



Hochschule für angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences

Konstruktion und Charakterisierung von *Corynebakterium glutamicum* Mutanten mit
Threonin unempfindlicher Homoserin-Dehydrogenase

Bachelorarbeit

Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von
Aljona Borodun
1915692

Hamburg
am 22. Februar 2012

Gutachter: Prof. Dr.
Gutachter: Prof. Dr.

Gesine Cornelissen (HAW-Hamburg)
An-Ping Zeng (TUHH)

Die Bachelorarbeit wurde betreut und erstellt im Institut für Bioprocess- und
Biosystemtechnik, Technische Universität Hamburg Harburg

Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit mit dem in Ausgabeantrag formulierten Thema ohne fremde Hilfe selbständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Aljona Borodun

Hamburg, den 22.02.2012

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bedanken,

bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. An-Ping Zeng für die Bereitstellung des überaus interessanten Themas, für die Übernahme des externen Gutachters und für die fachliche und konstruktive Begleitung dieser Arbeit,

bei Frau Prof. Dr. Gesine Cornelissen für die Übernahme des Erstgutachtens,

bei meiner Betreuerin Dr. Sugima Rappert für die ständige Diskussionsbereitschaft, konstruktive Kritik und die fachliche Unterstützung bei dieser Arbeit im Labor,

bei den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Arbeitsbereiches „Bioprozess- und Biosystemtechnik“ für das sehr gute Arbeitsklima.

und bei meiner Familie für den moralischen Rückhalt, Verständnis und die finanzielle Unterstützung während meines Studiums.

Schließlich möchte ich mich an dieser Stelle bei meinem Freund Artur für seine Liebe und Unterstützung während meiner Studienzeit bedanken.

Zusammenfassung

Heutzutage ist die Herstellung von Aminosäuren mit Hilfe von Mikroorganismen nicht mehr aus unserem Leben wegzudenken. Einer der wichtigsten Aminosäureproduzenten ist ein gram-positives Bodenbakterium *Corynebakterium glutamicum*, das vor mehr als 60 Jahren als ein natürlicher Glutaminsäureproduzent entdeckt wurde. Da dieses Bakterium genetisch und physiologisch gut untersucht ist und bereits für die Produktion von fast allen Aminosäuren eingesetzt wird, ist man bestrebt, durch die Anwendung von gut funktionierenden Transformationsmethoden und Vektorsystemen den Wildstamm *Corynebakterium glutamicum* ATCC 13032 gentechnisch so zu manipulieren, dass ein neuer Bakterienstamm entsteht. Der neuentwickelte Produktionsstamm soll dann seine Vorgänger bei der Produktion von der Aminosäure Lysin übertreffen. In weniger als 30 Jahren stieg die Produktion von dieser Aminosäure um mehr als 13%, der Grund für diesen Anstieg liegt in der Natur dieser Aminosäure. Da Lysin eine essentielle Aminosäure ist, muss sie mit der Nahrung in ausreichender Menge aufgenommen werden. Es ist ein wichtiger Baustein vieler Proteine im Körper und hat entsprechend viele Funktionen.

Viele Wege führen zur Steigerung der Lysin Produktion mit *Corynebakterium glutamicum*. Durch das Außerkraftsetzen von natürlichen Regelungsmechanismen der Zelle werden hocheffiziente Produktionsstämme entwickelt, bei denen auch eine hohe intrazelluläre Konzentration am Produkt nicht zum Abschalten des Biosyntheseweges führt, sondern gespeichert und ausgeschieden wird.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, mehrere Mutanten von *Corynebakterium glutamicum* zu konstruieren und zu charakterisieren, bei denen durch eine Mutation in *hom*-Gen (Expression zu Homoserin Dehydrogenase) die Feedback-Inhibierung durch das Endprodukt nicht mehr stattfindet und somit die Überproduktion von Lysin erwartet wird.

Nach der Konstruktion von Mutanten durch Anwendung von molekularbiologischen Techniken sollten die neuen Stämme auf die Lysin-Produktionsphasen, sowie auf die Wachstumsphasen mit den Standardstämmen *C. glutamicum* CLYSC-MUT6-CPPC-R873G-26F und *C. glutamicum* CLYSC-MUT6-CPPC-N917G-8F verglichen werden. Auf diese Weise konnten neue Mutanten von *C. glutamicum* auf ihr Potential zur Optimierung der Lysin-Produktion bewertet werden.

Es wurden während der Arbeit 4 neue Mutanten konstruiert, bei denen die erwünschte Mutation in hom-Gen durch die Sequenzierung nachgewiesen werden konnte. Durch die Kultivierung von den neuen Stämmen und von den Standards im gleichen Medium sowie bei gleichen Bedingungen sollte geprüft werden, ob diese gezielte Mutation in hom-Gen zum erwünschten Ergebnis geführt hat.

Es konnte gezeigt werden, dass die beiden neuen Stämme von *Corynebakterium glutamicum*::CLYSC-MUT6-CPPC-R873G-26F//newhom-R441A und ein neuer Stamm von *Corynebakterium glutamicum*::CLYSC-MUT6-CPPC-N917G-8F//newhom-R441A im Vergleich zu ihren Standardstämmen *Corynebakterium glutamicum*::CLYSC-MUT6-CPPC-R873G-26F und *Corynebakterium glutamicum*::CLYSC-MUT6-CPPC-N917G-8F in der Produktion von Lysin bessere Ergebnisse erzielt haben. Teilweise wurde die Erhöhung der Lysin-Produktion um ca. 10 % beobachtet. Grundsätzlich konnte die Produktion um durchschnittlich 7,6 % gesteigert werden.

Inhaltsverzeichnis

Erklärung	2
Danksagung	3
Zusammenfassung	4
Inhaltsverzeichnis	6
Abkürzungen	8
1. Einleitung	9
1.1. Gattung Corynebakterium.....	9
1.2. Produktionsstamm Corynebakterium glutamicum	9
1.3. Aminosäure Lysin.....	10
1.4. Biosynthese von Lysin in Corynebakterium glutamicum und ihre Optimierung	12
2. Material und Methoden	14
2.1. Verwendete Bakterienstämme und Plasmide	14
2.2. Verwendete Primer	15
2.3. Chemikalien	16
2.4. Geräte.....	17
2.5. Materialien	18
2.6. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen	18
2.6.1. Nährmedien für Corynebakterium glutamicum	18
2.6.2. Nährmedien für Escherichia Coli.....	19
2.6.3. Antibiotika.....	20
2.6.4. Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung.....	20
2.7. Kultivierung von Corynebakterium glutamicum	20
2.7.1. Bestimmung der Zellmasse	21
2.8. Metabolitbestimmung	21
2.8.1. Aminosäurebestimmung.....	21
2.9. Bestimmung der Konzentration und der Reinheit von DNA.....	23
2.10. Molekularbiologische Techniken.....	23
2.10.1. Isolierung der Plasmid-DNA.....	23
2.10.2. Isolierung der chromosomalen DNA aus C. glutamicum	24
2.10.3. Restriktion und Ligation von DNA.....	24
2.10.4. Agarose-Gelelektrophorese	25

2.10.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	26
2.10.6. Sequenzierung von DNA-Fragmenten.....	27
2.11. Techniken zur Manipulation von Zellen.....	28
2.11.1. Transformation von <i>E. coli</i>	28
2.11.2. Transformation von <i>C. glutamicum</i>	29
2.11.3. Screening von Mutanten.....	29
3. Ergebnisse.....	31
3.1. Konstruktion von <i>C. glutamicum</i> Mutanten.....	31
3.1.1. Transformation der pUC18//newhom Plasmid-DNA in die <i>E. coli</i> XL-10 Gold ...	31
3.1.2. Restriktion von pUC18//newhom-R441A.....	32
3.1.3. Isolierung der newhom-R441A-Cassette.....	33
3.1.4. Ligation von newhom-R441A-Cassette mit pk18mobsacB.....	34
3.1.5. Transformation von pk18mobsacB//newhom-R441A in <i>E. coli</i> DH5 α MCR.....	35
3.1.6. Selektion von <i>E. coli</i> DH5 α MCR::pk18mobsacB//newhom-R441A.....	36
3.1.7. Extraktion von pk18mobsacB//newhom-R441A.....	38
3.1.8. Elektroporation von pk18mobsacB//newhom-R441A mit <i>C. glutamicum</i>	39
3.1.9. Selektion von <i>C. glutamicum</i> Mutanten.....	40
3.1.10. Isolierung der chromosomalen DNA.....	43
3.2. Charakterisierung der <i>C. glutamicum</i> Mutanten.....	45
3.2.1. Wachstum von <i>C. glutamicum</i>	45
3.2.2. Bestimmung der Lysinkonzentration.....	47
4. Diskussion.....	54
5. Literaturverzeichnis.....	56
6. Anhang.....	59

Abkürzungen

AE	Elutionspuffer
Amp	Ampicillin
ATCC	American Type Culture Collection
BHIS	Brain Heart Infusion-Sorbitol
bp	Basenpaare
C. glutamicum	Corynebakterium glutamicum
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	Et alii (und andere)
h	Stunde
IPTG	Isopropyl-thio- β -D-galactopyranosid
kb	Kilobasen
Km	Kanamycin
LB	Luria-Bertani-Medium
LBHIS	Luria Bertani - Brain Heart Infusion – Sorbitol
M	Molarität
nm	Nanometer
OD ₂₆₀	Optische Dichte bei der Wellenlänge von 260 nm
PCR	Polymerasekettenreaktion
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SOC	SOB (Super optimal Broth)-Medium Derivat
Suc	Saccharose
TAE	Tris-Acetat-EDTA
x g	Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

1. Einleitung

1.1. Gattung Corynebakterium

Der Name Corynebakterium wurde 1896 von Lehmann und Neumann eingeführt. Die ersten Organismen dieser Gattung, die von Ihnen beschrieben wurden, waren Corynebakterium diphtheriae und Corynebakterium xerosis. Corynebakterium ist ein aerobes, Gram-positives, nichtsporenbildendes Bakterium mit hohem GC-Gehalt, das im Boden vorkommt. Die Vertreter dieser Gattung sind 3 bis 5 µm lang und unbeweglich. Einige von Ihnen sind für Menschen oder Tiere pathogen, so wie z.B. Corynebakterium diphtheriae, das Diphtherie auslösen kann. Andere, nicht pathogene Vertreter dieser Gattung, kommen häufig auf der menschlichen Haut vor. Die Zellen der Corynebakterien haben meistens eine charakteristische Keulenform (coryne ist griechisch und bedeutet Keule) und zeigen einen typischen Zellteilungsmodus, wobei eine unvollständige Trennung nach der Zellteilung zu v-förmig voneinander abgewinkelten Tochterzellen führt (snapping division) [15]. Während des Wachstums kann die Form zwischen stäbchenförmig und kokkoid wechseln [19][18]. Das Stützskelett der Zellwand von Corynebakterium besteht aus dem Peptidoglycan Murein, das die Diaminosäure meso-Diaminopimelinsäure enthält und mit dem Heteropolysaccharid Arabinogalactan verknüpft ist. Mit diesem sind kurzkettige (22 - 36 C-Atome) α-Alkyl, β-Hydroxy Fettsäuren, die Mycolsäuren, kovalent gebunden. Es wird angenommen, dass diese aus den Mycolsäuren gebildete Schicht noch andere Lipide enthält, die so angeordnet sind, dass eine Lipiddoppelschicht gebildet wird. Somit besitzen Corynebakterien, ähnlich wie Gram-negative Bakterien, eine äußere Diffusionsbarriere [20].

1.2. Produktionsstamm Corynebakterium glutamicum

1957 haben Kinoshita und seine Mitarbeiter in Japan ein Bakterium isoliert, in dessen Kulturmedium große Mengen an L-Glutaminsäure nachgewiesen wurden [11]. Dieses Bakterium, früher als Micrococcus glutamicus klassifiziert [16], kann in verschiedenen zucker- oder organisch-säurehaltigen Medien wachsen. Mittlerweile ist sein Genom vollständig sequenziert. Unter optimalen Bedingungen wandelt Corynebakterium glutamicum innerhalb von wenigen Tagen Glucose in L-Glutaminsäure um. Schon 1996

produzierte man mit diesem Bakterium bis 1 Mio. Tonnen Glutaminsäure pro Jahr [17]. Mittlerweile wurden für nahezu alle biogenen Aminosäuren fermentative Produktionsprozesse mit *Corynebakterium glutamicum* entwickelt. Die biotechnologische Produktion von Aminosäuren hat gegenüber der chemischen Synthese den Vorteil, dass sie kostengünstiger ist und dass die Aminosäuren in der physiologisch aktiven L-Konfiguration gebildet werden. *Corynebakterium glutamicum* besitzt außerdem gewisse Eigenschaften, die für die Aminosäureproduktion von Vorteil sind. Es fehlen ihm zum Beispiel Enzyme für den Abbau von Aminosäuren [12]. Darüber hinaus sind für *C. glutamicum* viele Transformationsmethoden und Vektorsysteme entwickelt worden, die für die Entwicklung und Optimierung von den neuen Produktionsstämmen eingesetzt werden können.

1.3. Aminosäure Lysin

L-Lysin (farblose Nadeln oder hexagonale Plättchen) ist eine proteinogene, essentielle Aminosäure mit positiv geladener polarer Aminobutyl-Seitenkette ($-(\text{CH}_2)_4\text{-NH}_2$), die 1889 von Drechsel aus Casein isoliert wurde [1]. Lysin besitzt zwei basische Amino-Gruppen, eine in α -Position zur Carboxygruppe und eine in der ϵ -Position der Seitenkette (Abb. 1.1) [9]. Mit seinen zwei Amino-Gruppen kann Lysin nicht nur Peptid-, sondern auch Isopeptid-Bindungen eingehen, z.B. Kollagen und Elastin; oft ist es im aktiven Zentrum von Enzymen anzutreffen, wo es Cofaktoren (z.B. Biotin, Liponsäure, Pyridoxalphosphat) und

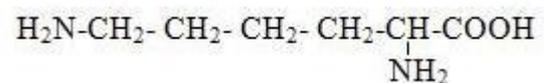


Abbildung 1.1 Aminosäure Lysin

Substrate (z.B. in Aldolase) kovalent bindet [8]. Lysin ist ein Bestandteil des intrazellulären ($994 \pm 385 \mu\text{mol/l}$ icw) und extrazellulären ($195 \pm 45 \mu\text{mol/l}$ Plasma) Pools an freien Aminosäuren im menschlichen Organismus. Aus Proteinen bzw. Peptiden im Darm freigesetztes Lysin wird aktiv mittels des Transportsystems für basische Aminosäuren (Ly-Transport) absorbiert (gestört bei lysinurischer Proteinintoleranz). Der Abbau von Lysin führt über Saccharopin und HMG-CoA zu Acetoacetat, wobei einige Reaktionsschritte mit dem Abbau des L-Tryptophans identisch sind. Mangelnde Aktivität des Enzyms Glutaryl-CoA-Dehydrogenase führt auch in Falle des Lysin-Abbaus zum Krankheitsbild der Glutaracidurie Typ I. Wie L-Threonin ist Lysin nicht an reversiblen Transaminierungen beteiligt [1].

Für den Menschen und für viele Tiere gehört Lysin zu den essentiellen Aminosäuren. Da Lysin nicht vom Körper selbst gebildet werden kann, muss diese Aminosäure in ausreichender Menge mit der Nahrung aufgenommen werden (Tagesbedarf eines Erwachsenen liegt bei ca. 14 mg pro kg Körpergewicht, Kinder haben einen etwa dreifach höheren Bedarf an Lysin)[14]. Lysin kommt als Eiweiß-Bestandteil in vielen tierischen, wenig aber in pflanzlichen Proteinen vor; so ist z.B. Getreide-Protein arm an Lysin.

Im Vergleich mit anderen Aminosäuren reagiert Lysin deutlich empfindlicher auf Verarbeitungsprozesse, das gilt vor allem für das Erhitzen. Dass hitzebehandelte Lebensmittel an freiem Lysin verarmen, geht auf dessen Neigung zum Eingehen von Maillard-Reaktionen mit Zuckern oder von Isopepid-Bindungen zurück. [8]

Lysin ist ein Teil vieler Proteine im Körper und hat dementsprechend viele Funktionen. Ein Mangel an Lysin kann die Proteinsynthese beeinträchtigen, so dass die Neubildung von Muskel- und Bindegewebe verlangsamt wird. Lysin wird zur Behandlung von Herpesinfektionen (speziell Herpes simplex) eingesetzt. Im Organismus dient Lysin als Ausgangsstoff für die Synthese von Carnitin, darüber hinaus verstärkt Lysin die Wirkung von Arginin, weil es den Transfer dieser Aminosäure vom Blut in die Zellen verzögert und damit für höhere Blutkonzentrationen sorgt. Ein positiver Nebeneffekt der Einnahme von Lysin ist die verstärkte Speicherung von Calcium [2][3].

In großem Umfang findet Lysin als Futtermittelzusatz Verwendung, um den Nährwert natürlicher Futtermittel mit einem geringen Gehalt an Lysin zu steigern. Es wird heute ausschließlich nach der Fermentationsmethode hergestellt. Betrachtet man die Produktion von Lysin in den letzten 25 Jahren, ist ein deutlicher Trend nach oben zu beobachten. 1985 wurden ca. 130 000 Tonnen Lysin fermentativ produziert [13], 2000 wurden es 450 000 Tonnen [21], heute sind es 1,5 Mio. Tonnen pro Jahr [4].

1.4. Biosynthese von Lysin in *Corynebakterium glutamicum* und ihre Optimierung

Die Biosynthese von Lysin in *Corynebakterium glutamicum* verläuft über den Syntheseweg der Aminosäuren der Aspartat-Familie, vom Tricarbonsäurecyclus-Intermediat Oxalacetat ausgehend (Abb.1.2, für Rekonstruktion des vollständigen Stoffwechsels in *Corynebakterium glutamicum* s. Anhang Abb. 6.3). Nach einer Transaminierung von Oxalacetat wird das Produkt Aspartat durch die Aspartatkinase zu Aspartylphosphat phosphoryliert, und unter NADPH-Verbrauch zu Aspartatsemialdehyd umgewandelt.

Die Dihydropicolinat-Synthase (dapA) katalysiert die Reaktion von Aspartatsemialdehyd zu L-2,3-Dihydrodipicolinat, welches über einen verzweigten Biosyntheseweg zu D, L-Diaminopimelat umgesetzt

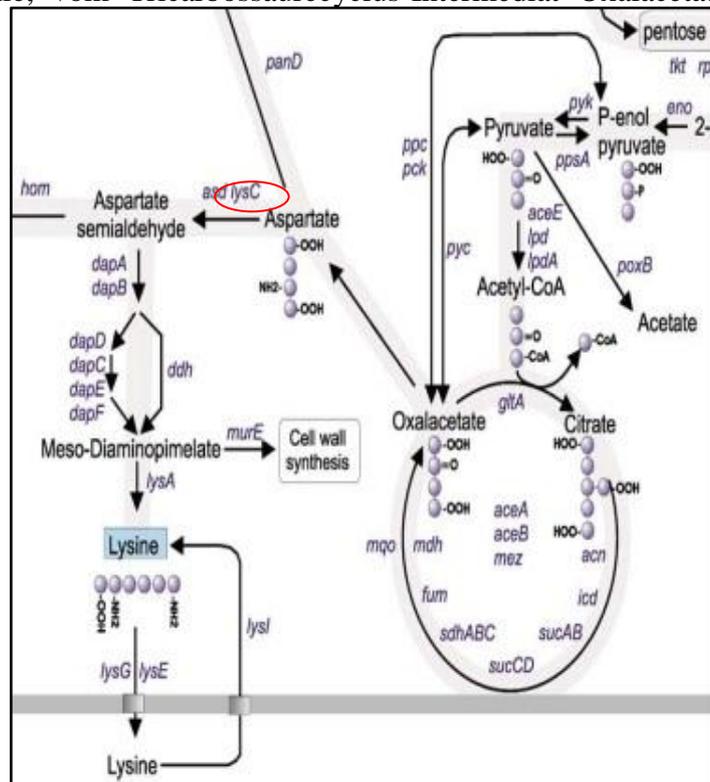


Abb. 1.2. Lysin Biosynthese in *Corynebakterium glutamicum*[10]

wird. Im letzten Schritt wird mit Hilfe der Diaminopimelat-Decarboxylase Lysin synthetisiert, das durch den spezifischen Lysinexporter (lysE) exportiert wird [23].

Die Lysinbiosynthese in *Corynebakterium glutamicum* wird an verschiedenen Stellen kontrolliert: So wird das für die Synthese aller Aminosäuren der Aspartat-Familie benötigte Enzym Aspartokinase (lysC) (Abb. 1.2. rot markiert) von den Endprodukten Lysin und Threonin gehemmt (s.a. Anhang Abb. 6.3.).

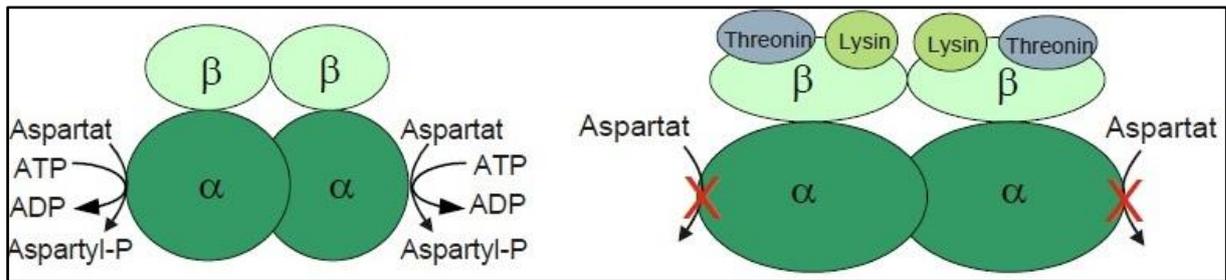


Abb. 1.3. Konformation der aktiven Aspartokinase mit katalytischen α -Untereinheiten und regulatorischen β -Untereinheiten und katalysierte Reaktion (links); Konformation der Feedback-inhibierten Aspartokinase mit veränderter Konformation durch Bindung von Threonin und Lysin an die regulatorische Untereinheit (rechts) [7]

Die Synthese von Aminosäuren in *Corynebakterium glutamicum* wird von natürlichen Regulationsmechanismen der Zelle so reguliert, dass nur das gebildet wird, was die Zelle für den Wachstum und die Teilung tatsächlich benötigt. Dadurch wird eine überschüssige Produktion von Aminosäuren in der Zelle vermieden.

Bei der Biosynthese von Lysin handelt es sich um eine gemeinsame Feedback-Inhibierung des Enzyms Aspartokinase (Abb.1.3.). Angriffspunkte für Lysin und Threonin sind die beiden regulatorischen β -Untereinheiten des Enzyms. Binden die Aminosäuren an die allosterischen Zentren der β -Untereinheiten, so sinkt die Affinität der katalytischen α -Untereinheiten für das Substrat Aspartat, und eine Überproduktion der Aminosäuren wird verhindert [7].

