Untersuchungen zum Export von Metaboliten und Xenobiotika in *Corynebacterium glutamicum*

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Bettine Boltres

aus Mediasch

Köln, April 2009

Berichterstatter:

1. Referent: Professor Dr. Reinhard Krämer

2. Referent: Professor Dr. Ulf-Ingo Flügge

Tag der Disputation: 24.06.2009

Abstract

As the bacterial membrane acts as a permeability barrier, transport systems are required to allow the selective passage of nutrients and the exclusion of harmful substances. Transport processes were analyzed with focus on their participation in sucrose metabolism, the export of toxins and their biotechnological relevance.

Sucrose is one of the most abundant carbon sources. In order to utilize sucrose, *C. glutamicum* has to perform sucrose uptake, cleavage and export of fructose which has to be reimported in order to obtain phosphorylated fructose. The reason for this is the lack of a fructokinase. Since the exporter is unknown this export process was investigated. It was ruled out that fructose export takes place via diffusion as well as by secondary active transport. Concluding that it has to be primary active transport a systematical screening was performed using a mutant library with strains being disrupted in certain transporter encoding genes. Cgl2831 and Cgl1525 could be discovered as putative fructose exporters.

In the second part the export of antibiotics and toxins was investigated. Therefore the “minimal inhibitory concentration” for a number of toxins for the *C. glutamicum* wildtype was determined. Using this information the already mentioned mutant library was screened for candidates with increased sensitivity towards toxins. As a result Cgl2012 was found to be a putative macrolide and aminoglycoside transporter, Cgl0952 a putative tetracycline exporter and Cgl1432 a putative multidrug exporter.

The last part was dedicated to the transport of the biotechnologically relevant substance (S,S)-Monatin, a sweetener. The production was optimized in order to ensure supply of all precursors and cofactors. However, (S,S)-Monatin production enzyme activities are limiting the synthesis. It was presumed that one exporter could transport also the structurally related substances indole and indole-3-pyruvate which occur during synthesis. Therefore some putative indole and I3P exporters were obtained in a methodical screening.

Kurzzusammenfassung

Die bakterielle Membran stellt eine semipermeable Barriere dar. Um dennoch einen stetigen Stoffaustausch mit der Umgebung zu gewährleisten, sind Transportsysteme erforderlich. Die Rolle dieser Transporter in Bezug auf den Saccharose-Metabolismus, den Export von Toxinen und die biotechnologische Anwendung wurden in dieser Arbeit untersucht.

Auf Grund der fehlenden Fructokinase muss *C. glutamicum* während der Saccharose-Verwertung die Fruktose exportieren, um sie dann über ein spezielles Fruktose-Aufnahmesystem wieder aufzunehmen und gleichzeitig zu phosphorylieren. Dieser Exportprozess wurde eingehend untersucht. Es wurde sowohl ausgeschlossen, dass es sich dabei um Diffusion, als auch, dass es sich um sekundär aktiven Transport handelt. Daraus wurde geschlussfolgert, dass ein primär aktiver Exporter involviert ist. In einem systematischen Ansatz wurden ABC-Typ-Export-Systeme inaktiviert und in einem nachfolgenden Screening Cgl2831 und Cgl1525 als potentielle Fruktose-Exporter erhalten.

Im zweiten Abschnitt wurde der Export von Toxinen in *C. glutamicum* untersucht. Dabei wurden für diverse Antibiotika und Toxine die „minimalen inhibitorischen Konzentrationen“ für den Wildtyp bestimmt. Danach wurden in diesem Ansatz die zuvor erstellte Mutantenbank auf potentielle Toxin-Exporter durchmustert. Es wurden dabei diverse putative Toxin-Exporter identifiziert. Darunter befinden sich Cgl2012 als potentieller Makrolid- und Aminoglykosid-Exporter, Cgl0952 als potentieller Tetracyclin-Exporter und Cgl1432 als potentieller Multidrug-Exporter.

Im letzten Abschnitt dieser Arbeit wurden der Transport der biotechnologisch relevanten Substanz (S,S)-Monatin, einem Süßungsmittel, untersucht. Die Produktion wurde zur biochemischen Charakterisierung des Transportprozesses optimiert, um sicherzustellen, dass alle nötigen Cofaktoren sowie Ausgangssubstanzen in ausreichender Konzentration vorhanden sind. Allerdings war die Aktivität der (S,S)-Monatin-produzierenden Enzyme zu gering. Die strukturelle Ähnlichkeit zu Indol und Indol-3-Pyruvat ließ vermuten, dass ein Transporter alle genannten Substrate transportieren könnte. In einem systematischen Screening-Ansatz wurden daher einige potentielle Indol- bzw. I3P-Exporter erhalten.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung 1

1.1. *Corynebacterium glutamicum* 1

1.2. Transporter in Prokaryoten 2

1.2.1. und ihre Rolle im Zucker-Metabolismus 3

1.2.2. und ihre biotechnologische Relevanz 6

1.2.3. und ihre Beteiligung am Export von Antibiotika und Toxinen 10

1.3. Ziele dieser Arbeit 14

II. Material und Methoden 15

2.1. Bakterienstämme und Plasmide 15

2.2. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen 19

2.2.1 für *E. coli* 19

2.2.2 für *C. glutamicum* 21

2.2.3 Antibiotika 24

2.3. Biochemische Techniken 25

2.3.1 Herstellung von Zellextrakten und Cytoplasmafraktionen 25

2.3.1.1 Aufschluss der Zellen im Fastprep-Gerät 25

2.3.1.2 Aufschluss der Zellen in Silikonölröhrchen 26

2.3.2 HPLC-Analyse von Zuckern, Aminosäuren und organischen Säuren 26

2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford 27

2.3.4 1-D-SDS-Polyacrylamidelektrophorese 28

2.3.5 Färbung mit Coomassie *Brilliant Blue* 29

2.3.6 Bestimmung der Aminosäure- bzw. Zuckeraufnahme 29

2.3.7 Bestimmung der MIC-Werte 31

2.4. Molekularbiologische Techniken 31

2.4.1 Plasmidpräparation aus *E. coli* 31

2.4.2 Plasmidpräparation aus *C. glutamicum* 31

2.4.3 Präparation chromosomaler DNA aus *C. glutamicum* 32

2.4.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA 32

2.4.5 Isolierung von DNA aus Agarosegelen 33

2.4.6 Restriktion von DNA 33

2.4.7 Ligation von DNA-Fragmenten 33
2.4.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 34
2.4.9 DNA-Sequenzierung 35
2.5. Techniken zur Manipulation von Zellen.....35
2.5.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen 35
2.5.2 Transformation von *E. coli*-Zellen 36
2.5.3 Herstellung kompetenter *C. glutamicum*-Zellen 36
2.5.4 Elektroporation von *C. glutamicum* -Zellen 37
2.5.5 Konstruktion von Insertionsmutanten 37
2.5.6 Konstruktion von Überexpressionsmutanten 38
2.6. Bioinformatische Ansätze 38

III. Ergebnisse 39
3.1. Untersuchungen zum Export von Fruktose 39
3.1.1 Untersuchungen zur Aufnahme von Saccharose und Fruktose 40
3.1.1.1 Wachstum auf Glukose und Saccharose 40
3.1.1.2 Aufnahmemessungen von Saccharose und Fruktose 41
3.1.1.3 Inhibition der Saccharose-Aufnahme durch andere Metabolite 43
3.1.2 Etablierung eines Messsystems zur biochemischen Charakterisierung des Fruktose-Exports 46
3.1.2.1 Bestimmung der externen Metabolit-Konzentrationen 46
3.1.2.2 Bestimmung der internen Metabolit-Konzentrationen 47
3.1.2.3. Analyse putativer Fruktose-Exporter 48
3.1.3 Untersuchungen zum Export von Fruktose 50
3.1.3.1 Induzierbarkeit des Fruktose-Exporters.....51
3.1.3.2 Die Wirkung von hohen externen Fruktose-Konzentrationen 52
3.1.3.3 Die Wirkung von CCCP, Valinomycin und Nigericin.....53
3.1.3.4 ABC-Transporter als putative Fruktose-Exporter.....56
3.2. Beteiligung von ABC-Transportern am Export von Antibiotika und Toxinen 61
3.2.1 Etablierung der MIC-Wert-Bestimmung in Mikrotiterplatten 61
3.2.2 Bestimmung der MIC-Werte in Mikrotiterplatten.....63
3.2.3 Screening von *C. glutamicum*-Stämmen, die in einem ABC-Exporter kodierenden Gen mutagenisiert wurden 66

3.3. Untersuchung des Transportprozesses für die biotechnologisch relevante Substanz (S,S)-Monatin 71

3.3.1 Die Synthese von (S,S)-Monatin nach Cargill 71

3.3.2 Modifizierung der Synthese 73

3.3.3 Bestimmung der inhibitorischen Konzentration der während der Biosynthese relevanten Metabolite 75

3.3.4 Synthese der Proteine AspC und ProA 77

3.3.5 Transport von Tryptophan 78

3.3.6 Interne Konzentrationen von Tryptophan und Alanin 79

3.3.7 Interne Konzentration von Pyruvat 81

3.3.8 Untersuchungen zur Lokalisation der Biosynthese 83

3.3.9 Untersuchungen zum Export von Indol und I3P 88

IV. Diskussion 92

4.1. Untersuchungen zum Export von Fruktose 92

4.1.1 Aufnahme von Saccharose und Fruktose 92

4.1.2 Induktion von PTS-kodierenden Genen 93

4.1.3 Inhibition der Saccharose-Aufnahme durch andere Metabolite 95

4.1.4 Etablierung eines Messsystems zur Bestimmung der externen und internen Zucker-Mengen 99

4.1.5 Biochemische Charakterisierung des Fruktose-Exports 100

4.1.6 Untersuchung von putativen Fruktose-Exportern 100

4.2. Beteiligung von ABC-Transportern am Export von Antibiotika und Toxinen 102

4.2.1 Etablierung eines Verfahrens zur Bestimmung von MIC-Werten 102

4.2.2 Bestimmung und Vergleich verschiedener MIC-Werte 103

4.2.3 Auswertung des Screenings von *C. glutamicum*-Stämmen, die in einem ABC-Exporter kodierenden Gen mutagenisiert wurden, auf erhöhte Sensitivität gegenüber Antibiotika und Toxinen 106

4.3. Untersuchung des Transportprozesses für die biotechnologisch relevante Substanz (S,S)-Monatin 113

4.3.1 Aufnahme, interne Akkumulation und Abbau der bei der (S,S)-Monatin-Synthese

relevanten Metabolite 114
4.3.2 Bereitstellung von Cofaktoren und Substraten 116
4.3.3 Untersuchungen zur Lokalisation der Biosynthese 117
4.3.4 Untersuchungen zum Export von Indol und I3P 118
V. Zusammenfassung 121
VI. Literaturverzeichnis 123

Abkürzungen

ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
Cam	Chloramphenicol
CCCP	Carbonyl cyanide *m*-chlorophenoxylhydrazone
et al.	et alii (und andere)
g/g	Gramm/Gramm
IPTG	Isopropyl-D-thiogalactopyranoside
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
LB	Luria Bertani Medium
MES	2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid
MFS	Major Facilitator Superfamily
MMI	Minimal Medium I
OD	Optische Dichte
PEP	Phosphoenolpyruvat
PTS	Phosphotransferase System
RND	Resistance-Nodulation-Cell Division transporter superfamily
SDS	Sodium dodecylsulphate
TRIS	2-amino-hydroxymethylpropane-1,3-diol
V_{max}	maximale Geschwindigkeit
WT	Wildtyp

I. Einleitung

1.1. *Corynebacterium glutamicum*

Das Gram-positive Bodenbakterium *C. glutamicum* wurde 1957 aus einem japanischen Zoo als natürlicher Glutamatproduzent mit dem ursprünglichen Namen *Micrococcus glutamicus* isoliert und charakterisiert (Kinoshita *et al.*, 1957; Abe *et al.*, 1967). Das aerob wachsende Stäbchen-förmige Bakterium besitzt eine Länge von ca. 1 – 1,5 µm und ist unbeweglich. Die Zellteilung erfolgt über die für Actinomyceten typische V-Form, bei der zwei Pole bis kurz vor der endgültigen Teilung noch aneinander haften (Abb. 1.1.), und es bildet keine Sporen. Der Stamm besitzt den „generally regarded as safe“ Status (GRAS), weswegen es zu den am meisten verwendeten Mikroorganismen in der biotechnologischen Herstellung von Aminosäuren, Nukleotiden und Vitaminen gehört. Auf Basis des bereits dreifach sequenzierten Genoms (*Cgl*–Annotation der Kitasato University Japan, (Nakagawa, Ikeda, 2003); *Cg*-Annotation der Universität Bielefeld, (Kalinowski *et al.*, 2003) und *NCgl*–Annotation von NCBI) mit 3,3 Mbp konnte durch metabolic engineering die Aminosäure-Produktion erheblich verbessert werden (Kimura, 2003). Die Glutamat-Exkretion wird beispielsweise durch Biotin-Mangel, durch Zusatz des antimycobakteriellen Mittels Ethambutol und Penicillin, welches schädigend auf die Zellwand wirkt, oder durch Zugabe des Tensids Tween40 erheblich gefördert. Das in der Lebensmittelindustrie als Geschmacksverstärker verwendete L-Glutamat stellt bei der Produktion immer noch mit 1,5 Millionen Tonnen pro Jahr den größten Anteil dar (Gutmann *et al.*, 1992). Zusätzlich wird L-Lysin als Futtermitteladditiv in der Tiernahrung mit 850.000 Tonnen hergestellt (Leuchtenberger *et al.*, 2005). Aber auch für die medizinische Forschung eignet sich *C. glutamicum* gut. Mit einem GC-Gehalt von 54 mol% gehört es zu den mykolsäurehaltigen Actinomyceten (Stackebrandt *et al.*, 1997), deren humanpathogene Vertreter *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* und *Corynebacterium diphteriae* beinhalten. Ihnen gemeinsam ist die äußerst resistente

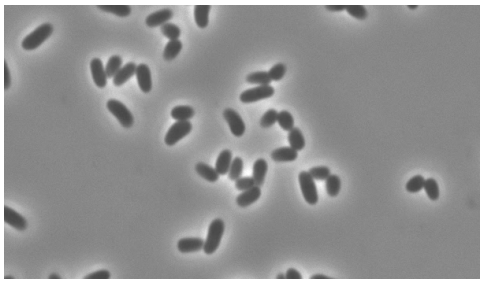

Abb.1.1: *Corynebacterium glutamicum*; lichtmikroskopische Aufnahme

Mykolsäureschicht, die in der äußeren Membran eingelagert ist, und gegen die gängigsten Antibiotika und Gifte eine effiziente Barriere darstellt (Puech *et al.*, 2001; Gebhardt *et al.*, 2007).

1.2. Transporter in Prokaryoten

Die Zellmembran von Bakterien hat eine Vielzahl von Aufgaben zu erfüllen. Um den stetigen Stoffaustausch mit der Umgebung zu gewährleisten, ist die Membran selektiv permeabel. Hydrophobe Moleküle wie Fettsäuren oder kleine Moleküle wie O_2, CO_2 und H_2O können die Membran frei passieren, während sie für geladene, große Substanzen eine Permeabilitätsbarriere darstellt. Für den Transport nicht membrangängiger Substanzen sind daher Transportsysteme nötig.
Unter anderem wird beim Transport in passiven und aktiven unterschieden, wobei der passive dem elektrochemischen Konzentrationsgradienten folgt. Beispiele hierfür sind die freie Diffusion und die erleichtere Diffusion über Kanäle. Beim aktiven Transport wird gegen den Konzentrationsgradienten transportiert, wobei Energie benötigt wird. Dabei nutzen die primär-aktiven Transporter die Hydrolyse von ATP als Energiequelle. Dazu besitzen sie eine hochkonservierte ATP-Bindestelle (ATP-Binding-Cassette). Sekundär aktive Transporter beziehen ihre Energie aus dem elektrochemischen Gradienten des Co-Substrats, das entweder zusammen (Symport) oder im Austausch (Antiport) gegen das eigentliche Substrat transportiert wird. Dabei handelt es sich in den meisten Fällen um H^+- oder Na^+-Ionen. Bei der Gruppentranslokation werden Zucker oder Zuckerderivate über die Membran transportiert und gleichzeitig phosphoryliert. Das dazu notwendige Phosphat wird über spezifische cytoplasmatische Proteine von Phospho*enol*pyruvat (PEP) bezogen. Sie werden daher auch Phosphotransferase-Systeme (PTS-Systeme) genannt. Im Folgenden werden die Transporter und ihre Rolle im Metabolismus, in der Biotechnologie und im Export von Toxinen näher beschrieben.

1.2.1. Transporter in Prokaryoten und ihre Rolle im Zucker-Metabolismus

C. glutamicum ist ein Bodenbakterium und in der Lage, eine Vielzahl von Kohlenstoffquellen zu nutzen. Es metabolisiert sowohl Monosaccharide wie Glukose, Fruktose und Ribose als auch Disaccharide wie Saccharose, Maltose, Trehalose, Laktose, aber auch organische Säuren wie Lactat und Acetat und Alkohole wie myo-Inositol (Krings *et al.*, 2006). Die am reichlichsten vorhandene Kohlenstoffquelle ist das Disaccharid Saccharose auf Grund seines Bestandes in Pflanzengewebe. Die Aufnahme von Mono- und Disacchariden über ein PEP-abhängiges PTS-System wurde 1987 entdeckt (Mori, Shiio, 1987). Im Laufe der nächsten Jahre wurden immer mehr Komponenten gefunden, die im Allgemeinen in allen Bakterien konserviert sind (Deutscher *et al.*, 2006). Grundsätzlich besteht das System aus zwei cytoplasmatischen Komponenten: Das Enzym I (EI) und HPr. EI, kodiert vom *ptsI*-Gen, weist in vielen Gram-positiven und –negativen Bakterien eine erhebliche Sequenzhomologie auf (Postma *et al.*, 1993). Über Autophosphorylierung in Gegenwart von Mg^{2+} erhält es eine Phosphat-Gruppe von PEP, die es an HPr, kodiert vom Gen *ptsH*, weitergibt. Auch die Sequenz von HPr ist hoch konserviert, vor allem in der Umgebung des aktiven Histidin-Rests (Postma *et al.*, 1993). Das dort gebundene Phosphat wird abschließend auf die spezifischen Membran gebundenen Enzyme II (EII) übertragen (Parche *et al.,* 2001). Die EII-Komplexe werden entweder aus nur einem distinkten Protein oder aus einem Multidomänen-Protein gebildet. So können auch Fusionsproteine aus EI-EII oder HPr-EII an der Membran entstehen. Es wurden für *C. glutamicum* vier EII-Komponenten identifiziert: für Saccharose, Glukose, Fruktose, und eins mit noch unbekannter Substratspezifität (Moon *et al.*, 2007). In *C. glutamicum* sind die drei bekannten EII-Komplexe Multidomänen-Proteine. Innerhalb der PTS-Systeme gibt es verschiedene Familien, die nach ihren Hauptsubstraten benannt wurden, wie z.B. Glucose (PTS^{Glu}), Fruktose (PTS^{Fru}), Lactose (PTS^{Lac}), Mannose (PTS^{Man}) oder L-Ascorbat (PTS^{Asc}) (Barabote *et al.*, 2005). Die Existenz und Anzahl der PTS-Systeme ist sehr unterschiedlich. Allein in der Gattung *Corynebacterium* existieren für *C. efficiens* ein PTS^{Glu} und PTS^{Fru}, für *C. diphtheriae* ein PTS^{Glu} und PTS^{Asc}, während *C. glutamicum* alle drei PTS-Systeme besitzt (Barabote *et al.*, 2005).

Die Aufgaben der PTS-Systeme sind jedoch vielfältiger. Sie sind außerdem in die Regulation von Kohlenstoff- und Glycogen-Metabolismus sowie von

Zellbeweglichkeit, Pathogenese und Chemotaxis involviert. Zusätzlich sind sie an der Regulation von Zellteilung und Transport von Nicht-PTS Substraten beteiligt. Ferner stellen sie eine Schnittstelle in der Regulation von aerobem und anaerobem Stoffwechsel sowie der Koordination von Kohlenstoff- und Stickstoff-Metabolismus dar (Barabote *et al.*, 2005). Besonders ihre Rolle in der Regulation des Zucker-Metabolismus‘ ist gut erforscht. Werden Bakterien mehrere Kohlenstoffquellen zur Verfügung gestellt, und eine davon wird bevorzugt metabolisiert, dann greift die Katabolit-Repression („carbon catabolite repression“, CCR). Dabei wird entweder die Synthese der katabolen Enzyme über einen Transkriptionsregulator (in Firmicutes CcpA) reguliert oder die Aufnahme der Kohlenstoffquelle („inducer exclusion“). In beide Mechanismen sind die PTS-Systeme involviert (Deutscher, 2008). Für andere Transporterklassen sind so weitreichende Funktionen noch nicht beschrieben worden.

Außer den PTS-Systemen sind allerdings noch andere Transporter für Zucker und deren Derivate gefunden worden. So importieren z.B. die beiden sekundär aktiven Transporter Cgl0181 und Cgl3058 aus *C. glutamicum* bei genügend hohen externen Fruktose-Konzentrationen Fruktose (Bäumchen *et al.*, 2009). Sie liegt anschließend in der Zelle unphosphoryliert vor. Ihre natürliche Aufgabe ist allerdings der myo-Inositol-Import. Innerhalb der sekundär aktiven Transporter wurde die Gruppe der „sugar porter“ (SP) zusammengestellt (www.membranetransport.de). In *Zymomonas mobilis* wurde ein Importer für Glukose entdeckt, das „glucose-facilitated diffusion“-Protein glf (Barnell *et al.*, 1992). Ebenfalls zu der Gruppe zählen der Glukose/Mannose:H^+-Symporter GlcP aus *Bacillus subtilis* (Paulsen *et al.*, 1998), der Fruktose:H^+-Symporter FucP aus *E. coli* (Gunn *et al.*, 1994) oder der Glukose/Galaktose:H^+-Symporter aus *Brucella abortus* (Rest, Robertson, 1974). Eine andere Untergruppe der sekundär aktiven Transporter sind die „glucose/ribose porter“ (GRP), zu denen beispielsweise die Glukose Permease GlcU aus *Lactococcus lactis* (Castro *et al.*, 2009) oder der Ribose Transporter RbsU aus *Lactobacillus sacei* (Stentz, Zagorec, 1999) zählen. Aber auch unter den primär aktiven Transportern gibt es zahlreiche Zucker und Zucker-Derivat Transporter, die in der Gruppe „Carbohydrate uptake transporter-1“ (CUT-1) zusammengefasst sind. Hierzu gehören der Maltooligosaccharid Porter MalFGK(2) aus *E. coli* (Orelle *et al.*, 2008) und der Maltose Transporter MdxEFG/MsmX aus *B. subtilis* (Schönert *et al.*, 2006). Zur CUT-2-Gruppe zählen beispielsweise der Ribose Porter RbsDACBKR aus

E. coli (Stewart, Mermodson, 2003), der Xylose Porter XylFGH aus *E. coli* (Khankal *et al.*, 2008) oder der Fruktose/Mannose/Ribose Porter FcrBCAK aus *Sinorhizobium meliloti* (Lambert *et al.*, 2001).

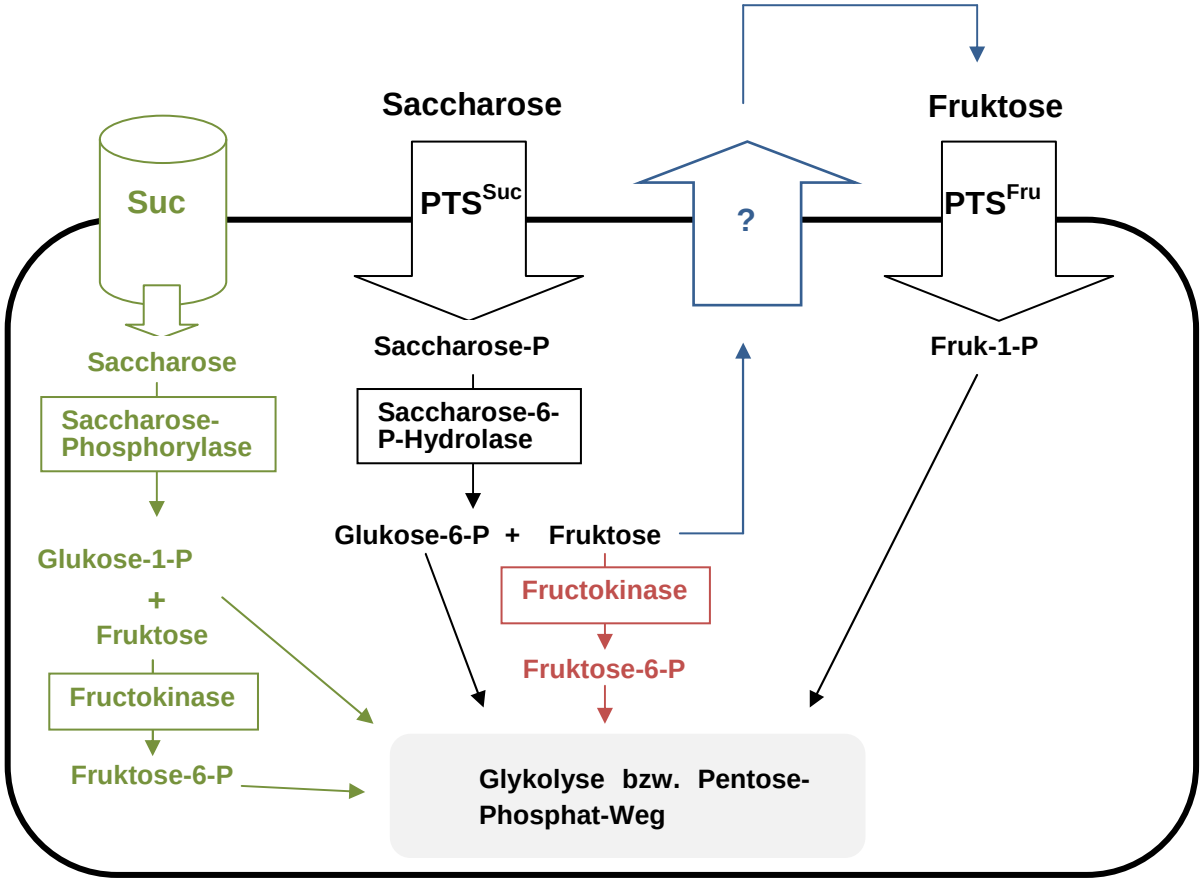

Abb. 1.2. : Schema des Saccharose-Metabolismus in Bakterien; Saccharose wird über PTS^{Suc} aufgenommen, gleichzeitig phosphoryliert und gespalten; die Fruktose wird durch eine Fructokinase phosphoryliert; in **schwarz:** genereller Mechanismus in den meisten Bakterien; in **rot:** nicht vorhanden in *C. glutamicum*; in **blau:** Mechanismus in *C. glutamicum*; während Glukose-6-phosphat direkt metabolisiert wird, wird die Fruktose erst durch einen Export/Import-Mechansimus phosphoryliert; in **grün:** vorhanden in einigen Bakterien; die Saccharose wird über einen Kanal importiert und erst im Cytoplasma phosphoryliert

Die Saccharose-Aufnahme in Prokaryoten wird allerdings hauptsächlich durch das PTS^{Suc}-System gewährleistet (Abb. 1.2.). Dabei wird sie während der Aufnahme phosphoryliert und anschließend durch die Saccharose-6-Hydrolase in Glucose-6-Phosphat und Fruktose gespalten. Während Glucose-6-Phosphat sofort in die Glykolyse eingeschleust werden kann, wird die Fruktose noch durch eine Fructokinase zu Fruktose-6-Phosphat phosphoryliert und schließlich auch der Glykolyse zur Verfügung gestellt. Zusätzlich existiert in vielen Mikroorgansimen eine Saccharose-Permease, die die Saccharose unphosphoryliert aufnimmt. Im

Cytoplasma wird sie durch die Saccharose Phosphorylase phosphoryliert und in Glukose-1-Phosphat und Fruktose gespalten (Kitaoka, Hayashi, 2002). Dieser Prozess benötigt kein ATP. Im Gegensatz dazu verbraucht die Fructokinase ein ATP zur Phosphorylierung von Fruktose. Die Gene für den Saccharose-Katabolismus sind strikt reguliert. Da die Verwertung sehr Energie verbrauchend ist, werden sie nur bei Anwesenheit von Saccharose bzw. bei Abwesenheit von anderen Kohlenstoffquellen exprimiert, was durch spezifische Transkriptionsregulatoren (z. B. SugR) gewährleistet wird (Reid, Abratt, 2005).

C. glutamicum besitzt keine Fructokinase und muss daher die Fruktose zunächst exportieren, um sie dann über das PTS^{Fru}-System wieder aufzunehmen und gleichzeitig zu phosphorylieren (Abb. 1.2.). Der dafür zuständige Exporter ist bis heute unbekannt. Es existieren noch andere Bakterien, die keine Fructokinase besitzen und daher auch den Export/Import-Mechanismus nutzen, z.B. *Aerobacter aerogenes* (Kelker, Anderson, 1972), über den allerdings auch noch keine näheren Untersuchungen existieren.

1.2.2. Transporter in Prokaryoten und ihre biotechnologische Relevanz

Die biotechnologische Produktion durch Fermentation hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Die dabei gewonnenen Produkte sind vielfältig und reichen von Ethanol, Vitaminen und Antibiotika über organische Säuren und Aminosäuren. Unter den Aminosäuren machten die Futtermitteladditive im Jahr 2004 56% der gesamten Aminosäureproduktion aus. Darunter fallen L-Lysin, DL-Methionin, L-Threonin und L-Tryptophan. Mit 32% vertreten waren die Aminosäuren L-Glutamat, in Form des Geschmacksverstärkers Monosodium Glutamat (MSG), und L-Aspartat und L-Phenylalanin als Vorstufen für die Süßungsmittel Aspartame (Leuchtenberger *et al.*, 2005).

Abgesehen von der Modifikation der Enzyme spielen in der biotechnologischen Produktion die Transporter eine wichtige Rolle. Eine Überexpression bzw. Deletion kann die Effektivität der Produktion steigern. Falls die Biosynthese-Enzyme nicht bereits gesättigt sind, kann eine Überexpression des Importers für eine Ausgangssubstanz die Produktivität innerhalb der Zellen erhöhen. Ferner kann die Überexpression eines Exporters durch verstärkten Entzug der Endsubstanz aus dem Cytoplasma zu einer erhöhten Produktionsrate führen. Es könnte somit unter

Umständen auch eine Vergiftung der Zelle bzw. die Repression der Biosynthese verhindert werden. Die Wiederaufnahme des Endprodukts würde zu einem „futile cycle“ führen, was unnötige Energieverschwendung wäre, die zusätzlich die Produktivität senken würde. Dies könnte wiederum durch Ausschalten des Importers des Endprodukts unterbunden werden.

Ein Beispiel für die Steigerung der Produktionsrate durch Modifikation des Transporters ist die Produktion von L-Glutamat. Es konnten für den Glutamat-Import zwei Transportsysteme identifiziert werden: ein primär aktives, kodiert von *gluABCD*, welches in Vollmedium der Glukose-Katabolit-Repression unterliegt und ein sekundär aktives, kodiert von *gltS*. Durch Deletion dieser Importer konnte eine Steigerung des Glutamat-Exports unter Laborbedingungen erreicht werden (Trötschel *et al.*, 2003). Für die ebenfalls biotechnologisch produzierte Aminosäure L-Lysin konnten sowohl Import als auch Export aufgeklärt werden. Das Lysin-Aufnahmesystem importiert L-Lysin im Austausch gegen L-Alanin, L-Valin oder L-Leucin (Bröer, Krämer, 1990). Der Transporter LysE katalysiert sowohl den Export von L-Lysin als auch von L-Arginin (Bellmann *et al.*, 2001). Die Produktion von L-Lysin konnte mit der Überexpression von LysE um das 5fache gesteigerte werden (Eggeling, Bott, 2005). Ferner konnte für die Produktion von Isoleucin in *C. glutamicum* festgestellt werden, dass die direkte Vorstufe von Isoleucin 2-Ketomethyl Valerat in den Zellen akkumuliert. Für den Produktionsstamm für Isoleucin stellt also der Export derselben den limitierenden Schritt dar (Morbach *et al.*, 1996). Auch durch die Entdeckung von BrnFE als L-Methionin Exporter kann in Zukunft die Produktion von L-Methionin gesteigert werden (Trötschel *et al.*, 2005).

In *Pseudomonas fluorescens* konnte ein Gen identifiziert werden, das für einen ABC-Exporter kodiert, der die Sekretion von Proteinen ins Medium vermittelt. Durch Überexpression dieses Gens konnte die externe Akkumulation der gewünschten im Cytoplasma ebenfalls überproduzierten Lipasen erhöht werden. Dieser Ansatz soll für die Produktion von diversen Enzymen zur Verwendung in der Medizin, als Lebensmittelzusatz oder in der Landwirtschaft verwendet werden (Rhee *et al.*, 2001).

In *Lactococcus lactis* wurde der ABC-Exporter LanT entdeckt, der das Lantibiotikum Nisin exportiert (Moll, Leenhouts, 2005). Auch hier wird an weiterer biotechnologischer Anwendung durch Überexpression des Exporters geforscht. Ein weiteres viel beforschtes Gebiet ist das der Süßungsmittel, zu welchen (S,S)-Monatin gehört.

(S,S)-Monatin ist ein natürlich vorkommender Süßstoff, der erstmals aus der Rinde der Wurzeln der südafrikanischen Pflanze *Schlerochiton ilicifolius* extrahiert wurde. Die Substanz ist ein weißes, kristallines, gut in Wasser lösliches Pulver mit einem Schmelzpunkt von 247-256℃ (Van Wyk, Ackerman**,** 1990). Aus der Strukturformel (Abb. 1.3.) ist die chemische Ähnlichkeit mit der Aminosäure Tryptophan erkennbar, wobei es an C2 und C4 ein Stereozentrum besitzt. In seiner natürlich Form kommt es sowohl als S,S- Isomer als auch als R,R-Isomer vor, wobei die S,S-Form bevorzugt ist. Ursprünglich wurde (S,S)-Monatin über Wasser aus der Rinde extrahiert, getrennt, gewaschen und abschließend gefriergetrocknet. Da die Konzentration in der getrockneten Rinde allerdings nur 0.007% g/g beträgt, ist diese Methode nicht für die großtechnische Gewinnung als Süßungsmittel geeignet. Seit seiner Entdeckung wurde (S,S)-Monatin in bereits über 200 Patenten erwähnt, wobei es den Sprung in die großtechnische Herstellung noch nicht geschafft hat. Aufgrund seines ca. 800 mal süßeren Geschmacks im Vergleich zu Saccharose (Van Wyk, Ackerman, 1990) ist (S,S)-Monatin besonders in der Getränke- und Lebensmittelindustrie ein gefragtes Produkt. Es kommt z.B. als Süßungsmittel in Diät-Cola-Getränken (Talebi, 2008) bzw. jeglicher Art von Getränken (Johnson, 2008) in Betracht, aber auch in der Anwendung in Kaugummis (Jani, 2008).

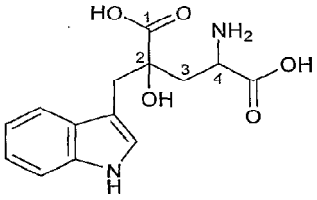

Abb. 1.3.: chemische Struktur von (S,S)-Monatin

Allein die Firma Cargill, ein weltweiter Anbieter von Produkten und Dienstleistungen in den Bereichen Lebensmittel, Landwirtschaft und Risikomanagement, beschäftigt sich seit 2003 in über 50 Patenten mit (S,S)-Monatin. Die dabei am häufigsten untersuchte Methode zur Herstellung ist die Nutzung von unterschiedlichen Mikroorganismen, wie z.B. *E. coli*, *B. subtilis*, Vertreter der *Corynebacteria*, aber auch Hefen und Pflanzen sowie generell alle Organismen, die den GRAS-Status besitzen (Anderson *et al.*, 2007). Obwohl bereits mehrfach eine chemische Totalsynthese des S,S-Isomers gelungen ist (z.B. Nakamura *et al.*, 2000), eignet sich die chemische Synthese aus ökonomischer Sicht nicht zur großtechnischen Produktion. Da *Corynebacterium glutamicum* bereits für die Herstellung anderer Substanzen, wie L-Lysin und L-Glutamat, verwendet wird, liegt es nahe, auch die (S,S)-Monatin-Produktion in diesem Organismus an zu streben. Die Biosynthese von (S,S)-Monatin ist in folgendem Schema zusammen gefasst.

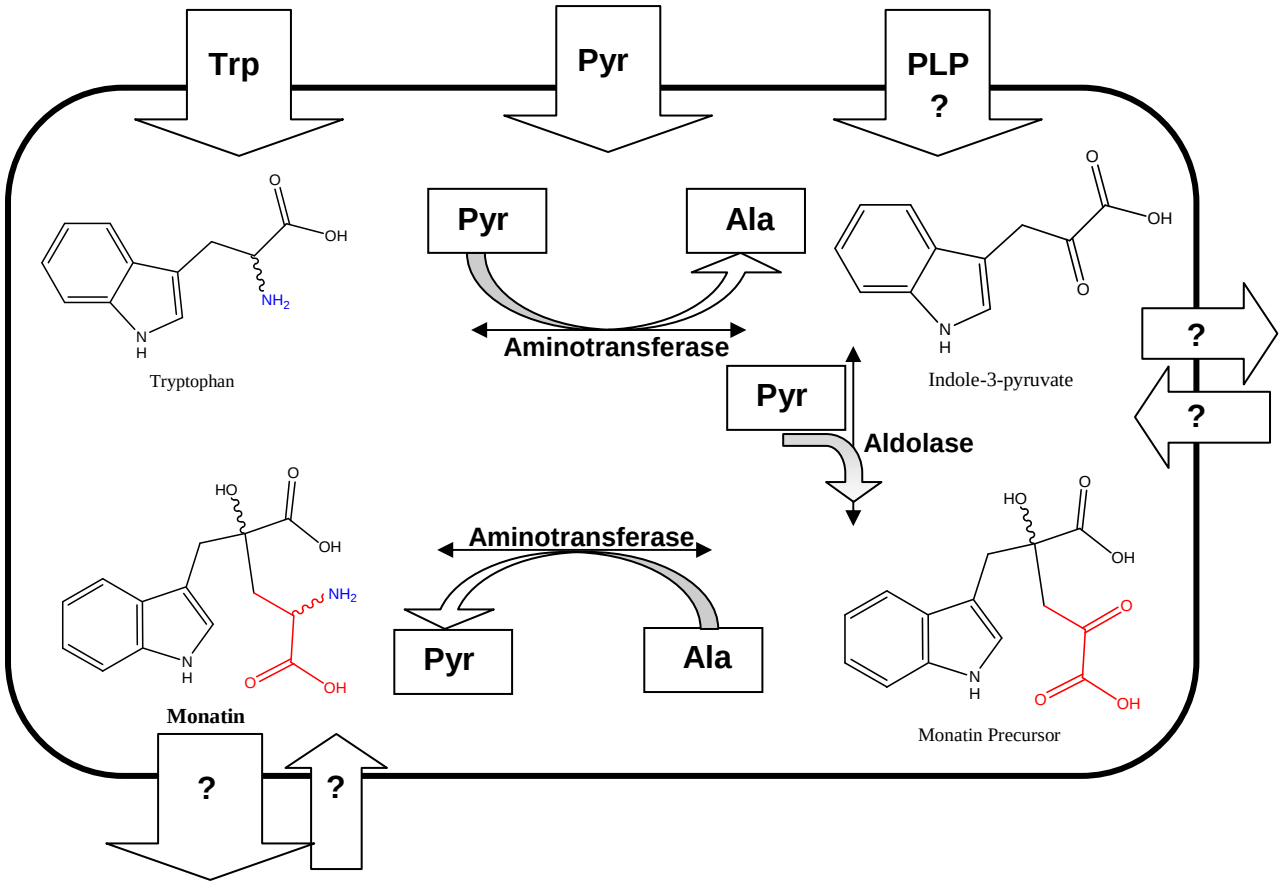

Abb. 1.4.: (S,S)-Monatin-Synthese und zugehörige Transportvorgänge in *C.glutamicum* pEKEx2A*spCproA*; alle Reaktionen sind reversibel

Während die enzymatischen Umsetzungen gut verstanden sind, ist der Transport der relevanten Substanzen zum Teil noch ungeklärt (Abb.1.4.). Die Ausgangssubstanz L-Tryptophan wird über das Aufnahmesystem AroP transportiert (Wehrmann *et al.*, 1995), während Pyruvat über den Transporter MctC importiert wird (Jolkver *et al.*, 2009). Auch der Transport des Cofaktors Pyridoxalphosphat (PLP) ist noch nicht eingehend untersucht worden. Der Import von (S,S)-Monatin ist zwar noch unaufgeklärt, ist jedoch von großer Bedeutung für die Syntheseeffizienz. Es ist bekannt, dass *C. glutamicum* (S,S)-Monatin nicht metabolisieren kann (persönliche Mitteilung, Cargill). Ferner ist der Transport der Zwischenstufen nicht bestimmt worden. Allerdings könnten auch diese Informationen genutzt werden, um die Syntheseeffizienz erhöhen.

Die Enzyme zur Synthese sind auf dem Überexpressionsplasmid pEKEx2 kodiert. Der erste Schritt wird von einer Aminotransferase durchgeführt, die die Aminogruppe

vom Tryptophan gegen eine Ketogruppe austauscht und damit aus einem Pyruvat ein Alanin und aus Tryptophan Indol-3-Pyruvat (I3P) generiert. Als Cofaktor benötigt sie dazu Pyridoxalphosphat. Der zweite Schritt wird durch eine Aldolase katalysiert, die die Ketogruppe durch ein Pyruvat ersetzt und so die (S,S)-Monatin-Vorstufe MonP ((S,S)-Monatin Precursor) herstellt. Der letzte Schritt wird wieder durch die Aminotransferase realisiert, indem die Ketogruppe am Pyruvat im MonP durch eine Aminogruppe ersetzt wird und somit wieder aus einem Alanin ein Pyruvat generiert und aus MonP (S,S)-Monatin.

1.2.3. Transporter in Prokaryoten und ihre Beteiligung am Export von Antibiotika und Toxinen

Antibiotika sind natürlich gebildete Stoffwechselprodukte von Pilzen oder Bakterien, die das Wachstum von anderen Mikroorganismen hemmen oder diese abtöten. Auch chemisch synthetisierte Substanzen mit antimikrobieller Wirkung werden als Antibiotika bezeichnet. Man unterscheidet zwischen einer bakteriostatischen Wirkung, indem die Vermehrung von Bakterien, z.B. durch Blockierung der Proteinsynthese am Ribosom, gehemmt wird und einer bakteriziden Wirkung, die durch Schädigung der Bakterienzelle den Tod der Bakterien herbeiführt.

Ein möglicher Angriffspunkt für die spezifische Bekämpfung von Bakterien stellt die Zellwand dar, da Bakterien die einzigen Organismen sind, deren Zellwand aus Murein besteht. Z. B. blockiert Penicillin, welches zu den β-Lactamen zählt, durch Bindung an das Enzym D-Alanin-Transpeptidase die Zellwandsynthese. Weitere Zellwandantibiotika sind Glykopeptide. Fluoroquinolone wie z.B. Ciprofloxacin inhibieren die A-Untereinheit der bakteriellen DNA-Gyrase und somit die DNA-Replikation. Rifampicin ist ein Antibiotikum, das die Transkription der DNA verhindert, indem es die β-Untereinheit der bakteriellen RNA-Polymerase inhibiert. Ein weiterer Angriffspunkt stellt die Proteinbiosynthese mittels 70S-Ribosomen in Bakterien dar. Tetracyclin und Aminoglykoside wie z.B. Streptomycin hemmen die 30S-Untereinheit der prokaryotischen Ribosomen, so dass die Aminoacyl-tRNA hier nicht mehr binden kann. Chloramphenicol und diverse Makrolide dagegen hemmen die Peptidyltransferaseaktivität der 50S-Ribosomen.

Mikroorganismen haben Strategien entwickelt, um Antibiotika und anderen Toxinen entgegenzuwirken. Einer der Mechanismen beinhaltet die Produktion von Enzymen,

die die Toxine durch Hydrolyse oder Umwandlung in ein inaktives Derivat unschädlich machen. Beispiele hierfür sind die β-Lactamase, die β-Lactame abbauen kann (Bush *et al.*, 1995) und die ADP Ribosyltransferase, die Rifampicin modifizieren und so inaktivieren kann (Nguyen, Thompson, 2006). Ein anderer Weg ist die Veränderung der Zielsubstanzen. Dabei wird durch Mutationen oder enzymatische Modifizierung die Affinität des Toxins reduziert. Das Gen *erm37* aus *M. tuberculosis* beispielsweise kodiert für ein Enzym, welches eine bestimmte Stelle in der 23S-Untereinheit der rRNA methyliert und so die Bindung des Antibiotikums, in diesem Fall der Makrolide, verhindert (Nguyen, Thompson, 2006).

Die Nachahmung der Zielsubstanz ist ein relativ neu erforschtes Gebiet in der Resistenzforschung. In *M. smegmatis* und *M. bovis* wurde das Protein MfpA entdeckt, welches die 3D-Struktur der DNA so nachstellt, dass Fluoroquinolone daran binden und so eine letale Bindung an den DNA-Gyrase-Komplex verhindert wird (Nguyen, Thompson, 2006).

Die weitaus effektivste und am weitesten verbreitete Strategie zur Resistenz ist allerdings der Einsatz von Exportern. Einige Exporter, wie z.B. die Tetracyclin-Exporter, sind spezialisierte Systeme, die ausschließlich den Export von Tetracyclinen und strukturell nah verwandten Substanzen vermitteln (Putman *et al.*, 2000). „Multidrug-Efflux“-Systeme hingegen erkennen eine große Anzahl an strukturell verschiedenen Substanzen (Neyfakh, 2001). Innerhalb der sekundär aktiven Transporter können verschiedene Familien unterschieden werden.

Zu den weitaus größten zählt die „Major Facilitator Superfamily“ (MFS). Generell sind sie aus 12 bis 14 Transmembrandomänen aufgebaut und kommen ubiquitär in Bakterien vor. Da mittlerweile eine Vielzahl von Multidrug-Transportern identifiziert werden konnten, werden hier nur einige erwähnt. Ein prominentes Beispiel für diese Gruppe ist der Transporter NorA aus *Staphylococcus aureus*. In *Bacillus subtilis* wurden gleich zwei strukturelle und funktionelle Homologe gefunden: Bmr und Blt stellen beide Multidrug-Exporter mit einer ähnlichen Substratbreite dar. In *Lactococcus lactis* wurde LmrP identifiziert, welcher den Transport von lipophilen Substanzen vermittelt. Des Weiteren wurde in *E. coli* der Transporter MdfA (auch bekannt als Cmr, CmlA) gut untersucht. Er wurde anfangs als Chloramphenicol-Transporter identifiziert. Allerdings reicht seine Substratbreite bis zu neutralen und positiv geladenen Substanzen. Ebenfalls in *E. coli* zeigen die Transporter EmrA, EmrB und EmrD Resistenz gegen verschiedene Toxine. In *M. tuberculosis* wurden

unter anderem die Transporter Tap und LfrA entdeckt. Tap vermittelt dabei Resistenzen gegen Aminoglykoside und Tetracycline, während LfrA die hydrophilen Quinolone transportiert (Putman *et al.*, 2000; Piddock, 2006; Poole, 2005; Nikaido *et al.*, 1996). Interessanterweise wurde auch in *C. glutamicum* ein Multidrug-Exporter gefunden (Cmr), der allerdings nur heterolog exprimiert in *E. coli* Multidrug-Resistenz vermittelte. Dies könnte daran liegen, dass es in seiner natürlichen Umgebung reprimiert ist, was bereits von EmrE bekannt ist, welches durch den Repressor *emrR* reguliert wird (Jäger *et al.*, 1997).

Eine weitere große Gruppe stellen die „Resistance-Nodulation-Cell Division Family“ (RND) dar. Diese Transporter besitzen 12 Transmembrandomänen und interagieren mit einem Membran-Fusions-Protein sowie mit einem Protein in der äußeren Membran. Die zwei prominentesten Beispiele hierfür sind der Transporter AcrAB/TolC aus *E. coli* und MexAB/OprM aus *P. aeruginosa*. Im Komplex AcrAB/TolC stellt AcrB den RND-Transporter dar, während AcrA das Membran-Fusions-Protein bildet und TolC den Kanal in der äußeren Membran. *E. coli* besitzt noch zwei Homologe von AcrAB, nämlich AcrEF und YhiUV, die beide mit TolC interagieren. Im Komplex MexAB/OprM entspricht die Verteilung genau der in *E. coli*.

Die kleinste Gruppe der Multidrug-Transporter stellt die „Small Multidrug Resistance Family“ (SMR) dar. Sie besitzen nur 4 Transmembrandomänen, weswegen vorgeschlagen wurde, dass sie als Homooligomere fungieren. Beispiele hierfür sind der Transporter EmrE aus *E. coli* (Ninio *et al.*, 2001) sowie Mmr aus *M. tuberculosis*.

