

**β -Alanin- und Pantothenattransport
in Zusammenhang mit der Pantothenatproduktion
in *Corynebacterium glutamicum***

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

vorgelegt von
Suna Giannona
aus Meerbusch
(copy team cologne, Köln)

Köln, Dezember 2003

**β -Alanin- und Pantothenattransport
in Zusammenhang mit der Pantothenatproduktion
in *Corynebacterium glutamicum***

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

vorgelegt von
Suna Giannona
aus Meerbusch
(copy team cologne, Köln)

Köln, Dezember 2003

Berichtersteller:

Professor Dr. Reinhard Krämer
Priv.-Doz. Dr. Andreas Burkovski

Tag der Disputation: 02. Februar. 2004

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|------------|
| Zusammenfassung | i |
| Abstract | iii |
| Abkürzungen | iv |
| I. Einleitung | 1 |
| Die Gattung <i>Corynebacterium</i> | 1 |
| Die Bedeutung von <i>Corynebacterium glutamicum</i> in der Biotechnologie | 2 |
| Das Vitamin Pantothersäure | 2 |
| Die Biosynthese von Pantothenat | 5 |
| Transport von Pantothenat und β-Alanin | 7 |
| Die industrielle Produktion von Vitaminen | 8 |
| Die industrielle Produktion von Pantothenat | 9 |
| II. Material und Methoden | 10 |
| 1 Bakterienstämme und Plasmide | 10 |
| 2 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen | 13 |
| 2.1 Nährmedien für <i>C. glutamicum</i> | 13 |
| 2.2 Nährmedien für <i>E. coli</i> | 13 |
| 2.3 Antibiotika | 13 |
| 2.4 Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung | 14 |
| 3 Biochemische Techniken | 14 |
| 3.1 Aufnahmemessungen mit radioaktiv markierten Substraten | 14 |
| 3.2 Nichtradioaktive Aufnahmemessungen | 15 |
| 3.2.1 Silikonölzentrifugation | 15 |
| 3.2.2 Bestimmung von Aminosäurekonzentrationen mit Hilfe der HPLC | 16 |
| 3.3 Mikrobiologischer Röhrentest zur Quantifizierung von Pantothersäure | 17 |
| 3.4 Screening von Transposonmutanten mit dem Plattentest | 18 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 3.5 | Bestimmung von ATP-Konzentrationen | 19 |
| 4 | Molekularbiologische Techniken | 20 |
| 4.1 | DNA-Techniken | 20 |
| 4.1.1 | Plasmid-Präparation aus <i>C. glutamicum</i> | 20 |
| 4.1.2 | Plasmid-Präparation aus <i>E. coli</i> | 20 |
| 4.1.3 | Präparation chromosomaler DNA aus <i>C. glutamicum</i> | 21 |
| 4.1.4 | Restriktion, Ligation und Modifikation von DNA | 21 |
| 4.1.5 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 22 |
| 4.1.6 | Sequenzierung von Plasmid-DNA | 23 |
| 4.2 | RNA-Techniken | 24 |
| 4.2.1 | Präparation von Gesamt-RNA aus <i>C. glutamicum</i> und RNA-Gelelektrophorese | 24 |
| 4.2.2 | Präparation der <i>cycA</i> mRNA-Sonde durch <i>in-vitro</i> -Transkription | 25 |
| 4.2.3 | RNA-Hybridisierung | 26 |
| 4.3 | Techniken zur Manipulation von Zellen | 27 |
| 4.3.1 | Herstellung kompetenter Zellen und Transformation | 27 |
| 4.3.2 | Konstruktion der Insertions- und Deletionsmutanten von <i>C. glutamicum</i> | 29 |
| 4.3.3 | Klonierung von pXMJ19NCgl2816 und pXMJ19 <i>cycA</i> | 31 |
| III. | Ergebnisse | 32 |
| 1 | Die β-Alaninaufnahme im <i>C. glutamicum</i> Wildtyp ATCC 13032 | 32 |
| 1.1 | Charakterisierung der β -Alaninaufnahme | 32 |
| 1.1.1. | Biochemische Charakterisierung der β -Alaninaufnahme | 32 |
| 1.1.2 | Energetische Aspekte der β -Alaninaufnahme | 33 |
| 1.1.3 | Kompetition der β -Alaninaufnahme durch verschiedene Aminosäuren | 36 |
| 1.2 | Molekularbiologischer Ansatz zur Identifizierung eines β -Alaninaufnahmesystems | 37 |
| 1.2.1 | Inaktivierung des Gens eines putativen β -Alaninimporters | 38 |
| 1.2.2 | Deletion des Gens eines putativen β -Alaninimporters | 39 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1.2.3 | Die β -Alaninaufnahme durch die Insertionsmutante ATCC 13032 <i>ykfD::pK18mob'ykfD'</i> mit dem inaktiven Gen eines putativen β -Alaninimporters | 41 |
| 1.3 | Heterologe Expression des Gens <i>cycA</i> für den β -Alanin Carrier aus <i>E. coli</i> in <i>C. glutamicum</i> | 42 |
| 1.3.1 | Nachweis der heterologen Expression von <i>cycA</i> in <i>C.</i> <i>glutamicum</i> durch RNA-Hybridisierung | 42 |
| 1.3.2 | β -Alaninaufnahme im <i>cycA</i> -exprimierenden Stamm ATCC 13032pXMJ19 <i>cycA</i> | 43 |
| 1.3.3 | Pantothenatproduktion durch den <i>cycA</i> -exprimierenden Stamm ATCC 13032pXMJ19 <i>cycA</i> | 44 |
| 2 | Die Pantothenataufnahme im <i>C. glutamicum</i> Wildtyp ATCC 13032 | 45 |
| 2.1 | Charakterisierung der Pantothenataufnahme | 45 |
| 2.1.1 | Biochemische Charakterisierung der Pantothenataufnahme | 45 |
| 2.1.2 | Einfluss von externem Pantothenat auf die Aufnahme | 46 |
| 2.2 | Molekularbiologischer Ansatz zur Identifizierung eines Pantothenat- aufnahmesystems | 47 |
| 2.2.1 | Deletion des Gens eines putativen Pantothenat- importers | 47 |
| 3 | Die Pantothenatexkretion in <i>C. glutamicum</i> | 50 |
| 3.1 | Screening nach <i>C. glutamicum</i> Transposonmutanten mit einer veränderten Pantothenatexkretion | 51 |
| 3.2 | Untersuchung der Transposonmutanten mit verändertem Verhalten in der Pantothenatexkretion | 52 |
| 3.2.1 | Charakterisierung der Transposonmutanten 1G6, 33.2G5 und 34F10 | 52 |
| 3.2.2 | Deletion der Gene putativer Pantothenatexporter | 52 |
| 3.2.3 | Effekt der Überexpression des Gens NCgl2816 im <i>C.</i> <i>glutamicum</i> Wildtyp ATCC 13032 | 54 |

| | |
|--|-----------|
| IV. Diskussion | 56 |
| 1 Die β-Alaninaufnahme im <i>C. glutamicum</i> Wildtyp ATCC 13032 | 56 |
| 1.1 Die β -Alaninaufnahme in <i>C. glutamicum</i> wird durch ein sekundär aktives Transmembranprotein katalysiert | 56 |
| 1.2 Effekte der Inaktivierung von Genen putativer β -Alaninimporter auf den Transport von β -Alanin und GABA in <i>C. glutamicum</i> | 57 |
| 1.3 Die heterologe Expression des <i>cycA</i> Gens für den β -Alaninimporter in <i>E. coli</i> führt in <i>C. glutamicum</i> zu einer 16-fachen Steigerung der β -Alaninaufnahmerate | 58 |
| 2 Die Pantothenataufnahme im <i>C. glutamicum</i> Wildtyp ATCC 13032 | 59 |
| 2.1 Biochemische Charakterisierung der Pantothenataufnahme in <i>C. glutamicum</i> | 59 |
| 2.2 Die Pantothenataufnahme wird durch ein primär aktives Aufnahmesystem katalysiert | 60 |
| 3 Die Pantothenatexkretion in <i>C. glutamicum</i> | 60 |
| 3.1 Die Deletion der Gene putativer Pantothenatexporter führt zu stark verminderter Pantothenatexkretion | 61 |
| 3.2 Die Überexpression des Gens für den putativen Pantothenatexporter NCgl2816 führt zu einer starken Zunahme der Pantothenatexkretion | 62 |
| 3.3 Der Weg zu einem Produktionsstamm für Pantothenat | 62 |
| Literatur | 66 |

Zusammenfassung

Stämme des Gram-positiven Bakteriums *Corynebacterium glutamicum* stellen heutzutage die wichtigsten Organismen zur biotechnologischen Herstellung von Aminosäuren dar. Da *C. glutamicum* ein genetisch und physiologisch gut untersuchtes Bakterium ist und für dessen Manipulation gut funktionierende Transformationsmethoden und Vektorsysteme zur Verfügung stehen, gibt es Bestrebungen, auch Pantothenensäure mit Hilfe dieses Organismus herzustellen. Der Weltjahresbedarf dieses ökonomisch wichtigen Vitamins wird heute durch chemische Verfahren gedeckt. Bei der Konstruktion eines Produktionsstammes für Pantothenensäure sind nicht nur Manipulationen des Stoffwechsels, sondern auch der Transmembranflüsse von Produkt (Pantothenat) und Substrat (β -Alanin) wichtig, da diese Flüsse die Produktion ebenfalls beeinflussen können. Die am Transport von Pantothenat und β -Alanin beteiligten Systeme waren in *C. glutamicum* bisher noch nicht bekannt. Ziel dieser Arbeit war deshalb deren Charakterisation und Identifikation.

Es konnte gezeigt werden, dass der Import von β -Alanin durch einen sekundär aktiven, Membranpotential-abhängigen Carrier mit einem K_m -Wert von 5 mM und einer maximalen Geschwindigkeit V_{max} von $1,66 \text{ nmol (mg TG)}^{-1} \text{ min}^{-1}$ katalysiert wird. Die Identifikation des β -Alaninaufnahmesystems ist durch Homologiestudien nicht gelungen, jedoch konnte durch eine heterologe Expression des Gens für den β -Alanin Carrier aus *Escherichia coli* die β -Alaninaufnahmerate in *C. glutamicum* bis um das 16-fache gesteigert werden.

Im Gegensatz zu β -Alanin wird Pantothenat durch ein primär aktives, ATP-abhängiges und hoch-affines System in die Zelle transportiert, welches sich durch einen K_m -Wert von $0,9 \text{ }\mu\text{M}$ und einer maximalen Geschwindigkeit von $26,6 \text{ pmol (mg TG)}^{-1} \text{ min}^{-1}$ auszeichnet. Das Aufnahmesystem konnte durch Homologiestudien nicht gefunden werden, da ein ABC-Transportsystem für Pantothenat in Bakterien oder Säugern noch nicht bekannt ist.

Für die Identifikation des Pantothenat-Exkretionssystems konnten in einem Screening von Transposonmutanten zwei Gene identifiziert werden, deren Deletion jeweils zu einem fast vollständigen Verlust der Pantothenatexkretion führte. Die

Überexpression eines dieser Gene führte zu einer Verdoppelung des exkretierten Pantothenats.

Abstract

Strains of the Gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* represent the most important organisms in the biotechnological production of amino acids. Since *C. glutamicum* is a genetically and physiologically well understood bacterium and established transformation methods and vector systems are available, there are efforts made to produce also pantothenic acid using this organism. The world's annual demand for this economically important vitamin is still met by chemical synthesis. Constructing a producer strain, one should not only take into account the possibilities of metabolic engineering, but also the transmembrane fluxes of product (pantothenate) and substrate (β -alanine), which can be limiting processes. The systems involved in the transport of pantothenate and β -alanine are still not known in *C. glutamicum*. Therefore, the aim of this work was the characterization and identification of these systems.

In the present work the uptake of β -alanine was found to be catalyzed by a secondary active, membrane potential-driven carrier which has a K_m of 5 mM and a maximum velocity V_{max} of $1,66 \text{ nmol (mg w}_d\text{)}^{-1}\text{min}^{-1}$. The identification of the β -alanine uptake system was not possible by homology studies, but the heterologue expression of the β -alanine carrier *CycA* of *Escherichia coli* resulted in a 16-fold increase of the β -alanine uptake rate in *C. glutamicum*.

The characterization of the pantothenate transport system revealed that *C. glutamicum* possesses a primary active, high-affinity carrier, which has a K_m of $0,9 \mu\text{M}$ and a maximum velocity V_{max} of $26,6 \text{ pmol (mg w}_d\text{)}^{-1}\text{min}^{-1}$. Since an ABC transport system is still not identified in bacteria or mammals, the identification of the carrier by homology studies was not possible.

For the identification of a pantothenate excretion system the screening of transposon mutants resulted in two genes, which were deleted individually. Both deletions led to an almost complete loss of pantothenate excretion, whereas an overexpression of one of the genes resulted in a twofold increase of pantothenate production.

Abkürzungen

| | |
|----------------------|--|
| Abb. | Abbildung |
| ABC-Transporter | ATP- <i>binding-casette</i> Transporter |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| ATCC | <i>American type culture collection</i> |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BHI | <i>brain-heart-infusion</i> |
| bp | Basenpaare |
| C | Celsius |
| CCCP | Carbonylcyanid- <i>m</i> -chlorophenylhydrazon |
| <i>C. glutamicum</i> | <i>Corynebacterium glutamicum</i> |
| CoA | Coenzym A |
| dpm | Zerfälle pro Minute |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleotid Triphosphat |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiaminotetraessigsäure |
| F | Farad |
| g | Gramm |
| × g | Erdbeschleunigung |
| GABA | γ -Amino- <i>n</i> -butyrylsäure |
| h | Stunde |
| HPLC | <i>high pressure liquid chromatography</i> |
| IPTG | Isopropylthiogalaktosid |
| kb | Kilobasen |
| KCN | Kaliumcyanid |
| K_m | Michaelis-Menten-Konstante |
| kV | Kilovolt |
| l | Liter |
| M | Molarität |
| min | Minute |
| OD ₆₀₀ | optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm |

| | |
|------------------|--------------------------------------|
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PP _i | anorganisches Phosphat |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| sec | Sekunde |
| Tab. | Tabelle |
| TG | Trockengewicht |
| Tris | 2-Amino-Hydroxymethylpropan-1,3-diol |
| V _{max} | maximale Aufnahmegeschwindigkeit |
| (v/v) | Volumen pro Volumen |
| w _d | <i>dry weight</i> |
| (w/v) | Gewicht pro Volumen |

I. Einleitung

Die Gattung *Corynebacterium*

Der Name *Corynebacterium* wurde 1896 von Lehmann und Neumann eingeführt, die mit *Corynebacterium diphtheriae* und *Corynebacterium xerosis* die ersten Organismen dieser Gattung beschrieben. Corynebakterien sind Gram-positive, nicht-sporenbildende Bakterien, die im Boden vorkommen und auch, zusammen mit anderen Gram-positiven Bakterien wie *Staphylococcus* und *Propionibacterium*, die menschliche Haut besiedeln. Sie haben eine keulenförmige (*coryne* ist griechisch und bedeutet Keule) Gestalt und zeigen einen typischen Zellteilungsmodus, wobei eine unvollständige Trennung nach der Zellteilung zu v-förmig voneinander abgewinkelten Tochterzellen führt (*snapping division*) (29). Corynebakterien sind aerob und nicht beweglich. Viele Arten von *Corynebacterium* sind Pflanzen- oder Tierpathogene, wie z. B. *C. diphtheriae*, der Erreger der Diphtherie, wobei interessanterweise nur solche *C. diphtheriae* Stämme pathogen sind und das giftige Exotoxin ausscheiden, die mit dem Phagen β lysogenisiert sind. Das Stützskelett der Zellwand von *Corynebacterium* besteht aus dem Peptidoglycan Murein, das die Diaminosäure meso-Diaminopimelinsäure enthält und mit dem Heteropolysaccharid Arabinogalactan verknüpft ist. Mit diesem sind kurzkettige (22 - 36 C-Atome) α -Alkyl, β -Hydroxy Fettsäuren, die Mycolsäuren, kovalent gebunden. Man nimmt an, dass diese aus den Mycolsäuren gebildete Schicht noch andere Lipide enthält, die so angeordnet sind, dass eine Lipiddoppelschicht gebildet wird (42). Somit besitzen Corynebakterien, ähnlich wie Gram-negative Bakterien, eine äußere Diffusionsbarriere (42). Wegen den biochemischen Ähnlichkeiten im Zellwandaufbau bezüglich der Peptidoglycan-Struktur, dem Vorkommen von Mycolsäuren und der Lipidzusammensetzung wird *Corynebacterium* zusammen mit *Mycobacterium*, *Nocardia* und *Rhodococcus* zu der sogenannten CMN-Gruppe zusammengefaßt (2). *Nocardia* und *Rhodococcus* gehören zu den Actinomyceten, wobei *Corynebacterium* und *Mycobacterium* als Actinomyceten-ähnliche Bakterien bezeichnet werden, da sie einen hohen G-C-Gehalt als Gemeinsamkeit mit den Actinomyceten haben (33). *Corynebacterium* bildet zwar keine Filamente, aber die unregelmäßige Morphologie und die Assoziation der Zellen nach der Teilung weisen ebenfalls auf eine verwandtschaftliche Beziehung zu den Filament-bildenden Actinomyceten.

Die Bedeutung von *Corynebacterium glutamicum* in der Biotechnologie

Corynebacterium glutamicum (damals *Micrococcus glutamicus*) wurde 1957 in Japan, infolge der ansteigenden Nachfrage nach Natriumglutamat als Geschmacksverstärker, im Rahmen eines Screeningprogramms als Glutamat-ausscheidender Organismus isoliert (28). Bis heute sind viele Mutanten von *C. glutamicum* isoliert worden, die für die Aminosäureproduktion eingesetzt werden und somit große wirtschaftliche Bedeutung erlangt haben. Auf diese Weise werden jährlich 1 Million Tonnen L-Glutamat und 450.000 Tonnen L-Lysin als Geschmacksverstärker bzw. Futtermittelzusatz und Isoleucin, Leucin und Valin als Bestandteile von Infusionslösungen hergestellt. Die biotechnologische Produktion von Aminosäuren hat gegenüber der chemischen Synthese den Vorteil, dass sie kostengünstiger ist und die Aminosäuren in der physiologisch aktiven L-Konfiguration gebildet werden. *C. glutamicum* besitzt gegenüber anderen Mikroorganismen gewisse Eigenschaften, die für die Aminosäureproduktion von Vorteil sind. Es fehlen ihm Enzyme für den Abbau von Aminosäuren (27) und bislang konnten auch keine Isoenzyme gefunden werden, was eine einfache Regulation des Stoffwechsels ermöglicht (12). Darüber hinaus sind für *C. glutamicum* Transformationsmethoden und Vektorsysteme, wie zum Beispiel Expressions- oder Deletionsvektoren, entwickelt worden, die für die Entwicklung und Optimierung von Produktionsstämmen eingesetzt werden können.

Das Vitamin Pantothersäure

Pantothersäure ist ein wasserlösliches Vitamin und gehört zum Vitamin-B-Komplex (Vitamin B₅). Es ist ein Dipeptid und besteht aus β -Alanin und 2,4-Dihydroxy-3,3-Dimethyl-Buttersäure (Pantoinsäure), die über eine Peptidbindung miteinander verknüpft sind (Abb. 1.1). Reine Pantothersäure ist eine gelbliche, ölig-viskose und sehr hygroskopische Flüssigkeit, die in saurer oder alkalischer Lösung instabil ist und durch Hitze leicht zerstört wird (60). Pantothersäure kommt in fast allen Nahrungsmitteln vor und konnte in den verschiedensten Organen unterschiedlichster Organismen nachgewiesen werden, was der Grund für die Namensgebung war (pantothen heißt auf griechisch „überall“). Aufgrund des stark verbreiteten Vorkommens des Vitamins kommt ein Pantothersäuremangel beim Menschen, der einen täglichen Bedarf von etwa 10 mg hat, praktisch nicht vor, obwohl Menschen,

wie alle anderen höheren Tiere, die Fähigkeit, das Vitamin selbst herzustellen, verloren haben. Außerdem trägt auch die Darmflora einen Teil zur Pantothenensäure-Versorgung bei. Dennoch gibt es einige Symptome, die möglicherweise durch einen Pantothen säuremangel auftreten wie zum Beispiel Wachstumsstillstand, Ergrauung der Haare und das *burning feet syndrome*, das im zweiten Weltkrieg bei einigen Kriegsgefangenen auftrat (14).

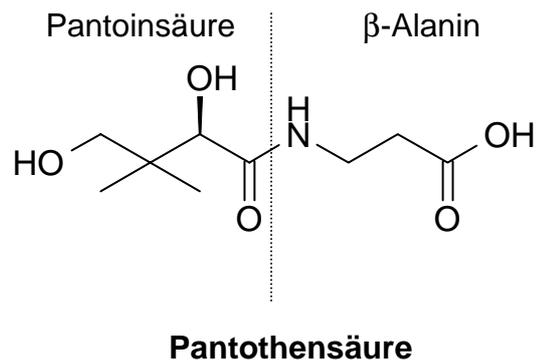


Abb. 1.1: Das B-Vitamin Pantothensäure (Vitamin B₅) besteht aus den Komponenten Pantoinsäure und β-Alanin.

Alle B-Vitamine sind Bestandteile von Coenzymen, wobei Pantothensäure Baustein des Coenzym A (Abb. 1.2) und des Acyl-Carrier-Proteins ist. Pantothensäure bildet zusammen mit Cysteamin das Pantethin, das als 4'-Phosphopantethin die prosthetische Gruppe des Coenzym A sowie des Acyl-Carrier-Proteins bildet. 4'-Phosphopantethin ist außerdem Bestandteil eines Enzyms der Enterobactin Biosynthese in *Escherichia coli* (44).

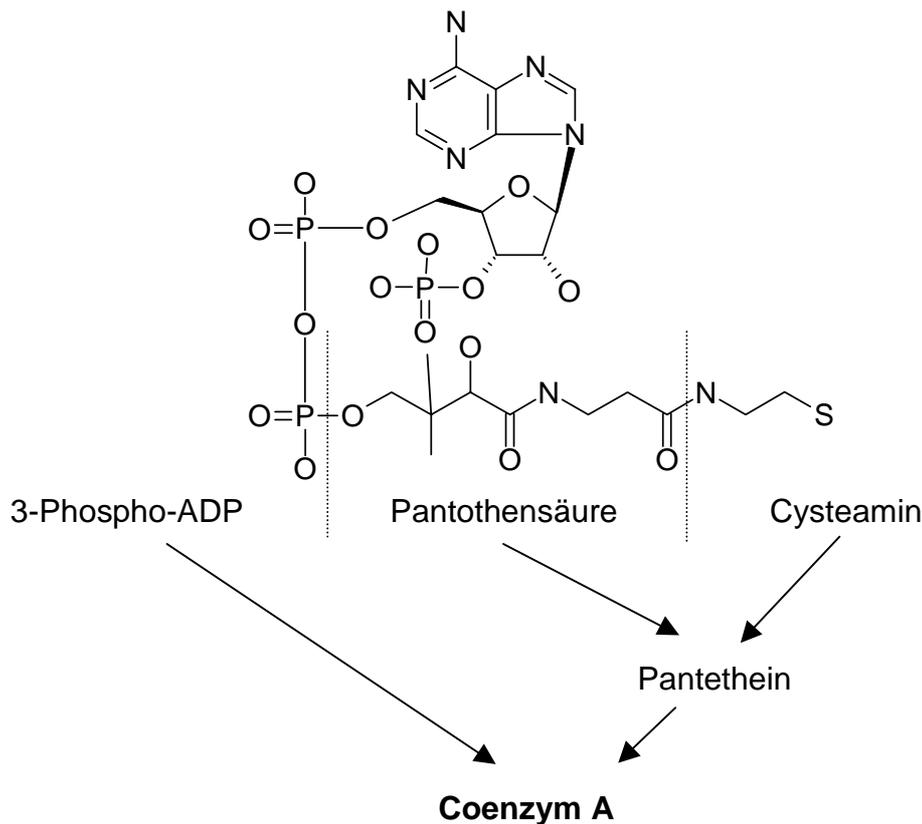


Abb. 1.2: Coenzym A enthält das Vitamin Pantothensäure. Mit der Sulfhydrylgruppe wird es als energiereicher Thioester an das zu aktivierende Substrat gebunden.

Coenzym A, die biologisch aktive Form der Pantothensäure, spielt in vielen Stoffwechselwegen wie der β -Oxidation von Fettsäuren, der Fettsäuresynthese und der Pyruvatdehydrogenase-Reaktion eine wichtige Rolle. Dabei werden Stoffwechselzwischenprodukte über energiereiche Thioesterbindungen mit der Thiolgruppe des Coenzym A kovalent verknüpft und aktiviert. Besonders wichtige Ester bilden sich dabei zwischen Acetat bzw. Fettsäure und Coenzym A (Acetyl-CoA und Acyl-CoA). Acetyl-CoA ist das Endprodukt von Kohlenhydrat-, Fett- und Aminosäurestoffwechsel und wird beispielsweise unter Energiegewinnung im Citratzyklus abgebaut oder ist Ausgangsstoff bei der Fettsäurebildung und der Synthese von eukaryotischen Membranlipiden wie Cholesterin. Acyl-CoA wird beispielsweise zu Acetyl-CoA abgebaut (β -Oxidation) oder spielt eine Rolle bei der Verlängerung oder Verkürzung der Fettsäurekette. Das Acyl-Carrier-Protein ist Bestandteil des Fettsäuresynthese-Komplexes, an dessen Sulfhydrylgruppe Zwischenprodukte der Fettsäuresynthese kovalent gebunden werden. Coenzym A

und Acyl-Carrier-Protein und damit auch die Pantothersäure haben also eine zentrale Stellung im Stoffwechsel.

Heute findet man Pantothersäure in vielen industriellen Produkten wieder, wobei es mit anderen Vitaminen als ergänzender Bestandteil in Futter- und Nahrungsmitteln dient. Die zum Alkohol reduzierte Form, das Panthenol, findet man in Hautcremes und Shampoos.

