

UNIVERZITA KARLOVA

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Doktorská disertační práce

**Úloha synthasy acetoxykyselin
z *Corynebacterium glutamicum*
v biosyntetické dráze valinu**

Veronika Elišáková

AKADEMIE VĚD ČESKÉ REPUBLIKY

MIKROBIOLOGICKÝ ÚSTAV

Školitel: Ing. Miroslav Pátek, CSc.

Praha 2005

Děkuji především svému školiteli Ing. Miroslavu Pátkovi, CSc. za odborné vedení a veškerou pomoc a podporu během vypracování této disertační práce (rovněž za provedení experimentu *primer extension*).

Děkuji Mgr. Jiřímu Holátkovi za měření HPLC, Daně Lukavské za praktickou pomoc při stanovení specifické aktivity AHAS a Ing. Martinovi Veselému za pomoc při práci s počítačem.

Děkuji RNDr. Janu Nešverovi, CSc. a všem kolegům laboratoře 123 za vytvoření přátelského pracovního prostředí, pomoc i cenné rady.

V neposlední řadě děkuji za veškerou podporu svojí rodině.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

1. ÚVOD	1
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	2
2.1. Rod <i>Corynebacterium</i>	2
2.1.1. <i>Corynebacterium glutamicum</i> a jeho využití.....	3
2.2. Aminokyseliny.....	5
2.2.1. Průmyslová výroba aminokyselin.....	5
2.2.1.1. Produkční kmeny.....	5
2.2.2. Ekonomický význam aminokyselin.....	8
2.2.3. Obecné principy biosyntézy aminokyselin a její regulace.....	8
2.2.3.1. Regulace na úrovni genové exprese.....	9
2.2.3.1.1. Represe transkripce.....	9
2.2.3.1.2. Atenuace transkripce.....	10
2.2.3.2. Regulace na úrovni aktivity enzymů.....	12
2.2.3.2.1. Substrátová specifita enzymů.....	12
2.2.3.2.2. Inhibice enzymu zpětnou vazbou.....	13
2.3. Biosyntéza valinu.....	13
2.3.1. Biosyntéza valinu v <i>C. glutamicum</i>	14
2.3.1.1. Biosyntetická dráha.....	14
2.3.1.2. Organizace genů a regulace exprese.....	17
2.3.2. Biosyntéza valinu v <i>E. coli</i>	19
2.3.2.1. Biosyntetická dráha.....	19
2.3.2.2. Organizace genů a regulace exprese.....	20
2.3.3. Biosyntéza valinu u dalších mikroorganismů a rostlin.....	23
2.4. Synthasa acetohydroxykyselin (AHAS).....	25
2.4.1. Enzym AHAS z <i>C. glutamicum</i>	26
2.4.2. Enzym AHAS z <i>E. coli</i>	27
2.4.3. Enzym AHAS z dalších mikroorganismů a rostlin.....	30
3. MATERIÁL A METODY	33
3.1. Materiál.....	33
3.1.1. Kultivační půdy.....	33
3.1.1.1. Půdy kompletní.....	33
3.1.1.2. Půdy minimální.....	34
3.1.2. Bakteriální kmeny.....	35
3.1.3. Plazmidy.....	36
3.1.4. Primery (Oligonukleotidy) pro PCR.....	37
3.1.5. Použitý software.....	39
3.2. Metody.....	39
3.2.1. Kultivace <i>E. coli</i> a <i>C. glutamicum</i>	39
3.2.2. Identifikace klonů <i>E. coli</i> s rekombinantními plazmidy α -komplementací.....	39
3.2.3. Izolace nukleových kyselin.....	40
3.2.3.1. Izolace plazmidové DNA z <i>E. coli</i>	40
3.2.3.2. Izolace plazmidové DNA z <i>C. glutamicum</i>	42
3.2.3.3. Izolace chromosomové DNA z <i>C. glutamicum</i>	42
3.2.4. Transformace.....	43
3.2.4.1. Transformace <i>E. coli</i>	43
3.2.4.2. Transformace <i>C. glutamicum</i> elektroporací.....	44

3.2.4.3. Vysoce účinná elektrotransformace <i>C. glutamicum</i>	45
3.2.5. Elektroforetická analýza DNA v agarosovém gelu.....	46
3.2.6. Manipulace s DNA.....	46
3.2.6.1. Extrakce fenolem.....	46
3.2.6.2. Srážení DNA ethanolem.....	47
3.2.6.3. Izolace plazmidové DNA a jejích fragmentů z gelu.....	47
3.2.6.4. Štěpení DNA restrikčními endonukleasami.....	47
3.2.6.5. Zatupení konců restrikčních fragmentů Klenowovým fragmentem DNA-polymerasy I.....	48
3.2.6.6. Defosforylace vektoru alkalickou fosfátasou.....	48
3.2.6.7. Ligace fragmentů plazmidové DNA.....	49
3.2.7. Polymerasová řetězová reakce (PCR).....	49
3.2.8. Místně specifická mutagenese (cílená mutagenese).....	50
3.2.9. Zavádění mutací a delecí do chromosomu <i>C. glutamicum</i>	52
3.2.9.1. Syntéza fragmentu nesoucího delecí (mutaci).....	52
3.2.9.2. Zavedení delecí (mutací) do chromosomu.....	54
3.2.10. Měření promotorové aktivity.....	55
3.2.10.1. Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) chloramfenikolu.....	55
3.2.10.2. Stanovení specifické aktivity chloramfenikolacetyltransferasy (CAT).....	55
3.2.11. Stanovení specifické aktivity synthasy acetoxyhydroxykyselin (AHAS)...	57
3.2.12. Stanovení produkce valinu.....	59
3.2.12.1. Detekce produkce valinu na miskách.....	59
3.2.12.2. Stanovení produkce valinu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC).....	60
4. VÝSLEDKY	61
4.1. Transkripční analýza genů <i>ilvB</i> a <i>ilvN</i> kódujících enzym AHAS.....	61
4.1.1. Promotor genu <i>ilvB</i> (P- <i>ilvB</i>).....	61
4.1.2. Promotor genu <i>ilvN</i> (P- <i>ilvN</i>).....	66
4.2. Konstrukce enzymu AHAS rezistentního ke zpětnovazebné inhibici.....	69
4.2.1. Konstrukce vektoru pECKA.....	69
4.2.2. Vložení operonu <i>ilvBNC</i> do vektoru pECKA.....	71
4.2.3. Konstrukce kmene <i>C. glutamicum</i> $\Delta ilvN$	72
4.2.4. Cílená (místně specifická) mutagenese genu <i>ilvN</i>	73
4.2.5. Zavedení mutace M13 do chromosomu <i>C. glutamicum</i>	76
4.2.6. Konstrukce kmenů <i>C. glutamicum</i> se zkrácenou regulační podjednotkou enzymu AHAS.....	78
4.3. Konstrukce kmenů <i>C. glutamicum</i> produkujících valin.....	80
4.3.1. Zavedení delece do genu <i>ilvA</i>	80
4.3.2. Zavedení delece do genu <i>panB</i>	81
4.3.3. Zavedení delece atenuátoru do vedoucí sekvence genu <i>ilvB</i>	81
4.3.4. Zavedení mutace M13 do genu <i>ilvN</i>	82
4.3.5. Klonování operonu <i>ilvBNC</i> v mnohokopiovém vektoru.....	82
4.3.6. Měření produkce valinu u vybraných kmenů <i>C. glutamicum</i>	83
4.3.7. Charakterizace kmene <i>C. glutamicum</i> $\Delta ilvA \Delta panB ilvNM13 /$ pECKA <i>ilvBNC</i>	87
5. DISKUSE	88
5.1. Transkripční analýza genů <i>ilvB</i> a <i>ilvN</i>	88

5.1.1. Promotor P-ilvB.....	88
5.1.2. Promotor P-ilvN.....	91
5.2. Konstrukce enzymu AHAS rezistentního ke zpětnovazebné inhibici.....	92
5.3. Konstrukce produkčních kmenů.....	95
6. ZÁVĚR.....	99
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	100

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A - adenin
AHAS - synthasa acetoxyhydroxykyselin
ATP - adenosin trifosfát
Att - atenuátor
bp (bps) - páry bází
BSA - hovězí sérový albumin
C - cytosin
cAMP - cyklický adenosin-5'-monofosfát
CAT - chloramfenikolacetyltransferasa
CoA - koenzym A
DNA - deoxyribonukleová kyselina
DR - nedokonalá přímá repetice
DTNB - 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoová kyselina
DTT - dithiothreitol
dNTP - deoxyribonukleotid trifosfát
EDTA - ethylendiaminotetraoctová kyselina
FAD - flavinadenin dinukleotid
G - guanin
HPLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IPTG - isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid
kb - tisíce párů bází
kDa - kilodaltony
Km^R - rezistence ke kanamycinu
Mb - milióny párů bází
MIC - minimální inhibiční koncentrace
MOPS - morfolinpropansulfonová kyselina
mRNA - mediátorová ribonukleová kyselina
NADPH - nikotinamidadenin dinukleotid fosfát
OD₆₀₀ - optická densita při vlnové délce 600 nm
PCR - polymerasová řetězová reakce
PEX - *primer-extension*
P-*ilvB* - promotor genu *ilvB*
P-*ilvN* - promotor genu *ilvN*
ppGpp - guanosin-5'-difosfát-3'-difosfát
RNA - ribonukleová kyselina
rRNA - ribosomální ribonukleová kyselina
SAP - alkalická fosfatasa izolovaná z garnáta
SDS - dodecylsulfát sodný
T - thymin
TNB - 5'-thio-2-nitrobenzoová kyselina
TPP - thiamin pyrofosfát
Tris - tris-hydroxymethyl-aminomethan
tRNA - transferová ribonukleová kyselina
WT - divoký typ (*wild type*)
X-Gal – 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galaktopyranosid

1. ÚVOD

Aminokyseliny jsou objemem výroby po ethanolu druhou nejvýznamnější skupinou biotechnologických produktů. Jako základní stavební jednotky proteinů mají tyto látky nezastupitelnou funkci v živých organismech. Pouze eubakterie, nižší eukaryota a rostliny jsou schopny syntetizovat všech 20 základních aminokyselin obsažených v proteinech. Pro ostatní organismy jsou některé z aminokyselin esenciální, ty pak musí být součástí jejich potravy. Z tohoto důvodu jsou průmyslově vyráběné aminokyseliny využívány zejména v potravinářství a zemědělství jako přísady do potravin a krmných směsí, v lékařství jako složky infúzních roztoků a jako prekurzory při řadě chemických a biotechnologických výrob.

Již od 60. let minulého století se pro průmyslovou výrobu aminokyselin používá mikrobiální fermentace. Mezi nejvýznamnější producenty patří grampozitivní bakterie *Corynebacterium glutamicum*, která je v současné době využívána především k produkci lysinu a kyseliny glutamové. Pro výrobu aminokyselin v průmyslovém měřítku se používají kmeny, které většinou prošly několikastupňovým procesem šlechtění. Řada producentů byla připravena metodami klasické genetiky, které jsou založeny zejména na technikách náhodné mutagenese a selekce. Ekonomické hledisko výrob však vyžaduje stále zvyšování finální koncentrace a čistoty produkovaných metabolitů. Podstatné zvýšení konečné hladiny požadovaných produktů umožnil v polovině 80. let rozvoj genového inženýrství, které umožňuje cílené zásahy do genetické výbavy producentů. Tyto úpravy však mohou být provedeny až na základě detailní znalosti regulace exprese genů dané biosyntetické dráhy.

Cílem této disertační práce bylo studium klíčového kroku biosyntetické dráhy valinu u *C. glutamicum*. Valin, spolu s leucinem a isoleucinem, patří mezi aminokyseliny s větveným nepolárním postranním řetězcem. Pro člověka jsou tyto aminokyseliny esenciální a požadavky na jejich levnou mikrobiální výrobu v poslední době stále rostou. Klíčovým krokem syntézy je první reakce specifická pro biosyntézu valinu, která je katalyzována synthasou acetohydroxykyselin (AHAS). Tato disertační práce se zabývá analýzou obou základních typů regulace biosyntetických drah aminokyselin: 1) analýzou regulace syntézy klíčového enzymu represí nebo předčasnou terminací transkripce (v této části byly studovány promotorové sekvence genů *ilvB* a *ilvN* kódující dvě podjednotky enzymu AHAS), 2) analýzou regulace aktivity enzymu (tato studie zahrnuje konstrukci enzymu AHAS rezistentního ke zpětnovazební inhibici valinem). Na závěr byly získané poznatky využity pro konstrukci kmenů *C. glutamicum* produkujících zvýšené množství valinu. Tyto kmeny mohou být základem pro konstrukci průmyslových produkčních kmenů nové generace.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Rod *Corynebacterium*

Rod *Corynebacterium* patří mezi nesporulující, grampozitivní, aerobní či fakultativně anaerobní a obligátně chemoorganotrofní mikroorganismy. Tvar buňky závisí u těchto bakterií na stáří kultury a použitém kultivačním mediu. Během růstu se rovné nebo zakřivené tyčinky, které bývají na jednom konci kyjovitě rozšířené a často tvoří formace ve tvaru písmene V, zkracují nebo rozpadají na jednotlivé buňky kokovitého tvaru (Talaro a Talaro, 1996).

Mezi nejvýznamnější charakteristiky těchto bakterií patří neobvyklé složení jejich buněčné stěny (Marienfeld *et al.*, 1997; Eggeling a Sahm, 2001; Puech *et al.*, 2001). I když *Corynebacterium* náleží mezi grampozitivní mikroorganismy, organizací povrchových obalů připomíná spíše bakterie gramnegativní (Bayan *et al.*, 2003). Spodní, silnou vrstvu buněčné stěny tvoří polymery arabinogalaktan a peptidoglykan, jehož specifickou součástí je peptid obsahující kyselinu meso-diaminopimelovou. V povrchové, lipidové vrstvě, jejíž struktura se s největší pravděpodobností velmi podobá vnější membráně gramnegativních bakterií, se nacházejí především řetězce kyseliny mykolové o délce 22 až 36 uhlíků. Právě chemické složení buněčných obalů, spolu se srovnávacími fylogenetickými studiemi nukleotidových sekvencí 16S-rRNA (Pascual *et al.*, 1995), potvrzuje blízkou příbuznost rodu *Corynebacterium* s rody *Gordona*, *Rhodococcus*, *Nocardia* a *Mycobacterium*, jejichž buněčná stěna rovněž obsahuje vysoký podíl kyseliny mykolové. Na základě této skutečnosti byl rod *Corynebacterium* zařazen mezi aktinomycety (Embley a Stackebrandt, 1994; Stackebrandt *et al.*, 1997).

Dalším významným znakem těchto bakterií je molární obsah guaninu a cytosinu (G+C) v DNA, který se pohybuje v rozmezí 51-65 %. Spolu s rody *Streptomyces* a *Mycobacterium* tak rod *Corynebacterium* patří mezi aktinomycety s vysokým obsahem G+C párů.

Zástupci rodu *Corynebacterium* jsou v přírodě hojně rozšířeni (Liebl *et al.*, 1991). Vyskytuje se mezi nimi řada patogenních druhů, například rostlinný patogen *C. fascians*, zvířecí patogen *C. pseudotuberculosis*, který vyvolává chronické, hnisavé infekce u ovcí, koz, koní a dalších teplokrevných zvířat, nebo *C. xerosis*, jenž je podmíněně patogenní obyvatel sliznice hosohltau. Nejvýznamnějším představitelem skupiny je lidský patogen *C. diphtheriae* způsobující záškrť. Symptomy tohoto onemocnění, jež může končit až smrtí pacienta, jsou důsledkem působení exotoxinu produkovaného tímto mikroorganismem.

Velmi početnou skupinu korynebakterií tvoří půdní, nepatogenní druhy, které nacházejí široké průmyslové uplatnění, především jako producenti aminokyselin. Nejvýznamnějším zástupcem této skupiny je *Corynebacterium glutamicum*.

2.1.1. *Corynebacterium glutamicum* a jeho využití

Kmeny druhu *Corynebacterium glutamicum* jsou v současné době využívány zejména pro průmyslovou produkci kyseliny L-glutamové a L-lysinu. Ročně se s použitím korynebakterií vyrobí až 1,5 miliónu tun glutamátu a více než 550 000 tun lysinu. Vyvíjeny jsou rovněž kmeny produkující další aminokyseliny, například isoleucin nebo threonin (Eggeling *et al.*, 1997). Proces mikrobiální fermentace je pro průmyslovou produkci aminokyselin využíván již od roku 1957, kdy byl v Japonsku izolován grampozitivní bakteriální kmen produkující vysoké množství kyseliny glutamové (až 30 g/l) (Kinoshita *et al.*, 1957). Nový mikroorganismus byl nejprve pojmenován *Micrococcus glutamicus* a později taxonomicky zařazen jako *Corynebacterium glutamicum*.

K druhu *C. glutamicum* byly na základě srovnávacích studií DNA-DNA nedávno zařazeny také kmeny původně známé jako *Brevibacterium lactofermentum* a *Brevibacterium flavum*. Dnes jsou tyto bakterie označeny jako *C. glutamicum subspecies lactofermentum* a *C. glutamicum subspecies flavum* (Liebl *et al.*, 1991).

C. glutamicum je půdní aerobní bakterie tvořící krátké nepravidelné tyčinky o velikosti 0,7-1 x 1-3 μm , které se často vyskytují v párech nebo shlucích. Velmi dobře roste v teplotním rozmezí 25-37 °C (optimální teplotou je 30 °C), zatímco při 42 °C se jeho růst výrazně zpomaluje. Kmeny *C. glutamicum* jsou schopny růst v minimálním minerálním mediu a syntetizovat všechny nezbytné buněčné komponenty a metabolity, kofaktory i vitamíny. Jedinou výjimku tvoří D-biotin, který musí být do kultivačního media přidáván (*C. glutamicum* je přirozený biotinový auxotrof). Vysvětlením tohoto defektu může být nepřítomnost genu *bioF* kódujícího jeden z enzymů biosyntetické dráhy biotinu (Hatakeyama *et al.*, 1993a; Hatakeyama *et al.*, 1993b).

Biotechnologický význam nepatogenních zástupců rodu *Corynebacterium* dokazuje mimo jiné i skutečnost, že v nedávné době byla publikována kompletní sekvence genomu těchto bakterií, a to třemi zcela nezávislými pracovišti. V databázi GenBank tak může být nalezena sekvence *C. glutamicum* (NC_003450) publikovaná japonskou společností Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. a sekvence blízkého příbuzného *C. efficiens* (NC_004369), který byl izolován a sekvenován japonskou konkurenční společností Ajinomoto Co. (Fudou *et al.*, 2002). Genom typového kmene *C. glutamicum* ATCC 13032 byl zcela nedávno sekvenován

také pracovištěm university v Bielefeldu ve spolupráci s německou společností Degussa AG (Kalinowski *et al.*, 2003). Výsledky kompletního sekvenování odhalily, že chromosom *C. glutamicum* je reprezentován kruhovou molekulou DNA o velikosti 3 282 708 bp, která je menší než genom taxonomicky blízkého kmene *M. tuberculosis* (4,2 Mb), ale větší než chromosom příbuzného *C. diphtheriae* (2,5 Mb). Obsah párů G+C činí 53,8 %. Pomocí počítačových programů vyhledávajících otevřené čtecí rámce bylo v chromosomu *C. glutamicum* nalezeno 3002 potenciálních genů, u 2489 z nich byla na základě homologických studií předpovězena funkce, u 250 zbývajících byla zjištěna podobnost s konzervovanými hypotetickými proteiny ostatních organismů. Pouze u 9 % genů zůstává funkce zatím neobjasněna.

Divoké kmeny *C. glutamicum* jsou schopny produkovat aminokyseliny převážně v nízkých koncentracích, které nejsou dostačující pro průmyslovou výrobu (Eikmanns *et al.*, 1993). Klasickým šlechtěním těchto kmenů, jehož základem jsou techniky náhodné mutagenese a následné selekce, bylo dosaženo vysoké produkce asi 15 různých aminokyselin. Od poloviny osmdesátých let minulého století jsou tyto metody obohaceny o techniky genového inženýrství, které pomocí zcela specifických a cílených zásahů do genomu této bakterie umožňují nalézt nové cesty k dosažení vyšší produkce (Jetten a Sinskey, 1995; Ikeda a Nakagawa, 2003). U korynebakterií tak byly postupně vyvinuty klonovací systémy založené na řadě kryptických plazmidů, které byly izolovány z *C. glutamicum* (Tauch *et al.*, 2003), zavedeny techniky genetických přenosů a zahájena molekulárně-genetická analýza (Bonamy *et al.*, 2003; Kirchner a Tauch, 2003). Detailně prostudovány jsou dnes také transkripční signály koryneformních bakterií (Pátek *et al.*, 1996; Vašicová *et al.*, 1999; Pátek *et al.*, 2003a; Pátek *et al.*, 2003b). Tyto výsledky potvrzují, že *C. glutamicum* disponuje mnoha vlastnostmi, které mu i nadále zajišťují přední místo mezi potenciálními producenty aminokyselin. K těmto charakteristikám patří, ve srovnání s *Escherichia coli* nebo *Bacillus subtilis*, jednodušší regulace biosyntetických drah, jež jsou u *C. glutamicum* realizovány na méně stupních. Vzhledem k poměrně malému genomu je značně omezen výskyt isoenzymů a degradativní enzymy pro mnohé aminokyseliny často zcela chybí. Charakteristická je naopak přítomnost exportních systémů, které zabraňují hromadění produktů v buňkách. Pomocí metod genového inženýrství již byla v posledních letech zkonstruována řada efektivních producentů aminokyselin (Sahm *et al.*, 1995; Eggeling *et al.*, 1997; Sahm *et al.*, 2000; Ohnishi *et al.*, 2002; Ohnishi *et al.*, 2003; Ohnishi *et al.*, 2005).

2.2. Aminokyseliny

Aminokyseliny jsou jako stavební kameny proteinů jedněmi z nejdůležitějších produktů každé buňky. Kromě této základní funkce mohou být využity také jako zdroje uhlíku, dusíku a energie, podílejí se na stavbě buněčné stěny a slouží jako prekursori dalších nepostradatelných látek. Narozdíl od bakterií, nižších eukaryot a rostlin nejsou ostatní organismy schopny syntetizovat všech 20 základních aminokyselin vyskytujících se v proteinech. Ty, které nejsou daným organismem vytvářeny, musí být složkou jeho potravy. Mezi aminokyseliny esenciální pro člověka a vyšší živočichy patří arginin, fenylalanin, histidin, isoleucin, leucin, lysin, methionin, threonin, tryptofan a valin.

2.2.1. Průmyslová výroba aminokyselin

Pro získávání aminokyselin v průmyslovém měřítku existují čtyři základní postupy: 1) extrakce (purifikace aminokyselin z proteinových hydrolyzátů), 2) chemická syntéza, 3) enzymatické postupy (v dnešní době pomocí imobilizovaných enzymů) a 4) mikrobiální fermentace. Kromě *C. glutamicum* se k výrobě aminokyselin mikrobiální fermentací využívá také *E. coli*, zejména pro produkci threoninu, tryptofanu a dalších aromatických aminokyselin (Hermann, 2003).

2.2.1.1. Produkční kmeny

Potenciálně produkční kmeny aminokyselin vždy podstupují několikastupňový proces šlechtění (dnes již cíleně směřovaný pomocí technik genového inženýrství), jehož výsledkem je efektivnější produkce požadovaného metabolitu (Wohlleben *et al.*, 1993; Eggeling a Sahm, 1999a; Sahm *et al.*, 2000; Pfefferle *et al.*, 2003). V průmyslové výrobě aminokyselin se tak uplatňují především auxotrofní mutanti, regulační mutanti, mutanti mající poruchu v regulaci aktivity klíčového enzymu zpětnou vazbou nebo kombinace těchto tří typů (násobní mutanti).

Auxotrofní mutanti mají přerušeny vedlejší metabolické dráhy a tím zastaveno odčerpávání metabolitů, které tak mohou být využity pro syntézu žádané aminokyseliny. V důsledku přerušení konkurenčních drah musí však být nepostradatelné metabolity vznikající těmito drahami buňce dodávány (Plachý, 1984; Nakayama, 1985). Pokud je přerušena konkurenční dráha pro jinou aminokyselinu a kultivace daného kmene probíhá v minimálním mediu, bývá požadované zvýšení produkce spojeno s hladověním a následnou limitací růstu. U lysinového producenta *C. glutamicum subspecies flavum* RC 115 (auxotrof

na threonin a methionin) tak došlo ke zvýšení produkce lysinu za podmínek stringentní odpovědi, která byla vyvolána limitující koncentrací threoninu v kultivačním mediu (Ruklisha *et al.*, 2001).

Regulační mutanti mají pozměněné regulační sekvence genů kódujících enzymy dané biosyntetické dráhy. Ztráta afinity represoru k těmto sekvencím vede ke zvýšené expresi příslušného enzymu a ve většině případů rovněž ke zvýšené syntéze požadovaného produktu. Regulační mutanty lze získat také změnou aminokyselinové sekvence represoru (Plachý, 1984).

Mutanti mající poruchu v regulaci enzymu zpětnou vazbou jsou rezistentní k inhibici enzymu konečnými produkty dané dráhy (v tomto případě aminokyselinami). Většinou se selektují jako mutanti rezistentní k analogům aminokyselin (Tsuchida a Momose, 1986; Morbach *et al.*, 1995; Ogawa-Miyata *et al.*, 2001). Mechanismus této regulace bude podrobněji popsán v kapitole 2.2.3.2.2.

S využitím technik genového inženýrství může být zesílena exprese genů biosyntetických drah klonováním pomocí strukturně i segregace stabilních vektorů nebo umístěním daných genů pod silný, případně indukovatelný promotor (Radmacher *et al.*, 2002). Novým trendem je simultánní koordinovaná zvýšená exprese více než jednoho genu dané dráhy, která umožní, aby byla při zrychleném toku metabolitů drahou zachována hladina (*pool*) jednotlivých meziproductů. Nedochozí tak k vyčerpání intermediátů ani k jejich nefyziologickému hromadění v buňce (Koffas *et al.*, 2003). Častým postupem pro zvýšení výsledné produkce bývá také zavedení nových genů nebo biosyntetických drah do průmyslově významných organismů. Vnesení genetické informace pro utilizaci druhotných substrátů tak například umožní nahradit dražší substráty za levnější varianty. Syntéza žádané aminokyseliny může být zvýšena také změnou vlastností genového produktu. Zavedením nejrůznějších mutací *in vitro* lze zlepšit katalytické i biochemické vlastnosti enzymů, například jejich tepelnou stabilitu nebo afinitu k substrátům.

Konečné množství dané aminokyseliny produkované do prostředí závisí rovněž na účinnosti jejího exportu z buňky (Krämer, 1994; Burkovski a Krämer, 2002). Vhodné mutace posilující transportní systémy se tak mohou podílet na celkově zvýšené produkci příslušné aminokyseliny (Krämer, 1996; Eggeling a Sahm, 1999b; Simic *et al.*, 2001). Na základě techniky mutagenese tak byla u *C. glutamicum* v nedávné době objevena dvoukomponentová permeasa BrnFE, která zodpovídá za export větvených aminokyselin (valinu, leucinu a isoleucinu) (Kennerknecht *et al.*, 2002). Zvýšení produkce vlivem posílení exprese genů *brnF* a *brnE* bylo již prokázáno v případě L-isoleucinu. Velmi důležitou roli má také import aminokyselin do buňky, zejména v souvislosti s auxotrofními produkčními

kmeny. Tuto skutečnost dokazují studie valinového stresu u valinového producenta *C. glutamicum* VAL1 (isoleucinový auxotrof) (Lange *et al.*, 2003). Přídavek valinu do kultivačního media v tomto případě stimuloval produkci valinu tímto kmenem, avšak zároveň výrazně zpomalil jeho růst. Inhibice růstu vyvolaná limitací na isoleucin zde byla vysvětlena jako důsledek kompetice valinu a isoleucinu o přenašeč BrnQ, který zodpovídá za transport valinu, leucinu a isoleucinu do buňky (Tauch *et al.*, 1998). Transportní systémy zajišťující import aminokyselin do buňky však mohou mít i přímý negativní vliv na produkci žádaného metabolitu. V případě kmene *C. glutamicum* produkujícího glutamát bylo například zjištěno, že se sekundární transportní systém, zajišťující vstup glutamátu do buňky, podílí na cirkulaci již vyprodukované aminokyseliny mezi buňkou a vnějším prostředím a oslabuje tak konečnou produkci této látky (Trötschel *et al.*, 2003).

Metabolismus buňky je komplexní proces, který je tvořen sítí vzájemně se ovlivňujících reakcí, z nichž žádná neprobíhá zcela izolovaně. Biosyntéza jednotlivých buněčných sloučenin je vždy napojena na centrální a energetický metabolismus, se kterým sdílí společné prekurzory i redukční ekvivalenty. Při konstrukci produkčních kmenů se proto mohou uplatnit i mírné zásahy posunující rovnováhu centrálního metabolismu ve prospěch žádaného produktu (Bott a Niebisch, 2003; Marx *et al.*, 2003). Vliv různých (i zcela nepříbuzných) genů na produkci dané aminokyseliny je dnes studován za nejrůznějších fyziologických podmínek s pomocí technik DNA (RNA) *microarrays* (Hayashi *et al.*, 2002; Wendisch, 2003), které spolu s analýzou vnitrobuněčné koncentrace a toku metabolitů (tzv. metabolom a fluxom), nabízejí globální pohled na tuto problematiku (Kiefer *et al.*, 2004; Krömer *et al.*, 2004; Polen a Wendisch, 2004; Wittmann *et al.*, 2004a; Wittmann *et al.*, 2004b).

Nezanedbatelný vliv na konečnou produkci aminokyselin má také složení kultivačního media (Plachý, 1975; Posten a Cooney, 1993). Pro každý produkční kmen musí být nejprve stanoveny optimální podmínky kultivace (teplota, pH, zředovací rychlost při kontinuální kultivaci apod.), včetně zdrojů uhlíku, dusíku a energie, které umožní nalézt ekonomicky vhodný kompromis mezi maximální růstovou rychlostí a maximálním výtěžkem dané aminokyseliny (Uy *et al.*, 2003). Příkladem může být studium vlivu přídavku acetátu jako kosubstrátu glukosy na rychlost růstu a produkci lysinu u lysinového producenta *C. glutamicum* RC 115 během kontinuální kultivace v bioreaktoru (Paegle a Ruklisha, 2003). Malá množství acetátu vyvolala drobné zpomalení růstu, avšak významný vzestup produkce lysinu, zatímco přídavek vysoké koncentrace acetátu způsobil výrazný pokles výtěžku lysinu. Zmíněný negativní efekt acetátu byl odstraněn přídavkem pyruvátu. Se složením kultivačního media rovněž úzce souvisí schopnost buněk efektivně přijímat jednotlivé živiny

pomocí různých transportních systémů nebo schopnost vyrovnat se s osmotickým stresem (Gourdon *et al.*, 2003; Rönsch *et al.*, 2003). I tyto faktory mohou výrazně ovlivnit výslednou produkci žádané aminokyseliny.

2.2.2. Ekonomický význam aminokyselin

Aminokyseliny patří vedle ethanolu a antibiotik k nejvýznamnějším mikrobiálním produktům (Glazer a Nikaido, 1995). V roce 1908 objevil japonský chemik Ikeda velmi atraktivní chuť L-glutamátu, která vedla k využití této látky jako ochucovadla potravin. Původně byla tato aminokyselina vyráběna finančně nákladnou hydrolyzou proteinů nebo chemickou syntézou, při které vznikala pouze obtížně dělitelná směs D- a L-glutamátu. V současné době bezkonkurenčně převládá fermentační postup výroby s využitím *C. glutamicum*. Také další aminokyseliny (například alanin, aspartát nebo cystein) nacházejí uplatnění v potravinářském průmyslu pro výrobu ochucovadel, sladidel a přísad do potravin.

Nezastupitelná je role aminokyselin i v dalších průmyslových odvětvích. V lékařství se využívají jako složky infuzních roztoků (arginin, isoleucin, leucin, lysin, prolin, tyrosin, tryptofan, valin) nebo terapeutické látky (asparagin, fenylalanin, glutamin, histidin, methionin, tryptofan), v zemědělství jako přísady do krmiv pro zvýšení nutriční hodnoty (zejména lysin, methionin a threonin) a jako růstové regulátory. Mnohé aminokyseliny nacházejí uplatnění také v chemickém a kosmetickém průmyslu (například serin).

2.2.3. Obecné principy biosyntézy aminokyselin a její regulace

Mnohé chemoorganotrofní bakterie mají schopnost syntetizovat všech 20 základních aminokyselin, a to i z velmi jednoduchých surovin, jakými jsou glukosa, amoniak, CO₂ a síran. Podle způsobu syntézy a výchozích prekurzorů se aminokyseliny dělí na 6 skupin (6 základních drah): glutamátová, aspartátová, pyruvátová, serinová, aromatická a histidinová (Kaprálek, 2000). Jednotlivé dráhy jsou různě dlouhé, zahrnují 3 až 13 dílčích reakcí a příslušný počet intermediátů.

Syntéza všech primárních metabolitů musí být vždy přesně vyvážena, z tohoto důvodu se během evoluce vyvinuly regulační mechanismy zajišťující přirozenou existenci buňky i její schopnost reagovat na nepříznivé vlivy prostředí. I když mezi různými bakteriálními druhy existují rozdíly v jednotlivých enzymatických i regulačních krocích dané dráhy a v rozmístění příslušných genů na chromosomu, základní mechanismus regulace anabolických drah zůstává zachován. V případě biosyntetických drah aminokyselin se jedná o kombinaci dvou základních typů: 1) regulace syntézy enzymu na úrovni genové exprese,

2) regulace aktivity již existujícího enzymu. Represe syntézy funguje zejména v případě, kdy se aminokyselina vyskytuje v prostředí a tvorba enzymového aparátu pro její syntézu je zbytečná. Druhý typ regulace koordinuje rychlost tvorby a spotřeby dané aminokyseliny v buňce.

2.2.3.1. Regulace na úrovni genové exprese

V biosyntetických drahách aminokyselin se uplatňují zejména dva typy regulace na úrovni genové exprese: 1) represe transkripce, 2) předčasná terminace transkripce (atenuace).

2.2.3.1.1. Represe transkripce

Regulace biosyntézy aminokyselin represí iniciace transkripce probíhá pomocí regulačního proteinu (represoru). Represor se váže na specifickou sekvenci DNA (operátor), která se vyskytuje v oblasti promotoru a má zpravidla palindromatický charakter.

Pro vazbu represoru na operátor je nutná přítomnost korepresoru, kterým je obvykle aminokyselina, jejíž syntéza je regulována. Vazba aminokyseliny na represor vyvolá jeho konformační změnu, která umožní komplexu represor-korepresor rozpoznat sekvenci operátoru. Vznik trojkomplexu represor-korepresor-operátor zabrání optimální interakci RNA-polymerasy s promotorem, a tím částečně nebo úplně reprimuje iniciaci transkripce.

Enzymy jedné biosyntetické dráhy často tvoří v bakteriální buňce samostatnou transkripční jednotku (operon), řízenou společným operátorem, který je zpravidla situován mezi promotorem a strukturními geny operonu. Syntéza těchto enzymů potom podléhá společné koordinované represí a derepresí (příkladem mohou být geny kódující enzymy biosyntetické dráhy histidinu).

V některých případech se geny jediné biosyntetické dráhy nalézají na různých místech chromosomu (například geny syntézy methioninu). I tyto geny však bývají regulovány společně jedním regulačním proteinem (jediným komplexem represor-korepresor) a tvoří tak regulační jednotku označovanou jako regulon.

U *C. glutamicum* se regulace exprese represí vyskytuje v drahách biosyntézy methioninu a cysteinu, kde jako předpokládaný transkripční represor řady genů působí protein McbR (člen rodiny TetR) (Rey *et al.*, 2003). Analýzou genu *leuB* z *C. glutamicum*, který kóduje 3-isopropylmalátdehydrogenasu (jeden z enzymů biosyntetické dráhy leucinu), bylo zjištěno, že se aktivita promotoru P-*leuB* významně snížila při kultivaci na mediu

obsahujícím leucin (Pátek *et al.*, 1998). Zatím však nebyl tento promotor, obsahující palindromickou sekvenci v oblasti transkripčního startu, podrobněji analyzován.

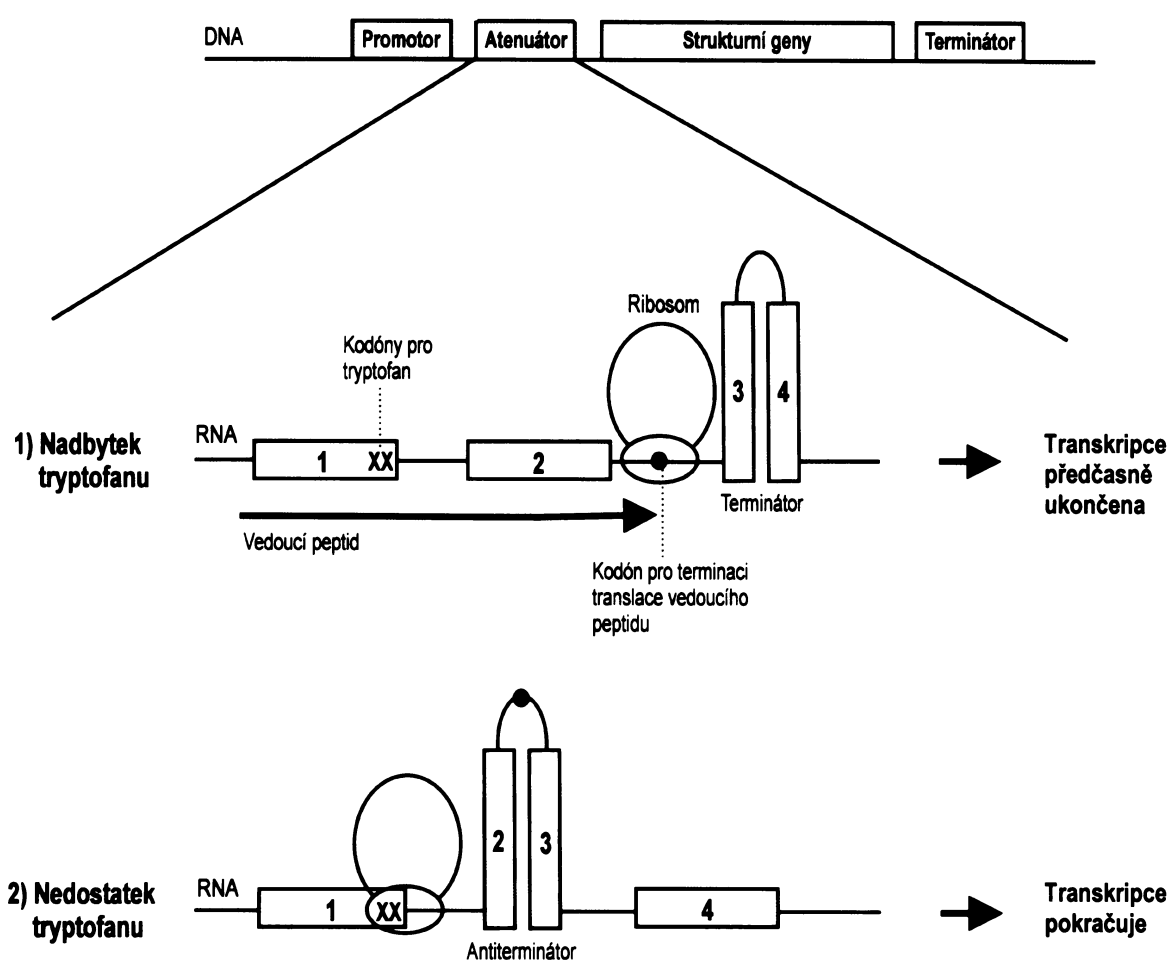
2.2.3.1.2. Atenuace transkripce

Předčasná terminace transkripce (atenuace transkripce) se v biosyntetických drahách aminokyselin vyskytuje velmi často. Tento typ regulace je zcela unikátní pro prokaryotické organismy, protože její princip je založen na bezprostřední návaznosti transkripce a translace u bakterií. V eukaryotických buňkách, kde probíhají oba tyto procesy nezávisle v oddělených kompartmentech, se atenuace vyvinout nemohla. Mechanismus předčasné terminace transkripce je popsán u mnoha genů různých bakteriálních druhů (Vitreschak *et al.*, 2004), na molekulární úrovni je však nejlépe prostudován u tryptofanového operonu z *E. coli* (Landick *et al.*, 1996; Rosypal, 1997; Snyder a Champness, 2003).

Za regulaci atenuací, jejíž mechanismus je založen na přesné souhře mezi transkripcí a translací, zodpovídá specifická sekvence (atenuátor) ve vedoucí oblasti příslušného operonu (Obr. 2.1.). 5'-konec vznikající mRNA je většinou tvořen čtyřmi úseky (1, 2, 3, 4), které jsou vzájemně komplementární a mohou tvořit tři alternativní sekundární struktury (vlásenky). V závislosti na koncentraci tryptofanu v buňce mohou nastat dvě možnosti vzniku těchto vlásenek. Za nadbytku tryptofanu se tvoří nejprve vlásenka mezi úseky 1 a 2 (protektor), která způsobí pozastavení transkripce a současně umožní vznik terminační vlásenky mezi úseky 3 a 4 nesoucí vlastnosti terminátoru nezávislého na faktoru *ρ*. Transkripce operonu je tak předčasně zastavena, protože enzymy pro syntézu aminokyseliny nejsou potřebné. Za nedostatku tryptofanu naopak vzniká vlásenka mezi úseky 2 a 3 (antiterminátor), jejíž funkcí je inhibice vzniku terminační vlásenky. Za těchto podmínek může transkripce celého operonu pokračovat. Další nezbytnou vlastností atenuátoru je kódování vedoucího peptidu, který obsahuje jeden nebo více zbytků aminokyseliny, jejíž biosyntéza je atenuací regulována (v tomto případě tryptofan). Kodóny determinující tryptofan jsou umístěny v úseku 1 a jejich hlavní úloha spočívá ve zprostředkování informace o vnitrobuněčné koncentraci tryptofanu. Vlastní signální molekulou je potom příslušná aminoacyl-tRNA (respektive poměr mezi nabitou a nenabitou formou transferové ribonukleové kyseliny).

Model mechanismu atenuace předpokládá, že tento proces je zahájen iniciací transkripce. Na 5'-konci vznikající mRNA se nejprve samovolně utvoří vlásenka mezi úseky 1 a 2, která způsobí pozastavení transkripce. Toto pozastavení hraje významnou roli pro synchronizaci celého procesu, protože umožní nasednutí ribosomu a iniciaci translace vedoucího peptidu. Pohyb ribosomu po mRNA v blízkosti vlásenky 1 a 2 pravděpodobně

tuto strukturu rozvolní a transkripce tak může pokračovat až k tryptofanovým kodónům v úseku 1. Při nedostatku tryptofanu nemohou být tyto kodóny obsazeny příslušnou aminoacyl-tRNA a translace je zastavena. Tím je umožněn vznik antiterminační vlásenky mezi úseky 2 a 3, která inhibuje tvorbu terminátoru mezi úseky 3 a 4 a transkripce pokračuje směrem ke strukturálním genům. Naopak při nadbytku tryptofanu může být tato aminokyselina zařazena do sekvence vedoucího peptidu, jehož syntéza je tak dokončena. Uvolnění ribosomu umožní opět vznik vlásenky mezi úseky 1 a 2, která zamezí tvorbě antiterminátoru mezi úseky 2 a 3. Úsek 3 zůstává volný a může se spojit s úsekem 4 za vzniku vlásenky terminační, která způsobí předčasné ukončení transkripce.