Die letzte hier erwähnte Gruppe der sekundär aktiven Multidrug-Exporter ist die „Multidrug And Toxic Compound Extrusion Family“ (MATE). Da diese Transporter ebenfalls 12 Transmembrandomänen besitzen, wurde vorgeschlagen, sie zu den MFS-Transportern zu zählen. Zu dieser Gruppe gehörten bis zum Jahr 2000 lediglich ca. 30 Proteine (Putman *et al.*, 2000; Piddock, 2006; Poole, 2005; Nikaido *et al.*, 1996).

An dieser Stelle sollen kurz die „Efflux Pump Inhibitors“ (EPIs) erwähnt werden. Sie sind eine Reihe von Substanzen, die MDR-Transporter in ihrer Funktion hemmen. So konnte gezeigt werden, dass Reserpin, ein pflanzliches Alkaloid, und Verapamil direkt mit dem Transporter Bmr aus *B. subtilis* interagieren und diesen hemmen. Durch diese Hemmung kann bei gleichzeitiger Applikation die Effektivität von Antibiotika potenziert werden, wie für den Transporter NorA aus *S. aureus* unter Verwendung von Reserpin und Norfloxacin gefunden wurde (Piddock, 2006). Beim

Screening einer Sammlung von 200.000 synthetischen und natürlichen Substanzen ist die Substanz MC-207,110 (Phe-Arg-β-naphthylamid, PA-β-N) zusammen mit Levofloxacin in *P. aeruginosa* aufgefallen (Lomovskaya *et al.*, 2006). EPIs haben zwar bisher noch keine medizinische Anwendung gefunden, jedoch werden immer wieder neue Substanzen entdeckt und die gleichzeitige Applikation mit Antibiotika bietet sich gerade auf Grund der steigenden Resistenzen an (Piddock, 2006).

Die primär aktiven ABC-Transporter beinhalten meistens 6 Transmembrandomänen, und zwei Nukleotidbindedomänen, bestehend aus 2 Walker-Motiven und der ABC-Bindesequenz. Die einzelnen Komponenten können als einzelne Proteine oder als Multidomänen-Protein exprimiert werden. Die meisten ABC-Typ-Exporter vermitteln den Transport von spezifischen Substanzen. Der erste eigentliche Multidrug-Exporter wurde in *Lactococcus lactis* gefunden. LmrA fungiert als Dimer und zeigte bei Expression in humanen Lungenfibroblasten ähnliche Resistenzvermittlung wie der humane Multidrug-Transporter P-glycoprotein.

Durch Sequenzanalysen konnten in *C. glutamicum* 130 Gene identifiziert werden, deren Genprodukte wahrscheinlich Bestandteile von sekundär aktiven Transportern sind. Außerdem konnten 60 mögliche ABC-Transportsysteme gefunden werden (Marin, Krämer, 2007).

1.3. Ziele dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und biochemische Charakterisierung von Exportern in *C. glutamicum* unter besonderer Berücksichtigung ihrer Bedeutung im Saccharose-Metabolismus, in der Biotechnologie und im Export von Toxinen. Die Arbeit wurde dazu in drei Abschnitte gegliedert:

Der noch unbekannte Fruktose-Exporter sollte im ersten Abschnitt dieser Arbeit identifiziert werden. Dazu sollten Verfahren etabliert werden, die es erlauben, sowohl den externen als auch den internen Fruktose-Gehalt zu verfolgen. Zur Ermittlung der internen Fruktose-Konzentrationen sollte spezifisch an der Fruktose radioaktiv markierte Saccharose verwendet werden. Damit sollten kinetische Daten, die energetische Kopplung und mögliche Kompetitoren ermittelt werden. Mit Hilfe dieser Informationen war ein systematischer Screening-Ansatz mit Stämmen, die in einem Transporter-kodierenden Gen mutagenisiert worden waren, zur Eingrenzung der möglichen Fruktose-Exporter geplant. Durch Inaktivierung der damit ermittelten potentiellen Fruktose-Exporter sollte anschließend die interne Akkumulation von Fruktose gemessen werden.

Im zweiten Abschnitt sollten mögliche Toxin-Transporter identifiziert werden. Dazu war zunächst geplant, die „minimalen inhibitorischen Konzentrationen“ diverser Antibiotika und Toxine für den Wildtyp zu ermitteln. Anhand dieser Daten sollte anschließend in dem bereits oben erwähnten systematischen Screening-Ansatz auf erhöhte Sensitivität gegenüber Antibiotika und Toxinen getestet werden. Die dabei erhaltenen potentiellen Antibiotika-Exporter sollten abschließend eingehender charakterisiert werden.

Im letzten Abschnitt war geplant, in einer Kooperation mit der amerikanischen Firma Cargill, zu untersuchen, welche Rolle Transportvorgänge von Substraten und Produkten bei der Produktion von (S,S)-Monatin spielen. Dazu sollte die Produktion, wie sie von Cargill entwickelt wurde, analysiert werden. Es sollten Bedingungen etabliert werden, die eine biochemische Charakterisierung des Transports erlauben und für die Suche von Transportern genutzt werden können.

II. Material und Methoden

2.1. Bakterienstämme und Plasmide

In Tabelle 2.1.1. finden sich die verwendeten *C. glutamicum*- und *E. coli*-Stämme, während in Tabelle 2.1.2. die verwendeten Plasmide aufgelistet sind.

Tab. 2.1.1.: In dieser Arbeit verwendete *E. coli*- und *C. glutamicum*-Stämme. Der Genotyp bzw. Phänotyp der eingesetzten Stämme ist aufgeführt. (Resistenzen: Amp: Ampicillin; Cm: Chloramphenicol; Km: Kanamycin; Nx: Nalidixinsäure; Sm: Streptomycin; Tc: Tetracyclin)

Stamm	Genotyp, Phänotyp	Referenz
E.coli		
BL 21 (DE3)	F^- ompT gal (dcm) (lon) hsdSB (r_B^- m_B^-) gal dcm (DE3) mit λ T7 RNA Polymerase	Studier *et al.*, 1990
BL21 (DE3) pET32*AspCproA*	BL21 (DE3) mit pET32 mit *AspCproA* zur Überexpression	Cargill, USA
DH5α (mcr)	*endA1 supE44 thi-1 λ⁻ recA1 gyrA96 relA1 deoR Δ(lacZYA-argF) U169 Φ80 Δ lacZ Δ M15mcrA Δ(mmr hsdRMS mcrBC)*	Grant *et al*., 1990
C. glutamicum		
ATCC 13032	Wildtyp	Abe *et al.,* 1967
Δ*ace*	Deletion im Gen *ace*	Blombach *et al.*, 2007a
Res 167	Restriktionsdefiziente Mutante von ATCC 13032; Δ(cglIM-cglIR-cglIIR), Nx^R	Tauch *et al.,* 2002
Res167 *Cgl0036*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl0036*	diese Arbeit
Res167 *Cgl0110*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl0110*	diese Arbeit
Res167 *Cgl0122*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl0122*	diese Arbeit
Res167 *Cgl0166*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl0166*	Konstruktion von T. Radespiel, Univ. zu Köln
Res167 *Cgl0181*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl0181*	diese Arbeit
Res167 *Cgl0216*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl0216*	diese Arbeit
Res167 *Cgl0235*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl0235*	diese Arbeit
Res167 *Cgl0322*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl0322*	Konstruktion von T. Mohrbach, Univ. zu Köln
Res167 *Cgl0406*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl0406*	Konstruktion vom FZ Jülich
Res167 *Cgl0421*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl0421*	Konstruktion von A. Wittmann, Univ. zu Köln
Res167 *Cgl0501*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl0501*	diese Arbeit

Res167 *Cgl0533*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl0533*	diese Arbeit
Res167 *Cgl0632*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl0632*	Konstruktion von C. Trötschel, Univ. zu Köln
Res167 *Cgl0635*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl0635*	Konstruktion von C. Trötschel, Univ. zu Köln
Res167 *Cgl0855*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl0855*	diese Arbeit
Res167 *Cgl0912*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl0912*	Konstruktion von S. Ballan, Univ. zu Köln
Res167 *Cgl0952*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl0952*	diese Arbeit
ATCC 13032 *Cgl0964*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl0964*	Konstruktion von E. Jolkver, Univ. zu Köln
Res167 *Cgl0965*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl0965*	diese Arbeit
Res167 *Cgl1005*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl1005*	Konstruktion vom Forschungszentrum Jülich
Res167 *Cgl1061*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl1061*	Konstruktion von S. Ballan, Univ. zu Köln
Res167 *Cgl1080*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl1080*	diese Arbeit
Res167 *Cgl1147*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl1147*	diese Arbeit
ATCC 13032 *Cgl1148*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl1148*	Konstruktion von E. Jolkver, Univ. zu Köln
Res167 *Cgl1227*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl1227*	diese Arbeit
Res167 *Cgl1420*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl1420*	Konstruktion von S. Ballan, Univ. zu Köln
Res167 *Cgl1432*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl1432*	diese Arbeit
ATCC 13032 *Cgl1522*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl1522*	Konstruktion von E. Jolkver, Univ. zu Köln
ATCC 13032 *Cgl1525*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl1525*	Konstruktion von E. Jolkver, Univ. zu Köln
Res167 *Cgl1567*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl1567*	diese Arbeit
ATCC 13032 *Cgl1568*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl1568*	Konstruktion von E. Jolkver, Univ. zu Köln
Res167 *Cgl1688*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl1688*	diese Arbeit
Res167 *Cgl2012*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl2012*	diese Arbeit
Res167 *Cgl2018*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl2018*	diese Arbeit
Res167 *Cgl2057*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl2057*	diese Arbeit
Res167 *Cgl2077*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl2077*	Konstruktion von S. Ballan, Univ. zu Köln
ATCC 13032 *Cgl2211*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl2211*	Konstruktion von E. Jolkver, Univ. zu Köln
Res167 *Cgl2298*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl2298*	diese Arbeit
ATCC 13032 *Cgl2314*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl2314*	Konstruktion von E. Jolkver, Univ. zu Köln

Res167 *Cgl2447*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl2447*	diese Arbeit
Res167 *Cgl2553*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl2553*	diese Arbeit
Res167 *Cgl2746*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl2746*	diese Arbeit
Res167 *Cgl2826*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl2826*	diese Arbeit
ATCC 13032 *Cgl2831*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl2831*	Konstruktion von E. Jolkver, Univ. zu Köln
Res167 *Cgl2993*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl2993*	diese Arbeit
Res167 *Cgl3036*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl3036*	diese Arbeit
Res167 *Cgl3039*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl3039*	diese Arbeit
Res167 *Cgl3058*::pDrive	Res 167 mit pDrive-Insertion in *Cgl3058*	diese Arbeit
ATCC13032ΔPTS$_{fruc}$ *Cgl0110* ::pDrive	ATCC13032ΔPTS$_{fruc}$ mit pDrive-Insertion in *Cgl0110*	diese Arbeit
ATCC13032ΔPTS$_{fruc}$ *Cgl0181* ::pDrive	ATCC13032ΔPTS$_{fruc}$ mit pDrive-Insertion in *Cgl0181*	diese Arbeit
ATCC13032ΔPTS$_{fruc}$ *Cgl0166* ::pDrive	ATCC13032ΔPTS$_{fruc}$ mit pDrive-Insertion in *Cgl0166*	diese Arbeit
ATCC13032ΔPTS$_{fruc}$ *Cgl3058* ::pDrive	ATCC13032ΔPTS$_{fruc}$ mit pDrive-Insertion in *Cgl3058*	diese Arbeit

Tab. 2.1.2.: In dieser Arbeit verwendete Plasmide. Die Eigenschaften der eingesetzten Plasmide sind aufgeführt. (Resistenzen: Amp: Ampicillin; Cm: Chloramphenicol; Km: Kanamycin)

Plasmid	Eigenschaft	Referenz
pEC-XC99E	p_{tac}, *lacI*^{q}, Cm^R, ΦGA1	Kirchner *et al*., 2003
pEC-XC99E*tnaB*	pEC-XC99E mit *tnaB* zur Überexpression	diese Arbeit
pEKEx2	p_{tac}, *lacI*^{q}, Km^R, *ori C. glut., ori E. coli E.coli - C. glut*. Shuttle-Vektor	Eikmanns *et al*., 1991
pEKEx2*AspCproA*	pEKEx2 mit *AspC und proA* zur Überexpression	Cargill, USA
PEKEx2*aroP*	pEKEx2 mit *aroP* zur Überexpression	diese Arbeit
pET32*AspCproA*	pET32 mit *AspC und proA* zur Überexpression	Cargill, USA
pDrive	p_{lac}, ori pUC, lacZα , Amp^R, Km^R, T-A cloning-Vektor	Qiagen, Hilden
pDrive*Cgl0036*	pDrive mit *Cgl0036*-Insertionsfragment	diese Arbeit
pDrive*Cgl0110*	pDrive mit *Cgl0110*-Insertionsfragment	diese Arbeit
pDrive*Cgl0122*	pDrive mit *Cgl0122*-Insertionsfragment	diese Arbeit
pDrive*Cgl0166*	pDrive mit *Cgl0166*-Insertionsfragment	Konstruktion von T. Radespiel, Univ. zu Köln
pDrive*Cgl0181*	pDrive mit *Cgl0181*-Insertionsfragment	diese Arbeit

pDrive*Cgl0216*	pDrive mit *Cgl0216*-Insertionsfragment	diese Arbeit
pDrive*Cgl0235*	pDrive mit *Cgl0235*-Insertionsfragment	diese Arbeit
pDrive*Cgl0322*	pDrive mit *Cgl0322*-Insertionsfragment	Konstruktion von T. Mohrbach, Univ. zu Köln
pDrive*Cgl0406*	pDrive mit *Cgl0406*-Insertionsfragment	Konstruktion vom FZ Jülich
pDrive*Cgl0421*	pDrive mit *Cgl0421*-Insertionsfragment	Konstruktion von A. Wittmann, Universität zu Köln
pDrive*Cgl0501*	pDrive mit *Cgl0501*-Insertionsfragment	diese Arbeit
pDrive*Cgl0533*	pDrive mit *Cgl0533*-Insertionsfragment	diese Arbeit
pDrive*Cgl0553*	pDrive mit *Cgl0553*-Insertionsfragment	
pDrive*Cgl0632*	pDrive mit *Cgl0632*-Insertionsfragment	Konstruktion von C. Trötschel, Universität zu Köln
pDrive*Cgl0855*	pDrive mit *Cgl0855*-Insertionsfragment	diese Arbeit
pDrive*Cgl0912*	pDrive mit *Cgl0912*-Insertionsfragment	Konstruktion von S. Ballan, Universität zu Köln
pDrive*Cgl0952*	pDrive mit *Cgl0952*-Insertionsfragment	diese Arbeit
pDrive*Cgl0964*	pDrive mit *Cgl0964*-Insertionsfragment	Konstruktion von E. Jolkver, Universität zu Köln
pDrive*Cgl0965*	pDrive mit *Cgl0965*-Insertionsfragment	diese Arbeit
pDrive*Cgl1005*	pDrive mit *Cgl1005*-Insertionsfragment	Konstruktion vom FZ Jülich
pDrive*Cgl1061*	pDrive mit *Cgl1061*-Insertionsfragment	Konstruktion von S. Ballan, Universität zu Köln
pDrive*Cgl1080*	pDrive mit *Cgl1080*-Insertionsfragment	diese Arbeit
pDrive*Cgl1147*	pDrive mit *Cgl1147*-Insertionsfragment	diese Arbeit
pDrive*Cgl1148*	pDrive mit *Cgl1148*-Insertionsfragment	Konstruktion von E. Jolkver, Universität zu Köln
pDrive*Cgl1227*	pDrive mit *Cgl1227*-Insertionsfragment	diese Arbeit
pDrive*Cgl1420*	pDrive mit *Cgl1420*-Insertionsfragment	Konstruktion von S. Ballan, Universität zu Köln
pDrive*Cgl1432*	pDrive mit *Cgl1432*-Insertionsfragment	diese Arbeit
pDrive*Cgl1525*	pDrive mit *Cgl1525*-Insertionsfragment	Konstruktion von E. Jolkver, Universität zu Köln
pDrive*Cgl1567*	pDrive mit *Cgl1567*-Insertionsfragment	diese Arbeit
pDrive*Cgl1568*	pDrive mit *Cgl1568*-Insertionsfragment	Konstruktion von E. Jolkver, Universität zu Köln
pDrive*Cgl1688*	pDrive mit *Cgl1688*-Insertionsfragment	diese Arbeit
pDrive*Cgl2012*	pDrive mit *Cgl2012*-Insertionsfragment	diese Arbeit
pDrive*Cgl2018*	pDrive mit *Cgl2018*-Insertionsfragment	diese Arbeit
pDrive*Cgl2057*	pDrive mit *Cgl2057*-Insertionsfragment	diese Arbeit

pDrive*Cgl2077*	pDrive mit *Cgl2077*-Insertionsfragment	Konstruktion von S. Ballan, Universität zu Köln
pDrive*Cgl2211*	pDrive mit *Cgl2211*-Insertionsfragment	Konstruktion von E. Jolkver, Universität zu Köln
pDrive*Cgl2298*	pDrive mit *Cgl2298*-Insertionsfragment	diese Arbeit
pDrive*Cgl2447*	pDrive mit *Cgl2447*-Insertionsfragment	diese Arbeit
pDrive*Cgl2553*	pDrive mit *Cgl2553*-Insertionsfragment	diese Arbeit
pDrive*Cgl2746*	pDrive mit *Cgl2746*-Insertionsfragment	diese Arbeit
pDrive*Cgl2826*	pDrive mit *Cgl2826*-Insertionsfragment	diese Arbeit
pDrive*Cgl2831*	pDrive mit *Cgl2831*-Insertionsfragment	Konstruktion von E. Jolkver, Universität zu Köln
pDrive*Cgl2993*	pDrive mit *Cgl2993*-Insertionsfragment	diese Arbeit
pDrive*Cgl3036*	pDrive mit *Cgl3036*-Insertionsfragment	diese Arbeit
pDrive*Cgl3039*	pDrive mit *Cgl3039*-Insertionsfragment	diese Arbeit
pDrive*Cgl3058*	pDrive mit *Cgl3058*-Insertionsfragment	diese Arbeit

2.2. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

2.2.1. für *E. coli*

Die Kultivierung der *E. coli*-Stämme wurde standardmäßig in LB (Luria Bertani)-Medium (Trypton 10g/l, Hefeextrakt 5g/l, NaCl 10g/l; nach SAMBROOK *et al.*, 1989) durchgeführt. Für die Herstellung von Agarplatten wurden diesem Medium 15g/l Bacto-Agar (Difco, Detroit, USA) zugesetzt. Die Flüssigkulturen wurden in Kolben mit Schikanen bei 37℃ und 135 bzw. 125 rpm geschüttelt . Das Wachstum wurde durch Messung der optischen Dichte (OD_{600}) im Photometer (Novaspec II oder Ultrospec 3000, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) ermittelt. Dabei enthält eine Bakterienkultur mit einer OD_{600} von 1 eine durchschnittliche Anzahl von 10^9 Zellen pro ml. Die Kulturen wurden in 5ml, 20ml, 50ml bzw. 200ml Medium angezogen.

Zur Synthese von (S,S)-Monatin wurden die von Cargill entwickelten Bedingungen verwendet (siehe Tab. 2.1.3. und Tab. 2.1.4.).

Tab. 2.1.3.: von Cargill entwickelte Kultivierungsbedingungen von *E. coli* BL21(DE3) pET32-*AspCproA* zur Synthese von (S,S)-Monatin

Vorkultur I		
5ml LB-Medium + Carbenicillin	Animpfen von Platte	
Vorkultur II		
20ml LB-Medium + Carbenicillin	~1ml aus Vorkultur I	
Hauptkultur		
Animpfen		
50 ml Trp1-Medium + Carbenicillin	OD_{600} 0,1 aus Vorkultur II	
Induktion		
bei OD_{600} 0,5	IPTG (1M)	50 µl
	Balchs Vitamin-Mix (1000x)	100 µl
	Pyridoxolhydrochlorid (50mM)	500 µl
1. Zugabe		
3 Stunden nach Induktion	Tryptophan	0,5 g
	Natriumpyruvat (200g/l)	2,5 ml
	Pyridoxalphosphat (20mM)	100 µl
	Natriumdecanoat (0,1M)	1,25 ml
	Tween 20 (20% w/v)	500 µl
2. Zugabe		
24 Stunden nach Induktion	Tryptophan	0,5 g
	Natriumpyruvat	0,75 g

Tab.2.1.4.: Zusammensetzung des Mineralsalzmediums Trp-1 (Medium modifiziert nach Zeman, 1990; Spurenelementelösung modifiziert nach Neidhardt, 1974)

Substanz	**Konzentration**
Stammlösung:	900 ml
$(NH_4)_2SO_4$	2 g/l
KH_2PO_4	13,6 g/l
Einstellen des pH-Werts mit NaOH auf 7,0	
Glukose (50%)	40 ml
$MgSO_4$ (1M)	0,81 ml
$CaCl_2$ (1M)	0,068 ml
$Fe(SO)_4$ (0,5 mg/ml)	1 ml
MOPS (1M)	10 ml
Spurenelementelösung:	0,2 ml
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$-$4H_2O$	0,18 g/l
$MnCl_2$ x 4 H_2O	0,8 g/l

$ZnSO_4$ x 7 H_2O	0,14 g/l
$CuSO_4$	0,12 g/l
H_3BO_3	1,24 g/l
$CoCl_2$ x 6H_2O	0,36 g/l

2.2.2. für *C. glutamicum*

Die Kultivierung der *C. glutamicum*-Stämme wurde standardmäßig in BHI (Brain Heart Infusion)-Medium 37g/l (Difco, Detroit, USA) durchgeführt. Für die Herstellung von Agarplatten wurden diesem Medium 15g/l Bacto-Agar (Difco, Detroit, USA) zugesetzt. Für die Herstellung von elektrokompetenten Zellen wurde LB-Medium verwendet, dem Wachstumsinhibitoren (25g/l Glycin, 4g/l Isonikotinsäurehydrazid, 1ml/l Tween 80) zugesetzt wurden. Zur Anzucht in definiertem Minimalmedium wurde MMI verwendet, dessen Zusammensetzung in Tabelle 2.1.5. aufgeführt ist. Die Flüssigkulturen wurden in Kolben mit Schikanen bei 30℃ und 135 bzw. 125 rpm geschüttelt. Das Wachstum wurde ebenfalls durch Messung der optischen Dichte (OD_{600}) im Photometer (Novaspec II oder Ultrospec 3000, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) ermittelt. Die Kulturen wurden in 5ml, 20ml, 50ml bzw. 200ml Medium angezogen.

Zur Synthese von (S,S)-Monatin wurden zunächst die von Cargill vorgeschlagenen Medien und Bedingungen verwendet (siehe Tab.2.1.6.). Die modifizierten Kultivierungsbedingungen sind in Tab.2.1.7. dargestellt. Der Stamm *C. glutamicum* Δ*aceE* wurde in YT-Medium und CgXII-Medium angezogen (Tab.2.1.8. und 2.1.9.).

Tab. 2.1.5.: Zusammensetzung des Mineralsalzmediums I (modifiziert nach Kase und Nakayama, 1972)

Substanz	**Konzentration**
Stammlösung:	900 ml
(NH_4SO_4)	5 g/l
Harnstoff	5 g/l
KH_2PO_4	2 g/l
K_2HPO_4	2 g/l
Einstellen des pH-Werts mit NaOH auf 7,0	
Glukose (50%)	80 ml
$MgSO_4$ (1M)	9 ml
$CaCl_2$ (0,1M)	9 ml
Biotin (200mg/ml)	1 ml

Spurenelementelösung:	1 ml
$FeSO_4$	10 mg/l
$MnSO_4$	10 mg/l
$ZnSO_4$	1 mg/l
$CuSO_4$	0,2 mg/l
$NiCl_2$ x 6 H_2O	0,02 mg/l
H_3BO_3	0,09 mg/l
$CoCl_2$ x 6H_2O	0,06 mg/l
$NaMoO_4$ x 2 H_2O	0,009 mg/l

Tab. 2.1.6.: Kultivierungsbedingungen von *C. glutamicum* pEKEx2*AspCproA* zur Synthese von (S,S)-Monatin; von Cargill entwickelt

Vorkultur I		
5 ml LB-Medium + 200 µl Glucose (50%) + Kanamycin	Animpfen von Platte	
Vorkultur II		
50 ml LB-Medium + 2 ml Glucose (50%) + Kanamycin	1-2 ml aus Vorkultur I	
Hauptkultur		
Animpfen		
50 ml MMI-Medium + Kanamycin	OD_{600} 0,1 aus Vorkultur II	
Induktion		
bei OD_{600} 0,5	IPTG (1 M)	50 µl
	Balchs Vitamin-Mix (1000x)	100 µl
	Pyridoxolhydrochlorid (50 mM)	500 µl
1. Zugabe		
3 Stunden nach Induktion	Tryptophan	0,5 g
	Natriumpyruvat (200 g/l)	3,75 ml
	Pyridoxalphosphat (20 mM)	100 µl
	Natriumdecanoat (0,1 M)	1,25 ml
	Tween 20 (20 % w/v)	500 µl
2. Zugabe		
24 Stunden nach Induktion	Tryptophan	0,5 g
	Natriumpyruvat	0,75 g

Tab. 2.1.7.: In dieser Arbeit optimierte Kultivierungsbedingungen von *C. glutamicum* pEKEx2*AspCproA* zur Synthese von (S,S)-Monatin

Vorkultur I		
5 ml LB-Medium + 200 µl Glucose (50%) + Kanamycin	Animpfen von Platte	
Vorkultur II		
20 ml LB-Medium + 2 ml Glucose (50%) + Kanamycin	1 ml aus Vorkultur I	
Hauptkultur		
Animpfen		
20 ml MMI-Medium + Kanamycin	OD_{600} 0,5 aus Vorkultur II	
Induktion		
bei OD_{600} 3	IPTG (1 M)	20 µl
	Balchs Vitamin-Mix (1000x)	40 µl
	Pyridoxolhydrochlorid (50 mM)	200 µl
1. Zugabe		
3 Stunden nach Induktion	Tryptophan (50mM)	2 ml
	Natriumpyruvat (200 g/l)	1,5 ml
	Pyridoxalphosphat (20 mM)	40 µl

Tab. 2.1.8.: Zusammensetzung des CgXII-Mediums

Substanz	Konzentration
Stammlösung:	900 ml
(NH_4SO_4)	10 g/l
Harnstoff	5 g/l
MOPS	21 g/l
$MgSO_4$ (1M)	2 ml/l
$CaCl_2$ (0,1M)	1 ml/l
Kaliumacetat	5 g/l
KH_2PO_4	1 g/l
K_2HPO_4	1 g/l
Einstellen des pH-Werts mit NaOH auf 7,0	
Auffüllen mit H_2O_{dd} auf 900 ml	
Autoklavieren der Lösung	
Glukose (50%)	80 ml
Biotin (200mg/ml)	1 ml
Spurenelementelösung:	2,22 ml

$FeSO_4$	10 mg/l
$MnSO_4$	10 mg/l
$ZnSO_4$	1 mg/l
$CuSO_4$	0,2 mg/l
$NiCl_2$ x 6 H_2O	0,02 mg/l
H_3BO_3	0,09 mg/l
$CoCl_2$ x 6 H_2O	0,06 mg/l
$NaMoO_4$ x 2 H_2O	0,009 mg/l

Tab. 2.1.9.: Zusammensetzung des YT-Mediums

Substanz	Konzentration
Bactotrypton	16 g/l
Hefeextrakt	10 g/l
NaCl	5 g/l
Einstellen des pH-Werts mit NaOH auf 7,0	

2.2.3. Antibiotika

Zur Selektion auf die Antibiotikaresistenzen wurden die Antibiotika wie in Tabelle 2.1.10. aufgeführt verwendet. Für die Verwendung in Agarplatten wurde das Medium auf ca. 50℃ abgekühlt, bevor das Antibiotikum zugegeben wurde. Aus Haltbarkeitsgründen wurde anstelle von Ampicillin Carbenicillin verwendet.

Tab. 2.1.10.: In dieser Arbeit verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Lösungsmittel	Stammlösung	Endkonzentration
Carbenicillin	H_2O	100 mg/ml	100 µg/ml
Chloramphenicol	Ethanol	25 mg/ml	25 µg/ml
Kanamycin	H_2O	50 mg/ml	25 µg/ml
Tetracyclin	H_2O	15 mg/ml	15 µg/ml

Die Stammlösungen wurden steril filtriert und bis zum Gebrauch bei –20℃ gelagert.

2.3. Biochemische Techniken

2.3.1. Herstellung von Zellextrakten und Cytoplasmafraktionen

2.3.1.1. Aufschluss der Zellen im FASTPREP-Gerät

Zur Herstellung von Zellextrakten wurden 20ml *C. glutamicum*-Zellen standardmäßig (wie in 2.2.2. beschrieben) oder unter bestimmten Versuchsbedingungen kultiviert und zu gegebenem Zeitpunkt geerntet (4000 xg, 5 min, 4℃). Die Pellets wurden in jeweils 1ml 200mM Tris/HCl-Puffer pH8 resuspendiert und in vorgekühlte 2ml Cryoröhrchen mit Glasperlen (0,2 – 0,3 mm Durchmesser) gefüllt. Der Aufschluss erfolgte durch hochfrequentes Schütteln im FASTPREP-Gerät (FP120, QBIOGENE, Heidelberg) für 4 x 30 Sekunden bei einer Geschwindigkeit von 6,5 Meter pro Sekunde. Zwischen den Intervallen wurden die Röhrchen für 3 Minuten auf Eis gekühlt. Nach dem Zellaufschluss wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (13000 xg, 30 min, 4℃) sedimentiert. Der Überstand , die Zellextraktfraktion, wurde entweder abpipettiert und bei -20℃ weiter gelagert oder weiter aufgetrennt. Dafür wurden 200 µl entnommen und durch Ultrazentrifugation in die Cytoplasma- und die Membranfraktion getrennt (60000 xg, 20 min, 4℃), w obei nur die Cytoplasmafraktion weiter verwendet wurde.

2.3.1.2. Aufschluss der Zellen in Silikonölröhrchen

Zur Herstellung von Zellextrakten wurden 20ml *C. glutamicum*-Zellen standardmäßig (wie in 2.2.2. beschrieben) oder unter bestimmten Versuchsbedingungen kultiviert. Die Silikonölröhrchen wurden folgendermaßen vorbereitet: Für jeden Messpunkt wurden drei 300µl Mikrozentrifugenröhrchen (Beckman, Instruments GmbH, München) mit 30µl 20 % Perchlorsäure und 70 µl Silikonöl der Dichte d = 1,04 g/cm^3 (Wacker, Burghausen) beschickt und kurz in einer Microfuge E (Beckman Instruments GmbH, München) anzentrifugiert. Zum Messzeitpunkt wurden jeweils 200µl der Zellkultur in die Röhrchen gefüllt und abzentrifugiert. Vom Überstand wurden jeweils 150µl abgenommen, 30 min bei 4℃ und 14000 xg zentrifug iert und in HPLC-Messgläschen gefüllt. Zur Messung der internen Proben wurden die Röhrchen in der Mitte durchtrennt, alle drei Spitzen umgekehrt in ein 2ml Eppendorfgefäß gelegt und 1 min abzentrifugiert. Die beiden oberen Spitzen wurden heraus genommen und 135µl H_2O und 100µl Silikonöl der Dichte d = 1,06 g/cm^3 (Wacker, Burghausen) zugegeben. Es erfolgte damit ein Zellaufschluss im Ultraschallbad für

10 min. Die Lösung wurde anschließend mit 75µl KOH (5M)/Triethanolamin (1M) und kurzem Vortexen neutralisiert. Nach einer kurzen Inkubation auf Eis wurden die wasserlöslichen zellinneren Bestandteile durch Zentrifugation (30 min, 4℃, 14000 xg) vom Rest getrennt und ebenfalls in HPLC-Messgläschen überführt.

2.3.2. HPLC-Analyse von Zuckern, Aminosäuren und organischen Säuren

Über HPLC erfolgte die Bestimmung von Tryptophan, Indole-3-Pyruvat, (S,S)-Monatin, der verschiedenen Zucker und organischen Säuren. Zur Messung der Aminosäuren wurden die Anlagen Agilent HP1100 und VWR/Hitachi EliteLaChrom Serie mit angeschlossenem Fluoreszenzdetektor verwendet. Die Aminosäuren wurden durch Vorsäulenderivatisierung mit o-Phtaldialdehyd/Borat/2-Mercaptoethanol derivatisiert. Gemessen wurde dabei im Fluoreszenzdetektor. Die Auftrennung der Substanzen erfolgte über eine „reversed phase“-Vorsäule (Multospher 40x4mm von CS-Chromatographie) und anschließend über eine „reversed phase“-Hauptsäule (Nucleodur RP-18, 125x4mm, Macherey & Nagel). Die Zusammensetzung des Puffers der mobilen Phase und die Übersicht des Programms sind in Tabellen 2.1.11. und 2.1.12. dargestellt.

Tab.2.1.11.: HPLC-Programm zur Messung von Aminosäuren

Zeit [min]	% Puffer B	% Puffer D
1	5	95
11	20	80
14	30	70
19	75	25
21	100	0
23	5	95

Tab.2.1.12.: HPLC-Einstellungen zur Messung von Aminosäuren

Puffer B	Methanol : Acetonitril 1:1
Puffer D	40 mM NaOAc (pH 6.5), 0,06% NaN_3,
Fluss	0,8 ml/min
Ofentemperatur	35 ℃
Fluoreszenzdetektor	Ex: 230 nm, Em: 450 nm

Zur Messung von Zuckern und organischen Säuren wurde die Ionentauscher-Vorsäule (ChromCart 30x4mm CC30/4 Nucleogel Sugar 810-H, Macherey & Nagel) und die Ionentauscher-Hauptsäule (300x7,8mm Nucleogel Sugar 810H, Macherey & Nagel) verwendet. Detektiert wurde über einen UV/VIS- bzw. RI-Detektor. Als mobile Phase diente 0,01M H_2SO_4 im isokratischen Fluss mit 0,5ml/min bei 40℃ Ofentemperatur.

Die Integrale der gewünschten Peaks wurden über eine vom Programm automatisch erstellte Kalibrierungsgerade ermittelt. Für die externen Proben musste lediglich die Verdünnung berücksichtigt werden. Die internen Proben der Aminosäuren-Messung mussten noch auf das Trockengewicht der Zellen und die Verdünnung bezogen werden. Die Formel dazu war:

$$c[mM] = \frac{HPLC - Wert[\mu M] \cdot 300}{1{,}6[\frac{\mu l}{mg}] \cdot 0{,}35[\frac{mg}{ml}] \cdot OD_{600} \cdot 0{,}6[ml] \cdot 1000}$$

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

300 = Verdünnungsfaktor, der sich durch die Aufarbeitung ergibt

OD_{600} = optische Dichte der Kultur

0,35 = Trockengewicht-Relation von *C. glutamicum* bei OD=1

0,6 = Volumen der Probe

1,6 = Zellvolumen von *C. glutamicum*

2.3.3. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Bei der Bestimmung der Proteinkonzentration wurde sich der Färbemethode mit Coomassie *Brilliant Blue* G-250 nach Bradford bedient (Bradford, 1976). Zur Erstellung der Eichgeraden wurden 0,2, 0,5, 1, 5, 10, 20 und 200 µg Rinderserumalbumin (BSA) eingesetzt. Die verschiedenen Verdünnungen der Eichlösung wurden auf 200µl berechnet und mit 800µl Bradford-Stammlösung (Roti-Nanoquant, Roth, 5 x Konzentrat) aufgefüllt. Die zu messenden Proben wurden 1:40 in 200µl verdünnt und ebenfalls mit 800µl Bradford-Reagenz versetzt. Als Nullwert für die Eichgerade dienten 200µl dest. Wasser + 800µl Bradford-Reagenz. Zur Unterstützung der Bindung des Farbstoffs an die Proteine wurden die Proben

gemischt und ca. 2 Minuten stehen gelassen. Alle Proben wurden sowohl bei 590nm als auch 450nm gegen Wasser als Referenz gemessen. Die Auftragung des Quotienten 590nm/450nm gegen die Proteinmenge [µg] ergab anschließend die Eichgerade.

2.3.4. 1-D-SDS-Polyacrylamidelektrophorese (1-D-SDS-PAGE)

Zur Untersuchung der Lokalisierung von Proteinen wurden der Zellextrakt und die Cytoplasmafraktion auf 10%ige Polyacrylamid-Gele (1-D-SDS-PAGE) aufgetragen (Schägger und von Jagow, 1987). Durch den in den Gelen enthaltenen Harnstoff und SDS werden die Proteine denaturiert und im weiteren Verlauf aufgetrennt. Zur Probenvorbereitung wurden 10µg Protein in 12µl H_2O verdünnt, mit 3µl 5x Protein Ladepuffer versetzt und für 5 Minuten bei 95℃ geko cht. Nach kurzem Abzentrifugieren wurde der Überstand zusammen mit dem Protein-Marker (PageRuler, Prestained Protein Ladder, MBI Fermentas, Wilna) aufgetragen. Die als Laufpuffer verwendeten Kathoden- und Anodenpuffer sind in Tab. 2.1.13. aufgeführt. Die Elektrophorese wurde bei 50 Volt und maximaler Stromstärke gestartet und nach einer halben Stunde, wenn die Proben das Sammelgel durchlaufen hatten, auf 150 Volt erhöht.

Tab. 2.1.13.: Zusammensetzung der Puffer für SDS-Gele

A	Sammelgel	Trenngel
		5,4g Harnstoff
	500µl Acrylamid/Bisacrylamid (48%/1,5%)	4ml Acrylamid/Bisacrylamid (48%/1,5%)
	1,55ml Gelpuffer	5ml Gelpuffer
	4ml Wasser	1ml Wasser
kurz vor Benutzung	50µl 10%iges APS (Ammoniumpersulfat)	50µl 10%iges APS (Ammoniumpersulfat)
	5µl TEMED	5µl TEMED

B	Kathodenpuffer	Anodenpuffer
	0,1M Tris	0,2M Tris
	0,1M Tricine	pH (HCl) = 8,9
	0,1% SDS	

C	Gelpuffer	Gelladepuffer
	3M Tris	4% SDS
	1M HCl	12% (w/v) Glycerin
		50mM Tris
		2% Mercaptoethanol
		0,01% Servablau G
		pH (HCl) = 6,8

2.3.5. Färbung mit Coomassie *Brilliant Blue*

Die auf dem SDS-Gel aufgetrennten Proteine wurden mit Coomassie *Brilliant Blue* nach Sambrook *et al*. (1989) sichtbar gemacht. Dafür wurden die Gele für 1 Stunde bei Raumtemperatur in Färbelösung eingelegt und anschließend in 10%iger Essigsäure über Nacht entfärbt. Zur Lagerung wurden die Gele in Folie eingeschweißt.

Tab. 2.1.14.: Zusammensetzung der Färbelösung

Färbelösung
45% Methanol
10% Essigsäure
0,2% Coomassie *Brilliant Blue* G-250

2.3.6. Bestimmung der Aminosäure- bzw. Zuckeraufnahme

Zur Bestimmung der Aufnahme von Aminosäuren bzw. Zuckern wurde der gewünschte Stamm zuerst in BHI und anschließend in MMI-Medium vorkultiviert. Die Zellen wurden erneut in frischem MMI-Medium auf eine OD_{600} von 2 eingestellt und bei 30℃ geschüttelt bis sie eine OD_{600} von ca. 5-6 erreichten. Dann wurden die Zellen abzentrifugiert (4000rpm, 4℃, 10min) und zweimal mit MES/TRIS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde eine OD_{600} von 3-4 eingestellt und den Zellen bei der Messung der Aminosäureaufnahme 10mM Glukose zur Energetisierung zugegeben. Bis zur Messung wurden sie auf Eis gelagert. Die Aufnahme wurde durch die Zugabe von entsprechenden radioaktiv markierten Substanzen bestimmt. Die verschiedenen gemessenen Substanzen und ihre spezifischen Aktivitäten sind in Tab. 2.1.15. aufgeführt.

Tab. 2.1.15.: Zusammensetzung des MES/TRIS-Puffers und spezifische Aktivitäten der radioaktiv markierten Substanzen

MES/TRIS-Puffer (500ml)	
MES	4,88g
TRIS	3,03g
NaCl	0,29g
KCl	0,37g
pH(NaOH) = 8	
mit H_2O auf 500 ml auffüllen	

Spezifische Aktivitäten		
Substanz	**spez. Akt.**	**Firma**
L-[^{14}C]-Tryptophan	74,92 MBq/mmol	Moravek
D-[^{14}C-(U)]-Fruktose	510 MBq/mmol	Amersham
D-[^{14}C-(U)]-Glukose	485 MBq/mmol	Moravek
D-[^{14}C-(U)]-Saccharose	1,05 GBq/mmol	Amersham
D-[^{14}C-(Fruktose)]-Saccharose	353 MBq/mmol	BioTrend

Zu Beginn der Messung wurden 2ml Zellsuspension in ein Rührgefäß gegeben und im Wasserbad für 3min inkubiert. Die Transportmessung wurde gestartet, indem 20µl der zu messenden Substanz in verschiedenen Konzentrationen zugegeben wurde. Je nach Versuchsaufbau wurden Proben von 5 Sekunden bis 23 Minuten genommen. Für Aufnahmemessungen waren die Zeitpunkte 5, 15, 25, 35, 45 und 55 Sekunden. Die „steady state“-Messung erfolgte bei 6,7 und 8 Minuten, und bei den „pulse-chase“-Experimenten wurde nach 8 Minuten Inkubation mit dem radioaktiv markierten Zucker der kalte Zucker zugegeben und der Export bis 23 Minuten verfolgt.

Die 200µl entnommene Probe wurde auf Glasfaserfilter (Millipore, Eschborn) pipettiert und durch eine Vakuum-Mehrfachfiltrationsanlage die Zellen vom Überstand getrennt. Nach zweimaligem Waschen mit 2,5ml 0,1M LiCl-Lösung wurden die Filter in Szintillationsgefäße überführt, mit 3,8ml Szintillationslösung (Ecoszint, Roth, Karlsruhe) gefüllt und geschüttelt. Die Radioaktivität wurde in einem Flüssig-Szintillationszähler (LS 6500, Beckman Instruments GmbH, München) über den Zerfall pro Minute (dpm) ermittelt. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität wurde eine 200µl-Probe direkt ohne Filtration gemessen. Zur Auswertung wurde die Aufnahmegeschwindigkeit [nmol/mg Trockengewicht] gegen die Zeit [sec] aufgetragen und aus dem linearen Teil die Aufnahmerate in nmol/mg Trockengewicht * min berechnet. Die Berechnung erfolgte nach der Formel:

$$c[\frac{nmol}{mgTG}] = \frac{dpm_{Probe} \cdot Stoffmenge[\mu mol] \cdot 1000}{dpm_{Gesamt} \cdot 0{,}35[\frac{mg}{ml}] \cdot OD_{600} \cdot 0{,}2[ml]}$$

dpm = Zerfälle pro Minute in einer Probe bzw. im Gesamtansatz

Stoffmenge = Stoffmenge in 200µl Probenvolumen

OD_{600} = optische Dichte der Kultur

0,35 = Trockengewicht-Relation von *C. glutamicum* [mg/ml OD=1]

0,2 = Volumen der Probe [ml]

2.3.7. Bestimmung der MIC-Werte

Die minimalen inhibitorischen Konzentrationen wurden in Mikrotiterplatten bestimmt. Dazu wurde der Stamm *C. glutamicum* ATCC13032 wie in 2.2.2. beschrieben vorkultiviert. Es wurden Mikrotiterplatten mit F-Profil der Firma Roth (Rotilabo-Mikrotest-Platten) verwendet. In die erste Reihe wurden 100 µl der Zellkultur mit einer OD_{600} von 0,2 bzw. in die Reihen 2-11 mit einer OD_{600} von 0,1 pipettiert. In die erste Reihe wurden zusätzlich 100 µl der Toxinlösung gegeben und mit der Zellkultur vermischt. Aus dieser Mischung wurden mit einer Mehrkanalpipette (Eppendorf) 100 µl entnommen und mit die zweite Reihe vermischt. Dies wurde bis zu Reihe 11 fortgesetzt. So entstand eine Verdünnungsreihe mit der höchsten Konzentration in der ersten Reihe. In Reihe 12 befanden sich 200 µl Zellkultur als Kontrolle ohne Toxinlösung. Zuletzt wurden noch 100 µl Zellkultur in die Reihen 1-11 gegeben, um ein Gesamtvolumen von 200 µl pro Vertiefung zu erreichen. Die Mikrotiterplatten wurden mit einer sauerstoffdurchlässigen Folie (Breathe-Easy, Roth) abgedichtet und 24 h auf einem Schüttler (Titramax 101, Heidolph) bei 1200 rpm und 30℃ inkubiert. Die OD_{600} wurde mit dem Victor 1420 Multilabel counter, Wallac einmal zu Beginn und einmal nach 24 Stunden gemessen.

2.4. Molekularbiologische Techniken

2.4.1. Plasmidpräparation aus *E. coli*

Die Vorkultivierung der Zellen wurde wie in 2.2.1. beschrieben durchgeführt. Für die Plasmid-Mini-Präparation wurde das NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey & Nagel, Düren) verwendet. Die abschließende Elution erfolgte in 50µl H_2O.

2.4.2. Plasmidpräparation aus *C. glutamicum*

Die Vorkultivierung der Zellen wurde wie in 2.2.2. beschrieben durchgeführt. Es wurden 2ml Übernachtkultur abzentrifugiert und das Pellet in 500µl Puffer A1

(Resuspension buffer), der 15mg/ml Lysozym enthielt, resuspendiert. Der Ansatz wurde anschließend 90 Minuten bei 37℃ geschüttelt. Im weiteren Verlauf wurden von den verwendeten Puffern immer die doppelte Menge eingesetzt. Es wurde das NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey & Nagel, Düren) verwendet. Die Elution erfolgte ebenfalls in 50µl H_2O.

2.4.3. Präparation chromosomaler DNA aus *C. glutamicum*

Die Zellen wurden wie in 2.2.2. beschrieben kultiviert. 2ml der Kultur wurden abzentrifugiert (4000 rpm, 5min, 4℃) und in 200 µl H_2O resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Phenol und gutem Mischen wurde 10 Minuten bei 65°C geschüttelt. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 2 Minuten, wonach 200 µl Chloroform zugegeben wurden. Das Gemisch wurde gut gevortext und zentrifugiert (14000 rpm, 5min, 4℃). Die obere, wässrige, Phase, in der sich die DNA befindet, wurde abgenommen, in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 200 µl kaltem Chloroform versetzt. Nach vorsichtigem Mischen wurde erneut zentrifugiert (14000 rpm, 5min, 4℃) und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die DNA wurde 1:20 verdünnt und für eine anschließende PCR 1 µl davon verwendet.

2.4.4. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Zur Größenauftrennung und Qualitäts- sowie Quantitätsbestimmung von Nukleinsäuren wurden diese in Agarosegelen aufgetrennt. Die Konzentration betrug 0,8% (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer (Sambrook *et al*. (1989)). Die Proben wurden vorher mit 6x Ladepuffer (Sambrook *et al*. (1989) versetzt und zusammen mit einem Standard (GeneRuler, 1kb ladder, MBI Fermentas, Wilna) auf ein Gel aufgetragen. Es wurde mit einer Spannung von 10V/cm Gellänge belegt. Nach vollendeter Auftrennung wurde das Gel in einem Ethidiumbromidbad eingefärbt und in einem Image Master VDS (Amersham Biosciences, Freiburg) dokumentiert.

Tab. 2.1.16.: Zusammensetzung des TAE-Puffers und des 6x Ladepuffers

TAE Puffer 50x	Ladepuffer 6x
242g Tris	0,25% Bromphenolblau
75,1ml Eisessig	0,25% Xylencyanol FF
100ml 0,5M EDTA	30% (w/v) Glycerin
pH (HCl) = 8,0	
Auffüllen H_2O_{bidest} auf 1000ml	

2.4.5. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung der DNA-Banden aus einem Agarosegel erfolgte über das NucleoSpin Extract Kit (Macherey & Nagel, Düren). Die DNA wurde abschließend in 15µl H_2O eluiert.

2.4.6. Restriktion von DNA

In dieser Arbeit wurden verschiedene Restriktionsenzyme verwendet, die entweder von Fermentas oder von New England Biolabs (NEB, Frankfurt/Main) bezogen wurden. Die Restriktionen wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Inkubation erfolgte für 2 Stunden bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur. Anschließend wurden die Restriktionsansätze auf einem Agarosegel aufgetrennt (siehe Abschnitt 2.4.4.) und gegebenenfalls extrahiert (siehe Abschnitt 2.4.5.). Ein Restriktionsansatz zur Kontrolle ist in Tab. 2.1.17. aufgeführt.

Tab. 2.1.17: Zusammensetzung eines Restriktionsansatzes

Restriktionsansatz	
10x Puffer	2µl
Enzym	1µl
Plasmid	2µl
H_2O	15µl

2.4.7. Ligation von DNA-Fragmenten

Für Ligationen mit dem Vektor pDrive wurde das PCR cloning Kit (Qiagen, Hilden) verwendet, wobei wieder nach Angaben des Herstellers gearbeitet wurde.

Für Ligationen mit allen anderen Vektoren wurde die T4 DNA Ligase (NEB, Frankfurt/Main) mit eigenem Puffer verwendet. Dabei wurden in der Regel 1µl Vektor und 3µl Fragment eingesetzt.