Für die Optimierung der Lysin Produktion ist das Aufheben dieser natürlichen Regulationsmechanismen von großer Bedeutung. Um überproduzierende Stämme zu erhalten, werden seit mehr als 50 Jahren viele Mutationen an *Corynebakterium glutamicum* durchgeführt. Bei dieser Arbeit wurde bei den Standardstämmen *Corynebakterium glutamicum*::CLYSC-MUT6-CPPC-R873G-26F und *Corynebakterium glutamicum*::CLYSC-MUT6-CPPC-N917G-8F durch eine gezielte Punktmutation im Gen der Homoserin-Dehydrogenase (hom), die Substitution an der Position 441 der Aminosäuresequenz des Enzyms, durchgeführt (Abb. 6.1.). Dadurch versuchte man die Feedback-Inhibierung des Enzyms Aspartokinase durch Lysin und Threonin zu verhindern. Homoserin-Dehydrogenase ist ein Zwischenprodukt in der Biosynthese von Threonin (s. Anhang Abb. 6.3.). Durch die vorhandene Mutation kann das Enzym seine Aufgaben nicht bzw. nicht vollständig ausführen. Die Mutation in der Homoserin-Dehydrogenase führt dazu, dass die Zelle kein Threonin mehr synthetisieren kann. Die gemeinsame Feedback-Inhibierung der Aspartokinase von Lysin und Threonin wird somit aufgehoben. Da Lysin alleine die Aspartokinase nicht regulieren kann, kommt es zu seiner Überproduktion. Ob diese Punktmutation zu dem erwünschten Ergebnis

führt, wurde in dieser Arbeit durch Konstruktion und anschließende Charakterisierung neuer Stämme mit Threonin unempfindlicher Homoserin-Dehydrogenase untersucht. Als Ausgangsstoff wurde ein pUC18 Plasmid mit eingebauter und bereits mutierter hom-Cassette vorgegeben. (*C. glutamicum* GenBank: BX927151, HOM: cg1337 gene 197692-199029; hom-Cassette: 197531-200289, 2759 bp; Mutationsbereich 198801-199030, 230 bp, s. Anhang Abb. 6.1.)

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in der Tabelle 2.1 und die Plasmide in der Tabelle 2.2 aufgeführt.

Tabelle 2.1. In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp/Phänotyp	Referenz
Escherichia Coli		
XL10-Gold®	Tet ^R Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI ^q ZΔM15 Tn10 (Tet ^R) Amy Cam ^R]	Jerpseth et al., 1997,1998 Aslanidis et al., 1990
DH5α TM mcr	F ⁻ mcrA (<i>mrr hsdRMS mcrB</i>) 80 <i>dlacZ</i> M15 (<i>lacZYA argF</i>) U169 <i>endA1 deo R thi sup E44 gyrA 96 relA1</i>	diese Arbeit
Corynebakterium glutamicum		
CLYSC-MUT6-CPPC-R873G-26F	<i>lysC_Q298A_ppc_R873G</i>	diese Arbeit
CLYSC-MUT6-CPPC-N917G-8F	<i>lysC_Q298A_ppc_N917G</i>	diese Arbeit

Tabelle 2.2. In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Eigenschaft	Referenz
pUC18	Amp ^r , cloning vector	Yanisch-Perron et al., 1985
pk18mobsacB	Kan ^r , oriVe. c., oriT, mob, sacB; von E. coli S17-1 durch seine mob-Region nach C. glutamicum übertragbar; Expression einer Levansucrase aus Bacillus subtilis (sacB)	diese Arbeit

2.2. Verwendete Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in der Tabelle 2.3. aufgeführt.

Tabelle 2.3. Verwendete Primer

Primer	Sequenz
R441A forward (F)	5'-gcaatcaacagtgtgatcgccctcgaaagggactaacg-3'
R441A reverse (R)	5'-cgttagtcccttcgagggcgatcacactgttgattgc-3'
NewHomCassette F-XbaI	5'- tctagactaaaaagctgggaaggtgaatc-3'
NewHomCassette R-BamHI	5'- ggatccagccgaagaactcgacgaa-3'
HomCassette R-BamHI	5'-accacgagactgcggaatgt-3'
Hom Mut-g 643-G644 F	5'-tgcagacgtcgaaggccatctcgccgatcc-3'
Hom Mut-g 643-G644 R	5'-ggatgcggcgagatggccttcgacgtctgca-3'

2.3. Chemikalien

Tabelle 2.4. Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
10x Buffer Fast Digest	Fermentas
6x DNA Loading Dye	Fermentas
Acetonitril	ROTH
Agar-Agar	ROTH
Ammoniumsulfat	ROTH
Ampicillin	Sigma
β -Alanin	Fluka
Calciumcarbonat	ROTH
Calciumchlorid	Riedel-De Haën AG
Corn steep liquor	Sigma
D-Biotin	Sigma
Eisensulfat·7H ₂ O	Fluka
Enzyme: BamHI, XbaI, ScaI	Fermentas
Essigsäure	ROTH
Glucose	ROTH
Harnstoff	Fluka
Hefeextrakt	Qiagen
Kaliumdihydrophosphat	ROTH
Kanamycin	Sigma
Magnesiumchlorid	Riedel-De Haën AG
Magnesiumsulfat	ROTH
Magnesiumsulfat·7H ₂ O	ROTH
Mangansulfat·H ₂ O	Merck
Natriumacetat	ROTH
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydroxid	ROTH

Nicotinsäure	Fluka
O'Gene Ruler™ DNA Ladder Mix	Fermentas
QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, USA
Saccharose	ROTH
Thiamin-HCl	Sigma
Trichloressigsäure	ROTH
Tryptone	OXOID, GB
x-Gal Solution (5-bromo-4-chlore-3-indolyl β D-Galactopyrynoside)	Fermentas

2.4. Geräte

Tabelle 2.5. Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller	Model
Analysenwaage	Sartorius	YPAC2105
Autoclave	Mediatech	Varioklav 75S/135S
Elektrophorese-System	Bio-Rad	Mini Sub Cell Gt
Kühlschrank	LiebHerr	PremiumFrost GN3056
Kühlzentrifuge	Thermo scientific	Biofuge fresco 17
Magnetrührer	Heidolph	MR3000
PCR	VWR	VWR
pH-Meter	Mettler Toledo	MP225
Schüttelschrank	NewBrunswick Scientific	Excella E24
Sicherheitswerkbank	Thermo scientific	Hera safe
Spektralphotometer	Thermo scientific	Genesis 10uv Scanning
Thermomixer	Eppendorf	5437
Vortexer	Bender & Hobein AG	Genie 2
Pipetten	Eppendorf	div.

2.5. Materialien

Tabelle 2.6. Verwendete Materialien

Material	Hersteller
Einmal-Küvetten	Plastibrand
Glasspipette	Sarstedt
Ipmföse	Sarstedt
Petri-Schallen	Greiner bio-one
Pipettenspitzen	Sarstedt
Plattierungsspatel	Sarstedt
Reagiergefäße	Sarstedt
Röhre	Sarstedt
Roti-Store Kryoröhrchen	ROTH

2.6. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

2.6.1. Nährmedien für *Corynebacterium glutamicum*

Folgende Medien wurden für *C. glutamicum* verwendet:

LB (Handbook of *Corynebacterium glutamicum*)

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

LBHIS (Handbook of *Corynebacterium glutamicum*)

Hirn-Herz-Infusion	37 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
Trypton	10 g/l
Sorbitol	182 g/l

DSMZ, Corynebakterium Medium (DSMZ, Leibniz-Institut)

Casein-Pepton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
Glucose	5 g/l
NaCl	5 g/l

LPG 2 (Ohnishi J et al, FEMS Microbiology Letters 242: 265-274)

Glucose	100 g/l
Corn steep liquor	10 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	45 g/l
Harnstoff	4,5 g/l
KH ₂ PO ₄	0,5 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g/l
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10 mg/l
MnSO ₄ ·4H ₂ O	10 mg/l
CaCO ₃	30 g/l
10x Vitamine	2 ml/l

10x Vitamine:

β-Alanin	50 mg/l
Nicotinsäure	50 mg/l
Thiamin HCl	50 mg/l
D-Biotin	3 mg/l

2.6.2. Nährmedien für Escherichia Coli

Zusätzlich zu dem LB-Medium wurde für E. coli folgendes Medium verwendet:

SOC (Promega)

Hefeextrakt	5 g/l
Trypton	20 g/l
Glucose	20 mM
Natriumchlorid	0,6 g/l

Kaliumchlorid	0,2 g/l
Magnesiumchlorid	10mM
Magnesiumsulfat	10mM

Für die Herstellung von Agarplatten wurden den oben genannten Medien 15 g/l Agar (ROTH, DE) zugegeben.

2.6.3. Antibiotika

Für die Selektion auf die entsprechenden Resistenzen bei *E. coli* wurden den Medien nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 60°C Antibiotika in folgenden Konzentrationen zugesetzt:

- Ampicillin 100 µg/ml (LB-Amp100)
- Kanamycin 50 µg/ml (LB-Km50)
- Kanamycin 25 µg/ml (LB-Km25)

Für *C. glutamicum* wurden folgende Antibiotikakonzentrationen verwendet:

- Kanamycin 15 µg/ml (LBHIS-Km15)
- Kanamycin 25 µg/ml (LB-Km25)

2.6.4. Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung

Bei dem Durchführen von molekularbiologischen Arbeiten wurden *E. coli* Stämme bei 37°C und *C. glutamicum* Stämme bei 30°C inkubiert bzw. kultiviert. Bei den Flüssigkulturen wurden diese bei 110-230 rpm geschüttelt.

Für die Lagerung von Bakterienkulturen wurden Kolonien von *C. glutamicum* von den DSMZ-Agarplatten in Roti-Store Kryoröhrchen überführt und bei -80°C eingefroren.

2.7. Kultivierung von *Corynebakterium glutamicum*

C. glutamicum wurde in 50 ml LPG 2 Medium (Ohnishi J et al, FEMS Microbiology Letters 242: 265-274) mit Glucose als Kohlenstoffquelle bei 30°C mit 230 rpm in 300 ml Erlenmeyerkolben mit vier Schikanen 78 h lang kultiviert. Zum Animpfen der Vorkulturen

wurden Einzelkolonien von DSMZ-Agarplatten verwendet, die nicht älter als 1 Woche waren. Die Vorkultivierung erfolgte 16 h lang in 30 ml DSMZ-Medium in 250 ml Erlenmeyerkolben mit 4 Schikanen, bevor die Hauptkultur zu 10% des Inoculums angeimpft wurde.

Die Probenahme erfolgte nach 24h, 30h, 48h, 54h, 72h, 78h. Es wurden jeweils 4 ml Proben genommen. 2 ml wurden bei 13000xg, 4°C, 10 min lang abzentrifugiert, der Überstand in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen. Der Überstand wurde für die Bestimmung von Aminosäurenkonzentration verwendet.

2.7.1. Bestimmung der Zellmasse

Zur Ermittlung der gewonnenen Zellmasse wurden während der Kultivierung nach bestimmten Zeitabständen Proben genommen. Um die Wachstumskurven von Bakterien anhand der Zellmasse aufstellen zu können, wurde eine photometrische Bestimmung der optischen Dichte bei 660 nm durchgeführt. Dabei wurden die Proben vor der Messung 1:100 in 0,1M HCl verdünnt, da die Proportionalität für die Messung der optischen Dichte nur in einem engen Bereich von 0,05 bis 0,6 gegeben ist.

2.8. Metabolitbestimmung

2.8.1. Aminosäurebestimmung

Die quantitative Bestimmung von der Aminosäure Lysin im Kulturmedium erfolgte durch high performance liquid chromatography (HPLC, Knauer).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde keine neue Methode für die Messung von Aminosäuren entwickelt. Die Proben wurden nach der Vorschrift von IBB vorbereitet und anschließend nach der vom Institut erarbeiteten Methode gemessen.

Probenvorbereitung:

1. Proteinfällung

- 20 µl Probe wurden mit 20 µl 20% Trichloressigsäure (TCA) gemischt und 10 min auf Eis inkubiert

- bei 13000xg 10 min lang zentrifugiert
 - Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt
2. pH-Wert Korrektur
 - der pH-Wert von den Proben wurde auf 7-8 mit 5M NaOH eingestellt
 3. Filtration
 - nach der pH-Wert Einstellung wurden die Proben durch einen Filter mit der Porenweite 0,2 µm filtriert, da keine Präzipitate in die Kapillare von HPLC gelangen dürfen
 4. Derivatisierung
 - Die Proben wurden nach Vorschrift von Waters derivatisiert (Waters AccQ-Fluor Reagent Kit, Waters Corporation, USA)

Eluentenvorbereitung

1. Eluent 1
 - 8,2030 g +/- 0,005 g Natriumacetat wurden in 1000 ml frisches MilliQ-Wasser hinzugegeben und ca. 3 min gemischt
 - 528 µl 100% Essigsäure wurden hinzugefügt und 5 min gemischt, anschließend wurde die Lösung auf 2 L aufgefüllt
 - Die Lösung wurde durch einen 0,2 µm Filter mittels einer Vakuumpumpe filtriert
 - 1350 ml wurden in eine 2 L Flasche überführt und 50 ml Acetonitril hinzugegeben
 - die Lösung wurde anschließend ca. 5 min gemischt.
2. Eluent 2
 - in eine 1L Flasche wurden 300 ml von dem Eluent 1 (ohne Acetonitril) und 150 µl 5M NaOH hinzugegeben und ca. 3 min gemischt
 - 700 ml Acetonitril wurden hinzugegeben und ca. 3 min gemischt.

2.9. Bestimmung der Konzentration und der Reinheit von DNA

Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer UV-Küvette. $OD_{260} = 1$ entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA bei pH 7,0.

$$\text{DNA Konz} = \text{Verdünnung} \cdot 50 \mu\text{g/ml} \cdot OD_{260}$$

Da die Nucleinsäurelösungen von der RNA, Proteinen und anderen Resten der Zelle kontaminiert werden können, bestimmt man die Reinheit der DNA-Lösung. Das Absorptionsmaximum bei Proteinen liegt bei 280 nm, das Verhältnis der OD_{260} zu OD_{280} zeigt an, wie stark die Lösung von den Resten verunreinigt ist.

$$\text{DNA Reinheit} = OD_{260}/OD_{280}$$

Ein Verhältnis von 1,8 spricht für eine reine DNA-Isolierung.

2.10. Molekularbiologische Techniken

2.10.1. Isolierung der Plasmid-DNA

Für die Plasmid-Präparation aus *E. coli* wurde das NucleoSpin® Plasmid Kit von Macherey-Nagel eingesetzt. Abhängig von dem Plasmid (low-copy/high-copy) wurden nach Herstellerangaben 2 unterschiedliche Vorgehensweisen gewählt.

Bei der Isolierung von pUC18 Plasmid (high-copy) aus *E. coli* wurden 5 ml Kultur 3 min lang bei 13000xg abzentrifugiert, der Überstand verworfen und mit den pelletierten Zellen weitergearbeitet.

Bei der Isolierung von pk18mobsacB (low-copy) aus *E. coli* wurden 10 ml Bakterienkultur 1 min bei 11000xg abzentrifugiert, der Überstand verworfen und mit dem Pellet nach den Angaben des Herstellers weitergearbeitet.

2.10.2. Isolierung der chromosomalen DNA aus *C. glutamicum*

Die Präparation chromosomaler DNA erfolgte nach dem NucleoSpin® Tissue Kit von Macherey-Nagel. Da *C. glutamicum* ein Gram-positives Bakterium ist und die Zellyse somit erschwert wird, sollten die Zellen vorbehandelt werden.

C. glutamicum Zellen wurden über Nacht im 5 ml DSMZ-Medium kultiviert, danach 1 ml 5 min bei 8000xg abzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 180 µl von 20 mM Tris/HCl; 2 mM EDTA; 1% Triton X-100; pH 8 mit zugesetztem 20 mg/ml Lysozym resuspendiert und bei 37°C 1h lang inkubiert.

Danach wurden dieser Lösung 25 µl Proteinase K (Macherey-Nagel) zugegeben und bei 56°C, 1000 rpm in dem Thermomixer über Nacht inkubiert. Im nächsten Schritt wurde gemäß den Herstellerangaben nach dem Protokoll für die DNA Isolierung aus einer Bakterienkultur vorgegangen.

2.10.3. Restriktion und Ligation von DNA

Die Restriktion von der Plasmid-DNA wurde mit Restriktionsenzymen von der Firma Fermentas durchgeführt.

Beim Schneiden von pUC18//newhom-R441A wurden folgende Reaktionslösung angesetzt:

Plasmid-DNA	1 µl
BamHI	0,75 µl
XbaI	0,75 µl
ScaI	0,75 µl
10x Puffer FD	3 µl
steril. H ₂ O	23,75 µl

Beim Schneiden von pk18mobsacB//newhom-R441A wurde folgendes Reaktionsgemisch angesetzt:

Plasmid-DNA	1 µl
BamHI	0,75 µl
XbaI	0,75 µl

10x Puffer FD	3 μ l
Steril. H ₂ O	24,5 μ l

Beide Reaktionslösungen wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die Ligation der DNA-Fragmente wurde mit T₄ DNA Ligase, 10x Ligase Puffer und ATP von Promega durchgeführt. Dephosphorylierung des DNA-Fragments wurde bereits vor dem Experiment durchgeführt.

Folgende Reaktionslösung wurde für die Ligation angesetzt:

Insert (newhom-R441A//BamHI-XbaI)	12,19 μ l
Vektor (pk18mobsacB//BamHI-XbaI-P*)	4 μ l
10x Ligase Puffer	2,5 μ l
100mM ATP	0,2 μ l
steril. H ₂ O	6,11 μ l
T ₄ DNA Ligase	1 μ l

Die Lösung wurde bei 4°C über Nacht inkubiert.

2.10.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung und Größenbestimmung der DNA-Fragmente, sowie zur Abschätzung der DNA-Konzentrationen eingesetzt. Es wurden 1%ige (w/v) Agarose-Gele verwendet (35 ml TAE-Puffer + 0,35 g Agarose). Für die Aufreinigung der DNA-Fragmente wurden 1,5%ige (w/v) Agarose-Gele hergestellt (35 ml TAE Puffer + 0,525 g Agarose). Die Gelelektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 70 V, 60 min, lang durchgeführt. Nach der Auftrennung wurde das Gel in einer SYBR-Gold-Lösung (1:5000 TAE-Puffer: SYBR-Gold) mind. 30 min gefärbt und die Banden im UV-Licht detektiert.

Als DNA Ladepuffer wurden 6x DNA Loading Dye und als DNA Größenstandard O'Gene Ruler™ DNA Ladder Mix von Fermentas verwendet (Die Markerleiter s. Anhang Abb.6.2.)

Die Extraktion der DNA-Fragmente aus dem Agarose-Gel erfolgte nach dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel). Die Isolierung wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt.

Bei der Bestimmung der DNA-Konzentration wurde 1%iges Agarosegel vorbereitet. Im Gegensatz zu der photometrischen Konzentrationsbestimmung braucht man bei dieser Methode ein geringeres Volumen an DNA Probe (5 μ l; für die OD-Messung mind. 10 μ l). Die Dicke der DNA-Bande wird mit der Dicke der Marker-Bande bei 3000 kb (O'Gene Ruller DNA Ladder Mix, Fermentas) verglichen. Dicke der Marker-Bande bei 3000 kb entspricht 60 ng.

2.10.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde hier zur Amplifizierung der DNA-Fragmente und zur Klonierung bestimmter Gene eingesetzt. Die Durchführung erfolgte mit dem Thermocycler (VWR), Annealing-Temperatur und Elongationszeit richteten sich nach dem jeweiligen Fragment und seinen Primern. Zur Vervielfältigung von pUC18//newhom-Cassette (5,6 kb) wurde das QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Stratagene, USA) verwendet. Amplifiziert wurde die DNA mit PfuUltra HF DNA Polymerase, die Primer im Wasser auf 100 ng/ μ l verdünnt. Für einen 50 μ l Reaktionsansatz wurden zusammenpipettiert:

10x Reaktionspuffer	5 μ l
dsDNA template	1 μ l (10 ng von der Stammlösung 280 μ l/ml)
Primer F-R441A	1, 25 μ l
Primer R-R441A	1, 25 μ l
dNTPmix	1 μ l (2 mM)
QuickSolution	3 μ l
ddH ₂ O	36, 5 μ l
PfuUltra HF DNA Polymerase	1 μ l (2, 5 U/ μ l)

Das Amplifikationsprogramm umfasste folgende Schritte:

Abschnitt 1	1 Zyklus	95°C	1 min
Abschnitt 2	18 Zyklen	95°C	50 sec
		60°C	50 sec
		68°C	2, 5 min/kb Plasmid
Abschnitt 3	1 Zyklus	68°C	15 min
Abschnitt 4		4°C	

Für die Klonierung von newhom-Cassette (2759 bp) wurde Pfu DNA Polymerase (2,5 U/ μ l) verwendet. Die Primer wurden auf 50 ng/ μ l im sterilen Wasser verdünnt. Für 50 μ l Reaktionsansatz wurden zusammenpipettiert:

DNA template	1 μ l (0,1 μ g/ μ l)
Primer newhomCassette F-XbaI	0,75 μ l
Primer newhomCassette R-BamHI	0,75 μ l
dNTPmix	5 μ l (2mM)
10x Pfu Puffer + MgSO ₄	5 μ l
ddH ₂ O	37 μ l
Pfu DNA Polymerase	0,5 μ l (2,5 U/ μ l)

Das Programm umfasste folgende Schritte:

Abschnitt 1	Deckel aufwärmen	110°C
Abschnitt 2	Schritt 1	95°C
Abschnitt 3	Schritt 1	95°C
	Schritt 2	64°C
	Schritt 3	72°C
Abschnitt 4	Schritt 1	95°C
	Schritt 2	52°C
	Schritt 3	72°C
Abschnitt 5	Schritt 1	72°C
	Schritt 2	4°C

2.10.6. Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Die Sequenzierung aller DNA-Fragmente wurde von Sequence Laboratories Göttingen durchgeführt.

Vor dem Einsenden von pUC18//newhom-R441A Proben wurden diese folgendermaßen vorbereitet:

Jede Plasmid-DNA Probe wurde mit jeweils 5 verschiedenen Primer (NewHomCassette F-XbaI, NewHomCassette R-BamHI, HomCassette R-BamHI, Hom Mut-g 643-G644 F, Hom Mut-g 643-G644 R)(s. Tabelle 2.3) versetzt.

Plasmid-DNA	Nr. 1 2,8 µl/ Nr.4 3,1 µl/ Nr. 7 3 µl
Primer (10pmol/µl)	2 µl
AE Puffer	Nr. 1 2,2 µl/ Nr.4 1,9 µl/ Nr. 7 2 µl

Vor dem Einschicken von newhom-R441A-Cassette Proben wurden sie wie folgt vorbereitet: Alle DNA Proben wurden im ersten Schritt mit dem Primer HomCassette R-BamHI versetzt (Das Erhaltensein der Mutation an R441A Position wurde überprüft). Im zweiten Schritt wurden die Proben mit dem Primer NewHomCassette F-XbaI versetzt(Die gesamte newhom-R441A Cassette Sequenz wurde überprüft)(s. Anhang Abb. 6.1.).

DNA	7 µl
Primer (10pmol/µl)	0,5 µl

2.11. Techniken zur Manipulation von Zellen

2.11.1. Transformation von E. coli

Die Transformation von E. coli mit Plasmid-DNA erfolgte nach zwei unterschiedlichen Methoden. Die Transformation von E. coli XL-10 Gold mit pUC18//newhom-Cassette erfolgte nach dem QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Stratagene, USA) gemäß den Herstellerangaben.

Die Transformation von E. coli DH5α MCR mit pk18mobsacB//newhom-R441A erfolgte nach dem Practical Course: From Gene to Product (TUHH, IBB).

100 µl kompetente Zellen von E. coli DH5α MCR wurden aus dem Gefrierfach (-80°C) genommen und nicht länger als 2 min auf dem Eis aufgetaut. 3/5/7 µl DNA-Lösung wurden hinzugefügt und vorsichtig gemischt. Die Lösung wurde danach 45 min lang auf dem Eis

inkubiert. Nach 45 min wurden die Zellen 45 sec lang bei 42°C im Thermoblock gehalten. Nach dem Hitzeschock sollten die Zellen für 10 min auf Eis gestellt werden.

