

**Methioninaufnahme und -export in  
*Corynebacterium glutamicum***

**Inaugural-Dissertation**

**zur**

**Erlangung des Doktorgrades**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

**Christian Trötschel**

aus Leverkusen

**Köln, Mai 2005**

**Berichterstatter:**

Professor Dr. Reinhard Krämer

Professor Dr. Ulf-Ingo Flügge

Tag der Disputation: 05.07.2005

## **Methionine uptake and excretion in *Corynebacterium glutamicum***

The characterization of methionine uptake in *C. glutamicum* revealed two uptake systems. The first system is a high-affinity transporter with a  $K_m$  of  $\sim 0.1 \mu\text{M}$  and a  $V_{\text{max}}$  of  $\sim 0.7 \text{ nmol/min (mg dw)}$ . Data base searches with the *E. coli* methionine uptake system MetD as query resulted in the identification of the genes *metI*, *metN* and *metQ* in *C. glutamicum*. The expression of this gene cluster encoding an ABC transporter is regulated by the repressor McbR.

The second uptake system is a medium-affinity transporter with a  $K_m$  of  $\sim 88 \mu\text{M}$  and a  $V_{\text{max}}$  of  $\sim 1.65 \text{ nmol/min (mg dw)}$ . This transport system, named MetP according to its *E. coli* counterpart was characterized in detail in the *metNI* deletion strain. Because of its sodium dependency MetP is a secondary active transporter, which is inhibited by the addition of alanine, valine, isoleucine, leucine and cysteine. Furthermore, *metP* does not belong to the McbR regulon.

To characterize methionine export, an L-methionine containing dipeptide loading system was established. The dipeptide is taken up by the cell and hydrolyzed in the cytoplasm, resulting in a strong increase of the internal methionine concentration. Afterwards the internal concentration decreased. It was shown that BrnFE is the main export system for methionine, whereas the expression of *brnFE* depends on the cytoplasmic methionine concentration. Since there was methionine export detectable in the *brnE* deletion strain, a further export system was expected. Cgl0944, identified by DEUTENBERG (2003) in a gene expression analysis, could be excluded as a methionine export system. Investigations presented in this work indicate, that the further export system is not of secondary type and its activity is influenced by the external osmolality. Its corresponding gene is not regulated on the level of gene expression.

Furthermore, in this work the existence of extracellular membrane-bound or cell surface-attached hydrolases that cleave dipeptides, was proven.

## Methioninaufnahme und -export in *Corynebacterium glutamicum*

Die Untersuchung der Methioninaufnahme in *C. glutamicum* führte zur Charakterisierung von zwei Aufnahmesystemen. Bei dem ersten Transporter handelt es sich um ein hoch-affines System mit einem  $K_m$  von ca. 0,1  $\mu\text{M}$  und einer  $V_{\text{max}}$  von ca. 0,7 nmol/min (mg TG). Datenbank-Analysen mit dem *E. coli* Methioninaufnahmesystem MetD als Vorlage führten zur Identifizierung der Gene *metI*, *metN* und *metQ* in *C. glutamicum*. Die Expression dieses Genclusters, das einen ABC-Transporter für Methionin kodiert, wird durch den Repressor McbR reguliert.

Das zweite Aufnahmesystem ist mittel-affin mit einem  $K_m$  von ca. 88  $\mu\text{M}$  und einer  $V_{\text{max}}$  von ca. 1,65 nmol/min (mg TG). Dieser Methioninimporter, der analog zu *E. coli* MetP genannt wurde, konnte im *metNI*-Deletionsstamm charakterisiert werden. Da die Methioninaufnahme über MetP  $\text{Na}^+$ -abhängig ist, handelt es sich um einen sekundären Transporter, der sowohl durch Alanin, Leucin, Isoleucin, Valin als auch Cystein im Überschuss gehemmt wird. Das *metP*-Gen gehört nicht zum McbR-Regulon.

Um den Methioninexport in *C. glutamicum* zu charakterisieren, wurde ein Beladungssystem mit L-Methionin-haltigen Dipeptiden etabliert. Dabei wurde das Dipeptid von der Zelle aufgenommen und im Cytoplasma hydrolysiert, was zu einem sehr starken Anstieg der internen Methioninkonzentration führte. Anschließend nahm die zellinterne Methioninkonzentration wieder ab. Es wurde gezeigt, dass BrnFE das Haupt-Exportsystem für Methionin ist, wobei die Expression von *brnFE* von der zellinternen Methioninkonzentration abhängt. Da im *brnE*-Deletionsstamm noch Methioninexport zu sehen war, wurde ein weiterer Exporter angenommen. Cgl0944, das durch DEUTENBERG (2003) bei einer Genexpressionsanalyse identifiziert wurde, konnte als Methioninexporter ausgeschlossen werden. Eigene Analysen zeigten, dass der zweite Exporter nicht sekundär aktiv ist und seine Aktivität durch die externe Osmolalität beeinflusst wird. Das entsprechende Gen ist zudem nicht expressionsreguliert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte außerdem das Vorhandensein von extrazellulären, Membran- oder Zellwand-gebundenen Hydrolasen nachgewiesen werden, die Dipeptide spalten.

## Inhaltsverzeichnis

<b>I. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1. <i>Corynebacterium glutamicum</i> und seine Bedeutung in der Biotechnologie	1
2. Die essentielle Aminosäure Methionin	2
3. Biosynthese von Methionin und deren Regulation in <i>C. glutamicum</i>	3
4. Aminosäuretransport in Prokaryoten	6
4.1 Aminosäuretransporter in <i>C. glutamicum</i>	7
4.2 Mikrobieller Methionintransport	9
5. Ziele dieser Arbeit	13
<b>II. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>14</b>
1. Bakterienstämme und Plasmide	14
1.1 Bakterienstämme	14
1.2 Plasmide	16
2. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen	18
2.1 Nährmedien	18
2.1.1 Vollmedien für <i>E. coli</i>	18
2.1.2 Vollmedien für <i>C. glutamicum</i>	18
2.1.3 Minimalmedium für <i>C. glutamicum</i>	19
2.1.4 Antibiotika	19
2.2 Kultivierungsbedingungen	20
3. Molekularbiologische Techniken	20
3.1 DNA-Techniken	20
3.1.1 Präparation chromosomaler DNA aus <i>C. glutamicum</i>	20
3.1.2 Plasmid-Präparation aus <i>E. coli</i>	22
3.1.3 Plasmid-Präparation aus <i>C. glutamicum</i>	22
3.1.4 Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA aus Agarosegelen	22
3.1.5 Restriktion und Ligation von DNA	23
3.1.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	24
3.1.7 Klonierung von PCR-Fragmenten	25
3.1.8 DNA-Sequenzierung	26

## Inhaltsverzeichnis

---

3.2	RNA-Techniken	27
3.2.1	Präparation von Gesamt-RNA aus <i>C. glutamicum</i> und RNA-Gelelektrophorese	27
3.2.2	RNA-Hybridisierung mittels Dot- bzw. Slot-Blots	28
3.2.3	Präparation von RNA-Sonden durch <i>in vitro</i> -Transkription	29
<b>4.</b>	<b>Techniken zur Manipulation von Zellen</b>	<b>30</b>
4.1	Herstellung kompetenter Zellen und Transformation	30
4.1.1	Herstellung kompetenter Zellen des <i>E. coli</i> -Stammes DH5 $\alpha$ und Transformation	30
4.1.2	Herstellung kompetenter Zellen von <i>C. glutamicum</i> und Elektroporation	31
4.2	Konstruktion von Deletionsmutanten und Konjugation	32
4.3	Konstruktion von Insertionsmutanten	34
<b>5.</b>	<b>Biochemische Techniken</b>	<b>34</b>
5.1	Bestimmung der Aminosäureaufnahme	34
5.2	Bestimmung der Aminosäureexkretion	36
5.2.1	Silikonölzentrifugation und Dipeptidfütterung	36
5.2.2	HPLC-Analyse	37
<b>6.</b>	<b>Bioinformatische Ansätze</b>	<b>38</b>
6.1	Ähnlichkeitssuche	38
6.2	Sekundärstrukturvorhersage von Proteinen	38
<b>III.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>39</b>
<b>1.</b>	<b>Methioninaufnahme in <i>C. glutamicum</i></b>	<b>39</b>
1.1	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 nimmt aktiv L-Methionin auf	39
1.2	Identifikation des hoch-affinen Methioninaufnahmesystems MetD	42
1.2.1	Identifikation von <i>metQNI</i>	42
1.2.2	Das Gencluster <i>metQNI</i> kodiert in <i>C. glutamicum</i> ein hoch-affines L-Methioninaufnahmesystem	43
1.3	Das Gencluster <i>metQNI</i> wird durch den Repressor McbR reguliert	44
1.4	Biochemische Charakterisierung von MetP	45
1.4.1	MetP ist ein Na <sup>+</sup> -abhängiger Transporter	46
1.4.2	Die Methioninaufnahme über MetP wird durch Cystein und die aliphatischen Aminosäuren Leucin, Valin, Isoleucin und Alanin gehemmt	47
1.4.3	K <sub>i</sub> -Wert-Bestimmung der Inhibitoren Leucin und Cystein	49
1.5	Identifikation von <i>metP</i>	52
1.5.1	L-Methionin wird nicht über BrnQ transportiert	52
1.5.2	Das putative Gen <i>metP</i> gehört nicht zum McbR-Regulon	53
1.5.3	MetP wird nicht von einem <i>E. coli ykfD</i> -Homolog kodiert	55

## Inhaltsverzeichnis

---

1.5.4	MetP wird von <i>Cgl1030</i> kodiert	56
1.6	Biochemische Charakterisierung von MetD	57
1.7	Zusammenfassung der Methioninaufnahme in <i>C. glutamicum</i>	59
<b>2.</b>	<b>Methioninexkretion in <i>C. glutamicum</i></b>	<b>59</b>
2.1	Etablierung der Dipeptidfütterung	60
2.2	Extrazelluläre Hydrolasen setzen Dipeptide um	61
2.3	Methioninbiosynthese und -katabolismus sind bei der Dipeptidfütterung unbedeutend	66
2.4	Die externe Methioninkonzentration wird durch die Methioninaufnahme nicht beeinflusst	68
2.5	Chloramphenicol beeinflusst die Methioninexkretion	69
2.6	Identifikation von möglichen Methioninexportern	70
2.7	<i>Cgl0944</i> ist nicht am Methioninexport beteiligt	71
2.8	Die Gene <i>brnFE</i> kodieren einen Methioninexporter	73
2.8.1	Methioninexport bei <i>C. glutamicum</i> $\Delta metNI \Delta brnE$	73
2.8.2	Einfluss der Überexpression von <i>brnFE</i> auf den Export	75
2.8.3	Das Gencluster <i>brnFE</i> ist expressionsreguliert	77
2.9	Isoleucin wird gegenüber Methionin von BrnFE geringfügig bevorzugt	80
2.10	Biochemische und molekularbiologische Charakterisierung der weiteren Methioninexporter	83
2.10.1	Die Gene der weiteren Methioninexporter sind nicht expressionsreguliert	83
2.10.2	Die weiteren Methioninexporter sind nicht sekundär aktiv	85
2.10.3	Die externe Osmolalität beeinflusst die Aktivität der weiteren Methioninexporter	86
2.10.4	Methionin wird nicht gemeinsam mit Prolin exportiert	88
2.11	Zusammenfassung der Methioninexkretion in <i>C. glutamicum</i>	91
<b>IV.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>92</b>
1.	Methioninaufnahme in <i>C. glutamicum</i>	93
2.	Methioninexkretion in <i>C. glutamicum</i>	98
3.	Extrazelluläre Dipeptidhydrolasen in <i>C. glutamicum</i>	105
4.	Modell des Methionintransports und der Dipeptidhydrolyse in <i>C. glutamicum</i>	106
<b>V.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>107</b>
<b>VI.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>109</b>

## Abkürzungen

Ap <sup>R</sup>	Resistenz gegen Ampicillin
BHI	Brain-Heart-Infusion
CAM	Chloramphenicol
CCCP	Carbonylcyanid-M-Chlorophenylhydrazon
Cm <sup>R</sup>	Resistenz gegen Chloramphenicol
CSPD	Dinatrium 3-(4-Methoxyspiro (1,2-Dioxetan-3,2-(5-Chloro)tricyclo [3.3.1.1 <sup>3</sup> ,7]decan)-4-yl)Phenylphosphat
dpm	Zerfälle pro Minute
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
Km <sup>R</sup>	Resistenz gegen Kanamycin
Nx <sup>R</sup>	Resistenz gegen Nalidixin
Tc	Tetracyclin



## I. Einleitung

### 1. *Corynebacterium glutamicum* und seine Bedeutung in der Biotechnologie

*Corynebacterium glutamicum* gilt heute als der bedeutendste Mikroorganismus bei der biotechnologischen Herstellung von Aminosäuren. Im Rahmen eines Screening-Programms für Aminosäure-produzierende Bakterien wurde *C. glutamicum* 1957 aus einer Bodenprobe des Zoos von Tokio isoliert und charakterisiert (KINOSHITA *et al.*, 1957; UDAKA, 1960; ABE *et al.*, 1967). Dieses Gram-positive, apathogene Bodenbakterium ist unbeweglich und nicht-sporulierend. Es verdankt seinen Namen dem meist keulenförmigen Aussehen (*coryne* = Keule). Zusammen mit den pathogenen Stämmen *C. diphtheriae*, *Mycobacterium tuberculosis* und *M. leprae* wird *C. glutamicum* zu den Mycolsäure-haltigen Actinomyceten gezählt (MINNIKIN, 1982; STACKEBRANDT *et al.*, 1997).

Seit seiner Entdeckung als natürlicher Glutamat-Produzent werden *C. glutamicum*-Stämme in der mikrobiellen Produktion von Aminosäuren, Antibiotika und Nukleotiden eingesetzt (SUZUKI *et al.*, 1972; ENEL *et al.*, 1985). Die besondere Eignung von *C. glutamicum* zur Produktion von Aminosäuren ist möglicherweise dadurch gegeben, dass dieses Bakterium nur über einen eingeschränkten Aminosäurekatabolismus verfügt (WOHLLEBEN *et al.*, 1993). L-Glutamat, das in der Lebensmittelindustrie als Geschmacksverstärker eingesetzt wird, und L-Lysin, das als Futtermitteladditiv in der Tierernährung Anwendung findet, sind die beiden wichtigsten biotechnologisch erzeugten Aminosäuren. Die Erhöhung der Produktion von 1.000.000 Jahrestonnen L-Glutamat bzw. 450.000 Jahrestonnen L-Lysin (LEUCHTENBERGER, 1996; EGGELING und SAHM, 1999) auf über 1.500.000 bzw. 550.000 Jahrestonnen (HERMANN, 2003) innerhalb der letzten Jahre zeigt die enorme wirtschaftliche Bedeutung dieser Aminosäuren. Weiter sind L-Threonin und D,L-Methionin als wichtige Futtermitteladditive zu nennen. Während L-Threonin mit einer Jahresproduktion von 30.000 Tonnen ausschließlich mit *Escherichia coli* fermentativ hergestellt wird (HERMANN, 2003), wird D,L-Methionin chemisch synthetisiert (über 400.000 Jahrestonnen).

### **2. Die essentielle Aminosäure Methionin**

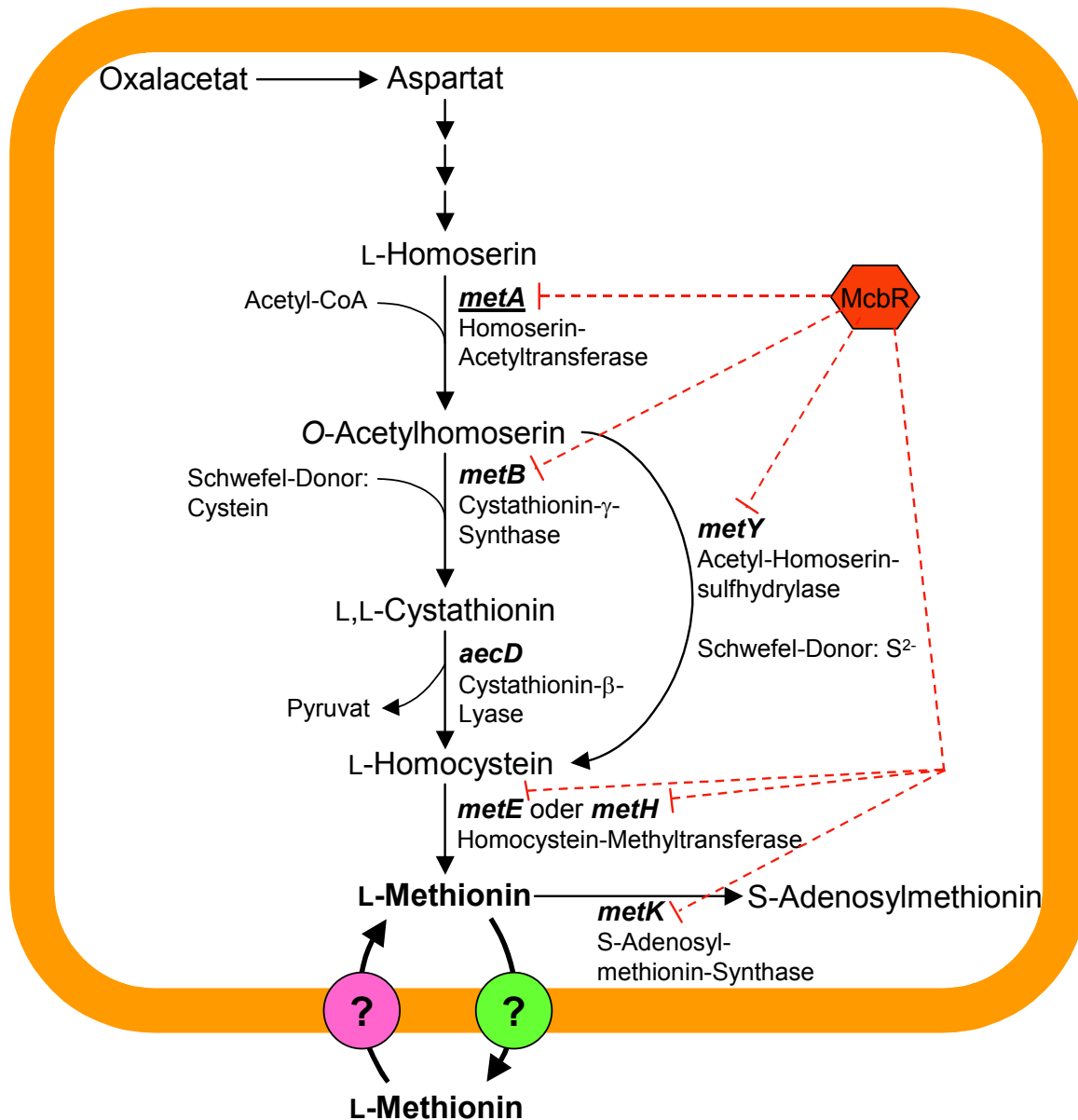
Methionin wurde im Jahre 1922 bei der Suche nach Komponenten aus Protein-Hydrolysaten, die das Wachstum von Streptokokken fördern können, erstmals aus Casein isoliert (MUELLER, 1922). Obwohl der Methionin-Anteil in Proteinen relativ gering ist, spielt es eine wichtige Rolle im Zellstoffwechsel. Bei Prokaryoten ist das Derivat N-Formylmethionyl-tRNA<sup>met</sup> das Initiator-Molekül der Proteinbiosynthese (ADAMS *et al.*, 1966; WEBSTER *et al.*, 1966). Die aus L-Methionin und ATP abgeleitete Verbindung S-Adenosylmethionin findet neben der Funktion als Hauptmethylgruppendedonor der Zelle (CANTONI, 1953; LU, 2000) auch in vielen Synthesen des intermediären Stoffwechsels, wie z.B. der Liponsäure- oder Polyaminsynthese, Verwendung.

Industriell erzeugtes D,L-Methionin wird hauptsächlich als Futtermitteladditiv in der Tiernahrung verwendet, da Methionin eine für viele Nutztiere essenzielle Aminosäure darstellt. Vom Menschen und den meisten Tieren können essenzielle Aminosäuren nicht selbst synthetisiert werden, so dass sie mit der Nahrung aufgenommen werden müssen. Da viele Nahrungs- und Futtermittel wie z.B. Getreide, Sojabohnen, Mais oder Reis relativ arm an den essenziellen Aminosäuren Methionin, Lysin und Threonin sind, wird D,L-Methionin, ebenso wie L-Lysin und L-Threonin, als Futtermitteladditiv verwendet. Methionin ist daher vor allem in der Schweine- und Geflügelzucht von großer Bedeutung. Zum einen spielt Methionin eine wichtige Rolle im Fettstoffwechsel und zum anderen ist Methionin bei Geflügel die erste limitierende Aminosäure, so dass ein Mangel die Verwertbarkeit des Futters herabsetzt. Somit bestimmt Methionin, als limitierende Aminosäure, zu welchem Prozentsatz alle übrigen Aminosäuren im Tierfutter verwertet werden können. Alle im Überschuss aufgenommenen Aminosäuren werden nicht in tierisches Protein umgesetzt, sondern abgebaut und ausgeschieden. Durch den gezielten Zusatz der limitierenden Aminosäure wird eine effektive Steigerung des Nährwerts erreicht, wodurch sich die benötigte Futtermenge und auch der Stickstoffgehalt der Exkremente reduziert. Dieser Umstand hat Methionin zu einer der wirtschaftlich bedeutendsten Aminosäuren werden lassen. Im Gegensatz zu den biotechnologisch erzeugten Aminosäuren L-Glutamat und L-Lysin wird D,L-Methionin chemisch synthetisiert (LEUCHTENBERGER, 1996; EGGELING *et al.*, 2001). Die Synthese im Carbonat-Prozess erfolgt über mehrere Zwischenschritte. Methylmercaptan wird mit Acrolein im ersten Schritt zu 3-Methylthiopropional (MMP) umgewandelt. Im zweiten Schritt

wird durch den Zusatz von Blausäure, Kohlendioxid und Ammoniak unter hohem Druck aus MMP Hydantoin. Anschließend entsteht durch die Zugabe von Kaliumcarbonat im folgenden Schritt Methionat. Am Ende des Carbonat-Prozesses reagiert Kohlendioxid mit Methionat zu D,L-Methionin. Bezogen auf Acrolein liegt die Ausbeute von D,L-Methionin bei bis zu 95 % (LÜSSING *et al.*, 1974). Das bei der chemischen Synthese entstehende racemische Gemisch aus L- und D-Methionin kann von Säugern verwertet werden, da sie eine D-Methionin-Racemase besitzen. Eine biotechnologische Produktion, bei der ausschließlich die L-Form entstehen würde, ist daher nicht zwingend erforderlich. Die mikrobiologische Aminosäureproduktion bietet aber gegenüber der chemischen Synthese zahlreiche Vorteile: Als Ausgangssubstrate für die biotechnologische Produktion dienen die nachwachsenden und relativ günstigen Rohstoffe Zucker und Stärkehydrolysat sowie einfache Stickstoff- und Schwefelverbindungen. Außerdem sind die Rückstände der Fermentation biologisch abbaubar. Durch die Kenntnis der Methioninbiosynthese und deren Regulation in *C. glutamicum* wird eine biotechnologische Produktion von Methionin über ein rationales Stammdesign möglich.

### **3. Biosynthese von Methionin und deren Regulation in *C. glutamicum***

Methionin stellt unter zellbiologischen und industriellen Aspekten eine äußerst interessante Aminosäure dar. Aufgrund der biotechnologischen Bedeutung von *C. glutamicum* wurde in den letzten 10 Jahren sehr intensiv die Methioninbiosynthese und deren Regulation in diesem Mikroorganismus erforscht. Der derzeitige Kenntnisstand ist in Abbildung 1.1 zusammengefasst.



**Abb. 1.1:** Methioninbiosynthese und deren Regulation in *C. glutamicum* (durchgehende Linien = Methioninbiosynthese bzw. -transport, gestrichelte Linien = Repression durch McbR)

L-Methionin gehört zur Aspartat-Familie der Aminosäuren. Wie in Abbildung 1.1 zu sehen, wird Oxalacetat aus dem Citratzyklus zu Aspartat und schließlich zu L-Homoserin umgewandelt. Die Homoserin-Acetyltransferase, die von *metA* kodiert wird, katalysiert die Acylierung des L-Homoserins mit einem Acetyl-CoA-Molekül zu O-Acetylhomoserin (PARK *et al.*, 1998). Anschließend gibt es zwei alternative Wege zum L-Homocystein – die Transsulfonierung und die direkte Sulfhydrierung (HWANG *et al.*, 2002). Während der Transsulfonierung entsteht im ersten Schritt mit Hilfe der Cystathionin- $\gamma$ -Synthase, die von *metB* kodiert wird, L,L-Cystathionin aus O-Acetylhomoserin und L-Cystein (HWANG *et al.*, 1999). Die Cystathionin- $\beta$ -Lyase, von

*aecD* kodiert, katalysiert im zweiten Schritt die Reaktion des L,L-Cystathionins zum L-Homocystein, wobei zusätzlich ein Molekül Pyruvat entsteht (RÜCKERT *et al.*, 2003). Alternativ wird O-Acetylhomoserin bei der direkten Sulfhydrierung zusammen mit der Schwefelquelle Sulfid zu L-Homocystein umgesetzt. Diese Reaktion wird von der O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase, die von *metY* kodiert wird, katalysiert. Letztlich entsteht L-Methionin durch die Katalyse der Methionin-Synthase, die von *metE* oder *metH* kodiert wird. *C. glutamicum* verfügt über zwei Methionin-Synthasen: Die durch *metH* kodierte Methionin-Synthase ist Vitamin B<sub>12</sub>-abhängig und schneller als die durch *metE* kodierte Form, welche Vitamin B<sub>12</sub>-unabhängig ist (HWANG *et al.*, 2002; RÜCKERT *et al.*, 2003). Anschließend katalysiert die Methionin-Adenosyltransferase, die von *metK* kodiert wird (GROßMANN *et al.*, 2000), die Reaktion vom L-Methionin zum S-Adenosylmethionin, welches in vielen Reaktionen als Methylgruppendonor dient.

Die Methioninbiosynthese in *C. glutamicum* wird auf der Ebene der Transkription reguliert. Eine transkriptionelle Regulation von *hom* (FOLLETTIE *et al.*, 1988), *metB* und *metY* (HWANG *et al.*, 2002) durch L-Methionin wird angenommen, da Methionin im Medium die Expression dieser Gene unterdrückt. Im Wesentlichen wird die Methioninbiosynthese aber durch den transkriptionellen Repressor McbR (Methionine and cysteine biosynthesis Repressor), der zur TetR-Familie gehört, reguliert (REY *et al.*, 2003). Neben der Methioninbiosynthese reguliert McbR auch die Synthese von Cystein, das für die Synthese des Homocysteins benötigt wird. REY *et al.* (2003) konnten zeigen, dass die Expression der Gene *metY* (O-Acetyl-L-Homoserin-Sulfhydrylase), *metK* (SAM-Synthetase), *hom* (Homoserin-Dehydrogenase), *cysK* (L-Cystein-Synthase), *cysI* (NADPH-abhängige Sulfid-Reduktase) und *ssuD* (Alkansulfonat-Monooxygenase) durch McbR kontrolliert wird. In dem Stamm *C. glutamicum*  $\Delta mcbR$  sind diese Gene verstärkt exprimiert. Durch DNA-*microarray*-Hybridisierungen wurde für 86 weitere Gene eine erhöhte Transkription in diesem Stamm detektiert (REY *et al.*, 2005). Aus den Promotorsequenzen der sieben im Vergleich zum Wildtyp am stärksten exprimierten Gene im Stamm *C. glutamicum*  $\Delta mcbR$  konnte die putative Konsensus-Sequenz 5'-TAGAC-N<sub>6</sub>-GTCTA-3' als McbR-Bindemotiv abgeleitet werden. Über ein Kompetitor-Assay mit der Promotorsequenz des Gens *hom* bzw. durch kompetitive EMSA-Versuche mit dem potenziellen McbR-Bindemotiv der Gene *cysI*, *cysK*, *metK* und *mcbR* konnte eine spezifische Bindung von McbR an die 16 bp umfassende

Konsensus-Sequenz belegt werden. Diese Bindung wird von dem Effektormolekül S-Adenosylhomocystein, das ein S-Adenosylmethionin-Abbauprodukt ist, unterbunden. Durch Analyse der Promotorregionen von Genen, deren Expression in einer *mcbR*-Deletionsmutante verstärkt war, konnten 22 Genen dem McbR-Regulon zugeordnet werden. Darunter befanden sich die meisten Gene der Methionin- bzw. S-Adenosylmethionin-Biosynthese. Daneben gehören auch Gene, die für Proteine kodieren, die an der Sulfat-Reduktion, der Cysteinbiosynthese und der Aufnahme bzw. Verwertung von organischem Schwefel beteiligt sind, diesem Regulon an. Ebenfalls wurden auch zwei putative ABC-Transportsysteme für bislang unbekannte Substrate als Bestandteil des McbR-Regulons identifiziert (REY *et al.*, 2005).

#### **4. Aminosäuretransport in Prokaryoten**

Neben der Synthese und dem möglichen Katabolismus von Aminosäuren spielt auch der Transport von Substraten und Produkten durch die Membran eine wesentliche Rolle bei der biotechnologischen Produktion. Vor allem Exkretionsprozesse sind von großem Interesse, da das Produkt darüber ins Medium gelangt, wodurch der aufwendige Aufschluss der Zellen entfällt. Zudem kann der Export einen limitierenden Faktor der Aminosäure-Produktion darstellen. Aufgrund einer dann erhöhten internen Akkumulation der entsprechenden Aminosäure kann es zu einer Reduktion des Wachstums und zu einer verstärkten Inhibition der Biosynthese kommen. Auch Aufnahmeprozesse sind von Bedeutung, da eine eventuelle Wiederaufnahme des exkretierten Produkts die Produktionsrate senken würde (IKEDA und KATSUMATA, 1995; TRÖTSCHER *et al.*, 2003). Aufgrund dieses *futile cycles* würde die Zelle zusätzlich Energie verbrauchen.

Im natürlichen Habitat hat die Aufnahme von Aminosäuren für die Zelle allerdings einen physiologischen Vorteil. Aufgenommene Aminosäuren können direkt für die Proteinbiosynthese verwendet werden, ohne dass Energie für ihre Synthese aufgebracht werden muss. Zudem können die importierten Aminosäuren auch teilweise katabolisiert und als C- bzw. N-Quelle verwendet werden. An der Aminosäureaufnahme bzw. -exkretion können grundsätzlich primäre und sekundäre Transporter beteiligt sein. Sekundäre Transporter beziehen ihre Energie aus dem elektrochemischen Gradienten des Co-Substrates, das zusammen (Symport) oder im Austausch (Antiport) mit dem eigentlichen Substrat transportiert wird. Dagegen liefert

die ATP-Hydrolyse die Energie für primäre Transporter. Oftmals sind in einem Organismus mehrere Aufnahmesysteme für eine Aminosäure vorhanden. So besitzt *C. glutamicum* z.B. zwei Systeme für die Glutamataufnahme, ein primäres und ein sekundäres (s. 1.4.2). Dabei haben primär aktive Aufnahmesysteme für gewöhnlich eine sehr hohe Substrataffinität aber eine relativ niedrige Maximalgeschwindigkeit, während für sekundäre Transporter eine niedrigere Affinität und eine höhere Maximalgeschwindigkeit charakteristisch sind. Sind für eine Aminosäure mehrere Aufnahmesysteme vorhanden, wird das weniger affine, meist sekundäre System im Allgemeinen konstitutiv exprimiert, während das hoch affine meist primäre System nur im Notfall als *scavenger*-System induziert wird (KRÄMER, 1994).

### 4.1 Aminosäuretransporter in *C. glutamicum*

In *C. glutamicum* konnten bereits einige Aminosäuretransporter charakterisiert und auf molekularer Ebene identifiziert werden. Das folgende Kapitel gibt einen kurzen Überblick:

Für die biotechnologisch wichtigste Aminosäure L-Glutamat sind bereits die an der Aufnahme beteiligten Transporter identifiziert. Zum einen gibt es einen Bindeprotein-abhängigen ABC-Transporter, der von *gluABCD* kodiert wird (KRONEMEYER *et al.*, 1995) und eine Maximalgeschwindigkeit von 16 nmol/min (mg TG) aufweist. ABC (*ATP binding cassette*)-Transporter sind primär aktiv und beziehen ihre Energie aus der ATP-Hydrolyse. Das *gluABCD-Cluster* unterliegt in Vollmedium der Glukose-Katabolit-Repression und ist daher reprimiert. Zum anderen konnte ein sekundär aktiver Importer mit einer Maximalgeschwindigkeit von 15 nmol/min (mg TG) charakterisiert werden (BURKOVSKI *et al.*, 1996). Dieser Transporter wird von *glts* kodiert (TRÖTSCHHEL *et al.*, 2003). Eine Deletion bzw. Überexpression von *glts* bewirkte eine Steigerung bzw. Reduktion der Glutamatproduktion. Damit konnte die Bedeutung von Aufnahmesystemen für die biotechnologische Aminosäureproduktion belegt werden. Der Glutamatexport wird ebenfalls von einem spezifischen Transporter katalysiert (HOISCHEN und KRÄMER, 1989). Dieser Transporter erreicht eine Exkretionsrate von ca. 40 nmol/min (mg TG) (GUTMANN *et al.*, 1992).

Für die ebenfalls industriell bedeutsame Aminosäure L-Lysin konnte sowohl die Aufnahme als auch der Export aufgeklärt werden. Das Lysinaufnahmesystem wird von *lysI* kodiert (SEEP-FELDHAUS *et al.*, 1991) und importiert L-Lysin im Austausch mit L-Alanin, L-Valin oder L-Leucin (BRÖER und KRÄMER, 1990). Die Aufnahmerate

ist mit 0,15 nmol/min (mg TG) allerdings sehr gering. Der Transporter LysE katalysiert den Export sowohl von L-Lysin als auch von L-Arginin (VRLJIC *et al.*, 1996; BELLMANN *et al.*, 2001). Ein von *lysG* kodiertes Protein induziert bei einer hohen internen Lysinkonzentration die Expression von *lysE*. Die Exkretionsrate der beiden basischen Aminosäuren L-Lysin und L-Arginin beträgt 1 nmol/min (mg TG). Obwohl der L-Argininexport bereits beschrieben ist, sind Aufnahmesysteme für diese Aminosäure weder charakterisiert noch identifiziert worden.

L-Threonin und L-Serin werden von ThrE exportiert (SIMIC *et al.*, 2001), wobei die Transportrate für Threonin bei 4 nmol/min (mg TG) liegt. Ein Aufnahmesystem für L-Threonin bzw. L-Serin konnte bisher noch nicht identifiziert werden. PALMIERI *et al.* (1996) konnten allerdings zeigen, dass die Threoninaufnahme durch einen sekundär aktiven Na<sup>+</sup>-abhängigen Transporter katalysiert wird.

Die aromatischen Aminosäuren L-Tryptophan, L-Tyrosin und L-Phenylalanin werden von dem Aufnahmesystem AroP transportiert (WEHRMANN *et al.*, 1995). Eine biochemische Charakterisierung wurde bisher noch nicht vorgenommen. Ebenso wurde die Exkretion der aromatischen Aminosäuren bisher nicht untersucht.

Der Export von L-Isoleucin, L-Leucin und L-Valin wird von BrnFE katalysiert (KENNERKNECHT *et al.*, 2002). BrnFE ist eine Permease, die von den Genen *brnE* und *brnF* kodiert wird. Beide Gene bilden ein Operon. Somit besteht dieser Exporter, der der neuen LIV-E-Familie angehört, aus zwei Untereinheiten. Für BrnE wurden 4 Transmembransegmente und für BrnF 7 Transmembransegmente vorhergesagt. Isoleucin und Leucin werden über BrnFE mit einer vergleichbaren Rate von ca. 7 nmol/min (mg TG) exportiert, wogegen Valin mit einer signifikant niedrigeren Rate exkretiert wird. *Upstream* von *brnF* befindet sich ein divergent exprimiertes Gen, welches für einen Lrp-ähnlichen Regulator kodiert. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Gen essenziell für den aktiven Export von Isoleucin ist. Die Aufnahme von L-Isoleucin und L-Leucin wird von dem sekundären Na<sup>+</sup>-abhängigen Transporter BrnQ katalysiert (EBBIGHAUSEN *et al.*, 1989; TAUCH *et al.*, 1998). Die Maximalgeschwindigkeit ist mit 1,1 nmol/min (mg TG) relativ niedrig.

Methioninaufnahmesysteme und -exporter in *C. glutamicum* sind bisher weder biochemisch charakterisiert noch auf molekularer Ebene identifiziert worden.



### 4.2 Mikrobieller Methionintransport

Obwohl bereits einige Aminosäuretransporter in *C. glutamicum* identifiziert werden konnten, wurde der Methionintransport in diesem Organismus noch nicht untersucht. Lediglich die fermentative Produktion von Methionin wird in der Literatur beschrieben. So erreichten BANIK und MAJUMDAR (1974) mit einer durch Röntgenbestrahlung erzeugten Mutante eine Methionin-Ausbeute von ca. 3 g/l Kulturmedium. Diese Produktivität wurde aber nur erreicht, wenn die Inkubation 3 Tage bei 28 °C in einem 100 ml-Schüttelkolben in 25 ml Medium durchgeführt wurde. Zudem muss das Medium 5 % Maltose, 0,8 % Ammoniumnitrat und 1 µg/ml Biotin enthalten. KASE und NAKAYAMA (1975) konnten mit einer Methioninanalogon-resistenten Mutante die Methionin-Produktion auf 2 g/l Kulturmedium steigern. Das Medium musste dafür auf jeden Fall 10 % Glukose enthalten. Eine Erhöhung der Produktivität war dabei verbunden mit einem erhöhten Level und reduzierter Repressibilität von Methionin-bildenden Enzymen. Zuletzt konnten PHAM *et al.* (1992) eine Methionin-Produktion von ca. 3,6 g/l Kulturmedium mit dem *C. glutamicum*-Stamm ATCC 21608 zeigen. Dabei wurde die Ausbeute aber nur erreicht, wenn das Kulturmedium Molasse und Kokosnuss-Wasser mit Ammoniumsulfat enthielt. DEUTENBERG (2003) konnte mit dem gezielt mutagenisierten Stamm *C. glutamicum* DD3 nach 48 Stunden Fermentation 0,5 g Methionin/l Kulturmedium erreichen. In diesem Stamm sind die Regulorgene *mcbR* und *hcbR*, dessen Genprodukt als weiterer Regulator der Synthese organischer Schwefelverbindungen diskutiert wird, deletiert. Des Weiteren werden die Biosynthesegene *metA*, *metE*, *metY* mit Hilfe des Vektors pZ8-1 konstitutiv exprimiert. Darüber hinaus besitzt der Stamm ein *metK*-Allel, dessen Methionin-Adenosyltransferase eine im Vergleich zum Wildtyp um 75 % reduzierte Enzymaktivität aufweist. In keiner dieser Studien aber wurde der Methionintransport berücksichtigt. Derartige Daten gibt es allerdings von anderen Organismen.

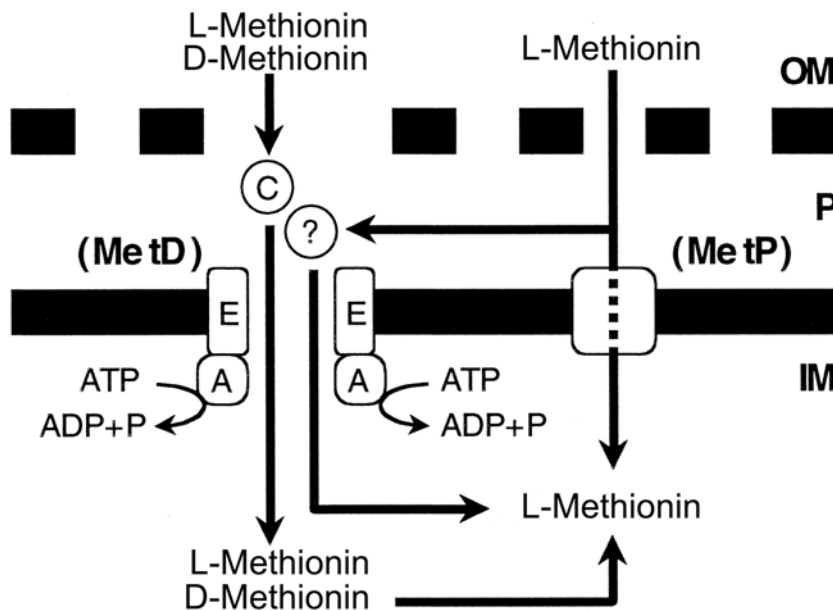
Eine biochemische und molekularbiologische Charakterisierung der Methioninaufnahme fand bei *E. coli*, *Salmonella typhimurium* und *Bacillus subtilis* statt. Diese drei Organismen besitzen jeweils (mindestens) zwei Methioninaufnahmesysteme.

Bereits vor dreißig Jahren erfolgte eine biochemische Charakterisierung der Methioninaufnahme im Gram-negativen Bakterium *E. coli* durch KADNER (1974). Hierbei konnte gezeigt werden, dass *E. coli* über mindestens zwei Aufnahmesysteme verfügt: das hochaffine MetD mit einem  $K_m$ -Wert von ca. 0,1 µM und das niedrig-affine MetP-System mit einem  $K_m$ -Wert von ca. 40 µM (KADNER 1974, KADNER

und WATSON 1974). Resultate von KADNER und WINKLER (1975) sowie KADNER (1977) legten zudem nahe, dass der hochaffine MetD-Transporter ATP-abhängig ist und neben L-Methionin auch das D-Isomer transportiert. Nach KADNER (1977) beträgt der  $K_m$ -Wert der D-Methioninaufnahme ca.  $1,16 \mu\text{M}$ . Der *metD*-Locus konnte von KADNER und WATSON (1974) zwischen den Loci *tonA* (später in *fhuA* umbenannt) und *proA* lokalisiert werden.

GÁL *et al.* (2002), MERLIN *et al.* (2002) und ZHANG *et al.* (2003) konnten schließlich den *metD*-Locus, ein für ein ABC-Transporter kodierendes Gencluster, in *E. coli* molekularbiologisch charakterisieren. Das Gencluster *metD*, das in *metNIQ* umbenannt wurde, besteht aus den Genen *metN*, kodiert für die ATP-bindende Untereinheit, *metI*, welches die Permeaseuntereinheit kodiert, und *metQ*, welches für ein periplasmatisches Bindepotein kodiert.

Die folgende Abbildung zeigt das postulierte Modell zur Methioninaufnahme in *E. coli* (verändert nach MERLIN *et al.*, 2002).



**Abb. 1.2:** Modell der Methioninaufnahme in *E. coli* (verändert nach MERLIN *et al.*, 2002); (OM = äußere Membran, IM = innere Membran, P = Periplasma)

Wie aus Abbildung 1.2 hervorgeht, werden sowohl D- als auch L-Methionin über das Aufnahmesystem MetD transportiert. D- bzw. L-Methionin wird von dem periplasmatischen Bindepotein (C) erkannt und gebunden. Daneben wird die Existenz eines weiteren periplasmatischen Bindepoteins diskutiert, das von *nlpA* kodiert wird (MERLIN *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2003). Anschließend wird das Methionin über die Permeaseuntereinheit (E) in die Zelle befördert. Die dafür nötige

Energie liefert die ATPase (A), die ATP hydrolysiert. Während MERLIN *et al.* (2002) und GÁL *et al.* (2002) lediglich belegen konnten, dass MetD D-Methionin transportiert, da ein methioninauxotropher Stamm mit einer *metNIQ*-Deletion auf D-Methionin nicht mehr wachsen konnte, zeigten ZHANG *et al.* (2003) durch Aufnahmemessungen, dass MetD sowohl L- als auch D-Methionin transportiert. Die L-Methioninaufnahme über MetD konnten MERLIN *et al.* (2002) und GÁL *et al.* (2002) nicht eindeutig in den Wachstumsversuchen zeigen, da das bereits erwähnte zweite Aufnahmesystem für L-Methionin (MetP) den Defekt in *metNIQ* kompensierte. Reguliert wird die Expression der Gene des *metNIQ*-Cluster über den Repressor MetJ und die Methioninkonzentration im Medium (GÁL *et al.*, 2002; MERLIN *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2003). Dabei befindet sich stromaufwärts des Gens *metN* die MET-Box, die Bindestelle für MetJ (THIEFFRY *et al.*, 1998).

Durch die Identifikation von *metNIQ* konnte im *metNIQ*-Deletionsstamm eine biochemische Charakterisierung des als „MetP“ bezeichneten niedrig-affinen Methioninaufnahmesystems erfolgen. ZHANG *et al.* (2003) konnten zeigen, dass die L-Methioninaufnahme über „MetP“ durch den Zusatz einer zu L-Methionin 10-fach höheren Konzentration an L-Threonin, L-Valin, L-Alanin bzw. L-Leucin deutlich reduziert war. Molekularbiologische Untersuchungen zur Identifikation von *metP* fehlen noch. Es wurde vermutet, dass der S-Methylmethionin-Importer MmuP in *E. coli* auch L-Methionin transportieren kann (THANBICHLER *et al.*, 1999). Aber weder GÁL *et al.* (2002) noch ZHANG *et al.* (2003) konnten einen Einfluss der *mmuP*-Deletion im *metNIQ*-Deletionsstamm auf den Methioninimport zeigen. Das lässt darauf schließen, dass MmuP nicht am L-Methionintransport beteiligt ist oder dass es noch ein weiteres L-Methioninaufnahmesystem in *E. coli* gibt. Während der Methioninimport in *E. coli* sehr ausführlich untersucht wurde, ist über die Methioninexkretion nichts bekannt.