Tab. 2.1.18.: Zusammensetzung der Ligationsansätze

Ligationsansatz	
10x Puffer	2µl
Vektor	1µl
Fragment	3µl
T4 DNA Ligase	1µl
H_2O	13µl

Ligationsansatz	
2x Puffer inkl. Ligase	5µl
pDrive	1µl
Fragment	3µl
H_2O	1µl

2.4.8. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung von DNA wurde die Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt. Die dabei verwendeten Oligonukleotide wurden von Operon (Köln) bezogen und in einer Konzentration von 50nM eingesetzt. Zur Herstellung von knockout-Mutanten wurde routinemäßig die *Taq*-Polymerase (enthalten im Master-Mix Kit 5' Prime (VWR)) verwendet. Für die Herstellung von Überexpressionsmutanten wurde entweder die Phusion-Polymerase (enthalten im High-Fidelity-PCR Kit von NEB, Frankfurt/Main) verwendet oder eine Mischung aus *Taq*-Polymerase und einer High-Fidelity-Polymerase mit „proofreading"-Aktivität (enthalten im Long PCR Enzyme Mix von Fermentas). Die Annealing-Temperatur wurde nach der Häufigkeit des Guanin/Cytosin bzw. Adenin/Thymin-Gehalts berechnet: für die Trennung von GC-Bindungen wurden 4℃ berechnet, für die Trennung von AT-Bindungen 2℃. Die PCR-Reaktion wurde in den Thermocyclern Mastercycler® gradient (Eppendorf, Hamburg) oder Flexcycler (AnalytikJena, Jena) durchgeführt.

Im Folgenden sind die gängigen Ansätze und die dazu gehörigen Programme zusammen gefasst.

Tab. 2.1.19.: Zusammensetzung der verschiedenen PCR-Ansätze

A PCR-Ansatz	
Master Mix, 2.5x	4µl
Primer forward	1µl
Primer reverse	1µl
DNA	1µl
H_2O	3µl

PCR-Programm			
init. Denaturierung		5 min	94℃
Denaturierung	a	30 sec	94℃
Annealing	b	30 sec	52℃
Elongation	c	90 sec	72℃
a - c	30 x		
Elongation		10 min	72℃
Kühlung		-	4℃

B PCR-Ansatz	
Puffer	10µl
Primer forward	3µl
Primer reverse	3µl
10mM dNTPs	1µl
Phusion	0,5µl
DNA	1µl
H_2O	32µl

PCR-Programm			
init. Denaturierung		30 sec	98℃
Denaturierung	a	10 sec	98℃
Annealing	b	30 sec	48℃
Elongation	c	60 sec	72℃
a - c	30 x		
Elongation		10 min	72℃
Kühlung		-	4℃

C PCR-Ansatz	
10x Puffer + $MgCl_2$	4µl
Primer forward	2µl
Primer reverse	2µl
10mM dNTPs	1µl
Enzyme Mix	0,25µl
DNA	0,6µl
H_2O	30,15µl

PCR-Programm			
init. Denaturierung		2 min	94℃
Denaturierung	a	15 sec	95℃
Annealing	b	30 sec	48℃
Elongation	c	2 min	68℃
a - c	31 x		
Elongation		10 min	68℃
Kühlung		-	4℃

2.4.9. DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung von Plasmid-DNA wurden 5 µl Probe mit 1 µl Primer (10 µM) verdünnt und ins Servicelabor des Zentrums für Molekulare Medizin (ZMMK), Universität zu Köln, gegeben. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit den Programmen Sci Ed Central for Windows 95 (Scientific & Educational Software, Cary, USA) und Chromas Lite Version 2.0 (Technelysium, Tewantin, Australien) ausgewertet.

2.5. Techniken zur Manipulation von Zellen

2.5.1. Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Chemisch kompetente *E. coli*-Zellen wurden nach Inoue *et al*. (1990) hergestellt. Dafür wurden die Zellen zunächst in 5ml LB-Medium vorkultiviert. 3ml der Vorkultur wurden verwendet, um 250ml SOB-Medium (Sambrook *et al*. (1989)) in einem 2l-Kolben mit Schikanen anzuimpfen. Die Kultur wurde bei Raumtemperatur über Nacht geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden die 250ml auf 50ml „Falcon tubes“ verteilt, auf Eis gekühlt und schließlich bei 4000rpm und 4℃ 5 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde in jeweils 20ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und die Zellen so insgesamt zweimal gewaschen. Abschließend wurde das Pellet in 20ml TB-Puffer resuspendiert und tropfenweise 1,4ml DMSO zugefügt. Nach einer erneuten 10minütigen Inkubation auf Eis wurde die Zellsuspension in 100µl-Aliquots auf vorgekühlte Eppendorfgefäße verteilt, in flüssigem Stickstoff tief gefroren und bei –80℃ gelagert.

Tab. 2.1.20.: Zusammensetzung des SOB-Mediums und des TB-Puffers

SOB-Medium		TB-Puffer	
Trypton	5g	PIPES	10mM
Hefeextrakt	1,25g	$CaCl_2$	15mM
NaCl	0,125g	KCl	250mM
KCl (1M)	625µl	$MnCl_2$	55mM
auf 250ml mit H_2O_{bidest} auffüllen		pH (KOH) = 6,7	
autoklavieren			
$MgCl_2$ (2M)	500µl		

2.5.2. Transformation von *E. coli*-Zellen

Zur Transformation wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, mit 3µl Plasmid versetzt und für 45 Minuten auf Eis stehen gelassen. Nach einem Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42℃ wurden die Zellen noch 15 Minuten auf Eis inkubiert, um sie anschließend mit 600µl LB-Medium zu mischen und 1 Stunde bei 37℃ regenerieren zu lassen. Schließlich wurden die Zellen bei 11000 rpm 1 Minute abzentrifugiert, im Rückfluss resuspendiert und auf Platten mit geeignetem Antibiotikum ausgestrichen. Zur Blau-Weiß-Selektion wurden auf den Platten noch 60µl XGal (40mg/ml in DMF) und 15µl IPTG (100mM in H_2O) mit ausgestrichen.

2.5.3. Herstellung kompetenter *C. glutamicum*-Zellen

Elektrokompetente Zellen von *C. glutamicum* wurden nach Liebl *et al*. (1989) hergestellt. Dafür wurden die Zellen zunächst in BHI-Medium vorkultiviert. Mit der Vorkultur wurden zweimal je 100ml LB-Medium + Wachstumsinhibitoren in einem 2l-Kolben mit Schikane auf eine OD_{600} von ca. 0,3 angeimpft und bei Raumtemperatur 28 Stunden schütteln gelassen. Bei einer OD_{600} von ungefähr 1 wurden die Zellen in 50ml „Falcon tubes“ überführt und bei 4000rpm und 4℃ für 10 Minuten abzentrifugiert. Es wurde anschließend viermal mit 20ml eiskaltem 10%igem Glycerol gewaschen. Nach dem letzten Waschgang wurden je zwei Fraktionen vereinigt und in je 0,5ml eiskaltem 1%igem Glycerol resuspendiert. 75µl-Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80℃ bis zur Verwendung gelagert.

Tab. 2.1.21.: Zusammensetzung des LB-Mediums mit Wachstumsinhibitoren

200ml	LB-Medium	+
Trypton	2g	
Hefeextrakt	1g	
NaCl	1g	
autoklavieren		
Isoniazid	0,8g	
Glycin	5g	
Tween80	200µl	

2.5.4. Elektroporation von *C. glutamicum*-Zellen

Zur Elektroporation der kompetenten *C. glutamicum*-Zellen wurden 3µl des zu transformierenden Plasmids zu den Zellen pipettiert und diese auf Eis auftauen gelassen. Zur Erhöhung der Effektivität der Elektroporation wurde das Plasmid vorher durch „Schwimmfilterdialyse“ entsalzt. Dafür wurden 5µl des Plasmids auf die glänzende Seite eines in einer Petrischale mit H_2O_{bidest} schwimmenden Nitrocellulosefilters (0,025µm, White VSWP, 13mm, Millipore, Eschborn) gelegt und 15 Minuten inkubiert. Anschließend konnte das entsalzte Plasmid zu den Zellen pipettiert werden. Die Zellsuspension wurde in eine Elektroporationsküvette mit einem Elektrodenabstand von 2mm überführt (peQLab, Erlangen) und in einem Micro-Pulser (Biorad) mit 2,5 kV (Programm Ec2) elektroporiert. Sofort danach wurde 1ml BHIS-Medium (BHI-Medium mit 0,5M Sorbitol) hinzu gefügt und bei 30℃ ca. 2 Stunden schütteln gelassen. Abschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (4000rpm, 30℃, 2min) und auf BHI-Platten mit geeig netem Antibiotikum ausplattiert.

2.5.5. Konstruktion von Insertionsmutanten

Zur Konstruktion von Insertionsmutanten wurde das Mittelstück des gewünschten Gens amplifiziert und in den Vektor pDrive (Qiagen, Hilden) ligiert. Das Mittelstück sollte wenigstens eine Länge von 500bp besitzen, um die homologe Rekombination zu gewährleisten, während die nicht amplifizierten Flanken mindestens 100 bp umfassen sollten. Die Amplifizierung erfolgte mit dem Master Mix mit der *Taq*-Polymerase (siehe 2.4.8.), da diese 3’-A-Überhänge generiert. Das Plasmid pDrive besitzt 5’-U-Überhänge, wodurch ein optimales AU-cloning erzielt wird. Nach der Amplifizierung wurden der Ansatz über ein Agarosegel gereinigt und mit pDrive ligiert

(siehe 2.4.7.). Der Ligationsansatz wurde anschließend in *E.coli*-Zellen transformiert, um dann über eine Plasmidpräparation das Plasmid zu erhalten. Dieses wurde in kompetente *C. glutamicum*-Zellen elektroporiert und die Klone per PCR überprüft. Dafür wurde ein Primer verwendet, der ca. 100 bp upstream des gewünschten Gens liegt und mit einem in pDrive bindenden Primer (M13 for und M13 rev) kombiniert. Nur eine der beiden Kombinationen darf ein Produkt ergeben.

2.5.6. Konstruktion von Überexpressionsmutanten

Zur Konstruktion von Überexpressionsmutanten wurden die Primer mit ca. 18 bp Länge direkt an den Anfang und das Ende des gewünschten Gens gelegt. Gegebenenfalls wurde zusätzlich eine Schnittstelle angefügt. Es musste darauf geachtet werden, dass das Konstrukt *in frame* mit der Gensequenz ist. Die Amplifizierung erfolgte entweder mit der Phusion-Polymerase oder mit dem Long-PCR-Enzyme-Mix (siehe 2.4.8.). Die Sequenzierung zur Verifizierung des Produkts wurde vom Servicelabor des Zentrums für Molekulare Medizin (ZMMK) der Universität zu Köln durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit den Programmen Sci Ed Central for Windows 95 (Scientific & Educational Software, Cary, USA) und Chromas Lite Version 2.0 (Technelysium, Tewantin, Australien) ausgewertet.

2.6. Bioinformatische Ansätze

Die Datenbanksuche nach homologen Sequenzen wurde online bei verschiedenen „Websites“ durchgeführt. Zur Suche eines Gens innerhalb des *C. glutamicum*-Genoms wurden die „Websites“: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi? oder http://gib.genes.nig.ac.jp verwendet. Bei der Ähnlichkeitssuche von *C. glutamicum*-Sequenzen zu Genen anderer Organismen wurde das „Blast-Tool“ von NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) und www.coryneregnet.de verwendet. Um die in verschiedenen Organismen vorhandenen Membran-Transporterproteine zu vergleichen, wurde die Seite http://www.membranetransport.org/ genutzt. Zur Vorhersage der vorhandenen Transmembrandomänen wurde die Seite www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/ vom Center for biological sequence analysis verwendet.

III. Ergebnisse

3.1. Untersuchungen zum Export von Fruktose

C. glutamicum kann eine Vielzahl von Zuckern metabolisieren, so auch Saccharose. Nachdem die Saccharose über das PTS^{Suc}–System aus dem Medium aufgenommen und dabei phosphoryliert wurde, wird sie durch die Saccharose-6-Phosphat Hydrolase gespalten, und es entsteht Glukose-6-Phosphat und Fruktose. Da *C. glutamicum* keine Fructokinase besitzt, muss die Fruktose wieder exportiert werden, um dann über das PTS^{Fru}-System wieder aufgenommen und gleichzeitig phosphoryliert zu werden (Abb.3.1.1.). Der dafür zuständige Exporter ist noch nicht bekannt. Dessen Charakterisierung und Identifizierung war ein Ziel dieser Arbeit.

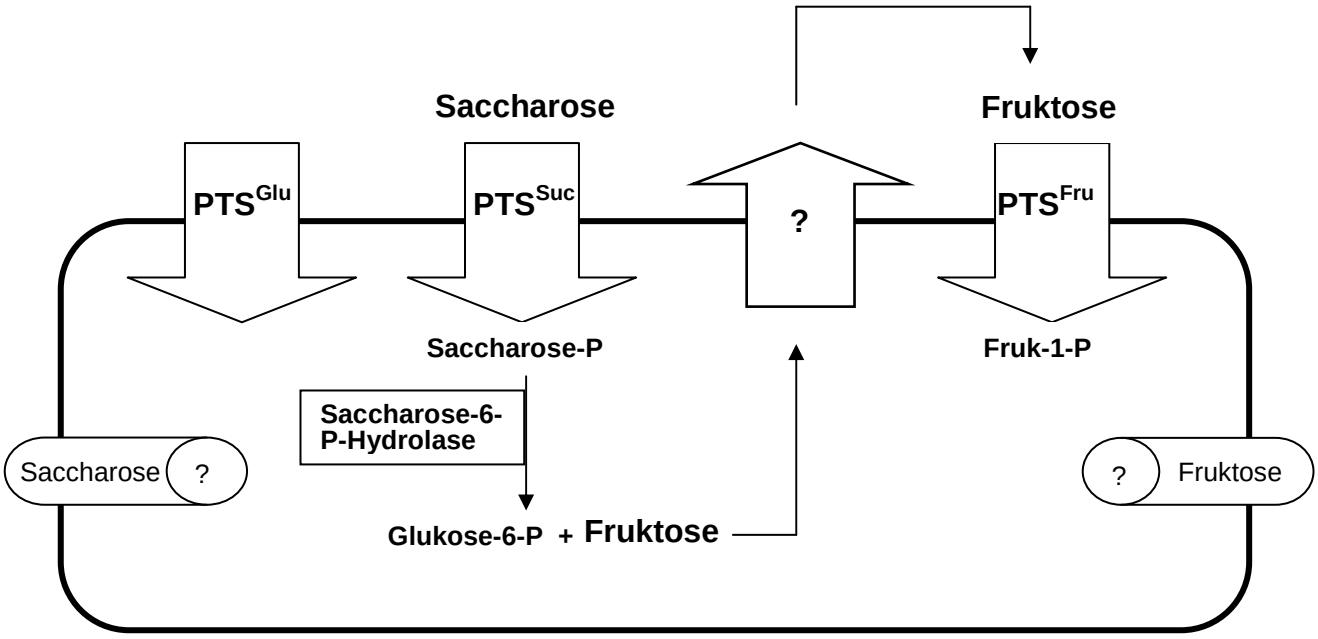

Abb. 3.1.1. Schema der Saccharose- und Fruktose-Aufnahme in *C. glutamicum*; Saccharose wird aufgenommen, gleichzeitig an der Glukose phosphoryliert und anschließend gespalten; da C. glutamicum keine Fructokinase besitzt, muss die Fruktose zunächst exportiert werden, um sie dann über das PTS^{Fru}-System phosphoryliert wieder aufzunehmen

Für die meisten Untersuchungen wurde ein *C. glutamicum*-Stamm verwendet, dessen PTS^{Fru}-System deletiert worden war (ΔPTS^{Fru}). Die exportierte Fruktose kann daher nicht mehr aufgenommen werden (Abb.3.1.1.), akkumuliert im Medium und kann so gemessen werden. Um den Export zu untersuchen müssen allerdings zunächst der Import von Saccharose und Fruktose verstanden werden.

3.1.1. Untersuchungen zur Aufnahme von Saccharose und Fruktose

3.1.1.1. Wachstum auf Glukose und Saccharose

Um die Auswirkungen des eingeschränkten Fruktose-Metabolismus‘ von *C. glutamicum* zu quantifizieren, wurde das Wachstum auf Saccharose und Fruktose verglichen. Da die ΔPTS^{Fru}-Mutante die exportierte Fruktose nicht wieder aufnehmen kann, fehlt ihr dieser Anteil an Kohlenstoffquelle zum Wachsen. Sie sollte ein geringeres Wachstum aufweisen.

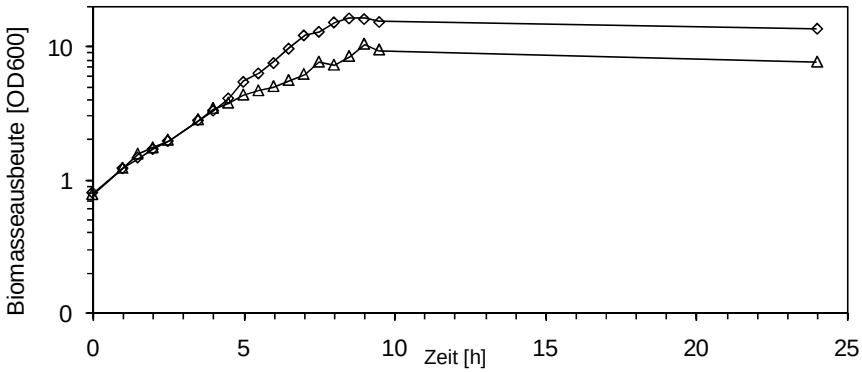

Abb. 3.1.2. Wachstum von *C. glutamicum* ΔPTS^{Fru} (Δ) und *C. glutamicum* ATCC 13032 (◊) in MMI mit 25 mM Saccharose

In den ersten 5 Stunden wachsen beide Stämme gleich schnell (µ ATCC13032 = 0,7; µ ΔPTS^{Fru}= 0,69). Es ist allerdings deutlich zu erkennen, dass der ΔPTS^{Fru}-Stamm nach etwa 5 Stunden das Wachstum verlangsamt und bei einer OD_{600} von etwa 8 in die stationäre Phase eintritt, während der Wildtyp bis zu einer OD_{600} von etwa 16 weiter wächst. Der ΔPTS^{Fru}-Stamm, der nur die Glukose als Kohlenstoffquelle nutzen kann, erreicht also erwartungsgemäß eine niedrigere Zellzahl.

Da sich Mikrotiterplatten sehr gut für Screenings eignen, wurden die Wachstumsversuche darin wiederholt. Die ersten Wachstumsexperimente wurden nur mit dem ΔPTS^{Fru}-Stamm und jeweils 2 % Glukose (111 mM), 2 % Saccharose (58,5 mM) und 2 % Fruktose (111 mM) durchgeführt. Von der selben Kultur wurden unter den gleichen Bedingungen auch Kolben angeimpft. Die jeweiligen Biomasseausbeuten nach 24 Stunden sind in Abbildung 3.1.3. dargestellt:

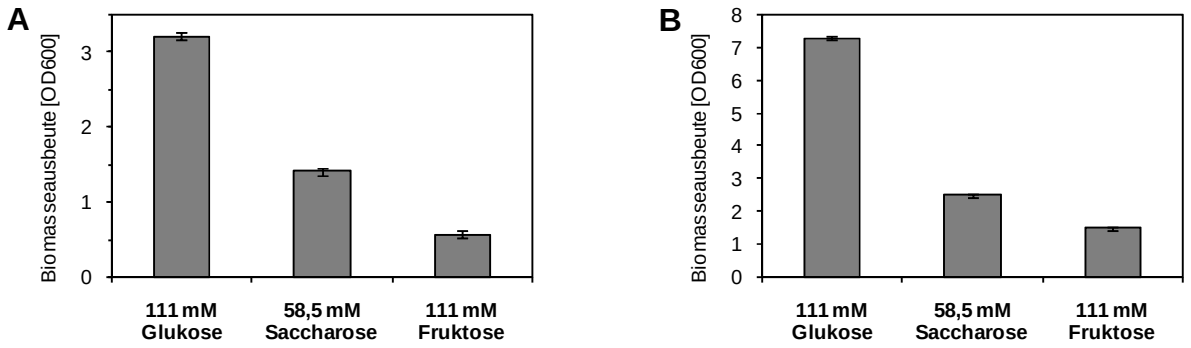

Abb. 3.1.3. *C. glutamicum* ΔPTS^{Fru} in MMI + 2% Zucker: 111 mM Glukose, 58,5 mM Saccharose, 111 mM Fruktose; Biomasseausbeuten nach 24 Stunden; **A:** in Mikrotiterplatten, **B:** in Kolben

Es ist zu erkennen, dass die Kultur mit 58,5 mM Saccharose sowohl in Mikrotiterplatten als auch in Kolben erwartungsgemäß deutlich weniger gewachsen ist wie die mit 111 mM Glukose. Es war allerdings noch ein Restwachstum der mit 111 mM Fruktose versehenen Kultur zu beobachten.
Für die Analyse des Exports ist zunächst die Quantifizierung des Imports notwendig, da die Aufnahme von Saccharose und der Export von Fruktose eng gekoppelt sein sollten (Abb.3.1.1.).

3.1.1.2. Aufnahmemessungen von Saccharose und Fruktose

Durch Aufnahmemessungen mit radioaktiv markierter Fruktose konnte gezeigt werden, dass der Stamm *C. glutamicum* ΔPTS^{Fru} in der Messzeit von 60 Sekunden keine Fruktose aufnimmt. Beim Wildtyp wurde unter Verwendung von 50 µM radioaktiv markierter Fruktose eine Aufnahmerate von 17 nmol/mgTG*min berechnet.

Zusätzlich wurde die Aufnahmerate von unspezifisch radioaktiv markierter Saccharose [U-^{14}C] im *C. glutamicum* ΔPTS^{Fru}-Stamm gemessen. Es wurden Konzentrationen von 10 µM bis 200 µM Saccharose verwendet und festgestellt, dass die Aufnahmerate ab 50 µM in eine Sättigung übergeht.

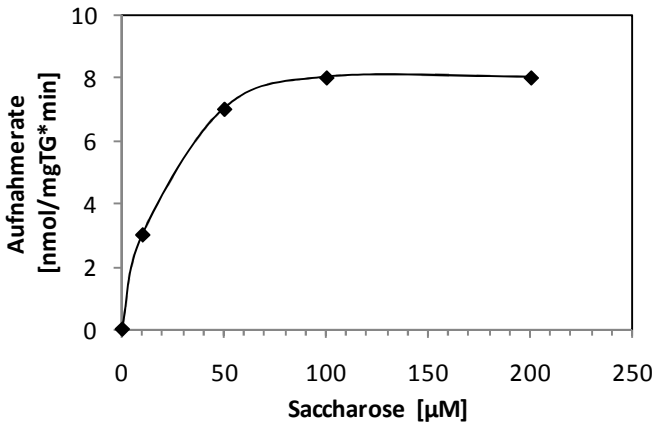

Abb. 3.1.4. Aufnahme von Saccharose [U-^{14}C] in *C. glutamicum* ΔPTS^{Fru} in Abhängigkeit von der Saccharose-Konzentration

Für folgende Messungen wurden daher immer 50 µM Saccharose verwendet.

Für den Wildtyp wurde unter Verwendung von 50 µM Saccharose [U-^{14}C] eine Aufnahmerate von 15,8 ± 1,2 nmol/mgTG*min bestimmt, während die Rate für den ΔPTS^{Fru}-Stamm bei 7,1 ± 0,3 nmol/mg TG*min lag.

Um ein optimales Messsystem zu etablieren, sollte die Saccharose-Aufnahme maximal sein. Da bekannt ist, dass die Expression des Gens des Saccharose-Importers induzierbar ist (Moon, 2005), wurde die Saccharose-Aufnahme bei Wachstum auf verschiedenen C-Quellen untersucht. Dazu wurde *C. glutamicum* ATCC 13032 auf Saccharose, Glukose und Acetat vorkultiviert und anschließend die Saccharose-Aufnahme gemessen.

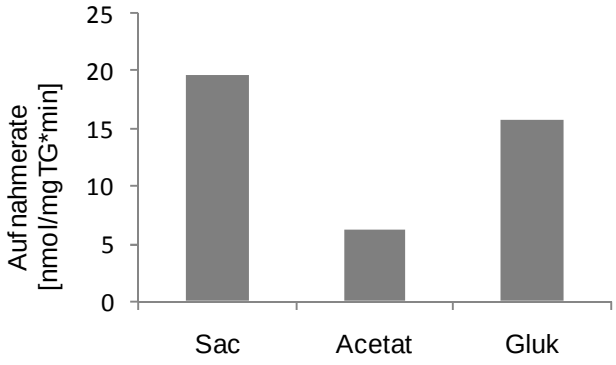

Abb. 3.1.5. Saccharose-Aufnahme in *C. glutamicum* ATCC 13032 bei 50 µM Saccharose [U-^{14}C]; Vorkultur erfolgte auf Saccharose, Acetat oder Glukose

Die Induzierbarkeit des Saccharose-Importers wird hier sehr deutlich. Auf Glukose gewachsen beträgt die Aufnahmerate 15,8 nmol/mgTG*min, während sie auf Saccharose gewachsen auf 19,7 nmol/mgTG*min erhöht ist. Am niedrigsten ist sie mit 6,2 nmol/mgTG*min, wenn die Zellen auf Acetat vorkultiviert wurden.

Es konnte zusätzlich in einem anderen Experiment bewiesen werden, dass das Gen des Saccharose-Importers induziert wird. Dazu wurden die Saccharose [U-^{14}C]-Aufnahmeraten 5 Minuten nach Zugabe von Chloramphenicol bei einer Kultur *C. glutamicum* ΔPTS^{Fru} bei Glukose-Vorkultivierung bzw. Saccharose-Vorkultivierung verglichen. Es zeigte sich, dass die Aufnahmerate bei der auf Saccharose vorkultivierten Kultur höher war als bei der auf Glukose vorkultivierten. Außerdem waren die Aufnahmeraten bei den Messungen ohne Zugabe von Chloramphenicol deutlich höher als bei Zugabe von Chloramphenicol (Daten nicht gezeigt). Es konnte also bestätigt werden, dass der Saccharose-Importer induzierbar ist.

Der Test auf Induzierbarkeit des Exporters setzt eine möglichst konstitutive Expression des Aufnahmesystems voraus. Da die Saccharose-Aufnahme bei Vorkultur auf Glukose lediglich 20% weniger betrug und eine Vorkultur auf Saccharose auf Grund des Fruktose-Vorkommens das Messsystem stören könnte, wurde weiterhin Glukose als C-Quelle verwendet.

3.1.1.3. Inhibition der Saccharose-Aufnahme durch andere Metabolite

Dass die Saccharose-Aufnahme bei Vorkultur auf Glukose verlangsamt war, spricht für eine Regulation auf Genexpressionsebene. Es könnte zusätzlich auch eine Regulation auf biochemischer Ebene vorliegen. Daher wurde untersucht, ob Glukose den Saccharose-Import direkt bei Zugabe hemmt. Es wurden dazu 1 Minute vor Beginn der Messung Glukose in folgenden Konzentrationen zugegeben: 10 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM, 50 µM, 300 µM, 1 mM, 3 mM und 10 mM (Abb.3.1.6.).

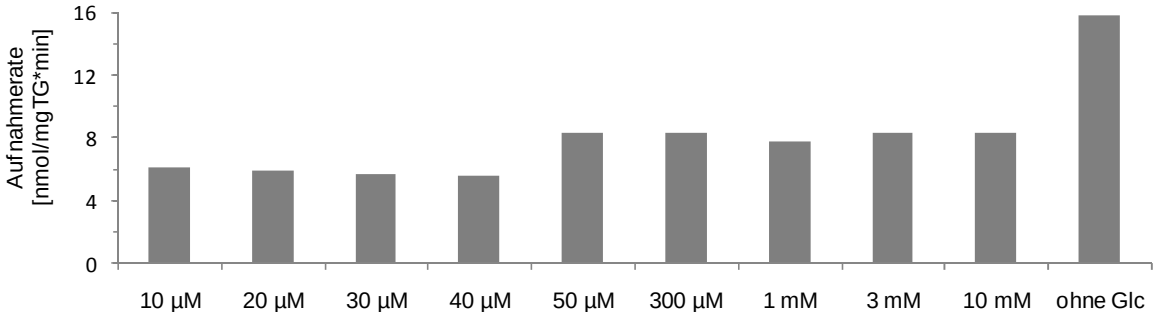

Abb. 3.1.6. Saccharose-Aufnahme in *C. glutamicum* ATCC 13032 bei 50 µM Saccharose [U-^{14}C] jeweils mit 10 µM – 10 mM Glukose bzw. ohne Glukose

Interessanterweise verlangsamte die Zugabe von Glukose die Aufnahme bei allen verwendeten Konzentrationen. Die Aufnahmerate wurde von 15,8 nmol/mgTG*min auf durchschnittlich 6 bzw. 8 nmol/mgTG*min vermindert (Abb. 3.1.6.). Da es sich um ein Artefakt handeln könnte, wurde die Saccharose-Aufnahme unter Zugabe von einer Pentose, die nicht aufgenommen werden kann (Xylose), Metaboliten, die nicht über das PTS-System aufgenommen werden (Glutamin und Pyruvat), einem Zucker, der über ein PTS-System aufgenommen wird (Fruktose) und einem Zucker, der nicht über ein PTS-System aufgenommen wird (Maltose) bestimmt.

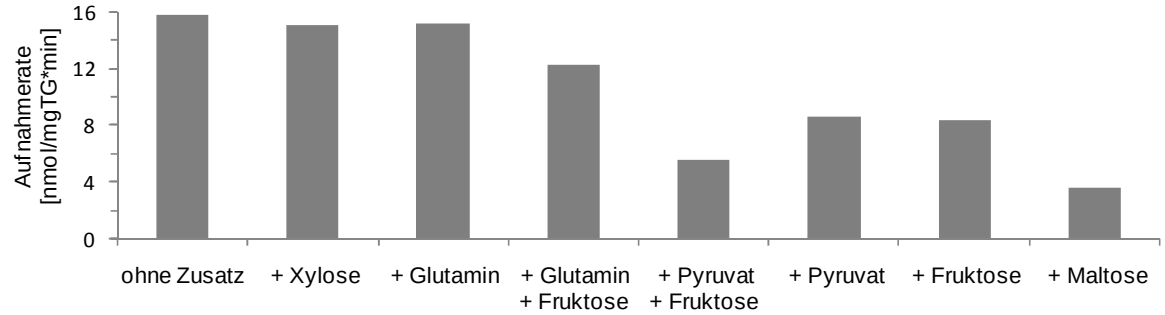

Abb. 3.1.7. Saccharose [U-^{14}C] - Aufnahme in *C. glutamicum* ATCC 13032 unter Zugabe von verschiedenen Substanzen, jeweils 10 mM, jeweils 1 Minute vor Beginn der Messung zugegeben

Xylose und Glutamin zeigten keine hemmende Wirkung auf die Aufnahme von Saccharose, während Maltose, Fruktose und Pyruvat sehr deutlichen Einfluss nahmen. Besonders fällt auch die additive Wirkung von Glutamin und Fruktose auf (Abb. 3.1.7.). Der Effekt von Maltose wurde im Weiteren detailierter untersucht.

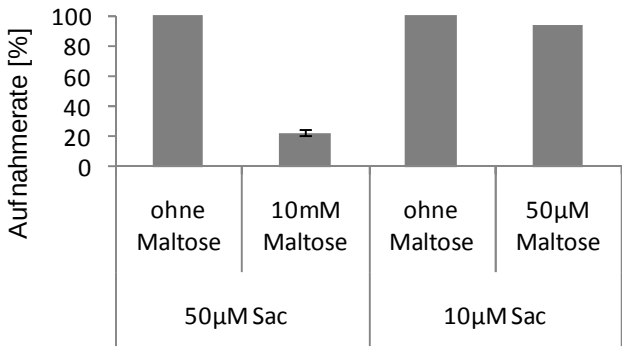

Abb. 3.1.8. Saccharose-Aufnahme in *C. glutamicum* ATCC 13032 bei 50 µM bzw. 10 µM Saccharose [U-^{14}C]; jeweils 10 mM bzw. 50 µM Maltose 1 Minute vor Beginn der Messung zugegeben; 100% = 16 nmol/mgTG*min

Bei einem 200fachen Überschuss an Maltose lässt sich eine deutlich Erniedrigung der Saccharose-Aufnahmerate auf 23% erkennen (Abb.3.1.8.). Bei lediglich 5fachem Überschuss an Maltose wurde keine Hemmung gemessen.

Zur Etablierung eines Messsystems war außerdem wichtig zu klären, ob Glukose auch auf die Fruktose-Aufnahme hemmend wirkt. Zusätzlich sollte die Induzierbarkeit des PTS^{Fru}-Systems verifiziert werden. Dafür wurde *C. glutamicum* ATCC 13032 auf Saccharose bzw. Glukose angezogen und zur Aufnahmemessung 50 µM Glukose zugesetzt.

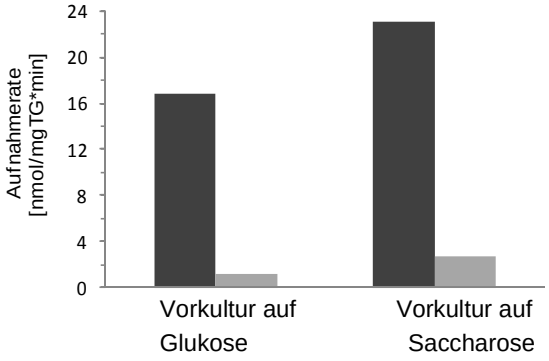

Abb. 3.1.9. Fruktose-Aufnahme in *C. glutamicum* ATCC 13032 bei 50 µM Fruktose; jeweils mit 50 µM Glukose (hellgrau) bzw. ohne (dunkelgrau); jeweils in MMI mit 25 mM Saccharose bzw. Glukose vorkultiviert

Bei Vorkultur auf Saccharose war ohne Glukose ein Rate von 23,4 nmol/mgTG*min, die mit Glukose auf 2,7 nmol/mgTG*min erniedrigt war, zu messen (Abb. 3.1.9.). Bei Vorkultur auf Glukose betrug die Rate ohne Zugabe von Glukose bereits nur 16,8

nmol/mgTG*min und wurde mit Glukose noch auf 1,2 nmol/mgTG*min gesenkt. Man erkennt deutlich die Induzierbarkeit der Gene für die Fruktose-Aufnahme: Die auf Saccharose gewachsenen Zellen nehmen signifikant schneller Fruktose auf. Außerdem konnte festgestellt werden, dass Glukose auch auf die Fruktose-Aufnahme hemmend wirkt.

Zusammenfassend wurde die Induzierbarkeit von PTS^{Suc} und PTS^{Fru} verifiziert. Die Saccharose-Aufnahme bei Vorkultur auf Glukose war nicht stark vermindert. Um Verunreinigungen mit Saccharose und Fruktose im Messsystem zu verhindern, wurde das Wachstum auf Glukose belassen. Es konnte eine Aufnahmehemmung durch verschiedene Metabolite gemessen werden. Vor allem aber Glukose inhibierte die Aufnahme von Saccharose und Fruktose.

3.1.2. Etablierung eines Messsystems zur biochemischen Charakterisierung des Fruktose-Exports

3.1.2.1. Bestimmung der externen Metabolit-Konzentrationen

Zur Quantifizierung des Umsatzes von Saccharose und der anschließenden Exkretion von Fruktose wurde ein Setup zur Messung der externen Konzentrationen mittels HPLC etabliert. Dafür wurde *C. glutamicum* im MMI mit Glukose vorkultiviert, gewaschen und anschließend 10 mM Saccharose zugegeben. Alle 20 Minuten wurden Proben vom Überstand genommen und vermessen.

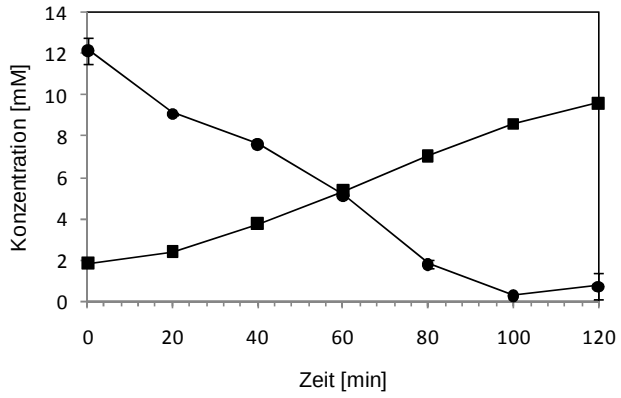

Abb. 3.1.10. Saccharose- (●) und Fruktose- (■) Konzentration im Kulturüberstand von *C. glutamicum* ΔPTS^{Fru} in MMI mit 10mM Saccharose

In Abb. 3.1.10. ist ein nahezu äquimolarer Umsatz der Saccharose erkennbar. Die Anfangskonzentration von Saccharose beruht auf einer Verunreinigung durch eine unbekannte Substanz mit gleicher Retentionszeit, die allerdings in der Endbilanz nicht stört. Dieses Setup kann für weitere Untersuchungen verwendet werden.

3.1.2.2. Bestimmung der internen Metabolit-Mengen

Zur Untersuchung der internen Metabolit-Mengen wurde ein Setup unter Verwendung von radioaktiv markierter Saccharose etabliert. Es konnte so die Aufnahme von Saccharose direkt und der Export von Fruktose indirekt verfolgt werden. Für diese Messungen wurde radioaktiv markierte Saccharose verwendet, die nur an der Fruktose markiert ist [Fruk-^{14}C]. Nach Spaltung der aufgenommenen Saccharose im Cytoplasma lässt sich so ausschließlich die Fruktose verfolgen. Zur Untersuchung des Exports der Fruktose wurde zunächst die Einstellung eines „steady-state"-Levels in den Zellen untersucht. Es wurden 50 µM radioaktiv markierte Saccharose zugegeben und bis 10 Minuten gemessen. Die Stabilität des „steady-state"-Levels wurde vorher überprüft. Wie Abb. 3.1.11. A zeigt, stellt sich nach ca. 360 Sekunden ein Gleichgewicht aus Saccharose-Aufnahme und Fruktose-Export ein. Dieses kann dazu genutzt werden, explizit nur den Fruktose-Export zu untersuchen. Dazu wurden spezielle „pulse-chase"-Experimente durchgeführt, indem zu einem bestimmten Zeitpunkt kalte Saccharose zugegeben und der Export der heißen Fruktose verfolgt wurde.

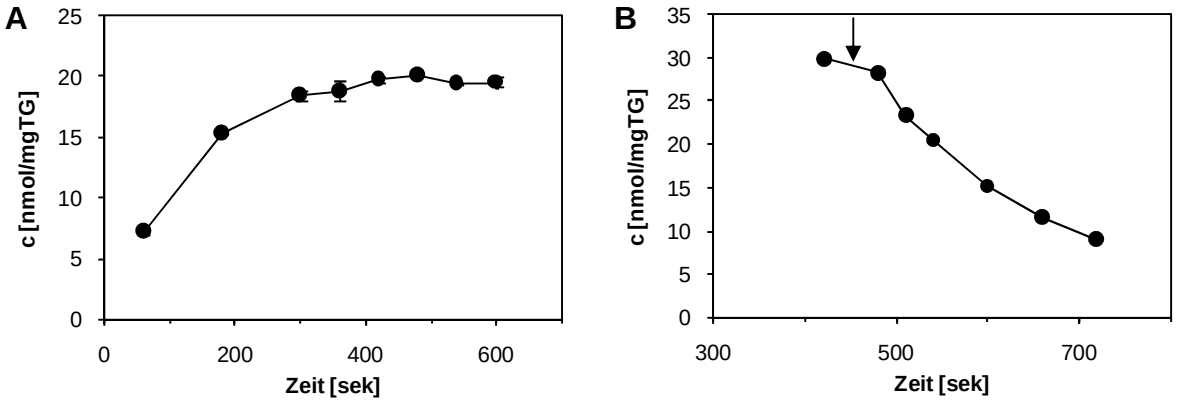

Abb. 3.1.11. Interne Konzentration von Fruktose in *C. glutamicum* **A:** Einstellung des „steady-state"-Levels von Fruktose (pulse) **B:** Pfeil kennzeichnet Zugabe von 5 mM kalter Saccharose und Export der Fruktose (chase); *C. glutamicum* ΔPTS^{Fru} bei 50 µM Saccharose [Fruk-^{14}C]; aus technischen Gründen 2 Experimente

Dies ist in Abb.3.1.11. B dargestellt. Es wurden im Laufe der verschiedenen Messungen unterschiedliche „steady-state“-Level erreicht, die aber keinen Einfluss auf die qualitative Bewertung der „pulse-chase“-Experimente haben.
Somit steht ein Messsystem zur Verfügung, um den Export von Fruktose biochemisch zu charakterisieren.

3.1.2.3. Analyse putativer Fruktose-Exporter

Mit Hilfe von genomweiten Homologievergleichen konnten bereits einige Transporter als putative Fruktose-Exporter ermittelt werden. Über die MFS-Transporter Cgl0181 und Cgl3058 war bereits bekannt, dass sie myo-Inositol importieren (Krings, 2006). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass sie auch als Permeasen für Fruktose dienen (Bäumchen *et al.*, 2009), welche allerdings anschließend nicht phosphoryliert in der Zelle vorliegt. Cgl0181 besitzt 75 %ige Übereinstimmung mit einem putativen Zucker-Transporter aus *Arthrobacter aurescens* (E. value: 0,0). Beide Transporter zeigen hohe Ähnlichkeiten zu Zucker-Transportern aus diversen anderen Bakterien-Stämmen. Der MFS-Transporter Cgl0110 weist Ähnlichkeit zu einem „glucose facilitated diffusion protein“ aus *Zymomonas mobilis* auf, welches sowohl Glukose als auch Fruktose über erleichterte Diffusion aufnimmt. Diese liegt in unphosphorylierter Form vor. Es konnte bereits über elektrophysiologische Untersuchungen nachgewiesen werden, dass bestimmte Saccharose-Transporter in Pflanzen in Abhängigkeit vom Membranpotential, dem pH-Gradienten aber auch der Saccharose-Konzentration in beide Richtungen transportieren können (Carpaneto *et al*., 2005). In den Untersuchungen von Krings *et al*. (Krings *et al.*, 2006) fand sich beim Wachstum auf myo-Inositol ein Exporter, dessen Gen induziert war. Es handelte sich hierbei um den MFS-Transporter Cgl0166.

Da die erwähnten Proteine Kandidaten für den Fruktose-Exporter waren, wurden deren Gene im *C. glutamicum* ATCC13032-Hintergrund ausgeschaltet, und es wurden Wachstumsversuche mit 25 mM Saccharose durchgeführt.

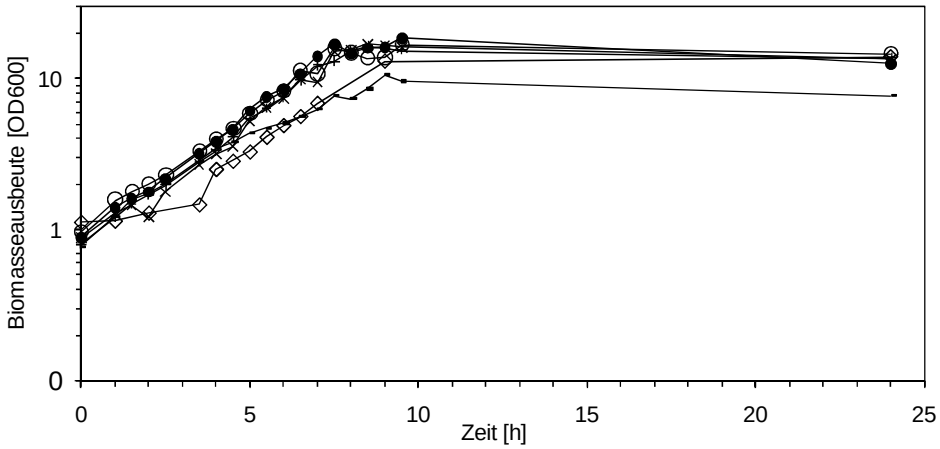

Abb.3.1.12. Wachstum der verschiedenen Mutanten in MMI mit 25 mM Saccharose. (x) *C. glutamicum Cgl0110*::pDrive, (◊) *C. glutamicum Cgl0166*::pDrive, (o*) C. glutamicum Cgl0181*::pDrive, (●) *C. glutamicum Cgl3058*::pDrive, (-) *C. glutamicum* ΔPTS^{Fru}, (+) *C. glutamicum* ATCC 13032

Es zeigte lediglich der Stamm *C. glutamicum Cgl0166*::pDrive ein geringes Wachstumsdefizit (Abb.3.1.12.). Dennoch erreichte sie dieselben Endwerte wie die anderen Stämme und der Wildtyp.

Die Gene dieser vier Transporter wurden ebenfalls im ΔPTS^{Fru}-Hintergrund mutagenisiert, und es wurden Messungen zum Umsatz von 10 mM Saccharose durchgeführt. Es zeigte sich bei den Mutanten *C. glutamicum* ΔPTS^{Fru} *Cgl0181*::pDrive, *C. glutamicum* ΔPTS^{Fru} *Cgl3058*::pDrive und *C. glutamicum* ΔPTS^{Fru} *Cgl0110*::pDrive kein verlangsamter Umsatz im Vergleich zur Kontrolle (Daten nicht gezeigt). Beim Stamm *C. glutamicum* ΔPTS^{Fru} *Cgl0166*::pDrive hingegen konnte ein vom Wildtyp abweichender Umsatz beobachtet werden.

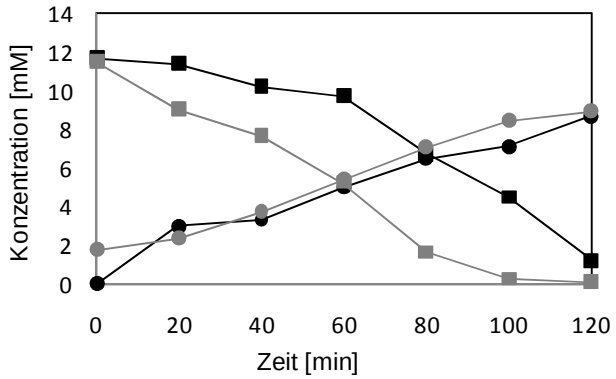

Abb.3.1.13 Saccharose- (■) und Fruktose- (●) Konzentration im Kulturüberstand von *C. glutamicum* ΔPTS^{Fru} (grau) und C. glutamicum ΔPTS^{Fru} Cgl0166::pDrive (schwarz) in MMI mit 10 mM Saccharose

Abb. 3.1.13 zeigt einen identischen Anstieg der externen Fruktose, während die Saccharose im Medium von *C. glutamicum* ΔPTS^{Fru} schneller abnimmt als die im Medium von und *C. glutamicum* ΔPTS^{Fru} *Cgl0166*::pDrive.

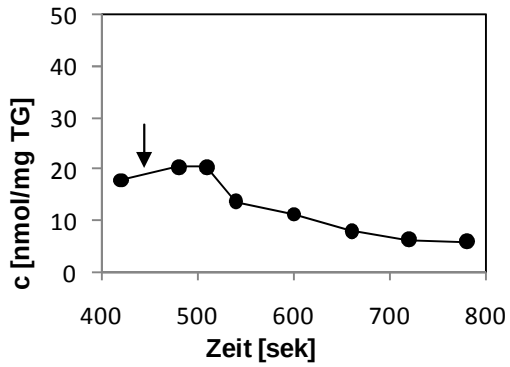

Abb. 3.1.14. Interne Konzentration von Fruktose in *C. glutamicum*; Pfeil kennzeichnet Zugabe von 5 mM kalter Saccharose und Export der Fruktose (chase); *C. glutamicum* ΔPTS^{Fru} *Cgl0166*::pDrive bei 50 µM Saccharose [Fruk-^{14}C]

Es wurde auch ein „pulse-chase“-Experiment mit diesem Stamm gemacht. Der Export von Fruktose entspricht genau dem Export von Fruktose im ΔPTS^{Fru}-Stamm (Abb.3.1.14.). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Cgl0166 nicht der gesuchte Fruktose-Exporter ist.
Wahrscheinlich ist keiner der Kandidaten am Fruktose-Export beteiligt. Daher ist eine genauere Analyse des Exports nötig.

3.1.3. Untersuchungen zum Export von Fruktose

Da sich herausstellte, dass die über bioinformatische Ansätze ermittelten Transporter keine Fruktose-Exporter sind, wurde eine biochemische Charakterisierung des Transports vorgenommen. Dabei sollte geprüft werden, ob das für den Fruktose-Exporter kodierende Gen induzierbar ist. Dies erschließt die Möglichkeit auf DNA-Chip-Experimente zur Eingrenzung der möglichen Transporter. Weiterhin sollte die Möglichkeit einer Diffusion geklärt werden. Dies ist zwar relativ unwahrscheinlich, sollte aber dennoch experimentell ausgeschlossen werden. Zuletzt sollte die energetische Kopplung untersucht werden.

3.1.3.1. Induzierbarkeit des Fruktose-Exporters

Es wurde geprüft, ob das für den Fruktose-Exporter kodierende Gen erst induziert wird oder ob es konstitutiv exprimiert wird. Dafür wurde *C. glutamicum* ΔPTS^{Fru} in MMI mit Glukose vorkultiviert und 100 µg/ml Chloramphenicol zugegeben. Nach 5 Minuten wurden 10 mM Saccharose hinzugefügt.