Transformierte Zellen wurden anschließend in 900 µl auf 42°C vorgewärmtes SOC-Medium hinzugegeben und 1 h lang bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen auf zwei LB-Km50 Agarplatten im Volumen von 250 µl und 750 µl ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.11.2. Transformation von *C. glutamicum*

Die Transformation von *C. glutamicum* Zellen erfolgte durch Elektroporation (Dunican et al., 1989; Liebl et al., 1989; Wolf et al., 1989). Bei dieser Arbeit wurden 2 unterschiedliche kompetente Zellen von *C. glutamicum* verwendet: *C. glutamicum*::CLYSC-MUT6-CPPC-R873G-26F und *C. glutamicum*::CLYSC-MUT6-CPPC-N917G-8F.

100 µl Zellen wurden aus -80°C Kühlfach entnommen und nicht länger als 3 min auf dem Eis aufgetaut. Danach wurde 1 µl DNA-Lösung hinzugefügt. Die Zellen wurden 15 min lang auf dem Eis inkubiert und anschließend in eine 0,2 cm Elektroporation-Küvette überführt. Die Zellsuspension wurde dem elektrischen Feld ausgesetzt (Elektroporatoreinstellungen: 25 µF, 400 Ω, 2,5 kV, 12 msec), 1 ml BHIS-Medium hinzugefügt und 6 min lang bei 46°C in einem Heizblock inkubiert. Die Reaktionsgefäße mit der Zellsuspension sollten dann nach genau 6 min auf Eis gestellt werden. Bei 30°C und 110rpm wurden die Zellen 4 h lang inkubiert. Zunächst nach 3 h, dann nach 4 h wurden 500 µl der Zellsuspension auf LBHIS-Km15 ausplattiert und bei 30°C 48h inkubiert.

2.11.3. Screening von Mutanten

Für die Kontrolle der Transformation von *E. coli* XL-10 Gold mit pUC18//newhom-Casette wurde eine Blau-Weiß-Selektion durchgeführt, um die Mutanten mit dem aufgenommenen Plasmid identifizieren zu können. Dafür wurden LB-Amp100 Agarplatten verwendet, auf denen zunächst x-Gal und IPTG ausgestrichen wurden (QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit, Agilent Technologies, Stratagene, USA). Nach 24 h konnten die Mutanten isoliert werden (weiße Kolonien), die die Plasmid-DNA aufgenommen haben.

Nach der Transformation von *E. coli* DH5 α MCR mit pk18mobsacB//newhom-R441A wurde eine Selektion nach Resistenz der Zellen gegen Kanamycin, Ampicillin und Verträglichkeit von Saccharose durchgeführt. Pk18mobsacB trägt zwei Selektionsmarker: ein Kanamycinresistenzgen Kan^R und ein sacB-Gen, dessen Produkt für Zellen letal ist, die auf Saccharose-haltigem Medium wachsen. Dafür wurden die Zellen auf 3 Agarplatten ausgestrichen: LB-Km50, LB-Suc10-Km25 und LB-Amp100. Es wurde immer eine einzelne Kolonie von der LB-Km50 Agarplatte genommen und auf jede der drei Agar-Platten ausgestrichen. Die Mutanten wurden nach 24 h isoliert. Diejenigen Kolonien, die nur auf LB-Km50 gewachsen sind, enthielten die durch Transformation eingebrachte Plasmid-DNA pk18mobsacB//newhom-R441A.

Nach der Elektrotransformation von *C. glutamicum*::CLYSC-MUT6-CPPC-R873G-26F und *C. glutamicum*::CLYSC-MUT6-CPPC-N917G-8F mit pk18mobsacB//newhom-R441A wurde eine ähnliche Selektionsmethode ausgewählt. Die Selektion wurde nach Handbook for *Corynebacterium glutamicum* durchgeführt [5].

Im ersten Selektionsschritt wurde die Aufnahme von der Plasmid-DNA in die Zelle überprüft. Dafür wurden 15 einzelne Kolonien von der LBHIS-Km15 Agarplatten in 5 ml LB Medium bei 30°C und 230 rpm über Nacht kultiviert. Von jeder Probe wurden dann 4 Verdünnungen von 10⁻¹ bis 10⁻⁴ im LB Medium hergestellt. 100 μ l von jeder Verdünnung wurden wie folgt ausgestrichen:

10 ⁻¹ bis 10 ⁻⁴	auf LB-Suc10
10 ⁻²	auf LB-Km25-Suc10
10 ⁻⁴	auf LB-Km25

Die Platten wurden bei 30°C 48 h lang inkubiert. Kleine Kolonienzahl auf LB-Km25 Platten, aber große Kolonienzahl auf LB-Km25-Suc10 waren der Hinweis auf das Vorhandensein von pk18mobsacB//newhom-R441A in der Zelle.

Im zweiten Selektionsschritt wurden die Mutanten isoliert, bei denen die newhom-R441A-Cassette in die chromosomale DNA der Zelle integriert wurde. Dafür wurden die Zellen auf den Verlust des pk18mobsacB Vektors und somit fehlende Kanamycinresistenz überprüft.

Einzelne Kolonien von den LB-Suc10 Platten wurden auf jeweils LB und LB-Km25 Platten ausgestrichen und bei 30°C über Nacht inkubiert. Ausschließlich diejenigen Kolonien, die nur auf LB und nicht LB-Km25 gewachsen sind, wiesen die vollständige Integration von newhom-R441A-Cassette auf.

3. Ergebnisse

3.1. Konstruktion von *C. glutamicum* Mutanten

3.1.1. Transformation der pUC18//newhom Plasmid-DNA in die *E. coli* XL-10 Gold

Als Ausgangsstoff für diese Arbeit wurde eine pUC18//newhom-R441A Plasmid-DNA gegeben, die eine Punktmutation im Gen der Homoserin-Dehydrogenase, die Substitution an der Position 441 der Aminosäuresequenz des Enzyms, enthält.

Die Konzentration der Plasmid-DNA in der Lösung betrug 280 µg/ml, die Reinheit 1,87. Die Länge von pUC18 beträgt ca. 2,7 kb, die Länge der newhom-R441A-Cassette beträgt ca. 2,8 kb (s. Anhang Abb.6.1.).

Nach dem die Plasmid-DNA im ersten Schritt durch PCR vervielfältigt wurde, wurde die Transformation der pUC18//newhom-R441A Plasmid-DNA in die *E. coli* XL-10 Gold durchgeführt. Die transformierten Zellen wurden auf insg. 3 LB-Amp100-IPTG-X-Gal Agarplatten ausgestrichen, mit jeweils 50 µl, 100 µl und 350 µl Zellsuspension. Nach 24 h konnten die Platten mit Kolonien ausgewertet werden. (Abb. 3.1, Abb. 3.2 und Abb. 3.3)

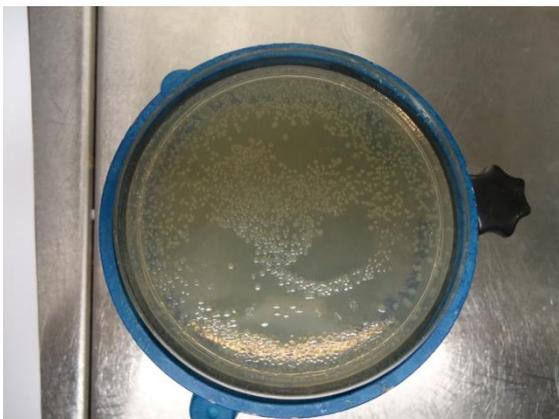


Abbildung 3.1. LB-Amp100-IPTG-x-Gal Platte mit 50 µl Zellsuspension von *E. coli* XL-10 Gold::pUC18//newhom-R441A



Abbildung 3.2. LB-Amp100-IPTG-x-Gal Platte mit 150 µl Zellsuspension von *E. coli* XL-10 Gold::pUC18//newhom-R441A



Abbildung 3.3. LB-Amp100-IPTG-x-Gal Platte mit 350 µl Zellsuspension von E. coli XL-10 Gold::pUC18/newhom-R441A

Das Ergebnis war positiv, alle Kolonien waren weiß, d.h. alle haben das Plasmid pUC18/newhom-R441A durch die Transformation aufgenommen.

Die Platten mit 150 µl und 350 µl Zellsuspension waren zu bewachen, so dass die Abnahme einer einzelnen Kolonie erschwert wurde. Aus diesem Grund wurden für die Isolierung der Plasmid-DNA 7 Kolonien von der Platte mit 50 µl (s. Abb. 3.1.) genommen und in 10 ml LB-Amp-100 bei 37°C 230 rpm 16 h lang inkubiert.

Nach der Isolierung der Plasmid-DNA wurden die Konzentrationen der Proben sowie ihre Reinheit bestimmt (s. Tabelle 3.1.).

Tabelle 3.1. Ergebnisse der Konzentrationsmessung und Reinheit von pUC18//New-hom-R441A

Probe Nr.	Konzentration [µg/ml]	Reinheit
1	250	1,92
2	210	1,83
3	165	1,83
4	225	1,88
5	155	1,94
6	230	1,77
7	235	1,96

3.1.2. Restriktion von pUC18//newhom-R441A

Im nächsten Schritt wurden die Plasmid-DNA-Proben mit 3 Restriktionsenzymen (BamHI, ScaI, XbaI) über Nacht bei 37°C geschnitten. Das Ergebnis wurde durch das Agarose-Gel sichtbar gemacht. Es konnte nachgewiesen werden, dass die isolierte Plasmid-DNA pUC18/newhom-R441A war, da es drei Banden zu sehen waren: 1. Bande bei ca. 2,8 kb, 2. Bande bei ca. 2 kb, 3. Bande bei ca. 1,5 kb. (s. Abb. 3.4.)

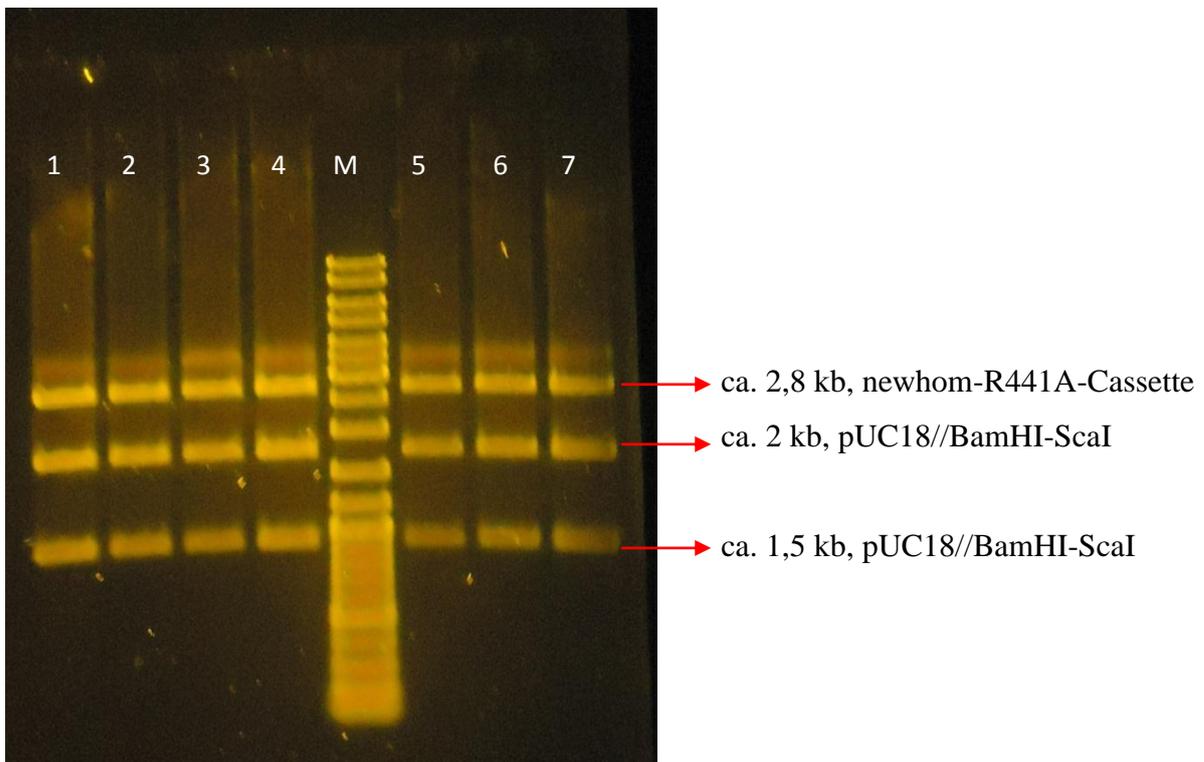


Abbildung 3.4. pUC18/newhom-R441A 3 Digestion mit BamHI, XbaI, ScaI, 1%iges Agarose-Gel (M=Marker)

Für die weitere Arbeit wurden nur 3 Proben mit der höchsten Konzentration und bester Reinheit gewählt: Probe Nr. 1, Nr. 4 und Nr. 7 (s. Tabelle 3.1.) Diese Proben wurde für die Sequenzierung mit je 5 unterschiedlichen Primer vorbereitet (NewHom Cassette F-XbaI, NewHom Cassette R-BamHI, Hom Cassette R-BamHI, Hom mut-g643C-G644TF, Hom mut-g643C-G644TR) und nach Sequence Laboratories Göttingen geschickt.

3.1.3. Isolierung der newhom-R441A-Cassette

Die Sequenzierung der 3 Plasmid-DNA Proben hat ergeben, dass die Punktmutation im Gen der Homoserin-Dehydrogenase (R441A) erhalten blieb und keine weiteren unerwünschten Mutationen entstanden sind. Die Probe Nr. 1 wurde wiederholt mit 3 Restriktionsenzymen über Nacht bei 37°C geschnitten und auf ein 1,5%iges Agarose-Gel aufgetragen. Die Bande bei ca. 2,8 kb für newhom-R441A-Cassette wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit extrahiert. Da das Extraktionsvolumen nur 45 µl betrug, wurde die Konzentration von der newhom-R441A-Cassette mit Hilfe von 1%igem Agarose-Gel bestimmt. Es wurden 5 µl Probe auf das Gel aufgetragen.

Die Dicke der Bande für newhom-R441A-Cassette entsprach der Dicke von der Marker-Bande bei 3 kb. Diese Dicke entspricht der Konzentration von 60 ng. Da für die Messung 5 μ l verwendet wurden, betrug die Konzentration der isolierten newhom-R441A-Cassette 12 ng/ μ l. (s. Anhang Abb. 6.2.)

3.1.4. Ligation von newhom-R441A-Cassette mit pk18mobsacB

Entscheidend für die Ligation-Reaktion ist die Konzentration der DNA Probe. Die Menge der eingesetzten Inserts newhom-R441A-Cassette wurde nach folgender Formel ermittelt:

$$V_{\text{Insert}} = \frac{\text{ng Vektor} \cdot \text{kb Insert}}{\text{kb Vektor}} / \text{Konz}_{\text{Insert}}$$

Die Länge der newhom-R441A-Cassette beträgt 2,759 kb, die Länge des Vektors pk18mobsabB beträgt 5,66 kb. Für die Ligation-Reaktion sollte die Menge von dem Vektor 100 ng betragen, deswegen wurden für die Reaktion 4 μ l der Plasmid-Lösung hinzugegeben.

$$V_{\text{Insert}} = \frac{100 \text{ ng} \cdot 2,759 \text{ kb}}{5,66 \text{ kb}} = 48,75 \text{ ng}$$

Man verwendet für die Ligation-Reaktion das 3x-fache an dem Insert, da bei einem Überschuss an Insert im Verhältnis zum Vektor eine höhere Ausbeute an dem Produkt erzielt wird. D.h. die eingesetzte Menge an newhom-R441A-Cassette betrug:

$$\frac{48,75 \text{ ng} \cdot 3}{12 \text{ ng}/\mu\text{l}} = 12,19 \mu\text{l}$$

Die Reaktionslösung wurde bei 4°C über Nacht inkubiert.

Mit einem 1% Agarose-Gel wurde das Produkt der Ligation geprüft. Bei der erfolgreichen Ligation sollte die neue Plasmid-DNA ca. 8,4 kb betragen (s. Abb. 3.5)

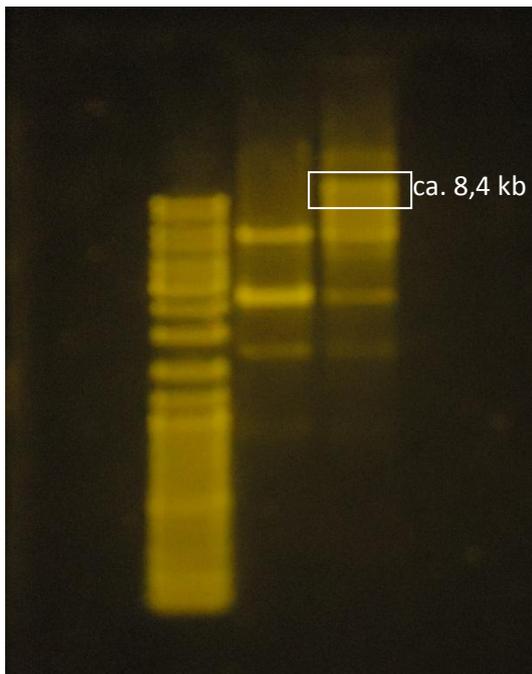


Abbildung 3.5. Ergebnis der Ligation von pk18mobsacB und newhom-R441A-Cassette (rechts), Marker(links), Kontrolle ohne T₄ DNA Ligase (Mitte)

3.1.5. Transformation von pk18mobsacB//newhom-R441A in E. coli DH5 α MCR

Nach der erfolgreichen Ligation von pk18mobsacB mit newhom-R441A-Cassette zu einem neuen Plasmid pk18mobsacB//newhom-R441A sollte dieses in die E. coli DH5 α MCR eingeschleust werden. Die Transformation wurde mit 3 unterschiedlichen Mengen an Plasmid-DNA durchgeführt: 3 μ l, 5 μ l und 7 μ l.

Nach der Transformation und anschließender Inkubation wurden die Zellen auf insgesamt 6 LB-Km50 Agarplatten ausgestrichen, in den Mengen von 250 μ l und 750 μ l. Am nächsten Tag wurden die Kolonien ausgezählt. (s. Tabelle 3.2.)

Tabelle 3.2. Kolonienzahl von E. coli DH5 α MCR::pk18mobsacB//newhom-R441A

Plasmidvolumen	Kolonienzahl (Zellvolumen 250 μ l)	Kolonienzahl (Zellvolumen 750 μ l)
3 μ l	28	33
5 μ l	46	30
7 μ l	30	78

In den Abbildungen 3.6. und 3.7. sind die Agarplatten von *E. coli* DH5 α MCR::pk18mobsacB//newhom-R441A dargestellt.

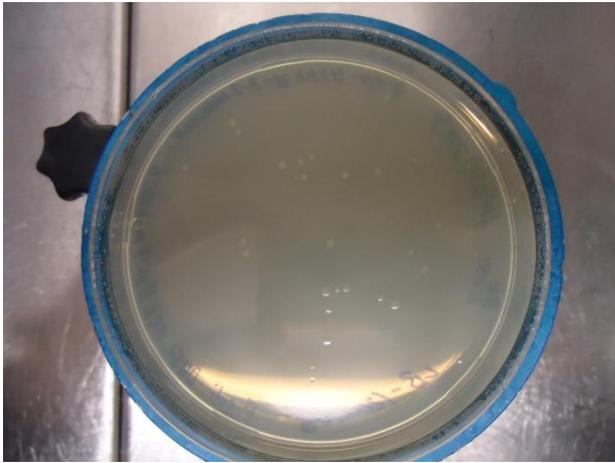


Abbildung 3.6. *E. coli* DH5 α MCR::pk18mobsacB//newhom-R441A (3 μ l Plasmid und 250 μ l Zellsuspension)

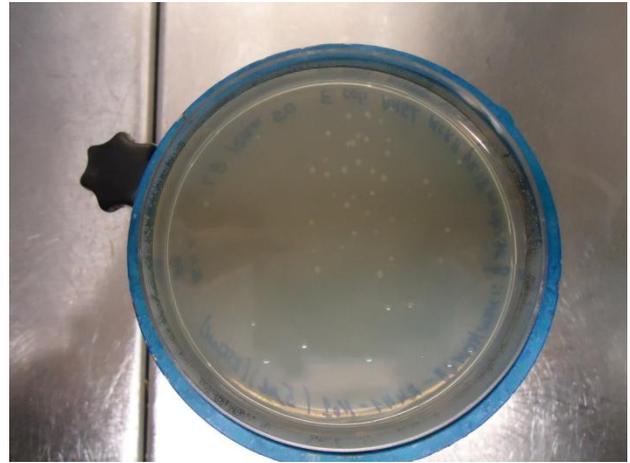


Abbildung 3.7. *E. coli* DH5 α MCR::pk18mobsacB//newhom-R441A (3 μ l Plasmid und 750 μ l Zellsuspension)

3.1.6. Selektion von *E. coli* DH5 α MCR::pk18mobsacB//newhom-R441A

Von allen 6 Agarplatten mit *E. coli* DH5 α MCR::pk18mobsacB//newhom-R441A werden insgesamt 40 Kolonien isoliert und auf je 3 unterschiedliche Agarplatten ausgestrichen: LB-Km50, LB-Suc10-Km25 und LB-Amp100. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Zellen mit dem richtigen Plasmid pk18mobsacB//newhom-R441A können nur auf LB-Km50 wachsen, da pk18mobsacB zwei Selektionsmarker trägt: ein Kanamycinresistenzgen Kan^R und ein sacB-Gen, dessen Produkt für Zellen letal ist, die auf Saccharose-haltigem Medium wachsen.

In der Tabelle 3.3. sind die Ergebnisse der Selektion dargestellt.

Tabelle 3.3. Ergebnisse der Selektion von *E. coli* DH5 α MCR::pk18mobsacB//newhom-R441A (Kolonie gewachsen ,+‘, Kolonie nicht gewachsen ,-‘)

Kolonienr.	LB-Km50	LB-Suc10-Km25	LB-Amp100
1	-	-	-
2	+	-	-
3	+	-	-
4	+	+	+
5	+	+	+
6	+	+	+
7	+	+	+
8	+	+	+
9	+	-	-
10	+	+	+
11	+	+	+
12	+	+	+
13	+	-	-
14	+	-	-
15	+	+	+
16	+	+	+
17	+	-	-
18	+	+	+
19	+	+	+
20	+	-	-
21	+	-	-
22	+	-	-
23	+	-	-
24	+	+	+
25	+	+	+
26	+	+	+
27	+	-	-
28	+	-	-
29	+	-	-
30	+	+	+
31	+	+	+
32	+	+	+
33	+	+	+
34	+	-	-
35	+	-	-
36	+	+	+
37	+	+	+
38	+	+	+
39	+	+	+
40	+	-	-

Die blau markierten Kolonien sind nur auf LB-Km50 gewachsen und wurden für die weitere Arbeit isoliert (Kolonien: 9,13,20,23,40). Jede Kolonie wurde in 20 ml LB-Km50 bei 37°C, 230 rpm 16 h lang kultiviert.

3.1.7. Extraktion von pk18mobsacB//newhom-R441A

Nach 16 wurde die Plasmid Extraktion vorgenommen. Anschließend nach der Plasmid-Extraktion wurden die Konzentrationen von den DNA Proben photometrisch bestimmt. (s. Tabelle 3.4.)

Tabelle 3.4. DNA-Konzentrationen von pk18mobsacB//newhom-R441A

ProbenNr.	Konzentration µg/ml	Reinheit
9	355	1,78
13	130	1,73
20	440	1,66
23	400	1,70
40	255	1,88

Alle DNA-Proben wurden mit 2 Restriktionsenzymen BamHI und XbaI bei 37°C über Nacht geschnitten. Damit sollte überprüft werden, ob bei der Plasmid-DNA pk18mobsacB//newhom-R441A die newhom-R441A-Cassette erhalten blieb.

Die Digestion-Produkte wurden auf 1%iges Agarose-Gel aufgetragen. Bei einer positiven DNA-Probe sollten 2 Banden zu sehen sein, 1. Bande bei ca. 5,66 kb für pk18mobsacB und die 2. Bande bei ca. 2,8 kb für die newhom-R441A-Cassette. (Abb. 3.8.)