Obr. 2.1. Schéma atenuace transkripce tryptofanového operonu z *E. coli*

Čísla 1, 2, 3 a 4 označují vzájemně komplementární úseky DNA ve vedoucí sekvenci tryptofanového operonu, které v závislosti na aktuální koncentraci tryptofanu v buňce mohou tvořit čtyři různé sekundární struktury (vlásenky), které řídí průběh transkripce strukturálních genů. Obrázek je detailně popsán v textu na stránkách 10 a 11.

Popsaným modelem lze, až na drobné odlišnosti, vysvětlit funkci všech dosud popsaných atenuátorů *E. coli*. U grampozitivních bakterií jsou mechanismy regulace transkripce atenuací rozmanitější (Henkin a Yanofsky, 2002). Předčasné terminaci transkripce může zabránit neaktivovaná tRNA svojí přímou interakcí se vznikající mRNA. Interakce mezi těmito molekulami pravděpodobně stabilizuje sekundární strukturu antiterminační vlásenky. Tento typ regulace byl popsán u operonu *ilv-leu* a genu *tyrS* z *B. subtilis* (Grundy *et al.*, 1994) a předpokládá se i u operonu *argS-lysA* z *C. glutamicum* (Grundy a Henkin, 1994). Další mechanismus atenuace, který závisí na funkci proteinu TRAP, byl nalezen u tryptofanového operonu z *B. subtilis* (Merino *et al.*, 1995; Babitzke, 1997; Babitzke, 2004; Yanofsky, 2004). Vlastní signální molekulou je zde přímo daná aminokyselina (v tomto případě tryptofan). Protein TRAP, jehož působení je regulováno na základě allosterické aktivace koncentrací tryptofanu v buňce, je schopen vázat vznikající mRNA a tím stabilizovat terminační vlásenku zodpovídající za předčasné ukončení transkripce. Nadbytek aminokyseliny aktivuje protein TRAP a ten zajistí terminaci transkripce příslušných biosyntetických genů. Negativní regulaci zajišťuje protein anti-TRAP, který se váže na protein TRAP a inhibuje tím jeho funkci. Syntéza proteinu anti-TRAP je indukována přítomností nenabitě Trp-tRNA (Snyder *et al.*, 2004).

Mezi operony *C. glutamicum* kontrolované atenuací byl nedávno zařazen také operon *ilvBNC* kódující enzymy biosyntetické dráhy valinu, leucinu a isoleucinu, jehož studium je mimo jiné náplní této disertační práce (Morbach *et al.*, 2000). Předčasnou terminaci transkripce je zřejmě regulován rovněž gen *leuA* z *C. glutamicum* (Pátek, 2005).

2.2.3.2. Regulace na úrovni aktivity enzymů

Aktivita enzymů může být v buňce regulována kovalentní chemickou modifikací, vazbou aktivátorů a inhibitorů, rozdílnou specifitou enzymu k substrátům nebo rychlostí degradace enzymu. V biosyntetických drahách aminokyselin se uplatňují zejména dva typy regulace: 1) rozdílná specifita vazby dvou nebo více substrátů daným enzymem, 2) allosterická interakce enzymu s metabolitem (inhibice enzymu zpětnou vazbou).

2.2.3.2.1. Substrátová specifita enzymů

Mnohé enzymy biosyntetických drah aminokyselin mají schopnost rozpoznávat dva nebo více substrátů. Specifita vazby se však může u jednotlivých substrátů značně lišit. Příkladem je enzym synthasa acetohydroxykyselin (AHAS), klíčový enzym biosyntetické dráhy valinu, jehož vlastnosti a funkce budou podrobně popsány v kapitole 2.4. Tento enzym

rozpoznává dva substráty (2-ketobutyryát a pyruvát), 2-ketobutyryát však s mnohem vyšší specifitou (Squires *et al.*, 1981).

2.2.3.2.2. Inhibice enzymu zpětnou vazbou

Inhibice zpětnou vazbou patří mezi základní regulační mechanismy aktivity enzymů. Je zprostředkována přímo produkty biosyntetických drah (aminokyselinami), které se vážou na molekulu enzymu, a tím usměrňují jeho aktivitu a zabraňují svému nadměrnému hromadění v buňce. Regulaci zpětnou vazbou podléhají především enzymy katalyzující vstupní reakci dané dráhy nebo enzymy soutěžící o společný substrát, který se vyskytuje v místech větvení dvou biosyntetických drah. Molekuly těchto enzymů jsou vybaveny dvěma vazebnými místy. Kromě katalytického místa pro substrát obsahují též allosterické místo, kam se váží zpětnovazebně působící inhibitory. Důsledkem této vazby je konformační změna molekuly enzymu, která znemožní vazbu substrátu do katalytického místa či přeměnu substrátu na produkt. Inhibice zpětnou vazbou byla popsána v *E. coli* i v *C. glutamicum*.

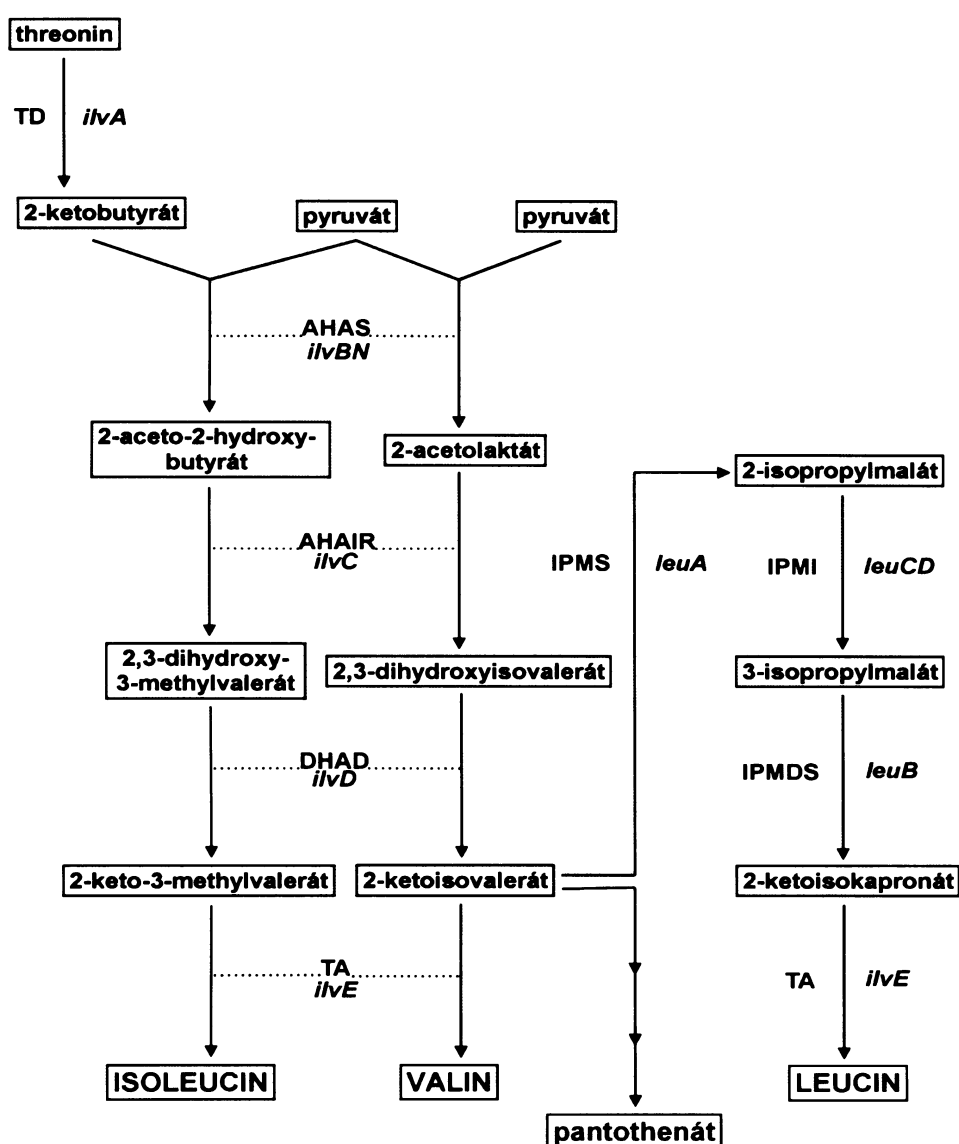
2.3. Biosyntéza valinu

Valin, spolu s leucinem a isoleucinem, tvoří skupinu aminokyselin s větveným, nepolárním postranním řetězcem. Jako aminokyseliny esenciální jsou však syntetizovány výhradně mikroorganismy, houbami a rostlinami. Roční světová průmyslová produkce činí asi 500 t L-valinu, 400 t L-leucinu a 400 t L-isoleucinu. V posledních letech však poptávka po těchto látkách vzrůstá. Biosyntetické dráhy větvených aminokyselin jsou úzce spjaty, paralelní syntézy valinu a isoleucinu jsou dokonce katalyzovány identickými enzymy (Obr. 2.2.). Kaskáda reakcí směřujících k syntéze valinu, leucinu a isoleucinu se vyznačuje všemi hlavními znaky charakterizujícími biosyntetické dráhy aminokyselin. K těmto znakům patří především větvení drah a multivalentní regulace genové exprese i enzymové aktivity (zejména allosterickou zpětnovazebnou inhibicí). Z hlediska dělení jednotlivých anabolických drah podle typu prekursoru spadají dráhy větvených aminokyselin do skupiny pyruvátové. Výjimku může tvořit isoleucin, jehož syntézu zahajuje aminokyselina threonin (člen rodiny aspartátové). Z tohoto důvodu bývá též isoleucin v některých publikacích řazen do aspartátové skupiny. Od biosyntetické dráhy valinu se odvětjuje biosyntetická dráha kyseliny pantothenové, jejímž prekursorem je 2-ketoisovalerát.

2.3.1. Biosyntéza valinu v *C. glutamicum*

2.3.1.1. Biosyntetická dráha

Biosyntetická dráha větvených aminokyselin z *C. glutamicum* je schématicky znázorněna na obrázku 2.2. Jednotlivé chemické reakce i enzymy, které je katalyzují, jsou shodné u všech organismů disponujících touto drahou (Voet a Voetová, 1995). Odlišnosti se ve většině případů vyskytují pouze v uspořádání genů na chromosomu, v počtu isoenzymů nebo v detailech regulačních mechanismů.



Obr. 2.2. Biosyntetické dráhy valinu, leucinu a isoleucinu v *C. glutamicum*

Červeně jsou značeny enzymy katalyzující jednotlivé reakce dráhy: TD = threonindeaminasa, AHAS = synthasa aceto-hydroxykyselin, AHAIIR = isomero-reduktasa aceto-hydroxykyselin, DHAD = dehydratasa dihydroxykyselin, TA = transaminasa, IPMS = isopropylmalátsynthasa, IPMI = isopropylmalátisomerasa, IPMDS = isopropylmalátdehydrogenasa. Modře jsou zvýrazněny geny, kterými jsou tyto enzymy kódovány.

První reakcí společné části biosyntetických drah větvených aminokyselin je reakce kondenzační, katalyzovaná synthasou acetoxykyselin (AHAS). V buňkách *C. glutamicum* se vyskytuje pouze jediná forma tohoto dvoupodjednotkového enzymu, jehož větší (katalytická) podjednotka je kódována genem *ilvB* a menší (regulační) podjednotka genem *ilvN* (Inui *et al.*, 1993; Keilhauer *et al.*, 1993). Jako klíčový enzym dráhy podléhá synthasa acetoxykyselin zpětnovazebné regulaci valinem, leucinem a isoleucinem, jež se vážou na regulační podjednotku IlvN. Tato regulace však není příliš striktní, protože i v přítomnosti vyšší koncentrace všech tří aminokyselin je inhibice enzymu maximálně 50 % (Eggeling *et al.*, 1987). Zatímco v případě dráhy syntézy valinu jsou substráty reakce dvě molekuly pyruvátu, v isoleucinové dráze figuruje pouze jedna molekula pyruvátu, druhým substrátem je 2-ketobutyrate vznikající deaminací threoninu účinkem threonindeaminasy (threonindehydratasy) (Cordes *et al.*, 1992). Také tento enzym (specifický pouze pro syntézu isoleucinu), jenž je kódován genem *ilvA*, podléhá zpětnovazebné inhibici konečným produktem (isoleucinem). Podobně jako v případě *E. coli* je rovněž threonindeaminasa z *C. glutamicum* tetramer, jehož allosterickým aktivátorem je valin (Möckel *et al.*, 1992). U všech dosud izolovaných threonindeaminas zodpovídá amino-terminální oblast polypeptidu za katalytickou aktivitu a karboxy-terminální oblast za aktivitu regulační. Enzym pocházející z *C. glutamicum* je však jedinečný svou malou velikostí, která je způsobena delecí 95 aminokyselin v karboxy-terminální oblasti.

Produktem alternativních kondenzačních reakcí katalyzovaných enzymem AHAS jsou dvě acetoxykyseliny, které v následujícím kroku podléhají isomerizaci a NADPH-dependentní redukci za vzniku 2,3-dihydroxykyselin. Reakce je katalyzována isomeroreduktasou kódovanou genem *ilvC* (Cordes *et al.*, 1992). I tento enzym podléhá mírné regulaci zpětnou vazbou (inhibice valinem a leucinem) (Leyval *et al.*, 2003), jeho aktivita v buňce je však konstantně vysoká. Narozdíl od enzymu AHAS, který je mezi jednotlivými mikrobiálními i rostlinnými druhy vysoce konzervován, je isomeroreduktasa ve své struktuře mnohem méně uniformní. Protein kódovaný genem *ilvC* má v buňkách *C. glutamicum* rovněž aktivitu ketopantoátoreduktasy. Tento enzym katalyzuje druhou reakci v biosyntetické dráze pantothenátu (Merkamm *et al.*, 2003).

Dalším krokem biosyntetické dráhy větvených aminokyselin je dehydratace 2,3-dihydroxykyselin za vzniku 2-ketokyselin. Enzym dehydratasa dihydroxykyselin, katalyzující tuto reakci, je kódován genem *ilvD* a podléhá mírné zpětnovazebné regulaci valinem a leucinem (Leyval *et al.*, 2003). Jedním z produktů dehydratační reakce je 2-ketoisovalerát, který reprezentuje místo větvení mezi biosyntetickou drahou valinu a drahou

směřující k syntéze leucinu (Obr. 2.2.). Tato leucinová větev je pro úplnost stručně popsána v posledním odstavci této kapitoly.

Poslední reakcí biosyntetické dráhy valinu a isoleucinu (ale též leucinu) je transaminace mezi 2-ketokyselinami a glutamátem za vzniku konečných produktů (valinu, isoleucinu a leucinu). Reakce je katalyzována enzymem transaminasou B, která je produktem genu *ilvE*. Jednotlivé transaminasy postupně izolované z různých organismů byly na základě své evoluční příbuznosti rozděleny do čtyř hlavních tříd, transaminasa B účastnící se biosyntézy větvených aminokyselin byla zařazena do skupiny III. Díky své široké a překrývající se substrátové specifitě však zůstávaly tyto proteiny posledními dosud nepopsanými enzymy mnoha biosyntetických drah. Zatímco v *E. coli* existují kromě transaminasy B další dva enzymy, které mohou částečně komplementovat transaminační aktivitu potřebnou pro syntézu valinu (transaminasa AvtA) a leucinu (transaminasa TyrB), o genu *ilvE* z *C. glutamicum* se předpokládalo, že kóduje jedinou transaminasu, která je v tomto organismu zodpovědná za biosyntézu větvených aminokyselin (Radmacher *et al.*, 2002). Nedávno byl však na základě srovnávacích studií (a též díky znalosti kompletní sekvence genomu) objeven v *C. glutamicum* nový gen *pdxR*, jehož produkt je schopen nahradit transaminasu B při tvorbě valinu (částečně také při tvorbě leucinu) (McHardy *et al.*, 2003). Protein PdxR, jehož sekvenční podobnost s transaminasou AvtA z *E. coli* je pouze 17 %, byl zařazen do rodiny bakteriálních transkripčních regulátorů MocR a pravděpodobně se účastní biosyntézy pyridoxinu (vitaminu B6). Překvapivé však bylo zjištění, že na svém C-konci nese motiv specifický pro aminotransferasy I. třídy. Transaminační funkce proteinu PdxR a jeho účast v biosyntéze valinu byla ověřena rovněž inaktivací příslušného genu. Kromě transaminasy PdxR byla v buňkách *C. glutamicum* detekována také slabá aktivita transaminasy AvtA (Leyval *et al.*, 2003).

Odvětvující se dráha vedoucí k syntéze leucinu zahrnuje tři specifické reakce: kondenzaci 2-ketoisovalerátu a acetyl-CoA, isomerizaci a oxidativní dekarboxylaci (Obr. 2.2.). Kondenzační reakce je katalyzována 2-isopropylmalátsynthasou, která je kódována genem *leuA* a jako první enzym specifický pro tvorbu leucinu podléhá velmi silné zpětnovazebné inhibici touto aminokyselinou. Následující dvě reakce katalyzují isopropylmalátisomerasa kódovaná geny *leuC* a *leuD* a 3-isopropylmalátdehydrogenasa, jež je produktem genu *leuB*. Poslední reakcí leucinové dráhy je reakce transaminační, která je společná pro biosyntézu všech tří větvených aminokyselin a je popsána v předchozím odstavci.

2.3.1.2. Organizace genů a regulace exprese

Geny determinující enzymy jednotlivých biosyntetických drah jsou většinou sdruženy do společných transkripčních jednotek (operonů) a podléhají společné regulaci exprese. Uspořádání těchto genů do operonů však není u všech mikroorganismů shodné. V případě dráhy biosyntézy valinu u *C. glutamicum* tvoří transkripční jednotku pouze geny *ilvB*, *ilvN* a *ilvC*.

Operon *ilvBNC* podléhá společné regulaci atenuací (Keilhauer *et al.*, 1993). Transkripční start genu *ilvB* byl přesně lokalizován 292 bp před počátkem translace a vedoucí sekvence genu *ilvB* byla zmapována deleční analýzou (Morbach *et al.*, 2000). Prokázána tak byla existence hlavních znaků charakterizujících operony regulované klasickým typem atenuace (tedy předčasnou terminací transkripce, která je řízena procesem translace). K těmto znakům patří přítomnost vedoucího peptidu, regulačních kodónů pro valin, leucin a isoleucin a přítomnost charakteristických sekundárních struktur (protektor, antiterminátor, terminátor) (Obr. 2.3.). Narozdíl od většiny dosud publikovaných studií atenuace však transkript vedoucího peptidu operonu *ilvBNC* neobsahuje vazebné místo pro ribosom (vzdálenost transkripčního a translačního startu činí pouze 1 nukleotid). I přes společnou regulaci operonu atenuací předcházejí také genům *ilvN* a *ilvC* vlastní promotory. Geny *ilvB*, *ilvN* a *ilvC* jsou tak přepisovány ve třech různých transkriptech o velikostech 3,9 kb (transkript *ilvBNC*), 2,3 kb (transkript *ilvNC*) a 1,1 kb (transkript *ilvC*) (Obr. 2.4.). Nejmenší transkript, jehož syntézu řídí silný, konstitutivní promotor P-*ilvC*, je nezávisle na kultivačních podmínkách vždy přítomen. Zjištění, že specifická aktivita isomeroreduktasy zůstává v buňkách *C. glutamicum* během kultivace téměř konstantní, je v souladu s transkripční analýzou. Atenuace operonu *ilvBNC* tak ovlivňuje především hladinu enzymu AHAS, zatímco aktivitu isomeroreduktasy zásadním způsobem nemění.

Narozdíl od uspořádání genů biosyntézy valinu a isoleucinu v chromosomu *E. coli* nejsou geny *ilvA* a *ilvE* z *C. glutamicum* součástí společného operonu. Gen *ilvD* rovněž není součástí operonu *ilvBNC*, je od tohoto operonu však oddělen pouze dvěma otevřenými čtecími rámci X a Y (Radmacher *et al.*, 2002) (Obr. 2.4.). Otevřený čtecí rámec X byl na základě homologie identifikován jako gen *yggB* kódující protein s funkcí mechanosenzitivního kanálu, funkce otevřeného čtecího rámce Y není dosud známa. Orientace genu *ilvD* je vzhledem k operonu *ilvBNC* opačná.

Geny *leuA*, *leuB*, *leuC* a *leuD* kódující enzymy specifické pro syntézu leucinu jsou v chromosomu *C. glutamicum* lokalizovány ve zcela odlišných oblastech a tvoří transkripční jednotku ani společný shluk (Bathe *et al.*, 1996). I v tomto případě však leucin (konečný produkt dráhy) reguluje nejen aktivitu enzymů, ale také expresi příslušných genů na úrovni iniciace transkripce (Pátek *et al.*, 1994; Pátek *et al.*, 1998). Represe promotorové aktivity v přítomnosti leucinu byla experimentálně prokázána u promotorů P-*leuA* a P-*leuB*. V případě genu *leuA* probíhá regulace exprese s největší pravděpodobností mechanismem atenuace (Pátek, 2005).

2.3.2. Biosyntéza valinu v *E. coli*

2.3.2.1. Biosyntetická dráha

V následujících dvou kapitolách (2.3.2. a 2.3.3.) jsou shrnuty výsledky studií biosyntetických drah větvených aminokyselin u dalších mikroorganismů a rostlin. U modelového mikroorganismu *E. coli* bylo doposud nashromážděno nejvíce informací, z tohoto důvodu je této bakterii věnována zvláštní kapitola. Protože základní schéma biosyntetické dráhy se od schématu z kapitoly 2.3.1. zásadně neliší, budou v následujících dvou kapitolách uvedena pouze fakta odlišující *E. coli* (případně další organismy) od *C. glutamicum*. Základním rozdílem mezi oběma mikroorganismy je jejich odlišná životní strategie a schopnost adaptace. *E. coli* (a enterobakterie obecně), narozdíl od půdní bakterie *C. glutamicum*, musí být připravena na mnohem rozmanitější podmínky prostředí, z tohoto důvodu bývají její biosyntetické dráhy složitější. Mezi hlavní odlišnosti patří přítomnost isoenzymů s různou regulací a s tím související větší počet genů se složitější regulací exprese (Umbarger, 1983; Umbarger, 1996).

Příkladem existence isoenzymů v *E. coli* může být klíčový enzym dráhy synthasa acetoxykyseliny (AHAS). Narozdíl od *C. glutamicum*, kde se vyskytuje pouze jediný typ tohoto enzymu, byly v *E. coli* nalezeny tři isoformy enzymu AHAS (AHAS I., II. a III.), které se odlišují svou substrátovou specifitou, zpětnovazebnou inhibicí i regulací genové exprese. Zatímco isoenzymy AHAS I. a III. podléhají inhibici konečným produktem dráhy (valinem), enzym AHAS II. je vůči této zpětnovazebné regulaci rezistentní. Aktivní formy všech tří isoenzymů jsou jako v případě *C. glutamicum* dvoupodjednotkové a kódují je následující dvojice genů: geny *ilvB* a *ilvN* (AHAS I.), geny *ilvG* a *ilvM* (AHAS II.) a geny *ilvI* a *ilvH* (AHAS III.). Jednotlivé isoenzymy budou blíže popsány v kapitole zaměřené na enzym AHAS.

Podobně jako v *C. glutamicum* také enzym AHAS z *E. coli* rozpoznává dva substráty: pyruvát a 2-ketobutyrát. 2-ketobutyrát vzniká deaminací threoninu a zahajuje sled biochemických reakcí směřujících k syntéze isoleucinu. Deaminaci threoninu katalyzuje threonindeaminasa kódovaná genem *ilvA*, jejíž aktivita je v buňkách *E. coli* velmi účinně kontrolována. Negativní regulaci zajišťuje zpětnovazebná inhibice isoleucinem, zatímco valin působí jako aktivátor enzymu. Aktivní forma threonindeaminasy je tvořena tetramerem identických podjednotek o velikosti 48,5 kDa a obsahuje dvě vazebná místa pro inhibitor a jedno vazebné místo pro aktivátor. Deaminace threoninu však není jedinou reakcí, která v *E. coli* zajišťuje syntézu 2-ketobutyrátu. Tento metabolit (a následně také isoleucin) mohou buňky tvořit paralelní drahou, jejíž součástí je β -methylaspartát tvořený pravděpodobně z glutamátu za účinku glutamátmutasy.

Následující dvě reakce biosyntetické dráhy větvených aminokyselin se zásadně neliší od schématu, který byl popsán u *C. glutamicum*. Katalyzovány jsou shodnými enzymy (isomeroreduktasa a dehydratasa dihydroxykyselin), jež jsou kódovány stejnými geny (*ilvC* a *ilvD*). Jisté rozdíly jsou v poslední transaminační reakci, které se v buňkách *E. coli* mohou účastnit až tři různé enzymy, i když ne se zcela identickým účinkem. Nejdůležitějším z nich je, podobně jako v případě *C. glutamicum*, transaminasa B kódovaná genem *ilvE* a spadající do třetí třídy transaminas. Tento enzym (182 kDa; hexamer identických podjednotek) je nezbytný pro tvorbu isoleucinu. V biosyntéze valinu a leucinu však může být transaminasa B zastoupena dalšími dvěma enzymy, které jsou řazeny mezi transaminasy první třídy. Tvorbu leucinu tak může katalyzovat enzym TyrB, v biosyntéze valinu se uplatňuje enzym AvtA (transaminasa C), jako donor amino-skupiny však v případě enzymu AvtA slouží alanin. Enzym AvtA je rovněž schopen konvertovat 2-ketobutyrát na 2-aminobutyát.

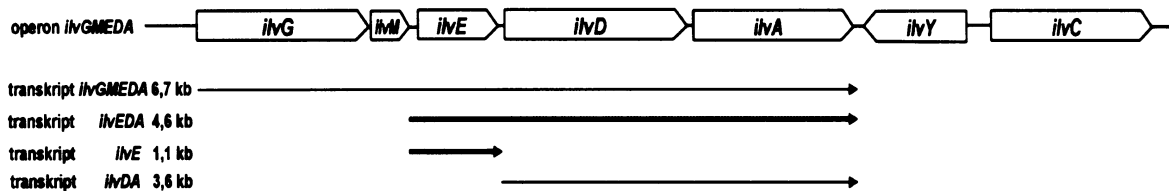
Schéma dráhy specifické pro leucin je v *E. coli* shodné se schématem na obrázku 2.2., který znázorňuje biosyntézu větvených aminokyselin u *C. glutamicum*.

2.3.2.2. Organizace genů a regulace exprese

Zatímco až na uvedené výjimky se *E. coli* a *C. glutamicum* ve vlastní biosyntetické dráze zásadně neodlišují, v uspořádání příslušných genů na chromosomu a rovněž v regulaci jejich exprese byly nalezeny značné rozdíly.

Pro *E. coli* je charakteristický operon *ilvGMEDA*, který sdružuje geny *ilvG* a *ilvM* (AHAS II.), *ilvE* (transaminasa B), *ilvD* (dehydratasa dihydroxykyselin) a *ilvA* (threonindeaminasa) do transkripční jednotky. Součástí tohoto shluku jsou také geny *ilvC* pro isomeroreduktasu a *ilvY*, jehož produkt zajišťuje pozitivní kontrolu exprese genu *ilvC*

(Obr. 2.5.). Geny *ilvBN* a *ilvIH* pro valin-senzitivní enzymy AHAS I. a III. vytvářejí vlastní transkripční jednotky nacházející se na odlišných místech chromosomu (geny *ilvIH* přímo sousedí s *leu*-operonem). V *E. coli* tak existují tři shluky genů, které zajišťují syntézu valinu, leucinu a isoleucinu.



Obr. 2.5. Uspořádání genů biosyntetické dráhy valinu v chromosomu *E. coli*

Na základě *Northern* analýzy operonu *ilvGMEDA* byla zjištěna existence dvou poměrně stabilních transkriptů *ilvEDA* (4,6 kb) a *ilvE* (1,1 kb) a dvou výrazně méně stabilních transkriptů *ilvGMEDA* (6,7 kb) a *ilvDA* (3,6 kb). Kompletní informace o způsobu transkripce operonu *ilvGMEDA* však mohou být získány až na základě potvrzení, jaké frakce *ilvEDA*, *ilvE* a *ilvDA* mRNA vznikají jako primární produkt transkripce a jaké frakce jsou výsledkem posttranskripčních procesů. Množství a velikost jednotlivých transkriptů závisí také na zvolených kultivačních podmínkách. Například během dereprese vzniká především transkript *ilvGMEDA* o plné délce, za anaerobních podmínek je naopak iniciována transkripce ze slabého vnitřního promotoru P-*ilvA*. Blíže charakterizovány byly rovněž tři ze čtyř promotorů: P-*ilvG*, P-*ilvE* a P-*ilvA*.

Expese genů biosyntetických drah větvených aminokyselin podléhá v *E. coli* multivalentní represi konečnými produkty, mechanismus této kontroly se však u jednotlivých operonů částečně liší. Regulace expese operonu *ilvGMEDA* závisí na přítomnosti všech tří aminokyselin. Zatímco represe nastává při nadbytku valinu, leucinu i isoleucinu, k derepresi operonu stačí nedostatek pouze jediné z uvedených aminokyselin. Operon *ilvBN* kódující izozym AHAS I. může být dereprimován pouze limitující koncentrací valinu nebo leucinu (bivalentní represe), množství isoleucinu expresi neovlivňuje. U operonu *ilvIH* pro izozym AHAS III. dochází k derepresi pouze za podmínek nízké koncentrace leucinu.

Regulace expese operonu *ilvGMEDA* je řízena atenuací, jejíž mechanismus odpovídá modelu popsaném v kapitole 2.2.3.1.2. Ve vedoucí sekvenci genu *ilvG* byly nalezeny příslušné typy vlásenek, detekován byl rovněž vedoucí transkript (183 bp) a vedoucí peptid o velikosti 32 aminokyselin, z nichž 15 patří k větveným aminokyselinám. Kromě atenuace se v regulaci expese operonu *ilvGMEDA* uplatňuje také globální regulační protein Lrp (*leucine-responsive protein*), jehož DNA-vazebné místo s vysokým stupněm konzervovanosti bylo nalezeno ve vedoucí sekvenci tohoto operonu mezi sekvencí atenuátoru a genem *ilvG* (Rhee *et al.*, 1996). Síla expese jednotlivých genů operonu

ilvGMEDA se může částečně lišit. Nejsilněji je dereprimován gen *ilvA*, a to zejména v případě hladovění na isoleucin. Odlišná odpověď na limitaci různými aminokyselinami může souviset s odlišným zastoupením těchto aminokyselinových zbytků v sekvenci jednotlivých enzymů. Transkripty vznikající přepisem operonu *ilvGMEDA* jsou znázorněny na obrázku 2.5. (Huang *et al.*, 1992).

Také bivalentní represe operonu *ilvBN* valinem a leucinem probíhá mechanismem atenuace. Detekován byl vedoucí transkript (188 bp) i vedoucí peptid o velikosti 32 aminokyselin, z nichž 12 tvoří valin a leucin. Na regulaci exprese operonu *ilvBN* se podílí rovněž katabolická represe. Ve vedoucí sekvenci operonu byly nalezeny nejen specifické sekundární struktury charakteristické pro atenuaci, ale v oblasti promotoru též úsek téměř identický s konsensus-sequencí vazebného místa pro protein CRP vážící cAMP, který po vazbě na DNA umožní transkripci genů citlivých ke katabolické represi.

Expresa třetího operonu *ilvIH* je odlišná od předchozích případů: její regulace neprobíhá mechanismem atenuace (přítomnost atenuačních vlásenek nebyla potvrzena ani sekvenční analýzou vedoucí oblasti). Represe může být vyvolána pouze jedinou aminokyselinou (leucinem), aktivaci operonu zprostředkuje globální regulační protein Lrp (Wang a Calvo, 1993). Úsek DNA, který zodpovídá za regulaci operonu, byl nalezen 200 až 350 bp před transkripčním startem. Tato oblast je nezbytná nejen pro represi leucinem, ale rovněž pro maximální expresi genů *ilvI* a *ilvH*.

Zcela specifickým způsobem je regulován gen *ilvC* kódující isomero reduktasu, jenž není součástí žádného operonu, ale spolu s genem *ilvY* leží v těsném sousedství operonu *ilvGMEDA* (Obr. 2.5.). Pro tvorbu funkčního enzymu je nutná přítomnost obou genů (*ilvC* a *ilvY*), jež se ve své funkci komplementují. Expresa genu *ilvC* podléhá indukci substrátem, avšak pouze v přítomnosti pozitivního kontrolního elementu kódovaného genem *ilvY*. Induktor (substrát) pravděpodobně přímo aktivuje produkt genu *ilvY*.

Společnou transkripční jednotku tvoří v *E. coli* také geny *leuA*, *leuB*, *leuC* a *leuD*, které kódují enzymy pro biosyntézu leucinu. Operon *leuABCD*, který se nalézá v těsném sousedství operonu *ilvIH*, je regulován atenuací.

2.3.3. Biosyntéza valinu u dalších mikroorganismů a rostlin

Charakteristiky biosyntetické dráhy větvených aminokyselin u *E. coli*, uvedené v předchozích kapitolách, platí pro enterobakterie obecně a liší se jen v detailech. Například *Salmonella typhimurium* vytváří pouze dvě isoformy enzymu AHAS, a to AHAS I. kódovanou geny *ilvBN*, která je citlivá ke zpětnovazebné inhibici, a zpětnovazebně rezistentní AHAS II., která je determinována geny *ilvGM*.

Naopak, velmi podobné uspořádání genů jako v *C. glutamicum* se nachází u druhů grampozitivního rodu *Streptomyces*. Jediná isoforma enzymu AHAS, jež podléhá částečné zpětnovazebné inhibici konečnými produkty, je v těchto bakteriích kódována geny *ilvB* a *ilvN*, které tvoří spolu s genem *ilvC* transkripční jednotku (De Rossi *et al.*, 1995; Potter a Baumberg, 1996).

Další bakterie, u kterých byla analyzována biosyntetická dráha větvených aminokyselin, jsou mléčné bakterie. Nejpodrobněji byla organizace biosyntetických genů studována u *Lactococcus lactis subspecies lactis*, kde bylo zjištěno, že devět z těchto genů je sdruženo do dvou skupin na jediném fragmentu DNA o velikosti 12 kb (Godon *et al.*, 1992). První skupinu tvoří geny specifické pro tvorbu leucinu (*leuA*, *leuB*, *leuC* a *leuD*), druhá skupina obsahuje geny uplatňující se v syntéze všech tří větvených aminokyselin (*ilvD*, *ilvB*, *ilvN*, *ilvC* a *ilvA*). Uvedené pořadí jednotlivých genů odpovídá jejich pořadí na chromosomu *L. lactis*. Mimo společný shluk leží pouze gen *ilvE*, který kóduje transaminasu katalyzující poslední reakci dráhy. Obě skupiny genů zřejmě obsahují vlastní promotorové sekvence, nejsou však odděleny transkripčním terminátorem. Z tohoto důvodu tvoří geny *leu* i *ilv* pravděpodobně společnou transkripční jednotku. Celý operon je regulován mechanismem atenuace, vedoucí peptid bohatý na leucinové zbytky se nápadně podobá vedoucímu peptidu operonu *leu* z *E. coli* a naopak odlišuje od vedoucího peptidu operonu *ilvGMEDA* a *ilvBN* z téhož organismu. Mezi oběma skupinami biosyntetických genů (tedy mezi geny *leuD* a *ilvD*) byl zcela neočekávaně nalezen neznámý gen ORF2, jehož produkt pravděpodobně patří do rodiny ATP-vazebných proteinů. Na základě homologických studií byla navržena funkce tohoto proteinu, jenž by se mohl účastnit transportu aminokyselin nebo regulace biosyntetických genů. Biosyntetická dráha větvených aminokyselin byla studována také u *Leuconostoc mesenteroides subspecies cremoris*, jenž rovněž nachází uplatnění v mlékárenství (Cavin *et al.*, 1999). Přestože organizace jednotlivých genů na chromosomu se částečně podobá právě popsanému uspořádání u *L. lactis*, v buněčném extraktu *Leuconostoc mesenteroides* nebyla naměřena žádná aktivita enzymu AHAS. V souladu se stanovením specifické aktivity AHAS je zjištění, že kmeny této bakterie jsou auxotrofní na všechny tři větvené aminokyseliny.

Analogie v uspořádání biosyntetických genů s modelem popsáným u *Lactococcus lactis* byla nalezena také u *Bacillus subtilis* (Grandoni *et al.*, 1992). Společný operon *ilv-leu* je v tomto případě tvořen sedmi z deseti biosyntetických genů a podléhá regulaci atenuací, jež je řízena koncentrací leucinu v buňce (nikoliv však koncentrací isoleucinu a valinu). Vedoucí sekvence genu *ilvB*, který je prvním strukturním genem operonu *ilv-leu*, se výrazně podobá vedoucí sekvenci leucinového operonu z *E. coli*. Kromě atenuace zajišťuje doladění negativní regulace operonu také globální regulátor TnrA uplatňující se zejména v metabolismu dusíku (Tojo *et al.*, 2004). Tímto způsobem je exprese operonu *ilv-leu* reprimována dvakrát až třikrát.

Mechanismem atenuace jsou s největší pravděpodobností regulovány též geny *ilvB* a *ilvN* ze stopkovité bakterie *Caulobacter crescentus* (Tarleton *et al.*, 1994). Geny *ilvB* a *ilvN* patrně tvoří, jako u ostatních mikroorganismů, společnou transkripční jednotku, jejíž vedoucí sekvence obsahuje znaky charakteristické pro vedoucí sekvenci operonu *ilvGMEDA* z *E. coli*.

V rostlinných buňkách probíhá biosyntéza valinu, leucinu a isoleucinu v chloroplastech, proto geny biosyntetických enzymů kódují navíc chloroplastový tranzitní peptid, díky němuž mohou být směřovány do cílových organel (Singh a Shaner, 1995). Na základě morfologického dělení jsou větvené aminokyseliny syntetizovány ve všech rostlinných orgánech, preferenčně však v mladých, rostoucích tkáních. Z hlediska regulačních mechanismů biosyntetických drah valinu, leucinu a isoleucinu se v rostlinných buňkách uplatňují stejné principy jako v buňkách bakteriálních: regulace genové exprese, substrátová specifita enzymů a zpětnovazebná inhibice konečnými produkty. Navíc může být exprese mnoha genů koordinována v závislosti na jejich výskytu v různých orgánech rostliny podle jejich specifické potřeby. U jednotlivých enzymů podílejících se na tvorbě větvených aminokyselin byly nalezeny některé specifické rysy, například mnohé parazitické a saprofytické rostliny obsahují kromě klasické threonindeaminasy podléhající zpětnovazebné inhibici isoleucinem rovněž threonindeaminasu, která je k této regulaci necitlivá. Substrátem tohoto enzymu, který se uplatňuje zejména v degradacích proteinů, může být kromě threoninu také serin. Dalším specifickým rysem může být i přítomnost dvou různých aminotransferas, jež se odlišují svou substrátovou specifitou. Nejlépe prostudovaným rostlinným enzymem je synthasa acetoxykyselin, která bude podrobněji popsána v následující kapitole.

2.4. Synthasa acetohydroxykyselin (AHAS)

Synthasa acetohydroxykyselin (AHAS), též nazývaná acetolaktátsynthasa (ALS), katalyzuje první reakci specifickou pro tvorbu valinu (a isoleucinu) a je proto klíčovým enzymem této biochemické dráhy (Chipman *et al.*, 1998). Vyskytuje se s poměrně vysokým stupněm konzervovanosti u všech organismů schopných syntetizovat tyto aminokyseliny (tedy u mikroorganismů a rostlin). V souladu s obecnými charakteristikami biosyntetických drah aminokyselin, uvedenými v kapitole 2.2.3., podléhá syntéza i vlastní aktivita tohoto enzymu komplexu regulačních mechanismů, které se u různých organismů liší v detailech, ale jejichž princip zůstává zachován. Kromě enterobakterií, kde bylo nalezeno více isoform, syntetizuje většina prokaryot pouze jedinou formu enzymu AHAS. V případě bakterií se nemění ani prostorová struktura proteinu, který se vždy skládá ze dvou podjednotek. Zatímco větší podjednotka zodpovídá za katalytickou aktivitu enzymu, menší podjednotka zprostředkuje zpětnovazebnou regulaci konečnými produkty. Nepřítomnost regulační podjednotky sice vyvolává rezistenci enzymu ke zpětnovazebné inhibici, ale způsobuje markantní pokles enzymové aktivity. Menší podjednotka je tak kromě zpětnovazebné regulace nezbytná pro stabilizaci enzymu a jeho plnou aktivitu. Také v případě rostlinných homologů byla nedávno prokázána existence dvoupodjednotkového uspořádání enzymu AHAS (Hershey *et al.*, 1999; Lee a Duggleby, 2001).

Zvláštním znakem bakteriálních i rostlinných enzymů AHAS je závislost jejich aktivity na koenzymu FAD, přestože kondenzační reakce katalyzovaná tímto enzymem nezahrnuje oxidaci ani redukci, pro něž je přítomnost tohoto koenzymu charakteristická (Singh a Shaner, 1995). Tato skutečnost, spolu s velmi silnou podobností aminokyselinových sekvencí enzymů AHAS a pyruvát oxidasy (až 30% identita), naznačují společný původ těchto proteinů. Kromě koenzymu FAD závisí aktivita enzymu AHAS také na přítomnosti thiamin difosfátu (TPP) a hořečnatých iontů.

Impulsem pro studium vlastností, funkcí i struktury enzymu AHAS byl především objev z počátku 80. let minulého století, kdy bylo zjištěno, že tento protein je terčem působení dvou vysoce aktivních a komerčně velmi úspěšných skupin herbicidů, imidazolinonů a sulfonylmočovinných herbicidů (například sulfometuronmethyl) (Ray, 1984; Shaner *et al.*, 1984). Tato skutečnost je od té doby hojně využívána v zemědělství, kde se specifické inhibitory enzymu AHAS používají pro přípravu herbicidů nezávadných pro životní prostředí i lidské zdraví (Singh a Shaner, 1995). Nízkou toxicitu těchto látek způsobuje zejména nepřítomnost enzymu AHAS v živočišných buňkách. Herbicidy nepůsobí pouze na rostlinné enzymy, ale inhibují rovněž aktivitu kvasinkových a

bakteriálních homologů, jež bývají často využívány jako model pro studium vazby enzym-inhibitor. Vazebná místa herbicidů se (narozdíl od vazebných míst pro zpětnovazebně působící inhibitory) vyskytují na velké, katalytické podjednotce poblíž aktivního centra enzymu (Pang *et al.*, 2002). Nedávno byly s využitím mykobakteriálních enzymů AHAS zahájeny experimenty testující využití sulfonylmočovinných a imidazolinonových herbicidů jako léků proti TBC (Zohar *et al.*, 2003).

Nepochybný je také biotechnologický význam enzymu AHAS, jenž může být využit pro přípravu bakteriálních kmenů produkujících vysoká množství větvených aminokyselin, popřípadě kyseliny pantothenové. Změnou vlastností proteinu lze totiž poměrně snadno posunout rovnováhu celé biosyntetické dráhy směrem k produkci žádaného metabolitu (Tsuchida a Momose, 1986).

Podobně jako kapitola popisující biosyntetickou dráhu větvených aminokyselin je i kapitola pojednávající o enzymu AHAS pro přehlednost rozdělena do tří částí, ve kterých jsou shrnuty informace získané studiem *C. glutamicum*, *E. coli* a dalších organismů.

