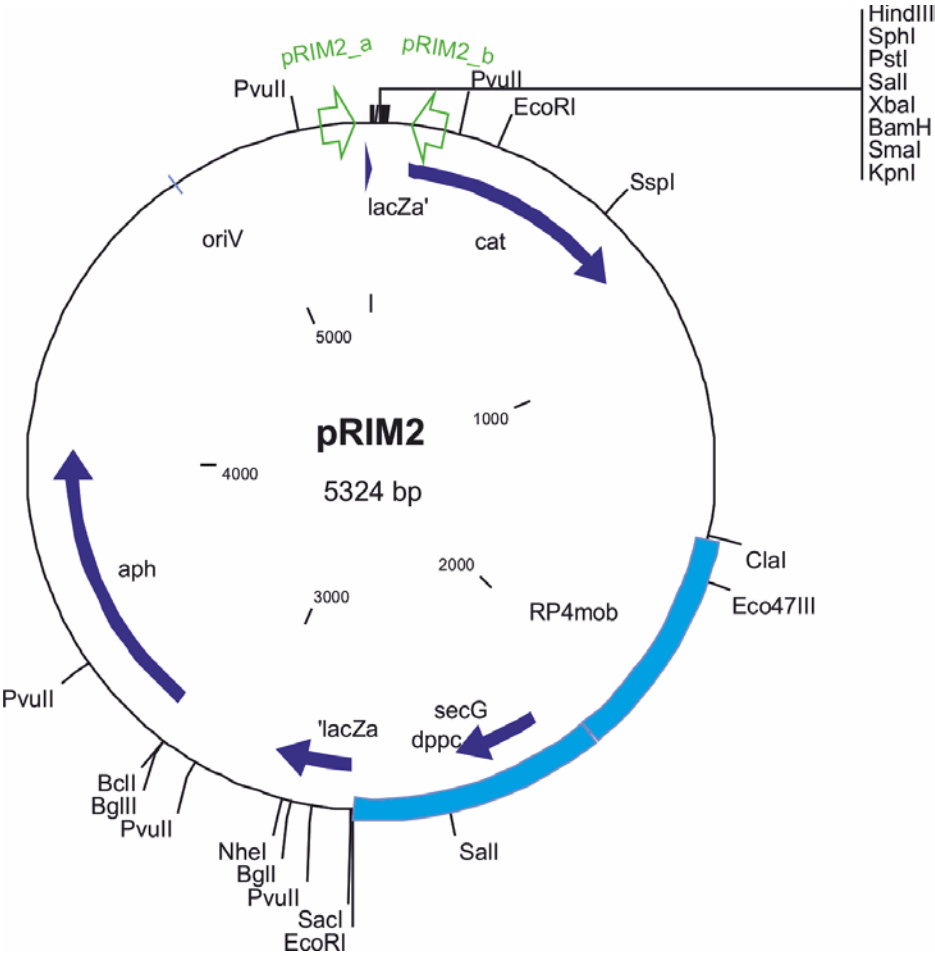


Abb. VII.4: pPRIM2-Leervektor

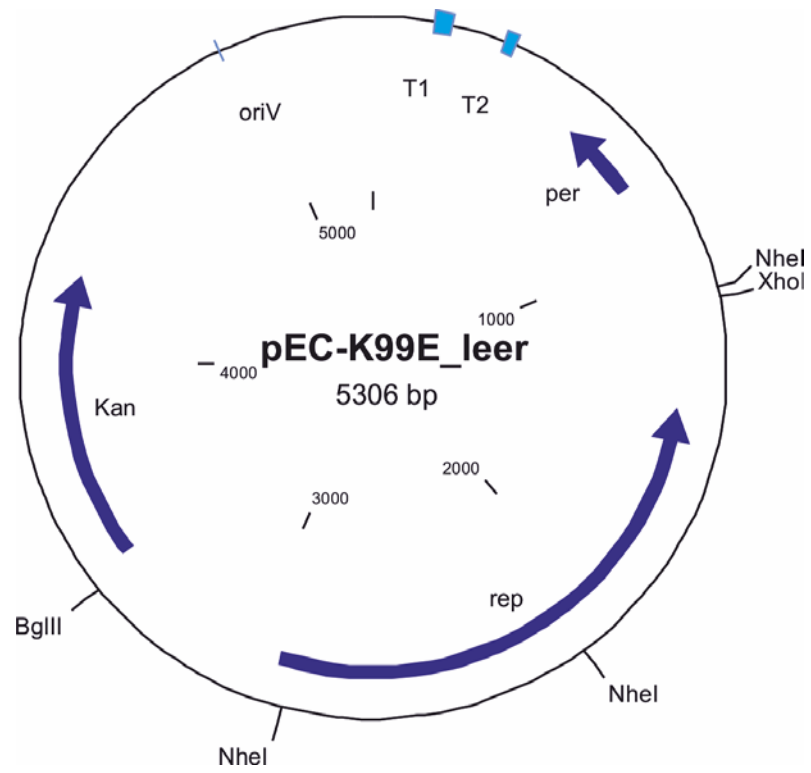


Abb. VII.5: pEC-K99E-Leervektor

Danksagung

Herrn Dr. Jörn Kalinowski danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas meiner Dissertation und für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung. Desweiteren danke ich ihm für die Zeit, die ich in seiner Arbeitsgruppe verbringen durfte und dafür, dass er mich zu jeder Zeit mit Rat und Tat unterstützt hat.

Ein Dankeschön gebührt allen Mitgliedern der „Coryne-Gruppe“ für ein tolles Arbeitsklima, der ständigen Bereitschaft zu konstruktiven Diskussionen und den immer sehr kurzweiligen Frühstücks- und Mittagspausen, die stets eine willkommene Ablenkung von den Problemen des Forschungsalltags waren. Ein besonderes Dankeschön geht in diesem Zusammenhang an meine „Mitbewohner“ im Labor G01-143 bzw. im Büro G2-147, die mich durch die Hochs und Tiefs der Doktorarbeit getragen haben. Ein besonders großer Dank geht dabei an Marcus Persicke, bei dem ich mich speziell für die anregenden Gespräche und die konstruktiven Verbesserungsvorschläge beim Schreiben meiner Arbeit bedanken möchte.

Darüber hinaus danke ich dem CLIB-Graduate Cluster für die Assoziierung und der damit verbundenen Voraussetzung ein 3-monatiges Industriepraktikum zu absolvieren. Zusätzlich bedanke ich mich beim CLIB für die Bereitstellung eines Laptops mittels dem diese Arbeit dann auch verfasst wurde.