Die Biosynthese von Pantothenat

Der Biosyntheseweg von Pantothenat umfaßt vier Schritte (Abb. 1.3) und ist in *E. coli* am besten untersucht worden. Zunächst findet eine Methylierung von α -Ketoisovalerat statt, das zuvor in drei Reaktionsschritten aus zwei Molekülen Pyruvat synthetisiert wird und Ausgangsstoff sowohl von Pantoat als auch der verzweigtkettigen Aminosäuren L-Leucin und L-Valin ist. Diese Reaktion wird durch die α -Ketopantoat Hydroxymethyltransferase, das Genprodukt von *panB*, katalysiert. Die Methylgruppe wird dabei von 5,10-Methylentetrahydrofolat auf α -Ketoisovalerat übertragen, wodurch α -Ketopantoat entsteht. Man nimmt an, dass in Bezug auf die Regulierung der Transferaseaktivität eine allosterische Inhibierung durch Pantothenat (> 500 μ M) und Coenzym A (>1 mM) vorliegen (38). Ob solche Inhibitorkonzentrationen *in vivo* allerdings überhaupt vorliegen ist fraglich (57). Beim nächsten Schritt wird α -Ketopantoat durch die α -Ketopantoat Reduktase, dem Genprodukt von *panE*, zu D-Pantoat reduziert (20). Dabei erfolgt, unter Verbrauch eines Reduktionsäquivalents NADPH, die Reduktion der Carbonylgruppe am β -C-Atom zum Alkohol. Diese Reaktion kann allerdings auch durch die Acetohydroxysäure Isomeroreduktase, dem *ilvC* Genprodukt, katalysiert werden, ein Enzym aus dem Biosyntheseweg von L-Isoleucin, L-Leucin und L-Valin (41).

β -Alanin, welches für die Kondensation mit D-Pantoat zu D-Pantothenat benötigt wird, stammt aus der von L-Aspartat- α -Decarboxylase (*panD*) katalysierten Reaktion, bei der L-Aspartat decarboxyliert wird (6). Als Cofaktor fungiert bei dieser Reaktion nicht wie bei anderen Dekarboxylierungen üblich Pyridoxalphosphat, sondern Pyruvat. Anders als bei dieser Decarboxylierungsreaktion entsteht β -Alanin in *E. coli* B-Stämmen durch Abbau von Uracil (37). Diesen Mechanismus findet man auch bei Hefen und höheren Eukaryoten (15).

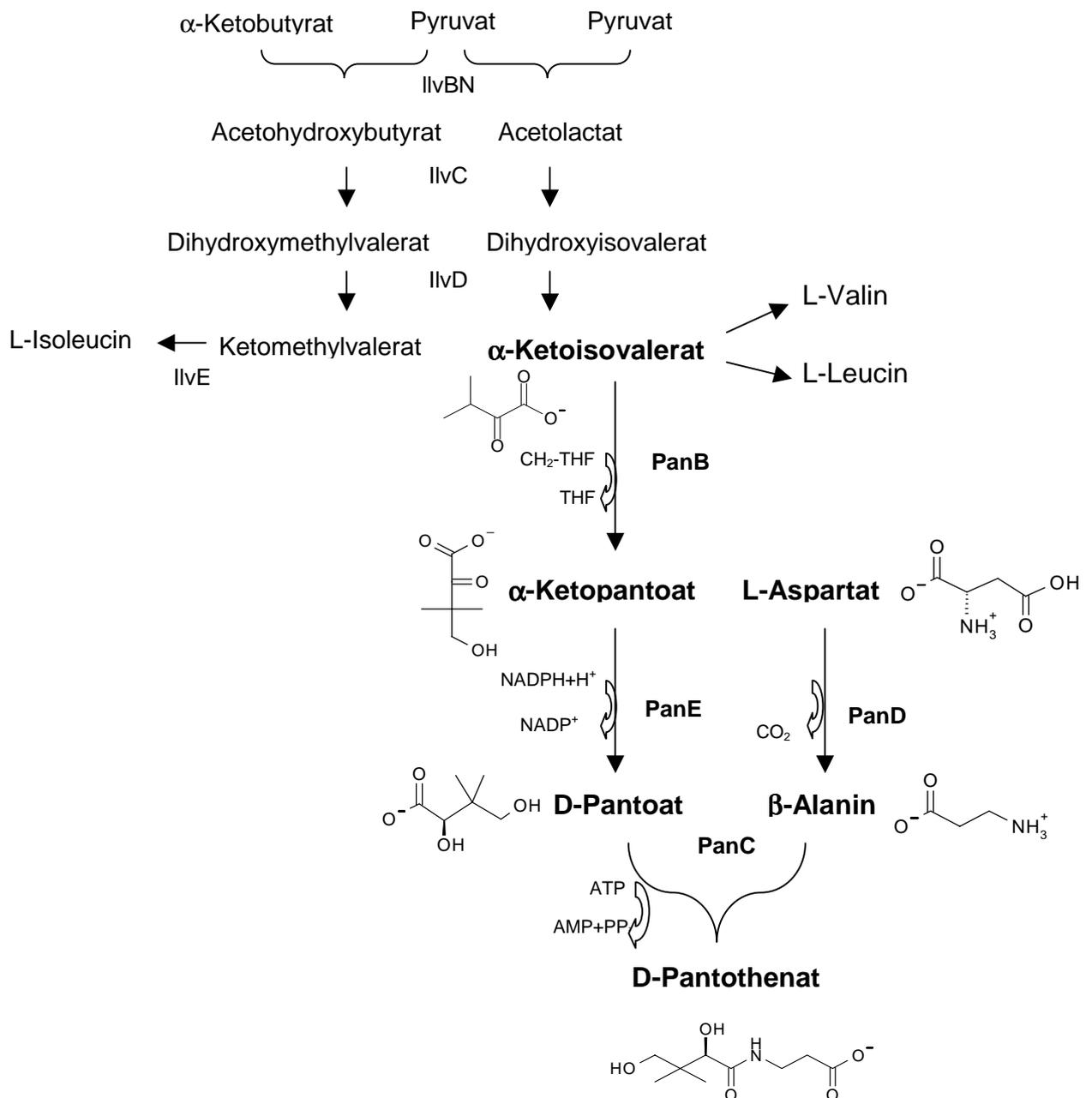


Abb. 1.3: Der Pantothenatbiosyntheseweg in *C. glutamicum*. umfasst vier Schritte: α -Ketoisovalerat, das der Ausgangsstoff sowohl von Pantothenat als auch der Aminosäuren L-Leucin und L-Valin ist, wird aus zwei Molekülen Pyruvat gebildet. Die Enzyme dieser Reaktionen (IlvBN, IlvC und IlvD) katalysieren gleichzeitig auch die Reaktionen der L-Isoleucinbiosynthese. Im ersten Schritt der Pantothenatbiosynthese wird α -Ketoisovalerat durch die α -Ketopantoat Hydroxymethyltransferase (PanB) zu α -Ketopantoat methyliert. Die Reduktion von α -Ketopantoat zu D-Pantoat erfolgt durch die α -Ketopantoat Reduktase (PanE). β -Alanin, das aus der Decarboxylierung von L-Aspartat (PanD: L-Aspartat- α -Decarboxylase) entsteht, wird im letzten Schritt der Biosynthese unter Verbrauch eines Moleküls ATP mit D-Pantoat zu D-Pantothenat verknüpft.

Im letzten Schritt der Pantothenatbiosynthese werden β -Alanin und D-Pantoat unter Verbrauch von einem Molekül ATP zu D-Pantothenat kondensiert. Diese Reaktion wird katalysiert durch die Pantothenat Synthetase, die vom *panC* Gen kodiert wird. Im Verlauf der Reaktion entsteht ein Enzym-Pantoyl-AMP Intermediat, wonach die Pantoylgruppe auf β -Alanin übertragen wird (36). In *E. coli* sind die Gene *panB*, *panC* und *panD* als Operon organisiert (7). Auch in *C. glutamicum* konnten die Gene *panD* (10), *panB* und *panC* kloniert werden, wobei die beiden letzteren ebenfalls ein Operon bilden (46). In *E. coli* wird die Pantothenat Synthetase anscheinend nicht strikt reguliert, da nachgewiesen werden konnte, dass die ausgeschiedene Vitaminmenge den Pantothenatbedarf der Coenzym A Synthese um das 15-fache übersteigt (22). Grund dafür könnte die symbiontische Lebensweise zwischen dem Dickdarmbewohner und seinem Wirt sein.

Transport von Pantothenat und β -Alanin

In *E. coli* wird die Pantothenataufnahme durch einen Na^+ -abhängigen, sekundär aktiven Transporter katalysiert, der durch das Gen *panF* kodiert wird und eine sehr niedrige maximale Aufnahmegeschwindigkeit V_{\max} von $45 \text{ pmol (mg TG)}^{-1} \text{ min}^{-1}$ hat (55) und mit einem K_m von $0,4 \text{ }\mu\text{M}$ eine hohe Affinität für Pantothenat besitzt. Bei dem Transporter handelt es sich um ein integrales Membranprotein mit 12 Transmembranhelices (22). In *Salmonella typhimurium* ist der Transportmechanismus von Pantothenat ebenfalls an einen Na^+ -Gradienten gekoppelt (9). Die Existenz eines Pantothenatexporters in *E. coli* konnte durch Nachweis von extrazellulärem, radioaktiv markiertem Pantothenat nach Fütterung von *panF panD* Doppelmutanten mit β -[$3\text{-}^3\text{H}$]-Alanin gezeigt werden (56), wobei angenommen wird, dass der Export von Pantothenat eine Rolle bei der Regulation der Coenzym A-Synthese spielt (22). Bei der ersten Reaktion der Coenzym A-Synthese wird Pantothenat durch die Pantothenat-Kinase phosphoryliert. Dieser Schritt wird über negative Rückkopplung durch Coenzym A reguliert und nicht phosphoryliertes Pantothenat wird ins Medium exkretiert (22). Da etwa 15 mal mehr Pantothenat synthetisiert wird als die Coenzym A Biosynthese benötigt (22), wird angenommen, dass der Pantothenatefflux durch ein Niedrighalten der Pantothenatkonzentration wichtig für die Regulation der Coenzym A Synthese ist.

Pantothenattransportsysteme wurden auch für andere Organismen charakterisiert. Das SMVT-System (Sodium-dependent Multivitamin Transporter) im absorbierenden Epithel der Plazenta von Säugern beispielsweise katalysiert die Aufnahme von Pantothenat, Biotin und Lipoat (39), wobei es sich hier um einen elektrogenen Prozeß handelt, da pro Molekül Pantothenat zwei Na^+ -Ionen aufgenommen werden. SMVT hat bezüglich seiner Sequenz Ähnlichkeit zu *E. coli* PanF und der K_m -Wert für Pantothenat beträgt 1,5 - 4,9 μM , was in den Konzentrationsbereich der im Blutplasma frei vorkommender Pantothensäure eines gesunden Menschen fällt (0,6-17 μM , 60). Im Gegensatz dazu hat der Pantothenattransporter Fen2 aus *Saccharomyces cerevisiae* keine Sequenzähnlichkeit zu den Vitamintransportern von Säugern oder Bakterien, wobei es sich bei Fen2 um einen hoch-affinen ($K_m = 3,5 \mu\text{M}$), H^+ -abhängigen Symporter handelt (54). An Protonen ist auch der Pantothenat-Transportprozeß in Erythrocyten gekoppelt, der durch den intraerythrocytären Malaria-Erreger *Plasmodium falciparum* induziert wird und für ihn überlebenswichtig ist (45). Bei diesem Transportprozeß werden jeweils ein H^+ und Pantothenatmolekül im Symport transportiert, wobei der Transporter mit einem K_m von etwa 23 mM eine niedrige Affinität zu seinem Substrat besitzt. Die auf die Aufnahme folgende intrazelluläre Phosphorylierung von Pantothenat wird durch eine ungewöhnlich hoch-affine Pantothenatkinase mit einem K_m von etwa 300 nM katalysiert. Diese Kombination aus Transport und Phosphorylierung stellt für den Erreger ein effektives Aufnahmesystem dar, das sich von dem des Wirtes unterscheidet und ein mögliches Ziel eines Therapieansatzes darstellt.

Die industrielle Produktion von Vitaminen

Tiere und Menschen sind darauf angewiesen, Vitamine mit der Nahrung aufzunehmen. Heutzutage findet man diese essentiellen Wirkstoffe als Ergänzungsmittel in Futter- und Nahrungsmitteln und als Bestandteile von Infusionslösungen und Kosmetika, wodurch sie große wirtschaftliche Bedeutung erlangt haben. Die Herstellung von Vitaminen erfolgt durch chemisch-synthetische Verfahren, durch Extraktion aus pflanzlichem Material und durch fermentative Produktion. Die Preise der Vitamine liegen zwischen 10 Euro/kg für Ascorbinsäure (Vitamin C) und 7500 Euro/kg für Cyanocobalamin (Vitamin B) (8). Nur drei Vitamine, nämlich Riboflavin (Vitamin B₂), Ascorbinsäure und Cyanocobalamin, das früher aus

Faulschlamm aus Kläranlagen gewonnen wurde, werden mit Mikroorganismen synthetisiert. Im Gegensatz zu den klassischen Fermentationsprodukten wie Käse oder Essig sind für die Entwicklung und Optimierung von Bakterienstämmen für die fermentative Produktion von Vitaminen Kenntnisse über die jeweiligen Biosynthesewege unerlässlich.

Die industrielle Produktion von Pantothenat

Pantothenat hat große ökonomische Bedeutung, weil es als Futtermittelzusatz und therapeutisches Agens eingesetzt wird. Der Weltjahresbedarf an Pantothenat beträgt etwa 4000 Tonnen (52) und wird auch heute noch mittels chemischer Synthese gedeckt. Dabei wird aus Formaldehyd, Isobutylaldehyd und Cyanid zunächst D,L-Pantolacton, das Lacton der Pantoinsäure, synthetisiert (35). Da nur D-Pantothenat physiologisch aktiv ist, muss D-Pantolacton, bevor es mit β -Alanin chemisch kondensiert wird, durch einen schwierigen Prozess chemisch aus dem Racemat isoliert werden (18). Zur Vereinfachung dieses Schrittes wurden auch Methoden entwickelt, bei denen die Enantiomerentrennung enzymatisch erfolgt (18). Bei einer weiteren Methode wird Pantothenat in einem Gemisch aus K^+ -Pantoat, β -Alanin und ATP enzymatisch synthetisiert, wobei der Nachteil dieses Prozesses ist, dass die Ausgangsstoffe Pantoat und ATP relativ teuer sind und die Produktausbeute sehr gering ausfällt. Neben diesen chemischen und chemie-enzymatischen Methoden, die viele Nachteile mit sich bringen, wurde ein Verfahren zur fermentativen Pantothenatproduktion entwickelt. Durch aufeinanderfolgende Mutagenese- und Selektionsschritte konnte ein *E. coli* Stamm isoliert werden, der gegen Salicylsäure, α -Ketoisovalerylsäure, α -Ketobutyrylsäure, α -Aminobutyrylsäure, β -Hydroxyasparaginsäure und O-Methylthreonin resistent ist. Durch zusätzliche Expression der plasmidkodierten Gene der Pantothenatbiosynthese *panB*, *panC* und *panD* und Zugabe von 1 % β -Alanin ins Medium konnte mit diesem Stamm bis zu 65 g/l Pantothenat akkumuliert werden (18). Durch eine mikrobiologische Pantothenatproduktion entfällt der Einsatz von teuren Ausgangssubstraten und Pantothenat wird direkt in der physiologisch wirksamen D-Konfiguration synthetisiert.

II. Material und Methoden

1 Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und ihre Eigenschaften sind in Tabelle 1, die verwendeten Plasmide in Tabelle 2 aufgeführt.

Tab. 2.1: Die in dieser Arbeit verwendeten *C. glutamicum* und *E. coli* Stämme und ihre Eigenschaften.

| Bakterienstamm | Genotyp/Phänotyp | Referenz |
|---|---|----------------------|
| <i>C. glutamicum</i> | | |
| ATCC 13032 | Wildtyp | (1) |
| ATCC 14752 | Wildtyp | ATCC, Rockville, USA |
| R127 <i>panC::pK18mob'panC'</i> | <i>panC</i> disruptiert durch die Integration des Vektors <i>pK18mob'panC'</i> , Pantothen säure-auxotropher Indikatorstamm | (46) |
| R127 <i>panC::pK18mob'panC'pXMJ19</i> | Stamm R127 <i>panC::pK18mob'panC'</i> transformiert mit <i>pXMJ19</i> zur Einführung der Choramphenicolresistenz | diese Arbeit |
| DHPF | ATCC 13032 mit Deletion von <i>putP</i> , <i>proP</i> , <i>ectP</i> , <i>betP</i> , <i>lcoP</i> | (53) |
| Δ NCgl0799 | ATCC 13032 mit Deletion von NCgl0799, das Ähnlichkeit zu <i>E. coli panF</i> hat | diese Arbeit |
| ATCC 13032NCgl0453:: <i>pK18mob'NCgl0453'</i> | NCgl0453 disruptiert durch die Integration des Vektors <i>pK18mob'NCgl0453'</i> | diese Arbeit |
| Δ NCgl1108 | ATCC 13032 mit Deletion von NCgl1108 | diese Arbeit |

| | | |
|--------------------------------------|---|--------------|
| ATCC 13032pXMJ19cycA | ATCC 13032 mit heterologer Expression von <i>E. coli cycA</i> | diese Arbeit |
| Δ NCgl1837 | ATCC 13032 mit Deletion von NCgl1837 | diese Arbeit |
| Δ NCgl2816 | ATCC 13032 mit Deletion von NCgl2816 | diese Arbeit |
| ATCC 13032pXMJ19NCgl2816 | ATCC 13032 mit Überexpression von NCgl2816 | diese Arbeit |
| ATCC 13032pEKEX2panBC | ATCC 13032 mit Überexpression der Gene <i>panB</i> und <i>panC</i> | (46) |
| ATCC 13032pEKEX2panBC pXMJ19NCgl2816 | Überexpression von NCgl2816 im Stamm 13032pEKEX2panBC | diese Arbeit |
| <i>E. coli</i> | | |
| MG1655 | K12-Wildtyp λ F ⁻ rph-1 | (24, 3) |
| DH5 α mcr | <i>endA1 supE44 thi-1</i> λ ⁻ <i>recA1 gyrA96 relA1 deoR</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 θ 80dlacZ Δ M15mcrA Δ (<i>mrr hsdRMS mcrBC</i>); unter anderem keine Restriktion von unmethyliertem Adenin in spezifischen Erkennungssequenzen (<i>hsdRMS</i> Gene kodieren für <i>EcoK</i> I); an bestimmten methylierten Adenin- und Cytosinbausteinen der DNA wird nicht geschnitten (<i>mcrA</i> , <i>mcrBC</i> , <i>mrr</i>) | (16) |
| S17-1 | <i>thi-1 F</i> ⁻ <i>endA1 hsdR17 supE44</i> λ ⁻ <i>pro</i> ; rekombinationsnegativ, R-Faktor RP4 in das Chromosom integriert | (40) |

Tab. 2.2 : Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und ihre Eigenschaften.

| | | |
|---|--|---------------------|
| pUC19 | Amp ^r , <i>oriV_{E. c.}</i> | (58) |
| pXMJ19 | <i>ptac</i> , <i>lacI^q</i> , Cam ^r | (23) |
| pDrive Cloning Vector | Amp ^r , Kan ^r , <i>plac</i> , <i>lacZ</i> α -Peptid, pT7 RNA-Pol., pSP6 RNA-Pol., <i>ori_{pUC}</i> , <i>ori_{phage f1}</i> | Qiagen GmbH, Hilden |
| pK18 <i>mob</i> | Insertionsvektor, Kan ^r , <i>oriV_{e. c.}</i> , <i>oriT</i> , <i>mob</i> ; von <i>E. coli</i> S17-1 durch seine <i>mob</i> -Region nach <i>C. glutamicum</i> übertragbar | (49) |
| pK18 <i>mobsacB</i> | Insertionsvektor, Kan ^r , <i>oriV_{e. c.}</i> , <i>oriT</i> , <i>mob</i> , <i>sacB</i> ; von <i>E. coli</i> S17-1 durch seine <i>mob</i> -Region nach <i>C. glutamicum</i> übertragbar; Expression einer Levan-Sucrase aus <i>Bacillus subtilis</i> (<i>sacB</i>) | (49) |
| pK18 <i>mob</i> 'NCgl0453' | pK18 <i>mob</i> mit internem 728 bp-Fragment aus NCgl0453 für Insertion in NCgl0453 | diese Arbeit |
| pK18 <i>mobsacB</i> - Δ NCgl1108 | pK18 <i>mobsacB</i> mit NCgl1108 flankierende Sequenzen (830 und 850 bp) für Deletion von NCgl1108 | diese Arbeit |
| pK18 <i>mobsacB</i> - Δ NCgl0799 | pK18 <i>mobsacB</i> mit NCgl0799 flankierende Sequenzen (868 und 931 bp) für Deletion von NCgl0799 | diese Arbeit |
| pK18 <i>mobsacB</i> - Δ NCgl1837 | pK18 <i>mobsacB</i> mit NCgl1837 flankierende Sequenzen (906 und 716 bp) für Deletion von NCgl1837 | diese Arbeit |
| pK18 <i>mobsacB</i> - Δ NCgl2816 | pK18 <i>mobsacB</i> mit NCgl2816 flankierende Sequenzen (618 und 648 bp) für Deletion von NCgl2816 | diese Arbeit |
| pXMJ19 <i>cycA</i> | pXMJ19 mit <i>E. coli cycA</i> für die heterologe Expression in <i>C. glutamicum</i> | diese Arbeit |
| pXMJ19NCgl2816 | pXMJ19 mit NCgl2816 für die Überexpression | diese Arbeit |

2 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

2.1 Nährmedien für *C. glutamicum*

Als Vollmedium für *C. glutamicum* wurde BHI-Medium (Difco, Detroit, USA) verwendet. Für Agarplatten wurde dem Medium 15 g/l Agar (ICN Biomedicals, Inc.) zugesetzt. Als definiertes Minimalmedium wurde CgC-Medium (25) eingesetzt. Die Zusammensetzung dieser Medien ist in Tabelle 2.3 angegeben.

2.2 Nährmedien für *E. coli*

E. coli Stämme wurden standardmäßig in LB-Medium kultiviert. Für Agarplatten wurde dem Medium 15 g/l Agar (ICN Biomedicals, Inc.) zugesetzt. Die Zusammensetzung dieser Medien ist in Tabelle 2.3 angegeben.

2.3 Antibiotika

Zur Selektion auf die entsprechenden Resistenzmarker bei *C. glutamicum* wurden den Medien nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf etwa 50°C Antibiotika in folgenden Endkonzentrationen zugegeben: Kanamycin 25 $\mu\text{g (ml)}^{-1}$, Chloramphenicol 30 $\mu\text{g (ml)}^{-1}$. Zur Selektion auf Kanamycin- und Chloramphenicolresistenz nach Elektroporation wurden BHI-Agarplatten mit nur 15 $\mu\text{g (ml)}^{-1}$ Kanamycin und 13 $\mu\text{g (ml)}^{-1}$ Chloramphenicol verwendet. Für *E. coli* wurden folgende Antibiotikakonzentrationen verwendet: Carbenicillin 50 $\mu\text{g (ml)}^{-1}$, Chloramphenicol 30 $\mu\text{g (ml)}^{-1}$ und Kanamycin 25 $\mu\text{g (ml)}^{-1}$.

Tab. 2.3: Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien.

| Medium | Zusammensetzung (pro l) |
|--------|---|
| LB | 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl |
| CgC | 42 g MOPS, 20 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 g Harnstoff, 0,5 g KH_2PO_4 , 0,5 g K_2HPO_4 , pH (NaOH) = 7,0; Nach dem Autoklavieren wurde hinzugegeben: 80 ml 50% Glukose, 10 ml 100 mM CaCl_2 , 10 ml 1M MgSO_4 , 200 μg Biotin, 1 ml Spurensalze (s. u.) |

| | |
|-------------|--|
| Spurensalze | 28,5 mg FeSO ₄ x 7H ₂ O, 16,5 mg MnSO ₄ x H ₂ O, 764 mg CuSO ₄ x 5H ₂ O, 6,4 g ZnSO ₄ x 7H ₂ O, 128 mg CoCl ₂ x 6H ₂ O, 44 mg NiCl ₂ x 6H ₂ O, 64 mg Na ₂ MoO ₂ x 2H ₂ O, 28 mg KAl(SO ₄) ₂ x 12H ₂ O, 20 mg Na ₂ SeO ₃ x 5H ₂ O, 50 mg H ₃ BO ₃ , 50 mg SrCl ₂ , 50 mg BaCl ₂ x 2H ₂ O, pH (H ₂ SO ₄) |
|-------------|--|

2.4 Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung

C. glutamicum-Stämme wurden bei 30°C, *E. coli*-Stämme bei 37°C angezogen. Flüssigkulturen wurden bei etwa 110 - 120 rpm geschüttelt. Für die längerfristige Lagerung von Bakterienstämmen wurden Kolonien von Platten in Roti-Store Cryoröhrchen (Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe) überführt und bei -20°C eingefroren.

