

**Identifikation und Charakterisierung  
von bakteriellen  
Carbonsäure-Transportern**

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

**Stephanie Huhn**  
aus Kirchen

Köln 2011



**Berichterstatter:**

Professor Dr. Reinhard Krämer

Professor Dr. Karin Schnetz

Tag der Disputation 30.01.2012



### **Kurzzusammenfassung**

*Escherichia coli* und *Corynebacterium glutamicum* sind wichtige Modellorganismen für die biotechnologische Produktion von Aminosäuren und organischen Säuren. In beiden Organismen kommt es zur Verwertung von Carbonsäuren, aber auch zur Exkretion dieser im Lauf von Produktionsverfahren. Während der bakterielle Stoffwechsel von Carbonsäuren weitestgehend verstanden ist, ist deren Import und Export nur in wenigen Fällen geklärt.

Ziel dieser Arbeit war es, genauere Kenntnisse über bakterielle Carbonsäure-Transporter zu erlangen. Dabei sollte der Pyruvatimport in *E. coli* identifiziert und beschrieben werden, sowie der Succinatexport in *C. glutamicum* eingehend charakterisiert werden.

Um den Pyruvatimporter zu identifizieren wurde eine Transposonmutagenese mit anschließender Selektion auf Bromopyruvat, einem toxischen Pyruvatanalogon, etabliert. Weiterhin wurden durch radioaktive Aufnahmemessungen und Wachstumsexperimente die Kandidaten YhjE und AnsP als potentielle Pyruvatimporter eingegrenzt. Für YhjE konnte die Rolle als Bromopyruvatimporter direkt bestätigt werden. Als weiterer Kandidat wurde der TRAP Transporter YiaMNO untersucht, dessen Inaktivierung ebenfalls eine Verringerung der Pyruvataufnahmeaktivität ergab. Damit wird in *E. coli* der Pyruvatimport von einer Vielzahl von Transportern katalysiert, die durch nachfolgende Experimente im Detail biochemisch charakterisiert werden können.

Die Identifikation des Succinatexporters SucE in *C. glutamicum* erfolgte mit Hilfe eines bioinformatischen Ansatzes, der den Vergleich von Proteinsequenzen der Succinatproduzenten *Actinobacillus succinogenes* und *Mannheimia succiniciproducens* mit denen aus *C. glutamicum* umfasste. Es wurde ein Transportsystem identifiziert, dessen Inaktivierung eine signifikant geringere Exkretion von Succinat zur Folge hatte. Durch die biochemische Charakterisierung konnte die Funktion als Importsystem ausgeschlossen und die Funktion als Exportsystem bestätigt werden. Damit wurde der erste bakterielle Exporter für Succinat erfolgreich identifiziert.

## Abstract

*Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* are important model organisms for the biotechnological production of amino acids and organic acids. During production processes both organisms utilize and also excrete carboxylates. While the bacterial carboxylate metabolism is well understood, import and export of carboxylates have not been studied in detail.

Getting an increased knowledge of the bacterial carboxylate transport was the aim of this study. Therefore the pyruvate import system of *E. coli* as well as the succinate export system of *C. glutamicum* should be identified and characterized.

For the identification of the pyruvate import of *E. coli* transposon mutagenesis, followed by a screening on the toxic pyruvate analogon bromopyruvate was established. Two candidates YhjE and AnsP have been identified as putative pyruvate import systems by measurements with radioactive labeled pyruvate and growth experiments. The function of YhjE as a bromopyruvate import system has been confirmed. As additional candidate, the TRAP transporter YiaMNO has been investigated and the inactivation of this caused a decrease of the pyruvate uptake rate as well. Therefore the pyruvate import of *E. coli* is catalyzed by a multiplicity of transport systems, which could be biochemically characterized in detail in following experiments.

The identification of the succinate exporter SucE of *C. glutamicum* was achieved using a bioinformatic approach, which enclosed the comparison of protein sequences of the succinate producing bacteria *Actinobacillus succinogenes* and *Mannheimia succiniciproducens* with sequences of *C. glutamicum*. A transport system could be identified, whose inactivation showed a significant decrease of succinate excretion. By biochemical characterization the function of SucE as an import system could be excluded and the function as an export system could be confirmed. Therefore the first bacterial succinate export system has been successfully identified.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	Biotechnologische Produktion von Carbonsäuren .....	1
1.2	Bedeutung von Carbonsäuren im bakteriellen Stoffwechsel .....	4
1.3	Carbonsäure-Transport in Prokaryoten .....	7
1.4	Ziele der Arbeit .....	11
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>12</b>
2.1	Bakterienstämme und Plasmide .....	12
2.1.1	Bakterienstämme .....	12
2.1.2	Plasmide .....	15
2.1.3	Oligonukleotide .....	17
2.2	Nährmedien und Kultivierungsbedingungen.....	19
2.2.1	Vollmedien .....	19
2.2.2	Minimalmedien.....	19
2.2.3	Antibiotika .....	20
2.2.4	Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung.....	20
2.2.5	Herstellung von Gradientenplatten.....	20
2.2.6	Kultivierung in Mikrotiterplatten .....	21
2.3	Molekularbiologische Methoden .....	21
2.3.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen und Transformation .....	21
2.3.2	Herstellung kompetenter <i>C. glutamicum</i> Zellen und Transformation ...	22
2.3.3	Isolierung von genomischer DNA aus <i>E. coli</i> und <i>C. glutamicum</i> .....	23
2.3.4	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....	24
2.3.5	Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA aus Agarosegelen. .....	24
2.3.6	Isolierung von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i> und <i>C. glutamicum</i> .....	25
2.3.7	Restriktion und Ligation von DNA .....	25
2.3.8	Sequenzierung von DNA .....	25
2.3.9	Transposonmutagenese .....	25
2.3.10	Konstruktion von Deletionsmutanten .....	26
2.3.11	<i>Bacterial two hybrid</i> -System .....	26
2.4	Biochemische Methoden .....	27
2.4.1	Aufnahme radioaktiv markierter Carbonsäuren.....	27
2.4.2	Dünnschichtchromatographie .....	29
2.4.3	High performance liquid chromatography (HPLC)-Analyse .....	29
2.4.4	Tryptophan-Fluoreszenzmessungen.....	30
2.5	Synthese von 2,3-Diketo-L-Gulonat.....	30
2.6	Proteinbiochemische Methoden .....	30
2.6.1	Synthese von Proteinen.....	30
2.6.2	Membranpräparation.....	31
2.6.3	Aufreinigung von Proteinen mittels Affinitätschromatographie .....	31
2.6.4	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford .....	32
2.6.5	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese .....	32
2.6.6	Coomassie-Färbung .....	32
2.6.7	Immunologischer Nachweis von Proteinen mittels Western Blot .....	32
2.7	Bioinformatische Ansätze .....	33

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>34</b>
3.1	Import von Pyruvat in <i>E. coli</i> .....	34
3.1.1	Etablierung eines Selektionssystems.....	34
3.1.2	Biochemische Charakterisierung des Pyruvatimporters.....	36
3.1.3	Identifikation von putativen Pyruvatimportsystemen .....	40
3.1.4	Identifikation von <i>cra</i> .....	47
3.1.5	Biochemische Charakterisierung der putativen Pyruvatimporter.....	50
3.1.6	Komplementation von $\Delta yhjE$ .....	55
3.1.7	Identifikation und Untersuchung des TRAP Transporters YiaMNO.....	57
3.2	Biochemische Charakterisierung des Pyruvatimporters aus <i>C. glutamicum</i> 61	
3.3	Identifikation des Succinatexporters SucE aus <i>C. glutamicum</i> .....	63
3.3.1	Bioinformatischer Ansatz zur Identifikation potentieller Succinatexporter .....	63
3.3.2	Biochemische Charakterisierung von SucE .....	64
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>69</b>
4.1	Carbonsäure-Import .....	69
4.1.1	In <i>E. coli</i> sind mehrere Transporter am Pyruvatimport beteiligt.....	69
4.1.2	YhjE ist zusätzlich am Import von Bromopyruvat beteiligt.....	72
4.1.3	Für die Charakterisierung von YiaMNO und AnsP sind weitere biochemische Untersuchungen notwendig.....	73
4.1.4	Die <i>cra</i> -abhängige Regulation der Gluconeogenese könnte für die biotechnologische Produktion genutzt werden.....	75
4.1.5	Pyruvataufnahmesystem MctCB aus <i>C. glutamicum</i> .....	77
4.2	Carbonsäure-Export .....	78
4.2.1	SucE ist der erste identifizierte bakterielle Carbonsäure-Exporter .....	78
4.2.2	Neben SucE gibt es weitere Succinatexporter .....	80
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>82</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>84</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ADP	Adenosine-5'-diphosphate
AHT	Anhydrotetracyclin
Amp <sup>R</sup>	Resistenz gegen Ampicillin
APC	<i>Amino acid/polyamine/organocation superfamily</i>
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chloro-3-Indolylphosphat-p-Toluidinsalz
BHI	Brain-Heart-Infusion
BSA	Rinderserumalbumin
Cam <sup>R</sup>	Resistenz gegen Chloramphenicol
CCCP	Carbonylcyanid- <i>m</i> -chlorphenylhydrazon
cpm	Zerfälle pro Minute
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
<i>et al.</i>	und andere
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside
Kan <sup>R</sup>	Resistenz gegen Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
LB	Luria-Bertani
MCC	Methylcitrat-Zyklus
n	Anzahl der Replikate
NAD(H)	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP(H)	Nicotinamidadenindinukleotid-phosphat
NBT	p-Nitrotetrazoliumblauschlorid

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEP	Phosphoenolpyruvat
PTS	Phosphotransferase System
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Spec <sup>R</sup>	Resistenz gegen Spectinomycin
Tab.	Tabelle
TCA	Tricarbonsäure-Zyklus
TG	Trockengewicht
V <sub>max</sub>	Maximale Geschwindigkeit
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	<i>E. coli</i> MG1655 bzw. <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032

# 1 Einleitung

## 1.1 Biotechnologische Produktion von Carbonsäuren

Ein Ausgangsstoff für die Produktion zahlreicher Chemikalien ist Rohöl. Aufgrund der Endlichkeit dieser fossilen Reserven, der steigenden Rohölpreise und der Umweltschädlichkeit dieser Methoden werden biobasierende Produktionen von Chemikalien immer interessanter (Willke, 1995; Willke und Vorlop, 2004). In den letzten Jahren ist diese Art der Produktion von Chemikalien immer stärker angestiegen. Die Produktion erfolgt dabei mit Bakterien, Hefen, filamentösen Pilzen oder pflanzlichen Zellen (Hatti-Kaul *et al.*, 2007; Sauer *et al.*, 2007).

Zu den wichtigsten Modellorganismen für die Produktion von Aminosäuren und organischen Säuren zählen *Escherichia coli* und *Corynebacterium glutamicum*.

*E. coli* wird zur industriellen Produktion von Aminosäuren wie z.B. L-Lysin, L-Tryptophan oder L-Threonin, sowie zur Produktion einer Reihe von pharmakologisch relevanten Proteinen, wie beispielsweise Insulin eingesetzt. *E. coli* wurde 1885 entdeckt und beschrieben (Escherich, 1885). Es handelt sich um ein stäbchenförmiges, fakultativ anaerobes, Gram-negatives und durch peritriche Begeißelung bewegliches Bakterium. Es gibt zahlreiche pathogene Stämme, die Lebensmittelvergiftungen, Harnwegs- und Darmentzündungen sowie Sepsis oder Neugeborenen-Meningitis hervorrufen können (Riley *et al.*, 1983; Everett *et al.*, 1948; Bonacorsi und Bingen, 2005). Für die biotechnologische Produktion und Forschung werden apathogene Stämme verwendet, wie beispielsweise *E. coli* K12. Die geringe Generationszeit von 20 min und die ausgiebige Erforschung seiner Physiologie und Genetik machen dieses Bakterium zum bestuntersuchten Modellorganismus der Molekularbiologie.

Neben *E. coli* ist *C. glutamicum* ein weiterer bedeutender Mikroorganismus, insbesondere für die biotechnologische Herstellung von Aminosäuren. Dabei werden mit Hilfe optimierter Produktionsstämme vor allem L-Glutamat und L-Lysin fermentativ hergestellt (Leuchtenberger, 2005; Eggeling und Sahm, 1999). Das apathogene Bodenbakterium *C. glutamicum* wurde 1957 als natürlicher Glutamat-Produzent aus einer Bodenprobe isoliert und charakterisiert (Kinoshita *et al.*, 1957; Abe *et al.*, 1967). Es handelt sich um ein unbewegliches, nicht-sporenbildendes, Gram-positives keulenförmiges Bakterium. Zusammen mit den pathogenen

Vertretern *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium leprae* zählt *C. glutamicum* zu den mycolsäurehaltigen Actinomyceten (Stackebrandt *et al.*, 1997; Minnikin, 1982).

Für die biotechnologische Produktion von unterschiedlichen Chemikalien werden optimierte Bakterienstämme verwendet. Um höhere Produktionsraten zu erreichen ist vor allem die Optimierung der Synthese und deren Regulation interessant. Auch der Export des Produktes spielt eine wichtige Rolle für die Produktion. Durch die Überexpression des Exporters erfolgt ein verstärkter Export, wodurch eine Akkumulation des Produktes verhindert wird. Dadurch kann ein möglicher negativer Effekt auf die Synthese des Produktes verhindert werden. Aber auch die Wiederaufnahme bereits ausgeschiedener Produkte kann die Produktionsrate senken. Daher kann durch Inaktivierung der oder des Importer/s dieser sogenannte *futile cycle* verhindert werden (Burkovski und Krämer, 2002).

Carbonsäuren finden hauptsächlich in der Lebensmittel-, pharmazeutischen- und chemischen Industrie Verwendung. Dabei werden sie als Lebensmittelzusatzstoffe oder Arzneimittel eingesetzt. Zudem sind sie wichtige Ausgangsstoffe für die chemische Industrie. Succinat wird beispielsweise als Tensid und Chelator verwendet, sowie als Zusatzstoff in der Lebensmittel- und Pharmaindustrie. Zudem wird Succinat als Ausgangsstoff für 1,4-Butandiol, eine Vorstufe eines biologisch abbaubaren Kunststoffes, Ethylen-diamin-disuccinat, ein biologisch abbaubarer Chelator, Adipinsäure, eine Vorstufe von Nylon, sowie einige andere eingesetzt (Zeikus *et al.*, 1999; Bozell und Petersen, 2009). Zurzeit wird Succinat hauptsächlich chemisch hergestellt. Es gibt zahlreiche Bakterien und Pilze, die Succinat ausscheiden, aber nur wenige produzieren genug für eine eventuelle biotechnologische Anwendung (Song und Lee, 2006; McKinlay *et al.*, 2007). Succinat ist ein wichtiges metabolisches Intermediat im Pansen von Wiederkäuern. Aus diesem konnten einige natürliche Succinatproduzenten isoliert werden wie z.B. *Actinobacillus succinogenes* und *Mannheimia succiniciproducens*, die für eine biotechnologische Produktion von Succinat vorgeschlagen wurden. (McKinlay *et al.*, 2007).

Unter anaeroben Bedingungen scheidet auch *C. glutamicum* Succinat aus (Inui *et al.*, 2004). Mit einem *C. glutamicum* Stamm, der keine Lactat-Dehydrogenase besitzt und zudem die Pyruvat-Carboxylase überexprimiert, konnte eine Ausbeute von

1,2 mol Succinat/mol Glucose erreicht werden. Diese liegt damit 3-4fach über der, die unter aeroben Bedingungen mit einem speziellen *E. coli*-Stamm erzielt werden konnte (Wendisch *et al.*, 2006). Die Succinatproduktionen unter anaeroben Bedingungen erreicht bislang höhere Ausbeuten als die Produktion unter aeroben Bedingungen (Wendisch *et al.*, 2006). Allerdings hat solch eine anaerobe Produktion auch einige Nachteile, so ist beispielsweise das Substratspektrum, das eine optimale Redoxbalance bietet, gering (San *et al.*, 2002). Zudem können viele anaerobe Produzenten nur in Komplexmedien, aber nicht in Minimalmedium wachsen (Lee *et al.*, 2001), was sowohl die Produktionskosten erhöht als auch die Reinigung des Produkts erschwert (McKinlay *et al.*, 2007). Für *C. glutamicum* konnte mit BL-1/pAN6-*pyc*<sup>P458S</sup>*ppc* ein Stamm konstruiert werden, der Succinat unter aeroben Bedingungen in Minimalmedium produziert (Litsanov *et al.*, 2011). Der Stamm BL-1/pAN6-*pyc*<sup>P458S</sup>*ppc* besitzt eine Inaktivierung des Gens *sdhCAB* und ist nicht mehr fähig, Succinat zu Fumarat zu oxidieren, außerdem sind die Gene *pqo*, *cat* und *pta-ackA* ausgeschaltet, die Enzyme der Acetatbildung codieren. Zudem werden in diesem Stamm die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (*ppc*) und die Pyruvat-Carboxylase (*pyc*) überexprimiert (Litsanov *et al.*, 2011). Mit diesem Stamm konnte eine Ausbeute von 0,45 mol Succinat/mol Glucose und mit 1,6 mmol g<sup>-1</sup> (cdw) h<sup>-1</sup> die höchste spezifische Produktivität, die bisher für eine aerobe Succinatproduktion erreicht wurde, erzielt werden (Litsanov *et al.*, 2011). Damit ist auch *C. glutamicum* ein interessanter Kandidat für die biotechnologische Produktion von Succinat.

