

**Beta-Alaninaufnahme und Pantothersäureexkretion
durch *Escherichia coli*.**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Frank Schneider
aus Köln

Köln, Mai 2003

Berichterstatter:

Professor Dr. Reinhard Krämer

Professor Dr. Reinhard Sterner

Tag der Disputation: 10. Juli 2003

Für meine liebe Sigrid.

Beta-Alaninaufnahme und Pantothersäureexkretion durch *Escherichia coli*.

In jüngster Zeit wurden erfolgreich biotechnologische Verfahren für die industrielle Produktion von Pantothersäure (Vitamin B₅) mit *Escherichia coli* etabliert. Hierbei werden dem Nährmedium hohe Konzentrationen der Vorstufe β -Alanin (3-Aminopropionsäure) zugesetzt. β -Alanin wird von den Bakterien aufgenommen und auf biochemischem Wege zu Pantothersäure umgesetzt. Diese wird von den Zellen exkretiert und kann dann aus dem Medium isoliert werden. Da die Pantothersäure-Produktion unmittelbar von den zwei Transportprozessen abhängig ist, können diese die Produktivität limitieren. Die beteiligten Transportsysteme waren jedoch bisher noch nicht bekannt. Das vorrangige Ziel dieser Arbeit war deshalb deren Identifikation und Charakterisierung.

Wie gezeigt werden konnte, wird β -Alanin in einem energieabhängigen Prozess durch den Aminosäurecarrier CycA aufgenommen. Das entsprechende Gen aus *E. coli* K12 MG1655 konnte kloniert und in verschiedenen Stämmen überexprimiert werden. Hierdurch ließ sich eine fast sechsfache Steigerung der Aufnahmeaktivität erzielen, und die Expression im Produktionsstamm FV5069 führte zur Verdopplung der spezifischen Produktivität. Die Steigerung der β -Alanin-Aufnahmeaktivität eröffnet somit eventuell neue Möglichkeiten zur weiteren Verbesserung von Produktionsstämmen für Pantothersäure.

Für die Identifikation des Pantothersäure-Exkretionscarriers wurde eine Transposonmutanten-Bank etabliert, deren Klone dann auf ihre Fähigkeit zur Exkretion von Pantothersäure untersucht wurden. Der gesuchte Transporter konnte so zwar nicht gefunden werden, jedoch zeigte die Analyse der Mutanten vielfältige Verbindungen zwischen der Pantothersäure-Biosynthese und anderen Stoffwechselwegen auf. Dabei scheint insbesondere die Bildung von 5,10-Methylentetrahydrofolat eine wichtige Rolle zu spielen.

Beta-alanine-uptake and excretion of pantothenic acid by *Escherichia coli*.

Biotechnological processes for the industrial production of pantothenic acid with *Escherichia coli* have been developed recently. Herein high concentrations of β -alanine (3-propionic acid) have to be added to the culture medium. β -alanine is taken up by the bacteria and biochemically converted to pantothenic acid. The cells excrete the product, which can then be purified from the fermentation broth. Since pantothenic acid production is directly dependent on the two transport processes, their limitation can lower the productivity. Despite of this essential role, the responsible carriers have been unknown so far. Therefore, the predominant goal of this work was their identification and characterization.

This thesis revealed that β -alanine uptake is mediated in an energy-dependent manner by the amino acid carrier CycA. The corresponding gene of *E. coli* K12 MG1655 has been cloned and overexpressed, leading to a nearly six-fold increase of the β -alanine uptake rate. Additionally, overexpression in the production strain FV5069 doubled its specific productivity. The enhancement of β -alanine uptake may therefore be way to further improve pantothenic acid production strains.

To identify the carrier responsible for pantothenic acid excretion a set of transposon mutants has been established and the cells were screened for their ability to excrete pantothenic acid. Although the carrier could not be found by this approach the analysis of the mutants revealed many connections of pantothenic acid biosynthesis and other metabolic pathways. Especially the formation of 5,10-methylenetetrahydrofolate seems to play an important role.

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1 Pantothersäure (Vitamin B₅)	1
1.2 Biosynthese von Pantothersäure und Coenzym A in <i>E. coli</i>	2
1.2.1 Biosynthese von β -Alanin.	2
1.2.2 Biosynthese von Pantoat.	3
1.2.3 Kondensation von β -Alanin und α -Ketoisovalerat zu Pantothersäure.	5
1.2.4 Biosynthese von Coenzym A	5
1.2.5 Transport von Pantothersäure und β -Alanin.	6
1.3 Biotechnologische Produktion von Pantothersäure.	7
1.4 Ziele dieser Arbeit.	8
2. Material und Methoden	9
2.1 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen.....	9
2.1.1 Vollmedien.	9
2.1.2 Minimalmedien.	9
2.1.3 Antibiotika.....	10
2.1.4 Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung	10
2.1.5 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation.	10
2.2 Bakterienstämme und Plasmide.	11
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	12
2.3.1 DNA-Präparation aus <i>E. coli</i>	12
2.3.2 Spaltung und Modifikation von DNA.	13
2.3.3 Klonierung von pTrc- <i>cycA</i>	13
2.3.4 Deletion von <i>gabP</i> und <i>phoA</i> bei <i>E. coli</i> MG1655.	14
2.3.5 Sequenzierung von Plasmid-DNA.	15
2.3.6 Sequenzierung von genomischer DNA.	15
2.4 Biochemische Methoden.	16
2.4.1 Aufnahmemessungen mit [1- ¹⁴ C] β -Alanin.	16

2.4.2	Nichtradioaktive Aufnahmemessungen.	16
2.4.3	Aminosäureanalytik mit Hilfe der HPLC.	17
2.4.4	Berechnung von intrazellulären β -Alanin-Konzentrationen und des Trockengewichtes.....	18
2.4.5	Mikrobiologische Quantifizierung von Pantothensäure.....	18
2.5	Aufbau der <i>TnphoA</i>-Mutantenbank.....	18
2.5.1	Etablierung der Mutantenbank.	18
2.5.2	Guss der Testplatten.	19
2.5.3	<i>Screening</i> der Transposonmutanten („Plattentest“).	19
3.	Ergebnisse	20
3.1	Aufnahme von β-Alanin durch <i>E. coli</i>.....	20
3.1.1	Biochemische Charakterisierung der β -Alanin-Aufnahme.....	20
3.1.2	Bedeutung des GABA-Transporters GabP für die β -Alanin-Aufnahme.	21
3.1.3	LB-Medium vermindert die β -Alanin-Aufnahmeaktivität.....	22
3.1.4	β -Alanin hemmt die Aufnahme von L-Alanin aus LB-Medium.....	24
3.1.5	L-Alanin, Glycin und D-Cycloserin hemmen die Aufnahme von β -Alanin.	25
3.1.6	Die <i>cycA</i> -Mutante CAG12073 nimmt nahezu kein β -Alanin auf.	27
3.1.7	Klonierung und plasmidcodierte Expression von <i>cycA</i> in CAG12073 und MG1655.....	28
3.1.8	Das Plasmid pTrc- <i>cycA</i> verursacht eine hohe Sensibilität gegenüber β -Alanin.....	30
3.1.9	Auswirkungen der Überexpression von <i>cycA</i> in FV5069 auf die Pantothenat- Produktion.	31
3.2	Aufbau einer Mutantenbank mit Hilfe des Transposons <i>TnphoA</i>.	33
3.2.1	Aufbau der <i>TnphoA</i> -Mutantenbank.....	33
3.2.2	Etablierung eines Verfahrens zur Identifikation von Mutanten mit veränderter Pantothensäure-Exkretion.	35
3.2.3	<i>Screening</i> der Mutantenbank („Plattentest“).	38
3.2.4	Direktsequenzierung genomischer DNA von Mutanten mit veränderter Pantothensäure-Exkretion.....	39
4.	Diskussion	42

4.1 β-Alanin Aufnahme durch <i>E. coli</i>...	42
4.1.1 Biochemische Charakterisierung der β -Alanin Aufnahme.	42
4.1.2 Identifikation und Überexpression des β -Alanin-Aufnahmesystems.	42
4.1.3 Überexpression von <i>cycA</i> im Produktionsstamm FV5069.	44
4.2 Analyse der <i>TnphoA</i> Mutantenbank von MG1655Δ<i>phoA</i>.	45
4.2.1 Einige Mutationen beeinflussen möglicherweise die Aufnahme von Eisen.	47
4.2.2 Einige Mutationen beeinflussen wahrscheinlich die Verfügbarkeit von β -Alanin.	49
4.2.3 Einige Mutationen beeinflussen wahrscheinlich die Verfügbarkeit von α -Ketoisovalerat.	51
4.2.4 Die Generierung von 5,10-Methylentetrahydrofolat kann als dritter Stoffwechselweg der Pantothen säure-Biosynthese betrachtet werden.	53
4.2.5 Mögliche Hinweise auf die Identität des Pantothenat-Exkretionscarriers.	58
5. Literatur	62

Abkürzungen

bp	Basenpaare
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
cpm	<i>counts per minute</i>
F	Farad
h	Stunden
IPTG	Isopropyl- β -Thiogalactosid
kb	Kilobasenpaare
K_m	Michaelis-Konstante
min	Minuten
Ω	Ohm
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
rpm	Umdrehungen pro Minute
sec	Sekunden
TG	Trockengewicht
kV	Kilovolt
U	Unit
V_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
xg	-fache Erdbeschleunigung (9,81 m/sec ²)

1. Einleitung

1.1 Pantothersäure (Vitamin B₅).

Pantothersäure (gr. *pantotheren* = von allen Seiten) ist ein wasserlösliches Vitamin der B-Gruppe (Vitamin B₅). Sie findet sich in den allermeisten Lebensmitteln, vor allem in Obst, Getreidekeimlingen und Innereien (z. B. Leber) (Campbell, 1997). Reine Pantothersäure ist eine gelbliche, ölig-viskose und sehr hygroskopische Flüssigkeit, die sich in saurer oder alkalische Lösung, sowie unter Hitzeeinwirkung leicht zersetzt (Willmes, 1993). Während die meisten Mikroorganismen und Pflanzen Pantothersäure *de novo* synthetisieren, haben Säugetiere diese Fähigkeit verloren. Sie decken ihren täglichen Bedarf (etwa 10 mg beim Menschen; Isler und Brubacher, 1988) hauptsächlich über die Nahrung, jedoch trägt auch die Darmflora einen Teil zur Versorgung bei. Das Bakterium *Escherichia coli* beispielsweise produziert 15-mal mehr Pantothersäure als es selber benötigt (Jackowski und Rock, 1981; 1984).

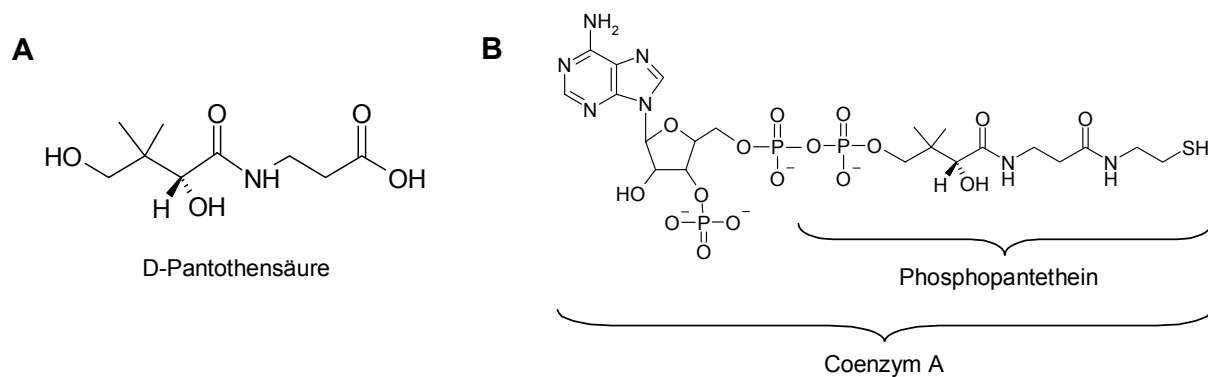


Abbildung 1.1: Chemische Struktur von (A) D-Pantothersäure und (B) Coenzym A.

Pantothersäure ist die Vorstufe von Coenzym A (CoA) und der prosthetischen Phosphopantetheinylgruppe des Acyl-Carrier-Proteins (Abbildung 1.1), deren terminale Sulfhydrylgruppe im Fettsäurestoffwechsel der Übertragung von aktivierten Acylresten dient. Acetyl-CoA ist zudem das entscheidende Bindeglied zwischen Glykolyse und Citratzyklus und es dient bei vielen weiteren Reaktionen als C2-Gruppen-Donor. Andere CoA-Derivate sind etwa an der Biosynthese von Membranlipiden, dem Abbau von verzweigt-kettigen Aminosäuren, der Biosynthese von Methionin und Arginin sowie (nicht bei Bakterien) an der Bildung des Porphyrinringes beteiligt. Phosphopantethein bildet zudem bei *E. coli* die prosthetische Gruppe zweier Enzyme der Enterobactin-Biosynthese (Rusnak *et al.*, 1991,

Gehring *et al.*, 1997). Obwohl die Pantothersäure an insgesamt mehr als 100 verschiedenen Stoffwechselreaktionen beteiligt ist (Abiko, 1975), sind Mangelkrankungen beim Menschen extrem selten. Möglicherweise wurde das *burning feet syndrome*, welches im zweiten Weltkrieg bei einigen Kriegsgefangenen auftrat, durch Pantothersäuremangel verursacht (Glusman, 1947). Ein bei Testpersonen durch die Verabreichung des Antagonisten ω -Methyl-Pantothersäure künstlich hervorgerufener Pantothersäuremangel verursachte allgemeine Krankheitsbeschwerden wie Unruhe, Abgeschlagenheit, Magen-Darm-Probleme, Schlaflosigkeit und Muskelkrämpfe (Hodges *et al.*, 1959).

Pantothersäure, bzw. deren Calcium-Salz (Ca^{2+} -Pantothenat), wird zusammen mit anderen Vitaminen oft als Futtermitteladditiv in der Landwirtschaft eingesetzt. Aber auch in der Nahrungsmittelindustrie dient das Vitamin als Zusatz für Joghurt, Sportgetränke, Babynahrung, Multivitamin-Säfte oder Multivitaminpräparate. Die zum Alkohol reduzierte Form, das Panthenol (Dexapanthenol), ist zudem Bestandteil vieler Wundsalben (z. B. Bepanthen-Salbe), da es die Epithelisierung stimuliert und entzündungshemmend wirkt (Lebensmittelchemische Gesellschaft, 1999). Von der Kosmetikindustrie wird Panthenol in großen Mengen als Zusatz für Hautcremes und Shampoos verwendet. Hierbei wirkt es feuchtigkeitsbindend (*moisturising*-Effekt), verleiht dem Haar einen seidigen Glanz und verbessert die Kämmbarkeit. Zusätzlich erhöht es die Flexibilität und Festigkeit der Fingernägel (<http://www.roche.com/vitamins/pdf/dpanth.pdf>).

1.2 Biosynthese von Pantothersäure und Coenzym A in *E. coli*.

Pantothersäure entsteht aus der Kondensation von β -Alanin (3-Aminopropionsäure) und Pantoat (Pantoinsäure). Beide Vorstufen werden über verschiedene, im Folgenden näher vorgestellte Stoffwechselwege gebildet (Abbildung 1.2, Seite 4).

1.2.1 Biosynthese von β -Alanin.

β -Alanin wird von *E. coli* zum allergrößten Teil *de novo* durch die von PanD (L-Aspartat-1-decarboxylase) katalysierte α -Decarboxylierung von L-Aspartat erzeugt (Begley *et al.*, 2001). Das *panD*-Genprodukt entsteht zunächst als enzymatisch inaktives 13,8 kDa Proenzym (das π -Protein), welches erst durch die autokatalytische Spaltung zwischen Gly24 und Ser25 in die aktive Form übergeht (Ramjee *et al.*, 1997). Durch den Spaltungsprozeß entsteht in der kleineren α -Kette eine kovalent gebundene, katalytisch aktive Pyruvoyl-Gruppe (Williamson and Brown, 1979). Diese bildet das gemeinsame Merkmal einer ansonsten recht heterogenen

Gruppe von Aminosäure-Decarboxylasen (Recsei und Snell, 1984). Die native Aspartatdecarboxylase ist ein Tetramer, bestehend aus vier $\alpha\beta$ -Untereinheiten (Albert *et al.*, 1998). Auch wenn der PanD-Weg die Hauptquelle für β -Alanin in *E. coli* K12 zu sein scheint (Cronan, 1980), so sind noch einige andere, recht unterschiedliche Möglichkeiten zur Synthese dieser Aminosäure bekannt. *E. coli* B ist etwa in der Lage Uracil zu β -Alanin abzubauen (Patel und West, 1987). Für Hefen und höhere Eukaryonten ist dies die einzige Möglichkeit zur β -Alanin Gewinnung, da diesen der PanD-Weg fehlt (Gojkovic *et al.*, 2001). *E. coli* ist zusätzlich in der Lage durch die Hydrolyse von Carnosin β -Alanin zu erzeugen (Klein *et al.*, 1986). Schließlich entsteht die Aminosäure auch noch beim Abbau von Spermidin (Tabor und Kellogg, 1970), jedoch ist die Existenz dieses Weges in *E. coli* fraglich.

1.2.2 Biosynthese von Pantoat.

Die ersten drei Reaktionen der Pantoat-Biosynthese führen von Pyruvat zu α -Ketoisovalerat, der letzten gemeinsamen Vorstufe von Valin, Leucin und Pantoat. Die Acetohydroxysäure-Synthasen I und III (zwei Isoenzyme) katalysieren unter CO_2 -Abspaltung die Kondensation zweier Pyruvat-Moleküle zu α -Acetolactat (Blatt *et al.*, 1972). Dieses wird von der Acetohydroxysäure-Isomeroeductase (codiert von *ilvC*) unter NADPH-Verbrauch zu α,β -Dihydroxyisovalerat reduziert und isomerisiert, woraus die Dihydroxysäure-Dehydratase (*ilvD*) unter Wasserabspaltung das α -Ketoisovalerat synthetisiert. Hier trennen sich die Wege. Valin entsteht aus α -Ketoisovalerat durch eine einfache Transaminierung, während die Bildung von Leucin vier weitere Reaktionen erfordert, die größtenteils durch die Genprodukte des *leu*-Operons katalysiert werden (Umbarger, 1996). Die erste spezifische Reaktion zur Synthese von Pantoat ist eine Hydroxymethylierung durch das *panB* Genprodukt, die Ketopantoat-Hydroxymethyltransferase. Sie überträgt unter Anlagerung von Wasser eine CH_2 -Gruppe von 5,10-Methylen tetrahydrofolat auf α -Ketoisovalerat, woraus α -Ketopantoat entsteht. *In vitro* Experimente von Powers und Snell (1976) sowie Teller *et al.* (1976) zeigten, dass das Enzym durch Pantoat, Pantothenat ($> 500 \mu\text{M}$) und CoA ($> 1\text{mM}$) gehemmt wird und so möglicherweise als Regulator dieses Stoffwechselweges fungiert. Ob solch hohe Konzentrationen *in vivo* eine Rolle spielen, ist jedoch fraglich (Vallari *et al.*, 1987). Für PanB von *Mycobacterium tuberculosis* wurde kürzlich gezeigt, dass es α -Ketoisovalerat auch Tetrahydrofolat-unabhängig enolisieren und Formaldehyd direkt auf das enzymatisch stabilisierte Carbanion übertragen kann (Sugantino *et al.*, 2003).

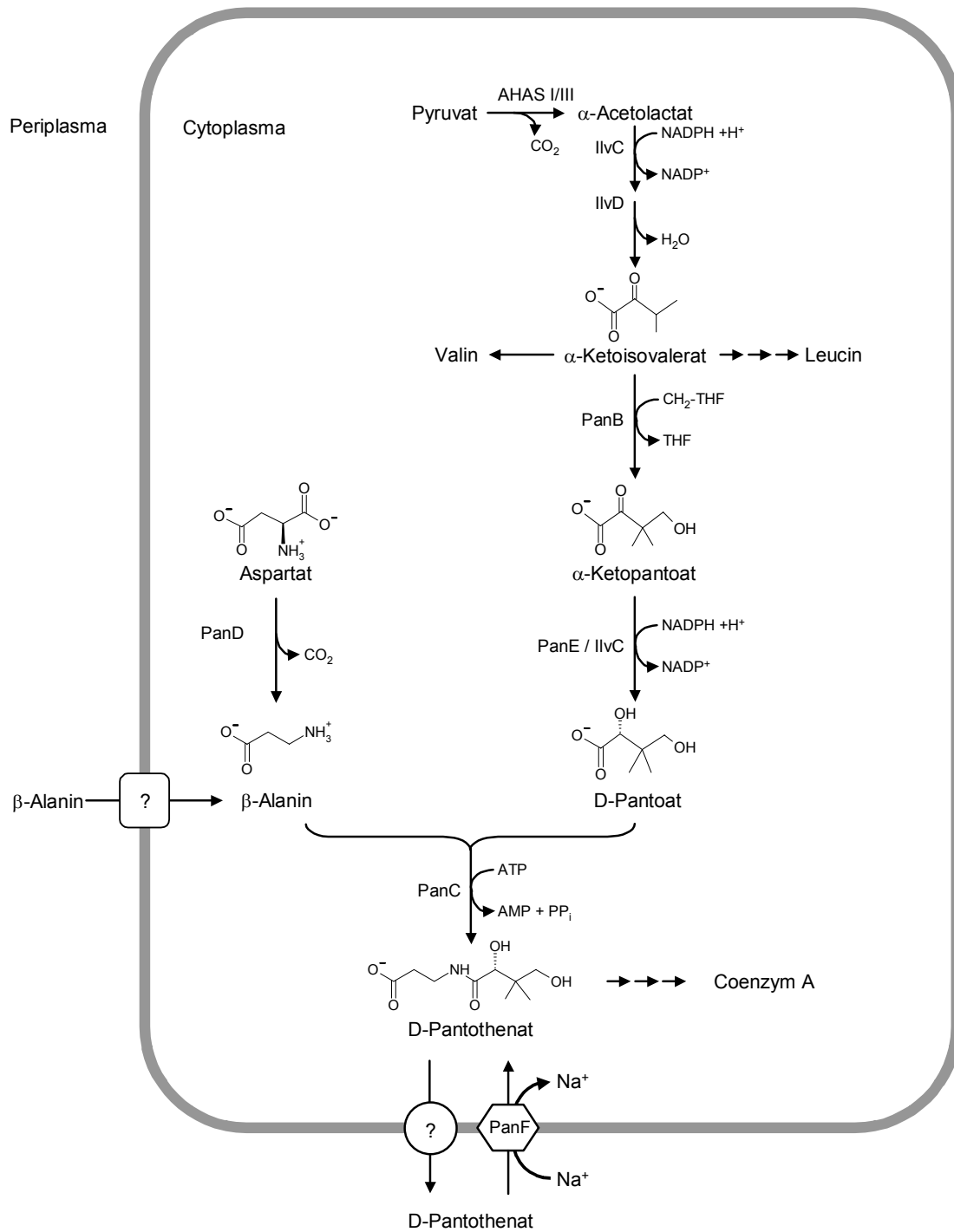


Abbildung 1.2: Biosynthese von Pantothersäure in *E. coli*. AHAS I/III: Actohydroxysäure-Synthasen I und III; CH₂-THF: 5,10-Methylentetrahydrofolat; THF: Tetrahydrofolat.

Die Umwandlung des α -Ketopantoats zum D-Pantoat erfolgt durch die Reduktion der Carbonylgruppe am β -C-Atom zum Alkohol. Für diese Reaktion zeichnet hauptsächlich das *panE* Genprodukt, die Ketopantoat-Reduktase, verantwortlich (Jackowski, 1996). Das 33,8 kD (303 Aminosäuren) große Enzym überträgt die Reduktionsäquivalente von NADPH auf Ketopantoat (Wilken *et al.*, 1979; Elischewski *et al.*, 1999). Die Identifizierung von *panE* war lange Zeit problematisch, da die Reaktion auch von IlvC, der Acetohydroxysäure-Isomeroreductase, katalysiert wird. Hierbei handelt es sich um das selbe Enzym, welches für die weiter oben besprochene Reduktion und Isomerisierung von α -Acetolactat verantwortlich ist (Primerano und Burns, 1983) und somit zwei verschiedene Reaktionen der Pantothesäure-Biosynthese katalysiert.

1.2.3 Kondensation von β -Alanin und α -Ketoisovalerat zu Pantothesäure.

Im letzten Schritt der Pantothenat Biosynthese laufen beide Stoffwechselwege in der Kondensation von D-Pantoat mit β -Alanin zusammen. Die Reaktion wird vom *panC*-Genprodukt, der Pantothenat-Synthetase, katalysiert und ist an die Hydrolyse von ATP zu AMP + PP_i gekoppelt, wobei als Zwischenprodukt wahrscheinlich Pantoyl-AMP entsteht (Miyatake *et al.*, 1976; 1978). Die native Pantothenat-Synthetase ist ein Homotetramer aus vier Polypeptidketten mit einer Gesamtmasse von etwa 72 kD. Ihre Sequenz und Struktur weist starke Homologien zu Klasse I Aminoacyl-tRNA-Synthetasen auf, mit denen sie wahrscheinlich auch den Reaktionsmechanismus gemeinsam hat (von Delft *et al.*, 2001). In Reis (*Oryza sativum*) und *Lotus japonicus* wurden mittlerweile ebenfalls Pantothenat-Synthetasen gefunden, welche *panC*-Mutationen in *E. coli* funktionell komplementieren (Genschel *et al.*, 1999). *E. coli* ist nicht in der Lage, Pantothenat abzubauen, jedoch wurden bei anderen Mikroorganismen, wie etwa *Pseudomonas fluorescens* Pantothenasen beschrieben. Diese Enzyme hydrolysieren Pantothenat zu β -Alanin sowie Pantoat oder Pantoyllacton (Airas, 1988).

1.2.4 Biosynthese von Coenzym A.

Nur etwa 7% des von *E. coli* synthetisierten Pantothenats verwendet das Bakterium zur Biosynthese von Coenzym A, der Rest wird exkretiert (Jackowski und Rock, 1981). In seiner natürlichen Funktion als Symbiont im Dickdarm höherer Tiere bedeutet dieses Verhalten einen Vorteil für den Wirt und sichert dem Bakterium so seinen Lebensraum. Die CoA-Biosynthese beginnt mit der Phosphorylierung des Pantothenats zu 4-Phosphopantothenat durch die Pantothenat-Kinase (Brown, 1959), welche von *coaA* codiert wird. Dieser Schritt ist

wahrscheinlich der Hauptregulationspunkt, denn das Enzym wird stark von freiem Coenzym A gehemmt (Jackowski und Rock, 1981). Die Phosphopantothencystein-Synthetase verknüpft das 4-Phosphopantothentat über eine Peptidbindung mit Cystein. Interessanterweise dient bei dieser Reaktion CTP statt ATP als Energiequelle (Brown, 1959). Jetzt folgt die Decarboxylierung zu 4-Phosphopantethin, welches die Zelle zwar exkretieren, nicht jedoch wieder aufnehmen kann (Jackowski, 1996). Durch die Adenylylierung zum Dephosphocoenzym A sowie eine Phosphorylierung am C-3' der Ribose entsteht daraus schließlich das Coenzym A.

1.2.5 Transport von Pantothersäure und β -Alanin.

Obwohl die Cytoplasmamembran von *E. coli* für Pantothersäure nicht permeabel ist, kann das Bakterium diese sowohl aufnehmen, als auch exkretieren (Vallari und Rock, 1985b). Die Pantothenat-Aufnahme wird von der Pantothenat-Permease PanF katalysiert (Vallari und Rock, 1985b), einem sekundären, Na^+ -abhängigen Transporter mit wahrscheinlich 12 Transmembranhelices (Vallari und Rock, 1985a, Jackowski und Alix, 1990). PanF ist hochspezifisch für Pantothersäure ($K_m=0,4 \mu\text{M}$), jedoch liegt die maximale Transportrate mit nur 45 pmol/(mg TG min) etwa hundertfach unter derjenigen eines typischen Aminosäuretransporters (Vallari und Rock, 1985a). *panF* und *prmA*, welches für die Methyltransferase des ribosomalen Proteins L11 codiert, bilden zusammen ein Operon (Vanet *et al.*, 1993). Zu PanF homologe Vitamintransporter finden sich in nahezu allen bisher untersuchten Bakterien und Säugetieren. Das menschliche SMVT-System etwa ermöglicht die Aufnahme von Pantothersäure, Biotin und Lipoat, wobei die Stöchiometrie hier $2 \text{Na}^+ : 1$ Substratmolekül beträgt (Wang *et al.*, 1999). Der H^+ -abhängige Pantothenat-Transporter FEN2 von *Saccharomyces cerevisiae* ist dagegen durch konvergente Evolution entstanden und weist keine Ähnlichkeit zu PanF auf (Stolz und Sauer, 1999). Eine interessante Strategie verfolgt der intrazelluläre Malaria-Parasit *Plasmodium falciparum*. Dieser eukaryontische Einzeller, welcher selbst nicht zur Pantothersäure-Biosynthese fähig ist, induziert bei infizierten Erythrocyten die Aufnahme von Pantothersäure aus dem Serum (Saliba *et al.*, 1998). Anschließend wird das Vitamin über ein relativ unspezifisches, H^+ -gekoppeltes Transportsystem ins Cytoplasma aufgenommen und dort umgehend durch Phosphorylierung fixiert (Saliba und Kirk, 2001). Vallari und Rock (1985b) zeigten, dass *E. coli* auch einen Exkretionscarrier für Pantothenat besitzen muss und dass dieser nicht mit PanF identisch ist. Die großen Mengen Pantothenat, welche von *E. coli* Produktionsstämmen in Medium exkretiert werden (siehe unten), lassen ebenfalls auf die Aktivität eines Effluxsystems

schließen (Moriya *et al.*, 1999).