3 Biochemische Techniken

3.1 Aufnahmemessungen mit radioaktiv markierten Substraten

5 ml BHI-Medium wurde morgens mit dem zu untersuchenden *C. glutamicum* Stamm beimpft und unter Schütteln ca. 7 h inkubiert. Diese Vorkultur wurde dann zum Animpfen von 20 ml CgC-Medium verwendet, nachdem die Zellen einmal mit CgC-Medium gewaschen worden waren. Nach dem Animpfen wurden die Zellen über Nacht unter Schütteln inkubiert, wodurch eine optimale Anpassung an das Minimalmedium erzielt wurde. Die Zellen aus der Übernachtskultur wurden in frisches CgC-Medium auf eine OD₆₀₀ von ca. 2,5 angeimpft und unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 5 weiterkultiviert. Die Zellen wurden bis zum Versuch auf Eis gelagert. 2 ml der Zellen wurden dann in ein Rührgefäß gegeben und im Wasserbad bei 30°C 5 min unter Rühren vorgewärmt. Die Aufnahme wurde durch Zugabe von 20 µl ¹⁴C-markiertem Substrat in der jeweiligen Konzentration gestartet (20.000 Counts oder 370 Becquerel pro Ansatz). Nach unterschiedlichen vom Versuchsansatz abhängigen Zeiten wurde jeweils eine Probe von 200 µl entnommen und die Zellen wurden durch Absaugen auf Glasfaserfiltern (0,45 µm Porengröße, Millipore, Eschborn) in einer Mehrfachfiltrationsanlage (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) und nachfolgendem zweimaligen Waschen mit je 2,5 ml 100 mM LiCl vom Medium getrennt. Die Zugabe des Entkopplers CCCP erfolgte in der 21. Minute,

wobei das Atmungsgift KCN zusammen mit dem Substrat zum Zeitpunkt Null zu den Zellen gegeben wurde. Die Kompetitoren der β -Alaninaufnahme wurden kurz vor Zugabe des Substrats zu den Zellen pipettiert. Die Filter wurden in Szintillationsröhrchen mit 3,8 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint eco plus, Roth, Karlsruhe) gegeben und nach kurzem Vortexen wurde die Radioaktivität in einem Szintillationszähler (Scintillation Counter LS6500, Beckman Coulter, München) bestimmt. Die Gesamtaktivität des Ansatzes wurde durch direktes Zählen von 200 μ l Reaktionsansatz bestimmt. Die jeweiligen counts (dpm, Disintegrationen (Zerfälle) pro Minute, wobei 1 dpm 1 Becquerel entspricht), die aus der Zählung resultierten wurden in die Formel

$$\frac{\text{dpm}_{(1)} \times x \text{ mol}_{(2)}}{\text{dpm}_{\text{total}(3)} \times 0,36_{(4)} \times 0,2_{(5)} \times \text{OD}_{600(6)}}$$

(1): counts aus der Zählung für die jeweilige Probe eines Messpunktes

(2): Stoffmenge des Substrats in der 200 μ l-Probe

(3): counts aus der Zählung der Probe ohne Filtration (Gesamtaktivität)

(4): 0,36 mg TG (ml OD_{600}^{-1})⁻¹

(5): 200 μ l-Proben

(6): OD_{600} -Wert der Kultur

eingesetzt, wodurch man $x \text{ mol (mg TG)}^{-1}$ für den entsprechenden Zeitpunkt erhielt. Durch Auftragung dieser Werte gegen die Zeit erhielt man die Aufnahmekinetik und die Aufnahme rate wurde aus dem linearen Teil dieser Kinetik bestimmt und in [$x \text{ mol (mg TG)}^{-1} \text{min}^{-1}$] angegeben.

3.2 Nichtradioaktive Aufnahmemessungen

3.2.1 Silikonölzentrifugation

Nichtradioaktive Aufnahmemessungen wurden mit Hilfe der Silikonölzentrifugation durchgeführt. Für jeden Messpunkt wurden 300 μ l Mikrozentrifugenröhrchen (Beckman Instruments GmbH, München) mit 30 μ l 20 % Perchlorsäure und 70 μ l Silikonöl der Dichte $d=1,04 \text{ g (cm}^3\text{)}^{-1}$ (Wacker, Burghausen) beschickt, kurz in einer Microfuge E (Beckman Instruments GmbH, München) zentrifugiert und auf Eis

gelagert. Die Kultivierung und Vorbereitung der Zellen für die β -Alanin- und GABA-Aufnahmemessungen erfolgte wie in Kapitel 3.1 beschrieben. Für die Aufnahmemessung der Gesamtaminosäuren erfolgte eine Kultivierung bis zu einer OD_{600} von 9, bevor die Messung gestartet wurde. Das Volumen der Zellsuspension betrug 4 ml und der Versuch wurde durch Zugabe von 40 μ l Substrat in der jeweiligen Konzentration zum Zeitpunkt Null gestartet. Jeweils drei Proben (je 200 μ l) wurden zu jedem Messpunkt in den versuchsabhängigen Zeitabständen entnommen und in die vorbereiteten Silikonölröhrchen gegeben. Danach wurden die Röhrchen 45 sec zentrifugiert, wodurch die schnelle Trennung der Zellen aufgrund des Dichteunterschieds vom umgebenden Medium erfolgte und die Zellen durch die Perchlorsäure sofort inaktiviert wurden. Das Medium verblieb als zellfreier Überstand, der abgenommen wurde und für die Bestimmung (mittels HPLC) der extrazellulären Substratkonzentrationen herangezogen werden konnte. Diese externen Proben wurden vor der Analyse so verdünnt, dass die Substratkonzentration in dem Bereich der Eichreihe (10 μ M - 300 μ M) lag. Anschließend wurden die Zentrifugenröhrchen in der Mitte der Ölschicht (mittlere Phase) durchtrennt. Die drei Spitzen wurden mit der Öffnung nach unten in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß vereinigt und 1 min bei 13000 x g zentrifugiert. Nach der Entfernung von zwei der drei Spitzen erfolgte die Zugabe von 135 μ l H_2O sowie 100 μ l Silikonöl der Dichte $1,06 \text{ g (cm}^3\text{)}^{-1}$ (Wacker, Burghausen) und die Resuspendierung des Sedimentes. Jetzt wurden die Zellen für 10 min im Ultraschallbad aufgeschlossen, mit 75 μ l 5 M KOH/1 M Triethanolamin zur Neutralisation und Pufferung des Extrakts versetzt und das Reaktionsgefäß kurz gevortext. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 4°C, wobei die Präzipitation von Kaliumperchlorat erfolgte, konnte für 10 min bei 13000 x g zentrifugiert werden, wodurch sich eine wässrige Phase absetzte. Diese Phase stellte die intrazelluläre Probe dar, dessen Substratkonzentration mit der HPLC analysiert wurde. Vor der Analyse wurden die Proben so verdünnt, dass die Substratkonzentration in dem Bereich der Eichreihe (10 μ M - 300 μ M) lag.

3.2.2 Bestimmung von Aminosäurenkonzentrationen 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 HP1100 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, 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)⁻¹. Die Quantifizierung der Eluenten erfolgte mit Hilfe von externen Standards, welche versuchsabhängig entweder β-Alanin, GABA oder alle proteinogenen Aminosäuren (außer Tyrosin und Cystein, welches schnell zu Cystin oxidiert) und β-Alanin enthielten.

Für die Berechnung intrazellulärer Substratkonzentrationen wurde ein Cytoplasmavolumen von 1,6 µl pro OD₆₀₀ 1 und Milliliter Kultur angenommen. Bei der Bestimmung von Transportraten wurde ein Trockengewicht (TG) von 0,36 mg TG pro OD₆₀₀ 1 und ml Kultur vorausgesetzt.

3.3 Mikrobiologischer Röhrchentest zur Quantifizierung von Pantothensäure

Die mikrobiologische Quantifizierung von Pantothensäure erfolgte mit Hilfe des auxotrophen *C. glutamicum* Stammes R127 *panC::pK18mob'panC* nach der Methode von Sahn und Eggeling (46). Dieser Indikatorstamm musste vor Einsatz im Test Pantothensäure ausgehungert werden und wurde für diesen Zweck zunächst in BHI-Medium mit 25 µg (ml)⁻¹ Kanamycin über Nacht kultiviert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit NaCl (9 g pro Liter) gewaschen und zum Animpfen von CgC-Medium mit 25 µg (ml)⁻¹ Kanamycin auf eine OD₆₀₀ von 0,5 benutzt. Diese Kultur wurde etwa 40 h geschüttelt und die Zellen wurden bis zum Gebrauch in 1 ml Glycerin (pro 1 ml Zellsuspension) bei -80°C gelagert. Da für die Pantothensäurebestimmung auch Überstände eingesetzt wurden, die von chloramphenicolresistenten Zellen stammten und deswegen das Antibiotikum im Medium und somit auch in den zu untersuchenden Proben vorhanden war, wurde

der Indikatorstamm elektrokompetent gemacht und mit dem Plasmid pXMJ19 transformiert. Der somit entstandene kanamycin- und chloramphenicolresistente Stamm R127 $panC::pK18mob'panCpXMJ19$ wurde ebenfalls wie oben beschrieben Pantothersäure ausgehungert. Jeder Testansatz hatte ein Gesamtvolumen von etwa 4 ml und enthielt 3 ml CgC-Medium, 60 μ l des Indikatorstammes und 4 μ l des jeweiligen Antibiotikums. Das restliche Volumen von 1 ml bestand aus variierenden Mengen der zu untersuchenden Probe und H₂O, wobei das Probenvolumen so gewählt wurde, dass eine Auswertung mit Hilfe der Eichreihe möglich war. Für die Erstellung der Eichgraden erhielt jeder Ansatz 4 ml CgC-Medium, 60 μ l Indikatorstamm, 4 μ l des jeweiligen Antibiotikums und 4 μ l eines Calcium-Pantothenat-Standards (0,25 μ g- 40 μ g (l)⁻¹). Die zu untersuchenden Proben (1 - 2 ml) wurden zunächst in versuchsabhängigen Zeitabständen aus den Kulturen entnommen und 3 min bei 13000 x g abzentrifugiert. Die Überstände wurden sterilfiltriert und bis zum Einsatz bei -20°C gelagert. Nach Zugabe der Proben zu den Testansätzen wurden die Kulturen für 48 h bei 30°C geschüttelt, und anschließend wurden die optischen Dichten bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereiches verhält sich die erreichbare Zelldichte des Indikatorstammes proportional zur Pantothersäurekonzentration in der Probe. Mit Hilfe der Kulturen mit den Standards ließ sich somit der Gehalt an Pantothersäure in den Proben quantifizieren. Dazu wurden zunächst die optischen Dichten der Kulturen mit den Standards gegen die Pantothenatkonzentrationen in den Standards grafisch aufgetragen und eine Eichgrade durch den linearen Bereich gelegt. Mit Hilfe der Gradengleichung dieser Eichgraden wurden die Pantothenatkonzentrationen in den zu untersuchenden Kulturen anhand ihrer optischen Dichten bestimmt. Die so erhaltene Pantothenatkonzentration in der Kultur wurde mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert, da ja unterschiedliche Volumina der Proben eingesetzt worden waren. Die Pantothenatkonzentration wurde unter Berücksichtigung der optischen Dichte auf das Trockengewicht bezogen, wobei ein Trockengewicht von 0,36 mg pro OD₆₀₀ 1 und ml Kultur vorausgesetzt wurden.

3.4 Screening von Transposonmutanten mit dem Plattentest

Der Plattentest wurde für das Screening der Transposonmutanten des *C. glutamicum* Stammes 14752 benutzt, um Mutanten mit einer veränderten

Pantothensäureexkretion zu identifizieren. Für jeden Test wurden die Platten frisch gegossen. Dazu wurde zunächst CgC-Medium, in das die Additive Glukose, CaCl₂, MgSO₄, Biotin und Spurensalze noch nicht hinzugefügt worden waren, mit Agar (15 g (l)⁻¹) in der Mikrowelle solange gekocht bis sich der Agar gelöst hatte. Nachdem das Medium unter Rühren bis auf 40 - 50°C abgekühlt war, erfolgte die Zugabe von den Additiven, dem Indikatorstamm R127*panC::pK18mob'panC'* (kanamycinresistent) oder R127*panC::pK18mob'panC'* pXMJ19 (kanamycin- und chloramphenicolresistent), dem jeweiligen Antibiotikum (Kanamycin 25 µg (ml)⁻¹, Choramphenicol (30 µg (ml)⁻¹) und 10 mM β-Alanin. Für jede Petrischale wurden 30 ml Medium und 200 µl Indikatorstamm eingesetzt. Der Ansatz wurde gut gemischt und in die Petrischalen gegossen. Um die spätere Bildung von übermäßig viel Kondenswasser zu vermeiden, mussten die Agarplatten jetzt etwa 30 min ohne Deckel unter der Sterilbank trocknen, bevor sie für den Plattentest verwendet werden konnten. Für das Screening wurden die bei -80°C gelagerten Mikrotiterplatten mit den Transposonmutanten unter der Sterilbank aufgetaut. Danach wurden die Mutanten mit sterilen Zahnstochern oder Pipettenspitzen einzeln auf die Testplatten ausgestrichen. Die Inkubation der Testplatten erfolgte für 72 h bei 30°C. Nach dieser Zeit sah man anhand des Wachstumsverhaltens der Zellen des Indikatorstammes um die ausgestrichenen Transposonmutanten herum, ob die Mutanten ein verändertes Pantothentekretionsverhalten hatten oder nicht.

3.5 Bestimmung von ATP-Konzentrationen

Die Lichtemission bei Umsatz von ATP durch das Luciferin/Luciferase-System bildet die Grundlage des Nachweises (modifiziert nach 33 und 48).



Der verwendete Luciferin/Luciferase-Rohextrakt lieferte keine zeitlich konstante Lichtemission, so dass die Lichtemission während der ersten 20 sec nach Start der Reaktion bestimmt wurde. Die Proportionalität der Messwerte wurde anhand eines ATP-Standards überprüft.

Zunächst wurden für einen schnellen Probenaufschluss 40 µl der Zellsuspension in 360 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) pipettiert. Anschließend wurden 1600 ml eiskaltes

Wasser zu dieser Suspension gegeben und die Lösung wurde bei -20°C bis zur Messung aufbewahrt. (Zugabe von Wasser und Einfrieren müssen sofort durchgeführt werden, da ATP sehr schnell umgesetzt wird). Für den ATP-Standard wurde ATP zunächst als eine $1\ \mu\text{M}$ Stammlösung in einem Puffer mit $50\ \text{mM}$ Tris/ H_2SO_4 , pH 7,4, $3,5\ \text{mM}$ MgSO_4 , $2,5\ \text{mM}$ K_2SO_4 , $0,6\ \text{mM}$ EDTA angesetzt. Daraus wurden die Standards bis zu einer Konzentration von $1\ \text{nM}$ hergestellt. Der Luciferin/Luciferase-Extrakt wurde aus einer Suspension von $50\ \text{mg}$ Lyophilisat (Sigma, Buffered Firefly Lantern Extract) in $5\ \text{ml}$ Wasser hergestellt, unlösliche Bestandteile wurden abzentrifugiert. Für die Messung wurden $100\ \mu\text{l}$ der ATP-Standardreihe oder $100\ \mu\text{l}$ Probe mit $100\ \mu\text{l}$ Luciferin/Luciferase-Extrakt vermischt. Die Anzahl der Lichtblitze (die Lichtemission) während der ersten $20\ \text{sec}$ nach Start der Reaktion wurden mit einem Biolumineszenzanalysator (Lumat LB 9507, EG&G Berthold, Wildbad) erfaßt und daraus die entsprechende ATP-Konzentration der Probe über eine Eichkurve bestimmt.

4 Molekularbiologische Techniken

4.1 DNA-Techniken

4.1.1 Plasmid-Präparation aus *C. glutamicum*

Für die Plasmid-Mini-Präparation aus *C. glutamicum* wurde das QIAprep® Spin Miniprep Kit von QIAGEN eingesetzt. Vor der Präparation wurden $1,5\ \text{ml}$ der Kultur $1\ \text{min}$ bei $13000 \times g$ abzentrifugiert und das Zellsediment in $1\ \text{ml}$ Lysozym-Lösung ($15\ \text{mg (ml)}^{-1}$, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) resuspendiert. Die Zellen wurden dann $1-2\ \text{h}$ bei 37°C inkubiert, bevor mit der Präparation begonnen wurde, wobei bei den ersten 3 Schritten jeweils das doppelte der angegebenen Volumina eingesetzt wurde.

4.1.2 Plasmid-Präparation aus *E. coli*

Für die Plasmid-Mini-Präparation aus *E. coli* wurde das GFX™ Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) gemäß den Herstellerangaben verwendet.

4.1.3 Präparation chromosomaler DNA aus *C. glutamicum*

Die Präparation chromosomaler DNA erfolgte nach Eikmanns *et al.* (13). *C. glutamicum*-Zellen wurden über Nacht in 5 ml BHI-Medium angezogen, abzentrifugiert (10 min bei 4000 x g, RT) und mit TE-Puffer (siehe unten) gewaschen. Das Pellet wurde in 1 ml TE-Puffer mit 15 mg Lysozym (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) in 15 ml Röhrchen resuspendiert und 3 h bei 37°C inkubiert (ohne Schütteln!). Danach wurden 220 µl 10%-ige (w/v) SDS-Lösung zugegeben und vorsichtig mit den Zellen vermischt. Nach Zugabe von 3 ml Lysis-Puffer (siehe unten) und 150 µl Proteinase K (PCR Grade, Roche Diagnostics, Mannheim) wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach wurden 2 ml gesättigte NaCl-Lösung zugegeben und durch vorsichtiges Invertieren des Röhrchens solange vermischt bis sich ein weißer Niederschlag bildete. Nach Zentrifugation (4000 x g, RT, 15 min) wurde der Überstand in 50 ml-Röhrchen überführt und nach Zugabe von etwa 15 ml eiskaltem Ethanol vermischt. Die ausgefällte DNA wurde mit einem Glashaken gefischt und mit 1 ml 70%igem (v/v) Ethanol in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß 5 min bei 13000 x g zentrifugiert. Danach wurde das Ethanol abgenommen und die DNA an der Luft getrocknet, bevor es in 200 µl H₂O aufgenommen wurde. Gelagert wurde die chromosomale DNA bei -20°C.

TE-Puffer:

10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH (HCl) = 7,5

Lysis-Puffer:

10 mM Tris, 400 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH (HCl) = 8,2

4.1.4 Restriktion, Ligation und Modifikation von DNA

Die Restriktion von DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen von der Firma New England Biolabs (NEB, Frankfurt / Main) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Restriktionsansätze wurden durch Agarose-Gelelektrophorese in TAE-Puffer (47) gereinigt. Aus den Agarose-Gelen wurde die DNA mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen GmbH, Hilden) oder mit dem Nucleo Spin® Extract Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) isoliert. Die Ligation von DNA Fragmenten wurde mit Rapid Ligation Ansätzen von MBI Fermentas GmbH (St.

Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Dephosphorylierungsreaktionen wurde alkalische Phosphatase aus Shrimps (Boehringer Mannheim) und für das Auffüllen von überhängenden DNA-Enden wurde das Klenow-Enzym (Boehringer Mannheim) nach Herstellerangaben verwendet.

4.1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifizierung von DNA mit Hilfe der PCR wurde hier zur Konstruktion von Plasmiden eingesetzt, die der Deletion, Insertion und Überexpression von Genen dienen. Außerdem wurde die PCR verwendet, um Deletionen und Insertionen nachzuweisen. Als *template* wurde genomische DNA verwendet, die aus einer chromosomalen DNA-Präparation stammte. Amplifiziert wurde die DNA mit der *Taq*-Polymerase (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen), wobei die Amplifikation kompletter Gene für die Überexpression mit der *Accu-Taq*-Polymerase (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) erfolgte, die zusätzlich Korrekturlese-Funktion besitzt. Die Primer wurden von Sigma-ARK (Darmstadt) bezogen und in Wasser auf eine Konzentration von $100 \text{ pmol } (\mu\text{l})^{-1}$ gelöst. Die PCR wurde in Thermocyclern durchgeführt. Für einen 25 μl Reaktionsansatz wurden zusammenpipettiert:

2,5 μl 10 x PCR-Puffer

2,5 μl MgCl_2

2,5 μl genomische DNA als *template*

1,25 μl dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dTTP, dGTP, (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)

je 0,25 μl Primer (25 pmol)

0,25 μl *Taq*-Polymerase oder *Accu-Taq*-Polymerase

15,5 μl H_2O

Das Standard-Amplifikationsprogramm umfaßte folgende Schritte: 3 min Initialdenaturierung bei 96°C gefolgt von 30 Zyklen (30 sec bei 96°C , 30 sec bei der jeweiligen *annealing*-Temperatur der Primer, 1 min pro kb zu amplifizierenden Fragments bei 72°C (*Taq*-Polymerase) oder 68°C (*Accu-Taq*-Polymerase)) und zum Schluss Abkühlen des Ansatzes auf 4°C .

4.1.6 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Um Mutationen auszuschließen, wurde das für die Überexpression in das Plasmid pXMJ19 klonierte Gen NCgl2816 sowie die für die Deletion klonierten, das zu deletierende Gen flankierende Bereiche sequenziert. Auch wurden zur Charakterisierung der Transposonmutanten die das Transposon flankierenden Sequenzen nach dem Klonieren in pUC19 sequenziert. Dabei wurde die Didesoxynukleotid-Terminationsmethode nach Sanger *et al.* (48) eingesetzt. Für die Sequenzierungsreaktion (*primer extension*-Reaktion) wurde das ABI PRISM BigDye[®] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems, Weiterstadt) verwendet. Die kapillarelektrophoretische Auftrennung und Analyse der fluoreszenzmarkierten Sequenzierungsprodukte erfolgte automatisch mit der Sequenzierapparatur ABI Prism[™] 310 Genetic Analyzer (PE Biosystems, Weiterstadt). Die Ansätze für die Sequenzierreaktion setzten sich wie folgt zusammen:

1 µg Plasmid-DNA
4 µl Ready Reaction Mix (aus dem Sequenzier-Kit)
2 µl Primer (10 pmol (µl)⁻¹)
ad 15 µl H₂O

Die Sequenzierreaktion erfolgte in einem Thermocycler nach folgendem Temperaturprogramm: 3 min Initialdenaturierung bei 96°C, DNA 30 Zyklen (15 sec bei 96°C, 15 sec bei der jeweiligen *annealing*-Temperatur des Primers, 4 min bei 60°C) und zum Schluss Abkühlen des Ansatzes auf 4°C.

Für die Ethanol-fällung wurde der Reaktionsansatz zunächst zusammen mit 80 µl Wasser in ein Sequenzierreaktionsgefäß überführt und mit 10 µl 3 M Na-Acetat (pH = 4,6) und 300 µl Ethanol versetzt und 30 min bei 13000 x g (RT) zentrifugiert. Das Pellet wurde einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen (5 min bei RT und 13000 x g) und getrocknet. Vor der Sequenzanalyse wurde das Pellet in 20 µl H₂O aufgenommen.

4.2 RNA-Techniken

Alle RNA-Arbeiten wurden zur Vermeidung von RNase-Kontaminationen unter sterilen Bedingungen durchgeführt und es wurden durchgehend Handschuhe getragen. Grundsätzlich wurden alle Geräte und Lösungen, wenn möglich, zur Eliminierung von RNase-Kontaminationen für 45 min bei 121°C autoklaviert.

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

Zur Präparation von Gesamt-RNA aus *C. glutamicum* wurde das NucleoSpin RNAII-Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) verwendet. Zellen von *C. glutamicum* wurden über Nacht in CgC-Medium angezogen und mit dieser Übernacht-Kultur wurde frisches CgC-Medium auf eine OD₆₀₀ von 1 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 5-6 weiterinkubiert. Nach Erreichen dieser OD wurden jeweils Proben von 2 ml entnommen und in 15 ml Röhren abzentrifugiert (6 min bei 4°C und 4000 x g). Das Pellet wurde dann sofort in 800 µl RA1-Puffer resuspendiert und in 2 ml Cryoröhren mit 300 mg Glasperlen pipettiert. Bis alle Proben gesammelt wurden, wurden die Cryoröhren in Flüssigstickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Der Zellaufschluss erfolgte durch hochfrequentes Schütteln der Röhren im „Fastprep“-Gerät (FP120, Qbiogene, Heidelberg) für 2 x 30 sec bei 6,5 m (s)⁻¹. Danach wurden die Röhren sofort für 2 min bei 14000 x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand wurde mit 525 µl Ethanol versetzt und mit dem NucleoSpin RNAII-Kit nach Angaben des Herstellers weiter aufgearbeitet, wobei die RNA während der Präparation routinemäßig mit DNase behandelt wurde, um Kontaminationen durch chromosomale DNA zu entfernen.

Zur Kontrolle der erfolgreichen Präparation wurde eine Gelelektrophorese in einem denaturierenden Agarose-Gel durchgeführt. Hierfür wurden 1 g Agarose in 74 ml Wasser gelöst, mit 10 ml 10 X MOPS-Puffer versetzt und 17 ml 37%ige Formaldehyd-Lösung zugegeben. Nach Erstarren des Gels wurden 5 µl der RNA mit 15 µl Gelladepuffer vermischt, 10 min bei 70°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 100 V durchgeführt, als Puffer wurde 1 X MOPS-Puffer verwendet. Nach der Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht betrachtet.

10 X MOPS-Puffer:

200 mM MOPS, 50 mM Na-Acetat, 10 mM EDTA, pH (NaOH) = 7,0

RNA-Gelladepuffer:

250 µl 100% Formamid (deionisiert), 83 µl 37% Formaldehyd, 50 µl 10 X MOPS-Puffer, 50 µl 86% Glycerin, 0,01% Bromphenolblau, 0,01% Xylencyanol, 1 µl Ethidiumbromid (10 mg (ml)⁻¹), ad 500 µl RNase-freies Wasser

4.2.2 Präparation der *cycA* mRNA-Sonde durch *in-vitro*-Transkription

Zur spezifischen Detektion der *cycA* mRNA in Gesamt-RNA wurde eine Digoxigenin-markierte antisense-RNA-Sonde verwendet. Zur Präparation dieser Sonde wurde ein vom Startkodon ausgehendes 560 Basenpaare langes Fragment des *cycA*-Gens in den Vektor pDrive Cloning Vektor (Qiagen GmbH, Hilden) kloniert. Dieser Vektor besitzt beiderseits der multiple cloning site Promotoren der RNA-Polymerasen SP6 bzw. T7. Durch einen asymmetrischen Verdau mit der Restriktionsendonuklease *XmnI* wurde die Orientierung des Inserts bestimmt und das Plasmid mit einem Schnitt auf der Seite des SP6-Promotors, an dem das Startkodon des Genfragments lokalisiert war, linearisiert. Das linearisierte Plasmid wurde nach Reinigung über eine Gelelektrophorese in RNase-freiem H₂O eluiert und diente als *template* in einem *in-vitro*-Transkriptionsansatz. Der Transkriptionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

ca. 1 µg linearisiertes Plasmid

2 µl 10 X Puffer für Polymerasen (NEB, Frankfurt am Main)

2 µl DIG RNA-Labeling-Mix (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

2 µl T7-Polymerase (NEB, Frankfurt am Main)

ad 20 µl RNase-freies Wasser

Nach 2 h Inkubation bei 37°C wurde das Plasmid durch Zugabe von 1 µl RNase-freie DNase (Boehringer, Mannheim) und 25 minütige Inkubation bei 37°C entfernt. Zur Kontrolle wurde eine Elektrophorese durchgeführt. Dazu wurden 3 µl des Ansatzes mit 15 µl Gelladepuffer gemischt, 10 min bei 70°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Die Probe wurde auf ein denaturierendes 1 %-iges Agarose-Gel geladen und die

Elektrophorese wurde bei 100 Volt durchgeführt. Die restliche RNA-Sonde wurde bei -80°C gelagert.