Für die Produktion von Pyruvat wurden in den letzten Jahren einige Stämme konstruiert, mit denen eine immer höhere Ausbeute an Pyruvat erzielt werden konnte. Pyruvat wird als Ausgangsstoff einiger industriell hergestellter Aminosäuren wie L-Tryptophan, L-Tyrosin und L-Dihydroxyphenylalanin verwendet (Li *et al.*, 2001a). Die klassische Herstellung von Pyruvat erfolgt durch Dehydrierung und Decarboxylierung von Traubensäure in Anwesenheit von Kaliumhydrogensulfat bei 220°C (Howard und Fraser, 1932). Dieses Verfahren ist sehr energieaufwendig und erzielt nur eine geringe Ausbeute von 0,5 mol Pyruvat/mol Traubensäure. Daher wurden in den letzten zwei Jahrzehnten alternative biotechnologische Verfahren zur Herstellung von Pyruvat beschrieben (Li *et al.*, 2001a, Zelić *et al.*, 2003; Gerharz, 2003). So kann beispielsweise mit vitaminuxotrophen Hefe-Stämmen, durch Fermentationen eine maximale Ausbeute von 1,2 mol Pyruvat/mol Glucose erzielt werden. Durch die Limitierung der Vitamine kann eine Verringerung des Pyruvat-

Dehydrogenase-Komplexes hervorgerufen werden und es kommt zur Ausscheidung von Pyruvat (Li *et al.*, 2001a). Mit dem Stamm *E. coli* YYC202*ldhA::kan* konnte mittels Fed-Batch-Fermentationen sogar eine Ausbeute von 1,78 mol Pyruvat/mol Glucose erreicht werden. *E. coli* YYC202*ldhA::kan* besitzt Mutationen in einigen Genen und ist nicht mehr fähig Pyruvat zu Acetyl-CoA (*aceEF*), Acetat (*poxB*), Formiat (*pflB*), Phosphoenolpyruvat (*pps*) und Lactat (*ldhA*) umzusetzen (Sahm *et al.*, 2004; Bott *et al.*, 2001; Gerharz *et al.*, 2001; Zelić *et al.*, 2003).

Die Carbonsäuren Lactat und Citrat werden heute sogar hauptsächlich biotechnologisch hergestellt (Sauer *et al.*, 2007). Citrat wird als Lebensmittelzusatzstoff verwendet. Die Produktion von Citrat erfolgt mit dem Fadenpilz *Aspergillus niger* (Berovic und Legisa, 2007; Papagianni, 2007). Lactat wird als Lebensmittelzusatzstoff, sowie für die Produktion von Polymeren eingesetzt. Hergestellt wird diese Carbonsäure mit *Lactobacillus*-Stämmen und alternativ mit dem Fadenpilz *Rhizopus oryzae* (Maas *et al.*, 2006).

Für eine Erhöhung der biotechnologischen Produktionsrate von Carbonsäuren sind genaue Kenntnisse über deren Stoffwechsel und Transport in und aus der Zelle unerlässlich.

### 1.2 Bedeutung von Carbonsäuren im bakteriellen Stoffwechsel

*E. coli* und *C. glutamicum* können auf unterschiedlichen Substraten wie Kohlenhydraten, Carbonsäuren, Aminosäuren sowie Alkoholen wachsen. Voraussetzung dafür ist das Vorhandensein von Importsystemen und entsprechenden Enzymen bzw. geeigneten Stoffwechselwegen.

Bei Wachstum auf Glucose erfolgt die Aufnahme von Glucose über das Phosphoenolpyruvat:Zucker Phosphotransferase System (PTS), diese wird während der Glykolyse zu Pyruvat umgesetzt (Postma *et al.*, 1993). Pyruvat ist ein zentrales Intermediat im zellulären Stoffwechsel und an zahlreichen anabolen und katabolen Stoffwechselwegen beteiligt (Sauer und Eikmanns, 2005). Bei Wachstum auf Glucose wird Pyruvat vorwiegend durch den Pyruvat-Dehydrogenase-Multienzymkomplex decarboxyliert und dabei der erhaltene Acetylrest an Coenzym A gebunden (de Kok *et al.*, 1998). Das so gebildete Acetyl-CoA wird anschließend über den TCA-Zyklus zu CO<sub>2</sub> oxidiert.

Pyruvat kann unter anaeroben Bedingungen auch durch die Lactatdehydrogenase (LdhA) zu Lactat reduziert werden (Bunch *et al.*, 1997). *E. coli* kann zudem unter anaeroben Bedingungen Ethanol und Formiat bilden. Dazu wird das aus Pyruvat gebildete Acetyl-CoA zunächst zu Acetaldehyd und dieses schließlich zu Ethanol mit Hilfe der Alkohol-Dehydrogenase reduziert. Bei der Bildung von Formiat wird Pyruvat durch die Pyruvat-Formiat-Lyase zu Formiat und Acetyl-CoA umgesetzt (Knappe und Sawers, 1990), *C. glutamicum* fehlt dagegen dieses Enzym (Inui *et al.*, 2004). Außerdem ist Pyruvat in beiden Organismen eine Ausgangssubstanz der Fettsäure- und Aminosäurebiosynthese, wobei die Aminosäuren Alanin, Valin, Leucin und Isoleucin über Pyruvat gebildet werden (Sauer und Eikmanns, 2005).

Für die Nutzung von Carbonsäuren als C-Quellen müssen diese zunächst über die entsprechenden Importsysteme in die Zellen gelangen und anschließend über die jeweiligen Stoffwechselwege, hauptsächlich mit Hilfe des Tricarbonsäure (TCA)-Zyklus, umgesetzt werden. Bei Wachstum auf Acetat, Fettsäuren, Ethanol oder TCA-Zyklus-Intermediate ist die Gluconeogenese der Ausgangspunkt. Dabei ist die Verbindung zwischen Glykolyse/Gluconeogenese und TCA-Zyklus durch den Phosphoenolpyruvat-Pyruvat-Oxalacetat Weg gegeben. Unter Glykolyse-Bedingungen werden die Endprodukte der Glykolyse Phosphoenolpyruvat und Pyruvat durch die Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA und durch die Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat zu Oxalacetat in den TCA-Zyklus geschleust. *C. glutamicum* kann zudem Pyruvat zu Oxalacetat carboxylieren, dies ist in *E. coli* nicht möglich (Peters-Wendisch *et al.*, 1998). Unter Gluconeogenese-Bedingungen werden die TCA-Zyklus-Intermediate Oxalacetat zu Phosphoenolpyruvat und Malt zu Pyruvat decarboxyliert, womit die Ausgangsstoffe der Gluconeogenese geliefert werden. *E. coli* ist zudem in der Lage mit Hilfe der Phosphoenolpyruvat-Synthetase Pyruvat zu Phosphoenolpyruvat umzusetzen (Sauer *et al.*, 2005).

Der Glyoxylat-Zyklus stellt eine weitere anaplerotische Reaktion des TCA-Zyklus dar. Dabei wird Isocitrat nicht wie im TCA-Zyklus decarboxyliert sondern in Succinat und Glyoxylat gespalten. Succinat wird zu Oxalacetat oxidiert und Glyoxylat mit Acetyl-CoA zu Malat kondensiert. Damit wird die Nutzung von Acetat, als einzige C-Quelle möglich (Clark und Cronan, 1996).

Die Nutzung von Propionat als C-Quelle wird durch den Methylcitrat (MCC)-Zyklus ermöglicht (Textor *et al.*, 1997; Claes *et al.*, 2002). Dabei wird zunächst Propionat zu Propionyl-CoA und schließlich zusammen mit Oxalacetat zu Pyruvat und Succinat

# EINLEITUNG

umgesetzt. Das Wachstum auf Lactat wird durch das Enzym Lactatdehydrogenase (LldD) ermöglicht, was die Oxidation von Lactat zu Pyruvat katalysiert.

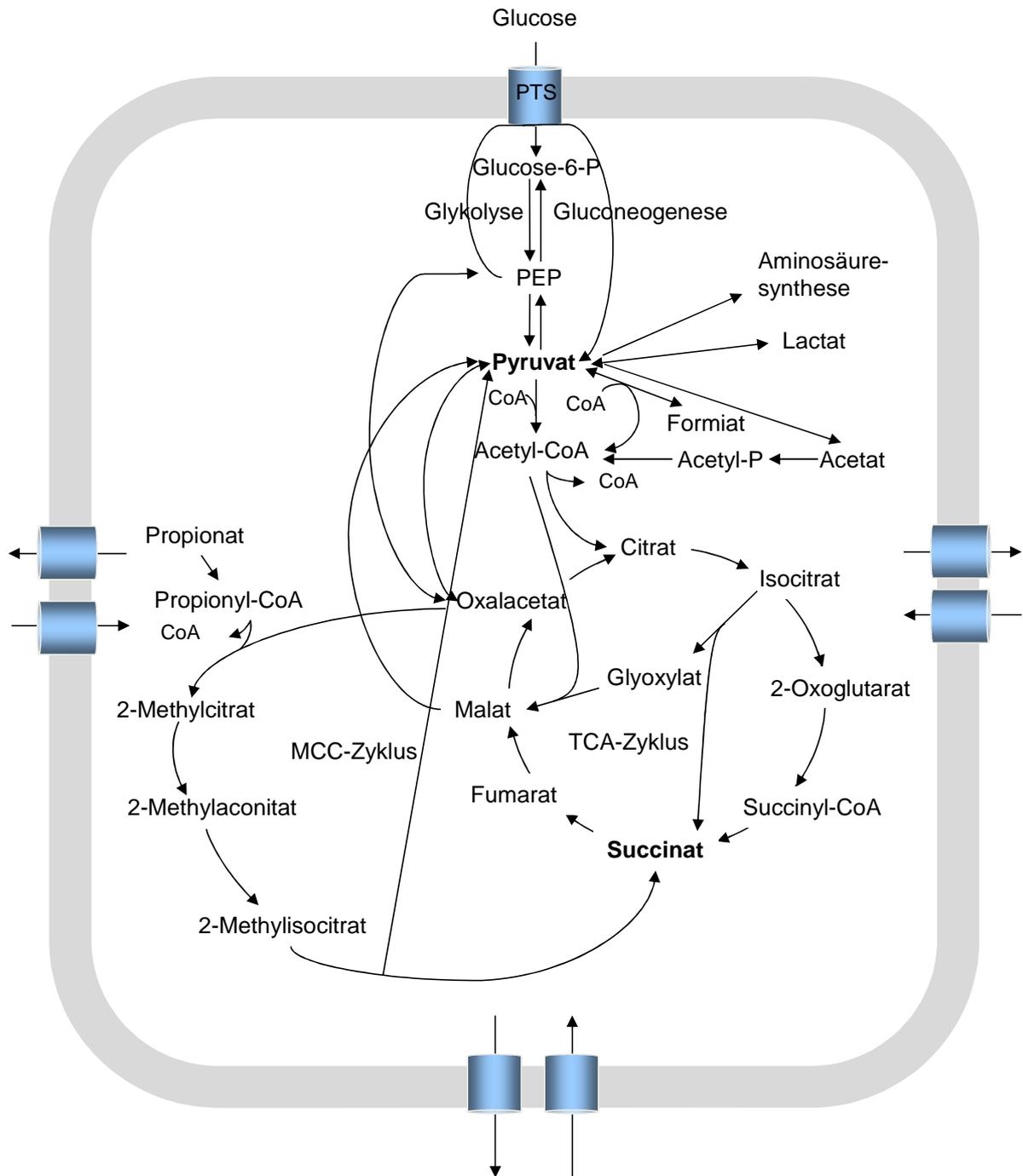


Abb. 1: Carbonsäure-Stoffwechsel in *C. glutamicum* und *E. coli*, wobei die Zusammenhänge der Glykolyse, des Tricarbonsäure (TCA)- Zyklus, des Glyoxylatzyklus und des Methylcitrat (MCC)-Zyklus gezeigt sind. In blau sind Import- und Exportsysteme dargestellt.

Während der Stoffwechsel von Carbonsäuren in zahlreichen Bakterien sehr gut untersucht ist, ist über deren Transport bislang nur wenig bekannt.

### 1.3 Carbonsäure-Transport in Prokaryoten

Unterschiedliche Mechanismen ermöglichen der Zelle die Aufnahme oder den Export von Substraten. Dabei unterscheidet man generell zwei proteinvermittelte Mechanismen, den passiven und aktiven Transport. Zum passiven Transport mittels Poren oder Carrier zählt die erleichterte Diffusion, die entlang eines Konzentrationsgradienten verläuft. Der aktive Transport benötigt dagegen eine Energiequelle. Dabei wird zwischen primär- und sekundär aktiven Transportern sowie der Gruppentranslokation mittels Phosphotransferase-System (PTS) unterschieden. Diese PTS Systeme sind unter anderem am Import von Zuckern beteiligt. Als Energiequelle dient dabei Phosphoenolpyruvat, dessen Phosphatgruppe durch die sogenannte Gruppentranslokation, über mehrere Proteine auf den importierten Zucker übertragen wird (Postma *et al.*, 1993). Zu den primär aktiven Transportsystemen zählen die Ionen-ATPasen und die ABC-Transporter. Beide gewinnen durch die Hydrolyse von ATP Energie für den Transport. ABC Transporter bestehen aus zwei Transmembranproteinen, die den Transportweg durch die Membran bilden, und zwei Nucleotidbindeproteine, die ATP binden und hydrolysieren. Zudem besitzen ABC Transporter ein Substratbindeprotein, das die Substratspezifität vermittelt. Ein sehr gut untersuchter ABC Transporter ist das Maltoseaufnahmesystem MalFGK<sub>2</sub> aus *E. coli* (Bordignon *et al.*, 2010).

Sekundär aktive Transportsysteme nutzen dagegen Energie aus dem elektrochemischen Gradienten des Cosubstrates, welches meistens H<sup>+</sup>- oder Na<sup>+</sup>-Ionen sind. Dabei kann der Transport des Substrats entweder in entgegengesetzte Richtung (Antiport) oder in gleiche Richtung (Symport) mit den Cosubstrat erfolgen. Ein Beispiel für solch einen Symporter stellt LacY aus *E. coli* dar, der Lactose zusammen mit H<sup>+</sup> Ionen transportiert (Viitanen *et al.*, 1986).

Die sogenannten *tripartite ATP-independent periplasmic* (TRAP) Transporter stellen eine besondere Gruppe dar. Es handelt sich dabei um sekundär aktive Transporter, die aus drei Komponenten bestehen: einem Substratbindeprotein und zwei Transmembrandomänen unterschiedlicher Größe, wobei die größere Untereinheit den Transport über die Membran katalysiert. Die Funktion der kleineren Untereinheit

ist dagegen nicht bekannt. TRAP Transporter nutzen, wie sekundär aktive Transporter, den elektrochemischen Gradienten des Cosubstrates als Energiequelle und wie primär aktive ABC Transporter besitzen sie zur Substraterkennung ein Substratbindeprotein (Abb. 2) (Rabus *et al.*, 1999; Kelly und Thomas, 2001; Mulligan *et al.*, 2010,).

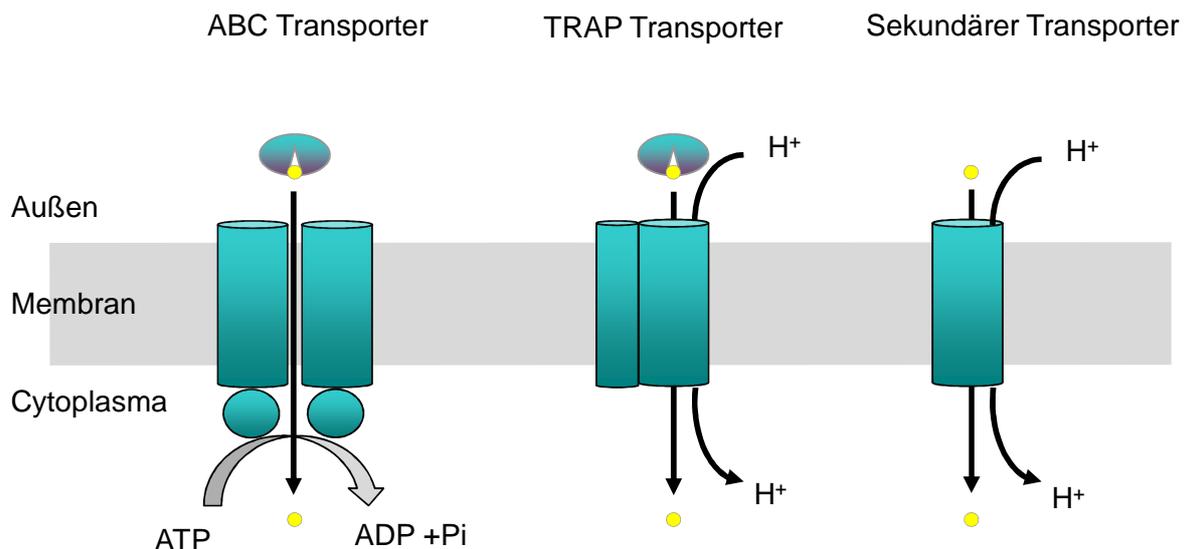


Abb. 2: Vergleich von TRAP Transportern mit den primär aktiven ABC Transportern und den sekundär aktiven Transportern. Das Substrat ist in gelb dargestellt (nach Kelly und Thomas, 2001).

*C. glutamicum* besitzt 236 vorgeschlagene Transportproteine, davon sind 128 sekundär aktive- und 91 primär aktive Transporter-Komponenten, jeweils sechs, zählen zu den Phosphotransferase Systemen bzw. Ionenkanälen. *E. coli* besitzt insgesamt 354 vorgeschlagene Transportproteine von denen 235 sekundär aktive - und 74 primär aktive Transporter-Komponenten sind. Zudem besitzt *E. coli* 13 Ionenkanäle und 29 Phosphotransferase System Komponenten (TransportDB). Damit besitzen beide Organismen eine ähnliche Aufteilung der Transportproteine in die unterschiedlichen Transportertypen.

In Bakterien sind am Transport von Aminosäuren, neben einigen primär aktiven Transportern, hauptsächlich sekundär aktive Transportsysteme beteiligt (Marin und Krämer, 2007). In *C. glutamicum* und *E. coli* konnten bislang bereits zahlreiche Aminosäuretransporter identifiziert und charakterisiert werden. So sind in *C. glutamicum* beispielsweise der ABC Transporter GluABCD und der sekundär

aktive Transporter GltS am Import von L-Glutamat beteiligt (Kronmeyer *et al.*, 1995, Trötschel *et al.*, 2003).