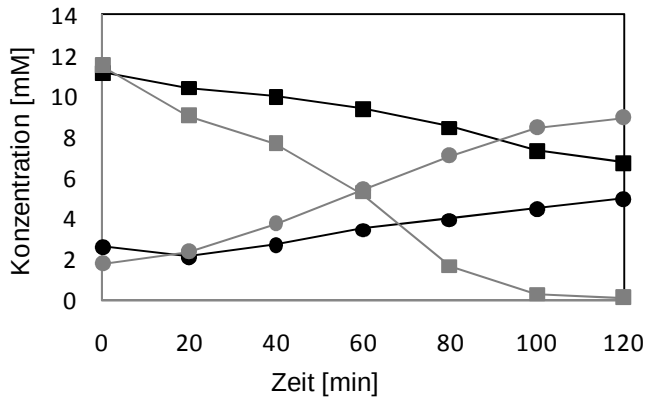

Abb. 3.1.15. Saccharose- (■) und Fruktose- (●) Konzentration im Kulturüberstand von *C. glutamicum* ΔPTS^{Fru} in MMI mit 10 mM Saccharose und mit 100 µg/ml Chloramphenicol (schwarz) oder ohne Chloramphenicol (grau)

In Abb. 3.1.15. ist eine signifikant verzögerte Saccharose-Aufnahme zu erkennen, die aus Hemmung des PTS^{Suc}-Systems resultieren kann. Durch die Kopplung von Saccharose-Aufnahme und Fruktose-Export ist auch nur der Anteil an Fruktose im Medium messbar, der an Saccharose aufgenommen wurde. Zur eindeutigen Klärung wurde der Export der internen Fruktose verfolgt.

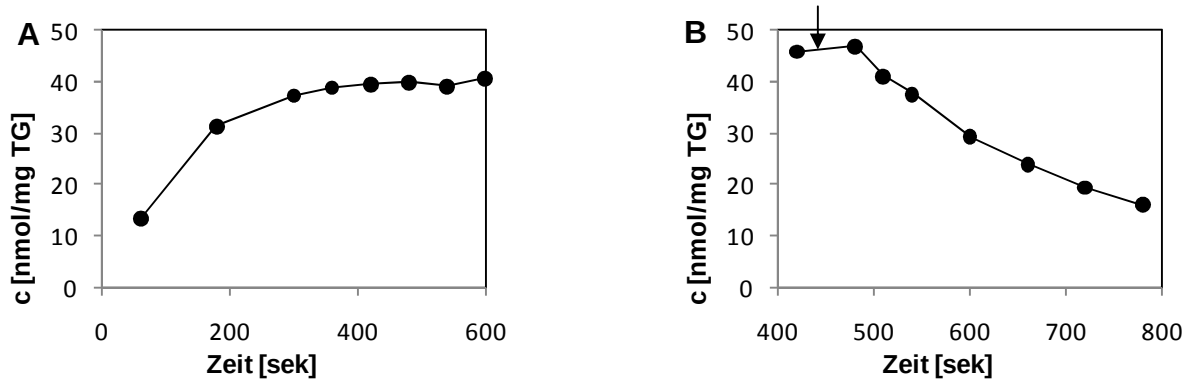

Abb. 3.1.16. Interne Konzentration von Fruktose in *C. glutamicum* **A:** Einstellung des „steady-state"-Levels von Fruktose (pulse) **B:** Pfeil kennzeichnet Zugabe von 5 mM kalter Saccharose und Export der Fruktose (chase); *C. glutamicum* ΔPTS^{Fru} bei 50 µM Saccharose [Fruk-^{14}C] + 100µg/ml Chloramphenicol; aus technischen Gründen 2 Experimente

Abb. 3.1.16. A zeigt die Einstellung des „steady-state“-Levels, während Abb. 3.1.16. B den Export von Fruktose darstellt. Es ist keine Hemmung des Fruktose-Exports durch Zugabe von Chloramphenicol zu erkennen.

3.1.3.2. Die Wirkung von hohen externen Fruktose-Konzentrationen

Um zu überprüfen, ob Fruktose über ein Porenprotein exportiert wird, wurden Untersuchungen mit dem Stamm *C. glutamicum* ΔPTS^{Fru} pEKEx2*YggB* durchgeführt, der den Kanal YggB überexprimiert. Dieser ist bevorzugt für die Exkretion von kleinen Soluten verantwortlich. Es konnte aber weder in den Messungen des Kulturüberstands bei Fütterung von 10 mM Saccharose noch in den Messungen mit radioaktiv markierter Saccharose ein beschleunigter Fruktose-Export festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Da es allerdings noch andere Porenproteine in *C. glutamicum* gibt, können diese mit diesem Experiment noch nicht ausgeschlossen werden.

Wenn die Fruktose die Zelle durch Diffusion verlassen würde, so müsste ein Überschuss an Fruktose im Medium den Export der internen Fruktose hemmen. Dies wurde im folgenden Versuch bestimmt. Es wurden sowohl 10 mM Saccharose als auch 10 mM Fruktose zu *C. glutamicum* ΔPTS^{Fru} gegeben und der Umsatz im Kulturüberstand verfolgt.

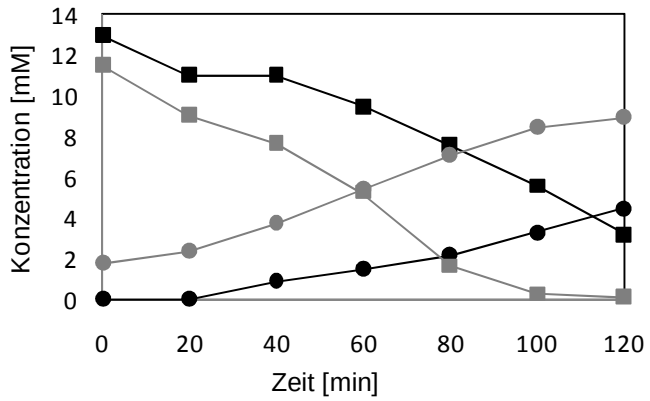

Abb. 3.1.17. Saccharose- (■) und Fruktose- (●) Konzentration im Kulturüberstand von *C. glutamicum* ΔPTS^{Fru} in MMI mit 10 mM Saccharose und mit 10 mM Fruktose (schwarz) oder ohne Fruktose (grau); 10mM Fruktose wurde abgezogen

Aus Abb. 3.1.17. wird deutlich, dass sowohl die Saccharose-Aufnahme als auch der Fruktose-Export verlangsamt sind. Dies stimmt mit den Beobachtungen überein, dass das Saccharose-Aufnahme-System durch die Fruktose im Medium gehemmt wird.

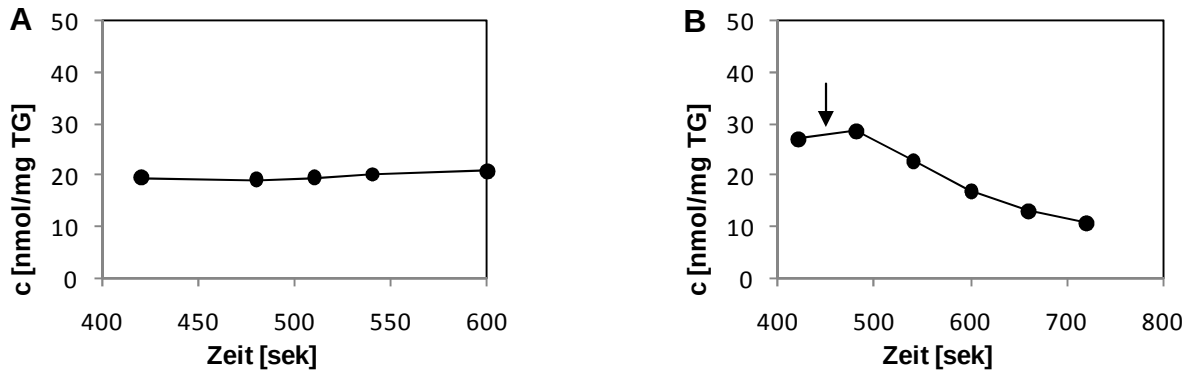

Abb. 3.1.18. Interne Konzentration von Fruktose in *C. glutamicum* **A:** „steady-state"-Level von Fruktose (pulse) **B:** Pfeil kennzeichnet Zugabe von 5 mM kalter Saccharose und Export der Fruktose (chase); *C. glutamicum* ΔPTS^{Fru} bei 50 µM Saccharose [Fruk-^{14}C] + 5 mM Fruktose; aus technischen Gründen 2 Experimente

In Abb. 3.1.18. ist zu erkennen, dass nach Einstellung des „steady-state"-Levels ein ungehinderter Export von Fruktose erfolgt. Der Versuch wurde mit 50 mM externer kalter Fruktose wiederholt und zeigte ebenfalls einen Export von Fruktose. Anhand dieser Experimente kann Diffusion als Mechanismus des Fruktose-Exports ausgeschlossen werden.

3.1.3.3. Die Wirkung von CCCP, Valinomycin und Nigericin

Um zu überprüfen, ob ein sekundär aktiver Transporter am Export von Fruktose beteiligt ist, wurde der ΔPTS^{Fru}-Stamm mit 20 µM CCCP (Carbonylcyanid-M-Chlorophenylhydrazon) behandelt . CCCP ist eine membrangängige Säure, die durch den Transport von Protonen über die Membran den Protonengradienten zusammenbrechen lässt. Somit sind sekundär aktive Transporter, die vom Membranpotential abhängig sind, deaktiviert, während primär aktive Transporter nur geringfügig beeinflusst werden, da über die Substratkettenphosphorylierung ausreichend ATP zur Verfügung gestellt werden kann. Die Verwendung von Ionophoren sollte keinen Einfluss auf die Saccharose-Aufnahme haben, da PTS-Systeme nicht vom Membranpotential abhängig sind.

Für diesen Versuch wurde *C. glutamicum* ΔPTS^{Fru} in MMI mit Glukose vorkultiviert und CCCP zugegeben. Kurz darauf wurden 10 mM Saccharose hinzugefügt. Der externe Zuckerumsatz ist in Abbildung 3.1.19. dargestellt.

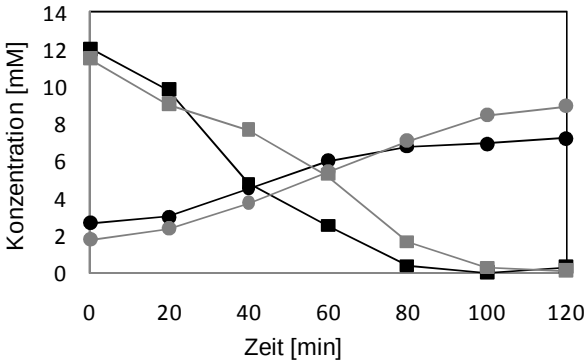

Abb. 3.1.19. Saccharose- (■) und Fruktose- (●) Konzentration im Kulturüberstand von *C. glutamicum* ΔPTS^{Fru} in MMI mit 10 mM Saccharose und mit 20 µM CCCP (schwarz) oder ohne CCCP (grau)

Aus dem Diagramm (Abb. 3.1.19.) ist ersichtlich, dass der Fruktose-Export bzw. die Saccharose-Aufnahme nicht vermindert sind. Es konnte mit radioaktiv markierter Saccharose bestätigt werden, dass auch die Saccharose-Aufnahme nicht beeinträchtigt ist (Daten nicht gezeigt). Die Wirkung von CCCP auf das „steady-state"-Level und den Export von Fruktose ist in Abb.3.1.20. dargestellt.

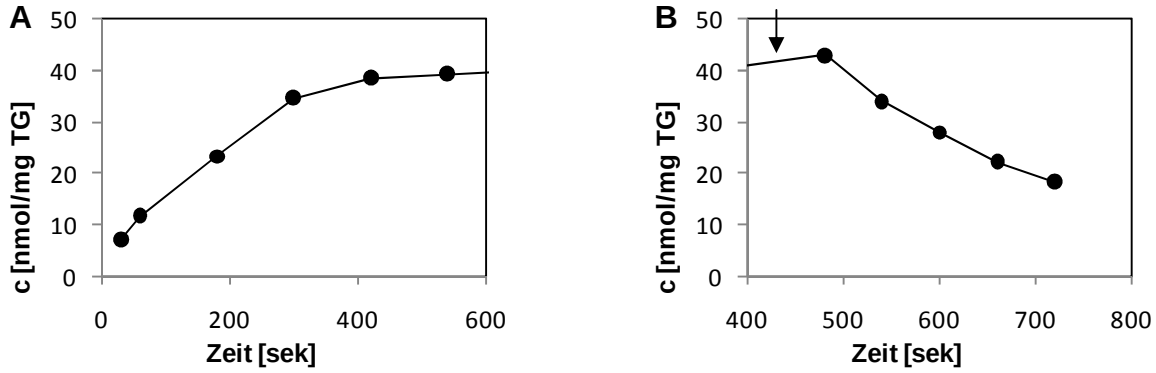

Abb. 3.1.20. Interne Konzentration von Fruktose in *C. glutamicum* **A:** Einstellung des „steady-state"-Levels von Fruktose (pulse) **B:** Pfeil kennzeichnet Zugabe von 5 mM kalter Saccharose und Export der Fruktose (chase); *C. glutamicum* ΔPTS^{Fru} bei 50 µM Saccharose [Fruk-^{14}C] + 20 µM CCCP; aus technischen Gründen 2 Experimente

Nach Einstellung des „steady-state"-Levels ist ein deutlicher Export von Fruktose erkennbar. Daraus wurde geschlussfolgert, dass CCCP keine Wirkung auf den Export von Fruktose hat.

Zusätzlich wurde der *C. glutamicum* ΔPTS^{Fru}-Stamm mit einer Kombination aus Valinomycin und Nigericin behandelt. Valinomycin transportiert K^+-Ionen über die Membran, während Nigericin als Ionophor für H^+- und K^+-Ionen fungiert. In Kombination lassen sie so das elektrochemische Protonenpotential zusammenbrechen. Für diesen Versuch wurde *C. glutamicum* ΔPTS^{Fru} in MMI mit Glukose vorkultiviert und 20 µM Valinomycin sowie 5 µM Nigericin zugegeben. Kurz darauf wurden 10 mM Saccharose hinzugefügt.

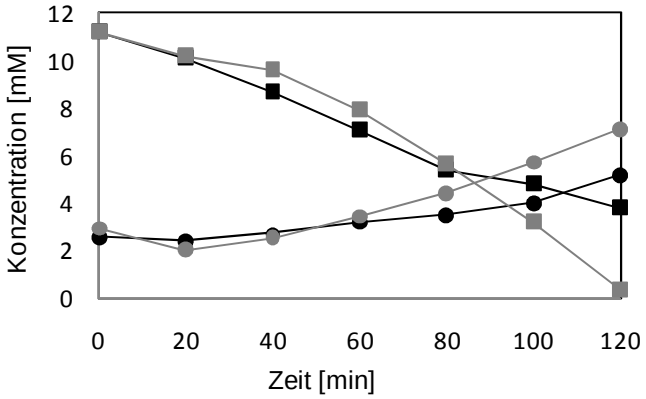

Abb. 3.1.21. Saccharose- (■) und Fruktose- (●) Konzentration im Kulturüberstand von *C. glutamicum* ΔPTS^{Fru} in MMI mit 10 mM Saccharose und mit 20 µM Valinomycin und 5 µM Nigericin (schwarz) oder ohne Valinomycin/Nigericin (grau)

In Abb. 3.1.21. sind keine signifikanten Auswirkungen von Valinomycin / Nigericin auf den Umsatz von Saccharose festzustellen.

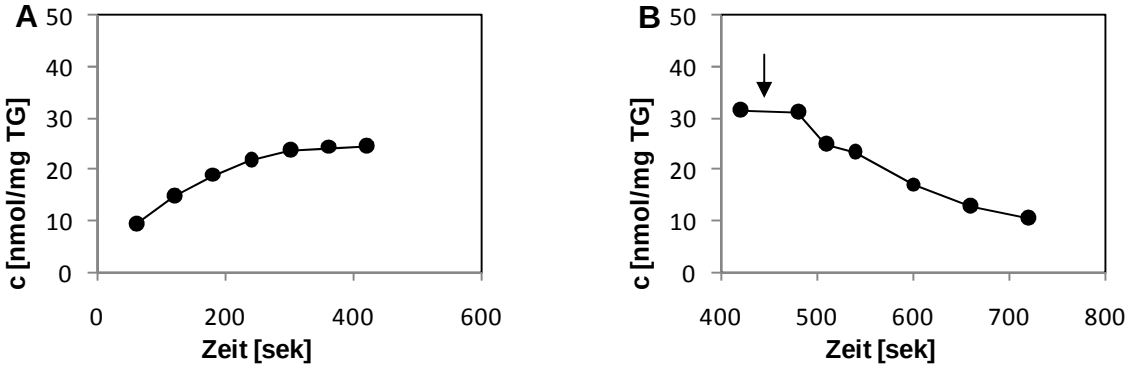

Abb. 3.1.22. Interne Konzentration von Fruktose in *C. glutamicum* **A:** Einstellung des „steady-state"-Levels von Fruktose (pulse) **B:** Pfeil kennzeichnet Zugabe von 5 mM kalter Saccharose und Export der Fruktose (chase); *C. glutamicum* ΔPTS^{Fru} bei 50 µM Saccharose [Fruk-^{14}C] + 20 µM Valinomycin + 5 µM Nigericin; aus technischen Gründen 2 Experimente

Nach Einstellung des „steady-state“-Levels erfolgte ein eindeutiger Export von Fruktose (Abb.3.1.22.).

Auf Grund der vorliegenden Experimente wurde geschlussfolgert, dass Fruktose durch einen primär aktiven Transporter exportiert wird.

3.1.3.4. ABC-Transporter als putative Fruktose-Exporter

Um den Fruktose-Exporter unter den in *C. glutamicum* vorhandenen primär aktiven Transportern zu identifizieren, wurde ein systematischer Ansatz gewählt. Aus den in *C. glutamicum* annotierten ABC-Transport-Systemen wurden diejenigen ausgewählt, die kein Bindeprotein besaßen. Da Bindeproteine nur für einen Importer benötigt werden, konnten so die Transporter grob in Importer und Exporter aufgeteilt werden. Die Gene der putativen ABC-Exporter sind in Tab. 3.1.1. zusammen gestellt. Im Genom von *C. glutamicum* liegen die Komponenten eines ABC-Transport-Systems nicht immer in einem Operon. Daher wurden die Komponenten, die wahrscheinlich in einem Operon liegen, in Gruppen zusammengefasst. Es wurde anschließend von allen Gruppen eine Komponente durch Insertion des Plasmids pDrive in das gewünschte Gen mutagenisiert. Welche Gene dabei ausgeschaltet wurden, ist ebenfalls in Tabelle 3.1.1. aufgeführt. Die meisten der fertigen Stämme wurden abschließend in eine Mikrotiterplatte überführt. Das zerstörte Gen und die Position des zugehörigen Stamms in der Mikrotiterplatte sind in Tab. 3.1.1. aufgelistet.

Tab. 3.1.1. ABC-Exporter-kodierende Gene aus *C. glutamicum*, die durch Insertion von pDrive ausgeschaltet wurden; Gene, die in einem Operon liegen könnten, wurden in Gruppen zusammengefasst (Gruppennummer); die vorhergesagte Funktion der Gene ist beschrieben; weiterhin ist die Position des zugehörigen Stamms in der Mikrotiterplatte aufgeführt

NCgl-Nummer	Cgl-Nummer	Gruppen-Nummer	Mutante vorhanden	vorhergesagte Funktion	Well in Mikrotiterplatte
NCgl0036	*Cgl0036*	1	x	Permease	
NCgl0037	*Cgl0038*			ATPase	
NCgl0197	*Cgl0200*	2		ATPase	
NCgl0198	*Cgl0201*		x	Permease	
NCgl0232	*Cgl0235*	3	x	Permease	B01
NCgl0394	*Cgl0406*	4	x	Permease	C01
NCgl0482	*Cgl0500*	5		ATPase	
NCgl0483	*Cgl0501*		x	Permease	
NCgl0484	*Cgl0502*			Permease	
NCgl0509	*Cgl0531*	6		Permease	

NCgl0510	*Cgl0532*			ATPase	
NCgl0511	*Cgl0533*		x	Permease	D01
NCgl0606	*Cgl0632*	7	x	Permease	E01
NCgl0607	*Cgl0633*		x	ATPase	F01
NCgl0768	*Cgl0802*	8		ATPase, involviert in Zellteilung	
NCgl0769	*Cgl0803*			Permease, involviert in Zellteilung	
NCgl0821	*Cgl0855*	9	x	Permease	G01
NCgl0822	*Cgl0856*			ATPase	
NCgl0875	*Cgl0912*	10	x	fusionierte ATPasen	H01
NCgl0909	*Cgl0946*	11		ATPase	
NCgl0910	*Cgl0947*		x	Permease	
NCgl0914	*Cgl0952*	12	x	ATPase + Permease	A02
NCgl0915	*Cgl0953*			ATPase + Permease	
NCgl0925	*Cgl0964*	13	x	ATPase + Permease	B02
NCgl0926	*Cgl0965*		x	ATPase + Permease	
NCgl1016	*Cgl1061*	14	x	fusionierte ATPasen	C02
NCgl1033	*Cgl1078*	15		Permease	
NCgl1034	*Cgl1079*			fusionierte ATPasen	
NCgl1035	*Cgl1080*		x	Permease	D02
NCgl1085	*Cgl1130*	16	x	fusionierte ATPasen + fusionierte Permeasen	
NCgl1101	*Cgl1147*	17	x	ATPase + Permease	E02
NCgl1102	*Cgl1148*		x	ATPase + Permease	F02
NCgl1174	*Cgl1221*	18		Permease	
NCgl1179	*Cgl1227*	19	x	ATPase	G02
NCgl1365	*Cgl1420*	20	x	fusionierte ATPasen	H02
NCgl1377	*Cgl1432*	21	x	ATPase + Permease	A03
NCgl1378	*Cgl1433*			ATPase + Permease	
NCgl1399	*Cgl1455*	22	x	ATPase	
NCgl1400	*Cgl1456*			Permease	
NCgl1467	*Cgl1524*	23	x	ATPase + Permease	
NCgl1468	*Cgl1525*		x	ATPase + Permease	B03
NCgl1493	*Cgl1554*	24	x	fusionierte ATPasen	
NCgl1501	*Cgl1562*	25		ATPase	
NCgl1502	*Cgl1563*			putativer Fe-regulierter Transporter	
NCgl1503	*Cgl1564*			putativer Fe-regulierter Transporter	
NCgl1506	*Cgl1567*	26	x	ATPase	
NCgl1507	*Cgl1568*		x	Permease	C03
NCgl1623	*Cgl1687*	27		ATPase	
NCgl1624	*Cgl1688*		x	Permease	D03
NCgl1884	*Cgl1959*	28	x	ATPase	
NCgl1885	*Cgl1960*		x	Permease	
NCgl1936	*Cgl2011*	29		Permease	
NCgl1937	*Cgl2012*		x	ATPase	E03
NCgl1942	*Cgl2018*	30	x	Permease	F03
NCgl1943	*Cgl2019*			ATPase	

NCgl1978	*Cgl2056*	31		Permease	
NCgl1979	*Cgl2057*		x	ATPase	G03
NCgl1997	*Cgl2077*	32	x	ATPase + Permease	H03
NCgl1998	*Cgl2078*			ATPase + Permease	
NCgl2176	*Cgl2257*	33	x	fusionierte ATPasen	
NCgl2218	*Cgl2298*	34	x	ATPase + Permease	A04
NCgl2361	*Cgl2447*	35	x	ATPase	B04
NCgl2368	*Cgl2454*	36	x	fusionierte ATPasen	
NCgl2370	*Cgl2456*		x	Permease	
NCgl2464	*Cgl2552*	37		Permease	
NCgl2465	*Cgl2553*		x	ATPase	C04
NCgl2650	*Cgl2746*	38	x	Permease	D04
NCgl2651	*Cgl2747*			ATPase	
NCgl2727	*Cgl2826*	39	x	ATPase	E04
NCgl2728	*Cgl2827*			ATPase	
NCgl2729	*Cgl2828*			Permease	
NCgl2732	*Cgl2831*	40	x	fusionierte ATPasen	F04
NCgl2733	*Cgl2832*		x	Permease	
NCgl2734	*Cgl2833*			Permease	
NCgl2746	*Cgl2843*	41	x	ATPase	
NCgl2891	*Cgl2993*	42	x	Permease	
NCgl2892	*Cgl2994*			ATPase	
NCgl2935	*Cgl3038*	43		ATPase	
NCgl2936	*Cgl3039*		x	Permease	G04

Mit diesen Stämmen wurden „pulse-chase“-Experimente mit radioaktiv markierter Saccharose [Fruk-^{14}C] durchgeführt. Zusätzlich wurden noch andere Stämme mit mutagenisierten Transportergenen, die im Arbeitskreis vorhanden waren, vermessen. Die Gene wurden nicht in *C. glutamicum* ΔPTS^{Fru} ausgeschaltet, wodurch die Stämme in der Lage sind, die exportierte Fruktose im Laufe der Messungen wieder aufzunehmen. Um dem entgegenzuwirken, wurde den Zellen kurz vor Zugabe der radioaktiv markierten Saccharose 5 mM kalte Fruktose zugegeben, um so das PTS^{Fru} -System abzusättigen. Dabei wurde bedacht, dass gezeigt wurde, dass die Fruktose inhibierend auf die Saccharose-Aufnahme wirkt (Abb.3.1.8.). Nach Einstellung des „steady-state“-Levels wurden Proben genommen, wonach direkt 5 mM kalte Saccharose zugegeben und 15 Minuten gewartet wurde. Es wurden wieder Proben genommen. In Abb.3.1.23. A und C sind in dunkelgrauen Balken die „steady-state“-Level von Fruktose und in hellgrauen Balken die zugehörigen Fruktose-Mengen nach 15 Minuten Wartezeit aufgezeigt. In Abb.3.1.23. B und D sind die zugehörigen

Differenzen zwischen „steady-state“-Level und Endwert aufgelistet. Die rote Linie zeigt den Wert des Wildtyps an.

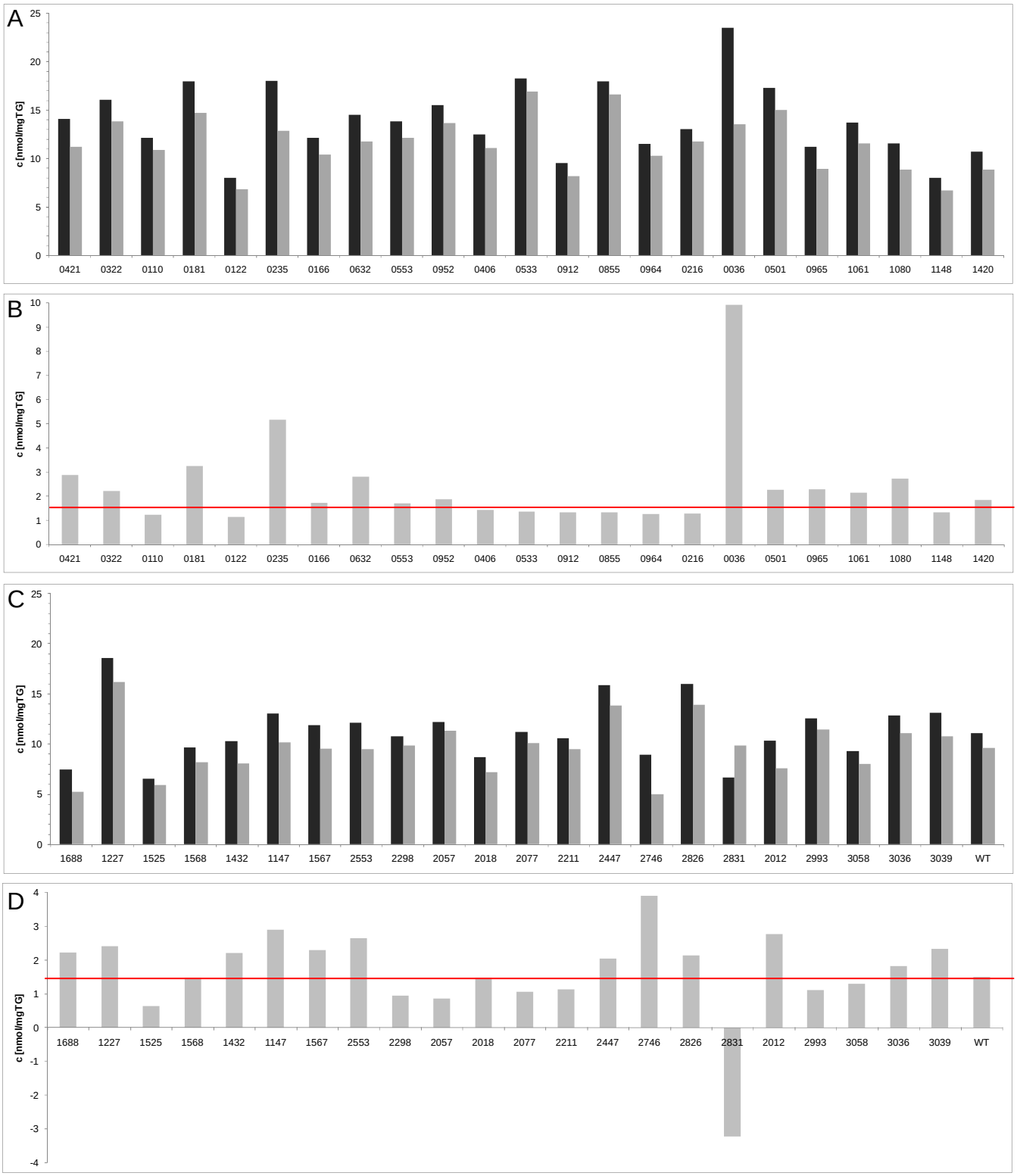

Abb. 3.1.23. Analyse von Saccharose-Aufnahme und Fruktose-Export in *C. glutamicum*-Stämme, die in ABC-Transporter kodierenden Genen mutagenisiert wurden bei 50 µM Saccharose [Fruk-^{14}C]; **A und C: dunkelgrau:** „steady-state“-Level; **hellgrau:** interne Menge an Fruktose nach Zugabe von 5 mM kalter Saccharose; **B und D:** Differenz in der internen Fruktose-Menge zwischen „steady-state“-Level und der Menge nach Zugabe von kalter Saccharose; die rote Linie zeigt den Wert der Wildtyp-Kontrolle; angegeben ist jeweils der Mittelwert aus 2 Messungen

In zwei Mutanten ist ein erheblich geringerer Export von Fruktose festgestellt worden. Cgl1525 ist eine ATPase fusioniert mit einer Permease. In der unmittelbaren gegentischen Umgebung befindet sich noch ein ABC-Transporter, ebenfalls bestehend aus ATPase und Permease. Bei der Ähnlichkeitssuche war das ähnlichste bekannte Protein TetA aus *Corynebacterium efficiens* mit einer Übereinstimmung von 64% (E. value: 0.0).

C. glutamicum pDrive::*Cgl2831* akkumuliert sogar die Fruktose. Cgl2831 ist eine fusionierte ATPase, die ein Transportsystem mit einer fusionierten Permease bildet. Bei der Ähnlichkeitssuche fiel ein ATP-Bindeprotein eines ABC-Transporters in *Bacillus coahuilensis* auf, der Zucker transportieren soll. Beide hatten eine Übereinstimmung von 27% (E. value: $1e^{-13}$).

3.2. Beteiligung von ABC-Transportern am Export von Antibiotika und Toxinen

C. glutamicum gehört zu den mykolsäurehaltigen Actinomyceten (Stackebrandt, 1997), deren humanpathogene Vertreter *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* und *Corynebacterium diphteriae* beinhalten (Puech, 2001; Gebhardt, 2007). Der Export von Antibiotika ist einer der häufigsten Gründe für Resistenzen innerhalb dieser Pathogene. Um neue Antibiotika zu entwickeln, ist ein ausgiebiges Wissen über die Transportmechanismen über die Membran nötig. Da sich diverse ABC-Transporter als Multidrug-Exporter erwiesen haben, wurde die bereits hergestellte Mutantenbank mit Genen, die in einem ABC-Transporter-kodierenden Gen mutagenisiert worden waren, auf den Export von Antibiotika und Toxinen untersucht.

3.2.1. Etablierung der MIC-Wert-Bestimmung in Mikrotiterplatten

Zur Bewertung der Sensitivität von *C. glutamicum* gegenüber einem Toxin wurde ein Verfahren etabliert, das es erlaubt, verschiedene Bedingungen parallel zu testen. Dabei können bis zu 96 verschiedene Stämme bzw. Bedingungen in einer Mikrotiterplatte untersucht werden. Da die Wachstumsbedingungen in Kolben und Mikrotiterplatten sehr unterschiedlich sind, wurden zunächst beide Systeme verglichen.

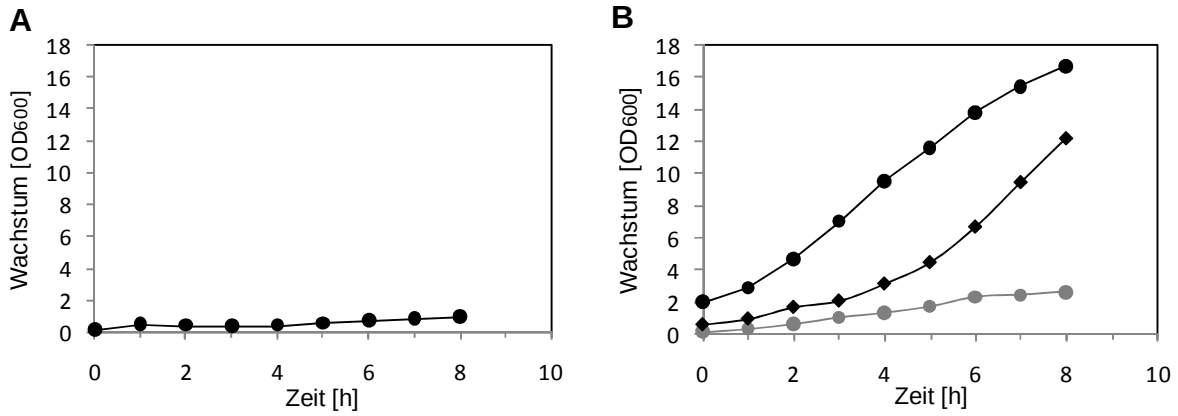

Abb. 3.2.1. Wachstum von *C. glutamicum* ATCC 13032 in MMI + Glukose **A:** Mikrotiterplatten, Inokulation mit OD_{600} 0,1; **B:** Kolben, Inokulation mit OD_{600} (●) 0,1, (♦) 0,5 und (●) 2

Vor allem die Sauerstoff-Versorgung und der Kohlendioxid-Gehalt sind zwei Faktoren, die das Wachstum entscheidend beeinflussen. Je höher die Zelldichte zu Beginn war, umso höher zeigten sich die Wachstumsrate und die Zelldichte nach 8 Stunden, was an anaplerotischen CO_2-bedürftigen Reaktionen liegen könnte. In Mikrotiterplatten herrscht eine schlechtere Sauerstoff-Versorgung, was die Zellen insgesamt langsamer wachsen lässt. Das Wachstum bei Inokulation mit OD_{600} von 0,1 in den ersten 8 Stunden war allerdings in Mikrotiterplatten und Kolben vergleichbar (Abb. 3.2.1.). Es wurden daher für alle weiteren Screenings Mikrotiterplatten verwendet.

Zur Bewertung der Sensitivität wurde die Bestimmung der „Minimalen Inhibitorischen Konzentration“ (MIC) als Methode gewählt. Das ist die minimale Konzentration einer Substanz, die nötig ist, um das Wachstum über Nacht sichtbar zu inhibieren. Die Vorgehensweise ist im Folgenden beschrieben.
Zunächst wurde eine Vorkultur von *C. glutamicum* ATCC13032 in BHI-Medium angesetzt. Aus dieser wurde nach ca. 9 Stunden eine zweite Vorkultur in MMI-Medium angesetzt. Nach Erreichen der stationären Phase wurde die Hauptkultur in Mikrotiterplatten mit einer Zelldichte von 0,1 hergestellt. Dann wurden die Toxine in einer Verdünnungsreihe zu den Zellen gegeben und die Mikrotiterplatten über 24 Stunden inkubiert. Zum Abdecken wurde eine sauerstoffdurchlässige Folie verwendet.

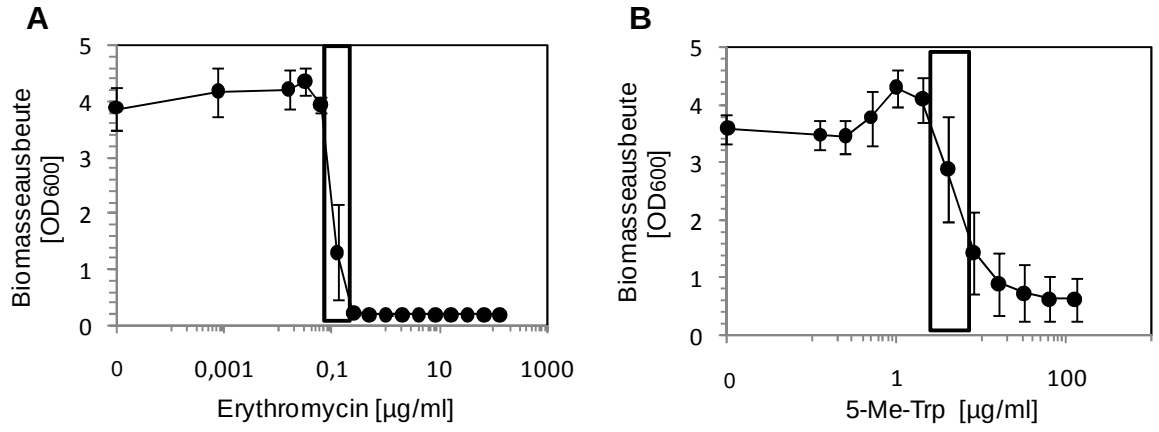

Abb. 3.2.2. Wachstum von *C. glutamicum* ATCC 13032 in Mikrotiterplatten in MMI-Medium mit Glukose unter Zusatz von **A:** Erythromycin; **B:** 5-Me-Trp; die Markierungen zeigen den Bereich der inhibitorischen Konzentration; n=3

In Abb. 3.2.2. sind zwei Beispiele zur Bestimmung des MIC-Werts gezeigt. Bei Erythromycin liegt der Bereich des MIC-Werts um 0,125 µg/ml zwischen den beiden

Punkten 0,065 µg/ml und 0,25 µg/ml. Auffallend ist der sehr enge Bereich der inhibitorischen Konzentration. Bei 0,065 µg/ml findet ungehemmtes Wachstum statt, während 0,25 µg/ml bereits die bakterizide Konzentration ist. Bei 5-Me-Trp, einem giftigen Analogon von Tryptophan, liegt der Bereich um 4 µg/ml zwischen den beiden Punkten 2 und 8 µg/ml. Damit erwies sich diese Methode als geeignetes System.

3.2.2. Bestimmung der MIC-Werte in Mikrotiterplatten

Nach dieser Methode wurden für viele andere Toxine die MIC-Werte bestimmt. Die Toxine wurden nach dem Kriterium ausgewählt, eine möglichst vielfältige intrazelluläre Wirkung zu haben. Sie sind in folgender Tabelle aufgelistet.

Tab. 3.2.1. Toxine und ihre ermittelten MIC-Werte für *C. glutamicum* ATCC13032

Toxin / Klasse	MIC [µg/ml]
Aminoglykoside	
Streptomycin	0,2
Kanamycin	0,25
Makrolide	
Erythromycin	0,125
Valinomycin	625
Tetracycline	
Tetracyclin	6,25
Chinolone	
Ciprofloxacin	0.39

Toxin / Klasse	MIC [µg/ml]
andere	
Chloramphenicol	1,56
Rifampicin	0,002
Reserpin	20
Verapamil	>256
PA-β-N	32
Ethambutol	0,78
SDS	>8
CCCP	2
Acridinorange	8
Pyrazinamid	>2079
EthBr	0.1
5-Methyl-Tryptophan	4
IAA	96
Indol	96
I3P	96

Die folgenden MIC-Werte wurden dabei von Andrea Brandt im Rahmen ihrer Diplomarbeit bestimmt: Streptomycin, Tetracyclin, Chloramphenicol, Ciprofloxacin, Rifampicin, Reserpin, Verapamil, Ethidiumbromid, SDS, Ethambutol, Acridinorange, CCCP und Pyrazinamid.

Aus der Gruppe der Antibiotika, die die Proteinbiosynthese hemmen, wurden die Aminoglykoside Streptomycin und Kanamycin ausgewählt. Als Exportsysteme für diese wurden bereits unter anderem der ABC-Transporter LmrA aus dem Gram-

positiven Bakterium *L. lactis* und der RND-Transporter AcrAD-TolC ausdem Gram-negativen Bakterium *E. coli* beschrieben (Poole, 2005). Des Weiteren wurden die Makrolide Erythromycin und Valinomycin getestet. Als Erythromycin-Exporter wurde unter anderen der ABC-Transporter MacAB-TolC aus *E. coli* gefunden (Kobayashi *et al.*, 2001). Von den Tetracyclinen wurde Tetracyclin verwendet, für welches bisher nur Exporter aus der „Major Facilitator Superfamily“ charakterisiert wurden (Poole, 2005). Zuletzt wurde noch der MIC-Wert für Chloramphenicol bestimmt, welches ebenfalls durch den ABC-Transporter LmrA aus *L. lactis* transportiert wird (Poelarends *et al.*, 2002). Aus der Gruppe der Antibiotika, die in die Transkription eingreifen, wurde aus den Fluoroquinolonen Ciprofloxacin gewählt. Für dieses wurden z.B. die ABC-Exporter MD1 und MD2 aus *Mycoplasma hominis* identifiziert (Raherison *et al.*, 2005). Des Weiteren wurde Rifampicin gewählt, welches die DNA-abhängige RNA-Polymerase hemmt. Ein Exporter konnte noch nicht gefunden werden. Stattdessen entwickelte sich die Resistenz gegen Rifampicin in Form einer Punktmutation. In *M. tuberculosis* beispielsweise konnte eine Mutation im Gen *rpoB*, welches für die β-Untereinheit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase kodiert, gefunden werden, was die Polymerase derart veränderte, dass Rifampicin nicht mehr binden konnte (Zazcek *et al.*, 2009). Als Antibiotikum gegen Tuberkulose wird auch Ethambutol verwendet, welches daher auch für diese Untersuchungen gewählt wurde. Es destabilisiert die Zellwand, indem es die Biosynthese der Bestandteile Lipoarabinomannan und deren Vorläufer blockiert (Mikusova *et al.*, 1995). Da die Zellmembran von *C. glutamicum* ähnlich aufgebaut ist wie die von Mykobakterien (Puech *et al.*, 2001), können durch die Untersuchungen des Exports von Ethambutol Erkenntnisse zur Entwicklung von Antituberkulotika gewonnen werden. Zusätzlich wurde die Gruppe der „Efflux Pump Inhibitors“ (EPIs) in die Versuche eingeschlossen. Das sind Substanzen, die zusammen mit Antibiotika deren Toxizität erhöhen (Lomovskaya *et al.*, 2006). Zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass Reserpin den MFS-Transporter NorA aus *S. aureus* inhibiert (Neyfakh *et al.*, 1993). Auch Verapamil wirkt inhibierend auf den MFS-Transporter Bmr aus *B. subtilis* (Neyfakh *et al.*, 1991). Schließlich wurde noch PA-β-N (MC-207,110) in die Untersuchungen mit aufgenommen, auch ein „Efflux Pump Inhibitor“, der sich sehr effektiv gegen diverse Multidrug-Transporter, vorwiegend RND-Transporter, erwiesen hat (Lomovskaya *et al.*, 2006). An Detergenzien wurde SDS (Sodium Dodecyl Sulfat) getestet, eine anionische Substanz, die in die Zellmembran interkaliert. Des Weiteren

wurde CCCP (Carbonylcyanid-M-Chlorophenylhydrazon), ein chemischer Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung, zugefügt (Heytler, 1980). Für CCCP konnte der Multidrug-Exporter EmrD aus *E. coli* als Transporter identifiziert werden (Putman *et al.*, 2000). Als Farbstoff wurde Acridinorange gewählt, welches ein pH-sensitiver Fluoreszenzfarbstoff ist. Bei neutralem pH-Wert zeigt er Membrangängigkeit, die bei saurer werdendem pH-Wert geringer wird, wobei die Substanz dann im Cytoplasma akkumuliert (Palmgren *et al.*, 1990). In *B. subtilis* wurde der Transporter Bmr als Exporter für Acridinorange identifiziert (Neyfakh, 2001). Auch Ethidium Bromid erwies sich als Substrat von Bmr (Neyfakh, 2001). Es interkaliert in die DNA und wurde auch in diesem Screening verwendet. Zusätzlich wurde Pyrazinamid getestet, ein Antibiotikum, welches oft in Kombination mit anderen Antituberkulotika verabreicht wird. Es blockiert die NAD-Synthese und erzeugt eine Übersäuerung des Cytoplasmas (Singh *et al.*, 2006). Wie für Rifampicin ist noch kein Transporter bekannt. Allerdings führt auch bei Pyrazinamid eine Punktmutation, nämlich im Gen *pncA* von *M. tuberculosis*, zu Resistenz (Mphahlele *et al.*, 2008). Als giftiges Analogon von Tryptophan wurde 5-Methyl-Tryptophan zugegeben. Da für *C. glutamicum* keine Tryptophanase im Genom annotiert ist, kann auch 5-Methyl-Tryptophan nicht abgebaut werden. Stattdessen wird es in der Proteinbiosynthese eingesetzt und verhindert so die Funktionalität der Proteine. Für Tryptophan ist noch kein Exporter in *C. glutamicum* bekannt. Zuletzt wurden noch drei Metabolite ausgewählt, die auch bei der (S,S)-Monatin-Produktion als Zwischenprodukte auftreten: Indolessigsäure (IAA), Indol und Indol-3-Pyruvat (I3P) (siehe Abschnitt 3.3.). Über den Export von Indol und I3P ist noch nicht viel bekannt. Indolessigsäure hingegen ist ein Substrat der „Auxin-Efflux-Carrier“-Familie in Pflanzen (Bennett *et al.*, 1998).

3.2.3. Screening von *C. glutamicum*-Stämmen, die in einem ABC-Exporter kodierenden Gen mutagenisiert wurden

Die in dieser Arbeit erstellte Mutantenbank mit ABC-Exportern wurde daraufhin auf Sensitivitäten gegenüber einigen der oben erwähnten Toxine überprüft. Als Konzentrationen wurden dafür die ermittelten MIC-Werte verwendet. Zunächst wurden alle Stämme zur Kontrolle in einer Mikrotiterplatte mit MMI-Medium inkubiert und das Wachstum verglichen (Abb. 3.2.3.). Da die mutagenisierten Stämme alle eine Insertion mit dem Vektor pDrive im Genom tragen, welcher die Kanamycin-Resistenz vermittelt, wurden dem Medium 25 µg/ml Kanamycin zugesetzt. Als Kontrollstamm wurde *C. glutamicum* ATCC 13032 mit dem Leervektor pEKEx2, zur Vermittlung der Kanamycinresistenz, verwendet. Er befindet sich an der Stelle H04. Die Zuteilung der Stämme ist in Tab. 3.1.1. abzulesen. Um ein robustes Maß als Vergleich zu erhalten, wurde das mittlere Wachstum von allen Stämmen berechnet (MW) und davon die Mittelwertsabweichung (roter Bereich im Diagramm) bestimmt. Dieses Screeningverfahren wurde im Weiteren verwendet, um Stämme zu ermitteln, die sensitiver auf bestimmte Toxine oder Antibiotika reagieren.