4.2.3 RNA-Hybridisierung

Zur Untersuchung der Transkription des *E. coli cycA*-Gens in *C. glutamicum* wurde ein Dot-Blot durchgeführt. 4-5 μg Gesamt-RNA pro Dot wurden in 10 X SSC (Bromphenolblau markiert: 1 μl Bromphenolblau-Lösung auf 10 ml 10 X SSC) verdünnt und mittels einer Dot-Blot Apparatur (S & S Minifold I, Schleicher & Schüll, Dassel) unter langsamem Durchsaugen der Lösung auf eine Nylonmembran (BioBond™Nylon Membrane, Sigma, Deisenhofen) aufgetragen. Nach Trocknen der Membran wurde die RNA durch UV-Bestrahlung in einem Cross-Linker (Bio-Link, LTF-Labortechnik, Wasserburg) fixiert ($125 \text{ mJ (cm}^2\text{)}^{-1}$, Einstellung "preset 0"). Die Membran wurde dann 1 h bei 50°C in Hybridisierungslösung blockiert. Nach Erwärmen auf 68°C wurde die DIG-markierte RNA-Sonde zugegeben und bei dieser Temperatur die Hybridisierung über Nacht durchgeführt. Zur Entwicklung der Blots wurde die Membran zweimal in Waschlösung 1 bei RT für je 15 min gewaschen, dann zweimal in Waschlösung 2 bei 68°C für je 25 min. Nach kurzem Waschen in Waschpuffer bei RT wurde die Membran durch 30 minütige Inkubation bei RT in 20 ml 1 X Blocking-Reagenz blockiert. Hierauf wurde Anti-DIG-Alkalische Phosphatase-Konjugat (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) zugegeben (1:10000 verdünnt) und weitere 30 min bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in Waschpuffer für je 20 min wurde die Membran für 5 min in Detektionspuffer inkubiert, mit CSPD-Reagenz (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) benetzt (1:100 in Detektionspuffer verdünnt) und in Klarsichtfolie eingeschweißt. Nach 15 minütiger Inkubation bei 37°C konnten die Signale durch Belichten (LAS-1000, Intelligent Dark Box, Fuji Medical Systems, USA, Stamford, CT) detektiert werden.

Hybridisierungslösung:

pro 30 ml: 15 ml Formamid, 7,5 ml 20 X SSC, 6 ml 10 X Blocking-Reagenz, 300 μl 10% (w/v) Na-Lauroylsarkosinat (sterilfiltriert), 60 μl 10 % (w/v) SDS (sterilfiltriert), 1,5 ml Wasser

20 X SSC:

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

10 X Blocking-Reagenz:

10 g Blocking-Reagenz (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) in 100 ml Maleinsäurepuffer suspendieren und in der Mikrowelle bis zum vollständigen Lösen erhitzen (nicht kochen).

Waschlösung 1:

2 X SSC, 0,1% SDS (sterilfiltriert)

Waschlösung 2:

0,2 X SSC, 0,1% SDS (sterilfiltriert)

Maleinsäurepuffer:

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

Waschpuffer:

Maleinsäurepuffer nach Autoklavieren mit 0,3% (v/v) Tween 20 versetzen

Detektionspuffer:

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

4.3 Techniken zur Manipulation von Zellen

4.3.1 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation

Chemisch kompetente Zellen von *E. coli* wurden nach Inoue *et al.* (19) hergestellt. Dazu wurden *E. coli* Zellen tagsüber in 5 ml LB-Medium angezogen und von dieser Vorkultur abends 1 ml in 250 ml SOB-Medium (47) in einem 2 l Kolben gegeben. Die Zellen wurden dann unter Schütteln über Nacht bei 20 - 22°C bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,6 angezogen. Hierauf wurden die Zellen nach 10 minütigem Abkühlen auf Eis abzentrifugiert (2500 x g, 4°C), in 80 ml eiskaltem TB-Puffer (10 mM Pipes, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, pH (KOH) = 6,7, dann 55 mM MnCl₂ und sterilfiltrieren) resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation und

Resuspendieren in 20 ml TB-Puffer wurden 1,4 ml DMSO zugegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Hierauf wurden die Zellen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, 100 μl davon mit der Plasmid-DNA vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach 30 sec Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad und erneuter 2 - 5 minütiger Inkubation auf Eis wurden 900 μl SOC-Medium (47) zugegeben, die Zellen unter Schütteln bei 37°C (Schüttler) für 1 h inkubiert und dann auf LB-Platten mit dem geeigneten Antibiotikum ausplattiert.

Elektrokompetente Zellen von *C. glutamicum* wurden nach Liebl *et al.* (32) hergestellt. Dazu wurden die Zellen in 10 ml BHI-Medium über Nacht kultiviert und mit dieser Kultur wurden 100 ml LB-Medium mit Wachstumsinhibitoren (siehe unten) in einem 2 l Kolben auf eine OD_{600} von 0,3 angeimpft und über Nacht bei $20 - 22^{\circ}\text{C}$ unter Schütteln bis zu einer OD_{600} von 1 inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen 10 min auf Eis abgekühlt und danach abzentrifugiert (10 min bei $4000 \times g$ und 4°C) und viermal jeweils mit 50 ml eiskaltem 10 %-igem (v/v) Glycerin gewaschen. Zum Schluss wurden die Zellen in 500 μl 10 %-igem (v/v) Glycerin resuspendiert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Für die Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und 50 μl davon in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette mit 2 mm Elektrodenabstand (Biorad, München) mit der Plasmid-DNA vermischt. Hierauf wurden die Zellen in einem Gene-Pulser (Biorad, München) durch einen Elektropuls von 2,5 kV bei 600 Ω Parallelwiderstand und 25 μF Kapazität elektroporiert. Sofort nach dem Puls wurde 1 ml BHIS-Medium (BHI-Medium mit 0,5 M Sorbitol) zugegeben und der Inhalt der Küvette wurde in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß 6 min bei 46°C inkubiert. Danach wurden die Zellen in 15 ml Plastikröhrchen überführt, unter Schütteln bei 30°C für 1 h inkubiert und dann auf BHI-Medium mit dem geeigneten Antibiotikum ausplattiert.

LB-Medium mit Wachstumsinhibitoren:

pro 100 ml LB-Medium: 0,4 g Isonikotinsäurehydrazid, 2,5 g Glycin, 0,1 ml Tween 80, Sterilisation durch Filtration

4.3.2 Konstruktion der Insertions- und Deletionsmutanten von *C. glutamicum*

Die Konstruktion von der Insertionsmutante ATCC13032NCgl0453::pK18mob NCgl0453' und der Deletionsmutanten von *C. glutamicum* erfolgte nach Schäfer *et al.* (48). Für die Insertion wurde ein 760 bp großes internes DNA-Fragment des Gens NCgl0453 mit Hilfe der PCR amplifiziert und Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *XbaI* eingeführt (Primer: 5'-GCGCGCTCTAGA_(XbaI)TGCCACAGGCATGGCGGA-3' und 5'-GCGCGCGAATTC_(EcoRI)TGCCGCCAGCGTACAGCA-3'). Nach Klonierung des Fragments in pK18mob wurden die Zellen mit dem Konstrukt transformiert. Der Vektor pK18mob kann von den Zellen nicht repliziert werden und bleibt nur erhalten, wenn eine Integration in das Genom durch homologe Rekombination erfolgt. Dadurch wird das entsprechende Gen inaktiviert. Für die Gendeletionen wurde der Vektor pK18mobsacB verwendet. Dieser Vektor trägt zwei Selektionsmarker: ein Kanamycinresistenzgen Kan^r und ein *sacB*-Gen, dessen Produkt für Zellen letal ist, die auf Saccharose-haltigem Medium wachsen. pK18mobsacB kann ebenfalls nicht in der Zelle repliziert werden. Zur Konstruktion der Deletion wurde ein Sequenzabschnitt von etwa 500 bp stromauf- und abwärts der gewünschten Deletionsstelle in pK18mobsacB kloniert und das Konstrukt in die Zellen eingebracht. Die für die Amplifikation der Sequenzabschnitte benutzten Primer sind in Tabelle 2.4 aufgelistet. In den Zellen erfolgt eine Integration in das Bakteriengenom durch homologe Rekombination. Die entstandenen kanamycinresistenten Klone wurden über Nacht in LB-Medium ohne Antibiotikum inkubiert. Dadurch wird das Entstehen von Klonen ermöglicht, die den Vektoranteil in einer zweiten Rekombination verloren haben. Im Genom verbleibt entweder die markerfreie Deletion oder das native Gen wird wiederhergestellt. Nach Ausplattieren der Zellen auf BHI-Medium mit 10% Saccharose können nur die Zellen wachsen, die den Vektoranteil verloren haben. Da das *sacB*-Gen anfällig für Mutationen ist, wurden die saccharoseresistenten Klone zur Bestätigung der Eliminierung des Vektoranteils auf BHI-Medium mit Kanamycin ausgestrichen. Klone, die kanamycinsensitiv waren, wurden über PCR auf Vorhandensein der Deletion getestet.

Tab. 2.4: Die für die Konstruktion der Deletionsmutanten benötigten Primer zur Amplifikation der die Gene flankierenden Sequenzabschnitte.

| Deletionsstamm | Primer |
|-------------------|---|
| Δ NCgl0799 | Primer 1: 5'-GCGCGCTCTAGA _(XbaI) CCAA GAAATGAAGCTGT CAGG-3' Primer 1.1: 5'-GCGCGCGGATCC _(BamHI) TGATTGCGCCGAAAA ACTGGGG-3' Primer 2: 5'-GCGCGCGGATCC _(BamHI) CAATCTTCCCACTGAAG AAC-3' Primer 2.1: 5'-GCGCGCGAATTC _(EcoRI) CCTTCTG CCTCATCAA GCACC-3' |
| Δ NCgl1108 | Primer 1: 5'-GCGCGCGCATGC _(SphI) ACCCACGACGATGTGAG CG-3' Primer 1.1: GCGCGCTCTAGA _(XbaI) GTGTCACTGGAATTGACG CG-3' Primer 2: GCGCGCTCTAGA _(XbaI) ACCCCTGATGTCAGTTTGC TC-3' Primer 2.1: GCGCGCGAATTC _(EcoRI) GTTACATTGATGCGTTTC TTCA-3' |
| Δ NCgl1837 | Primer 1: 5'-GCGCGCGCATGC _(SphI) AAGCACGTAAACACTGC GGT-3' Primer 1.1: 5'-GCGCGCTCTAGA _(XbaI) CTGTAGCGTTGCACAC TCA-3' Primer 2: 5'-GCGCGCTCTAGA _(XbaI) ACATGGCTAGCCTTCTCC TT-3' Primer 2.1: 5'-GCGCGCGAGCTC _(SacI) GCTCGGCGACTTCATC CGA A-3' |
| Δ NCgl2816 | Primer 1: 5'-GCGCGC TCTAGA _(XbaI) ACCCCGGCGACTGGCT GA-3' Primer 1.2: 5'-GCGCGCGGATCC _(BamHI) CGTGGCTTACCCCA TCAACG-3' Primer 2: 5'-GCGCGCGGATCC _(BamHI) CTAGACTCCGCGCTCA CCA-3' Primer 2.1: 5'-GCGCGCGAGCTC _(SacI) CACGGTTCCGCCGGTG CA-3' |

4.3.3 Klonierung von pXMJ19NCgl2816 und pXMJ19cycA

Das Plasmid pXMJ19NCgl2816 diente als Expressionsvektor für das Gen NCgl2816. Dazu wurde NCgl2816 von genomischer DNA mit Hilfe der PCR amplifiziert, wobei Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *Xba*I und *Eco*RI eingeführt wurden, und in das Plasmid pXMJ19 kloniert (Primer: 5'-GCGCGCTCTAGA_(XbaI)ATGTCTGACTCAGCGCCAAC-3' und 5'-GCGCGCGAATTC_(EcoRI)CTAGTTGCCTTG AAGTGTATTTG-3'). Durch die nachfolgende Sequenzierung des daraus resultierenden Plasmides pXMJ19NCgl2816 konnten Punktmutationen ausgeschlossen werden. *C. glutamicum* Zellen wurden mit dem fehlerfreien Konstrukt transformiert und die Transformanten auf Platten mit Chloramphenicol ausplattiert.

Das Plasmid pXMJ19cycA diente als Expressionsvektor für das Gen *cycA* aus *E. coli* MG1655. Das bereits sequenzierte und fehlerfreie *cycA*-Gen lag zuerst im Vektor pTTQ18 vor, aus dem es mit den Restriktionsendonukleasen *Nco*I und *Hind*III herausgeschnitten wurde. Anschließend wurden die überhängenden Enden des Fragments mit dem DNA-Polymerase I Klenow-Enzym (Boehringer, Mannheim) nach Herstellerangaben aufgefüllt. Das Plasmid pXMJ19 wurde mit *Sma*I, das beim Schneiden glatte Enden produziert, linearisiert und anschließend mit alkalischer Phosphatase aus Shrimps (Boehringer, Mannheim) dephosphoryliert. Nach einer *blunt end*-Ligation des Gens in den Vektor wurde das daraus resultierende Konstrukt pXMJ19cycA in *C. glutamicum* Zellen eingebracht.

III. Ergebnisse

1 Die β -Alaninaufnahme im *C. glutamicum* Wildtyp ATCC 13032

1.1 Charakterisierung der β -Alaninaufnahme

1.1.1 Biochemische Charakterisierung der β -Alaninaufnahme

Bei der Konstruktion eines *C. glutamicum* Produktionsstammes für die Herstellung von Pantothenat müssen nicht nur der Stoffwechsel, sondern auch die Transmembranflüsse von Produkt und Substrat in Betracht gezogen werden, da sich diese ebenfalls limitierend auf die Produktausbeute auswirken können. β -Alanin stellt als direktes Vorläufermolekül des Pantothenats das Substrat bei einer Pantothenatproduktion dar, so dass dessen Verfügbarkeit bei hohen Pantothenatsyntheseraten in einem Produktionsstamm Einfluss auf die Produktausbeute haben kann. Stellt der Transport von β -Alanin einen limitierenden Faktor dar, könnte man mit der Identifizierung und Überexpression des Gens für den β -Alaninimporter diesen Flaschenhals umgehen. Durch eine biochemische Charakterisierung der β -Alaninaufnahme wurde untersucht, ob im *C. glutamicum* Wildtyp ATCC 13032 ein β -Alanin-Carrier existiert oder das Substrat über Diffusion in die Zelle gelangt. Während bei einer Diffusion die Aufnahmerate mit der Substratkonzentration linear ansteigt, erhält man bei einem carriervermittelten Transport eine Sättigungskinetik. Bei der biochemischen Charakterisierung des β -Alaninimports wurden zur Bestimmung der kinetischen Parameter des Transporters Aufnahmemessungen mit radioaktiv markiertem β -Alanin (β -[1- 14 C]-Alanin) verschiedener Konzentrationen (0,1 - 50 mM) durchgeführt. Aus den resultierenden Kinetiken wurden die Aufnahmeraten bestimmt und diese gegen die Substratkonzentrationen grafisch dargestellt. Es resultierte annäherungsweise eine rechtwinklige Hyperbel, wie sie für die meisten Enzyme gilt und durch die Michaelis-Menten-Gleichung beschrieben werden kann (Abb. 3.1). Durch eine doppeltreziproke Darstellung der Werte, wodurch man ein Lineweaver-Burk-Diagramm erhält, konnte man die kinetischen Parameter des Transporters genau bestimmen. Es handelt sich bei dem β -Alaninaufnahmesystem um ein Transportprotein mit einem K_m -Wert von 5 mM und einer maximalen Aufnahmegeschwindigkeit V_{\max} von 1,66 nmol (mg TG)

min^{-1} . Da die β -Alaninaufnahme in Abhängigkeit von der Substratkonzentration Sättigungsverhalten zeigt, ist es unwahrscheinlich, dass hier passive Diffusion als Mechanismus der β -Alaninaufnahme vorliegt.

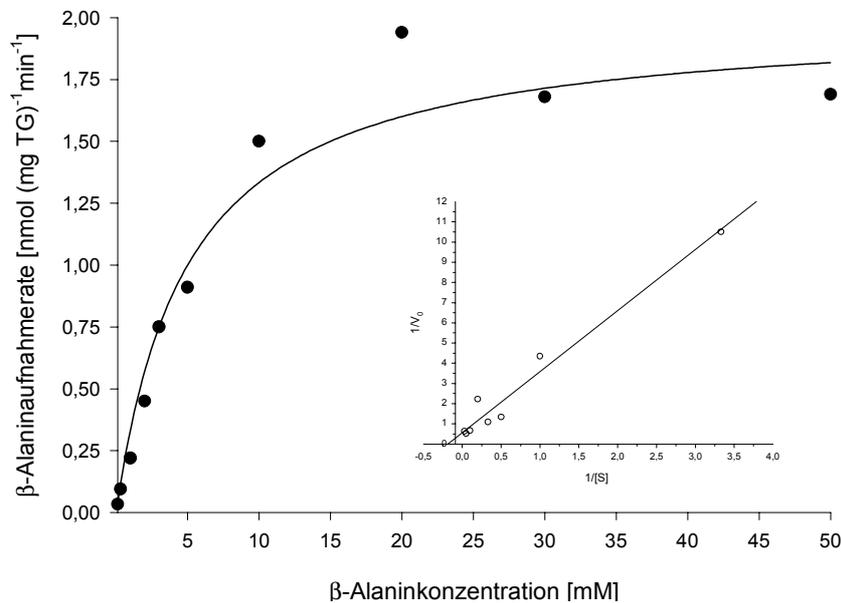


Abb. 3.1: Beziehung zwischen der Substratkonzentration und der Geschwindigkeit ihres sättigbaren Transports. In einer Transportanalyse mit radioaktiv markiertem β -Alanin (β -[1- ^{14}C]-Alanin) wurden im *C. glutamicum* Wildtyp ATCC 13032 die Aufnahmeraten bei verschiedenen β -Alaninkonzentrationen bestimmt und gegen die Substratkonzentrationen aufgetragen. Die Reaktionsgeschwindigkeit nahm mit der Substratkonzentration hyperbolisch zu und gehorchte so der Michaelis-Menten-Beziehung. **Inlet:** Lineweaver-Burk-Diagramm: Der Kehrwert der Aufnahmeraten wurde gegen den Kehrwert der Substratkonzentrationen aufgetragen, so dass man aus dem $1/V_0$ -Achsenabschnitt $1/V_{\max}$ und aus dem $1/[S]$ -Achsenabschnitt $-1/K_m$ genau bestimmen konnte.

1.1.2 Energetische Aspekte der β -Alaninaufnahme

Um das Vorhandensein eines aktiven, energieabhängigen Transportmechanismus von β -Alanin zu untermauern, wurde der Effekt von Carbonylcyanid-*m*-chlorophenylhydrazon (CCCP) auf die β -Alaninaufnahme untersucht. CCCP ist eine lipidlösliche, schwache Säure und ein effektiver Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung (und Photosynthese). Es transportiert Protonen über die Cytoplasmamembran in die Zelle, so dass das Membranpotential zusammenbricht. Es wurden Aufnahmemessungen mit radioaktiv markiertem β -Alanin (β -[1- ^{14}C]-Alanin) durchgeführt, wobei die Substratkonzentration 1 mM betrug. Die Messungen

wurden durch Zugabe des Substrates zum Zeitpunkt Null gestartet, kurz nach Entnahme der ersten Proben nach 20 min erfolgte die Zugabe von 50 μM CCCP in einen der Ansätze. Die Aufnahmemessung wurde über einen Zeitraum von 100 min durchgeführt, wobei alle 20 min Proben entnommen wurden. Die resultierenden Kinetiken zeigten eine starke Inhibition der β -Alaninaufnahme nach Zugabe des Entkopplers (Abb. 3.2). Eine Bestimmung der internen β -Alaninkonzentrationen ergab, dass das Substrat in Abwesenheit von CCCP innerhalb von 100 min bis auf eine Konzentration von 7,8 mM akkumuliert worden war, wobei in Anwesenheit des Entkopplers die cytoplasmatische β -Alaninkonzentration 2,1 mM betrug.

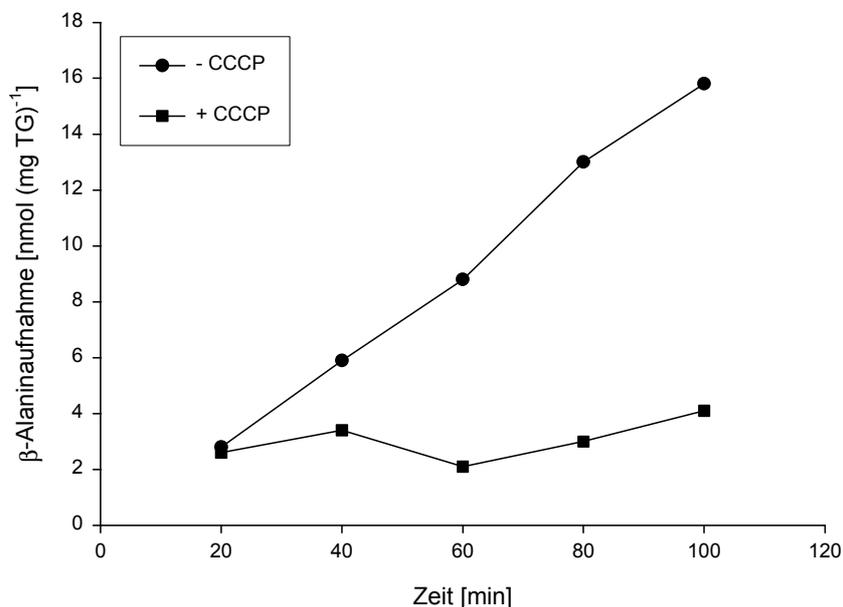


Abb. 3.2: β -Alaninaufnahmemessung des *C. glutamicum* Wildtyps ATCC 13032 in Gegenwart und Abwesenheit des Entkopplers CCCP. Die Substratkonzentration betrug 1 mM, wobei der Entkoppler kurz nach Entnahme der ersten Probe nach 20 min mit einer Konzentration von 50 μM zugesetzt wurde.

CCCP hat Auswirkungen auf den energetischen Zustand einer Zelle, wobei auch die ATP-Synthese zum Erliegen kommt. Um auszuschließen, dass die durch CCCP verursachte Erniedrigung der β -Alaninaufnahmerate auf eine ATP-Verarmung zurückzuführen ist, wurden die internen ATP-Pools von Zellen bestimmt, die über die gleiche Zeitspanne wie bei den Aufnahmemessungen in Gegenwart von CCCP kultiviert worden waren. Die Konzentration des Entkopplers betrug in diesem Versuch 140 μM . Das Experiment zeigte, dass innerhalb der Versuchsdauer die ATP-

Konzentration von 2,1 auf 1,1 mM zurückging, in den Zellen also noch ausreichend viel ATP vorhanden war (Abb. 3.3), das vermutlich von der Substratphosphorylierung in der Glykolyse stammt. Der Rückgang des β -Alaninimports nach CCCP-Zugabe ist also nicht Folge einer ATP-Verarmung, so dass man aus diesen Ergebnissen auf einen β -Alaninaufnahmeprozess in *C. glutamicum* schließen kann, der abhängig vom Membranpotential ist und carriervermittelt funktioniert.

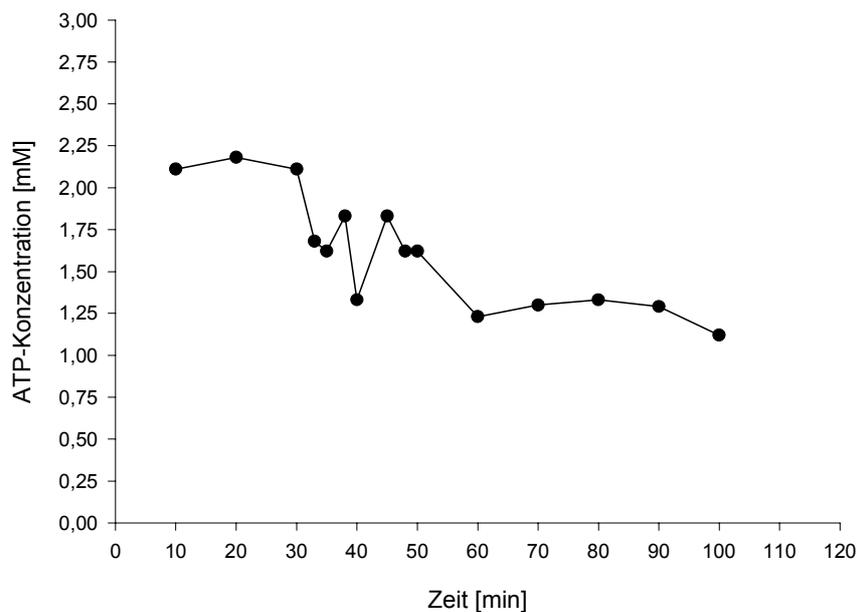


Abb. 3.3: Bestimmung der internen ATP-Konzentration von Zellen des *C. glutamicum* Wildtyps ATCC 13032, die in Gegenwart von 140 μ M des Entkopplers CCCP kultiviert worden waren.