Im Gegensatz zu Aminosäure-Transportern ist über Carbonsäure-Transporter in Bakterien bislang nur wenig bekannt. Neben einem aktiven Transport spielt auch die Diffusion der protonierten Form durch die Cytoplasmamembran eine Rolle. Es konnte für einige Carbonsäuren neben aktiven Aufnahmesystemen auch eine Aufnahme durch Diffusion nachgewiesen werden (Janausch *et al.*, 2001). So spielt bei der Aufnahme von Propionat und Acetat in *C. glutamicum*, neben der aktiven Aufnahme durch das Aufnahmesystem MctCB, auch die Diffusion eine Rolle (Jolkver, 2008; Jolkver *et al.*, 2009).

Die C<sub>4</sub>-Dicarbonsäure-Transporter sind die am besten untersuchten Carbonsäure-Transporter. Aufgrund von Übereinstimmungen in den Proteinsequenzen können diese in die folgenden fünf Familien eingeteilt werden: *dicarboxylate-transport* DctA-, *dicarboxylate-uptake* DcuAB-, DcuC-, CitT- und die TRAP- Familie. Dabei ist die DctA Familie eine Untergruppe der *dicarboxylate/amino acid:cation symporter* (DAACS). Die Mitglieder der DctA Familie sind am Import von C<sub>4</sub>-Carbonsäuren unter aeroben Bedingungen beteiligt (Janausch *et al.*, 2002). DcuAB Familienmitglieder katalysieren den Austausch, Import und teilweise auch den Export von C<sub>4</sub>-Carbonsäuren unter anaeroben Bedingungen (Janausch *et al.*, 2002). Mitglieder der DcuC Familie ähneln denen der DcuAB Familie. Sie katalysieren den Austausch, den Import und Export von C<sub>4</sub>-Dicarbonsäure unter anaeroben Bedingungen (Zientz *et al.*, 1996). So wird in *E. coli* Fumarat, Succinat und L-Malat unter aeroben Bedingungen durch DctA aufgenommen und unter anaeroben Bedingungen erfolgt die Aufnahme durch DcuA, DcuB, DcuC oder DcuD (Janausch *et al.*, 2001). CitT aus *E. coli* katalysiert den Citrat:Succinat Antiport und ermöglicht somit das Wachstum von *E. coli* auf Citrat unter anaeroben Bedingungen (Pos *et al.*, 1998). In *C. glutamicum* sind DccT und DctA am Import von Succinat, Fumarat und Malat beteiligt. DccT ist ein Na<sup>+</sup>-abhängiger sekundär aktiver Transporter und zählt zur *divalent anion/Na<sup>+</sup> symporter* (DASS) Familie. DctA gehört zur DAACS Familie und ist ein H<sup>+</sup>-abhängiger sekundär aktiver Transporter (Youn *et al.*, 2008; 2009).

Zudem sind einige TRAP Transporter an der Bindung oder am Import von Carbonsäuren beteiligt. Der TRAP Transporter DctPQM aus *Rhodobacter capsulatus* ist beispielsweise an der Bindung von Pyruvat, Oxobutyrat, Oxovalerat, Oxomethylvalerat, Oxoisovalerat und Oxoisocaproensäure beteiligt (Thomas *et al.*,

2006). TakPQM aus *Rhodobacter sphaeroides* besitzt ein ähnliche Substratspektrum wie DctPQM und bindet Pyruvat, Oxobutyrat, Oxovalerat und Oxomethylvalerat (Gonin *et al.*, 2007). Auch der TRAP Transporter TRAPT aus Cyanobacterium *Anabaena* sp strain PCC7120 ist am Import von Pyruvat beteiligt (Pernil *et al.*, 2010). Neben den genannten TRAP Transportern konnte auch ein sekundär aktiver Transporter, der am Import von Pyruvat beteiligt ist, identifiziert und charakterisiert werden. Dabei handelt es sich um den sekundär aktiven Transporter MctCB, der das elektrochemische Protonenpotential als treibende Kraft nutzt (Jolkver *et al.*, 2009). Dieses Transportsystem besteht aus zwei Komponenten, einer großen Untereinheit, MctC, die den Transport über die Membran katalysiert und einer kleinen Untereinheit, MctB, dessen Funktion bislang unbekannt ist (Abb. 3). Dabei besteht MctC wahrscheinlich aus 13 Transmembrandomänen, für MctB wurden dagegen nur zwei Transmembrandomänen vorhergesagt. MctCB weist strukturelle Ähnlichkeit zu Transportern der *Solute:Sodium Symporter* (SSS) Familie auf und transportiert neben Pyruvat auch die Carbonsäuren Acetat und Propionat (Jolkver *et al.*, 2009).

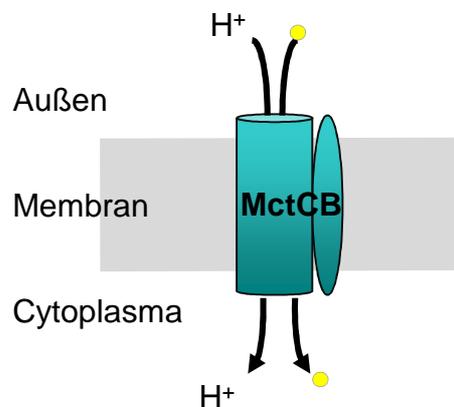


Abb. 3: MctCB aus *C. glutamicum*, ein Aufnahmesystem für Pyruvat, Propionat und Acetat.

ActP aus *E. coli* ist ein Transportprotein, das MctCB ähnlich ist. Auch dies besteht aus zwei Komponenten, einer großen Untereinheit ActP, auch als YjcG bekannt und einer kleinen Untereinheit, die als YjcH bezeichnet wird. ActP importiert, im Gegensatz zu MctCB, nur Acetat und Propionat, nicht aber Pyruvat (Gimenez *et al.*, 2003).

Da für *C. glutamicum* und *E. coli* auch der Export von Acetat, Pyruvat, Lactat und Succinat gezeigt werden konnte, wird auch vermutet, dass entsprechende Exportsystem vorhanden sein müssen (Inui *et al.*, 2004; Okino *et al.*, 2005). Bislang konnten allerdings keine bakteriellen Carbonsäure-Exporter identifiziert werden.

### 1.4 Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit sollten die bisher gewonnenen Kenntnisse über bakterielle Carbonsäure-Transporter erweitert werden. Von wesentlichem Interesse war hierbei die Identifikation und Charakterisierung des Pyruvataufnahmesystems in *E. coli* und die Charakterisierung des Succinatexporters in *C. glutamicum*.

Für die Identifikation des Pyruvatimporters in *E. coli* sollte zunächst ein Selektionssystem etabliert werden. Dazu sollte eine Transposonmutagenese mit anschließender Selektion in Anwesenheit des toxischen Pyruvatanalogon Bromopyruvat angewendet werden. Inwiefern die auftretenden Mutanten am Pyruvatimport beteiligt sind sollte mit Hilfe von physiologischen und biochemischen Methoden untersucht werden.

Weiterhin sollte das Succinatexportsystem (SucE) in *C. glutamicum* charakterisiert werden. Dabei sollte mit Hilfe von biochemischen Untersuchungen die Beteiligung von SucE am Export von Succinat geklärt werden. Zudem war geplant die Beteiligung dieses Transportsystems am Import von Succinat mit Hilfe von physiologischen und biochemischen Methoden zu untersuchen.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Kenntnisse über den Pyruvatimport in *E. coli* und den Succinatexport in *C. glutamicum* können für die Optimierung von Stämmen für die biotechnologische Produktion der jeweiligen Carbonsäure genutzt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Bakterienstämme und Plasmide

#### 2.1.1 Bakterienstämme

In der nachfolgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*- und *C. glutamicum*- Stämme, sowie relevante Eigenschaften aufgelistet.

Tab. 1: Verwendete *E. coli*- und *C. glutamicum*-Stämme

Stamm	Eigenschaft	Referenz
<b><i>E. coli</i></b>		
MG1655	K12-Wildtyp $\lambda^-$ F <sup>-</sup> <i>rph-1</i>	Blattner <i>et al.</i> , 1997
DH5 $\alpha$ <i>mcr-</i>	$\lambda^-$ <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 deoR</i> $\Delta$ ( <i>lacIZYA argF</i> )U169 $\Phi$ 80 $\Delta$ <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mmr hsdRMS mcrBC</i> )	Grant <i>et al.</i> , 1990
BL21	F <sup>-</sup> <i>gal dcm ompT hsdS</i> ( $r_B^- m_B^-$ )	Studier <i>et al.</i> , 1986
BTH101	F <sup>-</sup> , <i>cya-99, araD139, galE15, galK16, rpsL1, hsdR2, mcrA1, mcrB1</i>	Landant <i>et al.</i> , 1999
BTH101_pKT25_ <i>mctB+</i> pUT18_ <i>mctC</i>	BTH101 mit den Plasmiden pKT25_ <i>mctB</i> und pUT18_ <i>mctC</i>	Diese Arbeit
BTH101_pKNT25_ <i>mctB+</i> pUT18_ <i>mctC</i>	BTH101 mit den Plasmiden pKNT25_ <i>mctB</i> und pUT18_ <i>mctC</i>	Diese Arbeit
DH5 $\alpha$ _pKESK18	DH5 $\alpha$ mit dem Plasmid pKESK18	Diese Arbeit
$\Delta$ <i>ansP::Kan</i>	F <sup>-</sup> , $\Delta$ ( <i>araD-araB</i> )567, $\Delta$ <i>lacZ</i> 4787( $::rrnB-3$ ), $\lambda^-$ , $\Delta$ <i>ansP</i> 745( $::kan$ ), <i>rph-1</i> , $\Delta$ ( <i>rhaD-rhaB</i> )568, <i>hsdR</i> 514	Baba <i>et al.</i> , 2006
$\Delta$ <i>yhjE::Kan</i>	F <sup>-</sup> , $\Delta$ ( <i>araD-araB</i> )567, $\Delta$ <i>lacZ</i> 4787( $::rrnB-3$ ), $\lambda^-$ , $\Delta$ <i>yhjE</i> 778( $::kan$ ), <i>rph-1</i> , $\Delta$ ( <i>rhaD-rhaB</i> )568, <i>hsdR</i> 514	Baba <i>et al.</i> , 2006
$\Delta$ <i>ybjE::Kan</i>	F <sup>-</sup> , $\Delta$ ( <i>araD-araB</i> )567, $\Delta$ <i>lacZ</i> 4787( $::rrnB-3$ ), $\lambda^-$ , $\Delta$ <i>ybjE</i> 775( $::kan$ ), <i>rph-1</i> , $\Delta$ ( <i>rhaD-rhaB</i> )568, <i>hsdR</i> 514	Baba <i>et al.</i> , 2006
$\Delta$ <i>yiaM</i>	F <sup>-</sup> , $\Delta$ ( <i>araD-araB</i> )567, $\Delta$ <i>lacZ</i> 4787( $::rrnB-$	Baba <i>et al.</i> , 2006

## MATERIAL UND METHODEN

	3), $\lambda^-$ , $\Delta yiaM760::kan$ , $rph-1$ , $\Delta(rhaD-rhaB)568$ , $hsdR514$	
$\Delta yiaN$	F <sup>-</sup> , $\Delta(araD-araB)567$ , $\Delta lacZ4787(::rrnB-3)$ , $\lambda^-$ , $\Delta yiaN761::kan$ , $rph-1$ , $\Delta(rhaD-rhaB)568$ , $hsdR514$	Baba <i>et al.</i> , 2006
$\Delta yiaO$	F <sup>-</sup> , $\Delta(araD-araB)567$ , $\Delta lacZ4787(::rrnB-3)$ , $\lambda^-$ , $\Delta yiaO762::kan$ , $rph-1$ , $\Delta(rhaD-rhaB)568$ , $hsdR514$	Baba <i>et al.</i> , 2006
$\Delta ansP$	WT mit Deletion des Gens <i>ansP</i>	Diese Arbeit
$\Delta yhjE$	WT mit Deletion des Gens <i>yhjE</i>	Diese Arbeit
$\Delta ybjE$	WT mit Deletion des Gens <i>ybjE</i>	Diese Arbeit
$\Delta yhjE\_pKESK22$	$\Delta yhjE$ mit Expressionsplasmid pKESK22	Diese Arbeit
$\Delta yhjE\_pKESK22\_ybjE$ - Flag	$\Delta yhjE$ mit Expressionsplasmid pKESK22_ <i>ybjE</i> -Flag	Diese Arbeit
WT_pKESK22	WT mit Expressionsplasmid pKESK22	Diese Arbeit
WT_pKESK22_ <i>yhjE</i> -Flag	WT mit Expressionsplasmid pKESK22_ <i>yhjE</i> -Flag	Diese Arbeit
WT_pKD4_ <i>ansP</i>	WT mit Plasmid pKD4_ <i>ansP</i>	Diese Arbeit
WT_pKD4_ <i>yhjE</i>	WT mit Plasmid pKD4_ <i>yhjE</i>	Diese Arbeit
WT_pKD4_ <i>ybjE</i>	WT mit Plasmid pKD4_ <i>ybjE</i>	Diese Arbeit
BL21_pET52_ <i>yiaO</i>	BL21 mit Expressionsplasmid pET52b_ <i>yiaO</i>	Diese Arbeit
BL21_pASK-IBA3_ <i>mctB</i>	BL21 mit Expressionsplasmid pASK-IBA3_ <i>mctB</i>	Diese Arbeit
BL21_pASK-IBA3_ <i>mctC</i>	BL21 mit Expressionsplasmid pASK-IBA3_ <i>mctC</i>	Diese Arbeit
BL21_pASK-IBA5_ <i>mctB</i>	BL21 mit Expressionsplasmid pASK-IBA5_ <i>mctB</i>	Diese Arbeit
BL21_pMAL-p5X_ <i>mctB</i>	BL21 mit Expressionsplasmid pMAL-p5X_ <i>mctB</i>	Diese Arbeit
BL21_pMAL-p5X_ <i>mctC</i>	BL21 mit Expressionsplasmid pMAL-p5X_ <i>mctC</i>	Diese Arbeit
<b><i>C. glutamicum</i></b>		
ATCC13032	Wildtyp	Abe <i>et al.</i> , 1967
WT_1 <i>mctC</i>	pDrive Insertion in <i>mctC</i> , Kan <sup>R</sup>	Jolkver <i>et al.</i> , 2008

## MATERIAL UND METHODEN

WT_ <i>IsucE</i>	pDrive Insertion in <i>sucE</i> , Kan <sup>R</sup>	E. Jolkver
WT_pVWEx1_ <i>dccT</i>	WT mit dem Expressionsplasmid pVWEx1_ <i>dccT</i>	Youn <i>et al.</i> , 2008
WT_pXMJ19_ <i>sucE</i>	WT mit dem Expressionsplasmid pXMJ19_ <i>sucE</i>	E. Jolkver
WT_pXMJ19_ <i>mctB-S</i>	WT mit dem Expressionsplasmid pXMJ19_ <i>mctB-S</i>	E. Jolkver
WT_pXMJ19_ <i>S-mctB</i>	WT mit dem Expressionsplasmid pXMJ19_ <i>S-mctB</i>	E. Jolkver
WT_pXMJ19_ <i>H-mctB</i>	WT mit dem Expressionsplasmid pXMJ19_ <i>H-mctB</i>	E. Jolkver
WT_pXMJ19_ <i>H-mctC</i>	WT mit dem Expressionsplasmid pXMJ19_ <i>H-mctC</i>	E. Jolkver
WT_pXMJ19_ <i>S-mctC</i>	WT mit dem Expressionsplasmid pXMJ19_ <i>S-mctC</i>	E. Jolkver
WT_pEKEx2_ <i>mctC-S</i>	WT mit dem Expressionsplasmid pEKEx2_ <i>mctC-S</i>	E. Jolkver
WT_pEKEx2_ <i>H-mctC</i>	WT mit dem Expressionsplasmid pEKEx2_ <i>H-mctC</i>	E. Jolkver
WT_pEKEx2_ <i>mctB-S</i>	WT mit dem Expressionsplasmid pEKEx2_ <i>mctB-S</i>	E. Jolkver
WT_pEKEx2_ <i>H-mctB</i>	WT mit dem Expressionsplasmid pEKEx2_ <i>H-mctB</i>	E. Jolkver
WT_pEKEx2_GFP_ <i>mctB</i>	WT mit dem Expressionsplasmid pEKEx2_GFP_ <i>mctB</i>	Diese Arbeit
WT_pEKEx2_GFP_ <i>mctC</i>	WT mit dem Expressionsplasmid pEKEx2_GFP_ <i>mctC</i>	Diese Arbeit
WT_pEKEx3_ <i>mctB-S</i>	WT mit dem Expressionsplasmid pEKEx3_ <i>mctB-S</i>	E. Jolkver
WT_pEKEx3_ <i>S-mctB</i>	WT mit dem Expressionsplasmid pEKEx3_ <i>S-mctB</i>	E. Jolkver
WT_pEKEx3_ <i>H-mctC</i>	WT mit dem Expressionsplasmid pEKEx3_ <i>H-mctC</i>	E. Jolkver
WT_pEKEx3_ <i>H-mctB</i>	WT mit dem Expressionsplasmid pEKEx3_ <i>H-mctB</i>	E. Jolkver
WT_pEKEx3_ <i>S-mctC</i>	WT mit dem Expressionsplasmid	E. Jolkver