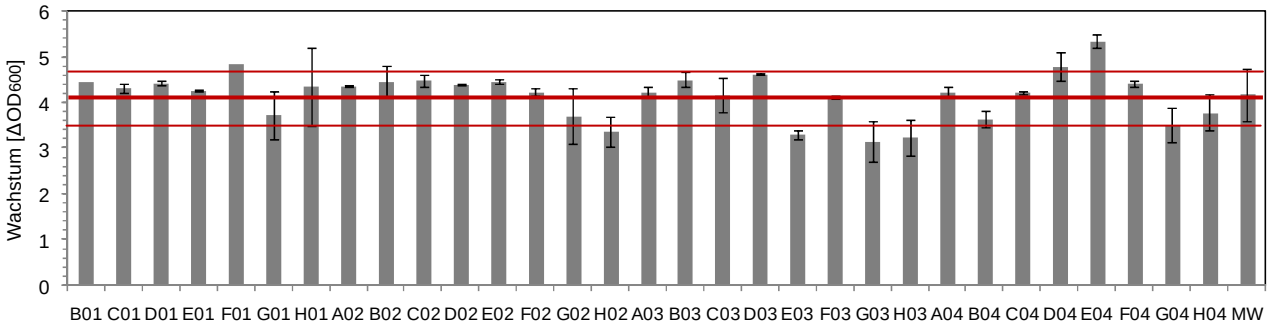

Abb. 3.2.3. *C. glutamicum*-Stämme, die in ABC-Exporter kodierenden Genen mutagenisiert wurden, in MMI mit Glukose, 25 µg/ml Kanamycin; Kontrolle: *C. glutamicum* ATCC 13032 pEKEx2 = H04 ; MW = Mittleres Wachstum; der rote Bereich markiert den Mittelwert des Wachstums ± Mittelwertsabweichung; n = 3

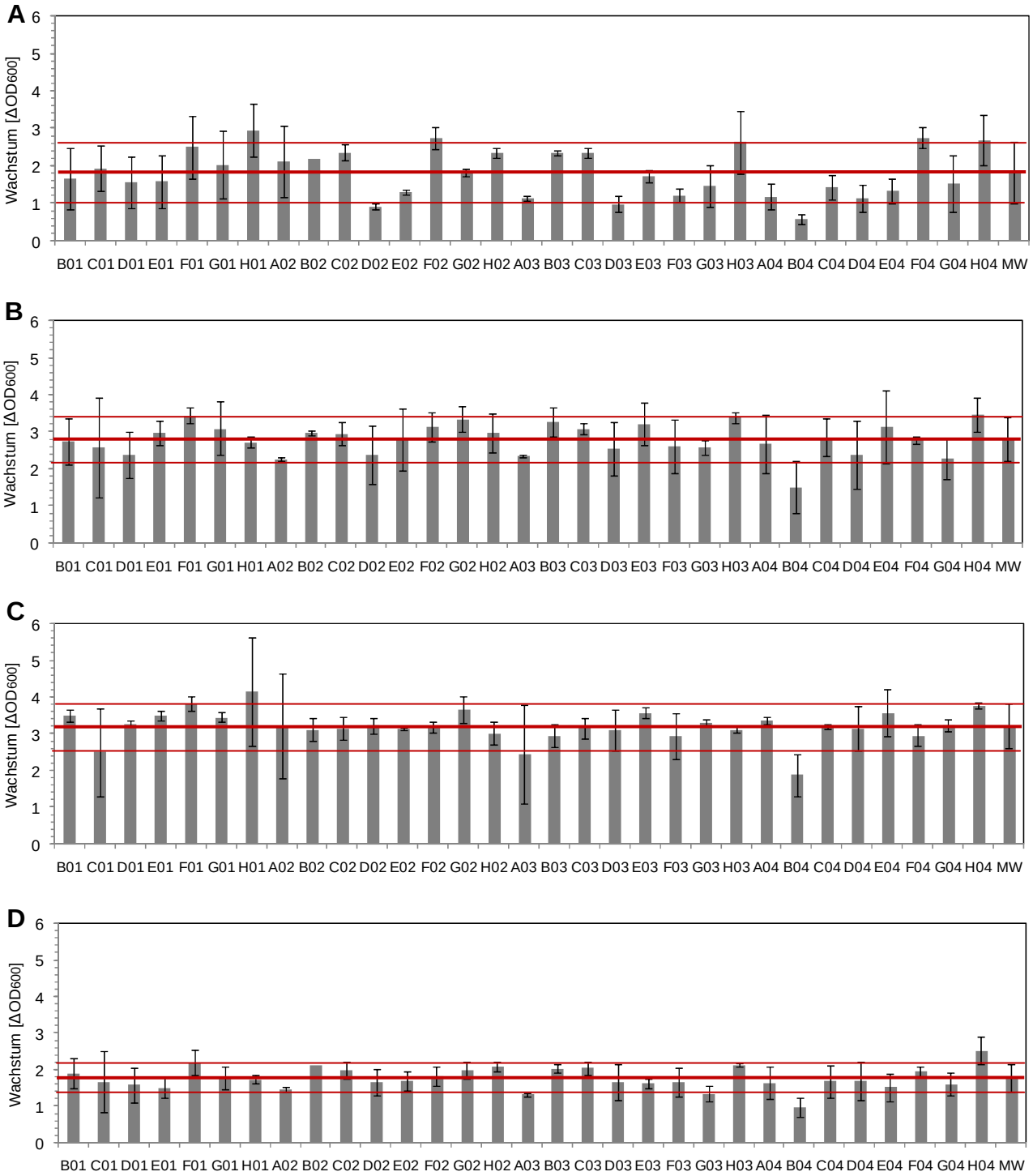

Abb. 3.2.4. *C. glutamicum*-Stämme, die in ABC-Exporter kodierenden Genen mutagenisiert wurden, in MMI mit Glukose, 25 µg/ml Kanamycin und **A:** 4 µg/ml **5-Methyl-Tryptophan**; **B:** 96 µg/ml **Indolessigsäure**; **C:** 96 µg/ml **Indol**; **D:** 2 µg/ml **CCCP**; Kontrolle: *C. glutamicum* ATCC 13032 pEKEx2 = H04; MW = Mittleres Wachstum; der rote Bereich markiert den Mittelwert des Wachstums ± Mittelwertsabweichung; n = 3

In Abb. 3.2.4. sind die Ergebnisse des Screenings auf erhöhte Sensitivitäten gegenüber Metaboliten wie 5-Methyl-Tryptophan (Abb. 3.2.4.A), Indolessigsäure (Abb. 3.2.4.B), Indol (Abb. 3.2.4.C) und dem Detergenz CCCP (Abb. 3.2.4.D) gezeigt. Unter Zugabe von 5-Methyl-Tryptophan zeigten einige Stämme schlechteres Wachstum, allerdings waren nur die Stämme *C. glutamicum Cgl1080*::pDrive (D02) und *C. glutamicum Cgl2447*::pDrive (B04) außerhalb des Bereichs der Mittelwertsabweichung. Da der Stamm *C. glutamicum Cgl2447*::pDrive (B04) in den weiteren Screenings ebenfalls ein schlechteres Wachstum als der Durchschnitt zeigte, wird dieser Stamm im Weiteren nicht mehr aufgelistet. Auf die Verwendung von Indolessigsäure, Indol und CCCP zeigten sich keine Stämme erhöht sensitiv.

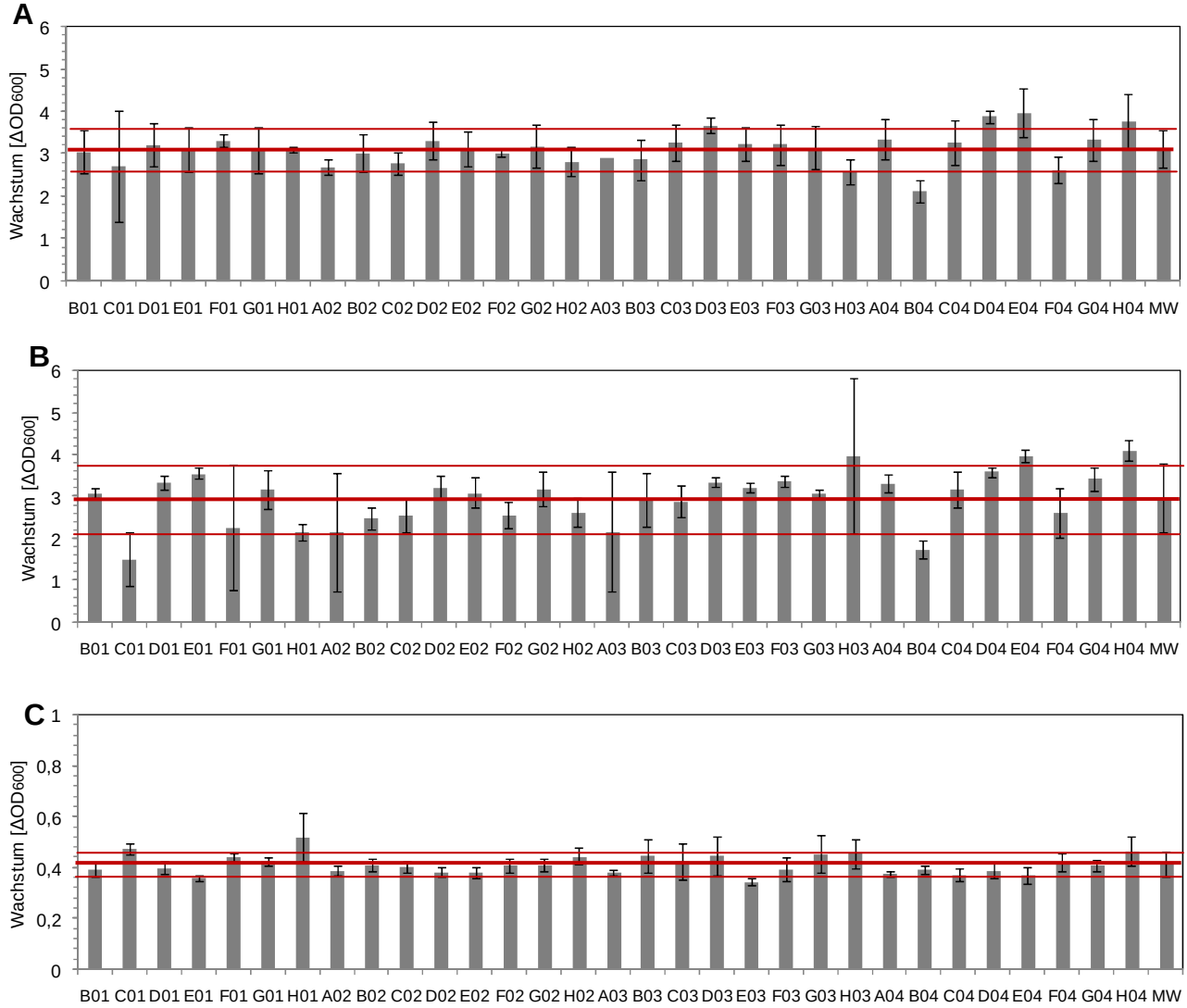

Abb. 3.2.5. *C. glutamicum*-Stämme, die in ABC-Exporter kodierenden Genen mutagenisiert wurden, in MMI mit Glukose, 25 µg/ml Kanamycin und **A:** 32 µg/ml **PA-β-N**; **B:** 0,78 µg/ml **Ethambutol**; **C:** 0,125 µg/ml **Erythromycin**; Kontrolle: *C. glutamicum* ATCC 13032pEKEx2 = H04 ; MW = Mittleres Wachstum; der rote Bereich markiert den Mittelwert des Wachstums ± Mittelwertsabweichung; n = 3

Bei den Untersuchungen zur Sensitivität gegenüber dem „Efflux Pump Inhibitor“ PA-β-N (Abb. 3.2.5.A) zeigte unter Berücksichtigung der Mittelwertsabweichung kein Stamm signifikant schlechteres Wachstum als der Durchschnitt. Bei den Untersuchungen zu Ethambutol (Abb. 3.2.5.B) wich ein Stamm vom mittleren Wachstum ab, nämlich *C. glutamicum Cgl0406*::pDrive (C01). Die Untersuchungen mit Erythromycin resultierten in einem generell schlechteren mittleren Wachstum (Abb. 3.2.5.C). Knapp unterhalb des mittleren Wachstums befand sich lediglich *C. glutamicum Cgl2012*::pDrive (E03).

In Abb. 3.2.6.A wurde die Sensitivität gegenüber Ciprofloxacin getestet, welches die Gyrase hemmt. Das Durchschnittswachstum betrug 2,8. Interessanterweise zeigte der Stamm *C. glutamicum Cgl0912*::pDrive (H01) ist signifikant erhöhtes Wachstum. Zusätzlich zeigten sich die beiden Stämme *C. glutamicum Cgl0952*::pDrive (A02) und *C. glutamicum Cgl1432*::pDrive (A03) leicht sensitiv.
Bei Zugabe von Streptomycin (Abb. 3.2.6.B) war eine große Varianz innerhalb des Wachstums zu sehen. Am stärksten im Wachstum eingeschränkt war der Stamm *C. glutamicum Cgl0406*::pDrive (C01). Ebenfalls ein verringertes Wachstum zeigten die Stämme *C. glutamicum Cgl2012*::pDrive (E03) und *C. glutamicum Cgl2826*::pDrive (E04)
Eine erhöhte Sensitivität gegenüber Rifampicin (Abb. 3.2.6.C) zeigte lediglich der Stamm *C. glutamicum Cgl0406*::pDrive (C01). Im Screening mit Tetracyclin (Abb. 3.2.6.D) zeigten sich zwei Stämme leicht sensitiv: *C. glutamicum Cgl0952*::pDrive (A02) und *C. glutamicum Cgl1432*::pDrive (A03).

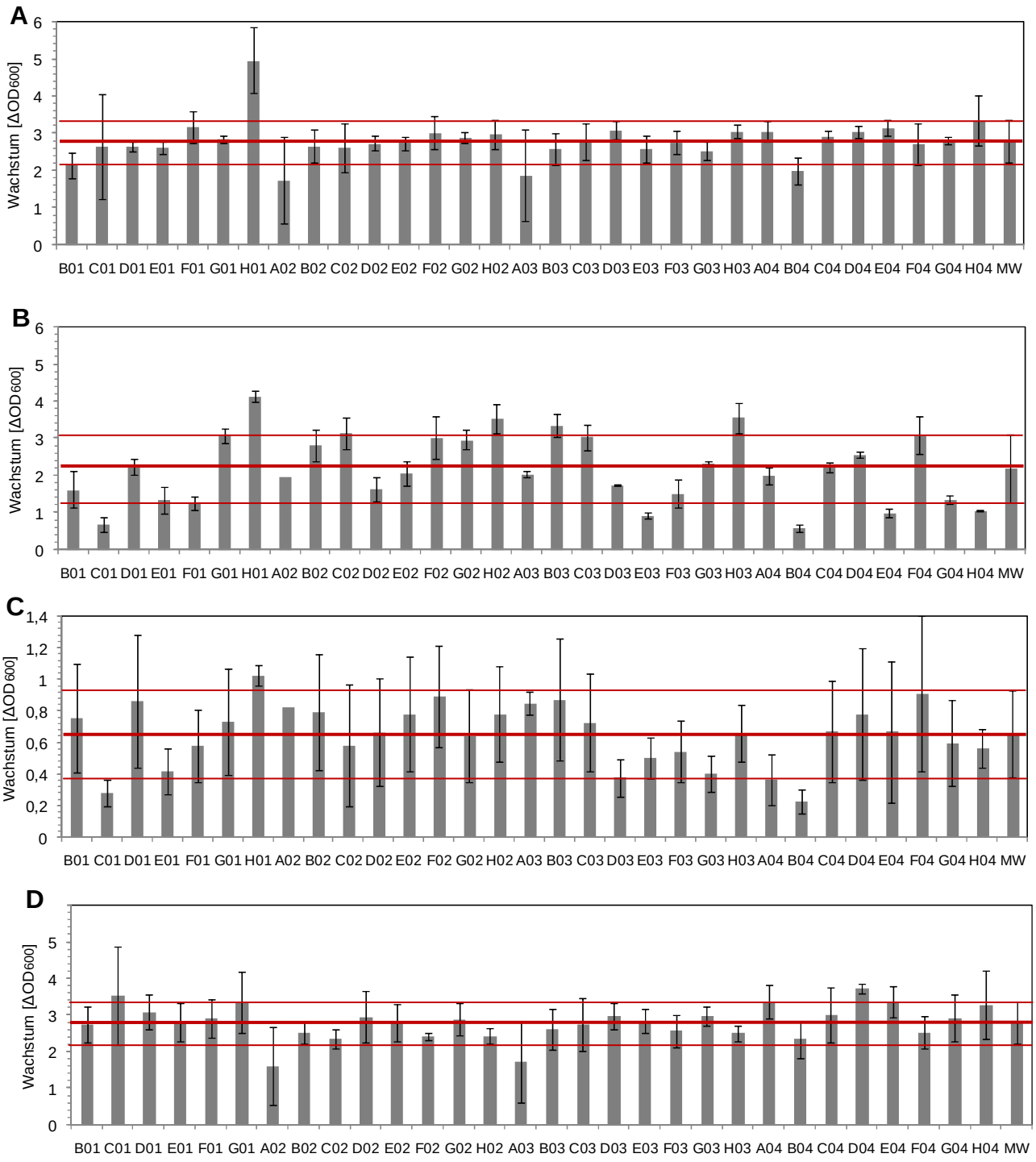

Abb. 3.2.6. *C. glutamicum*-Stämme, die in ABC-Exporter kodierenden Genen mutagenisiert wurden, in MMI mit Glukose, 25 µg/ml Kanamycin und **A:** 0,39 µg/ml **Ciprofloxacin**; **B:** 0,2 µg/ml **Streptomycin**; **C:** 0,002 µg/ml **Rifampicin**; **D:** 6,25 µg/ml **Tetracyclin**; Kontrolle: *C. glutamicum* ATCC 13032 pEKEx2 = H04 ; MW = Mittleres Wachstum; der rote Bereich markiert den Mittelwert des Wachstum ± Mittelwertsabweichung; n = 3

3.3. Untersuchung des Transportprozesses für die biotechnologisch relevante Substanz (S,S)-Monatin

Die vorliegenden Untersuchungen sind in einer Kooperation mit der Firma Cargill entstanden. Das Ziel dabei war, zu ermitteln, ob (S,S)-Monatin *C. glutamicum* über einen Transporter ins Medium gelangt und wenn ja, diesen Transporter zu charakterisieren. Eine Überexpression des Transporters könnte dazu beitragen, die (S,S)-Monatin-Produktion zu steigern.

3.3.1. Die Synthese von (S,S)-Monatin nach Cargill

Im Folgenden ist der Prozess zur Synthese von (S,S)-Monatin in *C. glutamicum* pEKEx2*AspCproA* dargestellt wie er von der Firma Cargill entwickelt wurde.

Tab. 3.3.1.: Prozess zur Synthese von Monatin in *C. glutamicum* pEKEx2*AspCproA* der Firma Cargill

Vorkultur I		
5 ml LB-Medium + 200 µl Glucose (50%) + Kanamycin	Animpfen von Platte	
Vorkultur II		
50 ml LB-Medium + 2 ml Glucose (50%) + Kanamycin	1-2 ml aus Vorkultur I	
Hauptkultur		
Animpfen		
50 ml MMI-Medium + Kanamycin	OD_{600} 0,1 aus Vorkultur II	
Induktion		
bei OD_{600} 0,5	IPTG (1 M)	50 µl
	Balchs Vitamin-Mix (1000x)	100 µl
	Pyridoxolhydrochlorid (50 mM)	500 µl
1. Zugabe		
3 Stunden nach Induktion	Tryptophan	0,5 g
	Natriumpyruvat (200 g/l)	3,75 ml
	Pyridoxalphosphat (20 mM)	100 µl
	Natriumdecanoat (0,1 M)	1,25 ml
	Tween 20 (20 % w/v)	500 µl
2. Zugabe		
24 Stunden nach Induktion	Tryptophan	0,5 g
	Natriumpyruvat	0,75 g

Nach dem Ansetzen der Hauptkultur wird bei einer OD_{600} von 0,5 die Biosynthese von (S,S)-Monatin über die Induktion der Expression der Gene *aspC* (kodiert für die Aminotransferase, die den ersten und letzten Schritt der Synthese katalysiert, Abb.

1.4.) und *proA* (kodiert für die Aldolase, die den mittleren Schritt katalysiert, Abb. 1.3.), die sich auf dem Plasmid pEKEx2 befinden, unter Verwendung von 1 mM IPTG, eingeleitet. Zusätzlich werden ein Vitamin-Mix und Pyridoxolhydrochlorid, ein Derivat des Cofaktors Pyridoxalphosphat, zugegeben. Die erste Zugabe von 0,5 g Tryptophan erfolgt 3 Stunden nach Induktion. Es werden noch Pyruvat und der Cofaktor Pyridoxalphosphat beigefügt. Während der Untersuchungen von Cargill haben sich die Detergenzien Natriumdecanoat und Tween 20 als für die Produktion förderlich gezeigt und werden daher ebenfalls im Produktionsprozess verwendet. Eine erneute Zugabe von 0,5 g Tryptophan erfolgt nach 24 Stunden. Dabei wird auch erneut Pyruvat zugefügt.

Nach diesem Protokoll wurden die ersten Syntheseversuche durchgeführt. Beispielhaft sind in Tab. 3.3.2. die (S,S)-Monatin-Ausbeuten dargestellt. Die Zellen wurden über Silikonölzentrifugation getrennt und aufgearbeitet. Die Analyse des Zellextrakts und des Mediums erfolgte über HPLC.

Tab. 3.3.2. Synthese von (S,S)-Monatin in *C.glutamicum* pEKEx2*AspCproA*; Aufarbeitung der internen Proben erfolgte über Silikonölzentrifugation; die Messung der externen Proben erfolgte in der HPLC

(S,S)-Monatin	extern	intern
nach 24 h	29 µM	320 µM
nach 48 h	33 µM	800 µM
nach 55 h	43 µM	2 mM
nach 72 h	44 µM	860 µM

Um Untersuchungen in Bezug auf mögliche Transportprozesse durchzuführen, müssen die internen Konzentrationen und deren zeitlicher Verlauf bestimmt werden können. Es stellte sich heraus, dass die Produktion von (S,S)-Monatin im Rahmen der hier durchgeführten Experimente zu gering war. Mit den erreichten geringen internen Mengen an (S,S)-Monatin, die sich in der HPLC an der unteren Detektionsgrenze befanden, war es nicht möglich, Transportvorgänge zu untersuchen. Daher musste zunächst eine Anpassung der Synthesebedingungen vorgenommen werden.

3.3.2. Modifizierung der Synthese

Da *C. glutamicum* sensibel auf niedrigen CO_2–Gehalt reagiert, wurde die Animpf-Dichte der Zellen auf OD_{600} 0,5 erhöht. Die erste Zugabe erfolgte nach 3 Stunden bzw. bei einer OD_{600} von 3, während auf die zweite Zugabe verzichtet wurde, da eine zu hohe Menge an Tryptophan die Analytik stört und die bereits vorhandene Menge an Tryptophan aus biochemischer Sicht ausreichend zur (S,S)-Monatin-Biosynthese sein müsste. Das Tryptophan wurde in Wasser gelöst in einer Endkonzentration von 10mM hinzu gegeben. Die von Cargill zugefügten 0,5 g entsprechen einer Endkonzentration von 50 mM, was bereits die Löslichkeitsgrenze von Tryptophan darstellt. Des Weiteren wurde die Biotin-Zugabe auf 200 µg/l erhöht. Biotin-Limitierung wird generell zur Glutamat-Produktion verwendet (Gutmann *et al.*, 1992), was in diesem Fall ein unerwünschter Nebeneffekt wäre.

Cargill verwendet für die Synthese die beiden Detergenzien Natriumdekanoat und Tween. Beide interagieren in einer noch nicht vollständig geklärten Art und Weise mit der Zellmembran. Tween 60 z.B. wird ebenfalls in der Produktion von Glutamat verwendet, wobei Tween 40 und Tween 80 bei *C. glutamicum* keine derartige Wirkung zeigen. Im Weiteren wurden sowohl die Endkonzentrationen von Dekanoat als auch die von Tween 40, 60 und 80 variiert. Zusätzlich wurde auch die Konzentration des Zwischenprodukts Indol-3-Pyruvat (I3P, Abb. 1.4.) verfolgt. Die Endkonzentrationen von (S,S)-Monatin und I3P im Medium nach 24 Stunden unter den verschiedenen Bedingungen sind in Tab. 3.3.3. zusammen gefasst. Da auf Grund der Instabilität von I3P nicht mit Sicherheit gesagt werden kann, dass der Peak bei der Retentionszeit von I3P tatsächlich I3P und nicht einem Abbauprodukt entspricht, wird im Weiteren der Begriff I3P-ähnlichen Substanz (I3P-äS) verwendet.

Der Tabelle ist zu entnehmen, dass die Proben mit 2,5 mM Dekanoat hohe Werte an (S,S)-Monatin zeigen, dabei am höchsten in der Probe mit 2,5 mM Dekanoat und 0,1 % Tween 60 (Probe 20 mit 23,6 µM (S,S)-Monatin). Tatsächlich konnte also in diesen Experimenten verifiziert werden, dass hohe Konzentrationen an Detergenz die (S,S)-Monatin-Ausbeute erhöht. Sehr auffallend ist, dass die I3P-äS-Konzentrationen durchweg höher sind als die von (S,S)-Monatin.

Tab. 3.3.3. Optimierung von verschiedenen Faktoren der (S,S)-Monatin-Synthese; zusätzlich zu den im Text vermerkten Änderungen in der Kultivierung sind hier die Änderungen in der Dekanoat- und Tween-Konzentrationen dargestellt; die Konzentration von (S,S)-Monatin und I3P-äS wurde nach 24 Stunden im Medium über HPLC-Analyse bestimmt

Nr.	Natriumdekanoat	Tween 40	Tween 60	Tween 80	(S,S)-Monatin	I3P-äS
	Endkonz. [mM]	Endkonz. [%]			[µM]	[µM]
1		0,02			**3**	219
2			0,02		**2,7**	174
3				0,02	**2,8**	167
4	2,5	0,02			**6,8**	1115
5	2,5		0,02		**6,1**	981
6	2,5			0,02	**6,2**	914
10	0				**5,2**	29,6
11	0,6				**8,5**	23,6
12	1,25				**3,1**	73
13	2,5				**3**	33,6
14	5				**0,8**	45,5
15	0,6		0		**9,8**	42,3
16	2,5		0		**17,8**	283,7
17	0,6		0,05		**8,7**	40,5
18	2,5		0,05		**13,3**	299
19	0,6		0,1		**8,4**	27,5
20	2,5		0,1		**23,6**	96,7
21	0,6		0,2		**5,2**	14
22	2,5		0,2		**12,7**	115,3
23	0,6		0,5		**5,4**	14
24	2,5		0,5		**8,4**	47,8

Das optimierte Protokoll ist in Tab. 3.3.4. zusammengestellt.

Da es allerdings nicht gelungen ist, das Protokoll so zu optimieren, dass die Produktion von (S,S)-Monatin reproduzierbar und ausreichend hoch zur Untersuchung von Transportvorgängen war, war eine weitere Optimierung und Charakterisierung des gesamten (S,S)-Monatin-Produktionsprozesses in der Zelle notwendig.

Tab. 3.3.4.: optimierter Prozess zur Produktion von (S,S)-Monatin in *C. glutamicum* pEKEx2*AspCproA*

Vorkultur I		
5 ml LB-Medium + 200 µl Glucose (50%) + Kanamycin	Animpfen von Platte	
Vorkultur II		
20 ml LB-Medium + 2 ml Glucose (50%) + Kanamycin	1 ml aus Vorkultur I	
Hauptkultur		
Animpfen		
20 ml MMI-Medium + Kanamycin	OD_{600} 0,5 aus Vorkultur II	
Induktion		
bei OD_{600} 3	IPTG (1 M)	20 µl
	Balchs Vitamin-Mix (1000x)	40 µl
	Pyridoxolhydrochlorid (50 mM)	200 µl
1. Zugabe		
3 Stunden nach Induktion	Tryptophan (50mM)	2 ml
	Natriumpyruvat (200 g/l)	1,5 ml
	Pyridoxalphosphat (20 mM)	40 µl

3.3.3. Bestimmung der inhibitorischen Konzentration der während der Biosynthese relevanten Metabolite

C. glutamicum kann weder (S,S)-Monatin noch I3P als C- oder N-Quelle verwerten (persönliche Mitteilung, Cargill).

Da bei einer Produktion sehr hohe Konzentrationen der Zwischenprodukte und der Endsubstanz im Cytoplasma und im Medium auftreten, wurde die Wirkung dieser Konzentrationen auf *C. glutamicum* getestet. Dazu wurde die „Minimale Inhibitorische Konzentration“ (MIC), die minimale Konzentration, die nötig ist, um das Wachstum zu inhibieren, dieser Substanzen in Mikrotiterplatten bestimmt.

Da I3P sehr instabil ist, und davon ausgegangen werden kann, dass es zu Indolessigsäure (IAA) und/oder Indol zerfällt bzw. abgebaut wird (Cooney, 1989), wurde auch für diese Substanzen der MIC-Wert bestimmt. Es wurde dabei wie in Material und Methoden beschrieben vorgegangen.

Es konnte für I3P (bzw. I3P-äS) ein MIC-Wert von 473 µM, für Indolessigsäure (IAA) ein MIC-Wert von 137 µM und für Indol ein MIC-Wert von 819 µM bestimmt werden (Abb. 3.3.1.).

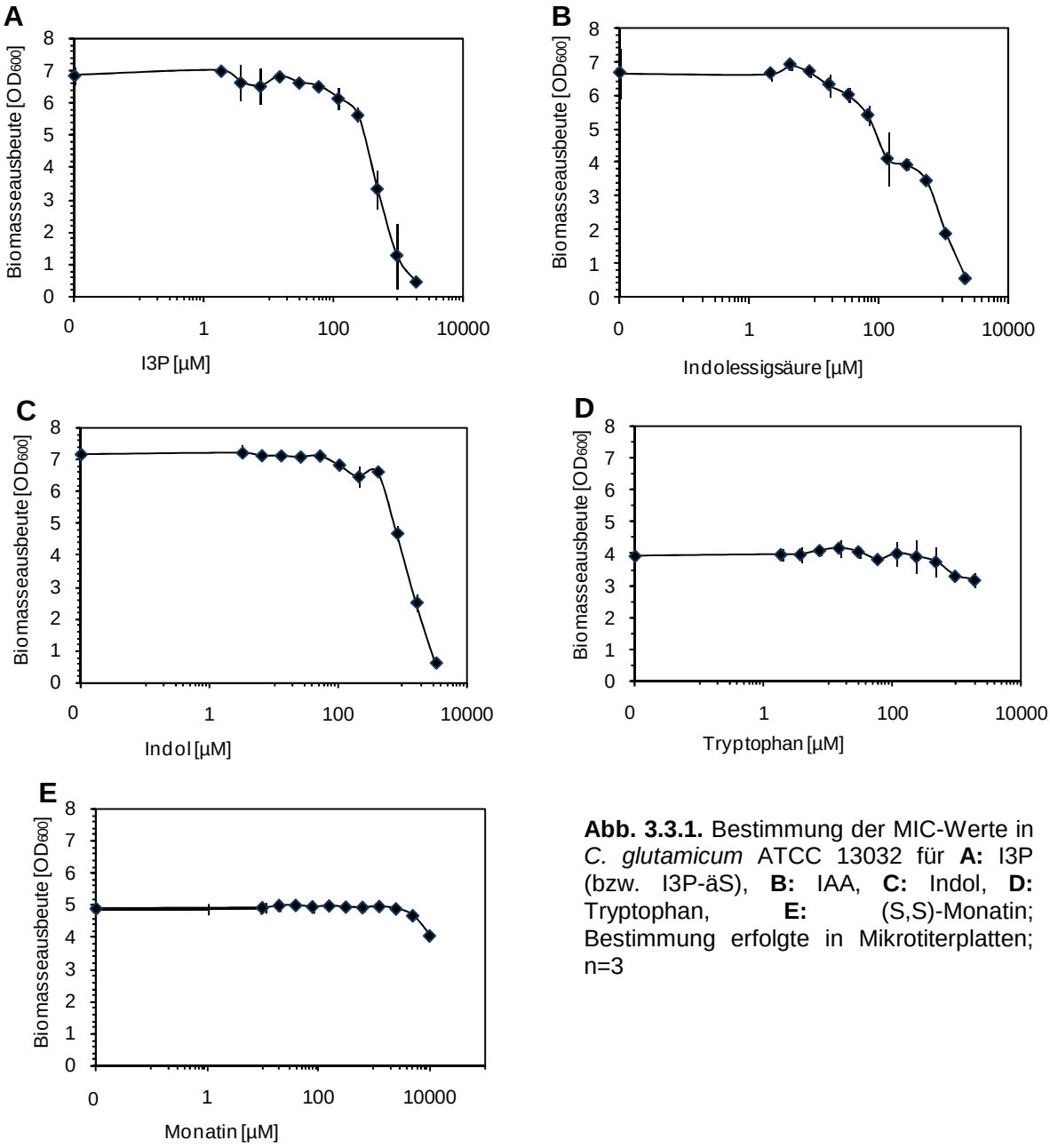

Abb. 3.3.1. Bestimmung der MIC-Werte in *C. glutamicum* ATCC 13032 für **A:** I3P (bzw. I3P-äS), **B:** IAA, **C:** Indol, **D:** Tryptophan, **E:** (S,S)-Monatin; Bestimmung erfolgte in Mikrotiterplatten; n=3

Dies bewegt sich in etwa in dem Bereich, der bei der Produktion von (S,S)-Monatin ebenfalls erreicht wird. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass I3P (bzw. I3P-äS) das Wachstum von *C. glutamicum* und damit die Produktion von (S,S)-Monatin hemmt. Tryptophan und (S,S)-Monatin hingegen zeigen keinerlei wachstumshemmende Wirkung. Da das Zellwachstum von vielen verschiedenen Faktoren, wie z.B. der Sauerstoffzufuhr, abhängig ist, zeigt sich ein sehr unterschiedliches Wachstumsverhalten in Mikrotiterplatten zum Wachstum in Schüttelkolben. Für I3P wurde daher der Versuch zur MIC-Wert-Bestimmung in Kolben wiederholt und bestätigt (Daten nicht gezeigt).

3.3.4. Synthese der Proteine AspC und ProA

Da die Konzentration an (S,S)-Monatin generell sehr gering war und für Transportmessungen nicht ausreichend, wurde die Expression der Gene *aspC* und *proA* verifiziert. Da keine Antikörper für diese Proteine zur Verfügung standen, konnte lediglich auf Grund des Größen- und Zeitvergleichs die Synthese der Proteine abgeschätzt werden. Cargill stellte auch *E. coli*-Stämme bereit, die für die Produktion von (S,S)-Monatin optimiert wurden. Diese Stämme wurden als Vergleichsobjekte zur Verfügung gestellt. Es wurden die Stämme *C. glutamicum* pEKEx2*AspCproA* und *E. coli* BL21(DE3) pET32*AspCproA* kultiviert, jeweils vor der Induktion, beim *E. coli*-Stamm 1 Stunde nach Induktion, vor Zugabe und zwei Stunden nach Zugabe Proben genommen und die lösliche Proteinfraktion auf ein SDS-Gel (nach Schägger) aufgetragen und anschließend mit Coomassie *Brilliant Blue* gefärbt.

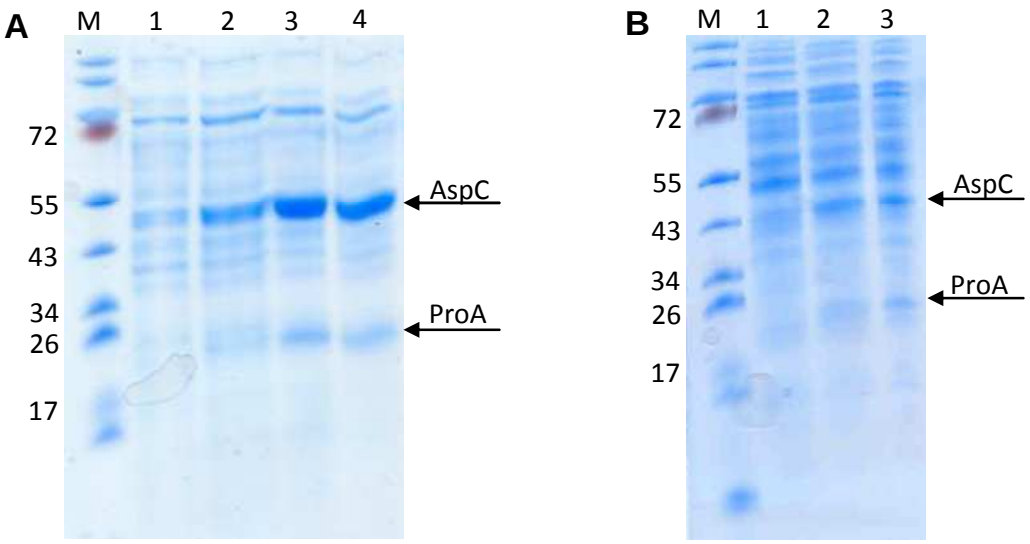

Abb. 3.3.2.: Auftrennung der Fraktion der löslichen Proteine von **A:** ***E. coli*** *BL21(DE3)* pET32-*AspCproA,* 1: vor Induktion; 2: 1h nach Induktion; 3: vor Zugabe; 4: 2h nach Zugabe, **B:** ***C. glutamicum*** pEKEx2*AspCproA* 1: vor Induktion; 2: vor Zugabe; 3: 2h nach Zugabe, M: Marker PageRuler

Die theoretische Masse des Proteins AspC beträgt 44 kDa, was, in Abb. 3.3.2.A besonders gut sichtbar, ab einer Stunde nach Induktion eine immer stärker werdende Bande zeigt. Da die Bande vor der Induktion noch fast gar nicht sichtbar ist, handelt es sich hierbei mit hoher Wahrscheinlichkeit um das Protein AspC. Bei der bei 24 kDa immer stärker werdenden Bande handelt es sich hingegen mit hoher Wahrscheinlichkeit um das Protein ProA.

Es wurde geschlussfolgert, dass AspC und ProA in ausreichenden Mengen, wenn auch in *C. glutamicum* weniger ausgeprägt (Abb. 3.3.2.B) als in *E. coli*, zur Produktion von (S,S)-Monatin zur Verfügung stehen. Daher wurde der Focus in weiteren Untersuchungen auf die Bereitstellung von Vorstufen und Cofaktoren gelegt.

3.3.5. Transport von Tryptophan

Da die Aufnahme von Tryptophan einen limitierenden Faktor in der (S,S)-Monatinproduktion darstellen kann, wurde diese unter Verwendung von radioaktiv markiertem Tryptophan näher untersucht. Da der K_M-Wert des Tryptophan-Aufnahmesystems AroP ca. 0,8 µM beträgt, sollte er mit den verwendeten 10 µM gesättigt sein. Zusätzlich wurden noch 100 µM (S,S)-Monatin bzw. 100 µM I3P zugegeben und die Aufnahme von Tryptophan gemessen. Sollten (S,S)-Monatin oder I3P-äS über denselben Transporter aufgenommen werden, so sollte das in einer deutlich niedrigeren Aufnahme für Tryptophan sichtbar sein. Abb. 3.3.3.A zeigt eine Tryptophanaufnahmerate von 0,06 nmol/mgTG*min, die durch Zugabe von (S,S)-Monatin oder I3P-äS nicht gehemmt wird.

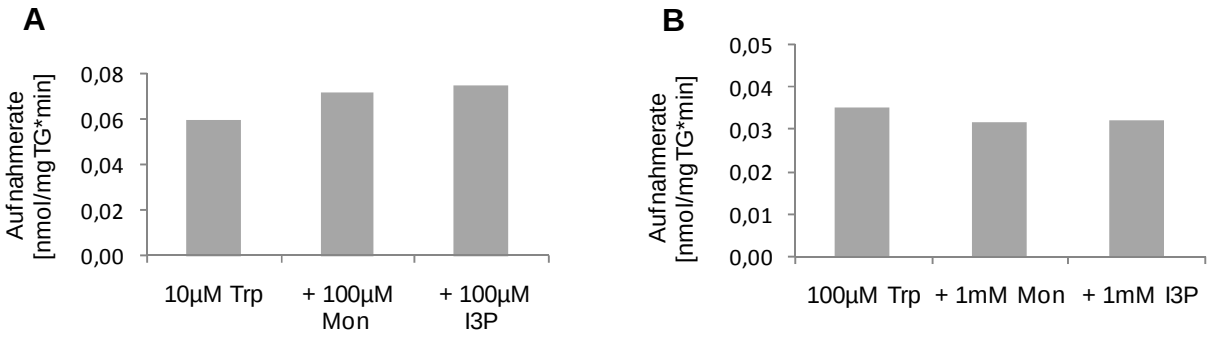

Abb. 3.3.3. Trp-Aufnahmeraten in **A:** ***C. glutamicum ATCC 13032****;* Messung erfolgte mit 10 µM radioaktiv markiertem Trp; zusätzlich wurden jeweils 100 µM (S,S)-Monatin bzw. I3P zugegeben; **B:** ***E. coli*** **BL21**; Messung erfolgte mit 100µM radioaktiv markiertem Trp; zusätzlich wurden jeweils 1mM (S,S)-Monatin bzw. I3P zugegeben

Es wurde auch für *E. coli* BL21(DE3) pET32*AspCproA* die Tryptophan-Aufnahmerate bestimmt. *E. coli* besitzt vier Aufnahmesysteme, wobei der höchste K_M-Wert ca. bei 70 µM liegt. Daher wurde für diese Untersuchungen eine Konzentration von 100 µM radioaktiv markiertem Tryptophan verwendet. Zur Hemmung wurden 1 mM (S,S)-

Monatin bzw. 1 mM I3P zugegeben. Abb. 3.3.3.B zeigt eine Aufnahmerate von 0,04 nmol/mgTG*min. (S,S)-Monatin und I3P zeigen keine hemmende Wirkung.
Daraus wurde geschlossen, dass weder (S,S)-Monatin noch I3P (bzw. I3P-äS) über die Tryptophan-Transporter importiert werden.

3.3.6. Interne Konzentrationen von Tryptophan und Alanin

In die (S,S)-Monatinsynthese involviert sind sowohl Pyruvat als auch Alanin und Tryptophan.
Um das interne Level an Tryptophan zu erhöhen, wurden zunächst zwei Ansätze verfolgt: Es wurde ein Stamm konstruiert, welcher das Gen für den Tryptophan-Importer AroP aus *C. glutamicum* überexprimiert. Da die Aufnahmerate von Tryptophan nicht zufriedenstellend hoch war, wurde ein Stamm konstruiert, der das Gen für den Tryptophan-Importer TnaB aus *E. coli* überexprimiert. In diesem Abschnitt wird die Konstruktion und Untersuchung beider zusammengefasst. Die Konstruktion erfolgte wie in „Material und Methoden“ beschrieben. Für die Überexpression von *tnaB* wurde das Plasmid pEC-XC99E gewählt. Es ist mit pEKEx2 kompatibel und besitzt eine Chloramphenicol-Resistenz, wodurch es zusammen mit dem pEKEx2*AspCproA* in *C. glutamicum* elektroporiert werden kann. Nach Fertigstellung der Plasmide und anschließender Elektroporation in *C. glutamicum* wurde die Funktionalität der Proteine überprüft. Dies wurde auf zwei Arten durchgeführt: Es wurde die Tryptophan-Aufnahmerate mittels radioaktiv markiertem Tryptophan gemessen. Zusätzlich wurde die „Minimale Inhibitorische Konzentration“ (MIC) des toxischen Tryptophan-Analogons 5-Methyl-Tryptophan (5-Me-Trp) ermittelt. Je höher die Aufnahmerate für Tryptophan ist, desto sensitiver gegenüber 5-Me-Trp sollte der Stamm sein.
In Abb. 3.3.4.A sind die Aufnahmeraten von radioaktiv markiertem Tryptophan dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass *C. glutamicum* pEKEx2*aroP* weniger effektiv ist als *C. glutamicum* pEC-XC99E*tna*B. In Abb. 3.3.4.B sind die MIC-Werte der drei Stämme gezeigt. Auch hier ist deutlich zu erkennen, dass *C. glutamicum* mit einer Überexpression von *tnaB* sensitiver gegenüber 5-Me-Trp ist (MIC von 2 µg/ml) als *C. glutamicum* mit einer Überexpression von *aroP* oder der Wildtyp (MIC von 4 µg/ml). Die höhere Sensitivität von *C. glutamicum* pEC-XC99E*tna*B gegenüber 5-Methyl-Tryptophan wurde außerdem über einen Wachstumstest auf 5-Me-Trp-haltigen MMI-Platten verifiziert (Daten nicht gezeigt).

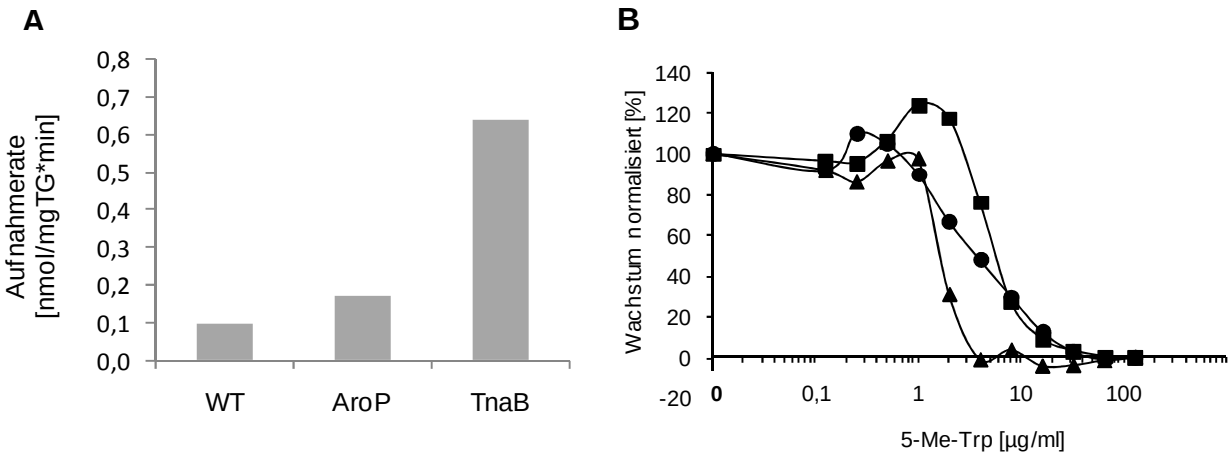

Abb.: 3.3.4. A: Trp-Aufnahme in *C. glutamicum* ATCC 13032, *C. glutamicum* pEKEx2*aroP* und *C. glutamicum* pEC-XC99E*tnaB*, Messung erfolgte mit 20µM radioaktiv markiertem Trp; **B: MIC-Wert-Bestimmung** in *C. glutamicum* ATCC 13032 (■), *C. glutamicum* pEKEx2*aroP* (●) und *C. glutamicum* pEC-XC99E*tnaB* (▲) für das toxische Trp-Analogon 5-Me-Trp

Auch bei der Überexpressionsmutante von *tnaB* wurde über Aufnahmemessungen mit Tryptophan unter Zusatz von (S,S)-Monatin und I3P gezeigt, dass diese die Aufnahme nicht hemmen (Daten nicht gezeigt). Die erfolgreiche Überexpression von *tnaB* sollte für eine ausreichend hohe Konzentration von Tryptophan im Cytoplasma sorgen, sodass dies nicht als limitierender Faktor in der (S,S)-Monatinproduktion in Frage kommen sollte.

Mit der Methode der Dipeptidfütterung des Dipeptids Tryptophan-Alanin (Trp-Ala) ist es möglich, sowohl den internen Tryptophan- als auch Alanin-Spiegel zu erhöhen. Es konnte gezeigt werden, dass Trp-Ala ein höheres internes Tryptophan-Level sicherstellt als Ala-Trp (Daten nicht gezeigt). In einem Produktionsexperiment wurde 3 mM Trp-Ala als Tryptophan-Quelle zum Zeitpunkt der Zugabe und erneut nach zwei Stunden zugefügt. Die internen Proben wurden über Silikonölzentrifugation aufgearbeitet und in der HPLC vermessen. Wie in Abb. 3.3.5.A ersichtlich, konnten interne Konzentrationen von Alanin von bis zu 110 mM erreicht werden. Es ist auch deutlich der erneute Anstieg nach der zweiten Zugabe von Trp-Ala nach zwei Stunden zu erkennen. Da Alanin innerhalb der Synthese wieder regeneriert wird, sollten diese Konzentrationen ausreichend sein.

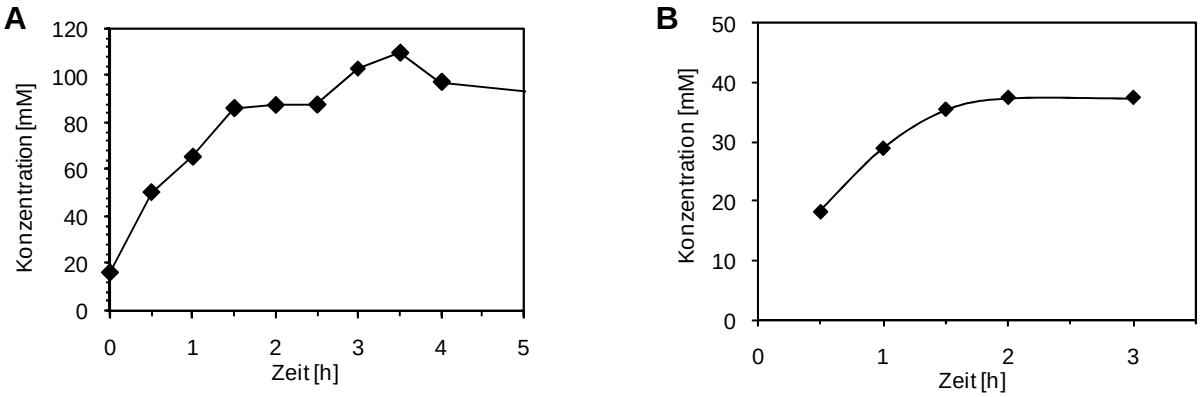

Abb.: 3.3.5. Interne Konzentrationen von **A: Alanin**; Zugabe von 3 mM Trp-Ala erfolgte zum Zeitpunkt 0 und nach zwei Stunden; **B: Tryptophan**; einmalige Zugabe von 3 mM Trp-Ala; *C. glutamicum* pEKEx2*AspCproA*

Durch die Zugabe von Trp-Ala lässt sich auch das interne Level an Tryptophan erhöhen. In Abb. 3.3.5.B ist ein Versuch dargestellt, in dem einmalig 3 mM Trp-Ala gefüttert wurden, und die interne Konzentration an Tryptophan nach Aufarbeitung über Silikonölzentrifugation in der HPLC gemessen wurden. Die interne Konzentration beläuft sich nach zwei Stunden auf ca. 40 mM.