In *S. typhimurium*, einem zu *E. coli* phylogenetisch eng verwandten Bakterium, wurde die Methioninaufnahme ebenfalls biochemisch charakterisiert. Wie bei *E. coli* besitzt das hochaffine Aufnahmesystem MetD, in *S. typhimurium* ursprünglich als MetP bezeichnet, für L-Methionin einen  $K_m$  von ca. 0,1  $\mu\text{M}$ , das niedrig-affine System einen  $K_m$  von 20-40  $\mu\text{M}$  (AYLING *et al.*, 1979; COTTAM und AYLING 1989; SHAW und AYLING 1991). POLAND und AYLING (1984) zeigten in *S. typhimurium* ebenfalls, dass der hochaffine MetD-Importer D-Methionin transportiert. Molekularbiologische Untersuchungen von GRUNDY und AYLING (1992) ergaben

vier oder mehr Komplementationsgruppen für den *metD*-Locus in *S. typhimurium*. Dies lässt auf einen Multiproteinkomplex für das hoch-affine System schließen, was auf einen ABC-Transporter hindeutet. In *S. typhimurium* wird die Aufnahme von Methionin über MetD genauso reguliert wie in *E. coli*. Der Repressor MetJ beeinflusst zusammen mit L-Methionin die L-Methioninaufnahme durch MetD (AYLING *et al.*, 1979). Zudem fanden AYLING *et al.* (1979), dass die L-Methioninaufnahme im *metD*-Deletionsstamm vor allem durch einen Überschuss an L-Leucin gehemmt werden konnte. Da es auch eine umgekehrte Inhibition gab, bei der ein L-Methioninüberschuss die L-Leucinaufnahme reduzierte, wird ein Leucinaufnahmesystem, das auch Methionin transportiert, diskutiert. Genauso wie für *E. coli* konnte bisher für *S. typhimurium* kein Methioninexportsystem beschrieben werden.

Auch beim Vertreter der Gram-positiven Bakterien *B. subtilis* konnte ein hoch-affines primär aktives Aufnahmesystem identifiziert werden (HULLO *et al.*, 2004). Die Gene *yusCBA* (umbenannt in *metNPQ*) kodieren für einen ABC-Transporter. Wie das MetD-System in *E. coli* und *S. typhimurium* importiert *yusCB* sowohl L- als auch D-Methionin. Die Regulation des entsprechenden Genclusters ist der der beiden anderen Prokaryoten analog. Über ein S-Box-Motiv wird die Expression von *yusCBA* in Abhängigkeit von der Methioninkonzentration reprimiert. Da der *yusCBA*-Deletionsstamm bei hohen Methioninkonzentrationen noch wachsen konnte, wird vermutet, dass es wie bei *E. coli* und *S. typhimurium* neben dem hoch-affinen Aufnahmesystem noch mindestens ein weiteres niedrig-affines Transportsystem geben muss. Dieser Transporter konnte bisher aber nicht identifiziert werden. Ebenso ist in *B. subtilis* der Methioninexport nicht untersucht worden.

In dem ebenfalls Gram-positiven Bakterium *Brevibacterium linens* wurde im Gegensatz zu den vorherigen Prokaryoten ein sekundär aktives, für L-Methionin stereospezifisches Aufnahmesystem mit niedriger Affinität ( $K_m$  von ca. 55  $\mu\text{M}$ ) biochemisch charakterisiert (FERCHICHI *et al.*, 1987). *B. linens* verfügt nur über ein L-Methioninaufnahmesystem. Dieser Transporter ist  $\text{Na}^+$ -abhängig und die L-Methioninaufnahme wird vom internen Methioninpool beeinflusst. Desweiteren konnten FERCHICHI *et al.* (1987) zeigen, dass unter anderem der L-Cystein-Zusatz die Methioninaufnahme stark hemmte. Auch der Zusatz der verzweigt-kettigen Aminosäuren Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin und Phenylalanin führte zur Inhibition der Methioninaufnahme.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Methioninaufnahme bereits in einigen Organismen weitgehend biochemisch charakterisiert werden konnte. Dabei gelang bisher nur die Identifikation eines Methioninaufnahmesystems vom ABC-Typ. Die biochemischen Daten weisen allerdings auf die Existenz mindestens eines weiteren Aufnahmesystems hin, das sekundär aktiv sein könnte. Zur Exkretion von Methionin fanden noch keine Untersuchungen statt.

### **5. Ziele dieser Arbeit**

Im Rahmen dieser Arbeit war geplant, sowohl die Aufnahme als auch den Export von Methionin im biotechnologisch bedeutenden Organismus *C. glutamicum* biochemisch zu charakterisieren und die beteiligten Transportproteine zu identifizieren.

Für die Charakterisierung der Methioninaufnahme sollten über Messungen mit radioaktiv-markiertem Methionin die kinetischen Daten, die energetische Kopplung, eventuelle Cosubstrate und mögliche Kompetitoren ermittelt werden. Zum einen sollte die Identifizierung der Gene für die Aufnahmesysteme durch die gezielte Inaktivierung eines Transporters, der eine große Übereinstimmung zu einem bereits bekannten Methioninimporter hat, erfolgen. Zum anderen war geplant, Gene, die für Aufnahmesysteme kodieren, durch eine Transposon-Mutagenese mit einem methioninauxotrophen Stamm zu identifizieren. Durch die Deletion der Gene, die die Aufnahmesysteme kodieren, sollte schließlich die Produktionsrate gesteigert und ein *futile cycling* verhindert werden.

Die Exkretion des Methionins ist der zweite entscheidende Transportprozess, der die biotechnologische Produktion limitieren kann. Da hierfür verantwortliche Transporter noch nicht identifiziert wurden, war ein Ziel dieser Arbeit, den Export mit Hilfe der Dipeptidfütterung, bei der die Zellen mit Methionin-haltigen Dipeptiden beladen werden, biochemisch zu charakterisieren. Dabei sollte auch der Einfluss der Genexpression auf den Export untersucht werden. Die Identifizierung der Gene, die putative Exporter kodieren, sollte ebenfalls mit der Dipeptidfütterung erfolgen. Es war geplant, eine veränderte Expression von Exporter-kodierenden Genen aufgrund der Dipeptidfütterung mit DNA-*microarrays* zu detektieren. Auch war beabsichtigt, durch die Überexpression der Exporter-kodierenden Gene, die Produktionsrate zu steigern.

## II. Material und Methoden

### 1. Bakterienstämme und Plasmide

#### 1.1 Bakterienstämme

Die folgende Tabelle gibt die in dieser Arbeit verwendeten *C. glutamicum*- und *E. coli*-Stämme sowie relevante Geno- und Phänotypen (Km: Kanamycin; Nx<sup>R</sup>: Resistenz gegen Nalidixinsäure; Tc: Tetracyclin) wieder.

**Tab. 2.1:** In dieser Arbeit verwendete *E. coli* und *C. glutamicum*-Stämme und ihre Eigenschaften

Gattung	Stamm	Genotyp, Phänotyp	Referenz/Quelle
<i>C. glutamicum</i>	ATCC 13032	Wildtyp	ABE <i>et al.</i> , 1967
	RES167	restriktionsdefizientes Derivat von ATCC13032, $\Delta(cgIIIM-cgIIIR-cgIIIR)$ , Nx <sup>R</sup>	TAUCH <i>et al.</i> , 2002
	ATCC 13032 $\Delta mcbR$	ATCC 13032 mit Deletion von <i>mcbR</i>	REY <i>et al.</i> , 2003 DEGUSSA AG (Halle, BRD)
	ATCC 13032 $\Delta metNI$	ATCC 13032 mit Deletion von <i>metI</i> und <i>metN</i>	diese Arbeit
	ATCC 13032 $\Delta metNI \Delta brnE$	ATCC 13032 $\Delta metNI$ mit Deletion von <i>brnE</i>	diese Arbeit
	ATCC 13032 $\Delta metNI \Delta Cgl0944$	ATCC 13032 $\Delta metNI$ mit Deletion von <i>Cgl0944</i>	diese Arbeit
	ATCC 13032 $\Delta metNI \Delta brnE \Delta Cgl0944$	ATCC 13032 $\Delta metNI \Delta brnE$ mit Deletion von <i>Cgl0944</i>	diese Arbeit
	ATCC 13032 $\Delta metNI \Delta brnE \Delta yggB$	ATCC 13032 $\Delta metNI \Delta brnE$ mit Deletion von <i>yggB</i>	diese Arbeit
	ATCC 13032 <i>metI::pK18mob</i>	ATCC 13032 mit pK18mob-Insertion in <i>metI</i>	diese Arbeit

## II. Material und Methoden

ATCC 13032 <i>metN</i> :: pK18 <i>mob</i>	ATCC 13032 mit pK18 <i>mob</i> -Insertion in <i>metN</i>	diese Arbeit
ATCC 13032 $\Delta$ <i>metNI</i> <i>Cgl0470</i> :: pK18 <i>mob</i>	ATCC 13032 $\Delta$ <i>metNI</i> mit pK18 <i>mob</i> -Insertion in <i>Cgl0470</i>	diese Arbeit
ATCC 13032 $\Delta$ <i>metNI</i> <i>Cgl0632</i> :: pK18 <i>mob</i>	ATCC 13032 $\Delta$ <i>metNI</i> mit pK18 <i>mob</i> -Insertion in <i>Cgl0632</i>	diese Arbeit
ATCC 13032 $\Delta$ <i>metNI</i> <i>Cgl0633</i> :: pK18 <i>mob</i>	ATCC 13032 $\Delta$ <i>metNI</i> mit pK18 <i>mob</i> -Insertion in <i>Cgl0633</i>	diese Arbeit
ATCC 13032 $\Delta$ <i>metNI</i> <i>Cgl0968</i> :: pK18 <i>mob</i>	ATCC 13032 $\Delta$ <i>metNI</i> mit pK18 <i>mob</i> -Insertion in <i>Cgl0968</i>	diese Arbeit
ATCC 13032 $\Delta$ <i>metNI</i> <i>Cgl1107</i> :: pK18 <i>mob</i>	ATCC 13032 $\Delta$ <i>metNI</i> mit pK18 <i>mob</i> -Insertion in <i>Cgl1107</i>	diese Arbeit
ATCC 13032 $\Delta$ <i>metNI</i> <i>Cgl1155</i> :: pK18 <i>mob</i>	ATCC 13032 $\Delta$ <i>metNI</i> mit pK18 <i>mob</i> -Insertion in <i>Cgl1155</i>	diese Arbeit
ATCC 13032 $\Delta$ <i>metNI</i> <i>Cgl1331</i> :: pK18 <i>mob</i>	ATCC 13032 $\Delta$ <i>metNI</i> mit pK18 <i>mob</i> -Insertion in <i>Cgl1331</i>	diese Arbeit
ATCC 13032 $\Delta$ <i>metNI</i> <i>Cgl2460</i> :: pK18 <i>mob</i>	ATCC 13032 $\Delta$ <i>metNI</i> mit pK18 <i>mob</i> -Insertion in <i>Cgl2460</i>	diese Arbeit
ATCC 13032 $\Delta$ <i>metNI</i> <i>Cgl2551</i> :: pK18 <i>mob</i>	ATCC 13032 $\Delta$ <i>metNI</i> mit pK18 <i>mob</i> -Insertion in <i>Cgl2551</i>	diese Arbeit

	ATCC 13032 $\Delta metP$	ATCC 13032 mit Deletion von <i>metP</i>	diese Arbeit
	ATCC 13032 $\Delta metNI \Delta metP$	ATCC 13032 $\Delta metNI$ mit Deletion von <i>metP</i>	diese Arbeit
	RES167 $\Delta brnE$	RES167 mit Deletion von <i>brnE</i>	diese Arbeit
	RES167 $\Delta metA \Delta metNI$	RES167 mit Deletion von <i>metA</i> und <i>metNI</i>	diese Arbeit
<b><i>E. coli</i></b>	DH5 $\alpha$ (mcr)	<i>endA1 supE44 thi-1 <math>\lambda^-</math> recA1 gyrA96 relA1 deoR <math>\Delta(lacZYA-argF)</math> U169 <math>\Phi80 \Delta lacZ \Delta M15 mcrA \Delta(mmr hsdRMS mcrBC)</math></i>	GRANT <i>et al.</i> , 1990
	JM109	<i>F' traD36 lacI<sup>q</sup> <math>\Delta(lacZ)M15 proA^+ B^+ / e14^- (McrA^-) \Delta(lac-proAB) thi gyrA96 (Nx^R) endA1 hsdR17 (r_{km}^-) relA1 supE44 recA1</math></i>	YANISCH-PERRON <i>et al.</i> , 1985
	S17-1	<i>res-, Pro, RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7</i>	SIMON <i>et al.</i> , 1983

## 1.2 Plasmide

Die verwendeten Plasmide und ihre Eigenschaften sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

**Tab. 2.2:** In dieser Arbeit verwendete Plasmide und ihre Eigenschaften (Ap<sup>R</sup>: Resistenz gegen Ampicillin; Cm<sup>R</sup>: Resistenz gegen Chloramphenicol; Km<sup>R</sup>: Resistenz gegen Kanamycin)

Plasmid	Eigenschaft	Referenz/Quelle
pK18 <i>mobsacB</i>	Km <sup>R</sup> , <i>ori pUC, mob, sacB</i>	SCHÄFER <i>et al.</i> , 1994
pK18 <i>mobsacB</i> $\Delta metA$	pK18 <i>mobsacB</i> mit 2 kb-Fragment für <i>metA</i> -Deletion	diese Arbeit
pK18 <i>mobsacB</i> $\Delta metNI$	pK18 <i>mobsacB</i> mit 2 kb-Fragment für <i>metNI</i> -Deletion	diese Arbeit



## II. Material und Methoden

pK18 <i>mobsacB</i> $\Delta$ <i>metP</i>	pK18 <i>mobsacB</i> mit 2 kb-Fragment für <i>metP</i> -Deletion	diese Arbeit
pK18 <i>mobsacB</i> $\Delta$ <i>brnE</i>	pK18 <i>mobsacB</i> mit 2 kb-Fragment für <i>brnE</i> -Deletion	DEGUSSA AG (Halle, BRD)
pK18 <i>mobsacB</i> $\Delta$ <i>yggB</i>	pK18 <i>mobsacB</i> mit 2 kb-Fragment für <i>yggB</i> -Deletion	NOTTEBROCK <i>et al.</i> , 2003
pK18 <i>mob</i>	Km <sup>R</sup> , <i>ori</i> pUC, <i>mob</i> <i>C. glutamicum</i> -Insertionsvektor	SCHÄFER <i>et al.</i> , 1994
pK18 <i>mobmetI</i> '	pK18 <i>mob</i> mit <i>metI</i> -Insertionsfragment	diese Arbeit
pK18 <i>mobmetN</i> '	pK18 <i>mob</i> mit <i>metN</i> -Insertionsfragment	diese Arbeit
pK18 <i>mobCgl0470</i> '	pK18 <i>mob</i> mit <i>Cgl0470</i> -Insertionsfragment	diese Arbeit
pK18 <i>mobCgl0632</i> '	pK18 <i>mob</i> mit <i>Cgl0632</i> -Insertionsfragment	diese Arbeit
pK18 <i>mobCgl0633</i> '	pK18 <i>mob</i> mit <i>Cgl0633</i> -Insertionsfragment	diese Arbeit
pK18 <i>mobCgl0968</i> '	pK18 <i>mob</i> mit <i>Cgl0968</i> -Insertionsfragment	diese Arbeit
pK18 <i>mobCgl1107</i> '	pK18 <i>mob</i> mit <i>Cgl1107</i> -Insertionsfragment	diese Arbeit
pK18 <i>mobCgl1155</i> '	pK18 <i>mob</i> mit <i>Cgl1155</i> -Insertionsfragment	diese Arbeit
pK18 <i>mobCgl1331</i> '	pK18 <i>mob</i> mit <i>Cgl1331</i> -Insertionsfragment	diese Arbeit
pK18 <i>mobCgl2460</i> '	pK18 <i>mob</i> mit <i>Cgl2460</i> -Insertionsfragment	diese Arbeit
pK18 <i>mobCgl2551</i> '	pK18 <i>mob</i> mit <i>Cgl2551</i> -Insertionsfragment	diese Arbeit
pUC19	Ap <sup>R</sup> , <i>lacZ</i> $\alpha$	VIERA und MESSING, 1982
pXMJ19	<i>ptac</i> , <i>lacI</i> <sup>q</sup> , Cm <sup>R</sup>	JAKOBY <i>et al.</i> , 1999

pXMJ19 <i>Cgl0944</i>	pXMJ19 mit <i>Cgl0944</i> -Gen für <i>Cgl0944</i> -Überexpression	diese Arbeit
pZ8-1	<i>ptac</i> , Km <sup>R</sup> , <i>ori</i> pUC, <i>ori C. glutamicum</i> <i>C. glutamicum</i> -Expressionsvektor	DEGUSSA AG (Halle, BRD)
pZ8-1 <i>brnFE</i>	pZ8-1 mit <i>brnFE</i> -Genen für <i>brnFE</i> -Überexpression	diese Arbeit

## 2. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

### 2.1 Nährmedien

#### 2.1.1 Vollmedien für *E. coli*

Die genutzten *E. coli*-Stämme wurden standardmäßig in LB (Luria Bertani)-Medium (Trypton 10 g/l, Hefeextrakt 5 g/l, NaCl 10 g/l; nach SAMBROOK *et al.*, 1989) kultiviert. Diesem Medium konnten 15 g/l Bacto-Agar (Difco, Detroit, USA) für die Herstellung von Agarplatten zugesetzt werden.

Für die Herstellung superkompetenter (*E. coli*-) Zellen wurden zudem noch TB-Puffer (10 mM PIPES, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl, 55 mM MnCl<sub>2</sub>; mit KOH auf pH 6,7 eingestellt) und SOB-Medium (2,5 mM KCl; 10 mM NaCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 2 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt) benötigt. Außerdem wurde SOC-Medium (wie SOB mit 20 mM Glucose) für die Transformation der (*E. coli*-) Zellen verwendet.

#### 2.1.2 Vollmedien für *C. glutamicum*

BHI-Medium (Brain-Heart-Infusion; DIFCO/BD, Detroit, USA) wurde zur Kultivierung von *C. glutamicum* als Flüssigmedium (37 g/l H<sub>2</sub>O) oder mit 15 g/l Bacto-Agar (Difco) verfestigt benutzt.

Die Anzucht zur Herstellung von kompetenten Zellen für die Transformation durch Elektroporation erfolgte in 100 ml LB-Medium, das die Wachstumsinhibitoren Isonicotinsäurehydrazid (4 g/l), Glycin (25 g/l) und Tween-80 (1 g/l) enthielt (HAYNES und BRITZ, 1989). Die Regeneration der Zellen erfolgte in BHIS-Medium (37 g/l Brain-Heart-Infusion, 0,5 M Sorbitol).

### 2.1.3 Minimalmedium für *C. glutamicum*

Für die Messung der Aminosäureaufnahme bzw. deren -exkretion wurde *C. glutamicum* in MMI (Mineralsalzmedium I, modifiziert nach KASE und NAKAYAMA, 1972) inkubiert. Für das Mineralsalzmedium I wurde eine Stammlösung angefertigt und sterilisiert, die  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , Harnstoff,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  enthielt. Die restlichen Bestandteile wurden getrennt angesetzt und sterilisiert. Tabelle 2.3 zeigt die Zusammensetzung von MMI.

**Tab. 2.3:** Zusammensetzung des Mineralsalzmediums I (modifiziert nach KASE und NAKAYAMA, 1972)

Substanz	Konzentration
<u>Stammlösung</u>	
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5 g/l
Harnstoff	5 g/l
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2 g/l
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{ H}_2\text{O}$	2 g/l
	Einstellung des pH-Wertes mit NaOH auf 7,0
Glukose	40 bzw. 50 g/l
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,25 g/l
$\text{CaCl}_2$	0,01 g/l
<u>Spurenelementlösung</u>	
$\text{FeSO}_4$	10 mg/l
$\text{MnSO}_4$	10 mg/l
$\text{ZnSO}_4$	1 mg/l
$\text{CuSO}_4$	0,2 mg/l
$\text{NiCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,02 mg/l
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,09 mg/l
$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,06 mg/l
$\text{NaMoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,009 mg/l
Biotin	200 µg/l

### 2.1.4 Antibiotika

Die zur Selektion auf Antibiotikaresistenz eingesetzten Antibiotika wurden in destilliertem Wasser oder Ethanol (Chloramphenicol) gelöst, steril filtriert und den sterilen Medien (für Agarplatten auf ca. 50 °C abgekühlt) in den aufgeführten Endkonzentrationen (s. Tabelle 2.4) zugefügt.

**Tab. 2.4:** In dieser Arbeit verwendete Antibiotika in der dem Versuch entsprechenden Endkonzentration

Antibiotikum	Stammlösung [mg/ml]	Endkonzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]
Kanamycin	25	15 (nach Elektroporation) oder 25
Chloramphenicol	25	25
Carbenicillin*	50	100

\* für Ampicillinresistenz

## 2.2 Kultivierungsbedingungen

Das Zellwachstum konnte durch die Messung der optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) mit Hilfe von Photometern (Novaspec II oder Ultrospec 3000, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) ermittelt werden.

Die Kultivierung der Bakterienzellen erfolgte entweder bei 30 °C (*C. glutamicum*) oder bei 37 °C (*E. coli*). Die Kulturen wurden auf einem Rotationsschüttler geschüttelt.

Die Stämme (sowohl *E. coli* als auch *C. glutamicum*) wurden als Vorkultur für die Messungen, zur Herstellung einer Dauerkultur oder für eine Plasmidpräparation in 5 ml Vollmedium angezogen. Für die Messreihen sowie zur Herstellung elektrokompetenter Zellen dagegen wurde *C. glutamicum* in 20 ml (Messreihe) bzw. 10 ml (kompetente Zellen) Flüssigmedium in 100 ml-Schüttelkolben mit Schikanen kultiviert. Des Weiteren fanden 2 l-Schüttelkolben mit Schikanen bei der Herstellung elektrokompetenter *C. glutamicum*-Zellen und superkompetenter *E. coli*-Zellen Anwendung.

## 3. Molekularbiologische Techniken

### 3.1 DNA-Techniken

#### 3.1.1 Präparation chromosomaler DNA aus *C. glutamicum*

Die Präparation der chromosomalen DNA für die Amplifikation von DNA-Abschnitten für eine Deletion, Insertion oder Überexpression erfolgte nach EIKMANN *et al.*

(1994). Die *C. glutamicum*-Zellen wurden über Nacht in 5 ml BHI-Medium angezogen. Nach der Zentrifugation (4.500x g, 4 °C, 10 min) und dem zweimaligen Waschen mit TE-Puffer wurden die Zellen in 1 ml TE-Puffer mit 15 mg/ml Lysozym resuspendiert. Nach einer Inkubation von 3 h unter Schütteln bei 37 °C wurden 200 µl 10 %ige-SDS-Lösung zugegeben und vorsichtig mit den Zellen vermischt. Nach 2 min wurden 3 ml Lysis-Puffer und 125 µl Proteinase K (Roche Diagnostics) zugesetzt und das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 2 ml gesättigte NaCl-Lösung zugegeben und durch 20-maliges vorsichtiges Invertieren des Gefäßes mit dem Ansatz vermischt. Nach der Zentrifugation (Eppendorf-Zentrifuge 5810 R; 4.500x g, RT, 30 min) wurde der Überstand in 50 ml-Röhrchen überführt und mit eiskaltem absoluten Ethanol bis zum Rand aufgefüllt und vermischt. Die ausgefällte DNA wurde dann mehrmals in 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen und schließlich an der Luft getrocknet. Nach dem Trocknen wurde die DNA in Wasser gelöst.

Die folgende Tabelle zeigt die Zusammensetzung von TE- und Lysis-Puffer.

**Tab. 2.5:** Zusammensetzung von TE- bzw. Lysispuffer

	TE-Puffer	Lysis-Puffer
Tris	10 mM	10 mM
NaCl	-	400 mM
EDTA	1 mM	2 mM
pH-Wert (HCl)	7,5	8,2

Für den Nachweis einer Insertion bzw. Deletion wurde die chromosomale DNA über eine Phenol-/Chloroformextraktion gewonnen. Dafür wurde ein Teil einer Kolonie in 200 µl Wasser resuspendiert. Nach der Zugabe von 200 µl Phenol wurde die Suspension gevortext und mindestens 10 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf Eis für 2 min abgekühlt. Der Suspension wurden danach 200 µl Chloroform zugesetzt. Nach dem Vortexen wurde das Gemisch bei 4 °C und 15.300x g 5 min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und nochmals wurden 200 µl Chloroform hinzugefügt. Die Suspension wurde erneut gevortext und bei 4 °C und 15.300x g 5 min zentrifugiert. Zuletzt wurde der Überstand, der die DNA enthält, in ein neues Eppendorf-Gefäß

überführt. Für die PCR zur Kontrolle der Deletion bzw. Insertion wurden 2 µl eingesetzt.

### 3.1.2 Plasmid-Präparation aus *E. coli*

Für die Plasmid-Mini-Präparation aus *E. coli* wurde das GFX<sup>TM</sup> Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) bzw. das NucleoSpin Extract-Kit (Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Die Präparation mit dem GFX<sup>TM</sup> Micro Plasmid Prep Kit erfolgte nach der Arbeitsanweisung, allerdings wurden die doppelten Mengen der Lösungen I, II und III für 2 – 3 ml Übernacht-Kultur zu den Zellen gegeben. Die Elution erfolgte zudem immer in 30 – 50 µl H<sub>2</sub>O.

Zur Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA wurde das Qiafilter Plasmid-Midi-Kit (Qiagen, Hilden) verwendet.

### 3.1.3 Plasmid-Präparation aus *C. glutamicum*

Das QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) wurde für die Plasmid-Mini-Präparation aus *C. glutamicum* benutzt. Die Präparation erfolgte weitgehend nach der Arbeitsanweisung. Allerdings wurden 2 ml Übernacht-Kultur abzentrifugiert und das Pellet wurde in 500 µl Puffer P1, der 15 mg/ml Lysozym enthielt, resuspendiert. Der Ansatz wurde anschließend 90 min bei 37 °C geschüttelt. Sowohl von Puffer P2 als auch von Puffer N3 wurde die doppelte Menge an Lösung in den folgenden Arbeitsschritten eingesetzt. Die Elution erfolgte auch bei dieser Plasmid-Präparation in 30 – 50 µl H<sub>2</sub>O.

### 3.1.4 Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Präparation von DNA und für Restriktionsanalysen wurde die DNA in TAE-Agarosegelen (0,8 %-ig zum Nachweis von Nukleotidsträngen > 500 bp oder 2 %-ig Nu-Sieve (FMC BioProducts, Rockland, Maine USA) zum Nachweis von Nukleotidsträngen < 500 bp) aufgetrennt (SAMBROOK *et al.*, 1989). Die Spannung bei der elektrophoretischen Auftrennung betrug 10 V/cm Gellänge (SAMBROOK *et al.*, 1989). Die Proben wurden mit einem 5 x Gel-Beladungspuffer (0,25 % Bromphenolblau, 40 % (w/v) Saccharose in Wasser) 1:5 zusammen auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard diente in der Regel der Lambda DNA/Eco911

(*Bst*II) Marker 15 (MBI Fermentas, Vilnius), von dem 5 µl – 7 µl (kleine Taschen) bzw. 10 µl – 12 µl (große Taschen) aufgetragen wurden. Für den Nachweis kleinerer Nukleotidstränge im Nu-Sieve-Gel wurde ein 100 bp-Marker verwendet. Die Färbung der Nukleinsäure erfolgte in einem Ethidiumbromidbad und konnte durch einen Image Master VDS (Amersham Biosciences, Freiburg) sichtbar gemacht werden. Die DNA wurde bei Bedarf mit Hilfe des QIAquick™ Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden) bzw. NucleoSpin Extract-Kits (Macherey-Nagel, Düren) nach der Anleitung des Herstellers aus dem Agarosegel isoliert. Es wurde entweder in 30 µl (zur Konzentrierung) oder in 50 µl H<sub>2</sub>O eluiert.

### 3.1.5 Restriktion und Ligation von DNA

In dieser Arbeit wurden verschiedene Restriktionsenzyme und die entsprechenden Schnittstellen benötigt. Bei den Enzymen und den entsprechenden Puffern handelte es sich um Produkte der Firma NEB (Frankfurt/Main). Die Restriktion wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zudem benötigte die Restriktion der Vektoren noch das Enzym SAP (Shrimp alkalische Phosphatase), das das 5'-Ende dephosphoryliert, um eine Religation des Vektors zu unterbinden. Im Allgemeinen setzte sich ein Restriktionsansatz mit 50 µl Gesamtvolumen wie folgt zusammen:

- 10x NEB-Puffer                    5 µl
- BSA-Lösung (1 mg/ml)        5 µl; nur bei Enzymen, die BSA benötigen
- PCR-Fragment oder Vektor    30 µl
- Enzym 1                            2 µl
- Enzym 2                            2 µl
- SAP                                 2 µl; nur bei Vektoren
- H<sub>2</sub>O                                 ad 50 µl

Die Inkubation dauerte 120 – 180 min bei der entsprechenden Temperatur. Die Reinigung des Restriktionsansatzes fand entweder mit Hilfe des QIAquick PCR-Purification Kits (Qiagen, Hilden) nach der Arbeitsanweisung, wobei in 30 µl H<sub>2</sub>O eluiert wurde, oder durch Agarose-Gelelektrophorese statt.

Die Ligation der DNA-Fragmente wurde mit der Ready-To-Go™ T4 DNA Ligase von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bzw. dem Rapid DNA Ligation Kit (MBI

Fermentas, St. Leon-Roth) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurde in der Regel 2 µl Vektor und entsprechend 18 µl DNA-Fragment eingesetzt.

### 3.1.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung von DNA wurde die Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt. Die Oligonukleotide wurden von SIGMA-ARK (Darmstadt) und Operon (Qiagen, Hilden) bezogen und in Wasser auf eine Konzentration von 100 pmol/µl gelöst. Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde anfangs mit der AccuTaq-Polymerase (Sigma, Darmstadt) und später mit dem Master-Mix (Qiagen, Hilden), der sowohl die DNA-Polymerase als auch die dNTPs enthält, durchgeführt. Ein Reaktionsansatz von 50 µl wurde wie folgt zusammengestellt:

- 10x PCR-Puffer	5 µl
- dNTP-Mix (10 mM jedes Desoxynukleotids)	1 µl
- AccuTaq-Polymerase	1 µl
- Primer 1 (100 pmol/µl)	1 µl
- Primer 2 (100 pmol/µl)	1 µl
- Chromosomale DNA	2 µl
- H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

oder

- Master-Mix	25 µl
- Primer 1 (100 pmol/µl)	1 µl
- Primer 2 (100 pmol/µl)	1 µl
- Chromosomale DNA	2 µl
- H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

Die *annealing*-Temperatur für die PCR-Amplifikation ergab sich aus der Sequenz der jeweiligen Primer: für ein Adenin oder Thymin wurden 2 °C berechnet, für ein Cytosin oder Guanin wurden 4 °C berechnet.



Die PCR wurde in den Thermocyclern Mastercycler<sup>®</sup> personal bzw. Mastercycler<sup>®</sup> gradient (Eppendorf, Hamburg) oder in Gene Amp<sup>®</sup> PCR System 9700 (PE Applied Biosystems, Norwalk, USA) durchgeführt.

Einer 5-minütigen Initialdenaturierung bei 94 °C folgten 30 Zyklen der eigentlichen Amplifizierung. Das Standard-Amplifizierungsprogramm umfasste folgende Schritte:

Denaturierung	(94 °C)
<i>Annealing</i>	( <i>annealing</i> -Temperatur der Oligonucleotide, 30 sek)
Elongation	(68 °C, 1 min pro 500 Basen zu amplifizierenden Fragments bei der AccuTaq-Polymerase oder 72 °C, 1 min pro kb zu amplifizierenden Fragments beim Master-Mix)

Im Anschluss an die 30 Zyklen kam ein 5-minütiger Schritt bei 68 °C bzw. 72 °C. Schließlich wurde der Reaktionsansatz auf 4 °C abgekühlt.

### 3.1.7 Klonierung von PCR-Fragmenten

Zur direkten gerichteten Klonierung von PCR-Fragmenten in Vektoren wurden die Fragmente mit Primern amplifiziert an deren 5'-Ende die gewünschte Schnittstelle angefügt war und die wie folgt zusammengesetzt waren: 5'-GCGCGC-Schnittstelle-Fragmentsequenz-3'.

Die GC-Sequenz am 5'-Ende diente zum einen dazu, die Enden des Fragments zu stabilisieren, zum anderen dazu, die Effizienz der Restriktion zu erhöhen, da Restriktionsenzyme dicht am Ende von DNA-Fragmenten normalerweise mit sehr geringer Effizienz schneiden. Das an beiden Enden mit Schnittstellen versehene PCR-Produkt wurde dann für 120 – 180 min mit den gewünschten Restriktionsenzymen inkubiert, über Gelelektrophorese gereinigt und dann direkt in den entsprechend geschnittenen Vektor ligiert.

In seltenen Fällen war bereits in oder vor der zu amplifizierenden DNA-Sequenz eine Schnittstelle vorhanden, so dass die Primersequenz keine GC-reiche Struktur bzw. keine zusätzliche Schnittstelle beinhaltete.

### 3.1.8 DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung von DNA-Fragmenten aus Plasmiden wurde die Dideoxynukleotid-Terminationsmethode nach SANGER *et al.* (1977) eingesetzt. Die Detektion der Sequenzierprodukte erfolgte automatisch mit dem ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (ABI, Heidelberg) unter Verwendung Fluoreszenz-markierter Primer. Für die Sequenzierreaktion wurde das BigDye® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems, Warrington, England) verwendet. Die Ansätze für eine Sequenzierreaktion setzten sich wie folgt zusammen:

- Plasmid-DNA (500 ng)            4 – 8 µl
- Ready Reaction Mix (RRM)    4 µl
- Primer (10 pmol)                1 µl
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>                        ad 15 µl

Die Komponenten wurden auf Eis in einem 200 µl-PCR-Reaktionsgefäß zusammenpipettiert. Daraufhin erfolgte die Sequenzierreaktion in einem Thermocycler (s. 3.1.6) nach folgendem Ablauf:

Einem ersten Denaturierungsschritt für 3 min bei 96 °C folgten 30 Zyklen, wobei ein Denaturierungsschritt ebenfalls bei 96 °C für 15 sec, eine „annealing“-Phase von 30 sec bei einer Temperatur, die die Primer-Sequenz vorgibt, und zuletzt ein Elongationsschritt für 4 min bei 60 °C nacheinander abliefen. Zum Schluss wurde der Ansatz auf 4 °C abgekühlt.

Mit Hilfe einer Fällung wurden die Sequenzierprodukte gereinigt. Der Reaktionsansatz wurde in 60 µl Wasser aufgenommen in ein Sequenziergefäß umgefüllt. Die Lösung wurde mit 7,5 µl 3 M Na-Acetat (pH = 4,6) und 187,5 µl abs. Ethanol versetzt und 20 min bei 13.000x g und RT zentrifugiert. Das Pellet wurde einmal mit 500 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen, im Dunkeln luftgetrocknet und anschließend in 20 µl Wasser aufgenommen. Es folgte die Auftrennung der Sequenzierprodukte und die Signaldetektion in einem ABI PRISM™ Genetic Analyzer.

Nachdem der ABI PRISM™ Genetic Analyzer nicht mehr verwendet werden konnte, wurde das Fragment, das mit den entsprechenden Vektor ligiert war, durch das ZMMK (Zentrum für Molekulare Medizin Köln) sequenziert. Dafür wurde das Plasmid

mit dem nötigen Sequenzierprimer (10 pmol) in 6 µl Wasser dem ZMMK zur Verfügung gestellt.

### 3.2 RNA-Techniken

Alle RNA-Arbeiten wurden zur Vermeidung von RNase-Kontaminationen unter sterilen Bedingungen durchgeführt, so dass durchgehend Handschuhe getragen wurden. Grundsätzlich wurden alle Geräte und Lösungen, soweit möglich, zur Eliminierung von RNase-Kontaminationen für 40 min bei 121 °C autoklaviert.

#### 3.2.1 Präparation von Gesamt-RNA aus *C. glutamicum* und RNA-Gelelektrophorese

Zur Präparation von Gesamt-RNA aus *C. glutamicum* wurde das NucleoSpin RNAII-Kit (Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Zellen wurden tagsüber in 5 ml BHI bei 30 °C schüttelnd angezogen. Für die Übernacht-Kultur wurden 20 ml MMI mit 1 ml Vorkultur angeimpft und bei 30 °C auf einem Schüttler inkubiert. Mit dieser Übernacht-Kultur wurde 20 ml frisches MMI morgens auf eine OD<sub>600</sub> von ca. 1 angeimpft und die Zellsuspension bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 5 – 6 weiter inkubiert. Nach Erreichen dieser OD<sub>600</sub> wurde entweder das Dipeptid zugesetzt und anschließend erfolgte die Probenentnahme (s. 5.2.1) oder sofort wurde je 1 ml Zellsuspension in vorgekühlten 2 ml Reaktionsgefäßen abzentrifugiert (14.000x g, 1 min, 4 °C). Das Pellet wurde sofort in 350 µl RA1-Puffer, der vorher mit 10 µl/ml β-Mercaptoethanol versetzt wurde, resuspendiert, in einem 2 ml Cryoröhrchen mit 300 mg Glasperlen in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Nach Auftauen der Zellsuspension auf Eis erfolgte der Zellaufschluss durch hochfrequentes Schütteln der Zellen im FASTPREP-Gerät (FP120, QBIOSYSTEMS, Heidelberg) für 2 x 30 sek bei 6,5 m/sek. Zwischen den beiden Durchgängen wurden die Röhrchen für 2 min auf Eis abgekühlt, um eine starke Erwärmung der Zellsuspension zu verhindern. Anschließend wurden die entstandenen Zelltrümmer in einer 3 minütigen Zentrifugation bei 14.000x g und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde mit 350 µl 70 %igen Ethanol versetzt und nach Angaben des Herstellers weiter aufgearbeitet, wobei die RNA während der Präparation routinemäßig mit DNase behandelt wurde. Zur Kontrolle der Präparation wurde eine

Gelelektrophorese durchgeführt und das Gel unter UV-Licht betrachtet. Die Zusammensetzung des verwendeten Gelladepuffers ist unten angegeben. Die Konzentration der erhaltenen RNA wurde über das Verhältnis der Extinktionen bei 260 und 280 nm im Photometer ermittelt. Die RNA wurde bei -80°C eingefroren.

### Gelladepuffer:

250 µl 100 % Formamid, deionisiert, 83 µl 37 % Formaldehyd, 50 µl 10x MOPS-Puffer, 10 µl 2,5 % Bromphenolblau, 50 µl 100 % Glycerin, 1 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml), ad 500 µl RNase-freies Wasser.

### **3.2.2 RNA-Hybridisierung mittels Dot- bzw. Slot-Blots**

Zur Untersuchung der Transkription von Genen, deren Produkte im Methionintransport involviert sind, wurden Dot- bzw. Slot-Blots durchgeführt. Ca. 5 µg Gesamt-RNA pro Dot bzw. 2 µg pro Slot wurden in 10x SSC verdünnt und mittels einer Dot-Blot- (S & S Minifold I, Schleicher & Schuell, Dassel) bzw. Slot-Blot-Apparatur (Fisher Scientific, Schwerte) unter langsamen Durchsaugen der Lösung auf eine Nylonmembran (BioBond™ Nylon Membrane, Sigma, Taufkirchen) aufgetragen. Nach Trocknen der Membran wurde die RNA durch UV-Bestrahlung in einem Cross-Linker (Bio-Link, LTF-Labortechnik, Wasserburg) fixiert (125 mJ/cm<sup>2</sup>, Einstellung „preset 0“). Die Membran wurde dann 1 h bei 50 °C in Hybridisierungslösung blockiert. Nach Erwärmen auf 68°C wurde die DIG-markierte RNA-Sonde zugegeben und bei dieser Temperatur die Hybridisierung über Nacht durchgeführt. Zur Entwicklung der Blots wurde die Membran zweimal in Waschlösung 1 bei 20 °C für je 15 min gewaschen, dann zweimal in Waschlösung 2 bei 68 °C für je 25 min. Nach kurzem Waschen mit Waschpuffer bei 20 °C wurde die Membran durch 30 min Inkubation bei 20 °C in 20 ml 1x Blocking-Reagenz blockiert. Hierauf wurde Anti-DIG-Alkalische Phosphatase-Konjugat (Roche, Mannheim; Verdünnung 1:10.000) zugegeben und weitere 30 min bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in Waschpuffer für je 20 min wurde die Membran für 3 min in Detektionspuffer inkubiert, mit CSPD-Lösung benetzt und in Klarsichtfolie eingeschweißt. Nach 15 min Inkubation bei 37 °C konnten die Signale mittels eines Fuji *luminescent image analyzer* LAS 100 (Raytest, Straubenhardt) detektiert werden. Die Quantifizierung der Signalstärke erfolgte mit Hilfe der Software AIDA 2.0 (Raytest, Straubenhardt).

## II. Material und Methoden

---

### Hybridisierungslösung:

pro 100 ml: 50 ml Formamid, 20 ml 10x Blocking-Reagenz, 25 ml 20x SSC, 1 ml 10 % Na-Lauroylsarkonisat, 200 µl 10 % SDS, ad 100 ml Wasser.

### 20x SSC:

3 M NaCl, 0,3 M tri-Natriumcitrat, pH (HCl) = 7,0.

### Waschlösung 1:

2x SSC, 0,1 % SDS.

### Waschlösung 2:

0,2x SSC, 0,1 % SDS.

### Maleinsäurepuffer:

0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH (NaOH) = 7,5.

### Waschpuffer:

Maleinsäurepuffer mit 0,3 % Tween 20.

### 10x Blocking-Reagenz:

10 g Blocking-Reagenz (Roche, Mannheim) wurden auf 100 ml mit Maleinsäurepuffer aufgefüllt und durch Erwärmen auf 60 °C in der Mikrowelle unter Rühren gelöst. Bei Bedarf wurde die fertige Lösung mit Maleinsäurepuffer weiter verdünnt.

### Detektionspuffer:

0,1 M Tris, 0,1 M NaCl, pH (NaOH) = 9,0.

### CSPD-Lösung:

1:100-Verdünnung von CSPD-Reagenz (Roche, Mannheim) in Detektionspuffer.

### **3.2.3 Präparation von RNA-Sonden durch *in vitro*-Transkription**

Zur Untersuchung der Expression einzelner Gene wurden Digoxigenin-markierte *antisense*-RNA-Sonden verwendet. Zur Herstellung dieser Sonden wurde ein ca. 0,5

– 0,6 kb großes Fragment des entsprechenden Gens mittels PCR amplifiziert. Dafür wurde an den *downstream*-Primer die Promotorsequenz für die RNA-Polymerase T7 gehängt. Für eine optimale Transkription benötigt die RNA-Polymerase zudem noch 6 weitere Basen *upstream* der Promotorsequenz. Daher wurden die Basen 5'-GCGCGC ebenfalls an diesen Primer gehangen. Nach der Amplifikation mittels PCR wurde das DNA-Fragment über eine Gelelektrophorese gereinigt und als *template* in einem *in vitro*-Transkriptionsansatz eingesetzt. Zur Markierung der entstehenden RNA-Sonden diente Digoxigenen-11-dUTP. Der Transkriptionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 1 µg PCR-Fragment in RNase-freiem Wasser
- 2 µl DIG RNA Labeling Mix (Roche, Mannheim)
- 2 µl 10x Transcription Buffer (Roche, Mannheim)
- 1 µl RNase Inhibitor (MBI Fermentas, St. Leon-Roth)
- 2 µl T7 RNA-Polymerase (Roche, Mannheim)

Die *in vitro*-Transkription wurde 2 h bei 37 °C durchgeführt. Das *template* wurde durch Zugabe von 1 µl DNase (Roche, Mannheim) und 20 min Inkubation bei 37 °C entfernt. Die Sonde wurde schließlich bei -80 °C aufbewahrt. Zur Hybridisierung wurde 2 µl des Ansatzes verwendet.

## **4. Techniken zur Manipulation von Zellen**

### **4.1 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation**

#### **4.1.1 Herstellung kompetenter Zellen des *E. coli*-Stammes DH5 $\alpha$ und Transformation**

Chemisch kompetente Zellen von *E. coli* wurden nach INOUE *et al.* (1990) hergestellt. Dabei wurden die Zellen tagsüber in 5 ml LB-Medium angezogen und von dieser Vorkultur abends 1 ml in 250 ml SOB-Medium (SAMBROOK *et al.*, 1989) in einen 2 l-Schüttelkolben mit Schikanen gegeben. Die Zellen wurden über Nacht bei 22 °C geschüttelt. Am nächsten Tag sollte die OD<sub>600</sub> ca. 0,6 betragen. Dann wurde die Kultur samt 2 l-Kolben für 15 min auf Eis gestellt. Nachdem die Zellen in kleinere Gefäße (z.B. 50 ml „Falcon Tubes“) überführt und bei 4.500x g und 4 °C

15 min (Eppendorf-Zentrifuge 5810 R) abzentrifugiert wurden, wurde das Pellet in 80 ml eiskaltem TB-Puffer (10 mM Pipes, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl, 55 mM MnCl<sub>2</sub>, pH (KOH) = 6,7) resuspendiert. Es folgte eine weitere Inkubation für 10 min auf Eis. Anschließend wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (4.500x g, 4 °C, 10 min) und das Pellet wurde in 20 ml TB-Puffer resuspendiert. Zu diesem Ansatz wurden dann 1,4 ml DMSO portionsweise hinzugefügt und die Kultur wurde ein weiteres Mal für 10 min auf Eis inkubiert. Schließlich wurden die Zellen zu 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C aufbewahrt. Für die Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1 – 5 µl Plasmid-DNA vermischt und 30 – 45 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 30 – 45 sec bei 42 °C im Wasserbad und einer kurzen Inkubation (ca. 2 min) auf Eis wurde dem Ansatz 450 (bei einem 50 µl-Ansatz) bzw. 900 µl (bei einem 100 µl-Ansatz) SOC-Medium (SAMBROOK *et al.*, 1989) hinzugefügt. Die Zellen wurden direkt danach für 60 min bei 37 °C geschüttelt und schließlich auf LB-Platten mit dem geeigneten Antibiotikum ausgestrichen.