Zuletzt aber und vor allen anderen möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie bedanken. Sie hat mich immer wieder während meines Studiums und der Dissertation ermutigt und überall unterstützt, wo es ihr möglich war.

Ein großes Dankeschön gilt auch meinem Freund Carsten für unendlich viel Verständnis und Unterstützung, die vielen aufmunternden Worte und das tapfere Ertragen meiner Launen in stressigen Phasen und/ oder wenn die Experimente mal wieder nicht so wollten wie geplant.

Erklärung

Mit der vorliegenden Dissertation beantrage ich beim Promotionsausschuss der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld die Eröffnung des Promotionsverfahrens nach § 9 der Promotionsordnung in der Fassung vom 10. Mai 2006.

Die Anfertigung dieser Dissertation mit dem Titel „Untersuchung des Argininmetabolismus und dessen Regulation in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032“ erfolgte unter Betreuung von Dr. Jörn Kalinowski in der AG "Mikrobielle Genomik und Biotechnologie" an der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Die Stellen der Dissertation, die anderen Quellen im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen wurden, sind durch Angaben der Herkunft kenntlich gemacht. Dies gilt auch für Zeichnungen, Skizzen, bildliche Darstellungen sowie für Quellen aus dem Internet.

Weiterhin erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation weder vollständig noch in Auszügen einer anderen Fakultät mit dem Ziel vorgelegt worden ist, einen akademischen Titel zu erwerben. Ich bewerbe mich hiermit erstmalig um den Doktorgrad der Naturwissenschaften der Universität Bielefeld.

Bielefeld, den 28.05.2013

Kathrin Haasner