3.3.7. Interne Konzentration von Pyruvat

Um die interne Konzentration an Pyruvat zu erhöhen, wurde ein *C. glutamicum*-Stamm, dem das Gen *aceE* deletiert worden war, verwendet (zur Verfügung gestellt von T. Radespiel). Das Gen *aceE* kodiert für die Pyruvatdecarboxylase-Untereinheit der Pyruvatdehydrogenase. Mit einer Deletion in diesem Gen wird verhindert, dass das Pyruvat in den Citratzyklus eingeschleust wird. Das Plasmid pEKEx2*AspCproA* wurde in den Stamm *C. glutamicum* Δ*aceE* transformiert und die internen Werte von Pyruvat über HPLC-Messungen bestimmt und verglichen. In Abb.3.3.6. ist der Unterschied deutlich zu erkennen. Im *aceE*-intakten Stamm ist kein internes Pyruvat messbar, da es sofort verstoffwechselt wird. In der Deletionsmutante hingegen finden sich ca. 13 mM internes Pyruvat, welches ausreichend für die (S,S)-Monatinsynthese sein sollte.

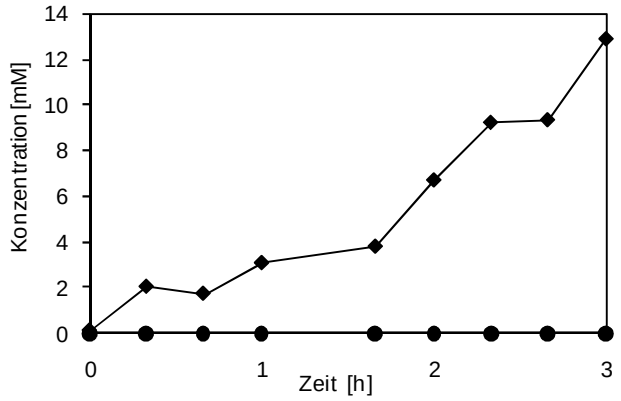

Abb.: 3.3.6. Interne Konzentration von Pyruvat in *C. glutamicum* pEKEx2*AspCproA* (●) und *C.glutamicum* Δ*aceE* pEKEx2*AspCproA* (♦)

Zusammenfassend wurden alle Faktoren, um die interne Versorgung mit zur (S,S)-Monatinsynthese notwendigen Substanzen zu gewährleisten, kombiniert und der Stamm *C. glutamicum* Δ*aceE* pEKEx2*AspCproA* konstruiert. Mit diesem Stamm wurden Syntheseexperimente unter Zugabe von 3 mM Trp-Ala durchgeführt. Beispielhaft ist ein Ergebnis in Abb. 3.3.7. dargestellt.

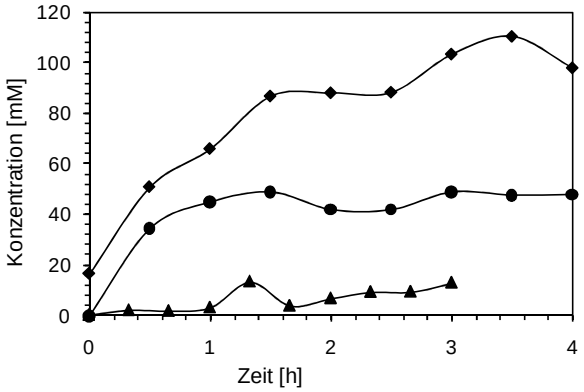

Abb.: 3.3.7. Interne Konzentrationen von Alanin (♦), Pyruvat (▲) und Tryptophan (●) in *C. glutamicum* Δ*aceE* pEKEx2*AspCproA;* einmalige Zugabe von 3 mM Trp-Ala;

In Abb. 3.3.7. sind die internen Konzentrationen von Alanin, Pyruvat und Tryptophan im Stamm *C. glutamicum* Δ*aceE* pEKEx2*AspCproA* nach Zugabe von Trp-Ala dargestellt. Es geht deutlich hervor, dass sich die internen Konzentrationen im mM-Bereich bewegen, für Synthesebedingungen also absolut ausreichend sein sollten. Die im Syntheseversuch gemessen Konzentrationen an internem (S,S)-Monatin sind in Abb. 3.3.8. gezeigt.

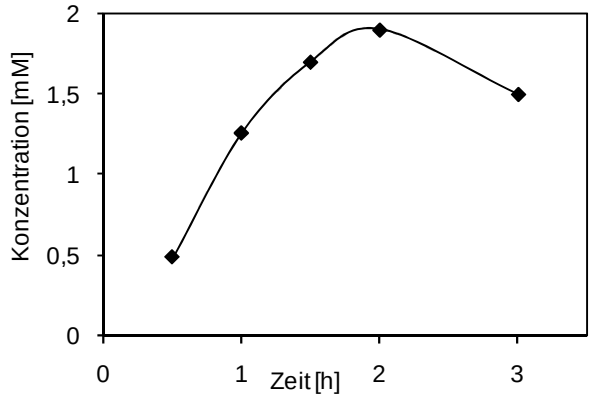

Abb.: 3.3.8. Interne Konzentration von (S,S)-Monatin in *C. glutamicum* Δ*aceE* pEKEx2*AspCproA;* einmalige Zugabe von 3 mM Trp-Ala;

Es konnten unter diesen Versuchsbedingungen internes (S,S)-Monatin von bis zu 1,8 mM nachgewiesen werden, wobei diese Messungen hohen Schwankungen unterlagen. Auch die hohen bereitgestellten Mengen an Vorstufen führten nicht zu einer signifikanten Steigerung der (S,S)-Monatin-Synthese. Die interne Konzentration an (S,S)-Monatin befindet sich immer noch am Detektionslimit und ist zu gering für eine biochemische Charakterisierung des Exports. Dies führte zu der Annahme, dass die Aktivität der Enzyme der limitierende Schritt sein könnte. Zusätzlich ergab sich die Frage, welche Auswirkungen die von Cargill verwendeten hohen Mengen an Detergenz auf die Biosynthese haben.

3.3.8. Untersuchungen zur Lokalisation der Biosynthese

Da die unphysiologisch hohen Konzentrationen an verwendetem Detergenz unter Verdacht stehen, die Zellen zu schädigen, wurden Untersuchungen zum Syntheseort gemacht. Dazu wurden 3 mM bis 50 mM Tryptophan zu Zellen gegeben. Würde die Biosynthese ausschließlich in den Zellen stattfinden, so sollte man keinen Unterschied zwischen der Zugabe von 10 mM und 50 mM Tryptophan finden, da aus biochemischer Sicht die Tryptophan-Importer gesättigt sind. Findet dagegen auch Biosynthese im Medium statt, so steigt die Synthese mit steigender Tryptophan-Menge. Es wurde dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3) pET32*AspCproA* jeweils 3 mM, 10 mM und 50 mM Tryptophan hinzugegeben und Proben nach 1, 2, 4 und 24 Stunden vermessen. Dabei wurden sowohl die externen als auch die internen Werte bestimmt. Die gemessenen (S,S)-Monatin-Mengen sind in Tab. 3.3.5. zusammen gefasst.

Tab. 3.3.5. Synthese von (S,S)-Monatin mit *E. coli* BL21(DE3) pET32*AspCproA* mit verschiedenen Tryptophan-Mengen; externe und interne (S,S)-Monatin-Konzentration nach 1, 2, 4 und 24 Stunden

Zeit nach	**+ 3 mM Trp**		**+ 10 mM Trp**		**+ 50 mM Trp**	
Zugabe	**extern**	**intern**	**extern**	**intern**	**extern**	**intern**
1 h	0 μM	370 μM	3 μM	305 μM	9 μM	440 μM
2 h	3 μM	570 μM	6 μM	340 μM	26 μM	770 μM
4 h	7 μM	610 μM	17 μM	450 μM	70 μM	760 μM
24 h	**4 μM**	390 μM	**28 μM**	500 μM	**131μM**	1,5 mM

Es ist ein signifikanter Anstieg in der (S,S)-Monatin-Konzentration bei Zugabe von 50 mM im Gegensatz zu 3 mM Tryptophan zu erkennen. Es besteht also ein linearer Zusammenhang zwischen höheren Tryptophan-Mengen und der ansteigenden (S,S)-Monatin-Konzentration, der biochemisch nicht zu erklären ist, wenn die Produktion ausschließlich im Zellinneren stattfände. Es ist auch sehr auffällig, dass die internen Konzentrationen ähnlich hoch sind, während die externen signifikant unterschiedlich sind.

Da Dekanoat ein Detergenz ist, welches vermutlich die Zellmembran beschädigt, wurde der Zusammenhang zwischen Dekanoat und der Menge an ausgetretenen Proteinen untersucht. Dabei wurde auch erörtert, ob die hohen verwendeten Konzentrationen von IPTG (1 mM) zur Induktion der Gene *aspC* und *proA* dazu beitragen, dass die Zellen lysieren und die hohen Mengen an Protein ins Medium entlassen. Diese Korrelation konnte allerdings nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Es wurden fünf Kolben mit *C. glutamicum* pEKEx2*AspCproA* für den Versuch vorbereitet und kultiviert. Die Induktion wurde nach Protokoll, aber mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen durchgeführt. Drei Stunden nach Induktion wurde nach Protokoll die Zugabe von Pyruvat und PLP durchgeführt, allerdings ohne Tryptophan. Wiederum drei Stunden später wurden die Zellen durch Sterilfiltration vom Medium getrennt und 10 mM Tryptophan zum zellfreien Überstand gegeben. Nach erneuten drei Stunden wurden Proben zur Vermessung in der HPLC genommen sowie 12 µl aus jedem Ansatz auf ein SDS-Gel aufgetragen.

Tab. 3.3.6. Synthese von (S,S)-Monatin in *C. glutamicum* pEKEx2*AspCproA*; nach Protokoll aber mit verschiedenen IPTG- bzw. Dekanoat-Konzentrationen

	Substanz	Kolben 1	Kolben 2	Kolben 3	Kolben 4	Kolben 5
Induktion:	IPTG	0 µM	5 µM	5 µM	10 µM	10 µM
Zugabe:	Dekanoat	0 mM	1.25 mM	2.5 mM	1.25 mM	2.5 mM
	Tween 60	0	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%

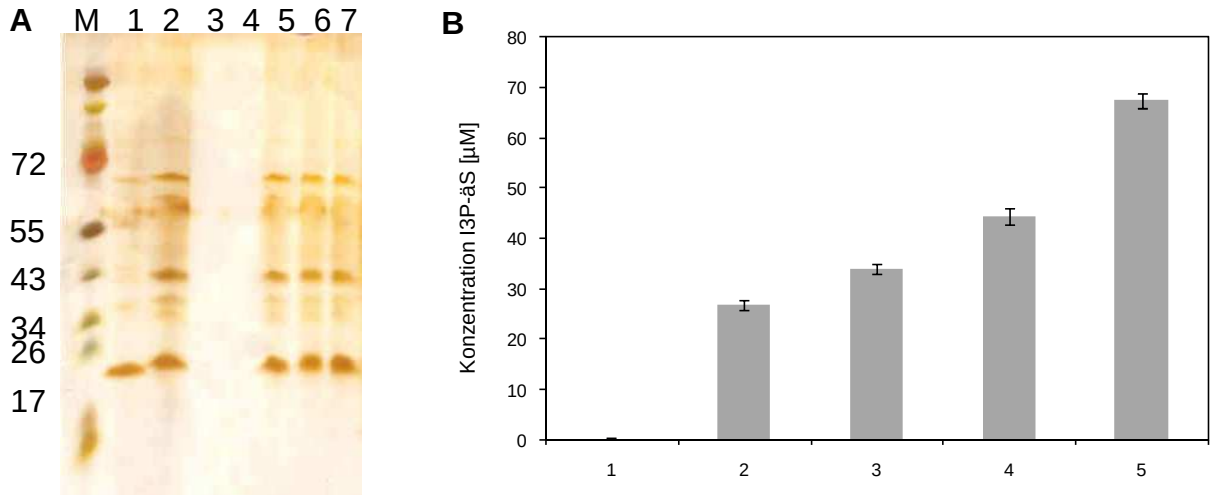

Abb. 3.3.9. A: Proteinmenge in 12µl zellfreiem Überstand von *C. glutamicum* pEKEx2*AspCproA*; nach Induktion mit verschiedenen IPTG- und Dekanoat-Konzentrationen (siehe Tab. 3.2.5.) wurde der zellfreie Überstand mit Tryptophan versetzt; 3 Stunden nach Zugabe von Tryptophan wurden die Proben genommen; **1:** Kolben 1, **2:** Kolben 2, **5:** Kolben 3, **6:** Kolben 4, **7:** Kolben 5, **M:** PageRuler; Banden über Silberfärbung sichtbar gemacht; **B:** I3P-äS-Konzentration im Überstand; **1:** Kolben 1, **2:** Kolben 2, **3:** Kolben 3, **4:** Kolben 4, **5:** Kolben 5

In Abb. 3.3.9.A ist zu erkennen, dass die Proteinmenge im Medium ohne Zugabe von Dekanoat (Spur 1) geringer ist als die Proteinmenge bei Zugabe von Dekanoat (Spuren 2,5,6,7). Dekanoat scheint also eine Auswirkung auf das Austreten der Proteine ins Medium zu haben. Gleichzeitig sieht man in Abb. 3.3.9.B, dass die Enzyme zur Synthese von (S,S)-Monatin ebenfalls im Medium vorhanden sein müssen, da I3P-äS produziert wird. Deutlich tritt auch die Korrelation zwischen Dekanoat- und I3P-äS-Konzentration hervor. Je mehr Dekanoat zugegeben wurde, umso mehr I3P-äS wurde produziert. Die höchste Effizienz wurde bei der Kombination von 10 µM IPTG, 2,5 mM Dekanoat und 0,2% Tween 60 erreicht.

Zur weiteren Klärung dieser Frage mit einem anderen Ansatzpunkt wurden die Zellen vorsätzlich permeabilisiert und auf (S,S)-Monatin-Biosynthese getestet. Dafür wurden drei Ansätze gewählt: Ein Ansatz wurde als Kontrolle nach dem gewohnten

Verfahren gewählt. Beim zweiten Ansatz wurden die Zellen durch Behandlung mit 0.2 % (w/w) CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromid, ein positiv geladenes Detergenz) permeabilisiert bzw. im dritten Ansatz durch dreimaligen Aufschluss in der French press bei maximalem Druck geöffnet. Es wurden jeweils 2 und 20 Stunden nach Zugabe Proben genommen und die Reaktionen mit 1 % SDS gestoppt. Die (S,S)-Monatin-Menge wurde in der HPLC vermessen. Die Resultate sind in Tabelle 3.3.7. zusammengefasst.

Tab. 3.3.7. Synthese von (S,S)-Monatin in *C. glutamicum* pEKEx2*AspCproA;* ein Ansatz erfolgte nach Protokoll, ein Ansatz wurde in der French Press aufgeschlossen, ein Ansatz wurde durch 0,2 % CTAB permeabilisiert; es wurden 10 mM Trp zugegeben; die Reaktion wurde mit 1 % SDS gestoppt, abzentrifugiert und in der HPLC gemessen

Zeit nach Zugabe	Kontrolle		French Press		CTAB	
	(S,S)-Monatin	I3P-äS	(S,S)-Monatin	I3P-äS	(S,S)-Monatin	I3P-äS
2 h	0 µM	0 µM	17 µM	750 µM	0 µM	750 µM
20 h	**0 µM**	500 µM	**28 µM**	640 µM	**10 µM**	1500 µM

Im Überstand der mit der French Press aufgeschlossenen Zellen wurde mit 28 µM mehr (S,S)-Monatin synthetisiert als in den noch intakten Zellen. Auch in den mit CTAB permeabilisierten Zellen konnte mit 10 µM mehr (S,S)-Monatin detektiert werden als in den intakten Zellen. Wiederum ist auffällig mehr I3P-äS synthetisiert worden. Im Kontrollansatz war kein (S,S)-Monatin zu messen. Wie bereits erwähnt befinden sich diese geringen Konzentrationen auch am Detektionslimit.

Als nächstes wurde die Stabilität von (S,S)-Monatin, Tryptophan und I3P in permeabilisierten Zellen des Produktionsstamms und des Wildtyps verglichen. Dazu wurde nach Induktion ein Zellextrakt der beiden Stämme hergestellt. 1 ml der Zellsuspension wurde mit jeweils 500 µM (S,S)-Monatin, 500 µM Tryptophan und 1000 µM I3P versetzt. Es wurden keine weiteren Cofaktoren, wie z.B. PLP, oder Pyruvat zugegeben. Regelmäßig ab einer Minute bis zu 3 Stunden wurden Proben genommen und mit 1 % SDS-Lösung die Reaktionen gestoppt. Die Vermessung in der HPLC zeigte, dass (S,S)-Monatin und Tryptophan weder im Produktionsstamm noch im Wildtyp abgebaut oder umgewandelt wurden (Daten nicht gezeigt). Es lässt sich daraus schließen, dass einerseits (S,S)-Monatin an sich ein stabiles Molekül ist, andererseits selbst der Produktionsstamm ohne zugehörige Cofaktoren und Zusätze nicht in der Lage ist, Tryptophan in I3P umzuwandeln. Bei I3P hingegen war ein

deutlicher Unterschied zwischen dem Produktionsstamm und dem Wildtyp zu sehen (Abb. 3.3.10.).

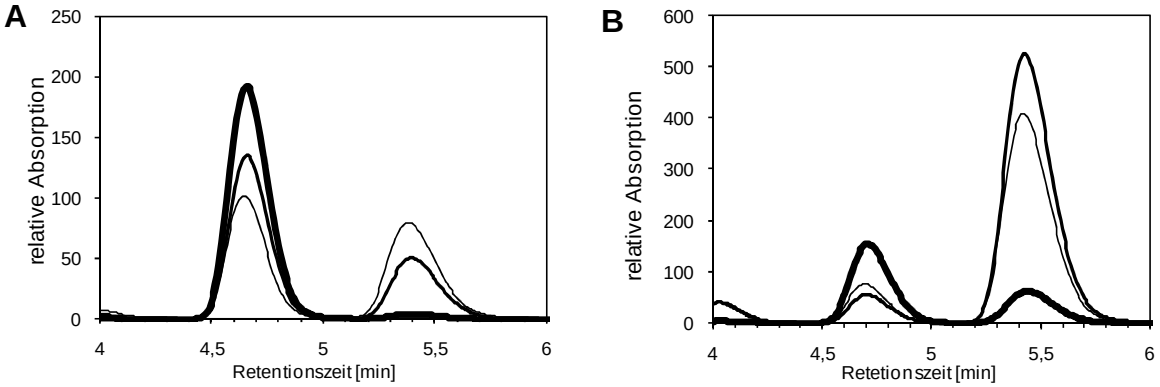

Abb.: 3.3.10. Relative Absorption von 1 mM I3P-äS im Zellextrakt von **A:** *C. glutamicum* ATCC 13032*,* ***B:*** *C. glutamicum* pEKEx2*AspCproA*; es wurden Proben ab 1 Minute bis 3 Stunden genommen und mit 1% SDS die Reaktion gestoppt; Probe nach 1 Minute ▬▬, nach 1 Stunde ——— , Probe nach 3 Stunden ———

Im Produktionsstamm ist ein schneller Zerfall bzw. Umwandlung zu beobachten. Es handelt sich bei der neuen Substanz wahrscheinlich nicht um (S,S)-Monatin, da (S,S)-Monatin eine Retentionszeit von 4,5 Minuten besitzt. Die Substanz, in die I3P umgewandelt wird, könnte entweder die Vorstufe von (S,S)-Monatin sein oder ein Zerfallsprodukt. Dies ist aber nicht eindeutig nachzuweisen, da diese Vorstufe nicht isoliert als Vergleichssubstanz vorliegt. Im Wildtyp hingegen findet diese Umwandlung sehr langsam statt. Es lässt sich daraus schließen, dass eines der Produktionsenzyme die Umwandlung von I3P beschleunigt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Bereitstellung von Vorstufen und Cofaktoren gewährleistet werden konnte. Die Synthese der Proteine konnte zwar mit hoher Wahrscheinlichkeit verifiziert werden, allerdings konnte die Aktivität nicht überprüft werden. Die Abhängigkeit der (S,S)-Monatin-Produktion von der zugegebenen Tryptophan-Menge und der Zugabe von Detergenz macht eine zusätzliche Produktion im Medium wahrscheinlich und legt die Vermutung nahe, dass die Aktivität der Enzyme den limitierenden Schritt darstellt.

3.3.9. Untersuchungen zum Export von Indol und I3P

Die strukturelle Ähnlichkeit von (S,S)-Monatin mit Tryptophan und Indol gab Anlass zur Vermutung, dass ein Exporter alle drei Substrate transportieren könnte. Da der (S,S)-Monatin-Export nicht direkt untersucht werden konnte, wurde parallel auch ein systematischer Ansatz gewählt. Daher wurde eine im Arbeitskreis hergestellte Mutantenbank mit 88 verschiedenen *C. glutamicum*-Stämmen, die in jeweils einem Gen, welches für einen Transporter kodiert, mutagenisiert worden waren, verwendet. Es wurde ein Screening in Mikrotiterplatten durchgeführt, bei dem die Sensitivität auf Indol getestet wurde. Dazu wurden 3,3 µM Indol zugegeben und das Wachstum nach 24 Stunden gemessen. Die Ermittlung der zugegeben Konzentration von Indol wurde in Abschnitt 3.2 erläutert.

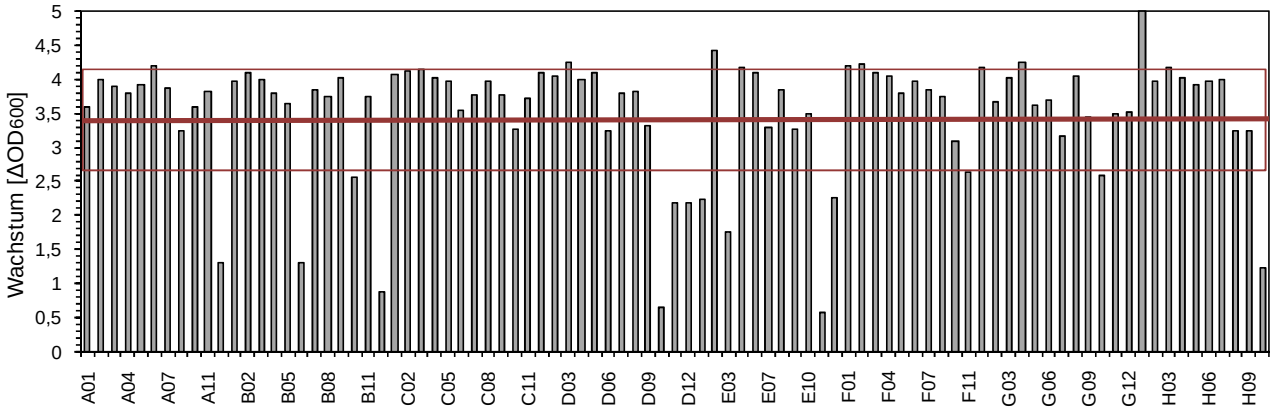

Abb. 3.3.11.: *C. glutamicum*-Stämme, die in 88 verschiedenen Transporter-kodierenden Genen mutagenisiert wurden; in MMI mit Glukose mit 3,3 µM Indol; Wachstum nach 24 Stunden; Kontrolle: C. glutamicum ATCC 13032 pEKEx2 = H10 ; der rote Bereich markiert das mittlere Wachstum ± Mittelwertsabweichung; das Durchschnittswachstum ohne Toxin betrug 4,3 OD_{600}

Die Stämme, die ein signifikant abweichendes Wachstum vom Durchschnitt zeigten, sind in Tab. 3.3.8. aufgelistet. Dass sie schlechteres Wachstum aufwiesen, könnte darauf zurückzuführen sein, dass auf Grund des fehlenden Indol-Exporters Indol intern akkumuliert und so den Stoffwechsel schädigt.

Die fett gedruckten Transporter wurden eingehender untersucht. Die Permease aus der MFS-Gruppe *Cgl0322* könnte ein interessanter Kandidat sein. In naher genetischer Umgebung zur Permease *Cgl0635* wurde ein Bindeprotein gefunden, was zu der Annahme führt, dass dies ein Importer ist, der also nicht am Indol-Export beteiligt sein sollte. Das Gleiche gilt auch für das Bindeprotein *Cgl0964*. Da über das hypothetische Membranprotein *Cgl1522* noch nichts bekannt ist, könnte dies als Kandidat in Frage kommen.

Tab.: 3.3.8.: Gene der im oberen Screening signifikant schlechter gewachsenen Stämme

Well in der Mikrotiterplatte	Cgl Nummer	Putative Funktion des zugehörigen Proteins
A12	***Cgl0322***	**Permease eines MFS-Transporters**
B06	*Cgl0635*	Permease eines ABC-Transporters
B12	*Cgl0964*	Bindeprotein eines ABC-Transporters
D10	***Cgl1522***	**Membranprotein unbekannter Funktion**
E03	***Cgl2018***	**Permease eines ABC-Transporters**
E11	***Cgl2314***	**Permease eines AEC-Transporters**

Auch die Permease *Cgl2018* aus der ABC-Familie könnte in Frage kommen, da kein Bindeprotein in ihrer genetischen Umgebung entdeckt wurde. Zuletzt ist noch die Permease *Cgl2089* aus der Familie der „Auxin Efflux Carrier" zu erwähnen, da unter anderem Indolessigsäure zu den Substraten von Transportsystemen dieser Familie gehört, welches strukturelle Ähnlichkeit zu Indol und (S,S)-Monatin besitzt.
Mit dieser Auswahl an möglichen (S,S)-Monatin-Exportern wurde ein Tropftest auf BHI-Agar-Platten mit unterschiedlichen Konzentrationen an Indol durchgeführt. Es sollte damit eingehender untersucht werden, ob die Stämme tatsächlich sensitiver auf Indol reagierten als der Wildtyp. Die Kulturen wurden in optischen Dichten von 1, 0,1, 0,01 und 0,001 aufgetragen. Die verschiedenen Indol-Konzentrationen betrugen 0, 100, 500 und 1000 µg/ml. Die abfotografierten Platten sind in Abb. 3.3.12. zu sehen.

Auf der Kontrollplatte ohne Indol sind, wie erwartet, alle Stämme gewachsen, während auf der Kontrollplatte mit 1000 µg/ml kein Stamm mehr wachsen konnte. Interessant ist die Platte mit 500 µg/ml Indol, da hier deutlich erkennbar der Wildtyp und der Stamm *C. glutamicum Cgl0322::pDrive* bei einer OD_{600} von 1 noch sehr gut wachsen, während die anderen drei Stämme erheblich schwächeres Wachstum aufweisen. Dies schließt den Stamm *C. glutamicum Cgl0322::pDrive* als potentielles Indol-Exportsystem eher aus. *C. glutamicum Cgl1522::*pDrive*, C. glutamicum* pDrive::*Cgl2018* und *C. glutamicum* pDrive::*Cgl2314* sind aber als potentielle (S,S)-Monatin-Exporter sehr gute Kandidaten, die weiter untersucht werden sollten.

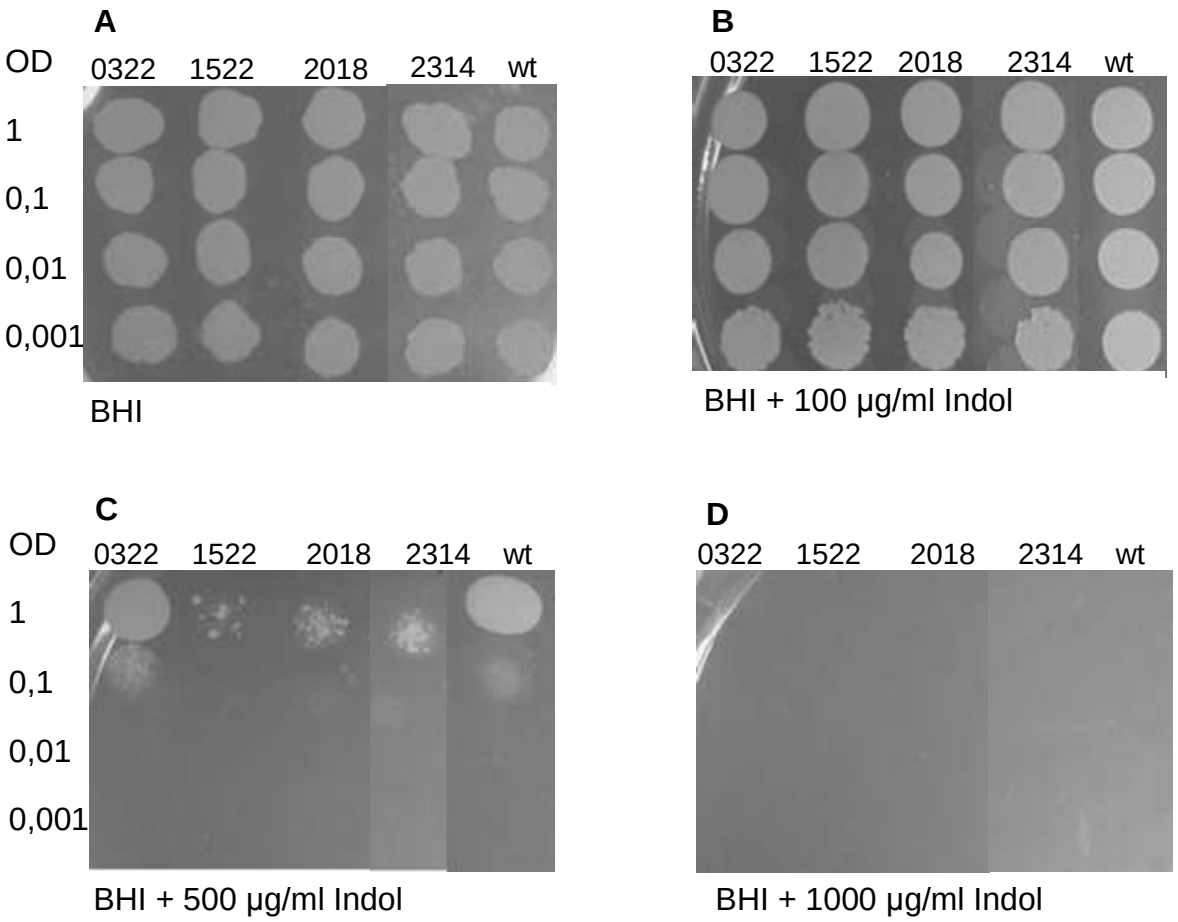

Abb.: 3.3.12. Tropftest mit den Stämmen, die in den oben ausgewählten Genen von *C. glutamicum* mutagenisiert sind; auf BHI-Agar-Platten mit 25 µg/ml Kanamycin **A:** ohne Indol, **B:** mit 100 µg/ml, **C:** mit 500 µg/ml, **D:** mit 1000 µg/ml Indol; aufgetropft wurden 5 µl mit verschiedener OD_{600}

Die bereits im ersten Teil eingeführte Mutantenbank mit Stämmen, die in für ABC-Transporter kodierenden Genen mutagenisiert worden war, wurde in einem weiteren breiten Ansatz in einem Screening auf erhöhte Sensitivität auf I3P getestet. Auch I3P weist strukturelle Ähnlichkeit mit (S,S)-Monatin auf, und könnte daher über den gleichen Exporter transportiert werden. Es wurden 0,5 µM I3P verwendet. Die Ermittlung dieser Konzentration wurde ebenfalls in Abschnitt 3.2. erläutert.

Es sind 7 Kandidaten, die auffallend wenig gewachsen sind, also eine höhere Sensitivität gegenüber I3P (bzw. I3P-äS) zeigen als der Wildtyp und die meisten anderen Mutanten. Diese sind in Tabelle 3.3.9. aufgelistet. Bei diesem systematisch gewählten Screening sind ebenfalls einige Stämme durch signifikant schlechteres Wachstum aufgefallen.

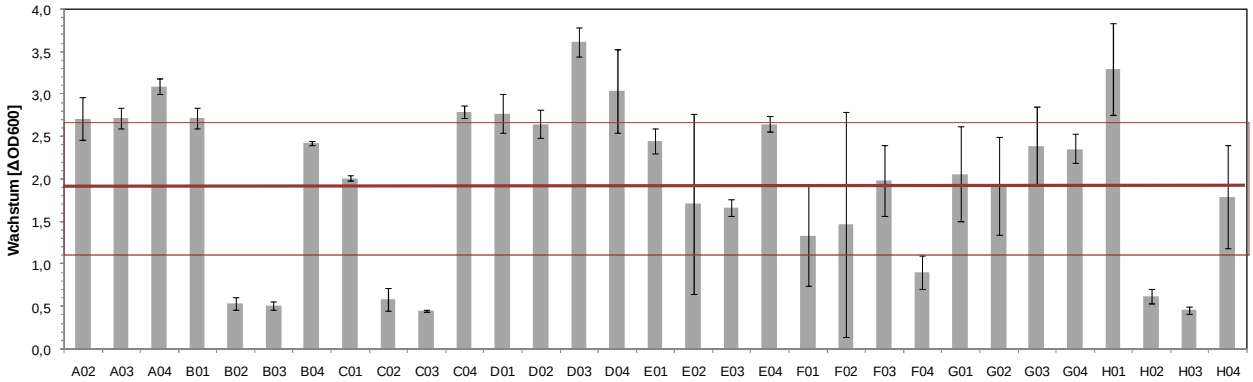

Abb.: 3.3.13. *C. glutamicum*-Stämme, die in ABC-Exporter kodierenden Genen mutagenisiert wurden, in MMI mit Glukose, 25 µg/ml Kanamycin und mit 0,5 µM I3P; Wachstum nach 24 Stunden gemessen; der Wildtyp befindet sich ganz rechts; der rote Bereich markiert das mittlere Wachstum ± Mittelwertsabweichung; das Durchschnittswachstum ohne I3P betrug 3,4 OD_{600}; n=3

Tab.: 3.3.9. Gene der im oberen Screening signifikant schlechter gewachsenen Stämme

Well in der Mikrotiterplatte	Cgl Nummer	Putative Funktion des zugehörigen Proteins
B02	*Cgl0964*	ATPase und Permease eines ABC-Transporters
B03	*Cgl1525*	ATPase und Permease eines ABC-Transporters
C02	*Cgl1061*	Fusionierte ATPase Einheiten eines ABC-Transporters
C03	*Cgl1568*	Permease eines ABC-Transporters
F04	*Cgl2831*	Fusionierte ATPase Einheiten eines ABC-Transporters
H02	*Cgl1420*	Fusionierte ATPase Einheiten eines ABC-Transporters
H03	*Cgl2077*	ATPase und Permease eines ABC-Transporters

Darunter sind die fusionierten ATPasen/Permeasen Cgl0964, Cgl1525 und Cgl2077. Des Weiteren wirkten sich die defekten fusionierten ATPasen Cgl1061, Cgl2831 und Cgl1420 in negativer Form auf das Wachstum aus. Auch der Stamm *C. glutamicum Cgl1568*::pDrive zeigte eine erhöhte Sensitivität gegenüber I3P (bzw. I3P-äS). Diese Stämme sollte eingehender untersucht werden.

Das Screening ist zwar geeignet, um die große Zahl an potentiellen Exportern einzugrenzen, allerdings sollte es auch kritisch betrachtet werden. Es ist relativ unwahrscheinlich, dass 7 Exporter für I3P existieren. Daher sollten diese z.B. durch Überexpression des Transporter-kodierenden Gens genauer geprüft werden.

IV. Diskussion

4.1. Untersuchungen zum Export von Fruktose

C. glutamicum ist ein Bodenbakterium und in der Lage, eine Vielzahl von Kohlenstoffquellen zu nutzen. Dabei metabolisiert es sowohl Monosaccharide als auch Disaccharide, aber auch organische Säuren und Zuckeralkohole (Krings *et al.*, 2006). Die am weitesten verbreitete Kohlenstoffquelle ist das Disaccharid Saccharose auf Grund seines Vorkommens in Pflanzengewebe. Die Aufnahme von Mono- und Disacchariden erfolgt über ein PEP-abhängiges PTS-System, das eines der Haupttransportsysteme für Kohlenstoffe ist (Reid, Abratt, 2005). Die Saccharose wird dabei über das PTS^{Suc} aufgenommen, gleichzeitig phosphoryliert und durch die Saccharose-6-Phosphat Hydrolase gespalten, wobei Glukose-6-Phosphat und Fruktose entstehen. Da *C. glutamicum* keine Fructokinase besitzt, muss die Fruktose wieder exportiert werden, um dann über das PTS^{Fru}-System wieder aufgenommen und gleichzeitig phosphoryliert zu werden. Dieser Mechanismus ist bereits aus *Aerobacter aerogenes* bekannt (Kelker, Anderson, 1972). Saccharose und Fruktose kommen in hohen Mengen in Melasse vor und werden so bei der Fermentation eingesetzt. Für die Erhöhung der Produktionseffektivität ist die Kenntnis der Stoffwechselwege von Saccharose und Fruktose unerlässlich. Aus diesem Grund wurde in diesem Abschnitt der noch unbekannte Exporter für Fruktose gesucht.
Um den Export zu charakterisieren, wurde zunächst der Import von Saccharose und Fruktose untersucht.

4.1.1. Aufnahme von Saccharose und Fruktose

Um ein geeignetes Messsystem zu etablieren, wurde ein Stamm verwendet, dessen transmembrane Einheit des PTS^{Fru}-Transporters deletiert worden war (ΔPTS^{Fru}). Die exportierte Fruktose kann nicht mehr aufgenommen werden. Zur Charakterisierung des ΔPTS^{Fru}-Stamms wurde das Wachstum mit *C. glutamicum* ATCC 13032 verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass der ΔPTS^{Fru}-Stamm nur den Glukose-Anteil der Saccharose als Kohlenstoffquelle nutzen kann. Dies stimmt mit den Beobachtungen von Moon (2005) überein, wo ebenfalls ein stark vermindertes Wachstum des ΔPTS^{Fru}-Stamms auf Saccharose gemessen wurde. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der ΔPTS^{Fru}-Stamm innerhalb der Messzeit von 60

Sekunden und einer Konzentration von 50 µM keine Fruktose aufnahm. Für den Stamm *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde eine Fruktose-Aufnahme von 17 nmol/mgTG*min gemessen. Über Aufnahmemessungen konnte ermittelt werden, dass die ins Medium exportierte Fruktose ebenfalls über das PTS^{Glu}-System aufgenommen wird, resultierend in Fruktose-6-Phosphat (Dominguez *et al.*, 1998). Allerdings stellt das PTS^{Glu}-System einen niedrig affinen Fruktose-Transporter dar (K_M: 4 mM), während das Hauptaufnahmesystem PTS^{Fru} mit einem K_M von 0,4 mM höher affin ist. Die Aufnahmerate von Fruktose über das PTS^{Glu}-System (auf Fruktose vorkultivierte Zellen) ist um 75% niedriger als die über das System PTS^{Fru} (Dominguez *et al.*, 1998). Bei Wachstum auf sowohl Saccharose als auch Fruktose ist der über das PTS^{Glu} aufgenommene Fruktose-Anteil vernachlässigbar (7,7% der Gesamt-Fruktose-Menge; Kiefer *et al.*, 2004). Bei Fruktose als alleiniger Kohlenstoffquelle lässt sich jedoch ein Restwachstum feststellen (Moon *et al.*, 2005), was auch in dieser Arbeit bestätigt wurde. In der PTS^{Fru} / PTS^{Glu}-Doppelmutante war dagegen gar kein Wachstum mehr zu messen (Moon *et al.*, 2005). Bei sehr hohen externen Fruktose-Konzentrationen konnte nachgewiesen werden, dass diese auch über die MFS-Transporter Cgl0181 und Cgl3058 aufgenommen wird (Bäumchen *et al.*, 2009). Allerdings liegt die Fruktose damit nicht phosphoryliert in der Zelle vor und kann so nicht metabolisiert werden. Dass *C. glutamicum* keine Fructokinase besitzt, wurde bereits nachgewiesen (Moon *et al.*, 2005). Bei heterologer Expression einer Fructokinase aus *Clostridium acetobutylicum* zeigte *C. glutamicum* ΔPTS^{Fru} wildtyp-identisches Wachstum auf Saccharose, und es konnte auch keine externe Fruktose detektiert werden (Moon *et al.*, 2005). Während die über das PTS^{Fru} aufgenommene Fruktose als Fruktose-1-Phosphat in der Zelle vorliegt und erst durch die 1-Phosphofructokinase in Fructose-6-Phosphat umgewandelt werden muss, generiert die Fructokinase Fruktose-6-Phosphat, welche direkt in den Pentose-Phosphat-Weg eingeschleust werden kann.

4.1.2. Induktion von PTS-kodierenden Genen

Um ein geeignetes Messsystem zu etablieren, sollte die Saccharose-Aufnahme möglichst maximal sein. Da bekannt war, dass die PTS-kodierenden Gene induzierbar sind, wurde dies eingehender untersucht.

Es konnte für Fruktose die Abhängigkeit der Aufnahmerate von der Kohlenstoffquelle in der Vorkultur verifiziert werden. Die niedrigste Aufnahme erfolgte bei Vorkultur auf

Glukose und zusätzlicher Zugabe von Glukose zur Messung. Bei Vorkultur auf Saccharose war die Aufnahmerate von Fruktose unter Zusatz von Glukose auf 31 % erniedrigt. Die Saccharose-Aufnahme betrug bei Vorkultur auf Glukose im Wildtyp 16 nmol/mgTG*min und im ΔPTS^{Fru}-Stamm 7 nmol/mgTG*min. Dass die Aufnahmerate für Saccharose [U-^{14}C] im ΔPTS^{Fru}-Stamm um 50 % geringer ist als im Wildtyp, könnte daran liegen, dass der Wildtyp die exportierte Fruktose wieder aufnehmen kann und als Folge davon mehr Radioaktivität in der Zelle ist als beim ΔPTS^{Fru}-Stamm, welcher die exportierte Fruktose nicht wieder aufnehmen kann.
Es wurde zusätzlich die Saccharose-Aufnahme bei Vorkultur auf verschiedenen C-Quellen bestimmt. Die auf Saccharose vorkultivierten Zellen zeigten die höchste Aufnahmerate, während die auf Acetat vorkultivierten Zellen die geringste Rate aufwiesen. Die gemessenen Aufnahmeraten aus den verschiedenen Experimenten aus Kapitel 3.1. sind in Tabelle 4.1.1. zusammengefasst.

Tab. 4.1.1. Aufnahmeraten von Saccharose und Fruktose in *C. glutamicum* ATCC 13032 und *C. glutamicum* ΔPTS^{Fru}; bei Vorkultur auf verschiedenen C-Quellen

Vorkultur auf	**Stamm**	**Substrat**	**Zugabe zur Messung**	**Aufnahmerate [nmol/mgTG*min]**
Glukose	ΔPTS^{Fru}	Fruktose	-	-
Glukose	ATCC 13032	Fruktose	-	17
Saccharose	ATCC 13032	Fruktose	-	23
Saccharose	ATCC 13032	Fruktose	Glukose	3
Glukose	ATCC 13032	Fruktose	-	17
Glukose	ATCC 13032	Fruktose	Glukose	1
Glukose	ΔPTS^{Fru}	Saccharose	-	7
Glukose	ATCC 13032	Saccharose	-	16
Saccharose	ATCC 13032	Saccharose	-	20
Acetat	ATCC 13032	Saccharose	-	6

Vergleichsdaten zur Saccharose-Aufnahme konnten von auf Saccharose vorkultivierten Zellen gefunden werden. Dabei wurden Raten von 33 nmol/mgTG*min bestimmt (Dominguez *et al.*, 1998). Allerdings wurden die Aufnahmeraten in durch Toluol permeabilisierten Zellen gemessen. Die Daten sind also nicht vergleichbar.
Alle drei PTS-Systeme werden konstitutiv exprimiert (Dominguez *et al.*, 1998). Abgesehen von PTS^{Glu}, welches in hohen Mengen exprimiert wird und wenig reguliert ist (Krömer *et al.*, 2003), sind PTS^{Suc} und PTS^{Fru} induzierbar (Moon *et al.*,

2005). Dies konnte in den erwähnten Aufnahmemessungen bestätigt werden. Bei Wachstum auf Acetat war die Aufnahme um mehr als 50 % verlangsamt im Gegensatz zu der Rate bei Wachstum auf Saccharose. Auch die Fruktose-Aufnahme war bei auf Glukose gewachsenen Zellen um 26 % geringer als bei auf Saccharose gewachsenen Zellen.

Die Induzierbarkeit der Gene des PTS^{Suc}-Systems konnte auch durch Zugabe von Chloramphenicol bestätigt werden. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass das für den Fruktose-Export kodierende Gen konstitutiv exprimiert wird, da trotz Zugabe von Chloramphenicol ein stetiger Export von Fruktose zu verfolgen war.

Trotz der maximalen Saccharose-Aufnahmerate bei Vorkultur auf Saccharose, wurde die Vorkultur auf Glukose vorgezogen. Da im Messsystem Saccharose zugegeben und quantifiziert wurde, wären selbst durch mehrmaliges Waschen der Zellen Verunreinigungen mit Saccharose schwer zu vermeiden gewesen.

4.1.3. Inhibition der Saccharose-Aufnahme durch andere Metabolite

Nach der Untersuchung der Regulation auf genetischer Ebene erfolgte die Untersuchung der Aktivität auf biochemischer Ebene. Dazu wurden die Aufnahmeraten von Saccharose unter Zugabe von verschiedenen Glukose-Konzentrationen bestimmt. Es zeigte sich eine um 50 % verminderte Aufnahmerate, ungeachtet der verwendeten Glukose-Konzentration. Dass es sich dabei um ein Artefakt durch Verunreinigung der radioaktiv markierten Saccharose mit Glukose handeln könnte, wurde dadurch ausgeschlossen, dass die Fruktose-Aufnahme ebenfalls durch Glukose inhibiert wurde. Da sowohl PTS^{Suc} als auch PTS^{Glu} für die Phosphorylierung ihrer Substrate HPr und damit PEP verwenden, schien es möglich, dass eine Konkurrenz um phosphoryliertes HPr die Hemmung verursacht (Abb.4.1.1.). Es wurde bereits für Glukose gezeigt, dass sie mit Mannose um den internen Pool an phosphoryliertem HPr konkurriert (Wong, 1990). Damit könnte die Dephosphorylierung von PEP der limitierende Schritt sein. Dies könnte einmal daher kommen, dass die Glykolyse bereits durch die Glukose-Aufnahme abgesättigt ist und so eine negative Rückkopplung zur Saccharose-Aufnahme entsteht. Da auch 10 µM Glukose die Saccharose-Aufnahme verringerte, ist es nicht wahrscheinlich, dass die Glykolyse an sich eine Limitierung darstellt. Andererseits könnte gerade dies dazu führen, dass zu wenig PEP synthetisiert wird. Eine andere Möglichkeit wäre auch eine direkte Interaktion von Glukose mit der transmembranen PTS^{Suc}-

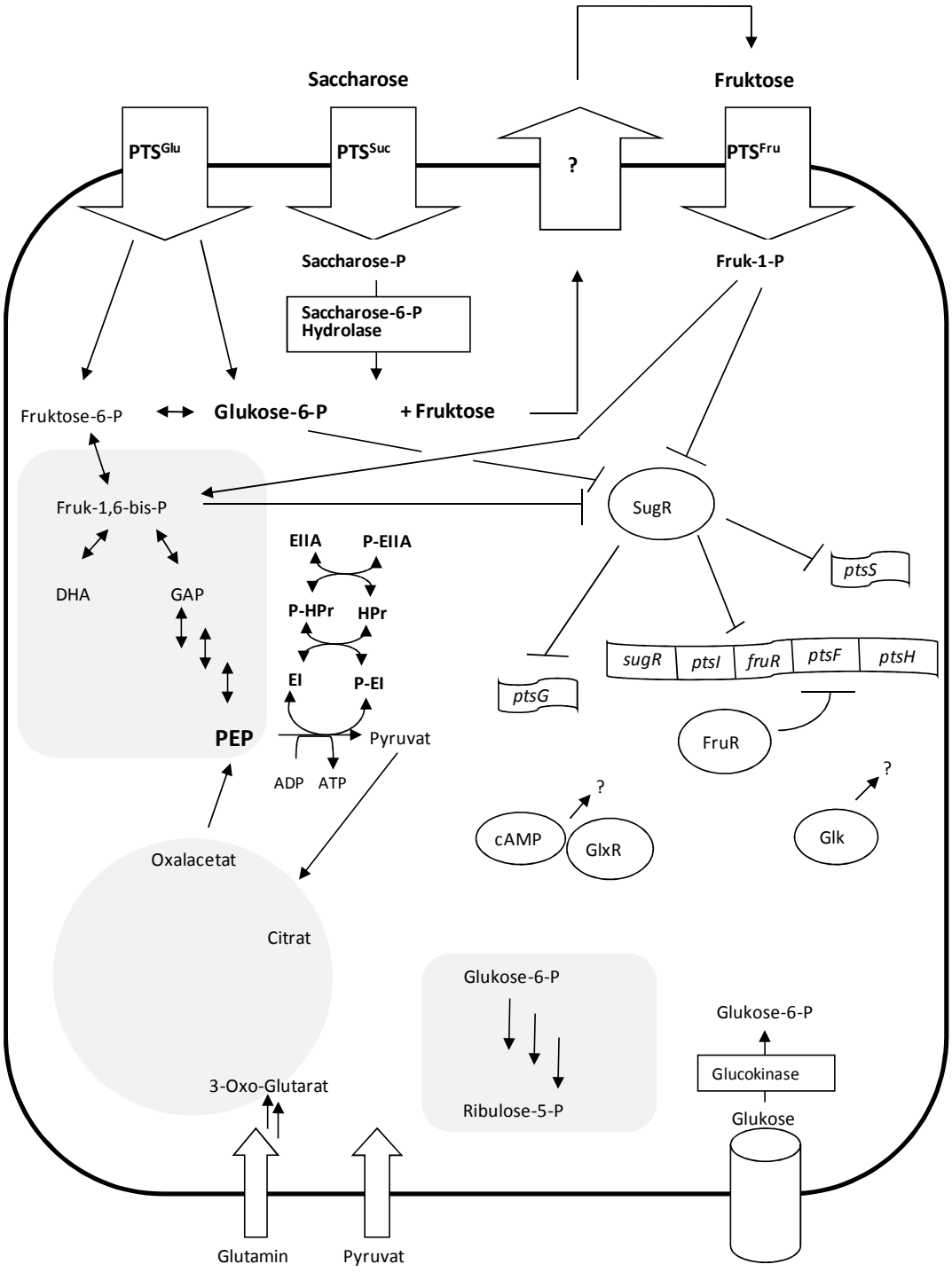

Abb. 4.1.1. Ausgewählte Aspekte des Saccharose-, Fruktose-, und Glukose-Metabolismus‘ in *C. glutamicum;* DHA: Dihydroxyaceton; GAP: Glycerinaldehydphosphat; cAMP: cyclisches AMP; PEP: Phsphoenolpyruvat;
⊣ : Hemmung

Untereinheit. Dies würde zumindest die gleichbleibende Hemmung bei verschiedenen Konzentrationen erklären.