Der Transport von β -Alanin wurde bei *E. coli* noch nicht eingehend erforscht. Da das Molekül in physiologischem pH zwei Ladungen trägt und keine lange Kohlenwasserstoff-Kette besitzt, ist die Diffusion über die Cytoplasmamembran unwahrscheinlich. Verschiedene Arbeiten mit β -Alanin-auxotrophen Stämmen zeigen jedoch, dass zugesetztes β -Alanin sehr wohl von den Zellen aufgenommen und zu Pantothenat umgesetzt wird (Cronan, 1980; Spitzer *et al.*, 1988). Auch bei der biotechnologischen Produktion von Pantothensäure gelangen große Mengen β -Alanin aus dem Medium in die Zellen (Hikichi *et al.*, 1996; siehe unten). *E. coli* scheint somit ein bisher noch nicht näher charakterisiertes β -Alanin-Aufnahmesystem zu besitzen.

1.3 Biotechnologische Produktion von Pantothensäure.

Auch heute erfolgt die industrielle Produktion von Pantothensäure in der Regel noch durch ein mehrstufiges chemisches Verfahren. Dabei wird aus Formaldehyd, Isobutylaldehyd und Cyanid zunächst D,L-Pantolacton (das Lacton der Pantoinsäure) synthetisiert (Miller und Schlesinger, 1993; Willmes, 1993). Da nur das D-Isomer der Pantothensäure biologisch aktiv ist, muss das D-Pantolacton aus dem Racemat gereinigt werden, bevor die Kondensation mit β -Alanin zur D-Pantothensäure bzw. deren Calcium-Salz erfolgen kann (Isler und Brubacher, 1988). Weil die fehlende Stereoselektivität die Ausbeute auf maximal 50% begrenzt und L-Pantothensäure ein Antagonist der D-Form ist (Kimura *et al.*, 1980), wird seit einiger Zeit an biotechnologischen Verfahren zur Pantothenat-Produktion gearbeitet. Ersten Ansätze beschränkten sich auf die biokatalytische Kondensation des D,L-Pantolactons mit β -Alanin (Nogami *et al.*, 1992). Mittlerweile sind jedoch hochentwickelte Produktionsstämme von *E. coli* verfügbar, welche D-Pantoat *de novo* synthetisieren und unter Zusatz hoher β -Alanin-Konzentrationen große Mengen D-Pantothenat exkretieren (Hikichi *et al.*, 1996; Morija, *et al.* 1999). In der Stammentwicklung erfolgte zunächst eine durch UV-Licht oder N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin induzierte Zufallsmutagenese, wonach die Zellen auf ihre Resistenz gegen Salicylsäure selektiert wurden. Ein Zusammenhang zwischen Salicylsäureresistenz und der Fähigkeit zur Produktion von Pantoat wurde erstmals von Maas (1952) beobachtet, wobei die biochemische Grundlage jedoch bis heute im Dunkeln liegt. Durch mehrere weitere Mutagenesen erhielten Hikichi *et al.* (1996) schließlich den Stamm FV5069, welcher zusätzlich gegen Zwischenprodukte der Pantoat-Biosynthese resistent ist und in geeignetem Medium bis zu 18 g/l Pantothenat produziert. Die plasmidcodierte Überexpression von

panBCD und *ilvGM* erlaubte in diesem Stammhintergrund eine weitere Steigerung auf bis zu 65 g/l (Moriya *et al.*, 1999) - entscheidend bleibt jedoch der Zusatz von β -Alanin, da die Produktivität ansonsten drastisch einbricht (Hikichi *et al.*, 1996).

1.4 Ziele dieser Arbeit.

Wie die Arbeit von Hikichi *et al.* (1996) zeigt, ist die Aufnahme von β -Alanin für die biotechnologische Pantothenensäure-Produktion von essentieller Bedeutung. Bei Limitierungen würde dieser Transportprozess zwangsläufig zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Pantothenensäure-Biosynthese werden. Bisher wurde die β -Alanin-Aufnahme *E. coli* jedoch noch nicht untersucht. Sie sollte im Rahmen dieser Arbeit zunächst biochemisch charakterisiert und daran anschließend das verantwortliche Transportprotein identifiziert werden. Durch die Klonierung und Überexpression des entsprechenden Gens, sollte zudem eine Möglichkeit zur weiteren Optimierung von Produktionsstämmen geschaffen werden.

Die Exkretion von Pantothenensäure ist der zweite entscheidende Transportprozess, welcher bei der biotechnologischen Pantothenensäure-Produktion zu Limitierungen führen kann. Da auch der hierfür verantwortliche Transporter bisher noch unbekannt ist, war dessen Identifizierung ein weiteres Ziel dieser Arbeit. Zu diesem Zweck sollte eine Bank mit Transposonmutanten etabliert und exkretionsdefiziente Klone durch einen *crossfeeding*-Test identifiziert werden. Die direkte Sequenzierung genomischer DNA sollte dann die Identifikation der betroffenen Gene und des gesuchten Transporters ermöglichen. Darüber hinaus sollte die Analyse der Mutantenbank dafür genutzt werden, Wechselwirkungen zwischen der Pantothenensäure-Biosynthese und anderen Stoffwechselwegen aufzudecken.

2. Material und Methoden

2.1 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen.

2.1.1 Vollmedien.

Als Vollmedium wurde für *E. coli* in der Regel LB-Medium verwendet (10 g/l Bacto Trypton, 5 g/l Bacto Yeast Extract, 10 g/l NaCl; Sambrook *et al.*, 1989). Bei der Transposonmutagenese erfolgte die erste Kultivierung der Insertionsmutanten z. T. in TYGPN-Medium (20 g/l Bacto Trypton, 10 g/l Bacto Yeast Extract, 9,2 ml/l 86% Glycerin, 5 g/l Na₂HPO₄, 10 g/l KNO₃). Zur Herstellung kompetenter Zellen war die Kultivierung in SOB-Medium notwendig (20 g/l Bacto Trypton, 5 g/l Bacto Yeast Extract, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂; Hanahan, 1985). Nach Transformationen wurden die Zellen in SOC-Medium regeneriert (SOB + 20 mM Glucose). Bei den Vorarbeiten zum Plattentest kam BHI-Medium (*brain heart infusion*, Difco/BD, Sparks, USA) zum Einsatz.

2.1.2 Minimalmedien.

Als Minimalmedium für *E. coli*-Zellen wurde in der Regel M9-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) verwendet (8,5 g/l Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 3 g/l KH₂PO₄, 0,5 g/l NaCl, 1 g/l NH₄Cl, 0,5% Glucose). Für Aufnahmemessungen und im Plattentest wurden folgende Zusätze hinzugefügt: 1 mM MgSO₄, 100 µM CaCl₂ und 0.01% einer Spurensalz-Lösung (10 g/l FeSO₄ x 7 H₂O, 10 g/l MnSO₄ x H₂O, 10 g/l CaCl₂ x 2 H₂O, 1 g/l ZnSO₄ x 7 H₂O, 0,2 g/l CuSO₄ und 0,02 g/l NiCl₂). Im Plattentest betrug die Glucosekonzentration 1% und das Medium enthielt zusätzlich noch 20 ng/ml Biotin (M9⁺-Medium). Bei den Vorarbeiten zum Plattentest wurden auch die folgenden Minimalmedien verwendet: „Vogel/Bonner“ Minimalmedium E (10 g/l K₂HPO₄, 3,5 g/l NaNH₄HPO₄ x 4 H₂O, 0,2 g/l MgSO₄, 2 g/l Citronensäure x 1 H₂O, 0,4 % Glucose; Vogel und Bonner, 1956) und MM1-Minimalmedium (5 g/l (NH₄)₂SO₄, 5 g/l Harnstoff, 2 g/l KH₂PO₄, 2 g/l K₂HPO₄). Zusätzlich kam CgC-Medium (Keilhauer *et al.*, 1993) zum Einsatz (5 g/l Harnstoff, 0,5 g/l K₂HPO₄, 0,5 g/l KH₂PO₄, 42 g/l MOPS, 20 g/l (NH₄)₂SO₄), welches für die Kultivierung von *C. glutamicum* in Flüssigkultur mit 1 mM MgSO₄, 0,1 mM CaCl₂, 20 µg/l Biotin und 100 µl Spurensalzen (s. o.) versetzt wurde. Wenn nicht anders angegeben, betrug die Glucose-Konzentration 2%. Transposonmutanten wurden für die Archivierung aus LB- oder TYGPN-Medium in *casaminoacids*-Medium übertragen (1% *casaminoacids* (Difco/BD, Sparks, USA), 0,5 % Glucose, 250 ml M9-Medium (ohne Glucose), 0,5% KNO₃, 20 mg/l Uracil, 5 mg/l Thiamin).

Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem entsprechenden Medium vor dem Autoklavieren 16 g/l Bacto-Agar zugesetzt.

2.1.3 Antibiotika.

Wenn nicht anders angegeben wurden Antibiotika in den folgenden Konzentrationen eingesetzt: 100 µg/ml Carbenicillin, 20 µg/ml Kanamycin (25 µg/ml bei der Transposonmutagenese und im Plattentest), 20 µg/ml Chloramphenicol und 10 µg/ml Tetracyclin.

2.1.4 Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung.

Die Kultivierung von *E. coli*-Zellen erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei 37°C, die von *C. glutamicum* dagegen bei 30°C. Flüssigkulturen wurden bei etwa 110-120 rpm geschüttelt, um eine gute Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Als Maß für die Zelldichte diente die Lichtstreuung bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀), welche mit Hilfe eines Spektrometers (Novaspec II, Pharmacia Biotech inc.) bestimmt wurde. Für die längerfristige Lagerung von Bakterienstämmen, wurden stationäre LB-Kulturen nach Herstellerangaben in Roti-Store Cryoröhrchen (Fa. Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe) überführt und bei -20°C oder -80°C eingefroren.

2.1.5 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation.

Für Plasmidklonierungen wurden chemisch kompetente DH5α mc^r -Zellen gemäß der von Inoue *et al.* (1990) beschriebenen Methode hergestellt und transformiert. Die Transformationen von MG1655-Derivaten und FV5069 erfolgte durch Elektroporation. Hierzu wurde je 50 ml SOB- oder LB-Medium mit 1 ml einer frischen Über-Nacht-Kultur angeimpft und bei 37°C inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,8 erreicht war. Die Zellen wurden auf Eis abgekühlt, dreimal mit je 50 ml eiskaltem, steilem Bideist-Wasser gewaschen, in etwa 1 ml eiskaltem 25% Glycerin aufgenommen (für die Transposonmutagenese in 1 ml Bideist-Wasser) und zu je 200 µl aliquotiert. In der Regel wurden die Zellen jetzt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Da für die Transposonmutagenese sehr hohe Kompetenzen nötig waren, mussten hierfür frische Zellen verwendet werden. Für die Elektroporation wurden die Aliquots auf Eis aufgetaut, mit ca. 2-3 µl Plasmidlösung versetzt und in eine gekühlte Küvette überführt. Die Elektroporation erfolgte in einem BioRad Gene Pulser II (BioRad, München) bei 2,5 kV, 200Ω und 25 µF. Sofort anschließend wurden 900 µl SOC-Medium zugesetzt, die Suspension in 14,5 ml Falcon-Röhrchen überführt und für 1

Stunde bei 37°C geschüttelt. Anschließend konnten die Zellen auf geeignete Agarplatten ausgestrichen werden.

2.2 Bakterienstämme und Plasmide.

Tabelle 2.1: Verwendete *E. coli* und *C. glutamicum*-Stämme.

Stamm	Eigenschaften	Referenz
<i>E. coli</i>		
MG1655	K12-Wildtyp λ^- F ⁻ <i>rph-1</i>	Blattner <i>et al.</i> (1997), Jensen (1993)
MG1655 Δ <i>gabP</i>	Deletion des 1401 bp <i>gabP</i> -Gens bei MG1655	diese Arbeit
MG1655 Δ <i>phoA</i>	Deletion des 1485 bp <i>phoA</i> -Gens bei MG1655	diese Arbeit
CAG12073	MG1655 <i>cycA30::Tn10</i>	Singer <i>et al.</i> (1989)
FV5069	Produktionsstamm für D-Pantothensäure	Hikichi <i>et al.</i> (1996)
DH5 α <i>mcr</i> ⁻	λ^- <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 deoR</i> Δ (<i>lacIZYA argF</i>)U169 Φ 80 Δ <i>lacZ</i> Δ M15 <i>mcrA</i> Δ (<i>mmr hsdRMS mcrBC</i>)	Grant <i>et al.</i> (1990)
DH5 α <i>pir</i>	Lysogen von DH5 α λ^+ <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 hsdR17</i> Δ (<i>lacIZYA argF</i>)U169 Φ 80 Δ <i>lacZ</i>	Donnenberg und Kaper (1991)
<i>C. glutamicum</i>		
R127 <i>panC::pK18 mob'panC'</i>	Pantothensäure-auxotropher Indikatorstamm	Sahm und Eggeling (1999)

Tabelle 2.2: Verwendete Plasmide.

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pKO3	Plasmid zur Gen-Deletion in <i>E. coli</i>	Link <i>et al.</i> (1997)
pKOΔ <i>gabP</i>	pKO3-Derivat zur Deletion von <i>gabP</i>	diese Arbeit
pKOΔ <i>phoA</i>	pKO3-Derivat zur Deletion von <i>phoA</i>	diese Arbeit
pTrc99a	<i>bla lacI^q ColE1 P_{trc}</i>	Amann und Abel (1989)
pTrc- <i>cycA</i>	pTrc99a-Derivat; Expressionsvektor für <i>cycA</i> aus MG1655	diese Arbeit
pRT733	<i>delivery</i> -Plasmid für <i>TnphoA</i> <i>oriR6L bla TnphoA</i>	Taylor <i>et al.</i> (1989) Manoil und Beckwith (1985)

2.3 Molekularbiologische Methoden.

2.3.1 DNA-Präparation aus *E. coli*.

Für Plasmid-Mini-Präparationen wurde das GFX Micro Plasmid Prep Kit von Amersham Pharmacia (Freiburg) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Wenn größere Plasmid-Mengen gereinigt werden mussten, kam das QIAfilter Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden) zum Einsatz.

Zur Präparation genomischer DNA von *E. coli* wurden Genomic-tips 100/G (Qiagen, Hilden) gemäß dem QIAGEN Genomic DNA Handbook verwendet. Die benötigten Puffer B1 und B2 wurden selbst angesetzt, alle weiteren dagegen aufgrund der identischen Zusammensetzung einem QIAfilter Plasmid Midi Kit entnommen. DNase-freie RNase wurde durch 20 minütiges Kochen einer 100 mg/ml RNase-Lösung (Sigma, Deisenhofen) und anschließendes Abkühlen auf Eis hergestellt. Die Spaltung von Proteinen erfolgte mit fertiger Proteinase K-Lösung (19 mg/ml; Roche, Mannheim) und die Zellwände wurden durch 100 mg/ml Lysozym (Sigma, Deisenhofen) abgebaut. Für jede Präparation wurden 6 ml eine LB-Über-Nacht-Kultur eingesetzt (etwa $1,5 \times 10^{10}$ lebende Zellen). Die Aufnahme der gereinigten DNA erfolgte schließlich in 200 µl TE-Puffer, wodurch die Endkonzentration meist etwa 250 ng/µl betrug.

2.3.2 Spaltung und Modifikation von DNA.

Die Spaltung von Plasmid-DNA wurde in der Regel mit Hilfe von Restriktionsendonucleasen der Firmen New England Biolabs (Frankfurt am Main) oder Roche (Mannheim) unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Enzyme für weitere Modifikationen (Dephosphorylierung, Auffüllen von *sticky ends*, Ligationen) wurden ebenfalls von New England Biolabs (Frankfurt am Main), Roche (Mannheim), Amersham Pharmacia (Freiburg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen und nach den Herstellerangaben verwendet.

2.3.3 Klonierung von pTrc-*cycA*.

Das Plasmid pTrc-*cycA* diente als Expressionsvektor für das 1413 bp große Gen *cycA* aus *E. coli* MG1655. Zunächst musste *cycA* von genomischer DNA mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert werden. Zu diesem Zweck wurde eine große *E. coli* Kolonie in 20 µl Wasser aufgenommen und die Zellen durch Erhitzen (10 min bei 95°C) lysiert. Die folgende PCR wurde mit Hilfe der AccuTaq LA DNA-Polymerase (Sigma, Deisenhofen) durchgeführt. Ein Reaktionsansatz (50 µl) enthielt 2 µl des Lysates als *template*, je 20 pmol der Primer „*cycA* Start“ und „*cycA* End“, 2,5 µl eines dNTP-Gemisches (je 10 mM dATP, dCTP, dTTP, dGTP; Sigma, Deisenhofen), 2,5U AccuTaq LA DNA-Polymerase sowie 5 µl des mitgelieferten Reaktionspuffers (Endkonzentration MgCl₂: 2,5 mM).

Primer „*cycA* Start“: 5'-AGAGAATTCCATGGTAGATCAGGTA AAAAGTCG-3'

Primer „*cycA* End“: 5'-GCAGAAGCTTATTTCCGCAGTTCAGCAGC-3'

Die PCR-Reaktion wurde im GeneAmp PCR System 9700 der Firma PE Applied Biosystems (Weiterstadt) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: (1) 1 min/98°C Denaturierung, (2) 30 sec/94°C Denaturierung, (3) 30 sec/56°C *annealing*, (4) 2 min/68°C Elongation. Die Schritte 2-4 wurden in 25 Zyklen wiederholt. Das PCR-Produkt, welches durch die Wahl der Primer an den Enden eine *EcoRI*- sowie eine *HindIII*-Schnittstelle besaß (in der Primersequenz fett gedruckt), wurde nun mit *EcoRI* und *HindIII* geschitten und mit dem *EcoRI/HindIII*-geschnittenen und dephosphorylierten Plasmid pTrc99a ligiert. Durch die nachfolgende Sequenzierung des daraus resultierenden Plasmides pTrc-*cycA* konnten Punktmutationen ausgeschlossen werden.

2.3.4 Deletion von *gabP* und *phoA* bei *E. coli* MG1655.

Für die Deletion der Gene *gabP* bzw. *phoA* in MG1655 kam das von Link *et al.* (1997) entwickelten pKO3-System zum Einsatz. Mit Hilfe der AccuTaq LA DNA-Polymerase (Sigma, Deisenhofen) wurden in zwei PCR-Ansätzen zunächst je 500bp *upstream* und *downstream* des zu deletierenden Gens amplifiziert. Die PCR-Produkte, welche durch das Desing der Primer an ihren dem Gen zugewandten Enden komplementäre 33 bp *nonsense*-Sequenzen besaßen, dienten jetzt in einer *cross over*-PCR als Matrize. Bei dem 1 kb großen Produkt handelte es sich um die Abschnitte vor und hinter dem zu deletierenden Gen, wobei das Gen selber durch die *nonsense*-Sequenz ersetzt worden war. Die Enden des PCR-Produkts enthielten primercodierte Restriktionsschnittstellen für *Bam*HI (*phoA*-Deletion) bzw. *Sal*I (*gabP*-Deletion). Diese wurden durch die entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und mit dem ebenso geschnittenen sowie dephosphorylierten Vektor pKO3 ligiert. Bei den daraus resultierenden Plasmiden (pKO Δ *phoA* und pKO Δ *gabP*) erfolgte dann die Sequenzierung der einklonierten DNA-Abschnitte, um die spätere Einführung von Punktmutationen in benachbarte Gene auszuschließen. pKO3 besitzt ein Chloramphenicol-Resistenzgen (*cat*) und das für die Levansucrase codierende Gen *sacB*. Levansucrase katalysiert die Polymerisation von Saccharose zu Levan, welches zum Tod der Zelle führt. pKO3 codiert außerdem für eine temperatursensitive Variante von RepA (*repA(ts)*), einem Protein, welches für die Replikation des Plasmides notwendig ist. Die pKO3-Derivate können dadurch nur bei 30°C, nicht jedoch bei 44°C repliziert werden.

Zur Deletion der Gene waren je zwei homologe Rekombinationsschritte erforderlich. MG1655-Zellen wurden zunächst durch das entsprechende Plasmid transformiert, auf LB-Agar mit 20µg/ml Chloramphenicol ausgestrichen und über Nacht bei 30°C inkubiert. Mit einigen Klonen wurden dann 3 ml Kulturen angeimpft und diese über Tag bei 30°C geschüttelt. Abends wurden etwa 10⁶ Zellen pro Platte auf LB-Agar mit 20µg/ml Chloramphenicol ausgestrichen und über Nacht bei 44°C inkubiert. Jetzt konnten sich nur noch solche Bakterien vermehren, bei denen das Plasmid (mit dem *cat*-Gen) ins Genom integriert war. Am nächsten Tag wurden nun einige der etwa 100 Kolonien pro Platte (Integrationsrate ca. 10⁻⁴) in 1 ml LB-Medium resuspendiert, 100µl einer 1000-fachen Verdünnung auf LB Platten mit 5% Saccharose ausgestrichen und die Platten über Nacht bei 30°C inkubiert. Jetzt konnten nur diejenigen Zellen überleben, bei denen das Plasmid (inklusive *sacB*) wieder durch homologe Rekombination aus dem Genom entfernt worden war. Um Mutationen in *sacB* auszuschließen, erfolgte schließlich noch eine Replikatlattierung auf LB Platten mit 5% Saccharose und 20µg/ml Chloramphenicol. Mit

Hilfe einer PCR wurde dann ermittelt, bei welchen der Saccharose-resistenten und Chloramphenicol-sensitiven Klone des Gen *phoA* bzw. *gabP* deletiert war.

2.3.5 Sequenzierung von Plasmid-DNA.

Um Mutationen auszuschließen, wurden bei allen mit Hilfe von PCR-Produkten hergestellten Plasmiden die inklonierten DNA-Abschnitte sequenziert. Die *primer extension*-Reaktion erfolgte mit dem „ABI PRISM Big Dye Reaction Terminator Cycle Sequencing Kit“ (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) nach Herstellerangaben. Die kapillarelektrophoretische Auftrennung und Analyse der fluoreszenzmarierten Produkte wurde mit Hilfe der Sequenzierapparatur ABI PRISM 310 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt.

2.3.6 Sequenzierung von genomischer DNA.

Zur Charakterisierung von 43 ausgewählten Transposonmutanten wurde der Bereich der genomischen DNA, in dem die Integration erfolgt war, direkt sequenziert. Die hierfür verwendete Methode basierte auf der Arbeit von Heiner *et al.* (1998). Ein typischer Reaktionsansatz (40 µl) für die *primer extension*-Reaktion bestand aus 16 µl *ready reaction mix* (PE Applied Biosystems, Weiterstadt), 25 pmol Primer „*phoA* Seite“ oder „Transpo Seite“ und 3 µg genomische DNA.

Primer „*phoA* Seite“: 5'-CCGGTTTTCCAGAACAGGGC-3'

Primer „Transpo Seite“: 5'-CACATGGAAGTCAGATCCTGG-3'

Die *primer extension*-Reaktion wurde im GeneAmp PCR System 9700 der Firma PE Applied Biosystems (Weiterstadt) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: (1) 5 min/95°C Denaturierung, (2) 30 sec/95°C Denaturierung, (3) 20 sec/55°C *annealing*, (4) 4 min/60°C Elongation. Die Schritte 2 bis 4 wurden in 53 Zyklen wiederholt. Eine anschließende Ethanolpräzipitation erfolgte durch die Zugabe von 60 µl H₂O, 10 µl 3M Na-Acetat (pH 4,6) sowie 250 µl Ethanol und eine 20-minütige Zentrifugation bei 13000xg und 4°C. Anschließend wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 12 µl H₂O aufgenommen. Die kapillarelektrophoretische Auftrennung der fluoreszenzmarierten Produkte erfolgte mit Hilfe der Sequenzierapparatur ABI PRISM 310 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) bei 2 kV über 10 sec für die Injektion und 15 kV über 36 min bei 50°C während des Laufes. Mit den ermittelten Sequenzen wurde dann eine BLASTn-Suche durchgeführt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), welche die Identifikation des

betroffenen Gens sowie die genaue Bestimmung des Integrationsortes erlaubte.

2.4 Biochemische Methoden.

2.4.1 Aufnahmemessungen mit [1-¹⁴C]β-Alanin.

Morgens wurde eine Kolonie der zu untersuchenden Zellen in 3 ml LB Medium überführt und ca. 7 Stunden bei 37°C geschüttelt. Dann wurden 1,5 ml der Kultur kurz zentrifugiert und mit dem Pellet 100 ml M9-Minimalmedium oder LB-Medium angeimpft. Diese Kultur wurde über Nacht bei 37°C und 135 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag folgten zwei Waschschrte mit eiskaltem M9-Medium, wonach die Zellen in 10 ml eiskaltem M9-Medium aufgenommen wurden. Die OD₆₀₀ wurde auf 5 eingestellt und die Suspension bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt.

Drei Minuten vor Beginn der Aufnahmemessung wurden 2,7 ml der Zellsuspension in ein Corex-Röhrchen überführt und unter ständigem Rühren für 3 Minuten in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt. Wenn erforderlich, erfolgte der Zusatz von Inhibitoren 30 sec vor dem Versuchsstart. Ein Experiment wurde durch die Zugabe von 300 µl eines Gemisches aus [1-¹⁴C]β-Alanin (ca. 750000 cpm) und β-Alanin gestartet. Zu den Zeitpunkten 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 und 240 Sekunden erfolgte die Entnahme einer Probe (200 µl), deren Zelle über einen Glasfaserfilter (45 µM Porengröße; Millipore, Eschborn) mit Hilfe einer Vakuum-Absauganlage (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) schnell von Medium getrennt wurden. Sofort anschließend wurde der Filter mit zweimal 2,5 ml 100 mM LiCl gewaschen, um anhaftende Medienreste zu entfernen. Nach Beendigung des Versuchs wurden die Filter mit den Oberseiten nach außen in Szintillationsröhrchen gegeben, mit „Rotiszint eco plus“ (Roth, Karlsruhe) überschichtet und gut geschüttelt. Die Messung der Radioaktivität erfolgt mit einem Beckman LS6500 Szintillationszähler (Beckman Coulter, München).

2.4.2 Nichtradioaktive Aufnahmemessungen.

Nichtradioaktive Aufnahmemessungen wurden mit Hilfe der Silikonölzentrifugation durchgeführt. Für jeden Messpunkt wurden drei 300 µl Mikrozentrifugenröhrchen (bei β-Alanin-Aufnahmemessungen ein Mikrozentrifugenröhrchen; Beckman Instruments GmbH, München) mit 30 µl 20% Perchlorsäure und 70 µl Silikonöl der Dichte d=1,04 g/cm³ (Wacker, Burghausen) beschickt. Die Kultivierung und Vorbereitung der Zellen erfolgte wie in Kapitel 2.4.1 beschrieben. Das Volumen der Zellsuspension betrug hier 9 ml und ein Versuch wurde durch die Zugabe von 1 ml β-Alanin oder 10% LB-Medium gestartet. Die

Proben (je 200 µl) wurden in die vorbereitete Silikonölröhrchen gegeben und 45 Sekunden (bei β -Alanin-Aufnahmemessungen 25 Sekunden) in einer Microfuge E (Beckman Instruments GmbH, München) 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 wurden die Überstände abgenommen und die Zentrifugenröhrchen in Höhe der mittleren Phase durchtrennt. Die drei Spitzen eines jeden Messpunktes wurden jetzt mit der Öffnung nach unten in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß vereinigt und 1 min bei 13000xg zentrifugiert. Nach der Entfernung von zwei der drei Spitzen erfolgte die Zugabe von 135 µl H₂O sowie 100 µl Silikonöl der Dichte 1,06 g/cm³ (Wacker, Burghausen) und die Resuspendierung des Sedimentes. Jetzt wurden die Zellen für 10 Minuten im Ultraschallbad aufgeschlossen, mit 75 µl 5 M KOH/1 M Triethanolamin versetzt und das Reaktionsgefäß kurz gevortext. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 4 °C konnte für 10 Minuten bei 13000xg zentrifugiert werden, wodurch sich eine wässrige Phase absetzte, die dann zur HPLC-Analyse entnommen wurde. Bei β -Alanin-Aufnahmemessungen wurde für jeden Messpunkt nur eine Probe entnommen, so dass sich die Volumina bei der Aufarbeitung auf 1/3 reduzierten.