2.4.1. Enzym AHAS z *C. glutamicum*

Některé vlastnosti enzymu AHAS z *C. glutamicum* byly uvedeny již v kapitole 2.3.1. popisující metabolickou dráhu větvených aminokyselin. Jednou z charakteristik enzymu AHAS je schopnost paralelně katalyzovat dvě reakce a tudíž také vázat dva substráty (pyruvát a 2-ketobutyrát) (Obr. 2.2.). Zatímco kondenzací dvou molekul pyruvátu začíná biosyntéza valinu (a leucinu), kondenzace jedné molekuly pyruvátu a jedné molekuly 2-ketobutyrátu zahajuje syntézu isoleucinu. Enzym AHAS rozpoznává oba zmíněné substráty, avšak s rozdílnou preferencí. Afinita enzymu k 2-ketobutyrátu je vyšší než afinita k pyruvátu a podobný poznatek byl získán také v případě *E. coli* K12 (Squires *et al.*, 1981). U typového kmene *C. glutamicum* byly stanoveny následující parametry charakterizující afinitu enzymu k jednotlivým substrátům: pro 2-ketobutyrát byly naměřeny hodnoty $K_m = 4,8 \times 10^{-3}$ M a $V_{max} = 0,58$ U/mg, pro pyruvát $K_m = 8,4 \times 10^{-3}$ a $V_{max} = 0,37$ U/mg (Eggeling *et al.*, 1987). Z tohoto důvodu bývá po exogenním přídávku 2-ketobutyrátu významně limitována tvorba valinu a leucinu ve prospěch syntézy isoleucinu. Buňky v této situaci hladovějí na valin a leucin a růst kultury se výrazně zpomaluje. Přídavek 2-ketobutyrátu do kultivačního media současně vyvolává u *C. glutamicum* až 20násobné zvýšení specifické aktivity enzymu AHAS (Eggeling *et al.*, 1987) a rovněž významné zvýšení hladiny transkriptů *ilvBNC*, *ilvNC* i vedoucího transkriptu v buňkách (Keilhauer *et al.*, 1993). Důsledky zvýšené koncentrace 2-ketobutyrátu (zvýšení exprese operonu *ilvBNC* a nárůst aktivity enzymu AHAS) jsou

především výsledkem atenuace, na kontrole exprese operonu *ilvBNC* se však pravděpodobně uplatňuje také další mechanismus regulace, kde by jako přímý nebo nepřímý aktivátor transkripce mohl působit právě 2-ketobutyrát (Morbach *et al.*, 2000).

Unikátní charakteristikou enzymu AHAS z *C. glutamicum* je rovněž způsob jeho exprese, zmíněný již v kapitole 2.3.1. *Northern* analýza prokázala existenci tří různě velkých transkriptů vznikajících přepisem operonu *ilvBNC* (Keilhauer *et al.*, 1993) (Obr. 2.4.). Překvapivá, a mezi dosud studovanými mikroorganismy jedinečná, byla přítomnost transkriptu o velikosti 2,3 kb, nesoucího geny *ilvN* a *ilvC*. Tento transkript zřejmě zajišťuje dostatečnou koncentraci regulační podjednotky IlvN v buňkách *C. glutamicum* a je tak pravděpodobně nezbytný pro vysokou aktivitu enzymu AHAS. V podmínkách *in vitro* bylo totiž prokázáno, že maximální aktivity isoenzymu AHAS III. z *E. coli* je dosahováno pouze v přítomnosti nadbytku regulační podjednotky IlvN (Weinstock *et al.*, 1992).

2.4.2. Enzym AHAS z *E. coli*

Enzym AHAS z *E. coli* je nejlépe prostudovaným proteinem z rodiny AHAS, a to jak z hlediska vlastností, funkce a prostorové struktury jeho molekul, tak i z hlediska kinetiky jím katalyzované chemické reakce (Barak *et al.*, 1987; Gollop *et al.*, 1989). Aktivní formu enzymu tvoří tetramer složený ze dvou velkých, katalytických podjednotek a dvou malých, regulačních podjednotek ($\alpha_2\beta_2$) (Weinstock *et al.*, 1992). Z *E. coli* byly izolovány tři isoformy enzymu AHAS, které se liší způsobem regulace (Grimminger a Umbarger, 1979; Umbarger, 1996) (Tab. 2.1.). Isoenzymy AHAS I. a III. podléhají silné zpětnovazebné inhibici valinem. Zatímco v *C. glutamicum* je aktivita enzymu inhibována pouze z 50 % (a to i společným působením všech tří větvených aminokyselin o koncentraci 10mM), isoenzymy AHAS I. a III. z *E. coli* K12 jsou inhibovány 1,5mM valinem až z 90 % (De Felice *et al.*, 1977). Isoenzym AHAS II. je naopak ke zpětnovazebné inhibici rezistentní. Odlišná je i afinita různých isoform k jednotlivým substrátům a inhibitorům. Isozym III. ve srovnání s isozymem I. například váže s nižší účinností pyruvát, avšak má mnohem vyšší afinitu k valinu. Podobně jako v případě *C. glutamicum* vykazují všechny tři isoenzymy vyšší vazebnou specifitu k 2-ketobutyrátu ve srovnání s pyruvátem. Většina prototrofních kmenů *E. coli* obsahuje enzym AHAS II. rezistentní ke zpětnovazebné inhibici konečnými produkty a alespoň jeden z isoenzymů sensitivních. Kmen *E. coli* K12 není schopen syntetizovat isoformu AHAS II. a jeho růst je z tohoto důvodu inhibován v přítomnosti vysoké koncentrace valinu.

Nedávno byly zahájeny experimenty, jejichž cílem je charakterizovat prostorovou strukturu enzymu AHAS. V případě isoformy AHAS II. byla podrobně studována větší, katalytická podjednotka s cílem nalézt aktivní místo enzymu (Ibdah *et al.*, 1996). Enzym AHAS II. je ze všech tří isoform přítomných v *E. coli* nejcitlivější k působení sulfonylmočovinných a imidazolinonových herbicidů. Místně specifická mutageneze odhalila roli několika významných aminokyselinových zbytků, a to nejen ve vazebné schopnosti enzymu (Ibdah *et al.*, 1996; Hill a Duggleby, 1998; Lee a Duggleby, 2000; Bar-Ilan *et al.*, 2001). Například substituce tryptofanu v pozici 464 výrazně snížila specifické rozpoznání preferovaného substrátu 2-ketobutyátu i citlivost enzymu k inhibici herbicidem sulfometuronmethylem. Záměna methioninu v pozici 460 naopak významně snížila stabilitu proteinu i jeho afinitu ke kofaktorům.

Na základě mutační analýzy i dalších kritérií byla předpovězena také trojrozměrná struktura malé, regulační podjednotky isoenzymu AHAS III. (Tab. 2.2., Obr. 2.6.) (Vyazmensky *et al.*, 1996; Mendel *et al.*, 2001; Mendel *et al.*, 2003). Pokud ostatní bakteriální druhy (většinou grampozitivní) obsahují pouze jedinou isoformu enzymu AHAS, podobá se svoji délkou i sekvencí právě isoenzymu AHAS III. (Porat *et al.*, 2004). Nejvíce konzervována je mezi jednotlivými isoenzymy i jednotlivými bakteriálními druhy N-koncová část polypeptidu, která je odpovědná za vazbu zpětnovazebných inhibitorů. U isoformy AHAS III. se tato oblast skládá do prostorové struktury, která se s největší pravděpodobností podobá nedávno popsané „ACT doméně“ vážící ligand. Jako ACT doména byla původně označena C-terminální doména 3-fosfoglycerátdehydrogenasy (3PGDH), dnes tato rodina zahrnuje také aspartokinasu, phenylalanin-4-hydroxylasu a další enzymy regulované koncentrací aminokyseliny (Chipman a Shaanan, 2001). Podobně jako u ostatních homologů je aktivní forma isoenzymu AHAS III. tvořena holoenzymem o velikosti 150-160 kDa složeného ze dvou velkých a dvou malých podjednotek. Na základě hypotézy vycházející z navržené prostorové struktury vzniká vazebné místo pro zpětnovazebně působící inhibitor valin na rozhraní interagujících N-terminálních domén obou regulačních podjednotek holoenzymu (Obr. 2.6.). Podobnou prostorovou strukturu zřejmě zaujímají všechny dosud známé enzymy AHAS, výjimku tvoří jen regulační podjednotka valin-rezistentního isoenzymu AHAS II., která nebyla pomocí programu PSI-BLAST (*position-specific iterative sequence database*) identifikována jako člen „ACT doménové“ rodiny. Deleční analýzou genu pro regulační podjednotku isoenzymu AHAS III. bylo zjištěno, že N-terminální doména je nejen zodpovědná za vazbu zpětnovazebných inhibitorů, ale je též nezbytná pro rozpoznání i úplnou aktivaci katalytické podjednotky (přítomnost malé podjednotky je nutná rovněž pro maximální aktivitu valin-rezistentního isoenzymu AHAS

II.). Naopak C-terminální část polypeptidu není pro rozpoznání ani aktivaci potřebná, avšak účastní se vazby zpětnovazebných inhibitorů. Její role může spočívat ve stabilizaci dimeru obou regulačních podjednotek nebo v přenosu signálu na podjednotku katalytickou. Uspořádání isoenzymu AHAS III. do konečné prostorové konformace vyžaduje koenzym FAD, složený holoenzym má ale poměrně velkou tendenci disociovat na jednotlivé podjednotky. Nepřítomnost malé, regulační podjednotky vyvolává rezistenci ke zpětnovazebné inhibici, ale současně i snížení enzymové aktivity na 3-5% původní hodnoty. Vazba mezi velkou a malou podjednotkou je specifická, malé podjednotky isoenzymů AHAS I. a AHAS III. se ve své vazbě na katalytickou podjednotku vzájemně nekomplementují. Isoenzym AHAS III. podléhá inhibici všemi třemi konečnými produkty, účinek jednotlivých inhibitorů klesá v následujícím pořadí: valin, isoleucin, leucin. Avšak pouze inhibice valinem, která může dosahovat 65-85 % a pravděpodobně probíhá mechanismem nekooperativní inhibice, má významnější fyziologický efekt.

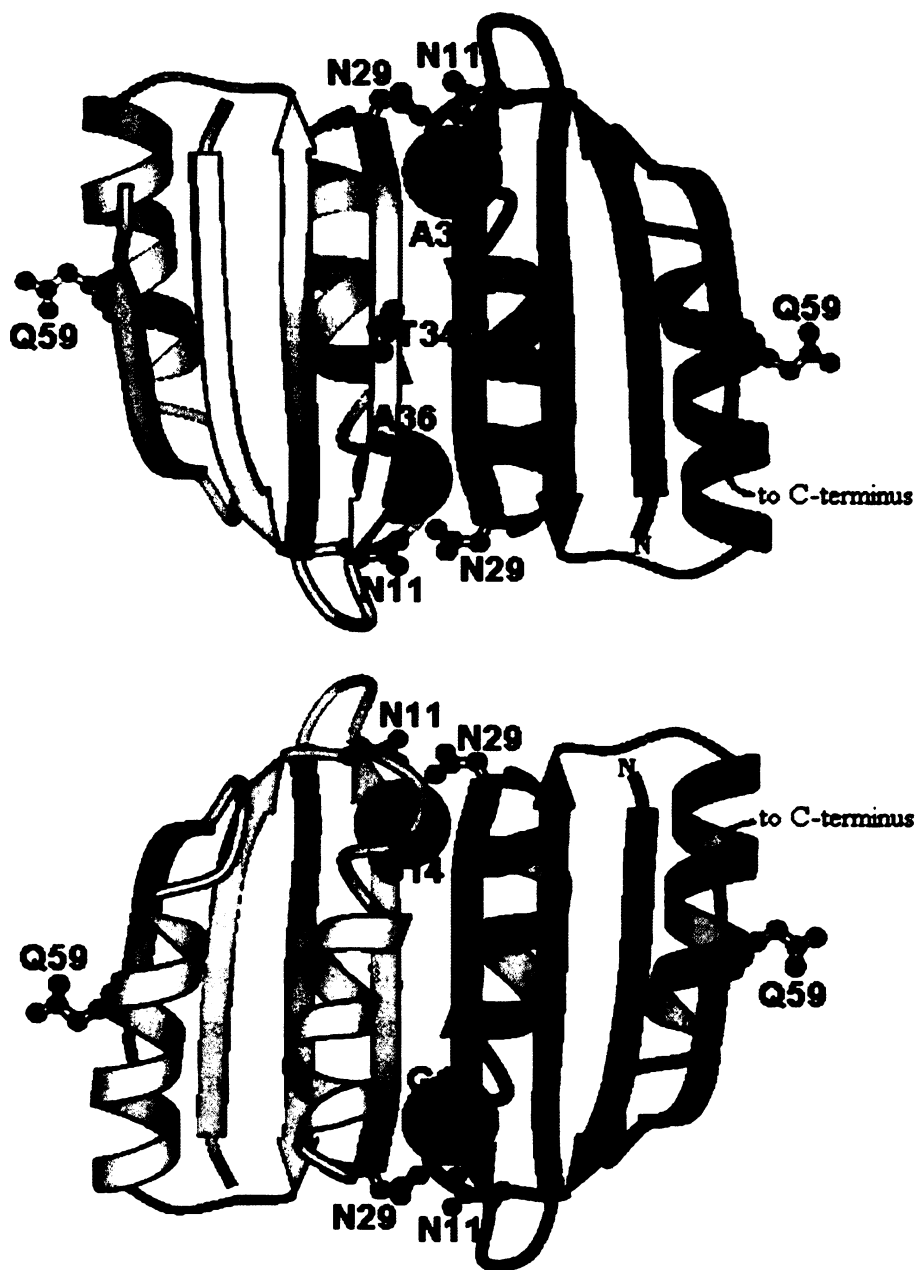
Tab. 2.1. Isoformy enzymu AHAS a jejich podjednotky izolované z *E. coli*

Gen	Enzym / podjednotka ¹	Velikost (kDa)	Zpětnovazebná regulace
<i>ilvB</i>	AHAS I. / velká podjednotka	60	ano
<i>ilvN</i>	AHAS I. / malá podjednotka	9,5	
<i>ilvG</i>	AHAS II. / velká podjednotka	59,3	ne
<i>ilvM</i>	AHAS II. / malá podjednotka	9,7	
<i>ilvI</i>	AHAS III. / velká podjednotka	61,8	ano
<i>ilvH</i>	AHAS III. / malá podjednotka	17,5	

¹K aktivaci ezymu je pravděpodobně nezbytná dimerizace katalytických podjednotek, které jsou u jednotlivých isoform vysoce konzervovány (přibližně 40% sekvenční identita). Regulační podjednotky jsou z hlediska sekvence i velikosti variabilnější.

Tab. 2. 2. Mutační analýza N-terminální části regulační podjednotky enzymu AHAS III. z *E. coli*

Původní aminokyselina	Pozice	Aminokyselina po substituci	Následek substituce
asparagin	11	alanin	Rezistence k inhibici valinem
glycin	14	kyselina asparagová	Rezistence k inhibici valinem Neschopnost vázat valin Nižší afinita malé podjednotky ke katalytické podjednotce
asparagin	29	histidin	Rezistence k inhibici valinem Neschopnost vázat valin
threonin	34	isoleucin	Výrazně snížená inhibice valinem Nižší afinita malé podjednotky ke katalytické podjednotce Vyšší aktivita holoenzymu ve srovnání s divokým enzymem AHAS III.
alanin	36	valin	Rezistence k inhibici valinem Nižší afinita malé podjednotky ke katalytické podjednotce
glutamin	59	leucin	Citlivost k inhibici valinem



Obr. 2.6. Model trojrozměrné struktury dimeru N-terminální části malé (regulační) podjednotky isoenzymu AHAS III. z *E. coli* (Mendel *et al.*, 2001)

N-koncová část polypeptidu pravděpodobně zaujímá prostorovou strukturu, která se velmi podobá doménám rodiny ACT. Model této části proteinu, zachycující 85 ze 163 aminokyselin, byl vytvořen mimo jiné na základě mutační analýzy vyznačených aminokyselinových zbytků. Důsledky jednotlivých substitucí shrnuje tabulka 2.2. Pro větší názornost a zobrazení polohy všech testovaných aminokyselin je polypeptid zachycen ze dvou různých pohledů otočených o 180°. Dvě molekuly navázaného zpětnovazebně působícího inhibitoru (valinu) jsou zakresleny červeně.

2.4.3. Enzym AHAS z dalších mikroorganismů a rostlin

Jednotlivé isoformy enzymu AHAS byly detailněji prostudovány rovněž v *Salmonella typhimurium* (Epelbaum *et al.*, 1998). Tato bakterie je schopna exprimovat pouze dvě isoformy enzymu AHAS (AHAS I. a AHAS II.), jež využívá podobně jako *E. coli* s různou účinností v závislosti na koncentraci pyruvátu ve vnitrobuněčném prostředí. Zpětnovazebně rezistentní AHAS II. jenž je kódován geny *ilvGM* disponuje podobně jako homolog pocházející z *C. glutamicum* výrazně vyšší afinitou k 2-ketobutyrátu než k pyruvátu. Z tohoto důvodu se uplatňuje především během růstu na glukose, kdy se v buňkách zvyšuje hladina pyruvátu jako universálního centrálního metabolitu s širokým využitím. Za těchto podmínek je naopak 2-ketobutyrát přítomen pouze v nízkých koncentracích. Pokud je jediným zdrojem uhlíku a energie například acetát, hlavní roli v biosyntetické dráze větvených aminokyselin přebírá isozym AHAS I. V tomto případě intracelulární koncentrace pyruvátu klesá, naopak vzrůstá koncentrace glyoxylátu, který působí jako inhibitor enzymu AHAS. V nepřítomnosti glukosy však současně dochází k aktivaci exprese genů citlivých ke katabolické represi, mezi něž patří také operon *ilvBN* kódující enzym AHAS I. Zvýšená exprese tohoto proteinu potom může potlačit negativní efekt glyoxylátu. S rozdílnou afinitou obou isoenzymů k substrátům souvisí také rozdílný tok metabolitů směřujících k valinu nebo isoleucinu. Zatímco dvě třetiny toku metabolitů k valinu a leucinu jsou zprostředkovány isoenzymem AHAS I., 70-90 % toku metabolitů směrem k isoleucinu zajišťuje AHAS II. Enzym AHAS I. je, narozdíl od enzymu AHAS II., citlivý ke zpětnovazebné regulaci valinem. Téměř kompletní inhibici jeho aktivity vyvolá již 2mM koncentrace této aminokyseliny. Podobně jako v případě *E. coli* je aktivita enzymu AHAS z *S. typhimurium* inhibována rovněž herbicidem sulfometuronmethylem, který působí především na isoenzym AHAS II. (Epelbaum *et al.*, 1996).

Podobné dvoupodjednotkové uspořádání vykazují také enzymy cyanobakterií (Kouhen a Joret, 2002) a eukaryotické enzymy nalezené v kvasince *Saccharomyces cerevisiae* (Pang a Duggleby, 1999). Kvasinkový enzym AHAS podléhá inhibici valinem a aktivaci ATP (Pang a Duggleby, 2001). Předmětem studia u kvasinek je zejména krystalická struktura katalytické podjednotky a struktura komplexu této podjednotky s již zmíněnými herbicidy (kapitola 2.4.), jež působí jako inhibitory enzymu blokující přístup substrátu do aktivního místa (Pang *et al.*, 2002; Pang *et al.*, 2003). Na základě těchto poznatků mohou být následně navrženy nové a účinnější molekuly studovaných herbicidů.

Narozdíl od enzymů mikrobiálních platilo ještě nedávno obecné tvrzení, že enzymy AHAS pocházející z rostlin jsou tvořeny jedinou podjednotkou, jejíž velikost i mnohé konzervované strukturní domény odpovídají velké katalytické podjednotce enzymů

bakteriálních. V posledních letech však byla také v buňkách vyšších rostlin prokázána přítomnost regulační podjednotky, struktura i mechanismus účinku prokaryotických a eukaryotických enzymů jsou tak pravděpodobně velmi podobné (Hershey *et al.*, 1999; Lee a Duggleby, 2001). Počet genů determinujících enzym AHAS je u různých rostlinných druhů variabilní. V *Arabidopsis* byl například nalezen pouze jediný gen kódující tento protein (Mazur *et al.*, 1987), zatímco v *Brassica napus* bylo objeveno až pět těchto genů (Rutledge *et al.*, 1991). Rovněž rostlinné enzymy se, podobně jako bakteriální, vyznačují rozdílnou substrátovou specifitou a zpětnovazebnou inhibicí zprostředkovanou konečnými produkty dané dráhy (Singh a Shaner, 1995). Regulaci inhibicí zajišťují v rostlinách všechny tři větvené aminokyseliny (valin, leucin, isoleucin), jejich společný účinek má synergistický charakter. Z tohoto důvodu byla vyslovena hypotéza, podle které se zpětnovazebné inhibitory zřejmě vážou do různých vazebných míst na molekule proteinu. Tento předpoklad byl již potvrzen, a to v případě enzymu AHAS z *Arabidopsis thaliana* (Lee a Duggleby, 2002). Regulační podjednotka tohoto enzymu obsahuje dvě repetice (interní duplikace), z nichž jedna váže valin a isoleucin a druhá pouze leucin. Také z rostlin byl již izolován mutant rezistentní ke zpětnovazebné inhibici valinem (Hervieu a Vaucheret, 1996). Inhibici rostlinných enzymů AHAS mohou vyvolat rovněž již zmíněné herbicidy pocházející ze tříd imidazolinonů a sulfonylmočovinných herbicidů, jež způsobují například zastavení mitosy a syntézy DNA nebo inhibici transportu cukrů z listů během fotosyntézy. Po exogenním přidavku větvených aminokyselin jsou však oba tyto procesy znovu obnoveny. Podle jiné hypotézy by mohl účinek herbicidů souviset s toxickým hromaděním 2-ketobutyátu (substrát inhibovaného enzymu AHAS) v buňce (LaRossa *et al.*, 1987). Podobně jako u kvasinkových homologů probíhají i u rostlin detailní studie krystalické struktury komplexu enzym-inhibitor (Pang *et al.*, 2004) i další mutační a deleční analýzy (Kim *et al.*, 2004). Spolu s přípravou nových herbicidů jsou vyvíjeny rovněž mutanty zemědělských rostlin rezistentní k těmto inhibitorům (Newhouse *et al.*, 1991a; Newhouse *et al.*, 1991b; Newhouse *et al.*, 1992; Tan *et al.*, 2004). Jejich společným znakem jsou mutace v genu kódujícím enzym AHAS, které způsobují necitlivost enzymu vůči působení použitých herbicidů. U různých rostlinných druhů byly popsány až tři formy této rezistence: selektivní rezistence k imidazolinonům, selektivní rezistence k sulfonylmočovinným herbicidům a společná rezistence k oběma zmíněným skupinám. Tyto výsledky naznačují přítomnost dvou nezávislých vazebných míst, jejichž vzájemná poloha však je patrně blízká a jež jsou oddělena od vazebných míst pro zpětnovazebně působící inhibitory.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Materiál

3.1.1. Kultivační půdy

3.1.1.1. Půdy kompletní

Půda LB

Trypton (Oxoid) 10 g
Yeast extract (Oxoid) 5 g
NaCl (Lachema) 10 g
Doplněno do 1000 ml destilovanou vodou a sterilizováno autoklávováním
pH 6,8 (neupravováno)

Půda LA

Do 1000 ml půdy LB přidáno 15 g agaru (Serva).

Půda 2xTY

Trypton 16 g
Yeast extract 10 g
NaCl 5 g
Doplněno do 1000 ml destilovanou vodou
pH 6,8 (neupravováno)
Po sterilizaci autoklávováním přidáno:
Glukosa 50% (Lachema) 10 ml
FeSO₄ x 7 H₂O (Lachema) (5 g/l) + MnSO₄ x 4 H₂O (Lachema) (5 g/l) 1 ml

Pevná půda 2xTY

Do 1000 ml půdy 2xTY přidáno 15 g agaru.

Půda SOB

Trypton 20 g
Yeast extract 5 g
NaCl 0,6 g
KCl (Lachema) 0,2 g
Doplněno do 1000 ml destilovanou vodou
Po sterilizaci autoklávováním přidáno:
1M MgCl₂ (Lachema) + 1M MgSO₄ (Lachema) 10 ml
pH 6,8 (neupravováno)

Půda SOC

Do 1000 ml půdy SOB přidáno 7 ml 50% glukosy.

Půda Epo

Trypton 1 g

Yeast extract 0,5 g

NaCl 1 g

Doplněno do 80 ml destilovanou vodou

Po sterilizaci autoklávováním přidáno 20 ml filtrací sterilizovaného roztoku:

Hydrazid isonikotinové kyseliny (Aldrich) 20 g/1000 ml (= 400 mg/20 ml)

Glycin (Lachema) 125 g/1000 ml (= 2,5 g/20 ml)

Tween 80 (Merck) 5 ml/1000 ml (= 0,1 ml/20 ml)

Půda BHIS

Brain Heart Infusion (Oxoid) 37 g

D-sorbitol (Serva) 91 g (autoklávován zvlášť)

Doplněno do 1000 ml destilovanou vodou

Půda LBHIS

Trypton 5 g

Yeast extract 2,5 g

NaCl 5 g

Brain Heart Infusion 18,5 g

Agar 15 g

D-sorbitol 91 g (autoklávován zvlášť)

Doplněno do 1000 ml destilovanou vodou a sterilizováno autoklávováním

3.1.1.2. Půdy minimální**Půda MM CGXII**

Močovina (Aristar) 5 g

(NH₄)₂SO₄ (Lachema) 20 g

K₂HPO₄ (Serva) 1 g

KH₂PO₄ (Lachema) 1 g

MgSO₄ x 7 H₂O (Lachema) 0,25 g

CaCl₂ (Lachema) (1 g/100 ml) 1 ml

Doplněno do 920 ml destilovanou vodou

pH 7

Po sterilizaci autoklávováním přidáno:

Stopové prvky 1 ml

(100ml: FeSO₄ (Lachema) 1 g

MnSO₄ (Lachema) 1 g

ZnSO₄ x 7 H₂O (Lachema) 0,1 g

CuSO₄ (Lachema) 0,02 g

NiSO₄ (Lachema) 0,002 g)

Biotin (Serva) (0,2 mg/ml) 1 ml

Glukosa 50% 80 ml

Kyselina protokatechová (Sigma) (30 mg/ml; pro rozpuštění přidán 1 ml 1N NaOH do 10 ml; sterilizováno filtrací) 60 μ l

Pro auxotrofní kmeny přidáno podle potřeby:

L-valin (Fluka) (výsledná koncentrace 5mM)

L-leucin (Sigma) (výsledná koncentrace 5mM)

L-isoleucin (Serva) (výsledná koncentrace 5mM)

Kyselina pantothenová (sodná sůl) (Sigma) (výsledná koncentrace 0,2mM)

Pevná půda MM CGXII

Do 1000 ml půdy MM CGXII přidáno 15 g agaru (autoklávován zvlášť).

3.1.2. Bakteriální kmeny

Escherichia coli DH5 α (*supE44* Δ *lacU169* (ϕ 80*lacZ* Δ M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1relA1*) - kmen umožňující α -komplementaci (Hanahan, 1985)

Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 (typový kmen)

Corynebacterium glutamicum Δ *ilvB* (Morbach *et al.*, 2000)

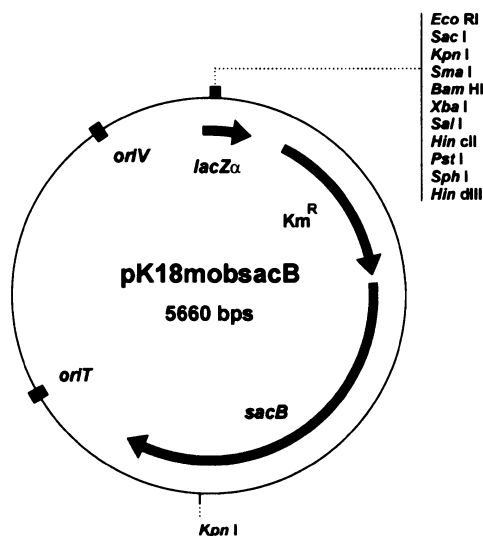
Kmeny *C. glutamicum* zkonstruované v této práci na základě typového kmene ATCC 13032 jsou uvedeny v tabulce 3.1.

Tab. 3.1. Seznam kmenů *C. glutamicum* zkonstruovaných v této práci na základě typového kmene ATCC 13032

Kmen <i>C. glutamicum</i>	Charakteristika
Δ <i>ilvN</i>	deleční mutant v genu <i>ilvN</i>
<i>ilvNM13</i>	mutant genu <i>ilvN</i>
Δ <i>ilvA</i> Δ <i>panB</i>	deleční mutant v genech <i>ilvA</i> a <i>panB</i>
Δ <i>ilvA</i> Δ <i>panB</i> <i>ilvNM13</i>	deleční mutant v genech <i>ilvA</i> a <i>panB</i> ; mutace v genu <i>ilvN</i>
Δ <i>AttilvB</i>	deleční mutant v atenuátoru promotoru genu <i>ilvB</i>
Δ <i>ilvA</i> Δ <i>panB</i> Δ <i>AttilvB</i>	deleční mutant v genech <i>ilvA</i> a <i>panB</i> ; delece v atenuátoru promotoru genu <i>ilvB</i>
Δ <i>ilvA</i> Δ <i>panB</i> Δ <i>AttilvB</i> <i>ilvNM13</i>	deleční mutant v genech <i>ilvA</i> a <i>panB</i> ; delece v atenuátoru promotoru genu <i>ilvB</i> ; mutace v genu <i>ilvN</i>
<i>ilvNstop</i> 1	deleční mutant v genu <i>ilvN</i> – zkrácení genu <i>ilvN</i>
<i>ilvNstop</i> 2	deleční mutant v genu <i>ilvN</i> – zkrácení genu <i>ilvN</i>

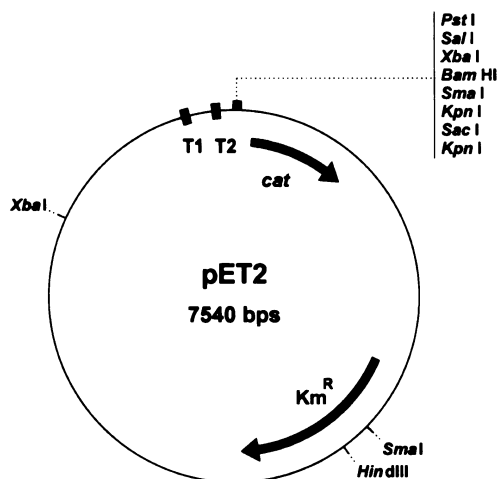
3.1.3. Plazmidy

Plazmidy použité v této práci jsou obsaženy v tabulce 3.2.



Obr. 3.1. Genetická a restriční mapa mobilizovatelného vektoru pK18mobsacB

Mobilizovatelný vektor pK18mobsacB (Schäfer *et al.*, 1994) lze přenášet do buněk *C. glutamicum* konjugací a rovněž se využívá pro integrace fragmentů DNA do chromosomu. *lacZα* = gen pro aminoterminální fragment β-galaktosidasy (zajišťuje selekci rekombinantních klonů na základě α-komplementace); *Km^R* = gen pro rezistenci ke kanamycinu; *sacB* = modifikovaný gen *sacB* pocházející z plazmidu pSM20 (*Bacillus subtilis*), který determinuje citlivost hostitelů k sacharose (enzym kódovaný genem *sacB* přeměňuje sacharosu z media na toxický polymer levansacharosu); *oriT*, *oriV* = počátky replikace v *E. coli*



Obr. 3.2. Genetická a restriční mapa promoter-probe vektoru pET2

Podvojný replikativní vektor pET2 (Vašicová *et al.*, 1998) lze použít pro měření síly promotorů v *E. coli* a v *C. glutamicum*. T1 = transkripční terminátor genu *leuB* z *C. glutamicum*; T2 = transkripční terminátory *rrnBT₁T₂* z *E. coli*; *cat* = bezpromotorový gen *cat* (= reportérový gen) kódující enzym chloramfenikolacetyltransferasu, která determinuje rezistenci ke chloramfenikolu; *Km^R* = gen pro aminoglykosidfosfotransferasu z transpozonu Tn903 zajišťující rezistenci ke kanamycinu.

Tab. 3.2. Seznam použitých plazmidů

Plazmid	Charakteristika	Citace
pK19	Km ^R , klonovací vektor <i>E. coli</i> umožňující selekci na základě α -komplementace β -galaktosidasy	Pridmore, 1987
pK19T	Vektor pK19 s odstraněným restričním místem <i>Bgl</i> III	Tato práce
pEC71	Km ^R , podvojný (<i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i>) klonovací vektor	Pátek <i>et al.</i> , 1993
pECKA	Km ^R , podvojný (<i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i>) klonovací vektor umožňující selekci na základě α -komplementace β -galaktosidasy	Tato práce
pKK5	Operon <i>ilvBNC</i> z <i>C. glutamicum</i> vložený do vektoru pJC1	Cordes <i>et al.</i> , 1992
pECKA <i>ilvBNC</i>	Operon <i>ilvBNC</i> z <i>C. glutamicum</i> vložený do vektoru pECKA	Tato práce
pECKA <i>ilvBNC</i> M8	Operon <i>ilvBNC</i> z <i>C. glutamicum</i> s mutací M8 v genu <i>ilvN</i> vložený do vektoru pECKA	Tato práce
pECKA <i>ilvBNC</i> M11	Operon <i>ilvBNC</i> z <i>C. glutamicum</i> s mutací M11 v genu <i>ilvN</i> vložený do vektoru pECKA	Tato práce
pECKA <i>ilvBNC</i> M13	Operon <i>ilvBNC</i> z <i>C. glutamicum</i> s mutací M13 v genu <i>ilvN</i> vložený do vektoru pECKA	Tato práce
pK18mobsacB	Km ^R , integrativní vektor <i>E. coli</i> umožňující selekci pomocí genu <i>sacB</i> (Obr. 3.1.)	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pK18mobsacB Δ <i>ilvN</i>	PCR fragment pro zavedení delece do genu <i>ilvN</i> vložený do vektoru pK18mobsacB	Tato práce
pK18mobsacB <i>ilvNM13</i>	PCR fragment pro zavedení mutace M13 do genu <i>ilvN</i> vložený do vektoru pK18mobsacB	Tato práce
pK18mobsacB Δ <i>Att</i> <i>ilvB</i>	PCR fragment pro deletování atenuátoru promotoru genu <i>ilvB</i> vložený do vektoru pK18mobsacB	Tato práce
pK18mobsacB <i>ilvN</i> stop 1	PCR fragment pro zkrácení genu <i>ilvN</i> vložený do vektoru pK18mobsacB	Tato práce
pK18mobsacB <i>ilvN</i> stop 2	PCR fragment pro zkrácení genu <i>ilvN</i> vložený do vektoru pK18mobsacB	Tato práce
pK18mobsacB Δ <i>ilvA</i>	PCR fragment pro zavedení delece do genu <i>ilvA</i> vložený do vektoru pK18mobsacB	Tato práce
pK18mobsacB Δ <i>panB</i>	PCR fragment pro zavedení delece do genu <i>panB</i> vložený do vektoru pK18mobsacB	Tato práce
pET2	Km ^R , podvojný (<i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i>) <i>promoter-probe</i> vektor (Obr. 3.2.)	Vašicová <i>et al.</i> , 1998
pET2P- <i>ilvB</i> 1	Promotor genu <i>ilvB</i> (PCR fragment, 148 bp) v pET2	Tato práce
pET2P- <i>ilvB</i> 2	Promotor genu <i>ilvB</i> (PCR fragment, 417 bp) v pET2	Tato práce
pET2P- <i>ilvB</i> 3	Promotor genu <i>ilvB</i> (PCR fragment, 70 bp) v pET2	Tato práce
pET2P- <i>ilvB</i> 4	Promotor genu <i>ilvB</i> (PCR fragment, 339 bp) v pET2	Tato práce
pET2P- <i>ilvN</i> 0	PCR fragment vedoucí sekvence genu <i>ilvN</i> , 303 bp, v pET2	Tato práce
pET2P- <i>ilvN</i> 1	Promotor genu <i>ilvN</i> (PCR fragment, 767 bp) v pET2	Tato práce
pET2P- <i>ilvN</i> 2	Promotor genu <i>ilvN</i> (PCR fragment, 640 bp) v pET2	Tato práce
pET2P- <i>ilvN</i> 3	Promotor genu <i>ilvN</i> (PCR fragment, 530 bp) v pET2	Tato práce
pET2P- <i>ilvN</i> 4	Promotor genu <i>ilvN</i> (PCR fragment, 393 bp) v pET2	Tato práce

3.1.4. Primery (oligonukleotidy) pro PCR

Oligonukleotidy (VBC-GENOMICS) použité jako primery pro PCR jsou uvedeny v tabulce 3.3.

Tab. 3.3. Seznam použitých primerů

Primer	Sekvence oligonukleotidu (5'-3') ¹	Účel
PILVBH1	GCT CTGC AGTAGCGGGAGCCTGCCT ^F	Klonování P- <i>ilvB</i>
PILVBD1	GT GGATCCT AGGTCATGGTGTGTCATGC ^R	Klonování P- <i>ilvB</i>
PILVBH2	GG CTGCAG CGTGCCTTGTGGAATTGGA ^F	Klonování P- <i>ilvB</i>
PILVBD2	TCT GGA TCCTTTACTAAATAAGG ^R	Klonování P- <i>ilvB</i>
DELATTH	GT GAA TCGACAACGATGCCG ^F	Delece v atenuátoru P- <i>ilvB</i>
DELATTD	GG GAA TCCACCAGAACAGGGCC ^R	Delece v atenuátoru P- <i>ilvB</i>
ATT3	CAAGCCAAGCGAATAATGGT TATGGTGTGTCA ^R	Delece v atenuátoru P- <i>ilvB</i>
ATT4	ACCATTATT CGCTTGGCTTGGACGGGTCC ^F	Delece v atenuátoru P- <i>ilvB</i>
DATTILVB	GAGCCAAGATTAGCGCTGA ^F	Ověření delece v atenuátoru P- <i>ilvB</i>
PILVNH1	AG GGATCC AAAAGGCTCGAGAGA ^F	Klonování P- <i>ilvN</i>
PILVND1	CT GGA TCCTGAACGAGTACGGAC ^R	Klonování P- <i>ilvN</i>
PILVND2	TC GGATCC GACGATGAAGTCGAT ^R	Klonování P- <i>ilvN</i>
PILVNH3	TT ATG CATTGAAACCCTGTCCAAG ^F	Klonování P- <i>ilvN</i>
PILVND3	GG GGATCC ACTCGCCCTGGTTACGA ^R	Klonování P- <i>ilvN</i>
PILVND4	CAGGAT CCTCTGCTGCAGAT ^R	Klonování P- <i>ilvN</i>
MILVNH	GCGGAGGAAGTACTGCC ^F	Mutagenese <i>ilvN</i>
MILVND	CAATCAGATTAATTGCTGTTTA ^R	Mutagenese <i>ilvN</i>
ILVNM1	GGACGTAGACGGT GAC ATTCCCGCG ^F A T	Mutagenese <i>ilvN</i>
MISBGL	GTTTAGAACTTGGCCGGAG ^R	Mutagenese <i>ilvN</i>
ILVNM13H	AGGACGTAGAC GATGACT TTTTCCCGCGTAT ^F	Mutagenese <i>ilvN</i> v chromosomu
ILVNM13D	ATACGCGGGAAA AGTCAT CGTCTACGTCCT ^R	Mutagenese <i>ilvN</i> v chromosomu
DELN1H	CT GAA TCCGGTGGACTGGGCACC ^F	Delece v <i>ilvN</i>
DELN1D	TTGAATGCGCTCTCTCCTTATGCCTCGGTC ^R	Delece v <i>ilvN</i>
DELN2H	TAAGGAGAGAGCGCATTCAACCTCGTGTC ^F	Delece v <i>ilvN</i>
DELN2D	CC GAA TCAAGGAGAGGTCAGCGTC ^R	Delece v <i>ilvN</i>
SILVNH	GATCCTGCCGACATTCACGA ^F	Ověření přítomnosti delece a mutace v <i>ilvN</i>
SILVND2	ATCAGCTTGTGGAGCTGC ^R	Ověření přítomnosti delece a mutace v <i>ilvN</i>
DELNH3	GT GAA TCCCGACTTTGTTACCCTTTCT ^F	Zkracování <i>ilvN</i>
DELND3	CAAGCAGTGT CAGG CATAGTGGTCTCTTC ^R	Zkracování <i>ilvN</i>
DELNH4	TATCGCCT GAC ACTGCTTGACGTGATGG ^F	Zkracování <i>ilvN</i>
DELND4	GT GAA TCCGTTCCAGTTTGGCTCG ^R	Zkracování <i>ilvN</i>
DELNH5	CCGCGCCTGACGCGAACTGATCCAATCC ^F	Zkracování <i>ilvN</i>
DELND5	GTTCCGCTC AGG CGCGGAAGATGTTCCG ^R	Zkracování <i>ilvN</i>
DELPANBH1	AACTGCAGCGCAAGAAGGTCT ^F	Delece v <i>panB</i>
DELPANBD1	AATCGTCTGCATCGCGACCCAGCACAACTG ^R	Delece v <i>panB</i>
DELPANBH2	GGGTCGCGATGCAGACGATTTCGACGCATTG ^F	Delece v <i>panB</i>
DELPANBD2	AACTGCAGGGGATTGACAA ^R	Delece v <i>panB</i>
DPANB	GTAAACGGCCAGAAAGTTTC ^F	Ověření přítomnosti delece v <i>panB</i>
DELILVAH1	AG GAA TTCAGAGGACTGAGCCTG ^F	Delece v <i>ilvA</i>
DELILVAD1	TGGTTCGATAGGCCACGCCCTGGGCATGGT ^R	Delece v <i>ilvA</i>
DELILVAH2	GGGCGTGGCCTATCGAACAGCGGGAGCAG ^F	Delece v <i>ilvA</i>
DELILVAD2	AAG AA TTCGTA CTCAGG AGTGCC ^R	Delece v <i>ilvA</i>
DILVA	GAGGATCTGCAGGATGTTCC ^F	Ověření přítomnosti delece v <i>ilvA</i>
CM4 ²	GAAAATCTCGT CGAAGCTCG ^R	<i>primer-extension</i> , sekvenování promotorů v pET2

¹Místa pro štěpení restrikčními enzymy jsou vyznačena kurzívou, mutované báze tučně, ^F na konci sekvencí označuje primery ve směru transkripce příslušných genů a ^R primery proti směru transkripce příslušných genů.
²Primer CM4 je komplementární k vektoru pET2.

3.1.5. Použitý software

- DNASTar LaserGene 99 (<http://www.dnastar.com>): analýza a zpracování sekvencí, vzájemné srovnání nukleotidových nebo proteinových sekvencí
- BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>): vyhledání homologních nukleotidových nebo proteinových sekvencí
- Chromas 1.43 (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>): analýza sekvenačních chromatogramů
- Adobe Photoshop 7.0CE (<http://www.adobe.com>): grafické úpravy
- CorelDraw 9 (<http://www.corel.com>): grafické úpravy
- Plasmid Map Enhancer 3.1 (http://www.scied.com/ses_en4.htm): grafické úpravy
- MS Office 2003CZ (<http://office.microsoft.com>)

3.2. Metody

3.2.1. Kultivace *E. coli* a *C. glutamicum*

Materiál:

-Kanamycin - kanamycinsulfát (Sigma)

Buňky *E. coli* byly kultivovány při 37 °C na rotační třepačce v baňkách obsahujících půdu LB nebo na miskách s půdou LA. Buňky *C. glutamicum* byly kultivovány při 30 °C na rotační třepačce v baňkách obsahujících půdu 2xTY nebo na miskách s pevnou půdou 2xTY. Pro selekci kmenů nesoucích plazmidy s rezistencí vůči kanamycinu bylo v obou případech do kultivačního media přidáno antibiotikum o konečné koncentraci 20 µg/ml.