Es wurde also eine detailiertere Analyse der Hemmung mit Metaboliten durchgeführt, die durch verschiedene Aufnahmesysteme importiert werden und über verschiedene

Wege metabolisiert werden. Dazu wurden Metabolite, wie Xylose, Glutamin, Pyruvat, Fruktose und Maltose zu den Aufnahmemessungen hinzugefügt.

Über Xylose war bereits bekannt, dass sie nicht metabolisiert werden kann. Über heterologe Expression einer D-Xylose-Isomerase und Xylulokinase konnte *C. glutamicum* R auf Xylose wachsen (Kawaguchi *et al.*, 2006). Damit wurde angenommen, dass der Stamm *C. glutamicum* R Xylose importieren kann. Es wurde allerdings innerhalb dieser Arbeit unter Verwendung von radioaktiv markierter Xylose festgestellt, das *C. glutamicum* ATCC 13032 diese nicht akkumuliert. Da die Genome von *C. glutamicum* R und *C. glutamicum* ATCC 13032 durchaus verschieden sind (Yukawa *et al.*, 2007), scheint dies möglich. Es konnte auch keine Inhibition der Saccharose-Aufnahme durch Xylose gemessen werden.

Unter Zugabe von Glutamin konnte keine verringerte Saccharose-Aufnahme bestimmt werden. Glutamin wird als 3-Oxoglutarat in den Citratzyklus eingeschleust (Abb.4.1.1.), aus dem anabole Stoffwechselwege wie z.B. die Gluconeogenese hervorgehen. Bei einem Überfluss könnte allerdings auch aus Oxalacetat über die PEP Carboxykinase PEP generiert werden. Wie erwartet interveniert Glutamin damit nicht in die Saccharose-Aufnahme.

Die Zugabe von Pyruvat hemmte die Saccharose-Aufnahme um 50%. Wird PEP nicht von EI dephosphoryliert, so wird es von der Pyruvatkinase zu Pyruvat modifiziert, welches in den Citratzyklus einfließt. Eine hohe interne Pyruvat-Konzentration könnte dazu führen, dass die PEP Carboxykinase aus Oxalacetat wieder PEP generiert. Dadurch sollte allerdings keine Hemmung zu beobachten sein. Der inhibierende Effekt von Pyruvat muss auf bisher unbekannte Mechanismen zurückzuführen sein.

Bei einem 200fachen Überschuss an Maltose lässt sich eine deutlich Verringerung der Saccharose-Aufnahmerate von 15,8 nmol/mgTG*min auf 3,6 nmol/mgTG*min erkennen. Bei lediglich 5fachem Überschuss an Maltose wurde keine Hemmung gemessen. Mit diesem Experiment wurde überprüft, ob die Glykolyse von den hohen eingesetzten Mengen an Maltose gesättigt ist und dadurch eine negative Rückkopplung zur Saccharose-Aufnahme entsteht. Maltose wird in *C. glutamicum* nicht über ein PTS-System aufgenommen, kann daher den Import von Saccharose nicht direkt inhibieren. Die aufgenommene Maltose wird in Glukose-6-Phosphat umgewandelt und geht so den gleichen Weg wie der Glukose-Anteil aus der Saccharose. Dass bei lediglich 5fachem Überschuss keine Hemmung mehr zu

messen war, spricht dafür, dass die Hemmung durch negative Rückkopplung eines in den Glukose-Metabolismus involvierten Enzyms hervorgerufen wurde.

In Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt wird die Katabolit Repression durch Systeme wie das CcpA (catabolite control protein A), cre (catabolite responsive elements) und eine HPr-Kinase/Phosphatase gewährleistet. In Gram-negativen Bakterien reguliert der Phosphorylierungsstatus von PTS^{Glu} die Adenylat Cyclase, die cAMP synthetisiert, welche zusammen mit dem Transkriptionsfaktor Crp (cAMP receptor protein) wiederum die Katabolit Repression reguliert (Reid, Abratt, 2005).

So gut die Katabolit-Repression in *E. coli* und *B. subtilis* verstanden ist, so wenig ist darüber in Gram-positiven Bakterien mit hohem GC-Gehalt bekannt. In *C. glutamicum* wurde zumindest keine HPr-Kinase/Phosphorylase gefunden (Parche *et al.*, 2001). Da in *C. glutamicum* auch viele Zucker und organische Säuren zusammen mit Glukose cometabolisiert werden, konnte bisher auch noch keine Katabolit-Repression festgestellt werden, bis auf die inhibierte Glutamat-Aufnahme in Anwesenheit von Glukose oder Fruktose (Krämer, Lambert, 1990).

Dass ein Homolog von Crp (GlxR) und cAMP in *C. glutamicum* gefunden wurden (Brune *et al.*, 2005), spricht dafür, dass der Regulationsmechanismus von *C. glutamicum* eher dem der Gram-negativen Bakterien gleicht. Das in *C. glutamicum* gefundene GlxR ist zu 27 % übereinstimmend mit Crp aus *E. coli*. Eine Deletion von *glxR* resultierte in stark erniedrigtem Wachstum und einer unterschiedlichen Expression von über 100 Genen (Moon *et al.*, 2007). In Bezug auf diese Arbeit könnte dies also bedeuten, dass die beobachtete Inhibition der Saccharose-Aufnahme durch den Transkriptionsfaktor GlxR reguliert wird. Zusätzlich zu GlxR könnte allerdings auch die Glucokinase Glk regulatorische Aufgaben haben.

In *S. coelicolor*, das auch keine HPr-Kinase/Phosphorylase besitzt, führte die Deletion von *glk* zu einem erheblichen Wachstumsdefekt, woraus sich schließen lässt, dass Glk in die Regulation involviert ist (Deutscher, 2008). Da auch *C. glutamicum* eine Glucokinase besitzt, kann dieser Regulationsweg hier auch nicht ausgeschlossen werden. Speziell in *C. glutamicum* wurde ein Regulationssystem gefunden, dass SugR und FruR als Haupttranskriptionsfaktoren identifiziert hat. FruR ist ein Repressor für alle relevanten *pts*-Gene, wie *ptsF* (kodiert für PTS^{Fru} EII), *ptsS* (kodiert für PTS^{Suc} EII), *ptsG* (kodiert für PTS^{Glu} EII), *ptsH* (kodiert für HPr) und *ptsI* (kodiert für EI). FruR ist ein DeoR-Typ Transkriptionsregulator, der mit *ptsF* coexprimiert wird. Eine Deletion von *fruR* hatte eine verstärkte Expression der oben

genannten *pts*-Gene bei Anwesenheit von Fruktose und Saccharose zur Folge (Tanaka *et al.*, 2008). SugR ist ein weiterer Repressor der oben genannten *pts*-Gene. *PtsI, ptsH, ptsF, sugR* und *fruR* gehören zum Fruktose-Gen-Cluster, während *ptsG* und *ptsS* an anderer Stelle im Genom lokalisiert sind. Für SugR wurden bisher mehr Funktionen als für FruR identifiziert. So wurden beispielsweise Fruktose-1-Phosphat, Fruktose-1,6-bisphosphat und Glukose-6-Phosphat als negative Effektoren für SugR gefunden. Den größten Effekt zeigte allerdings Fruktose-1-Phosphat, welche beim Import über das PTS^{Fru} gebildet wird. Daher sind die *pts*-Gene besonders bei Wachstum auf Acetat reprimiert (Gaigalat *et al.*, 2007), was in dieser Arbeit in Aufnahmemessungen verifiziert wurde. Darüber hinaus wird die Expression von *ptsG* über die beiden Transkriptionsregulatoren GntR1 und R2 bei Abwesenheit von Gluconat aktiviert (Frunzke *et al.*, 2008). Da diese Ergebnisse relativ neu sind, kann ein weiteres Regulationsspektrum von FruR und SugR noch nicht ausgeschlossen werden.

4.1.4. Etablierung eines Messsystems zur Bestimmung der externen und internen Zucker-Mengen

Es wurde ein Messsystem etabliert, das es ermöglicht, den Umsatz von Saccharose und Fruktose extern zu verfolgen. So wurde ein äquimolarer Umsatz von Saccharose gemessen, was den bereits bei den Wachstumsversuchen gezeigten Beobachtungen entspricht. Da die Saccharose-Aufnahme und der Fruktose-Export miteinander gekoppelt sind, findet sich bei verringerter Saccharose-Aufnahme auch weniger Fruktose im Medium. Zum detailierteren Verständnis wurde zusätzlich ein Messsystem etabliert, welches es erlaubt, die internen Mengen von Fruktose zu bestimmen. Da die Saccharose-6-Phosphat Hydrolase einen K_M-Wert von 0,04 mM hat (Engels, 2008), wurde davon ausgegangen, dass alle importierte Saccharose sofort in Glukose-6-Phosphat und Fruktose gespalten wird, und die gemessenen counts nur die Fruktose anzeigen. Es zeigten sich im Laufe der Messungen erheblich unterschiedliche „steady-state“-Level. Da die Saccharose-Aufnahme reguliert wird, und die Regulationsmechanismen sehr komplex sind, konnte nicht weiter darauf eingegangen werden. Zudem hatten die unterschiedlichen „steady-state“-Level keinen Einfluss auf den Export von Fruktose. Über die Korrelation dieser beiden Systeme sollte eine relativ genaue Charakterisierung des Saccharose/Fruktose-Transports gelingen.

4.1.5. Biochemische Charakterisierung des Fruktose-Exports

Wie bereits erwähnt konnte durch Zugabe von Chloramphenicol gezeigt werden, dass das für den Fruktose-Exporter kodierende Gen konstitutiv exprimiert wird. Über die biochemische Charakterisierung des Fruktose-Exports konnte weiterhin festgestellt werden, dass Fruktose nicht über Diffusion oder dem vom Konzentrationsgradienten abhängigen Kanal YggB transportiert wird. Bei Zugabe von 10 mM externer Fruktose konnte in Umsatzmessungen eine verlangsamte Saccharose-Aufnahme und damit Fruktose-Export detektiert werden. Dass dies nicht von einem verzögerten Fruktose-Export kommt, konnte anschließend in „pulse-chase“-Experimenten mit einem 100fachen Überschuss an externer Fruktose bestimmt werden. Es erfolgte ein stetiger Export der Fruktose. Zusätzlich zeigte sich kein höheres „steady-state“-Level als ohne Zugabe von externer Fruktose. Würde die Fruktose im Cytoplasma akkumulieren, wäre dies hier zu erwarten gewesen. Die erniedrigte Saccharose-Aufnahme in den Umsatzmessungen stimmt mit der Beobachtung überein, dass Fruktose die Saccharose-Aufnahme hemmt. Anschließend wurde geprüft, ob der Fruktose-Exporter vom Membranpotential abhängig ist. Dazu wurden Ionophore verwendet, die das Membranpotential zerstören, und somit den Transport außer Kraft setzen. Es konnte weder bei Umsatz-Messungen noch bei Bestimmung des Fruktose-Exports über radioaktiv markierte Saccharose ein Einfluss der Ionophoren gemessen werden. Bei den Umsatzmessungen unter Verwendung von Valinomycin/Nigericin war nach ca. 80 Minuten eine Verlangsamung der Saccharose-Aufnahme zu beobachten. Da Valinomycin und Nigericin allerdings sofort wirken, lassen sich diese Beobachtungen nur auf pleiotrope Effekte zurückführen. In „pulse-chase“-Experimenten konnte der stetige Export von Fruktose verfolgt werden.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurde geschlossen, dass es sich bei dem Fruktose-Exporter nicht um einen sekundär aktiven Transporter handelt. Es wurden daher die primär aktiven, also ABC-Transporter, eingehender untersucht.

4.1.6. Untersuchung von putativen Fruktose-Exportern

Der Ausschluss der Beteiligung von sekundär aktiven Transportern am Fruktose-Export bekräftigte die Experimente, in denen sich die untersuchten MFS-Transporter nicht als Fruktose-Exporter herausstellten.

Im Laufe dieser Arbeit ist eine Mutantenbank erstellt worden, in der ⅔ aller in *C. glutamicum* ATCC 13032 vorhandenen Gene von ABC-Exportern mutagenisiert wurden. Diese wurden auf mangelnden oder verlangsamten Fruktose-Export getestet. Unter Verwendung von radioaktiv markierter Saccharose [Fruk-^{14}C] wurde nach Einstellung des „steady-state“-Levels und Zugabe von 5 mM kalter Saccharose der Export von Fruktose überprüft.

Bei diesen Messungen fielen zwei Stämme auf, deren Fruktose-Export vom Wildtyp abwich: *C. glutamicum Cgl1525*::pDrive und *C. glutamicum Cgl2831*::pDrive.

Cgl1525 ist der Tetracyclin-Transporter TetA aus *C. glutamicum*, während das benachbarte Cgl1524 *(NCgl1467)* TetB darstellt. Um den Fruktose-Exporter zu finden, muss eingehender geklärt werden, ob derselbe Transporter zugleich Tetracyclin und Fruktose exportieren kann.

C. glutamicum Cgl2831::pDrive akkumulierte sogar die Fruktose. Cgl2831 ist eine fusionierte ATPase, benachbart zu einer fusionierten Permease. Bei der Ähnlichkeitssuche fiel ein ATP-Bindeprotein eines ABC-Transporters in *Bacillus coahuilensis* auf, der Zucker transportieren soll. Beide hatten eine Übereinstimmung von 27% (E. value: 1e^{-13}). Weiterhin konnte eine Ähnlichkeit mit der ATP-Bindekomponente MalK aus *E. coli* gefunden werden (Übereinstimmung: 32%, E. value: 9e^{-13}). *MalK* liegt mit *lamB* und *malM* in einem Operon. *Cgl2831* könnte mit den benachbarten Permeasen *Cgl2832* und *Cgl2833* in einem Operon liegen. Es wurde allerdings keine signifikante Übereinstimmung zwischen *lamB* und *Cgl2832* oder *malM* und *Cgl2833* gefunden. Trotzdem kommt Cgl2831als putativer Fruktose-Exporter in Frage und sollte unbedingt eingehender untersucht werden.

4.2. Beteiligung von ABC-Transportern am Export von Antibiotika und Toxinen

4.2.1. Etablierung eines Verfahrens zur Bestimmung von MIC-Werten

Seit der Entdeckung und Verwendung von Antibiotika konnte die Verbreitung einiger Krankheiten stark eingedämmt werden. Kurz nach der Einführung von Antituberkulotika tauchten allerdings auch die ersten resistenten Stämme von *Mycobacterium tuberculosis* auf (Johnson *et al.*, 2006). Mikroorganismen haben viele Strategien entwickelt, um Antibiotika und anderen Toxinen entgegenzuwirken. Die weitaus effektivste und am weitesten verbreitete Strategie zur Resistenz ist allerdings der Einsatz von Exportern (Lomovskaya *et al.*, 2001). Um Substanzen gegen Exporter zu entwickeln, ist ein umfangreiches Wissen über die Transportmechanismen und die Transporterstrukturen und –spezifitäten von Nöten. Auf Grund der Ähnlichkeit von *C. glutamicum* zu den mykolsäurehaltigen Actinomyceten (Stackebrandt *et al.*, 1997), deren humanpathogene Vertreter *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* und *Corynebacterium diphteriae* beinhalten (Puech *et al.*, 2001; Gebhardt *et al.*, 2007), ist es als Modellorganismus in der Identifizierung von Transportern besonders geeignet. In dieser Arbeit wurden speziell die primär aktiven Transporter untersucht. Zur ATP-Hydrolyse besitzen sie eine „ATP-binding cassette“ und werden daher ABC-Transporter genannt. Ihr Beitrag zur Resistenz gegenüber Toxinen wurde in dieser Arbeit erforscht. Dazu wurde ein Verfahren entwickelt, welches es erlaubt, viele Transporter und Toxine gleichzeitig zu testen. Es wird dabei die „minimale inhibitorische Konzentration“ (MIC) bestimmt, bei der ein Toxin das Wachstum eines Stamms bei Über-Nacht-Inkubation sichtbar inhibiert (Andrews, 2001). Dieses Verfahren wird standardmäßig in der Medizin verwendet, um pathogene Erreger auf Sensitivitäten gegenüber angewendeter Antibiotika zu testen (Morcilo *et al.*, 2004; Casey *et al.*, 2004). Allerdings gibt es dort keine einstimmige Definition des MIC-Werts. In den meisten Veröffentlichungen gibt es gar keine Definition (Kronvall *et al.*, 2006), während es in anderen mit der „minimum bactericidal concentration“ (MBC), der Konzentration, bei der das Wachstum vollständig eingestellt ist, gleichgesetzt wird (Guillemin *et al.*, 1999). In den letzten Jahren hat sich daher eine neue Bezeichnung etabliert, die in etwa zwischen dem MIC und dem MBC unterscheidet: Der MIC_{50}-Wert bezeichnet die Konzentration, bei der das Wachstum von 50% der Zellen inhibiert wurde, während der MIC_{90}-Wert die Konzentration zur Inhibierung des Wachstums von 90% der

Zellen angibt (Kriengkauykiat *et al.*, 2005). In dieser Arbeit wurde die Definition nach Jennifer Andrews (2001) verwendet. Diese entspricht den angegebenen MIC_{50}-Werten. Zur Etablierung der MIC-Wert-Bestimmung in Mikrotiterplatten wurden unter anderem die Veröffentlichung von Andrews (2001) und die von Morcillo (2004) herangezogen. Die Wahl der Medien zur Anzucht der Bakterien ist ebenfalls sehr unterschiedlich. In der Medizin werden vorwiegend Vollmedien verwendet, wie z.B. das Müller-Hinton-Medium (Darwish *et al.*, 2008) oder Middelbrook 7H9 (Stephan *et al.*, 2004). Zum Teil wird gerade bei human-pathogenen Stämmen 5% Schafsblut zugefügt (Rockhill *et al.*, 1982). Auf Grund der erhöhten Komplexität von Vollmedium bietet es allerdings keine kontrollierten Bedingungen. Deswegen wurde in dieser Arbeit definiertes Minimalmedium eingesetzt.

4.2.2 Bestimmung und Vergleich verschiedener MIC-Werte

Dass es in der Literatur keine Vergleichs-MIC-Werte für *C. glutamicum* gibt, liegt daran, dass *C. glutamicum* ein GRAS-Organismus ist und damit kein pathogener Stamm. Die MIC-Werte wurden vorwiegend für pathogene Stämme publiziert, so am häufigsten für multiresistente Mykobakterien-Stämme (Johnson *et al.*, 2006). Innerhalb der Gattung *Corynebacterium* wurden allerdings für verschiedene andere Stämme MIC-Werte bestimmt (Pereira *et al.*, 2008; Fernandez-Roblas *et al.*, 2009). In Tab. 4.2.1. sind beispielsweise die MIC-Werte für Tigecyclin, einem neuen halbsynthetischen Antibiotikum, das wie Tetracyclin an die Ribosomen bindet, zusammengestellt (Fernandez-Roblas *et al.*, 2009).

Tab. 4.2.1. MIC_{50}-Werte für Tigecyclin in verschiedenen Stämmen der Gattung *Corynebacterium*

Stamm	**MIC_{50}-Wert [µg/ml]**
C. urealyticum	0,094
C. amycolatum	0,125
C. jeikeium	0,094
C. coyleae	0,064
C. striatum	0,064
C. aurimucosum	0,094
C. afermentans	0,064

Tab. 4.2.2. MIC-Werte für Erythromycin in verschiedenen *Staphylococcus aureus*-Stämmen

S. aureus	**MIC-Wert [µg/ml]**
NCTC 6571	0,12
ATCC 25923	0,5
ATCC 29213	0,25

Die MIC_{50}-Werte für Tigecyclin in den verschiedenen Stämmen von *Corynebacterium* variieren um einen Faktor von ca. 2. Die relativ ähnlichen Werte zeigen, dass sich noch in keinem der Stämme Resistenzmechanismen gegen das neu eingesetzte Antibiotikum entwickelt haben. Die MIC-Wert-Bestimmung in der medizinischen Forschung erfolgt in der Regel an aktuell isolierten Stämmen von Patienten. In Tab. 4.2.2. sind dazu die MIC-Werte für Erythromycin in verschiedenen *Staphylococcus aureus*-Stämmen gezeigt (Andrews, 2001). Hier sieht man eine Abweichung um den Faktor 4, was zeigt, dass sich bereits Resistenzmechanismen ausgebildet haben könnten.

Tab. 4.2.3. MIC-Werte für Erythromycin in verschiedenen Stämmen

Stamm	**MIC-Wert [µg/ml]**	**Quelle**
S. aureus	0,12 - 0,5	Andrews, 2001
H. influenzae	8	Andrews, 2001
E. faecalis	4	Andrews, 2001
S. pneumoniae	0,12	Andrews, 2001
C. jejuni	0,125	Martinez, 2006
C. diphtheriae	0,094	Pereira, 2008
C. diphtheriae	0,0025-0,01	McLaughlin, 1971
C. jeikeium	> 256	Fernandez-Roblas, 2009
C. amycolatum	> 256	Fernandez-Roblas, 2009
C. urealyticum	> 256	Fernandez-Roblas, 2009
C. striatum	< 0,016	Fernandez-Roblas, 2009
C. glutamicum	0,125	diese Arbeit

In Tab. 4.2.3. sind die verschiedenen MIC-Werte für Erythromycin in verschiedenen Stämmen aufgelistet. Hier wird sehr deutlich, wie unterschiedlich die Resistenzmechanismen gegen Antibiotika sein können. Der in dieser Arbeit verwendete Stamm *C. glutamicum* ATCC 13032 zeigte einen MIC-Wert von 0,125 µg/ml, was verglichen mit einigen pathogenen Stämme sehr niedrig ist. Die von Andrews verwendeten Stämme stammen aus der „American Type Culture Collection“ (ATCC) und sind reine Laborstämme. Fernandez-Roblas *et al.* dagegen verwendeten in ihren Untersuchungen Stämme, die aus Patienten isoliert wurden und bereits zum Teil eine hohe Resistenz gegen Erythromycin entwickelt haben. Besonders interessant ist die Varianz innerhalb der Stämme der Gattung *Corynebacterium*. Während *C. diphtheriae, C. striatum* und *C. glutamicum* eine sehr hohe Sensitivität gegenüber Erythromycin aufweisen (< 0,125 µg/ml), zeigen sich *C. jeikeium, C. amycolatum* und *C. urealyticum* deutlich unempfindlicher (>256 µg/ml).

Tab.4.2.4. MIC-Werte für Rifampicin in verschiedenen Stämmen

Stamm	**MIC-Wert [µg/ml]**	**Quelle**
S. aureus	0,004-0,015	Andrews, 2001
E. faecalis	2	Andrews, 2001
S. pneumoniae	0,03	Andrews, 2001
E. coli	16	Andrews, 2001
C. jejuni	128	Martinez, 2006
C. diphteriae	unter 0,016	Pereira, 2008
C. diphteriae	0,001-0,01	McLaughlin, 1971
C. jeikeium	> 32	Fernandez-Roblas, 2009
C. amycolatum	0,004	Fernandez-Roblas, 2009
C. urealyticum	0,012	Fernandez-Roblas, 2009
C. striatum	> 32	Fernandez-Roblas, 2009
C. glutamicum	0,002	diese Arbeit

In Tab. 4.2.4. sind die MIC-Werte für Rifampicin in verschiedenen Stämmen zusammen gefasst. Generell zeigt sich die überwiegende Zahl der hier untersuchten Stämme sehr sensitiv gegenüber Rifampicin, so auch der in dieser Arbeit verwendete Stamm *C. glutamicum* ATCC 13032. Er weist einen MIC-Wert von 0,002 µg/ml auf, ähnlich wie auch *C. diphtheriae* mit 0,001 – 0,01 µg/ml. *Campylobacter jejuni* zeigt mit einem MIC-Wert von 128 µg/ml eine sehr hohe Resistenz gegenüber Rifampicin. Der dabei von Martinez *et al.* verwendete Stamm ist ein Wildtyp-Stamm, der 1988 aus dem Menschen isoliert worden war. Hier wird auch wieder die Varianz innerhalb der Gattung *Corynebacterium* deutlich. *C. diphtheriae* erweist sich wie bei Erythromycin sehr sensitiv gegenüber Rifampicin (< 0,016 µg/ml). *C. jeikeium* dagegen zeigt sich bei beiden verwendeten Antibiotika sehr resistent (Erythromycin: > 256 µg/ml, Rifampicin: >32 µg/ml). *C. amycolatum* und *C. urealyticum* zeigen untereinander vergleichbare Ergebnisse: Beide reagieren sehr unempfindlich auf Erythromycin (> 256 µg/ml), allerdings höchst empfindlich auf Rifampicin (0,004 – 0,012 µg/ml). Die von Fernandez-Roblas isolierten Stämme besitzen die Punktmutation im Gen der DNA-abhängigen RNA-Polymerase anscheinend nicht. Während *C. striatum* gegenüber Erythromycin eine sehr geringe Resistenz aufweist (< 0,016 µg/ml), ist diese gegenüber Rifampicin vergleichsweise hoch (>32 µg/ml). Der in dieser Arbeit verwendete Laborstamm *C. glutamicum* ATCC 13032 besitzt eine sehr hohe Empfindlichkeit gegenüber beiden Antibiotika (Erythromycin: 0,125 µg/ml, Rifampicin: 0,002 µg/ml). Da es ein reiner Laborstamm ist, deutet dies darauf

hin, dass sich noch keine Resistenzen auf Grund von Kontakt mit Antibiotika ausgebildet haben.

Aus diesen Daten wird die hohe Varianz der MIC-Werte ersichtlich. In den verschiedenen Bakterienstämmen befinden sich die Gene für Exporter für Toxine entweder auf dem Chromosom oder auf Plasmiden (Lomovskaya *et al.*, 2001). Da sich die genetischen Hintergründe gerade bei den human-pathogenen Stämmen im Lauf der Zeit durch Mutationen und Selektion verändern, müssen die MIC-Werte für aktuell isolierte Stämme neu bestimmt und effektivere Antibiotika entwickelt werden. Würde der Exporter für ein Toxin in dem Modellorganismus *C. glutamicum* identifiziert werden, könnte er eventuell durch Sequenzvergleiche auch in z.B. *C. jeikeium* gefunden werden.

4.2.3. Auswertung des Screenings von *C. glutamicum*-Stämmen, die in einem ABC-Exporter kodierenden Gen mutagenisiert wurden, auf erhöhte Sensitivität gegenüber Antibiotika und Toxinen

Die in dieser Arbeit entstandene ABC-Transporter-Mutantenbank bietet die Grundlage, die 30 Stämme mit nicht-funktionalen Exportern auf erhöhte Sensitivität gegenüber den oben beschriebenen Toxinen zu untersuchen. Eine Schwierigkeit bei der Identifizierung eines Exporters ergibt sich allein dadurch, dass viele der Multi-Drug-Exporter redundant sind, also die Funktion eines fehlenden Exporters übernehmen können. Außerdem können mehrere Transporter das gleiche Substrat transportieren, was entweder in einem lediglich leicht oder gar nicht reduzierten Wachstum resultiert. Während des Screenings sind dennoch einige Stämme mit erhöhter Sensitivität aufgefallen.

Bei fast allen Screenings wies ein Stamm schlechteres Wachstum auf: *C. glutamicum Cgl2447*::pDrive (B04). Cgl2447 ist eine einzelne ATPase. Es ist wahrscheinlich, dass es sich hierbei um ein generelles Wachstumsproblem des Stammes handelt und nicht um ein spezifisches, auf das Toxin zurückzuführendes. Unter Standardbedingungen ohne Toxin zeigte der Stamm das gleiche Wachstum wie der Wildtyp. Auf Grund der völlig verschiedenen Strukturen der Toxine ist es eher unwahrscheinlich, dass er als Multidrug-Exporter so ein breites Substratspektrum besitzt (Putman, 2000).

Im Folgenden sind die Screenings für Toxine derselben funktionellen Klassen zusammengefasst.

Screening auf erhöhte Sensitivität gegenüber (toxischen) Metaboliten, Detergenzien und „Efflux-Pump Inhibitoren“

Bei den Untersuchungen zur Sensitivität gegenüber Indol, Indolessigsäure, CCCP und PA-β-N ist kein Stamm signifikant schlechter gewachsen als der Durchschnitt. Diese Substanzen scheinen nicht über ABC-Transporter exportiert zu werden. Beim Screening auf Sensitivitäten gegenüber 5-Methyl-Tryptophan fiel ein Stamm durch schlechteres Wachstum auf: *C. glutamicum Cgl1080*::pDrive (D02). Cgl1080 ist eine Permease, die wahrscheinlich mit der benachbarten doppelten ATPase ein Operon bildet. In *Corynebacterium amycolatum* ist ein ähnliches Protein (E. value: $2e^{-69}$) als zu einem Cobalt-Transport-System zugehörig annotiert.

Screening auf erhöhte Sensitivität gegenüber Antibiotika, die auf die Zellmembran wirken

Bei den Untersuchungen zu Ethambutol wich ein Stamm signifikant ab: *C. glutamicum Cgl0406*::pDrive (C01). Cgl0406 ist eine Permease, die hohe Ähnlichkeit (E. value: $1e^{-125}$) mit einem Lipoprotein-Transporter aus *Rhodococcus jostii* besitzt. Falls Cgl0406 ebenfalls Lipoproteine transportiert, könnte die erhöhte Sensitivität gegenüber Ethambutol sich dadurch erklären, dass die Zellwand auf Grund von fehlenden Lipoproteinen instabiler ist und Ethambutol, da es die Synthese bestimmter Zellwandbestandteile hemmt, die Zellwand noch instabiler macht, wodurch ein verlangsamtes Wachstum auftritt. Es könnte aber auch ein Ethambutol-Transporter sein.

Screening auf erhöhte Sensitivität gegenüber Antibiotika, die die Transkription inhibieren

Interessanterweise zeigte der Stamm *C. glutamicum Cgl0912*::pDrive (H01) unter Zugabe von Ciprofloxacin ein signifikant erhöhtes Wachstum. Cgl0912 ist eine ATPase. Es konnte lediglich die Ähnlichkeit mit der ATPase eines Makrolid-Transporters aus *Mycobacterium smegmatis* gefunden werden (E. value: $6e^{-137}$). Warum der Stamm mit nicht-funktionalem Cgl0912 besser wächst, ist unklar. Werden Die Stämme *C. glutamicum Cgl0952*::pDrive (A02) und *C. glutamicum*

Cgl1432::pDrive (A03) wiesen ein leicht vermindertes Wachstum auf. Cgl0952 ist eine ATPase mit 4 - 6 Transmembrandomänen. Auf dem Genom benachbart liegen eine ABC-Transporter ATPase und Permease. Es konnte eine Ähnlichkeit (E. value: $1e^{-30}$) mit einem Tetracyclin-Resistenz vermittelnden Protein aus *Renibacterium salmoninarum* gefunden werden. Darüber hinaus wurde ein ähnliches Protein (E. value: $9e^{-23}$) bereits in *Corynebacterium striatum* als TetA identifiziert. Cgl1432 ist eine ATPase fusioniert mit einer Permease. Das ähnlichste bisher bekannte Protein ist TetA aus *C. efficiens* (E. value: $2e^{-41}$).

Bei den Untersuchungen zur Sensitivität gegenüber Rifampicin zeigte ein Stamm leicht verringertes Wachstum: *C. glutamicum Cgl0406*::pDrive (C01). Dieser Stamm wurde bereits beim Screening mit Ethambutol erwähnt.

Screening auf erhöhte Sensitivität gegenüber Antibiotika, die die Proteinbiosynthese inhibieren

Bei der Untersuchung zur Sensitivität gegenüber Streptomycin war eine große Varianz innerhalb des Wachstums zu sehen. Am stärksten im Wachstum eingeschränkt war der Stamm *C. glutamicum Cgl0406*::pDrive (C01). Cgl0406 fiel bereits im Screening gegen Ethambutol und Rifampicin auf. Ebenfalls ein verringertes Wachstum zeigte der Stamm *C. glutamicum Cgl2012*::pDrive (E03). Cgl2012 ist eine ATPase, die wahrscheinlich mit der benachbarten Permease ein Operon bildet. In *Corynebacterium amycolatum* ist ein ähnliches Protein (E. value: $2e^{-59}$) als Makrolid- Transporter MacB annotiert. Des Weiteren ist in *Clavibacter michiganensis* ein ähnliches Protein (E. value: $4e^{-42}$) als putativer ABC-Transporter für Peptide gefunden worden. Auch der Stamm *C. glutamicum Cgl2826*::pDrive (E04) zeigte ein schlechteres Wachstum. Cgl2826 ist eine ATPase, die wahrscheinlich mit der benachbarten Permease ein Operon bildet. Es wurden keine signifikanten Ähnlichkeiten zu bekannten Proteine gefunden.

Die Untersuchungen mit Erythromycin resultierten in einem schlechteren Durchschnittswachstum. Knapp unterhalb des Durchschnittswachstums befand sich lediglich *C. glutamicum Cgl2012*::pDrive (E03). Dieser Stamm wurde bereits im Screening gegen Streptomycin erwähnt.

Im Screening mit Tetracyclin fielen zwei Stämme durch ein leicht verschlechtertes Wachstum auf: *C. glutamicum Cgl0952*::pDrive (A02) und *C. glutamicum Cgl1432*::pDrive (A03). Beide Stämme wurden bereits im Screening mit Ciprofoxacin

beschrieben. Interessanterweise konnte eine Ähnlichkeit (E. value: $1e^{-30}$) mit einem Tetracyclin-Resistenz vermittelnden Protein aus *Renibacterium salmoninarum* gefunden werden. Die Übereinstimmung beträgt 38%. Darüber hinaus wurde ein ähnliches Protein (E. value: $2e^{-26}$) bereits in *Corynebacterium jeikeium* als TetA identifiziert. Die Übereinstimmung beträgt 27%.

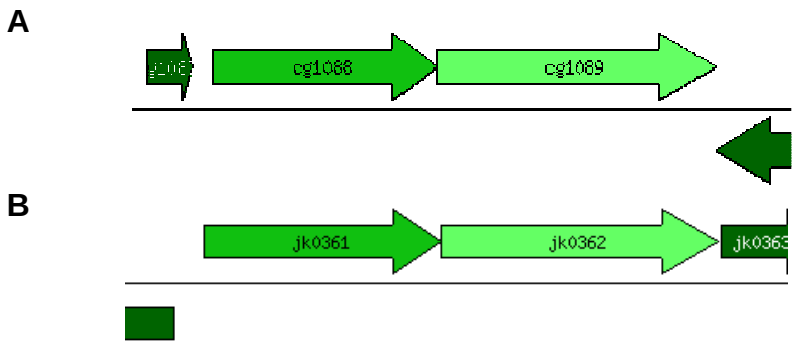

Abb. 4.2.1. Genetische Umgebung von **A:** *Cgl0952* (*Cg1088*) in *C. glutamicum* und **B:** *tetA* in *C. jeikeium (jk0361)*

Abb. 4.2.1. **B** zeigt die beiden Gene *tetA* und *tetB* aus *C. jeikeium*. In Abb. 4.2.1. **A** ist die genetische Umgebung von *Cgl0952* in *C. glutamicum* abgebildet. Das daneben (upstream) liegende Gen *Cgl0953* (*Cg1089*) weist eine hohe Ähnlichkeit mit TetB (E. value: $3e^{-64}$) aus *C. jeikeium* (Abb.4.2.1.B, *jk0362*) mit einer Übereinstimmung von 33% auf. Zusätzlich wurde eine hohe Ähnlichkeit mit TetB aus *C. efficiens* gefunden (E. value: $6e^{-52}$, Übereinstimmung: 33%). Diese Befunde sprechen dafür, dass das Protein Cgl0952 analog zu TetA die Tetracyclin-Resistenz vermittelt.

Es wurden bei dem Screening einige Transporter gefunden, die Hinweise auf deren Substrate liefern. Die Transporter sind zur Übersicht in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tab. 4.2.5. ABC-Exporter mit ihren möglichen Substraten; erhalten aus dem Screening von *C. glutamicum*-Stämmen, die in einem ABC-Transporter kodierende Gen mutagenisiert wurden; Screening auf erhöhte Sensitivität gegenüber verschiedener Toxine

ABC-Exporter	Mögliches Substrat
Cgl1080	5-Me-trp
Cgl0952	Ciprofloxacin
Cgl1432	Ciprofloxacin
Cgl0406	Rifampicin
Cgl0406	Ethambutol
Cgl0406	Streptomycin
Cgl2012	Streptomycin
Cgl2826	Streptomycin
Cgl0952	Tetracyclin
Cgl1432	Tetracyclin
Cgl2012	Erythromycin

Tab.4.2.6. ABC-Exporter mit ihren möglichen Substraten; erhalten aus dem Screening von *C. glutamicum*-Stämmen, die in einem ABC-Transporter kodierende Gen mutagenisiert wurden; Screening auf erhöhte Sensitivität gegenüber verschiedener Toxine

ABC-Exporter	Mögliches Substrat
Cgl1432	Ciprofloxacin
	Tetracyclin
Cgl0406	Rifampicin
	Ethambutol
	Streptomycin
Cgl2012	Streptomycin
	Erythromycin

Wie in Tabelle 4.2.5. ersichtlich, könnten für einige Transporter mehrere Substrate möglich sein. Dies ist in Tabelle 4.2.6. zusammengestellt. Die möglicherweise multifunktionellen Transporter werden im Folgenden näher betrachtet.

Wie bereits erwähnt ist Cgl1432 eine ATPase fusioniert mit einer Permease, welche zu 31 % mit TetA aus *C. efficiens* (E. value: $2e^{-41}$) ähnlich ist.

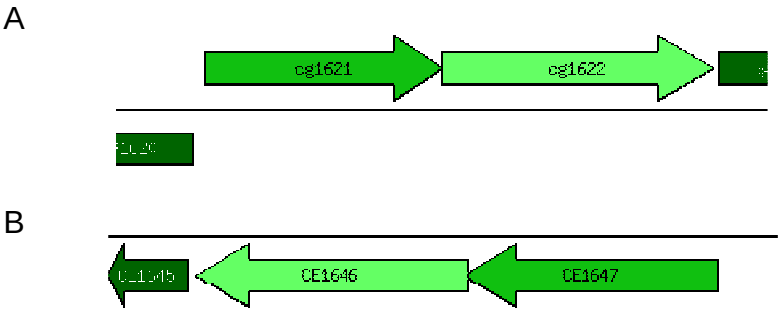

Abb. 4.2.2. Genetische Umgebung von **A:** *Cgl1432* (*Cg1621*) in *C. glutamicum* und **B:** *tetA* in *C. efficiens (CE1647)*

Abb. 4.2.2. **B** zeigt die beiden Gene *tetA* und *tetB* aus *C. efficiens*. In Abb. 4.2.2. **A** ist die genetische Anordnung von *Cgl1432* in *C. glutamicum* abgebildet. Das

daneben (upstream) liegende Gen *Cgl1433* (*Cg1622*) zeigt eine hohe Ähnlichkeit mit einem Gen, das für ein Tetracyclin-Resistenz vermittelndes Protein kodiert, aus *Renibacterium salmoninarum* (E. value: $2e^{-78}$) mit einer Übereinstimmung von 35%. Zusätzlich ist es zu 34% ähnlich zu TetB aus *C. efficiens* (E. value: $2e^{-72}$). Diese Befunde zusammen mit den Informationen zu *Cgl0952* und *Cgl0953* sprechen dafür, dass mindestens vier Tetracyclin-Exporter in *C. glutamicum* vorhanden sind. In *P. aeruginosa* konnte gezeigt werden, dass MexAB-OprM, welches ein RND-Transporter ist, ebenfalls Tetracyclin exportieren kann (Li *et al.*, 1995). MexAB-OprM ist ein Multidrug-Transporter, der außerdem Fluoroquinolone wie Ciprofloxacin transportiert (Li *et al.*, 1995). In dem vorliegenden Screening ist Cgl1432 auch durch erhöhte Sensitivität gegenüber Ciprofloxacin aufgefallen. Dies spricht dafür, dass Cgl1432 ein Multidrug-Exporter mit den Substraten Tetracyclin und Ciprofloxacin sein könnte.

Cgl0406 ist eine Permease, die zu 36 % ähnlich (E. value: $1e^{-125}$) mit dem Lipoprotein-Transporter LolE aus *Rhodococcus jostii* ist. In der genetischen Umgebung von LolE konnte kein vergleichbares Gen wie in der genetischen Umgebung von Cgl0406 gefunden werden. Bei einer Ähnlichkeitssuche von Cgl0407, welches mit Cgl0406 in einem Operon liegen könnte, wurden keine ähnlichen bekannten Proteine gefunden. So kann auch nicht erklärt werden, warum der Stamm *C. glutamicum Cgl0406*::pDrive bei Zugabe von Ethambutol bzw. Streptomycin ein Wachstumsdefizit zeigte. Wie bereits erwähnt, könnte, falls Cgl0406 ebenfalls Lipoproteine transportiert, die erhöhte Sensitivität gegenüber Ethambutol sich dadurch erklären, dass die Zellwand auf Grund von fehlenden Lipoproteinen instabiler ist und Ethambutol, da es die Synthese bestimmter Zellwandbestandteile hemmt, die Zellwand noch instabiler macht, wodurch ein verlangsamtes Wachstum auftritt. Die Funktion von Cgl0406 sollte eingehender geklärt werden.

Als letzter Transporter, der zwei mögliche Substrate hat, ist Cgl2012 zu erwähnen. Cgl2012 ist eine ATPase, welches zu 49 % identisch mit dem Makrolid-Transporter MacB aus *Corynebacterium amycolatum* ist (E. value: $2e^{-59}$). Es konnten für die genetische Umgebung keine zusätzlichen Ähnlichkeiten festgestellt werden. In verschiedenen Organsimen wurden jedoch bereits ABC-Transporter gefunden, die Makrolide exportieren, so z.B. MacAB-TolC aus *E. coli* (Poole, 2005). Für den ABC-Transporter LmrA aus *L. lactis* wurde gezeigt, dass er auch Aminoglykoside wie

Streptomycin exportiert. Und der zur RND-Familie gehörende Tranporter AmrAB-OprA aus *Burkholderia pseudomallei* exportiert sowohl Makrolide als auch Aminoglykoside (Lomovskaya *et al.*, 2001). Dass der Stamm *C. glutamicum Cgl2012*::pDrive unter Zugabe von Streptomycin ebenfalls ein Wachstumsdefizit vorwies, lässt sich dadurch erklären, dass er ebenfalls sowohl Makrolide als auch Aminoglykoside transportiert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ein Screening in Mikrotiterplatten etabliert werden konnte, das sich gut eignet, um auf erhöhte Sensitivitäten gegenüber Toxinen und Antibiotika zu testen. Allerdings sollte dabei bedacht werden, dass aus Gründen der Redundanz damit nicht alle Exporter identifiziert werden können. Mit den aus diesem Screening gewonnenen potentiellen Exportern sollten MIC-Wert-Bestimmungen durchgeführt werden, die einen eindeutigeren Hinweis auf deren Funktion geben. Anschließend sollte über Überexpression des für den gewünschten Exporter kodierenden Gens eine verminderte Sensitivität gegenüber dem getesteten Toxin verifiziert werden.

4.3. Untersuchung des Transportprozesses für die biotechnologisch relevante Substanz (S,S)-Monatin

Ein Schwerpunkt der Untersuchungen von Transportern in *C. glutamicum* war die Identifizierung und Charakterisierung eines putativen Exporters von (S,S)-Monatin. (S,S)-Monatin ist ein natürlich vorkommender Süßstoff, mit einem ca. 800 mal süßeren Geschmack als Saccharose (van Wyk, Ackerman, 1990). Daher ist (S,S)-Monatin besonders in der Getränke- und Lebensmittelindustrie ein sehr gefragtes Produkt, wobei sich die Herausforderung ergibt, den effizientesten Produktionsweg zu finden. Die bisher am häufigsten untersuchte Methode ist dabei die Produktion in Mikroorganismen (Anderson *et al.*, 2007). Obwohl bereits mehrfach eine chemische Totalsynthese des S,S-Isomers gelungen ist (z.B. Nakamura *et al.*, 2000), eignet sich die chemische Synthese aus ökonomischer Sicht nicht zur großtechnischen Produktion. *C. glutamicum* und *E. coli* werden bereits erfolgreich in der Fermentation zur Produktion von L-Glutamat, L-Lysin und L-Threonin eingesetzt (Hermann, 2003). Es liegt also nahe, die Produktionsmöglichkeiten für (S,S)-Monatin in diesen Organsimen zu untersuchen. Für eine effektive Produktion ist es notwendig, die Biosynthese und den Transport der Vorstufen und Produkte über die Membran, sowohl den Export als auch den Import, zu kennen und gegebenenfalls zu manipulieren. Das Ziel dieses Abschnitts war es, einen Exporter für (S,S)-Monatin zu finden. Die Untersuchung des Exports und die anschließende Überexpression des Exporters hat mehrere Vorteile: Zum Einen lässt sich eine bessere Trennung der Zellmasse vom Produkt erzielen, zum Anderen wird die Produktion dadurch erhöht, dass das Endprodukt dem Produktionszyklus entzogen und somit unter Umständen eine Vergiftung der Zelle bzw. die Repression der Biosynthese verhindert wird. Das exportierte Produkt darf allerdings nicht wieder aufgenommen werden. Dieser „futile cycle“ würde die Zelle unnötig Energie kosten.

Mit dem von Cargill zur Verfügung gestellten Produktionsstamm wurden die ersten Experimente zur Synthese von (S,S)-Monatin durchgeführt. Es zeigte sich sehr schnell, dass die erhaltenen (S,S)-Monatin-Mengen zu gering waren, um biochemische Untersuchungen zur Existenz eines Exporters damit durchzuführen. Daher wurde der Fokus zunächst auf die Modifizierung der Synthese gelegt.

4.3.1. Aufnahme, interne Akkumulation und Abbau der bei der (S,S)-Monatin-Synthese relevanten Metabolite

Eine wichtige Voraussetzung für die effektive Synthese von (S,S)-Monatin ist, dass der Produktionsstamm weder das Endprodukt noch die jeweiligen Zwischenprodukte metabolisieren kann. *C. glutamicum* kann weder (S,S)-Monatin noch I3P als C- oder-N-Quellen verwerten (persönliche Mitteilung, Cargill). Es konnte gezeigt werden, dass weder (S,S)-Monatin noch I3P (bzw. I3P-äS) über den Tryptophan-Transporter AroP importiert werden. Auch im Vergleichsstamm *E. coli* BL21 wurde bestätigt, dass weder (S,S)-Monatin noch I3P (bzw. I3P-äS) über einen Tryptophan-Transporter importiert werden.

Bei Zugabe von (S,S)-Monatin, Tryptophan und I3P zum Zellextrakt von *C. glutamicum* ATCC 13032 und *C. glutamicum* pEKEx2*AspCproA* konnte verifiziert werden, dass weder (S,S)-Monatin noch Tryptophan abgebaut werden. Da im Genom von *C. glutamicum* keine Tryptophanase annotiert ist, war dies zu erwarten. Allerdings konnte auch nicht verfolgt werden, dass Tryptophan im Produktionsstamm zu I3P oder (S,S)-Monatin umgewandelt wurde. Der Grund dafür könnte sein, dass weder der Cofaktor PLP noch das Substrat Pyruvat zugegeben wurden, was die Aktivität der Enzyme einschränkte. Für I3P (bzw. I3P-äS) konnte im Produktionsstamm eine schnellere Umwandlung verfolgt werden als im Wildtyp. Da die Vorstufe von (S,S)-Monatin nicht als Vergleichssubstanz vorlag, konnte nicht geprüft werden, ob es sich bei der gefunden Substanz um MonP ((S,S)-Monatin Precursor) handelt. Da I3P im Wildtyp in eine Substanz mit der gleichen Retentionszeit umgewandelt wurde, scheint dies allerdings unwahrscheinlich. Die hohe Instabilität von I3P war bereits bekannt (Cooney, Nonhebel, 1989), sodass es nahe lag, dass eines der Produktionsenzyme den Zerfall beschleunigt.