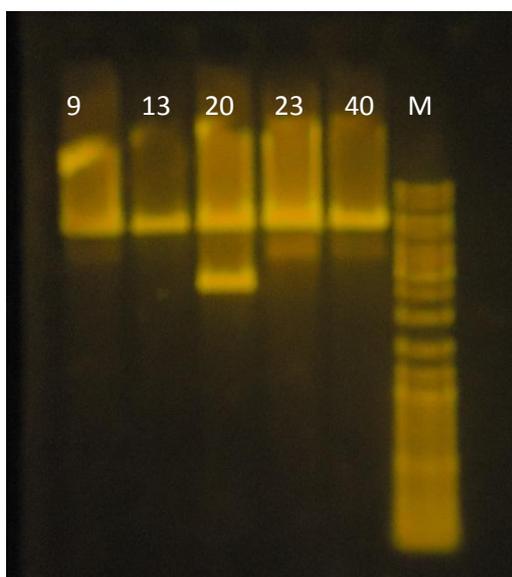


Abbildung 3.8. Digestion von pk18mobsacB//newhom-R441A mit BamHI und XbaI (rechts Marker)

Bei den Proben 9, 13, 23 und 40 war nur 1 Bande bei ca. 5,66 kb zu sehen. Nur die Probe Nr. 20 hatte 2 Banden und somit die newhom-R441A-Cassette.

3.1.8. Elektroporation von pk18mobsacB//newhom-R441A mit *C. glutamicum*

Es wurden 2 verschiedene kompetente Zellen von *C. glutamicum* zur Verfügung gestellt: *C. glutamicum*::CLYSC-MUT6-CPPC-R873G-26F und *C. glutamicum*::CLYSC-MUT6-CPPC-N917G-8F. Die Zellen wurden bei -80°C aufbewahrt.

Bei der Elektroporation wurde die Plasmid-DNA von der Probe Nr. 20 verwendet. Die Konzentration der DNA betrug $440 \mu\text{g/ml} = 0,44 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Die für die Transformation benötigte Menge an der Plasmid-DNA sollte $1 \mu\text{l}$ betragen: $1 \mu\text{g}/0,44 \mu\text{g}/\mu\text{l} = 2,27 \mu\text{l}$.

Die Sollwerte für die Elektropolator Einstellungen waren $25 \mu\text{F}$, 400Ω , $2,5 \text{ kV}$, 12 msec , die tatsächlichen Werte sind in der Tabelle 3.5 angegeben:

Tabelle 3.5. Ist-Werte der Elektroporation

Probe	Spannung [kV]	Zeit [msec]	Widerstand [Ω]	El. Kapazität [μF]
<i>C. glutamicum</i> ::CLYSC-MUT6-CPPC-R873G-26F	2,53	7,70	400	25
<i>C. glutamicum</i> ::CLYSC-MUT6-CPPC-R873G-26F	1,14	6,54	400	25
<i>C. glutamicum</i> ::CLYSC-MUT6-CPPC-R873G-26F	2,53	2,28	400	25
<i>C. glutamicum</i> ::CLYSC-MUT6-CPPC-N917G-8F	1,09	5,52	400	25
<i>C. glutamicum</i> ::CLYSC-MUT6-CPPC-N917G-8F	2,01	5,68	400	25
<i>C. glutamicum</i> ::CLYSC-MUT6-CPPC-N917G-8F	2,53	5,66	400	25

Nach der Transformation sollten die Zellen insgesamt 4 Stunden in BHIS bei 30°C und 110 rpm inkubiert werden. Nach 3 h wurden die ersten 500 μl auf eine LBHIS-Km15 Agarplatte

ausplattiert, nach 4 h wurden die restlichen 500 µl auf eine weitere LBHIS-Km15 Agarplatte ausplattiert. Die Platten wurden bei 30°C, 48 h lang inkubiert. Danach wurden die Kolonien ausgezählt (s. Tabelle 3.6.)

Tabelle 3.6. Kolonienzahl von *C. glutamicum* nach der Elektroporation

Probe	3 h	4 h
<i>C. glutamicum</i> ::CLYSC -MUT6-CPPC-R873G-26F	0	1
<i>C. glutamicum</i> ::CLYSC -MUT6-CPPC-R873G-26F	2	6
<i>C. glutamicum</i> ::CLYSC -MUT6-CPPC-R873G-26F	2	1
<i>C. glutamicum</i> ::CLYSC -MUT6-CPPC-N917G-8F	3	2
<i>C. glutamicum</i> ::CLYSC -MUT6-CPPC-N917G-8F	12	3
<i>C. glutamicum</i> ::CLYSC -MUT6-CPPC-N917G-8F	11	11

3.1.9. Selektion von *C. glutamicum* Mutanten

Die Selektion wurde nach Handbook of *Corynebacterium glutamicum* durchgeführt.

Im ersten Schritt wurden die Zellen auf das Vorhandensein der Plasmid-DNA pk18mobsacB//newhom-R441A untersucht. Dafür wurden 6 Kolonien von den Platten mit *C. glutamicum*::CLYSC-MUT6-CPPC-R873G-26F und 9 Kolonien von den Platten mit *C. glutamicum*::CLYSC-MUT6-CPPC-N917G-8F isoliert und über Nacht bei 30°C und 230 rpm im 5 ml LB Medium kultiviert.

Proben 1 bis 6: *C. glutamicum*::CLYSC-MUT6-CPPC-R873G-26F

Proben 7 bis 15: *C. glutamicum*::CLYSC-MUT6-CPPC-N917G-8F

Nach dem die Zellen gewachsen sind wurden 4 Verdünnungsreihen hergestellt und je 100 µl nach der Vorschrift auf je 3 unterschiedliche Platten ausgestrichen: LB-Suc10, LB-Km25-Suc10, LB-Km25. Die Platten wurden bei 30°C, 48 h lang inkubiert.

Die Zellen, die in großer Zahl auf LB-Km25 aber in kleiner Zahl auf LB-Km25-Suc10 gewachsen sind, werden für die 2. Selektion verwendet. Bei diesem Experiment waren alle 15 Proben positiv. In den Abb. 3.9.- Abb. 3.14 sind die Agarplatten von der ersten Probe mit *C. glutamicum*::CLYSC-MUT6-CPPC-R873G-26F dargestellt.



Abbildung 3.9. *C.glutamicum*::CLYSC-MUT6-
CPPC-R873G-26F//pk18mobsacB-newhom-R441A,
LB-Suc10 10^{-1}

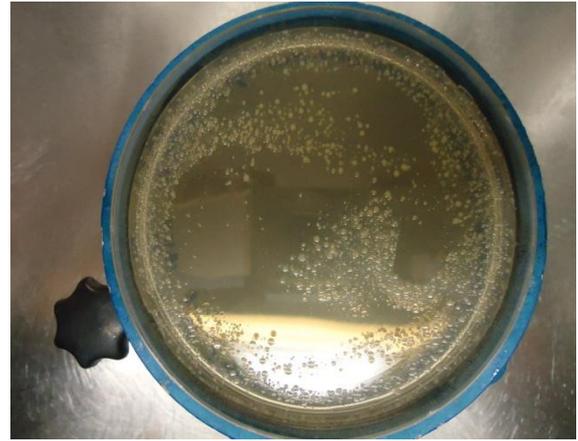


Abbildung 3.10. *C.glutamicum*::CLYSC-MUT6-
CPPC-R873G-26F//pk18mobsacB-newhom-R441A,
LB-Suc10 10^{-2}

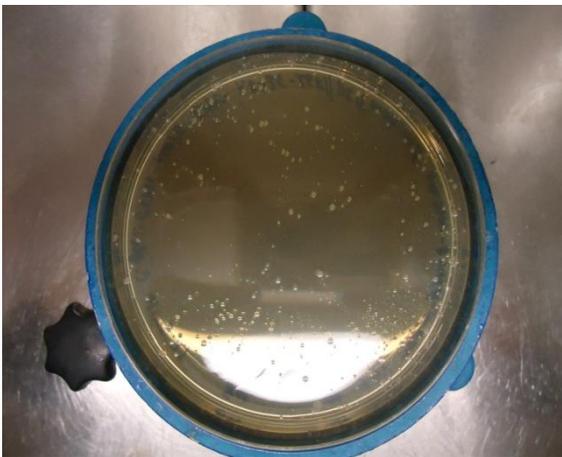


Abbildung 3.11. *C.glutamicum*::CLYSC-MUT6-
CPPC-R873G-26F//pk18mobsacB-newhom-R441A,
LB-Suc10 10^{-3}

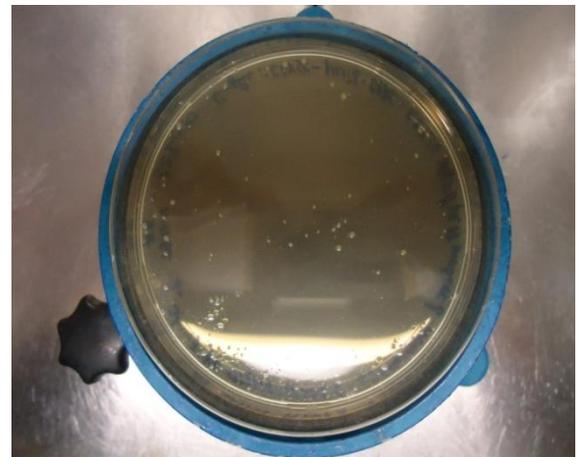


Abbildung 3.12. *C.glutamicum*::CLYSC-MUT6-
CPPC-R873G-26F//pk18mobsacB-newhom-R441A,
LB-Suc10 10^{-4}



Abbildung 3.13. *C.glutamicum*::CLYSC-MUT6-
CPPC-R873G-26F//pk18mobsacB-newhom-R441A,
LB-Km25 10^{-4}



Abbildung 3.14. *C.glutamicum*::CLYSC-MUT6-
CPPC-R873G-26F//pk18mobsacB-newhom-R441A,
LB-Km25 - Suc10 10^{-2}

Für die 2. Selektion wurden von jeder Probe 20 Kolonien (10 kleine und 10 große) von der LB-Suc10 mit 10^{-3} Verdünnung Agarplatten isoliert und auf je 2 weitere ausgestrichen: LB und LB-Km25.

Die Platten wurden bei 30°C, 48 h lang inkubiert. Bei der 2. Rekombination sollte die newhom-R441A-Cassette in die chromosomale DNA des *C. glutamicum*s eingebaut werden, wobei der pk18mobsacB Vektor nicht mehr repliziert wurde und somit verloren ging. Die Zellen, bei denen die 2. Rekombination stattfand, sind nur auf LB gewachsen, da sie keine Resistenz gegen Kanamycin mehr hatten.

Die Auswertung der Ergebnisse ist in der Tabelle 3.7. dargestellt.

Tabelle 3.7. Ergebnisse der 2. Selektion auf den LB-Km25 Agarplatten (,+⁺-Kolonie gewachsen, ,-⁻-keine Kolonie gewachsen).

Probe/ Kolonie	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
14	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
15	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
16	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
19	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
20	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+

Von dem *C. glutamicum*::CLYSC-MUT6-CPPC-R873G-26F//newhom-R441A sind insgesamt 7 Kolonien, von dem *C. glutamicum*::CLYSC-MUT6-CPPC-N917G-8F//newhom-R441A 21 Kolonien gewachsen, die als neue Mutanten mit unempfindlicher Homoserin-Dehydrogenase in Frage kommen könnten.

3. 1.10. Isolierung der chromosomalen DNA

Um auf genetischer Ebene prüfen zu können, ob die Mutanten die Mutation an der R441A Position beibehalten haben, sollte die chromosomale DNA isoliert und sequenziert werden. Von den Zellen des *C. glutamicum*::CLYSC-MUT6-CPPC-R873G-26F wurden 7 Kolonien (1 bis 7) genommen, von den Zellen des *C. glutamicum*::CLYSC-MUT6-CPPC-N917G-8F wurden 13 Kolonien (8 bis 20) isoliert und bei 30°C, 30 rpm über Nacht in 5 ml DSMZ-Medium kultiviert.

Nach 18 h wurde die genomische DNA von allen 20 Proben isoliert und ihre Konzentration gemessen (Tabelle 3.8)

Tabelle 3.8. Konzentration und Reinheit der DNA-proben

Probe	Konzentration µg/µl	Reinheit
1	0,23	1,92
2	0,565	1,98
3	0,25	2
4	0,265	2
5	0,33	1,94
6	0,365	1,59
7	0,25	1,92
8	0,23	2
9	0,38	2
10	0,455	1,89
11	0,445	1,93
12	0,175	2,1
13	0,215	2,2
14	0,165	1,83
15	0,165	1,94
16	0,11	2,2
17	0,28	1,80
18	0,32	2
19	0,145	1,93
20	0,11	2

Um nachher die newhom-Cassette in hoher Konzentration aus dem Agarose-Gel ausschneiden zu können, wurde die PCR von der gesamten DNA durchgeführt. Dabei wurden nur die Primer für die newhom-Cassette verwendet: NewhomCassette F-XbaI und NewhomCassette R-BamHI. (s Kapitel 2.10.5)

Nach der PCR wurden die Proben mit einem 1,5%igen Agarose-Gel aufgereinigt und die newhom-Cassette bei ca. 2,8 kb ausgeschnitten (s. Abb. 3.15). Dadurch, dass die

Konzentration von der newhom-Cassette durch PCR erhöht wurde, wurde sie auf dem Gel bei ca. 2,8 kb als etwas verdickte Bande sichtbar.

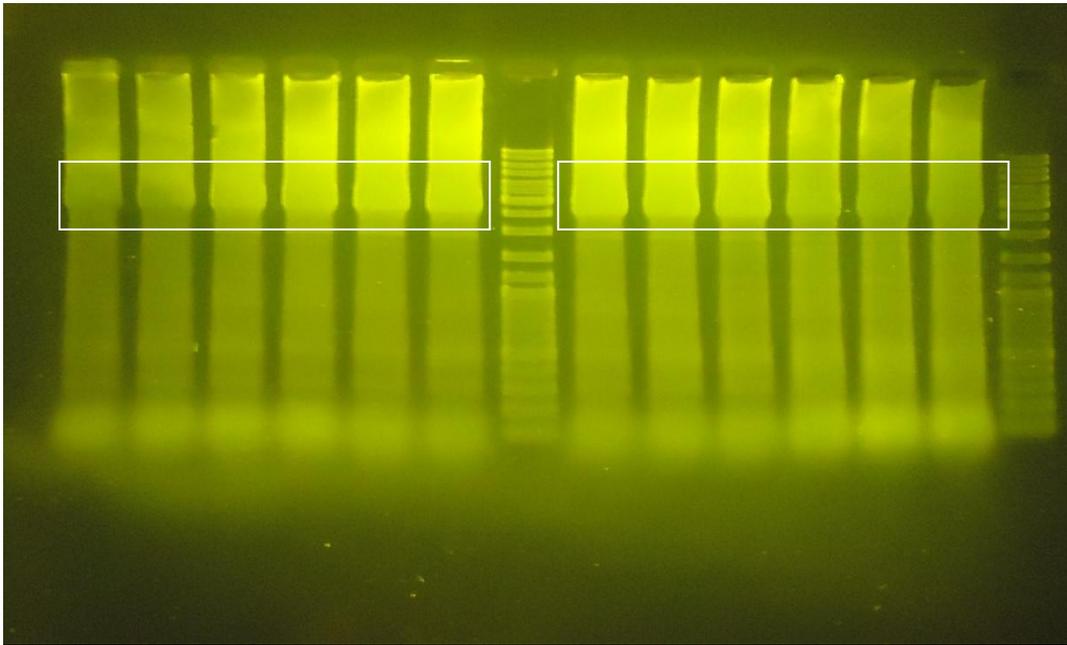


Abbildung 3.15. Agarose-Gel mit der newhom-R441A-Cassette bei ca. 2,8 kb

Die Gelausschnitte mit der newhom-Cassette wurden mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit extrahiert und für die Sequenzierung vorbereitet (s. Kapitel 2.10.6).

Nach der Analyse der Sequenzen von den 20 Proben wurden 4 Mutanten gefunden, die die Mutation an R441A Position nicht verloren haben und keine weitere Mutation im gesamten HOM-Gen hatten. Das waren Proben mit den Nummern 6, 7, 12 und 13.

Nr. 6: *C. glutamicum*::CLYSC-MUT6-CPPC-R873G-26F//newhom-R441A-6

Nr. 7: *C. glutamicum*::CLYSC-MUT6-CPPC-R873G-26F//newhom-R441A-7

Nr. 12: *C. glutamicum*::CLYSC-MUT6-CPPC-N917G-8F//newhom-R441A-12

Nr. 13: *C. glutamicum*::CLYSC-MUT6-CPPC-N917G-8F//newhom-R441A-13

Somit wurden 4 unterschiedliche Mutanten von *C. glutamicum* konstruiert, die eine Threonin unempfindliche Homoserin-Dehydrogenase haben.

3.2. Charakterisierung der *C. glutamicum* Mutanten

3.2.1. Wachstum von *C. glutamicum*

Die Kultivierung von *C. glutamicum* Mutanten wurde 78 Stunden lang durchgeführt. Neben den neuen Mutanten wurden auch beide Standardstämme *C. glutamicum* CLYSC-MUT6-CPPC-R873G-26F und *C. glutamicum* CLYSC-MUT6-CPPC-N917G-8F kultiviert. Der Vergleich der Leistungen der neuen Mutanten mit den Standards war für die Beurteilung ausschlaggebend. Dabei wurden die Proben zu den Zeitpunkten T_0 , T_{24} , T_{30} , T_{48} , T_{54} , T_{72} und T_{78} genommen. Bei jeder Probe wurde die optische Dichte bei 660 nm gemessen.

In den Tabellen 3.9. und 3.10 sind die gemessenen OD-Werte dargestellt.

Tabelle 3.9. Optische Dichte von *C. glutamicum* CLYSC-MUT6-CPPC-R873G-26F

Zeit, h	<i>C. glutamicum</i> CLYSC-MUT6-CPPC-R873G-26F// newhom-R441A-6	<i>C. glutamicum</i> CLYSC-MUT6-CPPC-R873G-26F// newhom-R441A-7	<i>C. glutamicum</i> CLYSC-MUT6-CPPC-R873G-26F-Standard
0	0,73	0,77	0,73
24	2,57	2,47	37,67
30	2,90	2,87	37,53
48	10,60	3,57	38,43
54	20,70	11,90	41,03
72	38,53	38,70	37,00
78	37,10	37,07	36,63

Tabelle 3.10 Optische Dichte von *C. glutamicum* CLYSC-CPPC-N917G-8F

Zeit, h	<i>C. glutamicum</i> CLYSC-MUT6-CPPC-N917G-8F// newhom-R441A-12	<i>C. glutamicum</i> CLYSC-MUT6-CPPC-N917G-8F// newhom-R441A-13	<i>C. glutamicum</i> CLYSC-MUT6-CPPC-N917G-8F-Standard
0	0,70	0,47	0,57
24	34,17	30,77	31,30
30	34,73	33,90	32,43
48	37,60	35,30	35,33
54	35,20	39,17	36,80
72	33,23	36,70	36,23
78	35,00	37,27	39,33

Diagramme 3.1. und 3.2. stellen zeitlichen Verlauf von dem Wachstum von *C. glutamicum* dar

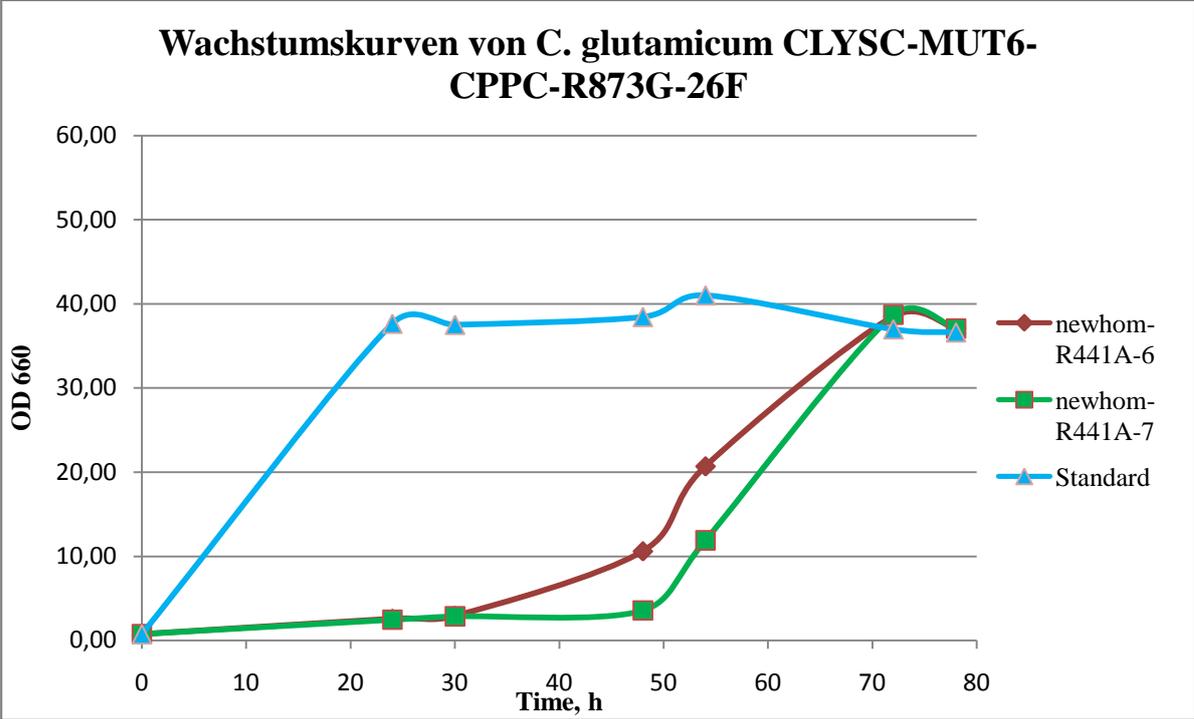


Diagramm 3.1. Wachstumskurven von *C. glutamicum*::CLYSC-MUT6-CPPC-R873G-26F

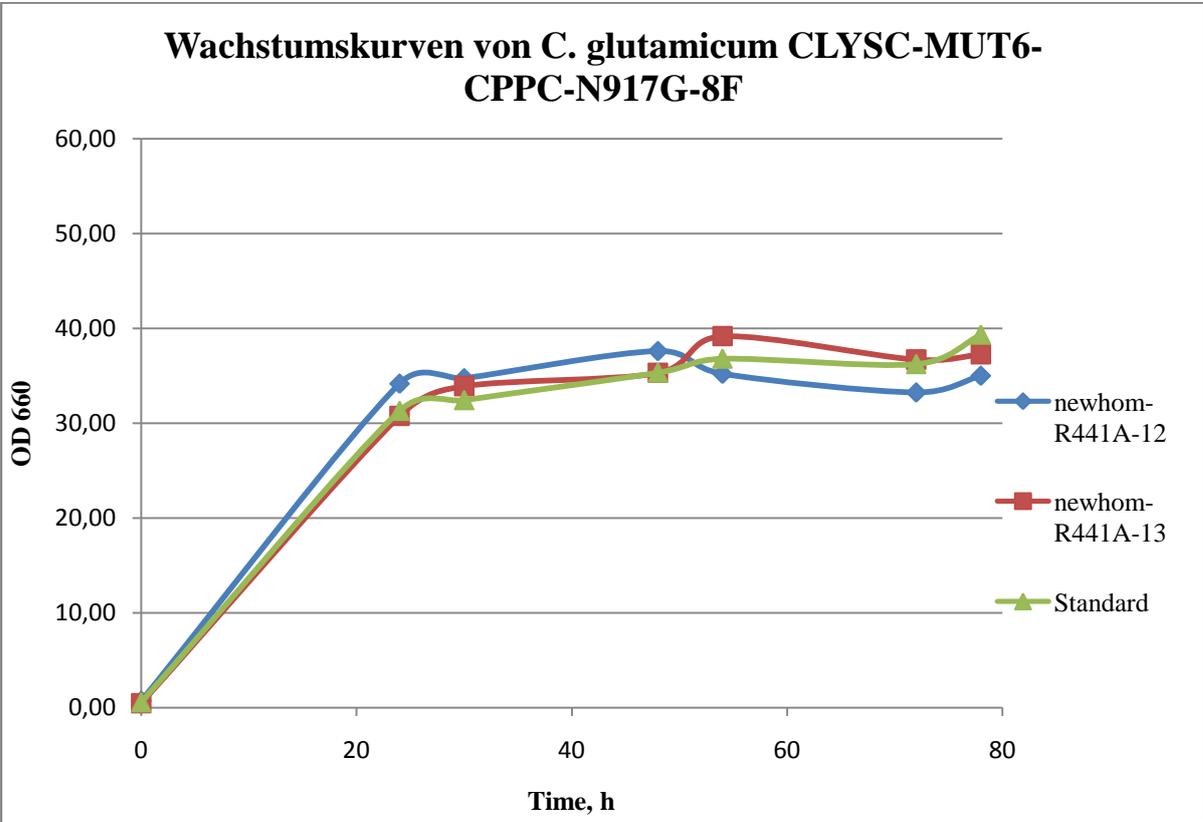


Diagramm 3.2. Wachstumskurven von *C. glutamicum*::CLYSC-MUT6--CPPC-N917G-8F

3.2.2. Bestimmung der Lysinkonzentration

Die Lysin Konzentration im Überstand wurde mittels HPLC gemessen. Da die Produktion von Lysin erst nach einigen Stunden eintritt und erfahrungsgemäß ihren maximalen Wert in der Mitte der stationären Wachstumsphase erreicht, wurden für die Messung jeweils 3 Proben von jedem Stamm genommen. Bei den Stämmen, die nach 24 Stunden gut gewachsen sind und teilweise in die stationäre Phase eingetreten sind (s. Diagramm 3.1. und Diagramm 3.2.) wurden die Proben zu den Zeitpunkten T_{24} , T_{48} und T_{78} gemessen. Bei den neuen Mutanten von *C. glutamicum* CLYSC-MUT6-CPPC-R873G-26F, die erst nach ca. 72 Stunden in die stationäre Phase übergegangen sind, wurden die Proben zu den Zeitpunkten T_{48} , T_{54} und T_{78} für die Messung genommen. Alle Proben wurden vor der Messung 1:200 in MilliQ-Wasser verdünnt. Das Ergebnis dieser Messung ist in der Tabelle 3.12. dargestellt. Tabelle 3.11 stellt die Kalibrierungswerte von Lysin dar.