2.4.3 Aminosäureanalytik mit Hilfe der HPLC.

Die Analyse von Aminosäuren (inklusive β -Alanin) erfolgte mit Hilfe der *high performance liquid chromatography* (HPLC) und anschließender Fluoreszenzdetektion auf einer HP1090 oder HP 1100 HPLC-Anlage (Hewlett-Packard, Waldbronn). Die Proben wurden einer automatischen Vorsäulenderivatisierung mit 10-fachem Überschuss an *o*-Phtaldialdehyd/Borat/3-Mercaptopropionsäure unterzogen. Dadurch reagierten primäre Amine zu thiosubstituierten Isoindolen (Lindroth und Mopper, 1979), welche sich nach der Auftrennung durch ihre Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 230 nm und einer Emissionswellenlänge von 455 nm detektieren ließen. Die Auftrennung der Aminosäurederivate erfolgte durch eine *reversed phase*-Säule (Hypersil ODS5, 5 µM, Vorsäule: 40 x 4,6 mm, Hauptsäule 125 x 4.6 mm; CS-Chromatographieservice, Langerwehe) mit einem Lösungsmittelgradienten von 97% Puffer A (20 mM Natriumacetat, 0,036% Triethylamin, 0,3% Tetrahydrofuran, pH 7,2) bis 100% Puffer B (20% 100 mM Natriumacetat pH 7,2, 40% Methanol, 40% Acetonitril) bei 40°C und einem Fluss von 0,8 - 1 ml/min. Die Quantifizierung der Eluenten erfolgte mit Hilfe von externen Standards, welche

alle proteinogenen Aminosäuren und β -Alanin enthielten.

2.4.4 Berechnung von intrazellulären β -Alanin-Konzentrationen und des Trockengewichtes.

Für die Berechnung intrazellulärer β -Alanin-Konzentrationen wurde ein Cytoplasmavolumen von 0,69 μ l sowie (bei der Silikonölzentrifugation) 1,82 μ l extracytoplasmatisches Medium pro OD₆₀₀-Einheit und Milliliter Kultur angenommen (Cayley *et al.*, 1991; Stock *et al.*, 1977). Bei der Bestimmung von Transportraten wurde ein Trockengewicht (TG) von 0,34 mg TG pro OD₆₀₀-Einheit und Milliliter Kultur vorausgesetzt.

2.4.5 Mikrobiologische Quantifizierung von Pantothersäure.

Die mikrobiologische Quantifizierung von Pantothersäure erfolgte mit Hilfe des auxotrophen *C. glutamicum*-Stammes R127*panC::pK18mob'panC'* nach der Methode von Sahn und Eggeling (1999). Hierfür wurden die Proben zunächst 10 Minuten bei 6000xg abzentrifugiert und die Überstände anschließend sterilfiltriert. 4 ml einer auf OD₆₀₀=0,1 angeimpften Kultur des Indikator-Stammes (in CgC-Medium mit 25 μ g/ml Kanamycin) wurden dann 50 μ l des (z. T. verdünnten) Filtrats oder verschiedener Calcium-Pantothenat-Standards zugesetzt. Die Kulturen wurden für 48 Stunden bei 30°C geschüttelt, und anschließend wurde die OD₆₀₀ bestimmt. Innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereiches verhält sich die erreichbare Zelldichte von *C. glutamicum* R127*panC::pK18mob'panC'* proportional zur Pantothersäure-Konzentration im Medium. Mit Hilfe der Standard-Kulturen lies sich somit der Gehalt an Pantothersäure in den Proben quantifizieren (1 g Calcium-Pantothenat entspricht 0,921 g Pantothersäure).

2.5 Aufbau der Tn*phoA*-Mutantenbank.

2.5.1 Etablierung der Mutantenbank.

Für die Erzeugung von Transposonmutanten wurden frisch hergestellte elektrokompente MG1655 Δ *phoA*-Zellen durch Elektroporation mit dem *delivery*-Plasmid pRT733 transformiert, auf LB-Agar + 25 μ g/ml Kanamycin + 200 μ g/ml BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat) ausgestrichen und für 48h bei 30°C inkubiert. Hierzu kamen quadratische Petrischalen aus Polystyrol mit einer Größe von 24,5 x 24,5 cm zum Einsatz (Nunc, Wiesbaden), welche den Ausstrich eines gesamten Transformationsansatzes pro Platte erlaubten. Blaue Kolonien wurden in sterilen 96-*well* Mikrotiterplatten (TPP, Trasadingen,

Schweiz) gesammelt und darin in TYGPN- oder LB-Medium + 25µg/ml Kanamycin bei 37°C kultiviert. Mit dem „Replikator“ (Boekel Scientific, Feasterville, USA), einem Stempel mit 96 Edelstahlspitzen im Abstand der Vertiefungen der Mikrotiterplatten, wurden die Klone am nächsten Tag in neue Mikrotiterplatten mit *casaminoacids*-Medium + 25 µg/ml Kanamycin übertragen und für 48 h bei 37°C kultiviert. Nach der Zugabe von 1/5 Vol. 86% Glycerin wurden die Platten dann bei -80°C eingefroren und gelagert.

2.5.2 Guss der Testplatten.

Für das *screening* der Transposonmutanten wurden ebenfalls große, quadratische Petrischalen (24,5 x 24,5 cm; Nunc, Wiesbaden) verwendet. M9⁺-Medium (z. T. mit 0,25% *casaminoacids*; Difco/BD, Sparks, USA) wurde zunächst in 2-facher Konzentration angesetzt und im Mikrowellenofen vorsichtig auf ca. 50°C erhitzt. Nun erfolgte der Zusatz von 1 Vol. 60°C heißem, 2-fach konzentriertem Agar (32 g/l), wonach die Flüssigkeit bei Raumtemperatur gerührt wurde, bis sie auf ca. 40-45°C abgekühlt war. Nun konnten pro Platte (= 300 ml) 5 ml einer *C. glutamicum* R127*panC*::pK18*mob'panC'*-Kultur (aus CgC-Minimalmedium ohne Pantothenat-Zusatz) sowie Kanamycin (Endkonzentration: 25µg/ml) hinzugefügt werden. Der Ansatz wurde gut gemischt und in die Petrischalen gegossen. Um die spätere Bildung von übermäßig viel Kondenswasser zu vermeiden, mussten die Agarplatten jetzt noch etwa 20 Minuten ohne Deckel unter der Sterilbank trocknen, bevor sie für den Plattentest verwendet werden konnten.

2.5.3 Screening der Transposonmutanten („Plattentest“).

Für das *screening* wurden die bei -80°C gelagerten Mikrotiterplatten zunächst auf Eis aufgetaut. Das Überimpfen der Mutanten auf die Testplatten erfolgte mit Hilfe des „Replicators“ (Boekel Scientific, Feasterville, USA). Dessen Spitzen wurden zunächst in Ethanol getaucht, dann kurz über dem Bunsenbrenner abgeflämmt und zum Abkühlen für einige Sekunden in sterilen, kalten Agar gedrückt. Der Replicator wurde jetzt in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte eingeführt und die Zellen durch Eindrücken des Replikators in den Testagar übertragen. Auf jeder großen Testplatte können so die Mutanten aus sechs Mikrotiterplatten (576 Klone) untersucht werden. Die Inkubation der Testplatten erfolgte für 48 Stunden bei 30°C.

3. Ergebnisse

3.1 Aufnahme von β -Alanin durch *E. coli*.

Die Aufnahme von β -Alanin spielt bei der biotechnologischen Produktion von Pantothersäure eine entscheidende Rolle. Deshalb sollte dieser Transportprozess im Rahmen dieser Arbeit biochemisch charakterisiert und das verantwortliche Transportprotein identifiziert werden. Als Stammhintergrund hierfür und für die Erstellung und Analyse einer Mutantenbank (Kapitel 3.2) diente *E. coli* K12 MG1655, dessen Genomsequenz vollständig bekannt ist. Die Zellen sind molekularbiologisch gut zugänglich, problemlos zu kultivieren und es sind zahlreiche, zum Teil gut charakterisierte Mutanten erhältlich.

3.1.1 Biochemische Charakterisierung der β -Alanin-Aufnahme.

Zunächst sollte untersucht werden, ob β -Alanin durch Diffusion, erleichterte Diffusion oder aktiven Transport in die Zelle gelangt. Hierzu erfolgten Transportmessungen mit [^{14}C] β -Alanin, dessen Aufnahme sich mit Hilfe eines Szintillationszählers gut nachweisen lässt. *E. coli* MG1655-Zellen wurden in M9-Minimalmedium kultiviert und zweifach gewaschen. Ein Versuch wurde durch den Zusatz eines β -Alanin/[^{14}C] β -Alanin-Gemisches (1 mM Endkonzentration) gestartet. Wie Abbildung 3.1 zeigt, akkumulierten die Zellen das Substrat bis auf mehr als 20 mM nach 4 Minuten und erreichten dabei zu Beginn des Versuches eine Aufnahmerate von etwa $12 \text{ nmol (mg TG min)}^{-1}$.

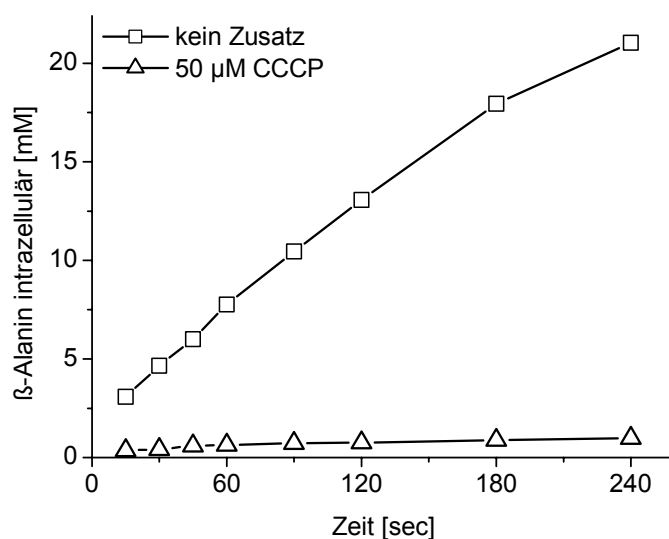


Abbildung 3.1: Aufnahme von β -Alanin durch *E. coli* MG1655 ohne und mit Zusatz von 50 μM CCCP. Die Zellen wurden in M9 Medium kultiviert und die Substratkonzentration betrug 1 mM.

In einem zweiten Experiment wurde dem Ansatz vor der Substratzugabe CCCP (Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon) in 50 μM Endkonzentration zugesetzt. Dieser Entkoppler verursacht einen Zusammenbruch des Membranpotentials (Heytler, 1980), was zur Inaktivierung aller energieabhängigen Transportprozesse führt. Die Aufnahme von β -Alanin wurde durch den Zusatz von CCCP fast vollständig blockiert (Abbildung 3.1) und die intrazelluläre Konzentration stieg während des gesamten Experiments nicht über 1 mM. Daraus und aus der ohne CCCP-Zugabe gegenüber dem Medium 20-fach höheren Akkumulation von β -Alanin wird geschossen, dass die β -Alanin-Aufnahme bei *E. coli* MG1655 durch einen aktiven Transportprozess erfolgt.

Um den Transport von β -Alanin biochemisch näher zu charakterisieren, wurden die Aufnahmeraten bei Substratkonzentrationen von 100 mM, 10 mM, 1 mM, 0,1 mM und 0,01 mM bestimmt. Aus diesen Daten wurde die in Abbildung 3.2 gezeigte Michaelis-Menten Kinetik genähert. Hieraus ergibt sich ein K_m von etwa 2,4 mM und eine V_{\max} von 46 $\text{nmol (mg TG min)}^{-1}$.

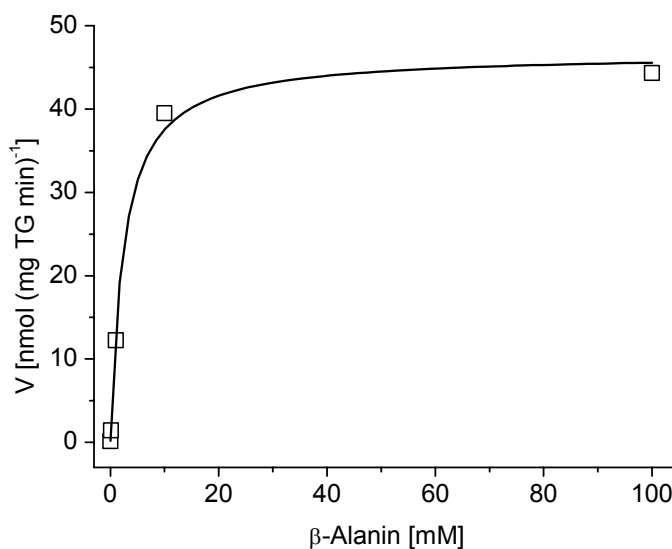


Abbildung 3.2 Aufnahme von β -Alanin durch *E. coli* MG1655. Näherung einer Aufnahmekinetik. Abgeleitet wurden die Konstanten $K_m=2,4$ mM und $V_{\max}=46$ $\text{nmol (mg TG min)}^{-1}$. Die Raten wurden mindestens doppelt, bei 1 mM dreifach bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte dieser Messungen.

3.1.2 Bedeutung des GABA-Transporters GabP für die β -Alanin-Aufnahme.

Aufgrund einiger Veröffentlichungen von S.C. King und Mitarbeitern (King *et al.*, 1995; Brechtel *et al.*, 1996; Brechtel und King, 1998) wurde vermutet, dass die Aufnahme von β -Alanin bei *E. coli* durch den γ -Aminobutyrat (GABA)-Transporter GabP katalysiert wird. Dieses Protein zählt zu den Aminosäure Transportern (AAT) und ist somit ein Mitglied der Aminosäure-Polyamin-Cholin (APC) Transporter-Familie (Jack *et al.*, 2000). Die Kohlenstoffkette von GABA ist gegenüber β -Alanin um eine CH_2 -Gruppe verlängert und die Substanz kann von manchen *E. coli*-Stämmen als Stickstoffquelle verwendet werden (Reitzer,

1996a). Brechtel und King (1998) zeigten, dass GabP von *Bacillus subtilis* die Aufnahme von β -Alanin katalysiert. Die Affinität von *E. coli*-GabP für β -Alanin ist zwar sehr niedrig, jedoch könnte dies durch den Einsatz relativ hoher Konzentrationen ($> 2\text{mM}$) durchaus ausgeglichen werden (King *et al.*, 1995; Brechtel *et al.*, 1996). Um den Einfluß von GabP auf die β -Alanin-Aufnahme zu untersuchen, wurde das *gabP*-Gen von MG1655 vollständig deletiert und durch eine 33 bp lange *nonsense*-Sequenz ersetzt. Der resultierende Stamm wurde mit MG1655 Δ *gabP* bezeichnet.

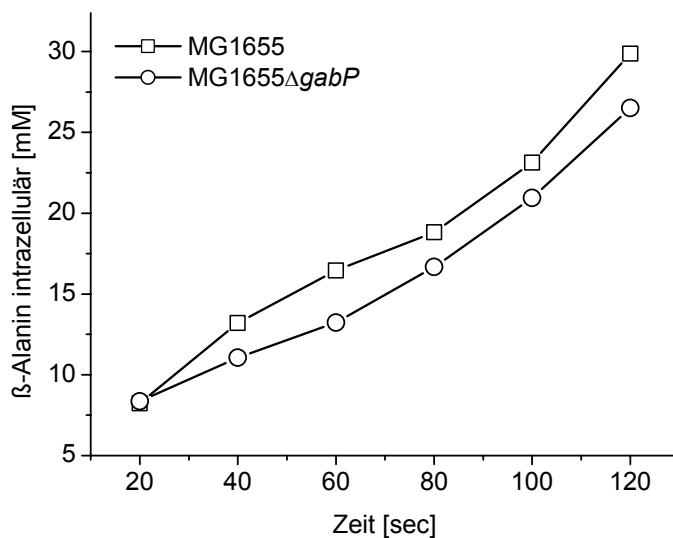


Abbildung 3.3: Vergleich der β -Alanin-Aufnahme durch MG1655 und MG1655 Δ *gabP* bei 10 mM β -Alanin im Medium. Aufnahmemessungen mit den Substratkonzentrationen 1 mM und 0,1 mM zeigten das qualitativ gleiche Ergebnis.

Abbildung 3.3 zeigt die Aufnahme von β -Alanin durch MG1655 und MG1655 Δ *gabP* bei 10 mM Substratkonzentration. Hierbei konnte kein Unterschied zwischen dem Wildtyp und MG1655 Δ *gabP* festgestellt werden. Zwei weitere Experimente mit 1 mM und 0,1 mM β -Alanin zeigten das qualitativ gleiche Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Daraus läßt sich schließen, daß die carriervermittelte Aufnahme von β -Alanin im Wesentlichen nicht durch GabP katalysiert wird.

3.1.3 LB-Medium vermindert die β -Alanin-Aufnahmeaktivität.

Für die bisher gezeigten Aufnahmemessungen wurden die Zellen in M9-Minimalmedium kultiviert. Der folgenden Versuch sollte zeigen, ob das Kultivierungsmedium die β -Alanin-Aufnahmeaktivität beeinflusst. Hierzu wurden MG1655-Zellen sowohl in M9-Minimalmedium als auch in LB-Vollmedium kultiviert und gewaschen. Anschließend wurde mit Hilfe von $[1-^{14}\text{C}]\beta$ -Alanin die β -Alanin-Aufnahme bei einer Substratkonzentration von insgesamt 1 mM gemessen. Sie liegt bei den in LB-Medium kultivierten Zellen mit einer Rate

von etwa $2 \text{ nmol (mg TG min)}^{-1}$ deutlich unter der Kontrolle ($12,5 \text{ nmol (mgTG min)}^{-1}$, Abbildung 3.4). Die Inhibition der β -Alanin-Aufnahmesystems könnte sowohl auf der Expressionsebene als auch direkt, etwa durch Reste von LB-Medium, erfolgen. Wei *et al.* (2001) zeigten, dass die Kultivierung von *E. coli* in Minimal- bzw. Vollmedium zu drastischen Unterschieden im Expressionsprofil der Zellen führt. Hiervon ist insbesondere die Transkription für Transportproteine codierender Gene betroffen.

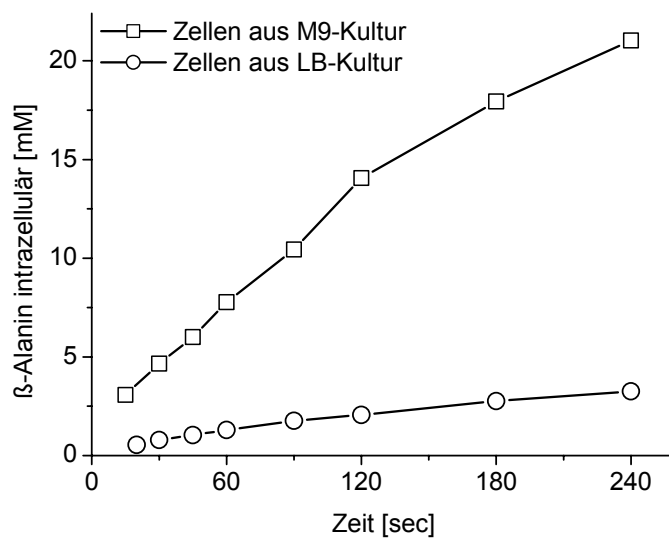


Abbildung 3.4: Vergleich der β -Alanin Aufnahme von MG1655 Zellen aus LB- und M9-Kulturen bei 1 mM Substratkonzentration.

Sollten sich im Versuchsansatz noch Reste von LB-Medium befinden, so kann dies auch zur direkten Inhibition des β -Alanin-Transporters durch kompetitive oder allosterische Wechselwirkungen führen. Mit der folgenden Aufnahmemessung wurde der direkte Einfluss von LB-Medium auf den β -Alanin-Transporter untersucht. Hierbei wurde den Zellen aus einer M9-Kultur in einem Fall 30 Sekunden vor Versuchsstart LB-Medium zugesetzt (Endkonzentration: 10%) und im anderen Fall erfolgte kein LB-Zusatz. In Abbildung 3.5 erkennt man deutlich die starke Hemmung der β -Alanin-Aufnahme durch das LB-Medium. Da eine Beeinflussung der Genexpression in so kurzer Zeit nicht zum Tragen kommt, zeigt das Experiment eine direkte Inhibition des β -Alanin-Transporters durch ein oder mehrere Bestandteile des LB-Mediums.

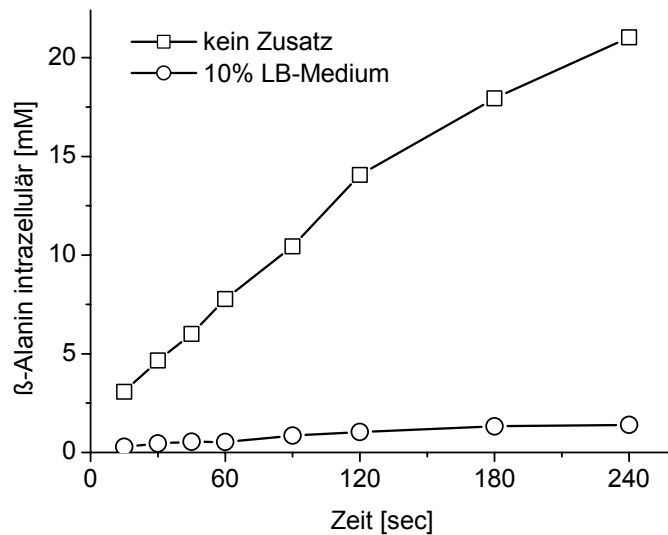


Abbildung 3.5: Einfluß von 10% LB-Medium auf die β -Alanin-Aufnahme durch MG1655. Die β -Alanin Gesamtkonzentration betrug 1 mM.

3.1.4 β -Alanin hemmt die Aufnahme von L-Alanin aus LB-Medium.

LB-Medium besteht zum Großteil aus Trypton, einem Caseinhydrolysat. Deshalb wurde vermutet, dass es sich bei der inhibierenden LB-Komponente um eine Aminosäure oder ein kurzes Peptid handelt. Um diese zu identifizieren wurde untersucht, ob sich die Aufnahme einzelner Aminosäuren aus LB-Medium durch die Gabe hoher Konzentrationen von β -Alanin hemmen lässt. In M9-Medium kultivierte MG1655-Zellen wurden mit 1% LB-Medium (Endkonzentration) versetzt, nach 0, 1, 2 und 3 Minuten durch Silikonölzentrifugation vom Medium getrennt und für die HPLC-Analyse aufgearbeitet. In einem zweiten Experiment wurde zusätzlich β -Alanin auf eine Endkonzentration von 10 mM zugegeben. Nach der Aufarbeitung wurden die intrazellulären primären Aminosäuren mit *o*-Phthaldialdehyd (OPA) derivatisiert, über HPLC aufgetrennt und im Fluoreszenzdetektor detektiert (Lindroth und Mopper, 1979).

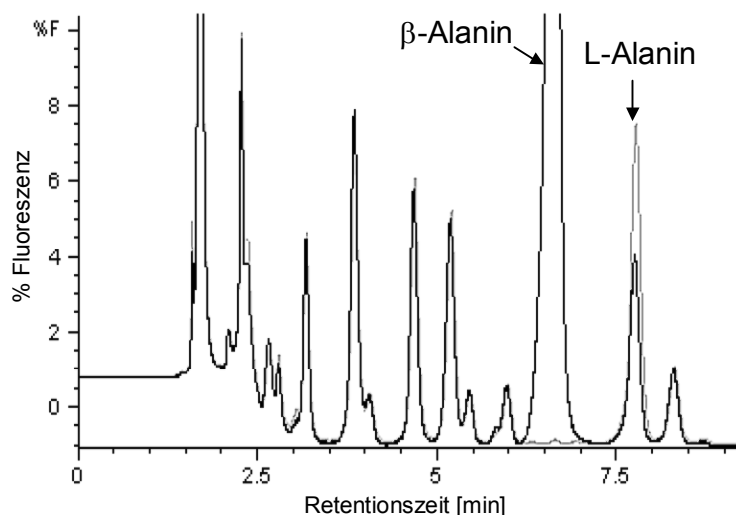


Abbildung 3.6: Chromatogramm des intrazellulären Aminosäure-pools von MG1655 nach Fütterung von 1% LB-Medium mit (schwarzes Chromatogramm) und ohne (graues Chromatogramm) Zusatz von β -Alanin (10 mM Endkonzentration). Die Abbildung zeigt eine Probe, die 1 Minute nach Versuchsstart entnommen wurde.

Abbildung 3.6 zeigt einen Ausschnitt zweier zur Deckung gebrachter Chromatogramme der intrazellulären Aminosäurepools zum Zeitpunkt 1 Minute nach Versuchsstart. Man erkennt, dass die Zellen im Experiment mit β -Alanin-Zusatz (schwarzes Chromatogramm) nur etwa halb so viel L-Alanin aus dem LB-Medium aufgenommen hatten, wie im Vergleichsversuch (graues Chromatogramm). Alle weiteren Peaks (außer dem von β -Alanin) waren Deckungsgleich. Der Unterschied in der L-Alanin-Aufnahme zeigte sich auch in den Proben zu den Zeitpunkten $t = 2$ und 3 Minuten (Daten nicht gezeigt). In den Nullproben (vor LB-Zugabe) war L-Alanin kaum nachzuweisen und zwischen diesen Versuchen waren keine Unterschiede feststellbar (Daten nicht gezeigt). Die Retentionszeiten von L-Alanin und β -Alanin wurden durch Analysen der reinen Substanzen verifiziert und das Vorkommen von L-Alanin in LB-Medium bestätigt (Daten nicht gezeigt). Aus diesen Versuchen wird daher geschlossen, dass hohe Konzentrationen von β -Alanin die Aufnahme von L-Alanin hemmen.

3.1.5 L-Alanin, Glycin und D-Cycloserin hemmen die Aufnahme von β -Alanin.

Für *E. coli* sind in der Literatur mindestens zwei L-Alanin-Aufnahmesysteme beschrieben (Reitzer, 1996a). Beide unterscheiden sich sowohl im Substratspektrum, als auch in der genutzten Energiequelle deutlich. Der sekundäre Aminosäurecarrier CycA ist für die Aufnahme von Glycin, D-Alanin, D-Serin, D-Cycloserin und L-Alanin verantwortlich (Robbins and Oxender, 1973). LIV-I ist dagegen ein primäres, Bindeprotein-abhängiges Transportsystem, welches den Transport von L-Leucin, L-Isoleucin, L-Valin, L-Threonin und L-Alanin katalysiert (Antonucci *et al.*, 1985). Für beide Systeme wurde nur die Regulation auf Transkriptionsebene beschrieben (Haney und Oxender, 1992; Zimmer *et al.*, 2000) – eine allosterische Regulation der Transporter ist nicht bekannt. Aus diesem Grund wurde angenommen, dass die in Kapitel 3.1.4 gezeigte Inhibition der L-Alanin-Aufnahme durch eine Konkurrenz mit β -Alanin zustande kommt. Mindestens einer der beiden L-Alanin-Transporter sollte demnach auch die Aufnahme von β -Alanin katalysieren. Zu dessen Identifizierung, wurde im Folgenden die Hemmung der β -Alanin-Aufnahme durch spezifische CycA- und LIV-I-Substrate untersucht.

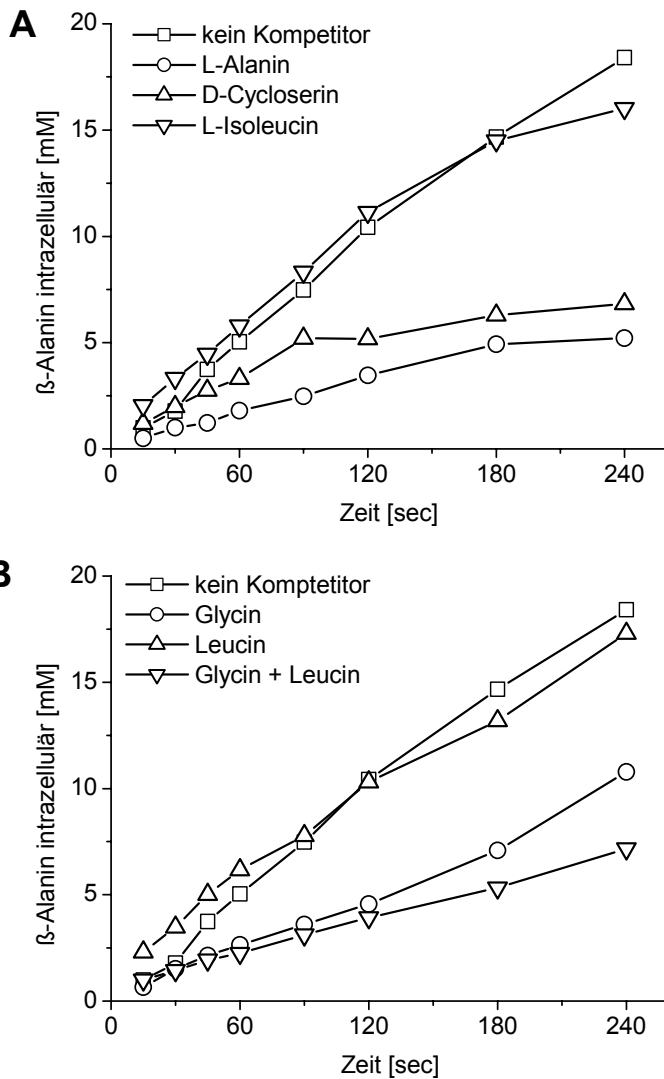


Abbildung 3.7: Hemmung der β -Alanin-Aufnahme von MG1655-Zellen aus M9-Kultur durch verschiedene Aminosäuren. Der β -Alanin-Transport wurde mit Hilfe von $[1-^{14}\text{C}]\beta$ -Alanin bei einer Substratkonzentration von insgesamt 1 mM bestimmt. **A.** Einfluß von L-Alanin, D-Cycloserin und L-Isoleucin auf die Aufnahme von β -Alanin. Die Substanzen wurden 30 Sekunden vor Versuchsstart in einer Endkonzentration von 1 mM zugesetzt. **B.** Einfluß von Glycin und L-Leucin auf die Aufnahme von β -Alanin. Die Substanzen wurden 30 Sekunden vor Versuchsstart in einer Endkonzentration von 50 μM zugesetzt.