Neben CCCP wurde auch der Effekt des Atmungsgifts Kaliumcyanid (KCN) auf die β -Alaninaufnahme untersucht. KCN bindet das Eisen des terminalen Enzyms der Atmungskette Cytochromoxidase und inaktiviert das Enzym dadurch. Als Folge kommt die Atmungskette zum Erliegen und es kann kein Membranpotential aufgebaut werden. Die Aufnahmemessungen wurden mit Zellen des *C. glutamicum* Wildtyps ATCC 13032 durchgeführt. β -Alanin und KCN wurden in einer Konzentration von jeweils 1 mM eingesetzt und zum Zeitpunkt Null zu den Zellsuspensionen gegeben. Über eine Zeitspanne von 60 min wurden alle 20 min Proben aus den Kulturen entnommen, mit der Silikonölzentrifugation aufgearbeitet und die β -Alaninkonzentrationen der internen Proben wurden mit der HPLC bestimmt. Ohne KCN akkumulierten die Zellen nach 100 min intern 12 mM β -Alanin, wobei in Gegenwart von KCN die intrazelluläre β -Alaninkonzentration 2,2 mM betrug

(Abb. 3.4). Aus diesen Daten wurden die β -Alaninaufnahmeraten bestimmt, die in Gegenwart von KCN von 0,2 um 90 % auf $0,02 \text{ nmol (mg TG)}^{-1} \text{ min}^{-1}$ zurückgingen. Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass β -Alanin durch einen aktiven, energieabhängigen Carrier transportiert wird.

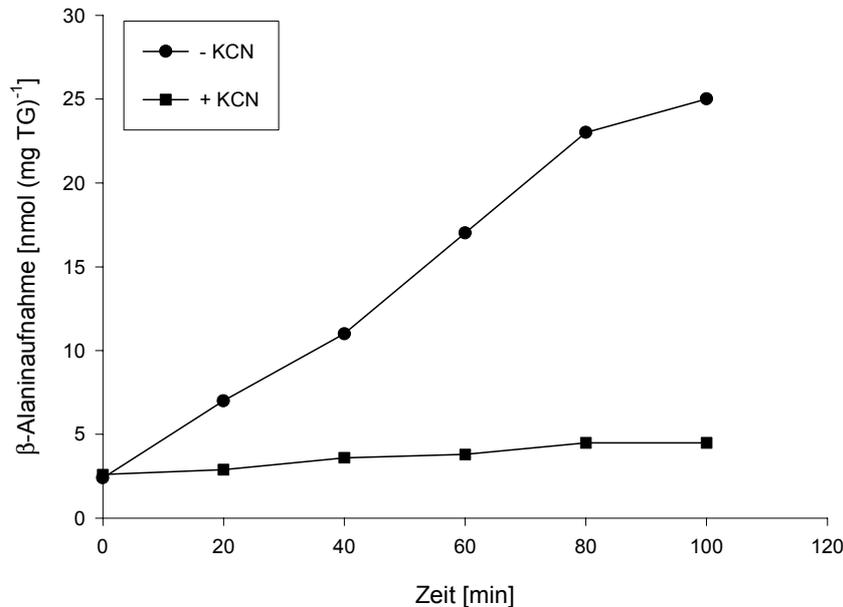


Abb. 3.4: β -Alaninaufnahme durch den *C. glutamicum* Wildtyp ATCC 13032 in Gegenwart und Abwesenheit des Atmungsgifts Kaliumcyanid (KCN). Das Substrat β -Alanin (1 mM) und KCN (1 mM) wurden zum Zeitpunkt Null zu den Zellen gegeben.

1.1.3 Konkurrenz der β -Alaninaufnahme durch verschiedene Aminosäuren

Um zu untersuchen, welche Aminosäuren mit β -Alanin um die Aufnahme konkurrieren, wurden β -Alaninaufnahmemessungen mit radioaktiv markiertem β -Alanin in Gegenwart von GABA, L-Serin, L-Alanin, D-Alanin und Glycin durchgeführt. Die Auswahl der letzten drei Aminosäuren lag darin begründet, dass es sich um Substrate des β -Alaninimporters CycA in *E. coli* handelt (43). GABA wurde aufgrund der hohen strukturellen Ähnlichkeit zu β -Alanin und der Tatsache, dass in *Bacillus subtilis* das GabP-Protein sowohl β -Alanin als auch GABA transportiert (4), ausgewählt. Bei den Transportanalysen betrug die β -Alaninkonzentration 5 mM und die Konzentrationen der zu untersuchenden Aminosäuren jeweils 50 mM. Über eine Zeitspanne von 60 min wurden alle 10 min Proben aus den Kulturen entnommen,

wobei jeweils Vierfachmessungen durchgeführt wurden. Von den hier untersuchten Aminosäuren kam es durch L-Alanin zu der stärksten Inhibierung der β -Alaninaufnahme. Sie sank von etwa $0,64 \pm 0,15 \text{ nmol (mg TG)}^{-1}\text{min}^{-1}$ auf $0,22 \pm 0,047 \text{ nmol (mg TG)}^{-1}\text{min}^{-1}$, was etwa 34 % der ursprünglichen Aufnahme rate entspricht (Tab. 3.1). L-Serin vermochte die β -Alaninaufnahme am wenigsten zu inhibieren, wobei hier die Aufnahme rate um 50 % auf $0,32 \pm 0,066 \text{ nmol (mg TG)}^{-1}\text{min}^{-1}$ sank (Tab. 3.1). Durch dieses Experiment konnte gezeigt werden, dass die hier untersuchten Aminosäuren mit β -Alanin um die Aufnahme konkurrieren.

Tab. 3.1: Konkurrenz der β -Alaninaufnahme durch verschiedene Aminosäuren. Es wurden Aufnahme messungen mit radioaktiv markiertem β -Alanin durchgeführt, wobei die Substratkonzentration jeweils 5 mM betrug. In Gegenwart verschiedener Aminosäuren erfolgte eine Abnahme der β -Alaninaufnahme rate in unterschiedlichem Ausmaß. Bei den Aufnahme rates handelt es sich um Mittelwerte aus vier unabhängigen Messungen.

| Kompetitor | β -Alaninaufnahme rate [nmol (mg TG) ⁻¹ min ⁻¹] | Aufnahme |
|------------------|---|------------------|
| keine Zugabe | $0,64 \pm 0,15$ | 100 % \pm 23 % |
| + 50 mM L-Alanin | $0,22 \pm 0,047$ | 34 % \pm 21 % |
| + 50 mM GABA | $0,24 \pm 0,041$ | 37 % \pm 17 % |
| + 50 mM D-Alanin | $0,25 \pm 0,062$ | 39 % \pm 10 % |
| + 50 mM Glycin | $0,29 \pm 0,067$ | 45 % \pm 23 % |
| + 50 mM L-Serin | $0,32 \pm 0,066$ | 50 % \pm 20 % |

1.2 Molekularbiologischer Ansatz zur Identifizierung eines β -Alaninaufnahmesystems

Durch verstärkte Synthese des β -Alaninaufnahmesystems könnte möglicherweise ein limitierender Faktor der Pantothenatproduktion behoben werden. Dass in *C. glutamicum* ein sekundär aktives Aufnahmesystem für β -Alanin existiert, konnte hier durch kinetische und energetische Analysen gezeigt werden. Zur Identifikation des β -Alanin Carriers wurde zunächst eine BLAST-Suche im *C. glutamicum*-Genom mit der Aminosäuresequenz von CycA, das in *E. coli* neben Glycin, L-Alanin, D-Alanin, D-Serin und Cycloserin auch β -Alanin transportiert (51), durchgeführt. Die Suche ergab, dass die von den Genen NCgl0453 und NCgl1108 kodierten Proteine ähnlich zu

CycA sind. Beide Gene sind annotiert als mögliche γ -Amino-*n*-butyrylsäure-Permeasen (GABA), wobei GABA bezüglich der Struktur β -Alanin sehr ähnlich ist, da es nur eine CH_2 -Gruppe mehr besitzt. Eine BLAST-Suche mit der Aminosäuresequenz von GabP, dem Transporter für β -Alanin und GABA in *B. subtilis* ergab die gleichen Resultate. Die Gene NCgl0453 und NCgl1108 wurden charakterisiert, indem der Effekt einer Inaktivierung bzw. Deletion untersucht wurde (siehe unten).

1.2.1 Inaktivierung des Gens eines putativen β -Alaninimporters

Das Gen NCgl0453 besteht aus 1410 Basenpaaren und für die daraus abgeleitete 469 Aminosäuren lange Proteinsequenz konnten durch eine computergestützte Topologieanalyse (TMHMM, EMBL, Heidelberg) 10 Transmembranregionen vorhergesagt werden. NCgl0453 wurde im *C. glutamicum* Wildtyp ATCC 13032 unter Verwendung des Integrationsvektors pK18mob'NCgl0453' inaktiviert. Nach der Transformation von *C. glutamicum* mit diesem Konstrukt durch konjugativen Transfer mit dem *E. coli* Stamm S-17 als Donor, konnte die Insertion des Vektors ins chromosomal kodierte Gen NCgl0453 durch eine PCR nachgewiesen werden. (Daten nicht gezeigt). Mit dieser Insertionsmutante ATCC 13032NCgl0453::pK18mob'NCgl0453' und dem Wildtyp ATCC 13032 wurde eine Aufnahmemessung mit [^{14}C]-markiertem β -Alanin durchgeführt, wobei die Substratkonzentration 5 mM betrug. Die Aufnahmekinetiken machten deutlich, dass sich die Aufnahmeraten nicht signifikant voneinander unterschieden (Abb. 3.5). Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass das Gen NCgl0453 für ein Protein kodiert, das vermutlich nicht an der β -Alaninaufnahme beteiligt ist.

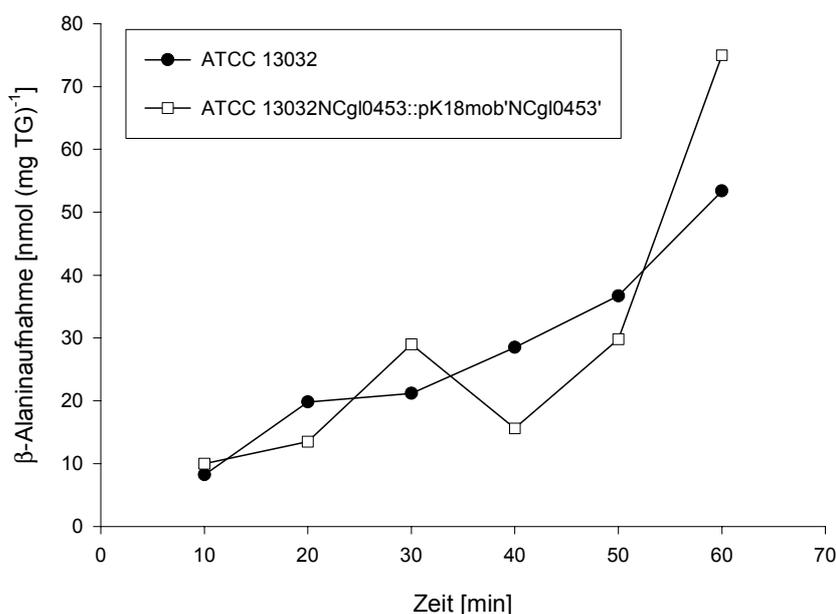


Abb. 3.5: Aufnahmemessung mit [¹⁴C]-markiertem β -Alanin: Die Inaktivierung des Gens NCgl0453 eines putativen β -Alaninimporters durch Insertion führte im Stamm ATCC 13032NCgl0453::pK18mob'NCgl0453' im Vergleich zum *C. glutamicum* Wildtyp ATCC 13032 zu keiner signifikanten Veränderung in der β -Alaninaufnahmekinetik. Die β -Alaninkonzentration betrug 5 mM.

1.2.2 Deletion des Gens eines putativen β -Alaninimporters

Das Gen NCgl1108, das 1406 bp lang ist und dessen abgeleitete Aminosäuresequenz Ähnlichkeit zur putativen Aminosäure-Permease aus *Corynebacterium efficiens* YS-314 zeigt, resultierte neben NCgl0453 ebenfalls aus der BLAST-Suche mit *E. coli* CycA und wurde zur näheren Charakterisierung im *C. glutamicum* Wildtyp ATCC 13032 deletiert. Dazu wurde das Konstrukt pK18mobsacB- Δ NCgl1108 verwendet und die Deletion konnte durch eine PCR nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Mit der Mutante Δ NCgl1108 und dem Kontrollstamm ATCC 13032 wurde eine Aufnahmemessung in Gegenwart von 5 mM β -Alanin durchgeführt. Die Aufnahme erfolgte über einen Zeitraum von 60 min, wobei alle 10 min Proben für die Silikonölzentrifugation entnommen wurden und die Bestimmung der β -Alaninkonzentrationen der internen Proben mit der HPLC erfolgte. Abbildung 3.6 zeigt, dass die Deletionsmutante nach 60 min mit 40 mM β -Alanin intern die gleiche Menge akkumuliert hat wie der Wildtyp. Dieses Genprodukt scheint

also nicht an der β -Alaninaufnahme beteiligt zu sein.

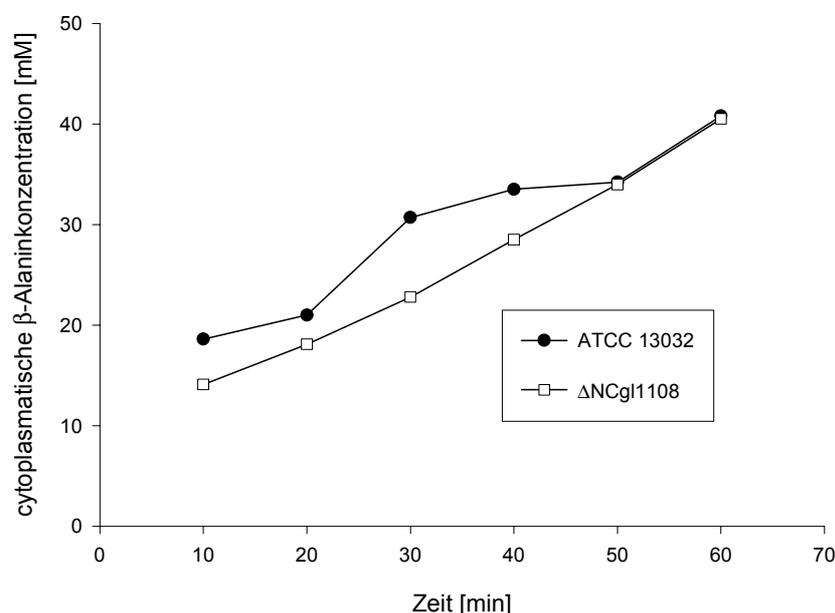


Abb. 3.6: β -Alaninaufnahme durch den *C. glutamicum* Wildtyp ATCC 13032 und der Deletionsmutante Δ NCgl1108, dem das Gen für den putativen β -Alaninimporter fehlt. β -Alanin wurde in einer Konzentration von 5 mM zum Zeitpunkt Null zu den Zellen gegeben. Die Bestimmung der β -Alaninkonzentrationen erfolgte mit Hilfe der HPLC.

Da das Gen NCgl1108 als möglicher GABA-Transporter annotiert ist, wurde mit der Deletionsmutante Δ NCgl1108 auch eine Aufnahmemessung mit GABA durchgeführt, um zu untersuchen, ob die Deletion eine Auswirkung auf dessen Aufnahme hat. Als Kontrollstamm diente ATCC 13032, die GABA-Konzentration betrug 5 mM. Über einen Zeitraum von 60 min wurden zunächst 1, 3, 6, 9 und 10 min nach Start und danach alle 10 min Proben aus den Kulturen entnommen und mit der Silikonölzentrifugation aufgearbeitet. Die GABA-Konzentrationen der internen Proben wurden daraufhin mit Hilfe der HPLC bestimmt und gegen die Zeit grafisch aufgetragen (Abb. 3.7). Die Transportanalyse ergab, dass die Deletionsmutante Δ NCgl1108 GABA mit der gleichen Rate akkumulierte wie der Wildtyp, wobei 60 min nach Versuchsbeginn die interne GABA-Konzentration bei der Mutante 23 mM und beim Wildtyp 25 mM betrug. Das Gen NCgl1108 scheint demnach auch nicht für ein Protein zu kodieren, das am Transport von GABA beteiligt ist.

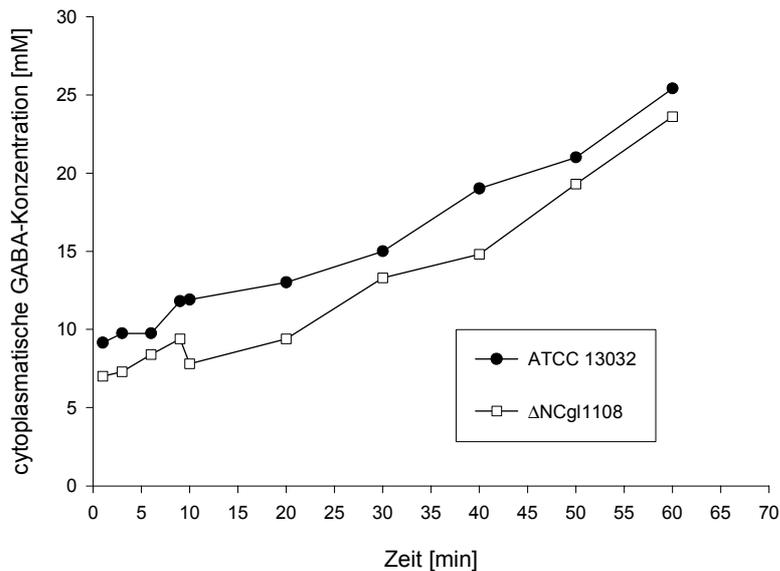


Abb. 3.7: GABA-Aufnahme durch den *C. glutamicum* Wildtyp ATCC 13032 und der Deletionsmutante Δ NCgl1108, dem das Gen für den putativen GABA-Importer fehlt. Die Aufnahmemessungen erfolgten mit GABA, das in einer Konzentration von 5 mM zum Zeitpunkt Null zu den Zellen gegeben wurde. Die Bestimmung der GABA-Konzentrationen erfolgte mittels HPLC.

1.2.3 Die β -Alaninaufnahme durch die Insertionsmutante ATCC 13032 *ykfD::pK18mob'ykfD'* mit dem inaktiven Gen eines putativen β -Alaninimporters

Aus einer unabhängig von dieser Arbeit durchgeführten BLAST-Suche mit dem S-Methyl-Methionin-Transporter YkfD aus *E. coli* resultierten in *C. glutamicum* drei offene Leserahmen, wobei zwei der Sequenzen den Genen NCgl0453 und NCgl1108 (siehe oben) entsprachen. Das dritte Gen, NCgl1062, war als GABA-Permease annotiert, so dass es nahe lag, infolge der strukturellen Ähnlichkeit von GABA und β -Alanin auch dieses Gen in Bezug auf eine Teilnahme am β -Alaninimport zu untersuchen. Eine Insertionsmutante mit dem inaktiven Gen NCgl1062 lag bereits vor (zur Verfügung gestellt von Christian Trötschel), so dass mit dieser Mutante eine β -Alaninaufnahmemessung durchgeführt wurde. Das Experiment zeigte, dass die Insertionsmutante ATCC 13032 *ykfD::pK18mob'ykfD'* β -Alanin mit gleicher Rate wie

der Wildtyp aufnahm und somit das Gen NCgl1062 nicht an diesem Transportprozess beteiligt zu sein scheint (Daten nicht gezeigt).

1.3 Heterologe Expression des Gens *cycA* für den β -Alanin Carrier aus *E. coli* in *C. glutamicum*

Da es nicht gelungen war, das Gen für den β -Alanin Carrier in *C. glutamicum* zu identifizieren, wurde auf einem anderen Wege versucht, den β -Alaninfluss in die Zelle zu erhöhen. Ein guter Kandidat hierfür war der CycA-Carrier in *E. coli*, der neben Glycin, L-Alanin, D-Alanin, D-Serin und Cycloserin auch β -Alanin in die Zelle transportiert (51). Eine heterologe Expression des *cycA* Gens in *C. glutamicum* wurde durchgeführt, um durch eine erhöhte β -Alaninaufnahme die fermentativen Pantothenatproduktion eventuell zu steigern.

1.3.1 Nachweis der heterologen Expression von *cycA* in *C. glutamicum* durch RNA-Hybridisierung

Für die *cycA*-Expression im *C. glutamicum* Wildtyp ATCC 13032 wurde der Expressionsvektor pXMJ19 genutzt. Nach Transformation der Zellen mit dem Konstrukt pXMJ19*cycA*, wurde durch Detektion der *cycA*-mRNA mit einem RNA-Hybridisierungsexperiment die Expression des *cycA*-Gens in dem Stamm ATCC 13032pXMJ19*cycA* nachgewiesen, wobei der Stamm ATCC 13032pXMJ19, der den Leervektor trägt, als Kontrollstamm diente. Die *cycA*-Expression wurde mit 1 mM IPTG induziert und die Induktionszeiten betragen 3, 6 und 24 h. Die Detektion der *cycA*-mRNA nach diesen Zeitspannen und auch vor Zugabe von IPTG erfolgte mit einer *cycA*-Sonde. Mit der RNA-Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass *cycA* in dem Stamm mit dem Leervektor erwartungsgemäß nicht exprimiert wurde, wohingegen im Stamm ATCC 13032pXMJ19*cycA* auch schon vor der Induktion *cycA*-mRNA infolge einer heterologen Expression nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.8).

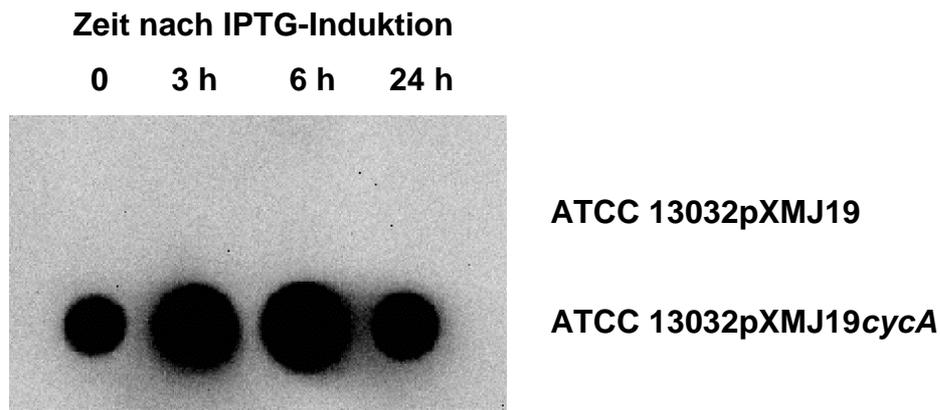


Abb. 3.8: Der *cycA*-exprimierende Stamm ATCC 13032pXMJ19*cycA* und der Kontrollstamm ATCC 1303pXMJ19 wurden über einen Zeitraum von 24 h in Gegenwart von IPTG kultiviert und die *cycA*-mRNA wurde nach verschieden langer Zeit der Induktion der *cycA*-Expression mit einer *cycA*-Sonde im RNA-Hybridisierungsexperiment detektiert.

1.3.2 β -Alaninaufnahme im *cycA*-exprimierenden Stamm ATCC 13032pXMJ19*cycA*

Nachdem die heterologe Expression von *E. coli cycA* in dem Stamm ATCC 13032pXMJ19*cycA* nachgewiesen werden konnte, wurde mit einer β -Alaninaufnahmemessung überprüft, ob mit der *cycA*-Expression auch ein funktionsfähiges Protein vorliegt, das zu einer erhöhten β -Alaninaufnahme in diesem Stamm führt. Als Kontrollstamm diente ATCC 13032pXMJ19, der den Leervektor trägt. Die Induktion der *cycA*-Expression erfolgte durch 1 mM IPTG, wobei die Induktionszeiten 0, 3, 6, 13, 17 und 24 h betragen. Die Aufnahmemessungen wurden in Gegenwart von 5 mM β -Alanin über einen Zeitraum von 60 min durchgeführt, wobei alle 10 min Proben entnommen wurden und die Bestimmung der β -Alaninkonzentrationen der internen Proben aus der Silikonölzentrifugation mit der HPLC erfolgte. Die Ergebnisse zeigten, dass erst nach 13-stündiger IPTG-Induktion der *cycA*-Expression eine erhöhte β -Alaninaufnahme durch den Stamm ATCC 13032pXMJ19*cycA* nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.9). 60 min nach Versuchsbeginn hatten die Zellen des *cycA*-Expressionsstammes 62 mM β -Alanin im Cytoplasma akkumuliert, während es beim Kontrollstamm lediglich 21 mM waren. Eine Berechnung der Aufnahmeraten aus diesen Daten ergab, dass die Aufnahmegeschwindigkeit infolge der *cycA*-Expression von 0,1 auf 1 nmol (mg TG)⁻¹min⁻¹ anstieg. 17 h nach IPTG-Zugabe lag die Aufnahmerate im Stamm

ATCC 13032pXMJ19cycA bereits bei $2,5 \text{ nmol (mg TG)}^{-1}\text{min}^{-1}$ und nach 24 h langer IPTG-Induktion wurde β -Alanin durch diesen Stamm mit einer Rate von $2,9 \text{ nmol (mg TG)}^{-1}\text{min}^{-1}$ aufgenommen. Im Gegensatz dazu blieb die Aufnahme durch den Stamm ATCC 13032pXMJ19 mit etwa $0,18 \text{ nmol (mg TG)}^{-1}\text{min}^{-1}$ relativ niedrig. Die heterologe *cycA*-Expression in *C. glutamicum* führte also zur Synthese eines funktionsfähigen Proteins, was in einer Erhöhung der β -Alaninaufnahmerate resultierte. Allerdings war die Aufnahmeaktivität des Stammes ATCC 13032pXMJ19 im Vergleich zum Wildtyp ATCC 13032, der β -Alanin mit einer Rate von etwa $0,64 \text{ nmol (mg TG)}^{-1}\text{min}^{-1}$ aufnimmt, relativ niedrig.