### 4.1.2 Herstellung kompetenter Zellen von *C. glutamicum* und Elektroporation

Elektrokompetente Zellen von *C. glutamicum* wurden nach LIEBL *et al.* (1989) hergestellt. Dafür wurden 100 ml LB-Medium mit Wachstumsinhibitoren (4 g/l Isonicotinsäurehydrazid, 25 g/l Glycin und 1 g/l Tween 80) in einem 2 l-Kolben mit einer *C. glutamicum*-Vorkultur, bei der die Zellen über Nacht bei 30 °C in LB-Medium mit 2 % Glukose inkubiert wurden, auf eine OD<sub>600</sub> von 0,3 angeimpft. Die Inkubation dieser Kultur erfolgte bei RT unter Schütteln über Nacht. Am nächsten Morgen wurden die Zellen, nachdem sie 10 min auf Eis standen, bei 4.500x g und 4 °C 10 min abzentrifugiert. Die Zellen wurden danach viermal in eiskaltem 10 %-igem Glycerin gewaschen und anschließend in 1 ml der 10 %-igen Glycerin-Lösung resuspendiert. Die Zellen wurden schließlich zu 50 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Diese Aliquots konnten dann bei -80 °C bis zur Transformation aufbewahrt werden. Für die Elektroporation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, mit 3 – 10 µl Plasmid-DNA vermischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette mit 2 mm Elektrodenabstand (peQLab, Erlangen) überführt. Um die Effektivität der Elektroporation zu erhöhen, wurde vorher eine „Schwimmfilterdialyse“ mit der Plasmid-DNA vorgenommen, wobei die die Plasmid-DNA enthaltende Lösung entsalzt wurde. Dabei wurde die Lösung auf einen

Nitrozellulose-Filter (0,025 µm, White VSWP, 13 mm; Millipore, Eschborn), der mit der matten Seite nach unten auf  $H_2O_{\text{bidest}}$  schwamm, pipettiert. Nach einer Inkubation von ca. 30 min konnte der Tropfen wieder abgenommen und den Zellen zugefügt werden. Die Zellen wurden hierauf in einem Gene-Pulser (Biorad) durch einen Elektropuls von 2,5 kV bei 600 Ω Parallelwiderstand und 25 µF Kapazität elektroporiert. Sofort nach dem Puls wurde mit BHIS-Medium (BHI-Medium mit 0,5 M Sorbitol) auf 1 ml aufgefüllt. Der Inhalt der Küvette wurde danach in ein 15 ml-Falcon-Gefäß überführt und die Zellen wurden dann 120 min bei 30 °C unter Schütteln inkubiert und schließlich auf BHI-Platten mit dem geeigneten Antibiotikum ausgestrichen.

### 4.2 Konstruktion von Deletionsmutanten und Konjugation

Die Konstruktion von *C. glutamicum*-Deletionsmutanten erfolgte nach SCHÄFER *et al.* (1994). Für Gendeletionen wurde der Vektor pK18*mobsacB* verwendet, der zwei Selektionsmarker trägt: ein Kanamycin-Resistenzgen ( $Km^R$ ) und ein *sacB*-Gen, dessen Produkt, die Levansucrase, für Zellen letal ist, die auf Saccharose-haltigem Medium wachsen. pK18*mobsacB* kann zudem nicht von *C. glutamicum*-Zellen, die diesen Vektor aufgenommen haben, repliziert werden. Zur Konstruktion der Deletion wurde ein Sequenzabschnitt von ca. 1000 bp stromauf- und stromabwärts der gewünschten Deletionsstelle in pUC19 und schließlich nach einer erfolgten Restriktion als komplettes Fragment (ca. 2000 bp) in pK18*mobsacB* kloniert. Dieses Konstrukt wurde dann in die Zellen eingebracht. In der Regel wurde dies über Elektroporation des Plasmids (s. 4.1.2) erreicht. War dieser Ansatz nicht erfolgreich, wurde das Plasmid per Konjugation in die Zellen gebracht. Die Methode der Konjugation diente ebenso wie die direkte Transformation dazu, Plasmide in *C. glutamicum* als Rezipienten einzuführen (SCHÄFER *et al.*, 1990), allerdings über den vorher transformierten Donorstamm *E. coli* S17-1 (SIMON *et al.*, 1983). Die Transformation erfolgte nach einer Methode von CHUNG *et al.* (1989). *E. coli* S17-1-Zellen wurden dafür aus einer LB-Vorkultur auf eine  $OD_{600}$  von 0,01 in 5 ml LB-Medium angeimpft. Nach einer Inkubation von 2 – 3 h unter Schütteln bei 37 °C sollte die  $OD_{600}$  zwischen 0,3 und 0,4 liegen. Die Zellen wurden dann 10 min bei 7.000x g und 4 °C abzentrifugiert und das Pellet in  $1/10$  Volumen (ca. 500 µl) TSS (2-fach LB-Medium, pH = 6,5: 20 g/l NaCl, 10 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Trypton; 100 g/l PEG8000,



5 % DMSO und 50 mM MgSO<sub>4</sub>) aufgenommen. Nach der Zugabe von 4 – 6 µl des Plasmids pK18*mobsacB* mit dem klonierten Fragment wurde die Zellen auf Eis über 30 min inkubiert. Anschließend wurden 1,8 ml LB-Medium zur Kultur gegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Schließlich wurden die Zellen auf LB-Platten, die 25 µg/ml Kanamycin enthielten, ausplattiert. Die so erhaltenen transformierten *E. coli* S17-1-Zellen konnten dann für die Konjugation eingesetzt werden. Dazu wurden 20 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum mit einer Übernachtskultur des Donorstammes (5 ml LB-Medium mit *E. coli* S17-1 und 25 µg/ml Kanamycin über Nacht bei 37 °C inkubiert) mit dem entsprechenden Plasmid auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft. Bei einer erreichten OD<sub>600</sub> von ca. 1 wurden die Donorzellen auf Eis gekühlt. Währenddessen wurden 10 ml Rezipientenkultur von *C. glutamicum*, die in 100 ml LB-Medium bei 30 °C über Nacht angezogen wurde und für das weitere Vorgehen eine OD<sub>600</sub> von ca. 5 aufweisen sollte, einem Hitzeschock über 9 min bei 48,5 °C unterzogen. Daraufhin wurden je 3 ml Rezipienten- und 1 ml Donorzellen vereinigt, 5 min bei 4.500x g und RT zentrifugiert und in ca. 100 µl des Überstandes resuspendiert. Zur Konjugation wurden sterile Nitrozellulose-Filter (0,45 µm, White HAWP, 24 mm; Millipore, Eschborn) auf LB-Platten gelegt und die Zellsuspension darauf pipettiert. Es folgte eine Inkubation für 20 h bei 30 °C. Am nächsten Tag wurden die Filter samt Suspension in 2 ml Eppendorfgefäße gegeben und die Zellen mit 600 µl LB-Medium abgeschwemmt. Schließlich wurden die Zellen auf BHI-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum (15 µg/ml Kanamycin) zur Selektion auf Transkonjuganden und Nalidixinsäure (50 µg/ml) zur Hemmung des Wachstums von *E. coli* S17-1 ausplattiert. Wurde pK18*mobsacB* über die Konjugation von *C. glutamicum* aufgenommen, so erfolgte in den Zellen eine Integration des Plasmids in das Bakteriengenom durch homologe Rekombination. Die entstandenen Kanamycin-resistenten Klone wurden über Nacht 20 h in LB-Medium ohne Antibiotikum inkubiert. Dadurch sollten Klone entstehen, die den Vektoranteil in einer zweiten Rekombination verloren haben. Im Genom verblieb entweder die markerfreie Deletion oder das native Gen wurde wieder hergestellt. Nach Ausplattieren der Zellen auf BHI-Platten mit 10 % Saccharose konnten nur die Zellen wachsen, die den Vektoranteil verloren hatten. Da das *sacB*-Gen anfällig für Mutationen ist, wurden die Saccharose-resistenten Klone zur Bestätigung der Eliminierung des Vektoranteils auf BHI-Platten mit Kanamycin ausgestrichen. Klone, die Kanamycin-sensitiv waren, wurden über PCR auf Vorhandensein der Deletion getestet.

### 4.3 Konstruktion von Insertionsmutanten

Die Konstruktion von Insertionsmutanten von *C. glutamicum* erfolgte mit Hilfe des Vektors pK18*mob*. Für Insertionen wurde ein 500 – 1000 bp großes internes DNA-Fragment des entsprechenden Gens über PCR amplifiziert. Da den Primern Schnittstellen für Restriktionsenzyme zugefügt waren, wurde sowohl der Vektor als auch das DNA-Fragment mit diesen Enzymen inkubiert. Nach der Gelelektrophorese erfolgte die Ligation (s. 3.1.5) und anschließend die Elektroporation des Plasmids in *C. glutamicum*. Der Vektor pK18*mob* kann von den Zellen nicht repliziert werden, und bleibt nur erhalten, wenn eine Integration in das Genom durch homologe Rekombination erfolgt. Dadurch wird das entsprechende Gen inaktiviert. Die Klone, die über eine Kanamycinresistenz selektiert werden konnten, wurden über PCR auf die Insertion hin getestet.

## 5. Biochemische Techniken

### 5.1 Bestimmung der Aminosäureaufnahme

Zur Bestimmung der Methioninaufnahme bei *C. glutamicum* wurde zuerst eine 5 ml Vorkultur in BHI-Medium, wenn erforderlich mit dem entsprechenden Antibiotikum, des jeweiligen Stammes angelegt und über Tag bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Abends wurden dann ca. 500 µl der Zellen in 20 ml MMI überführt. Je nach Stamm musste den Medien ebenfalls das entsprechende Antibiotikum zugefügt werden. Die Inkubation der Ansätze erfolgte über Nacht bei 30 °C unter Schütteln. Am nächsten Morgen wurden die Zellen auf eine OD<sub>600</sub> von 2 in frischem MMI-Medium (20 ml) angeimpft. Die Zellen wurden ebenfalls bei 30 °C schüttelnd inkubiert. War eine OD<sub>600</sub> von ca. 5 – 6 erreicht, wurden die Zellen 10 min bei 4.000x g und 4 °C abzentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5810 R) und zweimal mit MES/Tris-Puffer (50 mM, pH (NaOH) = 8,0; 10 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM Glukose) gewaschen. Nachdem die Zellen in der gleichen Menge MES/Tris-Puffer resuspendiert wurden, wurden die Zellen abhängig von der zu messenden Substratkonzentration auf eine OD<sub>600</sub> zwischen 0,3 und 5 eingestellt. Anschließend wurden die Zellen auf Eis aufbewahrt. Die Aminosäureaufnahme wurde durch das Benutzen von radioaktiv markiertem L-[<sup>14</sup>C]-Methionin (spezifische Aktivität: 1,96 GBq/mmol; Hartmann Analytic, Braunschweig) mit variierenden Endkonzentrationen bestimmt. Jeweils 1,6 oder 2 ml Zellsuspension wurde dafür in ein Rührgefäß gegeben und im Wasserbad

## II. Material und Methoden

---

3 min bei 30 °C im MES/Tris-Puffer vorinkubiert. Unter Rühren wurde dann die Transportmessung durch Zugabe von 16 bzw. 20 µl L-[<sup>14</sup>C]-Methionin mit Konzentrationen zwischen 10 µM und 20 mM gestartet. Zu verschiedenen Zeitpunkten (15, 30, 45, 60, 90 und 120 sek bzw. 150 und 180 sek) wurden 200 µl-Proben entnommen und auf Glasfaserfilter (Millipore, Eschborn bzw. Schleicher-Schuell, Dassel) pipettiert. Durch eine Vakuum-Mehrfachfiltrationsanlage wurde sofort nach der Entnahme das umgebende Medium abgesaugt und die Zellen wurden nachfolgend zweimal mit 2,5 ml 0,1 M LiCl-Lösung gewaschen. Die Filter wurden dann in Scintillationsgefäße überführt, mit 3,8 ml Scintillationsflüssigkeit (Ecoszint, Roth, Karlsruhe) versetzt und geschüttelt. Die Radioaktivität wurde in einem Flüssig-Scintillationszähler (LS 6500, Beckman Instruments GmbH, München) ermittelt. Die Gesamtaktivität im Reaktionsansatz wurde durch die direkte Messung einer 200 µl-Probe ohne Filtration ermittelt. Für jede Probe wurde der Zerfall pro Minute (dpm) ermittelt. Aus dem linearen Teil der Aufnahmekinetik konnte die Transportgeschwindigkeit abgeleitet werden. Die Aufnahmeaktivität wird somit in nmol/min (mg TG) angegeben. Durch eine Berechnung konnte dann für jede Probe die Methionin-Konzentration bestimmt werden. Die Berechnung ist wie folgt:

$$c \text{ [nmol/mg TG]} = \frac{(\text{dpm}_{\text{Probe}} \times \text{Stoffmenge [mol]})}{(\text{dpm}_{\text{total}} \times 0,36 \text{ [mg/ml]} \times \text{OD}_{600} \times 0,2 \text{ [ml]})}$$

dpm<sub>Probe</sub> = Zerfälle pro Minute in der filtrierten Probe

Stoffmenge = Stoffmenge in 0,2ml Probenvolumen [mol]

dpm<sub>total</sub> = Gesamtzerfälle pro Minute (ungefilterte Probe)

0,36 = Trockengewicht-Relation von *C. glutamicum* [mg/ml OD=1]

OD<sub>600</sub> = optische Dichte der Kultur für die Messung

0,2 = Volumen der Probe [ml]

Die Steigung des aufgenommenen Methionins gibt die Transportrate bei der jeweiligen eingesetzten Konzentration wieder.

Die Bestimmung der Leucin- bzw. Cysteinaufnahme erfolgte wie unter 5.1 beschrieben. Jedoch wurde die Messung mit 100 µM L-[<sup>14</sup>C]-Leucin (spezifische Aktivität: 12,7 GBq/mmol ;Amersham, Freiburg) bzw. 30 µM Cystein (spezifische Aktivität: 37 GBq/mmol; Biotrend, Köln) durchgeführt.

### 5.2 Bestimmung der Aminosäureexkretion

#### 5.2.1 Silikonölzentrifugation und Dipeptidfütterung

Nichtradioaktive Transportmessungen wurden mit Hilfe der Silikonölzentrifugation durchgeführt. Für jeden Messpunkt wurden drei 300 µl Mikrozentrifugenröhrchen (Beckman Instruments GmbH, München) mit 30 µl 20 % Perchlorsäure und 70 µl Silikonöl der Dichte  $d = 1,04 \text{ g/cm}^3$  (Wacker, Burghausen) beschickt und kurz in einer Microfuge E (Beckman Instruments GmbH, München) zentrifugiert. Die Anzucht der Zellen für die Dipeptidfütterung glich anfangs der unter 5.1 beschriebenen. Nach einer Übertag-Kultur in 5 ml BHI wurden die Zellen über Nacht in 20 ml MMI bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Am folgenden Morgen wurden die Zellen 10 min bei 4.000x g und 20 °C abzentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5810 R) und zweimal mit frischem MMI gewaschen. Anschließend wurde eine  $OD_{600}$  von ca. 3 in 18 ml frischem MMI eingestellt und die Zellen wurden weitere ca. 60 min bei 30 °C geschüttelt. Vor der Dipeptidzugabe wurde die erste Probe (3 x je 200 µl) in die vorbereiteten Silikonölröhrchen gegeben und 45 sek zentrifugiert. Dadurch erfolgte die schnelle Trennung der Zellen vom umgebenden Medium sowie deren sofortige Inaktivierung durch die Perchlorsäure (unterste Phase; KLINGENBERG und PFAFF, 1967). Anschließend wurde 2 ml des in MMI gelösten Dipeptids (vorwiegende Konzentration war 30 mM) zu dem Medium (18 ml) gegeben. Daraufhin wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen und zentrifugiert. Nach erfolgter Zentrifugation wurden die Überstände abgenommen und entweder direkt in frische Eppendorf-Gefäße oder insgesamt 450 µl der Überstände in 225 µl 20 % Perchlorsäure überführt. Zu den mit Perchlorsäure vermengten Überständen wurden anschließend 562,5 µl 5 M KOH/1 M Triethanolamin zur Neutralisation der Säure gegeben. Daraufhin mussten diese Ansätze bei 13.000x g und 4 °C 20 min zentrifugiert werden. Der klare Überstand wurde dann in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Die Zentrifugenröhrchen, die das Zellpellet enthielten, wurden in Höhe der mittleren Phase durchtrennt. Die drei Spitzen eines jeden Messpunktes wurden jetzt mit der Öffnung nach unten in einem 2 ml Eppendorf-Gefäß vereinigt und 1 min bei 13.000x g zentrifugiert. Nach der Entfernung von zwei der drei Spitzen erfolgte die Zugabe von 135 µl H<sub>2</sub>O sowie 100 µl Silikonöl der Dichte  $1,06 \text{ g/cm}^3$  (Wacker, Burghausen) und die Resuspendierung des Sediments. Die Zellen wurden daraufhin für 10 min im Ultraschallbad aufgeschlossen, mit 75 µl 5 M KOH/1 M Triethanolamin versetzt und das Reaktionsgefäß wurde kurz gevortext. Nach einer 30-minütigen

Inkubation bei 4 °C konnte für 20 min bei 13.000x g zentrifugiert werden, wodurch sich eine wässrige Phase absetzte, die dann in frische Eppendorf-Gefäße überführt wurde. Die Proben konnten anschließend mit der entsprechenden Verdünnung über die HPLC vermessen werden.

### 5.2.2 HPLC-Analyse

Die Bestimmung der Aminosäure- bzw. Dipeptidkonzentrationen, im Speziellen der Methionin- bzw. Met-Met-Konzentration, in der cytoplasmatischen Fraktion bzw. in den zellfreien Überständen erfolgte mit Hilfe der HPLC („high performance liquid chromatography“). Es wurde eine HPLC-Anlage HP 1100 (Hewlett-Packard, Waldbronn, BRD) mit angeschlossenem Fluoreszenzdetektor der Serie HP 1100 verwendet. Die in den Proben enthaltenen Aminosäuren wurden der automatischen Vorsäulenderivatisierung mit 10 fachem Überschuss an o-Phtaldialdehyd/Borat/2-Mercaptoethanol-Reagenz (Pierce Europe, B. V. Oud-Beijerland, NL) unterzogen. Dabei werden primäre Aminosäuren zu fluoreszierenden thiosubstituierten Isoindolen derivatisiert (LINDROTH und MOPPER, 1979), deren Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 230 nm und einer Emissionswellenlänge von 455 nm detektiert werden kann. Die Auftrennung erfolgte über eine „reversed phase“ Säule RP-18 (Vorsäule Multospher: 40 x 4 mm von CS Chromatographie, Langerwehe; Trennsäule Nucleodur RP-18: 125 x 4 mm von Macherey-Nagel, Düren) bei 35 °C und einem Fluss von 1 ml/min. Als mobile Phase wurde eine Mischung aus Puffer A (50 % Methanol, 50 % Acetonitril) und Puffer B (95 % 40 mM Na<sup>+</sup>-acetatpuffer pH = 6,5 mit 0,06 % Na<sup>+</sup>-azid; 5 % Puffer A) verwendet. Die Mischung wurde gemäß eines Gradientenprogramms während des Laufs von 100 % Puffer A auf 0 % Puffer A geändert. Durch eine automatisch ermittelte Kalibrierungsreihe, der vier definierte Aminosäurekonzentrationen von 20 µM, 50 µM, 100 µM und 300 µM bzw. Dipeptidkonzentrationen von 100 µM, 300 µM, 600 µM und 1 mM zugrunde lagen, konnten die *Peak*-Flächen der Proben direkt in die entsprechende Konzentration umgerechnet werden. Die errechneten Konzentrationen der cytoplasmatischen Proben wurden dann noch auf das Trockengewicht bezogen. Wie folgt sah diese Berechnung aus:

$$c \text{ [}\mu\text{mol/g BTM]} = \left( \text{HPLC-Wert} \times \left( \frac{300}{(\text{OD}_{600} \times 0,36 \text{ [mg/ml]} \times 0,6 \text{ [ml]})} \right) \right) / 1000$$

HPLC-Wert = ermittelte Konzentration in der Probe anhand einer Kalibrierungsreihe

300 = Verdünnungsfaktor, der sich durch die Aufarbeitung ergibt

OD<sub>600</sub> = optische Dichte der Kultur

0,36 = Trockengewicht-Relation von *C. glutamicum* [mg/ml OD=1]

0,6 = Volumen der Probe [ml]

Für die Errechnung der Konzentration [mM] in den Überständen musste nur die Verdünnung berücksichtigt werden.

## 6. Bioinformatische Ansätze

### 6.1 Ähnlichkeitssuche

Die Datenbanksuche nach homologen Sequenzen wurde online bei diversen *Websites* durchgeführt. Zur Suche eines Gens innerhalb des *C. glutamicum*-Genoms wurden die *Websites*:

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom\\_table.cgi?](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi?)

oder

<http://gib.genes.nig.ac.jp>

verwendet. Bei der Ähnlichkeitssuche von *C. glutamicum*-Sequenzen zu Genen anderer Organismen wurde das „Blast-Tool“ von NCBI verwendet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)

### 6.2 Sekundärstrukturvorhersage von Proteinen

Für die Sekundärstrukturvorhersage von möglichen Transportproteinen wurden verschiedene Programme (z.B. TMHMM, TopPred) unter <http://www.expasy.ch> verwendet.

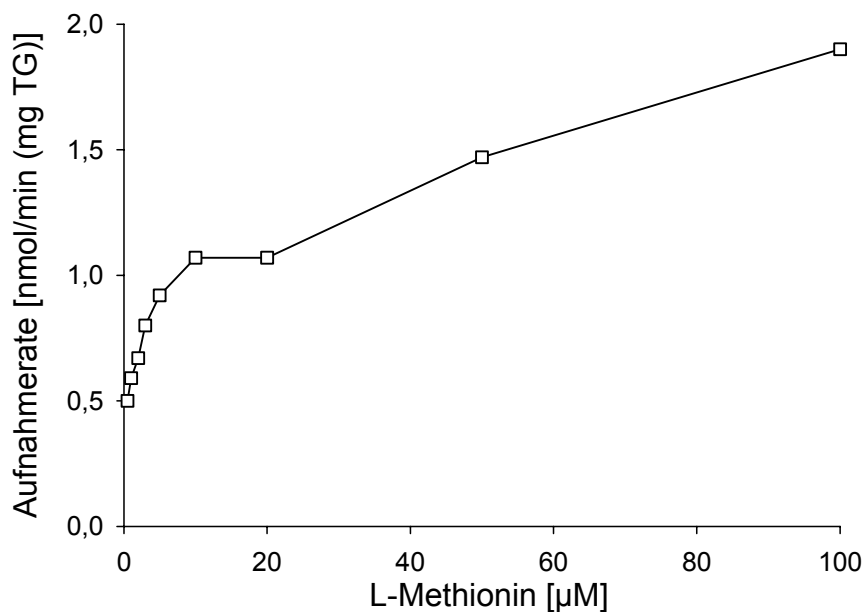
### III. Ergebnisse

#### 1. Methioninaufnahme in *C. glutamicum*

Die Aufnahme von L-Methionin spielt bei der biotechnologischen Produktion von Methionin eine entscheidende Rolle. Daher wurden dieser Transportprozess im Rahmen dieser Arbeit biochemisch charakterisiert und die verantwortlichen Transportproteine identifiziert. Als Stammhintergrund hierfür und für die Erstellung und Analyse von verschiedenen Mutanten diente *C. glutamicum* ATCC 13032, dessen Genomsequenz vollständig bekannt ist.

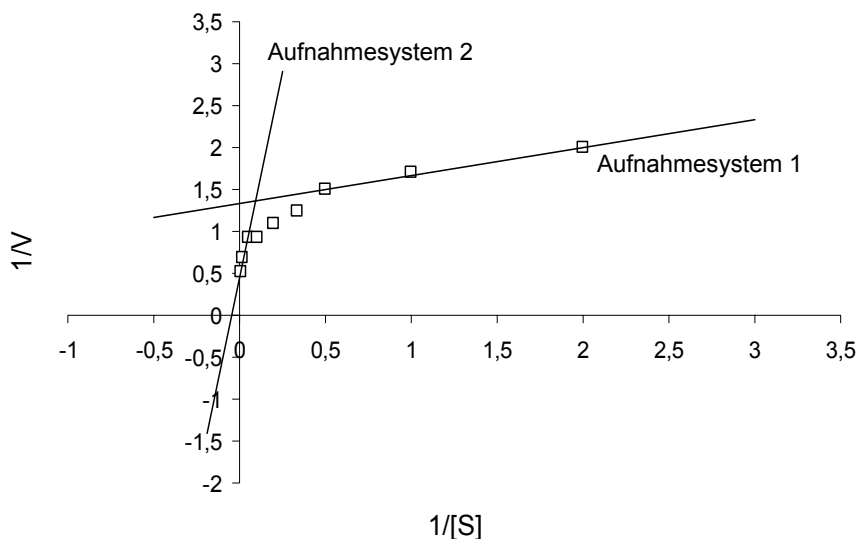
##### 1.1 *C. glutamicum* ATCC 13032 nimmt aktiv L-Methionin auf

Zunächst wurde untersucht, ob L-Methionin durch Diffusion, erleichterte Diffusion oder aktiven Transport in die Zelle gelangt. Die Anzahl der beteiligten Transporter wurde abgeleitet und die  $K_m$ -Werte bzw. Maximalgeschwindigkeiten bestimmt. Hierzu erfolgten Transportmessungen mit [ $^{14}\text{C}$ ]L-Methionin (spezifische Aktivität der Lösungen: 14,8 – 980 MBq/mmol), dessen Aufnahme sich mit Hilfe eines Szintillationszählers gut nachweisen lässt. Für dieses Experiment wurde der Wildtyp *C. glutamicum* ATCC 13032 verwendet.



**Abb. 3.1:** Aufnahme von L-Methionin durch *C. glutamicum* ATCC 13032 (Wildtyp). Die Aufnahmeraten wurden in Abhängigkeit von der Substratkonzentration ermittelt.

Wie Abbildung 3.1 verdeutlicht, zeigten die Zellen mit Zunahme der Substratkonzentration eine steigende Aufnahme rate. So betrug die Aufnahme rate bei  $0,5 \mu\text{M}$  L-Methionin  $0,5 \text{ nmol/min}$  (mg TG) und bei  $100 \mu\text{M}$   $1,9 \text{ nmol/min}$  (mg TG). Von einem aktiven Transport von Methionin konnte ausgegangen werden, da die Aufnahme nicht wie bei einer Diffusion linear abhängig von der Substratkonzentration stieg, sondern eine Sättigung beobachtet werden konnte. Die L-Methioninaufnahme erfolgte, wie bei aktivem Transport zu erwarten, annähernd mit einer Michaelis-Menten-Kinetik. Allerdings ließ sich aus den Daten von Abb. 3.1 weder der  $K_m$ -Wert noch die Maximalgeschwindigkeit ( $V_{\text{max}}$ ) ableiten, was auf die Beteiligung mehrerer Aufnahmesysteme für Methionin hindeutete. Daher wurde eine Abschätzung über ein Lineweaver-Burk-Diagramm (s. Abb. 3.2) vorgenommen. Dabei handelt es sich um eine doppelt-reziproke Auftragung der Substratkonzentrationen ( $1/[S]$  auf der Abszisse) gegen die Aufnahme rates ( $1/V$  auf der Ordinate).

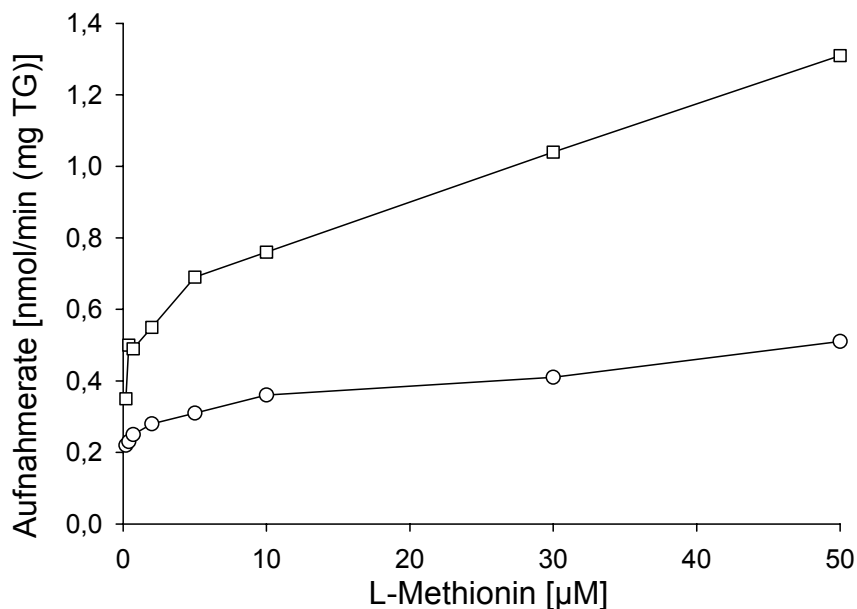


**Abb. 3.2:** Lineweaver-Burk-Diagramm zur Ermittlung der  $K_m$ -Werte und der Maximalgeschwindigkeiten der L-Methioninaufnahme in *C. glutamicum* ATCC 13032.

Wie in Abbildung 3.2 zu erkennen, ergab die Auswertung des Lineweaver-Burk-Diagramms die Beteiligung von mindestens zwei Aufnahmesystemen am L-Methioninimport. „Aufnahmesystem 1“ ist hoch-affin und hat einen  $K_m$ -Wert von ca.  $0,25 \mu\text{M}$  und eine  $V_{\text{max}}$  von ca.  $0,75 \text{ nmol/min}$  (mg TG). Bei „Aufnahmesystem 2“ handelt es sich um einen mittel-affinen Transporter, der einen  $K_m$ -Wert von ca.  $23 \mu\text{M}$  und eine  $V_{\text{max}}$  von ca.  $2,2 \text{ nmol/min}$  (mg TG) hat. Analog zu *E. coli* (KADNER, 1974) wurde das hoch-affine Aufnahmesystem in *C. glutamicum* als MetD und das mittel-affine System als MetP bezeichnet.



Für die Bestimmung der Energieabhängigkeit der L-Methioninaufnahme in *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde den Zellen kurz vor der Methioninzugabe CCCP (Carbonylcyanid-M-Chlorophenylhydrazon), ein chemischer Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung, zugefügt (HEYTLER, 1980). CCCP bindet Protonen und kann ungehindert die Membran passieren, wodurch der Protonengradient zusammenbricht. Somit sind in *C. glutamicum* sekundär aktive Transporter, die vom Membranpotential abhängig sind, deaktiviert. Primär aktive Transporter werden in *C. glutamicum* nur geringfügig beeinflusst, da über die Substratstufenphosphorylierung ausreichend ATP zur Verfügung gestellt werden kann. Analog zum vorherigen Experiment wurden verschiedene Methioninkonzentrationen verwendet.



**Abb. 3.3:** Aufnahme von L-Methionin durch *C. glutamicum* ATCC 13032 ohne ( $\square$ ) und mit ( $\circ$ ) Zusatz von 50  $\mu\text{M}$  CCCP.

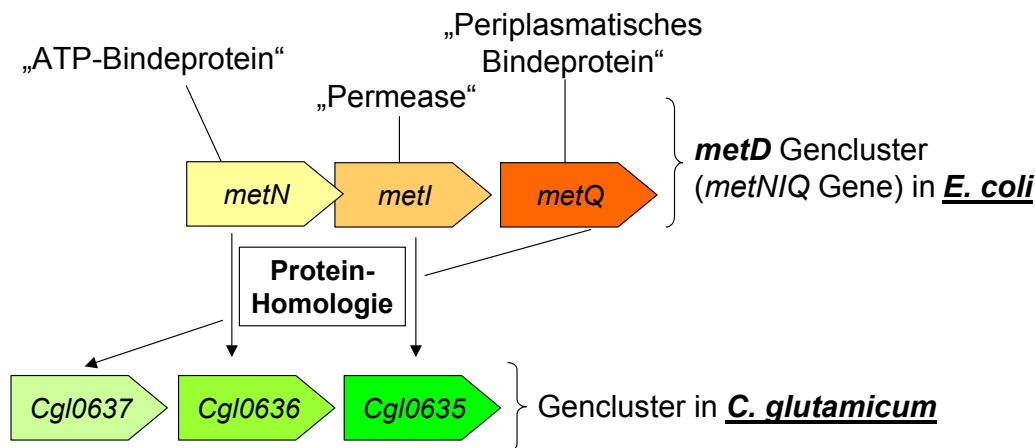
Wie in Abbildung 3.3 gezeigt, wurde die L-Methioninaufnahme vor allem bei hohen Konzentrationen durch CCCP reduziert. Bei 0,2  $\mu\text{M}$  war der CCCP-Einfluss noch sehr gering, wogegen bei 50  $\mu\text{M}$  nur noch ca. 1/3 der ursprünglichen Aufnahmerate gemessen wurde. Aufgrund dieses Experiments kann angenommen werden, dass bei niedrigen Methioninkonzentrationen ein primäres Aufnahmesystem, bei hohen Konzentrationen ein sekundäres System aktiv ist.

## 1.2 Identifikation des hoch-affinen Methioninaufnahmesystems MetD

GÁL *et al.* (2002) und MERLIN *et al.* (2002) identifizierten die Gene des Aufnahmesystems MetD aus *E. coli*. MetD ist ein ABC-Transporter und wird von einem Gencluster (*NIQ*-Gene) kodiert, das aus drei Genen besteht. Das Gen *metN* kodiert für die ATP-bindende Untereinheit, das Gen *metI* für die Permeaseuntereinheit und das Gen *metQ* für das periplasmatische Bindeprotein.

### 1.2.1 Identifikation von *metQNI*

Mit den Proteinsequenzen der MetNIQ-Proteine aus *E. coli* wurde eine Datenbanksuche durchgeführt, bei der hohe Ähnlichkeiten zu *C. glutamicum*-Proteinen gefunden wurden. MetN hat zum von *Cgl0636* kodierten Protein eine Identität von 55 % (*E. value*:  $8e^{-71}$ ), MetI und das von *Cgl0635* kodierte Protein sind zu 43 % identisch (*E. value*:  $2e^{-27}$ ) und MetQ zeigt zum durch *Cgl0637*-kodierten Protein eine 28 %ige Identität (*E. value*:  $1e^{-30}$ ). Die folgende Abbildung veranschaulicht die beiden Gencluster in *E. coli* und *C. glutamicum*.



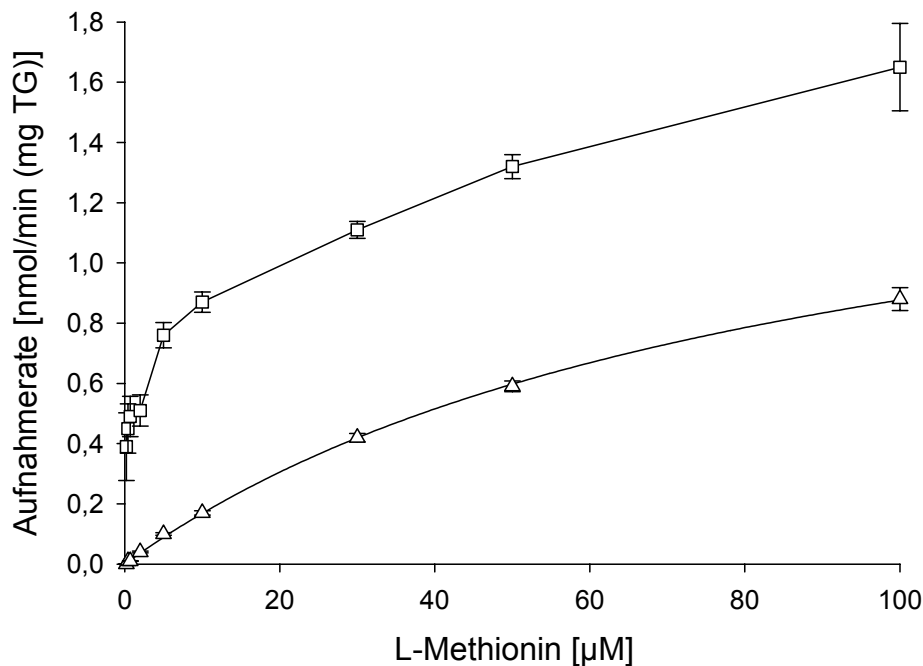
**Abb. 3.4:** Anordnung des *metD*-Genclusters (*metNIQ*-Gene) aus *E. coli* und des ähnlichen Genclusters aus *C. glutamicum*.

Abbildung 3.4 zeigt, dass die drei putativen Gene aus *C. glutamicum* wie die *metNIQ*-Gene aus *E. coli* in einem Cluster angeordnet sind. Neben den bereits erwähnten Ähnlichkeiten verdeutlicht diese Abbildung auch den Aufbau der beiden Gencluster. Im Gegensatz zu *E. coli* ist das putative Gen für das Substrat-Bindeprotein in *C. glutamicum* (*Cgl0637*) nicht *downstream* des Permease-kodierenden Gens (*Cgl0635*), sondern *upstream* des Gens für das putative ATP-Bindeprotein (*Cgl0636*). Aufgrund der hohen Ähnlichkeiten werden im Folgenden die Gene *Cgl0637*, *Cgl0636* und *Cgl0635* als *metQ*, *metN* und *metI* bezeichnet.

Auf der Grundlage der entsprechenden Nukleotidsequenzen aus *C. glutamicum* wurden zwei Mutanten mit jeweils einer Insertion in *metI* bzw. *metN* generiert. Beide Mutanten zeigten bei der Aufnahmemessung mit verschiedenen Methioninkonzentrationen den gleichen Phänotyp. Im Vergleich zum Wildtyp waren die Aufnahmeraten deutlich reduziert. Daraus kann geschlossen werden, dass beide Gene für Komponenten eines Methioninaufnahmesystems kodieren (Daten nicht gezeigt).

#### 1.2.2 Das Gencluster *metQNI* kodiert in *C. glutamicum* ein hoch-affines L-Methioninaufnahmesystem

Um polare Effekte auszuschliessen, wurde ein *C. glutamicum metNI*-Deletionsstamm generiert, in dem *metI* und *metN* deletiert sind. Die Methioninaufnahme des Stammes *C. glutamicum ΔmetNI* wurde mit der des Wildtyps bei verschiedenen Konzentrationen verglichen.



**Abb. 3.5:** Aufnahme von L-Methionin durch *C. glutamicum* ATCC 13032 ( $\square$ ) und *C. glutamicum*  $\Delta\text{metNI}$  ( $\triangle$ ). Die Aufnahmeraten wurden in Abhängigkeit von der Substratkonzentration ermittelt. Näherung einer Aufnahmekinetik bei *C. glutamicum*  $\Delta\text{metNI}$ . Abgeleitet wurden die Konstanten  $K_m = 88 \mu\text{M}$  und  $V_{\text{max}} = 1,65 \text{ nmol/min (mg TG)}$

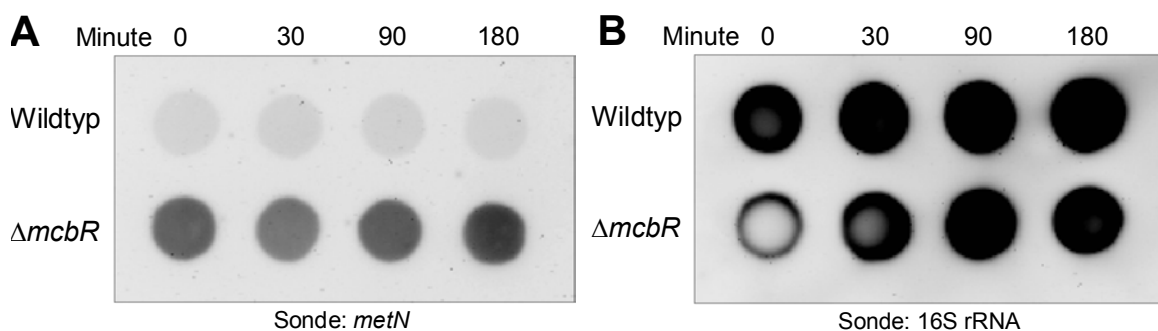
Durch Abbildung 3.5 wird deutlich, dass der Stamm *C. glutamicum*  $\Delta\text{metNI}$  langsamer Methionin aufnahm als der Wildtyp. Bei sehr niedrigen Methioninkonzentrationen wie 0,2 und 0,7  $\mu\text{M}$  war beim *metNI*-Deletionsstamm keine

Aufnahme zu beobachten. Dagegen transportierte der Wildtyp bereits 0,4 nmol Methionin/min (mg TG). Daraus kann geschlossen werden, dass das MetD-Homolog in *C. glutamicum* ein hoch-affines primär aktives Methioninaufnahmesystem darstellt. Mit Zunahme der Substratkonzentration wurde eine im Vergleich zum Wildtyp sehr viel niedrigere Transportrate erreicht. Bei 100  $\mu$ M Methionin transportiert der Wildtyp ca. doppelt so schnell Methionin als *C. glutamicum*  $\Delta$ *metNI*. Somit kann aus diesem Versuch auch geschlossen werden, dass MetD bis zu einer Methioninkonzentration von 100  $\mu$ M den größten Anteil an der Methioninaufnahme hat. Da aber noch immer Methioninaufnahme im Stamm *C. glutamicum*  $\Delta$ *metNI* stattfand, muss noch mindestens ein weiteres mittel-affines Transportsystem, das analog zu *E. coli* MetP genannt wurde, existieren. In dem Stamm *C. glutamicum*  $\Delta$ *metNI* zeigte die Zunahme der Geschwindigkeit in Abhängigkeit der Substratkonzentration einen hyperbolischen Verlauf. Daher wurden aus diesen Daten die Parameter der Michaelis-Menten-Kinetik bestimmt. Dabei ergibt sich ein  $K_m$ -Wert von ca. 88  $\mu$ M und eine Maximalgeschwindigkeit  $V_{max}$  von ca. 1,65 nmol/min (mg TG). Da die Aufnahme in *C. glutamicum*  $\Delta$ *metNI* einer Michaelis-Menten-Kinetik folgte, wurde geschlossen, dass neben MetD nur noch ein weiteres Aufnahmesystem in *C. glutamicum* existiert. Bei den Experimenten mit *C. glutamicum*  $\Delta$ *metNI* fiel auf, dass der verwendete Klon nicht mehr auf den alternativen Kohlenstoffquellen Lactat, Acetat und Malat wachsen konnte (Daten nicht gezeigt). Eine Erklärung dafür könnte sein, dass durch das Rekombinationsereignis während der Deletion ein Transposon, das sich im Chromosom befindet, an eine andere Stelle gesprungen ist (persönliche Mitteilung von R. Krämer). Da die beiden Einzelmutanten *C. glutamicum* *metI*::pK18*mob* und *C. glutamicum* *metN*::pK18*mob* im Gegensatz zum *metNI*-Deletionstamm auf Lactat wachsen konnten, ist ein transponierendes Element anzunehmen. Ein anderer *C. glutamicum*  $\Delta$ *metNI*-Klon müsste demnach Wachstum auf Lactat zeigen.

#### 1.3 Das Gencluster *metQNI* wird durch den Repressor McbR reguliert

Die Aufnahmemessung mit dem Stamm *C. glutamicum*  $\Delta$ *metNI* zeigte, dass MetD das primär aktive, hoch-affine Aufnahmesystem in *C. glutamicum* ist (s. 1.2.2). *Upstream* des *metQNI*-Genclusters befindet sich ein mögliches McbR-Motiv (persönliche Mitteilung J. Kalinowski, Universität Bielefeld). McbR ist ein transkriptioneller Repressor, der an der Regulation der Synthesewege für

schwefelhaltige Aminosäuren beteiligt ist (s. Einleitung). Da auch die Regulation von Transportergenen durch McbR möglich erschien, wurde die *metQNI*-Expression sowohl im Wildtyp *C. glutamicum* ATCC 13032 als auch im Stamm *C. glutamicum*  $\Delta mcbR$  überprüft. Nach der Inokulation in frischem Medium wurden Proben aus der *lag*- und der exponentiellen Phase des Wachstums genommen. Aus den Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und in einer *Northern*-Hybridisierung eingesetzt. Als Sonde wurde die *antisense*-RNA des Gens *metN* bzw. als Kontrollsonde die 16S rRNA verwendet. Die beiden folgenden Abbildungen zeigen das Resultat der Hybridisierungen.



**Abb. 3.6:** RNA-Hybridisierung der Gesamt-RNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 und dem Stamm *C. glutamicum*  $\Delta mcbR$  mit den Sonden *metN* (A) bzw. 16S rRNA (B).