### 2.1.2 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tab. 2: Verwendete Plasmide

Plasmid	Eigenschaft	Referenz
pKD4	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , FRT Site-flankierte Kan-Kassette	Datsenko und Wanner, 2000
pKD4_ <i>yhjE</i>	pKD4 mit <i>yhjE</i> aus <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
pKD4_ <i>ansP</i>	pKD4 mit <i>ansP</i> aus <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
pKD4_ <i>ybjE</i>	pKD4 mit <i>ybjE</i> aus <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
pKD46	P <sub>araB</sub> <sup>-</sup> λ <sup>-</sup> Red Rekombinasesystem, temperatursensitiv, Amp <sup>R</sup> ,	Datsenko und Wanner, 2000
pCP20	FLP-Rekombinase, temperatursensitiv, Amp <sup>R</sup> , Cam <sup>R</sup>	Datsenko und Wanner, 2000
pKESK18	<i>miniTn10</i> , Temperatursensitiv, Cam <sup>R</sup>	Madhusudan <i>et al.</i> , 2005
pKESK22	<i>lacI<sup>f</sup></i> , P <sub>tac</sub> , Kan <sup>R</sup>	Stratmann <i>et al.</i> , 2008
pKESK22_ <i>yhjE</i> -Flag	pKESK22 mit <i>yhjE</i> aus <i>E. coli</i> und Flag-Tag	Diese Arbeit
pKETS11	<i>lacI<sup>f</sup></i> , P <sub>tac</sub> , Kan <sup>R</sup>	AG Prof. Schnetz, Univ. Köln
pKETS11 Genbank	Genbank aus <i>E. coli</i>	T. Stratmann
pET52b	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , Amp <sup>R</sup>	Qiagen, Hilden
pET52_ <i>yiaO</i>	pET52b mit <i>yiaO</i> aus <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
pASK-IBA3	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , Amp <sup>R</sup>	IBA GmbH, Göttingen
pASK-IBA3_ <i>mctB</i>	pASK-IBA3 mit <i>mctB</i> aus <i>C. glutamicum</i>	Diese Arbeit
pASK-IBA3_ <i>mctC</i>	pASK-IBA3 mit <i>mctC</i> aus <i>C. glutamicum</i>	E. Jolkver
pASK-IBA5	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , Amp <sup>R</sup>	IBA GmbH, Göttingen
pASK-IBA5_ <i>mctB</i>	pASK-IBA5 mit <i>mctB</i> aus <i>C. glutamicum</i>	E. Jolkver
pMAL-p5X	<i>lacI<sup>f</sup></i> , P <sub>tac</sub> , <i>malE</i> , Amp <sup>R</sup>	NEB, Frankfurt

## MATERIAL UND METHODEN

pMAL-p5X_ <i>mctB</i>	pMAL-p5X mit <i>mctB</i> aus <i>C. glutamicum</i>	Diese Arbeit
pMAL-p5X_ <i>mctC</i>	pMAL-p5X mit <i>mctC</i> aus <i>C. glutamicum</i>	Diese Arbeit
pKT25	$P_{lac}[cyaA-T25]$ , Kan <sup>R</sup>	Karimova <i>et al.</i> , 2005
pKNT25	$P_{lac}[cyaA-T25]$ , Kan <sup>R</sup>	Karimova <i>et al.</i> , 2005
pUT18	$P_{lac}[cyaA-T18]$ , Amp <sup>R</sup>	Karimova <i>et al.</i> , 2005
pUT18C	$P_{lac}[cyaA-T18]$ , Amp <sup>R</sup>	Karimova <i>et al.</i> , 2005
pKT25_ <i>zip</i>	$P_{lac}[cyaA-T25]$ [ <i>GCN4 leucine zip</i> ], Kan <sup>R</sup>	Karimova <i>et al.</i> , 2005
pUT18C_ <i>zip</i>	$P_{lac}[cyaA-T18]$ [ <i>GCN4 leucine zip</i> ], Amp <sup>R</sup>	Karimova <i>et al.</i> , 2005
pKT25_ <i>mctB</i>	pKT25 mit <i>mctB</i> aus <i>C. glutamicum</i>	Diese Arbeit
pUT18_ <i>mctC</i>	pUT18 mit <i>mctC</i> aus <i>C. glutamicum</i>	Diese Arbeit
pKNT25_ <i>mctB</i>	pKNT25 mit <i>mctB</i> aus <i>C. glutamicum</i>	Diese Arbeit
pDrive	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , <i>lacZ<math>\alpha</math></i>	Qiagen, Hilden
pDrive_ <i>lmctC</i>	pDrive mit internem Fragment von <i>mctC</i>	E. Jolkver
pDrive_ <i>lsucE</i>	pDrive mit internem Fragment von <i>sucE</i>	E. Jolkver
pXMJ19	$P_{tac}$ , <i>lacI<sup>q</sup></i> , Cam <sup>R</sup>	Jakoby <i>et al.</i> , 1999
pXMJ19_ <i>mctB</i> -S	pXMJ19 mit <i>mctB</i> und Strep-Tag	E. Jolkver
pXMJ19_ <i>S-mctB</i>	pXMJ19 mit <i>mctB</i> und Strep-Tag	E. Jolkver
pXMJ19_ <i>H-mctB</i>	pXMJ19 mit <i>mctB</i> und His-Tag	E. Jolkver
pXMJ19_ <i>H-mctC</i>	pXMJ19 mit <i>mctC</i> und His-Tag	E. Jolkver
pXMJ19_ <i>S-mctC</i>	pXMJ19 mit <i>mctC</i> und Strep-Tag	E. Jolkver
pXMJ19_ <i>dccT</i>	pXMJ19 mit <i>dccT</i> aus <i>C. glutamicum</i>	Diese Arbeit
pXMJ19_ <i>sucE</i>	pXMJ19 mit <i>sucE</i> aus <i>C. glutamicum</i>	E. Jolkver
pEKEx2	$P_{tac}$ , <i>lacI<sup>q</sup></i> , Kan <sup>R</sup>	Eikmanns <i>et al.</i> , 1991
pEKEx2_ <i>mctC</i> -S	pEKEx2 mit <i>mctC</i> und Strep-Tag	E. Jolkver
pEKEx2_ <i>H-mctC</i>	pEKEx2 mit <i>mctC</i> und His-Tag	E. Jolkver
pEKEx2_ <i>mctB</i> -S	pEKEx2 mit <i>mctB</i> und Strep-Tag	E. Jolkver
pEKEx2_ <i>H-mctB</i>	pEKEx2 mit <i>mctB</i> und His-Tag	E. Jolkver
pEKEx2_ <i>GFP-mctB</i>	pEKEx2 mit <i>mctB</i> aus <i>C. glutamicum</i>	Diese Arbeit

## MATERIAL UND METHODEN

	und GFP	
pEKEx2_GFP_mctC	pEKEx2 mit <i>mctC</i> aus <i>C. glutamicum</i> und GFP	Diese Arbeit
pEKEx3	<i>lacI<sup>f</sup></i> , <i>P<sub>tac</sub></i> , <i>Spec<sup>R</sup></i>	Rademacher, 2005
pEKEx3_mctB-S	pEKEx3 mit <i>mctB</i> und Step-Tag	E. Jolkver
pEKEx3_S-mctB	pEKEx3 mit <i>mctB</i> und Step-Tag	E. Jolkver
pEKEx3_H-mctC	pEKEx3 mit <i>mctC</i> und His-Tag	E. Jolkver
pEKEx3_H-mctB	pEKEx3 mit <i>mctB</i> und His-Tag	E. Jolkver
pEKEx3_S-mctC	pEKEx3 mit <i>mctC</i> und Step-Tag	E. Jolkver
pVWEx1	<i>Kan<sup>R</sup></i> , <i>lacI<sup>f</sup></i> , <i>P<sub>tac</sub></i>	Peters-Wendisch <i>et al.</i> , 2001
pVWEx1_dccT	pVWEx1 mit <i>dccT</i> aus <i>C. glutamicum</i>	Youn <i>et al.</i> , 2008

### 2.1.3 Oligonukleotide

In Tabelle 3 sind die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotid-Sequenzen aufgelistet.

Tab. 3: Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')
pET52_yiaO_for	CCATGGGGCAAATTACGCTCTGTAACCTAC
pET52_yiaO_rev	GGATCCGCTTGCACCTCATCCACGGC
pKESK22_yhjE_Flag_for	GCTCTAGAAGGATTATAAAGATGATGATGATAAAGCTAGCC AAGCAACAGCCACAAC
pKESK22_yhjE_Flag_rev	GCGGATCCTTACAACGACTGATGTGCGGTCTCATGG
ansP_for_Kontrolle	GCGATTCGTATTGCGCTGTAA
ansP_rev_Kontrolle	GCGTAGGATGCTGCGCCGATAG
yhjE_for_Kontrolle	GCCCCCTTTTTGCCTGATTTT
yhjE_rev_Kontrolle	GCACGCCTTATCCGGCCTACAA
ybjE_for_Kontrolle	GCTTGACACAAAACATGAT
ybjE_rev_Kontrolle	GCAATACTCTACTGCTCCTTATG
fruR_for_Kontrolle	GCATACCAGTACAATGGCTATG
fruR_rev_Kontrolle	GCCATATTGATGTCCAGTCCCG
pkd4_yhjE_for	ATGCAAGCAACAGCCACAACACTCGACCACGAGCAAGAAT ACACGCCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC

## MATERIAL UND METHODEN

pkd4_yhjE_rev	TTACAACGACTGATGTCGCGTCTCATGGGTCAGCAGCAGG GCGATTACATATGAATATCCTCCTTAG
pkd4_ybjE_for	ATGTTTTCTGGGCTGTTAATCATTCTGGTTCCCCTGATTGT GGGTTAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
pkd4_ybjE_rev	TTACGCAGAGAAAAAGGCGATGAGGATCGGCACTAACAGG CTAAGACATATGAATATCCTCCTTAG
pkd4_ansP_for	ATGAGTAAACACGACACCGACACTTCAGATCAACACGCCG CGAAACGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
pkd4_ansP_rev	TAACTCGCCGTTTCAGGCTTAAACACAATTCCTGTTTTTC TTCATCATATGAATATCCTCCTTAG
pKESK18_Kan3'	GCGTAATGGCTGGCCTGTTG
S116	TGGCACGACAGGTTTCCCGA
S150	CGACGGGATCAGTACCGACGG
S358	CGGTATCAACAGGGACACCAGGATTTATTTATTCT
S359	GCTCTAGAGATCATATGACAAGATGTGTATCCACCTTAACT
S361	GCTCTAGAGGCCACGCGTCGACTAGTAC
T333	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNNTCAG
pEKEx2_GFP_mctB_for	GCGGATCCAGGAGACCTTTTAATGCAGAACAATCACCCA GGGGC
pEKEx2_GFP_mctB_rev	GCGAATTCTTAACCTTCCATCTTCTGGCGAATAGC
pEKEx2_GFP_mctC_for	GCGGATCCAGGAGACCTTTTAATTCCAATTCTCCTTGCA CAAG
pEKEx2_GFP_mctC_rev	GCGAGCTCTTAGTGATCAACAGCCTTTTCAACACCG
pMAL-p5X_mctB_for	CGGGATCCGAAAACCTGTATTTTCAGGGCAATGCAGAACA AATCACCCAGGGGCGTCGC
pMAL-p5X_mctB_rev	GCAAGCTTTTTATTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAACCTTC CATCTTCTGGCGAATAGCAGCCTG
pMAL-p5X_mctC_for	CGGGATCCGAAAACCTGTATTTTCAGGGCAATTCCAATT CTCCTTGCAACAAGACGCT
pMAL-p5X_mctC_rev	GCAAGCTTTTTATTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAGTGATC AACAGCCTTTTCAACACCGACACC
pASK-IBA3_mctB_for	GCCTCGAGATGAAAATAAAAACAAATGCAGAACAATCACC CAGGGGC
pASK-IBA3_mctB_rev	GCCTGCAGACCTTCCATCTTCTGGCGAATAG
pKT25_mctB_for	GCGCTCTAGACAATGCAGAACAATCA
pKT25_mctB_rev	GCATCCCGGGATTAACCTTCCATCTTC
pKNT25_mctB_for	GCGCTCTAGACATGAATGCAGAACA
pKNT25_mctB_rev	ATATCCCGGGTACCTTCCATCTTCTG

## MATERIAL UND METHODEN

---

pUT18_mctC_for	GCGCTCTAGACATGAATTCCACTAT
pUT18_mctC_rev	ATATCCCGGGAGTGATCAACAGCCT
pUT18C_mctC_for	GCGCTCTAGACAATTCCACTATTCT
pUT18C_mctC_rev	ATATCCCGGGATTAGTGATCAACAGC
pXMJ19_dccT_for	GCGGATCCAGGAGACCTTTATGAGCACACCTGACATTAAG G
pXMJ19_dccT_rev	GCGAATTCTTAAAGCATGATGCCAAAGAGTGGGATC

---

## 2.2 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

### 2.2.1 Vollmedien

*E. coli* wurde im Vollmedium LB (Luria Bertani)-Medium nach Sambrook *et al.* (1989) kultiviert.

LB-Medium (1 l):

10 g Trypton, 5 g Hefe Extrakt, 10 g NaCl

Die Kultivierung von *C. glutamicum* erfolgte in BHI-Medium (Brain-Heart-Infusion; DIFCO/BD, Detroit, USA).

### 2.2.2 Minimalmedien

*E. coli* wurde im Minimalmedium M9 kultiviert.

M9-Medium (1l):

6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g NaCl, 0,5 g NH<sub>4</sub>Cl

Die Lösung wurde autoklaviert und danach die folgenden Substanzen sterilfiltriert zugegeben:

20 ml 20%ige Glukose (w/v), 3 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub>, 1 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>, 1 ml Biotin (1 mg/ml), 1 ml Thiamin (1 mg/ml) und 10 ml Spurenelementlösung (5 g EDTA (wird zuerst gelöst und der pH auf 7,5 eingestellt), 0,83 g FeCl<sub>3</sub> x 6 H<sub>2</sub>O, 84 mg ZnCl<sub>2</sub>, 13 mg CuCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O, 10 mg CoCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O, 10 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1,6 mg MnCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O)

Die Kultivierung von *C. glutamicum* erfolgte in MMI-Medium.

MMI-Medium (1l):

5 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 5 g Harnstoff, 2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

Es wurde ein pH von 7,0 mit NaOH eingestellt und die Lösung autoklaviert. Danach wurden die folgenden Substanzen sterilfiltriert zugefügt:

40 ml 50%ige Glukose (w/v), 1 ml 1% (w/v)  $\text{CaCl}_2$ , 1 ml 1 M  $\text{MgSO}_4$ , 1 ml 0,02% Biotin, und 1 ml Spurenelementlösung (1 g  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ , 1 g  $\text{MnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ , 0,1 g  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ , 0,021 g  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ , 2 mg  $\text{NiCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$  ad 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ).

Für die Kultivierung von Bakterien auf Voll- oder Minimalmedium-Agar wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar zugefügt.

### 2.2.3 Antibiotika

Wenn nicht anders angegeben wurden Antibiotika in den folgenden Konzentrationen eingesetzt: 100  $\mu\text{g/ml}$  Carbenicillin, 25  $\mu\text{g/ml}$  Kanamycin, 15  $\mu\text{g/ml}$  Chloramphenicol, 100  $\mu\text{g/ml}$  Spectinomycin.

### 2.2.4 Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte bei 37°C. *C. glutamicum* wurde dagegen bei 30°C kultiviert. Flüssigkulturen wurden bei 125 rpm geschüttelt, um eine gute Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Für die längerfristige Lagerung von Bakterienstämmen wurden stationäre Kulturen nach Herstellerangaben in Roti-Store Cryoröhrchen (Fa. Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe) überführt und bei -80°C gelagert.

### 2.2.5 Herstellung von Gradientenplatten

Die verwendeten Gradientenplatten aus Voll- oder Minimalmedium-Agar besaßen einen Konzentrationsgradienten einer bestimmten Substanz.

Zunächst wurde eine untere Schicht Agar keilförmig gegossen, dazu wurde die Petrischale schräg aufgestellt und der flüssige Agar eingefüllt. Nach Erstarren dieser Schicht wurde eine weitere Schicht flüssigem Agar hinzugefügt, diese enthielt die zu untersuchende Substanz in der gewünschten Konzentration. Das Einfüllen der letzten

Schicht erfolgte nicht in Schräglage. Die zu untersuchende Substanz diffundiert schließlich von der oberen in die untere Agar-Schicht und ein Konzentrationsgradient entsteht.

Die Gradientenplatten wurden mit 3 µl einer Zellsuspension der gewünschten Stämme im jeweiligen Voll- oder Minimalmedium beimpft. Es wurde eine OD<sub>600</sub> von 0,02 für *E. coli* und von 0,2 für *C. glutamicum* eingestellt.

### 2.2.6 Kultivierung in Mikrotiterplatten

Für die Kultivierung in Mikrotiterplatten wurden 96-*well* Mikrotiterplatten (Sarstedt, Newton, USA) verwendet. Jedes *well* enthielt insgesamt 200 µl Volumen, bestehend aus Medium und Zellsuspension. Es wurde eine OD<sub>600</sub> von 0,02 für *E. coli* und von 0,2 für *C. glutamicum* eingestellt. Um den Verlust an Flüssigkeit zu vermeiden wurden die Mikrotiterplatten mit einer gasdurchlässigen Membran (Diversified Biotech, Boston, USA) verschlossen. Die Kultivierung von *E. coli* in Mikrotiterplatten erfolgt im Plattenlesegeräte Infinite<sup>®</sup> M200 (Tecan, Männedorf, Schweiz) bei 37°C. Die OD<sub>600</sub>-Messung erfolgte automatisch alle 15 min, zuvor wurde die Mikrotiterplatte automatisch geschüttelt.

*C. glutamicum* wurde bei 30°C inkubiert und mit dem Schüttler Tit ramax 101 (Heidolph, Schwabach) geschüttelt, jede Stunde wurde die OD<sub>600</sub> mit dem Plattenlesegerät Infinite<sup>®</sup> M200 dokumentiert.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen und Transformation

Für die Herstellung von kompetenten *E. coli* Zellen wurde eine Vorkultur mit 5 ml LB-Medium für ca. 8 h bei 37°C inkubiert. Mit 1 ml dieser Kultur wurde 250 ml SOB-Medium beimpft und über Nacht bei 25°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen durch Zentrifugation (250 rpm, 5 min, 4°C) geerntet und in eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis gekühlt. Danach wurden die Zellen erneut zentrifugiert, in TB-Puffer resuspendiert und 1,4 ml DMSO hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen für 10 min auf Eis inkubiert, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

SOB-Medium (1l):

20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>

TB-Puffer (1l):

10 mM PIPES, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl

Es wurde mit KOH ein pH von 6,7 eingestellt und danach 55 mM MnCl<sub>2</sub> zugegeben und sterilfiltriert.