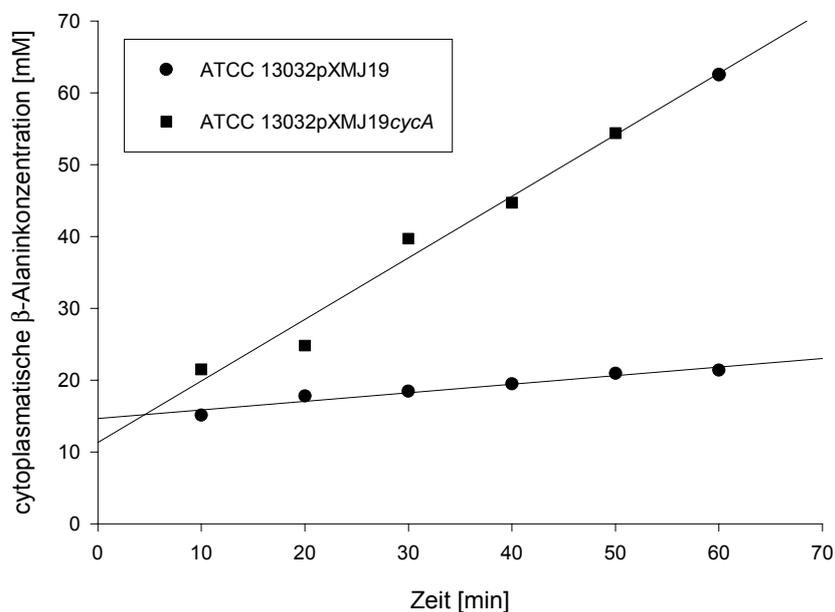


Abb. 3.9: Cytoplasmatische β -Alaninakkumulation durch den *cycA*-Expressionsstamm ATCC 13032pXMJ19cycA und den Kontrollstamm ATCC 13032pXMJ19. Beide Stämme wurden 13 h lang in Gegenwart von 1 mM IPTG kultiviert, bevor eine β -Alaninaufnahmemessung mit 5 mM β -Alanin durchgeführt wurde.

1.3.3 Pantothenatproduktion durch den *cycA*-exprimierenden Stamm ATCC 13032pXMJ19cycA

Da β -Alanin das direkte Vorläufermolekül von Pantothenat ist und hier gezeigt werden konnte, dass eine heterologe *cycA*-Expression durch den Stamm ATCC13032pXMJ19cycA zu einer Erhöhung der β -Alaninaufnahme führt, wurde weiterhin überprüft, ob mit diesem Stamm auch eine höhere Pantothenatproduktion

erreicht werden kann. Als Kontrollstamm diente ATCC 13032pXMJ19, der den Leervektor trägt. Da eine erhöhte β -Alaninaufnahme infolge der *cycA*-Expression erst nach einer etwa 13-stündigen Kultivierung mit dem Induktor IPTG nachgewiesen werden konnte, wurden in diesem Versuch die Stämme zunächst über Nacht mit 1 mM IPTG kultiviert und danach 10 mM β -Alanin hinzugegeben. Betrachtet man die Zugabe von IPTG als Startpunkt des Versuchs, so wurden 75, 96, 123 und 147 h nach Versuchsbeginn Proben aus den Kulturen entnommen und die Pantothenatmengen in den Überständen mit dem mikrobiologischen Röhrchentest bestimmt. Dazu wurden die sterilfiltrierten Überstände zu den Kulturen des Pantothenat-auxotrophen Indikatorstammes R127*panC::pK18mob'panC'*pXMJ19 gegeben und man erlaubte diesen 48 h lang zu wachsen, wobei das Wachstum abhängig vom Pantothenatgehalt im Überstand war. Das Experiment verdeutlichte, dass beide Stämme innerhalb des Versuchs vergleichbare Mengen an Pantothenat abgegeben hatten, wobei am Versuchsende nach 147 h der Stamm ATCC13032pXMJ19*cycA* 300 ng (mg TG)⁻¹ und der Kontrollstamm 400 ng (mg TG)⁻¹ Pantothenat produziert hatten (Daten nicht gezeigt).

2 Die Pantothenataufnahme im *C. glutamicum* Wildtyp ATCC 13032

2.1 Charakterisierung der Pantothenataufnahme

2.1.1 Biochemische Charakterisierung der Pantothenataufnahme

Auf dem Weg einer Stammkonstruktion mit dem Ziel einer vermehrten Pantothenatproduktion spielt auch der zelleinwärts gerichtete Fluss des Produkts eine Rolle. Durch die Zellen abgegebenes Pantothenat sollte nicht wieder aufgenommen werden, da dies sonst die Nettoausbeute senken könnte. Im Falle einer Pantothenatproduktion mit *C. glutamicum* sollte also der Pantothenatimport nicht mehr aktiv sein. Um herauszufinden, ob ein Aufnahmesystem in *C. glutamicum* existiert, sind in dieser Arbeit Aufnahmemessungen mit radioaktiv markiertem Pantothenat (Ca^{2+} -D-[1-¹⁴C]-Pantothenat) durchgeführt worden. Die Pantothenatkonzentrationen lagen zwischen 0,1 und 7 μM . Aus den Kinetiken der Messungen wurden die Anfangsgeschwindigkeiten bestimmt und diese gegen die entsprechenden Konzentrationen grafisch dargestellt, wobei eine Michaelis-Menten-Kinetik resultierte (Abb. 3.10). Durch eine doppeltreziproke Darstellung der Werte,

wodurch man eine Lineweaver-Burk-Diagramm erhält, konnte man die kinetischen Parameter des Transporters genau bestimmen. Es handelt sich bei dem Pantothenataufnahmesystem um ein hoch-affines Transportprotein mit einem K_m -Wert von $0,9 \mu\text{M}$ und sehr geringen Aufnahmezeiten mit einer maximalen Geschwindigkeit V_{max} von $26 \text{ pmol (mg TG)}^{-1}\text{min}^{-1}$.

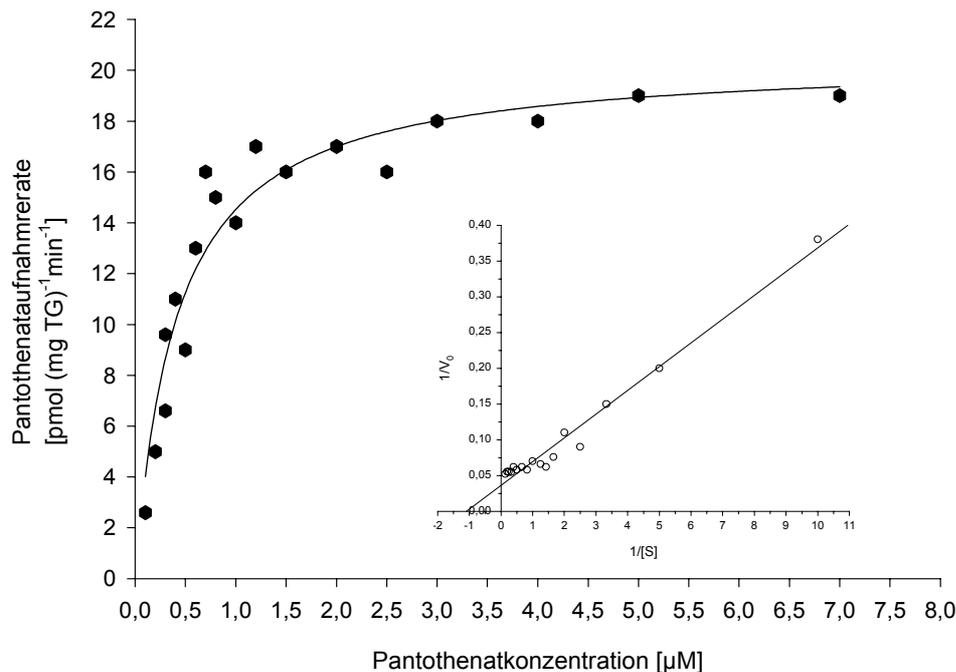


Abb. 3.10: Beziehung zwischen der Substratkonzentration und der Geschwindigkeit ihres sättigbaren Transports. Mit dem *C. glutamicum* Wildtyp ATCC 13032 wurden Aufnahmemessungen mit radioaktiv markiertem Pantothenat bei unterschiedlichen Pantothenatkonzentrationen durchgeführt. Die Auftragung der daraus resultierenden Aufnahmezeiten gegen die Substratkonzentrationen ergab eine Michaelis-Menten-Kinetik. **Inlet:** Lineweaver-Burk-Diagramm: Der Kehrwert der Aufnahmezeiten wurde gegen den Kehrwert der Substratkonzentrationen aufgetragen, so dass man aus dem $1/V_0$ -Achsenabschnitt $1/V_{\text{max}}$ und aus dem $1/[S]$ -Achsenabschnitt $-1/K_m$ genau bestimmen konnte.

2.1.2 Einfluss von externem Pantothenat auf die Aufnahmezeit

Für *Saccharomyces cerevisiae* wurde gezeigt, dass die Pantothenataufnahme durch die extrazelluläre Pantothenatkonzentration moduliert werden kann (54). Es wurden die Transportraten von Zellen, die bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen ($0,1 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$) gezogen wurden, bestimmt. Es zeigte sich, dass die Transportraten höher waren, je niedriger die Pantothenatkonzentrationen gewählt

wurden. In anderen Worten, die Expression des Gens für den Transporter wurde verstärkt, wenn niedrige extrazelluläre Substratkonzentrationen vorherrschten. Ob dies auch für *C. glutamicum* gilt, wurde hier überprüft. Dazu wurden die Zellen in Gegenwart von 10 μM Pantothenat kultiviert und vor der Aufnahmemessung zweimal mit CgC-Minimalmedium gewaschen. Es zeigte sich, dass das Vorhandensein von 10 μM Pantothenat im Kultivierungsmedium keinen Einfluss auf die Aufnahme rate hatte (Daten nicht gezeigt).

2.2 Molekularbiologischer Ansatz zur Identifizierung eines Pantothenataufnahmesystems

2.2.1 Deletion des Gens eines putativen Pantothenatimporters

Zur Identifizierung des Importers wurde mit der Nukleotidsequenz von *panF*, das in *E. coli* für den Pantothenatimporter kodiert (56), eine BLAST-Suche durchgeführt. Aus dieser Suche resultierte das Gen NCgl0799. Dieses Gen wurde im *C. glutamicum* Wildtyp ATCC 13032 unter Verwendung des Konstrukts pK18*mobsacB*- Δ 0799 deletiert, was mit Hilfe einer PCR nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Mit der Deletionsmutante Δ 0799 und dem Wildtyp ATCC 13032 wurden Aufnahmemessungen mit radioaktiv markiertem Pantothenat durchgeführt, wobei über eine Zeitspanne von 60 min alle 10 min Proben aus den Zellsuspensionen entnommen wurden. Der Versuch zeigte, dass die Aufnahmekinetiken von Wildtyp und Deletionsmutante fast identisch waren (Abb. 3.11). Bei einer Substratkonzentration von 10 μM lag die aus der Kinetik errechnete Aufnahme rate beim Wildtyp bei 23 $\text{pmol (mg TG)}^{-1}\text{min}^{-1}$ und bei der Mutante bei 19 $\text{pmol (mg TG)}^{-1}\text{min}^{-1}$. Somit konnte hier gezeigt werden, dass das Gen NCgl0799 vermutlich nicht an der Pantothenataufnahme beteiligt ist.

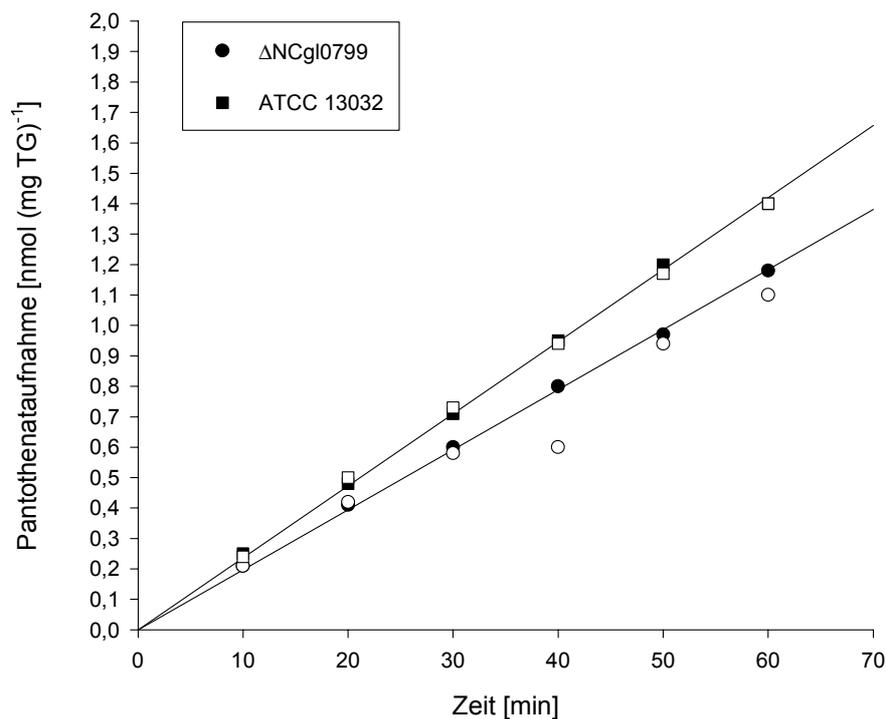


Abb. 3.11: Pantothenataufnahme durch den *C. glutamicum* Wildtyp ATCC 13032 und der Mutante Δ NCgl0799 mit einer Deletion des Gens, das Ähnlichkeit zu *panF* aus *E. coli* hat (PanF katalysiert in *E. coli* den Import von Pantothenat). Das radioaktiv markierte Pantothenat wurde mit einer Konzentration von 10 μ M zum Zeitpunkt Null zu den Zellen gegeben. Die offenen Symbole stellen Werte aus einer zweiten Messung dar.

Neben dem Gen NCgl0799 wurde bei einer BLAST-Suche mit *panF* auch das Gen *putP* identifiziert, dessen Produkt in *C. glutamicum* die kompatiblen Solute Prolin, Glycin, Betain und Ectoin transportiert. Es wurde angenommen, dass Pantothenat möglicherweise durch diesen Carrier co-transportiert wird, so dass eine Transportanalyse mit einer bereits vorhandenen Mutante (DHPF, 53) durchgeführt wurde, in der neben den Genen *proP*, *ectP*, *betP* und *lcoP* auch *putP* deletiert ist. Die Aufnahmemessungen erfolgten mit radioaktiv markiertem Pantothenat, wobei die Substratkonzentration 7 μ M betrug. Auch hier unterschieden sich die Aufnahmekinetiken kaum voneinander (Abb. 3.12). Die errechneten Aufnahmezeiten betragen beim Wildtyp 17 $\text{pmol (mg TG)}^{-1}\text{min}^{-1}$ und bei der Deletionsmutante 20 $\text{pmol (mg TG)}^{-1}\text{min}^{-1}$. Somit konnte hier gezeigt werden, dass auch PutP vermutlich nicht am Transport von Pantothenat beteiligt ist.

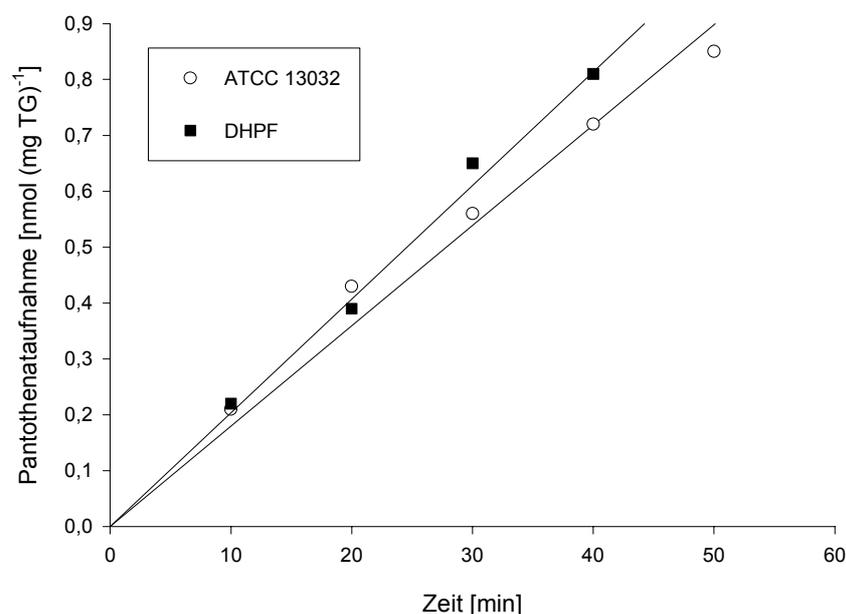


Abb. 3.12: Mit dem *C. glutamicum* Wildtyp ATCC 13032 und der Mutante DHPF, in dem unter anderem eine Deletion des *putP* Gens vorliegt, wurden Transportanalysen mit [¹⁴C]-markiertem Pantothenat durchgeführt. Das Pantothenat wurde mit einer Konzentration von 7 μM zum Zeitpunkt Null zu den Zellen gegeben.

Da die Deletion beider Gene, die Ähnlichkeit zum *E. coli panF* hatten, zu keiner Veränderung in der Pantothenataufnahme in *C. glutamicum* führte, war eine Identifizierung des Pantothenataufnahmesystems über die *panF*-Ähnlichkeit nicht möglich.

Um zusätzliche Daten über den Pantothenattransport zu erhalten, wurde die Aufnahme unter energetischem Aspekt untersucht. Dazu wurde der Effekt des Entkopplers CCCP auf die Pantothenataufnahme im *C. glutamicum* Wildtyp ATCC 13032 untersucht. Es wurden Aufnahmemessungen mit radioaktiv markiertem Pantothenat und 50 μM CCCP durchgeführt, wobei beim Kontrollversuch kein CCCP eingesetzt wurde. Die Substratkonzentration betrug 5 μM und über eine Zeitspanne von 60 min wurden alle 10 min Proben aus den Kulturen entnommen. Aus den fast identischen Aufnahmekinetiken (Abb. 3.13) wurden die Aufnahmeraten bestimmt, die bei beiden Versuchsansätzen $22 \text{ pmol (mg TG)}^{-1} \text{ min}^{-1}$ betragen. Dies deutet darauf hin, dass es sich beim Pantothenataufnahmesystem um einen primär aktiven ABC-Transporter handelt, der nicht vom Membranpotential abhängig ist. Das Transportprotein PanF aus *E. coli* ist im Gegensatz dazu ein sekundär aktiver

Carrier, der Pantothenat mit Na^+ -Ionen symportiert, was erklärt, weshalb über die *panF*-Ähnlichkeit kein entsprechendes Transportsystem identifiziert werden konnte.

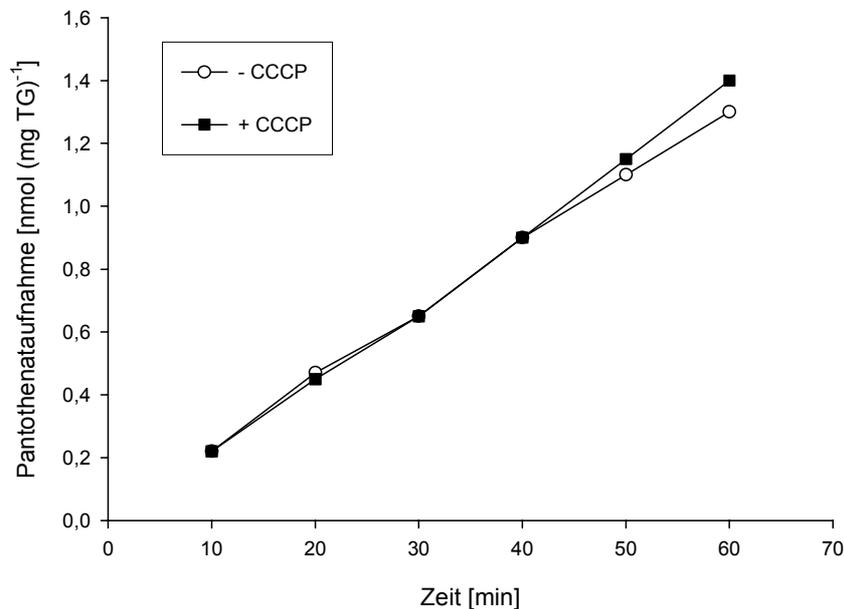


Abb. 3.13: Aufnahmemessung mit dem *C. glutamicum* Wildtyp ATCC 13032 und radioaktiv markiertem Pantothenat mit einer Konzentration von 5 μM . Die Messungen erfolgten in Gegenwart und Abwesenheit des Entkopplers CCCP (50 μM).

3 Die Pantothenatexkretion in *C. glutamicum*

Neben dem Import von β -Alanin und Pantothenat kann auch der Pantothenatexport die biotechnologische Produktion dieses Vitamins beeinflussen. Die Exkretion von Pantothenat könnte während eines Produktionsprozesses einen limitierenden Faktor darstellen, wenn die Syntheserate von Pantothenat höher ist als dessen Exportrate. Somit könnte durch eine Identifikation und Überexpression des Gens für das Pantothenatexportsystem ein limitierender Schritt in der Pantothenatproduktion aufgehoben werden.

3.1 Screening nach *C. glutamicum* Transposonmutanten mit einer veränderten Pantothenatexkretion

Untersucht wurden Mutanten des *C. glutamicum* Stammes ATCC 14752, der mit dem Transposon Tn5513 mutagenisiert worden war. Das Transposon, welches in die chromosomale DNA integriert, trägt das Gen *aph3* für die Kanamycinresistenz. Etwa 1500 Mutanten wurden qualitativ auf Veränderungen der Pantothenatexkretion untersucht. Das Screening erfolgte mit dem sogenannten Plattentest, bei dem die Mutanten auf CgC-Minimalmedium-Platten ausgestrichen wurden, in die der *C. glutamicum* Indikatorstamm R127*panC::pK18mob'panC'* mit eingegossen worden war. In diesem Indikatorstamm ist das Gen *panC*, das für das Enzym des letzten Reaktionsschrittes der Pantothenatbiosynthese kodiert, disruptiert, was eine Pantothenat-Auxotrophie zur Folge hat. Nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen bei 30°C sah man anhand des Wachstumsverhaltens des Indikatorstammes um die ausgestrichenen Mutanten herum, ob letztere durch die Integration des Transposons in ihrem Exkretionsverhalten verändert waren oder nicht. Zwei der so getesteten Transposonmutanten (Mutante 1G6 und 33.2G5) zeigten einen Pantothenatexkretions-negativen Phänotyp (Abb. 3.14a), während eine vermehrt Pantothenat ausschied (34F10, Abb. 3.14b).

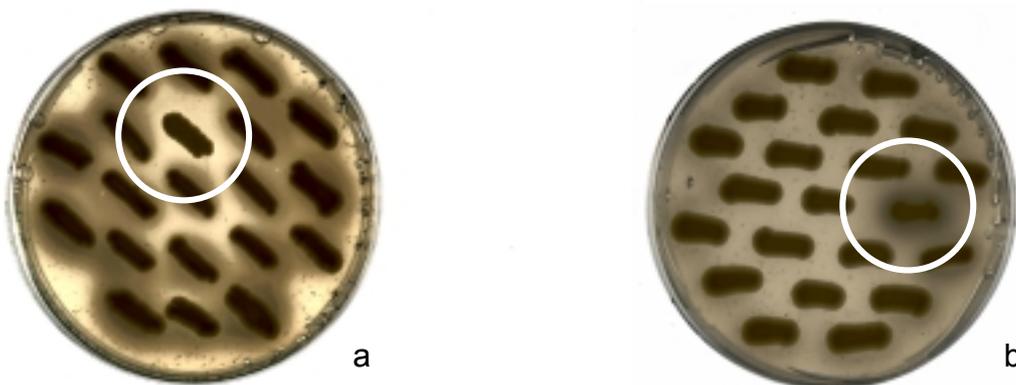


Abb. 3.14a/b: Plattentest für das Screening nach Transposonmutanten des *C. glutamicum* Stammes ATCC 14752 mit einem veränderten Pantothenatexkretionsverhalten. a: Markiert ist eine Mutante mit einem Pantothenatexkretions-negativen Phänotyp. b: Markiert ist eine Mutante, die vermutlich vermehrt Pantothenat ausscheidet.

3.2 Untersuchung der Transposonmutanten mit verändertem Verhalten in der Pantothenatexkretion

3.2.1 Charakterisierung der Transposonmutanten 1G6, 33.2G5 und 34F10

Durch Klonierung und Analyse der das Transposon flankierenden Sequenzen konnte in Klon 1G6 ein offenes Leseraster identifiziert werden, das 1337 Nukleotide lang ist und als uncharakterisiertes Membranprotein annotiert ist (NCgl1837). Für die Aminosäuresequenz des Gens konnten durch eine computergestützte Topologieanalyse (TMHMM, EMBL, Heidelberg) 10 Transmembransegmente vorhergesagt werden. Eine mit der Aminosäuresequenz durchgeführte BLAST-Suche ergab, dass Ähnlichkeit zu einem Transportprotein aus *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ATCC 33913 besteht (24% Identität, 46% Ähnlichkeit). Die gleichen Analysen ergaben, dass in der Mutante 33.2G5 das Transposon in ein 1302 Nukleotid langes Gen integriert war (NCgl2816), das ebenfalls für ein putatives integrales Membranprotein kodiert. Für das Genprodukt konnten hier 12 Transmembransegmente vorhergesagt werden. Eine BLAST-Suche mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz ergab Ähnlichkeit zu einem putativen Transportprotein aus *Streptomyces coelicolor* (34% Identität, 56% Ähnlichkeit) und zum Shikimat-Transportprotein aus *E. coli* (34% Identität, 54% Ähnlichkeit). Eine Analyse der Mutante 34F10, welcher deutlich mehr Pantothenat exkretierte, ergab, dass ein Gen durch das Transposon disruptiert war, welches für das Enzym 2-Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyldihydropteridinkinase (HPPK) kodiert. Dieses Enzym katalysiert in der Folatbiosynthese die Phosphorylierung von 2-Amino-4-Hydroxy-6-Hydroxymethyl-7,8-Dihydropteridin. Eine Erklärung dafür, warum ein Fehlen dieser Enzymaktivität zur einer erhöhten Pantothenatausscheidung führte, konnte nicht gefunden werden.