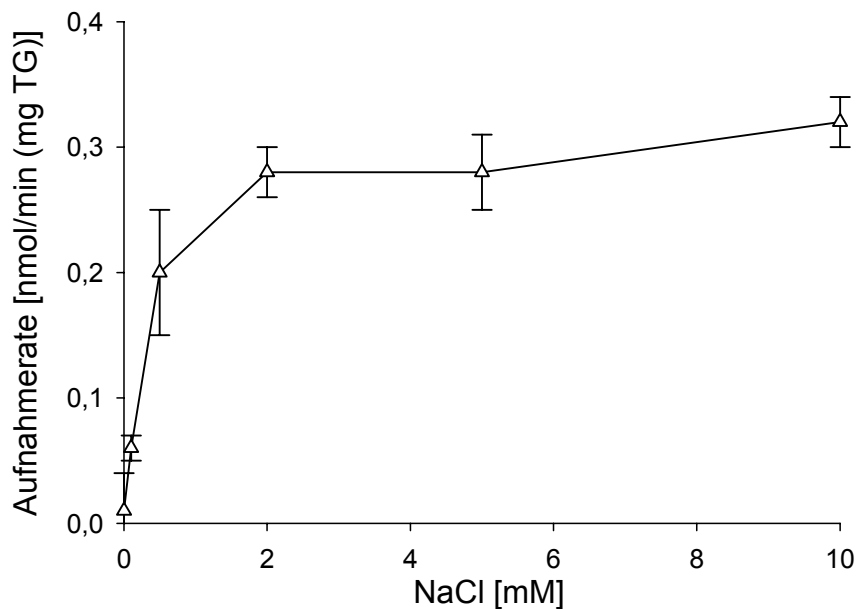
In Abbildung 3.6 A ist erkennbar, dass eine schwache Basis-Expression des Gens *metN* im Wildtyp stattfand. Die Deletion des McbR-kodierenden Gens führt zu einer deutlich höheren konstitutiven Expression von *metN*. Die Kontrolle mit der 16S rRNA in Abbildung 3.6 B zeigt, dass die Gesamt-RNA in vergleichbaren Mengen aufgetragen war. Der globale Repressor McbR reprimiert in *C. glutamicum* also neben den Genen der Methionin- bzw. Cysteinbiosynthese auch das *metQNI*-Gencluster, das das hoch-affine Methioninaufnahmesystem kodiert.

#### 1.4 Biochemische Charakterisierung von MetP

Nachdem das erste Methioninaufnahmesystem in *C. glutamicum*, analog zu *E. coli* MetD genannt, identifiziert werden konnte, konnte eine biochemische Charakterisierung des verbleibenden Transporters MetP im *metNI*-Deletionsstamm vorgenommen werden.

### 1.4.1 MetP ist ein Na<sup>+</sup>-abhängiger Transporter

Wurde dem Stamm *C. glutamicum* ATCC 13032 während der Methioninaufnahme CCCP zugesetzt, so war vor allem bei höheren Methioninkonzentrationen die Aufnahme stark reduziert (s. 1.1). Daraus wurde geschlossen, dass das mittel-affine Aufnahmesystem MetP sekundär aktiv ist. FERCHICHI *et al.* (1987) konnten zeigen, dass *B. linens* nur über ein sekundäres Methioninaufnahmesystem verfügt, das Na<sup>+</sup>-abhängig ist. Daher wurde mit dem Stamm *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  die Na<sup>+</sup>-Abhängigkeit des oder der weiteren Methioninaufnahmesystem(s/e) überprüft. Die Zellen wurden dafür nach der Inkubation und dem zweimaligen Waschen in MES/Tris-Puffer aufgenommen, der eine definierte NaCl-Konzentration enthielt. Die Aufnahmemessung wurde dabei mit je 30  $\mu$ M L-Methionin durchgeführt.



**Abb. 3.7:** Na<sup>+</sup>-Abhängigkeit der L-Methioninaufnahme bei 30  $\mu$ M externem Methionin durch *C. glutamicum*  $\Delta metNI$ .

Wie Abbildung 3.7 zeigt, stieg die Methioninaufnahmerate mit steigender NaCl-Konzentration an. Ohne NaCl war eine Aufnahme von Methionin nicht messbar. Demnach ist MetP ein sekundär aktives Na<sup>+</sup>-abhängiges Methioninaufnahmesystem. Ein weiteres Transportsystem, dass primär aktiv ist, kann ausgeschlossen werden, da solche Transporter ihr Substrat auch ohne den elektrochemischen Na<sup>+</sup>-Gradienten transportieren können.

### 1.4.2 Die Methioninaufnahme über MetP wird durch Cystein und die aliphatischen Aminosäuren Leucin, Valin, Isoleucin und Alanin gehemmt

Zunächst wurde der Einfluss von möglichen Kompetitoren der Methioninaufnahme bei dem Stamm *C. glutamicum metI::pk18mob* untersucht. FERCHICHI *et al.* (1987) und ZHANG *et al.* (2003) konnten zeigen, dass der Import über den sekundären Transporter in *B. linens* bzw. MetP in *E. coli* durch einen 10-fachen Überschuss an Aminosäuren wie z.B. L-Valin und L-Alanin gehemmt werden kann. In einem Versuch wurde daher die Methioninaufnahme in *C. glutamicum metI::pk18mob* bei einem Zusatz von 4 verschiedenen Aminosäuregemischen bestimmt. Jedem Ansatz mit 50 µM Methionin wurde eines dieser Gemische in einem 10-fachen Überschuss hinzugefügt. Die 4 Aminosäuregemische waren: **(1)** Glycin, L-Alanin, L-Leucin, L-Isoleucin und L-Valin, **(2)** L-Prolin, L-Cystein, L-Threonin, L-Serin und D-Methionin, **(3)** L-Aspartat, L-Asparagin, L-Glutamat und L-Glutamin, **(4)** L-Histidin, L-Lysin, L-Arginin, L-Phenylalanin und L-Tryptophan. Die ersten beiden Aminosäuregemische inhibierten die Methioninaufnahme so effektiv, dass keine Aufnahme mehr nachgewiesen werden konnte. Die beiden anderen Gemische hatten keinen Einfluss (Daten nicht gezeigt).

Daraufhin wurden alle 10 Aminosäuren der Gemische 1 und 2 einzeln getestet. Die folgende Tabelle gibt die ermittelten Aufnahmeraten dieser Messungen wieder.

**Tab. 3.1:** Konkurrenz der L-Methioninaufnahme bei *C. glutamicum metI::pK18mob* durch Zusatz von verschiedenen Aminosäuren im 10-fachen Überschuss bei 50 µM externem Methionin (V = Aufnahmerate)

Aminosäure	-AS	Gly	L-Ala	L-Val	L-Leu	L-Ile
<b>V [nmol/min (mg TG)]</b>	0,65	0,62	0,14	0	0	0
Aminosäure	L-Cys	L-Ser	L-Thr	D-Met	L-Pro	+alle AS
<b>V [nmol/min (mg TG)]</b>	0	0,62	0,34	0,46	0,61	0

Tabelle 3.1 gibt die verschiedenen Aufnahmeraten in Abhängigkeit vom (möglichen) Kompetitor wieder. Als Negativ-Kontrolle wurde eine Aufnahmemessung ohne zusätzliche Aminosäure (-AS), als Positiv-Kontrolle eine Aufnahmemessung mit allen 19 erwähnten Aminosäuren (+alle AS) durchgeführt. Im ersten Fall betrug die

Aufnahmerate 0,65 nmol/min (mg TG), im zweiten Fall 0 nmol/min (mg TG). Glycin, Serin und Prolin haben keinen Einfluss auf die Methioninaufnahme. Die Rate entspricht der der Negativ-Kontrolle. Threonin und D-Methionin haben einen geringen Einfluss auf die Methioninaufnahme: bei Threonin-Zusatz beträgt sie 0,34, bei D-Methionin-Zusatz 0,46 nmol/min (mg TG). Dagegen führte die Inkubation mit Alanin zu einer sehr geringen Methioninaufnahme. Die Rate betrug nur noch 0,14 nmol/min (mg TG). Die Aminosäuren Valin, Leucin, Isoleucin und Cystein kompetitierten die Methioninaufnahme schließlich komplett, so dass bei ihrer Verwendung keine Aufnahme von L-Methionin mehr zu beobachten war. Dieser Versuch unterstützte die Annahme, dass es neben MetP kein weiteres Aufnahmesystem im Stamm *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  gibt, da es sehr unwahrscheinlich ist, dass zwei verschiedene Systeme die gleiche Inhibition durch so unterschiedliche Aminosäuren wie L-Leucin und L-Cystein zeigen.

Da die Aminosäuren Leucin, Isoleucin, Valin, Cystein und auch Alanin die Methioninaufnahme über MetP in *C. glutamicum* *metI::pk18mob* inhibierten, ist es möglich, dass auch die Aufnahme von L-Leucin, L-Isoleucin, L-Valin, L-Alanin bzw. L-Cystein durch L-Methionin gehemmt wird und somit die genannten Aminosäuren an MetP binden können. Um dies zu überprüfen, wurden Versuche zur Inhibition der Cystein-, Alanin- und Leucinaufnahme durchgeführt.

In einem Versuch wurde überprüft, ob L-Methionin die L-Cysteinaufnahme im Stamm *C. glutamicum* *metI::pk18mob* kompetitieren kann. Dafür wurde [<sup>35</sup>S]L-Cystein mit einer Konzentration von 20  $\mu$ M (spezifische Aktivität der Lösung: 30 MBq/mmol) verwendet. Zur Kompetition der L-Cysteinaufnahme wurden ein 10-facher bzw. ein 50-facher Überschuss an L-Methionin oder ein 10-facher Überschuss an L-Cystein als Kontrolle zugefügt. In keinem der Ansätze war eine Inhibition zu detektieren (Daten nicht gezeigt). Bei der Überprüfung des radioaktiven Cysteins durch Dünnschichtchromatographie stellte sich allerdings heraus, dass das gelieferte Produkt nur einen sehr kleinen Anteil L-Cystein beinhaltete (Daten nicht gezeigt). Eine Neulieferung radioaktiv-markierten L-Cysteins war vorerst nicht möglich. Daher konnte aus diesem Experiment nicht geschlossen werden, ob Methionin die Cysteinaufnahme hemmen kann.

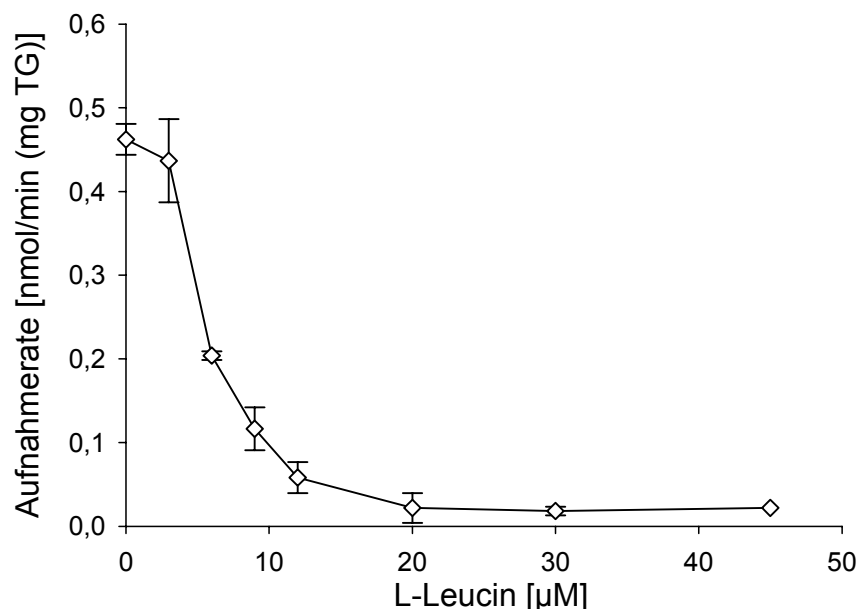
Für die L-Alaninaufnahme konnte gezeigt werden, dass sie durch einen Überschuss an L-Methionin inhibiert werden kann (persönliche Mitteilung von J. Nettekoven). Für diesen Versuch wurde [<sup>14</sup>C]L-Alanin mit einer Konzentration von 100  $\mu$ M (spezifische



Aktivität der Lösung: 7,4 MBq/mmol) verwendet. Zur Konkurrenz wurden zum einen ein 10-facher Überschuss an L-Methionin und zum anderen als Kontrolle ein 10-facher Überschuss an L-Alanin eingesetzt. In beiden Fällen war eine Konkurrenz zu erkennen, so dass sowohl Methionin als auch Alanin offensichtlich an MetP binden. Dieses Resultat legt zudem nahe, dass L-Methionin und L-Alanin über ein gemeinsames Aufnahmesystem in die Zelle transportiert werden. Die Konkurrenz der L-Leucinaufnahme durch L-Methionin ist unter 1.5.1 ausführlich beschrieben.

#### 1.4.3 $K_i$ -Wert-Bestimmung der Inhibitoren Leucin und Cystein

Wie in Kapitel 1.4.2 gezeigt, inhibierten L-Cystein und die aliphatischen Aminosäuren L-Leucin, L-Isoleucin, L-Valin bzw. L-Alanin die L-Methioninaufnahme über MetP erheblich. Die Aufnahme rate von Methionin sollte demnach in Abhängigkeit steigender Inhibitorkonzentrationen fallen. Somit konnte der  $K_i$ -Wert ermittelt werden. In den folgenden Versuchen wurde der Stamm *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  und eine Methioninkonzentration von 30  $\mu\text{M}$  verwendet. Die Konzentrationen der Inhibitoren L-Leucin bzw. L-Cystein lagen zwischen 0 und 45  $\mu\text{M}$  bzw. 0 und 120  $\mu\text{M}$ .



**Abb. 3.8:** Aufnahme von L-Methionin durch *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  bei Zusatz von verschiedenen L-Leucinkonzentrationen als Inhibitor. Die Substratkonzentration betrug 30  $\mu\text{M}$ .

Wie Abbildung 3.8 zeigt, setzte bei einer L-Leucinkonzentration von 3  $\mu\text{M}$  die Inhibition der Methioninaufnahme ein. Mit Zunahme der Konzentration wurde die

### III. Ergebnisse

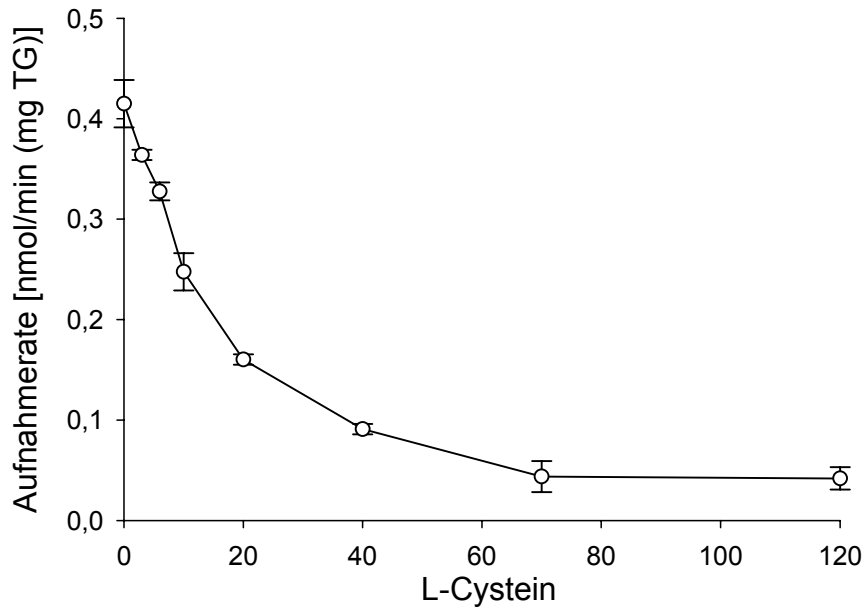
---

Aufnahme immer schwächer, bis bei einer Leucinkonzentration von 20  $\mu\text{M}$  die maximale Inhibition erreicht war. Anhand der Inhibitorkonzentration und der jeweils gemessenen Geschwindigkeit konnte der  $K_i$ -Wert für L-Leucin nach folgender Formel berechnet werden:

$$K_i [\mu\text{M}] = \frac{I [\mu\text{M}]}{\left( \frac{V_{\max} [\text{nmol}/\text{min} (\text{mg TG})]}{V [\text{nmol}/\text{min} (\text{mg TG})]} \right)^{-1} \times \frac{S [\mu\text{M}]}{K_m [\mu\text{M}]}^{-1}} \quad [1]$$

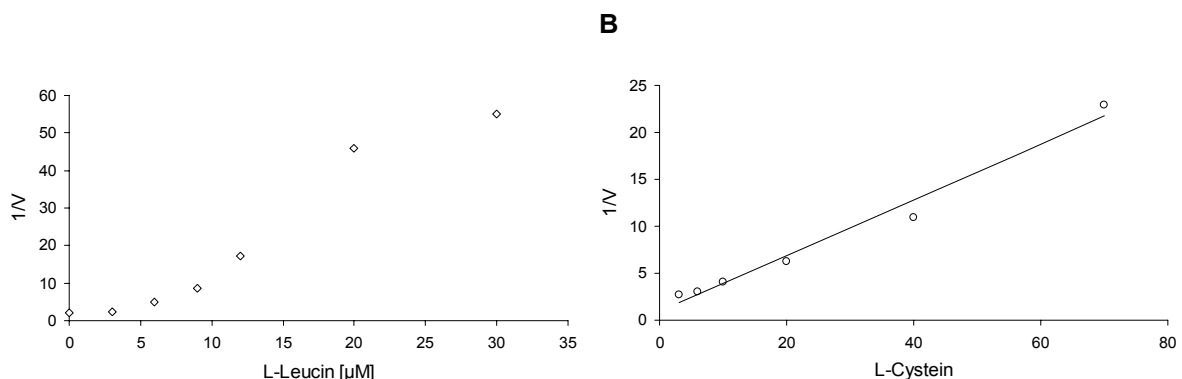
Die Maximalgeschwindigkeit ( $V_{\max}$ ) von 1,65 nmol/min (mg TG) und der  $K_m$ -Wert von 88  $\mu\text{M}$  für MetP konnten bereits ermittelt werden (s. 1.2.2). Wie erwähnt betrug die Methioninkonzentration (S) 30  $\mu\text{M}$ . Durch Einsetzen der Inhibitorkonzentration (I) und der entsprechenden Aufnahmerate (V) im Bereich zwischen minimaler und maximaler Inhibition konnte jeweils der  $K_i$ -Wert errechnet werden. Dieser beträgt für L-Leucin  $2,3 \pm 1,3 \mu\text{M}$ . MetP zeigte somit eine stärkere Bindung zu Leucin als zu Methionin. Vorausgesetzt MetP transportiert neben Methionin auch Leucin und es ist das einzige Leucinaufnahmesystem, so sollte in einem Dixon-Plot eine lineare Beziehung bestehen. Wurde die Inhibitorkonzentration gegen  $1/V$  in einem Dixon-Plot aufgetragen (s. Abb. 3.10 A), so war aber keine Linearität zu erkennen. Das deutet darauf hin, dass neben dem möglichen Leucinimporter MetP ein weiteres Leucinaufnahmesystem aktiv ist. BrnQ ist das Haupttransportsystem für L-Leucin und dessen Aktivität beeinflusst die Konkurrenz und somit die  $K_i$ -Wert-Berechnung. Die große Standardabweichung des  $K_i$ -Wertes ist vermutlich durch die Aktivität des Leucinaufnahmesystems BrnQ zu erklären.

Für die Inhibition durch L-Cystein wurde der Versuch analog zum vorherigen durchgeführt.



**Abb. 3.9:** Aufnahme von L-Methionin durch *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  bei Zusatz von verschiedenen L-Cysteinkonzentrationen als Inhibitor. Die Substratkonzentration betrug 30  $\mu M$ .

Die Inhibition der Methioninaufnahme durch L-Cystein ist in Abbildung 3.9 gut zu erkennen. Bei 3  $\mu M$  setzte die Inhibition der Methioninaufnahme ein und bei 70  $\mu M$  war das Maximum der Inhibition erreicht. Wie im vorherigen Versuch wurde der  $K_i$ -Wert für L-Cystein ermittelt (s. [1]). Dieser betrug  $11,8 \pm 3 \mu M$ . Wie bei Leucin bindet Cystein an MetP stärker als Methionin. Wurden die Werte ebenfalls in einem Dixon-Plot aufgetragen (s. Abb. 3.10 B), so konnte ein nahezu linearer Zusammenhang zwischen Inhibitorkonzentration und  $1/V$  festgestellt werden. Daher ist möglich, dass das Methioninaufnahmesystem MetP auch ein Importer für L-Cystein ist.



**Abb. 3.10:** Aufnahme von L-Methionin durch *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  bei Zusatz von verschiedenen L-Leucin- bzw. L-Cysteinkonzentrationen als Inhibitor, dargestellt als Dixon-Plot. Die Substratkonzentration betrug 30  $\mu M$ .

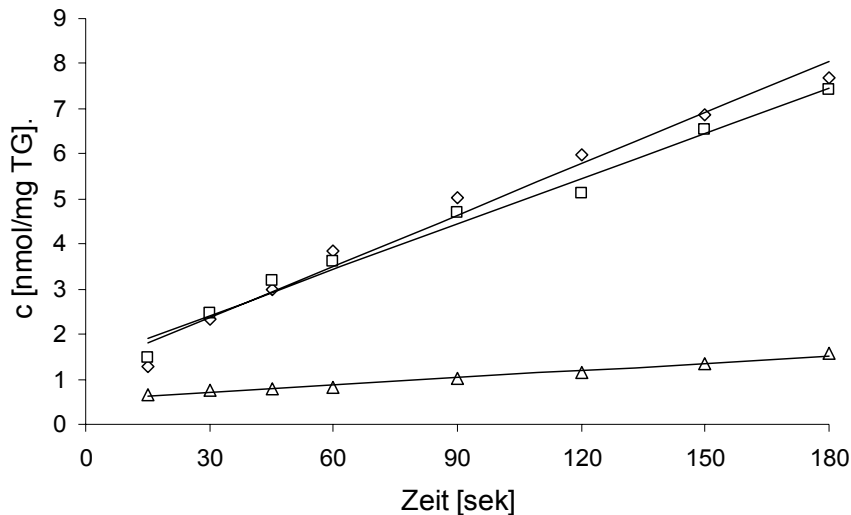
Wie gezeigt werden konnte, hat MetP zu Leucin und Cystein eine höhere Affinität als zu Methionin. Allerdings konnte noch nicht eindeutig gezeigt werden, dass MetP auch Leucin bzw. Cystein transportiert oder ob die beiden Aminosäuren mit Methionin lediglich um die Bindungsstelle konkurrieren.

#### 1.5 Identifikation von *metP*

Die biochemische Charakterisierung der L-Methioninaufnahme im Stamm *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  deutete darauf hin, dass es neben MetD nur ein weiteres Aufnahmesystem, welches als MetP bezeichnet wurde, geben kann. Mit Hilfe verschiedener Ansätze sollte das zweite Transportsystem MetP identifiziert werden.

##### 1.5.1 L-Methionin wird nicht über BrnQ transportiert

Es konnte gezeigt werden, dass die aliphatischen Aminosäuren L-Valin, L-Leucin und L-Isoleucin im Überschuss die L-Methioninaufnahme hemmen (s. 1.4.3). Daher lag die Vermutung nahe, dass das Aufnahmesystem für Leucin, Isoleucin und Valin auch Methionin transportieren kann. Das Gen *brnQ* kodiert einen sekundären Transporter, der das Hauptaufnahmesystem für Leucin, Isoleucin und Valin darstellt (TAUCH *et al.*, 1998). Die Deletion von *brnQ* führt zu einem fast vollständigen Verlust der Aufnahme. Der Stamm *C. glutamicum*  $\Delta metNI \Delta brnQ$ , in dem der Einfluss von BrnQ auf die Methioninaufnahme überprüft werden könnte, konnte nicht generiert werden. Daher wurde die Konkurrenz der L-Leucinaufnahme durch Methionin im Stamm *C. glutamicum* *metI::pk18mob* überprüft. Wenn BrnQ das zweite Methioninaufnahmesystem wäre, so müsste die L-Leucinaufnahme mit einem Überschuss an L-Methionin inhibierbar sein. Für diesen Versuch wurde [ $^{14}\text{C}$ ]L-Leucin mit einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  (spezifische Aktivität der Lösung: 2,2 MBq/mmol) verwendet. Zur Konkurrenz wurden zum einen 2 mM L-Methionin, also ein 20-facher Überschuss, und zum anderen 1 mM L-Isoleucin, also ein 10-facher Überschuss, als Kontrolle zugesetzt.



**Abb. 3.11:** Aufnahme von L-Leucin durch *C. glutamicum metI::pK18mob* (◇) mit 2 mM L-Methionin (□) bzw. 1 mM L-Isoleucin (△) im Überschuss. Die Substratkonzentration betrug 100 µM.

Wie Abbildung 3.11 zeigt, bewirkte der Zusatz von 2 mM L-Methionin keine signifikante Reduktion der L-Leucinaufnahme. Die Leucinaufnahme ohne Zusatz einer Aminosäure betrug ca. 2,2 nmol/min (mg TG) und mit 20-fachem Überschuss an Methionin ca. 2 nmol/min (mg TG). Wurde ein 10-facher Isoleucinüberschuss zugesetzt, so stieg die interne Leucinkonzentration nur noch um 0,3 nmol/min (mg TG). Während L-Isoleucin erwartungsgemäß die L-Leucinaufnahme kompetitierte, hatte Methionin keinen Einfluss auf die Aufnahme. Damit wird Methionin nicht über BrnQ transportiert. Wurde *brnQ* deletiert, so war noch eine sehr geringe Leucinaufnahme messbar (TAUCH *et al.*, 1998). Somit besteht die Möglichkeit, dass das zweite L-Methioninaufnahmesystem MetP auch L-Leucin, L-Isoleucin bzw. L-Valin transportieren kann und daher die unter 1.4.3 beschriebene Inhibition stattfindet.

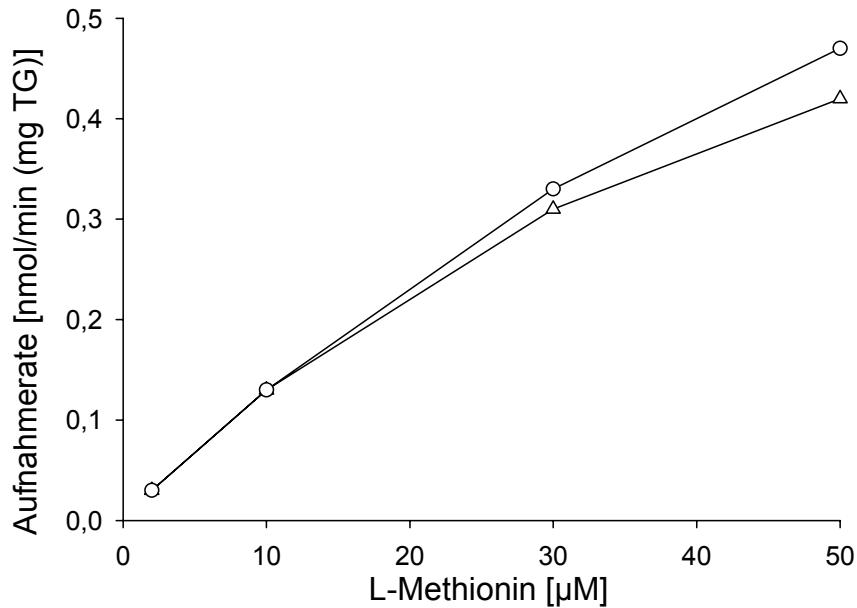
### 1.5.2 Das putative Gen *metP* gehört nicht zum McbR-Regulon

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Transkription des *metQNI*-Gencluster von dem globalen Repressor McbR reguliert wird (s. 1.3). In einem bioinformatischen Ansatz konnten neben *metQNI* noch vier weitere mögliche Transporter-kodierende Gene bzw. Gencluster identifiziert werden, die ein putatives McbR-Bindemotiv in ihrer Promotorsequenz aufweisen (persönliche Mitteilung J. Kalinowski, Universität Bielefeld). Diese vier Kandidaten sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

**Tab. 3.2:** Putative McbR-regulierte Transporter-kodierende Gene, Ähnlichkeiten zu Transportern anderer Organismen und generierte Stämme

offene Lese- rahmen ( <i>Cgl</i> )	Ähnlichkeiten	Stamm
1330, 1331, 1332	ABC-Transporter: aus <i>Agrobacterium</i> (Nopalin) / aus <i>E. coli</i> (Glutamin)	<i>C. glutamicum</i> <i>Cgl1331::pK18mob</i>
2458, 2459, 2460, 2461	Zucker-Transporter: aus <i>Thermoanaero-bacterium</i> (Maltose) / aus <i>Bacillus</i> (Arabinose)	<i>C. glutamicum</i> <i>Cgl2460::pK18mob</i>
2551	H <sup>+</sup> /Glutamat Symporter GltT aus <i>Bacillus</i> (sek. aktiv)	<i>C. glutamicum</i> $\Delta$ <i>metNI</i> <i>Cgl2551::pK18mob</i>
2434, 2436, 2437, 2438, 2439	ABC-Transporter: aus <i>Bacillus</i> (Oligopeptide) / aus <i>E. coli</i> (Dipeptide)	<i>C. glutamicum</i> $\Delta$ <i>Cgl2434-2439</i> (Universität Bielefeld)

Wie Tabelle 3.2 zeigt, sind drei putative primäre und nur ein sekundärer Transporter mit einer möglichen McbR-Bindestelle im *C. glutamicum*-Chromosom enthalten. Da durch die biochemische Charakterisierung gezeigt werden konnte, dass neben MetD nur ein weiteres sekundär aktives L-Methioninaufnahmesystem zu existieren scheint, war *Cgl2551* der interessanteste Kandidat für das MetP-kodierende Gen. Zusätzlich wurden aufgrund der putativen McbR-Bindestelle für die ersten beiden Kandidaten eine Insertionsmutante in *Cgl1331* bzw. *Cgl2460* ausgehend vom *C. glutamicum*-Wildtyp generiert. Ein Deletionsstamm *C. glutamicum*  $\Delta$ *Cgl2434-2439* wurde von C. Rückert (Universität Bielefeld) zur Verfügung gestellt. Für den interessanten Kandidaten *Cgl2551* wurde eine Insertionsmutante im Stamm *C. glutamicum*  $\Delta$ *metNI* generiert. Nachfolgend wurde über einen Bereich von 2 bis 100  $\mu$ M die L-Methioninaufnahme dieser Stämme bestimmt.



**Abb. 3.12:** Aufnahme von L-Methionin durch *C. glutamicum*  $\Delta\text{metNI}$  ( $\Delta$ ) und *C. glutamicum*  $\Delta\text{metNI Cgl2551::pK18mob}$  ( $\circ$ ). Die Aufnahmeraten wurden in Abhängigkeit von der Substratkonzentration ermittelt.

In Abbildung 3.12 ist deutlich zu erkennen, dass der Stamm *C. glutamicum*  $\Delta\text{metNI Cgl2551::pK18mob}$  nicht weniger Methionin aufnahm als der Ausgangsstamm *C. glutamicum*  $\Delta\text{metNI}$ . Somit ist *Cgl2551* nicht in die Methioninaufnahme involviert. Zudem zeigten die drei weiteren Stämme ebenfalls keinen Unterschied in der Aufnahme von Methionin im Vergleich zum Stamm *C. glutamicum* ATCC 13032 (Daten nicht gezeigt). Demnach scheint neben MetD kein weiterer Transporter, der dem McbR-Regulon zugeschrieben wurde, an der Methioninaufnahme beteiligt zu sein.

### 1.5.3 MetP wird nicht von einem *E. coli* *ykfD*-Homolog kodiert

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, vermuteten THANBICHLER *et al.* (1999), dass der S-Methylmethionin-Importer MmuP in *E. coli* auch L-Methionin transportieren kann. Dieses Aufnahmesystem wird von dem Gen *ykfD* kodiert. Auch wenn GÁL *et al.* (2002) und ZHANG *et al.* (2003) diese Vermutung widerlegen konnten, wurde aufgrund des Vorhandenseins von MmuP-Homologen in *C. glutamicum* deren Beteiligung am Methionintransport erwogen. Eine Datenbankrecherche mit der Primärstruktur von MmuP zeigte drei ähnliche Proteine in *C. glutamicum*, die alle eine Identität von mehr als 30% aufweisen: Cgl0470 (Identität = 33%), Cgl1107 (32%) und Cgl1155 (31%). Dabei handelt es sich laut Annotation um putative

sekundäre  $\gamma$ -Aminobutyrat- bzw. Aminosäure-Permeasen. *Cgl0470*, *Cgl1107* und *Cgl1155* wurden über eine Insertion im Stamm *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  deaktiviert. Die Methioninaufnahme der drei genannten Mutanten wurde mit der der Ausgangsstämme verglichen. Ist eines dieser Gene an der L-Methioninaufnahme beteiligt, sollte die Inaktivierung des entsprechenden Gens im Stamm *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  den Transport von Methionin merklich reduzieren. In keinem Fall zeigte sich aber eine veränderte Aufnahme von Methionin im Bereich zwischen 10 und 100  $\mu$ M L-Methionin (Daten nicht gezeigt). Somit kodieren *Cgl0470*, *Cgl1107* und *Cgl1155* nicht das zweite L-Methioninaufnahmesystem MetP.

#### 1.5.4 MetP wird von *Cgl1030* kodiert

Da die Kandidaten aus der McbR-Motivsuche (s. 1.5.2) bzw. der Literatur (s. 1.5.3), die als MetP in Frage kamen, nicht das zweite Methioninaufnahmesystem kodieren, sollte die Identifizierung zum einen über eine ungerichtete Mutagenese mit einem Transposon und zum anderen durch die Inaktivierung von putativen  $Na^+$ -abhängigen Transportern erfolgen. Für die Transposonmutagenese wurde der Stamm *C. glutamicum* RES167  $\Delta metA$   $\Delta metNI$  benötigt. Grundsätzlich musste *C. glutamicum* RES167 verwendet werden, da nur mit diesem Stamm die Transposonmutagenese mit dem Plasmid pAT6100 möglich ist (TAUCH *et al.*, 2002). Basierend auf diesem Stamm wurde eine *C. glutamicum* RES167  $\Delta metA$ -Mutante generiert, die methionin-auxotroph war. In diesem Stamm ist das Gen der Homoserin-Acetyltransferase deletiert. Für eine ausreichende Methionin-Versorgung ist *C. glutamicum* RES167  $\Delta metA$  auf funktionelle Methioninaufnahmesysteme angewiesen. In Methionin-freiem Minimalmedium MMI war der Stamm *C. glutamicum* RES167  $\Delta metA$  somit auch nicht mehr in der Lage, zu wachsen (Daten nicht gezeigt). Werden die Zellen aber auf Cystathionin-haltigem Minimalmedium ausgestrichen, können sie wachsen, da ausgehend vom Cystathionin die Methioninbiosynthese betrieben werden kann (PARK *et al.*, 1998). Alternativ konnte der Stamm *C. glutamicum* RES167  $\Delta metA$  auch auf BHI-Vollmedium oder Minimalmedium mit methionin-haltigen Dipeptiden wachsen. Basierend auf *C. glutamicum* RES167  $\Delta metA$  wurden auch die Gene des primären Methioninaufnahmesystems MetD deletiert (s. 1.2). Somit kann dieser Stamm nur aufgrund der Aktivität des zweiten Aufnahmesystems MetP auf methionin-haltigem



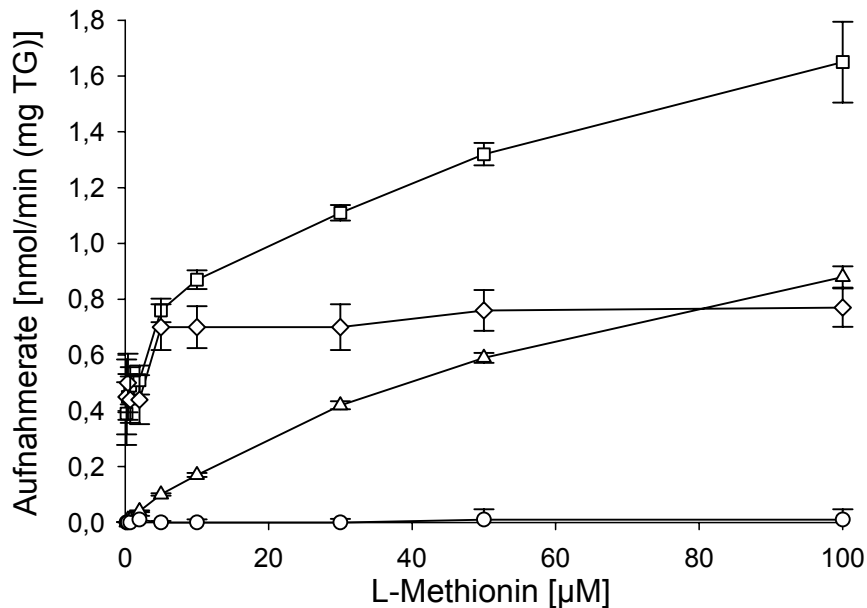
Minimalmedium wachsen. *C. glutamicum* RES167  $\Delta metA \Delta metNI$  sollte schließlich mit dem Transposon des Plasmids pAT6100 mutagenisiert werden. Nach erfolgter Transposon-Mutagenese sollten die Zellen auf Cystathionin-haltigen Minimalmedium ausgestrichen werden. Durch die Konkurrenz der Methioninaufnahme mit einem Überschuss an Cystathionin konnte im *metNI*-Deletionsstamm gezeigt werden, dass das Cystathionin-Aufnahmesystem nicht das sekundäre Methioninaufnahmesystem MetP ist (Daten nicht gezeigt). Auf Cystathionin-haltigen Minimalmedium sollten nach erfolgter Mutagenese alle Klone wachsen, da es für Cystathionin ein separates Aufnahmesystem gibt. Nach dem Umimpfen auf Methionin-haltiges Minimalmedium sollten die Klone, denen das zweite Methionin-Aufnahmesystem MetP fehlt, nicht mehr wachsen können. Die DNA-Bereiche, die das integrierte Transposon flankieren, sollten dann isoliert und sequenziert werden.

Alternativ zu diesem Ansatz wurden unter anderem 13 Transporter-kodierende Gene ausgewählt, die laut Annotation der NCBI-Datenbank Na<sup>+</sup>- bzw. H<sup>+</sup>-abhängig sind (FOLLMANN, 2004). Wie bereits gezeigt, ist MetP Na<sup>+</sup>-abhängig (s. 1.4.2). Bei den Genen handelte es sich um: *Cgl0067*, *Cgl0225*, *Cgl0833*, *Cgl1030*, *Cgl1163*, *Cgl1258*, *Cgl1436*, *Cgl2045*, *Cgl2327*, *Cgl2551*, *Cgl2595*, *Cgl2744* und *Cgl2908*. Diese Gene sollten durch eine pDrive-Insertion im Stamm in *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  deaktiviert werden. Sollte eines dieser Gene MetP kodieren, so sollte die Methioninaufnahme drastisch reduziert sein. Die Identifizierung von MetP mit Hilfe der Transposonmutagenese bzw. der gezielten Insertion von Genen war Thema der Diplomarbeit von M. Follmann (2004). Während FOLLMANN (2004) *metP* mittels der Transposonmutagenese nicht ausfindig machen konnte, zeigte die Insertionsmutante *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  *Cgl1030*::pDrive keine Methioninaufnahme mehr. Somit kodiert *Cgl1030* das zweite sekundäre L-Methioninaufnahmesystem *metP*. Neben MetD und MetP existiert kein weiteres spezifisches Methioninaufnahmesystem in *C. glutamicum* (s. 1.6).

#### 1.6 Biochemische Charakterisierung von MetD

Nachdem *metP* identifiziert werden konnte, wurden für eine biochemische Charakterisierung die entsprechenden Deletionsstämme *C. glutamicum*  $\Delta metP$  und *C. glutamicum*  $\Delta metNI \Delta metP$  generiert. Mit den vier Stämmen *C. glutamicum* ATCC 13032 (Wildtyp), *C. glutamicum*  $\Delta metNI$ , *C. glutamicum*  $\Delta metP$  und *C. glutamicum*

$\Delta metNI \Delta metP$  wurde anschließend die L-Methioninaufnahme in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen ermittelt.



**Abb. 3.13:** Aufnahme von L-Methionin durch *C. glutamicum* ATCC 13032 (□), *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  (△), *C. glutamicum*  $\Delta metP$  (◇) und *C. glutamicum*  $\Delta metNI \Delta metP$  (○). Die Aufnahmeraten wurden in Abhängigkeit von der Substratkonzentration ermittelt.

Während der Wildtyp, wie in Abbildung 3.13 zu erkennen, über den gesamten Bereich Methioninaufnahme zeigte und bei 100 µM eine Rate von ca. 1,6 nmol/min (mg TG) erreichte, konnte der *metNI*-Deletionsstamm bei niedrigen Konzentrationen kein Methionin transportieren, da dem Stamm das hoch-affine, primäre Aufnahmesystem fehlt. Die Doppelmutante *C. glutamicum*  $\Delta metNI \Delta metP$  war nicht mehr in der Lage, Methionin zu importieren, da sowohl MetD als auch das sekundär aktive MetP nicht mehr vorhanden waren. Daraus kann geschlossen werden, dass MetD und MetP die beiden L-Methioninaufnahmesysteme in *C. glutamicum* sind. Der Stamm *C. glutamicum*  $\Delta metP$  war wie der Wildtyp bei niedrigen Konzentrationen von unter 2 µM zur Methioninaufnahme befähigt. Bei einer Substratkonzentration von 5 µM war allerdings die Maximalgeschwindigkeit erreicht, die bei ca. 0,7 nmol/min (mg TG) liegt. Eine genaue Bestimmung des  $K_m$ -Wertes von MetD, dem hoch-affinen Transportsystem, ist nicht möglich, da dieser unter 0,1 µM liegt, was eine genaue Messung unmöglich macht.

Zudem konnte gezeigt werden, dass MetD stereospezifisch L-Methionin transportiert, da ein Überschuss an D-Methionin die L-Methioninaufnahme nicht hemmt (Daten nicht gezeigt).

Außerdem nahm der Stamm *C. glutamicum*  $\Delta metP$  im Vergleich zum Wildtyp weitaus weniger L-Alanin auf (persönliche Mitteilung von J. Nettekoven). Dies bestätigte die Annahme (s. 1.4.3), dass MetP sowohl L-Methionin als auch L-Alanin transportiert. Darüberhinaus ist MetP das Hauptaufnahmesystem für L-Alanin in *C. glutamicum*, da eine *metP*-Deletion die Alaninaufnahme um ca. 85 % reduzierte.

Desweiteren führte die Deletion von *metP* zu einem stark reduzierten Wachstum in LB- bzw. BHI-Vollmedium (Daten nicht gezeigt). In Minimalmedium dagegen wuchs der entsprechende Stamm normal und er erreichte die gleiche optische Dichte wie der Wildtyp. Da sowohl *C. glutamicum*  $\Delta metNI \Delta metP$  als auch *C. glutamicum*  $\Delta metP$  den gleichen Phänotyp in Vollmedium zeigten, muss es sich um einen Effekt handeln, der auf den Verlust von MetP zurückzuführen ist. Wurde dem Vollmedium Ammoniumsulfat und Magnesiumsulfat, die auch Bestandteile des Minimalmediums sind, zugesetzt, wuchsen die Stämme deutlich besser. Die Wachstumsrate des Wildtyps erreichten sie jedoch nicht (Daten nicht gezeigt).

#### **1.7 Zusammenfassung der Methioninaufnahme in *C. glutamicum***

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass MetD, das primär-aktive Methioninaufnahmesystem einen  $K_m$ -Wert von  $< 0,1 \mu\text{M}$  und eine Maximalgeschwindigkeit  $V_{\text{max}}$  von ca.  $0,7 \text{ nmol/min (mg TG)}$  hat. MetD wird in *C. glutamicum* von *Cgl0635 (metI)*, *Cgl0636 (metN)* und *Cgl0637 (metQ)* kodiert. Das sekundär aktive, mittel-affine Aufnahmesystem MetP konnte ebenfalls biochemisch charakterisiert werden. Der  $K_m$ -Wert beträgt ca.  $88 \mu\text{M}$  und die Maximalgeschwindigkeit ca.  $1,65 \text{ nmol/min (mg TG)}$ . MetP transportiert sowohl L-Methionin als auch L-Alanin. Weitere L-Methioninaufnahmesysteme können ausgeschlossen werden. Damit ist *C. glutamicum* das erste Bakterium, bei dem die komplette L-Methioninaufnahme charakterisiert und alle Methionintransporter-kodierenden Gene identifiziert werden konnten.

#### **2. Methioninexkretion in *C. glutamicum***

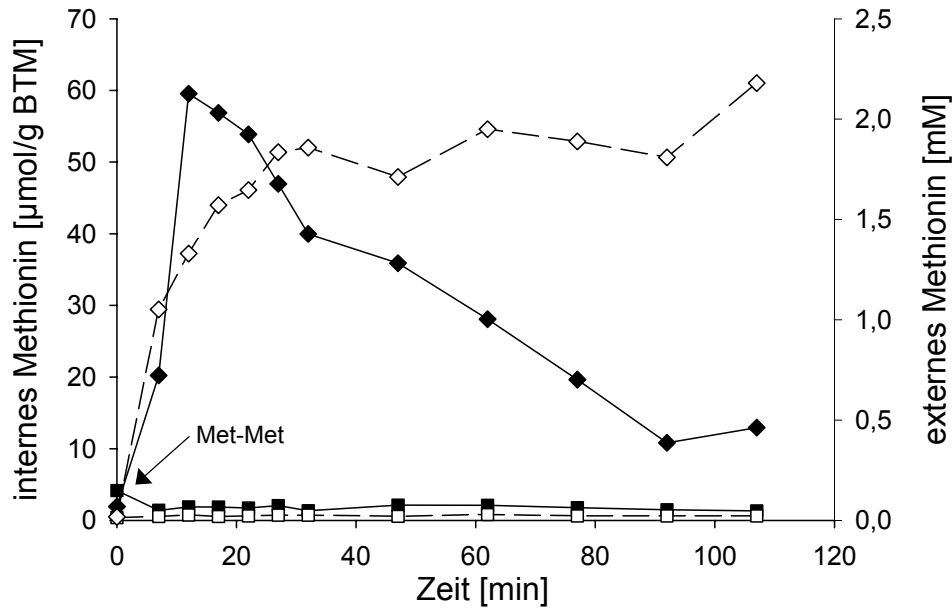
Neben der Aufnahme von L-Methionin spielt bei der biotechnologischen Produktion von Methionin auch die Exkretion eine wesentliche Rolle. Deshalb wurden auch dieser Transportprozess im Rahmen dieser Arbeit biochemisch charakterisiert und

die verantwortlichen Transportproteine identifiziert. Als Stamm diente wiederum *C. glutamicum* ATCC 13032, dessen Genomsequenz vollständig bekannt ist.