3.2.2. Identifikace klonů *E. coli* s rekombinantními plazmidy α -komplementací (Sambrook a Russel, 2001)

Materiál:

-X-Gal (Serva) (20 mg/ml v dimethylsulfoxidu)

-IPTG (Serva) (200 mg/ml)

Princip metody je založen na specifických vlastnostech klonovacího vektoru i použitého bakteriálního kmene. Vektor nese segment laktosového operonu *E. coli* obsahující

regulační sekvence a část genu *lacZ*, jehož expresí vzniká aminoterminální část β -galaktosidasy. Do kódující sekvence je začleněno mnohočetné klonovací místo, které nepřerušuje čtecí rámeček. Hostitelský kmen *E. coli* DH5 α naopak kóduje karboxyterminální fragment β -galaktosidasy, ani jeden z uvedených polypeptidů však není sám o sobě funkční. Aktivní enzym vzniká pouze v případě α -komplementace obou fragmentů a tato situace nastává, pokud je do buňky daného kmene přenesen vektor bez klonovaného insertu. Aktivní β -galaktosidasa je v tomto případě detekována na pevném agarovém mediu s chromogenním substrátem X-gal, jehož rozkladem vzniká produkt zbarvující bakteriální kolonie modře. Inzerce cizorodé DNA do klonovacího místa vektoru inaktivuje aminoterminální fragment enzymu a ke komplementaci nedochází. Kolonie buněk s rekombinantním plazmidem jsou potom bílé. Indukci exprese β -galaktosidasy zajišťuje přídavek IPTG do média. Tato látka je sterickým analogem přirozeného substrátu, avšak není enzymem rozkládána.

Na misku s půdou LA a příslušným antibiotikem bylo rovnoměrně rozetřeno 40 μ l X-Gal a 4 μ l IPTG. Po zaschnutí bylo na tuto misku vyseto 100 μ l buněčné suspenze *E. coli* po transformaci, následovala inkubace ve 37 °C. Druhý den byly na základě barevné odlišnosti identifikovány bílé kolonie s rekombinantními plazmidy. Kolonie obsahující religovaný vektor bez klonovaného fragmentu byly modré.

3.2.3. Izolace nukleových kyselin

3.2.3.1. Izolace plazmidové DNA z *E. coli*

Izolace plazmidové DNA byla založena na alkalické lyzi podle Birnboimovy metody (Birnboim, 1983).

Materiál:

-Pufř GET - 50mM glukosa, 10mM Na₂EDTA (Sigma), 25mM Tris-HCl (Sigma), pH 8

-Pufř TE - 1mM Na₂EDTA, 10mM Tris-HCl, pH 8

-1% SDS (Serva) v 0,2M NaOH (Lachema)

-3M octan draselný (Merck), pH 4,8 (upraveno k. octovou)

-Isopropanol

-5M LiCl (Sigma) v 50mM Tris-HCl, pH 7,5

-Ribonukleasa A (RNasa) (Serva)

Objemy do 2 ml byly stáčeny ve stolní mikrocetřize Hettich Mikro 20 (13 000x g), objemy větší v cetřize Sorvall RT6000B (5000 otáček/min.; 4 °C).

Buňky byly kultivovány přes noc v 50 ml půdy LB při 37 °C za stálého třepání.

Narostlá buněčná kultura byla stočena (10 min), supernatant odstraněn a sediment resuspendován v 5 ml ledového pufru GET. Po inkubaci v ledu (5 min) bylo přidáno 10 ml čerstvě připraveného 1% roztoku SDS v 0,2M NaOH a suspenze byla promíchána rychlým převrácením kyvety. Po 10-minutové inkubaci v ledu bylo přidáno 7,5 ml 3M octanu draselného, suspenze byla opatrně promíchána, inkubována v ledu (15 min) a centrifugována (20 min). Pokud byl supernatant po centrifugaci zakalen, byl přelit přes sterilní gázu do nové kyvety a znovu centrifugován. Ze supernatantu byla plazmidová DNA srážena přidáním 12 ml isopropanolu 10 min při laboratorní teplotě a sedimentována centrifugací (20 min při laboratorní teplotě). Supernatant byl pečlivě odstraněn a sediment rozpuštěn ve 2 ml sterilní vody. Přítomná RNA byla vysrážena přidáním 2 ml roztoku LiCl po dobu 15 min v ledu a odstraněna centrifugací (10 min). Supernatant byl přelit do nové kyvety a DNA byla vysrážena přidáním 10 ml 96% ethanolu po dobu 20 min při -20 °C. Následovala centrifugace (10 min). Supernatant byl odstraněn, vysušený pelet rozpuštěn ve 400 µl pufru TE obsahujícím RNasu (20 mg/ml) a inkubován 30 min při 37 °C. DNA byla přečištěna extrakcí fenolem a chloroformem (3.2.6.1.), srážena ethanolem (3.2.6.2.) a rozpuštěna v 50 µl sterilní vody.

V některých případech byl k izolaci plazmidové DNA využit kit Wizard Plus Midipreps DNA Purification System (Promega).

Miniizolace plazmidové DNA

Jedna až dvě kličky přes noc narostlé kultury byly převedeny z misky obsahující půdu LA do kyvety Eppendorf a resuspendovány ve 100 µl pufru GET na laboratorním mixeru Vortex. Po 5 min inkubace v ledu bylo přidáno 200 µl čerstvě připraveného 1% roztoku SDS v 0,2M NaOH. Obsah kyvety byl promíchán okamžitým převrácením a po 5 min inkubace v ledu bylo přidáno 150 µl ledového 3M octanu draselného. Obsah kyvety byl opatrně promíchán, inkubován v ledu dalších 15 min a centrifugován (5 min). Supernatant obsahující plazmidovou DNA byl přelit do nové kyvety a precipitován ethanolem (3.2.6.2.). Po vysušení sedimentu byla DNA rozpuštěna ve 20 µl roztoku RNasy (40 µg/ml) a inkubována 30 min při 37 °C.

V některých případech byl k izolaci plazmidové DNA využit kit Wizard Plus Minipreps DNA Purification System (Promega).

3.2.3.2. Izolace plazmidové DNA z *C. glutamicum*

Izolace byla založena na alkalické lyzi, které předcházela degradace buněčné stěny lysozymem.

Materiál:

-Pufr SET - 300mM sacharosa (Lachema), 10mM Na₂EDTA, 25mM Tris-HCl, pH 8

-Pufr TE - 1mM Na₂EDTA, 10mM Tris-HCl, pH 8

-Lysozym (Sigma) v pufru SET (3 mg/ml)

-1% SDS v 0,2M NaOH

-3M octan draselný, pH 4,8 (upraveno k. octovou)

-Isopropanol

-Ribonukleasa A (RNasa)

Všechny centrifugace byly provedeny ve stolní mikrocentrifuze Hettich Mikro 20 (13 000x g).

Přes noc narostlá buněčná kultura (2 ml) byla centrifugována (2 min). Po odstranění supernatantu byl pelet resuspendován ve 200 µl roztoku lysozymu v pufru SET a inkubován 2 h při 37 °C. Po inkubaci bylo přidáno 400 µl čerstvě připraveného 1% SDS v 0,2M NaOH, směs byla promíchána rychlým převrácením kyvety a inkubována 5 min v ledu. Poté bylo přidáno 300 µl 3M roztoku octanu draselného, obsah kyvety byl opatrně promíchán, ponechán 15 min v ledu a centrifugován (5 min). Supernatant obsahující plazmidovou DNA byl přelit do nové kyvety, DNA byla vysrážena přidáním 900 µl isopropanolu při laboratorní teplotě po dobu 15 min. Po centrifugaci (3 min) byl vysušený pelet rozpuštěn ve 100 µl pufru TE. V dalších krocích byla plazmidová DNA přečištěna extrakcí fenolem (3.2.6.1.), vysrážena ethanolem (3.2.6.2.), rozpuštěna ve 20 µl RNasy (40 µg/ml) a inkubována 30 min při 37 °C.

3.2.3.3. Izolace chromosomové DNA z *C. glutamicum*

Materiál:

-Pufr TES - 5mM Na₂EDTA, 50mM Tris-HCl, 100mM NaCl, pH 8

-Pufr SET - 300mM sacharosa, 10mM Na₂EDTA, 25mM Tris-HCl, pH 8

-Lysozym v pufru SET (10 mg/ml)

-20% SDS

-Ribonukleasa A (RNasa)

Všechny centrifugace byly provedeny ve stolní mikrocentrifuze Hettich Mikro 20 (13 000x g), objemy větší v centrifuze Sorvall RT6000B (5000 otáček/min.; 4 °C).

25 ml půdy 2xTY bylo zaočkováno čerstvě narostlou kulturou *C. glutamicum* na $OD_{600} = 0,1$. Kultivace probíhala v 30 °C do $OD_{600} = 0,5-0,8$, poté byly buňky zchlazeny v ledu (10 min) a centrifugovány (10 min). Po odstranění supernatantu byl pelet promyt 2 ml pufru TES, resuspendován ve 100 μ l roztoku lysozymu v pufru SET a inkubován 2 h při 37 °C. Po inkubaci bylo přidáno 10 μ l 20% SDS, směs byla důkladně promíchána a doplněna pufrům TES na celkový objem 400 μ l. Následovalo přečištění extrakcí fenolem (alespoň 2x) a chloroformem (3.2.6.1.). RNA byla ze vzorku odstraněna přidáním 4 μ l RNasy (10 mg/ml) a inkubací v 37 °C (30 min). Výsledná chromosomová DNA byla přesrážena ethanolem (3.2.6.2.) do 50 μ l sterilní vody.

3.2.4. Transformace

3.2.4.1. Transformace *E. coli* (Hanahan, 1983)

Materiál:

- Roztok RF1 - 100mM RbCl (Sigma), 80mM $MnCl_2 \times 4 H_2O$ (Lachema), 10mM $CaCl_2 \times 2 H_2O$ (Lachema), 30mM octan draselný (Sigma), 15% (v/v) glycerol (Lachema), pH 6,8 (upraveno 0,2N k. octovou), sterilizováno filtrací
- Roztok RF2 - 10mM MOPS (Biomol), 10mM RbCl, 70mM $CaCl_2 \times 2 H_2O$, 15% (v/v) glycerol, pH 6,8 (upraveno 0,2N NaOH), sterilizováno filtrací

Při izolaci byla použita centrifuga Sorvall RT6000B (5000 otáček/min.; 4 °C).

Příprava kompetentních buněk

50 ml půdy SOB bylo zaočkováno 1-2 koloniemi bakteriální kultury *E. coli*. Buňky byly kultivovány za stálého třepání při 37 °C. Po dosažení $OD_{600} = 0,2$ byla buněčná kultura zchlazena v ledu (15 min) a centrifugována (10 min). Supernatant byl odstraněn, buněčný pelet resuspendován v 17 ml ledového pufru RF1, ponechán 15 min v ledu a znovu centrifugován (10 min). Supernatant byl odstraněn, sedimentované buňky resuspendovány ve 4 ml ledového pufru RF2 a ponechány 15 min v ledu. Takto připravené kompetentní buňky byly rozplněny do předchlazených kyvet Eppendorf po 200 μ l a buď přímo použity pro transformaci nebo uchovány při -70 °C pro pozdější použití. Celá příprava kompetentních buněk probíhala při 0 - 4 °C.

Transformace kompetentních buněk plazmidovou DNA

K 200 μ l kompetentních buněk byl přidán 1 μ l plazmidové DNA nebo 10 μ l ligační směsi (0,1-1 μ g DNA) a suspenze byla 30 min inkubována v ledu. Poté byla vystavena teplotnímu šoku (90 s, 42 °C) a opět zchlazena v ledu. K transformační směsi bylo přidáno

800 μ l půdy SOC, suspenze byla přenesena do zkumavek a kultivována za třepání 45 min při 37 °C. 100 μ l této buněčné suspenze bylo vyseto na misky obsahující půdu LA s příslušným antibiotikem.

3.2.4.2. Transformace *C. glutamicum* elektroporací (Liebl *et al.*, 1989)

Materiál:

-Pufř GT - 8mM Tris-HCl, 10% glycerol (v/v), pH 8

-Roztok G -10% glycerol

Při izolaci byla použita centrifuga Sorvall RT6000B (5000 otáček/min.; 4 °C) a stolní mikrocentrifuga Hettich EBA 12 R (20 000x g; 4 °C).

Příprava kompetentních buněk

125 ml tekuté půdy 2xTY bylo zaočkováno 1 ml buněčné kultury *C. glutamicum* smyté z čerstvě narostlé agarové půdy. OD₆₀₀ na počátku kultivace bylo 0,1. Buňky byly inkubovány při 30 °C za stálého třepání do OD₆₀₀ = 0,5 - 0,7. Poté byla kultura zchlazena 15 min v ledu a centrifugována (10 min). Supernatant byl odstraněn a pelet resuspendován ve 25 ml ledového pufřu GT. Následovala opět centrifugace (10 min). Toto promývání v pufřu GT bylo provedeno ještě 2x. Supernatant byl pečlivě odstraněn, buňky resuspendovány v 1 ml ledového roztoku G, suspenze převedena do kyvet Eppendorf a centrifugována (1 min). Promytí v roztoku G bylo opakováno. Po odstranění supernatantu byly buňky opět resuspendovány v 1 ml ledového roztoku G a rozplněny po 200 μ l. Takto připravené kompetentní buňky byly použity pro transformaci elektroporací nebo uloženy v -70 °C.

Elektroporace

Na elektroporačním přístroji (Gene-Pulser, Bio-Rad) byly nastaveny tyto parametry: napětí 2,5 kV, kapacitance 25 μ F, odpor 200 Ω . K připraveným kompetentním buňkám bylo přidáno 1-2 μ l plazmidové DNA (0,5-1 μ g), obsah kyvety byl promíchán převrácením a kyveta ponechána 1 min v ledu. Suspenze byla převedena do předchlazené elektroporační kyvety (šířka 0,2 cm) a vystavena elektrickému pulzu trvajícím 3-5 ms. Poté byl ihned přidán 1 ml půdy 2xTY a obsah kyvety byl přelit do zkumavky. Transformované buňky byly kultivovány za stálého třepání 1,5-2 h při 30 °C, převedeny do kyvet Eppendorf a centrifugovány (2 min). Supernatant byl odstraněn, sediment resuspendován v 300 μ l media 2xTY. 100 μ l této suspenze bylo vyseto na pevné půdy 2xTY obsahující příslušné selekční antibiotikum.

Během celého postupu přípravy kompetentních buněk i vlastní elektroporace byly buňky uchovávány při 0 - 4 °C.

3.2.4.3. Vysoce účinná elektrotransformace *C. glutamicum*

(van der Rest *et al.*, 1999)

Tato metoda elektroporace byla využívána pro integraci požadovaných úseků DNA do chromosomu *C. glutamicum*.

Materiál:

-Roztok G -10% glycerol

Při izolaci byla použita centrifuga Sorvall RT6000B (4000 otáček/min.; 4 °C) a stolní mikrocetrifuga Hettich EBA 12 R (20 000x g; 4 °C).

Příprava kompetentních buněk

2x 50 ml tekuté půdy Epo bylo zaočkováno čerstvě narostlou kulturou *C. glutamicum* na počáteční $OD_{600} = 0,3$. Buňky byly inkubovány 28 h při 18 °C za stálého třepání 200 otáček/minutu. OD_{600} na konci kultivace dosáhla přibližně hodnoty 1. Po 28 h byla kultura ochlazená v ledu (15 min) a centrifugována (10 min). Supernatant byl odstraněn a pelet resuspendován ve 25 ml ledového roztoku G. Následovala opět centrifugace (10 min). Promývání v roztoku G bylo provedeno ještě 3x. Po čtvrtém promytí byl supernatant pečlivě odstraněn, buňky resuspendovány v 1 ml ledového roztoku G, převedeny do kyvet Eppendorf a stočeny (1 min). Promytí v roztoku G bylo provedeno ještě 1x. Po odstranění supernatantu byly buňky resuspendovány v 750 μ l ledového roztoku G a rozplněny po 150 μ l. Takto připravené kompetentní buňky byly použity pro transformaci elektroporací nebo uloženy v -70 °C.

Elektroporace

Na elektroporačním přístroji (Gene-Pulser, Bio-Rad) byly nastaveny tyto parametry: napětí 2,5 kV, kapacitance 25 μ F, odpor 600 Ω . K připraveným kompetentním buňkám bylo přidáno 5-10 μ l plazmidové DNA (až 10 μ g), obsah kyvety byl promíchán převrácením a kyveta ponechána 1 min v ledu. Suspenze byla převedena do předchlazené elektroporační kyvety (šířka 0,2 cm) a vystavena elektrickému pulzu trvajícím 10-12 ms. Poté byl přidán 1 ml půdy BHI a buňky ihned vystaveny tepelnému šoku 46 °C po dobu 6 min. Transformované buňky byly kultivovány za stálého třepání 2 h při 30 °C, zahuštěny centrifugací a celý obsah transformační směsi vyset na selektivní pevnou půdu LBHIS obsahující příslušné antibiotikum.

Během celého postupu přípravy kompetentních buněk i vlastní elektroporace byly buňky uchovávány při 0 - 4 °C.

3.2.5. Elektroforetická analýza DNA v agarosovém gelu

(Sambrook a Russel, 2001)

Materiál:

-Pufř TAE - 40mM Tris-acetát (Sigma), 1mM EDTA, pH 8 (upraveno k octovou)

Pro přípravu elektroforetického pufřu a agarosového gelu 50x zředěno.

-Agarosa (Lachema)

-indikační směs - 30% glycerol, 0,25% bromfenolová modř (Serva)

-0,005% ethidiumbromid (Serva) v H₂O

Elektroforetická separace plazmidové a chromosomové DNA nebo jejích fragmentů byla prováděna v horizontálním agarosovém gelu v pufřu TAE. Koncentrace agarosy (0,6 - 1,5%) byla volena podle velikosti analyzované DNA. Před nanesením do jamek v gelu byla ke vzorku DNA přidána sterilní voda (obvykle do 10 µl) a 2 µl indikační směsi. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 50-70 V po dobu 1-3 h. Poté byl gel přenesen do vodného roztoku ethidiumbromidu a DNA byla barvena 5-20 min (podle hustoty a tloušťky gelu a podle koncentrace DNA). Po obarvení byla DNA vizualizována UV zářením a elektroforetogram zdokumentován pomocí digitální kamery KODAK DC290 Zoom a počítačového programu KODAK 1D *Image Analysis Software*.

3.2.6. Manipulace s DNA

Následující postupy jsou založeny převážně na metodách popsanych v laboratorním manuálu *Molecular Cloning* (Sambrook a Russel, 2001).

3.2.6.1. Extrakce fenolem

Materiál:

-Fenol pH 8 – fenol (Sigma) upravený 0,1M Tris-HCl, pH 8

-Fenol (pH 8)/chloroform/isoamylalkohol (25:24:1)

-chloroform/isoamylalkohol (24:1)

Vzorky byly stáčeny na stolní mikrocentrifuze Hettich Mikro 20 (13 000x g; 2 min).

K roztoku DNA byl přidán stejný objem směsi fenol/chloroform/isoamylalkohol. Po důkladném protřepání a centrifugaci byla do nové Eppendorfovy kyvety odebrána horní

vodná fáze obsahující DNA. Tato extrakce fenolem byla opakována ještě jednou. Následovalo odstranění zbytků fenolu ze vzorku extrakcí do stejného objemu chloroformu (směs chloroform/isoamylalkohol) a po roztřepání a centrifugaci byla do nové kyvety opět odebrána horní vodná fáze s rozpuštěnou DNA. Tato DNA byla přečištěna srážením ethanolem (3.2.6.2).

3.2.6.2. Srážení DNA ethanolem

Materiál:

-96% ethanol

-70% ethanol

-3M octan draselný

Vzorky byly stáčeny na stolní mikrocentrifuze Hettich Mikro 20 (13 000x g; 5 min).

DNA byla srážena z roztoku přidavkem 3M octanu draselného (1/10 objemu) a 96% ethanolu (dvojnásobek objemu) při -20 °C po dobu 20 min. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a pelet vysrážené DNA byl promyt přidavkem 200 µl 70% ethanolu. Suspenze byla opět centrifugována, supernatant znovu odstraněn, pelet pečlivě vysušen za sníženého tlaku a rozpuštěn podle potřeby ve sterilní vodě nebo vhodném pufru.

3.2.6.3. Izolace plazmidové DNA a jejích fragmentů z gelu

Materiál:

- Kolonky *GenElute* pro purifikaci DNA (Supelco)

DNA byla izolována z agarosového gelu s použitím kolonek *GenElute* postupem doporučeným výrobcem. Během postupu byla využita stolní mikrocentrifuga Hettich Mikro 20. Po elektroforetické separaci byl pás v agarosovém gelu obsahující požadovaný fragment DNA vyříznut, agarosový bloček rozkrájen na malé kousky a vložen do kolonky *GenElute* (pH 8). Kolonka byla volně nasazena na kyvetu Eppendorf, zbavenou víčka. Následovala centrifugace (12 000x g, 10 min). Vodný roztok přítomný po centrifugaci v kyvetě obsahoval izolovanou DNA, která byla v dalším kroku zahuštěna srážením ethanolem (3.2.6.2.).

3.2.6.4. Štěpení DNA restrikčními endonukleasami

Restrikční endonukleasy použité v této práci:

- *NheI* (Amersham)

- *Bam*HI, *Bgl*III, *Hinc*II, *Sca*I, *Sma*I, *Ssp*I (BioLabs)
- *Nsi*I (GIBCO BRL)
- *Eco*RI, *Pst*I (MBI Fermentas)

Plazmidová DNA byla štěpena restričními endo-deoxyribonukleasami v objemu 10 -100 μ l v pufru dodávaném výrobcem a za podmínek jím doporučených. Doba štěpení závisela na účinnosti enzymu, na jeho stabilitě a na počtu a poloze zásahových míst pro daný enzym na molekule DNA. Plazmidová DNA byla štěpena obvykle po dobu 1 h. Pokud se restriční místa nacházela na koncích lineárního fragmentu DNA (například produkty PCR získané s použitím vhodných primerů), doba štěpení byla prodloužena, protože účinnost některých restričních enzymů v těchto případech výrazně klesá. Kontrola štěpení byla provedena elektroforézou v agarosovém gelu (0,7 - 1,5 %) (3.2.5.).

3.2.6.5. Zatupení konců restričních fragmentů Klenowovým fragmentem DNA-polymerasy I

Materiál:

- Klenowův fragment DNA-polymerasy I (MBI Fermentas) + reakční pufr dodaný výrobcem
- 2mM dNTP (Boehringer Mannheim)

Zatupení 5' - přečnávajících kohezních konců

DNA štěpená příslušným restričním enzymem byla přečištěna extrakcí fenolem (3.2.6.1.) a rozpuštěna v 19 μ l sterilní vody. Ke vzorku bylo přidáno 2,5 μ l 10x koncentrovaného pufru, 0,4 μ l Klenowova fragmentu DNA-polymerasy I (10 U/ μ l) a 2,5 μ l 2mM dNTP. Po 15-minutové inkubaci při 37 °C bylo přidáno 0,4 μ l Klenowova fragmentu DNA-polymerasy I a reakční směs byla inkubována dalších 15 min při 37 °C. Následovala inaktivace enzymu 15 min při 65 °C a přečištění DNA extrakcí fenolem.

3.2.6.6. Defosforylace vektoru alkalickou fosfatasou

Materiál:

- alkalická fosfatasa (SAP, USB) + reakční pufr dodaný výrobcem

Roztok vektoru štěpeného příslušnými restričními enzymy byl přečištěn srážením ethanolom (3.2.6.2.) a DNA byla rozpuštěna v 44 μ l vody. K roztoku DNA bylo přidáno 5 μ l 10x koncentrovaného defosforylačního pufru a příslušné množství SAP podle doporučení výrobce (množství enzymu se individuálně řídí množstvím a velikostí vektoru a typem konců vzniklých po štěpení restričními enzymy). Reakční směs byla inkubována 1 h při 37

°C. Následovala inaktivace enzymu 15 min při 65 °C a přečištění DNA srážením ethanolem.

3.2.6.7. Ligace fragmentů plazmidové DNA

Materiál:

-T4-DNA ligasa (MBI Fermentas) + reakční pufr dodaný výrobcem

Pro ligační reakci v celkovém objemu 20 µl bylo použito obvykle 100-200 ng vektoru. Množství fragmentu DNA vkládaného do příslušného vektoru bylo stanoveno podle vzorce:

$$m_I = (m_V \cdot L_I / L_V) \cdot MR$$

m_I = množství insertu (ng)

m_V = množství vektoru (ng)

L_I = velikost insertu (kb)

L_V = velikost vektoru (kb)

MR = zvolený molární poměr insert/vektor (většinou 3 : 1)

Ke směsi fragmentu klonované DNA a vektoru byly přidány 2 µl 10x koncentrovaného ligačního pufru a 1 µl T4-DNA ligasy. Poté byla směs doplněna sterilní vodou do 20 µl, inkubována 14 h při 15 °C a použita pro transformaci kompetentních buněk *E. coli* (3.2.4.1.).

3.2.7. Polymerasová řetězová reakce (PCR) (Mullis *et al.*, 1994)

Materiál:

-Taq polymerasa (Top-Bio) + reakční pufr dodaný výrobcem (obsahující 1,5mM MgCl₂)

-dNTP 20mM (Top-Bio)

Metoda PCR (*polymerase chain reaction*) byla používána pro amplifikaci specifických úseků DNA, pro potvrzení přítomnosti těchto úseků vložených do molekul vektorů a též pro ověření přítomnosti zaváděných delecí v chromosomu *C. glutamicum*. PCR reakce proběhly obvykle podle následujících schémat v termocykleru Techne-PROGENE.

Složení reakční směsi

Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce 3.4. Celkový objem směsi byl 50 nebo 100 µl. Po přidání všech komponent byla reakční směs převrstvena dvěma kapkami minerálního oleje (Sigma), který zabránil odpařování vzorku.

Program PCR reakce

Program PCR je uveden v tabulce 3.5.

Tab. 3.4. Složení reakční směsi pro PCR

Komponenta	Objem/množství/konečná koncentrace ve 100 μ l
Templátová DNA ¹	5 - 10 ng
10x reakční pufr	10 μ l
glycerol	5 μ l
Primer 1	1 μ M
Primer 2	1 μ M
dNTP (20mM)	200 μ M
MgCl ₂	1,5mM
Taq polymerasa	2,5 U
Sterilní voda	Doplnit do 100 μ l

¹Jako templát byla použita plazmidová nebo chromosomová DNA. Při potvrzení přítomnosti klonovaného fragmentu nebo delece byla v některých případech jako templát použita nepurifikovaná totální buněčná DNA (buněčný lyzát ze získaných transformantů).

Tab. 3.5. Program PCR reakce

Cyklus	Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
1	Denaturace	94 °C	2 min	1
2	Denaturace	94 °C	30 s	20-25
	Hybridizace ¹	T _m -5 °C	30 s	
	Syntéza ²	72 °C	40s-1,5min	
3	Závěrečná syntéza	72 °C	10 min	1

¹V této fázi hybridizují oligonukleotidové primery s řetězcem templátové DNA na principu komplementarity. Hybridizační teplota byla zvolena na základě teploty tání jednotlivých primerů (T_m), která byla vypočítána podle vzorce: T_m [°C] = 2 (A + T) + 4 (G + C). Pokud se T_m příslušných primerů lišily, byla vždy použita nižší z obou vypočtených hodnot.

²Pro syntézu nového řetězce DNA byla použita teplota 72 °C, což je optimální teplota pro aktivitu termostabilní Taq polymerasy. Délka fáze syntézy závisí na velikosti syntetizovaných fragmentů (syntéza 1 kb DNA = 1 min).

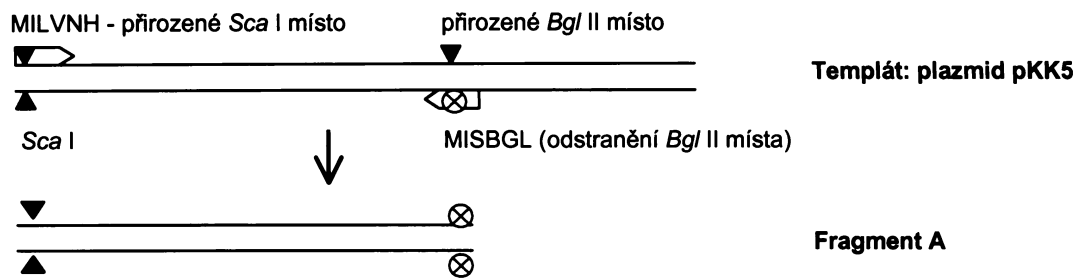
3.2.8. Místně specifická mutagenese (cílená mutagenese)

Postup místně specifické mutagenese využívající dvou následných PCR reakcí a mutačního primeru byl založen na metodě popsané v práci Ito *et al.*, 1991 (Obr. 3.3.). Cílem bylo připravit směs PCR fragmentů nesoucích až čtyři různé požadované mutace.

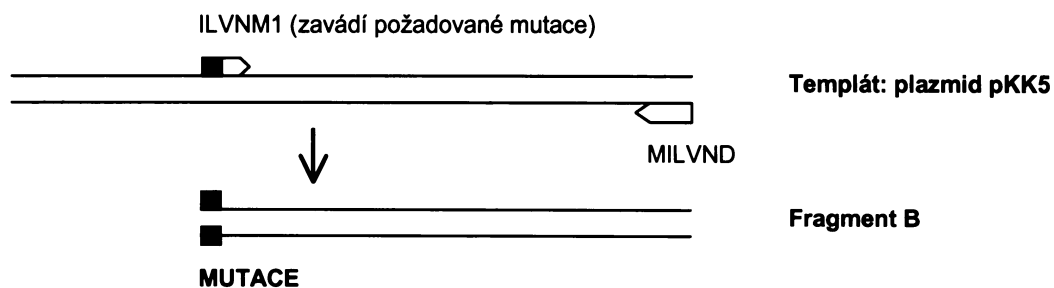
První PCR reakce byla provedena se dvěma paralelními kombinacemi primerů. Kombinace primerů MILVNH a MISBGL dala vznik fragmentu A o velikosti 786 bp. Primer MILVNH obsahoval přirozené zásahové místo pro restriční enzym *ScaI*, pomocí primeru MISBGL bylo mutováno (a tím inaktivováno) přirozené zásahové místo pro restriční enzym *BglII*. Paralelní kombinací primerů ILVNM1 a MILVND vznikl fragment B (směs fragmentů B) o velikosti 491 bp obsahujících požadované mutace zavedené pomocí degenerovaného primeru ILVNM1.



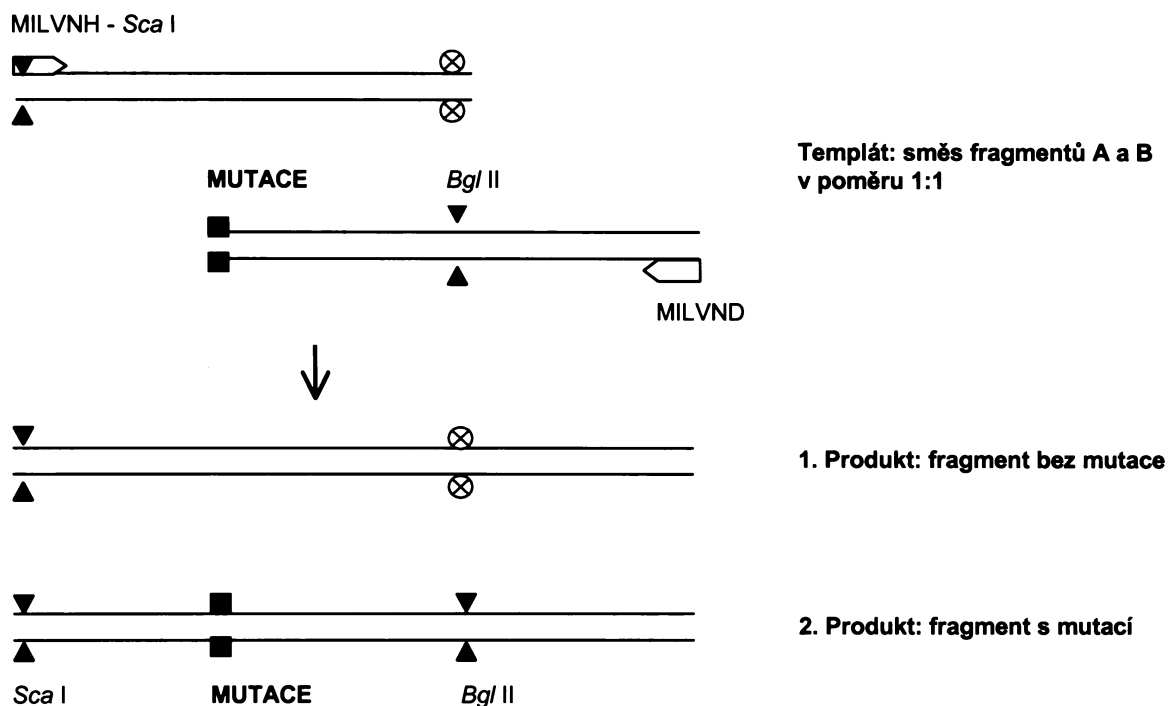
1) Syntéza fragmentu A ohraničeného primery MILVNH a MISBGL



2) Syntéza fragmentu B ohraničeného primery ILVNM1 a MILVND



3) Syntéza fragmentu C ohraničeného primery MILVNH a MILVND



Obr. 3.3. Schéma postupu místně specifické mutagenese

Restrikční místa jsou značena plným trojúhelníkem, zrušení restrikčního místa křížkem, zaváděné mutace plným červeným čtvercem a použité primery prázdnou šipkou. Po restrikci enzymy *Sca*I a *Bgl*II byl štěpen pouze fragment obsahující požadovanou mutaci.

Druhá PCR reakce byla provedena pomocí primerů MILVNH a MILVND. Jako templát byla použita směs přečištěných fragmentů A a B pocházejících z první PCR reakce v molárním poměru 1:1. Program reakce je znázorněn v tabulce 3.6.

Tab. 3.6. Program druhé PCR reakce pro syntézu cílového fragmentu nesoucího mutaci

Cyklus	Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
1	Denaturace	94 °C	2 min	1
2	Denaturace	94 °C	30 s	3
	Syntéza ¹	72 °C	1 min	
3	Denaturace	94 °C	30 s	20-25
	Hybridizace	50 °C	30 s	
	Syntéza	72 °C	1 min	
4	Závěrečná syntéza	72 °C	10 min	1

¹Během této fáze došlo ke spojení komplementárních částí denaturovaných vláken obou templátových fragmentů a k syntéze chybějících úseků.

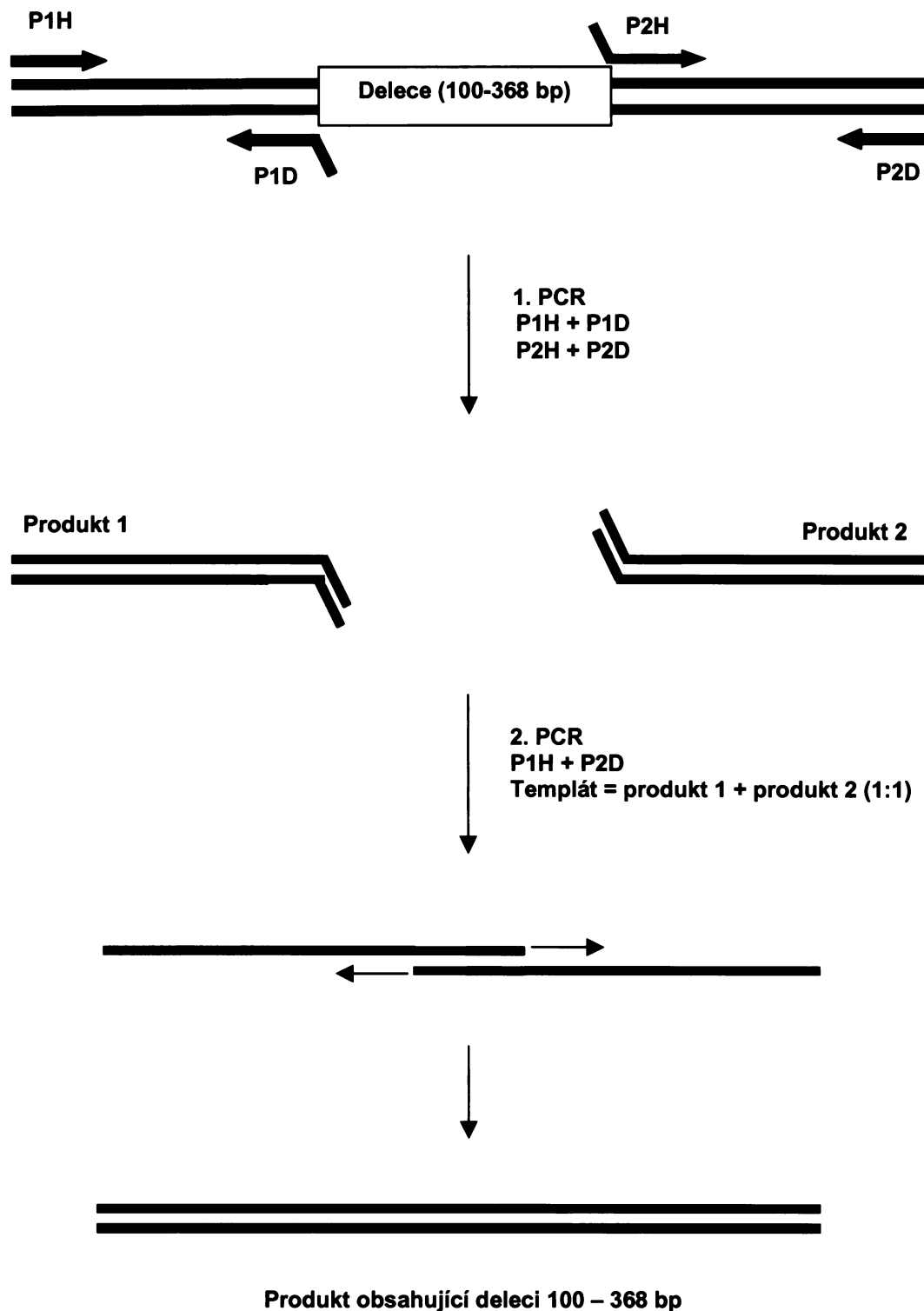
Výsledkem druhé PCR reakce byl fragment C (dva typy fragmentu C) o délce 803 bp (Obr. 3.3.). Oba typy výsledného fragmentu C byly sekvenčně téměř identické. První typ bez požadovaných mutací však ztratil zásahové místo pro restriční enzym *Bgl*II vlivem mutace nesené primerem MISBGL. Druhý typ se zachovaným zásahovým místem pro restriční enzym *Bgl*II byl tvořen směsí fragmentů nesoucích čtyři různé požadované mutace vnesené degenerovaným primerem ILVNM1. Tato směs mutovaných fragmentů byla štěpena restričními enzymy *Sca*I a *Bgl*II a použita pro výměnu za identický původní fragment uvnitř operonu *ilvBNC* (popsáno ve výsledkové části práce). Přítomnost jednotlivých mutací byla ověřena sekvenováním (sekvenační kit Applied Biosystems; automatický DNA sekvenátor ABI PRISM 3100).

3.2.9. Zavádění mutací a delecí do chromosomu *C. glutamicum*

3.2.9.1. Syntéza fragmentu nesoucího delecí (mutaci)

Fragmenty nesoucí mutace nebo delece byly syntetizovány pomocí metody využívající PCR (Horton *et al.*, 1995). Schéma syntézy fragmentu nesoucího delecí je znázorněno na obrázku 3.4. Základem postupu jsou opět dvě následné PCR reakce. Během první PCR reakce vznikají dva produkty. Primery P1D a P2H jsou navrženy tak, aby obsahovaly přesahy o délce 10 bp komplementární se sekvencemi, které budou ohraničovat budoucí delecí. Použitím primerů P1H a P1D vzniká produkt 1 s přesahem na 3' konci a kombinací primerů P2H a P2D vzniká produkt 2 s přesahem na 5' konci molekuly. Oba

produkty tak sdílejí překrývající se oblast v délce 20 bp.



Obr. 3.4. Schéma syntézy fragmentu nesoucího delecí

Červeně a modře jsou značeny komplementární oblasti navržených primerů s templátovou DNA. Výsledkem první PCR reakce jsou produkty 1 a 2, které sdílejí překrývající se komplementární oblast v délce 20 bp (červenomodrý úsek). Na základě tohoto překryvu je během druhé PCR reakce syntetizován výsledný fragment s delecí. Postup je detailně popsán v textu na předchozí a následující straně.

Produkty 1 a 2 jsou použity pro druhou PCR reakci jako templátová DNA v poměru 1:1. PCR reakce je provedena s použitím primerů P1H a P2D a její program je znázorněn v tabulce 3.7. Na základě již zmíněné komplementární oblasti o velikosti 20 bp dochází k překryvu obou fragmentů a následné syntéze výsledného fragmentu s delecí.

Tab. 3.7. Program druhé PCR reakce pro syntézu cílového fragmentu nesoucího delecí

Cyklus	Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
1	Denaturace	94 °C	2 min	1
2	Denaturace	94 °C	30 s	3
	Hybridizace ¹	$T_m - 5$ °C	60 s	
	Syntéza ²	72 °C	1,5 min	
3 ³	Denaturace	94 °C	30 s	20
	Hybridizace	$T_m - 5$ °C	30 s	
	Syntéza	72 °C	1,5 min	
4	Závěrečná syntéza	72 °C	10 min	1

¹Během hybridizační fáze došlo k překryvu obou templátových fragmentů na základě komplementární oblasti o velikosti 20 bp. Hybridizační teplota byla zvolena jako teplota tání překrývající se oblasti (T_m), která byla vypočítána podle vzorce: T_m [°C] = 2 (A + T) + 4 (G + C).

²V této fázi proběhla syntéza chybějících úseků obou překrývajících se vláken.

³Třetí cyklus reakce již odpovídá standardnímu programu popsanému v tabulce 3.5.

Pro zavedení mutace do chromosomu byl použit shodný postup s několika obměnami v první PCR reakci. Výsledný fragment s mutací má zachovány původní délku, proto se primery P1D a P2H nacházejí na identickém místě chromosomu (v místě budoucí mutace), jsou navzájem plně komplementární, nenesou žádné přesahy, ale obsahují požadovanou mutaci, kterou během první PCR reakce zavádějí do produktů 1 a 2.

3.2.9.2. Zavedení delecí (mutací) do chromosomu

Mutace a delece byly zavedeny do chromosomu *C. glutamicum* pomocí fragmentů syntetizovaných PCR reakcí a klonovaných v integrativním vektoru pK18mobsacB (Schäfer *et al.*, 1994). Tento vektor se v buňkách *C. glutamicum* nereplikuje, přežívá pouze díky integraci do chromosomu hostitele. K integraci dochází na základě homologní rekombinace mezi klonovaným fragmentem s požadovanou delecí (mutací) a odpovídající homologní oblastí v chromosomu *C. glutamicum*. Aby byla integrace do chromosomu dostatečně účinná, byla velikost klonovaného fragmentu alespoň 1200 bp (600 bp před delecí a 600 bp za delecí). Výslední integranti získávají rezistenci ke kanamycinu, která je determinována vektorem pK18mobsacB.

Selekce požadovaných delečních mutantů je následně provedena na základě podmíněného letálního efektu genu *sacB* v *C. glutamicum*. V přítomnosti 10 % sacharosy

rostou pouze klony, ve kterých došlo ke druhé homologní rekombinaci a tím ke ztrátě celé vektorové sekvence (tedy i genu *sacB*). Nalezení výsledných klonů bylo usnadněno také selekcí na základě fenotypového projevu. Delece způsobily ve většině případů auxotrofii, zavedení mutace do auxotrofního kmene naopak obnovení prototrofního fenotypu. Ve všech případech byly provedené zásahy do chromosomu potvrzeny PCR reakcí a sekvenováním.