Tabelle 3.11. Kalibrierung von Lysin (Retentionszeit 20,5 min)

Konzentration in μM	Peakfläche
10	24904,0
50	126175,3
100	246250,7
200	433748,7
500	626938,0

Tabelle 3.12 Ergebnisse der Messung von Lysin-Konzentration

Stamm	Zeit	Retentionszeit in min	Peakfläche	Errechnete Konzentration in μM
<i>C. glutamicum</i> ::CLYSC-MUT6-CPPC-R873G-26F				
newhom-R441A-6	T_{48}	20,497	18236	7,202
	T_{54}	20,515	63501	25,498
	T_{78}	20,510	170617	71,04
newhom-R441A-7	T_{48}	20,508	29094	11,49
	T_{54}	20,498	41164	16,26
	T_{78}	20,453	163788	68,202
Standard	T_{24}	20,462	156932	65,34
	T_{48}	20,578	133040	55,39
	T_{78}	20,542	150179	62,54

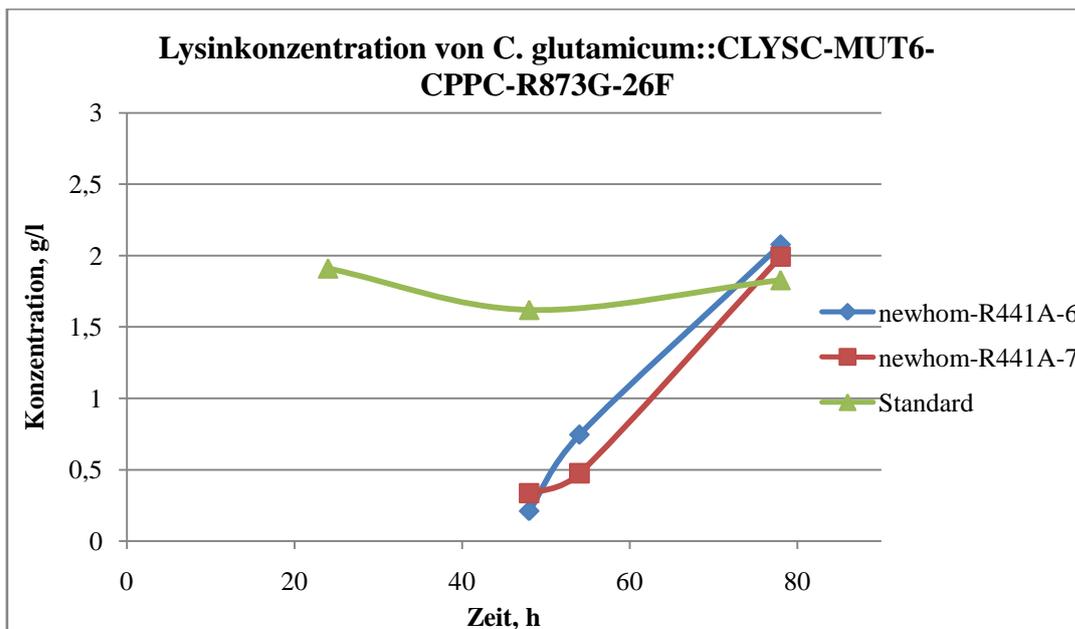
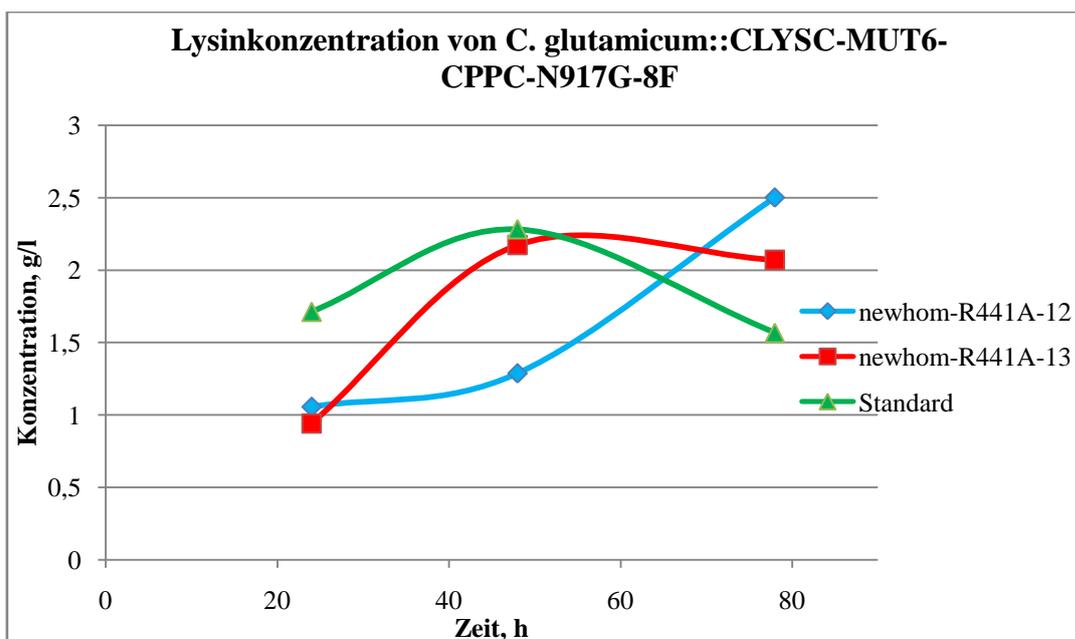
C. glutamicum::CLYSC-MUT6-CPPC-N917G-8F3				
newhom-R441A-12	T ₂₄	20,533	91441	36,12
	T ₄₈	20,550	111485	44,03
	T ₇₈	20,548	205406	85,53
newhom-R441A-13	T ₂₄	20,557	81468	32,18
	T ₄₈	20,518	178471	74,32
	T ₇₈	20,515	170064	70,82
Standard	T ₂₄	20,545	140681	58,58
	T ₄₈	20,512	187430	78,05
	T ₇₈	20,498	128790	53,63

Mit der Berücksichtigung der voreingeschalteten Verdünnung und der Molmasse von Lysin (146,19 g/mol) wurden die Endwerte für die Lysinkonzentration bestimmt. (Tabelle 3.13)

Tabelle 3.13. Endwerte für die Lysinkonzentration

Stamm	Zeit	Endkonzentration in g/l
C. glutamicum::CLYSC-MUT6-CPPC-R873G-26F		
newhom-R441A-6	T ₄₈	0,210
	T ₅₄	0,745
	T ₇₈	2,077
newhom-R441A-7	T ₄₈	0,336
	T ₅₄	0,475
	T ₇₈	1,994
Standard	T ₂₄	1,910
	T ₄₈	1,619
	T ₇₈	1,828
C. glutamicum::CLYSC-MUT6-CPPC-N917G-8F		
newhom-R441A-12	T ₂₄	1,056
	T ₄₈	1,287
	T ₇₈	2,500
newhom-R441A-13	T ₂₄	0,941
	T ₄₈	2,172
	T ₇₈	2,070
Standard	T ₂₄	1,712
	T ₄₈	2,282
	T ₇₈	1,568

Die in der Tabelle 3.13 ausgeführten Konzentrationen sind in Diagramm 3.3 und 3.4 bildlich dargestellt.

Diagramm 3.3 Lysinkonzentration von *C. glutamicum*::CLYSC-MUT6-CPPC-R873G-26FDiagramm 3.4. Lysinkonzentration von *C. glutamicum*::CLYSC-MUT6-CPPC-N917G-8F

Um einen besseren Einblick in den Verlauf der Produktion von Lysin zu schaffen, wurden die Wachstumskurve und der zugehörige Konzentrationsverlauf von jeweils einem Stamm in einem Diagramm zusammengestellt. Folgende Diagramme 3.5 bis 3.10 stellen dies dar.

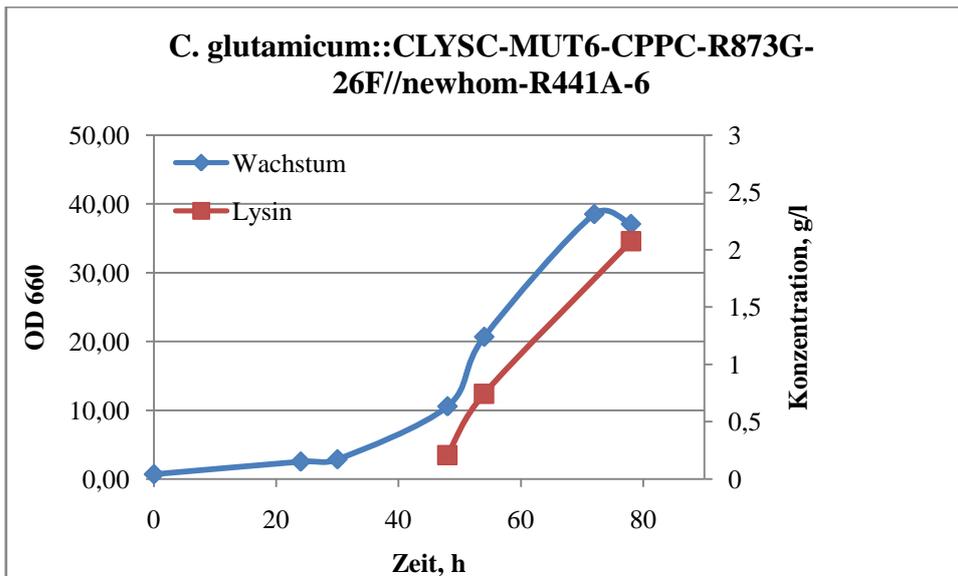


Diagramm 3.5. Wachstum und Lysinproduktion von *C. glutamicum::CLYSC-MUT6-CPPC-R873G-26F//newhom-R441A-6*

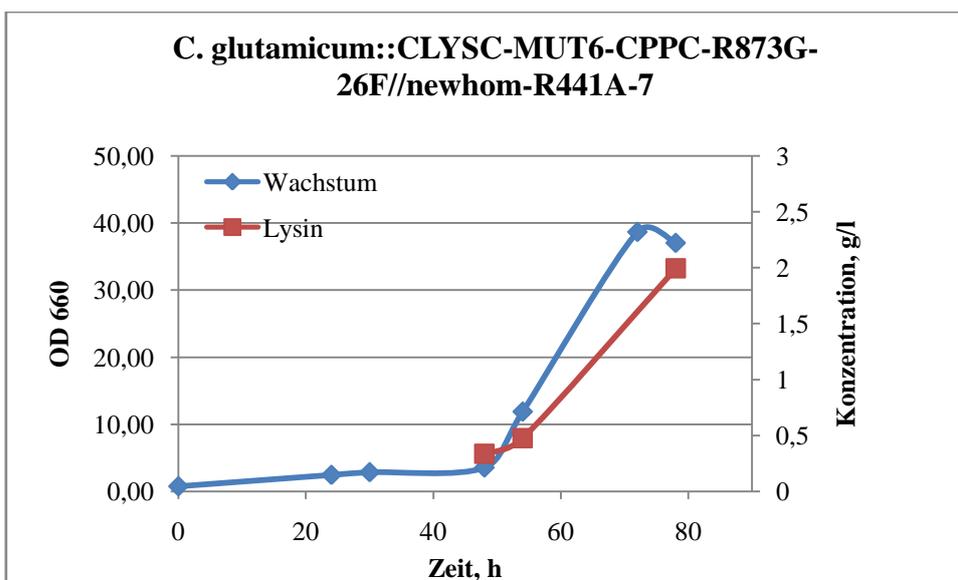


Diagramm 3.6. Wachstum und Lysinproduktion von *C. glutamicum::CLYSC-MUT6-CPPC-R873G-26F//newhom-R441A-7*

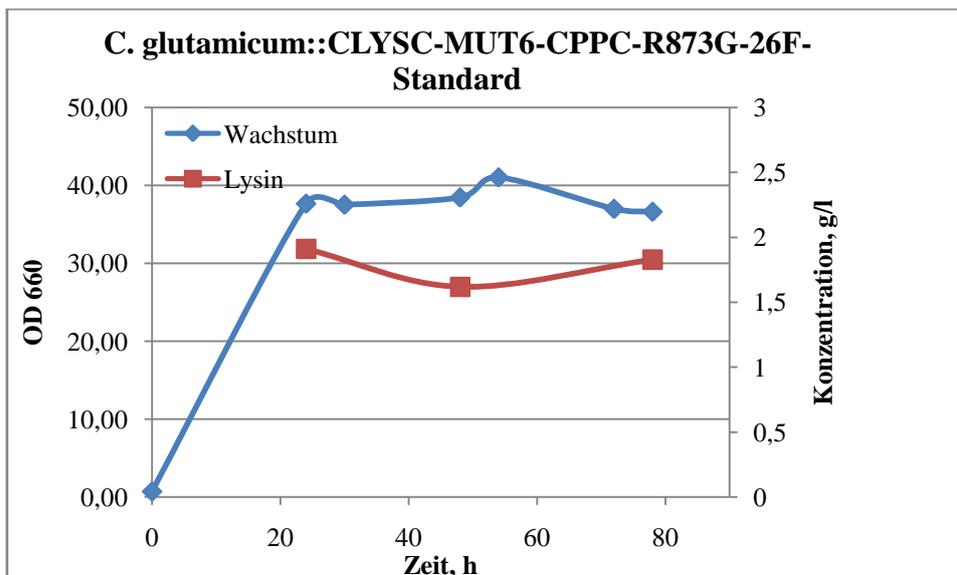


Diagramm 3.7. Wachstum und Lysinproduktion von *C. glutamicum::CLYSC-MUT6-CPPC-R873G-26F-Standard*

Vergleicht man die beiden neuen Mutante von *C. glutamicum::CLYSC-MUT6-CPPC-R873G-26F//newhom-R441A*, sind die Ähnlichkeiten in dem Wachstum, sowie in der Produktion von Lysin sehr auffällig. Die Endkonzentrationen von Lysin liegen nah an einander, und sind im Vergleich zu dem Standard um ca. 6 % höher (s. Tabelle 3.13). Wie oben schon erwähnt wurde, liegt das Maximum der Lysinproduktion meistens in der Mitte der stationären Wachstumsphase. Da die Kultivierung aber nach 78 Stunden unterbrochen wurde, und die stationäre Phase in der Zeit bei den neuen Mutanten erst eingetreten ist, kann man vermuten, dass die Produktion noch weiterhin steigen würde. Aber auch die vorhandenen Werte deuten auf eine gewisse Steigerung der Lysinproduktion hin.

Die Produktionskurve von dem Standardstamm weist keine für die Lysinproduktion typische Glockenform auf, aus dem Verlauf lässt sich auch erschließen, dass kein weiterer Anstieg der Lysinkonzentration zu erwarten ist. Bei diesem Stamm wurde das Maximum der Ausbeute nach 24 Stunden erreicht.

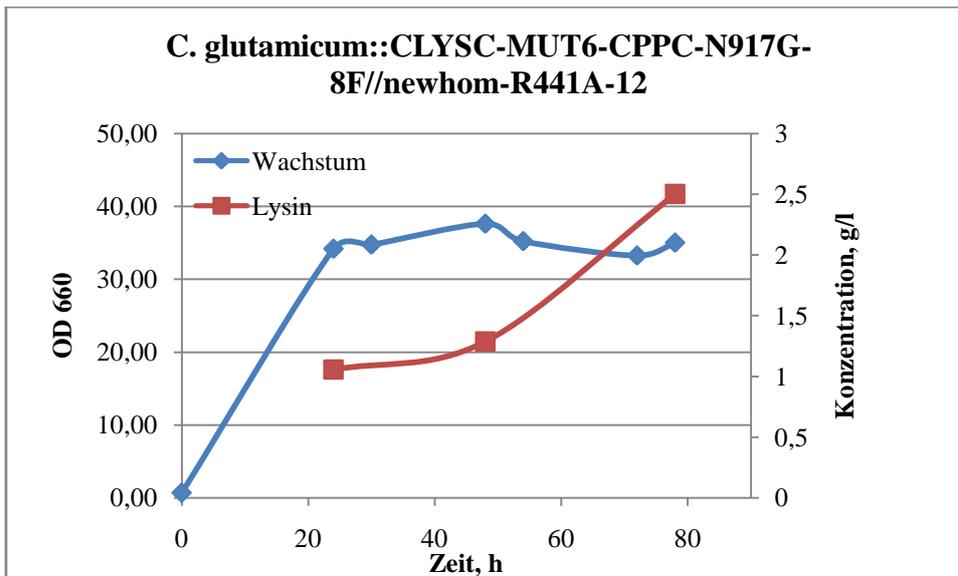


Diagramm 3.8. Wachstum und Lysinproduktion von *C. glutamicum*::CLYSC-MUT6-CPPC-N917G-8F//newhom-R441A-12

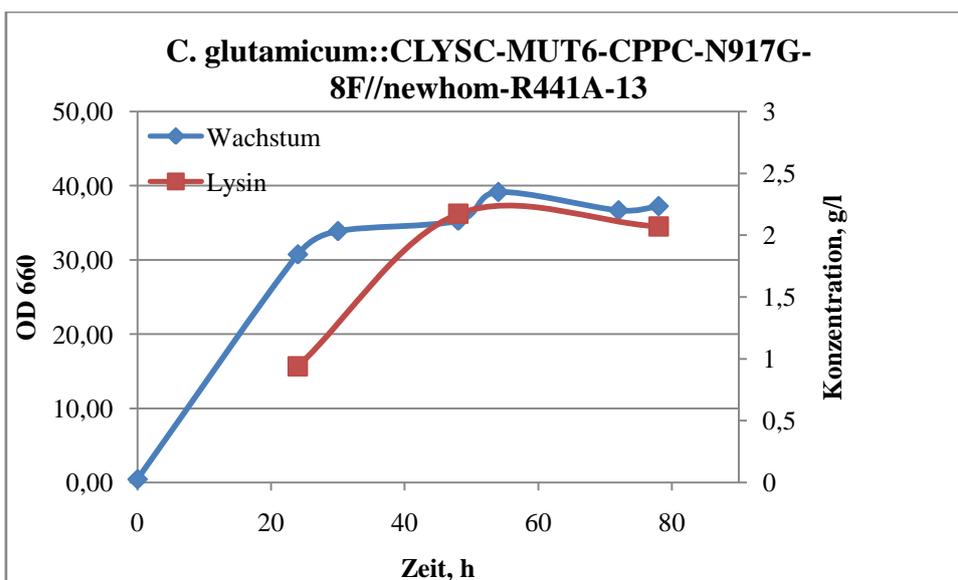


Diagramm 3.9. Wachstum und Lysinproduktion von *C. glutamicum*::CLYSC-MUT6-CPPC-N917G-8F//newhom-R441A-13

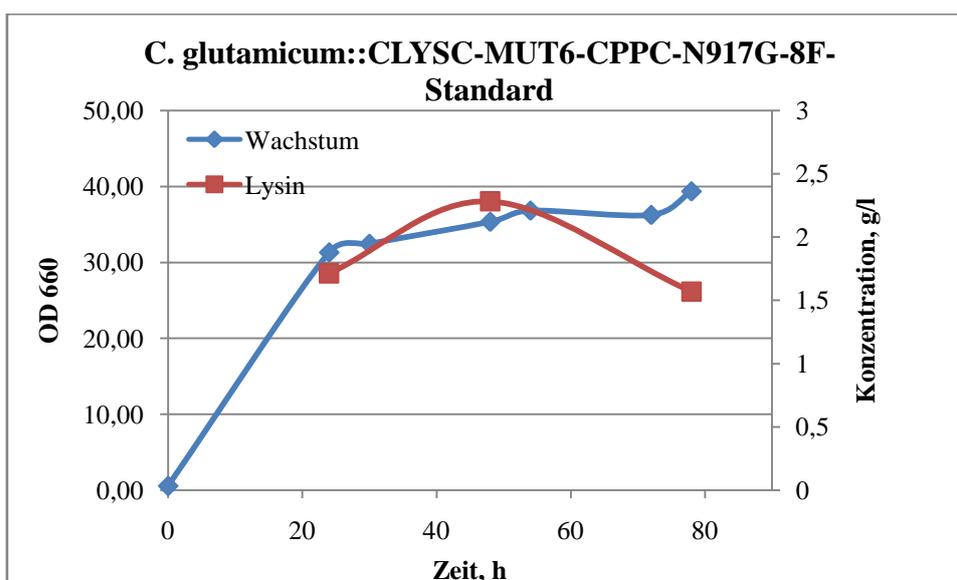


Diagramm 3.10. Wachstum und Lysinproduktion von *C. glutamicum::CLYSC-MUT6-CPPC-N917G-8F-Standard*

Betrachtet man die neuen Mutanten von *C. glutamicum::CLYSC-MUT6-CPPC-N917G-8F//newhom-R441A* sowie den Standardstamm, fällt es sofort auf, dass alle drei Produktionskurven von Lysin eine typische Glockenkurve aufweisen. In diesem Fall trifft die Aussage darüber, dass die höchste Konzentration an Lysin in der stationären Wachstumsphase erreicht wird, eindeutig zu. Bei einem der beiden Mutanten, bei *C. glutamicum::CLYSC-MUT6-CPPC-N917G-8F//newhom-R441A-12*, wurde die Höchstkonzentration möglicherweise noch nicht erreicht, allerdings ist die schon erreichte Konzentration um ca. 9 % höher, als die bei dem Standardstamm.