#### 2.1 Etablierung der Dipeptidfütterung

Für die biochemische Charakterisierung von möglichen Methioninexkretionssystemen wurde die Dipeptidfütterung verwendet. Bei dieser Methode wird einer Zellsuspension ein Dipeptid, das von den Zellen aufgenommen wird, in einer definierten Konzentration zugesetzt. Prokaryoten wie *E. coli* und *C. glutamicum* besitzen Aufnahmesysteme für Di- bzw. Oligopeptide, die im Allgemeinen Peptide sehr effektiv in die Zelle befördern. Da die Aufnahme von Dipeptiden nicht strikt reguliert ist, gelangen diese in großer Menge in die Zelle. In der Zelle werden die Dipeptide dann von cytoplasmatischen Hydrolasen gespalten. Wie bereits erwähnt, verfügt *C. glutamicum* nur über einen eingeschränkten Aminosäurekatabolismus (WOHLLEBEN *et al.*, 1993), so dass bei einer Akkumulation von Aminosäuren die Zellen den Stress mit einer effektiven Exkretion der Aminosäure kompensieren sollten. Vorausgesetzt das Dipeptid wird effektiv aufgenommen, kann mit dieser Methode das Vorhandensein eines Exporters gezeigt und dieser charakterisiert werden. Auf diese Weise konnten bereits der Lysinexporter LysE, der Threoninexporter ThrE und der Isoleucinexporter BrnFE beschrieben werden (VRLJIC *et al.*, 1996; SIMIC *et al.*, 2001; KENNERKNECHT *et al.*, 2003).

In Vorversuchen wurden die Methionin-haltigen Dipeptide Ala-Met, Met-Ala, Met-Met, Met-Gln, Met-Glu und Glu-Met im *C. glutamicum*-Wildtyp getestet. Es konnte gezeigt werden, dass alle Dipeptide aufgenommen werden, da die cytoplasmatische Konzentration der entsprechenden Aminosäuren anstieg (Daten nicht gezeigt). Mit Met-Met konnten allerdings die höchsten internen Konzentrationen erreicht werden (Daten nicht gezeigt), so dass im Folgenden zur Untersuchung des Methioninexports fast ausschließlich dieses Dipeptid verwendet wurde. Für ein entsprechendes Experiment zeigt die folgende Abbildung die Veränderung der externen und internen Methioninkonzentrationen nach der Dipeptid-Zugabe.



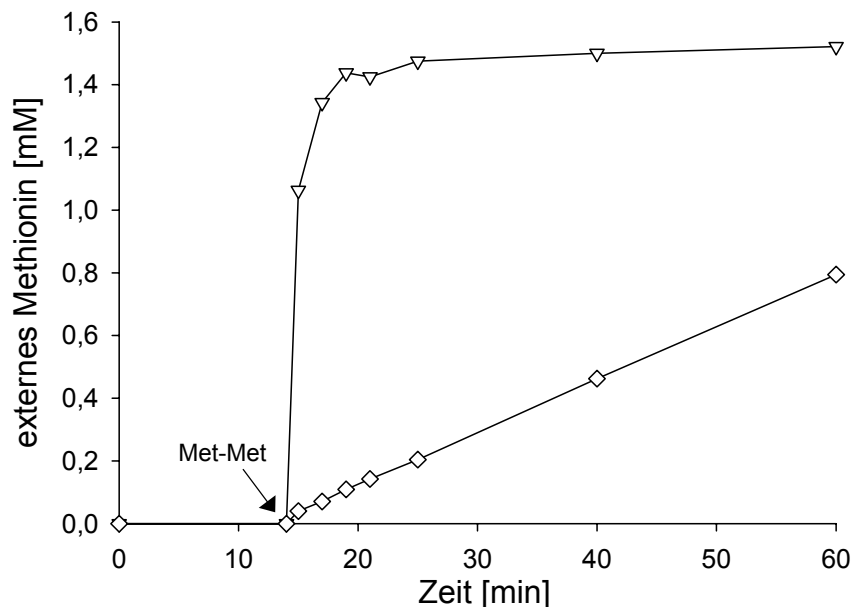
**Abb. 3.14:** Akkumulation von L-Methionin im Cytoplasma (geschlossene Symbole) und im Medium (offene Symbole) des Stammes *C. glutamicum* ATCC 13032. Es wurden kein (■, □) bzw. 1 mM (◆, ◇) Met-Met zugefügt. Die OD lag zwischen 1,8 und 3,2.

Aus Abbildung 3.14 geht deutlich hervor, dass in der Wildtyp-Kultur ohne Dipeptid keine Veränderung in den Methioninkonzentrationen zu detektieren war. Die Zellen, die mit dem Met-Met-Dipeptid gefüttert wurden, akkumulierten dagegen Methionin im Cytoplasma und im Medium. Wurde das Dipeptid zugesetzt, so erfolgte sofort die Aufnahme, Hydrolyse und offensichtlich auch der Export. 7 min nach der Dipeptidzugabe war bereits die höchste interne Konzentration von 60 µmol/g BTM an freiem Methionin erreicht. Danach nahm die interne Methioninkonzentration wieder ab, was auf die Aktivität eines Exporters hinweist. Die höchste externe Methioninkonzentration war aber erst 22 min nach der Zugabe des Dipeptids erreicht (27. Minute). Die Konzentration betrug ca. 2 mM. Dieser Wert war zu erwarten, da durch die Hydrolyse von 1 mM Met-Met-Dipeptid 2 mM Methionin entstehen. Die Methode der Dipeptidfütterung mit Methionin-haltigen Dipeptiden konnte etabliert werden.

## 2.2 Extrazelluläre Hydrolasen setzen Dipeptide um

Bei der Betrachtung der cytoplasmatischen Methioninkonzentration nach der Dipeptidzugabe fiel auf, dass der Export des Methionins scheinbar schneller ist als die Aufnahme des Dipeptids (s. Abb. 3.14). 5 min nach der Dipeptidzugabe war

intern erst eine Konzentration von 20  $\mu\text{mol/g}$  BTM erreicht, wogegen im Medium bereits mit einer Konzentration von 1 mM die Hälfte des zu erwartenden Methionins nachweisbar war. Dieser Befund wäre durch die Existenz von extrazellulären Hydrolasen zu erklären. Daher wurde in einem Versuch der Überstand direkt nach der Silikonölzentrifugation geteilt und eine Hälfte mit 20 %-iger Perchlorsäure vermengt. Aufgrund seiner denaturierenden Wirkung unterbindet Perchlorsäure die Aktivität von möglichen Hydrolasen. Perchlorsäure selbst hydrolysiert das Dipeptid Met-Met unter den gegebenen Versuchsbedingungen aber nicht (Daten nicht gezeigt). Für den Versuch wurde anstatt des Wildtyps *C. glutamicum* ATCC 13032 der Stamm *C. glutamicum*  $\Delta\text{metNI}$  verwendet. Mit der Verwendung dieses Stammes, sollte die Aufnahme des exkretierten Methionins über das hoch-affine Methioninaufnahmesystem MetD verhindert werden (s. 1.2). Zusätzlich wurde dem Medium noch 10 mM Leucin und 4 mM Cystein hinzugefügt, wodurch zusätzlich der Methionintransport über das zweite Aufnahmesystem MetP unterbunden wird (s. 1.4). In diesem Versuch, bei dem 1 mM Met-Met eingesetzt wurde, war der Verlauf der cytoplasmatischen Methioninkonzentration wie in dem vorherigen Experiment (s. Abb. 3.14).



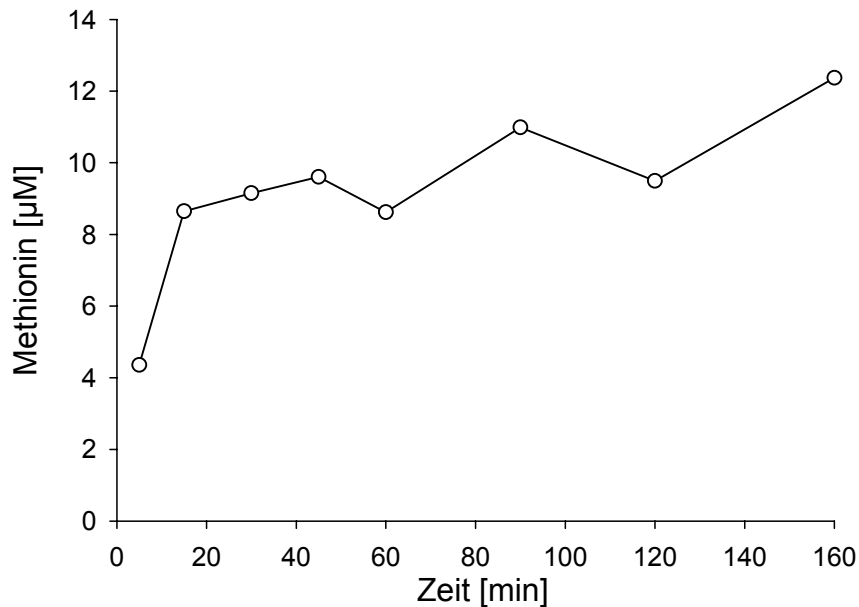
**Abb. 3.15:** Akkumulation von L-Methionin im Medium des Stammes *C. glutamicum*  $\Delta\text{metNI}$ . Es wurden 1 mM Met-Met zugefügt. Zur Inhibition von MetP waren 10 mM Leucin und 4 mM Cystein im Medium. Die Überstände wurden direkt aufgearbeitet ( $\nabla$ ) oder mit Perchlorsäure inkubiert ( $\diamond$ ). Die OD lag zwischen 1,6 und 2,2.

Wie in Abbildung 3.15 zu sehen, zeigte die externe Methioninakkumulation in den unbehandelten und den mit Perchlorsäure-behandelten Überständen

unterschiedliche Resultate. Während die Methioninkonzentration in den unbehandelten Proben schon nach 3 min ein Maximum von ca. 1,6 mM erreicht hatte, stieg die Konzentration in den Perchlorsäure-behandelten Überständen langsamer und nahezu linear an. 35 min nach der Dipeptidzugabe war erst eine Konzentration von ca. 0,8 mM erreicht. Die durch die Perchlorsäure bedingte Denaturierung aller Proteine im Überstand, insbesondere der Hydrolasen, verhinderte offensichtlich einen Abbau des Dipeptids in der Zeit nach der Probennahme. Daher wurden die Überstände in allen folgenden Versuchen nach der Silikonölzentrifugation mit Perchlorsäure behandelt, bevor sie mittels HPLC vermessen wurden. Durch den Einsatz der Perchlorsäure konnte die Aktivität der Hydrolase(n) in den Überständen nach der Probennahme inhibiert werden. Die aus den Versuchen resultierenden Werte für die externe Methioninkonzentration setzen sich demnach aus der Exporteraktivität und der Aktivität einer bzw. mehrerer Hydrolase(n) zusammen.

Um zu klären, ob es sich um sekretierte oder Membran- bzw. Zellwand-gebundene Hydrolasen handelt und um den Anteil der externen Hydrolasen am Abbau des Dipeptids zu quantifizieren, wurden folgende Experimente durchgeführt.

Für die Lokalisierung der Enzyme wurde in einem Experiment der Überstand einer *C. glutamicum*  $\Delta metNI$ -Kultur nach 2-stündigem Wachstum sterilfiltriert und anschließend mit 1 mM Met-Met inkubiert. Wurden Hydrolasen durch die Zellen ins Medium sekretiert, so sollte ein Abbau des Dipeptids bzw. die Zunahme von Methionin zu beobachten sein, da durch Filtration nur Zellen, nicht aber Enzyme abgetrennt werden können.



**Abb. 3.16:** Akkumulation von Methionin im sterilen Überstand einer *C. glutamicum*  $\Delta metNI$ -Kultur, nach Zusatz von 1 mM Met-Met.

Abbildung 3.16 zeigt lediglich einen sehr schwachen Anstieg der Methioninkonzentration. Die gemessenen Konzentrationen lagen um den Faktor 100 unter den Werten im Überstand, die im vorangegangenen Experiment beobachtet wurden (s. Abb. 3.15). Somit konnte das Vorhandensein von sekretierten Hydrolasen ausgeschlossen werden. Die im Überstand aktiven Hydrolasen sind vermutlich membrangebunden oder in der Zellwand lokalisiert.

Neben der Lokalisierung wurde auch der Anteil der Hydrolaseaktivität am Anstieg des externen Methioningehaltes untersucht. In einem ersten Experiment wurde einer *C. glutamicum*-Kultur während der Inkubation 50 µM CCCP und 3 mM KCN zugesetzt. Jeglicher Transport über die Membran sollte damit unterbunden sein, während Hydrolasen nicht beeinträchtigt werden. Mit diesem Ansatz sollte ausschließlich die hydrolytische Aktivität, die zur Zunahme des externen Methioningehalts führt, gemessen werden. Dieser Versuch war aber nicht aussagekräftig, da im Cytoplasma eine Akkumulation von Methionin nachgewiesen wurde. Die Aufnahme des Dipeptids und möglicherweise auch die Exkretion von Methionin konnte somit nicht unterbunden werden. (Daten nicht gezeigt).

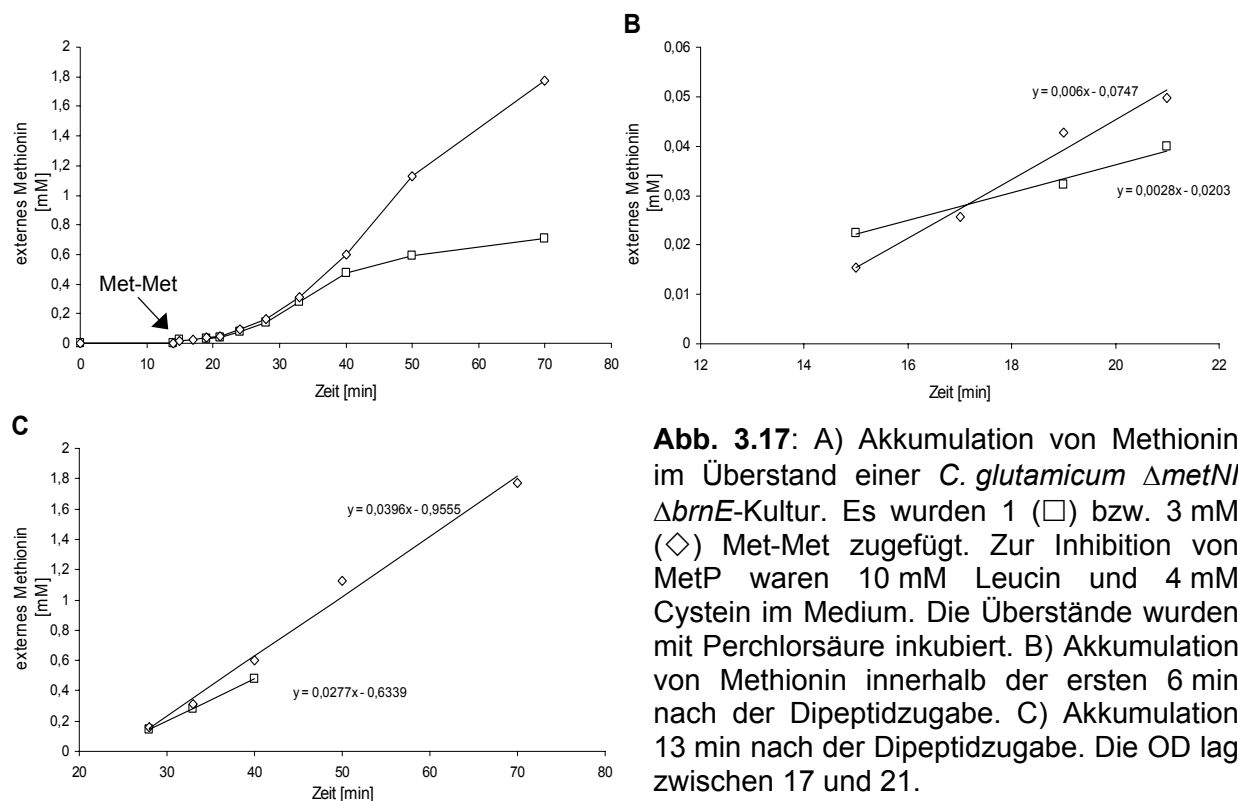
Für die Quantifizierung der hydrolytischen Aktivität wurde ein weiterer Versuch durchgeführt. Es wurde angenommen, dass innerhalb der ersten 10 min nach der Dipeptidzugabe nur die Dipeptidaufnahme, aber keine Methioninexkretion stattfindet. Bei der Betrachtung der cytoplasmatischen Methioninkonzentration nach der Zugabe



### III. Ergebnisse

von Met-Met fiel auf, dass es intern zu einem starken Anstieg innerhalb der ersten 10 min kam (s. Abb. 3.14). Anschließend fiel die Konzentration deutlich ab. Dies wurde auf die Aktivierung eines Exporters auf Genexpressionsebene zurückgeführt (s. 2.8). Daher wurde für diesen Versuch zum einen eine hohe Zelldichte (OD = 15 statt OD = 3) gewählt und zum anderen die Menge an Perchlorsäure zur Inhibition der Hydrolasen reduziert. Durch die höhere OD sollte der Umsatz des Dipeptids gesteigert werden. Die reduzierte Menge an PCA führte zu einer niedrigeren Verdünnung der externen Proben, so dass auch niedrigere Methioninkonzentrationen verlässlich durch die HPLC gemessen werden konnten.

Für diesen Versuch wurde der Stamm *C. glutamicum*  $\Delta metNI$   $\Delta brnE$  verwendet, da der Isoleucinexporter BrnFE (KENNERKNECHT *et al.*, 2003) als möglicher Methioninexporter diskutiert wird (s. 2.5). Es wurden 1 bzw. 3 mM Met-Met-Dipeptid eingesetzt.



**Abb. 3.17:** A) Akkumulation von Methionin im Überstand einer *C. glutamicum*  $\Delta metNI$   $\Delta brnE$ -Kultur. Es wurden 1 ( $\square$ ) bzw. 3 mM ( $\diamond$ ) Met-Met zugefügt. Zur Inhibition von MetP waren 10 mM Leucin und 4 mM Cystein im Medium. Die Überstände wurden mit Perchlorsäure inkubiert. B) Akkumulation von Methionin innerhalb der ersten 6 min nach der Dipeptidzugabe. C) Akkumulation 13 min nach der Dipeptidzugabe. Die OD lag zwischen 17 und 21.

In Abbildung 3.17 A ist ein identischer Anstieg der externen Methioninkonzentrationen in den Ansätzen mit 1 bzw. 3 mM Met-Met innerhalb der ersten 15 min nach Dipeptidzugabe zu erkennen. Wurde nur 1 mM Dipeptid zugesetzt, so wurde eine Konzentration von ca. 0,7 mM bei Minute 50 erreicht. Danach veränderte sich die externe Konzentration nicht mehr. Demnach musste das Dipeptid aufgebraucht sein. In dem Ansatz mit 3 mM Met-Met stieg die externe

Methioninkonzentration weiter an. Bei dieser Fütterung wurden nach 60 Minuten ca. 1,8 mM Methionin erreicht. Auffällig bei beiden Ansätzen war der zweistufige Anstieg der Methioninkonzentration. In den ersten 6 Minuten nach der Dipeptidzugabe war die Steigung geringer als in den folgenden 20 Minuten. Somit konnten zwei verschiedene Steigungen für die Zunahme der externen Methioninkonzentrationen ermittelt werden.

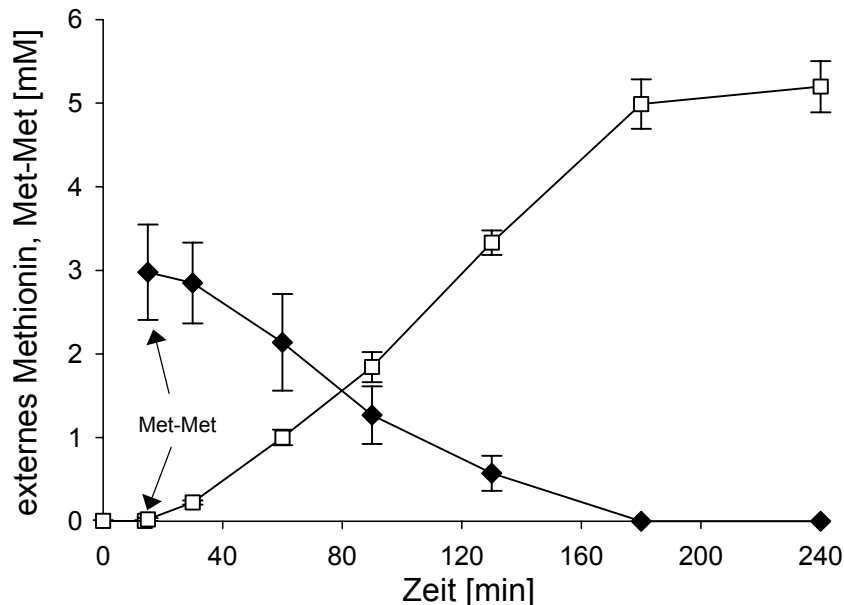
In Abbildung 3.17 B ist zu sehen, dass der Anstieg der externen Methioninkonzentration innerhalb der ersten 6 Minuten nach der Dipeptidzugabe zwischen  $2,8 \cdot 10^{-3}$  mM/min bei 1 mM Dipeptid und  $6 \cdot 10^{-3}$  mM/min bei 3 mM Dipeptid lag.

Die dargestellten Steigungen zwischen Minute 28 und 40 bzw. 70 in Abbildung 3.17 C betragen  $27,7 \cdot 10^{-3}$  mM/min bei 1 mM Dipeptid und  $39,6 \cdot 10^{-3}$  mM/min bei 3 mM Met-Met. Da Methioninexport innerhalb der ersten 10 Minuten nach der Dipeptidzugabe ausgeschlossen wurde, musste der Anstieg der externen Methioninkonzentration einzig durch die externen Hydrolasen erfolgen. Der zusätzliche Anstieg der Methioninkonzentration 10 min nach der Zugabe war auf die einsetzende Exporteraktivität zurückzuführen. Für die jeweilige Met-Met-Konzentration konnte die entsprechende Hydrolasaktivität bestimmt werden. Der Anteil der Membran- oder Zellwand-gebundenen Hydrolasen am Abbau von Met-Met liegt je nach Dipeptidkonzentration zwischen 10 und 15 %.

### **2.3 Methioninbiosynthese und -katabolismus sind bei der Dipeptid-fütterung unbedeutend**

Es konnte gezeigt werden, dass membrangebundene Hydrolasen das Dipeptid während der Versuchsdauer und der Messung über die HPLC spalten und damit den Methioningehalt in den Überständen beeinflussen. Ebenfalls wurde geklärt, wie hoch der Anteil von Methioninbiosynthese bzw. -katabolismus am externen Methionin während des Versuchs ist. Die Methioninbiosynthese kann weitgehend vernachlässigt werden. Aufgrund der hohen cytoplasmatischen Methioninkonzentration durch die Zugabe und Aufnahme von Met-Met sollten die Biosynthesegene durch den Repressor McbR und Methionin selbst reprimiert sein (HWANG *et al.*, 2002; REY *et al.*, 2003; REY *et al.*, 2005). Ein Einfluss des Methioninkatabolismus ist ebenfalls unwahrscheinlich, da das Gen *metK*, das das Methionin-abbauende Enzym SAM-Synthase kodiert, auch von McbR reprimiert wird

(REY *et al.*, 2005). Zur Bestimmung der Ausbeute von Methionin aus Met-Met während der Fütterung wurde dem Wildtyp-Stamm *C. glutamicum* ATCC 13032 3 mM Met-Met zugesetzt. Die Abnahme der Met-Met- bzw. die Zunahme der Methioninkonzentration wurde über einen Zeitraum verfolgt, in dem das komplette Dipeptid aufgebraucht sein sollte.

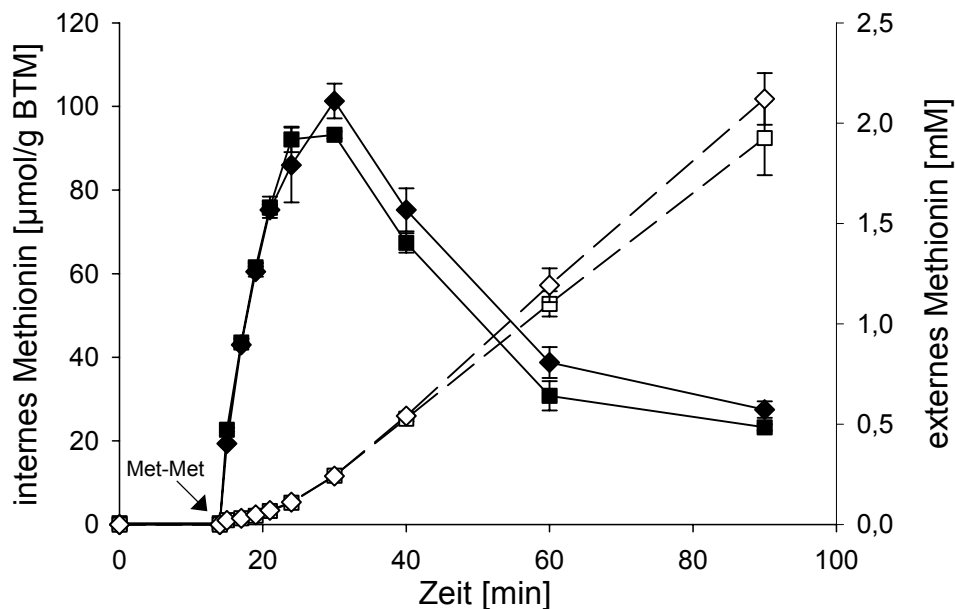


**Abb. 3.18:** Akkumulation von L-Methionin (□) und Abnahme von L-Met-Met (◆) im Medium des Stammes *C. glutamicum* ATCC 13032. Es wurden 3 mM Met-Met zugefügt. Die Überstände wurden mit Perchlorsäure inkubiert. Die OD lag zwischen 4 und 15.

Wie Abbildung 3.18 zeigt, lag die Konzentration von Met-Met zu Beginn des Versuchs bei ca. 3 mM. Die Konzentration nahm kontinuierlich ab, während die Methioninkonzentration annähernd doppelt so schnell zunahm und maximal 5,3 mM erreichte. Damit wurden 88 % des Dipeptids Met-Met zu Methionin umgesetzt. Die Geschwindigkeit der Met-Met-Abnahme lag bei 0,022 mM/min, die der Methionin-Zunahme bei 0,035 mM/min. Damit haben weder die Methioninbiosynthese noch der Methioninkatabolismus einen signifikanten Einfluss auf die Akkumulation von Methionin im Medium unter diesen Versuchsbedingungen. Aufbauend auf dieser Analyse und der Tatsache, dass Met-Met nie im Cytoplasma nachgewiesen werden konnte, scheint die cytoplasmatische Hydrolyse des Dipeptids als geschwindigkeitsbestimmender Schritt vernachlässigbar zu sein.

## 2.4 Die externe Methioninkonzentration wird durch die Methioninaufnahme nicht beeinflusst

IKEDA und KATSUMATA (1995) sowie TRÖTSCHEL *et al.* (2003) konnten zeigen, dass die Tryptophan- bzw. Glutamat-Produktion durch entsprechende Aufnahmesysteme dieser Aminosäuren beeinträchtigt wird. War beispielsweise das Gen *gltS*, das den sekundären Glutamatimporter kodiert, deletiert, war die Glutamat-Produktionsrate erhöht. Aufgrund dessen wurde überprüft, ob die Methioninaufnahmesysteme MetD und MetP die Methioninproduktion beeinflussen. Für diese Versuche wurde der Stamm *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  verwendet, wobei die MetP-Aktivität durch Zugabe von 10 mM Leucin und 4 mM Cystein inhibiert wurde (s. 1.4.2). Verglichen wurde der Stamm *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  mit dem Wildtyp *C. glutamicum* ATCC 13032.

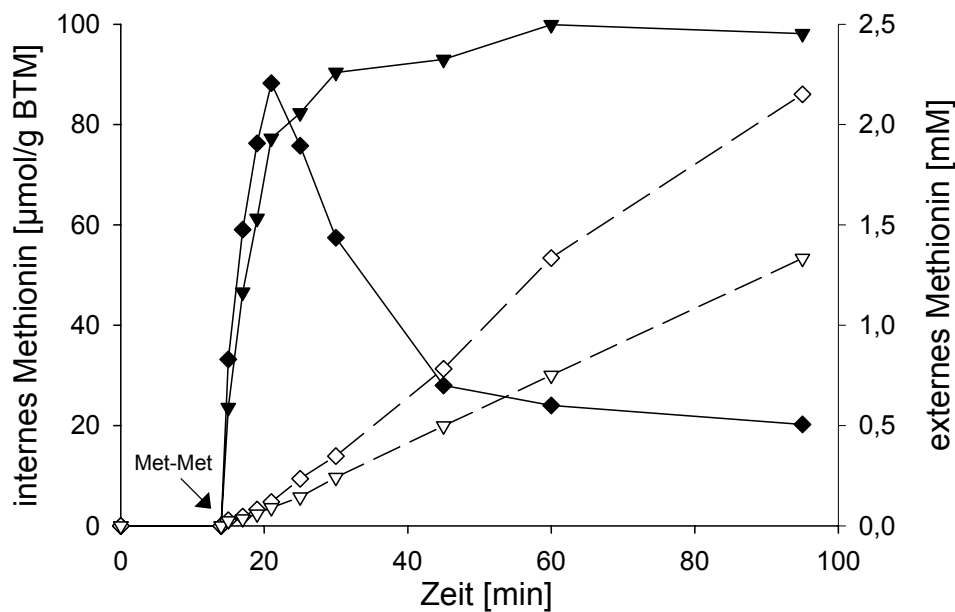


**Abb. 3.19:** Akkumulation von L-Methionin im Cytoplasma (geschlossene Symbole) und im Medium (offene Symbole) der Stämme *C. glutamicum* ATCC 13032 (■, □) und *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  (◆, ◇). Es wurden 3 mM Met-Met zugefügt. Zur Inhibition von MetP waren 10 mM Leucin und 4 mM Cystein im Medium. Die Überstände wurden mit Perchlorsäure inkubiert. Die OD lag zwischen 4 und 6.

Wie in Abbildung 3.19 zu sehen, wurde im Cytoplasma beider Stämme nach der Dipeptidzugabe ca. 100  $\mu\text{mol/g}$  BTM erreicht. Auch im Medium war kein signifikanter Unterschied zwischen *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  und *C. glutamicum* ATCC 13032 in der Methioninkonzentration erkennbar. Es wurden ca. 2 bzw. 2,2 mM Methionin 75 min nach der Zugabe erreicht. Die externe Methioninkonzentration wurde somit nicht durch die Methioninaufnahmesysteme MetD und MetP beeinflusst.

## 2.5 Chloramphenicol beeinflusst die Methioninexkretion

Ein weiterer Versuch sollte klären, ob die Regulation des Exportes auf der Ebene der Aktivität und/oder der Genexpression erfolgt. Es konnte gezeigt werden, dass die cytoplasmatische Methioninkonzentration innerhalb der ersten 10 min nach der Dipeptidzugabe stark anstieg (s. Abb. 3.19). Parallel dazu war im Medium innerhalb dieser Zeit nur eine schwache Methioninakkumulation sichtbar, die auf die Aktivität von Hydrolasen zurückgeführt werden konnte (s. 2.2). Nachdem im Cytoplasma ein Maximum erreicht war, schien der Methioninexport einzusetzen. Es wurde daher angenommen, dass die Expression des Exporter-kodierenden Gens erst induziert werden musste, bevor es zum Export kam. Für das Experiment wurde einer *C. glutamicum*  $\Delta metNI$ -Kultur zusätzlich Chloramphenicol (CAM) zugesetzt, wodurch die Proteinbiosynthese gehemmt wird.



**Abb. 3.20:** Akkumulation von L-Methionin im Cytoplasma (geschlossene Symbole) und im Medium (offene Symbole) der Stammes *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  ( $\blacklozenge$ ,  $\diamond$ ). Zur Inhibition der Proteinbiosynthese wurde einem Ansatz 100  $\mu\text{g/ml}$  Chloramphenicol ( $\blacktriangledown$ ,  $\triangledown$ ) zugesetzt. Es wurden 3 mM Met-Met zugefügt. Zur Inhibition von MetP waren 10 mM Leucin und 4 mM Cystein im Medium. Die Überstände wurden mit Perchlorsäure inkubiert. Die OD lag zwischen 2,7 und 3,5.

Aus Abbildung 3.20 wird ersichtlich, dass die Chloramphenicol-Zugabe einen Einfluss auf die Methioninakkumulation im Cytoplasma bzw. im Medium hatte. Während die unbehandelten Zellen intern bis ca. 90  $\mu\text{mol}$  Methionin/g BTM akkumulierten und die Konzentration danach wieder auf 20  $\mu\text{mol/g}$  BTM abfiel, stieg die Methioninkonzentration in den CAM-behandelten Zellen auf ca. 100  $\mu\text{mol/g}$  BTM

an und veränderte sich nicht mehr. Die Exkretion von Methionin lag demnach in beiden Ansätzen 60 min nach der Dipeptidzugabe im Gleichgewicht mit der Aufnahme des Dipeptids. Genauso wie bei den cytoplasmatischen Konzentrationen ergab sich auch eine Differenz im Medium. Nach 80 min erreichten die unbehandelten Zellen ca. 2,2 mM Methionin, die CAM-behandelten Zellen ca. 1,4 mM. Offensichtlich war die Exkretionsrate des Methionins nicht steigerungsfähig, so dass intern eine höhere Konzentration erreicht wurde. Parallel dazu gelangte auch weniger Methionin ins Medium, was nahe legt, dass die Induktion eines Exporterkodierenden Gens nötig ist, um Methionin schnell und effektiv aus der Zelle zu transportieren.

## 2.6 Identifikation von möglichen Methioninexportern

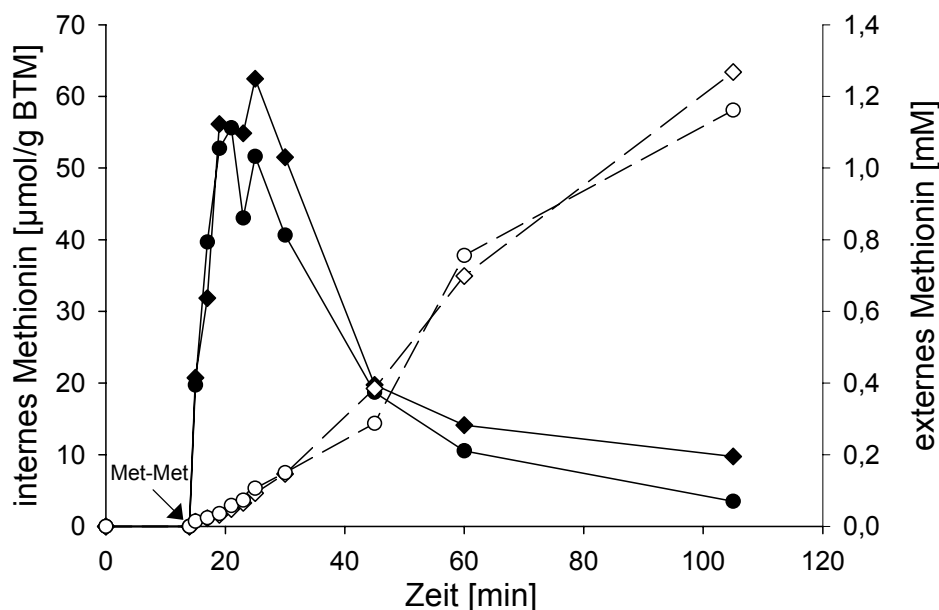
Durch den Chloramphenicol-Einsatz konnte gezeigt werden, dass anscheinend die Expression eines Methioninexporter-kodierenden Gens induziert werden muss. Nur wenn die Induktion erfolgte, war eine deutliche Reduktion des cytoplasmatischen Methioningehaltes sichtbar. Daher sollte mit Hilfe von DNA-Chips das entsprechende Gen identifiziert werden. Eine Kultur ohne Met-Met-Zugabe sollte mit einer Kultur verglichen werden, der das Dipeptid zugesetzt wurde. DEUTENBERG (2003) fand in einem DNA-*microarray*-Ansatz eine erhöhte Expression von putativen Transporterkodierenden Genen. Er nutzte den moderaten Produktionsstamm DD2 für Genexpressionsanalysen. In dem Stamm DD2 sind die beiden Regulatorkodierenden Gene *mcbR* und *hcbR* deletiert und die Methioninbiosynthesegene *metX*, *metE* und *metY* werden konstitutiv überexprimiert (s. Einleitung). Zudem verfügt DD2 über ein *metK*-Allel, dass lediglich eine 65 %-ige MetK-Enzymaktivität bedingt. Während nach einer 24-stündigen Kultivierung im Kulturüberstand kein Methionin nachweisbar war, konnte nach 48h 0,5 g Methionin/l extern nachgewiesen werden (DEUTENBERG, 2003). Das Genexpressionsmuster dieser Zellen verglich er mit dem der Zellen nach 24 h Inkubation. Dabei fand er 3 Transporter-kodierende Leserahmen, die zwischen 1,4- und 3-fach in den Zellen nach 48 h Inkubation stärker exprimiert waren. Demnach könnte im Falle des Produktionsstammes die Regulation der Genexpression für den Export wichtig sein. Es handelte sich bei den 3 Leserahmen um *brnE* sowie *brnF* und um *Cgl0944*. Die Gene *brnE* und *brnF* kodieren gemeinsam ein Isoleucin-Exportsystem (KENNERKNECHT *et al.* 2002), während *Cgl0944* als Multidrug-Exporter annotiert ist. Basierend auf diesen

Informationen wurden sowohl *brnE* als auch *Cgl0944* im Stamm *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  deletiert. Des Weiteren wurde auch eine Überexpression von *brnFE* und *Cgl0944* überprüft.

## 2.7 Cgl0944 ist nicht am Methioninexport beteiligt

Wie erwähnt, war die Beteiligung von *Cgl0944* am Methioninexport möglich. Laut Annotation der NCBI-Datenbank handelt es sich dabei um ein putatives MDR (multidrug resistance)-System. Durch MDR-Systeme sind Bakterien in der Lage, Zellgifte wie z.B. auch Antibiotika aus der Zelle zu transportieren. Diese Systeme sind meist sehr unspezifisch, wodurch *Cgl0944* als interessanter Kandidat erschien.

Im ersten Experiment wurden die Stämme *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  und *C. glutamicum*  $\Delta metNI \Delta Cgl0944$  miteinander verglichen.

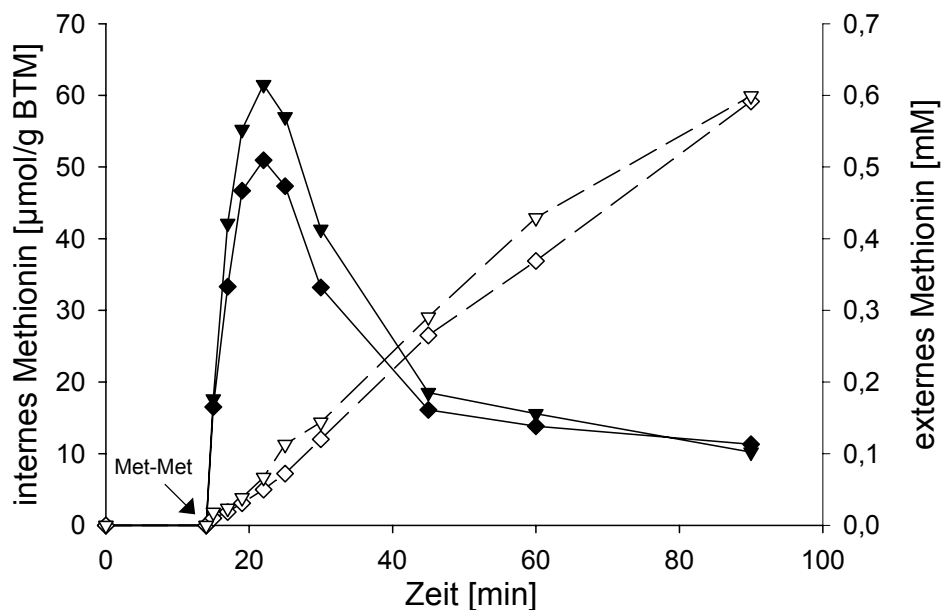


**Abb. 3.21:** Akkumulation von L-Methionin im Cytoplasma (geschlossene Symbole) und im Medium (offene Symbole) der Stämme *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  ( $\blacklozenge$ ,  $\diamond$ ) und *C. glutamicum*  $\Delta metNI \Delta Cgl0944$  ( $\bullet$ ,  $\circ$ ). Es wurden 1 mM Met-Met zugefügt. Zur Inhibition von MetP waren 10 mM Leucin und 4 mM Cystein im Medium. Die Überstände wurden mit Perchlorsäure inkubiert. Die OD lag zwischen 2 und 4.

Abbildung 3.21 zeigt, dass die Deletion von *Cgl0944* keinen Einfluss auf die cytoplasmatische bzw. externe Methioninkonzentration hatte. Im Cytoplasma erreichten beide Stämme innerhalb von 10 min ca. 60  $\mu\text{mol}$  Methionin/g BTM und anschließend fiel die Konzentration wieder stark ab. Ebenfalls war im Medium kein Unterschied auszumachen, da sowohl für *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  als auch für

*C. glutamicum*  $\Delta metNI$   $\Delta Cgl0944$  am Ende des Versuchs ca. 1,2 mM Methionin nachgewiesen werden konnte.

Da die Deletion von *Cgl0944* die Methioninexkretion nicht beeinflusste, wurde in einem weiteren Experiment die Überexpression von *Cgl0944* mittels IPTG-induzierbarem Vektors pXMJ19 überprüft, um die Kompensation des Ausfalls durch Induktion eines weiteren Methioninexportsystems auszuschließen. Es wurden die Stämme *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  pXMJ19 und *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  pXMJ19*Cgl0944* miteinander verglichen.



**Abb. 3.22:** Akkumulation von L-Methionin im Cytoplasma (geschlossene Symbole) und im Medium (offene Symbole) der Stämme *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  pXMJ19 (◆, ◇) und *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  pXMJ19*Cgl0944* (▼, ▽). Es wurden 1 mM Met-Met zugefügt. Die Induktion der Genexpression erfolgte durch 1 mM IPTG. Zur Inhibition von MetP waren 10 mM Leucin und 4 mM Cystein im Medium. Die Überstände wurden mit Perchlorsäure inkubiert. Die OD lag zwischen 3 und 5.

Die Überexpression von *Cgl0944*, wie in Abbildung 3.22 zu erkennen, hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Methioninexkretion. Im Cytoplasma akkumulierte der Stamm *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  pXMJ19 maximal ca. 50 µmol/g BTM, der Stamm *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  pXMJ19*Cgl0944* ca. 60 µmol/g BTM. Nachdem die Konzentration in beiden Fällen das Maximum erreichte, fiel sie wieder ab. Im Medium zeigte sich kein Unterschied im Verlauf des Versuchs. Bei beiden Stämmen war am Ende des Versuchs ca. 0,6 mM Methionin nachweisbar. Somit bewirkte auch die Überexpression von *Cgl0944* keine veränderte Exkretion von Methionin. Damit ist der



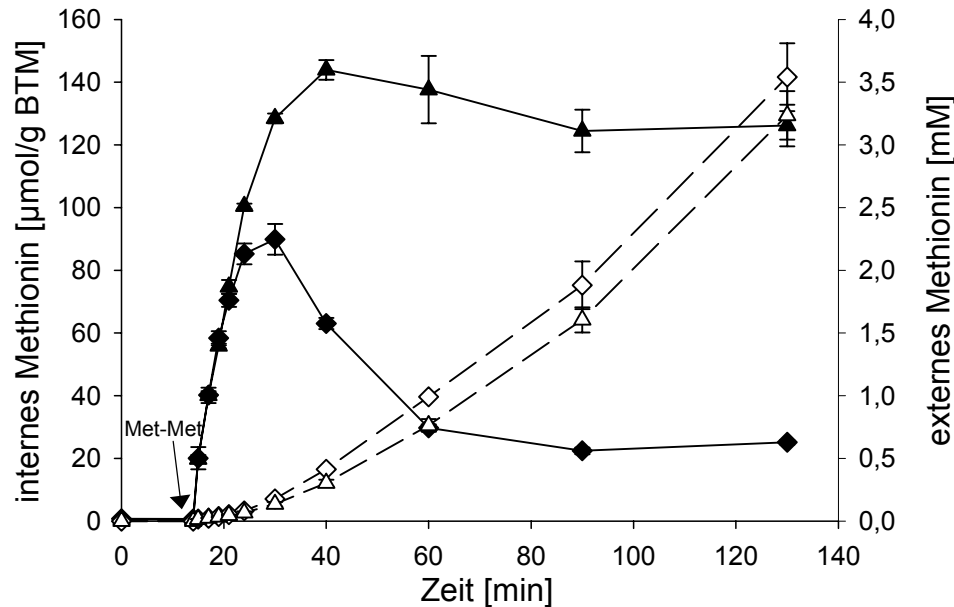
mögliche MDR-Transporter Cgl0944 sehr wahrscheinlich nicht am Methioninexport beteiligt.