3.2.10. Měření promotorové aktivity

3.2.10.1. Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) chloramfenikolu

Materiál:

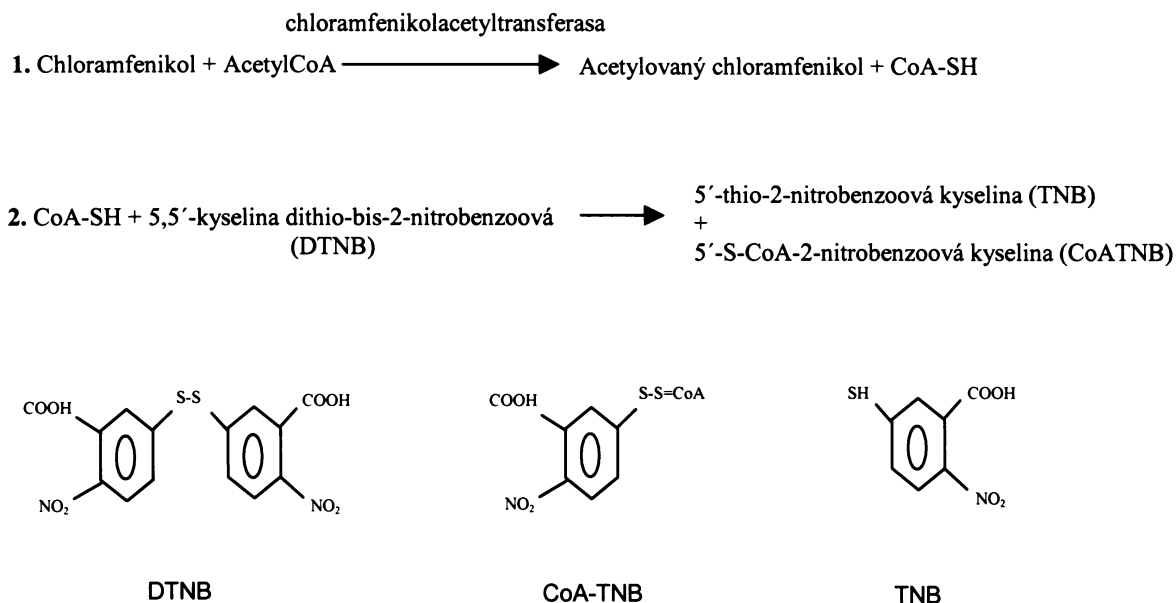
-Chloramfenikol (Sigma)

Při orientačním měření aktivity promotorů byla stanovena minimální inhibiční koncentrace (MIC) chloramfenikolu kmenů obsahujících *promoter-probe* vektor pET2 s reportérovým bezpromotorovým genem *cat*, kódujícím chloramfenikolacetyltransferasu, enzym inaktivující chloramfenikol acetylací. Do tohoto vektoru byly před gen *cat* klonovány studované promotory. Metoda je založena na skutečnosti, že míra rezistence buněk vůči chloramfenikolu je přibližně úměrná úrovni exprese genu *cat* a tedy i transkripční aktivitě studovaného promotoru.

Pro stanovení MIC chloramfenikolu byly buňky *C. glutamicum* kultivovány v 1 ml selekční půdy 2xTY přes noc za stálého třepání. Suspenze narostlých buněk byla po 10 μ l nakapána na sadu misek s příslušnou půdou a postupně se zvyšující koncentrací chloramfenikolu (0-100 μ g/ml). Po 48 h byla stanovena MIC jako nejnižší koncentrace chloramfenikolu, při které byl již zřetelně inhibován růst testované kultury.

3.2.10.2. Stanovení specifické aktivity chloramfenikolacetyltransferasy (CAT)

Enzymová aktivita chloramfenikolacetyltransferasy (CAT) byla stanovena kolorimetricky s použitím spektrofotometru *BioMate 5, ThermoSpectronic*. Princip metody (Shaw, 1975) je založen na přenosu acetylové skupiny z acetylkoenzymu A na chloramfenikol (Obr. 3.5.). Vzniklý koenzym A reaguje s kyselinou 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoovou (DTNB) za vzniku disulfidu koenzymu A a kyseliny thionitrobenzoové a ekvivalentního molárního množství volné kyseliny 5-thio-2-nitrobenzoové (TNB), která je žlutě zbarvena. Množství vznikající TNB bylo měřeno spektrofotometricky při vlnové délce 412 nm.



Obr. 3.5. Princip stanovení enzymatické aktivity chloramfenikolacetyltransferasy

Konečným produktem reakce je TNB sytě žluté barvy, jejíž intenzita je měřena spektrofotometricky při $\lambda=412$.

Materiál:

-Pufř KPP - 9 dílů 0,5M K_2HPO_4 (Lachema), 1 díl 0,5M KH_2PO_4 (Lachema), pH 7,8

-Pufř RM (10 ml) - 4 mg DTNB (Serva) v 1 ml 1M Tris-HCl (pH 7,8) + 200 μ l 5mM acetyl-koenzym A (Sigma), doplnit vodou do 10 ml

-5mM chloramfenikol

-Roztok Protein 1 - 4,5 g vinan sodno-draselný (Lachema), 1,5 g $CuSO_4 \times 5 H_2O$ (Lachema), 2,5 g KI (Lachema), doplnit do 500 ml 0,2N NaOH

-Hovězí sérový albumin (BSA) (Sigma)

Objemy do 2 ml byly stáčeny ve stolní mikrocentrifuze Hettich EBA 12 R (20 000x g; 4 °C), objemy větší v centrifuze Sorvall RT6000B (5000 otáček/min.; 4 °C).

Příprava bezbuněčného extraktu

25 ml půdy 2xTY bylo zaočkováno čerstvou buněčnou kulturou. Následovala kultivace za stálého třepání do $OD_{600} = 2 - 4$. Narostlá buněčná kultura byla zchlazena v ledu (10 min) a centrifugována (5000 otáček/min., 10 min, 4 °C). Buněčný pelet byl promyt 25 ml ledového pufru KPP a resuspendován v 500 μ l pufru KPP. Buňky byly rozbity ultrazvukem (sonikátor Ikasonic U50; IKA Labortechnik) v ledové lázni po dobu 20 min s impulsem délky 0,5 s opakujícím se každou sekundu a s nastavenou účinností 100 %. Po sonikaci následovala centrifugace (20 000x g, 20 min, 4 °C), supernatant (bezbuněčný

extrakt) byl odebrán a uchován při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Měření specifické aktivity CAT

Měření specifické aktivity CAT probíhalo při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a vlnové délce 412 nm . Do kyvety bylo přidáno $970\text{ }\mu\text{l}$ pufru RM a $10\text{-}50\text{ }\mu\text{l}$ bezbuněčného extraktu. Po dobu 1 min byla potom zaznamenána změna absorbance extraktu bez substrátu. Poté bylo přidáno $50\text{ }\mu\text{l}$ 5mM cloramfenikolu (substrát), obsah byl promíchán a měřena změna absorbance po dobu 1 min . Bezbuněčný extrakt byl zředěn tak, aby se změna absorbance v čase pohybovala v rozmezí $0,05\text{-}0,1/\text{min}$. Každý vzorek byl měřen alespoň 3x .

Měření celkové koncentrace proteinů

Obsah bílkovin v bezbuněčném extraktu byl stanoven biuretovou metodou. K $5\text{-}100\text{ }\mu\text{l}$ bezbuněčného extraktu byla přidána voda do celkového objemu $100\text{ }\mu\text{l}$ a $900\text{ }\mu\text{l}$ roztoku Proteinu 1. Obsah byl promíchán a inkubován ve tmě při pokojové teplotě po dobu 30 min . Poté byla měřena absorbance vzorku při vlnové délce 580 nm . Stejným postupem s použitím řady vodných roztoků BSA o různé koncentraci ($0\text{-}1\text{ mg/ml}$) byla získána kalibrační křivka. Výsledná celková koncentrace proteinů ve vzorku byla stanovena odečtením z grafu kalibrační křivky.

Výpočet specifické aktivity CAT

Specifická aktivita CAT byla vypočtena podle následujícího vzorce:

$$SA = (\Delta E \cdot V_c) / (\varepsilon \cdot V_E \cdot c)$$

SA specifická aktivita [U/mg proteinu]; ($U = \mu\text{mol/min}$)

ΔE změna absorbance za 1 min [$1/\text{min}$]

V_c celkový objem reakční směsi [ml]

ε extinkční koeficient [$\text{ml}/\mu\text{M}$]

V_E objem bezbuněčného extraktu [ml]

c koncentrace proteinů [mg/ml]

U získaných hodnot specifické aktivity CAT byla stanovena přesnost těchto hodnot vypočítáním směrodatné odchylky.

3.2.11. Stanovení specifické aktivity synthasy acetoxykyseliny (AHAS)

Metoda je založena na spektrofotometrickém stanovení acetolaktátu, který je produktem reakce katalyzované synthasou acetoxykyseliny (AHAS) (Singh *et al.*, 1988; Pospíšil *et al.*, 1998; Westerfeld, 1945). Substrátem této reakce jsou dvě molekuly pyruvátu. Vzniklý acetolaktát je detekován nepřímo po dekarboxylaci na acetoin v kyselém prostředí.

Acetoin je následně stanoven kolorimetricky. Po vytvoření komplexu s kreatinem a α -naftolem dochází v závislosti na množství přítomného acetoinu k různě intenzivnímu růžovému zbarvení vzorku.

Materiál:

-2% KCl

-0,1M pufr KPP - 9 dílů 0,1M K_2HPO_4 , 1 díl 0,1M KH_2PO_4 , pH 7,3

-Sonikační pufr - 0,1M KPP (pH 7,3), 0,5mM dTT (Sigma), 20% glycerol

-125mM pufr KPP - 9 dílů 125mM K_2HPO_4 , 1 díl 125mM KH_2PO_4 , pH 7,3

-333mM $MgCl_2$

-10mM flavinadenindinukleotid (FAD) (sodná sůl) (Sigma)

-10mM thiamin pyrofosfát (TPP) (Sigma)

-1M Pyruvát (Sigma)

-50% H_2SO_4 (Lachema)

-500mM Valin

-500mM Leucin

-500mM Isoleucin

-0,45N NaOH

-0,5% kreatin (Fluka)

-5% α -naftol (Sigma) v 2,5 N NaOH

-0,5mM acetoin (Fluka)

Objemy do 2 ml byly stáčeny ve stolní mikrocentrifuze Hettich EBA 12 R (20 000x g; 4 °C), objemy větší v centrifuze Sorvall RT6000B (5000 otáček/min.; 4 °C).

Příprava bezbuněčného extraktu

Buněčná kultura byla zaočkována z čerstvé misky do 50 ml minimálního media MM CGXII a kultivována do $OD_{600} = 4 - 10$. Narostlé buňky byly zchlazeny v ledu (10 min) a centrifugovány (5000 otáček/min., 10 min, 4 °C). Buněčný pelet byl dvakrát promyt 25 ml ledového 2% KCl a resuspendován ve 3 ml sonikačního pufru. Buňky byly rozbity ultrazvukem v ledové lázni po dobu 30 min s impulsem délky 0,5 s opakujícím se každou sekundu. Po sonikaci následovala centrifugace (20 000x g, 20 min, 4 °C), supernatant (bezbuněčný extrakt) byl odebrán a uchován v -20 °C.

Enzymatická reakce

Reakce probíhala v 37 °C s pravidelnými odběry (1 ml) v různém čase. Reakční směs (5ml) obsahovala v konečném složení 100mM pufr KPP, 10mM $MgCl_2$, 100 μ M TPP, 100 μ M FAD, 50mM pyruvát a v případě měření inhibice enzymu také 10 mM aminokyseliny. Reakce byla zahájena přidáním 500 μ l bezbuněčného extraktu a doba jejího

trvání závisela na jednotlivých kmenech *C. glutamicum* (zpravidla 5 min u kmenů plazmidových a 20 až 30 min u kmenů bezplazmidových). Po přidání 100 μl 50% H_2SO_4 došlo k zastavení reakce, následovala další kultivace v 37 °C po dobu 25 min. V průběhu tohoto času došlo v kyselém prostředí kyseliny sírové k dekarboxylaci acetolaktátu na acetoin, který mohl být detekován kolorimetricky.

Stanovení acetoinu

Ke 200 μl vzorku bylo přidáno 800 μl 0,45N NaOH a 1 ml směsi 0,5% kreatinu a 5% α -naftolu (v 2,5N NaOH) v poměru 1:1. Obsah byl promíchán a inkubován ve tmě při pokojové teplotě po dobu 30 min. Poté byla měřena absorbance vzorku při vlnové délce 535 nm. Stejným postupem byla připravena řada standardů o různé koncentraci acetoinu (0-0,06mM), které umožnily získat kalibrační křivku.

Měření celkové koncentrace proteinů

Celková koncentrace proteinů byla stanovena postupem uvedeným v metodě 3.2.10.2.

Výpočet specifické aktivity AHAS

Hodnoty absorbancí jednotlivých odběrů byly vyneseny graficky v závislosti na čase těchto odběrů, výslednými body byla proložena přímka. Směrnice této přímky udává změnu absorbance daného vzorku za minutu. Na základě kalibrační křivky acetoinu byla absorbance převedena na koncentraci acetoinu a vynásobena celkovým ředěním vzorku. Výsledná specifická aktivita AHAS (U/mg proteinu) byla získána po vydělení celkovou koncentrací proteinů ve vzorku. U získaných hodnot byla stanovena přesnost těchto hodnot vypočítáním směrodatné odchylky.

3.2.12. Stanovení produkce valinu

3.2.12.1. Detekce produkce valinu na miskách

Pro hrubé stanovení produkce valinu byl použit test produkce na Petriho miskách. Sledována byla velikost růstové zóny podkladového detekčního auxotrofního kmene *C. glutamicum* $\Delta ilvB$ kolem kmenů testovaných. Vlivem delece v genu *ilvB* není detekční kmen schopen syntetizovat valin a může tedy růst pouze v blízkosti kolonií kmene produkčního.

Na Petriho misku s pevnou půdou MM CGXII (25 ml) obsahující leucin, isoleucin a pantothenát bylo nanášeno 5 ml směsi *soft* (měkkého) agaru (0,5% agar v MM CGXII) s 500 μl přes noc narostlé buněčné suspenze detekčního kmene. Po zaschnutí byly na horní vrstvu *soft* agaru nakapány 3 μl buněčné suspenze testovaných kmenů. Kultivace probíhala dva až tři dny v 30 °C, poté byla sledována velikost vytvořené růstové zóny.

3.2.12.2. Stanovení produkce valinu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC)

Materiál:

- 0,05M NaAc (Sigma), pH 7,2 – polární fáze
- metanol (Lachema) – nepolární fáze
- ODS Hypersil HPLC kolony (velikost částic 5 μm , 200x2,1 mm; Thermo Electron, USA)
- membránový filtr (0,45 μm HV; Millipore Durapore)

Vzorky byly stáčeny na stolní mikrocentrifuze Hettich Mikro 20 (13 000x g; 10 min).

Kultivace

Testované kmeny *C. glutamicum* byly kultivovány 48 h v tekutém mediu MM CGXII (60 ml v 500-ml kultivačních baňkách, 30 °C, 120 otáček/minutu) do $\text{OD}_{600} \cong 40$. V případě kmenů obsahujících delece v genech *ilvA* a *panB* byly přidány 0,9mM isoleucin a 0,5 μM pantothenát zajišťující limitovaný růst buněčné kultury. Vzorek buněčné suspenze (1 ml) byl centrifugován, supernatant vakuově přefiltrován a použit pro stanovení koncentrace valinu HPLC.

Stanovení koncentrace valinu

Koncentrace valinu v mediu byla stanovena pomocí HPLC s reverzní fází (HP 1090; Hewlett-Packard, Waldbronn, Německo) s fluorimetrickou detekcí (excitace při 230 nm, emise při 450 nm) po automatické derivatizaci s orthofthaldialdehydem (Lindroth a Mopper, 1979). Konečná koncentrace valinu byla odečtena z kalibrační křivky.

4. VÝSLEDKY

Tato disertační práce se zabývá klíčovým krokem biosyntetické dráhy valinu u *Corynebacterium glutamicum*. Tímto krokem je první reakce specifická pro syntézu valinu, leucinu a isoleucinu, která je katalyzována synthasou acetoxykyselin (AHAS) (Obr. 2.2.). Kapitola Výsledky je pro snadnější orientaci rozdělena do tří částí. V první části jsou shrnuty výsledky transkripční analýzy genů *ilvB* a *ilvN* kódujících katalytickou a regulační podjednotku enzymu AHAS. Druhá část se zabývá studiem regulace aktivity enzymu AHAS, popsána je specifická mutageneze genu *ilvN* a konstrukce enzymu AHAS rezistentního ke zpětnovazebné inhibici. Třetí část, která navazuje na výsledky předchozích kapitol, popisuje konstrukci nových kmenů *C. glutamicum* produkujících valin. Porovnány jsou také konečné hodnoty produkce valinu u jednotlivých nově zkonstruovaných producentů.

4.1. Transkripční analýza genů *ilvB* a *ilvN* kódujících enzym AHAS

Základní poznatky týkající se mechanismu transkripce těchto genů již byly publikovány (Keilhauer *et al.*, 1993; Morbach *et al.*, 2000). Geny *ilvB* a *ilvN*, spolu s genem *ilvC* pro isomero-reduktasu acetoxykyselin, tvoří v chromosomu *C. glutamicum* společnou transkripční jednotku (operon), která podléhá regulaci atenuací. Tuto regulaci zajišťují specifické sekvence (atenuátor) v oblasti vedoucí sekvence genu *ilvB*. Kromě společného promotoru genu *ilvB* mají geny *ilvN* a *ilvC* také vlastní, nezávislé promotory. Přepisem operonu *ilvBNC* ze tří promotorů tak vznikají tři transkripty o různých délkách (Obr. 2.4.).

4.1.1. Promotor genu *ilvB* (P-*ilvB*)

Vedoucí sekvence genu *ilvB*, který kóduje větší, katalytickou podjednotku enzymu AHAS, byla podrobně zmapována mutační a deleční analýzou (Morbach *et al.*, 2000). Výsledky této studie potvrdily přítomnost vedoucího peptidu, specifických sekvencí (protektor, antiterminátor, terminátor) i regulačních kodónů pro valin, leucin a isoleucin, zajišťujících synchronizaci transkripce a translace (Obr. 2.3.). Hypotéza předpokládající regulaci exprese operonu *ilvBNC* atenuací tak byla prokázána. Kromě regulace atenuací se v případě operonu *ilvBNC* z *C. glutamicum* uplatňují ještě další kontrolní mechanismy

iniciace transkripce, nejpravděpodobněji přímá aktivace. Jako aktivátor promotoru P-*ilvB* by mohl působit 2-ketobutyrate (jeden z přirozených substrátů enzymu AHAS), jehož přítomnost v kultivačním mediu významně zvyšuje množství transkriptu *ilvBNC* v buňkách i aktivitu daného enzymu.

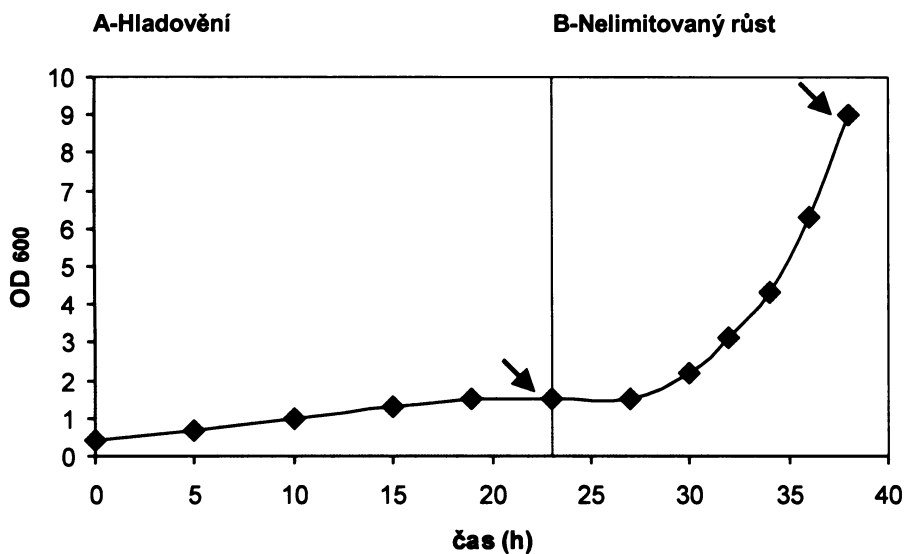
Cílené zásahy do regulačních sekvencí operonu *ilvBNC* za účelem zvýšení exprese (a tím i výsledné produkce valinu) vyžadují detailní znalost celé oblasti. Tato část disertační práce tedy navazuje na dosud získané poznatky a pokračuje v analýze promotorové sekvence genu *ilvB*.

Význam jednotlivých částí promotoru P-*ilvB* na jeho aktivitu byl prokázán měřením promotorové síly čtyř různě dlouhých fragmentů DNA (B1, B2, B3 a B4), nesoucích různé oblasti vedoucí sekvence genu *ilvB* (Obr. 4.2.A). K měření promotorové aktivity byl využit *promoter-probe* vektor pET2 (Obr. 3.2.) (Vašicová *et al.*, 1998) nesoucí bezpromotorový reportérový gen *cat* pro chloramfenikolacetyltransferasu (CAT), enzym inaktivující antibiotikum chloramfenikol acetylací. V tomto systému je aktivita studovaného promotoru měřena úrovní exprese genu *cat*, která se vyhodnocuje přímo měřením specifické aktivity CAT, nebo nepřímou, stanovením minimální inhibiční koncentrace (MIC) chloramfenikolu. Metoda stanovení MIC je založena na skutečnosti, že míra rezistence buněk vůči chloramfenikolu je přibližně úměrná síle exprese genu *cat*, a tedy i transkripční aktivitě testovaného promotoru.

Fragmenty B1 (148 bp), B2 (417 bp), B3 (70 bp) a B4 (339 bp) byly připraveny PCR reakcí s následujícími kombinacemi primerů: fragment B1 (primery PILVBH1 a PILVBD1), fragment B2 (primery PILVBH1 a PILVBD2), fragment B3 (primery PILVBH2 a PILVBD1) a fragment B4 (primery PILVBH2 a PILVBD2). Primery PILVBH1 a PILVBH2 nesou na svém 5' konci zásahové místo pro restrikční enzym *Pst*I, primery PILVBD1 a PILVBD2 zásahové místo pro restrikční enzym *Bam*HI. Po přečištění a štěpení příslušnými restrikčními enzymy byly fragmenty vkládány do *promoter-probe* vektoru pET2. Také vektor byl pro ligaci štěpen restrikčními enzymy *Bam*HI a *Pst*I a jeho volné konce byly defosforylovány alkalickou fosfatou SAP. Ligační směsí byly transformovány buňky *E. coli* DH5 α a sekvence vzniklých rekombinantních klonů byla ověřena sekvenováním (s použitím primeru CM4, komplementárního k sekvenci vektoru pET2).

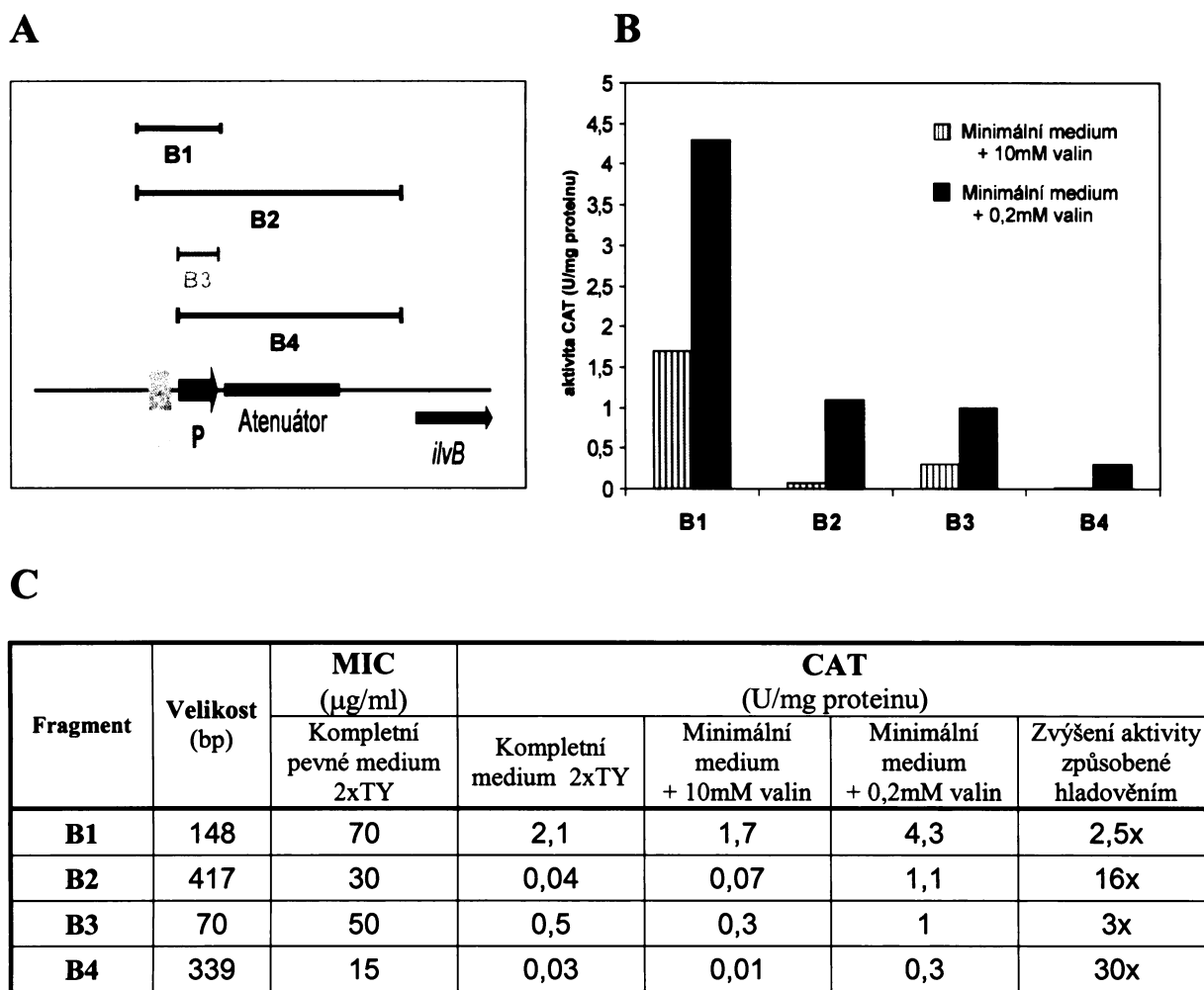
Za účelem porovnání promotorových aktivit jednotlivých fragmentů během různých fyziologických podmínek růstu byly DNA výsledných rekombinantních klonů použity k transformaci auxotrofního kmene *C. glutamicum* Δ *ilvB* (Morbach *et al.*, 2000). Tento kmen není v důsledku delece v genu *ilvB* schopen syntetizovat valin, leucin ani isoleucin, díky této skutečnosti však může být snadno vystaven stresovým podmínkám limitovaného růstu.

Aktivita studovaných promotorových fragmentů tak mohla být stanovena jak za podmínek nelimitovaného růstu, tak za podmínek růstu limitovaného, způsobeného hladověním buněk na valin. V tomto případě byl analyzován pouze vliv valinu, jehož zvýšená produkce je konečným cílem této disertační práce. Postup experimentu byl následující: buněčná kultura kmene *C. glutamicum* $\Delta ilvB$ obsahující vektor pET2 s klonovaným fragmentem promotoru P-*ilvB* byla kultivována v minimálním mediu MM CGXII za podmínek limitovaného růstu, způsobeného hladověním buněk na valin. Limitující koncentrace valinu byla 0,2mM, leucin a isoleucin byly přítomny v nadbytku (5mM). V okamžiku, kdy se růst kultury vlivem hladovění zastavil, byla odebrána polovina buněčné suspenze a vzorek byl zpracován pro stanovení aktivity CAT. Ke druhé polovině buněčné suspenze byl přidán valin v konečné koncentraci 10mM a kultura byla opět kultivována, dokud nedošlo k obnově exponenciálního růstu buněk. Poté byl i tento vzorek zpracován pro stanovení aktivity CAT. Příklad limitovaného a nelimitovaného růstu kultury je uveden na obrázku 4.1., výsledky experimentu (stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) chloramfenikolu a specifické aktivity CAT) jsou shrnuty v obrázku 4.2.B,C.



Obr. 4.1. Limitovaný a nelimitovaný růst *C. glutamicum* $\Delta ilvB$

V části A je vynesena růstová křivka kmene za podmínek růstu limitovaného valinem (minimální medium + 0,2mM valin). Ve 23. h růstu (v okamžiku, kdy se růst buněčné kultury v důsledku hladovění zastavil) byl přidán valin v konečné koncentraci 10mM a tím navozen nelimitovaný, exponenciální růst buněk. Červené šipky označují čas dvou odběrů biomasy pro stanovení specifické aktivity CAT (jeden odběr v okamžiku hladovění a druhý v průběhu exponenciálního růstu kultury).



Obr. 4.2. Měření aktivity promotoru P-ilvB

A
Schéma fragmentů B1, B2, B3 a B4 nesoucích různé části promotoru P-ilvB: DR = nedokonalá přímá repetice; P = jádro promotoru P-ilvB. Fragment B1 (148 bp) nese nedokonalou přímou repetici a sekvenci promotoru. Fragment B2 (417 bp) obsahuje nedokonalou přímou repetici, promotor a atenuátor. Fragment B3 (70 bp) nese pouze sekvenci promotoru, zatímco fragment B4 (339 bp) sekvenci promotoru i s atenuátorem.

B, C
Fragmenty B1, B2, B3 a B4 byly klonovány v *promoter-probe* vektoru pET2, jehož hostitelem byl kmen *C. glutamicum* $\Delta ilvB$ (kmen auxotrofní na valin, leucin a isoleucin). Hodnoty specifické aktivity CAT byly stanoveny za podmínek nelimitovaného růstu (kompletní medium 2xTY, minimální medium + 10mM valin) a za podmínek hladovění na valin (minimální medium + 0,2mM valin). Uvedené výsledky jsou průměrem alespoň tří nezávislých měření, jejichž přesnost byla ověřena vypočítáním směrodatné odchylky. Její hodnoty se pohybovaly v rozmezí $\pm 23\%$.

Z uvedených výsledků vyplývá, že za podmínek limitovaného růstu vyvolaného hladověním na valin dochází k významnému zvýšení promotorové aktivity fragmentů B2 a B4, které obsahují oblast atenuátoru. Zajímavé je také porovnání promotorových aktivit fragmentů lišících se přítomností nebo nepřítomností nedokonalé přímé repetice (DR) před sekvencí vlastního promotoru P-ilvB (Obr. 2.3.; Obr. 4.2.A). Přítomnost repetice na

fragmentu B1 způsobila při nelimitovaném růstu téměř 6-násobné zvýšení aktivity promotoru ve srovnání s fragmentem B3, který tuto oblast postrádá. Zcela obdobné je srovnání fragmentů B2 a B4. Fragment B2 nesoucí repetici měl 7-krát vyšší promotorovou aktivitu než identický fragment B4 bez repetice. Oblast nedokonalé přímé repetice tedy pravděpodobně zodpovídá za aktivaci promotoru P-*ilvB*.

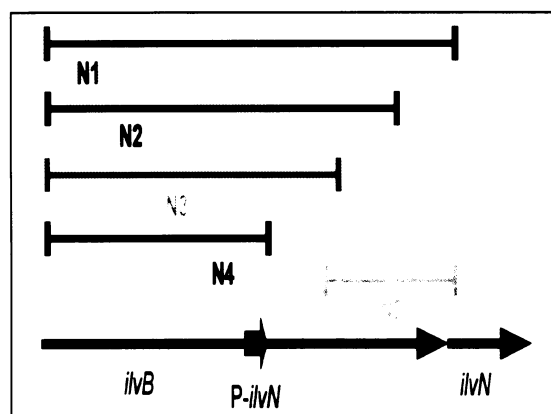
Jako jeden z možných kandidátů, který by přímou nebo nepřímou vazbou na nedokonalou repetici (DR) zprostředkoval aktivaci promotoru P-*ilvB*, byl testován 2-ketobutyrát (Keilhauer *et al.*, 1993). Aby mohla být tato hypotéza prokázána, byly DNA vektoru pET2 s naklonovanými fragmenty B1, B2, B3 a B4 použity k transformaci divokého kmene *C. glutamicum* 13032 a auxotrofního kmene *C. glutamicum* $\Delta ilvA$ (popis konstrukce tohoto kmene je uveden v kapitole 4.3.1.). Vlivem delece v genu *ilvA* není kmen *C. glutamicum* $\Delta ilvA$ schopen syntetizovat vlastní 2-ketobutyrát, který by mohl tvořit nežádoucí pozadí experimentu. Buněčné kultury byly kultivovány v minimálním mediu MM CGXII za přítomnosti následujících koncentrací 2-ketobutyrátu: 0mM, 5mM, 20mM, 50mM a 100mM. Testovány byly rovněž 3-hodinové indukce 2-ketobutyrátem a sledovány především aktivity fragmentů B1 a B3. Na základě navržené hypotézy měla přítomnost 2-ketobutyrátu v kultivačním mediu vyvolat zvýšení promotorové aktivity fragmentu B1, který nese před vlastním promotorem nedokonalou přímou repetici (DR). Fragment B3 repetici neobsahuje, proto jeho promotorová aktivita neměla být přítomností 2-ketobutyrátu ovlivněna. Získané výsledky však hypotézu nepotvrdily, ke zvýšení promotorové aktivity nedošlo u žádného z obou studovaných fragmentů. Pro kontrolu byl shodný experiment proveden také s fragmenty B2 a B4, které obsahují navíc oblast atenuátoru. V přítomnosti 5mM a 50mM 2-ketobutyrátu v kultivačním mediu došlo v případě fragmentu B2 k 2-násobnému a v případě fragmentu B4 k 3-násobnému zvýšení promotorové aktivity. Tento jev však spíše souvisí s přítomností atenuátorové sekvence. Enzym AHAS upřednostňuje ze svých dvou substrátů právě 2-ketobutyrát a pokud v buňce dojde ke zvýšení hladiny této látky, je syntetizován zejména isoleucin na úkor leucinu a valinu, jejichž koncentrace se tak stává limitující. Buňky začínají hladovět a aktivita promotoru stoupá. Mechanismus aktivace promotoru P-*ilvB* nezávislé na atenuaci tedy zatím zůstává neobjasněný.

Na základě výsledků analýzy promotorové sekvence genu *ilvB* byl navržen cílený zásah přímo v chromosomu *C. glutamicum*. Podstatou tohoto zásahu bylo zavedení delece atenuátoru do vedoucí sekvence genu *ilvB*, které by vyvolalo zvýšení exprese operonu *ilvBNC* (a tím i zvýšení produkce valinu). Detaily tohoto experimentu jsou uvedeny v kapitole 4.3.3., týkající se konstrukce produkčních kmenů.

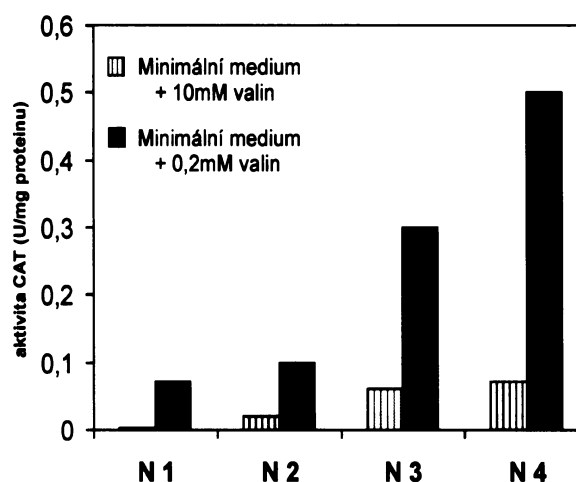
4.1.2. Promotor genu *ilvN* (P-*ilvN*)

Narozdíl od promotoru P-*ilvB* nebyl promotor genu *ilvN* pro menší, regulační podjednotku enzymu AHAS ještě studován, jeho existenci však naznačovalo mapování transkriptů operonu *ilvBNC* (Keilhauer *et al.*, 1993) (Obr. 2.4.). Jedním z úkolů této disertační práce tedy bylo nalézt oblast, ve které se tento promotor vyskytuje, a následně určit jeho přesnou polohu (místo transkripčního startu) metodou *primer-extension*. Z tohoto důvodu byla navržena syntéza fragmentu DNA (303 bp, později označen jako N0), který by pokrýval oblast před genem *ilvN* v rozsahu běžném pro výskyt promotorové sekvence. K syntéze fragmentu byla využita PCR reakce a primery PILVNH1 a PILVND1 nesoucí zásahová místa pro restriční enzym *Bam*HI. Podobně jako v případě promotoru P-*ilvB* byl fragment nesoucí potenciální promotor P-*ilvN* ligován do *promoter-probe* vektoru pET2 před bezpromotorový reportérový gen *cat*. Při stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) chloramfenikolu a specifické aktivity CAT však nebyla naměřena žádná promotorová aktivita tohoto fragmentu. PCR reakcí byl tedy připraven delší fragment N1 (767 bp) a jeho deleční deriváty N2 (640 bp), N3 (530 bp) a N4 (393 bp) (Obr. 4.3.A). Použity byly následující kombinace primerů: fragment N1 (primery PILVNH3 a PILVND1), fragment N2 (primery PILVNH3 a PILVND4), fragment N3 (primery PILVNH3 a PILVND2) a fragment N4 (primery PILVNH3 a PILVND3). Primer PILVNH3 nese zásahové místo pro restriční enzym *Nsi*I, primery PILVND1, PILVND2, PILVND3 a PILVND4 zásahové místo pro restriční enzym *Bam*HI. Enzym *Pst*I nebyl v tomto případě pro klonování vhodný (jeho zásahové místo se vyskytuje uvnitř fragmentů N1 a N2), byl proto nahrazen enzymem *Nsi*I, který po restrikci vytváří s enzymem *Pst*I identické kohezivní konce DNA. Následující postup experimentu byl shodný s postupem popsáním v kapitole 4.1.1., týkající se promotoru P-*ilvB*. Cílovým kmenem pro měření promotorové aktivity fragmentů byl opět kmen *C. glutamicum* $\Delta ilvB$. Výsledné hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC) chloramfenikolu a specifické aktivity CAT za podmínek nelimitovaného a limitovaného růstu jsou shrnuty v obrázku 4.3.B,C.

A



B



C

Fragment	Velikost (bp)	MIC (µg/ml)	CAT (U/mg proteinu)			
			Kompletní medium 2xTY	Minimální medium + 10mM valin	Minimální medium + 0,2mM valin	Zvýšení aktivity způsobené hladověním
N0	303	5	0	/	/	/
N1	767	15	0,01	0,003	0,07	23x
N2	640	25	0,06	0,02	0,1	5x
N3	530	50	0,2	0,06	0,3	5x
N4	393	70	0,6	0,07	0,5	7x

Obr. 4.3. Měření aktivity promotoru P-ilvN

A

Schéma různě dlouhých (odspodu postupně zkracovaných) fragmentů N1, N2, N3 a N4 nesoucích promotor P-ilvN. Fragment N0 nenese sekvenci promotoru a nevykazuje tedy ani žádnou promotorovou aktivitu.

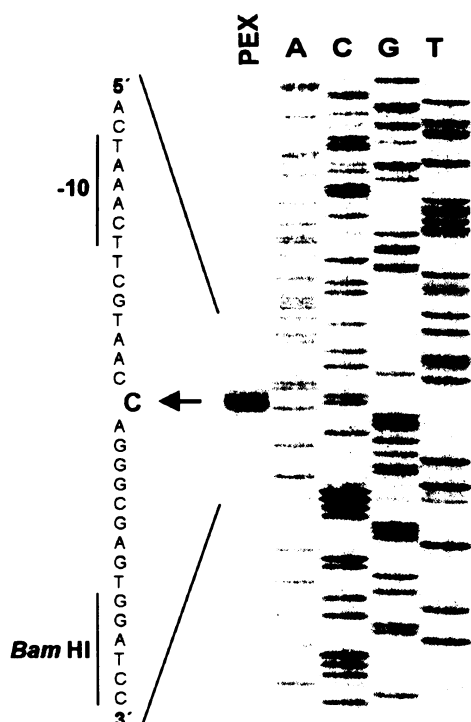
B, C

Fragmenty N0, N1, N2, N3 a N4 byly klonovány v *promoter-probe* vektoru pET2, jehož hostitelem byl kmen *C. glutamicum* $\Delta ilvB$ (kmen auxotrofní na valin, leucin a isoleucin). Hodnoty specifické aktivity CAT byly stanoveny za podmínek nelimitovaného růstu (kompletní medium 2xTY, minimální medium + 10mM valin) a za podmínek hladovění na valin (minimální medium + 0,2mM valin). Uvedené výsledky jsou průměrem alespoň tří nezávislých měření, jejichž přesnost byla ověřena vypočítáním směrodatné odchylky. Její hodnoty se pohybovaly v rozmezí $\pm 20\%$.

Analýza promotoru P-ilvN odhalila, že se tento promotor nachází neobvykle daleko, v oblasti 319 až 712 bp od translačního počátku strukturního genu *ilvN*, uvnitř genu *ilvB*. Na základě deleční studie promotoru bylo zjištěno, že oblast mezi vlastním promotorem a translačním startem genu *ilvN* je odpovědná za represi transkripce. Tuto hypotézu potvrzují promotorové aktivity fragmentů N1, N2, N3 a N4, které se snižují spolu s rostoucí délkou

fragmentu. Mechanismus represe nebyl podrobně studován, avšak poloha dané oblasti uvnitř genu *ilvB* znemožňuje tvorbu složitých sekundárních struktur, které by mohly být odpovědné za tuto regulaci. Ani počítačová analýza sekvence nepotvrdila přítomnost smyček a vlásenek, způsob regulace transkripce z promotoru P-*ilvN* je tedy zřejmě odlišný od regulace promotoru P-*ilvB*.

Přesná poloha transkripčního startu genu *ilvN* byla nalezena mapováním 5'-konce příslušné mRNA metodou *primer-extension* (PEX). Princip metody spočívá v reverzní transkripci studované mRNA ze značeného primeru CM4, který je k sekvenci sledované RNA komplementární. Jako templát byla využita totální RNA izolovaná z kmene *C. glutamicum* $\Delta ilvB$, který obsahoval vektor pET2 s naklonovaným fragmentem N4 nesoucím promotor P-*ilvN*. Reverzní transkripce z primeru CM4, jehož sekvence se nachází na vektoru pET2 za klonovaným fragmentem, probíhá opačným směrem než transkripce ze studovaného promotoru a směřuje k začátku testované mRNA. Výsledná jednořetězcová DNA byla poté analyzována v polyakrylamidovém gelu. Paralelně s reverzní transkripcí byla provedena také sekvenační reakce fragmentu s použitím stejného primeru. Porovnáním sekvenačního profilu a polohy pásu tvořeného produktem reverzní transkripce byl z autoradiogramu odečten transkripční počátek genu *ilvN* (Obr. 4.4.). Z obrázku je patrné, že pozice transkripčního startu odpovídá cytosinu ve vzdálenosti 337 bp od translačního počátku genu *ilvN*. Od polohy transkripčního startu byl následně odvozen vlastní promotor P-*ilvN*, který je tvořen sekvencemi TAAACT (oblast -10) a ATGAAG (oblast -35).