Über MIC-Wert-Bestimmung von (S,S)-Monatin, Tryptophan, I3P und dessen Zerfallsprodukten Indolessigsäure und Indol konnte gezeigt werden, dass I3P (bzw. I3P-äS) bereits bei Konzentrationen ab 400 µM wachstumsinhibierend wirkt. Auch die Zerfallsprodukte Indolessigsäure und Indol zeigten MIC-Werte von 140 µM bzw. 820 µM. Konzentrationen von I3P (bzw. I3P-äS) von über 400 µM waren im Laufe der Untersuchungen häufig bei der Synthese von (S,S)-Monatin zu finden. Dabei zeigte sich bei (S,S)-Monatin selbst bei Konzentrationen von über 10 mM kein eingeschränktes Wachstum. Dies kann allerdings auch bedeuten, dass es nicht aufgenommen wird. Um dies zu überprüfen, könnte radioaktiv markiertes (S,S)-

Monatin verwendet werden, was hier nicht zur Verfügung stand. Auch bei Tryptophan war bei den verwendeten 2 mM kein inhibiertes Wachstum zu messen. Dies stimmt mit den Beobachtungen überein, dass selbst bei Zugabe von 50 mM Tryptophan keine Wachstumsinhibition stattfand.

Die Akkumulation von I3P (bzw. I3P-äS) allerdings führt zu mehreren Problemen: Treten Konzentrationen von I3P und dessen Zerfallsprodukten auf, die über der inhibitorischen Grenze liegen, so kann dies zu erheblichen Einschränkungen im Wachstum des Produktionsstamms und damit zu erheblichen Einbußen in der Synthese von (S,S)-Monatin kommen. Dies wurde bei den Untersuchungen zur L-Lysin Produktion ebenfalls beobachtet. *C. glutamicum* ist nicht in der Lage, L-Lysin abzubauen. Kommt es, wie im Fall der L-Lysin-Produktion oder bei Deletion des L-Lysin-Exporters LysE, zu einer Akkumulation von L-Lysin, führt dies letztlich zu Bakteriostase (Eggeling, Bott, 2005). Zusätzlich könnten hohe interne Konzentrationen von I3P auch eine Feedback-Inhibition bei einem der Enzyme auslösen. Auch dies zeigte sich als Problem in der L-Lysin-Produktion, welches dadurch gelöst wurde, dass eine Feedback-resistente Aspartatkinase verwendet wurde (Eggeling, Bott, 2005). Die Feedback-Inhibition könnte auch durch die Abbauprodukte von I3P entstehen. In Bakterien und Pflanzen, die Indolessigsäure (IAA), ein Phytohormon, produzieren, ist I3P ein Bestandteil der IAA-Synthese. Dabei wird I3P entweder über die Indolacetat Dehydrogenase in Indole-3-Lactat umgewandelt oder über die Indolpyruvat Decarboxylase in Indol-3-Acetaldehyd (Schütz *et al.*, 2003). Beide Enzyme wurden in *C. glutamicum* noch nicht beschrieben, könnten aber zum Zerfall von I3P beitragen.

Akkumuliert das Zwischenprodukt in höheren Konzentrationen als das Endprodukt, wie es sich im Laufe der Untersuchungen heraus stellte, so deutet dies darauf hin, dass der endgültige Schritt der Umwandlung in (S,S)-Monatin der limitierende sein könnte. Dies kann aus mehreren Gründen der Fall sein: Zum Einen kann die Enzymaktivität limitiert sein, zum Anderen kann die Versorgung von benötigten Cofaktoren bzw. Cosubstraten eingeschränkt sein. Es standen keine Antikörper gegen die Enzyme zur Verfügung. So konnte die Synthese der Proteine nicht endgültig, aber mit hoher Wahrscheinlichkeit gezeigt werden. Dafür wurde allerdings die Versorgung der Cofaktoren bzw. Cosubstrate eingehend untersucht und wird im Folgenden erläutert.

4.3.2. Bereitstellung von Cofaktoren und Substraten

Interne Konzentrationen von Pyruvat und PLP

Die Aminotransferase benötigt Pyruvat und als Cofaktor Pyridoxalphosphat (PLP) für die Umwandlung von Tryptophan in I3P. Um die interne Versorgung mit Pyruvat zu gewährleisten, wurde ein *C. glutamicum*-Stamm verwendet, dem das Gen *aceE* deletiert worden war. Das Gen *aceE* kodiert für die Pyruvatdecarboxylase-Untereinheit der Pyruvatdehydrogenase. Mit einer Deletion in diesem Gen wird verhindert, dass das Pyruvat in den Citratzyklus eingeschleust wird. Es konnte gezeigt werden, dass im *C. glutamicum* ATCC 13032 kein signifikant hohes Level an Pyruvat erreicht wird, da dieses sofort metabolisiert wird. In der *aceE*-Deletionsmutante konnten interne Pyruvat-Werte von bis zu 13 mM detektiert werden, was für die Synthese von (S,S)-Monatin ausreichend sein sollte. Während des Biosyntheseprozesses von Cargill wird auch Pyruvat zugefügt, welches durch den Pyruvat-Importer MctC aufgenommen wird (Jolkver, 2009). Das benötigte PLP ist die biologisch aktive Form von Vitamin B_6 (Pyridoxin), welches in seiner gelösten Form als Pyridoxolhydrochlorid zugegeben wird. Da es noch keine eigehenden Untersuchungen bezüglich des Transports von Pyridoxin bzw. PLP über die bakterielle Membran gibt und die Enzyme zum Abbau von Pyridoxin in *C. glutamicum* noch nicht vollständig erforscht sind, wurden beide Substanzen hinzugefügt. Außerdem kam im Laufe dieser Untersuchungen die Frage auf, ob die Synthese ausschließlich im Cytoplasma oder zusätzlich im Medium stattfindet, weswegen es zusätzlich von Vorteil ist, beide Varianten zur Verfügung zu stellen.

Die Aldolase benötigt für die Umwandlung von I3P in die (S,S)-Monatin-Vorstufe MonP lediglich Pyruvat, dessen Verfügbarkeit bereits geklärt wurde.

Für die Reaktion von MonP zu (S,S)-Monatin, die ebenfalls von der Aminotransferase katalysiert wird, wird ein Molekül Alanin verbraucht. Durch die Verwendung des Dipeptids Trp-Ala konnten interne Konzentrationen von bis zu 100 mM Alanin erreicht werden. Da Alanin im ersten Schritt der Aminotransferase aus Pyruvat generiert wird, sollten die hier gemessenen Konzentrationen reichen. Das Dipeptid Trp-Ala ist in der Anschaffung sehr teuer und daher aus ökonomischer Sicht nicht für die großtechnische Produktion geeignet. Hier diente es allerdings der biochemischen Charakterisierung der Synthese in kleinem Maßstab.

Als letzte Substanz, die zur Biosynthese von (S,S)-Monatin notwendig ist, wurde die Versorgung mit Tryptophan untersucht. Dazu diente einerseits ebenfalls die

Fütterung mit dem Dipeptid Trp-Ala, womit eine interne Konzentration von ca. 40 mM erreicht wurde. Da allerdings die Dipeptidfütterung nicht besonders ökonomisch ist, wurde ein anderer Ansatz gewählt. Es wurde sowohl das Gen des Tryptophan-Importers TnaB aus *E. coli* heterolog in *C. glutamicum* überexprimiert als auch das Gen des *C. glutamicum*-eigenen Tryptophan-Importers AroP. TnaB hat eine viel höhere Aufnahmekapazität als AroP (Edwards, 1982). In *E. coli* existiert, im Gegensatz zu *C. glutamicum*, eine Tryptophanase, die das importierte Tryptophan abbaut. Daher muss TnaB effektiver sein als AroP, welches das alleinige Tryptophan-Aufnahmesystem in *C. glutamicum* ist, in dem es keine Tryptophanase gibt (Pittard, 1996; Wehrmann *et al.*, 1995). Es zeigte sich bei den Aufnahmemessungen, dass *C. glutamicum* pEC-XC99E*tna*B mit einer Aufnahmerate von 5 nmol/mgTG*min eine fünffach höhere Aktivität als der Wildtyp besitzt. Die ausreichende Zufuhr von Tryptophan sollte also sicher gestellt sein.

Trotz der Bereitstellung von Cofaktoren und Substraten in ausreichenden Mengen zeigte sich keine signifikant höhere (S,S)-Monatin-Synthese. Auffallend war zusätzlich, dass immer mehr I3P produziert wurde als (S,S)-Monatin, woraus geschlussfolgert wird, dass der letzte Schritt der Aminotransferase den limitierenden darstellt.

4.3.3. Untersuchungen zur Lokalisation der Biosynthese

Die unphysiologische Verwendung von Detergenzien wie Dekanoat und Tween warf die Frage auf, ob Dekanoat die Zellen so schädigt, dass sie lysieren und die Synthese auch im Medium stattfindet. Es konnte gezeigt werden, dass die zur Induktion verwendeten hohen IPTG-Konzentrationen die Zellen nicht so sehr schädigten, dass mehr Proteine im Medium zu finden waren als ohne Induktion. Bei der Verwendung von Dekanoat war dies allerdings anders. Bereits ab einer Konzentration von 1,25 mM Dekanoat konnte eine leicht vermehrte Anhäufung von Proteinen im Medium fest gestellt werden. Da auch eine höhere Menge an I3P (bzw. I3P-äS) produziert wurde, lässt dies darauf schließen, dass sich auch die zur Synthese von (S,S)-Monatin benötigten Enzyme im Medium befanden. Zusätzlich konnte die (S,S)-Monatin-Synthese in *C. glutamicum* pEKEx2*AspCproA* durch erhöhte Zugabe von Tryptophan (3 mM, 10 mM, 50 mM) gesteigert werden. Dies lässt sich nicht erklären, wenn die Synthese ausschließlich im Cytoplasma statt findet, da der Tryptophan-Importer AroP mit einem K_M von 0,8 µM und einem v_{max}

von 0,13 nmol/mgTG*min bereits bei Zugabe von 3 mM Tryptophan gesättigt ist. Findet die Synthese hingegen auch im Medium statt, so ist es nachvollziehbar, dass bei höheren Mengen des Ausgangssubstrats eine vermehrte Synthese von (S,S)-Monatin stattfindet. Dies hängt allerdings noch von dem uns unbekannten K_M-Wert der zur Synthese benötigten Enzyme ab. Wurden die Zellen mit 0,2% CTAB, einem kationischen Detergenz, permeabilisiert, so synthetisierten sie bereits mehr (S,S)-Monatin als in intaktem Zustand. Bei mehrmaligem Aufschließen mit der French Press konnte sogar noch eine Steigerung der Synthese erzielt werden. Aus all diesen Versuchen lässt sich folgern, dass die Synthese wahrscheinlich zum großen Teil im Medium statt findet und nur zu geringem Teil im Cytoplasma.

4.3.4. Untersuchungen zum Transport von Indol und I3P

Da die Synthese von (S,S)-Monatin nicht ausreichend war, um direkt den (S,S)-Monatin-Export zu messen, wurden indirekte Methoden angewandt, die Hinweise liefern sollten. Durch die strukturelle Ähnlichkeit von (S,S)-Monatin mit I3P und Indol könnte davon ausgegangen werden, dass der potentielle (S,S)-Monatin-Exporter auch I3P und Indol exportiert. Da für Indol in einem anderen Abschnitt dieser Arbeit bereits ein MIC-Wert bestimmt wurde, konnte eine im Arbeitskreis bestehende Mutantenbank mit *C. glutamicum*-Stämmen, in denen jeweils ein Transporter kodierendes Gen mutagenisiert worden war, in einem Mikrotiterplatten-Test auf Indol-Sensitivität geprüft werden. Zusätzlich wurde die in dieser Arbeit erstellte Mutantenbank mit Stämmen, in denen ein ABC-Exporter kodierendes Gen mutagenisiert worden war, auf erhöhte Sensitivität gegenüber I3P getestet. Auf Grund der hohen Substratbreite einiger Transporter, wie die in Abschnitt 3.2. beschriebenen Multidrug-Transporter, scheint es nicht unwahrscheinlich, dass ein Transporter sowohl (S,S)-Monatin als auch Tryptophan, Indol und I3P transportiert. Allerdings könnte die Identifizierung des Transporters auch auf Grund von Redundanzen erschwert werden.

Beim Screening kamen fünf Kandidaten in die engere Wahl. Mit dieser Auswahl wurde ein Tropftest auf Indol-haltigen Agar-Platten durchgeführt, in denen deutlich erkennbar drei Mutanten schlechteres Wachstum aufwiesen. *C.glutamicum* pDrive::Cgl*1522* ist ein Stamm, in dem ein hypothetisches Membranprotein unfunktional ist. Bei einer Ähnlichkeitssuche wurden keine relevanten ähnlichen Proteine gefunden. Beim Screening mit der ABC-Transporter-Mutantenbank fiel der

Transporter Cgl1525 auf. Der ABC-Transporter Cgl1525 zeigte Ähnlichkeiten zu einigen Multidrug-Transportern aus verschiedenen Bakterien und ist in *C. glutamicum* als Tetracyclin-Transporter TetA annotiert. Ein Export von sowohl Tetracyclin als auch I3P (bzw. I3P-äS) ist allerdings nicht ausgeschlossen. Diese beiden Transporter sollten daher eingehender untersucht werden.

Als weitere potentielle (S,S)-Monatin-Exporter stellten sich Cgl2018 heraus, eine Permease aus der ABC-Transporter-Familie und Cgl0322, eine Permease aus der MFS-Familie. Der letzte interessante Exporter ist die Permease Cgl2314. In *C. amycolatum* ist ein Homolog aus der „Auxin Efflux Carrier"-Familie annotiert (Identität 40%, E. value: $9e^{-59}$). Zu den Substraten zählt unter anderem Indolessigsäure, welches strukturelle Ähnlichkeit zu Indol und (S,S)-Monatin besitzt. Das pflanzliche Hormon Auxin ist in viele Aspekte der pflanzlichen Entwicklung wie Zellteilung, Elongation und Differenzierung involviert (Bennett, 1998).

Aus dem Screening der Mutantenbank mit ABC-Transportern auf Sensitivität gegenüber I3P (bzw. I3P-äS) ergaben sich weitere Kandidaten, die eingehender untersucht werden sollten, zu denen zum Teil zurzeit keine relevanten Informationen vorhanden sind. Darunter sind die fusionierten ATPasen/Permeasen Cgl0964, Cgl1525 und Cgl2077. Des Weiteren zeigten wirkten sich die defekten doppelten ATPasen Cgl1061, Cgl2831 und Cgl1420 in negativer Form auf das Wachstum aus. Auch der Stamm *C. glutamicum Cgl1568*::pDrive zeigte eine erhöhte Sensitivität gegenüber I3P(bzw. I3P-äS).

Das Screening ist zwar geeignet, um die große Zahl an potentiellen Exportern einzugrenzen, allerdings sollte es auch kritisch betrachtet werden. Es ist relativ unwahrscheinlich, dass 7 Exporter für I3P (bzw. I3P-äS) existieren.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse darauf hin, dass der limitierende Schritt zur Synthese von (S,S)-Monatin in den Zellen für biochemische Charakterisierungen des möglichen Transports von (S,S)-Monatin mit großer Wahrscheinlichkeit die Enzymaktivität der Aminotransferase bei der Umwandlung von MonP zu (S,S)-Monatin ist. Als potentielle Indol / I3P (bzw. I3P-äS)-Exporter stehen einige Kandidaten zur Verfügung, die im Weiteren näher untersucht werden sollten.

Zwei der in der gesamten Arbeit gefundenen Transporter weisen eine interessante Übereinstimmung in der Substratspezifität auf:

Der Transporter Cgl1525, TetA, fiel sowohl im Screening mit Indol und I3P als auch im Screening auf einen Fruktose-Exporter auf. Interessanterweise zeigte er allerdings im Screening mit Tetracyclin keine Wachstumsinhibition.

Auch Cgl2831 zeigte sich erhöht sensitiv gegenüber I3P und akkumulierte Fruktose im „pulse-chase“-Experiment. Diese Übereinstimmung ist interessant, da gerade Cgl2831 in keinem anderen Screening auffiel und die strukturelle Ähnlichkeit von I3P (bzw. I3P-äS) und Fruktose nicht sehr groß ist. Dennoch waren beide Screening-Ansätze gänzlich verschieden. Dieser Tatsache sollte nachgegangen werden.

V. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Transportprozesse in Bezug auf ihre Beteiligung am Saccharose-Metabolismus, am Export von Toxinen und ihre Rolle in der Produktion der biotechnologisch relevanten Substanz (S,S)-Monatin untersucht.

Da *C. glutamicum* keine Fructokinase besitzt, muss es die im Zellinneren durch Spaltung der Saccharose entstandene Fruktose zunächst exportieren, um sie dann über das PTS^{Fru}-System wieder aufzunehmen und gleichzeitig zu phosphorylieren. Im ersten Abschnitt der Arbeit wurde zunächst der Import von Saccharose charakterisiert und dabei verifiziert, dass die Expression der für PTS^{Suc} und PTS^{Fru}-kodierenden Gene vom Substratangebot abhängig induziert wird. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Saccharose- als auch die Fruktose-Aufnahme durch Zugabe von Glukose inhibiert werden. Darüber hinaus wurde die Saccharose-Aufnahme auch durch einen Überschuss an Fruktose, Pyruvat und Maltose gehemmt. Zur Charakterisierung des Exports wurde ein Messsystem etabliert, das es erlaubt, den externen Umsatz von Saccharose zu verfolgen. Zusätzlich wurde unter Verwendung von spezifisch an der Fruktose radioaktiv markierten Saccharose ein Messsystem zur Bestimmung der internen Fruktose-Mengen etabliert. So konnte in „pulse-chase“-Experimenten die Akkumulation und der Export der Fruktose verfolgt werden. Mit Hilfe dieser beiden Systeme konnte ausgeschlossen werden, dass Fruktose über Diffusion ins Medium gelangt. Zusätzlich konnte unter Verwendung von Ionophoren ausgeschlossen werden, dass es sich beim Fruktose-Export um einen sekundär aktiven Prozess handelt. Daher wurde in einem systematischen Screening-Ansatz, in dem Stämme verwendet wurden, die in einem ABC-Transporter-kodierenden Gen mutagenisiert worden waren, die Akkumulation und der Export von Fruktose verglichen. Dabei konnten Cgl2831 und Cgl1525 als putative Fruktose-Exporter erhalten werden.

Im zweiten Abschnitt wurde der Export von Antibiotika und Toxinen untersucht. Da für *C. glutamicum* noch keine „minimalen inhibitorischen Konzentrationen“ für Antibiotika und Toxine bekannt waren, wurden diese für eine Vielzahl von Substanzen ermittelt. Es wurde festgestellt, dass sich der bereits erwähnte systematische Screening-Ansatz dazu eignet, eine große Zahl von Exportern auf ihre potentielle Beteiligung am Toxin-Export hin zu untersuchen. Dazu wurden die

ermittelten „minimalen inhibitorischen Konzentrationen“ eingesetzt, um die Mutantenbank auf erhöhte Sensitivität gegenüber den verwendeten Toxinen zu selektieren. Dabei wurden drei putative Toxin-Exporter erhalten. Darunter befinden sich Cgl2012 als potentieller Makrolid- und Aminoglykosid-Exporter, Cgl0952 als potentieller Tetracyclin-Exporter und Cgl1432 als potentieller Multidrug-Exporter mit Tetracyclin und Ciprofloxacin als Substraten.

Außerdem wurde der Export von (S,S)-Monatin untersucht. Der von der Firma Cargill entwickelte Prozess zur Biosynthese wurde modifiziert, indem Stämme konstruiert wurden, die die Bereitstellung von Cofaktoren und der Ausgangssubstrate Pyruvat, Tryptophan und Alanin sicherten. Durch die heterologe Überexpression des *E. coli* Transporters TnaB konnte die Bereitstellung von ausreichend Tryptophan sichergestellt werden. Durch Verwendung des Dipeptids Trp-Ala wurde zusätzlich die interne Alanin-Konzentration erhöht. Alle Ansätze führten allerdings nicht zu ausreichend hoher Produktion von (S,S)-Monatin, um eine biochemische Charakterisierung des Exports vorzunehmen. Die Aktivität der heterolog eingebrachten Enzyme wurde als der limitierende Schritt identifiziert.

VI. Literaturverzeichnis

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

ANDERSON, J., C. *et al*., (Oktober 2007). Products and Methods for in vivo secretion of (S,S)-Monatin, U.S. Patent 20070105938

ANDREWS, J. (2001). Determination of minimal inhibitory concentrations. J. Antimicrobial Chemotherapy **48** S1: 5-16

BALCH, W. E., FOX, G. E., MAGRUM, L. J., WOESE, C. R. and WOLFE, R. S. (1979). Methanogens: reevaluation of a unique biological group. Microbiol. Rev. **43**:260-296.

BÄUMCHEN, C., KRINGS, E., BRINGER, S., EGGELING, L., SAHM, H. (2009). Myo-inositol facilitators lolT1 and lolT2 enhance D-mannitol formation from D-Fructose in *Corynebacterium glutamicum*. FEMS Microbiol. Lett. **290(2)**:227-35

BARABOTE, R., D., SAIER JR., M., H. (2005) Comparative Genomic Analyses of the Bacterial Phosphotransferase System. Microbiol. And Mol. Biol. Reviews **69(4)**: 608-634

BARNELL., W., O., LIU, J., HESMAN, T., L., O'NEILSS, M., C., CONWAY, T. (1992). The *Zymomonas mobilis* glf, zwf, edd, and glk Genes Form an Operon: Localization of the Promoter and Identification of a Conserved Sequence in the Regulatory Region. J. Bacteriol. 174(9):2816-2823

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

BENNETT, M., J., MARCHANT, A., MAY, S., T., SWARUP, R. (1998). Going the distance with auxin: unravelling the molecular basis of auxin transport. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. **353(1374)**:1511-5

BLOMBACH, B., SCHREINER, M., E., HOLATKO, J., BARTEK, T., OLDIGES, M., EIKMANNS, B., J. (2007a) L-valine production with pyruvate dehydrogenase complex-deficient *Corynebacterium glutamicum*. Appl. Environ. Microbiol. **73(7):**2079-84

BRADFORD, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgramm quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. Anal. Biochem. **116**:53-64

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

BRUNE, I., BRINKROLF, K., KALINOWSKI, J., PÜHLER, A., TAUCH, A. (2005). The individual and common repertoire of DNA-binding transcriptional regulators of *Corynebacterium glutamicum, Corynebacterium efficiens, Corynebacterium diphtheriae and Corynebacterium jeikeium* deduced from the complete genome sequences. BMC Genomics **6(1):**86

BUSH, K., JACOBY, G., A., MEDEIROS, A., A. (1995). A functional classification scheme for β-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob. Agents Chemother. **39**:1211-1233

CARPANETO, A., GEIGER, D., BAMBERG, E., SAUER, N., FROMM, J., HEDRICH, R. (2005) Phloem-localized, Proton-coupled Sucrose Carrier ZmSUT1 Mediates Sucrose Efflux under the Control of Sucrose Gradient and the Proton Motive Force. J. Biol. Chem. **280**:21437-21443

CASEY, J.T., O'CLEIRIGH, C., WALSH, P.K., O'SHEA, D., G. (2004). Development of a robust microtiter plate-based assay method for assessment of bioactivity. J Microbiol Methods **58(3)**: 327-34

CASTRO, R., NEVES, A., R., FONSECA, L., L., POOL, W., A., KOK, J., KUIPERS, O., P., SANTOS, H. (2009). Characterization of the individual glucose uptake systems of *Lactococcus lactis*: mannose-PTS, cellobiose-PTS and the novel GlcU permease. Mol. Microbiol. **71(3)**:795-806

COONEY, T., P., NONHEBEL, H., M. (1989). The measurement and mass spectral identification of indole-3-pyruvate from tomato shoots. Biochem. And Biophys. Research Communications **162(2)**:761-766

DARWISH, A., M., FARMER, B., D., HAWKE, J., P. (2008). Improved method for determining antibiotic susceptibility of *Flavobacterium columnare* isolates by broth microdilution. J Aquat Anim Health **20(4)**:185-91

DEUTSCHER, J. (2008). The mechanism of carbon catabolite repression in bacteria. Curr. Opinion in Microbiol. **11**:87-93

DEUTSCHER, J., FRANCKE, C., POSTMA, W., (2006) How Phosphotransferase System-Related Protein Phosphorylation Regulates Carbohydrate Metabolism in Bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **70**: 939-1031

DOMINGUEZ, H. *et al.,* (1998). Carbon-flux distribution in the central metabolic pathways of *Corynebacterium glutamicum* during growth on fructose.Eur. J. Biochem. **254**:96-102

DOMINGUEZ, H., LINDLEY, N. D. (1996). Complete Sucrose Metabolism Requires Fructose Phosphotransferase Activity in *Corynebacterium glutamicum* To Ensure Phosphorylation of Liberated Fructose. Appl. And Environ. Microbiol. **62(10)**:3878-80

EDWARDS, R., M., YUDKIN, M., D. (1982). Location of the gene for the low-affinity tryptophan-specific permease of *Escherichia coli*. *Biochem. J*. **204**: 617-9

EGGELING, L., BOTT, M., (2005). Handbook of *C. glutamicum* ISBN: 0-8493-1821-1

EIKMANNS, B. J., KLEINERTZ, E., LIEBL, W., SAHM, H. (1991). A family of *Corynebacterium glutamicum/Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing. Gene **102**:93-98

ENGELS, V., LINDNER, S., WENDISCH, V., F. (2008). The global repressor SugR controls expression of genes of glycolysis and of the L-lactate dehydrogenase LdhA in *Corynebacterium glutamicum*. J. Bacteriol. **190:**8033-8044

FATH, M., J., KOLTER, R. (1993) ABC Transporters: Bacterial Exporters. Microbiol. Reviews **57(4)**: 995-1017

FERNANDEZ-ROBLAS, R., ADAMES, H., MARTIN-DE-HIJAS, N., Z., ALMEIDA, D., G., GADEA, I., ESTEBAN, J. (2009) In vitro activity of tigecycline and 10 other antimicrobials against clinical isolates of the genus *Corynebacterium*. Int. J. Antimicrob. Agents **33(5)**:453-5

FRUNZKE, J., ENGELS, V., HASENBEIN, S., GÄTGENS, C., BOTT, M. (2008) Coordinated regulation of gluconate catabolism and glucose uptake in *Corynebacterium glutamicum* by two functionally equivalent transcriptional regulators, GntR1 and GntR2. Mol. Microbiol. **67:** 305–322

GAIGALAT, L., SCHLÜTER, J.-P., HARTMANN, M., MORMANN, S., TAUCH, A., PÜHLER, A., KALINOWSKI, J. (2007). The DeoR-type transcriptional regulator SugR acts as a repressor for genes encoding the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system (PTS) in *Corynebacterium glutamicum*. BMC Mol. Biol. **(8)**:104

GEBHARDT, H., MENICHE, X., TROPIS, M., KRÄMER, R., DAFFE, M., MORBACH, S. (2007) The key role of the mycolic acid content in the functionality of the cell wall permeability barrier in *Corynebacterieae*. Microbiol. **153**: 1424-1434

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

GUILLEMIN, I., SOUGAKOFF, W., CAMBAU, E., REVEL-VIRAVAU, V., MOREAU, N., JARLIER, V. (1999). Purification and inhibition by quinolones of DNA gyrases from *Mycobacterium avium, Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium fortuitum* bv. *peregrinum*. Microbiology **145**:2527-32

GUNN, F. J., C. G. TATE, and P. J. F. HENDERSON. (1994). Identification of a novel sugar-H1 symport protein, FucP, for transport of L-fucose into *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **12:**799–809.

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

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

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

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

JÄGER, W., KALINOWSKI, J., PÜHLER, A. (1997). A *Corynebacterium glutamicum* Gene Conferring Multidrug Resistance in the Heterologous Host *Escherichia coli*.J. Bacteriol. **179(7)**:2449-2451

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

JANI, B., (Oktober 2008). Package Assembly For Multi-Modality Sensation Chewing Gum Compositions, U.S. Patent 20080255938

JOHNSON, R., STREICHER, E., M., LOUW, G., E., WARREN, R., M., VAN HELDEN, P., D., VICTOR, T., C. (2006) Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Curr. Issues Mol. Biol. **8(2)**:97-112

JOHNSON, W., (September 2008). Ammoniated Glycyrrhizin Modified Sweetened Beverage Products, WIPO Pat. Appl. WO/2008/112971A1

JOLKVER, E., EMER, D., BALLAN, S., KRÄMER, R., EIKMANNS, B., J., MARIN, K. (2009). Identification and characterization of a bacterial transport system for the uptake of pyruvate, propionate and acetate in *Corynebacterium glutamicum*. J Bacteriol **191(3)**: 940-8

KALINOWSKI,J., BATHE, B., BARTELS, D., BISCHOFF, N., *et al.* (2003). The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. J. Bacteriol. **104**:5-25

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

KAWAGUCHI, H., VERTES, A., A., OKINO, S., INUI, M., YUKAWA, H (2006). Engineering of a Xylose Metabolic Pathway in *Corynebacterium glutamicum*. Appl. And Environ. Microbiol. **72(5)**:3418-3428

KELKER, N., E., ANDERSON, R., L., (1972). Evidence for Vectorial Phosphorylation of D-Fructose by Intact Cells of *Aerobacter aerogenes*. J. Bacteriol. 112: 1441-1443

KHANKAL, R., CHIN, J., W., CIRINO, P., C. (2008). Role of xylose transporters in xylitol production from engineered *Escherichia coli*. J. Biotechnol. **134(3-4)**:246-52

KIEFER, P., HEINZLE, E., ZELDER, O., WITTMANN, C. (2004). Comparative metabolic flux analysis of lysine producing *Corynebacterium glutamicum* cultured in glucose or fructose. Appl Environ Microbiol **70:** 229–239

KIMURA, E., (2003). Metabolic engineering of glutamate production. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. **79**: 37-57

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

KIRCHNER O., TAUCH, A., (2003). Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. J. Bacteriol.**175**:613-622

KITAOKA, M., HAYASHI, K. (2002). Carbohydrate-processing phosphorolytic enzymes. Trends Glycosci Glycotechnol **14**:35-50

KOBAYASHI, N., NISHINO, K., YAMAGUCHI, A. (2001). Novel Macrolide-Specific ABC-Type Efflux Transporter in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **183(19)**:5639-5644

KRÄMER, R., LAMBERT, C. (1990). Uptake of glutamate in *Corynebacterium glutamicum*. 2. Evidence for a primary active transport system. Eur. J. Biochem. **194(3)**:937-44

KRIENGKAUYKIAT, J., PORTER, E., LOMOVSKAYA, O., WONG-BERINGER, A. (2005). Use of an Efflux Pump Inhibitor To Determine the Prevalence of Efflux Pump-Mediated Fuoroquinolone Resistance and Multidrug Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. **49(2)**: 565-570

KRINGS, E., KRUMBACH, K., BATHE, B., KELLE, R., WENDISCH, V. F., SAHM, H., EGGELING, L., (2006). Characterization of *myo*-Inositol Utilization by *C. glutamicum:* the Stimulon, Identification of Transporters, and Influence on L-Lysine Formation. J. Bacteriol. **188**:8054-8061

KRÖMER, J., O., SORGENFREI, O., KLOPPROGGE, K., HEINZLE, E., WITTMANN, C. (2003). In-Depth Profiling of Lysine-Producing *Corynebacterium glutamicum* by Combined Analysis of the Transcriptome, Metabolome and Fluxome. J. Bacteriol. **186(6)**:1769-1784

KRONVALL, G., KARLSSON, I., WALDER, M., SÖRBERG, M., NILSSON, L., E. (2006). Epidemiological MIC cut-off values for tigecycline calculated from Etest MIC values using normalized resistance interpretation. J. Antimicrob Chemother. **57**:498-505

LAMBERT, A., OSTERAS, M., MANDON, K., POGGI, M., C., LE RUDULIER, D. (2001). Fructose uptake in *Sinorhizobium meliloti* is mediated by a high-affinity ATP-binding cassette transport system. J. Bacteriol. **183(16)**:4709-17

LAPLAZA, J. *et al.*, (Oktober 2006). Products and Methods for in vivo secretion of (S,S)-Monatin, WIPO Pat. Appl. WO/2006/113897

LEUCHTENBERGER, W., HUTHMACHER, K., DRAUZ, K. (2005). Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. Appl. Microbiol. Biotechnol. **69(1)**:1-8

LI, X., NIKAIDO, H., POOLE, K. (1995). Role of MexA-MexB-OprM in Antibiotic Efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents and Chemother. **39(9)**:1948-1953

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

LOMOVSKAYA, O., ZGURSKAYA, H., I., TOTROV, M., WATKINS, W. J. (2006). Waltzing transporters and 'the dance macabre' between humans and bacteria. Nature Reviews Drug Discovery. **6**:56-65

MARIN K., KRÄMER R. (2007) Amino Acid Transport Systems in Biotechnologically Relevant Bacteria. *Microbiol Monogr.* Springer-Verlag

MARTINEZ, A., LIN, J. (2006). Effect of an Efflux Pump Inhibitor on the Function of the Multidrug Efflux Pump CmeABC and Antimicrobial Resistance in *Campylobacter* **3(4)**:393-402

MCLAUGHLIN, J., V., BICKHAM, S. T., WIGGINS, G., L., LARSEN, S., A., BALOWS, A., JONES, W., L. (1971). Antibiotic Susceptibility Patterns Of Recent Isolates of *Corynebacterium diphtheria*. Appl Microbiol. **21(5)**:844-851

MIKUSOVA, K., SLAYDEN, R., A., BESRA, G., S., BRENNAN, P. J. (1995). Biogenesis of the Mycobacterial Cell Wall and the side of action of Ethambutol. Antimicrob. Agents Chemother. **39(11)**: 2484-2489

MOLL, G., N., LEENHOUTS, C., J. (2005). Export and modification of (poly)peptides in the lantibiotic way. U.S. Patent 6861236

MOON, M.-W., KIM, H.-J., OH, T.-K., SHIN, C.-S., LEE, J.-S., KIM, S.-J., LEE, J.-K., (2005). Analysis of enzyme II gene mutants for sugar transport and heterologous expression of fructokinase gene in *C. glutamicum* ATCC13032. FEMS Microbiol. Letters. **244**: 259-266

MOON, M.-W., PARK, S.-Y., CHOI, S.-K., LEE, J.-K., (2007). The Phosphotransferase System of *C. glutamicum*: Features of Sugar Transport and Carbon Regulation. J Mol Microbiol Biotechnol. **12**: 43-50

MORBACH, S., SAHM, H., EGGELING, L. (1996). L-Isoleucine Production with *Corynebacterium glutamicum*: Further Flux Increase and Limitation of Export. Appl. Environ. Microbiol. **62(12)**:4345-4351

MORCILLO, N., et al., (2004). A microplate indicator-based method for determining the susceptibility of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* to antimicrobial agents. Int J Tuberc Lung Dis **8(2)**: 253-259

MORI, M., SHIIO, I., (1987). Pyruvate formation and sugar metabolism in an amino acid-producing bacterium, *Brevibacterium flavum*. Agric Biol Chem **51**: 129-138

MPHAHLELE, M., *et al*. (2008) Pyrazinamide Resistance among South African Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. J. Clin. Microbiol. **46(10)**:3459-3464

NAKAGAWA, S., IKEDA, M., (2003). The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes. Appl. Microbiol. Biotechnol. **62(2-3)**: 99-109

NAKAMURA, K., BAKER, T., J., GOODMAN, M. (2000). Total synthesis of (S,S)-Monatin. Org. Lett. 2, (19): 2967-2970

NEIDHARDT F.C., BLOCH P.L., SMITH D.F. (1974). Culture medium for Enterobacteria. J. Bacteriol. **119**: 736-746

NEYFAKH, A., A. (2001). The Ostensible Paradox of Multidrug Recognition. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. **3(2)**:151-154

NEYFAKH, A., A., BIDNENKO, V., E., BO CHEN, L. (1991). Efflux-mediated multidrug resistance in *Bacillus subtilis*: similarities and dissimilarities with the mammalian system. Proc. Natl. Acad. Sci. **88**:4781-4785

NEYFAKH, A., A., BORSCH, C.,M., KAATZ, G. W. (1993). Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter. Antimicrob. Agents Chemother. **37**:128-129

NGUYEN, L., THOMPSON, C., J. (2006). Foundations of antibiotic resistance in bacterial physiology: the mycobacterial paradigm. Trends in Microbiology. 14(7)**:**304-312

NIKAIDO, H. (1996). Multidrug Efflux Pumps of Gram-Negative Bacteria. J. Bacteriol. **178(20)**:5853-59

NINIO, S., ROTEM, D., SCHULDINER, S. (2001). Functional Analysis of Novel Multidrug Transporters from Human Pathogens. J. Biol. Chem. **276(51)**:48250-48256

ORELLE, C., AYVAZ, T., EVERLY, R., M., KLUG, C., S., DAVIDSON, A., L. (2008). Both maltose-binding protein and ATP are required for nucleotide-binding domain closure in the intact maltose ABC transporter. Proc. Natl. Acad. Sci USA **105(35)**:12837-42

PALMGREN, M., G. (1990). Acridine Orange as a probe for measuring pH gradients across membranes: Mechanism and limitation. Analytical Biochemistry 192(2):316-21

PAO, S., S., PAULSEN, I., T., SAIER JR., M., H. (1998). Major Facilitator Superfamily. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62**(1)**:1-34

PARCHE, S., BURKOVSKI, A., SPRENGER, G., A., WEIL, B., KRÄMER, R., TITGEMEYER, F., (2001). *C. glutamicum*: a Dissection of the PTS. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. **3**(3): 423-428

PAULSEN, I., T., CHAUVAUX, S., CHOI, P., SAIER JR., M., H. (1998). Characterization of Glucose-Specific Catabolite Repression-Resistant Mutants of *Bacillus subtilis*: Identification of a Novel Hexose:H1 Symporter. J. Bacteriol. **180(3)**:498-504

PEREIRA, G., A., PIMENTA, F., P., DOS SANTOS, F., R., W., DAMASCO, P., V., JUNIOR, R., H., MATTOS-GUARALDI, A., L. (2008). Antimicrobial resistance among Brazilian *Corynebacterium diphtheriae* strains. Mem Inst Oswaldo Cruz **103(5)**: 507-510

PFEFFERLE, W., MÖCKEL, B., BATHE, B., MARX, A., (2003). Biotechnological manufacture of lysine. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. **79:** 59-112

PIDDOCK, L. J. (2006). Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. Clin. Microbiol. Rev. 19(2):382-402

PITTARD, A.J. (1996). Biosynthesis of the Aromatic Amino Acids. In: Neidhardt, F.C. (ed) *Escherichia coli* and *Salmonella*. ASM Press, Washington. pp. 458-484

POELARENDS, G., J., MAZURKIEWICZ, P., KONINGS, W., N. (2002). Multidrug transporters and antibiotic resistance in Lactococcus lactis. Biochim Biophys Acta/Bioenergetics **1555(1)**:1-7

POOLE, K. (2005). Efflux-mediated antimicrobial resistance. J Antimicrob Chemother **56**:20-51

POSTMA, P. W., LENGELER, J. W., JACOBSON, G. R.. (1993). Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. Microbiol. Rev. **57:**543–594.

PUECH, V., *et al.* (2001). Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non-covalently bound lipids in the barrier and fracture plane. Microbiology **147**:1365-1382

PUTMAN, M., VAN VEEN, H., W., KONINGS, W., N. (2000). Molecular Properties of Bacterial Multidrug Transporters. Microbiol and Mol Biol Rev. **64(4)**:672-693

RAHERISON, S., GONZALEZ, P., RENAUDIN, H., CHARRON, A., BEBEAR, C., BEBEAR, C., M. (2005). Increased Expression of Two Multidrug Exporter-Like Genes Is Associated with Ethidium Bromide And Ciprofloxacin Resistance in *Mycoplasma hominis*. Antimicrob. Agents Chemother. **49(1)**: 421-424

REID, S., J., ABRATT, V., R. (2005) Sucrose utilization in bacteria: genetic organisation and regulation. Appl Microbiol Biotechnol **67**:312-312

RHEE, J., S., PAN, J., G., AHN, J., H. (November 2001). ABC transporter gene cluster in *pseudomonas fluorescens* for enhanced lipase secretion. U.S. Patent 6329172

REST, R. F., D. C. ROBERTSON. (1974). Glucose transport in *Brucella abortus*. J. Bacteriol. **118:**250–258.

ROCKHILL, R., C., SUMARMO, HADIPUTRANTO, H., SIREGAR, S. P., MUSLIHUN, B. (1982). Tetracycline Resistance of *Corynebacterium diphtheria* Isolated from Diphtheria Patients in Jakarta, Indonesia. Antimicrob. Agents Chemother. **21(5)**842-843

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

SCHÄGGER, H. & VON JAGOW, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelelectrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal. Biochem. **166**, 368-379.

SCHÖNERT, S., SEITZ, S., KRAFFT, H., FEUERBAUM, E., A., ANDERNACH, I., WITZ, G., DAHL, M., K. (2006). Maltose and Maltodextrin utilization in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **188(11)**:3911-22

SCHÜTZ, A., *et al.* (2003). Studies on structure-function relationships of indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae,* a key enzyme of the indole acetic acid pathway. Eur. J. Biochem. **270:**2322-2331

SINGH, P. *et al.* (2006). The paradox of pyrazinamide: an update on the molecular mechanisms of pyrazinamide resistance in Mycobacteria. J. Commun. Dis. 38(3):288-98

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

STEPHAN, J., MAILAENDER, C., ETIENNE, G., DAFFE, M., NIEDERWEIS, M., (2004). Multidrug Resistance of a Porin Deletion Mutant of *Mycobacterium smegmatis*. Antimicrob. Agents Chemother. **48(11)**:4163-4170

STENTZ, R., ZAGOREC, M. (1999). Ribose utilization in *Lactobacillus sakei*: analysis of the regulation of the rbs operon and putative involvement of a new transporter. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. **1(1)**:165-173

STEWART, J., B., MERMODSON, M., A. (2003). Topology of RbsC, the Membrane Component of the *Escherichia coli* Ribose Transporter. J. Bacteriol. **185(17)**:5234-39

STUDIER, F. W., ROSENBERG, A. H., DUNN, J. J. & DUBENDORFF, J. W. (1990). Use of T7 polymerase to direct expression of cloned genes. Methods Enzymol. **185**: 60-89.

TALEBI, F., (September 2008). Cola Beverages, WIPO Pat. Appl. WO/2008/112844

TANAKA, Y., OKAI, N., TERAMOTO, H., INUI, M., YUKAWA, H. (2008). Regulation oft he expression of phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system (PTS) genes in *Corynebacterium glutamicum* R. Microbiology **154**:264-274

TAUCH, A., GÖTKER, S., PÜHLER, A., KALINOWSKI, J., THIERBACH, G. (2002). The 27.8-kb R-plasmid pTET3 from *Corynebacterium glutamicum* encodes the aminoglycoside adenyltransferase gene cassette *aadA9* and the regulated tetracycline efflux system Tet 33 flanked by active copies of the widespread insertion sequence IS*6100*. *Plasmid* **48**: 117-129

TRÖTSCHEL, C., DEUTENBERG, D., BATHE, B., BURKOVSKI, A., KRÄMER, R. (2005). Characterization of Methionine Export in *Corynebacterium glutamicum*. J. Bacteriol. **187(11)**:3786-3794

TRÖTSCHEL *et al*. (2003). GltS, the sodium-coupled L-glutamate uptake system of *Corynebacterium glutamicum*: identification of the corresponding gene and impact on L-glutamate production. Appl. Microbiol. Biotechnol. **60(6):** 738-742

VAN WYK, P., J., ACKERMAN, L., G., (**April 1990)**. 3-(1-amino-1,3-dicarboxy-3-hydroxy-but-4-yl)-indole compounds, U.S. Patent 4975298

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

WEHRMANN, A., MORAKKABATI, S., KRÄMER, R., SAHM, H., EGGELING, L. (1995). Functional Analysis of Sequences Adjacent to dapE of *Corynebacterium glutamicum* Reveals the Presence of aroP, Which Encodes the Aromatic Amino Acid Transporter. J. Bacteriol. **177**: 5991-5993

WONG, T.-Y. (1990). Possible Mechanism of Mannose Inhibition of Sucrose-Supported Growth in N_2-Fixing *Azotobacter vinelandii*. Appl. Environ. Microbiol. **56(1)**:93-97

YUKAWA, H., et al. (2007). Comparative analysis of the *Corynebacterium glutamicum* group and complete genome sequence of strain R. Microbiology **153**:1042-1058

ZACZEK, A., BRZOSTEK, A., AUGUSTYNOWICZ-KOPEC, E., ZWOLSKA, Z., DZIADEK, J. (2009). Genetic evaluation of relationship between mutations in rpoB and resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to rifampin. BMC Microbiology **9**:10

ZEMAN *et al.* (1990). Enzyme synthesis of L-Tryptophane. Folia Microbiol. **35**:200-4

Erklärung

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

Es liegen keine Teilpublikationen vor.

Datum: Köln, April, 2009 Unterschrift:

Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Krämer für die Möglichkeit danken, in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren. Ich danke ihm auch für die Bereitstellung der drei unterschiedlichen und gerade deswegen spannenden Themen. Dies gewährte mir einen breiten Einblick in die Welt der Bakterien. Es gab mir auch die Möglichkeit, mich weiterzuentwickeln und an meinen Softskills zu feilen. Ich möchte mich auch für die Ausflüge und die Retreats bedanken, bei denen ich immer viel Spaß hatte und auch viel gelernt habe.

Ich danke Herrn Prof. Flügge für die Übernahme des Koreferats.

Ein ganz besonderer Dank geht natürlich an Kay, der mich in der ganzen Zeit immer wieder mit seinen vielen Ideen motiviert hat. Von seinem unerschöpflichen Optimismus und seinen steten konstruktiven Widerworten habe ich sehr viel gelernt.

Liebe Arbeitsgruppe, bei euch bedanke ich mich für das enorm gute Klima während der ganzen drei Jahre. Ich habe mich immer sehr wohl gefühlt und bin nicht zuletzt wegen euch immer gerne zur Arbeit gekommen. Ich erinnere mich gerne an die 80er-Parties, die Singstar- und Wii-Abende, das Frisbee-Spielen auf der Wiese, die Laborausflüge, die Retreats, die zahlreichen Kaffee-Pausen, die Abende in der Oase, den Ausflug nach Stockholm und und und. Ich habe viele besondere Menschen in diesem Arbeitskreis kennengelernt, und ich hoffe, dass der Kontakt mit diesen nicht abbricht.

Für einen abwechslungsreichen Ausgleich neben der Arbeit danke ich unter anderem meinen Nachbarn Philipp und Mira und dem Jazzchor der Uni Köln, aber ganz besonders Marcus, der alle Höhen und Tiefen dieser Arbeit mitgemacht hat und mich immer aufgebaut und ermuntert hat. Besonders danke ich ihm dafür, dass er mir gezeigt hat, was es alles noch neben der Arbeit gibt.

Und natürlich geht ein ganzes großes Dankeschön an meine Eltern, die mich immer unterstützt und an mich geglaubt haben. Egal wohin ich auch gehe, ich werde niemals vergessen, woher ich kam.

Lebenslauf

Name:	*Bettine Boltres*
Adresse:	*Moltkestr. 33,*
	50674 Köln,
Tel.Nr. :	*0221-2720184*
e-mail:	*bboltres@uni-koeln.de*
Geburtsdatum:	*14.06.1980*
Nationalität:	*Deutsch*
Familienstand:	*ledig*

Dez. 2005 – Juni 2009 Promotion an der Universität zu Köln am Institut für Biochemie zum Thema „Untersuchungen zum Export von Metaboliten und Xenobiotika in *Corynebacterium glutamicum*“ in der Arbeitsgruppe von Prof. Krämer

Mai 2005 – Nov. 2005 praktische Arbeit im Bereich humane Zellkultur/ Stammzellforschung/Neurologie am Institut für molekulare Neurobiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Jan. 2005 – April 2005 Weltreise

July 2004 – Dez. 2004 Diplomarbeit an der Goethe-Universität Frankfurt am Main zum Thema „Konstruktion einer Knockout-Mutante von Cyclophilin A1 in *Streptomyces lividans*“ in der Arbeitsgruppe von Prof. Engels

Okt. 1999 – Dez. 2004 Studium der Chemie an der Goethe-Universität Frankfurt am Main; Abschluss: Diplom

Aug. 1990 – Juni 1999 Besuch des Lessing-Gymnasiums in Frankfurt am Main; Abschluss: Abitur

Aug. 1987 – July 1990 Besuch der Heinrich-Seliger-Grundschule in Frankfurt am Main

Aug. 1986 – July 1987 Besuch der Robert-Schumann-Grundschule in Frankfurt am Main