Bei dem *C. glutamicum::CLYSC-MUT6-CPPC-N917G-8F//newhom-R441A-13* wurde die Höchstkonzentration bei 2,712 g/l erreicht, was keine Verbesserung gegenüber dem Standard aufweist.

Was man auch nicht vernachlässigen kann ist, dass obwohl das Wachstum von *C. glutamicum::CLYSC-MUT6-CPPC-N917G-8F//newhom-R441A-12* dem von dem Standardstamm ähnlich ist (s. Diagramm 3.2.), ist die Produktion von Lysin bei dem Mutanten viel später eingetreten. Während bei dem Standardstamm nach 48 Stunden maximale Konzentration von 2,282 g/l erreicht wurde, lag die Lysinkonzentration bei dem neuen Mutanten erst bei 1,287 g/l. Erst nach weiteren 30 Stunden stieg die Konzentration auf 2,5 g/l.

4. Diskussion

Durch die Anwendung der bestehenden, sowie auch neuen molekularbiologischen Methoden, konnten im Rahmen dieser Bachelorarbeit neue *Corynebakterium glutamicum* Stämme konstruiert werden, mit dem Ziel, die Produktion von Lysin zu steigern. Durch das Einbringen einer gezielten Punktmutation im Gen der Homoserin-Dehydrogenase, die Substitution an der Position 441 der Aminosäuresequenz des Enzyms, konnte gezeigt werden, dass durch das Abschalten der Threonin-Biosynthese die Feedback-Inhibierung der Aspartokinase aufgehoben wurde. Das Fehlen von Threonin in der Zelle hatte die Überproduktion von Lysin zur Folge.

Die theoretischen Grundlagen bezüglich der Hemmung der gemeinsamen Feedback-Inhibierung der Aspartokinase von Lysin und Threonin wurden durch diese Arbeit bestätigt.

Als nächstes Ziel bei der Optimierung der Lysin Produktion mit dem *Corynebakterium glutamicum* könnte das Einbringen einer weiteren Mutation bzw. einer Mutation an einer anderen Position in hom-Gen sein. Andererseits könnte die bereits vorhandene Mutation an der Position 441 der Aminosäuresequenz des Enzyms Homoserin-Dehydrogenase mit einer weiteren Mutation in Diaminopimelat-Decarboxylase kombiniert werden. Diaminopimelat-Decarboxylase ist ein Enzym, das bei dem letzten Biosyntheseschritt von D, L-Diaminopimelat zu Lysin eine große Rolle spielt. Es könnte untersucht werden, ob die Mutation im Gen dieses Enzyms zu einer positiven Wirkung auf die Lysin Produktion führt.

Betrachtet man die durchgeführte Arbeit mit dem Hinblick auf die Kultivierung, so stehen auch hier noch viele Verbesserungsmöglichkeiten zur Verfügung. Letztendlich sind nicht nur die Ausbeute, sondern auch die eingesetzten Mittel von großer Bedeutung. Die Wirtschaftlichkeit des gesamten Prozesses steht dabei ebenfalls im Mittelpunkt.

Die Kultivierung der den neuen Mutanten in einem Bioreaktor könnte eine große Auswirkung auf die Ergebnisse haben. Die Kultivierung der Stämme in den Schüttelkoben hatte den Nachteil, dass weder pH-Wert, noch die Belüftung während des kompletten Prozesses nachverfolgt und je nach Bedarf korrigiert werden konnten. Außerdem konnte während der Kultivierung in den Schüttelkolben die Bildung von dem Schaum nicht verhindert werden, was teilweise zu einem Mediaustritt geführt hat. Durch die Kultivierung in einem Bioreaktor könnten alle diese Nachteile beseitigt werden.

Eine andere Optimierungsmöglichkeit für die Lysin Produktion mit den neuen Mutanten könnte durch die Änderung des Nährmediums realisiert werden. Am Beispiel der neuen

Mutanten von *C. glutamicum*::CLYSC-MUT6-CPPC-R873G-26F, die im Gegensatz zu den neuen Mutanten von *C. glutamicum*::CLYSC-MUT6-CPPC-N917G-8F sehr langsam gewachsen sind (Diagramm 3.1.), könnte überprüft werden, ob diese Verzögerung des Wachstums auf das verwendete Nährmedium zurückzuführen ist.

Im Großen und Ganzen wurde das Ziel der Arbeit erreicht. Die neuen Mutanten wurden konstruiert und auf ihre Eigenschaften, wie Lysin-Produktion und Wachstum, charakterisiert.

5. Literaturverzeichnis

- [1] Albus, C. et al: Lexikon der Ernährung, Berlin, Heidelberg (Spektrum Akademischer Verlag), 2002
- [2] Arndt, K.; Albers, T.: Handbuch Protein und Aminosäuren, 1. Aufl. Arnsberg (Novagenics Verlag), 2001
- [3] Biesalski, H.; Bischof, S.C.; Puchstein, C.: Ernährungsmedizin, 4. Aufl. Stuttgart (Georg Thieme Verlag), 2010
- [4] Biobasierte Produktion von L-Lysin mit *Corynebacterium glutamicum* – Maßgeschneiderte Zellfabriken und Bioprozesse, 2011
http://www.ibvt.de/DE/Forschung/Industrielle_Biotechnologie/Lysin.php (13.12.2011)
- [5] Bott, M.; Eggeling, L.: Handbook of *Corynebacterium glutamicum*, CRC PR INC Verlag, 2005
- [6] Collis, C., Kim, M. J. et al.: Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines, in: Journal of Bacteriology 184 (2002) 11, S. 3017–3026
- [7] D, L-Methionin, L-Lysin, L-Threonin als Futtermittelzusatz,
http://www.boku.ac.at/iam/edu/791.106_AllgemeineBiotechnologie/BT4_Kunert.pdf
(16.12.11)
- [8] Falbe, J.; Regitz, M.: Römpp-Chemie-Lexikon, 9. Aufl. Stuttgart (Georg Thieme Verlag), 1990
- [9] Jakubke, Hans-Dieter; Jeschkeit, Hans: Aminosäuren, Peptide, Proteine (Verlag Chemie), 1982

- [10] Kalinowski, J. et al.: The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins, in: *Journal of Biotechnology* 104 (2003), S. 5-25
- [11] Kinoshita, S., Udaka, S., Shimono, M.: Studies on the amino acid fermentation. I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms, in: *J. Gen. Appl. Microbiol.* (1957) 3, S. 193-205
- [12] Kinoshita, S.: Glutamic acid bacteria, in: *Biology of industrial microorganisms* (Hrsg.: Demain, A. L., Solomon, N. A.), London (The Benjamin/ Cummings Publishing Company), 1985
- [13] Kleemann, A., Leuchtenberger, W., Hoppe B., Tanner, H.: Amino acids, in: Gerhartz (ed) *Ulmans' encyclopedia of industrial chemistry*, vol 2A., Weinheim (VCH Verlagsgesellschaft) 2A, 1985
- [14] Kohlmeier, M.: *Nutrient Metabolism*, Elsevier, 2003
- [15] Komagata, K., Yamada, K., Ogawa, H.: Taxonomic studies on coryneform bacteria. Division of bacterial cells, in: *J. Gen. Appl. Microbiol.* (1969) 15, S. 243-259
- [16] Lessard, PA, Guillouet, S., Willis, LB, Sinskey, AJ: *Corynebacteria, Brevibacteria*, in: *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation* 1(1999), Edited by Michael C., Flickinger SWD. Wiley, S. 729-740
- [17] Leuchtenberger, W.: Amino acids technical production and use, in: *Biotechnology* (H.J. Rehm, A. Pühler, G. Reed and P.J.W. Stadler) VCH Verlagsgesellschaft, 1996
- [18] Madigan, Michael; Martinko, John; Parker, Jack: *Brock - Mikrobiologie*. 11. Auflage, München (Pearson Studium), 2006
- [19] Miksits, K.; Hahn, H.: *Basiswissen Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, Springer, 2007

[20] Puech, V., Chami, M., Lemassu, A., Lanéelle, M.-A., Schiffler, B., Gounon, P., Bayan, N., Benz, R., Daffé, M.: 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, in: *Microbiology* (2001) 147, S. 1365-1382

[21] Sahm, H., Eggeling, L.: Pathway analysis and metabolic engineering in *Corynebacterium glutamicum*, in: *J Biol. Chem.* 381(2000), S. 899-910

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

6. Anhang

197401 catggaactc agtgaatgg ctgtaaggcc tgcaccaaca atgattgagc gaagctccaa
197461 aatgtcctcc ccgggtgat attagattc ataatatac taaaaatctt gagagttttt
197521 ccgttgaaaa ctaaaaagct gggaagggtga atcgaatttc ggggctttaa agcaaaaatg
197581 aacagcttgg tctatagtgg ctaggtaccc ttttgtttt ggacacatgt aggggtggccg
197641 aaacaaagta ataggacaac aacgctcgac cgcgattatt tttggagaat catgacctca
197701 gcatctgcc caagctttaa ccccggaag ggtcccggct cagcagtcgg aattgcctt
197761 ttaggattcg gaacagtcgg cactgaggtg atgcgtctga tgaccgagta cggatgaa
197821 cttgcgcacc gcattggtgg cccactggag gtcctggca ttgctgttc tgatatctca
197881 aagccactg aaggcgttgc acctgagctg ctactgagg acgctttgc actcatcgag
197941 cgcgaggatg ttgacatcgt cgttgaggtt atcggcggca ttgagtacc acctgaggtg
198001 gttctcgag ctctgaaggc cggcaagtct gttgtaccg ccaataaggc tctgttga
198061 gtcactctg ctgagcttgc tgatgcagcg gaagccgcaa acgttgacct gtactcgag
198121 gctgctgtg caggcgcaat tccagtgggt ggcccactgc gtcgctcct ggctggcgat
198181 cagatccagt ctgtgatgg catcgtaac ggcaccacca acttcatctt ggacgccatg
198241 gattccaccg gcgctgacta tgcagattct ttggctgagg caactcgtt gggttacgcc
198301 gaagetgac caactgcaga cgtcgaaggc catgacgcc catcaaggc tgcaattttg
198361 gcatccatc cttccacac ccgtgttacc gcggatgatg tgtactgca aggtatcagc
198421 aacatcagcg ctgccgacat tgaggcagca cagcaggcag gccacacat caagttgtt
198481 gccatcttg agaagttcac caacaaggaa ggaaagtcgg ctatttctgc tcgctgcac
198541 ccgactctat tacctgtgtc ccaccactg gcgtcggtaa acaagtcctt taatgcaatc
198601 tttgtgaag cagaagcagc tggcgcctg atgttctacg gaaacggtgc aggtggcgcg
198661 ccaaccgct ctgctgtgct tggcgacgtc gttggtgcc cagaaacaa ggtgcacggt
198721 ggccgtgctc caggtgagtc cacctacgt aacctgccga tcgctgattt cggtagacc
198781 accactcgtt accacctga catggatgtg gaagatcgcg tgggggtttt ggctgaattg
198841 gctagcctgt tctctgagca aggaatctcc ctgcgtacaa tccgacagga agagcgcgat
198901 gatgatgcac gtctgatcgt ggtcaccac tctgcgctgg aatctgatct tcccgcacc
198961 gttgaactgc tgaaggctaa gcctgttgtt aaggcaatca acagtgtgat cgcctcgaa
199021 agggactaat ttactgaca tggcaattga actgaacgtc ggtcgtgagg ttaccgtcac
199081 ggtacctgga tctctgcaa acctcggacc tggcttgac actttaggtt tggcactgtc
199141 ggtatcgac actgtcgaag tggaaattat tccatctggc ttggaagtgg aagttttgg
199201 cgaaggccaa ggcaagtcc ctcttgatgg ctcccactg gtggttaaag ctattcgtgc

199261 tggcctgaag gcagctgacg ctgaagtcc tggattgcga gtggtgtgcc acaaca**acat**
 199321 **tccgcagtct cgtggcttg** gctcctctgc tgcagcggcg gttgctggtg ttgctgcagc
 199381 taatggttg gcggattcc cgtgactca agagcagatt gttcagttgt cctctgcctt
 199441 tgaaggccac ccagataatg ctgcggcttc tgtgctgggt ggagcagtgg tgctgtggac
 199501 aatctgtct atcgacggca agagccagcc acagtatgct gctgtaccac ttgaggtgca
 199561 ggacaatatt cgtgcgactg cgtggttcc taattccac gcatccaccg aagctgtgcg
 199621 ccgagtcctt cccactgaag tcaactcacat cgatgcgcga ttaacgtgt cccgcgttgc
 199681 agtgatgac gttgcgttgc agcagcgtcc tgatttctg tgggagggtg ctcgtgaccg
 199741 tctgcaccag cttatcgtg cagaagtgtt gcctattacc tctgagtggg taaaccgcct
 199801 gcgcaaccgt ggctacgagg cataccttc cggtgccggc ccaaccgcca tgggtctgtc
 199861 cactgagcca attccagaca aggttttga agatgctcgt gactctggca ttaaggtgct
 199921 tgagcttgag gttgcgggac cagtcaaggt tgaagtaac caaccttagg cccaacaagg
 199981 aaggccccct tgaatcaag aagggggcct tattagtga gcaattatc gctgaacacg
 200041 tgaaccttac aggtgcccgg cgcgttgagt ggtttgagt ccagctggat gcggttgtt
 200101 tcaccgaggc ttcttgat gaatccggcg tggatggcg agacgaaggc tgatgggcct
 200161 ttgctgtga ccacaaatgg gcagctgtg agagcgaggg agtttgctt ttcggttgc
 200221 gtgggtcaa agccatttc gcggagggcg ttaatgagcg gggagagggc **ttcgtcagat**
 200281 **tcttcggctt** cggcgtggtt aatgcccag acgtgtgcc actgggttcc gatggaaagt

Abb. 6.1. Sequenz vom hom-Gen von *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (**grau**) mit markierten Primer-Bereichen (**gelb**- NewHomCassette F-XbaI, **grün**- Hom Mut-g 643C-G644 F, Hom Mut-g 643C-G644 R, **rot**- HomCassette R-BamHI, **orange**- NewHomCassette R-BamHI,) und Mutationsposition R441A (**schwarz umrandet**) (Sequenzen s. Tab.2.3)

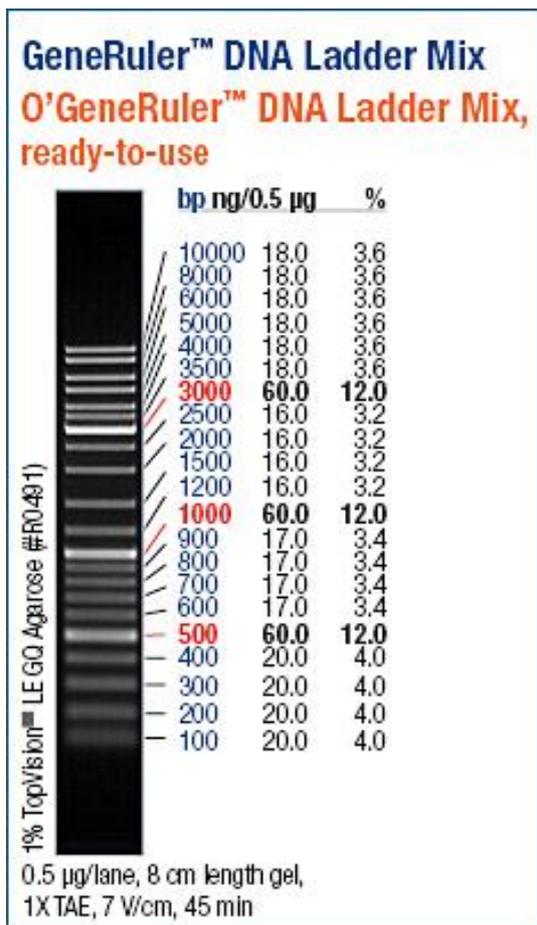


Abb. 6.2. Marker-Leiter von GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas

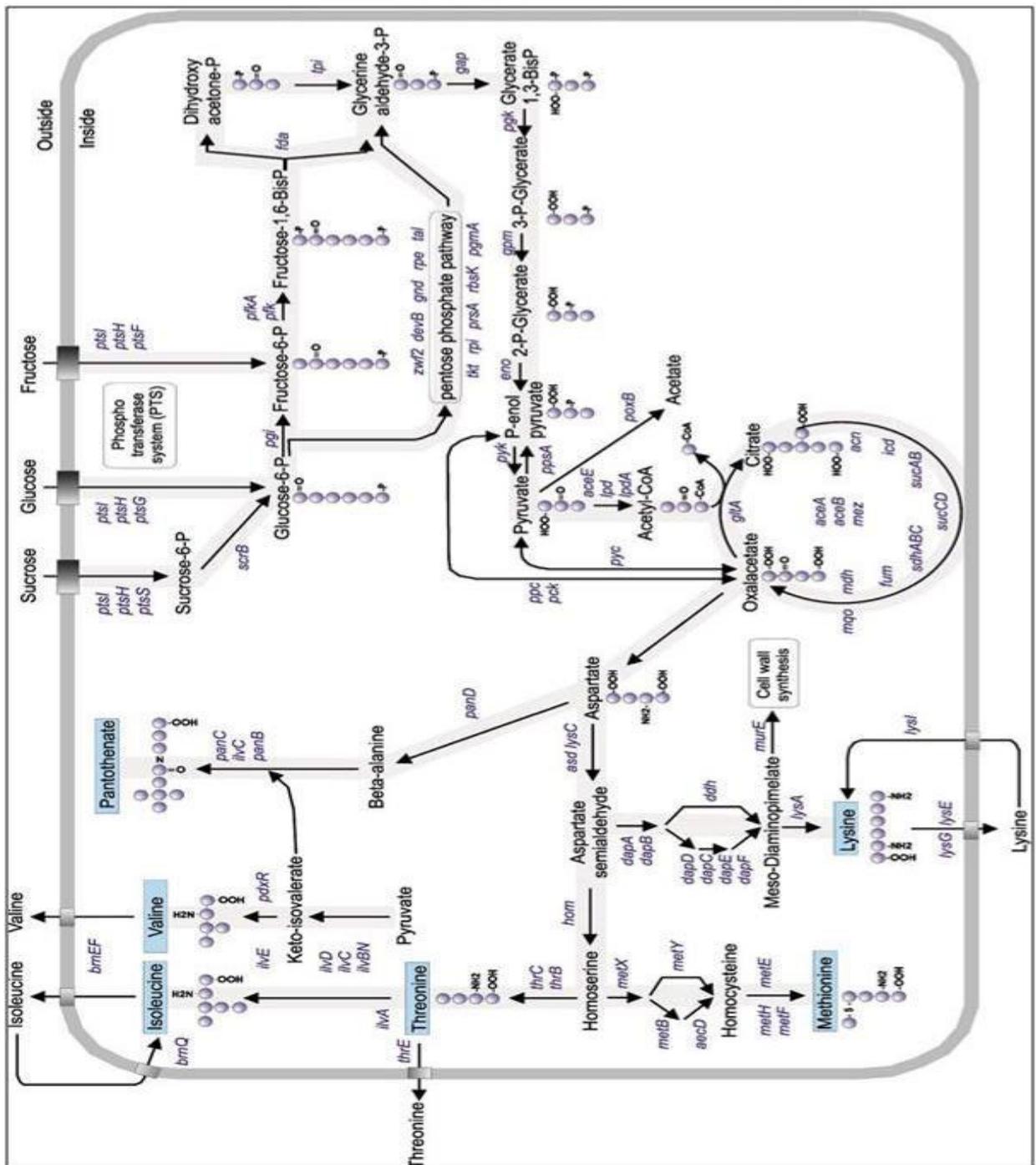


Abb. 6.3. Rekonstruktion von Stoffwechselprozess von *Corynebacterium glutamicum* (J.Kalinovski et al. Journal of Biotechnology, 2003)

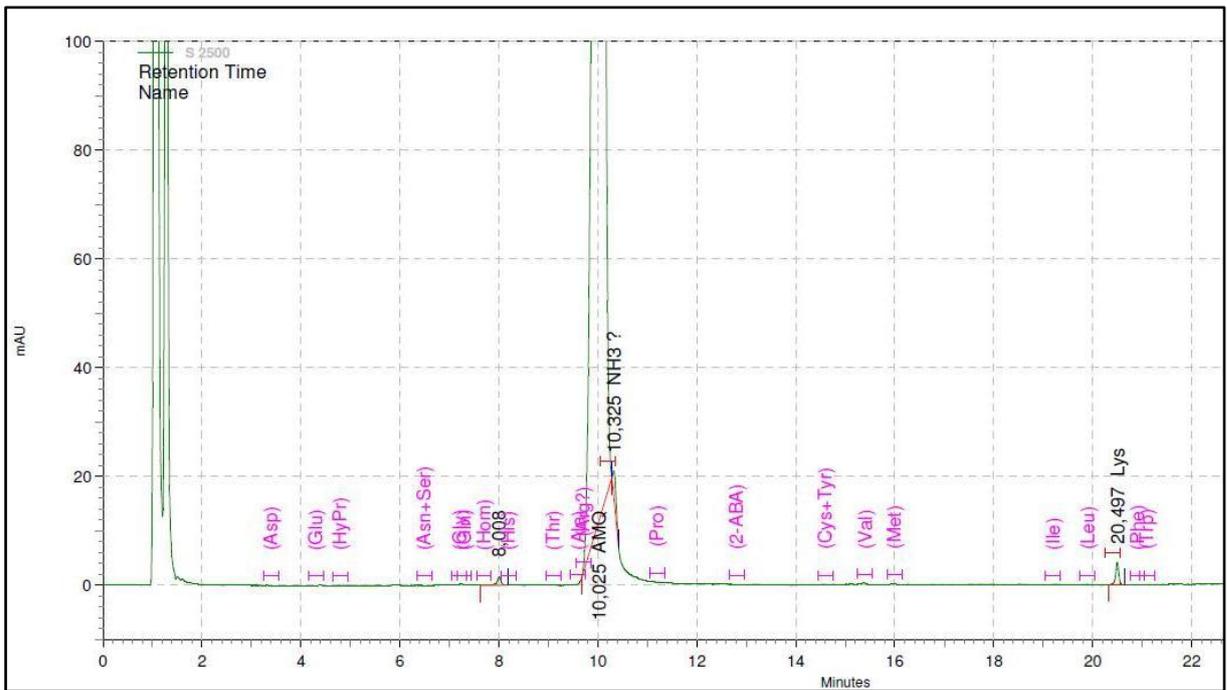


Diagramm 6.1. Ergebnisse der Messung für *Corynebacterium glutamicum*::CLYSC-MUT6-CPPC-R873G-26F//newhom-R441A-6, 48 h