Obr. 4.4. Stanovení transkripčního počátku genu *ilvN* (*primer-extension*)

Výsledek reakce *primer-extension* se nachází v prvním sloupci (PEX). Další dráhy autoradiogramu, které reprezentují sekvenační reakci, jsou označeny jako komplementární nukleotidy (A, C, G a T) tak, aby sekvence čtená odshora odpovídala konvenčnímu zápisu (5'-3' vláknem). Tato sekvence, je pro názornost vypsána po levé straně obrázku, a lze v ní identifikovat oblast -10 promotoru P-*ilvN*. Tučným písmem je zvýrazněn nukleotid odpovídající transkripčnímu počátku genu *ilvN* (C). Pomocí restričního enzymu *Bam*HI byl studovaný promotor ligován do *promoter-probe* vektoru pET2.

4.2. Konstrukce enzymu AHAS rezistentního ke zpětnovazebné inhibici

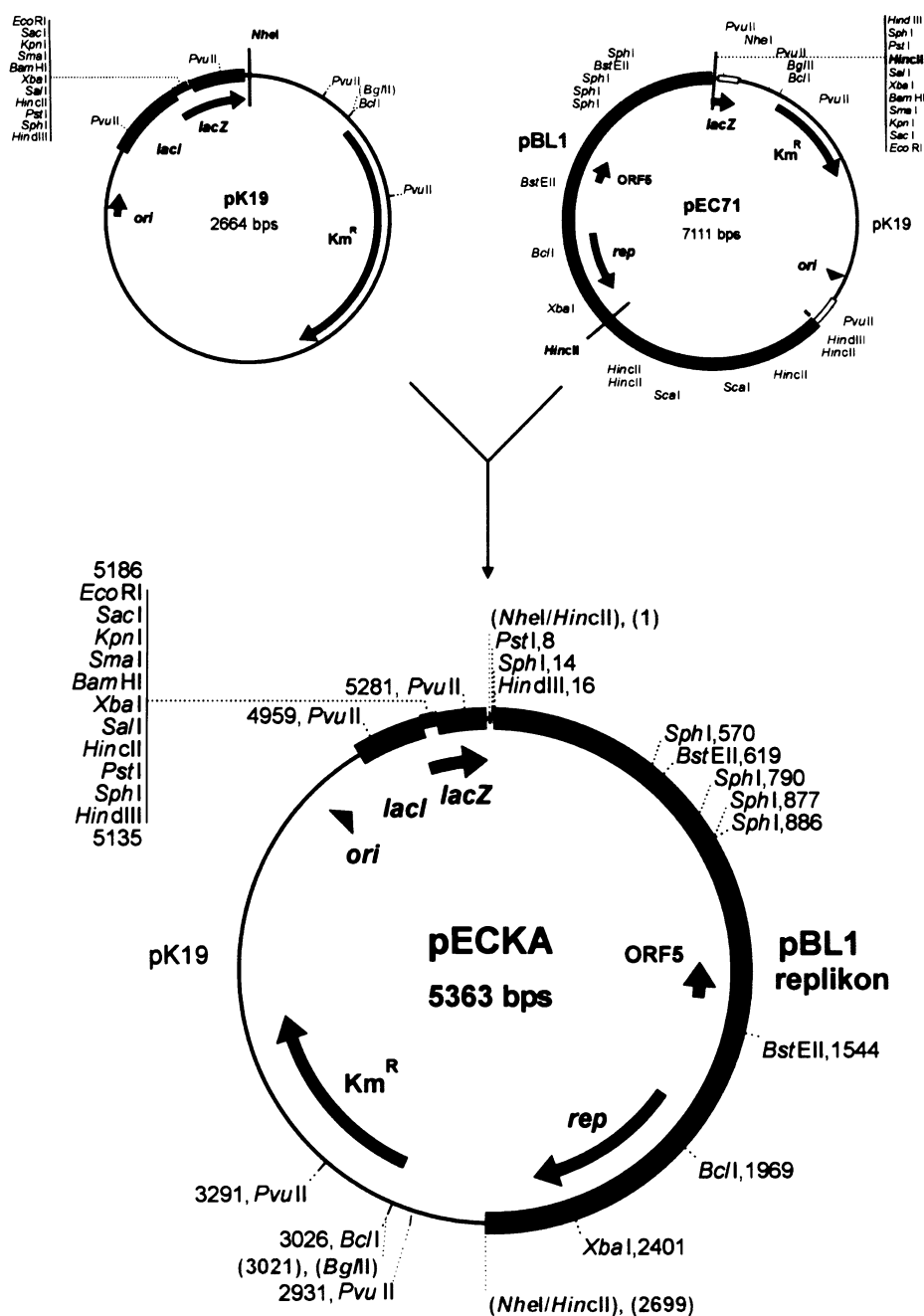
Klíčovým krokem biosyntetické dráhy valinu u *C. glutamicum* je první reakce specifická pro syntézu valinu, leucinu a isoleucinu, která je katalyzována enzymem synthasou acetoxyhydroxykyselin (AHAS) (Obr. 2.2.). Obecným rysem biosyntetických drah aminokyselin je regulace aktivity klíčového enzymu zpětnovazebně působící inhibicí, která je zprostředkována konečnými produkty daných drah. Také v případě biosyntetické dráhy valinu podléhá klíčový enzym AHAS inhibici valinem, leucinem a isoleucinem (Eggeling *et al.*, 1987). Konstrukce enzymu rezistentního ke zpětnovazebné inhibici může pomoci objasnit samotný mechanismus regulace (sílu inhibice, počet vazebných míst pro inhibitory atd.) a rovněž může sloužit jako základ pro konstrukci kmene, který by našel uplatnění při průmyslové produkci valinu. K přípravě enzymu AHAS rezistentního k inhibici byla zvolena metoda místně specifické mutagenese genu *ilvN* pro regulační podjednotku enzymu. Kapitola navíc popisuje konstrukci kmene *C. glutamicum* $\Delta ilvN$ a vektoru pECKA potřebných pro detekci mutovaného enzymu a měření jeho aktivity.

4.2.1. Konstrukce vektoru pECKA

Principem konstrukce enzymu AHAS rezistentního ke zpětnovazebné inhibici byla výměna divokého genu *ilvN* v operonu *ilvBNC* za gen mutovaný. Tato výměna byla uskutečněna pomocí restrikčních enzymů *ScaI* a *BglIII*, jejichž přirozená zásahová místa se uvnitř operonu vyskytují. Nejprve však musel být vytvořen vhodný vektor, který by sloužil jako nosič operonu *ilvBNC* v buňkách *C. glutamicum* a zároveň by umožnil výměnu divokého fragmentu *ScaI-BglIII* za fragment mutovaný. Nezbytnou vlastností tohoto nového vektoru tedy musela být absence zásahových míst pro restrikční enzymy *ScaI* a *BglIII*.

Základem nového vektoru pECKA byl vektor pK19 (Pridmore, 1987) z *E. coli* a replikon kryptického plazmidu pBL1 z *C. glutamicum*. Prvním krokem konstrukce bylo odstranění zásahového místa pro restrikční enzym *BglIII* ve vektoru pK19 pomocí Klenowova fragmentu DNA polymerasy I. Takto upravený plazmid pK19T byl štěpen restrikčním enzymem *NheI* a vzniklé 5'-přesahující kohezivní konce DNA byly pro účely ligace zatupeny Klenowovým fragmentem DNA polymerasy I. K získání replikonu plazmidu pBL1 byl využit již dříve připravený podvojný vektor pEC71 (Pátek *et al.*, 1993), jehož fragment *HincII* o velikosti 2,7 kb byl ligován s plazmidem pK19T. Schéma konstrukce je znázorněno na obrázku 4.5. Výsledný vektor pECKA (5,4 kb) je schopen replikace

v buňkách *E. coli* i *C. glutamicum*. Obsahuje gen determinující rezistenci ke kanamycinu, kazetu laktosového operonu zajišťující selekci rekombinantních molekul α -komplementací a 7 unikátních zásahových míst pro restriční enzymy *HincII*, *SalI*, *BamHI*, *SmaI*, *KpnI*, *SacI* a *EcoRI*.

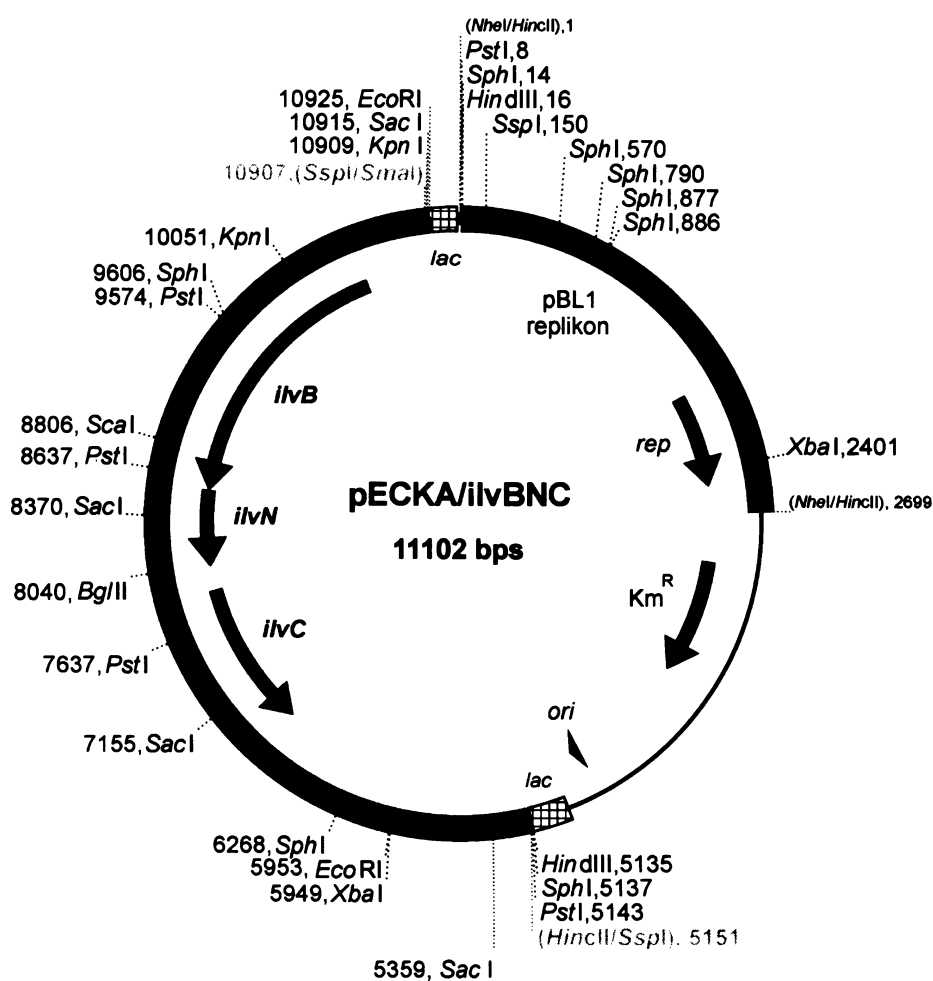


Obr. 4.5. Konstrukce vektoru pECKA

Rekombinantní plazmid pECKA je podvojný, klonovací vektor, schopný samostatné replikace v buňkách *E. coli* a *C. glutamicum*. Tmavě zelenou barvou jsou zvýrazněny restriční enzymy použité pro klonování, světle zelenou barvou enzymy, jejichž zásahové místo bylo během konstrukce odstraněno. *lacZ* a *lacI* = kazeta laktosového operonu, zajišťující selekci rekombinantních klonů na základě α -komplementace; *Km^R* = gen pro rezistenci ke kanamycinu; *ori* = počátek pro replikaci plazmidu v *E. coli*; *rep* = gen kódující protein Rep zahajující replikaci plazmidu v *C. glutamicum*; *ORF5* = gen, jenž je součástí minimálního replikonu plazmidu pBL1.

4.2.2. Vložení operonu *ilvBNC* do vektoru pECKA

Celý proces místně specifické mutagenese byl proveden v nově zkonstruovaném vektoru pECKA s naklonovaným operonem *ilvBNC* z *C. glutamicum*. Jako zdroj operonu byl využit plazmid pKK5 (Cordes *et al.*, 1992). Restrikčním enzymem *SspI* byl z tohoto plazmidu vyštěpen fragment o velikosti 5,8 kb, který byl ligován do vektoru pECKA štěpeného restrikčními enzymy *SmaI* a *HincII*. Výsledný plazmid pECKA*ilvBNC* (11,1 kb) je znázorněn na obrázku 4.6.



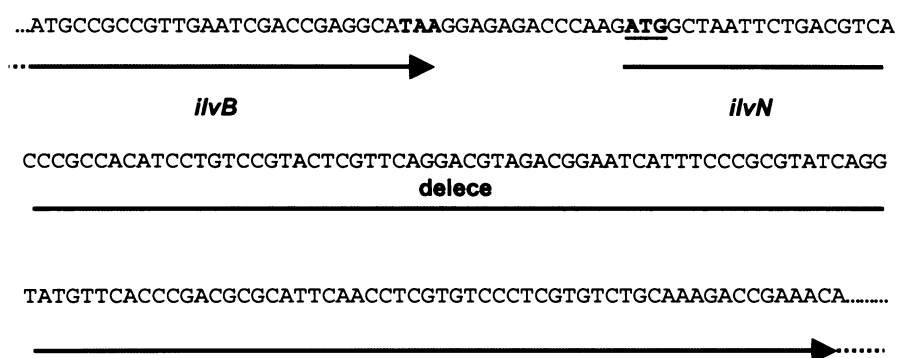
Obr. 4.6. Restrikční a genetická mapa plazmidu pECKA*ilvBNC*

Červeně je na mapě plazmidu vyznačen fragment nesoucí operon *ilvBNC* z *C. glutamicum*, černě původní vektor pECKA. Světle zelenou barvou jsou zvýrazněny restrikční enzymy použité pro vkládání operonu *ilvBNC* do vektoru pECKA, v závorkách jsou uvedeny enzymy, jejichž zásahové místo bylo během procesu konstrukce odstraněno. *lac* = kazeta laktosového operonu, která byla přerušena vložení fragmentu; *Km^R* = gen pro rezistenci ke kanamycinu; *ori* = počátek pro replikaci plazmidu v *E. coli*; *rep* = gen kódující protein Rep zahajující replikaci plazmidu v *C. glutamicum*.

4.2.3. Konstrukce kmene *C. glutamicum* $\Delta ilvN$

Rezistence enzymu AHAS ke zpětnovazebné inhibici může být prokázána pouze měřením specifické aktivity daného enzymu v přítomnosti inhibitorů. Tato kapitola popisuje konstrukci kmene *C. glutamicum* $\Delta ilvN$ vhodného pro tato měření, ve kterém došlo po zavedení delece do chromosomu k inaktivaci genu *ilvN* pro regulační podjednotku enzymu AHAS (Obr. 4.7.). Po transformaci plazmidem pECKA nesoucím mutovaný operon *ilvBNC* tak nejsou v buňkách tohoto kmene přítomny žádné regulační podjednotky *IlvN* divokého typu, které by při měření specifické aktivity AHAS interferovaly s podjednotkami mutovanými.

Schéma syntézy delečních kmenů je detailně popsáno a zobrazeno v kapitole 3.2.9. v části Materiál a metody. Fragment PCR (1,2 kb) obsahující deleci v genu *ilvN* o velikosti 100 bp byl připraven pomocí vnějších primerů DELN1H a DELN2D a primerů DELN1D a DELN2H ohraničujících budoucí deleci a nesoucích přesahy o délce 10 bp. Výsledný fragment byl pomocí restrikčního enzymu *EcoRI* ligován do integrativního vektoru pK18mobsacB, s jehož pomocí byl vložen do chromosomu *C. glutamicum* ATCC 13032. Požadované klony s delecí byly po druhé homologní rekombinaci selektovány na pevném minimálním mediu MM CGXII, obsahujícím pouze 5mM leucin a 5mM isoleucin. V tomto případě nezpůsobila inaktivace genu *ilvN* pro regulační podjednotku enzymu AHAS úplnou auxotrofii výsledného kmene. Enzym si i v nepřítomnosti regulační podjednotky zachoval nízkou aktivitu, její hodnota však byla téměř neměřitelná (Tab. 4.1.). V minimálním mediu neobsahujícím valin proto rychlost růstu delečního kmene ve srovnání s kmenem divokým výrazně poklesla.

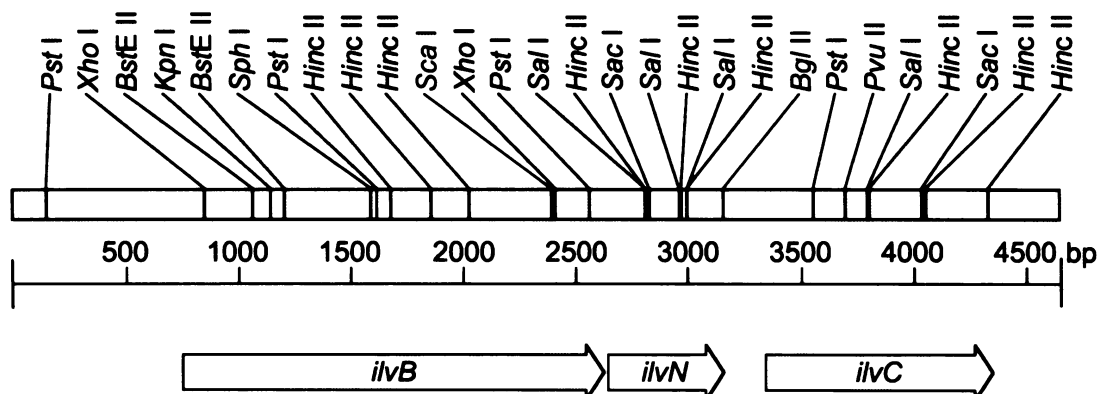


Obr. 4.7. Zavedení delece do genu *ilvN*

Červeně je zvýrazněna delece zavedená do genu *ilvN*, podtrženým, tučným, červeným písmem odstraněný translační počátek téhož genu. Modrým tučným písmem je vyznačen stop kodón předchozího genu *ilvB*.

4.2.4. Cílená (místně specifická) mutagenéze genu *ilvN*

Principem cílené mutagenéze genu *ilvN*, která by vyvolala rezistenci enzymu AHAS ke zpětnovazebné inhibici, byla výměna přirozeného fragmentu *ScaI*-*BglII* (766 bp) uvnitř operonu *ilvBNC* za fragment mutovaný (Obr. 4.8.).



Obr. 4.8. Schéma operonu *ilvBNC* z *C. glutamicum*

Červeně jsou na obrázku vyznačena zásahová místa pro restrikční enzymy *ScaI* a *BglII*, jejichž štěpením vznikl fragment o velikosti 766 bp. Tento fragment byl po místně specifické mutagenézi použit k výměně za stejně vymezený fragment nesoucí požadované mutace.

Podkladem pro návrh místně specifické mutagenéze byly výsledky získané studiem biosyntézy valinu u *Streptomyces cinnamonensis* a *E. coli* (Kopecký *et al.*, 1999; Vyazmensky *et al.*, 1996). V případě *S. cinnamonensis* bylo sekvenční analýzou genu *ilvN* u mutantů rezistentních k analogům valinu zjištěno, že substituce aminokyselin glycinu, valinu a leucinu v pozicích 16, 17 a 18 za kyselinu asparagovou v pozicích 16 a 17 a za fenylalanin v pozici 18 zcela odstranila inhibici enzymu AHAS 10mM valinem. Stejněho fenotypu bylo dosaženo během studia regulační podjednotky homologního enzymu AHAS III. z *E. coli*, kódované genem *ilvH*. Spontánní záměnou glycinu v pozici 14 za kyselinu asparagovou ztratil protein schopnost vázat valin. Tyto výsledky dokazují, že uvedené záměny v aminokyselinové sekvenci regulační podjednotky enzymu AHAS ovlivňují výslednou konformaci enzymu a nevratně poškozují vazebné místo pro inhibitor valin. Jak je patrné z obrázku 4.9., zmíněná oblast odpovídá N-koncové doméně proteinu, která je mezi jednotlivými bakteriálními druhy značně konzervována. Pro účely místně specifické mutagenéze u *C. glutamicum* byly proto vybrány aminokyseliny glycin, isoleucin, isoleucin

v pozicích 20, 21 a 22, které se vlivem vysoké konzervovanosti této oblasti s největší pravděpodobností rovněž vyskytují v allosterickém vazebném místě enzymu.

7	L S V L V E N K P	G V L	A R I T A L F...	- <i>Streptomyces cinnamomensis</i>
8	L S V L V E D K P	G V L	A R V A A L F...	- <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
11	I S A L V L N K P	G V L	Q R I S G L F...	- <i>Methanococcus jannaschii</i>
5	L S V L L E N E S	G A L	S R V I G L F...	- <i>Salmonella typhimurium</i>
5	L S V L L E N E S	G A L	S R V I G L F...	- <i>Escherichia coli</i> - AHAS III
5	I T L T V V N R S	G V L	N R I T G L F...	- <i>Bacillus subtilis</i>
11	L S V L V Q D V D	G I I	S R V S G M F...	- <i>Corynebacterium glutamicum</i>

Obr. 4.9. Porovnání aminokyselinové sekvence konzervované N-terminální domény regulační podjednotky enzymu AHAS

Čísla po levé straně udávají pozici prvních aminokyselinových zbytků v příslušném proteinu. Tučně jsou zvýrazněny aminokyseliny identické se sekvencí *Streptomyces cinnamomensis*. Rámeček označuje kritickou oblast výskytu mutací, vedoucích k odstranění zpětnovazebné inhibice enzymu. U modře zvýrazněných aminokyselin v pozicích 16, 17, 18 u *S. cinnamomensis* a v pozici 14 u *E. coli* byl tento fenotyp experimentálně prokázán. Červeně jsou vyznačeny aminokyseliny v pozicích 20, 21 a 22, které byly vybrány pro místně specifickou mutagenézi genu *ilvN* u *C. glutamicum*.

Příprava fragmentu nesoucího požadované mutace je detailně popsána v kapitole 3.2.8. v oddílu Materiál a metody. K zavedení mutací byl využit degenerovaný primer ILVNM1. Směs výsledných mutovaných fragmentů *ScaI-BglII* s různými kombinacemi jedné, dvou nebo tří aminokyselinových záměn byla použita k výměně původního fragmentu v plazmidu pECKAilvBNC. Izolovány byly 3 mutované klony (pECKAilvBNCM8, pECKAilvBNCM11 a pECKAilvBNCM13), jejichž záměny byly zjištěny sekvenováním s využitím sekvenačních primerů SILVNH a SILVND2. Aminokyselinové sekvence i sekvence DNA získaných mutantů jsou znázorněny na obrázku 4.10. DNA tří mutovaných klonů, spolu s divokým typem pECKAilvBNC, byla použita k transformaci nově zkonstruovaného kmene *C. glutamicum* $\Delta ilvN$. Následovalo stanovení specifické aktivity AHAS a inhibice enzymu valinem, leucinem a isoleucinem. Výsledky měření jsou shrnuty v tabulce 4.1.

Sekvence DNA	Sekvence proteinu			Mutace
GGA ATC ATT	Gly (20)	Ile (21)	Ile (22)	WT
GGT GAC ATT	Gly (20)	Asp (21)	Ile (22)	M11
GGT GAC TTT	Gly (20)	Asp (21)	Phe (22)	M8
GAT GAC TTT	Asp (20)	Asp (21)	Phe (22)	M13

Obr. 4.10. Sekvence klonů získaných cílenou mutagenézou genu *ilvN* z *C. glutamicum*

Modře jsou zvýrazněny mutované báze, červeně substituované aminokyseliny a černě divoké sekvence. Čísla v závorkách udávají pozice aminokyselin regulační podjednotky enzymu AHAS.

Tab. 4.1. Měření specifické aktivity AHAS a její zpětnovazebné inhibice v plazmidových kmenech *C. glutamicum ΔilvN*

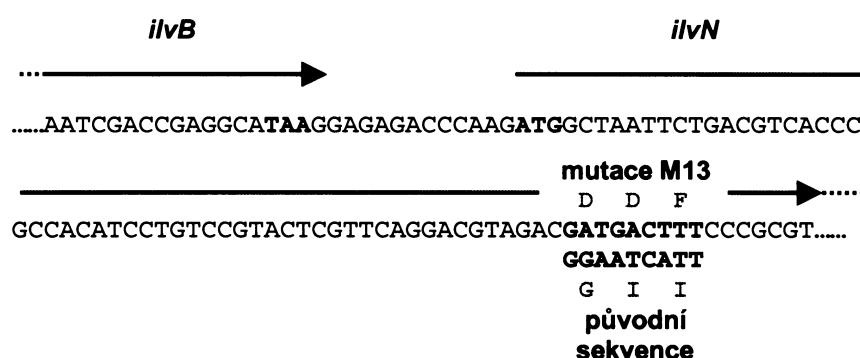
Plazmid	Aktivita AHAS ¹ (U/mg proteinu)	Zbytková aktivita AHAS v přítomnosti 10mM aminokyselin (%)		
		Valin	Leucin	Isoleucin
-	0,0004	-	-	-
pECKAilvBNC	0,11	52	65	57
pECKAilvBNC M11	0,008	32	61	82
pECKAilvBNC M8	0,03	112	105	112
pECKAilvBNC M13	0,06	95	98	108

¹Uvedené hodnoty specifické aktivity AHAS jsou průměrem alespoň tří nezávislých měření, jejichž přesnost byla stanovena vypočítáním směrodatné odchylky. Její hodnoty se pohybovaly v rozmezí ± 18 %.

Z tabulky 4.1. vyplývá, že výsledné mutované klony M8 a M13 získaly očekávaný fenotyp a inhibice enzymu AHAS valinem, leucinem i isoleucinem byla tedy odstraněna. Aktivita enzymu měřená bez přítomnosti inhibitorů však u těchto kmenů poklesla. Tento fakt může být vysvětlen zeslabením vazby mezi katalytickou a regulační podjednotkou enzymu. Vazba regulační podjednotky aktivuje působení podjednotky katalytické, v nepřítomnosti regulační podjednotky si katalytická podjednotka uchovává jen minimální aktivitu. Důkazem tohoto tvrzení je aktivita enzymu AHAS bezplazmidového kmene *C. glutamicum ΔilvN*, jejíž hodnota byla pouze 0,0004 U/mg proteinu. Na základě zmíněné hypotézy by se vazebné místo pro inhibitory, jehož konformace byla cílenou mutagenezí pozměněna, mohlo podílet také na vzájemné vazbě katalytické a regulační podjednotky enzymu AHAS. Druhým závěrem tohoto experimentu je skutečnost, že místně specifickou mutagenezí vazebného místa pro valin byla odstraněna též inhibice leucinem a isoleucinem. Na molekule enzymu tedy zřejmě existuje jediné společné vazebné místo pro tyto tři inhibitory.

4.2.5. Zavedení mutace M13 do chromosomu *C. glutamicum*

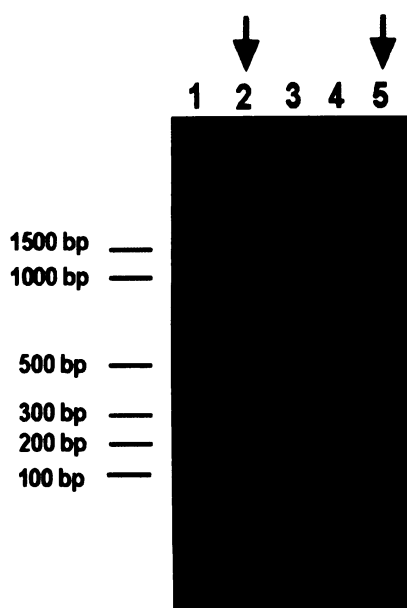
Klonováním ve vysokokopiových vektorech dochází k výraznému zvýšení exprese genů biosyntetických drah, která však často negativně ovlivňuje stabilitu daného plazmidu (Reinscheid *et al.*, 1994). V případě klonování mutovaného operonu *ilvBNC* v *C. glutamicum* $\Delta ilvN$ navíc docházelo k nežádoucím homologním rekombinacím mezi odpovídajícími úseky DNA na chromosomu a ve vektoru pECKA*ilvBNC*, jejichž důsledkem byla postupná výměna mutovaných alel *ilvN* nesených plazmidem za alely obsahující delecii. Z tohoto důvodu bylo navrženo schéma, podle kterého byla nejvhodnější mutace M13 zavedena přímo do chromosomu *C. glutamicum*. Pozice této mutace je pro názornost znovu vyznačena na obrázku 4.11.



Obr. 4.11. Sekvence 5'-konce genu *ilvN* a pozice mutace M13

Červeně jsou zvýrazněny mutované báze, tučným černým písmem původní sekvence v mutované oblasti a modrým písmem stop kodón genu *ilvB* a počátek translace genu *ilvN*. Zeleně jsou vyznačeny aminokyselinové sekvence.

Detailní postup experimentu je uveden v kapitole 3.2.9. v části Materiál a metody. Fragment PCR o velikosti 1,3 kb nesoucí mutaci M13 byl připraven pomocí vnějších primerů DELN1H a DELN2D a plně komplementárních mutačních primerů ILVNM13H a ILVNM13D. S použitím integrativního vektoru pK18mobsacB byla mutace zavedena do chromosomu kmene *C. glutamicum* $\Delta ilvN$ za vzniku stabilního bezplazmidového kmene *C. glutamicum* *ilvNM13*. Deleční kmen $\Delta ilvN$ byl využit z důvodu snadnější selekce výsledných mutantů pomocí PCR (Obr. 4.12.). Hodnoty specifické aktivity AHAS a zpětnovazebné inhibice naměřené u nově zkonstruovaného kmene jsou shrnuty v tabulce 4.2.



Obr. 4.12. PCR-detekce mutantů po výměně deletované alely *ilvN* v chromosomu *C. glutamicum* za alelu nesoucí mutaci M13

Detekce byla založena na syntéze fragmentu DNA vymezeného primery SILVNH a SILVND2, který se liší velikostí u kmene delečního *C. glutamicum* $\Delta ilvN$ (200 bp) a kmenů mutantních *C. glutamicum* *ilvNM13* (300 bp). Obrázek představuje elektroforetickou analýzu fragmentů DNA vzniklých PCR reakcí, kde byla jako templát použita nepurifikovaná totální buněčná DNA (buněčný lyzát testovaných klonů). Dráhy odpovídající mutantním klonům jsou označeny červenou šipkou.

1. velikostní standard DNA (BioLabs)
2. PCR fragment (300 bp) (klon s mutací M13 v genu *ilvN*)
3. PCR fragment (200 bp) (klon s delecí v genu *ilvN*)
4. PCR fragment (200 bp) (klon s delecí v genu *ilvN*)
6. PCR fragment (300 bp) (klon s mutací M13 v genu *ilvN*)

Tab. 4.2. Měření specifické aktivity AHAS a její zpětnovazebné inhibice v bezplazmidovém kmenu *C. glutamicum* *ilvNM13*

Kmen	Aktivita AHAS ¹ (U/mg proteinu)	Zbytková aktivita AHAS v přítomnosti 10mM aminokyselin (%)		
		Valin	Leucin	Isoleucin
WT ²	0,04	43	57	47
<i>ilvNM13</i>	0,03	104	98	105

¹Uvedené hodnoty specifické aktivity AHAS jsou průměrem alespoň tří nezávislých měření, jejichž přesnost byla stanovena vypočítáním směrodatné odchylky. Její hodnoty se pohybovaly v rozmezí $\pm 15\%$.

²Jako kontrola byl použit divoký kmen *C. glutamicum* ATCC 13032.

Podobně jako v případě plazmidových kmenů získal i bezplazmidový kmen *C. glutamicum* *ilvNM13* po cílené mutagenézi rezistenci ke zpětnovazebné inhibici enzymu AHAS. Narozdíl od kmenů plazmidových je však nově zkonstruovaný kmen zcela stabilní. Navíc hodnota aktivity enzymu v přítomnosti 10mM valinu je u kmene mutovaného vyšší než u kmene divokého.

mutačních primerů byla do výsledného fragmentu 1 zavedena mutace měnící triplet CGC v místě D1 na stop kodón TGA, tato mutace byla bezprostředně následována delecí o velikosti 142 bp. Fragment 2 (1,2 kb) byl připraven pomocí shodných vnějších primerů DELNH3 a DELND4 a mutačních primerů DELND5 a DELNH5. Také v tomto případě byla do fragmentu 2 zavedena mutace, která pozměnila triplet CGA v místě D2 na stop kodón TGA a ihned za ním byla vytvořena delece o velikosti 96 bp. Oba fragmenty byly štěpeny restričním enzymem *EcoRI* a klonovány ve vektoru pK18mobsacB, s jehož pomocí byly zavedeny do chromosomu divokého kmene *C. glutamicum* ATCC 13032. Výsledné kmeny *C. glutamicum ilvNstop 1* a *C. glutamicum ilvNstop 2*, obsahující zkrácenou formu regulační podjednotky enzymu AHAS, byly stabilní, avšak ani v jednom případě neodpovídala specifická aktivita enzymu očekávaným hodnotám (Tab. 4.3.).

Tab. 4.3. Měření specifické aktivity AHAS a její zpětnovazebné inhibice valinem v bezplazmidových kmenech *C. glutamicum ilvNstop 1* a *C. glutamicum ilvNstop 2* se zkrácenými regulačními podjednotkami enzymu AHAS

Kmen	Aktivita AHAS ¹ (U/mg proteinu)	Zbytková aktivita AHAS v přítomnosti 10mM valinu (%)
WT ²	0,03	35
<i>ilvNstop 1</i>	0,003	100
<i>ilvNstop 2</i>	0,01	73

¹Uvedené hodnoty specifické aktivity AHAS jsou průměrem alespoň tří nezávislých měření, jejichž přesnost byla stanovena vypočítáním směrodatné odchylky. Její hodnoty se pohybovaly v rozmezí $\pm 17\%$.

²Jako kontrola byl použit divoký kmen *C. glutamicum* ATCC 13032.

Z výsledků uvedených v tabulce 4.3. je patrné, že u obou nově zkonstruovaných kmenů *C. glutamicum ilvNstop 1* a *C. glutamicum ilvNstop 2* došlo k odstranění nebo výraznému snížení inhibice enzymu AHAS 10mM valinem, zároveň však tato zkrácení genu *ilvN* způsobila markantní pokles enzymové aktivity. Tyto kmeny proto nebyly využity v dalších experimentech.

4.3. Konstrukce kmenů *C. glutamicum* produkujících valin

Na základě výsledků popsaných v předchozích dvou kapitolách byla zahájena konstrukce nových kmenů *C. glutamicum* produkujících valin. Byla zkonstruována řada bezplazmidových i plazmidových kmenů s různými kombinacemi následujících genomových zásahů: delece v genu *ilvA*, delece v genu *panB*, delece atenuátoru promotoru genu *ilvB*, mutace M13 v genu *ilvN* a zvýšení exprese operonu *ilvBNC* klonováním v mnohokopiovém vektoru. V této části oddílu Výsledky budou nejprve blíže popsány jednotlivé zmíněné manipulace, dále budou uvedeny hodnoty produkce valinu u vybraných kmenů, stanovené metodou HPLC, a porovnán vliv jednotlivých genomových zásahů na výslednou produkci. Obsahem poslední kapitoly výsledkové části je potom analýza některých fyziologických vlastností dosud nejlepšího získaného produkčního kmene.

4.3.1. Zavedení delece do genu *ilvA*

Gen *ilvA* kóduje enzym threonindeaminasu, která katalyzuje přeměnu threoninu na 2-ketobutyřát, jeden ze substrátů studovaného enzymu AHAS (Obr. 2.2.). Kondenzací 2-ketobutyřátu a pyruvátu je zahájena řada biochemických reakcí, na jejímž konci vzniká aminokyselina isoleucin. Paralelní kondenzací dvou molekul pyruvátu, která je též katalyzována enzymem AHAS, začíná kaskáda reakcí končící tvorbou valinu. Z obou uvedených substrátů enzymu AHAS je 2-ketobutyřát substrátem preferenčním, tedy i dráha vedoucí k syntéze isoleucinu je upřednostněna na úkor dráhy zajišťující tvorbu valinu. Zavedením delece do genu *ilvA* byla zastavena syntéza konkurenčního 2-ketobutyřátu, pyruvát se stal jediným dostupným substrátem enzymu AHAS a produkce valinu vzrostla. Výsledný auxotrofní kmen *C. glutamicum* $\Delta ilvA$ však nebyl schopen syntetizovat isoleucin.

Postup zavedení delece $\Delta ilvA$ do chromosomu divokého kmene *C. glutamicum* ATCC 13032 je detailně popsán v kapitole 3.2.9. v části Materiál a metody. K přípravě fragmentu PCR (1,2 kb) nesoucího deleci o velikosti 368 bp byly využity vnější primery DELILVAH1 a DELILVAD2 a mutační primery DELILVAD1 a DELILVAH2. Výsledný fragment byl štěpen restrikčním enzymem *EcoRI* a klonován v integrativním vektoru pK18mobsacB, s jehož pomocí byl zaveden do chromosomu *C. glutamicum*.

4.3.2. Zavedení delece do genu *panB*

Biosyntetická dráha vitamínu pantothenátu se odvětjuje od dráhy syntetizující valin a odčerpává tak její metabolity (Obr. 2.2.). Místo větvení je reprezentováno 2-ketoisovalerátem, společným substrátem pro následující dva enzymy: 1) transaminasu, katalyzující poslední reakci biosyntetické dráhy valinu a 2) ketopantoáthydroxymethyltransferasu, kódovanou genem *panB* a katalyzující první reakci specifickou pro syntézu pantothenátu. Inaktivací genu *panB* zavedením delece bylo zastaveno odčerpávání 2-ketoisovalerátu konkurenční drahou a tím umožněno maximální využití tohoto intermediátu ve prospěch syntézy valinu. I v tomto případě se však výsledný kmen *C. glutamicum* $\Delta panB$ stal auxotrofem dependentním na přídavek pantothenátu do kultivačního media.

Syntéza fragmentu (1,2 kb) nesoucího deleci (200 bp) i zavedení delece do chromosomu *C. glutamicum* pomocí vektoru pK18mobsacB je opět detailně popsáno v kapitole 3.2.9. V tomto experimentu byly využity vnější primery DELPANBH1 a DELPANBD2, mutační primery DELPANBD1 a DELPANBH2 a restriční enzym *PstI* pro ligaci delečního fragmentu s vektorem pK18mobsacB.

4.3.3. Zavedení delece atenuátoru do vedoucí sekvence genu *ilvB*

Základem pro zavedení delece atenuátoru do vedoucí sekvence genu *ilvB* byly výsledky transkripční analýzy promotoru P-*ilvB*, shrnuté v kapitole 4.1.1. Z těchto výsledků vyplývá, že přítomnost atenuátoru snižuje za podmínek nelimitovaného růstu aktivitu promotoru 25-30x. Z tohoto důvodu bylo navrženo zavedení delece atenuátoru promotoru P-*ilvB* přímo do chromosomu *C. glutamicum*, jehož očekávaným důsledkem mělo být zvýšení exprese operonu *ilvBNC*.

Experiment byl opět proveden s využitím vektoru pK18mobsacB postupem popsaným v kapitole 3.2.9. Fragment PCR (1.2 kb) nesoucí deleci o velikosti 221 bp byl připraven pomocí vnějších primerů DELATTH a DELATTD a mutačních primerů ATT3 a ATT4. Oblast zaváděné delece je znázorněna na obrázku 4.14. Výsledkem experimentu byl kmen *C. glutamicum* $\Delta AttilvB$.

4.3.6. Měření produkce valinu u vybraných kmenů *C. glutamicum*

Produkce valinu byla měřena pomocí HPLC u vybraných nově zkonstruovaných kmenů *C. glutamicum*, nesoucích různé kombinace dosud popsaných genomových úprav. Výsledná koncentrace valinu byla stanovena po 48-hodinové kultivaci buněk v minimálním mediu MM CGXII. Auxotrofní kmeny nesoucí delecii v genech *ilvA* a *panB* byly kultivovány za podmínek limitovaného růstu, způsobeného přítomností 0,9mM isoleucinu a 0,5 μ M pantothenátu. Hodnoty naměřených produkcí a vliv jednotlivých genomových zásahů na výslednou produkci jsou shrnuty v tabulkách 4.4. - 4.9. Uvedené výsledky jsou průměrem alespoň tří nezávislých měření, jejichž přesnost byla stanovena vypočítáním směrodatné odchylky. Její hodnoty se pohybovaly v rozmezí $\pm 25\%$.