Für die schnelle Herstellung von kompetenten Zellen wurde 5 ml LB-Medium beimpft und für ca. 3 h bei 37°C inkubiert bis eine OD<sub>600</sub> von 0,3- 0,5 erreicht wurde. 1,5 ml dieser Kultur wurden zentrifugiert (11000 rpm, 1 min, 4°C) und in 400 µl eiskaltem TSS-Puffer resuspendiert. 100 µl davon wurde direkt für die Transformation verwendet.

TSS-Puffer (1l):

10 g Pepton, 10 g NaCl, 5 g Hefeextrakt, 5 % DMSO, and 20 mM MgSO<sub>4</sub>

Für die Transformation von kompetenten *E. coli* Zellen wurden 1-3 µl Plasmid-DNA zu 50 µl kompetenten Zellen gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 45 sec und eine erneute Inkubation auf Eis für 5 min. Anschließend wurden 400 µl LB-Medium zu den Zellen gegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurde danach zentrifugiert (11000 rpm, 1 min, 4°C) und in 50 µl LB-Medium resuspendiert und auf LB-Agar ausgestrichen und bei 37°C für ca. 16 h inkubiert.

### **2.3.2 Herstellung kompetenter *C. glutamicum* Zellen und Transformation**

Die Herstellung von kompetenten *C. glutamicum* Zellen erfolgte nach Liebl *et al.* (1989). Dazu wurde eine Vorkultur mit 20 ml LB-Medium mit 2 % Glucose für ca. 8 h bei 30°C inkubiert. Von dieser Kultur wurde eine Hauptkultur, bestehend aus LBI-Medium, auf eine OD<sub>600</sub> zwischen 0,2 und 0,3 angeimpft und für ca. 16 h bei 25°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen durch Zentrifugation (4000 rpm, 5 min, 4°C) geerntet und fünfmal mit eiskaltem 10%igem Glycerin gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 1 ml 10%igem Glycerin resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

LBI-Medium (1l):

10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, 25 g Glycin, 4 g Isonicotinsäurehydrazid, 0,1 % (v/v) Tween 80

Für die Transformation wurden 50µl kompetente *C. glutamicum* Zellen in eiskalte Elektroporationsküvetten (Biorad, München) überführt und 1-3 µl Plasmid-DNA zugegeben. Die Elektroporation erfolgte in einem Gene-Pulser (Bio-Rad, München) bei 2,5 kV, 600 Ω und 25 µF. Danach wurde 1 ml BHIS-Medium hinzugefügt und für 2 h bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurde danach zentrifugiert (4000 rpm, 2 min, 4°C), in 50 µl BHIS-Medium resuspendiert und auf BHI-Agar ausgestrichen und bei 30°C für ca. 16 h inkubiert.

BHIS-Medium (1l):

37 g BHI, 91 g Sorbitol

### **2.3.3 Isolierung von genomischer DNA aus *E. coli* und *C. glutamicum***

Die Isolierung genomischer DNA erfolgte mittels Phenol-Chloroform Extraktion. Dazu wurden 5 ml einer Über-Nacht-Kultur zentrifugiert (4000 x g, 5 min, 4°C) und anschließend das Pellet in 3 ml der B1-Lösung resuspendiert und 2 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden 400 µl 10%ige SDS-Lösung dazugegeben und vermischt. Nach 2 min wurden 5 mg Proteinase K zugegeben und für 2 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden 3 ml Phenol:Chloroform:Isoamyl-Alkohol-Mischung (25:24:1) zugegeben und vermischt. Nach anschließender Zentrifugation (4000 x g, 5 min, 4°C) wurde der Überstand in ein neue Gefäß überführt und mit 3 ml Ethanol vermischt. Die ausgefällte DNA wurde anschließend zentrifugiert (4000 x g, 25 min, 20°C) und das Pellet in 6 ml 70%igem Ethanol gewaschen und wiederum zentrifugiert (4000 x g, 5 min, 20°C). Das Pellet wurden dann mit 300 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und bei 4°C aufbewahrt.

B1-Lösung:

25 mM TRIS/HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA; 50 mM Glucose, 20 mg/ml Lysozym, 30 µg/ml RNase

### 2.3.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Amplifizierung von spezifischen DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion nach Mullis *et al.* (1986) durchgeführt. Dazu wurden zwei Primer verwendet, die das zu amplifizierende DNA-Fragment flankieren. Der PCR Ansatz bestand aus der zu amplifizierenden DNA-Sequenz (chromosomale DNA, Plasmid DNA oder eine Bakterienkolonie), jeweils 10 pmol Primer, dNTP's, *taq*- oder Phusion- Polymerase.

Für die Durchführung der PCR wurden die Thermocycler Mastercycler<sup>®</sup> personal (Eppendorf, Hamburg) oder FlexCycler (Analytikjena, Jena) verwendet. Die *annealing*-Temperatur wurde durch die Sequenz der Primer bestimmt, für ein Adenin oder Thymin wurden 2°C und für ein Cytosin oder Guanin wurden 4°C berechnet.

Das Standard-Amplifizierungsprogramm umfasst die folgenden Schritte:

94°C min

94°C 15 sec

*annealing*-Temperatur 15 sec

72°C 60 sec pro 1000 bp

72°C 10 min

4°C

Mit Hilfe der Software Sci. Ed. Central wurden die verwendeten Primer geplant und über Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen.

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

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden TAE-Agarosegele (40 mM TRIS, 0,5 mM EDTA, pH 7,5) mit einer Agarosekonzentration von 1 % eingesetzt und nach Sambrook *et al.* (1989) aufgetrennt. Als Größenstandard wurden 5 µl 1kb Ladder Marker (MBI Fermentas, St. Leon-Roth) eingesetzt. Nach der Gelelektrophorese wurden die Gele in einem Ethidiumbromidbad gefärbt und anschließend mit einem Image Master VDS (Amersham Biosciences, Freiburg) dokumentiert.

Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde mit dem NucleoSpin<sup>®</sup> Extract-II-Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben durchgeführt.

### **2.3.6 Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli* und *C. glutamicum***

Die Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli* und *C. glutamicum* wurde mit dem NucleoSpin® Plasmid QuickPure Miniprep Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Plasmid-Mini-Präparation aus *C. glutamicum* wurde dem Puffer A1 zusätzlich 15 mg/ml Lysozym zugefügt und die Probe für 30 min bei 37°C inkubiert.

### **2.3.7 Restriktion und Ligation von DNA**

Für die Restriktion von DNA wurden Restriktionsenzyme von New England Biolabs (Frankfurt/Main) oder MBI Fermentas (St. Leon-Roth) benutzt und nach den Angaben des Herstellers verwendet. Nach der Restriktion wurde die DNA mittels Agarose-Gelelektrophores aufgetrennt und mit dem NucleoSpin® Extract-II-Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben aus dem Gel isoliert.

Für die Ligation von geschnittenen DNA Fragmenten und Vektoren mit kompatiblen Überhängen wurde die T4-DNA-Ligase (Fermentas, St. Leon-Roth) nach Herstellerangaben verwendet.

Für die Ligation von PCR Produkten in den Vektor pDrive wurde das QIAGEN PCR Cloning Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Dieser Vektor besitzt 3'-terminale Thymin-Überhänge. Wird bei der PCR von DNA-Fragmenten die *Tag*-DNA-Polymerase verwendet so entstehen 3'-Adenin-Überhänge, so dass ist eine Ligation der Vektoren und der PCR-Fragmente möglich.

Das Verhältnis von Insert und linearisiertem Vektor im Ligationsansatz betrug 3:1.

### **2.3.8 Sequenzierung von DNA**

Die Sequenzierung von DNA Fragmenten wurde von GATC Biotech AG (Konstanz) durchgeführt. Dafür wurden ca. 30-100 ng/µl DNA und 10 pmol/µl Primer verwendet. Die anschließende Auswertung der erhaltenen DNA Sequenzen erfolgte mit der Software Sci. Ed. Central.

### **2.3.9 Transposonmutagenese**

Die Transposonmutagenese wurde eingesetzt um durch Selektion auf Bromopyruvat, dem toxischen Analogon von Pyruvat, putative Pyruvatimporter zu identifizieren. Dies

erfolgte nach Madhusudan *et al.* (2005). Dazu wurde das Plasmid pKESK18, welches ein mini-Tn10-Cam Transposon besitzt, in kompetente *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Bei 28°C wird die Expression der Transpoase gehemmt und das Plasmid wird repliziert. Ein Temperaturwechsel auf 42°C bewirkt, dass die Replikation des Plasmids gestoppt wird. Die Expression und damit die Integration der Transpoase ins Genom wird induziert. Nach der Transformation wurden die Zellen in 5 ml LB-Medium für 24 h bei 28°C inkubiert. 500 ml dieser Kultur wurden anschließend in 10 ml überführt und für 24 h bei 28°C inkubiert. Danach wurden die Zellen in Medium (M9-Medium mit 50 mM Glycerin oder LB) überführt und entweder erneut bei 30°C oder bei 42°C für 8-24 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Selektion auf M9-Agarplatten mit 50 mM Glycerin und 0,5 mM oder 1 mM Bromopyruvat.

Die Identifikation des Insertionslocus erfolgte mit Hilfe der *semi-random, two-step* PCR (ST-PCR) nach Chun *et al.* (1997) und anschließender Sequenzierung.

### **2.3.10 Konstruktion von Deletionsmutanten**

Die Herstellung von Deletionsmutanten in *E. coli* erfolgte nach Datsenko *et al.* (2000). Hier wurde zur Erstellung der Deletionskonstrukte das Plasmid pKD4 verwendet. Der Nachweis der Deletion erfolgte, wie bei Datsenko *et al.* (2000) angegeben, zunächst mittels PCR. Zur endgültigen Überprüfung wurde das PCR-Produkt sequenziert. Wurden in einem Deletionsstamm weitere Gene deletiert, so musste zunächst die pKD4-Kassette durch Transformation mit dem Plasmid pCP20 entfernt werden. Für die weitere Deletion wurden wie zu Beginn beschrieben vorgegangen.

### **2.3.11 Bacterial two hybrid-System**

Protein-Protein Interaktionen wurden mit Hilfe des Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid (BACTH) System Kit (Euromedex, Frankreich) untersucht.

Dieses System beruht auf der interaktionsvermittelten Rekonstitution der Adenylatzyklase-Aktivität in *E. coli*. Der katalytische Bereich der Adenylatzyklase von *Bordetella pertussis* besteht aus zwei komplementären Fragmenten, T18 und T25. Liegen diese Fragmente getrennt vor weisen sie keine Aktivität auf. Werden sie dagegen an interagierende Proteine gekoppelt dann werden auch T18 und T25

zusammengeführt und cAMP gebildet, welches an das catabolic activator protein (CAP) bindet. Der cAMP/CAP Komplex ist ein Transkriptionsregulator in *E. coli*, der auch die Expression der Gene des *lac* und *mal* operons auslöst. Somit können diese Bakterien Laktose oder Maltose als Kohlenstoffquelle nutzen, was auf Selektivmedien überprüft werden kann.

Die Gene, die die zwei zu untersuchenden Proteine codieren wurden in die Vektoren pKT25 oder pKNT25 mit dem T25 Fragment und pUT18 oder pUT18C mit dem T18 Fragment kloniert. Die zwei Plasmide wurden anschließend in kompetente BTH101 Zellen transformiert. Nach der Transformation wurden die Zellen auf den Indikator- oder Selektivmedium LB-X-Gal-Agar oder McConkey-Maltose-Agar aufgetropft und für 2 Tage bei 30°C inkubiert. Interagieren die zwei zu untersuchenden Proteine sollten rote Kolonien auf McConkey-Maltose-Agar und blaue Kolonien auf LB-X-Gal-Agar zu sehen sein.

## 2.4 Biochemische Methoden

### 2.4.1 Aufnahme radioaktiv markierter Carbonsäuren

Für die Aufnahmemessungen wurde zunächst eine Vorkultur von *E. coli* in LB - Medium und von *C. glutamicum* in BHI-Medium für ca. 8 h inkubiert. Davon wurde dann eine Kultur in M9- bzw. MMI-Medium beimpft und für ca. 16 h bei 37 °C bzw. 30°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde von dieser Kultur eine Hauptkultur, bestehend aus M9- bzw. MMI-Medium, auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 (*E. coli*) bzw. 2 (*C. glutamicum*) angeimpft und bis zur exponentielle Phase für ca. 3-5 h bei 37°C bzw. 30°C inkubiert. Die *E. coli* Zellen wurden dann dreimal mit M9-Medium gewaschen und in der gleichen Menge wieder resuspendiert. Die *C. glutamicum* Zellen wurden dreimal mit MES/TRIS Puffer gewaschen und in der gleichen Menge resuspendiert. Danach wurden die Bakteriekulturen auf eine OD<sub>600</sub> zwischen 2 und 3 eingestellt und bis zur Messung auf Eis gelagert. Für die Aufnahmemessung von radioaktivem Pyruvat wurden 2,2 ml *E. coli* Zellen in Reagensgläsern bei 37°C unter rühren inkubiert. Durch Zugabe von radioaktiv markiertem [<sup>14</sup>C]-Pyruvat (Perkin Elmer, Massachusetts), mit unterschiedlichen Endkonzentrationen, zu den Zellen wurde die Messung gestartet. Es wurden zu unterschiedlichen Zeiten 200 µl Proben entnommen auf Glasfaserfilter (Milipore, Eschborn) pipettiert. Mit einer

Vakuumfiltrationsanlage wurde die Flüssigkeit abgesaugt und die Zellen mit 5 ml 0,1 M LiCl gewaschen. Die Filter wurden dann in Scintillationsgefäße überführt und 3,8 ml Scintillationsflüssigkeit (Rotiszint, Roth) zugegeben. Die Radioaktivität der Proben wurde dann im Flüssig-Scintillationszähler (LS 6500, Beckman Instruments GmbH, München) bestimmt. Die Gesamtaktivität wurde durch die direkte Messung einer 200 µl-Probe ohne Filtration bestimmt. Mit Hilfe folgender Formel konnte dann die Aufnahme in Abhängigkeit der Substratkonzentration bestimmt werden:

$$\text{Aufnahme [nmol/ (mg TG)]} = \frac{\text{cpm}_{\text{Probe}} \times \text{Stoffmenge } [\mu\text{mol}]}{\text{cpm}_{\text{ges}} \times 0,36 \text{ [mg/ml]} \times \text{OD}_{600} \times \text{Probenv [ml]}}$$

$\text{cpm}_{\text{Probe}}$  = Zerfälle pro Minute in der filtrierten Probe

Stoffmenge = Stoffmenge im Probenvolumen [mol]

$\text{cpm}_{\text{ges}}$  = Gesamtzerfälle pro Minute (ungefilterte Probe)

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

$\text{OD}_{600}$  = optische Dichte der Kultur für die Messung

Probenv = Volumen der Probe [ml]

Die Messung der Akkumulation von radioaktivem Succinat und die *Pulse-Chase*-Experimente erfolgten unter anaeroben Bedingungen, dazu wurde eine hohe Zelldichte von ca.  $\text{OD}_{600}$  20 verwendet. Für die Messung wurden 3,5 ml *C. glutamicum* Zellen in Reagenzgläsern bei 30°C ohne rühren inkubiert. Durch Zugabe von radioaktiv markiertem [ $^{14}\text{C}$ ]-Succinat (Perkin Elmer, Massachusetts), mit unterschiedlichen Endkonzentrationen, zu den Zellen wurde die Messung gestartet. Für die *Pulse-Chase*-Experimente wurden die Zellen zunächst mit dem radioaktiv markierten [ $^{14}\text{C}$ ]-Succinat bis zum Fließgleichgewicht beladen. Anschließend wurde unmarkiertes Succinat im Überschuss zugefügt und der zweite Teil der Messung gestartet. Durch die Zugabe des unmarkierten Substrats im Überschuss wird die Aufnahme des markierten Substrates unterbunden, da das markierte Substrat so stark verdünnt ist, dass es zu keiner messbaren Aufnahme der markierten Substanz kommt. Der Export kann dann durch die Abnahme der akkumulierten radioaktiven Substanz gemessen werden (Quick *et al.*, 1999)

Es wurden zu unterschiedlichen Zeiten 200 µl Proben entnommen und diese in 800 µl MES/TRIS-Puffer verdünnt und auf Glasfaserfilter (Milipore, Eschborn) pipettiert.

Alles weitere erfolgte wie für die Messung von radioaktivem Pyruvat beschrieben.

MES/TRIS Puffer:

50 mM MES, 50 mM TRIS, 10 mM NaCl, 10 mM KCl, pH 8.0 mit HCl

### **2.4.2 Dünnschichtchromatographie**

Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie sollte die eventuelle Verstoffwechslung von radioaktiv markiertem [<sup>14</sup>C] Succinat in der Zelle überprüft werden. Dazu mussten die Zellen zunächst aufgeschlossen werden. Es wurden 400 µl Zellen entnommen und für 10 min bei 11000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde zunächst in 1 ml 80 % Ethanol resuspendiert und 2 h bei 65°C inkubiert und danach für 10 min im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurden die Zellen bei 14000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei 30°C eingetrocknet. Der eingetrocknete Überstand wurde schließlich mit 5 µl Wasser resuspendiert und auf eine Kieselgelplatte (Silica gel plates; Macherey und Nagel, Düren) aufgetragen und in der Entwicklungskammer in die mobile Phase (n-Butanol/Essigsäure/H<sub>2</sub>O [4:1:1, (v/v/v)]) getaucht. Danach wurden die Platten getrocknet und über Nacht auf „Storage Phosphor Imaging“ Platten (BAS-IP MP 2025, Fujifilm, Düsseldorf) inkubiert. Die Substratpunkte wurden anschließend mit Hilfe eines Phosphorimager (Fujifilm BAS-1800, Fujifilm, Düsseldorf) detektiert.