## 2.8 Die Gene *brnFE* kodieren einen Methioninexporter

Neben Cgl0944 fielen in dem beschriebenen DNA-*microarray*-Ansatz (s. 2.6) auch die Transporter-kodierenden Gene *brnF* und *brnE* auf (DEUTENBERG, 2003). Die Expression der beiden Gene *brnF* und *brnE* war in dem Methioninproduzenten *C. glutamicum* DD2 erhöht. Die Gene *brnF* und *brnE* kodieren Proteine, die gemeinsam einen Exporter für L-Isoleucin, L-Leucin und L-Valin bilden (KENNERKNECHT *et al.*, 2002). KENNERKNECHT *et al.* (2002) konnten zudem zeigen, dass sich stromaufwärts von *brnFE* ein divergent transkribiertes Gen befindet, welches ein Lrp (Leucline-responsive regulatory protein)-ähnliches Regulator-Protein kodiert. Dieses Gen ist essentiell für den aktiven Isoleucinexport. Eine Deletion des Lrp-ähnlichen Gens führte zum Verlust der Isoleucinexkretion (KENNERKNECHT *et al.*, 2002). Auch wenn BrnFE als Exporter für aliphatische hydrophobe Aminosäuren charakterisiert war, sollte die Beteiligung am Methionintransport analysiert werden, da Methionin wie Isoleucin eine ungeladene Seitenkette besitzt.

### 2.8.1 Methioninexport bei *C. glutamicum* $\Delta$ *metNI* $\Delta$ *brnE*

Für die Untersuchung des Einflusses von BrnFE auf die Methioninexkretion wurden die Stämme *C. glutamicum*  $\Delta$ *metNI* und *C. glutamicum*  $\Delta$ *metNI*  $\Delta$ *brnE* miteinander verglichen.



**Abb. 3.23:** Akkumulation von L-Methionin im Cytoplasma (geschlossene Symbole) und im Medium (offene Symbole) der Stämme *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  ( $\blacklozenge$ ,  $\diamond$ ) und *C. glutamicum*  $\Delta metNI \Delta brnE$  ( $\blacktriangle$ ,  $\triangle$ ). Es wurden 3 mM Met-Met zugefügt. Zur Inhibition von MetP waren 10 mM Leucin und 4 mM Cystein im Medium. Die Überstände wurden mit Perchlorsäure inkubiert. Die OD lag zwischen 3,5 und 5,8.

Wie Abbildung 3.23 zeigt, wich der Verlauf der cytoplasmatischen Methioninakkumulation im Stamm *C. glutamicum*  $\Delta metNI \Delta brnE$  stark von der des Kontrollstammes ab. Während *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  nach 10 min im Cytoplasma ca. 90  $\mu\text{mol}$  Methionin/g BTM erreichte, stieg die Konzentration in *C. glutamicum*  $\Delta metNI \Delta brnE$  auf ca. 140  $\mu\text{mol}$ /g BTM weiter an. Im Gegensatz zum Kontrollstamm, bei dem die cytoplasmatische Konzentration nach Erreichen des Maximums wieder abfiel, verblieb sie im *brnE*-Deletionsstamm bei ca. 130  $\mu\text{mol}$ /g BTM. Die Methionin-Gleichgewichtskonzentration lag bei *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  bei ca. 25  $\mu\text{mol}$ /g BTM, bei *C. glutamicum*  $\Delta metNI \Delta brnE$  bei ca. 130  $\mu\text{mol}$ /g BTM. In beiden Fällen war ein Gleichgewicht zwischen Dipeptidaufnahme und Methioninexkretion erreicht. Im Medium war kein so deutlicher Unterschied zwischen den Stämmen auszumachen. Bis zum Ende des Versuchs akkumulierte *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  ca. 3,6 mM, *C. glutamicum*  $\Delta metNI \Delta brnE$  ca. 3,2 mM Methionin.

Aus dem Experiment konnte geschlossen werden, dass BrnFE Methionin exportiert. Damit ist es das erste beschriebene Methioninexkretionssystem in Prokaryoten. BrnFE ist in der Lage, Methionin mit einer hohen Geschwindigkeit zu transportieren.  $V_{\text{max}}$  war allerdings nicht bestimmbar. Höchstwahrscheinlich stellt die Dipeptidaufnahme den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar, so dass die

Maximalgeschwindigkeit der Exkretion über BrnFE nicht erreicht wurde. So wurde bei einer Erhöhung der Dipeptidkonzentration kein signifikant anderer Verlauf sowohl der cytoplasmatischen als auch externen Methioninkonzentration detektiert (Daten nicht gezeigt).

Bei einem Vergleich des Stammes *C. glutamicum*  $\Delta metNI$   $\Delta brnE$  mit dem Chloramphenicol-behandelten *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  (s. 2.5) fiel auf, dass die cytoplasmatische Akkumulation ähnlich verlief. Anscheinend kam es durch das Chloramphenicol nicht zur Synthese von BrnFE. Demnach muss *brnFE* expressionsreguliert sein (s. 2.8.3).

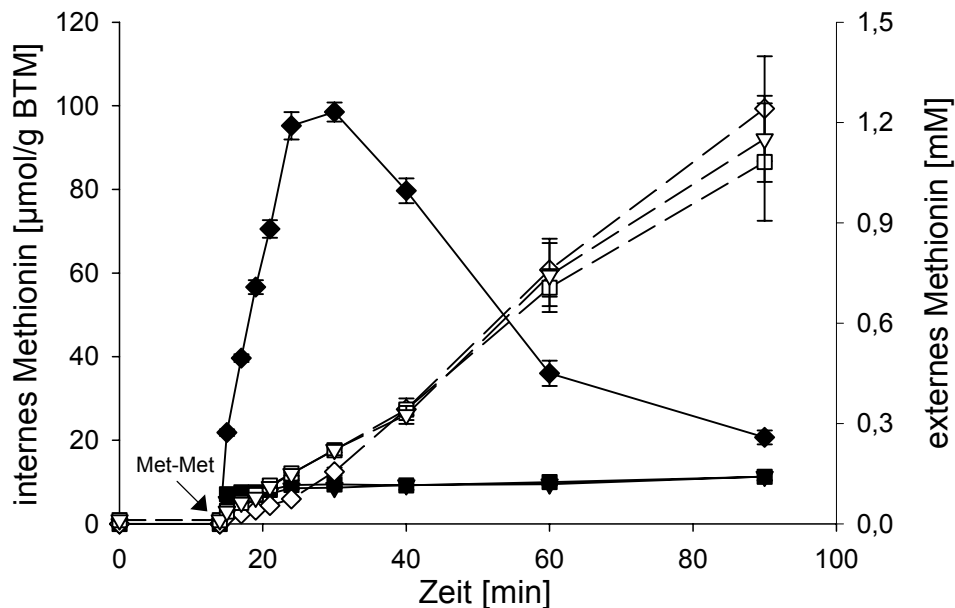
Trotz der Deletion von *brnE* fand offensichtlich noch Exkretion statt. Die neue Gleichgewichtskonzentration des Methionin, die beim Stamm *C. glutamicum*  $\Delta metNI$   $\Delta brnE$  bei 130  $\mu\text{mol/g}$  BTM anstatt bei 25  $\mu\text{mol/g}$  BTM lag, kann nur durch weitere Exkretion erklärt werden. Es konnte gezeigt werden, dass das Met-Met über den gesamten Verlauf des Experimentes kontinuierlich abnahm (2.3) und somit nicht limitierend sein konnte. Zudem erfolgte auch im Medium des Stammes *C. glutamicum*  $\Delta metNI$   $\Delta brnE$  ein weiterer Anstieg der Methioninkonzentration, der größer war als die externe Hydrolyse (s. 2.2).

Die relativ hohe cytoplasmatische Methioninkonzentration schien sich zudem auf das Wachstum von *C. glutamicum*  $\Delta metNI$   $\Delta brnE$  auszuwirken. Ca. 80 min nach der Dipeptidzugabe, also nach Erreichen der Methionin-Gleichgewichtskonzentration von 130  $\mu\text{mol}$  Methionin/g BTM, brach das Wachstum ein. Der Ausgangsstamm dagegen kam in die exponentielle Phase des Wachstums (Daten nicht gezeigt). Offensichtlich bedeutet die relativ hohe cytoplasmatische Methioninkonzentration Stress für die Zelle.

#### **2.8.2 Einfluss der Überexpression von *brnFE* auf den Export**

Es konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *brnE*, das zusammen mit *brnF* einen Isoleucinexporter kodiert, die Methioninexkretion stark beeinflusste (s. 2.8.1). Daher wurde in weiteren Experimenten die Überexpression von *brnFE* in *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  bzw. in *C. glutamicum*  $\Delta metNI$   $\Delta brnE$  für eine Komplementation untersucht. Die drei Stämme *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  pZ8-1, *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  pZ8-1*brnFE* und *C. glutamicum*  $\Delta metNI$   $\Delta brnE$  pZ8-1*brnFE*

wurden miteinander verglichen. pZ8-1 ist ein Vektor, in dem die klonierten Gene unter Kontrolle des *tac*-Promotors konstitutiv exprimiert werden.



**Abb. 3.24:** Akkumulation von L-Methionin im Cytoplasma (geschlossene Symbole) und im Medium (offene Symbole) der Stämme *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  pZ8-1 ( $\blacklozenge$ ,  $\diamond$ ), *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  pZ8-1brnFE ( $\blacksquare$ ,  $\square$ ) und *C. glutamicum*  $\Delta metNI$   $\Delta brnE$  pZ8-1brnFE ( $\blacktriangledown$ ,  $\triangledown$ ). Es wurden 3 mM Met-Met zugefügt. Zur Inhibition von MetP waren 10 mM Leucin und 4 mM Cystein im Medium. Die Überstände wurden mit Perchlorsäure inkubiert. Die OD lag zwischen 3,5 und 4,7.

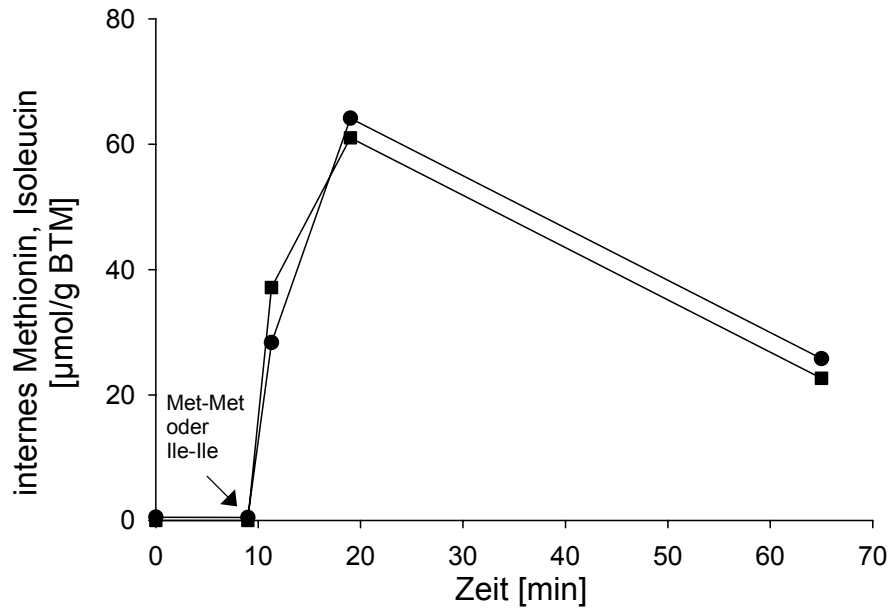
Abbildung 3.24 stellt den Einfluss der *brnFE*-Überexpression auf die Methioninexkretion dar. Der Stamm *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  pZ8-1 akkumulierte Methionin im Cytoplasma wie der Ausgangsstamm (s. Abb. 3.23). Nachdem intern eine Konzentration von ca. 100  $\mu\text{mol/g}$  BTM erreicht war, fiel sie wieder ab. Somit hat der Vektor selbst keinen Einfluss auf die Exkretion. In den Stämmen *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  pZ8-1brnFE und *C. glutamicum*  $\Delta metNI$   $\Delta brnE$  pZ8-1brnFE stieg die Methioninkonzentration im Cytoplasma im Gegensatz dazu nur auf ca. 10  $\mu\text{mol/g}$  BTM an, wonach sich die Konzentration nicht mehr änderte. Daher wurde Methionin, das durch die Dipeptidaufnahme in die Zelle gelangte, sofort exportiert. Im Falle des Stammes *C. glutamicum*  $\Delta metNI$   $\Delta brnE$  pZ8-1brnFE konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von *brnFE* die *brnE*-Deletion komplementierte. Der Stamm *C. glutamicum*  $\Delta metNI$   $\Delta brnE$  pZ8-1 verhielt sich wie der Stamm *C. glutamicum*  $\Delta metNI$   $\Delta brnE$  (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz zum Cytoplasma waren im Medium keine Unterschiede in der Methioninkonzentration zwischen den Stämmen erkennbar, da jedes Mal eine Konzentration von ca. 1,2 mM Methionin erreicht

wurde. Trotz der erhöhten Exkretion durch die *brnFE*-Überexpression war nicht mehr Methionin im Medium, da die Dipeptidaufnahme limitierend war. Es kann über BrnFE nicht mehr exportiert werden, als durch die Dipeptidaufnahme in die Zelle kommt.

#### **2.8.3 Das Gencluster *brnFE* ist expressionsreguliert**

Es konnte dargestellt werden, dass die Deletion von *brnE* den gleichen Phänotyp zeigte wie der Ausgangsstamm, der Chloramphenicol-behandelt war (s. 2.5). Daher war anzunehmen, dass die Genexpression von *brnFE* induziert werden muss. Generell lieferte bereits der Wildtyp *C. glutamicum* ATCC 13032 den Hinweis, dass Genexpression bei der Methioninexkretion eine wesentliche Rolle spielt, da erst 10 min nach der Dipeptidzugabe die Exkretion einsetzte (s. Abb. 3.19).

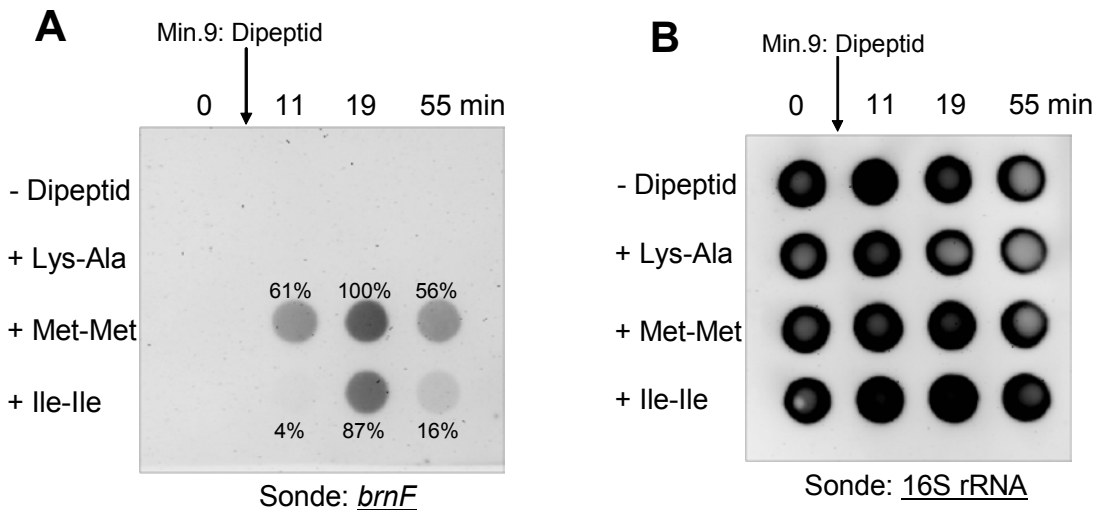
Zur Untersuchung der *brnFE*-Expression wurde der Wildtyp *C. glutamicum* ATCC 13032 verwendet. In vier verschiedenen Ansätzen wurde den Zellen entweder kein Dipeptid oder jeweils 3 mM Lys-Ala, Met-Met bzw. Ile-Ile zugesetzt. KENNERKNECHT *et al.* (2002) konnten zeigen, dass BrnFE ein Isoleucinexporter darstellt, so dass Ile-Ile als Positivkontrolle verwendet wurde. Als Negativkontrolle wurde kein Dipeptid bzw. Lys-Ala, das sehr gut von *C. glutamicum* ATCC 13032 aufgenommen wird (VRLJIC *et al.*, 1996; BELLMANN *et al.*, 2001), zugefügt. Im Medium befanden sich weder Leucin noch Cystein zur Inhibition von MetP. Zu vier Zeitpunkten wurde eine Probe zur Gewinnung der Gesamt-RNA und eine Probe zur Bestimmung der cytoplasmatischen Isoleucin- bzw. Methioninkonzentration genommen.



**Abb. 3.25:** Akkumulation von L-Methionin oder L-Isoleucin im Cytoplasma des Stammes *C. glutamicum* ATCC 13032. Es wurden 3 mM Met-Met (■) oder 3 mM Ile-Ile (●) zugefügt. Die OD lag zwischen 5 und 8.

In Abbildung 3.25 ist zu erkennen, dass es nach der Zugabe von 3 mM Met-Met bzw. Ile-Ile zu einem identischen Anstieg von Isoleucin bzw. Methionin im Cytoplasma nach der Hydrolyse des jeweiligen Dipeptids kam. 11 Minuten nach der Dipeptidzugabe war in beiden Fällen eine Konzentration von ca. 60 µmol/g BTM erreicht, wonach die Isoleucin- bzw. Methioninkonzentration auf ca. 25 µmol/g BTM abfiel. Die Dipeptide Met-Met und Ile-Ile wurden demnach gleichermaßen über die Dipeptidaufnahmesysteme in die Zelle transportiert und auch die Hydrolyse der Dipeptide verlief mit ähnlichen Raten.

Nachdem die Gesamt-RNA der Zellen aus den vier Ansätzen isoliert war, wurde sie in einer Northern-Hybridisierung eingesetzt. Als Sonden dienten eine *antisense*-RNA des Gens *brnF* und ein *antisense*-Fragment der 16S rRNA.



**Abb. 3.26:** RNA-Hybridisierung der Gesamt-RNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 ohne Dipeptid oder mit 3 mM Lys-Ala, 3 mM Ile-Ile bzw. 3 mM Met-Met gefüttert. Es wurden die Sonden *brnF* (A) bzw. 16S rRNA (B) verwendet.

Dot-Blot A in Abbildung 3.26 zeigt deutlich die Induktion der *brnFE*-Expression nach der Zugabe der Dipeptide Met-Met und Ile-Ile. Obwohl eine vergleichbare RNA-Menge aufgetragen war, wie anhand des rechten Blots B mit der 16S rRNA-Sonde zu sehen ist, war ohne Dipeptid bzw. mit dem Dipeptid Lys-Ala keine Expression detektierbar. Die Induktion der *brnFE*-Expression durch Met-Met war weitaus stärker als die durch Ile-Ile, obwohl BrnFE als Isoleucin-Exportsystem beschrieben ist. Bereits 2 Minuten nach der Dipeptidzugabe war ein deutliches Signal beim Dipeptid Met-Met zu erkennen. Dagegen war das Signal bei Ile-Ile äußerst schwach. Wird das stärkste Signal bei Minute 19 mit dem Dipeptid Met-Met als 100 % betrachtet, so war 2 min nach der Dipeptidzugabe von Met-Met die Signalstärke 61 %, nach der Zugabe von Ile-Ile lediglich 4 %. 46 Minuten nach der Dipeptidzugabe (55. min) fand beim Dipeptid Met-Met noch eine starke *brnFE*-Expression statt (57 %), beim Dipeptid Ile-Ile war die Expression zu diesem Zeitpunkt nur noch sehr gering (16 %). Das stärkste Signal ist bei beiden Ansätzen bei Minute 19 zu sehen. Während die Signalstärke bei Met-Met 100 % betrug, lag sie bei Ile-Ile bei 87 %.

In einem weiteren Experiment konnte gezeigt werden, dass der Zusatz von 3 mM Methionin oder 3 mM Isoleucin zum Medium die Expression von *brnFE* nicht induzieren konnte (Daten nicht gezeigt). Die cytoplasmatische Konzentration, die zur Induktion notwendig ist, wurde allein durch die Aufnahme der jeweiligen Aminosäure nicht erreicht.

Obwohl BrnFE als Isoleucinexporter beschrieben ist, induziert Methionin die *brnFE*-Expression stärker und vor allem lang anhaltender als Isoleucin. Höchst wahrscheinlich fungiert dabei das Lrp-ähnliche Protein als Induktor der Expression.

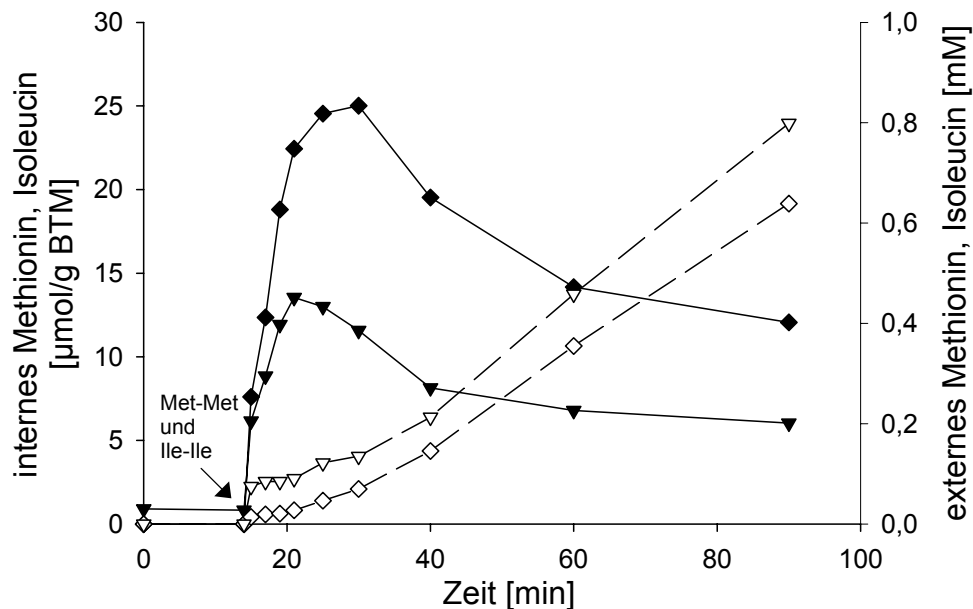
#### **2.9 Isoleucin wird gegenüber Methionin von BrnFE geringfügig bevorzugt**

Es konnte gezeigt werden, dass das als Isoleucin-Exporter charakterisierte BrnFE Methionin transportiert und dass Methionin die Expression von *brnFE* stärker induziert als Isoleucin. Daher wurde untersucht, ob Methionin auch das bevorzugte Substrat von BrnFE ist. Dafür sollten die Zellen im ersten Experiment mit dem Dipeptid Met-Ile beladen werden, um eine äquimolare Menge der jeweiligen Aminosäure im Zellinneren zu erreichen. Wenn BrnFE für eine der beiden Aminosäuren einen viel niedrigeren  $K_m$ -Wert hat, so müsste mehr von dieser im Überstand zu messen sein und die zweite Aminosäure müsste sich im Cytoplasma stärker anreichern. Allerdings wurde das Met-Ile nur sehr schlecht über die Dipeptidaufnahmesysteme in die Zelle transportiert (Daten nicht gezeigt). Isoleucin und Methionin lagen zwar äquimolar vor, jedoch erreichte die Konzentration nur ca. 14  $\mu\text{mol/g}$  BTM. Das cytoplasmatische Methionin bzw. Isoleucin nahm nur sehr langsam zu und die Abnahme nach Erreichen der maximalen Konzentration war auch äußerst gering. Nachdem die Konzentration auf ca. 6  $\mu\text{mol/g}$  BTM abgenommen hatte, erfolgte wieder ein leichter Anstieg. Auch im Medium war kein Unterschied zwischen Isoleucin und Methionin zu messen (Daten nicht gezeigt). Daher wurden Experimente durchgeführt, bei denen der Stamm *C. glutamicum*  $\Delta\text{metNI}$  mit den beiden Dipeptiden Met-Met und Ile-Ile gefüttert wurde. Wie gezeigt werden konnte, werden Met-Met und auch Ile-Ile sehr gut von den Zellen aufgenommen (s. Abb. 3.25). Allerdings musste dafür auch die Hydrolyse des Dipeptids Ile-Ile im Medium bestimmt werden. Dies wurde ebenfalls mit dem Stamm *C. glutamicum*  $\Delta\text{metNI}$   $\Delta\text{brnE}$ , dem der Isoleucin- und Methioninexporter BrnFE fehlt, durchgeführt. Der Versuchsaufbau war analog zur Bestimmung der Hydrolyse von Met-Met (s. 2.2). Dabei zeigte sich, dass 42 % des Dipeptids Ile-Ile im Medium gespalten wird (Daten nicht gezeigt).

Da bekannt war, wie hoch der Anteil der hydrolytischen Spaltung der beiden Dipeptide Met-Met und Ile-Ile am gesamten Abbau ist, konnte eine Bestimmung des bevorzugten Substrates von BrnFE erfolgen. Dafür wurde der Stamm *C. glutamicum*



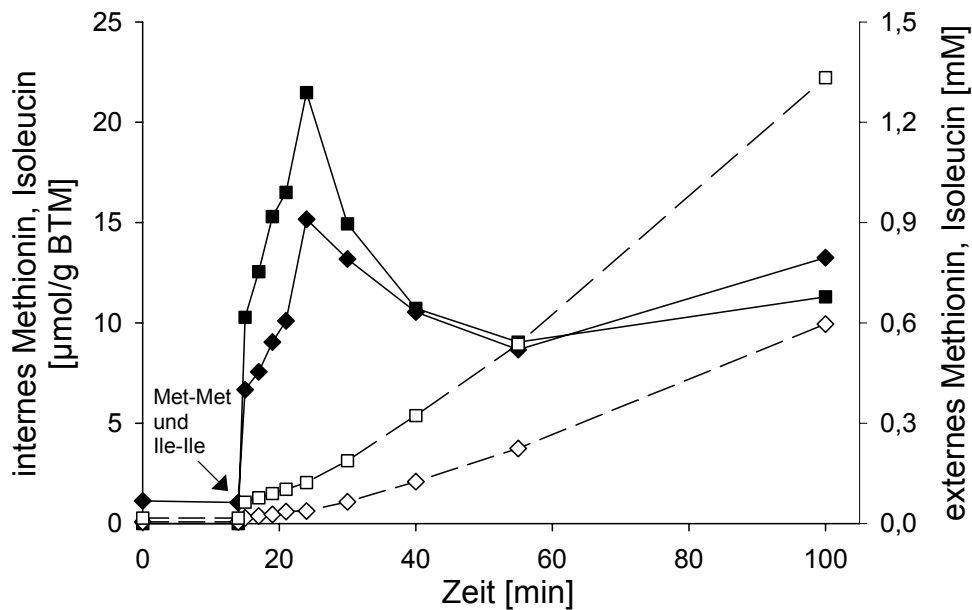
$\Delta metNI$  verwendet. Durch die Verwendung verschiedener Verhältnisse von Met-Met zu Ile-Ile sollte eine nahezu äquimolare Konzentration beider Aminosäuren im Cytoplasma erreicht werden. Über den Anstieg der externen Aminosäurekonzentration, für den BrnFE verantwortlich ist, kann das bevorzugte Substrat bestimmt werden.



**Abb. 3.27:** Akkumulation von L-Methionin (◆, ◇) bzw. L-Isoleucin (▼, ▽) im Cytoplasma (geschlossene Symbole) und im Medium (offene Symbole) des Stammes *C. glutamicum*  $\Delta metNI$ . Es wurden 1 mM Met-Met und 1 mM Ile-Ile zugefügt. Zur Inhibition von MetP waren 10 mM Leucin und 4 mM Cystein im Medium. Die Überstände wurden mit Perchlorsäure inkubiert. Die OD lag zwischen 4,1 und 5,6.

Wurde ein Verhältnis der Dipeptidkonzentrationen von 1 mM zu 1 mM verwendet, wie Abbildung 3.27 zeigt, so stieg die cytoplasmatische Methioninkonzentration stärker an als Isoleucin. 15 Minuten nach der Dipeptidzugabe waren ca. 26  $\mu\text{mol}$  Methionin/g BTM und nur ca. 14  $\mu\text{mol}$  Isoleucin/g BTM erreicht. Damit war das Verhältnis der cytoplasmatischen Methionin- zur Isoleucinkonzentration ungefähr 2 (Met/Ile). Anschließend fielen die Konzentrationen wieder ab. Da im Gegensatz zu den Einzeldipeptidfütterungen, bei denen intern ca. 60  $\mu\text{mol/g}$  BTM erreicht wurden, nur so geringe Mengen akkumulierten, müssen sich die Dipeptide gegenseitig kompetitieren. Trotz der unterschiedlichen cytoplasmatischen Isoleucin- bzw. Methioninakkumulation stieg die Konzentration der beiden Aminosäuren extern nahezu parallel an. Allerdings war von Beginn an stetig mehr Isoleucin im Medium als Methionin. Das könnte auf eine Isoleucin-„Verunreinigung“ im Ile-Ile-Dipeptid zurückzuführen sein. Aufgrund der Ile-Ile-Zugabe war die Rate des Methioninexports

im Vergleich zu vorherigen Versuchen (s. z.B. Abb. 3.21) reduziert, da eine Konkurrenz von Methionin und Isoleucin als Substrate der BrnFE-vermittelten Exkretion vorlag. Wird die Hydrolyse der Dipeptide Met-Met (ca. 12 %) und Ile-Ile (ca. 42 %) berücksichtigt, so stieg die Methioninkonzentration im Medium tatsächlich um ca. 8,8  $\mu\text{M}/\text{min}$  und die Isoleucinkonzentration um ca. 7  $\mu\text{M}/\text{min}$  an. Somit lag das Verhältnis der Exportraten bei ca. 1,3 (Met/Ile).



**Abb. 3.28:** Akkumulation von L-Methionin (◆, ◇) bzw. L-Isoleucin (■, □) im Cytoplasma (geschlossene Symbole) und im Medium (offene Symbole) des Stammes *C. glutamicum*  $\Delta\text{metNI}$ . Es wurden 1 mM Met-Met und 1,3 mM Ile-Ile zugefügt. Zur Inhibition von MetP waren 10 mM Leucin und 4 mM Cystein im Medium. Die Überstände wurden mit Perchlorsäure inkubiert. Die OD lag zwischen 4,4 und 6.

Wurde ein Dipeptidverhältnis von 1 mM Met-Met zu 1,3 mM Ile-Ile verwendet, wie Abbildung 3.28 darstellt, so stieg aufgrund der erhöhten zugesetzten Ile-Ile-Konzentration die cytoplasmatische Isoleucin- geringfügig stärker an als die Methioninkonzentration. Das Verhältnis der cytoplasmatischen Methionin- zur Isoleucinkonzentration betrug ca. 0,9 (Met/Ile). Im Überstand stieg im Vergleich zum Methionin die Isoleucinkonzentration sehr viel stärker an. Wird die Rate der Hydrolyse für das jeweilige Dipeptid berücksichtigt (s.o.), so stieg die Methioninkonzentration im Überstand um ca. 7  $\mu\text{M}/\text{min}$ , während die Isoleucinkonzentration um ca. 9,9  $\mu\text{M}/\text{min}$  zunahm. Das Verhältnis der Exportraten von Methionin und Isoleucin betrug somit ca. 0,7 (Met/Ile).

In einem dritten Experiment wurden 1 mM Met-Met und 1,7 mM Ile-Ile zum Stamm *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  gegeben (Daten nicht gezeigt). Dabei lag das Verhältnis der cytoplasmatischen Methionin- zur Isoleucinkonzentration bei ca. 0,6 (Met/Ile) und das der tatsächlichen Exportraten von Methionin und Isoleucin bei ca. 0,45 (Met/Ile). Vorausgesetzt beide Aminosäuren werden gleichermaßen von BrnFE exportiert, müsste das Verhältnis der tatsächlichen Exportraten gleich dem der cytoplasmatischen Konzentrationen sein. In allen drei Ansätzen lag aber das Verhältnis der tatsächlichen Methionin- und Isoleucin-Exportraten immer etwas unterhalb des Verhältnisses der cytoplasmatischen Methionin- und Isoleucinkonzentration. Somit wird sehr wahrscheinlich Isoleucin von BrnFE geringfügig bevorzugt.

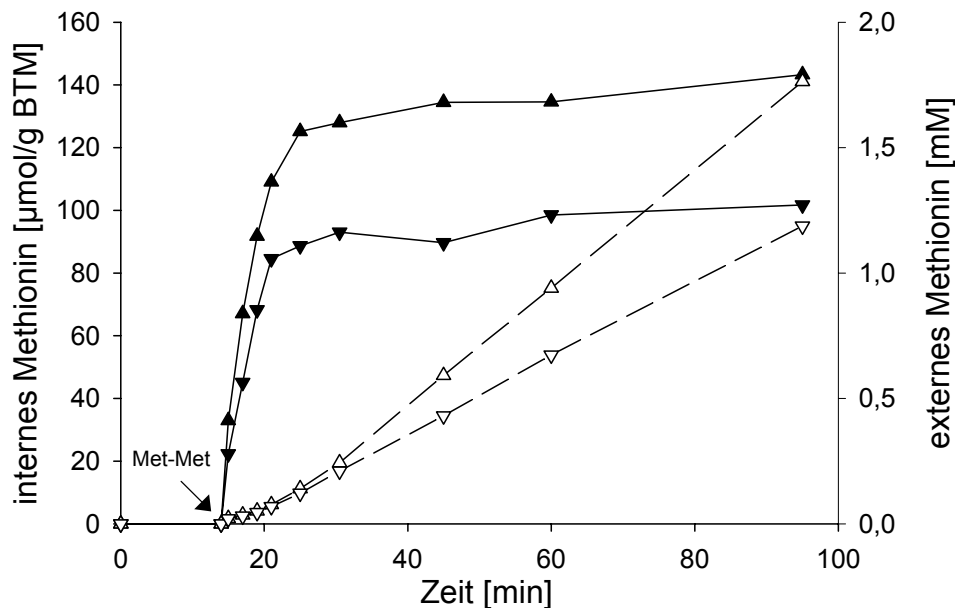
#### **2.10 Biochemische und molekularbiologische Charakterisierung der weiteren Methioninexporter**

Der Isoleucinexporter BrnFE konnte als Exkretionssystem für Methionin identifiziert werden. Wurde *brnFE* deletiert, so stieg die cytoplasmatische Methioninkonzentration nach Zugabe von Met-Met auf ca. 130  $\mu\text{mol/g}$  BTM an. Für einen weiteren Exporter neben BrnFE spricht, dass auch der *brnE*-Deletionsstamm wie der Ausgangsstamm eine Methionin-Gleichgewichtskonzentration einstellte, bei dem die Dipeptidaufnahme im Gleichgewicht mit der Methioninexkretion war. Zudem stieg im Medium die Methioninkonzentration stärker an, als die Hydrolasen Dipeptid spalten. Alternativ zu einem Transporter könnte Methionin auch aufgrund der hohen internen Konzentration per Diffusion aus der Zelle gelangen.

##### **2.10.1 Die Gene der weiteren Methioninexporter sind nicht expressionsreguliert**

Bei der Charakterisierung des Methioninexports mit dem Stamm *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  konnte gezeigt werden, dass offensichtlich ein Teil der Exporter-kodierenden Gene expressionsreguliert ist (s. 2.5). Nach der Identifizierung von BrnFE als Methioninexporter konnte die Regulation der entsprechenden Gene auf Transkriptionsebene dargestellt werden. Da noch mindestens ein weiteres Exkretionssystem vorhanden sein könnte, wurde der Stamm *C. glutamicum*  $\Delta metNI$   $\Delta brnE$  mit 100  $\mu\text{g/ml}$  Chloramphenicol behandelt. Damit sollte überprüft werden, ob

die möglichen weiteren Transporter-kodierenden Gene auch auf der Ebene der Genexpression reguliert sind.



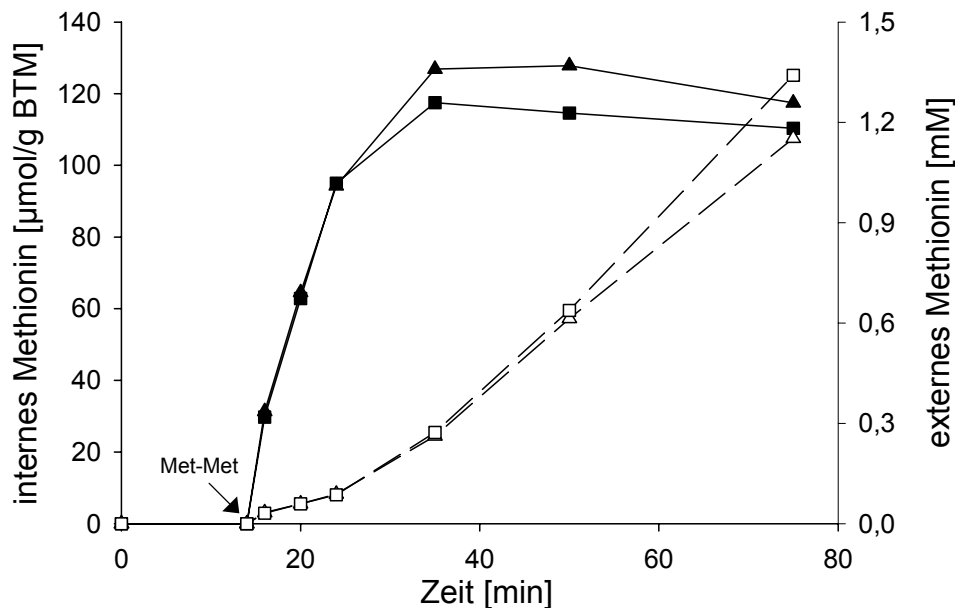
**Abb. 3.29:** Akkumulation von L-Methionin im Cytoplasma (geschlossene Symbole) und im Medium (offene Symbole) des Stammes *C. glutamicum*  $\Delta metNI \Delta brnE$  (▲, △). Zur Inhibition der Proteinbiosynthese wurde einem Ansatz 100  $\mu g/ml$  Chloramphenicol zugesetzt (▼, ▽). Es wurden 3 mM Met-Met zugefügt. Zur Inhibition von MetP waren 10 mM Leucin und 4 mM Cystein im Medium. Die Überstände wurden mit Perchlorsäure inkubiert. Die OD lag zwischen 2,5 und 4,3.

Abbildung 3.29 zeigt eine Differenz der cytoplasmatischen Methioninkonzentration zwischen dem Chloramphenicol-behandelten bzw. unbehandelten Stamm. Dennoch erreichten die Zellen in beiden Ansätzen nach ca. 30 min eine Gleichgewichtskonzentration für Methionin. Bei dem Stamm mit Chloramphenicol lag diese bei ca. 100  $\mu mol/g$  BTM, beim unbehandelten Stamm bei ca. 140  $\mu mol/g$  BTM. Im Medium war dagegen nur eine geringe Differenz von 10 % zwischen dem behandelten bzw. unbehandelten Stamm *C. glutamicum*  $\Delta metNI \Delta brnE$  zu sehen. Die Differenz in der Methioninkonzentration zwischen den beiden Ansätzen könnte zum einen daraus resultieren, dass noch mindestens zwei weitere Transporter am Methioninexport beteiligt sind, wobei einer transkriptionsreguliert ist. Zum anderen könnte aber auch mindestens ein Dipeptidaufnahmesystem transkriptionsreguliert sein. Da von Anfang an nach der Dipeptidzugabe die cytoplasmatische Methioninkonzentration in den Chloramphenicol-behandelten Zellen schwächer anstieg, ist es wahrscheinlicher, dass ein Dipeptidaufnahmesystem auf der Ebene der Genexpression reguliert ist.

Das zweite Transporter-kodierende Gen *Cgl0944*, das bei der Genexpressionsanalyse von DEUTENBERG (2003) auffiel (s. 2.6), kann als Methioninexporter ausgeschlossen werden. Der Chloramphenicol-behandelte *C. glutamicum*  $\Delta metNI$   $\Delta brnE$ -Stamm deutete daraufhin, dass der weitere Methionintransporter nicht auf der Ebene der Genexpression reguliert ist. Letztlich zeigte der Stamm *C. glutamicum*  $\Delta metNI$   $\Delta brnE$   $\Delta Cgl0944$  im Vergleich zu *C. glutamicum*  $\Delta metNI$   $\Delta brnE$  keine veränderte Methioninexkretion (Daten nicht gezeigt).

### 2.10.2 Die weiteren Methioninexporter sind nicht sekundär aktiv

In diesem Teil der Arbeit wurde die Energetik des weiteren Methioninexporters untersucht. Dafür wurde dem Stamm *C. glutamicum*  $\Delta metNI$   $\Delta brnE$  während der Dipeptidfütterung CCCP zugesetzt. Dies bewirkt einen Zusammenbruch des Membranpotentials, so dass sekundäre Transporter inaktiviert sind.



**Abb. 3.30:** Akkumulation von L-Methionin im Cytoplasma (geschlossene Symbole) und im Medium (offene Symbole) des Stammes *C. glutamicum*  $\Delta metNI$   $\Delta brnE$  (▲, △). Zur Hemmung sekundärer Transporter wurde einem Ansatz 20  $\mu M$  CCCP zugesetzt (■, □). Es wurden 3 mM Met-Met zugefügt. Zur Inhibition von MetP waren 10 mM Leucin und 4 mM Cystein im Medium. Die Überstände wurden mit Perchlorsäure inkubiert. Die OD lag zwischen 4 und 5,2.

Wie in Abbildung 3.30 zu erkennen, hatte der Zusatz von 20  $\mu M$  CCCP keinen Einfluss auf die Methioninexkretion. Im Cytoplasma erreichten die Zellen beider

Ansätze ca. 120  $\mu\text{mol/g}$  BTM, im Medium lag die Konzentration am Ende des Versuchs bei ca. 1,2 mM.

Dieses Experiment schloss aus, dass MetP, der sekundäre Methioninimporter, am Export beteiligt ist. Sekundäre Systeme können in Abhängigkeit der (elektro-) chemischen Gradienten der Substrate in beide Richtungen transportieren. Letztlich zeigte auch der Stamm *C. glutamicum*  $\Delta\text{metNI}$   $\Delta\text{brnE}$   $\text{metP}::\text{pK18mob}$  im Vergleich zu *C. glutamicum*  $\Delta\text{metNI}$   $\Delta\text{brnE}$  keine veränderte Methioninexkretion (Daten nicht gezeigt).

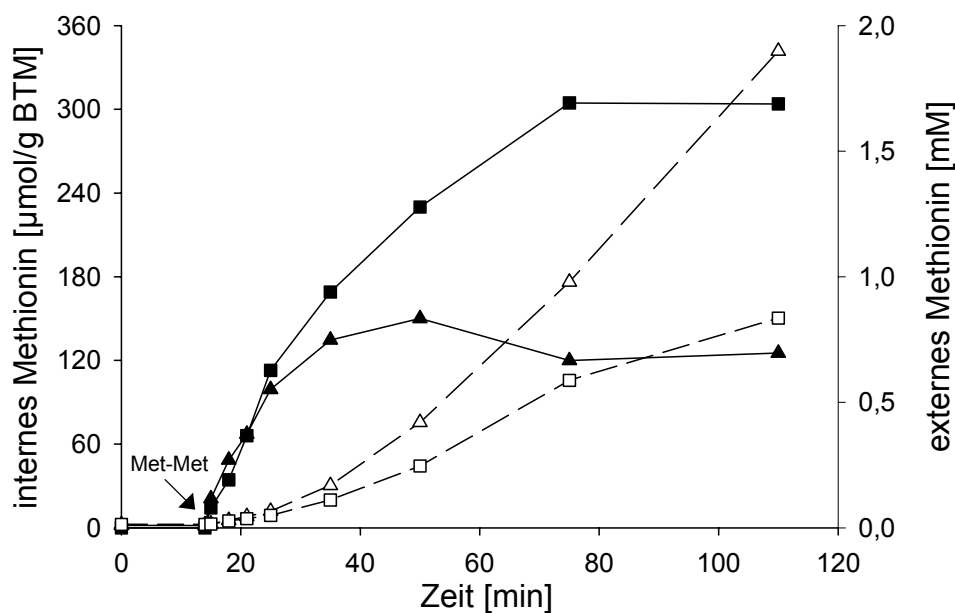
Der weitere Methioninexporter ist somit nicht sekundär aktiv, sondern er muss ein primärer Transporter oder ein Kanal sein.

#### **2.10.3 Die externe Osmolalität beeinflusst die Aktivität der weiteren Methioninexporter**

Neben BrnFE gibt es noch (mindestens) einen weiteren Methioninexporter, da in dem Stamm *C. glutamicum*  $\Delta\text{metNI}$   $\Delta\text{brnE}$  noch Exkretion messbar war. Eine transkriptionelle Regulation des weiteren Exporter-Gens konnte ausgeschlossen werden (s. 2.10.1). Damit muss ein in der Membran befindlicher Transporter vermutlich durch die hohe Methioninkonzentration aktiviert werden. Auch ist dieses weitere System nicht sekundär aktiv. Diese beiden Charakteristika lassen auf ein primäres System oder einen Kanal schließen. Mikroorganismen verfügen über primäre MDR-Transporter, womit sie sich z.B. vor Vergiftungen schützen. Um eine schnelle Antwort auf einen solchen Stress zu gewährleisten, sind diese Systeme meist schon synthetisiert. Kanäle sind ebenfalls möglich, da sie wie MDR-Transporter meist nicht transkriptionell reguliert sind und in der Membran inaktiv vorliegen. Das eingeschränkte Wachstum bei *C. glutamicum*  $\Delta\text{metNI}$   $\Delta\text{brnE}$  nach der Met-Met-Dipeptidzugabe deutete daraufhin, dass ein Stress vorlag und daher ein MDR-Transporter oder ein mechanosensitiver Kanal aktiv wurde. *C. glutamicum* verfügt über mindestens zwei mechanosensitive Kanäle, die Betain und zum Teil auch die Aminosäure Prolin aus der Zelle befördern können (RUFFERT *et al.*, 1997). Primär dienen diese Kanäle der Anpassung an hypoosmotischen Stress, da Ionen über diese Kanäle aus dem Cytoplasma gelangen. Da über mechanosensitive Kanäle viele verschiedene Metabolite die Membran passieren können, erschienen sie als interessante Kandidaten für den zu identifizierenden zweiten Methioninexporter. YggB und MscL sind bereits in *C. glutamicum* identifiziert und charakterisiert. Ein

weiterer mechanosensitiver Kanal wird angenommen, ist aber noch nicht bekannt (NOTTEBROCK *et al.*, 2003). Ist ein mechanosensitiver Kanal am Methioninexport beteiligt, so müsste eine Veränderung der Osmolalität im Medium die Exkretion beeinflussen. Während unter normalen Versuchsbedingungen in Minimalmedium MMI mit einer Osmolalität von ca. 0,3 osmol/kg bei ca. 130  $\mu\text{mol}$  Methionin/g BTM im Cytoplasma Export einsetzte, müsste eine Erhöhung der Osmolalität die Öffnung der mechanosensitiven Kanäle verzögern. Gelangt Methionin über einen oder mehrere mechanosensitive Kanäle ins Medium, so würde Methionin intern stärker akkumulieren, bis die interne Osmolalität die externe wieder übersteigt.