3.2.2 Deletion der Gene putativer Pantothenatexporter

Die in den Transposonmutanten inaktivierten Gene NCgl1837 und NCgl2816 führten im Screening dazu, dass der Pantothenat-auxotrophe *C. glutamicum* Stamm R127 *panC::pK18mob'panC'* im Plattentest nicht wuchs. Deshalb wurde angenommen, dass diese Gene an der Pantothenatexkretion beteiligt sein könnten. Daraufhin wurden die Gene mit den Deletionsplasmiden pK18mobsacB-ΔNCgl1837

und pK18*mobsacB*- Δ NCgl2816 im *C. glutamicum* Wildtyp ATCC 13032 deletiert, was mit Hilfe einer PCR nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Die Deletionsmutanten Δ NCgl1837 und Δ NCgl2816 wurden im mikrobiologischen Röhrentest quantitativ auf ihr Exkretionsverhalten von Pantothenat untersucht, wobei der *C. glutamicum* Wildtyp ATCC 13032 als Kontrollstamm diente. Die Zellen wurden in Anwesenheit von 10 mM β -Alanin kultiviert und aus diesen Kulturen wurden nach 24, 48, 64, 66,5, 69, 72 und 93 h Proben entnommen und die Pantothenatmengen in den sterilfiltrierten Überständen im mikrobiologischen Röhrentest quantifiziert. Das Experiment zeigte, dass der Wildtyp am Versuchsende nach einem Zeitraum von 93 h $1,3 \mu\text{g (mg TG)}^{-1}$ des Vitamins exkretiert hatte, wobei der Beginn der Pantothenatproduktion erst nach 64 h nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.15). Die Deletionsmutanten Δ NCgl1837 und Δ NCgl2816 hatten nach 93 h nur 21 bzw. 18 ng $(\text{mg TG})^{-1}$ Pantothenat ausgeschieden (Abb. 3.15). In vier weiteren Tests konnte die verminderte Abgabe von Pantothenat durch die Deletionsmutanten wiederholt gezeigt werden.

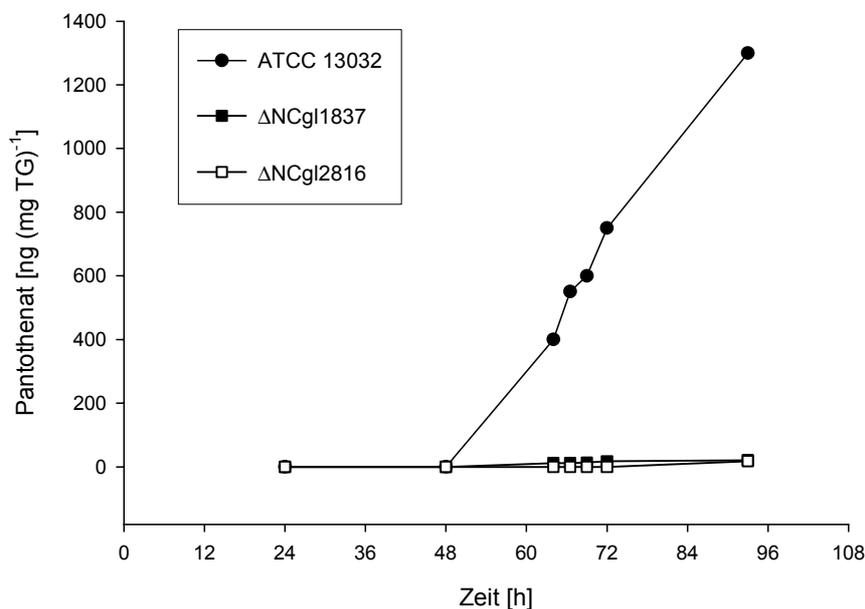


Abb. 3.15: Pantothenatexkretion durch den *C. glutamicum* Wildtyp ATCC 13032 und die Deletionsmutanten Δ NCgl1837 und Δ NCgl2816, denen jeweils das Gens eines putativen Pantothenatexporters fehlt. Kultiviert wurden die Zellen in Gegenwart von 10 mM β -Alanin, dem direkten Vorläufermolekül von Pantothenat.

3.2.3 Effekt der Überexpression des Gens NCgl2816 im *C. glutamicum* Wildtyp ATCC 13032

Da in dieser Arbeit eine starke Verminderung der Pantothenatexkretion infolge der Deletion des Gens NCgl2816 in *C. glutamicum* gezeigt werden konnte, scheint dieses Gen am Export des Vitamins beteiligt zu sein. Eine Überexpression des Gens sollte folglich zu einer Erhöhung des Pantothenateffluxes führen, was im Rahmen einer Pantothenatproduktion von Vorteil wäre. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde zunächst das Gen mit Hilfe einer PCR amplifiziert und in den Überexpressionsvektor pXMJ19 kloniert sowie sequenziert. Mit dem fehlerfreien Konstrukt pXMJ19NCgl2816 wurden Zellen des *C. glutamicum* Wildtypes ATCC 13032 durch Elektroporation transformiert und die Auswirkung der Überexpression auf die Pantothenatproduktion wurde mit dem mikrobiologischen Röhrchentest untersucht. Als Kontrollstamm diente ATCC 13032pXMJ19, der den Leervektor trägt. Die Stämme wurden in Anwesenheit von 10 mM β -Alanin kultiviert und für die Induktion der Genexpression wurde 1 mM IPTG eingesetzt. Aus diesen Kulturen wurden 64, 72, 96 und 123 h nach Versuchsbeginn Proben entnommen und die Pantothenatmengen in den sterilfiltrierten Überständen wurden im Röhrchentest quantifiziert. Dazu wurden die Überstände zu Kulturen des Pantothenat-auxotrophen Indikatorstammes R127panC::pK18mob'panC'pXMJ19 gegeben und deren optische Dichten nach 48 h gemessen. Demnach hatte der Stamm ATCC 13032pXMJ19NCgl2816 nach 123 h mit $415 \text{ ng (mg TG)}^{-1}$ fast vier mal so viel Pantothenat exkretiert als der Kontrollstamm mit etwa $110 \text{ ng (mg TG)}^{-1}$ (Abb. 3.16). Da in diesem Experiment Pantothenat nur in den nach 96 und 123 h entnommenen Proben nachgewiesen werden konnte, wurde in zwei weiteren Experimenten versucht, durch Variation der Zeitpunkte der Probenentnahme, den Exkretionsbeginn festzustellen. Doch auch hier konnte ein früheres Einsetzen der Pantothenatproduktion nicht beobachtet werden. Was allerdings wieder beobachtet werden konnte, war eine höhere Pantothenatabgabe durch den Expressionsstamm ATCC 13032pXMJ19NCgl2816. Dieser hatte in beiden Experimenten nach 75 h 155 bzw. $120 \text{ ng Pantothenat (mg TG)}^{-1}$ ins Medium abgegeben, während es beim Kontrollstamm 95 bzw. $60 \text{ ng Pantothenat (mg TG)}^{-1}$ waren (Daten nicht gezeigt). Obwohl die Werte aus den drei Versuchen voneinander abweichen, bekräftigen diese Ergebnisse die Annahme, dass das Gen NCgl2816 an der Pantothenatexkretion beteiligt ist.

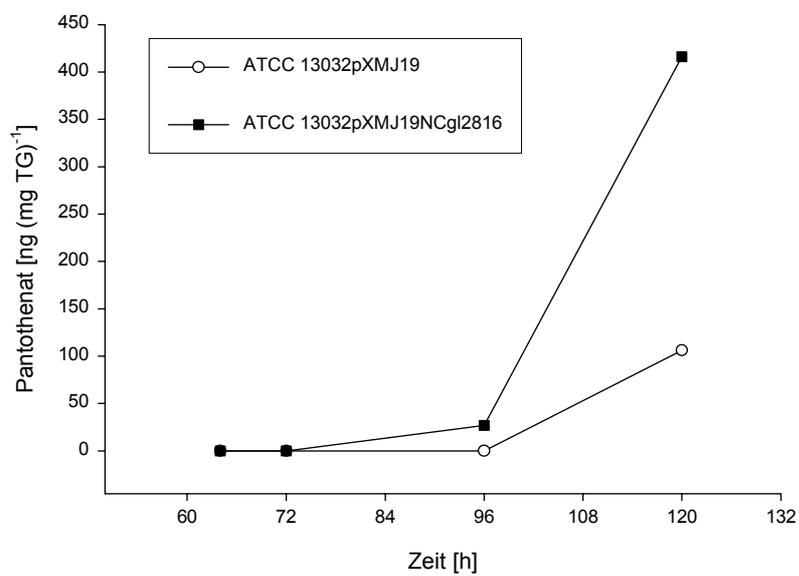


Abb. 3.16: Pantothenatexkretion durch den Stamm ATCC 13032pXMJ19NCgl2816, der das Gen eines putativen Pantothenatexporters exprimiert, und den Kontrollstamm ATCC 13032pXMJ19 mit dem Leervektor.

IV. Diskussion

1 Die β -Alaninaufnahme im *C. glutamicum* Wildtyp ATCC 13032

1.1 Die β -Alaninaufnahme in *C. glutamicum* wird durch ein sekundär aktives Transmembranprotein katalysiert

Verschiedene Stämme von *C. glutamicum* haben heutzutage in der industriellen Produktion von Aminosäuren große wirtschaftliche Bedeutung erlangt und mittlerweile steigt auch das Interesse, Vitamine mikrobiologisch herzustellen. Auch das Vitamin Pantothersäure (Vitamin B₅) hat als Futtermittelzusatz und therapeutisches Agens große ökonomische Bedeutung erlangt, wird aber größtenteils noch chemisch synthetisiert. Auf dem Weg zur Entwicklung eines *C. glutamicum*-Stammes für die biotechnologische Herstellung von Pantothenat konnten bereits drei der vier Gene des Pantothenatbiosynthesewegs (*panB*, *panC* und *panD*) kloniert (46, 10) und durch Überexpression der Gene *panB* und *panC* eine Erhöhung der Syntheserate des Vitamins in *C. glutamicum* erzielt werden (46). Dabei zeigte sich eine starke Abhängigkeit der Pantothenatbildung von externer Zugabe des Pantothenat-Vorläufers β -Alanin, was die intrazelluläre β -Alaninsynthese als limitierenden Schritt der Pantothenatproduktion verdeutlicht. Wäre β -Alanin in der Lage, durch die Membran zu diffundieren, könnte man bei der Produktion die Zellen mit großen Mengen des Substrats füttern und die unmittelbare Umsetzung von β -Alanin durch den Produktionsstamm würde die Aufnahme antreiben. Allerdings kann die Diffusion, genauso wie ein carriervermittelter Aufnahmemechanismus, in einem Produktionsprozess limitierend sein. Da ein β -Alaninaufnahmesystem bisher noch nicht bekannt ist, war es ein Ziel dieser Arbeit, den β -Alaninimporter von *C. glutamicum* zu identifizieren und durch Überexpression des Carriers die β -Alaninaufnahme und somit die Pantothenatproduktion zu erhöhen. Zunächst wurde der β -Alaninimport biochemisch charakterisiert, indem die kinetischen Parameter durch Aufnahmemessungen mit radioaktiv markiertem Substrat bestimmt wurden. Die Aufnahmeraten wurden bei β -Alaninkonzentrationen zwischen 0,1 und 50 mM bestimmt, wobei aus den Reaktionsgeschwindigkeiten annäherungsweise eine rechteckige Hyperbel resultierte, wie sie für die meisten Enzyme gilt und durch die Michaelis-Menten-Gleichung beschrieben werden kann. Dadurch konnte gezeigt

werden, dass der β -Alaninimport durch einen Transporter vermittelt wird, dessen kinetische Parameter durch eine doppeltreziproke Darstellung der Werte (Lineweaver-Burk-Diagramm) genau bestimmt werden konnten. Demnach handelt es sich bei der β -Alaninaufnahme um einen Transporter mit einem K_m -Wert von 5 mM und einer maximalen Aufnahmegeschwindigkeit V_{max} von $1,66 \text{ nmol (mg TG)}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Im Vergleich dazu haben sekundär aktive Carrier für Aminosäuren in *E. coli* gewöhnlich K_m -Werte zwischen 1 μM und 1 mM, wobei die V_{max} -Werte zwischen 0,1 und etwa $50 \text{ nmol (mg TG)}^{-1} \text{ min}^{-1}$ variieren (30). Bei β -Alaninaufnahmemessungen in Gegenwart des Entkopplers CCCP und des Atmungsgiftes KCN kam es zu einer drastischen Inhibition der Aufnahmerate. Die Bestimmung des intrazellulären ATP-Pools während des Experiments mit CCCP zeigte, dass innerhalb der Versuchsdauer die ATP-Konzentration von 2,1 auf 1,1 mM zurückging. Es war also noch genügend ATP in der Zelle vorhanden, das von der Substratphosphorylierung in der Glykolyse stammte. Der Rückgang der β -Alaninaufnahme ist demnach auf den Zusammenbruch des Membranpotentials und nicht auf eine ATP-Verarmung zurückzuführen. Dies zeigt, dass es sich beim β -Alaninimporter um ein Transportprotein handelt, das sekundär aktiv und abhängig vom Membranpotential ist. Passive Diffusion kann hier als Mechanismus der β -Alaninaufnahme in *C. glutamicum* ausgeschlossen werden.

1.2 Effekte der Inaktivierung von Genen putativer β -Alaninimporter auf den Transport von β -Alanin und GABA in *C. glutamicum*

Das β -Alaninaufnahmesystem in *C. glutamicum*, dessen Existenz in dieser Arbeit durch kinetische und energetische Analysen nachgewiesen und biochemisch charakterisiert werden konnte, könnte bei einer β -Alaninfütterung im Rahmen einer Pantothenatproduktion V_{max} erreichen und sich limitierend auf die Produktion auswirken. Für eine Überexpression des β -Alaninimporters zur Ausschaltung dieses möglichen limitierenden Faktors sollte in dieser Arbeit das Gen für den β -Alanintransporter identifiziert werden. Eine BLAST-Studie ergab, dass die Gene NCgl0453 und NCgl1108 sowohl zum β -Alanin Carrier *CycA* aus *E. coli* (51) als auch zum GabP Protein, das in *B. subtilis* β -Alanin und GABA transportiert (4), ähnlich sind. Eine Inaktivierung des Gens NCgl0453 im *C. glutamicum* Wildtyp ATCC 13032

hatte keinen Einfluss auf die β -Alaninaufnahmerate und auch die Deletion des Gens NCgl1108, das als möglicher GABA Carrier annotiert ist, zeigte keinen Effekt in Bezug auf die Aufnahme von β -Alanin und GABA. Demnach kodieren diese Gene vermutlich nicht für einen Transporter für eines der hier untersuchten Substrate. Eine β -Alaninaufnahmemessung wurde auch mit der Insertionsmutante ATCC 13032 *ykfD::pK18mob'ykfD'* durchgeführt. Das in dieser Mutante inaktive Gen *ykfD* ist als GABA-Permease annotiert, wobei GABA eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu β -Alanin besitzt und deshalb als Substrat für YkfD angenommen wurde. Doch auch hier gab es keinen Unterschied zu der Aufnahmerate im Wildtyp.

Eine Identifizierung des β -Alanin Transportsystems durch Ähnlichkeitsstudien ist hier nicht gelungen. Die Annahme, dass möglicherweise mehr als ein Carrier für β -Alanin existieren, so dass das Ausschalten eines einzelnen putativen Transporters unentdeckt bleiben würde, ist durch die biochemische Charakterisierung der β -Alaninaufnahme unwahrscheinlich. Das Vorhandensein mehrerer Transportsysteme hätte im Lineweaver-Burk-Diagramm erkannt werden müssen.

1.3 Die heterologe Expression des *cycA* Gens für den β -Alaninimporter in *E. coli* führt in *C. glutamicum* zu einer 16-fachen Steigerung der β -Alaninaufnahmerate

Da es nicht gelungen ist, über eine Ähnlichkeitsstudie das Gen für das β -Alaninaufnahmesystem in *C. glutamicum* zu identifizieren, wurde eine heterologe Expression des Gens für den β -Alanin Carrier *CycA* aus *E. coli* zur Erhöhung der β -Alaninaufnahmerate durchgeführt. Die *cycA*-Expression im Stamm ATCC 13032pXMJ19*cycA* konnte in einem RNA-Hybridisierungsexperiment durch Nachweis der *cycA*-mRNA gezeigt werden. Danach wurde untersucht, ob infolge der *cycA*-Expression ein funktionsfähiges Protein entsteht, was zu einer Erhöhung der β -Alaninaufnahme in *C. glutamicum* führt. Das Experiment zeigte, dass nach 13-stündiger IPTG-Induktion der *cycA*-Expression eine etwa 5-fache Steigerung der β -Alaninaufnahmerate erzielt werden konnte. Nach 17-stündiger Induktion lag eine 13-fache und nach 24-stündiger Induktion sogar eine 16-fache Erhöhung der Aufnahmerate vor. Warum der Effekt einer *cycA*-Expression so verzögert in Erscheinung tritt, lässt sich nicht erklären. Bei der Entwicklung eines *C. glutamicum* Produktionsstammes für Pantothenat braucht demnach nicht unbedingt das zelleigene

Gen für den β -Alaninimporter exprimiert zu werden. Auf diese Weise kann die Sättigung des β -Alaninimports, die bei der β -Alaninfütterung während eines Produktionsprozesses auftreten kann, vermieden werden. Eine erhöhte Pantothenatexkretion durch den *cycA*-exprimierenden Stamm konnte hier allerdings nicht gezeigt werden.

2 Die Pantothenataufnahme im *C. glutamicum* Wildtyp ATCC 13032

2.1 Biochemische Charakterisierung der Pantothenataufnahme in *C. glutamicum*

Im Rahmen einer Pantothenatproduktion mit *C. glutamicum* spielt der zelleinwärts gerichtete Rücktransport von Pantothenat insofern eine Rolle, als dass er die Nettoausbeute senken kann. Mit einer biochemischen Charakterisierung der Pantothenataufnahme wurde hier untersucht, ob sich die vorherrschenden Aufnahmeraten negativ auf die Produktausbeute auswirken können. Da *C. glutamicum* in der Lage ist, Pantothenat selbst zu synthetisieren, ist ein Aufnahmesystem für Pantothenat eigentlich entbehrlich. Das trifft auch auf *E. coli* zu, jedoch konnte hier ein Importer (PanF) charakterisiert werden (55). Durch Aufnahmemessungen mit radioaktiv markiertem Pantothenat konnte der Pantothenatimporter in *C. glutamicum* biochemisch charakterisiert werden. Es stellte sich heraus, dass es sich um ein hoch-affines Transportsystem mit einem K_m -Wert von $0,9 \mu\text{M}$ und einer sehr niedrigen maximalen Aufnahmegeschwindigkeit V_{\max} von $26 \text{ pmol (mg TG)}^{-1}\text{min}^{-1}$ handelt. Das erscheint extrem wenig, aber berücksichtigt man die natürlich vorkommenden Konzentrationen von Pantothenat im Boden (zwischen 4 und $80 \mu\text{M}$ in verschiedenen Pflanzenteilen), so ermöglicht dieses Aufnahmesystem dem Organismus dennoch eine effiziente Nutzung des Vitamins. Eine optimale Aufnahme von Pantothenat in physiologischen Konzentrationen ist gewährleistet. *E. coli* besitzt ebenfalls ein hoch-affines Transportsystem für Pantothenat (PanF) mit einem K_m -Wert von $0,4 \mu\text{M}$ und einer maximalen Aufnahmegeschwindigkeit V_{\max} von $1,6 \text{ pmol (mg TG)}^{-1}\text{min}^{-1}$ (55). Aus der biochemischen Charakterisierung des Pantothenatimporters in *C. glutamicum* lässt sich schlussfolgern, dass die Rückaufnahme des Vitamins durch die Zellen während einer Pantothenatproduktion unberücksichtigt bleiben kann.

2.2 Die Pantothenataufnahme wird durch ein primär aktives Aufnahmesystem katalysiert

Durch Transportanalysen konnte gezeigt werden, dass der Entkoppler CCCP keinen Effekt auf die Pantothenataufnahme hat. Es scheint sich bei dem Aufnahmesystem um einen primär aktiven ABC-Transporter zu handeln, der nicht vom Membranpotential abhängig ist. Unterstützt wird diese Aussage auch durch den extrem niedrigen K_m -Wert des Transporters (siehe oben), einem Merkmal, das häufig bei primär aktiven Transportsystemen beobachtet wird. Im Gegensatz dazu handelt es sich beim Pantothenatimporter PanF aus *E. coli* um einen sekundär aktiven Carrier, der den Symport von Pantothenat und Na^+ -Ionen katalysiert. Das scheint auch der Grund gewesen zu sein, warum über die Ähnlichkeit zu *panF* kein Pantothenattransporter in *C. glutamicum* identifiziert werden konnte. Eine weitere Computerrecherche ist nicht möglich, da ein ABC-Transporter für Pantothenat in Bakterien oder Säugern nicht bekannt ist. Eine andere Möglichkeit zur Identifizierung des Pantothenatimporters besteht darin, zunächst den Pantothenat auxotrophen Stamm R127*panC::pK18mob'panC*, bei dem das Gen für den terminalen Biosyntheseschritt inaktiv ist, einer Transposonmutagenese zu unterziehen. Es können dann Mutanten auf ihre Unfähigkeit hin, Pantothenat aufzunehmen, isoliert werden. Auf diese Vorgehensweise wurde jedoch wegen der geringen Bedeutung des Pantothenatimports auf die Pantothenatproduktion verzichtet.

3 Die Pantothenatexkretion in *C. glutamicum*

Im allgemeinen ist in einem Produktionsstamm der jeweilige Biosyntheseweg so verändert, dass hohe intrazelluläre Produktkonzentrationen vorherrschen. Das kann durch eine Erhöhung der Aktivität von Enzymen der Biosynthese, durch Veränderung von Regulationsmechanismen der Enzyme und durch das Blockieren von Stoffwechselwegen, die zu Nebenprodukten oder zum Abbau des Produktes im Cytosol führen, erreicht werden (31). Doch es spielt nicht nur der Stoffwechsel und dessen Manipulation eine Rolle, sondern es muss auch der Export des Produktes als letzter Schritt der Stoffwechselvorgänge berücksichtigt und der Produktion angepasst werden. Herrschen hohe intrazelluläre Substratkonzentrationen vor, so kann durch eine Überexpression des Exporters eine effiziente Produktion erreicht werden.

Im Hinblick auf eine fermentative Pantothenatproduktion sollte in dieser Arbeit der

Pantothenatexporter in *C. glutamicum* identifiziert werden. Man nimmt an, dass die physiologische Bedeutung des Pantothenatexports in *E. coli* in der Kontrolle der intrazellulären Coenzym A Konzentration liegt (22), wobei Pantothenat, das nicht phosphoryliert wird, aus der Zelle transportiert wird. Die Erhaltung eines niedrigen Substratspiegels könnte also für die Kontrolle der Phosphorylierung von Pantothenat von Bedeutung sein, so dass eine Rolle der Pantothenatexkretion in der Regulation der Coenzym A Synthese und somit die Existenz eines Exkretionssystems auch in *C. glutamicum* angenommen werden kann.

Für die Identifikation einer Mutante mit einem Defekt in der Pantothenatexkretion wurde eine Screeningmethode angewandt, bei dem ein Pantothenat-auxotropher Stamm als Indikator für exkretionsdefekte Mutanten fungierte. Auf diese Weise wurden zwei Transposonmutanten identifiziert, die nicht mehr in der Lage zu sein schienen, Pantothenat zu exkretieren.

3.1 Die Deletion der Gene putativer Pantothenatexporter führt zu stark verminderter Pantothenatexkretion

Im Screening konnten zwei Transposonmutanten mit einem Pantothenatexkretionsnegativen Phänotyp identifiziert werden. Das Klonieren und die Analyse der Sequenzen, in die das Transposon integriert war, ergab, dass Gene getroffen waren, für deren abgeleitete Aminosäuresequenzen 10 bzw. 12 Transmembranhelices vorhergesagt werden konnten. Beide Gene, NCgl1837 und NCgl2816, wurden einzeln im *C. glutamicum* Wildtyp ATCC 13032 deletiert und es zeigte sich, dass die Deletionsstämme im Gegensatz zum Wildtyp eine stark verminderte Pantothenatexkretion aufwiesen. Anscheinend sind diese offenen Leseraster am Transport des Vitamins beteiligt, wobei unklar ist, wie beide Deletionen den gleichen Effekt haben können. Sind beide Gene am Export beteiligt, so dürfte das Ausschalten eines Gens keinen exkretionsnegativen Phänotyp hervorrufen. Zu erklären wäre dieses Ergebnis möglicherweise durch die Tatsache, dass fast alle sekundär aktiven Carrier aus 10 bis 14 Transmembransegmenten bestehen und diese durch ein oder zwei Gene kodiert werden. Existieren zwei Gene für einen Transporter, so kann entweder ein homooligomeres oder heterooligomeres System die aktive Form darstellen (26). Die Resultate in dieser Arbeit könnten somit dadurch erklärt werden, dass das Exportprotein durch zwei Gene kodiert wird.

Jedoch wird diese Annahme durch die Tatsache entkräftet, dass die Gene NCgl1837 und NCgl2816 weit voneinander im Genom lokalisiert sind. Außerdem wäre ein heterologes System mit 22 Transmembranhelices äußerst ungewöhnlich, zumal ein solches System bisher noch in keinem Organismus bekannt ist.

3.2 Die Überexpression des Gens für den putativen Pantothenatexporter NCgl2816 führt zu einer starken Zunahme der Pantothenatexkretion

Die Überexpression des Gens NCgl2816 im *C. glutamicum* Wildtyp ATCC 13032 führte im Vergleich zum Kontrollstamm zu einem starken Anstieg der Pantothenatexkretion. Dieses Ergebnis bekräftigt die Annahme, dass das Gen an der Exkretion beteiligt ist und zeigt die Möglichkeit, durch Überexpression des Exporters eine höhere Ausbeute des Produktes in einem Produktionsprozess zu erzielen. Der Grund dafür, warum Pantothenat erst in den Überständen stationärer Kulturen nachgewiesen werden konnte, liegt wahrscheinlich daran, dass in stationären Zellen der Kohlenstofffluss abwärts von Glukose-6-Phosphat nicht in Richtung Pentose-Phosphat-Weg, sondern vermehrt zum Pyruvat fließt, so dass mehr Ketoisovalerat als Ausgangsstoff für Pantothenat gebildet werden kann (Abb. 4.1).