### **2.4.3 High performance liquid chromatography (HPLC)-Analyse**

Die Bestimmung der externen Konzentration von Succinat erfolgte mit Hilfe der HPLC (EliteLaChrom system, VWR, Darmstadt). Die Zellen wurden vom Medium durch Zentrifugation (13000 rpm, 20 min, 4°C) getrennt und der Überstand analysiert. Die Auftrennung erfolgte mit Hilfe einer 300x7.8 mm Nucleogel Sugar 810H (Macherey-Nagel, Düren), bei 40°C und einer Flussrate von 0,5 ml/min. Als mobile Phase wurde 0,01 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eingesetzt und mit einem UV-Detektor bei 210 nm und einem RI-Detektor detektiert.

### 2.4.4 Tryptophan-Fluoreszenzmessungen

Die Aminosäure Tryptophan ist ein intrinsisches Fluorophor, die in wässrigem Medium gegenüber einer apolaren Umgebung eine blauverschobene Fluoreszenz zeigt (Wimley und White, 2000). Eine Konformationsänderung der Substratbindetasche hat dementsprechend eine Veränderung des Tryptophan-Fluoreszenzemissionsspektrums zur Folge.

Die Tryptophan-Fluoreszenzmessung wurde in einem Lumineszenz Spektrometer (SLM Aminco, USA), mit einer Anregungswellenlänge von 291 nm und einer Emissionswellenlänge von 330 nm, durchgeführt. Für die Messungen wurden Quarzküvetten mit 1 ml Puffer (50mM TRIS/HCl, 200 mM NaCl, pH 7,5), 10 µl Protein und unterschiedliche Konzentrationen an potentiellen Substraten verwendet.

### 2.5 Synthese von 2,3-Diketo-L-Gulonat

Die Synthese von 2,3-Diketo-L-Gulonat erfolgte nach Kagawa (1962). Es wurde zunächst 3,7 g  $KIO_3$  in 50 ml Wasser gelöst und darin 8,9 g L-Ascorbinsäure gelöst. Diese braune Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und am nächsten Morgen wurde die entstandene klare Lösung mit N KOH auf pH 5 neutralisiert. Zu dieser Lösung wurden dann 800 ml kaltes Ethanol gegeben und der entstandene weiße Niederschlag wurde gefiltert. Der Filter wurde danach in einem Exikator eingetrocknet. Die anschließende chromatographische Überprüfung der Substanz wurde freundlicherweise von Prof. Marner von der Universität Köln durchgeführt.

### 2.6 Proteinbiochemische Methoden

#### 2.6.1 Synthese von Proteinen

Durch die Induktion der Genexpression erfolgte die Synthese von Proteinen. Dazu wurde eine Vorkultur mit LB- bzw. BHI-Medium beimpft und bei 37°C für ca. 16 h inkubiert. Danach wurde von dieser Kultur eine Hauptkultur, bestehend aus LB- bzw. BHI-Medium, mit einer  $OD_{600}$  zwischen 0,1 und 0,3 beimpft und bis zu einer  $OD_{600}$  von ca. 0,9 inkubiert. Durch die Zugabe von 0,5-1 mM IPTG bzw. 2 µg/ml AHT (abhängig vom Vektorsystem) wurde die Genexpression induziert und nach 3-5 h wurden die Zellen zentrifugiert (20 min, 4000 rpm, 4°C).

Als Expressionskontrolle wurden vor der Induktion, nach 3 h und 5 h 1 ml Proben entnommen und zentrifugiert (10 min, 11000 rpm, 4°C). Das Pellet wurde in H<sub>2</sub>O resuspendiert, pro OD<sub>600</sub> 1 wurden 50 µl H<sub>2</sub>O und 30 µl 4x-SDS-Probenpuffer zugefügt und mit Hilfe einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt.

### 2.6.2 Membranpräparation

Für die Membranpräparation wurde das Zellpellet, welches wie unter 2.6.1 beschriebene gewonnen wurde, in TRIS/HCl-Puffer inklusive Proteaseinhibitor (Complete EDTA-frei, Roche Diagnostics, Mannheim,) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte bei Ansätzen mit geringen Volumen mit Hilfe der FastPrep (FastPrep FP120, QBiogene, Heidelberg). Dabei wurde die Zellsuspension in Aufschlussgefäße mit 300 mg Glasperlen (Ø 0,2-0,3 mm) überführt und viermal für 30 sec bei 6.5 m/sec in der FastPrep geschüttelt. Um Zelltrümmer abzutrennen wurde dies dann zentrifugiert (11000 rpm, 20 min, 4°C). Bei Ansätzen mit großem Volumen erfolgte der Zellaufschluss mit Hilfe der FRENCH<sup>®</sup> pressure cell press (SLM Aminco, USA). Die Zellen wurden dreimal bei einem Druck von 18000 psi aufgeschlossen und die Zelltrümmer anschließend abzentrifugiert (4000 rpm, 20 min, 4°C). Der Überstand wurde dann in einer Ultrazentrifuge bei 50000 rpm für 20 min bei 4°C sedimentiert. Das Membranpellet wurde anschließend in TRIS/HCl-Puffer resuspendiert. Wurden cytosolische Proteine untersucht, dann wurde der Überstand verwendet.

TRIS/HCl-Puffer:

50 mM TRIS, 200 mM NaCl, pH 7,5 mit HCl

### 2.6.3 Aufreinigung von Proteinen mittels Affinitätschromatographie

Nach dem Zellaufschluss oder der Membranpräparation wurden die Proteine mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die proteinkodierenden Gene wurden zuvor mit Histidin-Tag versehen. Diese Proteine wurden mittels *batch*-Verfahren mit Ni-NTA-Agarose-Beats (Qiagen, Hilden) gereinigt. Der dazu verwendete Puffer (50 mM TRIS/HCl, 200 mM NaCl, pH 7,5) wurde mit variierenden Imidazolkonzentrationen versehen. Im Aufschluss wurde eine Imidazolkonzentration von 0-5 mM eingesetzt. Gewaschen wurde mit 10-50 mM Imidazol und die Elution erfolgte in Anwesenheit

von 100-250 mM Imidazol. Die Elutionen wurden aliquotiert und bei -80°C oder 4°C gelagert.

### **2.6.4 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford**

Die Proteinkonzentrationen wurden nach Bradford (1976) bestimmt. Dies wurde mit Hilfe des Roti<sup>®</sup>-Nanoquant-Reagenz (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Eichgerade wurde mit Rinderserumalbumin (BSA) hergestellt.

### **2.6.5 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese**

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte nach Laemmli (1970). Dazu wurden 10-15%ige SDS Polyacrylamidgele und „Minigel-Twin“-Kammern (Biometra, Göttingen) verwendet. Den Proben wurden, vor dem Auftragen auf das SDS Polyacrylamidgele, 4x-SDS-Probenpuffer zugefügt und für 5 min bei 95°C inkubiert. Die Auftrennung erfolgte bei maximal 30 mA. Anschließend wurden die Gele entweder mit Coomassie gefärbt oder ein Western-Blot-Analyse durchgeführt.

### **2.6.6 Coomassie-Färbung**

SDS-Gele wurden nach der Elektrophorese mit Coomassie gefärbt (Sambrook *et al.*, 1989). Die Gele wurden ungefähr 30 min in Coomassie-Lösung inkubiert und über Nacht in 10 % Essigsäure entfärbt.

Coomassie-Lösung:

30 % Ethanol, 10 % Essigsäure und 0,2 % Serva Blue R

### **2.6.7 Immunologischer Nachweis von Proteinen mittels Western Blot**

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteinen wurden diese mit Hilfe eines *semi-dry*-Blots aus dem Gel auf eine PVDF-Membran (Immobilon P, Porengröße 0,45 µm, Millipore, Bedford) übertragen. Die Membran wurde dazu für einige Minuten in 100 % Methanol aktiviert und dann in einer Blotapparatur (Biometra, Göttingen) auf einen Stapel aus drei Whatmann-Filterpapieren

(Whatmann GmbH, Dassel), die zuvor in Transferpuffer getränkt wurden, aufgelegt. Darauf wurden anschließend das SDS-Gel und drei weitere Whatmann-Filterpapiere gelegt. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte bei  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  Oberfläche für 1 h. Danach wurde die Membran für 30 min in Blockierungslösung, bestehend aus PBS-T-Puffer mit 3 % BSA, inkubiert. Der erste Antikörper (Anti-His (Qiagen, Hilden), 1:1000 verdünnt in PBS-T-Puffer mit 3 % BSA) wurde auf die Membran gegeben und für 1 h inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für 15 min mit PBS-T-Puffer gewaschen und anschließend mit dem zweiten Antikörper (Anti-Maus (Sigma, Deisenhofen), 1:10000 verdünnt in PBS-T-Puffer mit 3 % BSA) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T-Puffer wurde die Membran in Entwicklungspuffer mit einem Gemisch aus BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat) und NBT ( $p$ -Nitrobluetetrazolium) im Dunkeln bis zur gewünschten Signalstärke inkubiert.

Transferpuffer:

10 mM CAPS, 10 % Methanol, pH 11 mit NaOH

PBS-T-Puffer (1 l):

0,344 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3,2 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 7,7 g NaCl, 1 ml Tween 80, pH 7 mit KOH

Entwicklungspuffer:

100 mM TRIS/HCl (pH 9,4), 100 mM NaCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$

## 2.7 Bioinformatische Ansätze

Die Suche nach homologen Sequenzen erfolgte mit Hilfe des „Blast-Tool“ von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Für die Vorhersage der Sekundärstruktur von potentiellen Transportproteinen wurde das Programm TMHMM verwendet (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Import von Pyruvat in *E. coli*

##### 3.1.1 Etablierung eines Selektionssystems

Die Suche nach Pyruvatimportern in *E. coli* erfolgte mittels Transposonmutagenese und anschließender Selektion von Transposonmutanten in Anwesenheit von Bromopyruvat. Bromopyruvat ist ein toxisches Analogon von Pyruvat und inhibiert den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (Lowe *et al.*, 1984). Zudem hemmt diese Substanz den Pyruvatimport in *E. coli* (Lang *et al.*, 1987). Daher liegt die Vermutung nahe, dass der Pyruvatimporter auch Bromopyruvat bindet und/oder transportiert und damit wird die Anwendung dieses Selektionssystems bei der Suche nach dem Pyruvatimporter ermöglicht. Für die Selektion der Transposonmutanten musste zunächst die minimale Hemmkonzentration von Bromopyruvat bestimmt werden. Dazu wurden Gradientenplatten mit Minimal- bzw. Vollmedium und unterschiedlichen Bromopyruvatkonzentration von 0-5 mM verwendet.

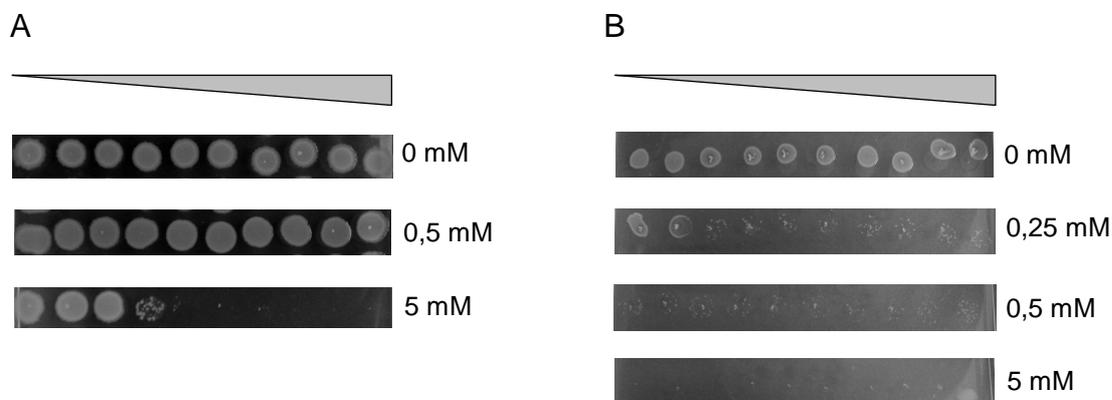


Abb. 4: Wachstum von *E. coli* MG1655 (WT) auf LB- (A) bzw. M9- (B) Gradientenplatten mit unterschiedlichen Bromopyruvatkonzentrationen (0-5 mM). Der Verlauf des Gradienten wird durch das Dreieck dargestellt.

Auf LB-Gradientenplatten konnte ab einer Konzentration von 2,5 mM kein Wachstum mehr beobachtet werden (Abb. 4A). Auf Gradientenplatten mit M9-Medium erwies sich bereits eine Konzentration von ungefähr 0,08 mM Bromopyruvat als toxisch für die Zellen (Abb. 4B).

## ERGEBNISSE

---

Für die Selektion der Transposonmutanten wurden daher Bromopyruvatkonzentrationen von 0,5 mM und 1 mM verwendet.

Da Glucose einen hemmenden Effekt auf die Pyruvat-Umsetzung hat (Gerharz 2003) wurde für die Selektion der Transposonmutanten nach einer alternativen C-Quelle gesucht. Es wurden Wachstumsversuche in Mikrotiterplatten mit M9-Medium mit 50 mM der unterschiedlichen C-Quellen Acetat, Glycerin, Lactat, Pyruvat und Glucose sowie den genannten C-Quellen in Kombination mit 50 mM Pyruvat durchgeführt. Bei den Wachstumsversuchen mit Glucose und Pyruvat in Kombination als C-Quelle konnte ein diauxisches Wachstum beobachtet werden (Daten nicht gezeigt) und damit eine Hemmung von Glucose auf die Pyruvatverstoffwechslung bestätigt werden. Glycerin ermöglichte von den untersuchten C-Quellen die höchste Wachstumsrate (Tab. 4) und hatte keinen Einfluss auf die Umsetzung von Pyruvat, da im Wachstumsversuch mit Glucose und Glycerin in Kombination kein diauxisches Wachstum beobachtet werden konnte. Daher wurde Glycerin statt Glucose als C-Quelle für die Selektion der Transposonmutanten verwendet.

Tab. 4: Wachstumsraten bei Wachstum von *E. coli* MG1655 auf jeweils 50 mM unterschiedlicher C-Quellen.

<b>C-Quelle</b>	<b>Wachstumsrate <math>\mu</math> [1/h]</b>
Glucose	0,199
Pyruvat	0,079
Lactat	0,044
Acetat	0,028
Glycerin	0,050
Pyruvat und Glucose	0,192
Pyruvat und Lactat	0,059
Pyruvat und Acetat	0,052
Pyruvat und Glycerin	0,079

### 3.1.2 Biochemische Charakterisierung des Pyruvatimporters

Für die biochemische Charakterisierung des Pyruvatimporters in *E. coli* wurden Aufnahmemessungen mit radioaktiv markiertem [<sup>14</sup>C]-Pyruvat durchgeführt. Zur Bestimmung der kinetischen Parameter  $V_{\max}$  und  $K_m$  wurden unterschiedlichen Pyruvatkonzentrationen zwischen 5 und 100  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Mit zunehmender Substratkonzentration zeigte *E. coli* MG1655 eine steigende Pyruvataufnahme bis zu einer Sättigung (Abb. 5). Die kinetischen Parameter wurden mit Hilfe der Software Sigma Plot 10.0 von dem in Abb. 5 gezeigten Michaelis-Menten-Diagramm durch direktes *fitting* bestimmt. Der Wildtyp erreichte einen  $V_{\max}$  von 2,91  $\text{nmol}/(\text{mg TG}\cdot\text{min})$  und einen  $K_m$ -Wert von 8,2  $\mu\text{M}$ .

Bei der Pyruvataufnahme handelt es sich um einen proteinvermittelten Transport, da bei dem Pyruvatimport eine Sättigung zu beobachten war. Bei einer Diffusion von Pyruvat würde eine linear steigende Pyruvataufnahme, in Abhängigkeit von der Substratkonzentration, erwartet.

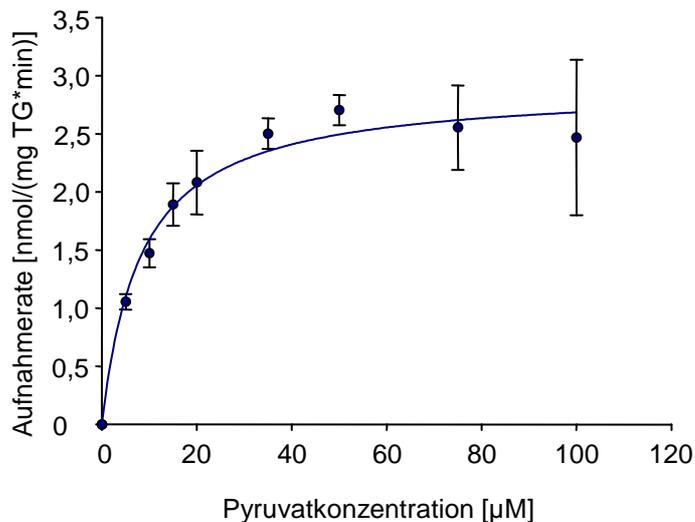


Abb. 5: Aufnahme von [<sup>14</sup>C]-Pyruvat durch *E. coli* MG1655 (WT). Die Aufnahmeraten wurden in Abhängigkeit von der Substratkonzentration bestimmt (n=3).

Zur weiteren Charakterisierung des Pyruvatimports wurden kurz vor Beginn der radioaktiven Aufnahmemessung 30  $\mu\text{M}$  CCCP zu den Zellen gegeben. CCCP ist eine membrangängige Säure, die Protonen bindet und diese passiv durch die Membran schleußt. Somit bricht das anliegende elektrochemische Protonenpotential zusammen und ein sekundär aktiver, protonenabhängiger Transport wird unmöglich.