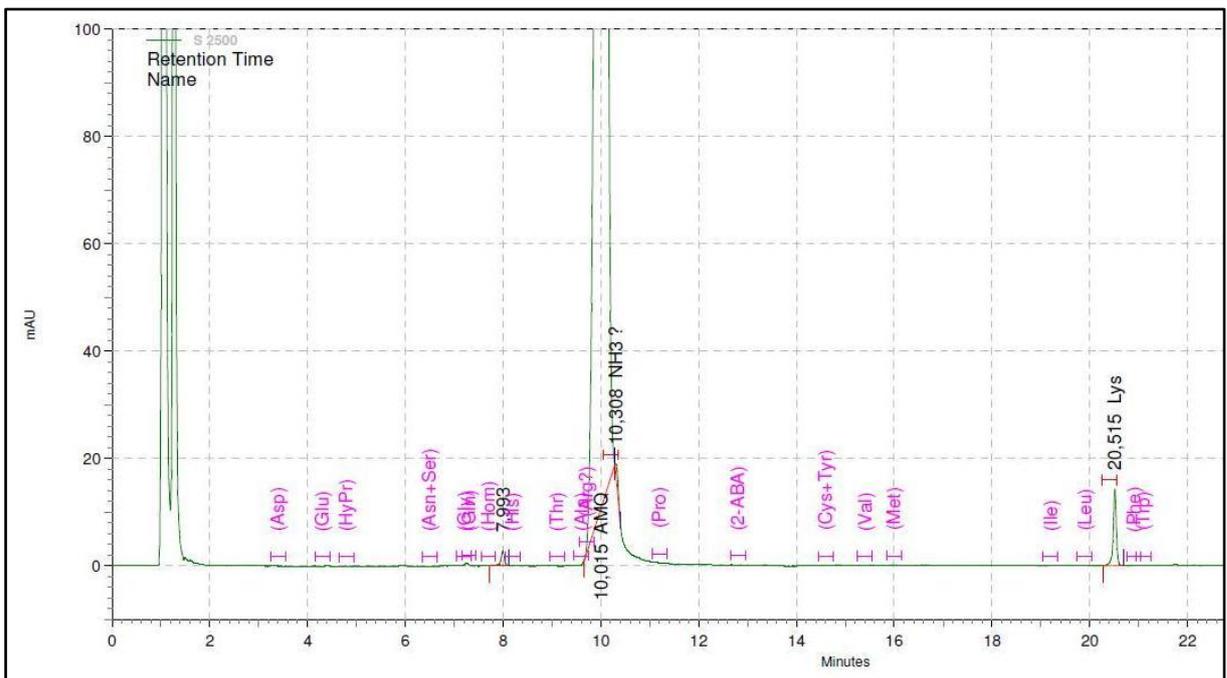


Diagramm 6.2. Ergebnisse der Messung für *Corynebacterium glutamicum*::CLYSC-MUT6-CPPC-R873G-26F//newhom-R441A-6, 54 h

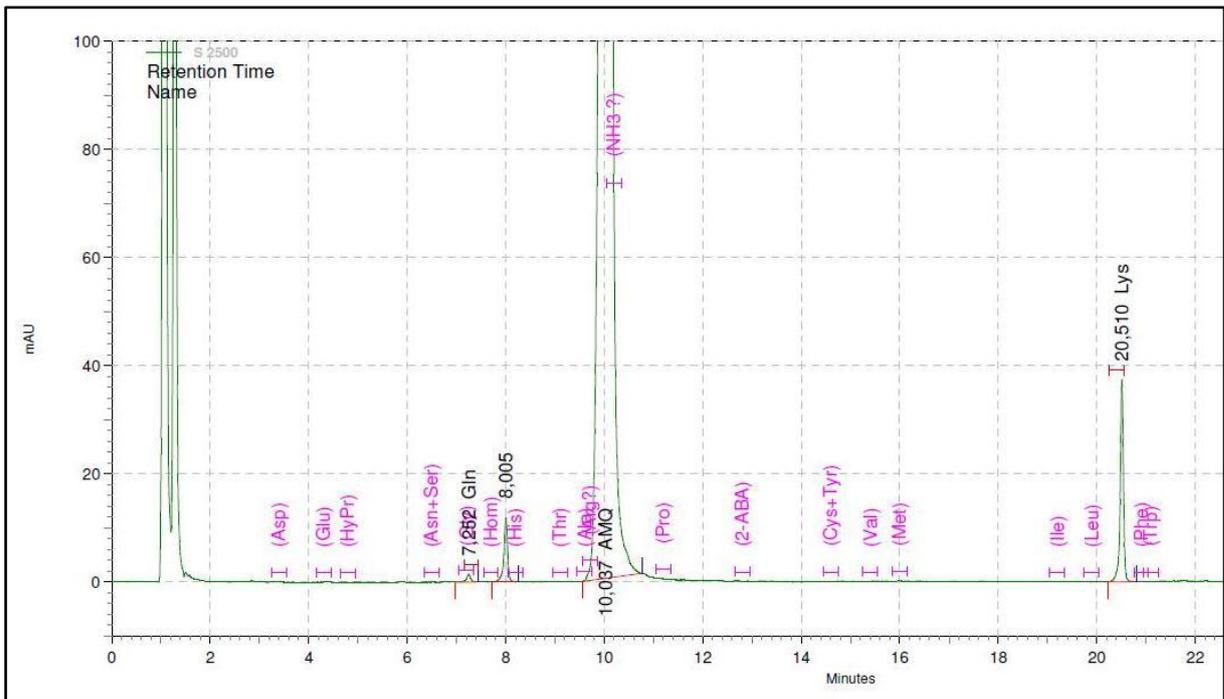


Diagramm 6.3. Ergebnisse der Messung für *Corynebacterium glutamicum*::CLYSC-MUT6-CPPC-R873G-26F//newhom-R441A-6, 78 h

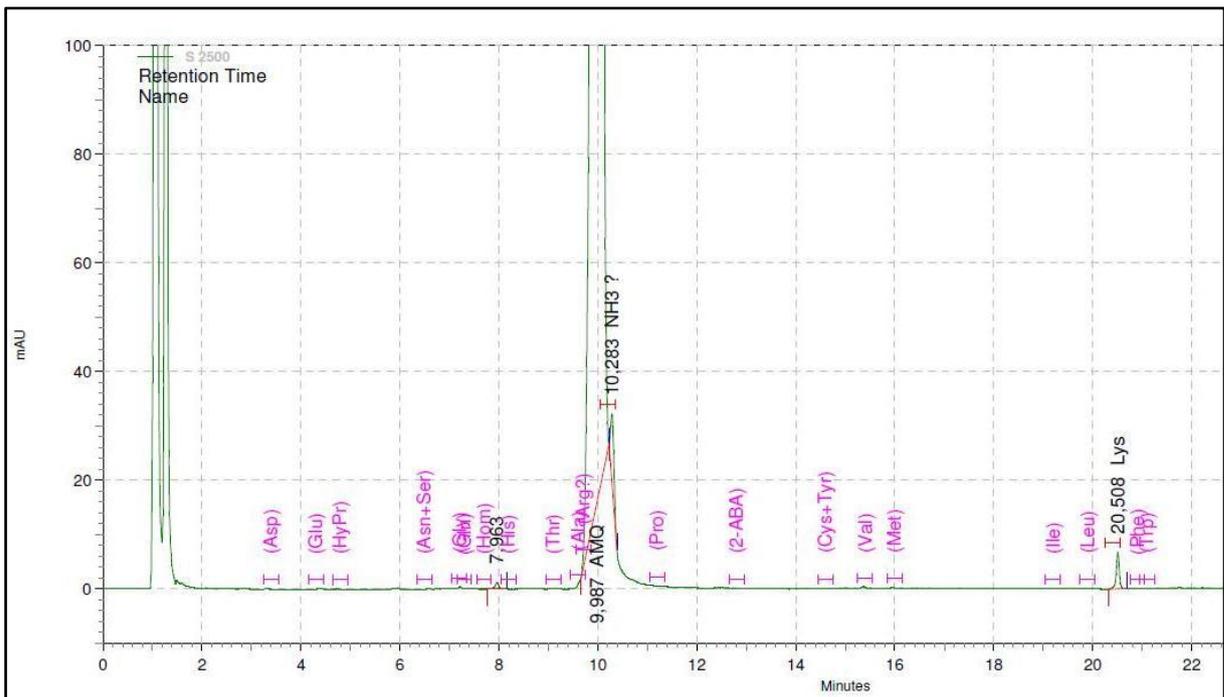


Diagramm 6.4. Ergebnisse der Messung für *Corynebacterium glutamicum*::CLYSC-MUT6-CPPC-R873G-26F//newhom-R441A-7, 48 h

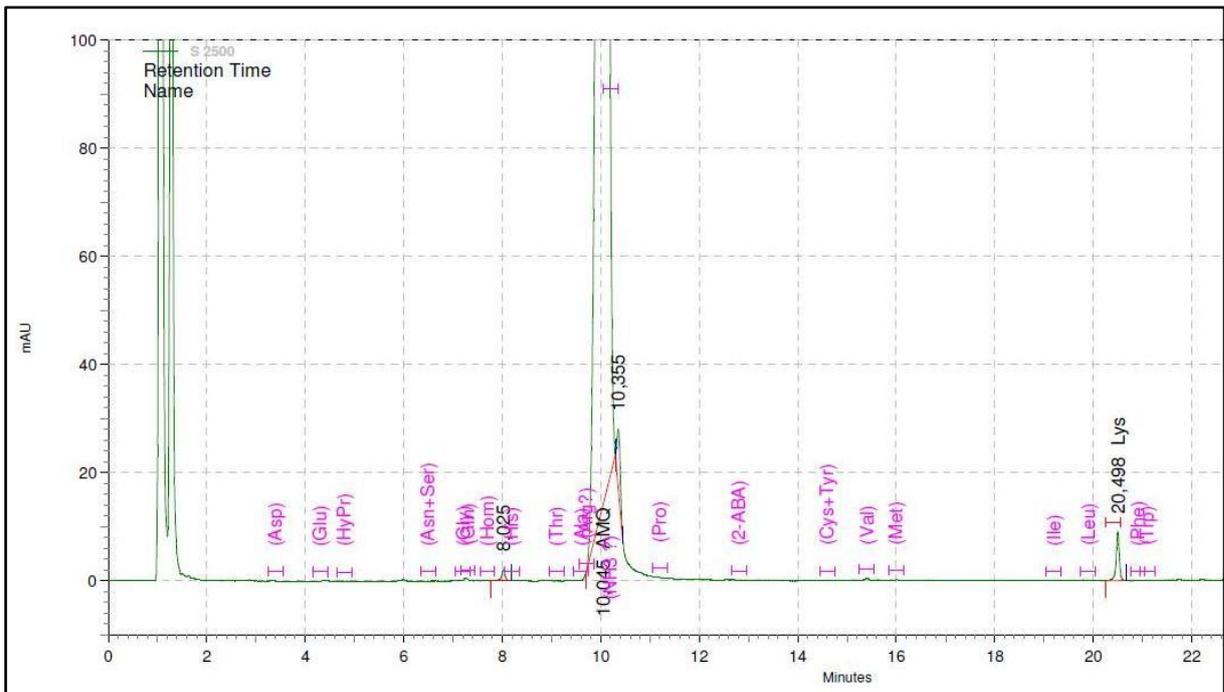


Diagramm 6.5. Ergebnisse der Messung für *Corynebacterium glutamicum*::CLYSC-MUT6-PPC-R873G-26F//newhom-R441A-7, 54 h

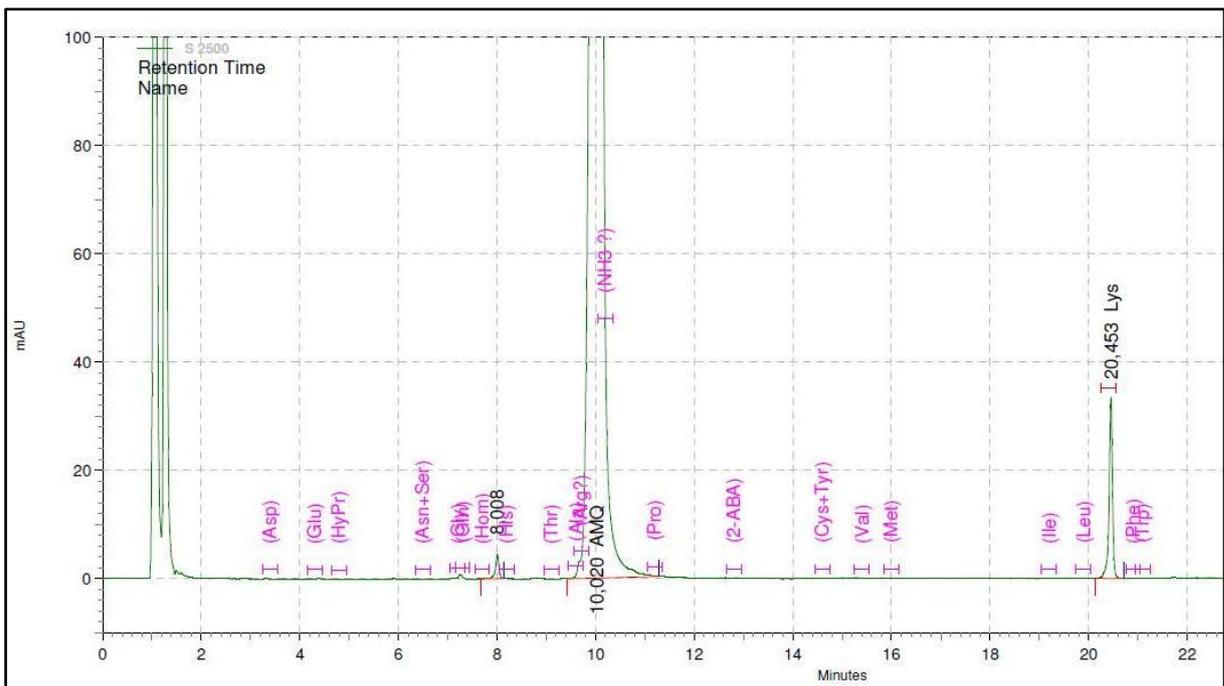


Diagramm 6.6. Ergebnisse der Messung für *Corynebacterium glutamicum*::CLYSC-MUT6-PPC-R873G-26F//newhom-R441A-7, 78 h

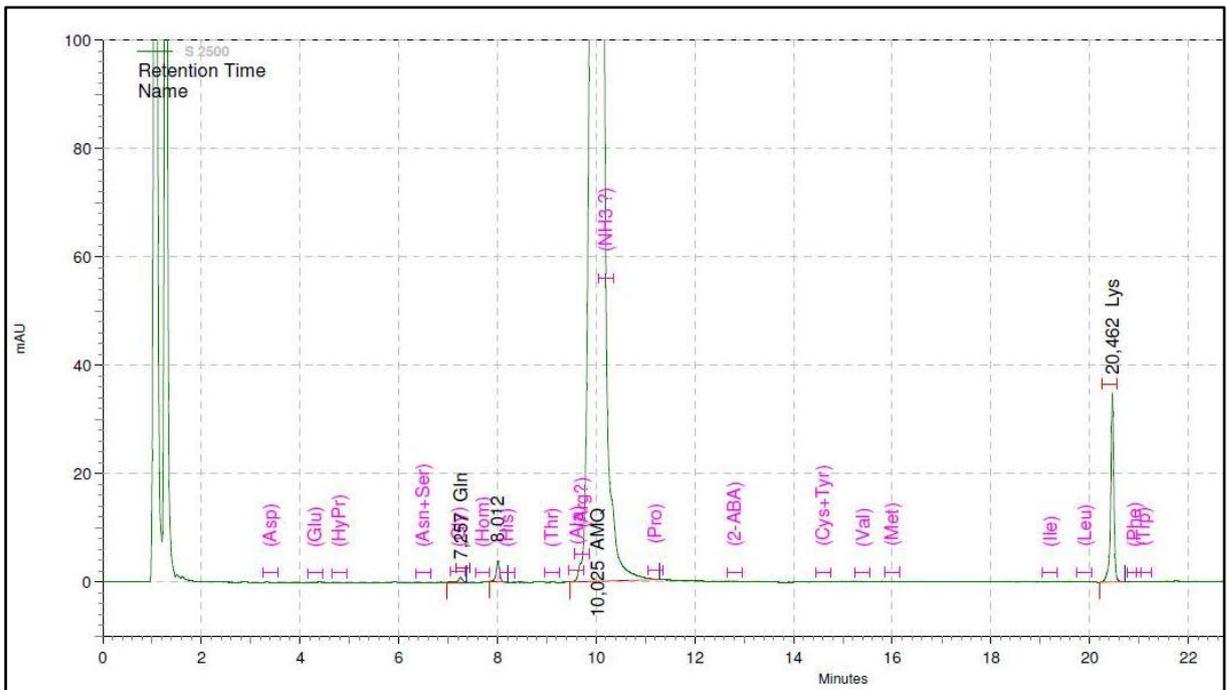


Diagramm 6.7. Ergebnisse der Messung für *Corynebacterium glutamicum*::CLYSC-MUT6-CPPC-R873G-26F, 24 h

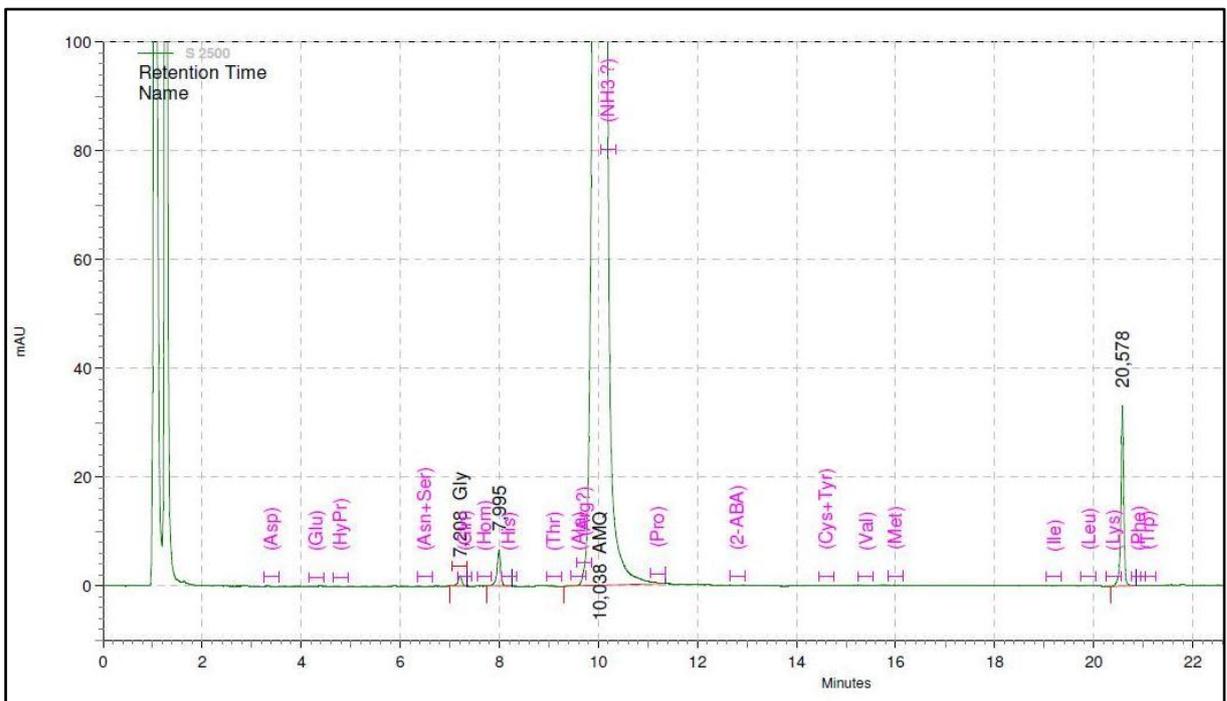


Diagramm 6.8. Ergebnisse der Messung für *Corynebacterium glutamicum*::CLYSC-MUT6-CPPC-R873G-26F, 48 h

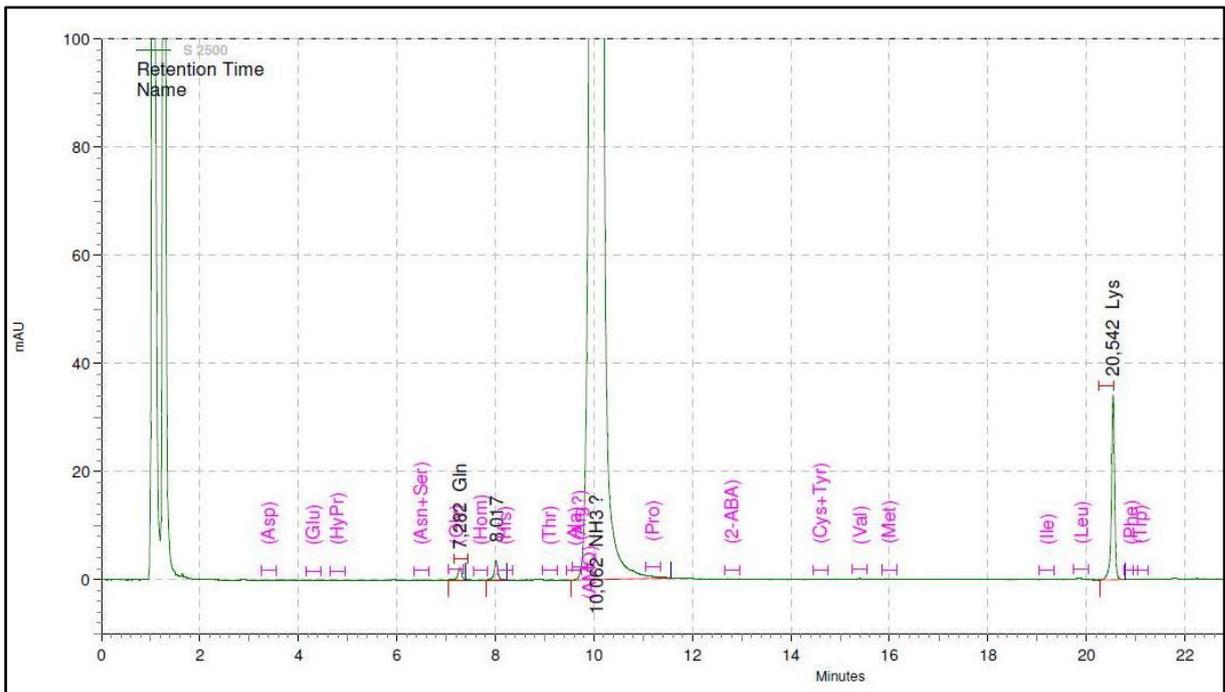


Diagramm 6.9. Ergebnisse der Messung für *Corynebacterium glutamicum*::CLYSC-MUT6-CPPC-R873G-26F, 78 h

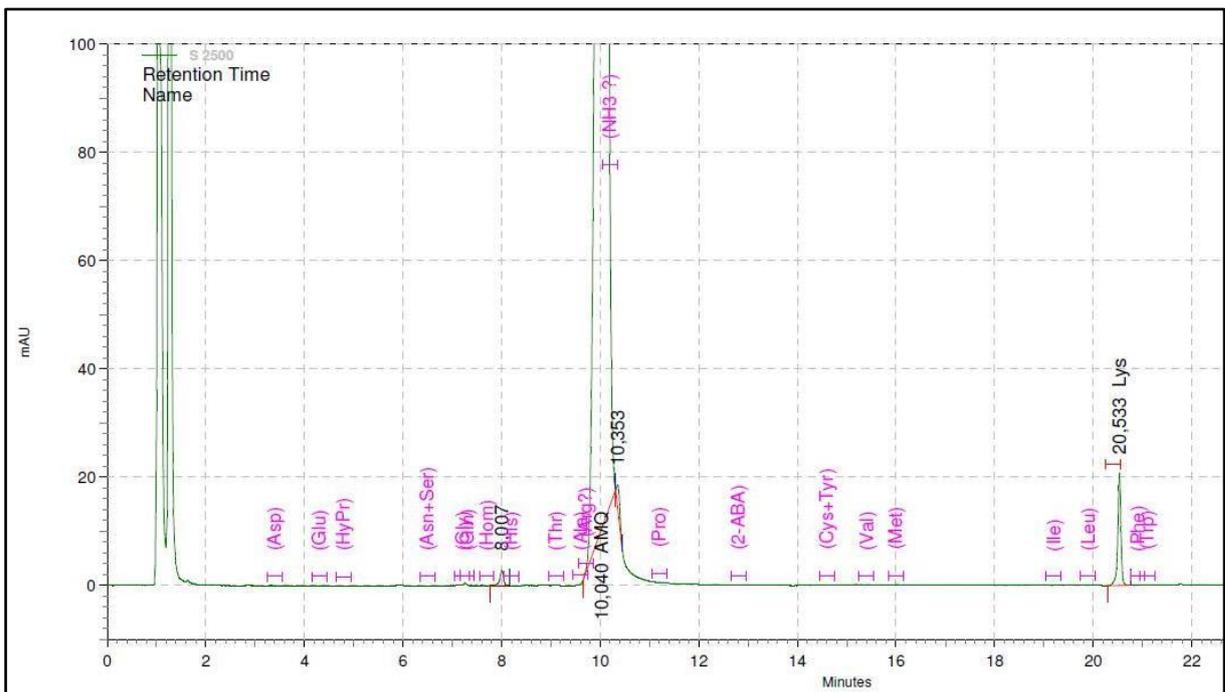


Diagramm 6.10. Ergebnisse der Messung für *Corynebacterium glutamicum*:: CLYSC-MUT6-CPPC-N917G-8F//newhom-R441A-12, 24 h

