

## Inhaltsverzeichnis

Titel	Seitenzahl
ZUSAMMENFASSUNG (ENGLISCH)	6
ZUSAMMENFASSUNG (DEUTSCH)	7
ABKÜRZUNGEN	12
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>14</b>
1.1 <i>Corynebacterium glutamicum</i>	14
1.2 Biotechnologische Produktion von Lysin	15
1.3 Citratsynthese von <i>C. glutamicum</i>	18
1.4 Systembiologie zum rationalen Stammdesign von <i>C. glutamicum</i>	20
1.5 Aufgabenstellung	22
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>23</b>
2.1 Material	23
2.1.1 Stämme und Plasmide	23
2.1.2 Chemikalien	27
2.2 Methoden	28
2.2.1 Kultivierungsbedingungen und Medien	28
2.2.1.1 Medien	28
2.2.1.2 Kultivierung	29
2.2.1.2 Kultivierung im Bioreaktor	29
2.2.1.2 Stammhaltung	30
2.2.1.2 Bestimmung des Bakterienwachstums	30
2.2.2 Molekulargenetische Methoden	31
2.2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA	31
2.2.2.2 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentration	31
2.2.2.3 Ligationen, Modifikationen und Restriktionsspaltungen von DNA	31
2.2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese	32
2.2.2.5 Transformation von <i>E. coli</i> und <i>C. glutamicum</i>	32
2.2.2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)	33
2.2.2.7 DNA Sequenzierungen	34
2.2.2.8 Isolierung von RNA	34
2.2.2.9 Synthese von cDNA	35
2.2.2.10 RNA-ligase mediated rapid amplification of cDNA ends (RLM-RACE)	35

2.2.2.11 Northern Blot	36
2.2.2.12 Genomweite Expressionsanalysen (Microarray)	36
2.2.3 Proteinbiochemische Arbeiten	38
2.2.3.1 Herstellung zellfreier Extrakte	38
2.2.3.1 Proteinbestimmung	38
2.2.3.2 Bestimmung von Enzymaktivitäten	38
2.2.3.3 Westernblot	39
2.2.4 Quantitative Bestimmung von Metaboliten	40
2.2.4.1 Quantitative Bestimmung von Aminosäuren im Kulturüberstand	40
2.2.4.2 Quantitative Bestimmung von Glucose im Kulturüberstand	40
2.2.4.3 Quantitative Bestimmung von organischen Säuren im Kulturüberstand	41
2.2.4.4 Quantitative Bestimmung intrazellulärer Metabolite	41
2.2.4.5 Quantitative Bestimmung extrazellulärer Raten durch ein Prozessmodell	41
<b>3. ERGEBNIS</b>	<b>43</b>
3.1 Charakterisierung der <i>gltA</i> Transkripte	43
3.1.1 Untersuchung der Promotorbereiche von <i>gltA</i>	43
3.1.2 Zwei monocistronische <i>gltA</i> -Transkripte	44
3.1.3 Promotoren und Terminator von <i>gltA</i>	46
3.2 Fkb (NCgl0796) Ein Chaperon der Citratsynthese	47
3.3 Regulation der <i>gltA</i> Transkription in <i>C. glutamicum</i>	48
3.3.1 <i>gltA</i> -Expression bei Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen	49
3.3.2 RamA und RamB regulieren die <i>gltA</i> -Expression	51
3.4 Austausch der <i>gltA</i> -Promotoren	54
3.4.1 Auswahl der <i>dapA</i> -Promotoren	55
3.4.2 Auswirkungen der reduzierten der CS-Aktivität	56
3.4.3 Bildung der CS-Proteine durch die <i>dapA</i> -Promotoren	57
3.4.4 Verringerte CS wirkt sich auf Wachstum und Lysinausbeute aus	58
3.5 Globale Auswirkungen der CS Reduktion	62
3.5.1 Vergleichende genomweite Expressionsanalyse	63
3.5.2 Einfluss von <i>aceA</i> , <i>aceB</i> , <i>pck</i> und <i>odx</i> auf die Lysinausbeute	67
3.5.3 Bestimmung interner Metabolitkonzentrationen	68
3.6 Kohlenstoffbilanzen und Ratenbestimmung	72
3.6.1 Kultivierung der Stämme unter Batch-Bedingungen im Bioreaktor	72
3.7 Supplementation der DM1800-CS- <i>dapA</i> -Promotormutanten	75
3.7.1 Supplementation mit Glutamat, Arginin, Prolin und Citrat	76
3.7.2 Charakterisierung der Prolin-Supplementation von DM1800'C7	77

3.7.3 Vergleich von Prolin- und Betainzugabe bei reduzierter CS-Aktivität	79
3.7.4 Kohlenstoffbilanz und extrazelluläre Raten bei Prolinsupplementation	81
3.8 Bearbeitung weiterer Zielgene zur verbesserten Lysinproduktion	83
3.8.1 Pyruvatdehydrogenase	83
3.8.2 Glucose-6-Phosphatdehydrogenase	84
4. DISKUSSION	87
4.1 Charakterisierung der gltA (Citratsynthase) Transkription	87
4.2 Promotoraustausch der Citratsynthase	89
4.3 Globale Auswirkungen der Citratsynthasereduktion	90
4.4 Extrazelluläre Flüsse und Kohlenstoffbilanzen	94
4.5 Supplementation der CS-Mutanten	95
4.6 Expression der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase	96
5. LITERATURVERZEICHNIS	98
ANHANG	110
DANKSAGUNG	116