Abbildung 3.7A zeigt eine Aufnahmemessung mit einer Gesamtkonzentration von 1 mM β -Alanin. Ohne Zusatz eines Inhibitors war die Substrataufnahme mit früheren Versuchen vergleichbar (vgl. Abb. 3.1). Durch 1 mM L-Alanin wurde sie dagegen stark um rund 72 % gehemmt (Aufnahmerate: $3,4 \text{ nmol (mg TG min)}^{-1}$ gegenüber $11,1 \text{ nmol (mg TG min)}^{-1}$). Auch der Zusatz des spezifischen CycA-Substrates D-Cycloserin (Endkonzentration: 1 mM) verursachte eine deutliche Hemmung auf etwa $5 \text{ nmol (mg TG min)}^{-1}$, während 1 mM L-Isoleucin (ein LIV-I Substrat) keinen Einfluss hatte. Die Daten deuten somit auf CycA als β -Alanin-Transporter. Um diese Hypothese zu untermauern, wurde ein weiteres Konkurrenzexperiment mit Glycin bzw. L-Leucin als Kompetitor durchgeführt (Abbildung 3.7B). Aufgrund der hohen Affinität von CycA für Glycin (K_m ca. 4 μM ; Robbins und Oxender, 1973) wurde die Konzentration der Kompetitoren mit 50 μM sehr niedrig gewählt. Trotz der geringen Konzentration verursachte Glycin eine deutliche Hemmung der β -Alanin Aufnahme (von $11,1 \text{ nmol (mg TG min)}^{-1}$ ohne Zusatz auf $4,4 \text{ nmol (mg TG min)}^{-1}$). L-

Leucin hatte dagegen nahezu keinen Einfluß, und auch die Kombination von Glycin und L-Leucin inhibierte den β -Alanin-Transport nicht stärker als Glycin alleine. Daraus wird geschlossen, dass bei *E. coli* der Aminosäurecarrier CycA für die Aufnahme von β -Alanin verantwortlich ist.

3.1.6 Die *cycA*-Mutante CAG12073 nimmt nahezu kein β -Alanin auf.

Um die Notwendigkeit eines funktionsfähigen CycA-Proteins für den β -Alanin-Transport zu untersuchen, wurden Transportmessungen mit der *cycA*-Mutante CAG12073 durchgeführt. Der Stamm ist ein MG1655-Derivat und unterscheidet sich vom Wildtyp nur durch eine Tn10-Insertion im Gen *cycA* (Singer *et al.*, 1989). Es ist daher davon auszugehen, dass CAG12073 kein funktionsfähiges CycA-Protein synthetisieren kann.

Zur Messung der Aufnahmeaktivität wurden die Zellen mit β -Alanin/[^{14}C] β -Alanin (1 mM Gesamtkonzentration) versetzt. Neben einem Versuch ohne Inhibitor wurden auch je 50 μM Glycin, L-Leucin bzw. Glycin und L-Leucin zugesetzt. Abbildung 3.8 zeigt, dass die β -Alanin-Aufnahme durch CAG12073 auch ohne den Zusatz eines Inhibitors gegenüber MG1655 (Abbildung 3.7B) um 87,4 % reduziert war ($1,4 \text{ nmol (mg TG min)}^{-1}$ gegenüber $11,1 \text{ nmol (min mg TG)}^{-1}$). Die Restaktivität ließ sich weder durch Glycin, noch durch L-Leucin weiter hemmen. Aus dem Versuch wird somit geschlossen, dass die Inaktivierung des Gens *cycA* eine deutliche Reduzierung der β -Alanin-Aufnahmeaktivität zur Folge hat.

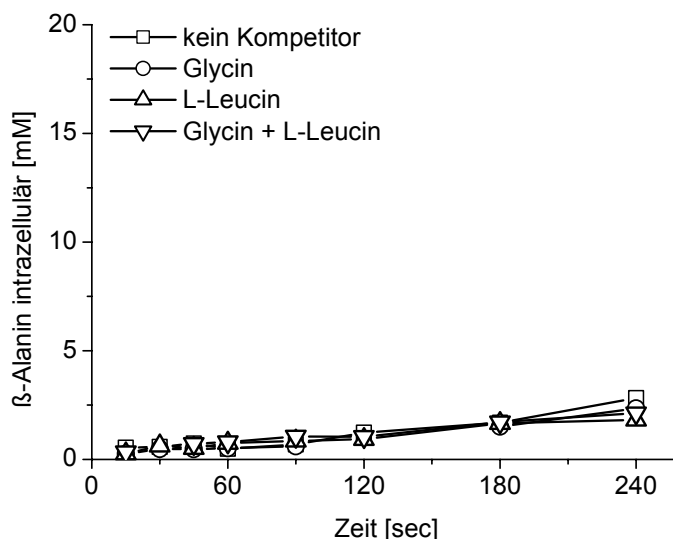


Abbildung 3.8: Aufnahme von β -Alanin durch die *cycA* Insertionsmutante CAG12073. Der β -Alanin-Transport wurde mit Hilfe von [^{14}C] β -Alanin bei einer Substratkonzentration von insgesamt 1 mM bestimmt. Die Inhibitoren Glycin, L-Leucin bzw. Glycin und L-Leucin wurden 30 Sekunden vor Versuchsstart in einer Endkonzentration von je 50 μM zugesetzt.

3.1.7 Klonierung und plasmidcodierte Expression von *cycA* in CAG12073 und MG1655.

Durch die Expression eines plasmidcodierten *cycA*-Gens in CAG12073 sollte im Folgenden die β -Alanin-Aufnahme wieder hergestellt und dadurch die Funktion von CycA als β -Alanin-Transporter verifiziert werden. Hierzu wurde das 1413 bp große Gen mit Hilfe der PCR von genomischer MG1655-DNA amplifiziert und in die *multiple cloning site* des Expressionsvektors pTrc99a (Amann und Abel, 1989) kloniert. Im daraus resultierenden Plasmid pTrc-*cycA* steht *cycA* unter der Kontrolle des starken *Trc*-Promotors, dessen Aktivität durch den plasmidcodierten und konstitutiv exprimierten Lac-Repressor LacI reguliert wird. Wie Vorversuche zeigten, war die Induktion mit IPTG allerdings nicht nötig, da der Promotor auch ohne Induktor eine hohe Basalaktivität gewährleistet (Daten nicht gezeigt). Für die Aufnahmemessungen wurden kompetente CAG12073-Zellen durch den Leervektor pTrc99a und das Expressionsplasmid pTrc-*cycA* transformiert. Die resultierenden Stämme wurden mit CAG12073/pTrc99a und CAG12073/pTrc-*cycA* bezeichnet. Aufgrund der sehr unterschiedlichen Qualität verschiedener [$1\text{-}^{14}\text{C}$] β -Alanin-Chargen wurden diese und alle folgenden Aufnahmemessungen mit Hilfe der Silikonölzentrifugation und anschließender HPLC-Analyse des intrazellulären β -Alanin-Gehaltes durchgeführt.

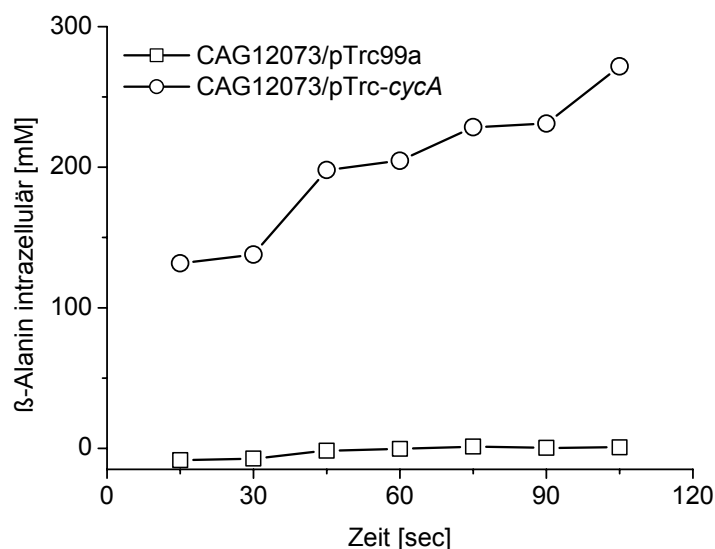


Abbildung 3.9: Aufnahme von β -Alanin durch CAG12073/pTrc99a und CAG12073/pTrc-*cycA* bei 10 mM Substratkonzentration. Die Zellen wurden zu den gegebenen Zeitpunkten durch Silikonölzentrifugation vom Medium getrennt. Das Cytoplasma wurde aufgearbeitet und der Gehalt an β -Alanin mit Hilfe der HPLC bestimmt. Die gezeigten Daten wurden in jeweils zwei zueinander zeitversetzten Experimenten ermittelt.

Abbildung 3.9 zeigt die Messung der β -Alanin-Aufnahme bei einer Substratkonzentration von 10 mM. Im Cytoplasma von CAG12073/pTrc99a war nahezu kein β -Alanin nachweisbar. CAG12073/pTrc-*cycA* dagegen zeigte eine sehr hohe Aufnahmerate von etwa $185 \text{ nmol (mg TG min)}^{-1}$, was in etwa der vierfachen V_{max} des Wildtyps entspricht. Zusätzlich fällt hier ein

sehr hoher Hintergrund von etwa 100 mM auf. Die Daten zeigen, dass die fehlende β -Alanin-Aufnahmeaktivität von CAG12073 durch die plasmidcodierte Expression von *cycA* wiederhergestellt werden kann. Dies impliziert eine korrekte Faltung und die Integration des CycA-Proteins in die Cytoplasmamembran.

Wie in Kapitel 3.1.1 gezeigt, wurde für MG1655 eine maximale der β -Alanin-Aufnahmerate von etwa $46 \text{ nmol (mg TG min)}^{-1}$ ermittelt. Im Folgenden wurde untersucht, ob diese durch die Überexpression des *cycA*-Gens gesteigert werden kann. Kompetente MG1655-Zellen wurden durch pTrc99a und pTrc-*cycA* transformiert, woraus die Stämme MG1655/pTrc99a und MG1655/pTrc-*cycA* resultierten. Abbildung 3.10 zeigt die β -Alanin-Aufnahme der Zellen bei einer Substratkonzentration von 10 mM. Für MG1655/pTrc99a wurde die anfängliche Aufnahmerate mit $41 \text{ nmol (mg TG min)}^{-1}$ ermittelt – einem mit dem Wildtyp vergleichbaren Wert. MG1655/pTrc-*cycA* weist dagegen eine Rate von $241 \text{ nmol (mg TG min)}^{-1}$ auf, was einer nahezu sechsfachen Steigerung gegenüber der Kontrolle entspricht. Die Zellen erreichten so innerhalb von 105 Sekunden eine intrazelluläre β -Alanin-Konzentration von mindestens 170 mM (nach Abzug des Hintergrundes). Der Versuch zeigt, dass sich durch die Überexpression von *cycA* auch in MG1655 eine erheblich Steigerung der β -Alanin-Aufnahmeaktivität erzielen lässt.

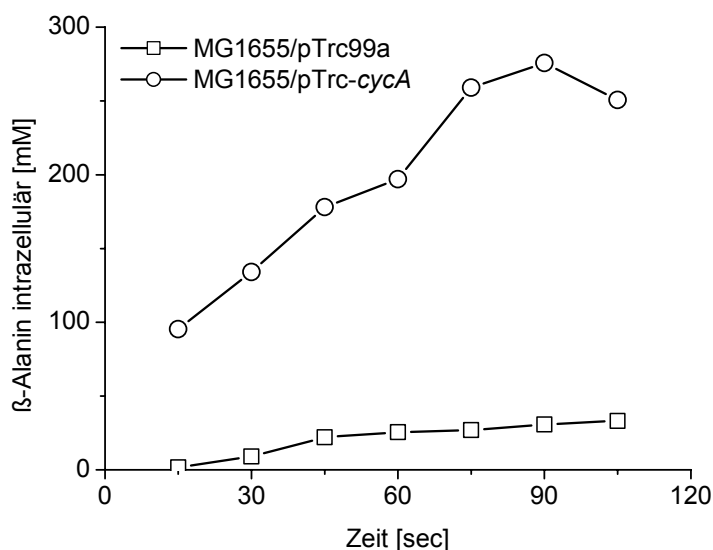


Abbildung 3.10: Aufnahme von β -Alanin durch MG1655/pTrc99a und MG1655/pTrc-*cycA* bei 10 mM Substratkonzentration. Die Zellen wurden zu den gegebenen Zeitpunkten durch Silikonölzentrifugation vom Medium getrennt. Das Cytoplasma wurde aufgearbeitet und der Gehalt an β -Alanin mit Hilfe der HPLC bestimmt. Die gezeigten Daten wurden in jeweils zwei zueinander zeitversetzten Experimenten ermittelt.

3.1.8 Das Plasmid pTrc-cycA verursacht eine hohe Sensibilität gegenüber β -Alanin.

Bei der Arbeit mit MG1655/pTrc-cycA zeigte sich, dass diese Zellen extrem empfindlich gegen β -Alanin sind. In Abbildung 3.11 ist das Wachstumsverhalten von MG1655/pTrc-cycA nach Gabe verschiedener β -Alanin Konzentrationen dargestellt. Eine M9-Kultur der Zellen wurde bis zu einer OD_{600} von 1,3 kultiviert, aufgeteilt und dann β -Alanin auf die angegebenen Konzentrationen zugesetzt. Als Vergleichsstamm diente MG1655/pTrc99a ohne β -Alanin-Zusatz. Wie die Abbildung zeigt, hemmte schon 1 mg/l (= 11 μ M) β -Alanin das weitere Wachstum von MG1655/pTrc-cycA in M9-Medium deutlich. Bei mehr als 10 mg/l (= 112 μ M) stellten die Zellen das Wachstum vollständig ein.

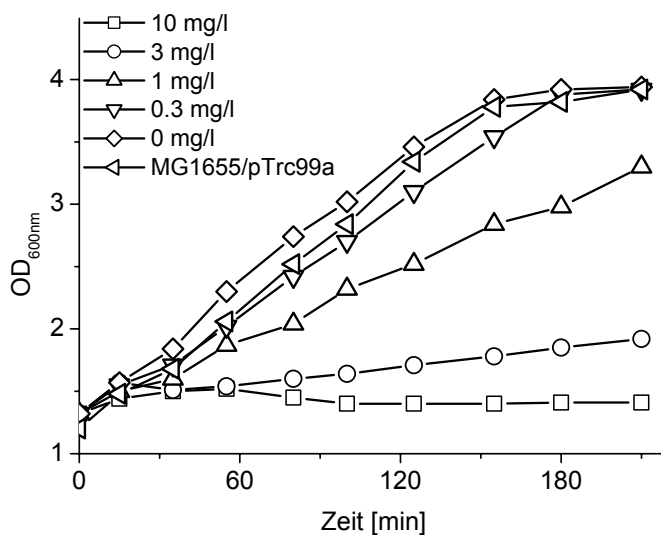


Abbildung 3.11: Wachstum von MG1655/pTrc-cycA in M9-Minimalmedium nach Zusatz von β -Alanin auf Endkonzentrationen von 0–10 mg/l bei $OD_{600}=1,3$. Als Vergleich ist das Wachstum von MG1655/pTrc99a ohne β -Alanin-Zusatz gezeigt.

Die Abbildung 3.12 zeigt die Auswirkungen höherer β -Alanin-Konzentrationen. MG1655/pTrc-cycA und MG1655/pTrc99a wurden in M9-Minimalmedium bis zu einer OD_{600} von 1,88 bzw. 2,25 kultiviert. Anschließend wurde den Kulturen β -Alanin mit einer Endkonzentration von 891 mg/l (= 10 mM) zugesetzt und das weitere Wachstum verfolgt. Wie in der Abbildung dargestellt, führte β -Alanin hier sogar zur Lyse von MG1655/pTrc-cycA. Die OD_{600} fiel innerhalb von 90 Minuten um fast eine Einheit auf 1,34 ab und die Kultur bekam eine zähflüssige Konsistenz. MG1655/pTrc99a wuchs dagegen während des gesamten Experiments normal weiter. Andere Versuche zeigten, dass MG1655/pTrc99a und MG1655 selbst bei 18 g/l β -Alanin (einer typischerweise für die Pantothenat-Produktion eingesetzten Konzentration) mit nur wenig verminderter Geschwindigkeit wachsen (Daten nicht gezeigt). Erfolgt die Kultivierung von MG1655/pTrc-cycA in LB-Vollmedium, so sind die Zellen β -Alanin-resistent (Daten nicht gezeigt). Aus den Versuchen wird geschlossen, dass die

Überexpression des Gens *cycA* bei der Kultivierung in Minimalmedium eine extreme Sensibilität gegenüber β -Alanin verursacht.

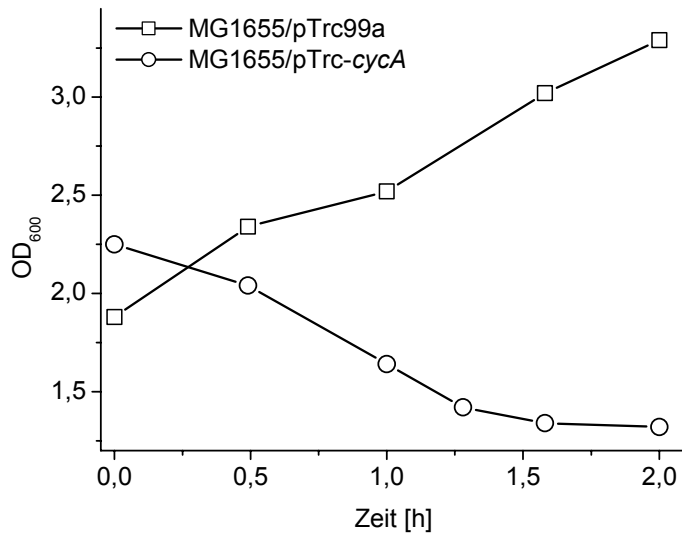


Abbildung 3.12: Wachstum von MG1655/pTrc-*cycA* und MG1655/pTrc99a in M9-Minimalmedium nach Zusatz von β -Alanin auf eine Endkonzentration von 891 mg/l (10 mM).

3.1.9 Auswirkungen der Überexpression von *cycA* in FV5069 auf die Pantothenat-Produktion.

FV5069 ist ein hochentwickelter Produktionsstamm, der bei 2 % β -Alanin in speziellen Medien bis zu 18 g/l Pantothenat produziert (Hikichi *et al.*, 1996). Industriell wird er zusammen mit Plasmiden eingesetzt, welche die verstärkte Expression von Genen der Pantothenat-Biosynthese erlauben (Moriya *et al.*, 1999). Durch Transformation von FV5069 mit pTrc-*cycA* bzw. pTrc99a wurde im Folgenden untersucht, ob sich die Überexpression von *cycA* positiv auf die Pantothenatproduktion auswirkt. Da auch FV5069/pTrc-*cycA* empfindlich auf β -Alanin reagierte, wurde der Produktionsassay mit einer Konzentration von 25 μ M in M9-Medium durchgeführt. Abbildung 3.13A zeigt das Wachstum von MG1655/pTrc99a und MG1655/pTrc-*cycA*. MG1655/pTrc-*cycA* besaß eine deutlich verlängerte *lag*-Phase, und die Zellen teilten sich auch in der exponentielle Phase langsamer als die des Kontrollstammes. Dieser Wachstumsnachteil ist auf das β -Alanin im Medium zurückzuführen, da der Stamm ohne β -Alanin normal wuchs (Daten nicht gezeigt). Die Pantothensäure-Konzentration im Medium der FV5069/pTrc-*cycA*-Kultur lag dagegen während des gesamten Versuchs nur wenig unter derjenigen von FV5069/pTrc99a (Abbildung 3.13B). Als ein direktes Maß für die Produktionsleistung jeder einzelnen Zelle kann die spezifische Produktivität (das Verhältnis von produzierter Pantothensäure zur

Biomasse) angesehen werden. Während eines Zeitraumes von 8 bis 18 Stunden lag diese bei FV5069/pTrc-*cycA* etwa doppelt so hoch, wie bei FV5069/pTrc99a (Abbildung 3.13C). Somit hatte sich auch die Produktionsleistung jeder Zelle im Vergleich zur Kontrolle verdoppelt. Aus den Daten wird deshalb geschlossen, dass die Syntheserate von Pantothersäure im Stamm FV5069 durch eine gesteigerte β -Alanin-Aufnahme deutlich verbessert werden kann.

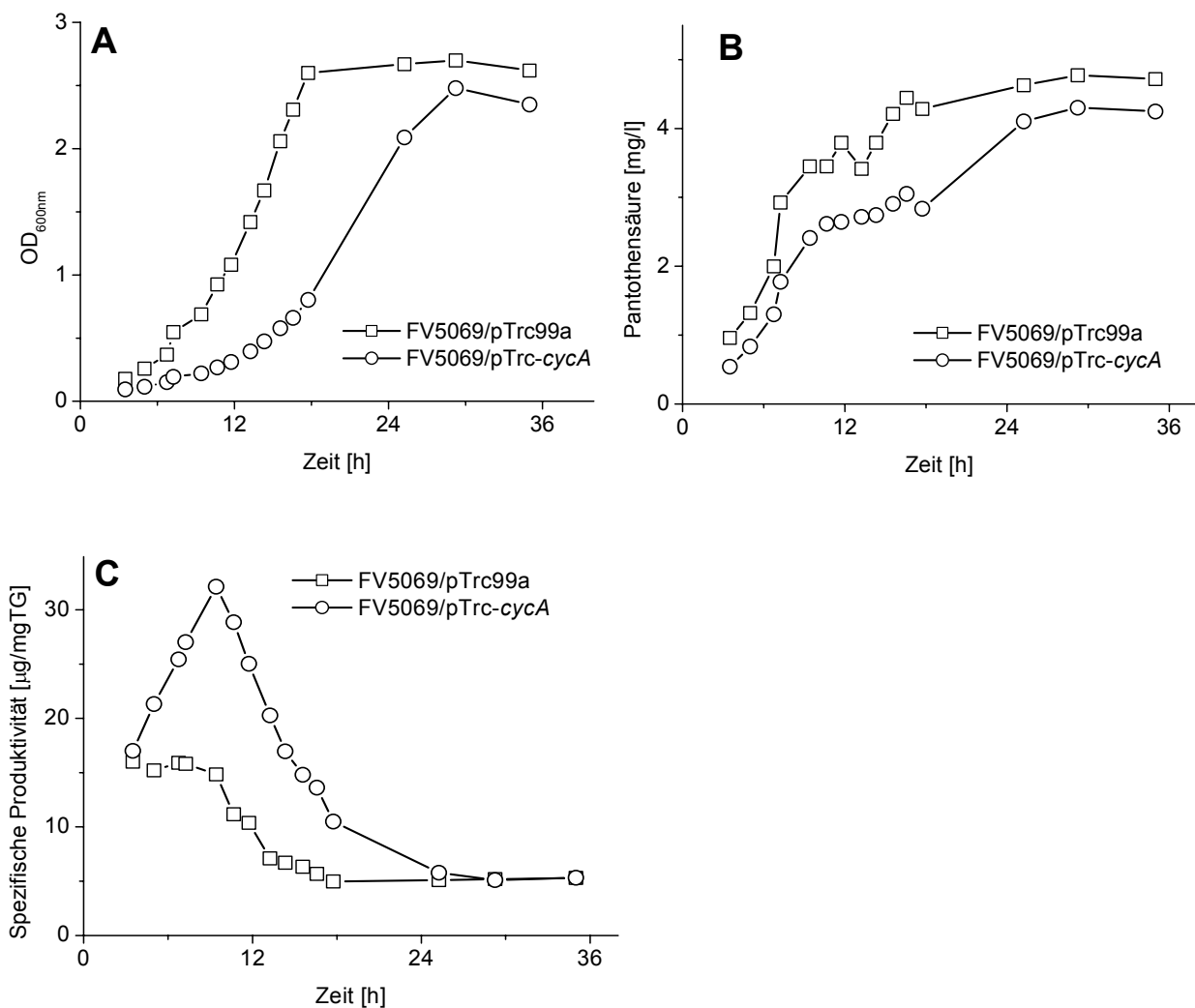


Abbildung 3.13: Pantothenatproduktion der Stämme FV5069/pTrc99a und FV5069/pTrc-*cycA* in M9-Minimalmedium bei 25 μ M β -Alanin. **A.** Wachstum der Kulturen. **B.** Pantothersäurekonzentration im Medium. **C.** Spezifische Produktivität von Pantothersäure. Pantothersäure-Konzentrationen wurden anhand des Wachstum von *C. glutamicum* R127panC::pK18mob'panC' ermittelt.

3.2 Aufbau einer Mutantenbank mit Hilfe des Transposons *TnphoA*.

Neben der Aufnahme von β -Alanin ist auch die Exkretion des Produktes für die Pantothen säure-Produktion entscheidend. Das hierfür verantwortliche Transportprotein sollte mit Hilfe einer *TnphoA*-Mutantenbank identifiziert werden. Deren Analyse sollte zusätzlich dazu dienen, Verflechtungen der Pantothen säure-Biosynthese mit anderen Stoffwechselwegen aufzudecken.

3.2.1 Aufbau der *TnphoA*-Mutantenbank.

Das Transposon *TnphoA*. *TnphoA* ist ein Derivat von Tn5 (Manoil und Beckwith, 1985). Von diesem stammt das für die Transposase codierende Gen *tnpA* sowie das Kanamycin-Resistenzgen *aph(3')-II*, welches die Selektion der Integrationsmutanten erlaubt (Abbildung 3.14). Direkt anschließend an den linken *inverted repeat* befindet sich das promotorlose Gen *phoA*, welches für eine Alkalische Phosphatase ohne Signalpeptid codiert. Dieses Enzym ist aufgrund der Notwendigkeit Disulfidbrücken auszubilden nur im oxydierenden extrazellulären Milieu aktiv (Manoil *et al*, 1990). Integriert das Transposon in der richtigen Orientierung in ein aktiv transkribiertes Gen, so entsteht ein gemeinsames Transkript aus dem Anfang des Gens, der Sequenz der *inverted repeats* und *phoA*. Wenn die Integration zusätzlich *in frame* erfolgte, so wird diese mRNA in ein PhoA-Fusionsprotein translatiert. Wird der PhoA-Bereich dieses Fusionsproteins dann - etwa durch Sekretion ins Periplasma oder als Teil eines Transmembranproteins - außerhalb des Cytoplasmas lokalisiert, so besitzt er Phosphataseaktivität. Diese lässt sich leicht mit Hilfe des Indikators BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyolphosphat) nachweisen, durch dessen Hydrolyse ein intensiv blauer Farbstoff entsteht. Die blau/weiß-Selektion sollte bei der Erstellung der Mutantenbank zu einer Anreicherung von Klonen mit Mutationen in Transmembranproteinen führen und so die Chancen zur Identifikation des Pantothenat-Exporters erhöhen.

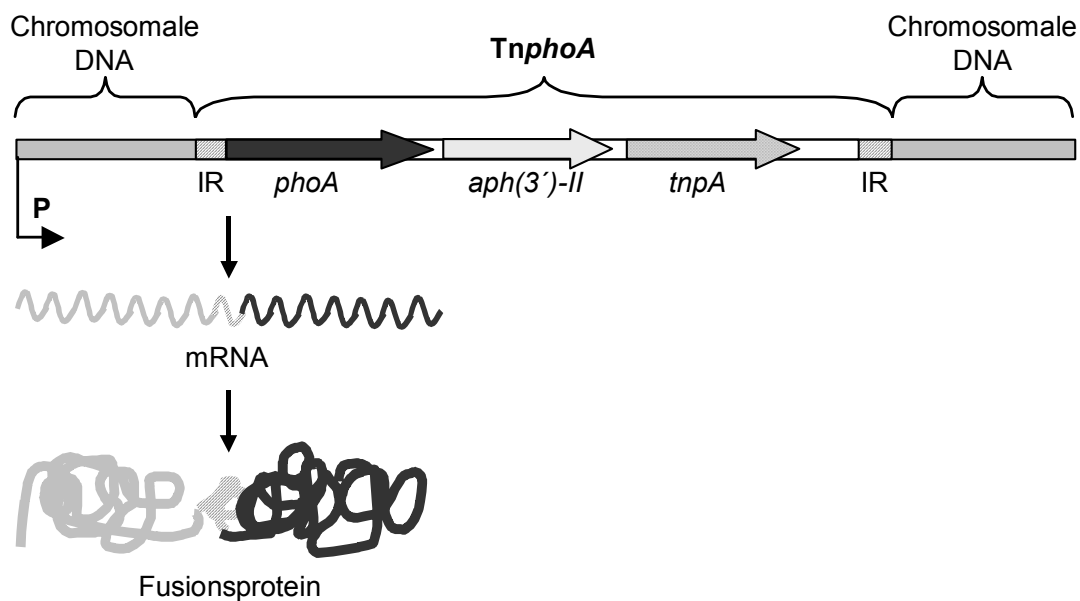


Abbildung 3.14: Funktionsweise des Transposons *TnphoA*. Unmittelbar an den linken *inverted repeat* (IR) schließt das für Alkalische Phosphatase codierende Gen *phoA* an. Integriert das Transposon in der richtigen Orientierung in ein transkribiertes Wirtsgen, so entsteht ein gemeinsames Transkript. Bei der Integration *in frame* entsteht daraus ein Fusionsprotein aus dem Produkt des getroffenen Gens und der Alkalischen Phosphatase PhoA. *aph(3')-II*: Kanamycin-Resistenzgen; *tnpA*: Transposase; P: Promotor des betroffenen Gens.