3.3 Der Weg zu einem Produktionsstamm für Pantothenat

Während bislang Produktionsstämme durch Mutation und Selektion gewonnen wurden, ermöglichen heutzutage gentechnische Methoden die gezielte Manipulation des Stoffwechsels und der an der Produktion beteiligten Transmembranflüsse. Bei der mikrobiellen Herstellung von Pantothenat muss die Pantothenatexkretion als ein wichtiger, terminaler Schritt der Fermentation berücksichtigt werden, da sie einen limitierenden Faktor darstellen kann und somit Stoffwechselmanipulationen uneffektiv bleiben können. Eine Überexpression des Pantothenatexporters in einem Produktionsstamm mit hoher interner Substratakkumulation stellt somit eine Möglichkeit dar, eine Steigerung in der Produktion zu erzielen. Darüber hinaus sollten zur Beseitigung von Engpässen in einem Produktionsstamm die Biosynthesegene überexprimiert werden, da die spezifischen Aktivitäten drei der Enzyme (PanD, PanB und PanC, Abb. 4.1) des Syntheseweges mit etwa $1 \text{ nmol (mg Protein)}^{-1} \text{ min}^{-1}$ extrem niedrig sind. Im Vergleich dazu haben Enzyme der Aminosäuresynthese eine um

zwei Größenordnungen höhere spezifische Aktivität und bei Enzymen des Zentralstoffwechsels sind es sogar drei Größenordnungen (46). Die niedrigen Enzymaktivitäten im Pantothenatbiosyntheseweg können zurückzuführen sein auf niedrige Enzymmengen, die wiederum auf geringen Transkriptionsraten der entsprechenden Gene beruhen können. Darüber hinaus unterliegt PanB einer feedback Hemmung durch Pantoat (38), so dass durch Mutation im allosterischen Zentrum die Inhibierbarkeit des Enzyms erniedrigt oder ganz ausgeschaltet werden kann. Desweiteren ist eine Manipulation der Gene des L-Isoleucin Biosyntheseweges unumgänglich. Die Deletion von *ilvA*, das für das Schlüsselenzym der Isoleucinsynthese kodiert (Abb. 4.1), führt zu einer Pantothenatakkumulation, da auf diese Weise die IlvBN-Aktivität ausschließlich für die Ketoisovaleratsynthese zur Verfügung steht und nicht mehr durch L-Isoleucin inhibiert werden kann (11). Mit einer Überexpression von *ilvBNCD* steht Ketoisovalerat in größeren Mengen zur Verfügung, wobei eine höhere Akkumulation des Vitamins nur erreicht werden kann, wenn gleichzeitig die Gene *panBC* exprimiert werden (46). Alle hier aufgeführten Manipulationen haben jedoch nur dann einen Effekt, wenn die Verfügbarkeit von β -Alanin gewährleistet ist, da gezeigt werden konnte, dass die intrazelluläre β -Alaninsynthese einen limitierenden Schritt der Pantothenatproduktion darstellt (46). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die heterologe Expression des *cycA* Gens zu einer vielfachen Steigerung der β -Alaninaufnahmerate führt, so dass möglicherweise dieser limitierende Faktor umgangen werden kann.

In einer anderen Arbeit konnte ebenfalls der Bedarf der Pantothenatbiosynthese an Methylentetrahydrofolat (CH_2 -THF) gezeigt werden (5). CH_2 -THF entsteht durch die Übertragung der Methylgruppe von L-Serin auf Tetrahydrofolat (THF) durch die Serinhydroxymethyltransferase, wobei Glycin und CH_2 -THF entstehen (Abb. 4.1). Bei Zellen, die sich in der stationären Phase befinden, konnte eine Korrelation der Glycinakkumulation mit der Pantothenatproduktionsrate beobachtet werden (5). Die Bereitstellung von Serin und somit von Methylentetrahydrofolat kann also limitierend für die Pantothenatbiosynthese sein. Durch Überexpression des Enzyms Threonin Dehydratase, das Pyruvat in Serin umwandelt, könnte dieser mögliche limitierende Schritt beseitigt werden (Abb. 4.1). Möglichkeiten einer erhöhten Bereitstellung von Pyruvat für diese Reaktion ist weiter unten im Text beschrieben.

Durch eine Analyse der Kohlenstoffflüsse während einer Pantothenatproduktion mit dem *C. glutamicum* Stamm ATCC 13032 Δ *ilvA* pECM3*ilvBNCD*pEKEx2*panBC*, in

dem das *ilvA* Gen deletiert ist und die Gene *ilvBNCD* und *panBC* überexprimiert sind, konnte gezeigt werden, dass mehr als 85 % des Flusses abwärts vom Pyruvat in Richtung Ketoisovalerat geleitet werden, aber an dieser Stelle 90 % des Flusses zum Valin fließen (5). Diese Verzweigungsstelle (Abb. 4.1) sollte bei Überlegungen zur Konstruktion eines effektiven Produktionsstammes unbedingt berücksichtigt werden. Beispielsweise könnte durch Punktmutationen im Promotor des ersten Enzyms dieses konkurrierenden Weges eine Erniedrigung der Transkriptionsrate erreicht werden, so dass der Kohlenstofffluss vermehrt in Richtung Pantothenat fließt. Ein verstärkter Fluss in Richtung Pantothenat könnte auch dann eintreten, wenn mit Kulturen produziert wird, die sich in der stationären Phase befinden, so dass der Bedarf an Kohlenstoff-Metaboliten für die anabolen Wege sinkt. Gleichzeitig sinkt der NADPH-Bedarf der Zelle, so dass der Kohlenstofffluss ab Glukose-6-Phosphat vermehrt zum Pyruvat fließt und nicht in Richtung Pentose-Phosphat-Weg (Abb. 4.1) abgeleitet wird, der die Hauptquelle für NADPH in *C. glutamicum* darstellt und in den etwa 94 % des Kohlenstoffs fließen. Eine erhöhte Bereitstellung der Vorstufe Pyruvat könnte auch durch Überexpression der Gene anaplerotischer Reaktionen erreicht werden, wobei die Oxalacetatdecarboxylase und das Malatenzym in Betracht kämen (Abb. 4.1). Darüber hinaus könnte die Überexpression des Gens für die Pyruvatcarboxylase zu einer erhöhten Bereitstellung von Oxalacetat und somit zu L-Aspartat führen, der Vorstufe von β -Alanin (Abb. 4.1). Wie man sieht, gibt es viele Wege, mögliche Engpässe sowohl im Pantothenatbiosyntheseweg und im Zentralstoffwechsel als auch in den Transmembranflüssen durch Manipulation zu beseitigen.

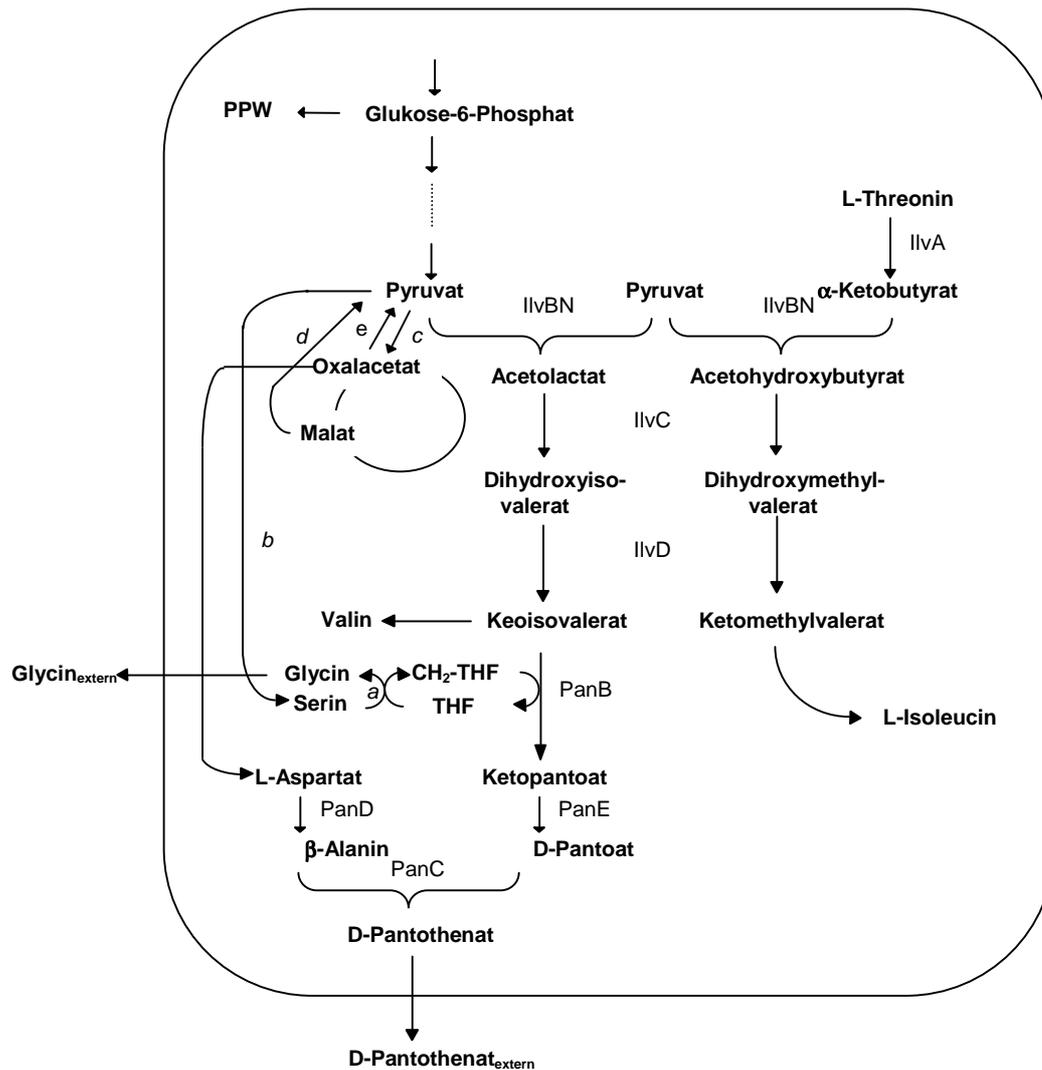


Abb. 4.1: Der Pantothematbiosyntheseweg und weitere Reaktionen, die bei einer Stammkonstruktion für die Pantothematproduktion berücksichtigt werden könnten.

a: Serin Hydroxymethyltransferase, *b:* Threonin Dehydratase, *c:* Pyruvat Carboxylase, *d:* Malatenzym, *e:* Oxalacetat Decarboxylase, IlvA: Threonin Dehydratase, IlvBN: Acetohydroxysäure Synthase, IlvC: Isomero Reduktase, IlvD: Dihydroxysäure Dehydratase, PanB: Ketopantoat Hydroxymethyltransferase, PanE: Ketopantoat Reduktase, PanD: L-Aspartat- α -Decarboxylase, PanC: Pantothemat Synthetase, PPW: Pentosephosphat-Weg.

Literatur

- (1): **Abe S., Takayama K., Kinoshita S.**; Taxonomical studies on glutamic acid producing bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 1967; 13: 279-301.
- (2): **Barksdale L.**; *Corynebacterium diphtheriae* and its relatives. *Bacteriol Rev.* 1970; 4: 378-422.
- (3): **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., Rose D. J., Mau B., Shao Y.**; The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science.* 1997; 277: 1453-1474.
- (4): **Brechtel C. E., King S. C.**; 4-Aminobutyrate (GABA) from the amine-polyamine-choline superfamily: substrate specificity and ligand recognition profile of the 4-aminobutyrate permease from *Bacillus subtilis*. *Biochem. J.* 1998; 333: 565-571.
- (5): **Chassagnole C, Letisse F, Diano A, Lindley ND.** Carbon flux analysis in a pantothenate overproducing *Corynebacterium glutamicum* strain. *Mol Biol Rep.* 2002; 29: 129-34.
- (6): **Cronan J. E. Jr.**; β -Alanine synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1980; 141: 1291-1297.
- (7): **Cronan J. E. Jr., Littel K. J., Jackowski S.**; Genetic and biochemical analysis of pantothenate biosynthesis in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 1982; 149: 916-922.
- (8): **Deckwer W.-D., Pühler A., Schmid R. D.**; Lexikon Biotechnologie und Gentechnik. RÖMPP. 1999, 2. überarbeitete Auflage.
- (9): **Dunn S. D., Snell E. E.**; *J Supramol. Struct.* 1977; 6: 136.

-
- (10): **Dusch N., Pühler., Kalinowski J.;** Expression of the *Corynebacterium glutamicum panD* gene encoding L-aspartate- α -decarboxylase leads to pantothenate overproduction in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999; 65: 1530-1539.
- (11): **Eggeling I., Cordes C., Eggeling L., Sahm H.;** Regulation of acetohydroxy acid synthase in *Corynebacterium glutamicum* during fermentation of α -ketobutyrate to L-isoleucine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1987; 25: 346-351.
- (12): **Eikmanns B. J., Eggeling L., Sahm H.;** Molecular aspects of lysine, threonine, and isoleucine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1993-94; 64 (2): 145-163.
- (13): **Eikmanns B. J., Thum-Schmitz N., Eggeling L., Lüdtke K.-U., Sahm H.;** Nucleotide sequence, expression and transcriptional analysis of the *Corynebacterium glutamicum gltA* gene encoding citrate synthase. *Microbiology.* 1994; 140: 1817-1828.
- (14): **Glusman M.;** The syndrome of "burning feet" (nutritional melalgia) as a manifestation of nutritional deficiency. *Am. J. Mec.* 1947; 11: 95.
- (15): **Gojkovic Z., Sandrini M. P., Piskur J.;** Eukaryotic beta-alanine synthases are functionally related but have a high degree of structural diversity. *Genetics.* 2001;158: 999-1011.
- (16): **Grant S. G., Jessee J., Bloom F. R., Hanahan D.;** Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990; 87: 4645-4649.
- (17): **Halvorson O., Skrede S.;** Regulation of the biosynthesis of CoA at the level of pantothenate kinase. *Eur. J. Biochem.* 1982; 124: 211-215.
- (18): **Hikichi Y., Moriya T., Miki H., Yamaguchi T., Nogami I.;** Production of D-pantoic acid and D-pantothenic acid. United states patent number 5,518,906. 1996.

- (19): **Inoue H., Nojima H., Okayama H.**; High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. 1990; 96:23-28.
- (20): **Jackowski S.**; Biosynthesis of pantothenic acid and coenzyme A. 1996. Aus: Neidhardt F. C., Curtiss III R., Ingraham J. L., Lin E. C. C., Low K. B., Magasanik B., Reznikoff W. S., Riley M., Schaechter M., Umberger H. E.; *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology. ASM Press 2nd edition, S. 687-690.
- (21): **Jackowski S., Alix J.-H.**; Cloning, sequence, and expression of the pantothenate permease (*panF*) gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1990; 172: 3842-3848.
- (22): **Jackowski S., Rock C. O.**; Regulation of coenzyme A biosynthesis. *J. Bacteriol.* 1981; 148: 926-032.
- (23): **Jakoby M., Ngouoto-Nkili C. E., Burkovski A.**; Construction and application of new *Corynebacterium glutamicum* vectors. *Biotechnol. Tech.* 1999; 13: 437-441.
- (24): **Jensen K. F.**; 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.* 1993; 175: 3401-3407.
- (25): **Keilhauer C., Eggeling L., Sahm H.**; Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon. *J. Bacteriol.* 1993; 175: 5595-5603.
- (26): **Kennerknecht N, Sahm H, Yen MR, Patek M, Saier Jr MH Jr, Eggeling L.** Export of L-isoleucine from *Corynebacterium glutamicum*: a two-gene-encoded member of a new translocator family. *J Bacteriol.* 2002; 184: 3947-56.
- (27): **Kinoshita S.**; Glutamic acid bacteria. 115-142 in: Demain A. L., Solomon N. A.; *Biology of industrial microorganisms*. The Benjamin/ Cummings Publishing Company, London, U. K. 1985.

- (28): **Kinoshita S., Udaka S., Shimono M.**; Studies on the amino acid fermentation. J. Gen. Appl. Microbiol. 1957; 3: 193-205.
- (29): **Komagata K., Yamada K., Ogawa H.**; Taxonomic studies on coryneform bacteria. Division of bacterial cells. J. Gen. Appl. Microbiol. 1969; 15: 243-259.
- (30): **Krämer R.**; Systems and mechanisms of amino acid uptake and excretion in prokaryotes. Arch Microbiol. 1994; 162: 1-13.
- (31): **Krämer R.**; Secretion of amino acids by bacteria: Physiology and mechanism. FEMS Microbiol. Rev. 1993; 13: 75-94.
- (32): **Liebl W., Bayerl A., Schein B., Stillner U., Schleifer KH.**; High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells. FEMS Microbiol Lett. 1989; 53:299-303.
- (33): **Liebl W., Ehrmann M., Ludwig W., Schleifer K. H.**; Transfer of "*Brevibacterium divaricatum*" DSM 20297T, "*Brevibacterium flavum*" DSM 20411, "*Brevibacterium lactofermentum*" DSM 20412 and DSM 1412, and *Corynebacterium lilium* DSM 20137T to *Corynebacterium glutamicum* and their distinction by rRNA gene restriction patterns. Internat. J. Syst. Bacteriol. 1991; 41: 255-260.
- (34): **Lundin A., Rickardson A., Thore A.**; Continuous monitoring of ATP-converting reactions by purified firefly luciferase. Anal. Biochem. 1976. 75: 611-620.
- (35): **Miller S. L., Schlesinger G.**; Prebiotic synthesis of vitamin coenzymes: II. Pantoic acid, pantothenic acid, and the composition of coenzyme A. J. Mol. Evol. 1993; 36: 308-314.
- (36): **Miyatake K., Nakano Y., Kitaoka S.**; Enzymological properties of pantothenate synthetase from *Escherichia coli* B. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 1978; 24: 243-253.
- (37): **Patel B. N., West T. P.**; Degredation of the pyrimidine bases uracil and thymine by *Escherichia coli* B. Microbios. 1987; 49: 107-113.

- (38): **Powers S., Snell E. E.**; Ketopantoate hydroxymethyltransferase. II. Physical, catalytic, and regulatory properties. *J Biol Chem.* 1976; 251: 3786-3793.
- (39): **Prasad P. D., Wang H., Kekuda R., Fujita T., Fei Y.-J., Devoe L. D., Leibach F. H., Ganapathy V.**; Cloning and functional expression of a cDNA encoding a mammalian sodium-dependent vitamin transporter mediating the uptake of pantothenate, biotin, and lipoat. *J. biol. Chem.* 1998; 273: 7501-7506.
- (40): **Priefer U.B., Simon R., Puhler A.**; Extension of the host range of *Escherichia coli* vectors by incorporation of RSF1010 replication and mobilization functions. *J Bacteriol.* 1985; 163: 324-30.
- (41): **Primerano D. A., Burns R. O.**; Role of acetohydroxy acid isomeroreductase in biosynthesis of pantothenic acid in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 1983; 153: 259-269.
- (42): **Puech V., Chami M., Lemassu A., Lanéelle M.-A., Schiffler B., Gounon P., Bayan N., Benz R., Daffé M.**; Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non-covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane. *Microbiology.* 2001; 147: 1365-82.
- (43): **Robbins J. C., Oxender D. L.**; Transport systems for alanine, serine, and glycine in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 1973; 116: 12-18.
- (44): **Rusnak F., Sakaitani M., Drueckhammer D., Reichert J., Walsh C. T.**; Biosynthesis of the *Escherichia coli* siderophore enterobactin: sequence of the *entF* gene, expression and purification of *entF*, and analysis of covalent phosphopantetheine. *Biochemistry.* 1991; 30: 2916-2927.
- (45): **Saliba K. J., Kirk K.**; H⁺-coupled pantothenate transport in the intracellular malaria parasite. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 18115-18121.
- (46): **Sahm H., Eggeling L.**; D-Pantothenate synthesis in *Corynebacterium*

glutamicum and use of *panBC* and genes encoding L-valine synthesis for D-pantothenate overproduction. Appl. Environ. Microbiol. 1999; 65: 1973-1979.

(47): **Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.**; Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. 1989.

(48): **Sanger F., Nicklen C. & Coulson A. R.**; DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977; 74: 5463-5467.

(49): **Schäfer A., Tauch A., Jäger W., Kalinowski J., Thierbach G., Pühler A.**; Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. Gene. 1994; 145: 69-73.

(50): **Schimz K. L., Rütten B., Tretter M.**; Determination of adenosine nucleotides with luciferin/luciferase from crude firefly lantern extract on bioluminescence analyser. Adv. Biotechnol. 1981; 1: 457-462.

(51): **Schneider F.**; β -Alaninaufnahme und Pantothenensäure-Exkretion durch *Escherichia coli*. Dissertation Universität zu Köln. 2003.

(52): **Shimizu S., Yamady H.**; Pantothenic acid (vitamin B₅), coenzyme A and related compounds. In: Vandamme E. J.. Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors. Elsevier science publisher LTD, GB. 1989.

(53): **Steger R.**; Vergleichende Studien zur Aktivitätsregulation osmosensitiver Transporter aus *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation Universität zu Köln. 2002.

(54): **Stolz J., Sauer N.**; The fenpropimorph resistance gene *fen2* from *Saccharomyces cerevisiae* encodes a plasma membrane H⁺-pantothenate symporter. J. Biol. Chem. 1999; 274: 18747-18752.

-
- (55): **Vallari D. S., Rock C. O.**; Pantothenate transport in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 1985; 162: 1156-1161.
- (56): **Vallari D. S., Rock C. O.**; Isolation and characterization of *Escherichia coli* pantothenate permease (*panF*) mutants. J. Bacteriol. 1987; 164: 136-142.
- (57): **Vallari D. S., Jackowski S., Rock C. O.**; Regulation of pantothenate kinase by coenzyme A and its thioesters. J. Biol. Chem. 1987; 262: 2468-2471.
- (58): **Viera J. & Messing J.**; The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic primers. Gene. 1982; 19: 259-268.
- (59): **Williamson J. M.**; L-Aspartate α -decarboxylase. Methods Enzymol. 1985; 113: 589-595.
- (60): **Willmes A.**; Taschenbuch chemischer Substanzen. Verlag Harri Deutsch, Frankfurt am Main. 1993; S. 515-516.
- (61): **Wittwer C. T., Schweitzer C., Pearson J., Song W. O., Windham C. T., Wyse B. W., Hansen R. G.**; Enzymes for liberation of pantothenic acid in blood: use of plasma pantetheinase. Am J. Clin. Nutr. 1989; 50: 1072-1078.

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Reinhard Krämer bedanke ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die stete Hilfsbereitschaft, und dass er immer ein offenes Ohr für meine Fragen und Anliegen hatte.

Andreas danke ich für die Übernahme des Korreferates, und dass er mir bei Fragen und Problemen immer behilflich war.

Ich danke meinen lieben Kollegen aus meinem Labor für die schöne, gemeinsame Zeit: Astrid dafür, dass ich mit ihr über alles reden konnte, ihre Einsatzbereitschaft und ausnahmslose Hilfe in allen Dingen; Frank für seine wertvollen Ratschläge und seine stete Hilfsbereitschaft; Christian T. danke ich ebenfalls sehr für seine Unterstützung und eine angenehme Arbeitsatmosphäre (ich wette mit dir wir sind beide kerngesund und werden uralt); Kay danke ich, dass er mir mit Rat und Tat immer zur Seite stand; Marit danke ich für die schöne Zeit neben ihr im Labor und Christian A. danke ich ebenfalls und wünsche ihm auf seinem Weg noch viel Glück.

Natürlich danke ich auch meinen alten und jetzigen Kollegen aus den anderen Laboren für das schöne Arbeitsklima: Gabi B., Johannes, Martin, Anne, Julia, Anja, Alja, Gabi S., Susanne, Sabine, Dirk, Maike, Klaus, Ute, Eva G., Eva, Oliver, Nina, Nuran, Britta, Henrike, Tim, Hamide und Rahaleh.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Benova für ihre Hilfsbereitschaft und ihren Einsatz für mich bedanken.

Ich danke meinen Eltern für den Rückhalt und die bedingungslose Unterstützung.

Meinem Mann Alfredo danke ich für seine aufbauenden Worte, seine ansteckende Motivation, dass wir gemeinsam so viel lachen und er mir jeden Tag zeigt, was wirklich zählt.

Ich danke Shirin, meinem Sonnenschein auch in schwierigen Zeiten.

Erklärung nach § 3 Abs. 10 der Promotionsordnung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig 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 – 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

Lebenslauf



Persönliche Daten

| | |
|-----------------------|-------------------------------------|
| Vor- und Zuname | Suna Giannona |
| Geburtsname | Kandirali |
| Adresse | Gosser Weg 5 51766 Engelskirchen |
| Tel.-Nr.: | 02263-801486 |
| Geburtsdatum und -ort | 29.07.1973 in Meerbusch |
| Familienstand | verheiratet, 1 Kind |
| Staatsangehörigkeit | Deutsch |

Promotion

| | |
|----------|---|
| 11. 2000 | Beginn der Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Reinhard Krämer am Institut für Biochemie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln Thema: „ β -Alanin- und Pantothenattransport in Zusammenhang mit der Pantothenatproduktion in <i>Corynebacterium glutamicum</i> “ |
|----------|---|

Hochschulstudium

| | |
|-------------------|--|
| 10.1994 – 09.2000 | Studiengang Diplom-Biologie an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln |
|-------------------|--|

Hauptstudium:

04.1997 – 10.1999

Schwerpunkte: Genetik
Biochemie
Botanik

Diplomarbeit am Anatomischen Institut I an der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

Thema: „Hc-Ad Vektor vermittelte Infektion von drei Astrozyten-Klonen der Ratte als Modell einer ex vivo-Gentherapie“

Abschluss: Diplom

Grundstudium:

10.1994 – 10.1996

Abschluss: Vordiplom

Schulbildung

08.1985 – 06.1994

Georg-Büchner-Gymnasium in Köln-Weiden

Abschluss: Abitur

08.1981 – 06.1985

Clarenhof-Grundschule in Köln-Weiden