## ERGEBNISSE

---

Die Pyruvataufnahme in *E. coli* MG1655 konnte durch die Zugabe von CCCP deutlich inhibiert werden (Abb. 6), daher handelt es sich bei dem Pyruvatimporter sehr wahrscheinlich um ein sekundär aktives Aufnahmesystem

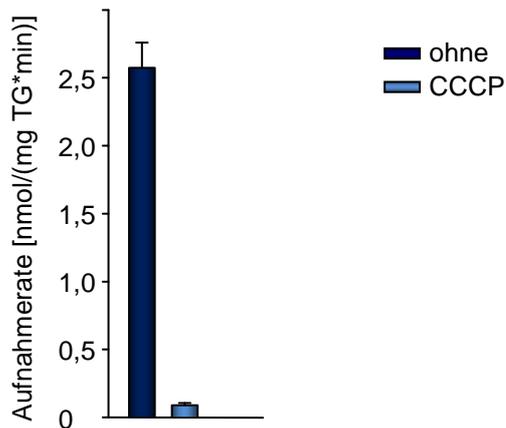


Abb. 6: Aufnahme von [<sup>14</sup>C]-Pyruvat durch *E. coli* MG1655 (WT) ohne und nach Zusatz von 30 µM CCCP (n=3).

Um das Substratspektrum des Pyruvatimporters zu untersuchen, wurden radioaktive Aufnahmemessungen mit [<sup>14</sup>C]-Pyruvat in Anwesenheit unterschiedlicher potentieller Substrate als Kompetitoren durchgeführt. Dazu wurden kurz vor Beginn der radioaktiven Aufnahmemessung nicht-radioaktive Substanzen in 100-fachem Überschuss zu den Zellen gegeben und die Messung gestartet.

Zunächst wurde überprüft, ob das für die Selektion der Transposonmutanten verwendete, toxische Bromopyruvat einen hemmenden Effekt auf den Pyruvatimport hat. Weiterhin wurde untersucht, ob eine oder mehrere Aminosäuren die Pyruvataufnahme hemmen.

Dazu wurden die folgenden Aminosäuregemische (AS) verwendet:

(AS 1): Glycin, L-Alanin, L-Leucin, L-Isoleucin und L-Valin,

(AS 2): L-Prolin, L-Cystein, L-Threonin, L-Serin und L-Methionin,

(AS 3): L-Aspartat, L-Asparagin, L-Glutamat und L-Glutamin,

(AS 4): L-Histidin, L-Lysin, L-Arginin, L-Phenylalanin und L-Tryptophan.

## ERGEBNISSE

Die Aminosäuregemische AS 1 und AS 2 inhibierten die Pyruvataufnahme um die Hälfte (Abb. 7). Die Zugabe von unmarkiertem Bromopyruvat bzw. Pyruvat im Überschuss bewirkte, dass die Aufnahme des markierten Pyruvats unterbunden wird, da dieses so stark verdünnt wird, dass es zu keiner messbaren Aufnahme der markierten Substanz kommt, wenn die unmarkierte Substanz gleichzeitig transportiert oder gebunden wird (Abb. 7).

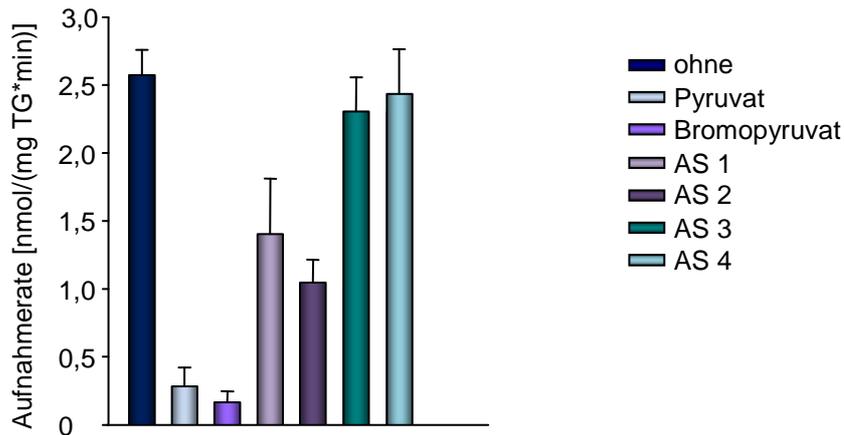


Abb. 7: Konkurrenz der [ $^{14}\text{C}$ ]-Pyruvataufnahme bei *E. coli* MG1655 (WT) ohne und durch Zusatz von Pyruvat, Bromopyruvat und Aminosäuren im 100-fachen Überschuss. AS 1: Aminosäuregemisch 1, AS 2: Aminosäuregemisch 2, AS 3: Aminosäuregemisch 3, AS 4: Aminosäuregemisch 4 (n=3).

Um festzustellen welche Aminosäuren an dieser Inhibition beteiligt waren, wurden alle Aminosäuren der Ansätze AS 1 und AS 2 separat getestet (Abb. 8).

Eine geringe Hemmung der Pyruvataufnahme wurde durch Glycin, Isoleucin, Valin, Threonin, Serin und Methionin beobachtet. Die Zugabe von Cystein führte hingegen zur Halbierung der Pyruvataufnahme. Die Zugabe von Alanin bewirkte wahrscheinlich eine zusätzliche Energetisierung und damit eine höhere Pyruvataufnahme (Abb. 8).

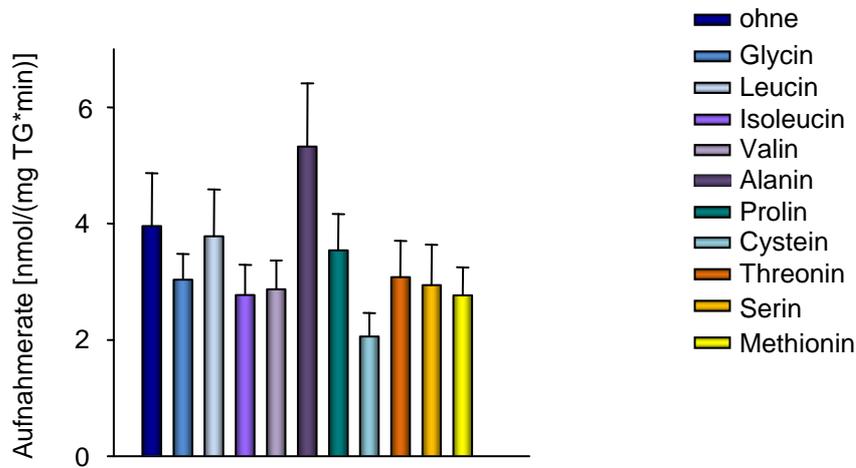


Abb. 8: Konkurrenz der  $[^{14}\text{C}]$ -Pyruvataufnahme bei *E. coli* MG1655 (WT) ohne und durch Zusatz von allen Aminosäuren der Ansätze AS 1 und AS 2 einzeln im 100-fachen Überschuss (n=3).

Sehr wahrscheinlich wird keine Aminosäure über das Pyruvatimportsystem aufgenommen. Die auftretende Hemmung der Pyruvataufnahme wird durch die Kombination mit mehreren Aminosäuren addiert.

Des Weiteren wurde die Hemmung des Pyruvatimports durch die Carbonsäuren, Lactat, Oxalat, Fumarat, Acetat, Ketoisoleucin, Ketoleucin und Ketovalin untersucht. Eine geringe Inhibition der Pyruvataufnahme wurde durch Acetat, Ketoisoleucin und Ketoleucin hervorgerufen. Eine fast vollständige Inhibition bewirkte dagegen die Zugabe von Ketovalin (Abb. 9).

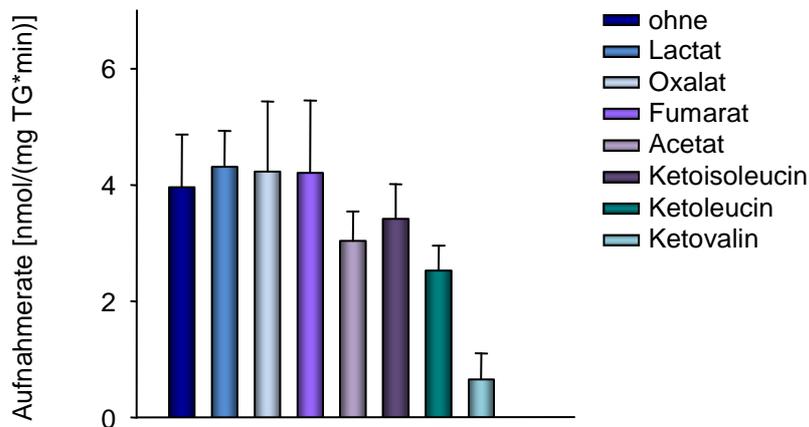


Abb. 9: Konkurrenz der  $[^{14}\text{C}]$ -Pyruvataufnahme bei *E. coli* MG1655 (WT) ohne und durch Zusatz von Lactat, Oxalat, Fumarat, Acetat, Ketoisoleucin, Ketoleucin und Ketovalin im 100-fachen Überschuss (n=3).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Bromopyruvat und Ketovalin an den Pyruvatimporter binden können oder von diesem transportiert werden. Die Aminosäuren Glycin, Isoleucin, Valin, Cystein, Threonin, Serin und Methionin sowie die Carbonsäuren Acetat, Ketoisoleucin und Ketoleucin zeigten eine geringe Inhibition der Pyruvataufnahme, werden aber vermutlich nicht von dem Pyruvatimporter transportiert.

### 3.1.3 Identifikation von putativen Pyruvatimportsystemen

Die Identifikation von Pyruvatimportern erfolgte mit Hilfe einer Transposonmutagenese und einer anschließenden Selektion in Anwesenheit des toxischen Pyruvat Analogons Bromopyruvat. Dazu wurde das Plasmid pKESK18, welches ein mini-Tn10-Cam Transposon besitzt, in den *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  transformiert. Da die Transposonmutagenese mit dem Plasmid pKESK18 in diesem Stamm etabliert wurde (Madhusudan *et al.*, 2005), wurde auch für diese Anwendung der Stamm DH5 $\alpha$  verwendet. Nach der Transformation wurden die Zellen zunächst in LB-Medium für 24 h bei 30°C inkubiert und anschließend in M9- Medium mit 50 mM Glycerin als C-Quelle überführt und für 24 h bei 30°C inkubiert. Danach wurden verschiedene Ansätze in M9- Medium mit 50 mM Glycerin als C-Quelle mit unterschiedlichen OD<sub>600</sub> Werten zwischen 0,05 und 0,1 beimpft, die Inkubation erfolgte bei 42°C für 8-24 h. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und in unterschiedlichen Verdünnungen auf M9-Agarplatten mit 50 mM Glycerin und mit 0,5 bzw. 1 mM Bromopyruvat ausplattiert. Parallel dazu wurde zur Bestimmung der Transposoneffizienz die Proben auf LB-Agarplatten ausplattiert, dazu wurde eine Verdünnung von 1:100.000 verwendet. Die maximale Transposoneffizienz, die erzielt wurde lag bei 0,368 %.

Durch die unterschiedlichen Ansätze wurde eine große Anzahl an Mutanten gefunden, die eine Bromopyruvatresistenz aufwiesen. Es wurden schließlich nur die Mutanten genauer untersucht, die auf M9-Agarplatten in Anwesenheit von 1 mM Bromopyruvat gewachsen sind. Dabei handelte es sich um insgesamt 37 Mutanten.

Die Identifikation des Insertionslocus erfolgte mit Hilfe der Semi-random, two-step PCR (ST-PCR) nach Chun *et al.* (1997) und anschließender Sequenzierung. In Tabelle 5 sind die Ergebnisse der Sequenzierung dargestellt.

## ERGEBNISSE

---

Tab. 5: Identifizierte Gene nach Sequenzierung sowie deren Funktion.

<b>Gen</b>	<b>Funktion</b>
<i>ansP</i>	L-Asparagin APC Transporter
<i>yhjE</i>	MFS Transporter
<i>fruA</i>	Fructose PTS Permease
<i>ybjE</i>	vorhergesagter Transporter
<i>yhbX</i>	vorhergesagte Hydrolase der inneren Membran
<i>uspB</i>	vorhergesagtes Stressprotein
<i>yihG</i>	vorhergesagte Endonuclease
<i>exbD</i>	Teil von TonB
<i>astB</i>	Succinylarginin Dihydrolase
<i>galK</i>	Galaktokinase
<i>rhsA</i>	Teil des Rhs Elements, Polysaccharid Synthese/Export
<i>sdiA</i>	Transkriptionsregulator
<i>ybiT</i>	putative ATPase Komponente eines ABC- Transporters
<i>ydfI</i>	vorhergesagte Mannonat Dehydrogenase
<i>yehI</i>	vorhergesagte ATPase Komponente eines Abc- Transporters
<i>yjbS</i>	putatives Protein
<i>yjiS</i>	putatives Protein
<i>yrhB</i>	putatives Protein
<i>mgIB</i>	periplasmatisches Bindepotein des Galaktose ABC Transporter
<i>yjbl</i>	putatives Protein
<i>fliD</i>	Komponente des Flagellums
<i>htrE</i>	putatives Protein der äußeren Membran
<i>yhcD</i>	putatives Protein der äußeren Membran

Bei vier der identifizierten Gene (*yhjE*, *ansP*, *ybjE* und *fruA*) handelte es sich um Gene, die Transportproteine codieren. Da mit dem Pyruvataufnahmesystem ein Transportprotein gesucht wurde werden im Folgenden nur diese vier Transportproteine näher betrachtet.

## ERGEBNISSE

YhjE ist ein nicht charakterisiertes Transportprotein, welches zu *major facilitator superfamily* (MFS) zählt. Es besteht aus 440 Aminosäuren und es werden elf Transmembrandomänen vorhergesagt (Abb. 10).

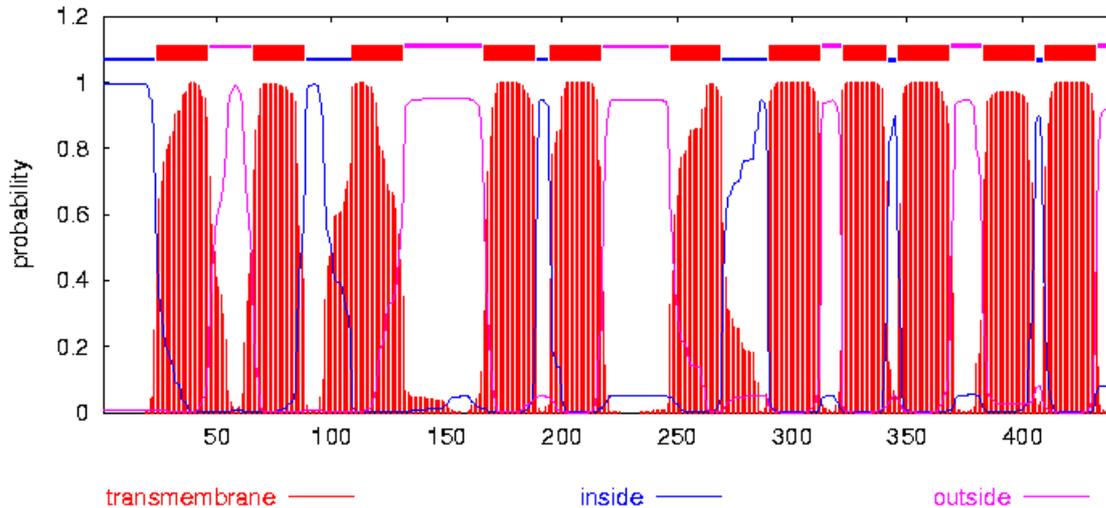


Abb. 10: Vorhersage von Transmembrandomänen von YhjE durch [www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM). Dargestellt ist die Wahrscheinlichkeit für eine transmembrane (rot), cytoplasmatische (blau) und periplasmatische (rosa) Lokalisation der Aminosäuren.

Aufgrund von Sequenzvergleichen wird AnsP als L-Asparagin Transporter beschrieben, der zur APC Familie zählt. Für das aus 499 Aminosäuren bestehende Transportprotein AnsP werden zwölf Transmembrandomänen vorhergesagt (Abb. 11).

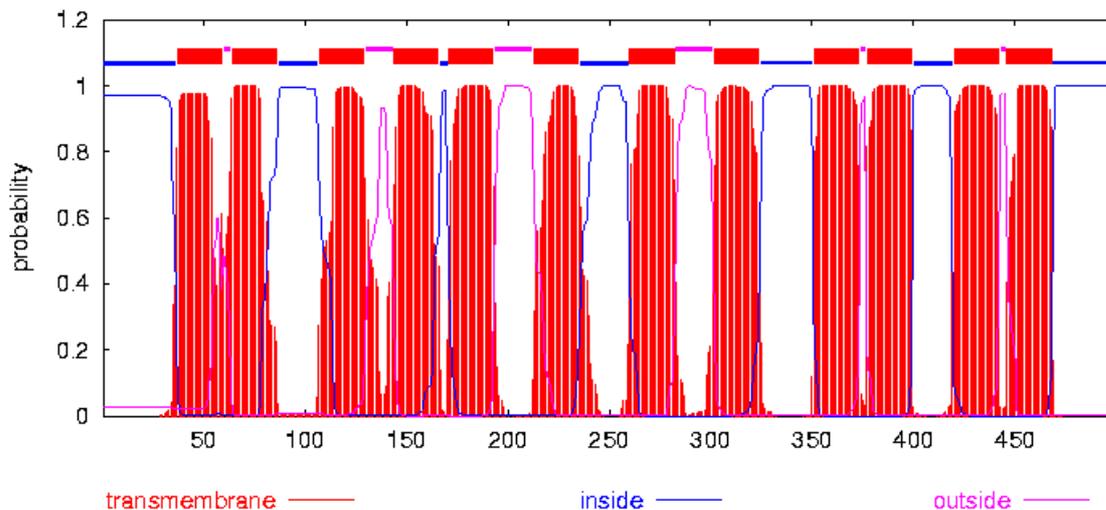


Abb. 11: Vorhersage von Transmembrandomänen von AnsP durch [www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM). Dargestellt ist die Wahrscheinlichkeit für eine transmembrane (rot), cytoplasmatische (blau) und periplasmatische (rosa) Lokalisation der Aminosäuren.