Tab. 4.4. Vliv delece *ilvA* a delece *panB* na produkci valinu

Kmen <i>C. glutamicum</i>	Produkce valinu (mM)	Efekt $\Delta ilvA \Delta panB$ na produkci valinu
ATCC 13032 (WT)	1,3	zvýšení 25x
$\Delta ilvA \Delta panB$	32,8	
<i>ilvNM13</i>	15,3	zvýšení 5,7x
$\Delta ilvA \Delta panB ilvNM13$	87,3	

Tab. 4.5. Vliv chromosomové mutace M13 na produkci valinu

Kmen <i>C. glutamicum</i>	Produkce valinu (mM)	Efekt chromosomové mutace M13 na produkci valinu
ATCC 13032 (WT)	1,3	zvýšení 12x
<i>ilvNM13</i>	15,3	
$\Delta ilvA \Delta panB$	32,8	zvýšení 2,7x
$\Delta ilvA \Delta panB ilvNM13$	87,3	
$\Delta ilvA \Delta panB \Delta AttilvB$	8	zvýšení 4,5x
$\Delta ilvA \Delta panB \Delta AttilvB ilvNM13$	36,1	

Tab. 4.6. Společný vliv delece *ilvA*, delece *panB* a chromosomové mutace M13 na produkci valin

Kmen <i>C. glutamicum</i>	Produkce valinu (mM)	Efekt na produkci valinu
ATCC 13032 (WT)	1,3	
<i>ilvNM13</i>	15,3	zvýšení 12x
$\Delta ilvA \Delta panB$	32,8	zvýšení 25x
$\Delta ilvA \Delta panB ilvNM13$	87,3	zvýšení 67x

Tab. 4.7. Vliv delece atenuátoru promotoru genu *ilvB* na produkci valinu

Kmen <i>C. glutamicum</i>	Produkce valinu (mM)	Efekt Δ Att <i>ilvB</i> na produkci valinu
Δ <i>ilvA</i> Δ <i>panB</i>	32,8	snížení 4,1x
Δ <i>ilvA</i> Δ <i>panB</i> Δ Att <i>ilvB</i>	8	
Δ <i>ilvA</i> Δ <i>panB</i> <i>ilvNM13</i>	87,3	snížení 2,4x
Δ <i>ilvA</i> Δ <i>panB</i> <i>ilvNM13</i> Δ Att <i>ilvB</i>	36,1	

Tab. 4.8. Vliv přítomnosti plazmidu pECKA*ilvBNC* na produkci valinu

Kmen <i>C. glutamicum</i>	Produkce valinu (mM)	Efekt pECKA <i>ilvBNC</i> na produkci valinu
ATCC 13032 (WT)	1,3	zvýšení 23x
ATCC 13032 (WT)/pECKA <i>ilvBNC</i>	30,5	
Δ <i>ilvA</i> Δ <i>panB</i>	32,8	zvýšení 3,6x
Δ <i>ilvA</i> Δ <i>panB</i> /pECKA <i>ilvBNC</i>	118,5	
Δ <i>ilvA</i> Δ <i>panB</i> <i>ilvNM13</i>	87,3	zvýšení 1,5x
Δ <i>ilvA</i> Δ <i>panB</i> <i>ilvNM13</i> /pECKA <i>ilvBNC</i>	126,8	
Δ <i>ilvA</i> Δ <i>panB</i> <i>ilvNM13</i> Δ Att <i>ilvB</i>	36,1	zvýšení 2,4x
Δ <i>ilvA</i> Δ <i>panB</i> <i>ilvNM13</i> Δ Att <i>ilvB</i> /pECKA <i>ilvBNC</i>	86	

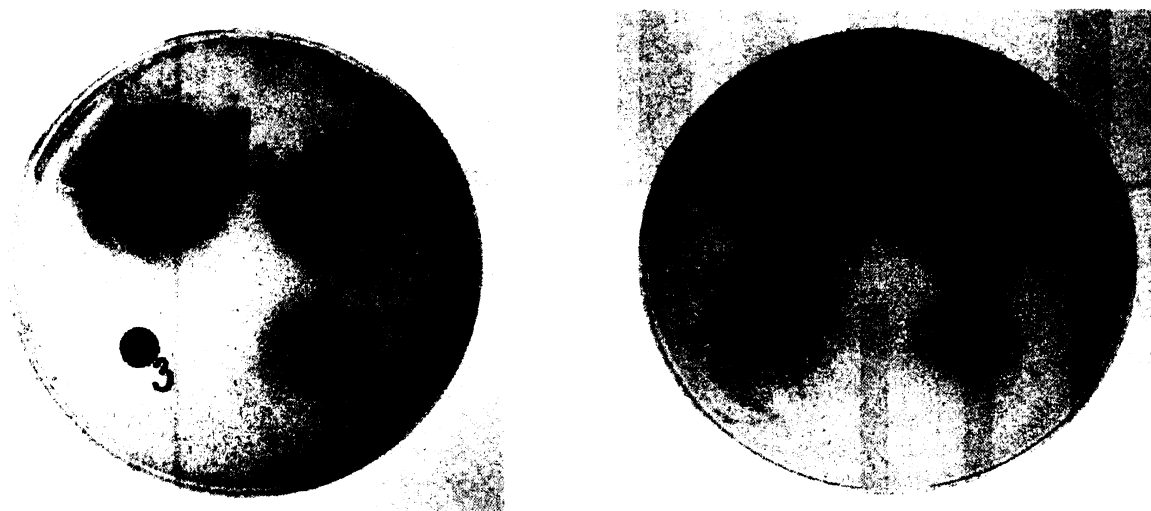
Tab. 4.9. Vliv chromosomové mutace M13 a mutace M13 nesené na plazmidu pECKA na produkci valinu

Kmen <i>C. glutamicum</i>	Produkce valinu (mM)	Efekt chromosomové mutace M13 a mutace M13 nesené plazmidem na produkci valinu
ATCC 13032 (WT)/pECKA <i>ilvBNC</i>	30,5	zvýšení 1,6x
<i>ilvNM13</i> /pECKA <i>ilvBNC</i> M13	50	
Δ <i>ilvA</i> Δ <i>panB</i> /pECKA <i>ilvBNC</i>	118,5	mírné zvýšení
Δ <i>ilvA</i> Δ <i>panB</i> <i>ilvNM13</i> /pECKA <i>ilvBNC</i> M13	123,5	

Z výsledků uvedených v tabulkách je patrné, že zatímco delece v genech *ilvA* a *panB*, mutace M13 v genu *ilvN* a klonování operonu *ilvBNC* prokazatelně zvyšují produkci valinu, delece atenuátoru ve vedoucí sekvenci genu *ilvB* způsobuje výrazné snížení produkce. Negativní efekt delece atenuátoru byl potvrzen také měřením specifické aktivity enzymu AHAS. Ve srovnání s divokým kmenem *C. glutamicum* ATCC 13032 (specifická aktivita AHAS = 0,033 U/mg proteinu) byla u kmene *C. glutamicum* Δ Att*ilvB* naměřena pouze aktivita poloviční (0,015 U/mg proteinu). Překlonováním dané oblasti do *promoter-probe* vektoru pET2 a měřením specifické aktivity CAT však bylo prokázáno, že zmíněný negativní efekt není způsoben snížením aktivity promotoru P-*ilvB* během konstrukce

delečního kmene. Naopak, transkripční aktivita fragmentu nesoucího vedoucí sekvenci genu *ilvB* s delecí v atenuátoru (4 U/mg proteinu) byla za nelimitujících podmínek téměř 2,5x vyšší než aktivita nejsilnějšího fragmentu B1 (kapitola 4.1.1.) nesoucího pouze vlastní promotor P-*ilvB* a nedokonalé přímé repetice (DR) (specifická aktivita CAT = 1,7 U/mg proteinu) a 57x vyšší než aktivita nedeletovaného fragmentu B2 (specifická aktivita CAT = 0,07 U/mg proteinu). Možným vysvětlením negativního vlivu delece atenuátoru ve vedoucí sekvenci genu *ilvB* na aktivitu enzymu AHAS a výslednou produkci valinu by mohla být agregace regulačních (popřípadě katalytických) podjednotek, způsobená jejich zvýšenou expresí (Mendel *et al.*, 2003).

Positivní vliv přítomnosti mutace M13 v chromosomu *C. glutamicum* je velmi dobře patrný také z obrázku 4.15., který ukazuje výsledek jednoduchého testu produkce valinu na Petriho miskách (metoda je popsána v kapitole 3.2.12.1. v sekci Materiál a metody).



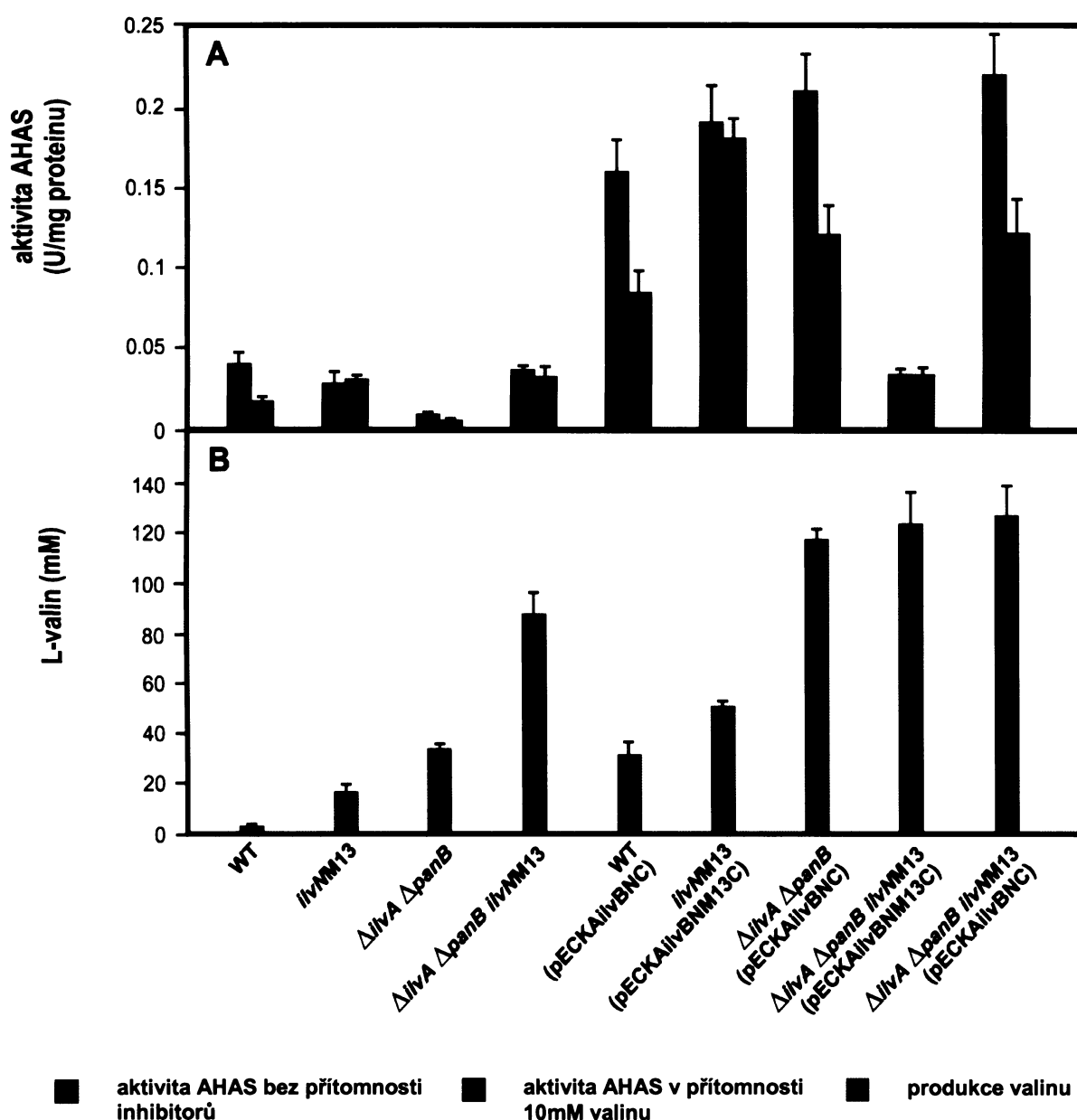
- 1 *C. g. ΔilvA ΔpanB/pECKAilvBNC*
- 2 *C. g. ilvNM13*
- 3 *C. g. ΔAtt/ilvB*
- 4 *C. g. ATCC 13032 (WT)*

- 1 *C. g. ΔilvA ΔpanB/pECKAilvBNC*
- 2 *C. g. ΔilvA ΔpanB ilvNM13*
- 3 *C. g. ΔilvA ΔpanB*
- 4 *C. g. ATCC 13032 (WT)*

Obr. 4.15. Test produkce valinu na Petriho miskách

Na Petriho misky obsahující minimální medium MM CGXII s leucinem, isoleucinem a pantothenátem byl hustě rozetřen podkladový detekční kmen *C. glutamicum* $\Delta ilvB$, který bez přítomnosti valinu není schopen samostatného růstu. Po zaschnutí bylo na povrch nanášeno po 3 μ l suspenze kultur čtyř testovaných produkčních kmenů *C. glutamicum* a po 48-72 hodinách byly porovnány růstové zóny auxotrofního kmene kolem kmenů testovaných. Velikost této růstové zóny je úměrná schopnosti testovaného kmene produkovat valin do media a komplementovat tak deficienci detekčního kmene.

U vybraných kmenů *C. glutamicum* nesoucích genomové zásahy pozitivně působící na produkci valinu byla kromě výsledné hodnoty produkce stanovena také specifická aktivita enzymu AHAS a její inhibice v přítomnosti 10mM valinu. Výsledek tohoto pokusu je graficky znázorněn na obrázku 4.16. Zcela podle očekávání došlo ke ztrátě citlivosti enzymu AHAS ke zpětnovazební inhibici u všech kmenů syntetizujících pouze mutovaný typ regulační podjednotky (tedy u bezplazmidových kmenů s mutací M13 v genu *ilvN* a u plazmidových kmenů nesoucích mutaci M13 v chromosomu i na plazmidu).

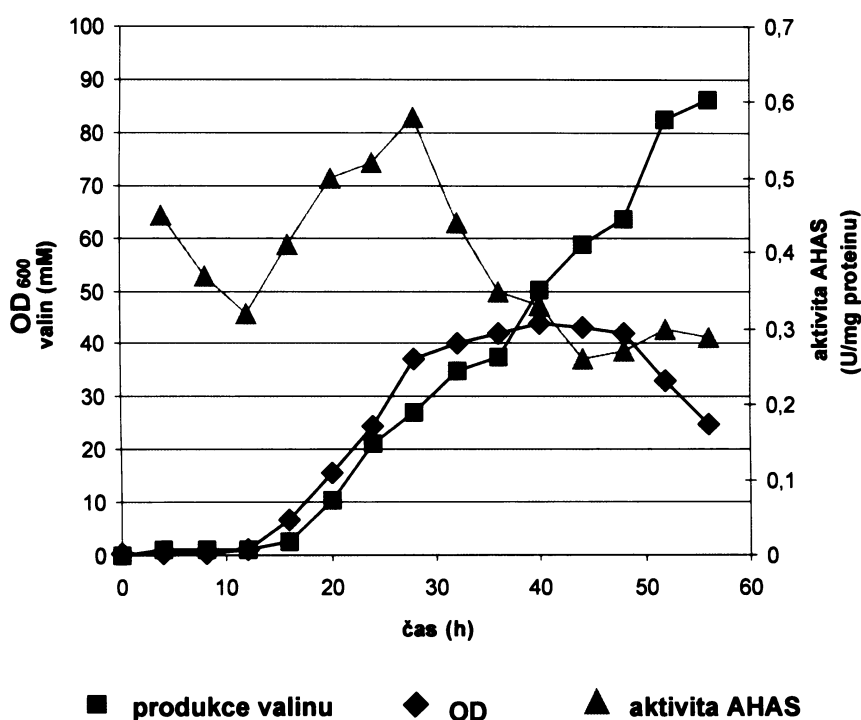


Obr. 4.16. Specifická aktivita AHAS a produkce valinu u vybraných kmenů *C. glutamicum*

Specifická aktivita AHAS byla měřena během exponenciální fáze růstu, výsledná produkce valinu byla stanovena po 48-hodinové kultivaci metodou HPLC. Uvedené hodnoty jsou výsledkem alespoň tří nezávislých měření.

4.3.7. Charakterizace kmene *C. glutamicum* $\Delta ilvA \Delta panB ilvNM13/pECKAilvBNC$

Nejlepším producentem valinu zkonstruovaným v této práci je plazmidový kmen *ΔilvA ΔpanB ilvNM13/pECKAilvBNC*, jehož produkce dosáhla až 127mM valinu po 48 hodinách kultivace. Za účelem lepší charakterizace tohoto kmene byl proveden experiment, ve kterém byly v průběhu kultivace v minimálním mediu MM CGXII stanoveny tři fyziologické parametry: optická denzita buněk, specifická aktivita enzymu AHAS a produkce valinu. Získané hodnoty a jejich závislost na čase jsou znázorněny na obrázku 4.17. Z vynesných křivek vyplývá, že produkce valinu vzrůstá paralelně s růstem buněčné kultury, lineární akumulace valinu však pokračuje i ve stacionární fázi, kdy už optická denzita nestoupá. Specifická aktivita enzymu AHAS se zvyšuje během exponenciální fáze růstu a na jejím konci dosáhne vrcholu. S přechodem buněčné kultury do fáze stacionární však prudce klesá.



Obr. 4.17. Specifická aktivita AHAS a produkce valinu v průběhu kultivace *C. glutamicum* $\Delta ilvA \Delta panB ilvNM13/pECKAilvBNC$

Optická denzita, specifická aktivita AHAS a produkce valinu byly měřeny u nejlepšího získaného producenta valinu během 56-hodinové jednorázové kultivace v minimálním mediu MM CGXII. Kmen byl limitován přítomností 0,9mM isoleucinu a 0,5 μ M pantothenátu. Produkce valinu byla stanovena pomocí HPLC.

5. DISKUSE

Cílem této disertační práce byla analýza klíčového kroku biosyntetické dráhy valinu v *C. glutamicum*. Tento krok je reprezentován kondenzační reakcí katalyzovanou syntasou acetohydroxykyselin (AHAS). Součástí komplexní regulace aktivity enzymu AHAS je v buňkách *C. glutamicum* katalýza homologních reakcí, odlišná afinita enzymu k různým substrátům, multivalentní zpětnovazebná inhibice, regulace exprese předčasnou terminací transkripce a pravděpodobně také přímá aktivace iniciace transkripce (Eggeling *et al.*, 1987; Keilhauer *et al.*, 1993; Morbach *et al.*, 2000; Radmacher *et al.*, 2002).

Valin je jako esenciální aminokyselina velmi důležitým biotechnologickým produktem, jenž je používán jako přísada do krmných směsí nebo nezbytná složka infuzních roztoků (Glazer a Nikaido, 1995). Z tohoto důvodu byly získané výsledky využity ke konstrukci nových kmenů produkujících zvýšené množství této aminokyseliny.

Pro snadnější orientaci je diskuse, stejně jako výsledková část, rozdělena do tří kapitol. První kapitola se zabývá analýzou regulace klíčového enzymu AHAS na úrovni transkripce, druhá kapitola analýzou regulace enzymu na úrovni jeho aktivity a ve třetí části je diskutována konstrukce a vlastnosti nových produkčních kmenů.

5.1. Transkripční analýza genů *ilvB* a *ilvN*

5.1.1. Promotor P-*ilvB*

Promotor genu *ilvB*, který kóduje katalytickou podjednotku enzymu AHAS, byl již v nedávné době podrobněji studován, stanovena byla rovněž jeho přesná poloha (Keilhauer *et al.*, 1993; Morbach *et al.*, 2000). Regulaci promotoru zajišťuje především atenuace, jež je řízena všemi třemi větvenými aminokyselinami, částečně se pravděpodobně uplatňuje také přímá nebo nepřímá aktivace transkripce. Za účelem detailní analýzy promotoru P-*ilvB* byly do promotorové sondy pET2 vloženy čtyři fragmenty DNA (B1, B2, B3 a B4) nesoucí různé části vedoucí sekvence genu *ilvB* (Obr. 4.2.A). U těchto fragmentů byla za různých fyziologických podmínek stanovena jejich promotorová aktivita. V souladu s výsledky, které již byly publikovány, bylo při hladovění testované buněčné kultury na valin detekováno zvýšení promotorové aktivity u fragmentů B2 a B4 nesoucích atenuátor. Zatímco v případě, kdy reportérovým enzymem byla β -galaktosidasa a limitující živinou 2,5mM valin (Morbach *et al.*, 2000) došlo pouze ke dvojnásobnému zvýšení promotorové aktivity, u sondy pET2 za

přítomnosti 0,2mM valinu vzrostla aktivita promotoru šestnáctkrát (fragment B2) až třicetkrát (fragment B4).

V souvislosti s právě popsanými experimenty je rovněž zajímavé zmínit a porovnat tři různé způsoby kultivace, které více či méně vedly k vyhladovění testovaných buněčných kultur. Nejprve byly pro kultivaci v minimálním mediu MM CGXII s nadbytkem valinu (10mM koncentrace) a s limitující koncentrací valinu (0,2mM koncentrace) použity dvě oddělené kultivační baňky. Získané výsledky však mohly být ovlivněny chybou, jež vznikla porovnáváním dvou zcela nezávisle rostoucích buněčných kultur. Navíc byl pokus v tomto provedení náročný na čas i množství použitých kultivačních baněk. Z tohoto důvodu bylo schéma experimentu upraveno pro jedinou baňku, ve které probíhala nejprve kultivace v nadbytku valinu. Jakmile kultura dosáhla exponenciální fáze růstu, byla odebrána polovina buněčné suspenze a vzorek byl zpracován pro stanovení specifické aktivity CAT. Následovalo promytí druhé poloviny buněčné kultury, které mělo odstranit veškerý valin přítomný v kultivačním mediu, a poté kultivace za podmínek limitující koncentrace valinu. Tímto způsobem se však i přes pečlivé a opakované promývání kultury nikdy nepodařilo použitý auxotrofní kmen *C. glutamicum* $\Delta ilvB$ zcela vyhladovět. Na základě uvedených problémů byl zvolen třetí způsob kultivace popsáný v kapitole 4.1.1., kde v jediné kultivační baňce probíhala nejprve kultivace za podmínek limitující koncentrace valinu. V okamžiku, kdy se růst kultury vlivem hladovění zastavil, byla odebrána polovina buněčné suspenze a vzorek byl zpracován pro stanovení specifické aktivity CAT. Ke druhé polovině buněčné suspenze byl přidán valin o konečné koncentraci 10mM a kultura byla dále kultivována, dokud nedošlo k obnovení exponenciálního růstu buněk. Toto schéma pokusu, jež bylo použito také během analýzy promotoru P-*ilvN*, nakonec poskytlo nej přesnější a nejprůkaznější výsledky měření.

Porovnáním promotorových aktivit fragmentů B1 a B3 (popřípadě B2 a B4), které se liší pouze přítomností nedokonalé přímé repetice lokalizované před (*upstream*) vlastním jádrem promotoru P-*ilvB* (Obr. 4.2.A, Obr. 2.3.), bylo zjištěno, že tato repetice zodpovídá za aktivaci promotoru. Jako možný aktivátor, který by mohl působit prostřednictvím nedokonalé přímé repetice, byl testován 2-ketobutyrát, v jehož přítomnosti výrazně vzrůstá aktivita enzymu AHAS (až 7x) i množství transkriptu *ilvBNC* v buňkách (Keilhauer *et al.*, 1993; Morbach *et al.*, 2000). Promotorové aktivity fragmentů B1, B2, B3 a B4 za přítomnosti 2-ketobutyrátu byly měřeny v divokém kmeni *C. glutamicum* 13032 a auxotrofním kmeni *C. glutamicum* $\Delta ilvA$. Kmen $\Delta ilvA$ není schopen syntetizovat 2-ketobutyrát a nevytváří tak nežádoucí pozadí experimentu. Pokus byl navržen v několika schématech: 1) kultivace testovaných kultur v přítomnosti 0mM, 5mM, 20mM, 50mM a

100mM 2-ketobutyátu nebo 2) tří-hodinové indukce 50mM a 100mM 2-ketobutyátem. Porovnány byly výsledné hodnoty promotorových aktivit odpovídajících fragmentů B1 a B3 (popřípadě B2 a B4), které se liší pouze přítomností nedokonalé přímé repetice. Ani pod vlivem 100mM 2-ketobutyátu však nebyl v případě fragmentu B1 nesoucího repetici zaznamenán nárůst promotorové aktivity ve srovnání s fragmentem B3. Tento výsledek může být vysvětlen dvěma způsoby: 1) 2-ketobutyrát nepůsobí jako aktivátor promotoru P-*ilvB*. Aktivaci promotoru potom zajišťuje jiná, dosud neznámá látka, nebo sama sekvence DNA, jež v přítomnosti nedokonalé přímé repetice zaujímá výhodnější konformaci pro vazbu RNA-polymerasy a iniciaci transkripce. 2) 2-ketobutyrát působí jako aktivátor promotoru P-*ilvB*, avšak nikoliv prostřednictvím nedokonalé přímé repetice. Obě tyto hypotézy musí být dále studovány. V případě fragmentů, které nesou navíc sekvenci atenuátoru (fragmenty B2 a B4), došlo k dvojnásobnému (fragment B2) až k trojnásobnému (fragment B4) zvýšení promotorové aktivity vlivem přítomnosti 50mM 2-ketobutyátu v kultivačním mediu. Tento jev však může být vysvětlen právě na základě regulace promotoru P-*ilvB* atenuací. Klíčový enzym dráhy (enzym AHAS) totiž projevuje vyšší substrátovou specifitu k 2-ketobutyátu než k pyruvátu. Z tohoto důvodu výrazný nadbytek 2-ketobutyátu v kultivačním mediu posunuje tok metabolitů ve prospěch isoleucinu (respektive dráha běží téměř výhradně směrem k isoleucinu), buňka začíná hladovět na valin a leucin a exprese operonu *ilvBNC* vlivem atenuace stoupá.

Detailní analýza promotoru P-*ilvB* rovněž odhalila, že odstranění atenuátorové sekvence zvýší aktivitu tohoto promotoru až 30x (Obr. 4.2.: srovnání promotorových aktivit fragmentů B1 a B2 (popřípadě B3 a B4) při nelimitovaném růstu v minimálním mediu). Z tohoto důvodu byla navržena delece atenuátoru promotoru P-*ilvB* přímo v chromosomu *C. glutamicum*. Na základě této hypotézy mělo dojít ke zvýšení exprese operonu *ilvBNC*, které by mělo podobný důsledek jako klonování operonu v mnohokopiovém replikativním vektoru (tedy zvýšení produkce valinu). Navržený předpoklad však nebyl potvrzen. I když se transkripční aktivita takto upravené vedoucí sekvence genu *ilvB* prokazatelně zvýšila (potvrzeno překlonováním daného úseku DNA do *promoter-probe* vektoru pET2), specifická aktivita enzymu AHAS se ve srovnání s divokým kmenem *C. glutamicum* 13032 snížila na polovinu a výsledná produkce valinu až 4x. Řešením tohoto problému by mohlo být vytvoření delece nikoliv celé oblasti atenuátoru, ale pouze jeho specifické části. Podobný experiment totiž prokázal, že delece o velikosti 9 nukleotidů ve vzdálenosti přibližně 30 bp od atenuátorové sekvence mírně zvyšuje transkripční aktivitu vedoucí sekvence genu *ilvB* (Morbach *et al.*, 2000).

5.1.2. Promotor P-*ilvN*

Narozdíl od promotoru P-*ilvB* nebyl promotor genu *ilvN* pro regulační podjednotku enzymu AHAS dosud identifikován. Jeho existence však byla prokázána *Northern* analýzou operonu *ilvBNC*, která odhalila přítomnost transkriptu *ilvNC* o velikosti 2,3 kb (Keilhauer *et al.*, 1993). Podobně jako enzym AHAS III. z *E. coli*, také homolog z *C. glutamicum* pro svoji maximální aktivitu zřejmě vyžaduje nadbytek molekul regulační podjednotky. Funkcí transkriptu *ilvNC* je tedy pravděpodobně zajistit dostatečně vysokou koncentraci této podjednotky v buňce. Zatímco v *E. coli* jsou obě podjednotky enzymu AHAS přepisovány vždy společně z jediného promotoru, potenciální interní promotor situovaný před genem *ilvN* byl nalezen také v *Methanococcus aeolicus* (Bowen *et al.*, 1997).

Přesná poloha promotoru P-*ilvN* v *C. glutamicum* byla stanovena metodou *primer-extension*, která prokázala, že transkripční start genu *ilvN* leží uvnitř předcházejícího genu *ilvB* v poměrně velké vzdálenosti (337 bp) od počátku translace genu *ilvN*. Na základě počítačové i funkční analýzy souboru promotorů pocházejících z *C. glutamicum* spadá promotor P-*ilvN* se svými oblastmi -10 (TAAACT) a -35 (ATGAAG) mezi středně silné transkripční signály (Pátek *et al.*, 1996; Vašicová *et al.*, 1999; Pátek *et al.*, 2003b).

Oblast mezi transkripčním a translačním počátkem genu *ilvN* byla dále analyzována, a to postupným zkracováním daného úseku směrem k transkripčnímu startu genu *ilvN*. Tímto způsobem byly připraveny čtyři fragmenty DNA o různé délce (N1, N2, N3 a N4) (Obr. 4.3.A), u nichž byla pomocí promotorové sondy pET2 stanovena jejich promotorová aktivita. Na základě deleční analýzy bylo zjištěno, že zmíněná oblast zodpovídá za represi transkripce probíhající z promotoru P-*ilvN*. Tuto hypotézu potvrzují promotorové aktivity jednotlivých testovaných fragmentů DNA, které se snižují spolu s rostoucí délkou fragmentu. Mechanismus této regulace nebyl dosud objasněn, zcela jistě se však jedná o jiný typ kontroly exprese než v případě promotoru P-*ilvB*. Poloha této oblasti uvnitř strukturního genu *ilvB* totiž snižuje možnosti výskytu regulačních smyček a vlásenek. Přítomnost těchto sekundárních struktur nebyla potvrzena ani počítačovou analýzou sekvence DNA.

5.2. Konstrukce enzymu AHAS rezistentního ke zpětnovazebné inhibici

V buňkách *C. glutamicum* podléhá enzym AHAS multivalentní zpětnovazebné regulaci všemi třemi aminokyselinami s větveným řetězcem (valinem, leucinem a isoleucinem) (Eggeling *et al.*, 1987). V produkčních kmenech *C. glutamicum* vnitrobuněčná koncentrace těchto aminokyselin výrazně vzrůstá, například v buňkách kmene produkujícího valin byla stanovena koncentrace valinu až 75mM a koncentrace leucinu 15mM (Leyval *et al.*, 2003). Tyto koncentrace větvených aminokyselin již mohou mít výrazně negativní vliv na aktivitu enzymu AHAS, a proto jedním z cílů této disertační práce bylo připravit enzym rezistentní ke zpětnovazebné inhibici. Takto upravené klíčové enzymy bývají často využívány pro konstrukci produkčních kmenů (Ogawa-Miyata *et al.*, 2001). Pro přípravu enzymu AHAS rezistentního ke zpětnovazebné inhibici byla využita metoda místně specifické mutagenese. Experiment byl nejprve prováděn v plazmidovém systému s použitím nově sestaveného podvojného vektoru pECKA. Podkladem pro návrh tohoto pokusu byly výsledky získané náhodnou mutagenézí u *S. cinnamomensis* a *E. coli* (Vyazmensky *et al.*, 1996; Kopecký *et al.*, 1999; Pospíšil *et al.*, 1998; Pospíšil *et al.*, 1999). Po místně specifické mutagenesi byly izolovány tři mutované klony M8, M11 a M13 (Obr. 4.10.), u nichž byla stanovena specifická aktivita enzymu AHAS a její inhibice větvenými aminokyselinami (Tab. 4.1.).

Zatímco aktivita divoké formy enzymu byla jednotlivými aminokyselinami (v koncentraci 10mM) inhibována z 35 % (inhibice leucinem) až 50 % (inhibice valinem), mutanti M8 a M13 získali úplnou rezistenci k této inhibici. Současně však, ve srovnání s divokým typem, specifická aktivita mutantů bez přítomnosti inhibitorů významně poklesla, pravděpodobně vlivem oslabení vazby mezi regulační a katalytickou podjednotkou.

Zcela v souladu s publikovanými daty byl nejsilnějším inhibitorem divoké formy enzymu AHAS valin (Leyval *et al.*, 2003). V buňkách kmenů *C. glutamicum* produkujících valin je tak aktivita enzymu AHAS regulována pravděpodobně zejména touto aminokyselinou. Také pro většinu ostatních dosud popsáných enzymů AHAS má větší fyziologický význam pouze inhibice valinem. Příkladem může být isoenzym AHAS III. z *E. coli*, kde inhibice touto aminokyselinou může dosáhnout až 85 % (De Felice *et al.*, 1977), nebo nově charakterizovaná synthasa acetoxykyselin z *Bacillus stearothermophilus* (Porat *et al.*, 2004). Enzymy AHAS v divokém kmeni *C. glutamicum* nebo v rostlinách podléhají zpětnovazebné regulaci všemi třemi větvenými aminokyselinami, v *C. glutamicum* však i v případě jejich společného působení nepřesáhne inhibice enzymu 50%.

Zavedením mutace M13 a M8 do genu *ilvN* pro regulační podjednotku enzymu AHAS došlo k odstranění inhibice enzymu nejen valinem, ale také leucinem a isoleucinem. Tento výsledek naznačuje, že na molekule enzymu AHAS z *C. glutamicum* velmi pravděpodobně existuje jediné společné vazebné místo pro všechny tři zpětnovazebně působící inhibitory. Toto allosterické vazebné místo se pravděpodobně nachází na rozhraní interagujících N-terminálních domén obou regulačních podjednotek enzymu (Obr. 2.6.) (Mendel *et al.*, 2001). Zcela jiná situace byla popsána u rostlinného homologa z *Arabidopsis thaliana* (Lee a Duggleby, 2002). Regulační podjednotka enzymu AHAS obsahuje u těchto rostlin dvě sekvenční repetice, z nichž jedna pravděpodobně váže pouze leucin a druhá valin a isoleucin. Na molekule tohoto enzymu tak existují dvě oddělená allosterická vazebná místa.

Klonování deregulovaných biosyntetických genů ve vysokokopiových vektorech často způsobuje nestabilitu vzniklých plazmidů (Reinscheid *et al.*, 1994). Také mutované molekuly enzymu AHAS byly v tomto případě determinovány geny nesenými multikopiovým vektorem pECKA, navíc v kmeni *C. glutamicum* $\Delta ilvN$, kde docházelo k výměně částečně deletované alely a mutované alely mezi plazmidem a chromosomem v důsledku homologních rekombinací. Za účelem konstrukce stabilního mutovaného kmene *C. glutamicum* byla mutace M13 zavedena přímo do chromosomu této bakterie. U vzniklého bezplazmidového kmene *C. glutamicum* *ilvNM13* byla stanovena specifická aktivita enzymu AHAS a její inhibice větvenými aminokyselinami (Tab. 4.2.). Synthasa acetohydroxykyselin ze zkonstruovaného kmene vykazovala opět úplnou rezistenci ke zpětnovazebné inhibici a specifická aktivita mutovaného enzymu byla v přítomnosti 10mM valinu vyšší než aktivita divokého typu. Narozdíl od plazmidových kmenů vykazuje kmen *C. glutamicum* *ilvNM13* úplnou genetickou stabilitu.

Mutace M13 v genu *ilvN* pro regulační podjednotku enzymu AHAS způsobila zcela podle očekávání rezistenci enzymu ke zpětnovazebné inhibici, podobně jako mutace aminokyselin v analogických polohách v enzymech pocházejících z *E. coli* a *S. cinnamonensis* (Obr. 4.9.) (Vyazmensky *et al.*, 1996; Kopecký *et al.*, 1999). Narozdíl od *E. coli* (kde byl substituován glycin v pozici 14 za kyselinu asparagovou) a *S. cinnamonensis* (kde došlo po náhodné mutagenезi k záměně glycinu v pozici 16 za kyselinu asparagovou nebo valinu v pozici 17 za kyselinu asparagovou nebo leucinu v pozici 18 za fenylalanin), pouze v případě *C. glutamicum* (kde byly po místně specifické mutagenезi substituovány až tři aminokyseliny najednou: glycin v pozici 20 za kyselinu asparagovou, isoleucin v pozici 21 za kyselinu asparagovou a isoleucin v pozici 22 za fenylalanin) došlo ke snížení aktivity enzymu. Další mutace v regulační podjednotce enzymu AHAS III. z *E. coli*, které vedly

k odstranění zpětnovazebné inhibice, jsou uvedeny v tabulce 2.2. (Mendel *et al.*, 2001). Ve snaze docílit zpětnovazebné rezistence a zároveň plné aktivity enzymu AHAS byl polypeptid regulační podjednotky na svém C-konci postupně zkrácen, a to zavedením terminačních kodónů v oblasti 90 a 117 aminokyseliny (Obr. 4.13.). I tento experiment byl založen na výsledcích náhodné mutagenese v *E. coli* a *S. cinnamonensis*. V *E. coli* byla popsána tři zkrácení na C-konci polypeptidu regulační podjednotky o 35, 48 a 80 aminokyselin (Obr. 4.13.) (Mendel *et al.*, 2003). Výsledkem těchto delecí byla rezistence enzymu ke zpětnovazebné inhibici a zachování nebo v případě mutanta zkráceného o 80 aminokyselin dokonce mírné zvýšení aktivity enzymu ve srovnání s divokým typem. Podobného výsledku bylo dosaženo také náhodnou mutagenézí v *S. cinnamonensis*, kde zmíněný fenotyp způsobilo zkrácení polypeptidu regulační podjednotky vyvolané přeměnou kodónů pro 106. a 109. aminokyselinu ve stop kodóny (Obr. 4.13.) (Kopecký *et al.*, 1999). V případě *C. glutamicum* sice uvedená zkrácení regulační podjednotky výrazně snížila citlivost enzymu ke zpětnovazebné inhibici, výsledná aktivita enzymu však byla opět významně redukována. Vysvětlením tohoto negativního efektu je s největší pravděpodobností snížení afinity malé, regulační podjednotky k podjednotce katalytické. Studium vlastností regulační podjednotky enzymu AHAS III. z *E. coli* objasnilo, že mnohé z uvedených mutací v N-koncové části peptidu i delecí v C-koncové části proteinu, které vyvolávají rezistenci ke zpětnovazebné inhibici i mírné zvýšení aktivity enzymu, zároveň způsobují snížení vzájemné afinity podjednotek. To znamená, že pro zachování původní aktivity je u mutovaných enzymů nezbytné zvýšení koncentrace regulačních podjednotek. Narozdíl od experimentů *in vitro* prováděných u *E. coli* a *S. cinnamonensis* se tato nepříznivá skutečnost mohla naplno projevit v *C. glutamicum*, kde byla všechna měření uskutečněna *in vivo*. Řešením tohoto problému by mohlo být posílení exprese genu *ilvN* v mutovaných kloněch, které by zvýšilo hladinu regulačních podjednotek v buňce. Vzhledem k lokalizaci promotoru P-*ilvN* uvnitř strukturního genu *ilvB* se však ani tato cesta zatím nejeví zcela schůdná.

5.3. Konstrukce produkčních kmenů

Na základě výsledků popsaných v předchozích dvou kapitolách byla zahájena konstrukce nových kmenů *C. glutamicum* produkujících valin. Zavedením delecí a mutací do chromosomu a klonováním genů ve vektorech byla připravena řada bezplazmidových i plazmidových kmenů nesoucích různé kombinace těchto genomových zásahů: delece v genu *ilvA*, delece v genu *panB*, delece atenuátoru promotoru genu *ilvB*, mutace M13 v genu *ilvN* zajišťující rezistenci enzymu AHAS ke zpětnovazební inhibici a zvýšení exprese operonu *ilvBNC* klonováním v nově zkonstruovaném mnohokopiovém vektoru pECKA. Studován byl především vliv jednotlivých genomových zásahů na výslednou produkci valinu, u vybraných kmenů byla stanovena rovněž specifická aktivita enzymu AHAS a její inhibice 10mM valinem. Výsledky těchto experimentů jsou přehledně shrnuty v tabulkách 4.4. - 4.9. a na obrázcích 4.15. a 4.16.

Kromě delece v atenuátoru genu *ilvB*, která snížila výslednou produkci valinu až 4x a jejíž další důsledky již byly diskutovány v kapitole 5.1.1., ovlivnily všechny ostatní genomové úpravy výslednou produkci valinu vždy pozitivně. Důsledkem delece v genu *ilvA* je v první řadě neschopnost daného kmene syntetizovat 2-ketobutyát, jenž je preferenčním substrátem enzymu AHAS a rovněž vstupním intermediátem biosyntetické dráhy isoleucinu (Obr. 2.2.). Nepřítomnost 2-ketobutyátu proto umožní buňkám použít enzym AHAS výhradně pro syntézu valinu (a leucinu), zároveň se kmen s delecí v genu *ilvA* stává isoleucinovým auxotrofem. I této skutečnosti však bylo využito pro zvýšení výsledné produkce valinu. Produkční kmeny byly kultivovány v minimálním mediu, které obsahovalo limitující koncentraci isoleucinu (0,9mM). Nedostatek této aminokyseliny spouští v hladovějících buňkách dva regulační mechanismy: 1) vlivem atenuace vzrůstá exprese operonu *ilvBNC*; 2) limitující koncentrace aminokyseliny obecně vyvolává stringentní odpověď, jejímž důsledkem stoupá vnitrobuněčná koncentrace ppGpp. Tento alarmon potom aktivuje nebo naopak inhibuje řadu pochodů, kterými se buňka vyrovnává s danou stresovou situací. Jedním z těchto procesů je také aktivace operonů kódujících enzymy pro biosyntézu mnoha aminokyselin. Otázka způsobu limitace produkčních kmenů během kultivace však není dosud zcela dořešena. Obecně platí, že hladověním na různé aminokyseliny může být vlivem popsané stringentní odpovědi zvýšena produkce žádané aminokyseliny. Často ale mívá na výslednou produkci pozitivní vliv také limitace růstu živinou, která s metabolismem aminokyselin přímo nesouvisí. U *C. glutamicum* bylo například popsáno zvýšení produkce lysinu jako důsledek limitující koncentrace fosfátu v kultivačním mediu (Coello *et al.*, 1992).

Vytvoření delece v genu *ilvA* výrazně zvýšilo produkci valinu, současně se avšak téměř u všech kmenů $\Delta ilvA$ snížila specifická aktivita AHAS. Snížení transkripce enzymu AHAS je pravděpodobně vyvoláno nepřítomností 2-ketobutyátu, který za plné funkce genu *ilvA* zajišťuje indukci exprese operonu *ilvBNC*. Snížená aktivita AHAS je v kmenech nesoucích deleci v genu *ilvA* patrně kompenzována blokováním isoleucinové dráhy, které tak poskytuje pyruvát pro syntézu valinu. Delece v genu *panB*, který kóduje enzym katalyzující první reakci specifickou pro syntézu pantothenátu, zabránila odčerpávání metabolitu ketoisovalerátu touto konkurenční drahou (Obr. 2.2.). Pozitivní vliv delecí uvnitř genů *ilvA* a *panB* byl již dříve pro konstrukce produkčních kmenů pro větvené aminokyseliny využit (Radmacher *et al.*, 2002). V této práci bylo u kmenů nesoucích uvedené delece naměřeno až 25-násobné zvýšení produkce valinu (Tab.4.4.).

Průkazně pozitivní efekt na výslednou produkci valinu má rovněž zavedení mutace M13 do chromosomu *C. glutamicum*. Tato mutace v genu *ilvN*, jenž kóduje regulační podjednotku enzymu AHAS, již byla diskutována v kapitole 5.2. Její přítomnost způsobuje úplnou rezistenci enzymu ke zpětnovazebné inhibici větvenými aminokyselinami. Protože v *C. glutamicum* je aktivita enzymu AHAS i v přítomnosti všech tří inhibitorů redukována maximálně o 50 %, byl pozitivní vliv zpětnovazebně rezistentního mutantního enzymu na výslednou hodnotu produkce dlouho zpochybňován. Z tohoto hlediska jsou výsledky získané v této práci překvapivé a neočekávané. Pouhá přítomnost mutace M13 v chromosomu *C. glutamicum* (kmen *C. glutamicum ilvNM13*) zvýšila produkci valinu 12x ve srovnání s kmenem divokým (Tab. 4.5.; Obr. 4.15. a 4.16.). Také u dalších nově zkonstruovaných bezplazmidových kmenů produkce valinu po zavedení mutace M13 do chromosomu výrazně vzrostla (Tab. 4.5.; Obr. 4.15. a 4.16.). Nejlepším dosud získaným bezplazmidovým kmenem je kmen *C. glutamicum $\Delta ilvA \Delta panB ilvNM13$* , který po 48-hodinové kultivaci produkuje téměř 90mM valin.

Klonování operonu *ilvBNC* v nově sestrojeném mnohokopiovém vektoru pECKA zvýšilo specifickou aktivitu enzymu AHAS 4x a výslednou produkci valinu 23x (Tab. 4.8.; Obr. 4.15. a 4.16.: srovnání divokého kmene *C. glutamicum* ATCC 13032 s kmenem nesoucím plazmid pECKA). Nejlepší dosud získaný plazmidový kmen *C. glutamicum $\Delta ilvA \Delta panB ilvNM13/pECKAilvBNC$* produkoval až 127mM valin během 48-hodinové kultivace. Podobný efekt zvýšené produkce byl pozorován také jako důsledek klonování operonu *ilvBNC* v jiných multikopiových vektorech (Sahm and Eggeling, 1999; Radmacher *et al.*, 2002). Vysokou produkci plazmidových produkčních kmenů však velmi často provází strukturální nestabilita použitých vektorů (Reinscheid *et al.*, 1994). V této práci se zmíněný negativní účinek projevil zejména v případě klonování mutovaného operonu *ilvBNC*

nesoucího mutaci M13 v genu *ilvN* (Tab. 4.9.; Obr. 4.16.). I zde způsobila přítomnost mutace, kromě rezistence enzymu AHAS ke zpětnovazební inhibici, také mírné zvýšení výsledné produkce, avšak na úkor genetické stability použitých kmenů.

Během analýzy produkčních kmenů, nesoucích mimo jiné chromosomovou delecí v genu *ilvA*, bylo zjištěno, že přítomnost 40mM valinu v kultivačním mediu vyvolává u těchto kmenů inhibici růstu, zvýšení množství transkriptu *ilvBNC* v buňkách (2,5x) a rovněž zvýšení specifické aktivity enzymu AHAS (3,5x) (Lange *et al.*, 2003). Tyto důsledky vysoké koncentrace valinu v mediu byly vysvětleny na základě hladovění testovaných kmenů na isoleucin, které bylo způsobeno kompeticí obou zmíněných aminokyselin o přenašeč BrnQ na vstupu do buňky. Také v případě nejlepšího producenta valinu získaného v této práci (*C. glutamicum* $\Delta ilvA \Delta panB ilvNM13/pECKAilvBNC$) byla provedena studie některých fyziologických parametrů v průběhu 56-hodinové jednorázové kultivace (Obr. 4.17.). Vynesené křivky ukazují, že se specifická aktivita enzymu AHAS zvýšila během exponenciální fáze téměř 2x (porovnání hodnot mezi 12. a 28. hodinou kultivace). Po 28 h růstu byl již v mediu akumulován téměř 30mM valin a růst kultury se začal výrazně zpomalovat, pravděpodobně vlivem zmíněné limitace isoleucinem. Přesto lineární růst koncentrace valinu v mediu pokračoval i ve stacionární fázi, zřejmě díky zvýšené expresi operonu *ilvBNC* a zvýšené dostupnosti zdroje uhlíku, který již nebyl využíván pro produkci buněčné biomasy. Naopak, specifická aktivita enzymu AHAS opět poklesla k hodnotě měřené ve 12. hodině kultivace.