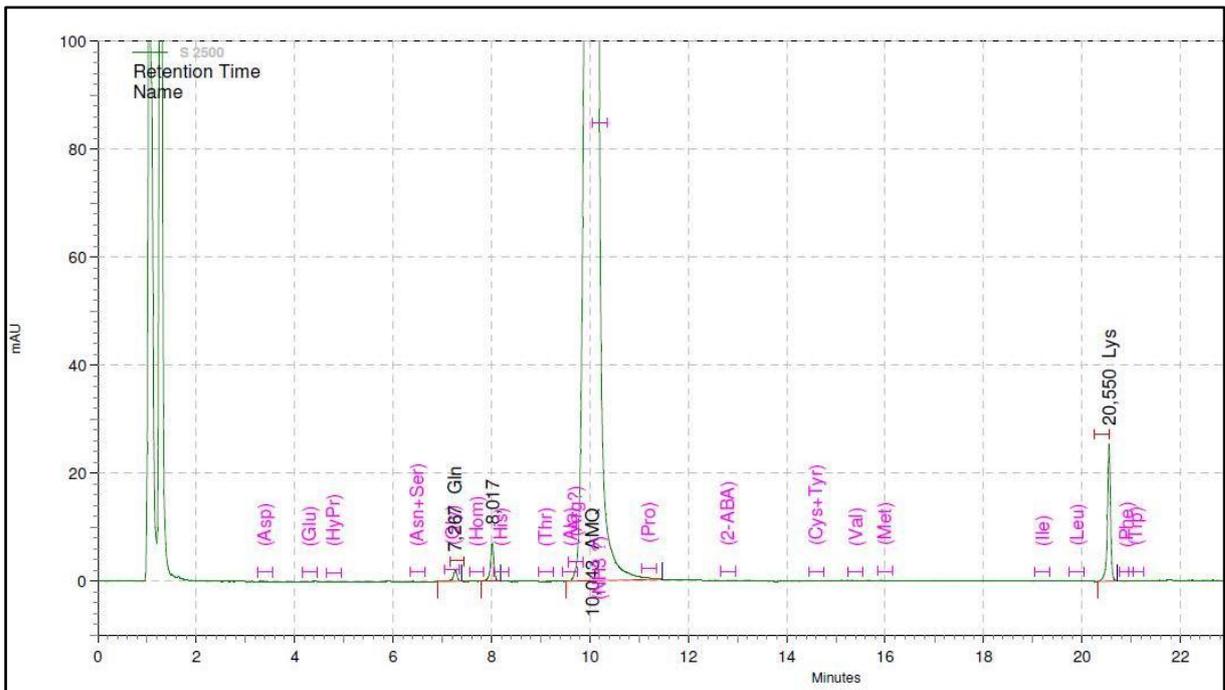


Diagramm 6.11. Ergebnisse der Messung für Corynebacterium glutamicum:: CLYSC-MUT6-CPPC-N917G-8F//newhom-R441A-12, 48 h

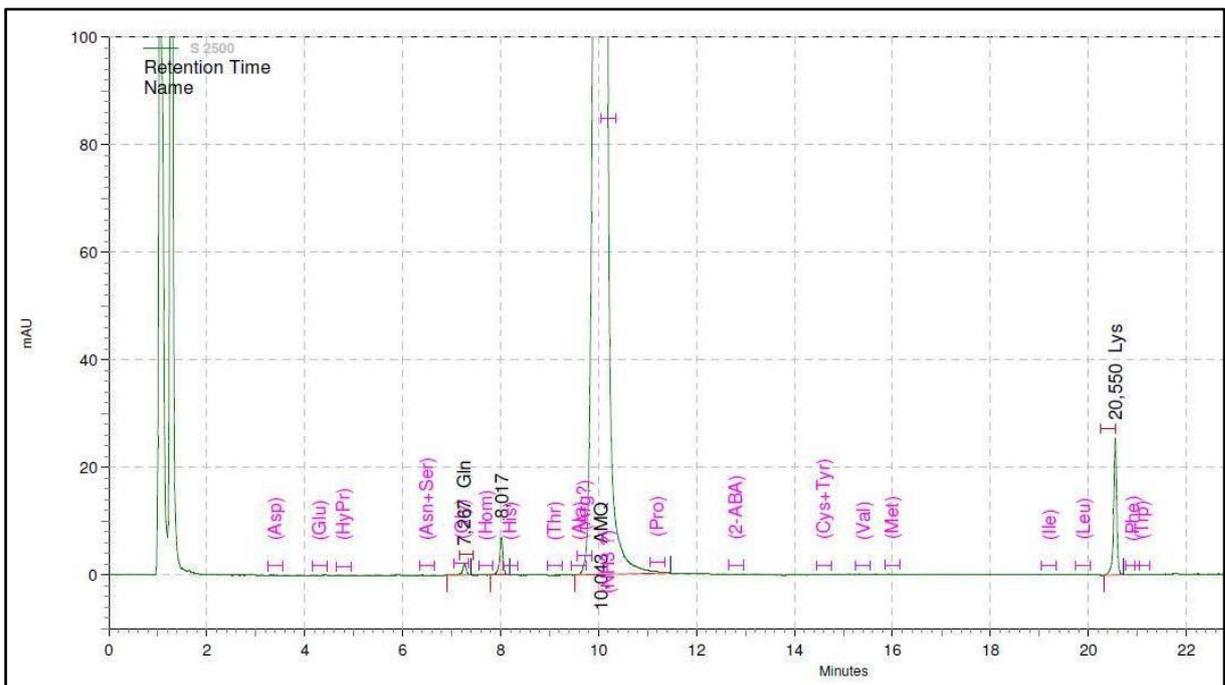


Diagramm 6.12. Ergebnisse der Messung für Corynebacterium glutamicum:: CLYSC-MUT6-CPPC-N917G-8F//newhom-R441A-12, 78 h

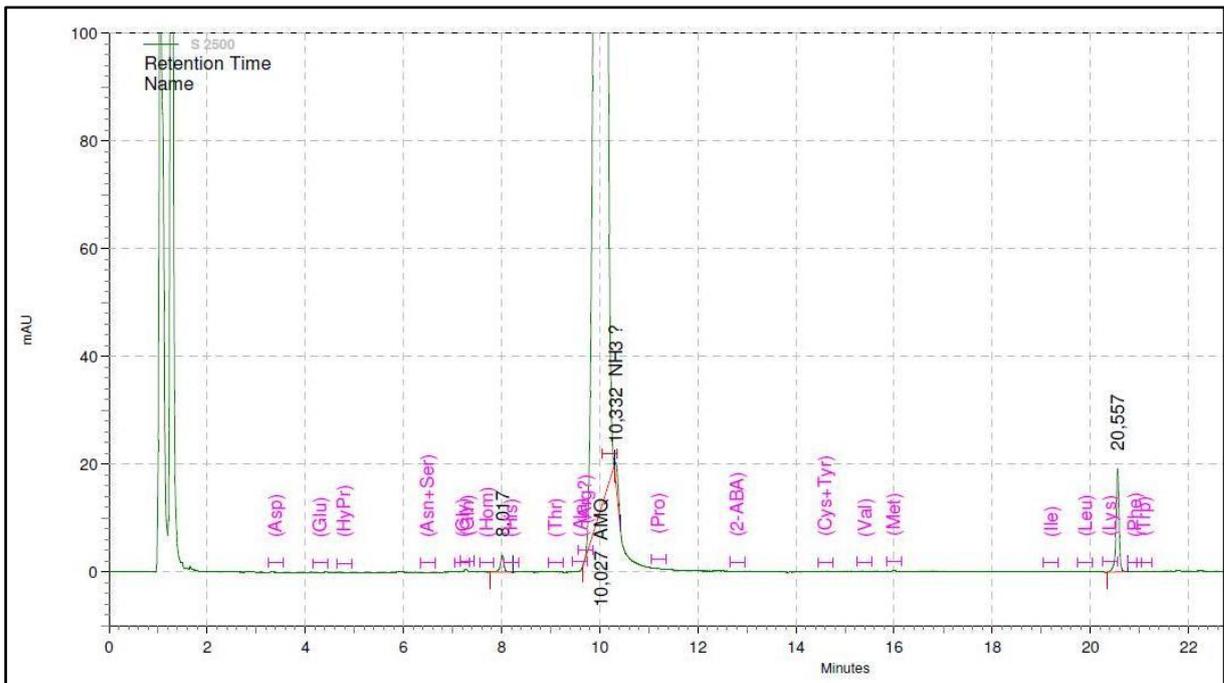


Diagramm 6.13. Ergebnisse der Messung für Corynebacterium glutamicum:: CLYSC-MUT6-CPPC-N917G-8F//newhom-R441A-13, 24 h

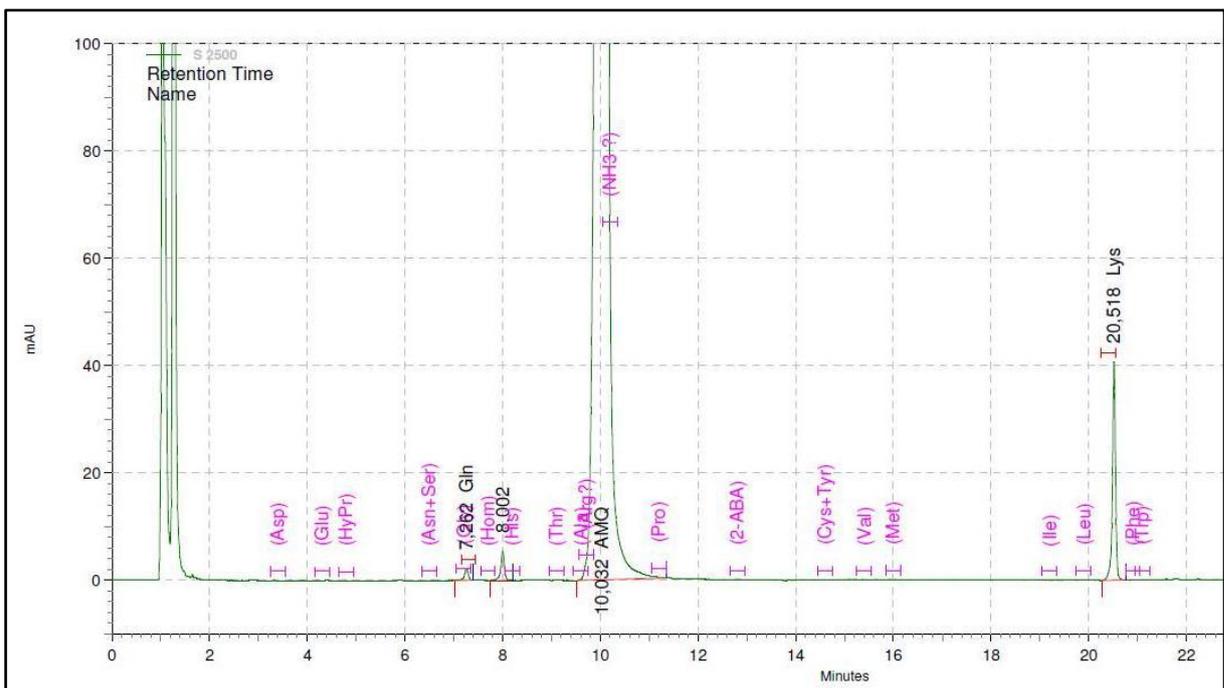


Diagramm 6.14. Ergebnisse der Messung für Corynebacterium glutamicum:: CLYSC-MUT6-CPPC-N917G-8F//newhom-R441A-13, 48 h

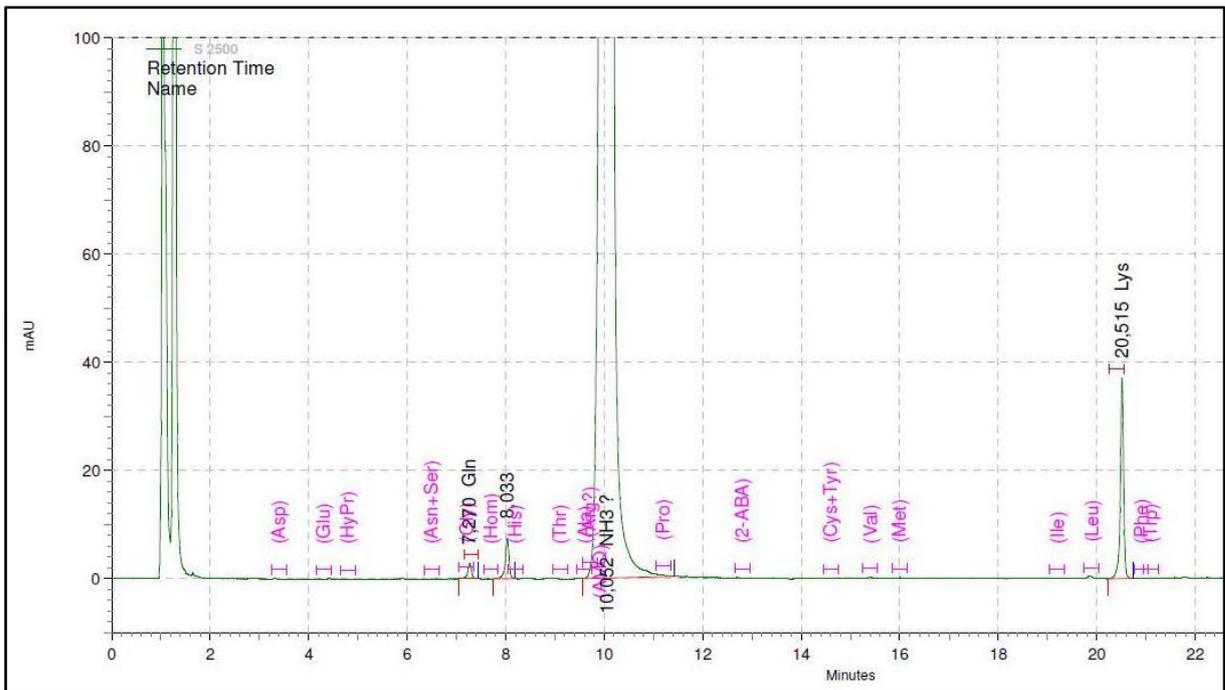


Diagramm 6.15. Ergebnisse der Messung für *Corynebacterium glutamicum*:: CLYSC-MUT6-CPPC-N917G-8F//newhom-R441A-13, 78 h

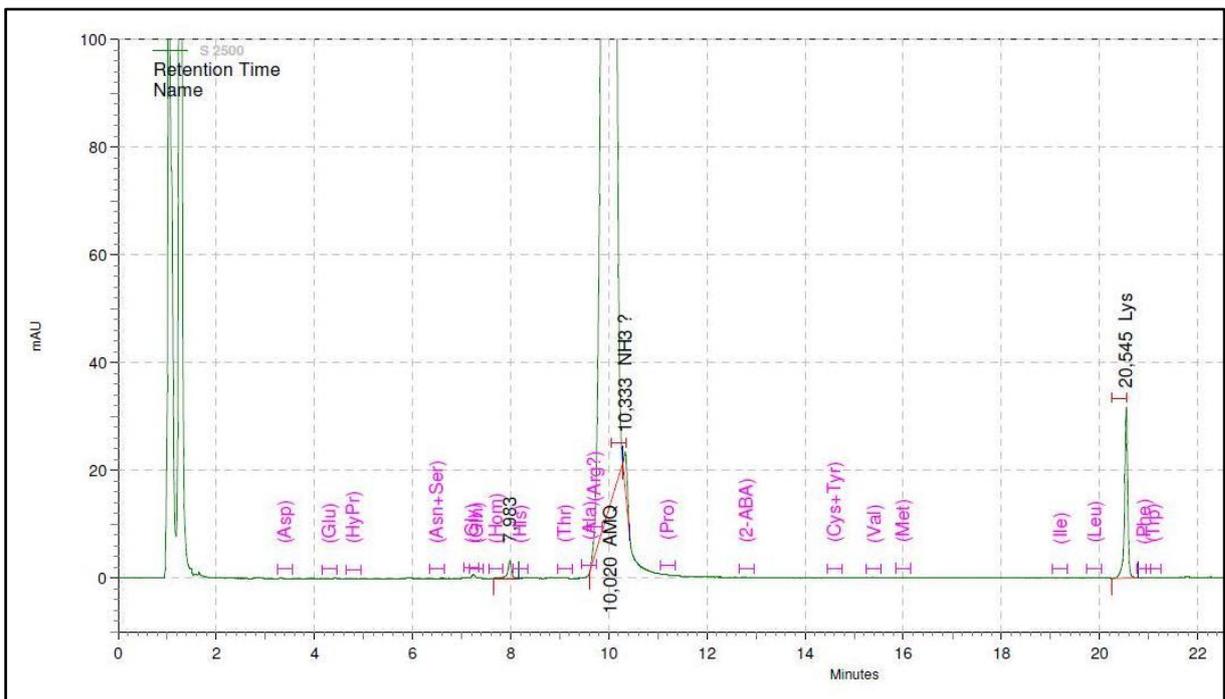


Diagramm 6.16. Ergebnisse der Messung für *Corynebacterium glutamicum*:: CLYSC-MUT6-CPPC-N917G-8F, 24 h

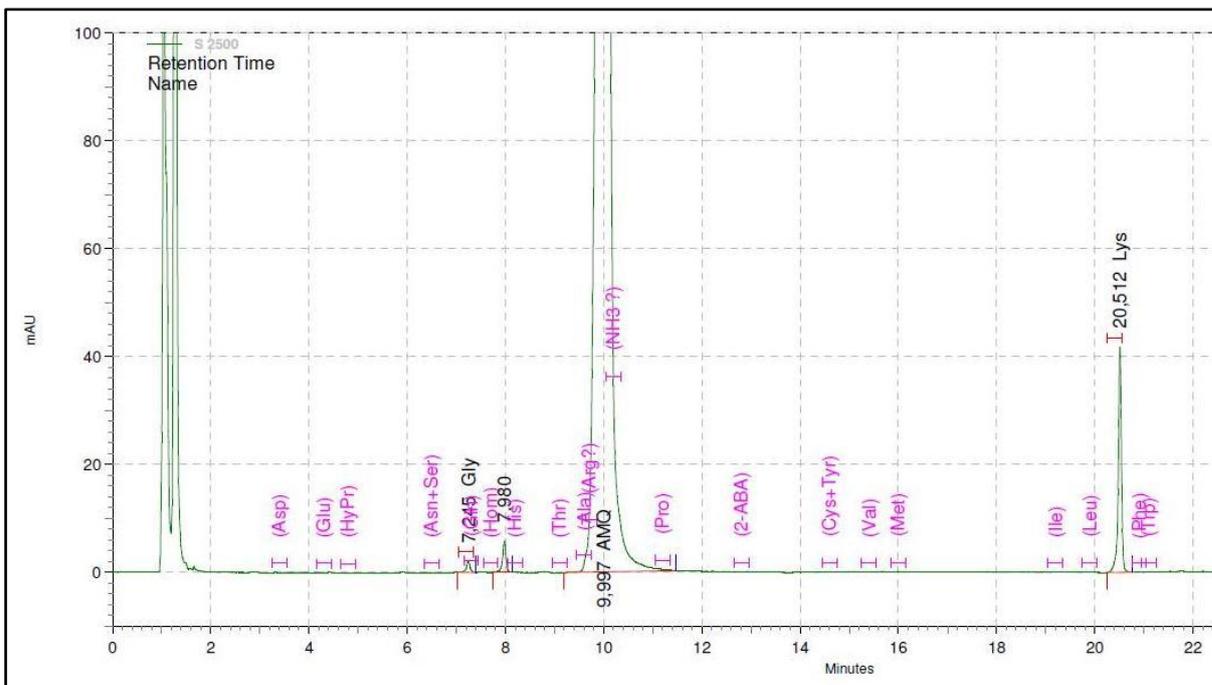


Diagramm 6.17. Ergebnisse der Messung für *Corynebacterium glutamicum*:: CLYSC-MUT6-CPPC-N917G-8F, 48 h

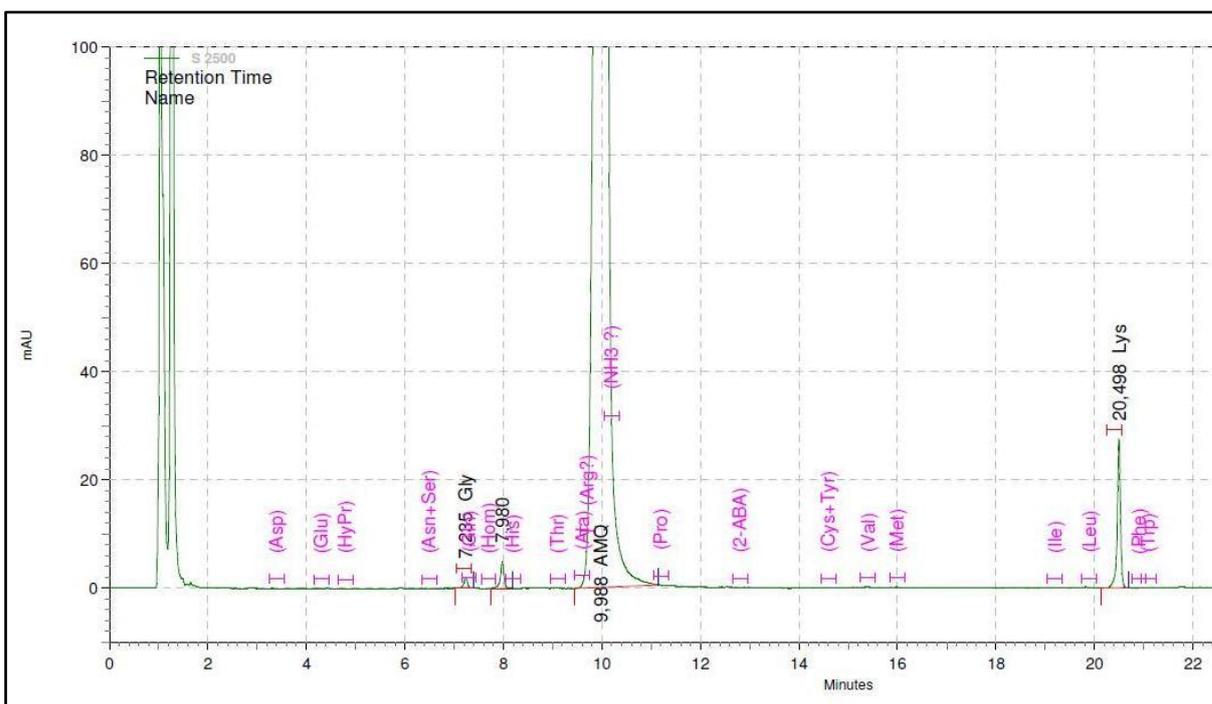


Diagramm 6.18. Ergebnisse der Messung für *Corynebacterium glutamicum*:: CLYSC-MUT6-CPPC-N917G-8F, 78 h