Deletion des Gens *phoA* in MG1655. Auch für die Transposonmutagenese sollte *E. coli* MG1655 als Stammhintergrund dienen, da dieser bereits vollständig sequenziert wurde (Blattner *et al.*, 1997) und die Daten beim *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) frei zugänglich sind. Vorversuche mit MG1655 ergaben, dass die Zellen eine eigene Phosphataseaktivität zeigen und somit auf BCIP-haltigem Agar immer blaue Kolonien bilden. Aus diesem Grund musste zunächst das chromosomal codierte *phoA*-Gen deletiert werden. Für die Deletion wurde das von Link *et al.* (1997) entwickelte pKO3 System verwendet. *phoA* wurde hiermit vollständig durch eine 33 bp lange *nonsense*-Sequenz ersetzt, ohne die flankierenden Gene *yaiB* und *psiF* zu beschädigen (Abbildung 3.15). Der daraus resultierende Stamm MG1655 Δ *phoA* zeigte sowohl in Minimal- als auch in Vollmedium ein normales Wachstum. Wurden diese Zellen auf BCIP-haltigem Agar ausgestrichen und bei 37°C - 44°C inkubiert, so bildeten auch sie blaue Kolonien. Erst durch die Erniedrigung der Inkubationstemperatur auf 30°C konnten cremefarbene Kolonien erhalten werden, welche ein *screening* auf Phosphataseaktivität erlaubten.

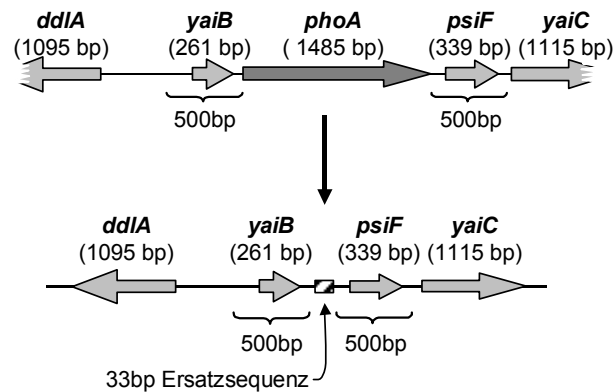


Abbildung 3.15: Schematische Darstellung der *phoA*-Deletion in MG1655. Das 1485 bp große Gen *phoA* wurde durch eine 33 bp *nonsense*-Sequenz ersetzt und der daraus resultierende Stamm mit MG1655 Δ *phoA* bezeichnet.

Generierung von MG1655 Δ *phoA* Transposonmutanten. Das Transposon *TnphoA* wurde mit Hilfe des *delivery*-Vektors pRT733 (Taylor *et al.*, 1989) durch Elektroporation in die Zellen eingebracht. Dieses Plasmid besitzt den Replikationsursprung *oriR6L*, der nur in *pir*⁺ Stämmen die Replikation ermöglicht. *E. coli* MG1655 Δ *phoA* besitzt das *pir*-Gen nicht. Klone mit chromosomalen *TnphoA*-Integrationen konnten somit aufgrund ihrer Resistenz gegen Kanamycin selektiert werden. Das zusätzlich im Agar vorhandene BCIP ermöglichte außerdem die Identifizierung von Klonen mit aktiver Alkalischer Phosphatase.

Nach 24-stündiger Inkubation bei 30°C zeigten lediglich 0,4% der Integrationsmutanten eine deutliche Blaufärbung. Nach 24 weiteren Stunden bekamen zusätzliche Kolonien eine blassblaue Farbe, so dass sich der Anteil der gesuchten Klone auf etwa 1,5% erhöhte. Diese Zellen wurden in Mikrotiterplatten mit TYGPN- oder LB-Medium gesammelt, dann in *casaminoacids*-Medium zwischenkultiviert und bis zur Analyse eingefroren. Auf diese Weise wurde eine *TnphoA*-Mutantenbank mit einem Umfang von insgesamt 7100 verschiedenen Klonen aufgebaut.

3.2.2 Etablierung eines Verfahrens zur Identifikation von Mutanten mit veränderter Pantothersäure-Exkretion.

Unter den Transposonmutanten mussten solche gefunden werden, die ein verändertes Exkretionsverhalten für Pantothersäure zeigen. Hierfür wurde ein *crossfeeding*-Test entwickelt, in dem der Pantothersäure-auxotrophe *C. glutamicum*-Stamm R127*panC*::pK18*mob'panC'* als Indikator diente. Zellen des Indikatorstammes wurden in Agarplatten eingegossen, auf denen dann die *E. coli*-Mutanten ausgestrichen und kultiviert

wurden. Die Pantothensäure-Exkretion durch die *E. coli*-Mutanten induzierte die Bildung von Höfen aus *C. glutamicum* R127*panC*::pK18*mob*'*panC*'-Zellen. Klone mit einem veränderten Exkretionsverhalten ließen sich dann durch ihre größeren oder kleineren Höfe identifizieren. Wie sich zeigte, machte die Etablierung dieses Verfahrens jedoch zunächst die Lösung einiger praktischer Probleme notwendig.

Ermittlung eines geeigneten Mediums. Für die Kultivierung von *E. coli* und *C. glutamicum* werden in der Regel unterschiedliche Medien verwendet – hier musste aber ein Pantothensäure-freies Nährmedium gefunden werden, auf dem beide Arten gut gedeihen. Dazu wurde das Wachstum von *C. glutamicum* R127*panC*::pK18*mob*'*panC*' und einigen zufällig ausgewählten MG1655Δ*phoA*::T*nphoA*-Mutanten auf jeweils vier verschiedenen Minimalagar- sowie auf BHI-Platten untersucht. Alle Platten enthielten 25 µg/ml Kanamycin und für die Kultivierung des Indikatorstammes zusätzlich 20 µg/l Calcium-Pantothenat.

Die Eignung folgender Medien wurden untersucht:

- M9-Minimalmedium (Sambrook *et. al.*, 1989)
- Vogel/Bonner Minimalmedium E (Vogel und Bonner, 1956)
- CgC-Minimalmedium (wie GCXII, Keilhauer *et al.*, 1993)
- MM1-Minimalmedium
- BHI-Vollmedium (Difco Laboratories, Sparks, USA)

Es wurden etwa 100 Zellen pro Platte ausgestrichen und für 48 Stunden bei 37°C (*E. coli*) bzw. 30°C (*C. glutamicum*) inkubiert. Tabelle 3.1 zeigt die relative Größe der Kolonien. Beide Stämme bildeten auf den verschiedenen Minimalmedien relativ kleine Kolonien. Auf BHI wuchs *C. glutamicum* R127*panC*::pK18*mob*'*panC*' zwar gut, *E. coli* dagegen gar nicht.

Tabelle 3.1: Größe der Kolonien von *E. coli* MG1655Δ*phoA*::T*nphoA* und *C. glutamicum* R127*panC*::pK18*mob*'*panC*' auf verschiedenen Sorten Nähragar. Alle Agarplatten enthielten 25 µg/ml Kanamycin. Für *C. glutamicum* wurde zusätzlich 20 µg/ml Calcium-Pantothenat zugesetzt. Die Inkubation erfolgte für 48 Stunden bei 37°C (*E. coli*) bzw. 30°C (*C. glutamicum*).

	M9	Vogel/Bonner MME	CgC	MM1	BHI
<i>E. coli</i>	o	o	-	o	--
<i>C. glutamicum</i>	-	-	-	-	++

(++: sehr groß; +: groß; o: mittel; -: klein; --: wächst nicht)

Optimierung der Minimalmedien. Durch verschiedene Zusätze wurde versucht, die Eignung der Minimalmedien zu optimieren. Mit BHI-Agar wurde nicht weiter gearbeitet.

Die folgenden Substanzen wurden den Medien zugesetzt (pro Liter):

- 1 ml 1M MgSO₄
- 1 ml 100mM CaCl₂
- 100 µl 200µg/ml Biotin
- 100 µl *C. glutamicum* Spurensalze

Zusätzlich musste der Glucosegehalt angepasst werden. Medien für *C. glutamicum* weisen in der Regel $\geq 2\%$ Glucose auf, wogegen für *E. coli* meist 0,4%-0,5% eingesetzt werden. Es zeigte sich, dass 1% Glucose beiden Bakterienarten auf geeigneten Medien ein recht gutes Wachstum ermöglichte (*E. coli* auf M9-Agar und *C. glutamicum* auf CgC-Agar). Daher wurde diese Konzentration für die weiteren Versuche gewählt. Die modifizierten Medien mit 1% Glucose werden im Folgenden mit einem „+“ gekennzeichnet. Die Tabelle 3.2 zeigt, dass beiden Bakterienarten sowohl auf M9⁺, als auch auf MM1⁺-Agar ein gutes Wachstum möglich war.

Tabelle 3.2: Größe der Kolonien von *E. coli* MG1655 Δ phoA::TnphoA und *C. glutamicum* R127panC::pK18mob'panC' auf verschiedenen Sorten Nähragar mit den oben genannten Zusätzen. Die Glucose-Konzentration betrug 1% und alle Agarplatten enthielten 25 µg/ml Kanamycin. Für die Kultivierung von *C. glutamicum* wurde 20 µg/ml Calcium-Pantothemat zugesetzt. Die Inkubation erfolgte für 48 Stunden bei 37°C (*E. coli*) bzw. 30°C (*C. glutamicum*).

	M9 ⁺	Vogel/Bonner MME ⁺	CgC ⁺	MM1 ⁺
<i>E. coli</i>	+	+	o	+
<i>C. glutamicum</i>	+	o	++	+

(++: sehr groß; +: groß; o: mittel; -: klein; --: wächst nicht)

Ermittlung einer geeigneten Inkubationstemperatur. Die optimale Wachstumstemperatur von *C. glutamicum* beträgt etwa 30°C, wogegen *E. coli*-Zellen höhere Temperaturen von 37-40°C bevorzugen. Um eine Temperatur zu ermitteln, die beiden Bakterienarten ein zufriedenstellendes Wachstum ermöglicht, wurden sowohl MG1655 Δ phoA::TnphoA, als auch

C. glutamicum R127*panC*::pK18*mob'panC'* auf MM1⁺-Agar ausgestrichen und für 48 Stunden bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Danach wurde die relative Koloniegröße bestimmt. Wie aus Tabelle 3.3 ersichtlich, bildete *C. glutamicum* auf MM1⁺-Agar bei Temperaturen oberhalb von 34°C keine Kolonien. Bei 30°C zeigten dagegen sowohl *E. coli*, als auch *C. glutamicum*-Zellen ein ausreichendes Wachstum, so dass diese Inkubationstemperatur einen guten Kompromiss darstellt.

Tabelle 3.3: Größe der Kolonien von *E. coli* MG1655Δ*phoA*::T*nphoA* und *C. glutamicum* R127*panC*::pK18*mob'panC'* auf MM1⁺-Agar bei verschiedenen Temperaturen. Die Glucose-Konzentration betrug 1% und alle Agarplatten enthielten 25 µg/ml Kanamycin. Für die Kultivierung von *C. glutamicum* wurde 20 µg/ml Calcium-Pantothenat zugesetzt. Die Inkubation erfolgte für 48 Stunden.

	RT	30°C	32°C	34°C	36°C	38°C	40°C
<i>E. coli</i>	-	o	o	+	+	+	+
<i>C. glutamicum</i>	o	+	o	-	--	--	--

(++: sehr groß; +: groß; o: mittel; -: klein; --: wächst nicht)

3.2.3 Screening der Mutantenbank („Plattentest“).

Im ersten *screening* der Mutantenbank (im Folgenden als „Plattentest“ bezeichnet) auf MM1⁺-Agar mit eingegossenen *C. glutamicum* R127*panC*::pK18*mob'panC'*-Zellen wurden die Testplatten für 48 Stunden bei 30°C inkubiert und danach begutachtet. Auffällig war ein recht ungleichmäßiges Wachstum sowohl der *E. coli*-Mutanten als auch der *C. glutamicum*-Höfe. Eine gleichmäßige Größe ist jedoch von entscheidender Wichtigkeit, um Klone mit veränderter Pantothensäure-Exkretion vom Durchschnitt unterscheiden zu können. Durch die Verwendung von M9⁺-Agar ergab sich ein etwas homogeneres Bild, so dass dieses Medium im Plattentest Verwendung fand. Der Zusatz von 2,5 g/l Aminosäuren (*casaminoacids*, Difco, Sparks, USA) verbesserte das Wachstum der Transposonmutanten deutlich, jedoch führte dies grundsätzlich zur Bildung kleinerer Höfe und teilweise zu einem deutlich veränderten Exkretionsverhalten. Deshalb wurde die gesamte Mutantenbank dreimal sowohl mit, als auch ohne Aminosäurezusatz im Plattentest durchgemustert. Dadurch konnten 43 Klone ermittelt werden, welche deutlich kleinere oder größere Höfe induzierten (Tabelle 3.4).

3.2.4 Direktsequenzierung genomischer DNA von Mutanten mit veränderter Pantothersäure-Exkretion.

Um den Integrationsort eines Transposons zu sequenzieren, ist es normalerweise nötig, das Genom zunächst mit Restriktionsenzymen zu spalten und in einem Plasmid (z.B. pUC18/19) zwischen zu klonieren. Klone mit dem relevanten Sequenzabschnitt lassen sich nach der Transformation aufgrund der Antibiotikaresistenz des Transposons selektieren, vermehren und erst nach einer Plasmidpräparation sequenzieren. Da eine solche Strategie relativ aufwendig ist, wurde ein Verfahren etabliert, um genomische DNA der Transposonmutanten direkt zu sequenzieren.

Die genomische DNA interessanter Klone wurde mit Hilfe von „Genomic-tip 100/G“-Säulen der Firma Qiagen (Hilden) präpariert, welche eine reproduzierbar gute DNA-Qualität und Ausbeute gewährleisteten. Für die *primer*-Verlängerung wurden Oligonukleotide gewählt, die jeweils zum Anfang und zum Ende des Transposons komplementär sind und in Richtung der benachbarten genomischen Abschnitte verlängert werden. Das für die Sequenzierung verwendete Verfahren basierte auf einem Protokoll von Heiner *et al.* (1998), welches verschiedenen Punkten angepasst wurde (siehe Kapitel 2.3.6). Bei den insgesamt 43 Klonen, die im Plattentest einen interessanten und reproduzierbaren Phänotyp zeigten, konnte das von der *TnphoA*-Integration betroffene Gen ansequenziert werden. Zur Identifikation schloss sich eine Standard BLASTn-Suche (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST/>) mit den ermittelten DNA-Sequenzen an (Tabelle 3.4). So konnte der Integrationsort des Transposons in der Regel bis auf die Base genau bestimmt werden, wodurch sich die Klone 14F1/14G2, 29H11/30F8 sowie 70B3/74D4/74D7 als identisch erwiesen. Bei den 39 unabhängigen Mutanten integrierte das Transposon 21-mal in Gene für cytoplasmatische Proteine, 9-mal in Gene für Proteine der Cytoplasmamembran, 6-mal in Gene für periplasmatische Proteine und 3-mal in Gene, über deren Lokalisation nichts bekannt ist. Von den 2656 durch Blattner *et al.* (1997) klassifizierten Genen codieren circa 25% für Proteine mit extracytoplasmatischen Bereichen. Die Anreicherung von Transposonmutationen in solchen Genen war mit 42% daher nur mäßig erfolgreich. Um Auxotrophien zu erkennen, wurden die Mutanten zusätzlich für 48 Stunden bei 37°C in Mikrotiterplatten mit M9-Minimalmedium kultiviert. Klone die hier kein Wachstum zeigten, sind in der Tabelle 3.4 gekennzeichnet.

Tabelle 3.4: Bei 43 *TnphoA*-Mutanten, die im Plattentest einen interessanten Phänotyp zeigten, wurde das jeweils betroffene Gen ansequenziert und durch eine BLASTn-Suche identifiziert (Spalte 2). Identische Klone sind in einer Zeile zusammengefasst, voneinander unabhängige Integrationen in das gleiche Gen werden dagegen separat aufgeführt. Die zu erwartende oder bereits nachgewiesene Lokalisation der Genprodukte ist in Spalte 3 angegeben (C: Cytoplasma; M: Cytoplasmamembran; P: Periplasma; ?: unbekannt). Die relativen Größen der induzierten Höfe im Plattentest sind in den Spalten 4 (ohne *casaminoacids*) und 5 (mit *casaminoacids*) gezeigt (++: sehr groß; +: groß; o: durchschnittlich; -: klein; --: kein Hof; sw: schlechtes Wachstum der Mutante; kw: kein Wachstum der Mutante). Die letzte Spalte gibt an, ob der Klon in M9-Flüssigmedium wuchs (✓: ja; -:nein).

Klon	Gen	Lokalisation	Hofgröße ohne Aminosäuren	Hofgröße 0,25% Aminosäuren	Wachstum in M9
3F6	<i>hns</i>	C	sw	--	✓
10F2	<i>hdeA</i>	P	+	++	✓
13E7	<i>ilvH</i>	C	o	-	✓
14F1 14G2	<i>cysG</i>	C	kw	++	-
15F5	<i>recC</i>	C	-	-	✓
16F12	<i>cspC</i>	C	++	++	✓
20E4	<i>cspC</i>	C	+	+	✓
25G8	<i>dcd</i>	C	++	++	✓
27C2	<i>dcd</i>	C	(+)	+	✓
28A10	<i>brnQ</i>	M	-	o	✓
28H1	<i>dcd</i>	C	++	++	✓
29H11 30F8	<i>aspC</i>	C	-	-	✓
30E5	<i>zwf</i>	C	sw	-	✓
35E7	<i>yicL</i>	M	+	++	✓
37E4	<i>exbB</i>	M	sw	-	✓
38E1	<i>lepA</i>	M	-	(+)	✓
38G6	<i>lpp</i>	P	sw	+	✓
39B6	<i>yicL</i>	M	+	+	✓

43A10	<i>lysA</i>	C	kw	+	-
43C4	<i>degS</i>	P	-	++	✓
44G9	<i>aphA</i>	P	o	--	✓
45H1	<i>hdeA</i>	P	-	(+)	✓
46B12	<i>yicL</i>	M	o	+	✓
46C8	<i>ftsK</i>	M	o	-	✓
48D2	<i>clpP</i>	C	o	-	✓
49D3	<i>entA</i>	?	kw	--	-
49H4	<i>yicL</i>	M	(+)	+(+)	✓
57B3	<i>tolA</i>	P	(+)	+	✓
58C6	<i>pitA</i>	M	(-)?	+	✓
60A1	<i>gcvP</i>	C	-	(-)	✓
63B10	<i>icdA</i>	C	kw	+	-
64A5	<i>yjcX</i>	?	++	++	✓
67B6	<i>leuL</i>	C	kw	+	✓
67E7	<i>rpoC</i>	C	-	-	✓
68D12	<i>gcvP</i>	C	-	-	✓
69H6	<i>metJ</i>	C	-	-	✓
70B3 74D4 74D7	<i>himD</i>	C	+	+(+)	✓
71A5	<i>yieF</i>	?	o	+(+)	✓
73E5	<i>entA</i>	C	kw	sw,--	-

4. Diskussion

4.1 β -Alanin Aufnahme durch *E. coli*.

Im biotechnologischen Produktionsprozeß für D-Pantothensäure ist der Zusatz von β -Alanin unverzichtbar, da der Bedarf durch die endogene Biosynthese bei weitem nicht gedeckt wird (Hikichi *et al.*, 1996). Somit kommt der β -Alanin-Aufnahme eine entscheidende Bedeutung zu, da sich Limitierungen hier direkt auf die Produktivität auswirken können. Ein Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung dieses Transportprozesses und die Identifikation des verantwortlichen Aufnahmesystems, um damit einen neuen Ansatzpunkt zur gezielten Stammoptimierung zur Verfügung zu haben.

4.1.1 Biochemische Charakterisierung der β -Alanin Aufnahme.

Die Transportmessungen mit [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-markiertem β -Alanin zeigten, dass *E. coli* MG1655 das Substrat auf Konzentrationen anreichert, welche diejenigen im umgebenden Medium um das mehr als das 20-fache übersteigen (Kapitel 3.1.1). Dies lässt, zusammen mit der fast vollständigen Inhibition durch den Entkoppler CCCP, auf einen energieabhängigen Transportprozess schließen. Die Aufnahmeaktivitäten bei verschiedenen β -Alanin-Konzentrationen folgten einer Michaelis-Menten-Kinetik. Aus dieser konnte für stationäre Zellen in Minimalmedium ein K_m von etwa 2,4 mM und eine V_{\max} von etwa 46 nmol (mg TG min) $^{-1}$ abgeleitet werden. Während die V_{\max} in einer für Aminosäuretransporter typischen Größenordnung liegt, ist der K_m recht hoch. Dies deutet darauf hin, dass β -Alanin nicht das bevorzugte Substrat des gesuchten Transportsystems ist.

4.1.2 Identifikation und Überexpression des β -Alanin-Aufnahmesystems.

Arbeiten von King *et al.* (1995) und Brechtel *et al.* (1996) zeigten, dass β -Alanin bei millimolaren Konzentrationen an den GABA-Transporter GabP bindet. Daher wurde vermutet, dass GabP die β -Alanin-Aufnahme katalysiert. Die Transportmessungen mit dem Deletionsstamm MG1655 Δ gabP zeigten allerdings keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyp (Kapitel 3.2). Somit kann GabP nicht wesentlich an der Aufnahme von β -Alanin beteiligt sein.

Eine wichtige Spur zur Identifizierung des β -Alanin-Transporters lieferte die deutlich verminderte Aufnahmeaktivität von Zellen, die in LB-Vollmedium kultiviert wurden (Kapitel 3.3). Wie sich zeigte, wird die β -Alanin-Aufnahme durch den Zusatz von LB-Medium stark

gehemmt. Mit Hilfe von HPLC-Analysen konnte nachgewiesen werden, dass β -Alanin seinerseits die Aufnahme von L-Alanin inhibiert (Kapitel 3.4), was ein starker Hinweis auf den Transport von β -Alanin und L-Alanin durch ein gemeinsames Transportsystem ist. Die Aufnahme von L-Alanin wird in *E. coli* sowohl durch das primäre LIV-I-System-, als auch von dem sekundären Aminosäuretransporter CycA katalysiert (Antonucci *et al.*, 1985; Robbins and Oxender, 1973). Die starke Hemmung des β -Alanin-Transportes durch die CycA-Substrate Glycin und D-Cycloserin deutet auf CycA als das gesuchte System (Kapitel 3.5). Dies wird dadurch bestätigt, dass die Transportaktivität in der *cycA*-Mutante CAG12073 gegenüber dem Wildtyp um mehr als 87% vermindert war (Kapitel 3.6). Da sich die geringe Restaktivität nicht durch L-Leucin hemmen ließ, wird sie wahrscheinlich nicht durch LIV-I verursacht. *cycA* wurde erstmals als eine Mutation beschrieben, welche die Resistenz gegenüber D-Cycloserin zur Folge hat – einem Antibiotikum, das durch die kompetitive Hemmung der D-Alanin-D-Alanin-Ligase die Zellwand schädigt (Lugtenberg, 1972). Da die Aufnahme durch CycA erfolgt, sind *cycA* Mutanten gegen Cycloserin resistent (Wargel *et al.*, 1971). Ausserdem transportiert CycA L-Alanin, D-Alanin, Glycin und D-Serin (Wargel *et al.*, 1970; Cosloy, 1973) und ist an der Regulation des *glycine cleavage complex* (GCV) beteiligt, indem es die intrazelluläre Glycin-Konzentration kontrolliert (Ghris und Stauffer, 1995). CycA gehört, wie auch GabP, zur Familie der Aminosäuretransporter (Jack *et al.*, 2000), einer Gruppe von Aminosäure/Polyamin/Organokation-Transportern (APC). Hydrophobizitätsplots lassen auf die Existenz von 12 Transmembranhelices schließen und wahrscheinlich dient der Cotransport von Protonen als Energiequelle (<http://www.expasy.org/cgi-bin/sprot-search-ac?P39312>). Die Expression des *flkB-cycA*-Operons wird durch das *nitrogen assimilation control* (NAC)-Protein reguliert, welches ein Bestandteil der NtrC-Kaskade zur Stickstoffkontrolle ist (Zimmer *et al.*, 2000).

Zur Überexpression des *cycA*-Gens wurde das Plasmid pTrc-*cycA* kloniert, mit dessen Hilfe sich die β -Alanin-Aufnahme durch CAG12073 wiederherstellen ließ (Kapitel 3.7). Dies beweist, dass CycA tatsächlich für die Aufnahme von β -Alanin verantwortlich ist. Die für den Stamm MG1655/pTrc-*cycA* gemessene, gegenüber dem Kontrollstamm fast sechsfach höhere Aufnahmerate, zeigt zudem das Potential zur Verbesserung dieses Transportprozesses. Eine weitere, bisher allerdings unverständliche Auswirkung der *cycA*-Überexpression ist die extreme Sensitivität der pTrc-*cycA*-Stämme gegenüber β -Alanin (Kapitel 3.8), die bei höheren Substratkonzentrationen sogar zur Lyse der Zellen führt (Abbildung 3.12). Bei MG1655/pTrc-*cycA* verursachen schon Konzentrationen von mehr als 3 mg/l (0,034 mM)

einen fast vollständigen Wachstumsstopp, der nicht allein durch hohe intrazelluläre β -Alanin-Konzentrationen verursacht werden kann: bei 3 mg/l und einer $OD_{600}=1,3$ (wie in Abbildung 3.11) würde die Aufnahme des gesamten Substrates zu einer intrazellulären β -Alanin-Konzentration von etwa 38 mM führen. Bei 10 mM β -Alanin wurden vergleichbare Konzentrationen jedoch von MG1655 (Daten nicht gezeigt) und MG1655/pTrc99a (Abbildung 3.10) schon schnell erreicht, behinderten hier aber nicht das Wachstum. Auch ein besonders schneller Anstieg des cytoplasmatischen β -Alanin-Gehaltes scheidet als Ursache aus: anhand der Michaelis-Menten-Gleichung lässt sich bei MG1655/pTrc-*cycA* mit der Aufnahmerate von 241 nmol/(mg TG min) bei 10 mM β -Alanin (Kapitel 3.1.7) und $K_m=2,4$ mM eine V_{max} von ca. 292 nmol/(mg TG min) extrapolieren. Bei 3 mg/l (= 0,034 mM) β -Alanin ergibt sich daraus eine Rate von etwa 4,1 nmol/(mg TG min). Dieser Wert beträgt nur gut 10% der Transportrate von MG1655 bei 10 mM β -Alanin (vgl. Abbildung 3.2), welche die Zellen nicht am Wachstum hindert. Die Sensitivität ist auch nicht auf den Stammhintergrund MG1655 zurückzuführen, da FV5069/pTrc-*cycA* ebenfalls sehr empfindlich auf β -Alanin reagierte. Ihre Ursache bleibt daher aufgrund der bisherigen Daten im Unklaren. Möglicherweise kann das Problem durch eine striktere Kontrolle der *cycA*-Expression in einem anderen Plasmidsystem gelöst werden. Ausserdem sollte der Zusatz komplexer Medienbestandteile (z.B. Maisquellwasser) durch kompetitive Effekte von Glycin oder L-Alanin ebenfalls zur Verringerung der β -Alanin Sensibilität beitragen können.

4.1.3 Überexpression von *cycA* im Produktionsstamm FV5069.

Um den Einfluss einer gesteigerten β -Alanin-Aufnahme auf die Pantothersäure-Biosynthese im Produktionsstamm FV5069 (Hikichi *et al.*, 1996) zu untersuchen, wurde dieser durch die Plasmide pTrc-*cycA* und pTrc99a transformiert (Kapitel 3.1.9). Da auch FV5069/pTrc-*cycA* sehr sensitiv gegenüber β -Alanin war, konnte dem Produktionsmedium nur eine sehr geringe β -Alanin-Konzentration zugesetzt werden. Obwohl der Stamm gegenüber MG1655/pTrc99a einen deutlichen Wachstumsnachteil besaß (Abbildung 3.13A), produzierte er nur geringfügig weniger Pantothersäure (Abbildung 3.13B). Die spezifische Produktivität lag daher über einen weiten Bereich doppelt so hoch, wie bei MG1655/pTrc99a. Somit bewirkte die Überexpression von *cycA* in diesem Zeitfenster eine Verdopplung der Produktionsleistung jeder einzelnen Zelle. Abschließend kann konstatiert werden, dass die Überexpression von *cycA* eine neue Möglichkeit zur Steigerung der β -Alanin-Aufnahme darstellt, die in Zukunft zur gezielten Verbesserung von Produktionsstämmen genutzt werden könnte.