Für dieses Experiment wurde dem Stamm *C. glutamicum*  $\Delta\text{metNI}$   $\Delta\text{brnE}$  zur Erhöhung der Osmolalität zusammen mit dem Dipeptid NaCl zugesetzt. Die NaCl-Konzentration betrug 300 mM. Die Osmolalität erhöhte sich dadurch von ca. 0,3 auf ca. 0,9 osmol/kg.



**Abb. 3.31:** Akkumulation von L-Methionin im Cytoplasma (geschlossene Symbole) und im Medium (offene Symbole) des Stammes *C. glutamicum*  $\Delta\text{metNI}$   $\Delta\text{brnE}$  (▲, △). Einem Ansatz war 300 mM NaCl zur Erhöhung der externen Osmolalität zugesetzt (■, □). Es wurden 3 mM Met-Met zugefügt. Zur Inhibition von MetP waren 10 mM Leucin und 4 mM Cystein im Medium. Die Überstände wurden mit Perchlorsäure inkubiert. Die OD lag zwischen 3,8 und 5,5.

Abbildung 3.31 zeigt die Wirkung von NaCl auf die interne Methioninkonzentration. In dem Ansatz ohne Salz erreichten die Zellen im Cytoplasma ca. 130  $\mu\text{mol}$  Methionin/g BTM, wonach sich die Methionin-Gleichgewichtskonzentration einstellte. Dagegen stieg in den Ansätzen mit NaCl die Methioninkonzentration weitaus stärker an, so dass am Ende des Versuchs ca. 300  $\mu\text{mol}$  Methionin/g BTM erreicht war.

Anschließend änderte sich die Konzentration nicht mehr. Analog zur cytoplasmatischen Konzentration war der Anstieg des Methionins im Medium ebenfalls verändert. Ohne den Salzzusatz wurde eine Konzentration von ca. 1,9 mM bei Minute 110 erreicht. Wurde NaCl zu Beginn des Versuchs hinzugefügt, war der Anstieg stark verringert, wodurch eine Konzentration von nur 0,8 mM nachgewiesen werden konnte. Damit reduzierte eine Erhöhung der Osmolalität von ca. 0,3 auf ca. 0,9 osmol/kg im Medium den Export von Methionin erheblich.

Wurde NaCl erst bei Minute 40 zugesetzt, als sich die cytoplasmatische Methionin-Gleichgewichtskonzentration begann einzustellen, stieg die interne Methioninkonzentration sofort weiter an. Eine neue Gleichgewichtskonzentration stellte sich bei ca. 250  $\mu\text{mol/g}$  BTM ein. Damit wirkte NaCl auch kurzfristig auf die cytoplasmatische Methioninakkumulation (Daten nicht gezeigt).

Ein Einfluss der veränderten Osmolalität auf die Dipeptidaufnahmesysteme kann weitgehend ausgeschlossen werden, da die Methioninkonzentration im Cytoplasma in beiden Ansätzen direkt nach der Dipeptidzugabe nahezu identisch anstieg.

Da aber der Zusatz von NaCl zumindest den elektrochemischen  $\text{Na}^+$ -Gradienten beeinflusst, bestand die Möglichkeit, dass dies der Grund für eine veränderte Methioninexkretion sein könnte. Wurde dem Stamm *C. glutamicum*  $\Delta\text{metNI}$   $\Delta\text{brnE}$  statt 300 mM NaCl 600 mM Sorbitol zugefügt, zeigte sich dasselbe Resultat. Die Zellen exkretierten weniger Methionin (Daten nicht gezeigt).

Die mechanosensitiven Kanäle YggB und MscL in *C. glutamicum* konnten bereits identifiziert werden (NOTTEBROCK *et al.*, 2003). Da ein mechanosensitiver Kanal als Methioninexporter angenommen wurde, wurde *yggB* in *C. glutamicum*  $\Delta\text{metNI}$   $\Delta\text{brnE}$  deletiert. Die Deletion von *mscL* war nicht erfolgreich. Der Stamm *C. glutamicum*  $\Delta\text{metNI}$   $\Delta\text{brnE}$   $\Delta\text{yggB}$  zeigte allerdings im Vergleich zu *C. glutamicum*  $\Delta\text{metNI}$   $\Delta\text{brnE}$  keine veränderte Methioninexkretion, so dass YggB als weiterer Methioninexporter ausgeschlossen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

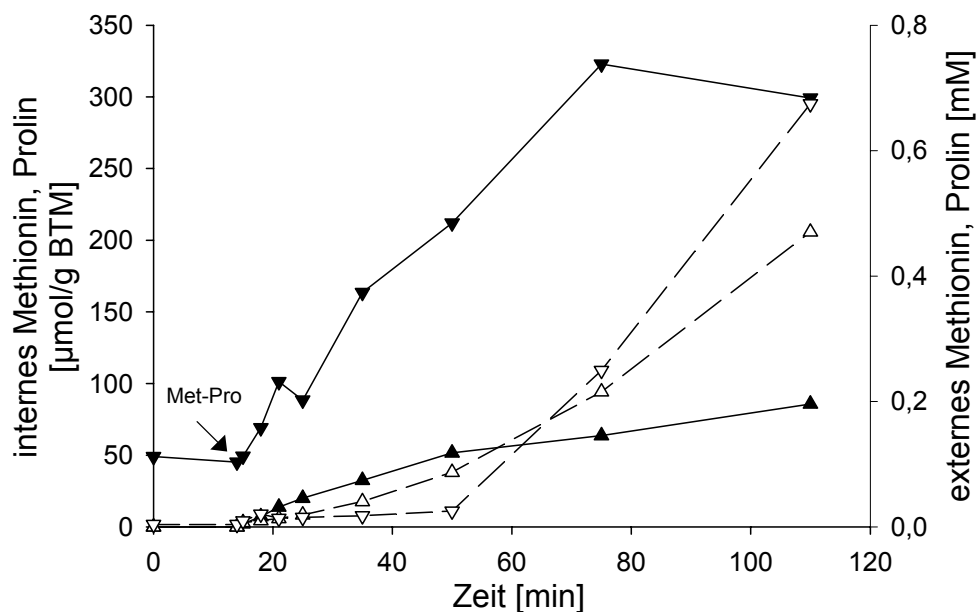
#### **2.10.4 Methionin wird nicht gemeinsam mit Prolin exportiert**

Wie bereits erwähnt, können viele verschiedene Metabolite mechanosensitive Kanäle passieren. Prolin z.B. kann ebenfalls über mindestens einen Kanal die Membran durchqueren. Wird *C. glutamicum* einem hypoosmotischen Schock ausgesetzt, so gelangt das Osmolyt Prolin über einen dieser Kanäle ins Medium.



Prolin sollte unter Standardbedingungen aber nicht exportiert werden (persönliche Mitteilung von S. Morbach). Ist ein mechanosensitiver Kanal am Methioninexport beteiligt, so könnte möglicherweise auch Prolin zusammen mit Methionin exkretiert werden.

Die Spezifität des weiteren Methioninexporters wurde mit dem Dipeptid Met-Pro überprüft. In den Zellen sollte aufgrund des Dipeptids eine äquimolare Konzentration beider Aminosäuren entstehen. Setzt in dem Stamm *C. glutamicum*  $\Delta metNI$   $\Delta brnE$  wegen der hohen cytoplasmatischen Methioninkonzentration die Exkretion ein, so könnte auch Prolin exportiert werden.

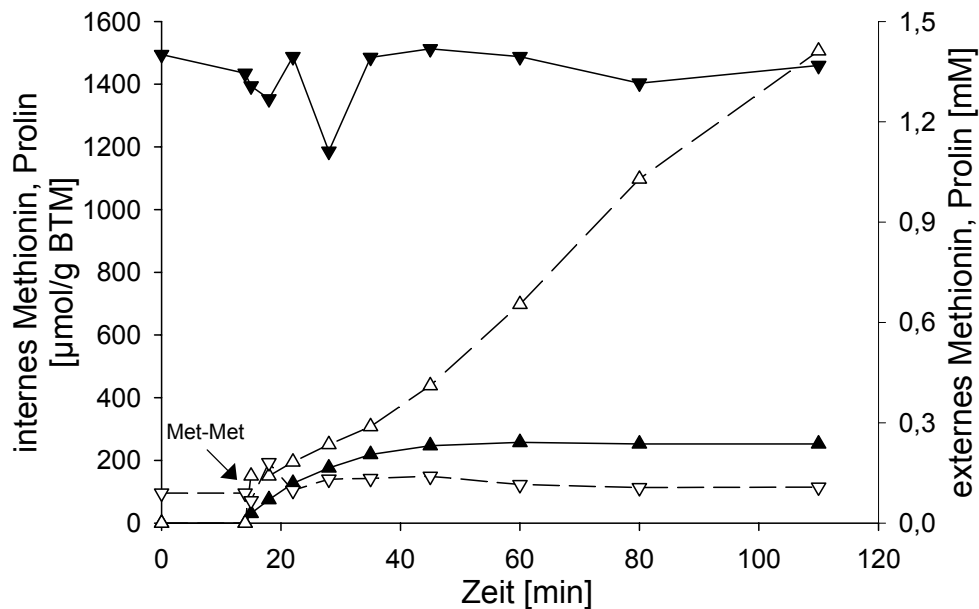


**Abb. 3.32:** Akkumulation von L-Methionin (▲, △) bzw. L-Prolin (▼, ▽) im Cytoplasma (geschlossene Symbole) und im Medium (offene Symbole) des Stammes *C. glutamicum*  $\Delta metNI$   $\Delta brnE$ . Es wurden 3 mM Met-Pro zugefügt. Zur Inhibition von MetP waren 10 mM Leucin und 4 mM Cystein im Medium. Die Überstände wurden mit Perchlorsäure inkubiert. Die OD lag zwischen 3,8 und 5,8.

Abbildung 3.32 stellt dar, dass die cytoplasmatische Prolinkonzentration stärker anstieg als die Methioninkonzentration. Das kann nur auf eine verstärkte Prolinsynthese oder -aufnahme zurückgeführt werden. Möglicherweise wurde Prolin, das aus der extrazellulären Hydrolyse des Dipeptids resultierte, in die Zellen transportiert. Obwohl offensichtlich die Methioninexkretion 20 min nach der Dipeptidzugabe einsetzte, konnte kaum Prolin im Medium nachgewiesen werden. Erst 30 min nachdem die Methioninexkretion begann, war plötzlich eine steigende Prolinkonzentration im Medium detektierbar. Offensichtlich werden beide Aminosäuren über verschiedene Systeme transportiert.

### III. Ergebnisse

Da dieser Versuch nicht eindeutig zeigen konnte, ob Prolin und Methionin gemeinsam exkretiert werden, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt. Dafür wurde der Stamm *C. glutamicum*  $\Delta metNI \Delta brnE$  über Nacht salzadaptiert, wobei die Osmolalität des Mediums 2,2 statt 0,3 osmol/kg betrug. *C. glutamicum* ist in der Lage, sich dieser Osmolalität anzupassen. Dabei synthetisiert *C. glutamicum* Prolin, so dass eine hohe cytoplasmatische Konzentration vorliegt. So lange die Zellen in diesem Medium wachsen, wird kein Prolin exkretiert. Gelangen Prolin und Methionin über einen gemeinsamen mechanosensitiven Kanal aus der Zelle, müsste nach der Met-Met-Zugabe, sofern unter diesen Bedingungen Methionin exportiert wird, auch die Prolinkonzentration im Medium ansteigen.



**Abb. 3.33:** Akkumulation von L-Methionin (▲, △) bzw. L-Prolin (▼, ▽) im Cytoplasma (geschlossene Symbole) und im Medium (offene Symbole) des Stammes *C. glutamicum*  $\Delta metNI \Delta brnE$ . Die Osmolalität des Mediums betrug 2,2 osmol/kg. Es wurden 3 mM Met-Met zugefügt. Zur Inhibition von MetP waren 10 mM Leucin und 4 mM Cystein im Medium. Die Überstände wurden mit Perchlorsäure inkubiert. Die OD lag zwischen 2,7 und 3,5.

Wie in Abbildung 3.33 zu sehen, weisen die Zellen aufgrund der Salzadaptation eine hohe cytoplasmatische Prolinkonzentration von ca. 1500  $\mu\text{mol/g}$  BTM auf. Dagegen war im Medium fast kein Prolin vorhanden. Wurde Met-Met zugefügt, so stieg im Cytoplasma die Methioninkonzentration auf ca. 200  $\mu\text{mol/g}$  BTM an, womit die Gleichgewichtskonzentration für Methionin in *C. glutamicum*  $\Delta metNI \Delta brnE$  erreicht war. Aufgrund der Methioninexkretion stieg die Konzentration im Medium ebenfalls, so dass am Ende des Versuchs ca. 1,4 mM nachgewiesen werden konnte. Während Methionin exportiert wurde, blieb die Prolinkonzentration im Cytoplasma und im

Medium konstant. Demnach wurde Prolin nicht gemeinsam mit Methionin über einen Kanal ins Medium befördert. Wäre dies der Fall, so müsste vor allem Prolin ins Medium gelangen, da die cytoplasmatische Konzentration ca. 7 Mal höher war als die des Methionins.

#### **2.11 Zusammenfassung der Methioninexkretion in *C. glutamicum***

In diesem Teil der Arbeit konnte der Isoleucin-Exporter BrnFE als Methionintransporter identifiziert werden. Unterhalb einer cytoplasmatischen Methioninkonzentration von ca. 80  $\mu\text{mol/g}$  BTM exportiert hauptsächlich BrnFE. Wird im *brnE*-Deletionsstamm eine Methioninkonzentration von ca. 130  $\mu\text{mol/g}$  BTM erreicht, wird ein weiteres Exkretionssystem aktiv. Während die Genexpression von *brnFE* durch eine steigende cytoplasmatische Methionin- bzw. Isoleucinkonzentration induziert wird, ist das Gen des weiteren Exporters nicht transkriptionsreguliert. BrnFE exportiert sowohl Methionin als auch Isoleucin. Obwohl Methionin die Expression von *brnFE* stärker induziert als Isoleucin, wird Isoleucin von BrnFE geringfügig bevorzugt. Der weitere Methioninexporter ist nicht sekundär aktiv und die externe Osmolalität beeinflusst dessen Aktivität. Die Annahme, dass es sich bei dem weiteren Transporter um einen mechanosensitiver Kanal handelt, konnte nicht bestätigt werden. Der *yggB*-Deletionsstamm, dem der Kanal YggB fehlte, zeigte keine veränderte Exkretion. Zudem werden Methionin und Prolin, das nachweislich über mechanosensitive Kanäle ins Medium befördert wird, nicht gemeinsam exportiert.

### IV. Diskussion

Mikroorganismen werden in einer Vielzahl von biotechnologischen Prozessen verwendet. Für eine effektive Fermentation ist es unerlässlich, die Biosynthese und den Membrantransport des Produktes zu kennen und gegebenenfalls zu manipulieren. Produkte wie vorzugsweise Aminosäuren, aber auch Vitamine, Nukleotide und Antibiotika werden auf diese Weise gewonnen. So werden heute Bakterien der Spezies *C. glutamicum* und *E. coli* vorwiegend zur biotechnologischen Herstellung der Aminosäuren L-Glutamat, L-Lysin, und L-Threonin eingesetzt (HERMANN, 2003). Während L-Glutamat als Geschmacksverstärker dient, werden L-Lysin und L-Threonin in der Futtermittelindustrie angewendet. Die Aminosäure L-Methionin hat ebenfalls eine sehr große Bedeutung in der Tierernährung. Im Gegensatz zu den drei genannten Aminosäuren wird Methionin aber chemisch synthetisiert. Da die Methioninbiosynthese und deren Regulation in dem biotechnologisch relevanten Organismus *C. glutamicum* in den letzten Jahren aufgeklärt werden konnte, wird eine fermentative Produktion möglich (RÜCKERT *et al.*, 2003; REY *et al.*, 2005). Um aber eine hohe Produktivität zu erreichen, muss auch der Methionintransport berücksichtigt werden. Der Export des Methionins ermöglicht eine bessere Trennung der Zellmasse vom Produkt und zudem auch eine höhere Produktivität. Das synthetisierte Methionin wird bei einer hohen Aktivität des Transporters nicht katabolisiert, sondern sofort exportiert und verhindert somit unter Umständen eine Vergiftung der Zellen bzw. eine Repression der Biosynthese. Sind zur gleichen Zeit auch Aufnahmesysteme aktiv, so wird die Produktivität reduziert und aufgrund der unnötigen Energieverschwendung entsteht ein *futile cycle*. Bakterielle Methioninaufnahmesysteme sind bisher in *E. coli*, *B. subtilis*, *S. typhimurium* und *B. linens* bekannt (FERCHICHI *et al.*, 1987; GRUNDY und AYLING, 1992; GÁL *et al.*, 2002; HULLO *et al.*, 2004). Exkretionssysteme wurden weder charakterisiert noch identifiziert. In *C. glutamicum* sind weder Methioninaufnahmesysteme noch Exporter beschrieben. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit sowohl die Methioninaufnahme als auch der –export in diesem Bakterium biochemisch charakterisiert und die entsprechenden Gene identifiziert.

### 1. **Methioninaufnahme in *C. glutamicum***

Die Transportmessungen mit [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]-markiertem L-Methionin zeigten mit Zunahme der Substratkonzentration eine steigende Aufnahmerate in *C. glutamicum* ATCC 13032. Die Aufnahme folgte annähernd einer Michaelis-Menten-Kinetik und sie konnte teilweise durch den Entkoppler CCCP unterbunden werden. Daraus konnte geschlossen werden, dass es sich um einen energieabhängigen Transportprozess handelt. Da im Lineweaver-Burk-Diagramm die reziproken Werte der Aufnahmeraten im Stamm *C. glutamicum* ATCC 13032 mindestens 2 Geraden ergaben und CCCP in erster Linie bei hohen Methioninkonzentrationen seine Wirkung zeigte, müssen mindestens zwei Transportsysteme in *C. glutamicum* an der Methioninaufnahme beteiligt sein. Diese Annahme stimmt mit den Resultaten der Methioninaufnahme von *E. coli* überein. Für diesen Gram-negativen Vertreter konnten ebenfalls zwei verschiedene Aufnahmesysteme charakterisiert werden: das hoch-affine MetD und das niedrig-affine MetP (KADNER, 1974). Zudem ist in *E. coli* das hoch-affine Aufnahmesystem MetD ein primär aktiver ABC-Transporter (KADNER und WINKLER, 1975). Da CCCP bei *C. glutamicum* vor allem bei hohen Methioninkonzentrationen wirkte, wurde angenommen, dass das mittel-affine System sekundär und das hoch-affine primär aktiv ist. Daher wurden die Aufnahmesysteme analog zu *E. coli* auch in *C. glutamicum* MetD und MetP genannt. Durch die Auftragung der Aufnahmeraten in Abhängigkeit von der Substratkonzentration in einem Lineweaver-Burk-Diagramm konnten die  $K_m$ -Werte bzw. die Maximalgeschwindigkeiten ( $V_{\max}$ ) abgeleitet werden. Demnach hätte das hoch-affine Aufnahmesystem MetD in *C. glutamicum* einen  $K_m$  von ca.  $0,25\ \mu\text{M}$  und eine  $V_{\max}$  von ca.  $0,75\ \text{nmol/min (mg TG)}$  und das mittel-affine System MetP einen  $K_m$  von ca.  $23\ \mu\text{M}$  und eine  $V_{\max}$  von ca.  $2,2\ \text{nmol/min (mg TG)}$ . Ein Vergleich der  $K_m$ -Werte bzw.  $V_{\max}$  mit denen von *E. coli* und *S. typhimurium* zeigt übereinstimmende Ergebnisse. Der Methioninimporter MetD bzw. das entsprechende Gencluster konnte in *C. glutamicum* identifiziert werden. Das *E. coli* MetD-Homolog ist in *C. glutamicum* ebenfalls das hoch-affine Aufnahmesystem (GÁL *et al.*, 2002, MERLIN *et al.*, 2002). Der Stamm *C. glutamicum*  $\Delta\text{metNI}$  war nicht mehr in der Lage, bei niedrigen Konzentrationen von unter  $2\ \mu\text{M}$  Methionin zu transportieren. In *C. glutamicum* besteht *metQNI* aus *Cgl0635* (kodiert die putative Permeaseuntereinheit MetI), *Cgl0636* (kodiert das putative ATP-Bindeprotein MetN) und *Cgl0637* (kodiert das putative Substrat-Bindeprotein MetQ). Da die beiden Insertionstämme *C. glutamicum*

*metL::pK18mob* und *metN::pK18mob* bei der Methioninaufnahme den gleichen Phänotyp zeigten, müssen sie dem Gencluster angehören. Die Deletion bzw. Insertion von *metQ* gelang nicht, so dass letztendlich nicht eindeutig geklärt werden konnte, ob dieses Gen zum Transporter MetD gehört. Aufgrund der Ähnlichkeit zum *E. coli*-Protein MetQ ist es aber anzunehmen. Die Einzelmutante *C. glutamicum*  $\Delta metQ$  wäre allerdings sehr interessant, da in *E. coli* neben MetQ ein weiteres periplasmatisches Bindeprotein für die Methioninaufnahme über MetD angenommen wird (MERLIN *et al.*, 2002). Die  $\Delta metQ$ -Mutante erreichte eine höhere Methioninaufnahme im Vergleich zum Stamm *E. coli*  $\Delta metN \Delta metI$ , bei dem das Permease- und ATPase-kodierende Gen deletiert sind. Durch die zusätzliche Deletion von *nlpA* im Stamm *E. coli*  $\Delta metQ$  konnte die Methioninaufnahme weiter reduziert werden (ZHANG *et al.*, 2003). Somit ist NlpA ein alternatives periplasmatisches Bindeprotein für MetD. Sowohl MetQ als auch NlpA aus *E. coli* zeigen eine 28 %ige Identität zum putativen MetQ (Cgl0637) aus *C. glutamicum* (*e. value*:  $1e^{-30}$  bzw.  $7e^{-23}$ ). Während MetQ und NlpA aus *E. coli* eine äußerst hohe Übereinstimmung haben (Identität: 58 %; *e. value*:  $6e^{-90}$ ), gibt es im *C. glutamicum*-Genom kein homologes Protein zu MetQ.

Die Expressionsanalysen mit *C. glutamicum* ATCC 13032 und *C. glutamicum*  $\Delta mcbR$  zeigten, dass das Gencluster *metQNI* durch McbR reprimiert wird. McbR ist der globale Repressor der Methionin- und Cysteinbiosynthese. Während im Wildtyp lediglich eine Basisexpression zu sehen war, fand im *mcbR*-Deletionsstamm eine konstitutiv hohe Expression von *metQNI* statt. REY *et al.* (2005) konnte dieses Resultat mit Hilfe von DNA-*microarrays* bestätigen. Zudem weist die Promotorregion von *metQNI* das konservierte McbR-Bindemotiv auf, das nahezu alle Methioninbiosynthesegene gemein haben. Die Repression des *metQNI*-Genclusters ist verständlich, da es einen hoch-affinen ABC-Transporter kodiert. Für den Transport eines Methioninmoleküls benötigt MetD mindestens ein Molekül ATP. Im Gegensatz zu sekundären Transportsystemen ist dieser Prozess sehr energieaufwendig. Nur wenn es zu einem drastischen Mangel an Methionin bzw. an S-Adenosylhomocystein, dem McbR-Effektormolekül, kommt, wird *metQNI* exprimiert. Die Expression des *metNIQ*-Operon in *E. coli* wird genauso wie in *C. glutamicum* reprimiert (MERLIN *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2003). In der Promotorregion des *E. coli* *metNIQ* befindet sich die Konsensus-MET-Box, an die der Repressor MetJ bindet (GÁL *et al.*, 2002). Genau wie *E. coli* und *S. typhimurium*

verfügt *B. subtilis* über mindestens zwei Methioninaufnahmesysteme (HULLO *et al.*, 2004), wobei das *yusCBA*-Operon ebenfalls einen hoch-affinen ABC-Transporter kodiert. Wie in *E. coli* und auch *C. glutamicum* wird die Expression dieses Gencluster über das in der Promotorregion von *yusCBA* befindliche S-Box-Motiv reprimiert (HULLO *et al.*, 2004). Allerdings bindet kein Repressor an die S-Box, sondern diese Box enthält einen intrinsischen transkriptionellen Terminator.

Die biochemische Charakterisierung des weiteren Methioninaufnahmesystems und letztlich die Identifizierung des entsprechenden Gens zeigten, dass neben MetD in *C. glutamicum* nur noch ein Importer, nämlich MetP, vorhanden ist. Mit Hilfe der Michaelis-Menten-Gleichung fand daher eine Bestimmung der Parameter im Stamm *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  statt. Demnach hat MetP einen  $K_m$  von ca. 88  $\mu M$  und eine  $V_{max}$  von ca. 1,65 nmol/min (mg TG). Die vormals ermittelte Kinetik von MetP anhand des Wildtyps, bei der ein  $K_m$  von ca. 23  $\mu M$  und eine  $V_{max}$  von ca. 2,2 nmol/min (mg TG) abgeleitet wurde, konnte damit präzisiert werden. Ein tatsächlicher  $K_m$ -Wert von 88  $\mu M$  bei MetP liegt deutlich über dem von *E. coli* und *S. typhimurium*, bei denen der  $K_m$  zwischen 20 und 40  $\mu M$  liegt. Dagegen ist die Maximalgeschwindigkeit des mittel-affinen Systems aus *C. glutamicum* nur halb so hoch wie in *E. coli*.

Es konnte gezeigt werden, dass im *C. glutamicum*-Wildtyp CCCP vor allem bei hohen Methioninkonzentrationen wirkte. Daher wurde vermutet, dass das mittel-affine Aufnahmesystem MetP sekundär aktiv ist. Die Methioninaufnahme im *metNI*-Deletionsstamm war abhängig von der NaCl-Konzentration, was die Annahme bestätigte. Wie in *B. linens*, das nur über einen sekundären Transporter verfügt, ist auch MetP in *C. glutamicum*  $Na^+$ -abhängig (FERCHICHI *et al.*, 1987).

Der Zusatz von verschiedenen Aminosäuren zum Stamm *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  während der Methioninaufnahme zeigte, dass L-Threonin, D-Methionin und vor allem L-Alanin, L-Valin, L-Isoleucin, L-Leucin und L-Cystein den Transport über MetP erheblich hemmten. Wurden L-Cystein oder die aliphatischen Aminosäuren L-Valin, L-Isoleucin und L-Leucin im 10-fachen Überschuss zugesetzt, war keine Aufnahme mehr messbar. Dieselbe Inhibition fanden ZHANG *et al.* (2003) im *E. coli*  $\Delta metNIQ$ -Stamm, in dem ausschließlich MetP aktiv sein sollte. Eine deutliche Reduktion der Methioninaufnahme wurde durch den Zusatz von L-Threonin, L-Alanin, L-Valin bzw. L-Leucin erreicht. Ebenso inhibierte auch in *S. typhimurium* ein Überschuss an L-Leucin die Methioninaufnahme im *metD*-Deletionsstamm (AYLING *et al.*, 1979). Da auch umgekehrt die Leucinaufnahme mit Methionin gehemmt werden konnte, wird

ein gemeinsames Aufnahmesystem für Methionin und Leucin diskutiert. Für *C. glutamicum* konnte schließlich auch gezeigt werden, dass im *metNI*-Deletionsstamm die Alaninaufnahme durch Methionin inhibiert wird (persönliche Mitteilung von J. Nettekoven). Durch die Identifikation von *metP* konnte letztlich deutlich gemacht werden, dass MetP neben Methionin auch wesentlich Alanin transportiert. Aufgrund dieser Resultate ist anzunehmen, dass MetP in *C. glutamicum* auch die aliphatischen Aminosäuren transportiert. Allerdings konnte das nicht im Stamm *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  gezeigt werden, da der hauptsächliche Importer BrnQ aktiv ist. Dieses Aufnahmesystem macht den Großteil der Aufnahme der aliphatischen Aminosäuren L-Leucin, L-Isoleucin und L-Valin aus, so dass der mögliche Import von Leucin, Isoleucin bzw. Valin über MetP verdeckt wird. Äußerst ungewöhnlich ist allerdings, dass der  $K_i$ -Wert des Leucins mit ca. 2,3  $\mu M$  deutlich niedriger ist als der  $K_m$ -Wert des Methionins mit 88  $\mu M$ , obwohl nicht MetP sondern BrnQ das Hauptaufnahmesystem für Isoleucin ist. Inwiefern MetP an der Leucinaufnahme beteiligt ist, sollte mit dem Stamm *C. glutamicum*  $\Delta metNI$   $\Delta brnQ$  nachweisbar sein. Ein Methioninüberschuss müsste in diesem Stamm die übrige Leucinaufnahme hemmen. Vorausgesetzt MetP transportiert tatsächlich Leucin, sollte *C. glutamicum*  $\Delta metNI$   $\Delta metP$   $\Delta brnQ$  im Vergleich zu *C. glutamicum*  $\Delta metNI$   $\Delta brnQ$  weniger oder gar kein Leucin mehr aufnehmen können. In dem Konkurrenzexperiment mit *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  konnte zumindest gezeigt werden, dass BrnQ kein Methionin transportiert, da der Methioninzusatz die Leucinaufnahme nicht hemmte. Aufgrund der Identifikation von *metP* konnte dieses Resultat bestätigt werden, da im Stamm *C. glutamicum*  $\Delta metNI$   $\Delta metP$  keine Methioninaufnahme mehr nachgewiesen werden konnte. Neben den aliphatischen Aminosäuren hemmte auch Cystein die Methioninaufnahme über den mittel-affinen Transporter MetP. Dieselbe Inhibition fanden FERCHICHI *et al.* (1987) in *B. linens*, das nur über ein mittel-affines sekundäres Methioninaufnahmesystem verfügt. Möglicherweise ist MetP in *C. glutamicum* auch an der Aufnahme von Cystein beteiligt. Allerdings konnte dies nicht eindeutig gezeigt werden, da das vermeintliche [<sup>35</sup>S]L-Cystein im Wesentlichen nicht aus Cystein bestand. Bei der Konkurrenz der Methioninaufnahme war der  $K_i$ -Wert von ca. 12  $\mu M$  des Inhibitors Cystein niedriger als der  $K_m$ -Wert des Methionins. Da in *C. glutamicum* noch kein Cystein-aufnahmesystem beschrieben ist, könnte MetP somit auch das Haupttransportsystem für Cystein sein, das zusätzlich Methionin, Alanin und die



aliphatischen Aminosäuren importiert. MetP in *C. glutamicum* ist offensichtlich ein höchst interessanter Transporter, da er neben Methionin und Alanin sehr wahrscheinlich auch Leucin und Cystein transportieren kann. Damit hätte dieses Aufnahmesystem ein sehr breites Substratspektrum.

FOLLMANN (2004) konnte zeigen, dass *Cgl1030* den mittel-affinen Transporter MetP kodiert. Trotz der funktionellen Übereinstimmung von MetP aus *C. glutamicum* zu MetP aus *E. coli* gibt es kein homologes Protein (FOLLMANN, 2004). In *C. glutamicum* gehört *metP* weder zum McbR-Regulon (REY *et al.*, 2005) noch ist dessen Genprodukt ähnlich zum S-Methymethioninimporter MmuP aus *E. coli* (THANBICHLER *et al.*, 1999). Es war zu erwarten, dass *metP* nicht Bestandteil des McbR-Regulons ist, denn es würde wenig Sinn machen, wenn zwei Transporter mit unterschiedlichen Affinitäten und Geschwindigkeiten auf dieselben Bedingungen reagieren würden. Der Transport von Methionin über den sekundären Importer MetP ist weitaus weniger energieaufwendig als der Transport über das primäre MetD oder die Biosynthese. Somit wird *metP* höchstwahrscheinlich konstitutiv exprimiert sein.

Aufgrund der Möglichkeit, *metP* zu deletieren, konnte MetD im Stamm *C. glutamicum*  $\Delta metP$  biochemisch charakterisiert werden. MetD hat demnach eine Maximalgeschwindigkeit von ca. 0,7 nmol/min (mg TG) und einen  $K_m$ -Wert von  $< 0,1 \mu M$ . Der  $K_m$ -Wert ist somit deutlich niedriger als der ermittelte Wert im Wildtyp ( $K_m = 0,25 \mu M$ ). Aber ein  $K_m$ -Wert von  $< 0,1 \mu M$  entspricht exakt dem Wert von MetD aus *E. coli*. Die  $V_{max}$  liegt dagegen ein wenig über der des *E. coli* MetD von ca. 0,4 nmol/min (mg TG). Da die L-Methioninaufnahme im Stamm *C. glutamicum*  $\Delta metP$  nicht mit D-Methionin inhibierbar war, transportiert MetD in *C. glutamicum* im Gegensatz zum *E. coli* MetD kein D-Methionin. Damit ist MetD stereospezifisch für L-Methionin.

Der Methionintransport in *C. glutamicum* ist ein gutes Beispiel für eine häufig in Bakterien vorkommende Konstellation von Aminosäureaufnahmesystemen (KRÄMER, 1994). Das primär aktive Aufnahmesysteme MetD hat eine sehr hohe Substrataffinität ( $K_m < 0,1 \mu M$ ) aber eine relativ niedrige Maximalgeschwindigkeit ( $V_{max} = 0,7 \text{ nmol/min (mg TG)}$ ), während für den sekundären Transporter MetP eine niedrigere Affinität ( $K_m = 88 \mu M$ ) und eine höhere Maximalgeschwindigkeit ( $V_{max} = 1,65 \text{ nmol/min (mg TG)}$ ) charakteristisch sind. Dabei wird das weniger affine sekundäre System MetP sehr wahrscheinlich konstitutiv exprimiert, während das

hoch affine primäre System MetD nur im Notfall als *scavenger*-System durch die Aufhebung der McbR-Repression induziert wird.

## 2. **Methioninexkretion in *C. glutamicum***

Mit Hilfe der Dipeptidfütterung, bei der Methionin-haltige Dipeptide zum Ansatz gegeben werden, konnte *C. glutamicum* mit Methionin beladen werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass *C. glutamicum* eine Vielzahl dieser Dipeptide sehr gut aufnehmen kann. Da das Dipeptid Met-Met sehr effizient importiert wurde, wurde im Wesentlichen dieses Dipeptid für die Experimente verwendet. Pro importiertem Met-Met entstehen dabei nach der Hydrolyse im Cytoplasma zwei Moleküle Methionin, wodurch eine bestmögliche Anreicherung von Methionin erzielt werden konnte. Nachdem erst eine Zunahme der Methioninkonzentration nach der Dipeptidzugabe zu beobachten war, fiel sie danach auch wieder ab. Dieser Verlauf deutete bereits auf Export von Methionin hin. Würde die Zelle kein Methionin exportieren können, müsste die cytoplasmatische Methioninkonzentration immer weiter ansteigen. Aber während das Dipeptid im Medium kontinuierlich abnahm, nahm die Methioninkonzentration zu. Da nur ca. 10 – 15 % des Dipeptids durch Membran- oder Zellwand-gebundene Hydrolasen gespalten werden, müssen die restlichen ca. 85 % von der Zelle aufgenommen und als Methionin exportiert werden. Die Methioninbiosynthese bzw. der –katabolismus konnte bei diesen Versuchen weitgehend vernachlässigt werden. Aufgrund der starken cytoplasmatischen Anreicherung von Methionin sollten nahezu alle Gene der Methioninbiosynthese über McbR oder Methionin selbst reprimiert sein (HWANG *et al.*, 2002; REY *et al.*, 2005). Da *C. glutamicum* nur über einen eingeschränkten Aminosäurekatabolismus verfügt (WOHLLEBEN *et al.*, 1993) und zudem *metK*, kodiert die Methionin-Adenosyltransferase, ebenfalls durch McbR reprimiert ist, sollte der Methioninkatabolismus auch keine Rolle spielen. Während die 3 mM Met-Met in dem Experiment vollständig verbraucht wurden, entstanden ca. 5,3 mM Methionin. Die Ausbeute betrug ca. 90 %, so dass demnach nur maximal 10 % von den Zellen verbraucht worden sein konnten. Genauso wie die Methioninbiosynthese bzw. der –katabolismus kann auch die Methioninaufnahme während der Dipeptidfütterung vernachlässigt werden. Es war kein Unterschied zwischen *C. glutamicum* ATCC 13032 und *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  der zudem mit Leucin und Cystein zur Kompetition

von MetP inkubiert wurde, auszumachen. Es war der gleiche Verlauf der Methioninkonzentration im Cytoplasma und im Medium zu sehen. Ein *futile cycle* wie bei der Glutamat- bzw. Tryptophanproduktion mit *C. glutamicum* kommt nicht zustande. Die Deletion von *gltS*, das den sekundären Glutamatimporter kodiert, führte zu einer ca. 10 % höheren Glutamatproduktion (TRÖTSCHHEL *et al.*, 2003), da offensichtlich GltS bereits exkretiertes Glutamat reimportiert. Genauso exkretierte der Stamm, in dem die Gene der Tryptophanimporter deletiert sind, 10 – 20 % mehr Tryptophan als der Ausgangsstamm (IKEDA und KATSUMATA, 1995). Die unterschiedlichen Einflüsse der Aufnahmesysteme auf die Methionin- bzw. Glutamatproduktion sind auf die Maximalgeschwindigkeiten der Importer zurückzuführen. Während der Glutamatimporter GltS eine  $V_{\max}$  von ca. 15 nmol/min (mg TG) aufweist (BURKOVSKI *et al.*, 1996), erreichen MetD und MetP zusammen gerade mal ca. 2,5 nmol/min (mg TG).

Bereits mit dem Stamm *C. glutamicum*  $\Delta metNI$ , dem Chloramphenicol zugesetzt wurde, konnte gezeigt werden, dass scheinbar ein Teil der Transporter-kodierenden Gene transkriptionsreguliert ist. In diesen Zellen erhöhte sich das cytoplasmatische Maximum nach der Dipeptidzugabe auf ca. 100  $\mu\text{mol/g}$  BTM, wonach sich die Konzentration nicht mehr änderte. Offensichtlich wurde dagegen im Chloramphenicol-unbehandelten Stamm innerhalb der ersten 10 min nach Dipeptidzugabe die Expression eines Exporter-kodierenden Gens induziert, da in diesem Fall die cytoplasmatische Konzentration wieder fiel. Durch die Identifikation von BrnFE als Methioninexporter konnte dies bestätigt werden. DEUTENBERG (2003) fand mit Hilfe eines DNA-*microarray*-Ansatzes in einem Methioninproduzenten die erhöhte Expression von zwei putativen Transporter-kodierenden Genen. Zum einen handelte es sich um *Cgl0944*, das einen putativen MDR-Transporter kodiert, und zum anderen um das Gencluster *brnFE*, das einen Isoleucinexporter kodiert (KENNERKNECHT *et al.*, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass *Cgl0944* nicht am Methioninexport beteiligt ist. Weder die Deletion noch die Überexpression von *Cgl0944* im Stamm *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  hatte einen Einfluss auf die Exkretion. Auch die Dreifachmutante *C. glutamicum*  $\Delta metNI \Delta brnE \Delta Cgl0944$  exkretierte genauso wie *C. glutamicum*  $\Delta metNI \Delta brnE$  Methionin. Die Deletion von *brnE* im Stamm *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  dagegen bewirkte eine veränderte Exkretion bzw. cytoplasmatische Akkumulation von Methionin. Anstelle eines Maximums bei ca. 100  $\mu\text{mol/g}$  BTM wurde eines bei ca. 140  $\mu\text{mol/g}$  BTM erreicht. Anschließend

veränderte sich die Konzentration in *C. glutamicum*  $\Delta metNI$   $\Delta brnE$  nicht mehr. Bei dieser Konzentration lag offensichtlich ein neues Gleichgewicht zwischen Dipeptidaufnahme und Methioninexkretion vor. Wird umgekehrt *brnFE* in den Stämmen *C. glutamicum*  $\Delta metNI$  bzw. *C. glutamicum*  $\Delta metNI$   $\Delta brnE$  überexprimiert, so war im Cytoplasma keine maximale Methioninkonzentration von ca. 100  $\mu\text{mol/g}$  BTM zu sehen, sondern es wurde sofort eine Methionin-Gleichgewichtskonzentration bei ca. 10  $\mu\text{mol/g}$  BTM eingestellt. Die Deletion von *brnE* konnte durch die Überexpression komplementiert werden. Da eine Erhöhung oder Verringerung der zugesetzten Dipeptidmenge bzw. die Deletion oder Überexpression der Exporterkodierenden Gene *brnFE* keine Auswirkung auf die extrazelluläre Methioninkonzentration hatte, muss die Dipeptidaufnahme der limitierende Faktor bei diesen Experimenten sein. Damit war es auch nicht möglich, die Maximalgeschwindigkeit von BrnFE zu ermitteln. Diese lag auf jeden Fall sehr viel höher als die Geschwindigkeit der Dipeptidaufnahme, die ca. 0,02 mmol/min (g BTM) betrug.

Der Stamm *C. glutamicum*  $\Delta metNI$   $\Delta brnE$  zeigte den gleichen Phänotyp wie der Chloramphenicol-behandelte Stamm *C. glutamicum*  $\Delta metNI$ . Das deutete daraufhin, dass *brnFE* expressionsreguliert ist. Zudem konnte KENNERKNECHT *et al.* (2002) zeigen, dass ein *upstream* von *brnF* befindliches divergent exprimiertes Lrp-ähnliches Regulatorgen essenziell für den aktiven Isoleucin-Export ist. Wie bereits erwähnt, wurde BrnFE als Isoleucinexporter charakterisiert. Wurde *lrp* deletiert, war kein aktiver Isoleucinexport mehr zu sehen (KENNERKNECHT *et al.*, 2002). Es wurde angenommen, dass Isoleucin der Induktor der Expression ist. Da BrnFE auch Methionin transportiert, sollte auch diese Aminosäure die Expression induzieren, was mit Hilfe eines RNA-Hybridisierungsexperiments belegt werden konnte. Sowohl Methionin als auch Isoleucin induzieren die *brnFE*-Expression nach der Zugabe von Met-Met oder Ile-Ile. In den Kontrollansätzen ohne Dipeptid bzw. mit Lys-Ala war dagegen kein Signal detektierbar. Obwohl die cytoplasmatische Methionin- als auch Isoleucinkonzentration den gleichen Verlauf zeigte, war die Expression von *brnFE* durch Methionin stärker und auch länger induziert als durch Isoleucin, so dass BrnFE möglicherweise in erster Linie ein Methioninexporter darstellt. Daher wurde der Export von Methionin und Isoleucin untersucht, wenn beide in der Zelle vorliegen. Wird eine der beiden Aminosäuren bevorzugt, sollte diese auch eine höhere Konzentration im Medium erreichen. Mit dem Dipeptid Met-Ile konnten die Zellen

nicht ausreichend beladen werden, da im Cytoplasma nur ein äußerst geringer Anstieg erkennbar war. Nachdem beide nur 14  $\mu\text{mol/g}$  BTM erreichten, fiel die Konzentration geringfügig, um dann wieder leicht anzusteigen. Offensichtlich fand keine ausreichende Induktion der *brnFE*-Expression statt, da dieses Dipeptid kaum aufgenommen wurde. Daher wurden verschiedene Verhältnisse von Met-Met und Ile-Ile verwendet. Beide Dipeptide werden sehr effektiv in die Zellen befördert. Wird jeweils das Verhältnis der cytoplasmatischen Methionin- und Isoleucinkonzentration mit dem der tatsächlichen Exportraten der drei Versuche in Bezug gebracht, so zeigte sich eine geringfügige Bevorzugung von Isoleucin durch BrnFE. Die positive Regulation von Aminosäureexporter-kodierenden Genen ist für *C. glutamicum* charakteristisch. Der Lysinexporter über *LysE* ist ebenfalls abhängig von einem transkriptionellen Regulator (VRLJIC *et al.*, 1996). *Upstream* von *lysE* befindet sich das divergent transkribierte Regulatorgen *lysG* (BELLMANN *et al.*, 2001). Die Induktion der *lysE*-Expression über *LysG* benötigt eine hohe intrazelluläre Lysin-, Arginin-, Histidin- bzw. Citrullinkonzentration. Da *C. glutamicum* Lysin nicht abbauen kann, ist der Lysinexport das klassische Beispiel für einen limitierenden Katabolismus (KRÄMER, 1994). Dadurch muss diese Aminosäure exportiert werden, um zellinternen Stress zu vermeiden. Ebenso wird auch bei der Threoninexkretion ein Regulator-Gen, das sich *upstream* von *thrE* befindet, angenommen (SIMIC *et al.*, 2001). Wie die Lysinexkretion ist die Threoninexkretion ebenfalls ein Beispiel des limitierenden Katabolismus.