Z tabulek 4.4. - 4.9. vyplývá, že se vliv jednotlivých genomových zásahů na produkci valinu vzájemně nescítá. Čím více úprav již buňka nese a čím více aminokyseliny produkuje, tím menší je pozitivní vliv každého nového zásahu. Navíc jakákoliv změna v expresi nebo aktivitě enzymu nemůže být ojedinělá, v ideálním případě by měla být zvýšena exprese ve všech stupních dané reakční kaskády, aby nedocházelo ke zbytečnému a pro buňku zatěžujícímu hromadění intermediátů. V biosyntetické dráze valinu je proto nutné posílit také transkripci genů *ilvD* a *ilvE* (Obr. 2.2.), popřípadě genů kódujících transportní systémy aminokyselin.

Rovněž auxotrofie produkčních kmenů není zcela určitě nejvýhodnější a neekonomičtější vlastností, protože kultivační půdy musí být za těchto podmínek obohaceny o chybějící metabolity. Na základě detailní analýzy transkripčních signálů (Pátek *et al.*, 1996; Vašicová *et al.*, 1999; Pátek *et al.*, 2003a; Pátek *et al.*, 2003b) byly z tohoto důvodu v projektu navazujícím na tuto práci zkonstruovány bradytrofní (*leaky*) mutantní kmeny *C. glutamicum* s mutacemi v promotorech genů *ilvA*, *panB* a *leuA* (Obr. 2.2.), které výrazně zeslabily sílu uvedených promotorů a tím i expresi daných genů. Růst výsledných

bradytrofních kmenů je vlivem nízké vnitrobuněčné koncentrace isoleucinu, pantothenátu nebo leucinu limitován, přesto však jsou tyto kmeny z hlediska syntézy všech nezbytných látek zcela soběstačné.

Metabolismus buňky je komplexní proces, v němž žádný krok neprobíhá izolovaně, naopak jednotlivé reakce sdílejí společné intermediáty a redukční ekvivalenty. Výsledná produkce valinu tak může být posílena rovněž mírným zásahem do centrálního metabolismu, například zvýšením dostupnosti substrátu klíčového enzymu AHAS, kterým je pyruvát. Tento metabolit je jako jeden ze základních intermediátů centrálního metabolismu substrátem mnoha enzymů, které o jeho vazbu vzájemně soupeří. Na základě přímého měření bylo zjištěno, že vnitrobuněčná koncentrace této látky není pro saturaci enzymu AHAS dostatečná (rovněž vlivem velmi nízké afinity enzymu k tomuto substrátu) (Leyval *et al.*, 2003). Zesílením afinity enzymu AHAS k pyruvátu, například místně specifickou mutagenézí, nebo zvýšením jeho koncentrace v buňkách *C. glutamicum* tak může být významně posílena větev dráhy směřující k tvorbě valinu, která je za běžných podmínek potlačena větví isoleucinovou.

Z výsledků této disertační práce má největší praktický význam nově zkonstruovaný bezplazmidový kmen *C. glutamicum* $\Delta ilvA \Delta panB ilvNM13$ schopný produkovat téměř 90mM valin po 48 hodinách kultivace. Tento kmen nesoucí veškeré modifikace na chromosomu může být využit jako základ nové generace bezplazmidových produkčních kmenů *C. glutamicum*, které budou ve srovnání s kmeny plazmidovými geneticky stabilnější a kde bude rovněž výrazně sníženo teoretické riziko spojené s přítomností rekombinantních vektorů. Použití plazmidů, jež nesou heterologní geny a markery determinující rezistenci k antibiotikům, podléhá v současnosti výraznému legislativnímu omezení z důvodu nekontrolovatelného horizontálního šíření této genetické informace v prostředí. Neopomenutelnou výhodou nově zkonstruovaných kmenů produkujících valin je rovněž možnost jejich přeměny v producenty metabolitů odvětvujících se biosyntetických drah (tedy v producenty leucinu, isoleucinu nebo pantothenátu) (Sahm a Eggeling, 1999).

6. ZÁVĚR

Studium klíčového kroku biosyntetické dráhy valinu v *Corynebacterium glutamicum*, který je reprezentován kondenzační reakcí katalyzovanou synthasou acetohydroxykyselin (AHAS), zahrnovalo tři přístupy: 1) transkripční analýzu genů *ilvB* a *ilvN* kódujících katalytickou a regulační podjednotku enzymu AHAS; 2) analýzu enzymu AHAS na úrovni jeho aktivity a přípravu enzymu AHAS rezistentního ke zpětnovazebné inhibici; 3) praktické využití získaných výsledků pro konstrukci nových kmenů *C. glutamicum* produkujících valin. V jednotlivých směrech bylo dosaženo těchto výsledků:

- 1) Analýzou vedoucí sekvence genu *ilvB* bylo zjištěno, že dereprese promotoru P-*ilvB* vyvolaná hladověním kultury na valin zvýšila jeho transkripční aktivitu až 30x a naopak, za podmínek nelimitovaného růstu byla vlivem atenuace snížena aktivita promotoru rovněž 25-30x. Oblast nedokonalé přímé repetice, která se nachází před jádrem promotoru P-*ilvB*, dále zvyšuje aktivitu tohoto promotoru 4-6x.
- 2) Metodou *primer extension* byl lokalizován transkripční start genu *ilvN*, a to uvnitř strukturního genu *ilvB* ve vzdálenosti 337 bp od translačního počátku genu *ilvN*. Na základě sekvencí oblastí -10 a -35 byl promotor P-*ilvN* zařazen mezi středně silné promotory *C. glutamicum*. Deleční analýzou bylo zjištěno, že oblast vymezená transkripčním a translačním počátkem genu *ilvN* je zodpovědná za represi promotoru P-*ilvN*.
- 3) Cílenou mutagenezí genu *ilvN* byly připraveny mutantní formy enzymu AHAS nesoucí mutace M8 a M13, jež zajišťují rezistenci enzymu ke zpětnovazebné inhibici valinem, leucinem i isoleucinem. Na molekule enzymu AHAS tak patrně existuje jediné společné vazebné místo pro tyto tři inhibitory. Zavedení mutace M13 do chromosomu *C. glutamicum* zvýšilo produkci valinu 12x.
- 4) Na základě dosažených výsledků byla zkonstruována řada bezplazmidových i plazmidových kmenů *C. glutamicum* produkujících valin. Tyto kmeny obsahují různé kombinace následujících genomových zásahů: delece v genu *ilvA*, delece v genu *panB*, delece atenuátoru ve vedoucí sekvenci genu *ilvB*, mutace M13 v genu *ilvN* a zvýšení exprese operonu *ilvBNC* klonováním v mnohokopiovém vektoru pECKA. Nejlepším dosud získaným plazmidovým producentem byl kmen *C. glutamicum* $\Delta ilvA \Delta panB ilvNM13/pECKAilvBNC$ produkující 127mM valin, nejlepším bezplazmidovým producentem byl kmen *C. glutamicum* $\Delta ilvA \Delta panB ilvNM13$ produkující téměř 90mM valin po 48-hodinové kultivaci. Kmen *C. glutamicum* $\Delta ilvA \Delta panB ilvNM13$ bude využit jako základ produkčních kmenů nové generace.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Babitzke, P.** (1997) Regulation of tryptophan biosynthesis: Trp-ing the TRAP or how *Bacillus subtilis* reinvented the wheel. *Mol Microbiol* **26**:1-9.
- Babitzke, P.** (2004) Regulation of transcription attenuation and translation initiation by allosteric control of an RNA-binding protein: the *Bacillus subtilis* TRAP protein. *Curr Opin Microbiol* **7**:132-139.
- Barak, Z., Chipman, D.M. and Gollop, N.** (1987) Physiological implications of the specificity of acetohydroxy acid synthase isozymes of enteric bacteria. *J Bacteriol* **169**:3750-3756.
- Bar-Ilan, A., Balan, V., Tittmann, K., Golbik, R., Vyazmensky, M., Hubner, G., Barak, Z. and Chipman, D.M.** (2001) Binding and activation of thiamin diphosphate in acetohydroxyacid synthase. *Biochemistry* **40**:11946-11954.
- Bathe, B., Kalinowski, J. and Puhler, A.** (1996) A physical and genetic map of the *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 chromosome. *Mol Gen Genet* **252**:255-265.
- Bayan, N., Houssin, C., Chami, M. and Leblon, G.** (2003) Mycomembrane and S-layer: two important structures of *Corynebacterium glutamicum* cell envelope with promising biotechnology applications. *J Biotechnol* **104**:55-67.
- Birnboim, H.C.** (1983) A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol* **100**:243-255.
- Bonamy, C., Labarre, J., Cazaubon, L., Jacob, C., Bohec, F.L., Reyes, O. and Leblon, G.** (2003) The mobile element IS1207 of *Brevibacterium lactofermentum* ATCC21086: isolation and use in the construction of Tn5531, a versatile transposon for insertional mutagenesis of *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* **104**:301-309.
- Bott, M. and Niebisch, A.** (2003) The respiratory chain of *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* **104**:129-153.
- Bowen, T.L., Union, J., Tumbula, D.L. and Whitman, W.B.** (1997) Cloning and phylogenetic analysis of the genes encoding acetohydroxyacid synthase from the archaeon *Methanococcus aeolicus*. *Gene* **188**:77-84.
- Burkovski, A. and Krämer, R.** (2002) Bacterial amino acid transport proteins: occurrence, functions, and significance for biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**:265-274.
- Cavin, J.F., Dartois, V., Labarre, C. and Divies, C.** (1999) Cloning of branched chain amino acid biosynthesis genes and assays of alpha-acetolactate synthase activities in *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. *Res Microbiol* **150**:189-198.
- Coello, N., Pan, J.G. and Lebeault, J.M.** (1992) Physiological aspects of L-lysine production: effect of nutritional limitations on a producing strain of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**:259-262.
- Cordes, C., Mockel, B., Eggeling, L. and Sahm, H.** (1992) Cloning, organization and functional analysis of *ilvA*, *ilvB* and *ilvC* genes from *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **112**:113-116.
- De Felice, M., Squires, C., Levinthal, M., Guardiola, J., Lamberti, A. and Iaccarino, M.** (1977) Growth inhibition of *Escherichia coli* K-12 by L-valine: a consequence of a regulatory pattern. *Mol Gen Genet* **156**:1-7.
- De Rossi, E., Leva, R., Gusberty, L., Manachini, P.L. and Riccardi, G.** (1995) Cloning, sequencing and expression of the *ilvBNC* gene cluster from *Streptomyces avermitilis*. *Gene* **166**:127-132.

- Eggeling, I., Cordes, C., Eggeling, L. and Sahm, H.** (1987) Regulation of acetohydroxy acid synthase in *Corynebacterium glutamicum* during fermentation of alpha-ketobutyrate to L-isoleucine. *Appl Microbiol Biotechnol* **25**:346-351.
- Eggeling, L., Morbach, S. and Sahm, H.** (1997) The fruits of molecular physiology: engineering the L-isoleucine biosynthesis pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* **56**:167-182.
- Eggeling, L. and Sahm, H.** (1999a) Amino acid production: principles of metabolic engineering. s. 153-177, v knize: Papoutsakis, E.T. and Lee, S.Y. (eds.), *Metabolic engineering*, Marcel Dekker, New York
- Eggeling, L. and Sahm, H.** (1999b) L-glutamate and L-lysine: traditional products with impetuous developments. *Appl Microbiol Biotechnol* **52**:146-153.
- Eggeling, L. and Sahm, H.** (2001) The cell wall barrier of *Corynebacterium glutamicum* and amino acid efflux. *J Biosci Bioeng* **92**: 201-213.
- Eikmanns, B.J., Eggeling, L. and Sahm, H.** (1993) Molecular aspects of lysine, threonine, and isoleucine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **64**:145-163.
- Embley, T.M. and Stackebrandt, E.** (1994) The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes. *Annu Rev Microbiol* **48**:257-289.
- Epelbaum, S., Chipman, D.M. and Barak, Z.** (1996) Metabolic effects of inhibitors of two enzymes of the branched-chain amino acid pathway in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **178**:1187-1196.
- Epelbaum, S., LaRossa, R.A., VanDyk, T.K., Elkayam, T., Chipman, D.M. and Barak, Z.** (1998) Branched-chain amino acid biosynthesis in *Salmonella typhimurium*: a quantitative analysis. *J Bacteriol* **180**:4056-4067.
- Fudou, R., Jojima, Y., Seto, A., Yamada, K., Kimura, E., Nakamatsu, T., Hiraishi, A. and Yamanaka, S.** (2002) *Corynebacterium efficiens* sp. nov., a glutamic-acid-producing species from soil and vegetables. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**:1127-1131.
- Glazer, A.N. and Nikaido, H.** (1995) *Microbial Biotechnology: fundamentals of applied microbiology*. Freeman and Company, New York
- Godon, J.J., Chopin, M.C. and Ehrlich, S.D.** (1992) Branched-chain amino acid biosynthesis genes in *Lactococcus lactis subsp. lactis*. *J Bacteriol* **174**:6580-6589.
- Gollop, N., Damri, B., Barak, Z. and Chipman, D.M.** (1989) Kinetics and mechanism of acetohydroxy acid synthase isozyme III from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **28**:6310-6317.
- Gourdon, P., Raherimandimby, M., Dominguez, H., Cocaign-Bousquet, M. and Lindley, N.D.** (2003) Osmotic stress, glucose transport capacity and consequences for glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* **104**:77-85.
- Grandoni, J.A., Zahler, S.A. and Calvo, J.M.** (1992) Transcriptional regulation of the *ilv-leu* operon of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **174**:3212-3219.
- Grimminger, H. and Umbarger, H.E.** (1979) Acetohydroxy acid synthase I of *Escherichia coli*: purification and properties. *J Bacteriol* **137**:846-853.
- Grundy, F.J. and Henkin, T.M.** (1994) Conservation of a transcription antitermination mechanism in aminoacyl-tRNA synthetase and amino acid biosynthesis genes in gram-positive bacteria. *J Mol Biol* **235**:798-804.
- Grundy, F.J., Rollins, S.M. and Henkin, T.M.** (1994) Interaction between the acceptor end of tRNA and the T box stimulates antitermination in the *Bacillus subtilis tyrS* gene: a new role for the discriminator base. *J Bacteriol* **176**:4518-4526.
- Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**:557-580.
- Hanahan, D.** (1985) Techniques for transformation of *E. coli*. s. 109-135, v knize: Glover, D.M. (ed.), *DNA Cloning. A Practical Approach*, Vol.1., IRL Press, Oxford

- Hatakeyama, K., Hohama, K., Vertes, A.A., Kobayashi, M., Kurusu, Y. and Yukawa, H. (1993a) Genomic organization of the biotin biosynthetic genes of coryneform bacteria: cloning and sequencing of the *bioA-bioD* genes from *Brevibacterium flavum*. *DNA Seq* 4:177-184.
- Hatakeyama, K., Kohama, K., Vertes, A.A., Kobayashi, M., Kurusu, Y. and Yukawa, H. (1993b) Analysis of the biotin biosynthesis pathway in coryneform bacteria: cloning and sequencing of the *bioB* gene from *Brevibacterium flavum*. *DNA Seq* 4:87-93.
- Hayashi, M., Mizoguchi, H., Shiraishi, N., Obayashi, M., Nakagawa, S., Imai, J., Watanabe, S., Ota, T. and Ikeda, M. (2002) Transcriptome analysis of acetate metabolism in *Corynebacterium glutamicum* using a newly developed metabolic array. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66:1337-1344.
- Henkin, T.M. and Yanofsky, C. (2002) Regulation by transcription attenuation in bacteria: how RNA provides instructions for transcription termination/antitermination decisions. *Bioessays* 24:700-707.
- Hermann, T. (2003) Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *J Biotechnol* 104:155-172.
- Hershey, H.P., Schwartz, L.J., Gale, J.P. and Abell, L.M. (1999) Cloning and functional expression of the small subunit of acetolactate synthase from *Nicotiana glauca*. *Plant Mol Biol* 40:795-806.
- Hervieu, F. and Vaucheret, H. (1996) A single amino acid change in acetolactate synthase confers resistance to valine in tobacco. *Mol Gen Genet* 251:220-224.
- Hill, C.M. and Duggleby, R.G. (1998) Mutagenesis of *Escherichia coli* acetohydroxyacid synthase isoenzyme II and characterization of three herbicide-insensitive forms. *Biochem J* 335 (Pt 3):653-661.
- Horton, R.M. (1995) PCR-mediated recombination and mutagenesis. SOEing together tailor-made genes. *Mol Biotechnol* 3:93-99.
- Huang, F., Coppola, G. and Calhoun, D.H. (1992) Multiple transcripts encoded by the *ilvGMEDA* gene cluster of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 174:4871-4877.
- Chipman, D., Barak, Z. and Schloss, J.V. (1998) Biosynthesis of 2-aceto-2-hydroxy acids: acetolactate synthases and acetohydroxyacid synthases. *Biochim Biophys Acta* 1385:401-419.
- Chipman, D.M. and Shaanan, B. (2001) The ACT domain family. *Curr Opin Struct Biol* 11:694-700.
- Ibdah, M., Bar-Ilan, A., Livnah, O., Schloss, J.V., Barak, Z. and Chipman, D.M. (1996) Homology modeling of the structure of bacterial acetohydroxy acid synthase and examination of the active site by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 35:16282-16291.
- Ikeda, M. and Nakagawa, S. (2003) The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol* 62:99-109.
- Inui, M., Vertes, A.A., Kobayashi, M., Kurusu, Y. and Yukawa, H. (1993) Cloning and sequence determination of the acetohydroxy acid synthase genes from *Brevibacterium flavum* MJ233 by using the polymerase chain reaction. *DNA Seq* 3:303-310.
- Ito, W., Ishiguro, H. and Kurosawa, Y. (1991) A general method for introducing a series of mutations into cloned DNA using the polymerase chain reaction. *Gene* 102:67-70.
- Jetten, M.S. and Sinskey, A.J. (1995) Recent advances in the physiology and genetics of amino acid-producing bacteria. *Crit Rev Biotechnol* 15:73-103.
- Kalinowski, J., Bathe, B., Bartels, D., Bischoff, N., Bott, M., Burkovski, A., Dusch, N., Eggeling, L., Eikmanns, B.J., Gaigalat, L., Goesmann, A., Hartmann, M., Huthmacher, K., Kramer, R., Linke, B., McHardy, A.C., Meyer, F., Mockel, B., Pfefferle, W., Puhler, A., Rey, D.A., Ruckert, C., Rupp, O., Sahm, H., Wendisch,

- V.F., Wiegrabe, I. and Tauch, A. (2003) The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J Biotechnol* **104**:5-25.
- Kaprálék, F. (2000) *Základy bakteriologie*. Karolinum, Praha
- Keilhauer, C., Eggeling, L. and Sahm, H. (1993) Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon. *J Bacteriol* **175**:5595-5603.
- Kennerknecht, N., Sahm, H., Yen, M.R., Patek, M., Saier Jr, M.H., Jr. and Eggeling, L. (2002) Export of L-isoleucine from *Corynebacterium glutamicum*: a two-gene-encoded member of a new translocator family. *J Bacteriol* **184**:3947-3956.
- Kiefer, P., Heinzle, E., Zelder, O. and Wittmann, C. (2004) Comparative metabolic flux analysis of lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* cultured on glucose or fructose. *Appl Environ Microbiol* **70**:229-239.
- Kim, J., Beak, D.G., Kim, Y.T., Choi, J.D. and Yoon, M.Y. (2004) Effects of deletions at the C-terminus of tobacco acetohydroxyacid synthase on the enzyme activity and cofactor binding. *Biochem J* **384**:59-68.
- Kinoshita, S., Udaka, S. and Shimono, M. (1957) Studies on the amino acid fermentation. I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J Gen Appl Microbiol* **3**:193-205.
- Kirchner, O. and Tauch, A. (2003) Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* **104**:287-299.
- Koffas, M.A., Jung, G.Y. and Stephanopoulos, G. (2003) Engineering metabolism and product formation in *Corynebacterium glutamicum* by coordinated gene overexpression. *Metab Eng* **5**:32-41.
- Kouhen, O.M. and Joset, F. (2002) Biosynthesis of the branched-chain amino acids in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803: existence of compensatory pathways. *Curr Microbiol* **45**:94-98.
- Kopecký, J., Janata, J., Pospíšil, S., Felsberg, J. and Spížek, J. (1999) Mutations in two distinct regions of acetolactate synthase regulatory subunit from *Streptomyces cinnamomensis* result in the lack of sensitivity to end-product inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* **266**:162-166.
- Krämer, R. (1994) Systems and mechanisms of amino acid uptake and excretion in prokaryotes. *Arch Microbiol* **162**:1-13.
- Krämer, R. (1996) Genetic and physiological approaches for the production of amino acids. *J Biotechnol* **45**:1-21.
- Krömer, J.O., Sorgenfrei, O., Klopprogge, K., Heinzle, E. and Wittmann, C. (2004) In-depth profiling of lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* by combined analysis of the transcriptome, metabolome, and fluxome. *J Bacteriol* **186**:1769-1784.
- Landick, R., Turnbough, C.L. and Yanofski, C. (1996) Transcription attenuation. s.1263-1309, v knize: Neidhardt, F.C. (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, ASM Press, New York
- Lange, C., Rittmann, D., Wendisch, V.F., Bott, M. and Sahm, H. (2003) Global Expression Profiling and Physiological Characterization of *Corynebacterium glutamicum* Grown in the Presence of L-Valine. *Appl Environ Microbiol* **69**:2521-2532.
- LaRossa, R.A., Van Dyk, T.K. and Smulski, D.R. (1987) Toxic accumulation of alpha-ketobutyrate caused by inhibition of the branched-chain amino acid biosynthetic enzyme acetolactate synthase in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **169**:1372-1378.
- Lee, Y.T. and Duggleby, R.G. (2000) Mutagenesis studies on the sensitivity of *Escherichia coli* acetohydroxyacid synthase II to herbicides and valine. *Biochem J* **350** (Pt 1):69-73.

- Lee, Y.T. and Duggleby, R.G. (2001) Identification of the regulatory subunit of *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase and reconstitution with its catalytic subunit. *Biochemistry* **40**:6836-6844.
- Lee, Y.T. and Duggleby, R.G. (2002) Regulatory interactions in *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase. *FEBS Lett* **512**:180-184.
- Leyval, D., Uy, D., Delaunay, S., Goergen, J.L. and Engasser, J.M. (2003) Characterisation of the enzyme activities involved in the valine biosynthetic pathway in a valine-producing strain of *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* **104**:241-252.
- Liebl, W., Bayerl, A., Schein, B., Stillner, U. and Schleifer, K.H. (1989) High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells. *FEMS Microbiol Lett* **53**:299-303.
- Liebl, W., Ehrmann, M., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. (1991) Transfer of *Brevibacterium divaricatum* DSM 20297T, "*Brevibacterium flavum*" DSM 20411, "*Brevibacterium lactofermentum*" DSM 20412 and DSM 1412, and *Corynebacterium glutamicum* and their distinction by rRNA gene restriction patterns. *Int J Syst Bacteriol* **41**:255-260.
- Lindroth, P. and Mopper, K. (1979) High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with *o*-phthalaldehyde. *Anal Chem* **51**:1667-1674.
- Marienfeld, S., Uhlemann, E.M., Schmid, R., Kramer, R. and Burkovski, A. (1997) Ultrastructure of the *Corynebacterium glutamicum* cell wall. *Antonie Van Leeuwenhoek* **72**:291-297.
- Marx, A., Hans, S., Mockel, B., Bathe, B. and de Graaf, A.A. (2003) Metabolic phenotype of phosphoglucose isomerase mutants of *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* **104**:185-197.
- Mazur, B.J., Chui, C.F. and Smith, J.K. (1987) Isolation and characterization of plant genes coding for acetolactate synthase, the target enzyme for two classes of herbicides. *Plant Physiol* **85**:1110-1117.
- Mendel, S., Elkayam, T., Sella, C., Vinogradov, V., Vyazmensky, M., Chipman, D.M. and Barak, Z. (2001) Acetohydroxyacid synthase: a proposed structure for regulatory subunits supported by evidence from mutagenesis. *J Mol Biol* **307**:465-477.
- Mendel, S., Vinogradov, M., Vyazmensky, M., Chipman, D.M. and Barak, Z. (2003) The N-terminal domain of the regulatory subunit is sufficient for complete activation of acetohydroxyacid synthase III from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **325**:275-284.
- Merino, E., Babitzke, P. and Yanofsky, C. (1995) *trp* RNA-binding attenuation protein (TRAP)-*trp* leader RNA interactions mediate translational as well as transcriptional regulation of the *Bacillus subtilis trp* operon. *J Bacteriol* **177**:6362-6370.
- Merkamm, M., Chassagnole, C., Lindley, N.D. and Guyonvarch, A. (2003) Ketopantoate reductase activity is only encoded by *ilvC* in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* **104**:253-260.
- McHardy, A.C., Tauch, A., Ruckert, C., Puhler, A. and Kalinowski, J. (2003) Genome-based analysis of biosynthetic aminotransferase genes of *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* **104**:229-240.
- Möckel, B., Eggeling, L. and Sahm, H. (1992) Functional and structural analyses of threonine dehydratase from *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **174**:8065-8072.
- Morbach, S., Jünger, C., Sahm, H. and Eggeling, L. (2000) Attenuation control of *ilvBNC* in *Corynebacterium glutamicum*: evidence of leader peptide formation without the presence of a ribosome binding site. *J Biosci Bioeng* **90**:501-507.

- Morbach, S., Sahm, H. and Eggeling, L.** (1995) Use of feedback resistant threonine dehydratases of *Corynebacterium glutamicum* to increase carbon flux towards L-isoleucine. *Appl Environ Microbiol* **61**:4315-4320.
- Mullis, K.B., Ferré, F. and Gibbs, R.A.** (1994) The polymerase chain reaction, Birkhäuser Boston, USA
- Nakayama, K.** (1985) Lysine. s. 607-620, v knize: Young, M.M. (ed.), Comprehensive biotechnology, Vol. 3., Pergamon Press, Oxford
- Newhouse, K.E., Singh, B.K., Shaner, D.L. and Stidham, M.A.** (1991a) Mutations in corn (*Zea mays* L.) conferring resistance to imidazolinone herbicides. *Theor Appl Genet* **83**:65-70.
- Newhouse, K.E., Wang, T. and Anderson, P.C.** (1991b) Imidazolinone-resistant crops. s. 139-150, v knize: Shaner, D.L. and O'Connor, S.L. (eds.), The Imidazolinone Herbicides, Boca Raton, FL: CRC Press
- Newhouse, K.E., Smith, W.A., Starrett, M.A., Schaefer, T.J. and Singh, B.K.** (1992) Tolerance to imidazolinone herbicides in wheat. *Plant Physiol* **100**:882-886.
- Ogawa-Miyata, Y., Kojima, H. and Sano, K.** (2001) Mutation analysis of the feedback inhibition site of aspartokinase III of *Escherichia coli* K-12 and its use in L-threonine production. *Biosci Biotechnol Biochem* **65**:1149-1154.
- Ohnishi, J., Hayashi, M., Mitsuhashi, S. and Ikeda, M.** (2003) Efficient 40 degrees C fermentation of l-lysine by a new *Corynebacterium glutamicum* mutant developed by genome breeding. *Appl Microbiol Biotechnol* **62**:69-75.
- Ohnishi, J., Katahira, R., Mitsuhashi, S., Kakita, S. and Ikeda, M.** (2005) A novel *gnd* mutation leading to increased L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett* **242**:265-274.
- Ohnishi, J., Mitsuhashi, S., Hayashi, M., Ando, S., Yokoi, H., Ochiai, K. and Ikeda, M.** (2002) A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine-producing mutant. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**:217-223.
- Paegle, L. and Ruklisha, M.** (2003) Lysine synthesis control in *Corynebacterium glutamicum* RC 115 in mixed substrate (glucose-acetate) medium. *J Biotechnol* **104**:123-8.
- Pang, S.S. and Duggleby, R.G.** (1999) Expression, purification, characterization, and reconstitution of the large and small subunits of yeast acetohydroxyacid synthase. *Biochemistry* **38**:5222-5231.
- Pang, S.S. and Duggleby, R.G.** (2001) Regulation of yeast acetohydroxyacid synthase by valine and ATP. *Biochem J* **357**:749-757.
- Pang, S.S., Duggleby, R.G. and Guddat, L.W.** (2002) Crystal structure of yeast acetohydroxyacid synthase: a target for herbicidal inhibitors. *J Mol Biol* **317**:249-262.
- Pang, S.S., Guddat, L.W. and Duggleby, R.G.** (2003) Molecular basis of sulfonylurea herbicide inhibition of acetohydroxyacid synthase. *J Biol Chem* **278**:7639-7644.
- Pang, S.S., Guddat, L.W. and Duggleby, R.G.** (2004) Crystallization of *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase in complex with the sulfonylurea herbicide chlorimuron ethyl. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**:153-155.
- Pascual, C., Lawson, P.A., Farrow, J.A., Gimenez, M.N. and Collins, M.D.** (1995) Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16S rRNA gene sequences. *Int J Syst Bacteriol* **45**:724-728.
- Pátek, M., Hochmannová, J. and Nešvera, J.** (1993) Production of threonine by *Brevibacterium flavum* containing threonine biosynthesis genes from *Escherichia coli*. *Folia Microbiol* **38**:355-359.

- Pátek, M., Krumbach, K., Eggeling, L. and Sahm, H.** (1994) Leucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: enzyme activities, structure of *leuA*, and effect of *leuA* inactivation on lysine synthesis. *Appl Environ Microbiol* **60**:133-140.
- Pátek, M., Eikmanns, B.J., Pátek, J. and Sahm, H.** (1996) Promoters from *Corynebacterium glutamicum*: cloning, molecular analysis and search for a consensus motif. *Microbiology* **142** (Pt 5):1297-1309.
- Pátek, M., Hochmannová, J., Jelínková, M., Nešvera, J. and Eggeling, L.** (1998) Analysis of the *leuB* gene from *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* **50**:42-47.
- Pátek, M., Muth, G. and Wohlleben, W.** (2003a) Function of *Corynebacterium glutamicum* promoters in *Escherichia coli*, *Streptomyces lividans*, and *Bacillus subtilis*. *J Biotechnol* **104**:325-334.
- Pátek, M., Nešvera, J., Guyonvarch, A., Reyes and O.Leblo, G.** (2003b) Promoters of *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* **104**:311-323.
- Pátek, M.** (2005) Regulation of gene expression. s. 81-98, v knize: Eggeling, L. and Bott, M. (eds.), Handbook of *Corynebacterium glutamicum*, CRC Press, BocaRaton
- Pfefferle, W., Möckel, B., Bathe, B. and Marx, A.** (2003) Biotechnological manufacture of lysine. s. 59-112, v knize: Scheper, T., Faurie, R. and Thommel, J. (eds.), Advances in biochemical engineering/biotechnology (79) Microbial production of L-amino acids, Springer
- Plachý, J.** (1975) The effect of medium composition on the production of valine by *Corynebacterium* 9366 – EMS/184. *Folia Microbiol* **20**:346-350.
- Plachý, J.** (1984) Amino acids. s. 677-717, v knize: Kruphanzl, V. and Řeháček, Z. (eds.), Modern biotechnology, Inst. Of Microbiol. Czechoslovak Academy of Sciences, Prague
- Polen, T. and Wendisch, V.F.** (2004) Genomewide expression analysis in amino acid-producing bacteria using DNA microarrays. *Appl Biochem Biotechnol* **118**:215-232.
- Porat, I., Vinogradov, M., Vyazmensky, M., Lu, C.D., Chipman, D.M., Abdelal, A.T. and Barak, Z.** (2004) Cloning and characterization of acetohydroxyacid synthase from *Bacillus stearothermophilus*. *J Bacteriol* **186**:570-574.
- Pospíšil, S., Kopecký, J., Přikrylová, V.** (1998) Derepression and altered feedback regulation of valine biosynthetic pathway in analogue-resistant mutants of *Streptomyces cinnamonensis* resulting in 2-ketoisovalerate excretion. *J Appl Microbiol* **85**:9-16.
- Pospíšil, S., Kopecký, J., Přikrylová, V. and Spížek, J.** (1999) Overproduction of 2-ketoisovalerate and monensin production by regulatory mutants of *Streptomyces cinnamonensis* resistant to 2-ketobutyrate and amino acids. *FEMS Microbiol Lett* **172**:197-204.
- Posten, C. H. and Cooney, C.L.** (1993) Growth of microorganisms. s. 111-162, v knize: Rehm, H.J. and Reed, G. (eds.), Biotechnology, Vol.1. Biological fundamentals, VCH Weinheim, second edition
- Potter, C.A. and Baumberg, S.** (1996) End-product control of enzymes of branched-chain amino acid biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology* **142** (Pt 8):1945-1952.
- Pridmore, R.D.** (1987) New and versatile cloning vectors with kanamycin-resistance marker. *Gene* **56**:309-312.
- Puech, V., Chami, M., Lemassu, A., Laneelle, M.A., Schiffler, B., Gounon, P., Bayan, N., Benz, R. and Daffe, M.** (2001) Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non-covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane. *Microbiology* **147**:1365-1382.
- Radmacher, E., Vaitsikova, A., Burger, U., Krumbach, K., Sahm, H. and Eggeling, L.** (2002) Linking central metabolism with increased pathway flux: L-valine

- accumulation by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol* **68**:2246-2250.
- Ray, T.B.** (1984) Site of action of chlorsulfuron. *Plant Physiol* **75**:827-831.
- Reinscheid, D.J., Kronmeyer, W., Eggeling, L., Eikmanns, B.J. and Sahm, H.** (1994) Stable expression of *hom-1-thrB* in *Corynebacterium glutamicum* and its effect on the carbon flux to threonine and related amino acids. *Appl Environ Microbiol* **60**:126-132.
- Rey, D.A., Pühler, A. and Kalinowski, J.** (2003) The putative transcriptional repressor McbR, member of the TetR-family, is involved in the regulation of the metabolic network directing the synthesis of sulfur containing amino acids in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* **103**:51-65.
- Rhee, K.Y., Parekh, B.S. and Hatfield, G.W.** (1996) Leucine-responsive regulatory protein-DNA interactions in the leader region of the *ilvGMEDA* operon of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **271**:26499-507.
- Rönsch, H., Kramer, R. and Morbach, S.** (2003) Impact of osmotic stress on volume regulation, cytoplasmic solute composition and lysine production in *Corynebacterium glutamicum* MH20-22B. *J Biotechnol* **104**:87-97.
- Rosypal, S.** (1997) Úvod do molekulární biologie (Díl první), Brno
- Ruklisha, M., Jonina, R., Paegle, L. and Petrovica, G.** (2001) Metabolism and lysine biosynthesis control in *Brevibacterium flavum*: impact of stringent response in bacterial cells. s. 51-57, v knize: Durieux, A. and Simon, J.P. (eds.), Applied microbiology, Kluwer Academic Publishers, Netherlands
- Rutledge, R., Ouellet, T., Hattori, J. and Miki, B.** (1991) Molecular characterization and genetic origin of the *Brassica napus* acetohydroxyacid synthase multigene family. *Mol Gen Genet* **229**:31-40.
- Sahm, H., Eggeling, L., Eikmanns, B. and Krämer, R.** (1995) Metabolic design in amino acid producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Rev* **16**:243-252.
- Sahm, H. and Eggeling, L.** (1999) D-Pantothenate synthesis in *Corynebacterium glutamicum* and use of *panBC* and genes encoding L-valine synthesis for D-pantothenate overproduction. *Appl Environ Microbiol* **65**:1973-1979.
- Sahm, H., Eggeling, L. and de Graaf, A.A.** (2000) Pathway analysis and metabolic engineering in *Corynebacterium glutamicum*. *Biol Chem* **381**:899-910.
- Sambrook, J. and Russel, D.V.** (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, third edition
- Shaner, D.L., Anderson, P.C. and Stidham, M.A.** (1984) Imidazolinones: Potent inhibitors of acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiol* **76**:545-546.
- Shaw, W.V.** (1975) Chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-resistant bacteria. *Methods Enzymol* **43**:737-755.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. and Pühler, A.** (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**:69-73.
- Simic, P., Sahm, H. and Eggeling, L.** (2001) L-threonine export: use of peptides to identify a new translocator from *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **183**:5317-5324.
- Singh, B.K., Stidham, M.A. and Shaner, D.L.** (1988) Assay of acetohydroxyacid synthase. *Anal Biochem* **171**:173-179.
- Singh, B.K. and Shaner, D.L.** (1995) Biosynthesis of Branched Chain Amino Acids: From Test Tube to Field. *Plant Cell* **7**:935-944.
- Snyder, D., Lary, J., Chen, Y., Gollnick, P. and Cole, J.L.** (2004) Interaction of the *trp* RNA-binding attenuation protein (TRAP) with anti-TRAP. *J Mol Biol* **338**:669-682.

- Snyder, L. and Champness, W. (2003) Molecular genetics of bacteria. ASM Press, Washington D.C., second edition
- Squires, C.H., Levinthal, M. and De Felice, M. (1981) A role for threonine deaminase in the regulation of alpha-acetolactate biosynthesis in *Escherichia coli* K12. *J Gen Microbiol* **127**:19-25.
- Stackebrandt, E., Rainey, F.A. and Ward-Rainey, N.L. (1997) Proposal of a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *Int. J Syst Bacteriol* **47**: 479-491.
- Talaro, K. and Talaro, A. (1996) Microbiology. Wm. C. Brown Publishers, Chicago, USA, second edition
- Tan, S., Evans, R.R., Dahmer, M.L., Singh, B.K. and Shaner, D.L. (2004) Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. *Pest Manag Sci* **61**:246-257.
- Tarleton, J.C., Malakooti, J. and Ely, B. (1994) Regulation of *Caulobacter crescentus* *ilvBN* gene expression. *J Bacteriol* **176**:3765-3774.
- Tauch, A., Hermann, T., Burkovski, A., Kramer, R., Puhler, A. and Kalinowski, J. (1998) Isoleucine uptake in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 is directed by the *brnQ* gene product. *Arch Microbiol* **169**:303-312.
- Tauch, A., Puhler, A., Kalinowski, J. and Thierbach, G. (2003) Plasmids in *Corynebacterium glutamicum* and their molecular classification by comparative genomics. *J Biotechnol* **104**:27-40.
- Tojo, S., Satomura, T., Morisaki, K., Yoshida, K., Hirooka, K. and Fujita, Y. (2004) Negative transcriptional regulation of the *ilv-leu* operon for biosynthesis of branched-chain amino acids through the *Bacillus subtilis* global regulator TnrA. *J Bacteriol* **186**:7971-7979.
- Trötschel, C., Kandirali, S., Diaz-Achirica, P., Meinhardt, A., Morbach, S., Kramer, R. and Burkovski, A. (2003) GltS, the sodium-coupled L-glutamate uptake system of *Corynebacterium glutamicum*: identification of the corresponding gene and impact on L-glutamate production. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**:738-742.
- Tsuchida, T. and Momose, H. (1986) Improvement of an L-leucine-producing mutant of *Brevibacterium lactofermentum* 2256 by genetically desensitizing it to alpha-acetohydroxy acid synthase. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**:1024-1027.
- Umbarger, H.E. (1983) The biosynthesis of isoleucine and valine and its regulation. s. 245-266, v knize: Herrmann, K.M. and Somerville, R.L. (eds.), Amino acids: biosynthesis and genetic regulation, Addison-Wesley Publishing Company, Advanced book program reading, Massachusetts
- Umbarger, H.E. (1996) Biosynthesis of the branched-chain amino acids. s. 442-457, v knize: Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Low, B.L., Magasanik, B., Schaechter, M. and Umbarger, H.E. (eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* (Cellular and molecular biology), ASM Press, Washington
- Uy, D., Delaunay, S., Germain, P., Engasser, J.M. and Goergen, J.L. (2003) Instability of glutamate production by *Corynebacterium glutamicum* 2262 in continuous culture using the temperature-triggered process. *J Biotechnol* **104**:173-184.
- van der Rest, M.E., Lange, C. and Molenaar, D. (1999) A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogenetic plasmid DNA. *Appl Microbiol Biotechnol* **52**:541-545.
- Vašicová, P., Abrahámová, Z., Nešvera, J., Pátek, M. and Sahn, H. (1998) Integrative and autonomously replicating vectors for analysis of promoters in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol Techniques* **12**:743-746.
- Vašicová, P., Pátek, M., Nešvera, J., Sahn, H. and Eikmanns, B. (1999) Analysis of the *Corynebacterium glutamicum* *dapA* promoter. *J Bacteriol* **181**:6188-6191.

- Vitreschak, A.G., Lyubetskaya, E.V., Shirshin, M.A., Gelfand, M.S. and Lyubetsky, V.A.** (2004) Attenuation regulation of amino acid biosynthetic operons in proteobacteria: comparative genomics analysis. *FEMS Microbiol Lett* **234**:357-370.
- Voet, D. a Voetová, J.G.** (1995) Biochemie. Victoria Publishing, Praha ČR
- Vyazmensky, M., Sella, C., Barak, Z. and Chipman, D.M.** (1996) Isolation and characterization of subunits of acetohydroxy acid synthase isozyme III and reconstitution of the holoenzyme. *Biochemistry* **35**:10339-10346.
- Wang, Q. and Calvo, J.M.** (1993) Lrp, a global regulatory protein of *Escherichia coli*, binds co-operatively to multiple sites and activates transcription of *ilvIH*. *J Mol Biol* **229**:306-318.
- Weinstock, O., Sella, C., Chipman, D.M. and Barak, Z.** (1992) Properties of subcloned subunits of bacterial acetohydroxy acid synthases. *J Bacteriol* **174**:5560-5566.
- Wendisch, V.F.** (2003) Genome-wide expression analysis in *Corynebacterium glutamicum* using DNA microarrays. *J Biotechnol* **104**:273-285.
- Westerfeld, W.W.** (1945) A colorimetric detection of blood acetoin. *J Biol Chem* **161**:495-502.
- Wittmann, C., Kiefer, P. and Zelder, O.** (2004a) Metabolic fluxes in *Corynebacterium glutamicum* during lysine production with sucrose as carbon source. *Appl Environ Microbiol* **70**:7277-7287.
- Wittmann, C., Kim, H.M. and Heinzle, E.** (2004b) Metabolic network analysis of lysine producing *Corynebacterium glutamicum* at a miniaturized scale. *Biotechnol Bioeng* **87**:1-6.
- Wohlleben, W., Muth, G. and Kalinowski J.** (1993) Genetic engineering of gram positive bacteria. s. 83-133, v knize: Pühler, A. (ed.), Genetic engineering of microorganisms, VCH Weinheim
- Yanofsky, C.** (2004) The different roles of tryptophan transfer RNA in regulating *trp* operon expression in *E. coli* versus *B. subtilis*. *Trends Genet* **20**:367-374.
- Zohar, Y., Einav, M., Chipman, D.M. and Barak, Z.** (2003) Acetohydroxyacid synthase from *Mycobacterium avium* and its inhibition by sulfonyleureas and imidazolinones. *Biochim Biophys Acta* **1649**:97-105.