4.2 Analyse der *TnphoA* Mutantenbank von MG1655 Δ *phoA*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Klonbank von *E. coli* MG1655 Δ *phoA* mit etwa 7100 *TnphoA*-Insertionsmutanten aufgebaut und ein Verfahren entwickelt, um deren Fähigkeit zur Exkretion von Pantothersäure zu untersuchen. Zusätzlich konnte eine effiziente Technik zur Direktsequenzierung genomischer DNA etabliert werden, die zusammen mit der computergestützten Analyse der ermittelten DNA-Sequenzen eine schnelle Identifikation der entsprechenden Gene erlaubte.

Bei allen 43 ausgewählten Klonen wurde das von der *TnphoA*-Integration betroffene Gen identifiziert. Mit nur 42% lag der Anteil von Mutationen in Genen für nichtcytoplasmatische Proteine unter den Erwartungen. Dies hat wahrscheinlich verschiedene Ursachen. Zum Einen führten Integrationen in schwach exprimierte Gene möglicherweise nicht zu einer Blaufärbung der Kolonien und fanden daher keine Aufnahme in die Klonbank. Andererseits lässt das Auftreten mehrerer unabhängiger Integrationen in ein gleiches Gen (z. B. bei den vier *yicL*-Mutanten) darauf schließen, dass auch *TnphoA* bestimmte Bereiche des Genoms bevorzugt (sog. *hot spots*). Nach den Daten von Blattner *et al.* (1997) lässt sich abschätzen, dass etwa 25 % der Gene von MG1655 für nichtcytoplasmatische Proteine codieren (rund 1100 Gene). Geht man von etwa 3000 entsprechenden *TnphoA*-Mutanten in der Klonbank aus (42%), so ergibt sich rechnerisch eine 2,8-fache Abdeckung. Da sich die Integrationen aus den oben genannten Gründen jedoch wahrscheinlich nicht zufällig über das Genom verteilen, ist es fraglich, ob in der Mutantenbank tatsächlich jedes gesuchte Gen durch eine Mutation repräsentiert ist. Eventuell ist dies ein Grund dafür, dass der Exkretionscarrier für Pantothersäure im Plattentest nicht gefunden wurde. Eine andere naheliegende Erklärung ist das Vorhandensein von zwei redundanten Exkretionssystemen, welche sich in ihrer Funktion wechselseitig ersetzen können und so im Plattentest keinen veränderten Phänotyp besitzen.

Trotzdem findet sich unter den sequenzierten Klonen eine große Anzahl interessanter Mutationen, die auf den ersten Blick wenig miteinander gemeinsam haben. In den folgenden Kapiteln wird versucht, die Verbindungen zum Pantothersäure-Stoffwechsel darzulegen, um so den jeweils beobachteten Phänotyp zu erklären. Zunächst soll in Tabelle 4.1 jedoch Reihe von Klonen vorgestellt werden, bei denen Gene für globale Regulatoren, Komponenten der Stressantwort und andere Proteine von den Insertionen betroffen sind. Weil sich die Auswirkungen auf die Pantothenat-Biosynthese hier schlecht einschätzen lassen, werden diese Mutationen nicht diskutiert.

Tabelle 4.1: Mutationen, deren Einfluss auf die Pantothenat-Biosynthese unklar ist.

Klon	Gen	Protein / Funktion
3F6	<i>hns</i>	DNA-bindendes Protein H-NS: globaler Regulator, Stabilisierung von <i>supercoil</i> -Strukturen (Pettijohn, 1996; Hulton <i>et al.</i> , 1990)
10F2 45H1	<i>hdeA</i>	periplasmatisches Protein HdeA: Säureresistenz, Expression von <i>hdeAB</i> wird durch H-NS reprimiert (Gajiwala und Burley, 2000)
15F5	<i>recC</i>	Teil der Exonuclease V: Einleitung der homologen Rekombination (Taylor und Smith, 1995)
16F12 20E4	<i>cspC</i>	<i>cold shock protein C</i> : Stressprotein, stabilisiert mRNA und wirkt bei der Transkription als Antiterminator (Bae <i>et al.</i> , 2000)
30E5	<i>zwf</i>	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase: Eintritt von Glucose-6-phosphat in den Pentosephosphatweg (Fraenkel, 1996)
35E7 39B6 46B12 49H4	<i>yicL</i>	RhtA-homologer Transporter: homolog zu verschiedenen Aminosäure-Exkretionscarriern (Daßler <i>et al.</i> , 2000; Livshits <i>et al.</i> , 2003), eventuell Regulation der Häm-Biosynthese (Kanjo <i>et al.</i> , 2001); da alle <i>yicL</i> -Mutanten mehr Pantothenat exkretieren, ist dies nicht der gesuchte Transporter
38E1	<i>lepA</i>	LepA: GTP-bindende Domäne (March und Inouye, 1985), Funktion unbekannt, <i>lepB</i> (Signalpeptidase I) wahrscheinlich auch beeinträchtigt
43C4	<i>degS</i>	Protease DegS: Stressantwort, Spaltung von anti- σ^E -Faktor RseA, periplasmatisch (Alba <i>et al.</i> , 2001; De Las Peñas, 1997)
44G9	<i>aphA</i>	periplasmatische Phosphatase AphA: auch Bindung hemi-methylierter DNA (Thaller <i>et al.</i> , 1997; Rossolini <i>et al.</i> , 1994)
46C8	<i>ftsK</i>	FtsK: Translokation der Chromosomen bei der Zellteilung, Auflösung von chromosomalen Dimeren (Donachie, 2002)
48D2	<i>clpP</i>	Protease ClpP: Stressantwort, Abbau von denaturierten Proteinen und σ^S (Porankiewicz <i>et al.</i> , 1999)
58C6	<i>pitA</i>	Phosphat-Aufnahmesystem PitA: wichtigster P_i -Carrier von <i>E. coli</i> (Harris <i>et al.</i> , 2001)
64A5	<i>yjcX</i>	nicht charakterisiert, Lokalisation unbekannt
67E7	<i>rpoC</i>	β' -Untereinheit der RNA-Polymerase: Einfluß auf den Pyrimidin-Stoffwechsel (Jensen <i>et al.</i> , 1982)
70B3 74D4 74D7	<i>himD</i>	DNA-bindendes Protein IHF: globaler Regulator, spezifische Bindung an <i>att</i> -Sequenzen (Pettijohn, 1996)
71A5	<i>yieF</i>	nicht charakterisiert, Lokalisation unbekannt

4.2.1 Einige Mutationen beeinflussen möglicherweise die Aufnahme von Eisen.

Eine Voraussetzung für die Biosynthese von Pantothenensäure ist die gute Verfügbarkeit von Eisen. Die Dihydroxysäure-Dehydratase (IlvD; vgl. Abbildung 1.2), welche die Dehydrierung von α,β -Dihydroxyisovalerat zu α -Ketoisovalerat katalysiert, ist Fe^{2+} -abhängig (Myers, 1961), weil das katalytische Zentrum von einem [4Fe-4S]-cluster gebildet wird (Flint *et al.*, 1993). Im Medium gelöstes Eisen oxydiert unter aeroben Bedingungen schnell zu Fe(III), dessen extrem schlechte Löslichkeit die Konzentration freier Eisen-Ionen (bei pH 7,4) auf etwa 10^{-18} M limitiert (Raymond, *et al.*, 2003). Im Serum von Säugetieren ist Eisen zudem an Transferrin gebunden, so dass hier die Fe(III)-Konzentration mit etwa 10^{-24} M sogar noch deutlich darunter liegt (Aisen *et al.*, 1978). Um die ausreichende Versorgung sicherzustellen, sekretiert *E. coli* unter anderem das Siderophor Enterobactin: einen Chelator, der Fe(III) mit extrem hoher Affinität bindet und dann vom Bakterium wieder aufgenommen und abgebaut wird. Da Enterobactin aufgrund seiner Größe die äußere Membran nicht passieren kann, besitzen die Zellen ein komplexes Transportsystem zu dessen Aufnahme. Bei einigen *TnphoA*-Mutanten ist entweder die Biosynthese oder der Transport von Enterobactin betroffen.

Tabelle 4.2: Drei Klone, bei denen sich die Mutationen möglicherweise auf die Aufnahme von Eisen auswirken. In den Spalten drei und vier ist die relative Größe der Höfe im Plattentest angegeben. (++: sehr groß; +: groß; o: durchschnittlich; -: klein; --: kein Hof; sw: schlechtes Wachstum der Mutante; kw: kein Wachstum der Mutante). Die letzte Spalte bezeichnet die biologische Funktion des von der Mutation betroffenen Genprodukts.

Klon	Gen	Hofgröße ohne Aminosäuren	Hofgröße 0,25% Aminosäuren	Funktion
49D3	<i>entA</i>	kw	--	Enterobactin-Biosynthese
73E5	<i>entA</i>	kw	sw; --	Enterobactin-Biosynthese
37E4	<i>exbB</i>	sw	-	Enterobactin-Aufnahmesystem
57B3	<i>tolA</i>	(+)	+	TolQRAB-Transportsystem
38G6	<i>lpp</i>	sw	+	Lipoprotein der Mureinschicht

In den Klonen 49D3 und 73E5 wurde das Gen *entA* inaktiviert. EntA ist ein Protein des EntABC-Komplexes, der zusammen mit dem EntBDEF-Komplex die Biosynthese von

Enterobactin aus Chorismat und L-Serin katalysiert (Gehring *et al.*, 1998; Abbildung 4.1A). *entA*-Mutanten sollten erhebliche Probleme mit der Eisenversorgung haben. Tatsächlich waren die Klone 49D3 und 73E5 nicht fähig, in M9-Minimalmedium und im Plattentest ohne Aminosäurezusatz zu wachsen (Tabelle 4.2). Mit Aminosäurezusatz wuchsen sie zwar, jedoch bilden sie keine Höfe aus. *casaminoacids* (ein Casein-Hydrolysat) enthält zwar nur sehr wenig Eisen (Difco Manual, 11th ed.), jedoch könnte die Substanz mit Enterobactin oder anderen Chelatoren, etwa Citrat, verunreinigt sein. Trotzdem ist ein Eisenmangel wahrscheinlich die Ursache für die fehlenden Höfe. Als prosthetische Gruppe besitzen EntB und EntF interessanterweise einen Phosphopantetheinyl-Rest, der durch EntD von CoenzymA auf diese übertragen wird (Gehring *et al.*, 1997).

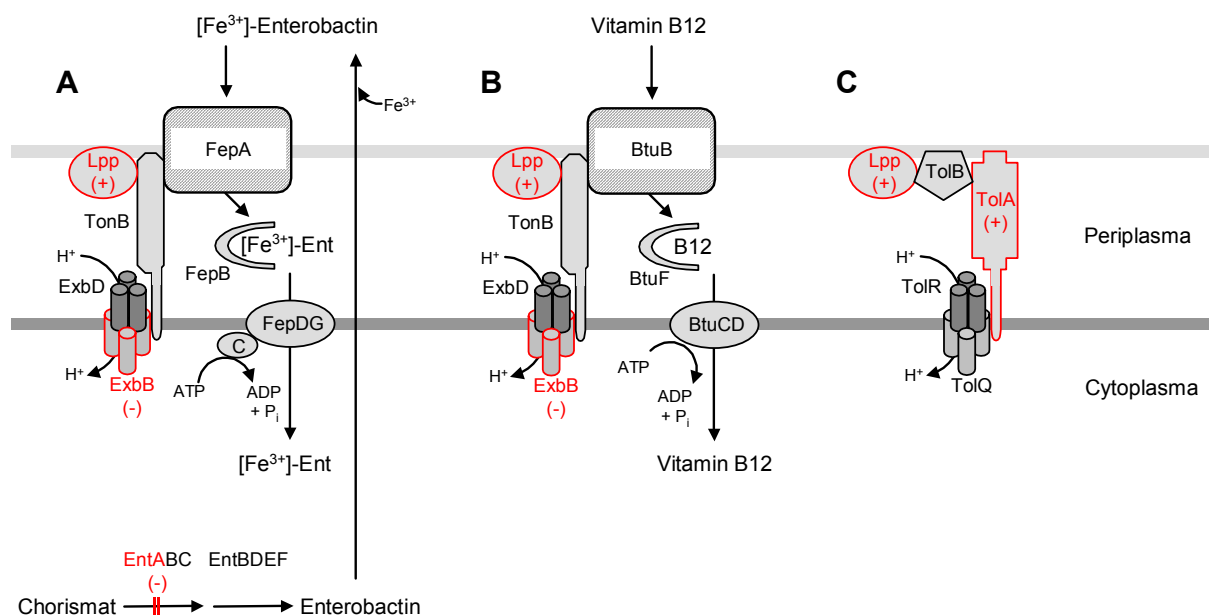


Abbildung 4.1: **A.** Aufnahme von [Fe³⁺]-Enterobactin durch das ExbBD-TonB-System. **B.** Aufnahme von Cobalamin (Vitamin B₁₂) durch das ExbBD-TonB-System. **C.** Aufbau des TolQR-TolA-Systems. Von Insertionen betroffene Enzyme und Proteine sind durch rote Schrift hervorgehoben und die Größe der Höfe im Plattentest durch ein (+) bzw. (-) angedeutet. Die Unterbrechung der Enterobactin-Biosynthese ist durch das Zeichen = kenntlich gemacht. B12: Vitamin B₁₂; [Fe³⁺]-Ent: [Fe³⁺]-Enterobactin.

Bei Klon 37E4 erfolgte die *TnphoA*-Insertion in das Gen *exbB*, welches für ein Protein des Enterobactin-Aufnahmesystems codiert (Abbildung 4.1A). Fe(III)-Enterobactin wird durch FepA, das in der äusseren Membran lokalisiert ist, ins Periplasma transportiert. Der ExbB/ExbD-Komplex in der Cytoplasmamembran überträgt dabei die aus dem Einstrom von

Protonen gewonnene Energie auf TonB (Higgs *et al.*, 1998), welches das Periplasma durchspannt. TonB verursacht dadurch eine Konformationsänderung in FepA, wodurch die Translokation des Liganden zustande kommt (Wooldridge *et al.*, 1992). Higgs *et al.* (2002) konnten zeigen, dass TonB zusätzlich an das periplasmatische Protein Lpp (Klon 38G6, siehe unten) bindet, dieses jedoch nicht für die Energieübertragung notwendig ist. Periplasmatisches Fe(III)-Enterobactin wird schließlich durch das FepBCDG-System (einen ABC-Transporter) ins Cytoplasma gepumpt (Raymond *et al.*, 2003). Mutationen in ExbB oder ExbD haben den Verlust von 90% der TonB-Aktivität zur Folge (Ahmer *et al.*, 1995). Die durch das paraloge TolQR-System (Abbildung 4.1C) verursachte Restaktivität ist wahrscheinlich der Grund dafür, dass der Klon 37E4 in Minimalmedium wächst. Trotzdem wird die *exbB*-Mutation wahrscheinlich einen deutlichen Eisenmangel verursachen, welcher den *entA*-ähnlichen Phänotyp erklärt. Interessanterweise nutzt auch der Cobalamin- (Vitamin B₁₂) Transporter BtuB das ExbBD-TonB System (Higgs *et al.*, 2002), so dass bei *exbBD*-Mutanten zusätzlich die Cobalamin-Aufnahme gestört ist (Abbildung 4.1B).

E. coli besitzt ein zu TonB-ExbBD paraloges Transportsystem, das TolQRAB-System (Abbildung 4.1C). TolQ und TolR sind paralog zu ExbBD, während TolA nur eine geringe Sequenzähnlichkeit zu TonB besitzt, aber die gleiche Funktion übernimmt (Lazdunski *et al.*, 2000). TolB interagiert mit TolA und Lpp, welche in der äußeren Membran verankert sind (Clavel *et al.*, 1998). Die natürliche Funktion von TolQRAB ist noch nicht bekannt, jedoch sind Tol-Mutanten resistent gegen GruppeA-Colicine. Sowohl Klon 38G6 (*lpp*), als auch Klon 57B3 (*tolA*) bilden im Plattentest mit Aminosäurezusatz größere Höfe (Tabelle 4.2).

4.2.2 Einige Mutationen beeinflussen wahrscheinlich die Verfügbarkeit von β -Alanin.

Bei drei Klonen beeinflussen die Mutationen wahrscheinlich die Entstehung oder den Verbrauch von Aspartat, der direkten Vorstufe des β -Alanins. Aspartat entsteht in *E. coli* durch die Transaminierung von Oxalacetat, eine Reaktion, welche von den Isoenzymen AspC und TyrB katalysiert wird (Reitzer, 1996b). Beiden Transaminasen dient Glutamat als Aminogruppen-Donor, wobei die Aspartat-Aminotransferase AspC den größten Teil des Aspartats synthetisiert (Gelfand und Steinberg, 1977; Abbildung 4.2). Bei den Klonen 29H11 und 30F8 hatte eine Insertion in *aspC* die Bildung von deutlich kleineren Höfen zur Folge – unabhängig davon, ob Aminosäuren zugesetzt wurden oder nicht (Tabelle 4.3). Wahrscheinlich wirkt sich die gestörte Aspartat-Biosynthese in den *aspC*-Mutanten negativ auf die Verfügbarkeit von β -Alanin aus und könnte so die Ursache für die geringere Exkretion von Pantothenensäure im Plattentest sein.

Tabelle 4.3: Drei Klone, bei denen sich die Mutationen möglicherweise auf die Verfügbarkeit von β -Alanin auswirken. In den Spalten drei und vier ist die relative Größe der Höfe im Plattentest angegeben. (++: sehr groß; +: groß; o: durchschnittlich; -: klein; --: kein Hof; kw: kein Wachstum der Mutante). Die letzte Spalte bezeichnet die biologische Funktion des von der Mutation betroffenen Genprodukts.

Klon	Gen	Hofgröße ohne Aminosäuren	Hofgröße 0,25% Aminosäuren	Funktion
29H11 30F8	<i>aspC</i>	-	-	Aspartat-Transaminase
63B10	<i>icdA</i>	kw	+	Isocitrat-Dehydrogenase
43A10	<i>lysA</i>	kw	+	Diaminopimelat-Decarboxylase

Der Klon 63B10 trägt die *TnphoA*-Insertion im Gen *icdA*, welches für die Isocitrat-Dehydrogenase codiert (Tabelle 4.3). Dies ist das Schlüsselenzym an der Schnittstelle zwischen Citrat- und Glyoxylatcyclus. In der *icdA*-Mutante muss das gesamte Isocitrat in den Glyoxylatcyclus eintreten (Cronan und La Porte, 1996; Abbildung 4.2), wo (im Gegensatz zum Citratcyclus) in jeder Runde ein Molekül Oxalacetat neu gebildet wird. Daher verursacht die Mutationen wahrscheinlich einen Anstieg der Oxalacetat-Konzentration, was wiederum ein Mehr an Aspartat und β -Alanin zur Folge haben könnte. Die Mutante bildete im Plattentest mit Aminosäurezusatz deutlich größere Höfe, als der Durchschnitt, was gut zu der vermuteten Überproduktion des β -Alanins passt. In M9-Minimalmedium und im Plattentest ohne Aminosäurezusatz wuchs die Mutante dagegen nicht, da sie kein α -Ketoglutarat synthetisieren kann und daher Glutamat-auxotroph ist (Cronan und La Ponte, 1996). Ein möglicher Hinweis auf die Identität des Pantothenat-Exporter durch die *icdA*-Mutante wird weiter unten diskutiert.

Auch die Inaktivierung der Diaminopimelat-Decarboxylase (Gen *lysA*) in Klon 43A10 führte zur Exkretion von mehr Pantothersäure (Tabelle 4.3). Das Enzym katalysiert die letzte Reaktion der Lysin-Biosynthese und die Inaktivierung hat eine Lysin-Auxotrophie zur Folge (Patte, 1996; Abbildung 4.2). Aus diesem Grund benötigt auch der Klon 43A10 Aminosäuren zum Wachsen. Die Biosynthese von Lysin beginnt bei Aspartat, so dass deren Blockade möglicherweise den Aspartat-Verbrauch senkt und deshalb mehr β -Alanin entstehen kann.

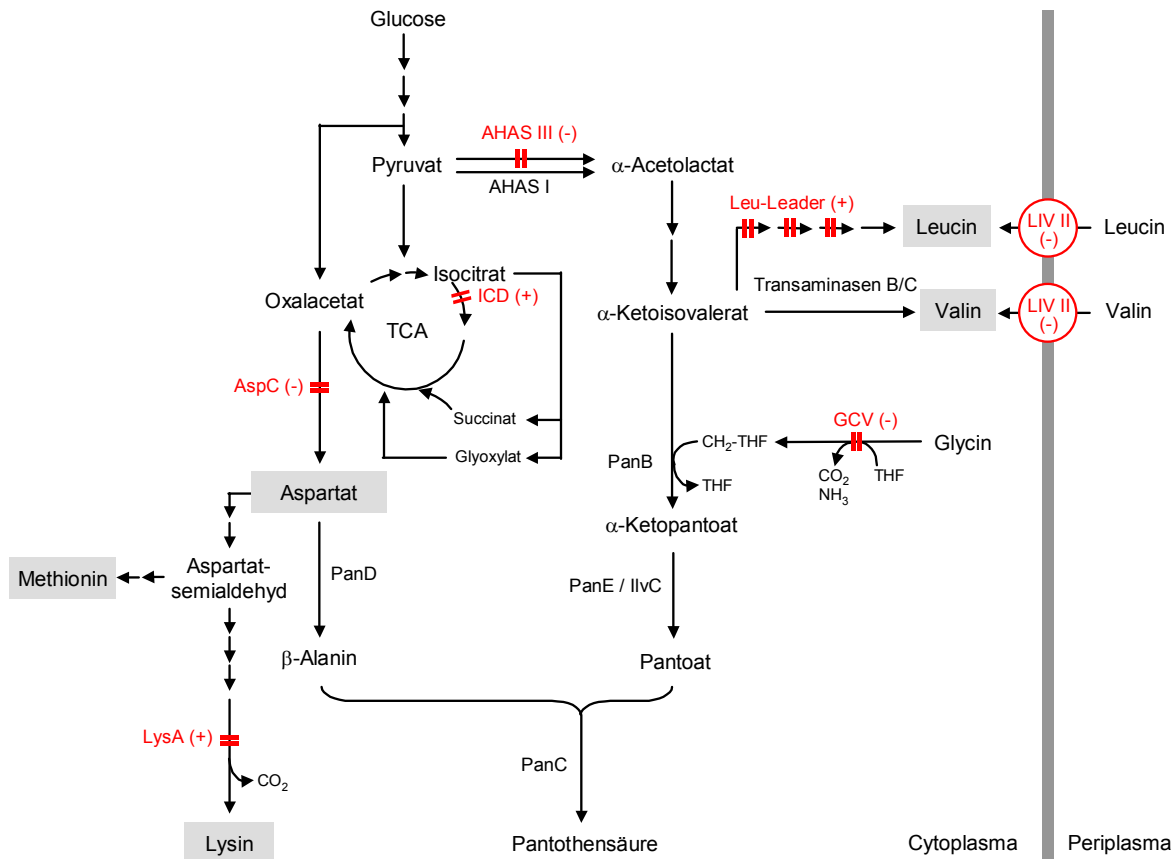


Abbildung 4.2: Einordnung einiger Transposon-Mutanten in den Pantothensäure-Stoffwechsel. Von Insertionen betroffene Enzyme und Proteine sind durch rote Schrift hervorgehoben und die Größe der Höfe im Plattentest durch ein (+) bzw. (-) angedeutet. Die Unterbrechung einzelner Stoffwechselwege durch Mutationen ist durch das Zeichen = kenntlich gemacht. AHAS: Acetohydroxysäure-Synthase; CH₂-THF: 5,10-Methylentetrahydrofolat; CH₃-THF: 5-Methyltetrahydrofolat; GCV: *glycine cleavage complex*; ICD: Isocitrat-Dehydrogenase; TCA: Citratcyclus; THF: Tetrahydrofolat.

4.2.3 Einige Mutationen beeinflussen wahrscheinlich die Verfügbarkeit von α -Ketoisovalerat.

Bei drei Mutanten könnten sich die Integrationen auf die Entstehung oder den Verbrauch von α -Ketoisovalerat auswirken, der wichtigsten Vorstufe im zweiten Ast der Pantothenat-Biosynthese (Abbildung 4.2). Der Klon 13E7 trägt die *TnphoA*-Insertion im Gen *ilvH*, das für die kleine Untereinheit des Isoenzym III der Acetohydroxysäure-Synthase (AHAS III) codiert. Die Acetohydroxysäure-Synthasen (AHAS) katalysieren die Kondensation zweier Pyruvat-Moleküle zu α -Acetolactat, welches eine gemeinsame Vorstufe von Valin, Leucin und Pantoat ist (Blatt *et al.*, 1972). *E. coli* besitzt drei AHAS-Enzyme, die von den Genen *ilvBN* (AHAS I), *ilvGM* (AHAS II) und *ilvIH* (AHAS III) codiert werden. Die AHAS II ist allerdings in K12-Derivaten aufgrund einer *frameshift*-Mutation in *ilvG* inaktiv (Lawther *et*

al., 1981). Interessant ist die Beobachtung, dass der Klon 13E7 im Plattentest mit Aminosäurezusatz deutlich weniger Pantothersäure exkretiert (Tabelle 4.4). Die AHAS I unterliegt einer starken Produkthemmung durch Valin und Leucin (Umbarger, 1996) und sollte daher bei guter Versorgung mit externen Aminosäuren inaktiv sein. α -Ketoisovalerat kann auch durch die Deaminierung von Valin durch die Transaminasen B oder C entstehen. Die Transaminase C arbeitet jedoch vor allem in Richtung der Valin-Biosynthese (Umbarger, 1996) und die Expression des für die Transaminase C codierenden *ilvE*-Gens wird stark von Alanin reprimiert (Whalen und Berg, 1984). Es ist daher möglich, dass bei Klon 13E7 auf aminosäurehaltigem Minimalagar ein Mangel an α -Ketoisovalerat vorliegt, welcher die geringere Pantothersäure-Exkretion verursachen könnte.

Tabelle 4.4: Drei Klone, bei denen sich die Mutationen möglicherweise auf die Verfügbarkeit von α -Ketoisovalerat auswirken. In den Spalten drei und vier ist die relative Größe der Höfe im Plattentest angegeben. (++: sehr groß; +: groß; o: durchschnittlich; -: klein; --: kein Hof; kw: kein Wachstum der Mutante). Die letzte Spalte bezeichnet die biologische Funktion des von der Mutation betroffenen Genprodukts.

Klon	Gen	Hofgröße ohne Aminosäuren	Hofgröße 0,25% Aminosäuren	Funktion
13E7	<i>ilvH</i>	o	-	Acetohydroxysäure-Synthase III
28A10	<i>brnQ</i>	-	o	<i>branched chain amino acid transport system II (LIV-II)</i>
67B6	<i>leuL</i>	kw	+	<i>leader</i> -Peptid des <i>leu</i> -Operons

In Klon 28A10 wurde das Gen *brnQ* inaktiviert (Tabelle 4.4). Es codiert für das *branched chain amino acid transport system II (LIV-II)*, dem wichtigsten Aufnahmecarrier für Leucin, Isoleucin und Valin (Ohnishi *e al.*, 1988; Abbildung 4.2). Die Mutante bildete im Plattentest ohne Zusatz von Aminosäuren deutlich kleinere Höfe. Dagegen unterschied sich die Pantothenat-Produktion in einer M9-Flüssigkultur nicht vom Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise scheidet der Indikatorstamm aufgrund der *panC*-Mutation Valin aus. Dieses könnte von den Mutanten aufgenommen, zu α -Ketoisovalerat deaminiert und dann zu D-Pantoat umgesetzt werden. Die gestörte Valin-Aufnahme würde somit nur im Plattentest zur Produktion von weniger Pantothersäure führen. Da in den Flüssigkulturen keine *C. glutamicum*-Zellen vorhanden waren, wäre hier das gleiche (niedrige) Niveau wie in allen anderen Mutanten zu erwarten. Diese Vermutung ließe sich durch einen Produktionsassay in

M9-Minimalmedium unter Zusatz von Valin, Leucin und Isoleucin überprüfen.

Die Mutante 67B6 trägt die *TnphoA* Insertion in *leuL*, dem *leader*-Peptid des *leuLABCD* Operons (Abbildung 4.2). Das Operon codiert für vier Enzyme, welche zusammen mit der Transaminase B die Synthese von Leucin aus α -Ketoisovalerat katalysieren. Seine Transkription wird (ähnlich dem *trp*-Operon) durch Attenuation über die Translation der *leuL*-mRNA reguliert (Carter *et al.* 1985). Aufgrund der Integration von *TnphoA* wurden die Gene *leuABCD* von ihrem Promotor getrennt. Es ist daher zu erwarten, dass diese nicht mehr transkribiert werden und die Mutante Leucin-auxotroph ist. Der Klon wuchs zwar ohne Aminosäurezusatz im Plattentest tatsächlich nicht (Tabelle 4.4), dafür jedoch in der M9-Flüssigkultur. Möglicherweise entsteht eine große mRNA über die gesamte Länge von *leuL-TnphoA-leuABCD* oder der Promotor des Kanamycin-Resistenzgens *aph(3')-II* in *TnphoA* (der die gleiche Orientierung besitzt) erlaubt die Transkription einer *aph(3')-II-leuABCD*-mRNA (vgl. Abbildung 3.14). Dadurch könnte noch eine geringe Leucin-Versorgung sichergestellt werden. Die Bildung größerer Höfe mit Aminosäurezusatz lässt sich trotzdem gut durch einem Überschuss an α -Ketoisovalerat erklären.