Der Stamm *C. glutamicum*  $\Delta\text{metNI}$   $\Delta\text{brnE}$  war noch immer in der Lage, Methionin zu exportieren. Im Cytoplasma war eine Methionin-Gleichgewichtskonzentration von ca. 140  $\mu\text{mol/g}$  BTM, bei dem die Dipeptidaufnahme mit der Methioninexkretion im Gleichgewicht ist, nachzuweisen. Das externe Methionin stieg noch immer stärker an, als die Hydrolasen das Dipeptid Met-Met spalten können. Deshalb wurde noch mindestens ein weiteres Methioninexportsystem, „MetT“ genannt, angenommen. Es konnte gezeigt werden, dass diese(s) nicht expressionsreguliert ist, da Chloramphenicol keine Wirkung auf die Exkretion von Methionin im Stamm *C. glutamicum*  $\Delta\text{metNI}$   $\Delta\text{brnE}$  hatte. Die Differenz in der cytoplasmatischen Methioninakkumulation des behandelten im Vergleich zum unbehandelten Stamm ist sehr wahrscheinlich auf eine geringere Dipeptidaufnahme zurückzuführen, da Methionin im Chloramphenicol-behandelten Stamm intern nach der Dipeptidzugabe langsamer anstieg. Für *E. coli* und *S. typhimurium* konnte bereits gezeigt werden,

dass Di- bzw. Tripeptidtransporter-kodierende Gene expressionreguliert sind (ANDREWS und SHORT, 1986; GIBSON *et al.*, 1987; SMITH und PAYNE, 1992). Vorausgesetzt es ist nur ein weiterer Methioninexporter vorhanden, wird das Gen nicht auf der Ebene der Genexpression reguliert. „MetT“ muss bereits synthetisiert sein und wird möglicherweise aufgrund der hohen cytoplasmatischen Methioninkonzentration auf der Ebene der Aktivität reguliert.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der zweite Methioninexporter nicht wie BrnFE sekundär aktiv ist, da das Ionophor CCCP die Exkretion im *brnE*-Deletionsstamm nicht reduzieren konnte. Die Dipeptidaufnahmesysteme sollten durch CCCP ohnehin nicht beeinflussbar sein, da sie in der Regel primär aktiv sind (ANDREWS und SHORT, 1985; TYNKKYNNEN *et al.*, 1993; FOUCAUD *et al.*, 1995). Für den Threoninexport in *C. glutamicum* konnte im Gegensatz zur Methioninexkretion im *brnE*-Deletionsstamm gezeigt werden, dass der Export über ThrE durch den Einsatz von 20  $\mu\text{M}$  CCCP deutlich verringert werden konnte (SIMIC *et al.*, 2001). Der zweite Methioninexporter „MetT“ muss somit entweder primär aktiv, wie MDR-Transporter, oder ein (mechanosensitiver) Kanal sein. Die Gene von MDR-Systemen und auch mechanosensitiven Kanälen sind in der Regel nicht expressionsreguliert und die Genprodukte dienen der schnellen Antwort auf (osmotischen) Stress. Die Tatsache, dass die cytoplasmatische Methioninkonzentration in dem Stamm *C. glutamicum*  $\Delta\text{metNI}$   $\Delta\text{brnE}$  nicht exponentiell anstieg, wie bei einer Michaelis-Menten-Kinetik zu erwarten, deutet auf einen Kanal hin. Für „MetT“ ist eine Bestimmung der kinetischen Parameter mit Hilfe der Michaelis-Menten-Gleichung nicht möglich. Aufgrund der Form des Graphen, der für den Stamm *C. glutamicum*  $\Delta\text{metNI}$   $\Delta\text{brnE}$  bei ca. 140  $\mu\text{mol/g}$  BTM ein extrem schnelles Einstellen der Methionin-Gleichgewichtskonzentration zeigte, wurde geschlossen, dass es sich bei „MetT“ um einen mechanosensitiven Kanal handelt. Die bereits identifizierten Kanäle MscL und YggB dienen der Antwort auf hypoosmotischen Stress (NOTTEBROCK *et al.*, 2003). Da auch Prolin bzw. Betain diese Kanäle passieren können (RUFFERT *et al.*, 1997), sind sie möglicherweise auch am Export von Methionin beteiligt. Daher wurde während der Dipeptidfütterung mit *C. glutamicum*  $\Delta\text{metNI}$   $\Delta\text{brnE}$  die Osmolalität im Medium erhöht. Die mechanosensitive Kanäle MscL und YggB sollten somit sehr viel später öffnen. Durch den Zusatz von NaCl bzw. Sorbitol zur Erhöhung der Osmolalität konnte die Methioninexkretion deutlich reduziert werden. Allerdings wurde auch in diesen

Experimenten sehr spät eine Methionin-Gleichgewichtskonzentration erreicht, die bei ca. 300  $\mu\text{mol/g}$  BTM lag. Aus diesem Befund ergab sich die Vermutung, dass „MetT“ möglicherweise ein mechanosensitiver Kanal ist. Beispielsweise konnte auch gezeigt werden, dass der putative Glutamatexporter in *C. glutamicum* ebenfalls auf eine Veränderung der Osmolalität reagiert. Dabei handelt es sich aber offensichtlich nicht um einen Kanal, da der Glutamatexport von einem Transporter katalysiert wird, der energieabhängig ist (persönliche Mitteilung von R. Krämer). Da die Deletion von *yggB* im Gegensatz zu *mscL* in dem Stamm *C. glutamicum*  $\Delta\text{metNI}$   $\Delta\text{brnE}$  erfolgreich war, wurde die Dreifachmutante mit Met-Met gefüttert, wobei sich allerdings kein Unterschied zeigte. Somit ist YggB nicht der zweite Methioninexporter „MetT“. Um generell einen Einfluss von mechanosensitiven Kanälen auf den Methioninexport zu charakterisieren, wurde der Stamm *C. glutamicum*  $\Delta\text{metNI}$   $\Delta\text{brnE}$  mit Methionin und Prolin beladen. Die Versuch mit dem Dipeptid Met-Pro brachte kein eindeutiges Resultat. Aufgrund der Hydrolyse von Met-Pro im Cytoplasma sollte eine äquimolare Menge von Methionin und Prolin vorliegen. Die Prolinkonzentration stieg allerdings viel stärker an, was auf eine erhöhte Prolinsynthese hindeuten könnte. Allerdings ist der Grund für die gesteigerte Prolinbiosynthese unklar. Daher wurde der Stamm *C. glutamicum*  $\Delta\text{metNI}$   $\Delta\text{brnE}$  in einem NaCl-haltigen Medium auf eine Osmolalität von 2,2 osmol/kg adaptiert, wodurch es zu einer erhöhten Prolinkonzentration aufgrund einer stark gesteigerten Prolinsynthese kommt. Wurde Met-Met zugefügt, erreichte die cytoplasmatische Methioninkonzentration ein Gleichgewicht von ca. 200  $\mu\text{mol/g}$  BTM. Parallel dazu stieg die externe Methioninkonzentration ebenfalls an. Dagegen war weder eine Abnahme der Prolinkonzentration im Cytoplasma noch eine Zunahme von Prolin im Medium nachzuweisen. Somit werden Prolin und Methionin nicht gemeinsam transportiert. Da Prolin über mechanosensitive Kanäle ins Medium gelangt, ist am Export von Methionin ein solcher Kanal möglicherweise nicht beteiligt.

Da nicht endgültig ausgeschlossen werden konnte, dass es sich bei „MetT“ um einen mechanosensitiven Kanal handelt, bleiben die entsprechenden Gene sowie die Gene von putativen primären MDR-Transportern interessante Kandidaten, die den zweiten Methioninexporter kodieren. Eine Transposonmutagenese zur Identifikation des entsprechenden Gens erscheint wenig sinnvoll. Diese Methode konnte für *C. glutamicum* noch nicht reproduzierbar etabliert werden. Auch war FOLLMANN (2004) nicht in der Lage, mit dieser Strategie trotz eines großen Aufwands den

Methioninimporter MetP zu identifizieren. Dagegen konnte FOLLMANN (2004) durch die gezielte Inaktivierung von putativen Na<sup>+</sup>-gekoppelten Aufnahmesystemen MetP identifizieren. Daher erscheint diese Methode am besten geeignet, den zweiten Methioninexporter zu finden. Eine Datenbanksuche lieferte 24 mögliche Gene bzw. Cluster, die einen MDR-Transporter oder einen Kanal kodieren. Diese sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

**Tab. 4.1:** Gene für putative primäre MDR-Transporter bzw. Kanäle in *C. glutamicum*

Cgl-Nummer oder cg-Nummer	Putative Funktion
<i>Cgl0063</i>	putativer Chlorid-Kanal
<i>Cgl0879</i>	MscL, mechanosensitiver Kanal (NOTTEBROCK <i>et al.</i> , 2003)
<i>Cgl0946</i>	ATPase
<i>Cgl0952</i>	ATPase
<i>Cgl0953</i>	ATPase
<i>Cgl0965</i>	Membrandomäne
<i>Cgl 1130</i>	ATPase
<i>Cgl 1147</i>	ATPase
<i>Cgl1148</i>	ATPase
<i>Cgl1432</i>	ATPase
<i>Cgl1433</i>	ATPase
<i>Cgl1455</i>	ATPase
<i>Cgl1456</i>	Membrandomäne
<i>Cgl1524</i>	ATPase
<i>Cgl1525</i>	ATPase
<i>Cgl1567</i>	ATPase
<i>Cgl1568</i>	Membrandomäne
<i>Cgl1687</i>	ATPase
<i>Cgl2019</i>	ATPase
<i>Cgl2056</i>	Membrandomäne
<i>Cgl2057</i>	ATPase
<i>Cgl2077</i>	ATPase
<i>Cgl2078</i>	ATPase
<i>Cgl2587</i>	putatives Kanal-Protein



<i>Cgl2746</i>	Membrandomäne
<i>Cgl2747</i>	ATPase
<i>Cgl3038</i>	ATPase
<i>cg3110</i>	putatives Aquaporin

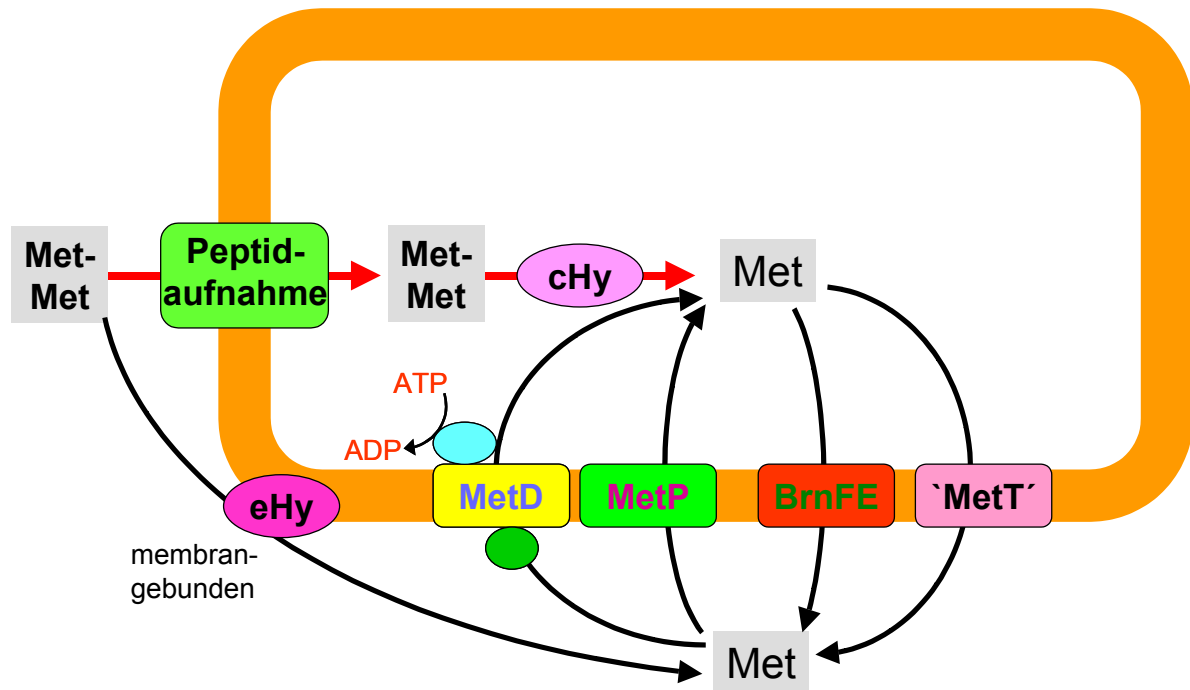
Da primäre MDR-Transporter in der Regel aus einer ATPase und einer Membrandomäne bestehen, sollten die Gene *Cgl1455* und *Cgl1456*, *Cgl1567* und *Cgl1568*, *Cgl2056* und *Cgl2057* bzw. *Cgl2746* und *Cgl2747* ein Cluster bilden. Dem putativen *cg3110* (Annotation der Universität Bielefeld) war keine *Cgl*-Nummer zugeordnet. Durch eine gezielte Inaktivierung dieser Gene bzw. Gencluster in dem Stamm *C. glutamicum*  $\Delta metNI$   $\Delta brnE$  sollte die Beteiligung am Methioninexport nachweisbar sein.

### 3. Extrazelluläre Dipeptidhydrolasen in *C. glutamicum*

Bei der Etablierung der Dipeptidfütterung konnte die Beteiligung einer oder mehrerer membrangebundener extrazellulärer Peptidhydrolase(n) am Abbau der Dipeptide charakterisiert werden. Wurden die Überstände nicht mit Perchlorsäure behandelt, war ein schneller Abbau des Met-Met detektierbar. Zudem stieg die externe Methioninkonzentration in dem Stamm *C. glutamicum*  $\Delta metNI$   $\Delta brnE$  nach der Dipeptidzugabe leicht an, obwohl kein Export von Methionin stattfinden sollte. Die cytoplasmatische Konzentration nahm innerhalb der ersten 12 min sehr stark zu, bis eine Methionin-Gleichgewichtskonzentration erreicht war. Parallel zur Einstellung dieses Gleichgewichts stieg die externe Methioninkonzentration dann deutlich stärker an. Niemals zuvor wurde die Beteiligung von externen membrangebundenen Peptidasen in *C. glutamicum* beschrieben bzw. berücksichtigt. Dabei wurden der Lysinexporter LysE, der Threoninexporter ThrE und der Isoleucinexporter BrnFE mit Hilfe der Dipeptidfütterung charakterisiert (VRLJIC *et al.*, 1996; SIMIC *et al.*, 2001; KENNERKNECHT *et al.*, 2002). Vor allem für das Dipeptid Ile-Ile hat die Hydrolase eine große Relevanz, da diese ca. 42 % des Dipeptids an der Zellwand von *C. glutamicum* spaltet. Periplasmatische bzw. extrazelluläre Peptidasen sind dabei weit verbreitet. Sowohl in Gram-negativen Bakterien wie *E. coli* als auch in Gram-positiven wie *Lactococcus lactis* konnten Peptidasen identifiziert und lokalisiert werden (MURGIER *et al.*, 1976; MARUGG *et al.*, 1995).

#### 4. Modell des Methionintransports und der Dipeptidhydrolyse in *C. glutamicum*

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse sind nochmals vereinfacht in der folgenden Abbildung zusammengefasst.



**Abb. 4.1:** Modell der Transmembranflüsse des Methionins und der Hydrolyse des Dipeptids Met-Met in *C. glutamicum*

In Abbildung 4.1 ist gezeigt, dass das Dipeptid sowohl in die Zellen transportiert als auch von Membran- oder Zellwand-gebundenen extrazellulären Hydrolasen gespalten wird. Dabei werden 10 – 15 % des Dipeptids Met-Met extern hydrolysiert, so dass demnach ca. 85 – 90 % des Met-Met in die Zelle aufgenommen werden. Nachdem das Dipeptid durch cytoplasmatische Hydrolasen gespalten wurde, reicherte sich Methionin in den Zellen an. Aufgrund der Induktion der Expression von *brnFE* durch eine hohe Methioninonzentration wird schließlich Methionin über den entsprechenden Transporter ins Medium exportiert. Ist BrnFE inaktiviert oder würde die Maximalgeschwindigkeit von BrnFE überschritten werden, so dass intern ca. 140  $\mu\text{mol/g}$  BTM vorliegen, wird das weitere Exkretionssystem „MetT“ aktiviert. Im Medium befindliches Methionin wird über den primären Importer MetD und den sekundären MetP in die Zelle transportiert. Die Expression des Genclusters *metQNI* wird durch McbR reprimiert.

## V. Zusammenfassung

*Corynebacterium glutamicum* ist ein bedeutender Mikroorganismus für die biotechnologische Produktion von Aminosäuren. Vor allem L-Glutamat und L-Lysin werden mit diesem Bakterium fermentativ hergestellt. Während L-Glutamat als Geschmacksverstärker dient, wird L-Lysin als Futtermitteladditiv verwendet. Wie L-Lysin findet auch Methionin Verwendung in der Tierernährung. Im Gegensatz zu L-Glutamat und L-Lysin wird Methionin chemisch synthetisiert. Da in den letzten Jahren die Methioninbiosynthese und dessen Regulation in *C. glutamicum* charakterisiert und die entsprechenden Gene identifiziert wurden, wird eine biotechnologische Produktion möglich. Der Transport von L-Methionin über die Zellmembran ist für die mikrobielle Fermentation ebenfalls von großer Bedeutung. Während der Export der Aminosäure die Produktivität erhöht und die Separation vereinfacht, reduziert der (gleichzeitige) Import die Produktivität und Energie wird verschwendet. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit sowohl der Methioninimport als auch –export biochemisch charakterisiert und die entsprechenden Gene identifiziert.

Bei der biochemischen Charakterisierung der L-Methioninaufnahme stellte sich heraus, dass zwei Systeme an der Aufnahme beteiligt sind: ein primär aktiver, hoch-affiner Transporter mit einem  $K_m$  von ca. 0,1  $\mu\text{M}$  und einer  $V_{\text{max}}$  von ca. 0,7 nmol/min (mg TG) und ein sekundärer, mittel-affiner Transporter mit einem  $K_m$  von ca. 88  $\mu\text{M}$  und einer  $V_{\text{max}}$  von ca. 1,65 nmol/min (mg TG). Eine Datenbank-Suche mit dem *E. coli* Methioninaufnahmesystem MetD als Vorlage führte zur Identifizierung des primär aktiven L-Methioninaufnahmesystems in *C. glutamicum*. Die Expression des entsprechenden Genclusters, das aus *Cgl0635* (kodiert MetI), *Cgl0636* (kodiert MetN) und *Cgl0637* (kodiert MetQ) besteht, wird durch den Repressor McbR reguliert. Der sekundäre Methioninimporter, der analog zu *E. coli* MetP genannt wurde, konnte im *metNI*-Deletionsstamm charakterisiert werden. Zum einen ist die Methioninaufnahme über MetP  $\text{Na}^+$ -abhängig und zum anderen durch einen Überschuss an Alanin, Leucin, Isoleucin, Valin und Cystein hemmbar. Dabei hat MetP eine höhere Affinität zu L-Leucin bzw. L-Cystein als zu L-Methionin. Nach der Identifizierung von *metP* (FOLLMANN, 2004) konnte im *metP*-Deletionstamm MetD biochemisch charakterisiert werden. Im Gegensatz zum *E. coli* MetD, das sowohl D- als auch L-Methionin transportiert, ist das *C. glutamicum* MetD stereospezifisch für L-Methionin.

Für die Charakterisierung des Methioninexports wurde ein Beladungssystem mit L-Methionin-haltigen Dipeptiden etabliert. Das Dipeptid wird von der Zelle aufgenommen und im Cytoplasma hydrolysiert. Die Hydrolyse des Dipeptids erfolgte sehr schnell, so dass das Dipeptid im Cytoplasma nicht nachgewiesen werden konnte. Wurde das Dipeptid zugegeben, kam es zu einem sehr starken Anstieg der internen Methioninkonzentration. Anschließend nahm die Konzentration wieder ab, bis ein *steady state* erreicht war, bei dem Dipeptidaufnahme und Methioninexport offensichtlich im Gleichgewicht waren. Parallel dazu nahm die externe Methioninkonzentration doppelt so schnell zu, wie die Dipeptidkonzentration abnahm. Es wurde angenommen, dass die Induktion eines Exportsystems für die Reduktion der internen Methioninkonzentration verantwortlich ist. DNA-*microarray*-Experimente führten zu zwei offenen Leserahmen, die möglicherweise am Methioninexport beteiligt sind (DEUTENBERG, 2003). Das erste kodiert einen putativen *multidrug resistance*-Transporter (MDR) und das zweite ist *brnFE*, das einen Exporter für verzweigt-kettige Aminosäuren kodiert. Das MDR-System ist nicht am Methioninexport beteiligt, da die Deletion bzw. Überexpression des entsprechenden Gens den Methioninexport nicht beeinflusste. Dagegen führte die Deletion von *brnE* zu einem sehr starken Anstieg des internen Methionins und die Überexpression von *brnFE* unterband diesen. BrnFE ist das Haupt-Exportsystem für Methionin und die Regulation von *brnFE* hängt vom internen Methionin ab. Obwohl BrnFE als Isoleucin-Exporter beschrieben war, konnte nur eine geringfügige Bevorzugung des Isoleucins gegenüber Methionin gezeigt werden. Da im *brnE*-Deletionsstamm noch Methioninexport zu sehen war, wurde ein weiterer Exporter angenommen. Dieser ist nicht sekundär aktiv und das entsprechende Gen zudem nicht expressionsreguliert. Da die Exkretion über das weitere System nicht einer Michaelis-Menten-Kinetik folgte und zudem durch die externe Osmolalität beeinflusst wurde, wurde ein mechanosensitiver Kanal vermutet. Der mechanosensitive Kanal YggB ist allerdings nicht am Methionintransport beteiligt. Außerdem erfolgt der Methioninexport nicht zusammen mit Prolin, dass mechanosensitive Kanäle passieren kann, was gegen die Beteiligung eines Kanals spricht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch extrazelluläre, Membran- oder Zellwandgebundene Hydrolasen charakterisiert, die Dipeptide spalten können. Die Hydrolysegeschwindigkeit ist dabei abhängig vom Dipeptid.

## VI. Literaturverzeichnis

**ABE, S., TAKAYAMA, K., KINOSHITA, S. (1967).** Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **13**: 279-301

**ADAMS, J. M., CAPPECHI, M. R. (1966).** N-Formylmethionin-sRNA as the initiator of protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **55**: 147-155

**ANDREWS, J. C., SHORT, S. A. (1985).** Genetic analysis of *Escherichia coli* oligopeptide transport mutants. *J. Bacteriol.* **161**: 484-492

**ANDREWS, J. C., SHORT, S. A. (1986).** *opp-lac* operon fusions and transcriptional regulation of the *Escherichia coli* *trp*-linked oligopeptide permease. *J. Bacteriol.* **165**: 434-442

**AYLING, P. D., MOJICA-A, T., KLOPOTOWSKI, T. (1979).** Methionine transport in *Salmonella typhimurium*: Evidence for at least one low-affinity transport system. *J. Gen. Microbiol.* **114**: 227-246

**BANIK, A. K., MAJUMDAR, S. K. (1974).** Studies on methionine fermentation: Part I – Selection of *Micrococcus glutamicus* & optimum conditions for methionine production. *Indian J. Experimental. Biol.* **12**: 363-365

**BELLMANN, A., VRLJIC, M., PÀTEK, M., SAHM, H., KRÄMER, R., EGGELING, L. (2001).** Expression control and specificity of the basic amino acid exporter LysE of *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology* **147**: 1765-1774

**BRÖER, S., KRÄMER, R. (1990).** Lysine uptake and exchange in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **172**: 7241-7248

**BURKOVSKI, A., WEIL, B., KRÄMER, R. (1996).** Characterization of a secondary uptake system for L-glutamate in *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **136**: 169-173

**CANTONI, G. L. (1953).** S-adenosymethionine: a new intermediate formed enzymatically from L-methionine and ATP. *J. Biol. Chem.* **204**: 403-416

**CHUNG, C. T., NIEMELA, S. L., MILLER, R. H. (1989).** One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 2172-2175

**COTTAM, A. N., AYLING, P. D. (1989).** Genetic studies of mutants in a high-affinity methionine transport system in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Gen. Genet.* **215**: 358-363

**DEUTENBERG, D. (2003).** Genetische Optimierung der Methioninproduktion in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. Diplomarbeit, Universität Bielefeld

**DRIESSEN, A. J. M., HELLINGWERF, K. J., KONINGS, W. N. (1987).** Mechanisms of energy coupling to entry and exit of neutral and branched amino acids in membrane vesicles of *Streptococcus cremoris*. *J. Biol. Chem.* **262**: 12438-12443

**EBBIGHAUSEN, H., WEIL, B., KRÄMER, R. (1989).** Transport of branched-chain amino acids in *Corynebacterium glutamicum*. *Arch. Microbiol.* **151**: 238-244

**EGGELING, L., SAHM, H. (1999).** L-glutamate and L-lysine: traditional products with impetuous developments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 146-153

**EGGELING, L., SAHM, H. (2001).** The cell wall Barrier of *Corynebacterium glutamicum* and amino acid efflux. *J. Biosci. Bioeng.* **92**: 201-213

**EGGELING, L., WATER, P., SAHM, H. (2001).** Amino acids. In: Ratledge, C. and Kristiansen, B. (eds), *Basic Biotechnology*. Cambridge University Press, 2. Auflage, pp. 281-303

**EIKMANN, B. J., THUM-SCHMITZ, N., EGGELING, L., LÜDTKE, K.-U., SAHM, H. (1994).** Nucleotide sequence, expression and transcriptional analysis of the *Corynebacterium glutamicum gltA* gene encoding citrate synthase. *Microbiology* **140**: 1817-1828

**ENEI, H., SHIBAI, H., HIROSE, Y. (2001).** 5'-guanosine monophosphate. In: M. Moo-Young, (ed), *Comprehensive Biotechnology*. Pergamon Press, Oxford. pp. 653-658

**FERCHICHI, M., HEMME, D., NARDI, M. (1987).** Na<sup>+</sup>-stimulated transport of L-methionine in *Brevibacterium linens* CNRZ 918. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2159-2164

**FOLLETTIE, M. T., SHI, H. K., SINSKEY, A. J. (1988).** Organization and regulation of the *Corynebacterium glutamicum hom-thrB* and *thrC* loci. *Mol. Microbiol.* **2**: 53-62

**FOLLMANN, M. (2004).** Aufnahme von Methionin in *Corynebacterium glutamicum*: Identifizierung und Charakterisierung der beteiligten Transportproteine. Diplomarbeit, Universität zu Köln

**FOUCAUD, C., KUNJI, E. R. S., HAGTING, A., RICHARD, J., KONINGS, W. N., DESMAZEAUD, M., POOLMAN, B. (1995).** Specificity of peptide transport systems in *Lactococcus lactis*: Evidence for a third system which transports hydrophobic di- and tripeptides. *J. Bacteriol.* **177**: 4652-4657

**GÁL, J., SZVETNIK, A., SCHNELL, R., KÁLMÁN, M. (2002).** The *metD* D-methionine transporter locus of *Escherichia coli* is an ABC transporter gene cluster. *J. Bacteriol.* **184**: 4930-4932

**GIBSON, M. M., ELLIS, E. M., GRAEME-COOK, K. A., HIGGINS, C. F. (1987).** OmpR and EnvZ are pleiotropic regulatory proteins: positive regulation of the tripeptide permease (*tppB*) of *Salmonella typhimurium*. *Mol. Gen. Genet.* **207**: 120-129

**GRANT, S. G. N., JESSEE, J., BLOOM, F. R., HANAHAN, D. (1990).** Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. USA* **87**: 4645-4649

**GROßMANN, K., HERBSTER, K., MACK, M. (2000).** Rapid cloning of *metK* encoding methionine adenosyltransferase from *Corynebacterium glutamicum* by screening a genomic library on a high density colony-array. *FEMS Microbiol. Lett.* **193**: 99-103

**GRUNDY, C. E., AYLING, P. D. (1992).** Fine structure mapping and complementation studies of the *metD* methionine transport system in *Salmonella typhimurium*. *Genet. Res. Camb.* **60**: 1-6

**GUTMANN, M., HOISCHEN, C., KRÄMER, R. (1992).** Carrier-mediated glutamate secretion by *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation. *Biochim. Biophys. Acta* **1112**: 115-123

**HAYNES, J. A., BRITZ, M. L. (1989).** Electrotransformation of *Brevibacterium lactofermentum*: growth in Tween 80 increases transformation frequencies. *FEMS Microbiol. Lett.* **61**: 329-334

**HERMANN, T. (2003).** Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *J. Biotechnol.* **104**: 155-172

**HEYTLER, P. G. (1980).** Uncouplers of oxidative phosphorylation. *Pharmacol. Ther.* **10**: 461-472

**HOISCHEN, C., KRÄMER, R. (1989).** Evidence for an efflux carrier system involved in the secretion of glutamate by *Corynebacterium glutamicum*. *Arch. Microbiol.* **151**: 342-347

**HULLO, M., F., AUGER, S., DASSA, E., DANCHIN, A., MARTIN-VERSTRAETE, I. (2004).** The *metNPQ* operon of *Bacillus subtilis* encodes an ABC permease transporting methionine sulfoxide, D- and L-methionine. *Res. Microbiol.* **155**: 80-86



**HWANG, B.-J., KIM, Y., KIM, H.-B., HWANG, H.-J., KIM, J.-H., LEE, H.-S. (1999).** Analysis of *Corynebacterium glutamicum* methionine biosynthetic pathway: Isolation and analysis of *metB* encoding cystathionine  $\gamma$ -synthase. *Mol. Cells* **9**: 300-308

**HWANG, B.-J., YEOM, H.-J., KIM, Y., LEE, H.-S. (2002).** *Corynebacterium glutamicum* utilizes both transsulfuration and direct sulfhydrylation pathways for methionine biosynthesis. *J. Bacteriol.* **184**: 1277-1286

**IKEDA, M., KATSUMATA, R. (1995).** Tryptophan production by transport mutants of *Corynebacterium glutamicum*. *Biosc. Biotech. Biochem.* **59**: 1600-1602

**INOUE, H., NOJIMA, H., OKAYAMA, H. (1990).** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28

**JAKOBY, M., NGOUOTO-NKILI, C. E., BURKOVSKI, A. (1999).** Construction and application of new *Corynebacterium glutamicum* vectors. *Biotechnol. Tech.* **13**: 437-441

**KADNER, R. J. (1974).** Transport systems for L-methionine in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **117**: 232-241

**KADNER, R. J. (1977).** Transport and utilization of D-methionine and other methionine sources in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **129**: 207-216

**KADNER, R. J., WATSON, W. J. (1974).** Methionine transport in *Escherichia coli*: Physiological and genetic evidence for two uptake systems. *J. Bacteriol.* **119**: 401-409

**KADNER, R. J., WINKLER, H. H. (1975).** Energy coupling for methionine transport in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **123**: 985-991

**KASE, H., NAKAYAMA, K. (1972).** Production of L-threonine by analog-resistant mutants. *Agric. Biol. Chem.* **36**: 1611-1621

**KASE, H., NAKAYAMA, K. (1975).** L-methionine production by methionine analog-resistant mutants of *Corynebacterium glutamicum*. *Agr. Biol. Chem.* **39**: 153-160

**KENNERKNECHT, N., SAHM, H., YEN, M.-R., PÁTEK, M., SAIER, M. H., 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

**KINOSHITA, S., UDAKA, S., SHIMONO, M. (1957).** Studies on the amino acid fermentation. Part I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **3**: 193-205

**KLINGENBERG, M., PFAFF, E. (1967).** Means of terminating reactions. *Methods Enzymol.* **10**: 680-684

**KRÄMER, R. (1994).** Secretion of amino acids by bacteria: Physiology and mechanisms. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**: 75-94

**KRONEMEYER, W., PEEKHAUS, N., KRÄMER, R., SAHM, H., EGGELING, L. (1995).** Structure of the *gluABCD* cluster encoding the glutamate uptake system of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **177**: 1152-1158

**LEUCHTENBERGER, W. (1996).** Amino acids – technical production and use. In: Rehm, H. J., Reeds, G. (eds) Products of primary metabolism. Biotechnology, Vol 6. VCH, Weinheim, Germany. pp. 455-502

**LIEBL, W., EHRMANN, M., LUDWIG, W., SCHLEIFER, K. (1989).** High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **65**: 45-54

**LINDROTH, P., 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

**LU, S. C. (2000).** S-Adenosylmethionine. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **32**: 391-395

**LÜSSLING, T., MÜLLER, K., SCHREYER, G., THEISSEN, F. (1974).** Verfahren zur Gewinnung von Methionin und Kaliumhydrogencarbonat aus den im Kreislauf geführten Mutterlaugen des Kaliumcarbonat-Methioninverfahrens. *Ger. Patent* 2 421 167

**MARUGG, J. D., MEIJER, W., van KRANENBURG, R., LAVERMAN, P., BRUINENBERG, P. G., de VOS, W. M. (1995).** Medium-dependent regulation of proteinase gene expression in *Lactococcus lactis*: control of transcription initiation by specific dipeptides. *J. Bacteriol.* **177**: 2982-2989

**MERLIN, C., GARDINER, G., DURAND, S., MASTERS, M. (2002).** The *Escherichia coli metD* locus encodes an ABC transporter which includes Abc (MetN), YaeE (MetI), and YaeC (MetQ). *J. Bacteriol.* **184**: 5513-5517

**MINNIKIN, D. E., GOODFELLOW, M., COLLINS, M. D. (1978).** Lipid composition in the classification and identification of coryneform and related taxa, pp 85-159. In: Bousfield, I. J. and Calley, A. G. (eds), Coryneform bacteria. Academic Press, London

**MINNIKIN, D. E. (1982).** In: Ratledge, J. L. (eds) The biology of the mycobacteria. *Academic. Pr.* **1**: 95-184

**MUELLER, J. H. (1922).** A new sulphur-containing amino acid isolated from casein. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **19**: 161-163

**MURGIER, M., PELISSIER, C., LAZDUNSKI, A., LAZDUNSKI, C. (1976).** Existence, localization and regulation of the biosynthesis of aminoendopeptidase in gram-negative bacteria. *Eur. J. Biochem.* **65**: 517-520

**NOTTEBROCK, D., MEYER, U., KRÄMER, R., MORBACH, S. (2003).** Molecular and biochemical characterization of mechanosensitive channels in *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **218**: 305-309

**PALMIERI, L., BERNS, D., KRÄMER, R., EIKMANN, M. (1996).** Threonine diffusion and threonine transport in *Corynebacterium glutamicum* and their role in threonine production. *Arch. Microbiol.* **165**: 48-54

**PARK, S.-D., LEE, J.-Y., KIM, Y., KIM, J.-H., LEE, H.-S. (1998).** Isolation and analysis of *metA*, a methionine biosynthetic gene encoding homoserine acetyltransferase in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Cells* **8**: 286-294

**PHAM, C. B., GALVEZ, F. C. F., PADOLINA, W. G. (1992).** Methionine production by batch fermentation from various carbohydrates. *ASEAN Food Journal* **7**: 34-37

**POLAND, J., AYLING, P. D. (1984).** Methionine and glutamine transport systems in D-methionine utilising revertants of *Salmonella typhimurium*. *Mol. Gen. Genet.* **194**: 219-226

**REY, D. A., PÜHLER, A., 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 sulphur containing amino acids in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* **103**: 51-65

**REY, D. A., NENTWICH, S. S., KOCH, D. J., RÜCKERT, C., PÜHLER, A., TAUCH, A., KALINOWSKI, J. (2005).** The McbR repressor modulated by the effector substance S-adenosylhomocysteine controls directly the transcription of a regulon involved in sulphur metabolism of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Mol. Microbiol.*

**RÜCKERT, C., PÜHLER, A., KALINOWSKI, J. (2003).** Genome-wide analysis of the L-methionine biosynthetic pathway in *Corynebacterium glutamicum* by targeted gene deletion and homologous complementation. *J. Biotechnol.* **104**: 213-228

**RUFFERT, S., LAMBERT, C., PETER, H., WENDISCH, V. F., KRÄMER, R. (1997).** Efflux of compatible solutes in *Corynebacterium glutamicum* mediated by osmoregulated channel activity. *Eur. J. Biochem.* **247**: 572-580

**SAMBROOK, J., FRITSCH, E. E., MANIATIS, T. (1989).** Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

**SANGER, F., NICKLEN, S., COULSEN, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467

**SCHÄFER, A., KALINOWSKI, J., SIMON, R., SEEP-FELDHAUS, A., PÜHLER, A. (1990).** High frequency conjugal plasmid transfer from Gram-negative *Escherichia coli* to various Gram-positive coryneform bacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 1663-1667

**SCHÄFER, A., TAUCH, A., JÄGER, W., KALINOWSKI, J., THIERBACH, G., PÜHLER, A. (1994).** Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73

**SEEP-FELDHAUS, A. H., KALINOWSKI, J., PÜHLER, A. (1991).** Molecular analysis of the *Corynebacterium glutamicum lysI* gene involved in lysine uptake. *Mol. Microbiol.* **5**: 2995-3005

**SHAW, N. A., AYLING, P. D. (1991).** Cloning of high-affinity methionine transport genes from *Salmonella typhimurium*. *FEMS Microbiol. Lett.* **78**: 127-132

**SIMIC, P., SAHM, H., EGGELING, L. (2001).** L-threonin export: use of peptides to identify a new translocator from *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **183**: 5317-5324

**SIMON, R., PRIEFER, U., PÜHLER, A. (1983).** A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1**: 784-791

**SMITH, M. W., PAYNE, J. W. (1992).** Expression of periplasmic binding proteins for peptide transport is subject to negative regulation by phosphate limitation in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **79**: 183-190

**STACKEBRANDT, E., RAINEY, F. A., WARD-RAINEY, N. L. (1997).** Proposal of a new hierarchic classification system, *Actinobacteria classis nov. Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 479-491

**SUZUKI, T., HONDA, H., KATSUMATA, R. (1972).** Production of antimicrobial compounds analogous to chloramphenicol by n-paraffin-grown bacteria. *Agric. Biol. Chem.* **36**: 2223-2228

**TAUCH, A., HERMANN, T., BURKOVSKI, A., KRÄMER, R., PÜHLER, A., KALINOWSKI, J. (1998).** Isoleucine uptake in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 is directed by the *brnQ* gene. *Arch. Microbiol.* **169**: 303-312

**TAUCH, A., GÖTKER, S., PÜHLER, A., KALINOWSKI, J., THIERBACH, G. (2002).** The 27.8-kb R-plasmid pTET3 from *Corynebacterium glutamicum* encodes the aminoglycoside adenylyltransferase gene cassette *aadA9* and the regulated tetracycline efflux system Tet 33 flanked by active copies of the widespread insertion sequence IS6100. *Plasmid* **48**: 117-129

**THANBICHLER, M., NEUHIERL, B., BOCK, A. (1999).** S-methylmethionine metabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**: 662-665

**THIEFFRY, D., SALGADO, H., HUERTA, A. M., COLLADO-VIDES, J. (1998).** Prediction of transcriptional regulatory sites in the complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Bioinformatics* **14**: 391-400

**TRÖTSCHEL, C., KANDIRALI, S., DIAZ-ACHIRICA, P., MEINHARDT, A., MORBACH, S., KRÄMER, R., 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

**TYNKKYNNEN, S., BUIST, G., KUNJI, E., KOK, J., POOLMAN, B., VENEMA, G., HAANDRIKMAN, A. (1993).** Genetic and biochemical characterization of the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **175**: 7523-7532

**UDAKA, S. (1960).** Screening method for microorganisms accumulating metabolites and its use in the isolation of *Micrococcus glutamicus*. *J. Bacteriol.* **79**: 754-755

**VIERA, J., MESSING, J. (1982).** The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic primers. *Gene* **19**: 259-268

**VRLJIC, M., SAHM, H., EGGELING, L. (1996).** A new type of transporter with a type of cellular function: L-lysine export in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Microbiol.* **22**: 815-826

**WEBSTER, R. E., ENGELHARDT, D. L., ZINDER, N. D. (1966).** In vitro protein synthesis: chain initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **55**: 155-161

**WEHRMANN, A., MORAKKABATI, S., KRÄMER, R., SAHM, H., EGGELING, L. (1995).** Functional analysis of sequences adjacent to *dapE* of *Corynebacterium glutamicum* reveals the presence of *aroP*, which encodes the aromatic amino acid transporter. *J. Bacteriol.* **177**: 5991-5993

**WOHLLEBEN, W., MUTH, G., KALINOWSKI, J. (1993).** Genetic engineering of gram positive bacteria. In: Rehm, H. J., Reed, G., Pühler, A., Stadler, P. (eds.) *Biotechnology*, Vol. 2. VCH, Weinheim, Germany. pp. 457-505

**YANISCH-PERRON, C., VIEIRA, J., MESSING, J. (1985).** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119

**ZHANG Z., FEIGE, J. N., CHANG, A. B., ANDERSON, I. J., BRODIANSKI, V. M., VITRESCHAK, A. G., GELFAND, M. S., SAIER, M. H. Jr. (2003).** A transporter of *Escherichia coli* specific for L- and D-methionine is the prototype for a new family within the ABC superfamily. *Arch. Microbiol.* **180**: 88-100

---

## Lebenslauf

**Christian Trötschel**

**Hubertusstr. 9**

**50767 Köln**

Geboren am 18.08.1974 in Leverkusen

Staatsangehörigkeit: deutsch

verheiratet

### Mai 2002 – Juni 2005

Doktorarbeit am Institut für Biochemie der Universität zu Köln in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Krämer, gefördert durch ein Werner-Schwarze-Stipendium der Degussa-Hermann-Schlosser-Stiftung.

Thema: „Methioninaufnahme und -export in *Corynebacterium glutamicum*“.

### Juni 2001 – April 2002

Diplomarbeit am Institut für Biochemie der Universität zu Köln in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Krämer.

Thema: „Glutamatttransport in *Corynebacterium glutamicum*: Charakterisierung eines am Transport beteiligten Membranproteins“.

### Oktober 1996 – Mai 2001

Diplomstudiengang Biologie an der Universität zu Köln mit den Schwerpunkten Biochemie, Tierphysiologie und Genetik

### Oktober 1995 – April 1996

Diplomstudiengang Chemietechnik an der Universität Dortmund; nach einem Semester Wechsel des Studienfaches.

### August 1985 – Juni 1995

Besuch des Lise-Meitner-Gymnasiums in Leverkusen, Abschluss: Abitur

### Juli 1981 – Juli 1985

Besuch der Grundschule Pestalozzistraße, Leverkusen



---

## Erklärung

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

### Teilpublikationen:

**Trötschel, C., Deutenberg, D., Bathe, B., Burkovski, A., Krämer, R. (2005).** Characterization of methionine export in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **187**: im Druck

**Trötschel, C., Burkovski, A., Krämer, R. , Bathe, B. (2004).** Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung rekombinanter Mikroorganismen. Deutsche und Internationale Patentanmeldung 10 2004 009 454.3

Datum: Köln, Mai 2005

Unterschrift:

---

## Danksagung

Herrn Prof. Krämer danke ich herzlichst für das Vertrauen, das er mir entgegenbrachte, für das Bereitstellen des spannenden Themas, die Unterstützung beim Antrag des Stipendiums und vor allem für das Engagement rund um mein Thema. Die vielen anregenden Diskussionen werden unvergesslich bleiben.

Herrn Prof. Dr. U.-I. Flüge danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Ein besonderer Dank gilt Andreas für die Hilfe bei den „alltäglichen“ Problemen mit *Corynebacterium* und *Escherichia*. Zudem danke ich ihm für die engagierte Betreuung, die hilfreichen Diskussionen, für das nicht einfache Korrekturlesen („kölscher Einschlag“) und auch für das leckere Essen, das er zu Weihnachten oder Partys zubereitet hat.

Brigitte Bathe und Natalie Schischka von der Degussa AG danke ich für die tolle Zusammenarbeit und die schönen Treffen.

Der Degussa-Hermann-Schlosser-Stiftung danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Meiner „Laborwelt“ gilt ein besonderer Dank für die vielen schönen Momente und für das entspannte Arbeitsklima. Ich danke Martin für die tolle und erfolgreiche Zusammenarbeit, Astrid für ihre unendliche Hilfsbereitschaft und das Interesse an unseren Themen, Marit für die angenehme Atmosphäre und ihre Ruhe, Jeannine für ihre Unterstützung bei den Transportern und Charles dafür, dass ich englisch sprechen musste. Bei Kay muss ich mich kurz fassen, sonst wird die Seite zu voll. Ihm danke ich für seine stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft (obwohl „seine“ Bakterien grün sind), für sein Bemühen um das gute und „saubere“ Laborklima, für das Korrekturlesen und für die schönen Tage in Pisa (ich hoffe, ich war nicht zu anstrengend). Und ich sitze nicht nur vor dem Computer!

Den Kolleginnen und Kollegen der anderen „Welten“ sowie den Ehemaligen Johannes, Frank und Suna danke ich für das schöne Arbeitsklima, die Geburtstagsleckereien, die guten Diskussionen und das ein oder andere Tässchen Tee.

Allen anderen Freunden und Verwandten danke ich für das Leben neben den *Corynes*.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir mit wohlwollenden Worten den Weg gewiesen haben. Außerdem danke ich ihnen für die Unterstützung während der Schule und des Studiums und für die schönen 28 Jahre zu „Hause“ in Leverkusen.

Mein liebster Dank gilt Yvonne, die immer mit Engelsgeduld meine Laborgeschichten ertragen hat und vermutlich nach 3 Jahren den Methionintransport genauso beherrscht wie ich. Mit ihrer ruhigen Art hat sie für meine Ausgeglichenheit gesorgt und mir gezeigt, dass es auch andere Dinge neben *Corynebacterium* gibt. 1000 Dank!