4.2.4 Die Generierung von 5,10-Methyltetrahydrofolat kann als dritter Stoffwechselweg der Pantothersäure-Biosynthese betrachtet werden.

Tetrahydrofolat-Derivate dienen in einer Reihe von Stoffwechselwegen der Übertragung von C1-Einheiten auf Akzeptormoleküle. Bei der Kultivierung von *E. coli* in glucosehaltigem Minimalmedium tritt Kohlenstoff nur in Form von 5,10-Methyltetrahydrofolat (CH₂-THF) in den Tetrahydrofolat-Stoffwechsel ein (Matthews, 1996), welches dann durch Oxydationen oder Reduktionen in die anderen Derivate umgewandelt werden kann. 5,10-Methyltetrahydrofolat wird ausgehend von Serin durch zwei Reaktionen gebildet: die Serin-Hydroxymethyltransferase (SHMT codiert von *glyA*) katalysiert die Spaltung von Serin zu Glycin und CH₂-THF. Glycin kann seinerseits, katalysiert durch den *glycine cleavage complex* (GCV), ein weiteres CH₂-THF-Molekül liefern. Abgesehen von der Oxydation zu Methenyltetrahydrofolat ist 5,10-Methyltetrahydrofolat (bei Glucose als C-Quelle) an nur drei Reaktionen direkt beteiligt (Matthews, 1996; Roberts *et al.*, 1957): der PanB-katalysierten Synthese von α -Ketopantoat, an der Entstehung von dTMP aus dUMP und an der Bildung von 5-Methyltetrahydrofolat (CH₃-THF) durch MetF. CH₃-THF dient in *E. coli* ausschließlich zur Biosynthese von Methionin. In sieben verschiedenen Klonen wurden Mutationen identifiziert, die sich auf die Verfügbarkeit von 5,10-Methyltetrahydrofolat auswirken sollten.

Tabelle 4.5: Sieben Klone, bei denen sich die Mutationen möglicherweise auf die Verfügbarkeit von 5,10-Methylentetrahydrofolat auswirken. In den Spalten drei und vier ist die relative Größe der Höfe im Plattentest angegeben. (++: sehr groß; +: groß; o: durchschnittlich; -: klein; --: kein Hof; kw: kein Wachstum der Mutante). Die letzte Spalte bezeichnet die biologische Funktion des von der Mutation betroffenen Genprodukts.

Klon	Gen	Hofgröße ohne Aminosäuren	Hofgröße 0,25% Aminosäuren	Funktion
60A1	<i>gcvP</i>	-	(-)	Untereinheit des <i>glycine cleavage complex</i> (GCV)
68D12	<i>gcvP</i>	-	-	Untereinheit des <i>glycine cleavage complex</i> (GCV)
14F1 14G2	<i>cysG</i>	kw	++	Uroporphyrinogen III-Methylase
69H6	<i>metJ</i>	-	-	Repressor der Methionin-Biosynthese
25G8	<i>dcd</i>	++	++	dCTP-Deaminase
27C2	<i>dcd</i>	(+)	+	dCTP-Deaminase
28H1	<i>dcd</i>	++	++	dCTP-Deaminase

Das Gen *gcvP* (betroffen in den Klonen 60A1 und 68D12) codiert für eine Untereinheit des *glycine cleavage complex* (GCV), der die Spaltung von Glycin zu CO₂, NH₃ und 5,10-Methylentetrahydrofolat katalysiert. GCV-Mutanten exkretieren Glycin (Ghrist und Stauffer, 1995) und sollten weniger CH₂-THF synthetisieren können. Dieser Mangel könnte eine Limitierung der PanB-katalysierten Hydroxymethylierung von α -Ketoisovalerat zu α -Ketopantoat verursachen (Abbildungen 4.2 und 4.3). Tatsächlich induzieren die Klone 60A1 und 68D12 im Plattentest sowohl mit als auch ohne Aminosäurezusatz deutlich kleinere Höfe (Tabelle 4.5).

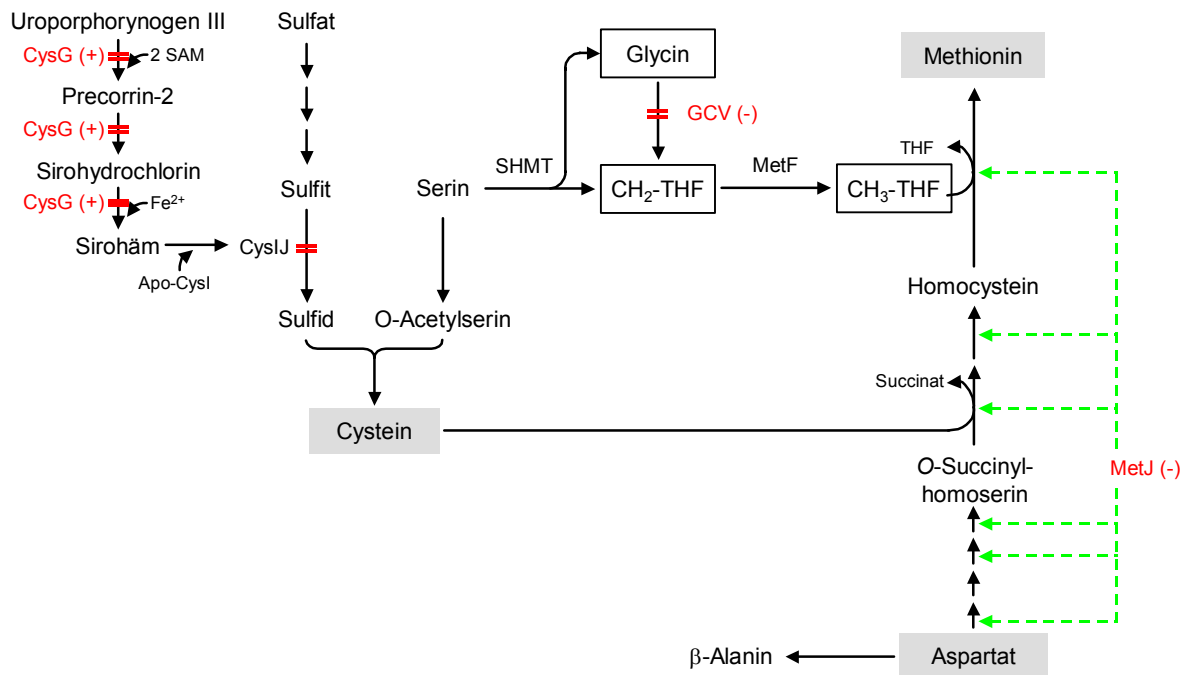


Abbildung 4.3: Biosynthese von Cystein und Methionin in *E. coli*. Von Insertionen betroffene Enzyme und Proteine sind durch rote Schrift hervorgehoben und die Größe der Höfe im Plattentest durch ein (+) bzw. (-) angedeutet. Die Unterbrechung einzelner Stoffwechselwege durch Mutationen ist durch das Zeichen = kenntlich gemacht, die Aktivierung der Methionin-Biosynthese durch grüne Pfeile (←). Apo-CysI: CysI Apoprotein; GCV: *glycine cleavage complex*; CH₂-THF: 5,10-Methylentetrahydrofolat; CH₃-THF: 5-Methyltetrahydrofolat; SAM: S-Adenosylmethionin; SHMT: Serin-Hydroxymethyltransferase; THF: Tetrahydrofolat.

Die identischen Klone 14F1 und 14G2 tragen die Insertion im Gen *cysG*, welches für die Uroporphyrinogen III-Methylase codiert. Das Enzym katalysiert die Biosynthese von Sirohäm, der prosthetischen Gruppe der Sulfitreductase CysIJ von *E. coli* (Abbildung 4.3). Deshalb können *cysG*-Mutanten Sulfit nicht zu Sulfid reduzieren, was auf sulfathaltigem Minimalmedium eine Cystein-Auxotrophie zur Folge hat (Kredich, 1996) und das Wachstum der Klone 14F1 und 14G2 in M9-Flüssigkultur sowie im Plattentest ohne Aminosäurezusatz verhindert. Die erste von CysG katalysierte Reaktion ist die Übertragung zweier Methylgruppen von S-Adenosylmethionin auf Uroporphyrinogen III. Es entsteht Precorrin-2, welches bei *Salmonella typhimurium* auch eine Vorstufe für Cobalamin ist. Interessant ist der Befund, nach dem die *cysG*-Mutanten mit Aminosäurezusatz deutlich größere Höfe induzieren (Tabelle 4.5). Ein geringerer Verbrauch von S-Adenosylmethionin spielt hier wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle, da der Bedarf an Sirohäm vergleichsweise niedrig ist. Der Ausfall der Cystein-Biosynthese bedingt jedoch einen Minderverbrauch von Serin,

was möglicherweise dem $\text{CH}_2\text{-THF-pool}$ zugute kommt.

Die Mutation von *metJ* (Klon 69H6), welches für den globalen Repressor der Methionin-Biosynthese codiert, hat eine gegenteilige Auswirkung (Abbildung 4.3). Methionin entsteht über mehrere Zwischenschritte aus Aspartat und Cystein, das seinerseits aus Serin gebildet wird. Die letzte Reaktion dieses Stoffwechselweges ist eine Methylierung von Homocystein, bei der 5-Methyltetrahydrofolat als Methylgruppen-Donor dient. 5-Methyltetrahydrofolat entsteht nur aus der Reduktion von 5,10-Methylen tetrahydrofolat durch das *metF*-Genprodukt. Mutationen in *metJ* führen zur verstärkten Expression der Methionin-Biosynthesegene (einschließlich *metF*) und zur Überproduktion von Methionin (Nakamori *et al.*, 1999), was einen höheren Verbrauch von Aspartat, $\text{CH}_2\text{-THF}$ und Serin (in Form von Cystein) zur Folge hat. Daher könnte die geringere Pantothen säure-Exkretion von Klon 69H6 (Tabelle 4.5) durch den Mangel an $\text{CH}_2\text{-THF}$, dessen C1-Donor Serin und möglicherweise auch β -Alanin erklärt werden.

Sehr große Höfe bildeten die drei Klone 25G8, 27C2 und 28H1 bei denen sich die Insertionen (unabhängig voneinander) im Gen für die dCTP-Deaminase (*dcd*) befinden (Tabelle 4.5). Mindestens 75% des Bedarfs an dUMP wird durch die Deaminierung von dCTP zu dUTP und dessen anschließende Hydrolyse gedeckt (Neuhard und Kelln, 1996; Krogan *et al.*, 1998; Abbildung 4.4). dUMP ist seinerseits die einzige Vorstufe für die Desoxythymidinphosphat-Derivate, welche aus der ThyA-katalysierten Methylierung von dUMP zu dTMP entstehen. Als Methylgruppen-Donor dient auch hier das 5,10-Methylen tetrahydrofolat.

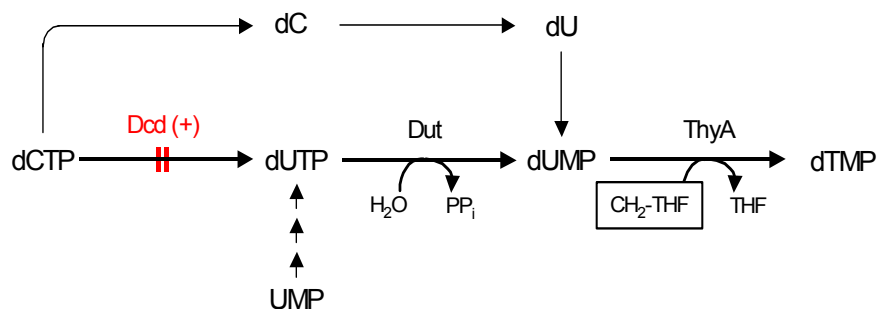


Abbildung 4.4: Biosynthese von dTMP in *E. coli*. Die von der Insertion betroffene dCTP-Deaminase ist durch rote Schrift hervorgehoben und die Größe des Hofes im Plattentest durch ein (+) angedeutet. Die Unterbrechung des Stoffwechselweges ist durch das Zeichen = kenntlich gemacht. $\text{CH}_2\text{-THF}$: 5,10-Methylen tetrahydrofolat; THF: Tetrahydrofolat.

Krogan *et al.* (1998) zeigten, dass die Inaktivierung von *dcd* in *Salmonella typhimurium* zu einem deutlichen Anstieg des dCTP-pools und zu einem Mangel an dTMP führt.

Möglicherweise verbrauchen deshalb auch die Transposonmutanten weniger CH₂-THF für die dTMP-Biosynthese, welches dann für PanB zur Verfügung stünde.

Die mit den *gcvP*, *cycG*, *dcd* und *metJ* Mutanten gewonnenen Daten weisen auf eine zentrale Rolle von 5,10-Methylen tetrahydrofolat für die Biosynthese von Pantothersäure hin. Im Einklang dazu stehen Flussanalysen mit einem *C. glutamicum*-Stamm, welcher fast alle Gene der α -Ketosiovalerat und Pantothersäure-Biosynthese (einschließlich *panB*) überexprimiert (Chassagnole *et al.*, 2002). Diese Zellen verarbeiten mehr als 65% des in Form von Glucose eingesetzten Kohlenstoffs zu α -Ketoisovalerat. Hiervon werden jedoch fast 90% zu L-Valin transaminiert, aber nur 5,4% durch PanB zu α -Ketopantoat hydroxymethyliert, welches dann allerdings vollständig zur Pantothersäure umgesetzt wird. Die Autoren vermuten die Ursache für den geringen Fluss in einer unzureichenden Expression der *pan*-Gene oder in der, durch Stickstoffüberschuss bedingten, übermäßig starken Aktivität der Transaminasen. Eine naheliegende Erklärung könnte jedoch die durch einen Mangel an 5,10-Methylen tetrahydrofolat bedingte geringe Aktivität von PanB sein, welche diesen Schritt zum „Flaschenhals“ werden lässt. Da *C. glutamicum* keinen *glycine cleavage complex* besitzt (Jörn Kalinowski, persönliche Mitteilung), muss es für jedes Pantothersäuremolekül mindestens ein Molekül Serin zu Glycin abbauen (bei *E. coli* $\frac{1}{2}$ Serin), um die C1-Einheit bereit stellen zu können. Somit erscheint die Entstehung eines „Flaschenhalses“ bei PanB zwingend, wenn die Biosynthese von Serin (aus 3-Phosphoglycerat) oder dessen Spaltung mit der Bildung von α -Ketoisovalerat nicht Schritt halten kann.

Ansätze zur gezielten Verbesserung von Produktionsstämmen beschränkten sich bisher auf die Erzeugung von D-Pantoat und β -Alanin, wobei letzteres trotzdem in hohen Konzentrationen dem Medium zugesetzt werden muss (Moriya *et al.*, 1999; Sahn *et al.*, 1999). Es wäre daher interessant zu untersuchen, ob sich solche Stämme durch die Verstärkung der Serin-Biosynthese und der Spaltung zu CH₂-THF noch weiter verbessern lassen. Insbesondere der von Chassagnole *et al.* (2002) untersuchte *C. glutamicum*-Stamm sollte davon deutlich profitieren können. Aufgrund der Bedeutung des Serin/CH₂-THF-Weges erscheint es zudem sinnvoll, diesen neben der Generierung von β -Alanin und α -Ketoisovalerat als einen dritten Ast der Pantothersäure-Biosynthese zu betrachten (Abbildung 4.5). Zusammengefasst machen die bisher besprochenen Mutationen deutlich, wie stark die Pantothersäure-Biosynthese in den Aminosäurestoffwechsel eingebettet ist.

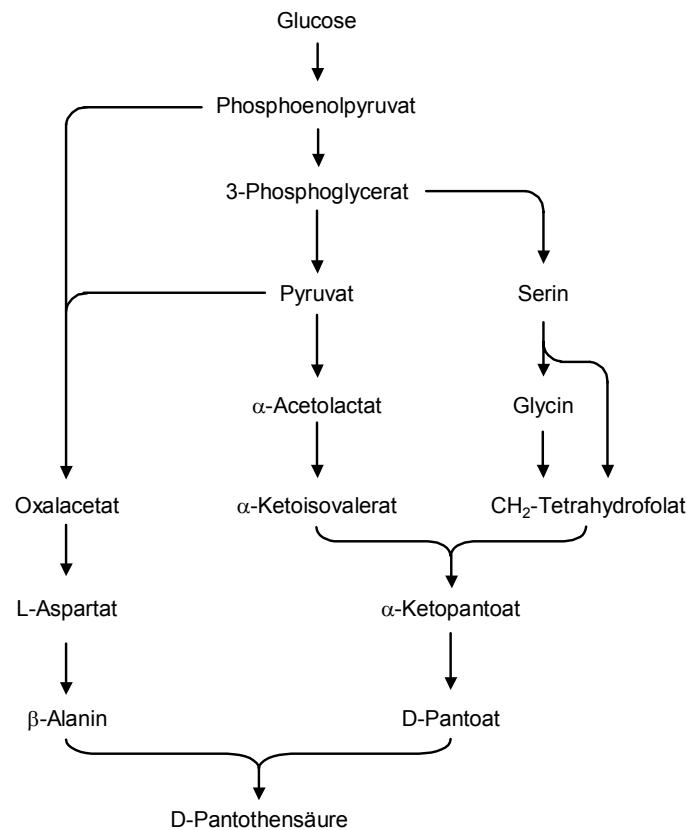


Abbildung 4.5: Alternative Darstellung der Biosynthese von Pantothersäure. Die Serin-Biosynthese mit anschließendem Abbau zu 5,10-Methylentetrahydrofolat ist als gleichwertiger Stoffwechselweg gezeigt. CH₂-Tetrahydrofolat: 5,10-Methylentetrahydrofolat.

4.2.5 Mögliche Hinweise auf die Identität des Pantothenat-Exkretionscarriers.

Obwohl der Exkretionscarrier für Pantothersäure durch die Analyse der Mutantenbank nicht direkt identifiziert werden konnte, geben die Ergebnisse in Verbindung mit anderen Daten möglicherweise einen Hinweis auf dessen Identität. Hikichi *et al.* (1996) zeigten, dass bei *E. coli* ein Zusammenhang zwischen der Salicylsäure-Resistenz und der Fähigkeit zur Produktion großer Mengen Pantothersäure besteht (vgl. Kapitel 1.3). Salicylsäure induziert die Expression von *marA*, einem Transkriptionsaktivator (Cohen *et al.*, 1993), der zumindest bei *Salmonella choleraesuis* auch für die Resistenz verantwortlich ist (Tibbetts *et al.*, 2003). MarA aktiviert zusammen mit SoxS und RobA die Expression des *multidrug*-Exportsystems AcrAB-TolC, welches den Efflux einer Reihe von toxischer Substanzen (u.a. Nalidixinsäure) katalysiert (White *et al.*, 1997). Helling *et al.* (2002) zeigten, dass auch die Inaktivierung der Gene *icdA*, *cysH*, *metE* und *purB* zur verstärkten Expression von *acrAB* führt und dadurch die Resistenz der Zellen gegen Nalidixinsäure erhöht.

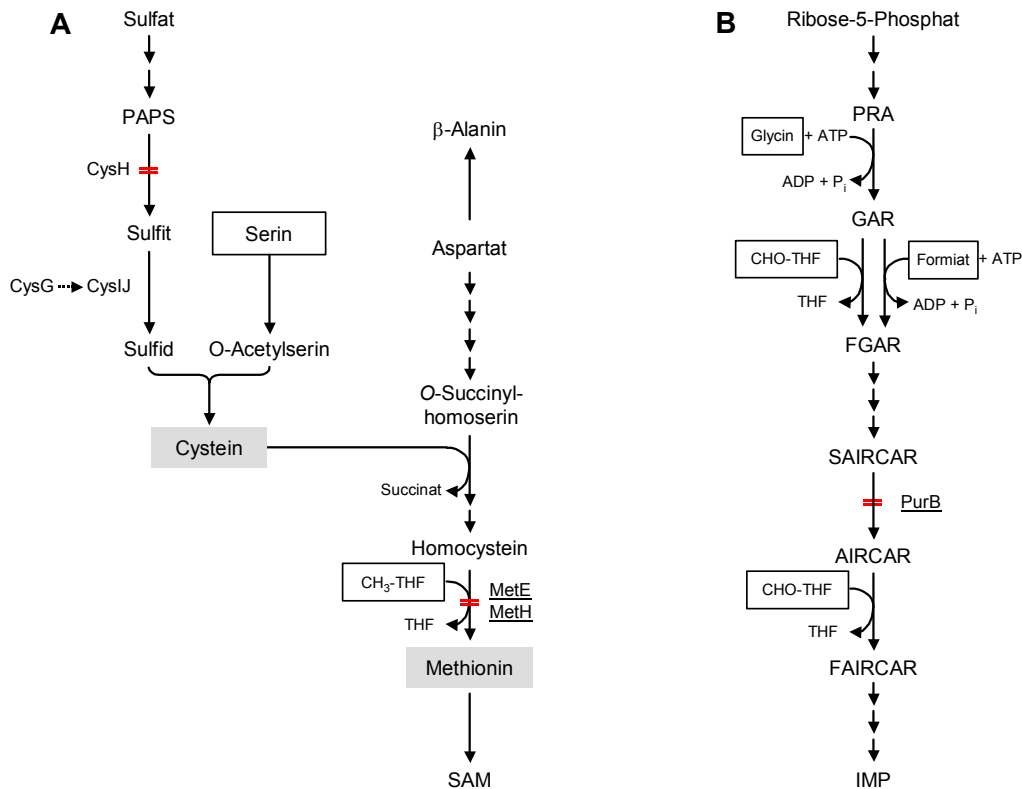


Abbildung 4.6: **A.** Biosynthese von Cystein und Methionin in *E. coli*. **B.** Biosynthese der Purin-Nucleotide in *E. coli*. Die Pyrimidin-Biosynthese verbraucht zwei Moleküle 10-Formyltetrahydrofolat und ein Molekül Glycin. Formiat kann von *E. coli* nur aus 10-Formyltetrahydrofolat gebildet werden (Dev und Harvey, 1978). Tetrahydrofolat-Derivate bzw. deren Äquivalente Serin, Glycin und Formiat sind durch Rahmen hervorgehoben. = kennzeichnet die Unterbrechung eines Stoffwechselweges durch die von Helling *et al.* untersuchten Mutationen. AIRCAR: 5'-Phosphoribosyl-4-carboxamid-5-aminoimidazol; CH₃-THF: 5-Methyltetrahydrofolat; CHO-THF: 10-Formyltetrahydrofolat; FAIRCAR: 5'-Phosphoribosyl-4-carboxamid-5-formamidoimidazol; FGAR: 5'-Phosphoribosyl-N-formylglycinamid; GAR: 5'-Phosphoribosylglycinamid; IMP: Inosin-5'-monophosphat; PAPS: 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat; PRA: 5'-Phospho-b-D-ribosylamin; SAIRCAR: 5'-Phosphoribosyl-4-(N-succinocarboxamid)-5-aminoimidazol; SAM: S-Adosylmethionin; THF: Tetrahydrofolat;

Der Vergleich der Mutationen mit den *TnphoA*-Mutanten dieser Arbeit ist interessant, denn die Inaktivierung von *icdA* führt auch (wie in Kapitel 4.2.2 besprochen) zur gesteigerten Pantothersäure-Exkretion. *cysH* codiert für die 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat-Sulfotransferase, welche den letzten Schritt bei der Reduktion von Sulfat zu Sulfit katalysiert (Abbildung 4.6A). *cysH*-Mutanten sind daher, genau wie die oben vorgestellte *cysG*-Mutante, nicht in der Lage, Cystein und Methionin aus Sulfat zu synthetisieren (Kredich, 1996). Da bei beiden der gleiche Reaktionsweg unterbrochen ist, sollte auch eine *cysH*-Mutante mehr Pantothersäure produzieren.

E. coli besitzt zwei Methioninsynthesen, die von den Genen *metE* und *metH* codiert und durch den Methionin-Repressor MetJ reguliert werden (Nakamori *et al.*, 1999). Beide Enzyme übertragen die Methylgruppe von 5-Methyltetrahydrofolat auf Homocystein und katalysieren so die letzte Reaktion der Methionin-Biosynthese (Abbildung 4.6.A). Sie unterscheiden sich jedoch in einem wichtigen Punkt: die Aktivität von MetH ist strikt Cobalamin-abhängig, die von MetE dagegen nicht. Da *E. coli* nicht zur Biosynthese von Cobalamin fähig ist, wachsen *metE*-Mutanten in Minimalmedium nur, wenn Methionin oder Cobalamin zugesetzt sind (Greene, 1996; Davis und Mingiolo, 1950). Helling und Mitarbeiter testeten die Resistenz ihrer *metE*-Mutante in Trypton-Minimalmedium *ohne* Cobalamin-Zusatz, so dass die Methionin-Biosynthese hier vollständig blockiert war. Wie in Kapitel 4.2.4 gezeigt, führt die Überproduktion von Methionin zur Exkretion von weniger Pantothersäure. Umgekehrt sollte die vollständige Blockade der Methionin-Biosynthese eine stärkere Pantothersäure-Produktion zur Folge haben.

Bei der vierten von Helling *et al.* untersuchten Mutante (*purB*) ist die Purin-Biosynthese blockiert, und zwar direkt vor dem zweiten, 10-Formyltetrahydrofolat verbrauchenden Schritt (Abbildung 4.6B). 10-Formyltetrahydrofolat kann von *E. coli* nicht aus Formiat gebildet werden (Dev und Harvey, 1978), sondern entsteht ausschließlich aus 5,10-Methylentetrahydrofolat (Matthews, 1996). Es ist anzunehmen, dass auch eine *purB*-Mutante mehr Pantothersäure produziert, denn für jedes synthetisierte Purin-Molekül muss die Zelle zwei 10-Formyltetrahydrofolat- und ein Glycin-Molekül (entsprechend einem CH₂-THF) aufwenden. Leider konnten in dieser Arbeit grundsätzlich keine *pur*-Mutanten isoliert werden, da schon bei der Zwischenkultivierung der Transposonmutanten ein Purin-freies Medium (*casaminoacids*-Medium, vgl. Kapitel 2.1.2) verwendet wurde.

Helling *et al.* (2002) konnten für die Aktivierung des AcrAB-TolC-Systems durch solch verschiedenartige Mutationen keine schlüssige Erklärung finden. Da alle vier Mutationen jedoch nachweislich (*idcA*) oder sehr wahrscheinlich (*cysH*, *metE*, *purB*) zur vermehrten Produktion von Pantothersäure führen, könnte diese für die MarA-induzierte Expression von *arcAB* verantwortlich sein. Die Salicylat-Resistenz der von Hikichi *et al.* (1996) entwickelten Produktionsstämme wäre dann ebenfalls auf die hohe Pantothenat-Konzentrationen zurückzuführen. Wenn diese Hypothese stimmt, sollte auch ein Großteil derjenigen *TnphoA*-Mutanten, die größere Höfe bilden, eine erhöhte Resistenz gegen Nalidixinsäure und Salicylsäure zeigen. Das AcrAB-TolC System besitzt ein extrem breites Substratspektrum. So exkretiert es verschiedenste Antibiotika (z.B. Chloramphenicol, Tetracyclin, Nalidixinsäure), organische Lösungsmittel (Cyclohexan) oder auch Detergentien wie SDS (White *et al.*, 1997;

Nishino und Yamaguchi, 2001). Daher könnte auch die Pantothensäure durchaus ein Substrat von AcrAB-TolC sein - eine Vermutung, die sich in Zukunft durch die Untersuchung von *tolC*-Mutanten klären lassen sollte.

5. Literatur

Abiko, Y. (1975). Metabolism of Coenzyme A. in **D. M. Greenburg (ed.)**. Metabolic pathways. Academic Press, inc., New York.

Ahmer, B. M., Thomas, M. G., Larsen, R. A. und K. Postle (1995). Characterization of the *exbBD* operon of *Escherichia coli* and the role of ExbB and ExbD in TonB function and stability. *J. Bacteriol.* 177:4742-4747.

Airas, R. K. (1988). Pantothenases from pseudomonads produce either pantoyl lactone or pantoic acid. *Biochem. J.* 250:447-451.

Aisen, P., Leibman, A und J. Zweier (1978). Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin. *J. Biol. Chem.* 253:1930-1937.

Alba, B. M., Zhong, H. J., Pelayo, J. C. und C. A. Gross (2001). *degS* (*hhoB*) is an essential *Escherichia coli* gene whose indispensable function is to provide sigma (E) activity. *Mol. Microbiol.* 40:1323-1333.

Albert, A., Dhanaraj, V., Genschel, U., Khan, G., Ramjee, M. K., Pulido, R., Sibanda, B.L., von Delft, F., Witty, M., Blundell, T. L., Smith, A. G. und C. Abell (1998). Crystal structure of aspartate decarboxylase at 2.2 Å resolution provides evidence for an ester in protein self-processing. *Nat. Struct. Biol.* 5:289-293.

Amann, E. und K. J. Abel (1989). Expression vectors for the production of non-fusion proteins in microorganisms. Europäisches Patent Nr. EP0345615.

Antonucci, T. K., Landick, R. und D. L. Oxender (1985). The leucine binding proteins of *Escherichia coli* as models for studying the relationships between protein structure and function. *J. Cell. Biochem.* 29:209-216.

Bae, W., Xia, B., Inouye, M. und K. Severinov (2000). *Escherichia coli* CspA-family RNA chaperones are transcription antiterminators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97:7784-7789.

Begley, T. P., Kinsland, C. und E. Strauss (2001). The biosynthesis of coenzyme A in bacteria. *Vitam. Horm.* 61:157-171.

Blatt, J. M., Pledger, W. J. und H. E. Umbarger (1972). Isoleucine and valine metabolism in *Escherichia coli*. Multiple forms of acetohydroxy acid synthetase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48:444-450.

Blattner, F. R., Plunkett, G. III, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B. und Y. Shao (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277:1453-1474.

Brechtel, C. E., Hu, L. und S. C. King (1996). Substrate specificity of the *Escherichia coli* 4-aminobutyrate carrier encoded by *gabP*. Uptake and counterflow of structurally diverse molecules. *J. Biol. Chem.* 271:783-788.

Brechtel, C. E. und S. C. King (1998). 4-Aminobutyrate (GABA) transporters from the amine-polyamine-choline superfamily: substrate specificity and ligand recognition profile of the 4-aminobutyrate permease from *Bacillus subtilis*. *Biochem. J.* 333:565-571.

Brown, G. M. (1959). The metabolism of pantothenic acid. *J. Biol. Chem.* 234:370-378.

Campbell, N. A. (1997). Biologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. S. 892.

Carter, P. W., Weiss, D. L., Weith, H. L. und J. M. Calvo (1985). Mutations that convert the four leucine codons of the *Salmonella typhimurium* *leu* leader to four threonine codons. *J. Bacteriol.* 162:943-949.

Cayley, S., Lewis, B. A., Guttman, H. J. und M. T. Record, Jr. (1991). Characterization of the cytoplasm of *Escherichia coli* K-12 as a function of external osmolarity. Implications for protein-DNA interactions *in vivo*. *J. Mol. Biol.* 222:281-300.

Chassagnole, C., Letisse, F., Diano, A. und N. D. Lindley (2002). Carbon flux analysis in a pantothenate overproducing *Corynebacterium glutamicum* strain. *Mol. Biol. Rep.* 29:129-134.

Clavel, T., Germon, P., Vianney, A., Portalier, R. und J. C. Lazzaroni (1998). TolB protein of *Escherichia coli* K-12 interacts with the outer membrane peptidoglycan-associated proteins Pal, Lpp and OmpA. *Mol. Microbiol.* 29:359-367.

Cohen, S. P., Levy, S. B., Foulds, J. und J. L. Rosner (1993). Salicylate induction of antibiotic resistance in *Escherichia coli*: activation of the *mar* operon and a *mar*-independent pathway. *J. Bacteriol.* 175:7856-7862.

Cosloy, S. D. (1973). D-serine transport system in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 114:679-684.

Cronan, J. E., Jr. (1980). Beta-alanine synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 141:1291-1297.

Cronan, J. E., Jr. und D. La Porte (1996). Tricarboxylic acid cycle and glyoxylate bypass. in Neidhardt, F. C. *et al.* (1996). *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. 2nd ed., ASM Press, Washington D.C. S. 206-216.

Daßler, T., Maier, T., Winterhalter, C. und A. Böck (2000). Identification of a major facilitator protein from *Escherichia coli* involved in efflux of metabolites of the cysteine pathway. *Mol. Microbiol.* 36:1101-1112.

Davis, B. D. und E. S. Mingioli. (1950). Mutants of *Escherichia coli* requiring Methionin or Vitamin B₁₂. *J. Bacteriol.* 60:17-28.

De Las Peñas, A., Connolly, L. und C. A. Gross (1997). The sigmaE-mediated response to extracytoplasmic stress in *Escherichia coli* is transduced by RseA and RseB, two negative regulators of sigmaE. *Mol. Microbiol.* 24:373-385.

Dev, I. K. und R. J. Harvey (1978). A complex of N5,N10-methylenetetrahydrofolate dehydrogenase and N5,N10-methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase in *Escherichia coli*. Purification, subunit structure, and allosteric inhibition by N10-formyltetrahydrofolate. *J. Biol. Chem.* 253:4245-4253.

Difco Manual (1998). 11th edition. Difco Laboratories, Sparks, Maryland, USA. S. 110-112.

Donachie, W. D. (2002). FtsK: Maxwell's Demon? *Mol. Cell* 9:206-207.

Donnenberg, M. S. und J. B. Kaper (1991). Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infect. Immun.* 59:4310-4317.

Elischewski, F., Pühler, A. und J. Kalinowski (1999). Pantothenate production in *Escherichia coli* K12 by enhanced expression of the *panE* gene encoding ketopantoate reductase. *J. Biotechnol.* 75:135-146.

Flint, D. H., Emptage, M. H., Finnegan, M. G., Fu, W. und M. K. Johnson (1993). The role and properties of the iron-sulfur cluster in *Escherichia coli* dihydroxy-acid dehydratase. *J. Biol. Chem.* 268:14732-14742.

Fraenkel, D. G. (1996). Glycolysis. in **Neidhardt, F. C. et al. (1996).** *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. 2nd ed., ASM Press, Washington D.C. S.189-198.

Gajiwala, K. S. und S. K. Burley (2000). HdeA, a periplasmatic protein that supports acid resistance in pathogenic enteric bacteria. *J. Mol. Biol.* 295:605-612.

Gehring, A. M., Bradley, K. A. und C. T. Walsh (1997). Enterobactin biosynthesis in *Escherichia coli*: isochorismate lyase (EntB) is a bifunctional enzyme that is phosphopantetheinylated by EntD and then acylated by EntE using ATP and 2,3-dihydroxybenzoate. *Biochemistry* 36:8495-8503.

Gehring, A. M., Mori, I. und C. T. Walsh (1998). Reconstitution and characterization of the

Escherichia coli enterobactin synthetase from EntB, EntE, and EntF. *Biochemistry* 37:2648-2659.

Gelfand, D. H. und R. A. Steinberg (1977). *Escherichia coli* mutants deficient in the aspartate and aromatic amino acid aminotransferases. *J. Bacteriol.* 130:429-440.

Genschel, U., Powell, C. A., Abell, C. und A. G. Smith (1999). The final step of pantothenate biosynthesis in higher plants: cloning and characterization of pantothenate synthetase from *Lotus japonicus* and *Oryza sativum* (rice). *Biochem. J.* 341:669-678.

Ghrist, A. C. und G. V. Stauffer (1995). The *Escherichia coli* glycine transport system and its role in the regulation of the glycine cleavage enzyme system. *Microbiology* 141:133-140.

Glusman, M. (1947). The syndrome of "burning feet" (nutritional melalgia) as a manifestation of nutritional deficiency. *Am. J. Med.* 11:95.

Gojkovic, Z., Sandrini, M. P. und J. Piskur (2001). Eukaryotic beta-alanine synthases are functionally related but have a high degree of structural diversity. *Genetics* 158:999-1011.

Grant, S. G., Jessee, J., Bloom, F. R. und D. Hanahan (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 87:4645-4649.

Greene, R. C. (1996). Biosynthesis of Methionine. in **Neidhardt, F. C. et al. (1996).** *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. 2nd ed., ASM Press, Washington D.C. S. 542-560.

Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation fo *E. coli*. in **Glover, D. M. (ed.).** DNA cloning. Vol. 1. IRL-Press, Oxford, Washington D. C. S. 109-136.

Haney, S. A. und D. L. Oxender (1992). Amino acid transport in bacteria. *Int. Rev. Cytol.* 137:37-95.

Harris, R. M., Webb, D. C., Howitt, S. M. und G. B. Cox (2001). Characterization of PitA and PitB from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183:5008-5014.

Heiner, C. R., Hunkapiller, K. L., Chen, S. M., Glass, J. I. und E. Y. Chen (1998). Sequencing multimegabase-template DNA with BigDye terminator chemistry. *Genome Res.* 8:557-561.

Helling, R. B., Janes, B. K., Kimball, H., Tran, T., Bundesmann, M., Check, P., Phelan, D. und C. Miller (2002). Toxic waste disposal in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 184:3699-3703.

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

Higgs, P. I., Myers, P. S. und K. Postle (1998). Interactions in the TonB-dependent energy transduction complex: ExbB and ExbD form homomultimers. *J. Bacteriol.* 180:6031-6038.

Higgs, P. I., Letain, T. E., Merriam, K. K., Burke, N. S., Park, H., Kang, C. und K. Postle (2002). TonB interacts with nonreceptor proteins in the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 184:1640-1648.

Hikichi, Y., Moriya, T., Miki, H., Yamaguchi, T. und I. Nogami (1996). Production of D-pantoic acid and D-pantothenic acid. United States Patent Nr. 5518906 (EPA 0590857).

Hodges, R. E., Bean, W. B., Ohison, M. A. und R. Bleiler (1959). Human pantothenic acid deficiency produced by omega-methyl pantothenic acid. *J. Clin. Invest.* 38:1421- 1425.

Hulton, C. S., Seirafi, A., Hinton, J. C., Sidebotham, J. M., Waddell, L., Pavitt, G. D., Owen-Hughes, T., Spassky, A., Buc, H. und C. F. Higgins (1990). Histone-like protein H1 (H-NS), DNA supercoiling, and gene expression in bacteria. *Cell* 63:631-642.

Inoue, H., Nojime, H. und H. Okayama (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96:23-28.

Isler, O. und G., Brubacher. (1988). Pantothensäure. in **O. Isler, G. Brubacher, S. Ghisla und B. Kräutler (1988).** Vitamine II. Wasserlösliche Vitamine. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. S. 309-319.

Jack, D. L., Paulsen, I. T. und M. H. Saier (2000). The amino acid/polyamine/organocation (APC) superfamily of transporters specific for amino acids, polyamines and organocations. *Microbiology* 146:1797-1814.

Jackowski, S. und C. O. Rock (1981). Regulation of coenzyme A biosynthesis. *J. Bacteriol.* 148:926-932.

Jackowski, S und C. O. Rock (1984). Metabolism of 4'-phosphopantethenine in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 158:115-120.

Jackowski, S. und J. H. Alix (1990). Cloning, sequence, and expression of the pantothenate permease (*panF*) gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172:3842-3848.

Jackowski, S. (1996). Biosynthesis of Pantothenic Acid and Coenzyme A. in **Neidhardt, F. C. et al. (1996).** *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. 2nd ed., ASM Press, Washington D.C. S.687-694.

Jensen, K. F., Neuhard, J. und L. Schack (1982). RNA polymerase involvement in the regulation of expression of *Salmonella typhimurium pyr* genes. Isolation and characterization of a fluorouracil-resistant mutant with high, constitutive expression of the *pyrB* and *pyrE* genes due to a mutation in *rpoBC*. *EMBO J.* 1:69-74.

Jensen, K. F. (1993). The *Escherichia coli* K-12 "wild types" W3110 and MG1655 have an *rph* frameshift mutation that leads to pyrimidine starvation due to low *pyrE* expression levels. *J. Bacteriol.* 175(11):3401-3407.

Kanjo, N., Nakahigashi, K., Oeda, K. und H. Inokuchi (2001). Isolation and characterization of a cDNA from soybean and its homolog from *Escherichia coli*, which both complement the light sensitivity of *Escherichia coli hemH* mutant strain VS101. *Genes. Genet. Syst.* 76:327-334.

Keilhauer, C., Eggeling, L. und H. Sahm (1993). Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon. *J. Bacteriol.* 175:5595-5603.

Kimura, S., Furukawa, Y., Wakasugi, J., Ishihara, Y. und A. Nakayama (1980). Antagonism of L(-)pantothenic acid on lipid metabolism in animals. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* (Tokyo) 26:113-117.

King, S. C., Fleming, S. R. und C. E. Brechtel (1995). Ligand recognition properties of the *Escherichia coli* 4-aminobutyrate transporter encoded by *gabP*. *J. Biol. Chem.* 270:19893-19897.

Klein, J., Henrich, B. und R. Plapp (1986). Cloning and expression of the *pepD* gene of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 132:2337-2343.

Klingenberg, M. und E. Pfaff (1967). Means of terminating reactions. *Methods. Enzymol.* 10:680-684.

Kredich, N. M. (1996). Biosynthesis of cysteine. in **Neidhardt, F. C. et al. (1996).** *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. 2nd ed., ASM Press, Washington D.C. S.514-527.

Krogan, N. J., Zaharik, M. L., Neuhard, J. und R. A. Kelln (1998). A combination of three mutations, *dcd*, *pyrH*, and *cdd*, establishes thymidine (Deoxyuridine) auxotrophy in thyA⁺ strains of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 180:5891-5895.

Lawther, R. P., Calhoun, D. H., Adams, C. W., Hauser, C. A., Gray, J. und G. W. Hatfield (1981). Molecular basis of valine resistance in *Escherichia coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78:922-925.

Lazdunski, C., Bouveret, E., Rigal, A., Journet, L., Lloubes, R. und H. Benedetti (2000). Colicin import into *Escherichia coli* cells requires the proximity of the inner and outer membranes and other factors. *Int. J. Med. Microbiol.* 290:337-344.

Lebensmittelchemische Gesellschaft (1999). Datenblätter zur Bewertung der Wirksamkeit von Wirkstoffen in kosmetischen Mitteln: Panthenol. Herausgeber: Gesellschaft Deutscher Chemiker, Frankfurt am Main.

Lindroth, P. und K. Mopper (1979). High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthalaldehyde. *Anal. Chem.* 51:1667-1674.

Link, A.J., Phillips, D. und G. M. Church (1997). Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J. Bacteriol.* 179: 6228-6237.

Livshits, V. A., Zakataeva, N. P., Aleshin, V. V. und M. V. Vitushkina (2003). Identification and characterization of the new gene *rhtA* involved in threonine and homoserine efflux in *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* 154:123-135.

Lugtenberg, E. J. (1972). Studies on *Escherichia coli* enzymes involved in the synthesis of uridine diphosphate-N-acetyl-muramyl-pentapeptide. *J. Bacteriol.* 110:26-34.

Maas, W.K. (1952). Pantothenate studies II. Evidence from mutants for interference by salicylate with pantoate synthesis. *J. Bacteriol.* 63:227-232.

Manoil, C. und J. Beckwith (1985). *TnphoA*: a transposon probe for protein export signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:8129-8133.

Manoil, C., Mekalanos, J. J. und J. Beckwith (1990). Alkaline phosphatase fusions: sensors of subcellular location. *J. Bacteriol.* 172:515-518.

- March, P. E. und M. Inouye (1985).** Characterization of the *lep* operon of *Escherichia coli*. Identification of the promoter and the gene upstream of the signal peptidase I gene. *J. Biol. Chem.* 260:7206-7213.
- Matthews, R. G. (1996).** One-carbon metabolism. *in* **Neidhardt, F. C. et al. (1996)** *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. 2nd ed., ASM Press, Washington D.C. S.600-611.
- Miller, S. L. und G. Schlesinger (1993).** Prebiotic syntheses of vitamin coenzymes: II. Pantoic acid, pantothenic acid, and the composition of coenzyme A. *J. Mol. Evol.* 36:308-314.
- Miyatake, K., Nakano, Y. und S. Kitaoka (1976).** Pantothenate synthetase of *Escherichia coli* B. I. Physicochemical properties. *J. Biochem. (Tokyo)* 79:673-678.
- Miyatake, K., Nakano, Y. und S. Kitaoka (1978).** Enzymological properties of pantothenate synthetase from *Escherichia coli* B. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 24:243-53.
- Moriya, T., Hikichi, Y., Moriya, Y. und T. Yamaguchi (1999).** Process for producing D-pantoic acid and D-pantothenic acid or salts thereof. United States Patent Nr. 5932457.
- Myers, J. W. (1961).** Dihydroxy acid dehydrase: an enzyme involved in the biosynthesis of isoleucine and valine. *J. Biol. Chem.* 236:1414-1418.
- Nakamori, S., Kobayashi, S., Nishimura, T. und H. Takagi (1999).** Mechanism of L-methionine overproduction by *Escherichia coli*: the replacement of Ser-54 by Asn in the MetJ protein causes the derepression of L-methionine biosynthetic enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52:179-185.
- Neuhard, J. und R. A. Kelln (1996).** Biosynthesis and conversion of pyrimidines. *in* **Neidhardt, F. C. et al. (1996).** *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. 2nd ed., ASM Press, Washington D.C. S.580-599.

Nishino, K. und A. Yamaguchi (2001). Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183:5803-5812.

Nogami, I., Hikichi, Y., Miki, H., Moriya, T. und T. Yamaguchi (1992). Production method of d-pantothenic acid and plasmids and microorganisms thereof. Europäisches Patent Nr. EP0493060.

Ohnishi, K., Hasegawa, A., Matsubara, K., Date, T., Okada, T. und K. Kiritani (1988). Cloning and nucleotide sequence of the *brnQ* gene, the structural gene for a membrane-associated component of the LIV-II transport system for branched-chain amino acids in *Salmonella typhimurium*. *Jpn. J. Genet.* 63:343-357.

Patel, B. N. und T. P. West (1987). Degradation of the pyrimidine bases uracil and thymine by *Escherichia coli* B. *Microbios.* 49:107-113.

Patte, J.-C. (1996). Biosynthesis of threonine and lysine. in **Neidhardt, F. C. et al. (1996).** *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. 2nd ed., ASM Press, Washington D.C. S.528-541.

Pettijohn, D. E. (1996). The Nucleoid. in **Neidhardt, F. C. et al. (1996).** *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. ASM Press, Washington D.C. S.158-166.

Porankiewicz, J., Wang, J. und A. K. Clarke (1999). New insights into the ATP-dependent Clp protease: *Escherichia coli* and beyond. *Mol. Microbiol.* 32:449-458.

Powers, S. G. und E. E. Snell (1976). Ketopantoate hydroxymethyltransferase. II. Physical, catalytic, and regulatory properties. *J. Biol. Chem.* 251:3786-3793.

Primerano, D. A. und R. O. Burns (1983). Role of acetohydroxy acid isomeroreductase in biosynthesis of pantothenic acid in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 153:259-269.

Ramjee, M. K., Genschel, U., Abell, C. und A. G. Smith (1997). *Escherichia coli* L-

aspartate-alpha-decarboxylase: preprotein processing and observation of reaction intermediates by electrospray mass spectrometry. *Biochem. J.* 323:661-669.

Raymond, K. N., Dertz, E. A. und S. S. Kim (2003). Enterobactin: An archetype for microbial iron transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:3584-3588.

Recsei, P. A. und E. E. Snell (1984). Pyruvoyl enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 53:357-387.

Reitzer, L. J. (1996a). Sources of nitrogen and their utilization. *in Neidhardt, F. C. et al. (1996). Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology.* 2nd ed., ASM Press, Washington D.C. S.380-390.

Reitzer, L. J. (1996b). Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine. and D-alanine. *in Neidhardt, F. C. et al. (1996). Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology.* 2nd ed., ASM Press, Washington D.C. S.391-407.

Robbins, J. C. und D. L. Oxender. (1973). Transport systems for alanine, serine, and glycine in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 116:12-18.

Roberts, R. B., Abelson, P. H., Cowie, D. B., Bolton, E. T. und R. J. Britten (1957). Studies on biosynthesis in *Escherichia coli*. Publication 607. Carnegie Institution of Washington, Washington, D.C.

Rossolini, G. M., Thaller, M. C., Pezzi, R. und G. Satta (1994). Identification of an *Escherichia coli* periplasmic acid phosphatase containing of a 27 kDa-polypeptide component. *FEMS Microbiol. Lett.* 118:167-173.

Rusnak, F., Sakaitani, M., Drucekhammer, D., Reichert, J. und C. T. Walsh (1991). Biosynthesis of the *Escherichia coli* siderophore enterobactin: sequence of the entF gene, expression and purification of EntF, and analysis of covalent phosphopantetheine. *Biochemistry* 30:2916-2927.

Sahm, H. und L. Eggeling (1999). D-Pantothenate synthesis in *Corynebacterium glutamicum* and use of *panBC* and genes encoding L-valine synthesis for D-pantothenate overproduction. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1973-1979.

Saliba, K. J., Horner, H. A. und K. Kirk (1998). Transport and metabolism of the essential vitamin pantothenic acid in human erythrocytes infected with the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* 273:10190-10195.

Saliba, K. J. und K. Kirk (2001). H⁺-coupled pantothenate transport in the intracellular malaria parasite. *J. Biol. Chem.* 276:18115-18121.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. und T. Maniatis (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Singer, M., Baker, T. A., Schnitzler, G., Deischel, S. M., Goel, M., Dove, W., Jaacks, K. J., Grossman, A. D., Erickson, J. W. und C. A. Gross (1989). A collection of strains containing genetically linked alternating antibiotic resistance elements for genetic mapping of *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 53:1-24.

Spitzer, E. D., Jimenez-Billini, H. E. und B. Weiss (1988). beta-Alanine auxotrophy associated with *dfp*, a locus affecting DNA synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170:872-876.

Stock, J. B., Rauch, B. und S. Roseman (1977). Periplasmic space in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 252:7850-7861.

Stolz, J. und N. Sauer (1999). The fenpropimorph resistance gene FEN2 from *Saccharomyces cerevisiae* encodes a plasma membrane H⁺-pantothenate symporter. *J. Biol. Chem.* 274:18747-18752.

Sugantino, M., Zheng, R. und M. Yu (2003). *Mycobacterium tuberculosis* ketopantoate hydroxymethyltransferase: tetrahydrofolate-independent hydroxymethyltransferase and enolization reactions with alpha-keto acids. *Biochemistry* 42:191-199.

Tabor, C. W. und P. D. Kellogg (1970). Identification of flavin adenine dinucleotide and heme in a homogeneous spermidine dehydrogenase from *Serratia marcescens*. *J. Biol. Chem.* 245:5424-5433.

Taylor, R. K., Manoil, C. und J. J. Mekalanos (1989). Broad-host-range vectors for delivery of *TnphoA*: use in genetic analysis of secreted virulence determinants of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 171:1870-1878.

Taylor, A. F. und G. R. Smith (1995). Monomeric RecBCD enzyme binds and unwinds DNA. *J. Biol. Chem.* 270:24451-24458.

Teller, J. H., Powers, S. G. und E. E. Snell (1976). Ketopantoate hydroxymethyltransferase. I. Purification and role in pantothenate biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 251:3780-3785.

Thaller, M. C., Schippa, S., Bonci, A., Cresti, S. und G. M. Rossolini (1997). Identification of the gene (*aphA*) encoding the class B acid phosphatase/phosphotransferase of *Escherichia coli* MG1655 and characterization of its product. *FEMS Microbiol. Lett.* 146:191-198.

Tibbetts, R. J., Lin, T. L. und C. C. Wu (2003). Phenotypic evidence for inducible multiple antimicrobial resistance in *Salmonella choleraesuis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 218:333-338.

Umbarger, H. E. (1996). Biosynthesis of the branched-chain amino acids. in **Neidhardt, F. C. et al. (1996).** *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. 2nd ed., ASM Press, Washington D.C. S. 442-457.

Vallari, D. S. und C. O. Rock (1985a). Pantothenate transport in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 162:1156-1161.

Vallari, D. S. und C. O. Rock (1985b). Isolation and characterization of *Escherichia coli* pantothenate permease (*panF*) mutants. *J. Bacteriol.* 164:136-142.

Vallari, D. S., Jackowski, S. und C. O. Rock (1987). Regulation of pantothenate kinase by coenzyme A and its thioesters. *J. Biol. Chem.* 262:2468-2471.

Vanet A., Plumbridge J. A. und J. H. Alix (1993). Cotranscription of two genes necessary for ribosomal protein L11 methylation (*prmA*) and pantothenate transport (*panF*) in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 175:7178-7188.

Vogel, H. J. und D. M. Bonner (1956). Acetylornithinase of *E. coli*: a partial purification and some properties. *J. Biol. Chem.* 218:97-106.

von Delft, F., Lewendon, A., Dhanaraj, V., Blundell, T. L., Abell, C. und A. G. Smith (2001). The crystal structure of *E. coli* pantothenate synthetase confirms it as a member of the cytidylyltransferase superfamily. *Structure (Camb)* 9:439-450.

Wang, H., Huang, W., Fei, Y. J., Xia, H., Yang-Feng, T. L., Leibach, F. H., Devoe, L. D., Ganapathy, V. und P. D. Prasad (1999). Human placental Na⁺-dependent multivitamin transporter. Cloning, functional expression, gene structure, and chromosomal localization. *J. Biol. Chem.* 274:14875-14883.

Wargel, R. J., Shadur, C. A. und F. C. Neuhaus (1970). Mechanism of D-cycloserine action: transport systems for D-alanine, D-cycloserine, L-alanine, and glycine. *J. Bacteriol.* 103:778-788.

Wargel, R. J., Shadur, C. A. und F. C. Neuhaus (1971). Mechanism of D-cycloserine action: transport mutants for D-alanine, D-cycloserine, and glycine. *J. Bacteriol.* 105:1028-1035.

Wei, Y., Lee, J. M., Richmond, C., Blattner, F. R., Rafalski, J. A. und R. A. La Rossa (2001). High-density microarray-mediated gene expression profiling of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183:545-556.

Whalen, W. A. und C. M. Berg (1984). Gratuitous repression of *avtA* in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 158:571-574.

White, D. G., Goldman, J. D., Demple, B. und S. B. Levy (1997). Role of the *acrAB* locus in organic solvent tolerance mediated by expression of *marA*, *soxS*, or *robA* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179:6122-6126.

Wilken, D. R., King, H. L. Jr. und R. E. Dyar (1979). Ketopantoyl lactone reductases. *Methods. Enzymol.* 62:209-215.

Williamson, J. M. und G. M. Brown (1979). Purification and properties of L-Aspartate-alpha-decarboxylase, an enzyme that catalyzes the formation of beta-alanine in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 254:8074-8082.

Willmes, A. (1993). Taschenbuch chemischer Substanzen. Verlag Harri Deutsch, Frankfurt am Main, S. 515-516.

Wooldridge, K. G., Morrissey, J. A. und P. H. Williams (1992). Transport of ferric-aerobactin into the periplasm and cytoplasm of *Escherichia coli* K12: role of envelope-associated proteins and effect of endogenous siderophores. *J. Gen. Microbiol.* 138:597-603.

Zimmer, D. P., Soupene, E., Lee, H. L., Wendisch, V. F., Khodursky, A. B., Peter, B. J., Bender, R.A. und S. Kustu (2000). Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: Scavenging as a defense against nitrogen limitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:14674-14679

Lebenslauf

Frank Schneider
Brühler Str. 7
50968 Köln

Geboren am 18.02.1971 in Köln
Staatsangehörigkeit: deutsch
verheiratet, zwei Kinder

März 2000:

Beginn der Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Reinhard Krämer am Institut für Biochemie der Universität Köln

Oktober 1999:

Diplom mit der Gesamtnote „sehr gut“.

September 1998 – September 1999:

Diplomarbeit am Institut für Genetik der Universität Köln bei PD Dr. Peter Dröge.
Thema: „Konstruktion und Charakterisierung von Resolvase-Invertase-Chimären.“

Oktober 1993 – August 1998:

Biologie-Studium an der Universität Köln mit den Schwerpunkten Genetik, Biochemie und Entwicklungsbiologie

Oktober 1992 – September 1993:

Studium der Musikwissenschaft, Physik und Phonetik an der Universität Köln.
Nach zwei Semestern Wechsel des Studienfachs.

August 1991 – Oktober 1992:

Zivildienst beim Caritasverband für die Stadt Köln e.V.: Versorgung und Betreuung alter Menschen in ihren eigenen Wohnungen

1977 – 1991:

Grundschule und Lessing-Gymnasium, Köln-Porz. Abschluss: Abitur

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 betreut worden.

Teilpublikationen: keine

Ein herzliches Dankeschön an...

... Prof. Reinhard Krämer für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die engagierte Betreuung, die stete Bereitschaft zur Diskussion und für viele wertvolle Ratschläge.

... Prof. Reinhard Sterner für die freundliche Übernahme des Korreferates.

... Prof. Thomas Langer für die freundliche Übernahme des Vorsitzes bei der Disputation.

... Andreas für die vielen Tipps sowie die schönen Diskussionen über Biochemie und meine Kinder.

... die Degussa für die finanzielle Unterstützung meines Projektes.

... meine lieben Laborkollegen und -kolleginnen: Suna (die bald Mama wird), den großen und den kleinen Christian, Astrid (irgendwann kommt der Tag, da funktionieren beide HPLC's - wenn auch nur für eine Stunde...) und Kai (grüne Bakterien? ... komisches Zeug...).

... die netten Leute aus den anderen „Welten“, z. B. Gabi B. und Gabi S., Anne, Maike, Julia, Anja, Susanne, Johannes (Wie? Schon wieder freimessen?), Nina, Henrike, Ute, Oliver (Olli, mein Computer spinnt...), Dirk und Martin.

... die „Ehemaligen“, besonders an Pilar, Rolf, Andreas, Daniela, Markus und Birgit.

... Lothar und Nicole für die schöne Zeit in Jülich.

... Peter Dröge für eine sehr aufbauende Weihnachts-E-mail.

... Heiner Platzbecker, der in mir vor langer Zeit das Interesse an der Wissenschaft geweckt hat.

... die Zentral-Mensa für das leckere Essen und Schmitz-Nittenwilm für den Kuchen zum Nachmittagskaffee.

Mein größter Dank gilt jedoch meiner lieben Frau Sigrid und meinen tollen Kindern Benjamin und Fabian, die mir immer wieder zeigen, dass es etwas wichtigeres als *E. coli* im Leben gibt.