Bei YbjE handelt es sich um vorhergesagtes Transportprotein, über dessen Funktion bislang nichts bekannt ist. Die Vorhersage der Transmembrandomänen ergab, dass das 299 Aminosäuren lange Protein acht Transmembrandomänen besitzt (Abb. 12)

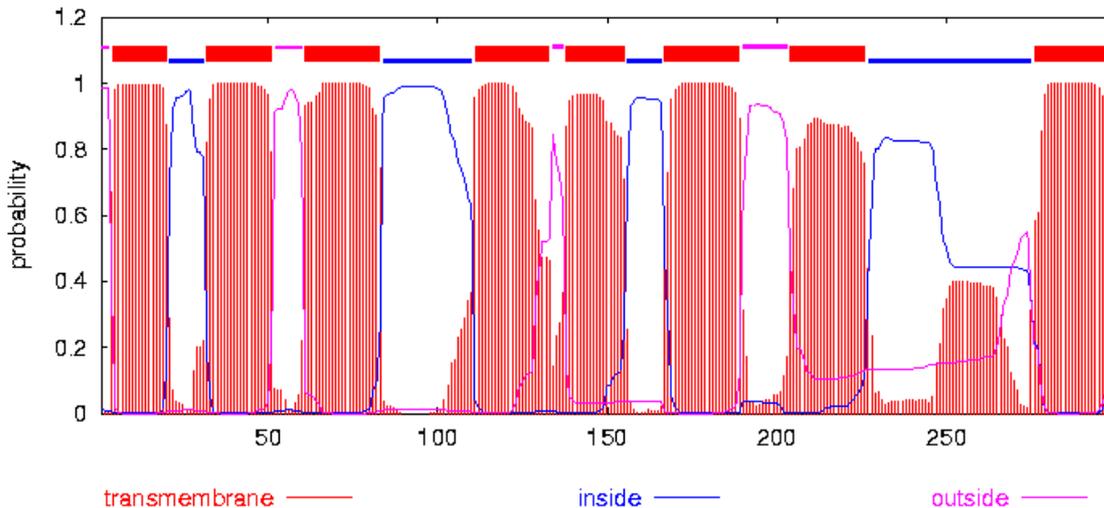


Abb. 12: Vorhersage von Transmembrandomänen von YbjE durch [www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM). Dargestellt ist die Wahrscheinlichkeit für eine transmembrane (rot), cytoplasmatische (blau) und periplasmatische (rosa) Lokalisation der Aminosäuren.

FruA ist die Fructose PTS Permease, die eine Komponente des Fructose-PTS-Transporters ist. Nach bisherigen Kenntnissen ist dieser Transporter nicht am Import von Pyruvat beteiligt. Daher wurden nur die Transposonmutanten (T) *T\_yhjE*, *T\_ansP* und *T\_ybjE* durch weitere Wachstumsversuche charakterisiert.

Da die Selektion der Transposonmutanten in Anwesenheit von Bromopyruvat stattgefunden hat, zeigten alle Mutanten auf M9-Agarplatten eine Resistenz gegenüber Bromopyruvat. Diese Resistenz wurde zunächst durch Wachstumsversuche in Mikrotiterplatten mit M9-Medium mit 50 mM Glycerin als C-Quelle sowie 1 mM Bromopyruvat überprüft. Dabei konnten die Resistenz der Mutanten *T\_yhjE*, *T\_ansP* und *T\_ybjE* gegenüber Bromopyruvat bestätigt werden (Abb. 13).

## ERGEBNISSE

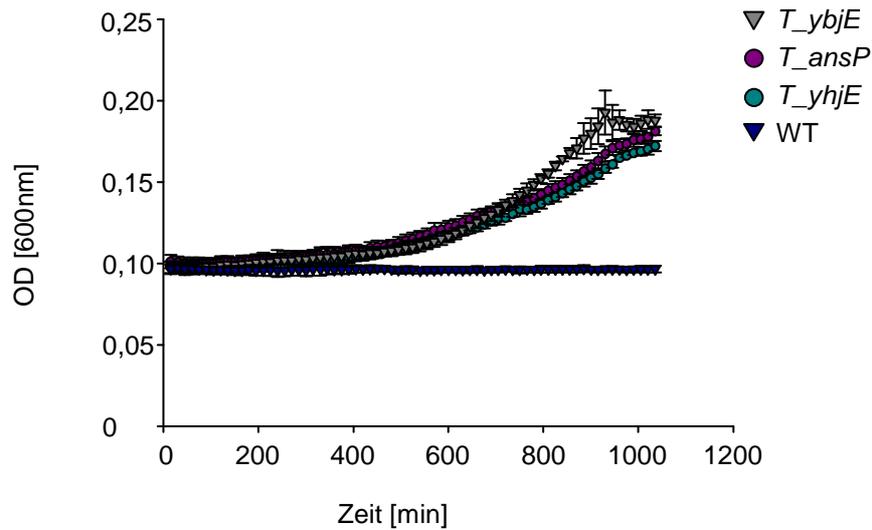


Abb. 13: Wachstum von *E. coli* MG1655 (WT), *T\_yhjE*, *T\_ansP* und *T\_ybjE*. Das Wachstum erfolgte in Mikrotiterplatten mit M9-Medium mit 1 mM Bromopyruvat (n=3).

Anschließend wurde dieser Wachstumsversuch mit den jeweiligen Deletionsmutanten wiederholt. Die Herstellung dieser erfolgte wie unter 2.3.10 beschrieben. Dabei wurde gezeigt, dass die Mutanten  $\Delta ansP$  und  $\Delta ybjE$ , im Gegensatz zu den entsprechenden Transposonmutanten, sensitiv gegenüber Bromopyruvat waren. Die Mutante  $\Delta yhjE$  zeigte dagegen ebenfalls wie die Transposonmutante *T\_yhjE* eine Bromopyruvatresistenz (Abb. 14).

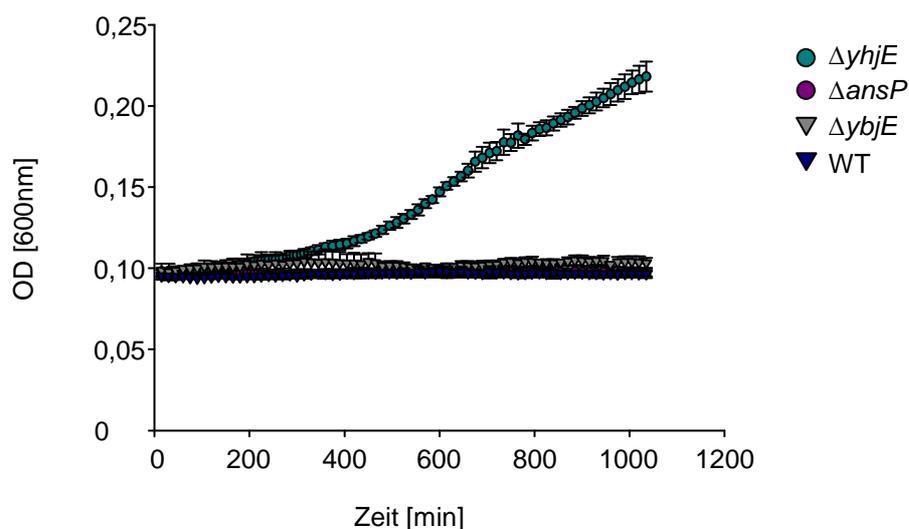


Abb. 14: Wachstum von *E. coli* MG1655 (WT),  $\Delta yhjE$ ,  $\Delta ansP$  und  $\Delta ybjE$ . Das Wachstum erfolgte in Mikrotiterplatten mit M9-Medium mit 1 mM Bromopyruvat (n=3).

## ERGEBNISSE

Die Mutanten  $\Delta ansP$  und  $\Delta ybjE$  zeigten in Anwesenheit von Bromopyruvat in Flüssigkultur kein Wachstum (Abb. 14). Zur Überprüfung ob diese Mutanten bei geringeren Bromopyruvatkonzentrationen eine erhöhte Resistenz zeigen, wurden Gradientenplatten verwendet. Dazu wurden Gradientenplatten mit M9-Medium und unterschiedlichen Bromopyruvatkonzentration eingesetzt. Das M9-Medium enthielt als C-Quelle 50 mM Glycerin. 3  $\mu$ l der zuvor in M9-Medium kultivierten *E. coli* MG1655 wurden auf die Gradientenplatten aufgetropft und bei 37°C inkubiert. Die Mutanten  $\Delta ansP$  und  $\Delta ybjE$  zeigten im Vergleich zum Wildtyp keine erhöhte Resistenz gegenüber Bromopyruvat (Abb. 15 B, C und D). Die Resistenz von  $\Delta yhjE$ , die schon in Flüssigkultur (Abb. 14) beobachtet wurde, konnte mit diesem Versuch bestätigt werden (Abb. 15 A).

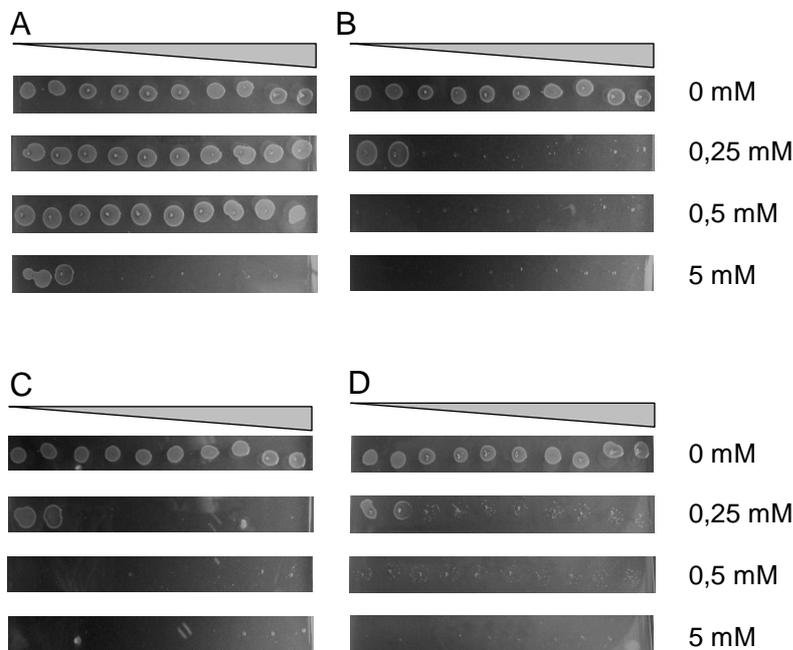


Abb. 15: Wachstum von  $\Delta yhjE$  (A),  $\Delta ansP$  (B),  $\Delta ybjE$  (C) und *E. coli* MG1655 (WT) (D) auf M9-Gradientenplatten mit 0-5 mM Bromopyruvat. Der Verlauf des Gradienten wird durch das Dreieck dargestellt.

Des Weiteren wurde das Wachstumsverhalten in Mikrotiterplatten mit M9-Medium mit Pyruvat als C-Quelle untersucht. Zuvor wurden bereits Wachstumsversuche aller in Tab. 5 gelisteten Transposonmutanten in M9-Medium mit Pyruvat durchgeführt. Dabei wurde gezeigt, dass alle Mutanten nicht auf Pyruvat als C-Quelle wachsen konnten (Daten nicht gezeigt). Die Wachstumsversuche in Mikrotiterplatten bestätigten, dass die Transposonmutanten  $T_{yhjE}$ ,  $T_{ansP}$  und  $T_{ybjE}$  Pyruvat als C-Quelle nicht verwerten konnten (Abb. 16).

## ERGEBNISSE

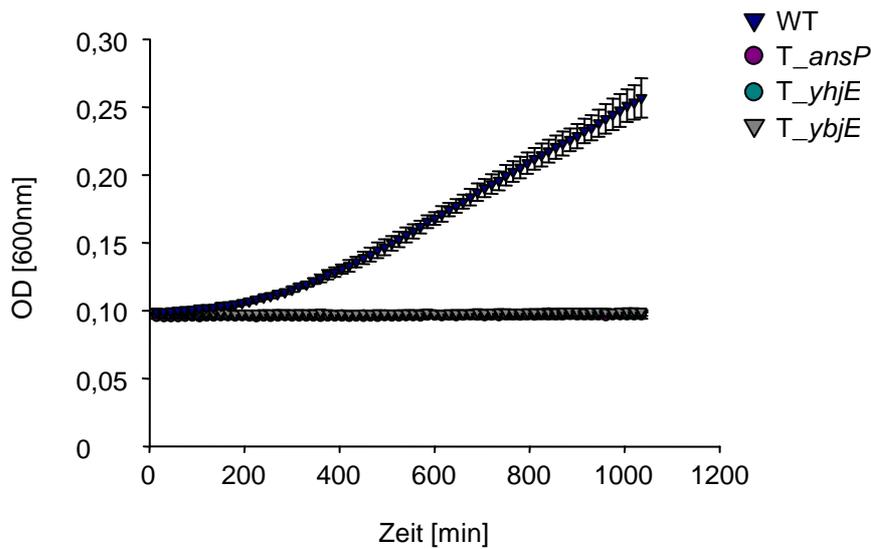


Abb. 16: Wachstum von *E. coli* MG1655 (WT), *T\_yhjE*, *T\_ansP* und *T\_ybjE*. Das Wachstum erfolgte in Mikrotiterplatten mit M9-Medium mit 50 mM Pyruvat als einzige C-Quelle (n=3).

Anschließend wurde dieser Wachstumsversuch mit den jeweiligen Deletionsmutanten wiederholt. Dabei wurde gezeigt, dass die Deletionsmutanten, im Gegensatz zu den entsprechenden Transposonmutanten, auf Pyruvat als C-Quelle wuchsen (Abb. 17).

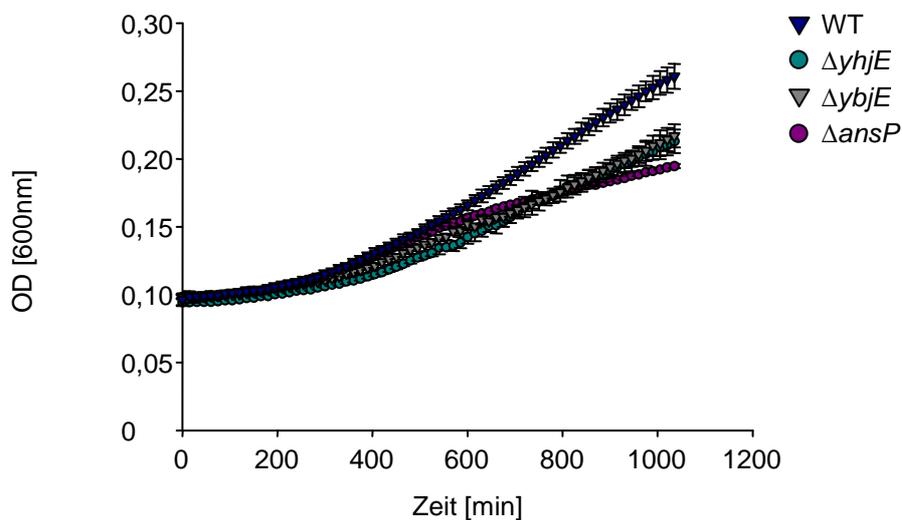


Abb. 17: Wachstum von *E. coli* MG1655 (WT),  $\Delta yhjE$ ,  $\Delta ansP$  und  $\Delta ybjE$ . Das Wachstum erfolgte in Mikrotiterplatten mit M9-Medium mit 50 mM Pyruvat als einzige C-Quelle (n=3).

Zur Überprüfung, ob die Deletionsmutanten bei geringeren Pyruvatkonzentrationen unterschiedliche Wachstumsphänotypen zeigten, wurden Wachstumsversuche mit

Gradientenplatten durchgeführt. Dazu wurden Gradientenplatten mit M9-Medium und unterschiedlichen Pyruvatkonzentration als C-Quelle eingesetzt. 3 µl der zuvor in M9-Medium kultivierten *E. coli* MG1655 wurden auf die Gradientenplatten aufgetropft und bei 37°C inkubiert. Es konnte kein unterschiedliches Wachstum beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Da sehr wahrscheinlich Bromopyruvat ebenfalls von dem Pyruvatimportsystem gebunden oder transportiert wird ist YhjE der vielversprechendste Kandidat für das gesuchte Pyruvatimportsystem. Da die Mutante  $\Delta yhjE$  in Anwesenheit von Bromopyruvat wuchs und es sich bei YhjE um ein Transportprotein handelt, liegt die Vermutung nahe, dass dieses am Bromopyruvatimport beteiligt sein könnte. AnsP und YbjE zeigten dagegen nach den bisherigen Versuchen (Abb. 14 und 17) keinen Hinweis, der eine Beteiligung am Pyruvatimport belegen würde.

Sehr auffällig war das unterschiedliche Wachstumsverhalten der Transposonmutanten im Vergleich zu den jeweiligen Deletionsmutanten. Dies deutete daraufhin, dass die Transposonmutanten weitere Mutationen besitzen, die diesen Wachstumsphänotyp hervorrufen.

### **3.1.4 Identifikation von *cra***

Keine der untersuchten Transposonmutanten wuchs auf Pyruvat als C-Quelle, im Gegensatz zu den entsprechenden Deletionsmutanten der drei Kandidaten (Abb. 16 und 17). Mit Hilfe einer Genbank sollte geklärt werden, welches Gen für diesen Wachstumsphänotyp verantwortlich ist. Dazu wurde überprüft, ob nach Transformation der Genbank in eine Transposonmutante diese wieder fähig ist, auf Pyruvat als einziger C-Quelle zu wachsen. Ist dies der Fall, besteht die Möglichkeit, dass das defekte Gen, welches das Wachstum auf Pyruvat verhindert, bestimmt werden kann. Die verwendete Genbank besteht aus dem Plasmid pKETS11 mit Inserts von 2-5 kb des *E. coli* Genoms und wurde von der AG Schnetz zur Verfügung gestellt. Nach der Transformation der Genbank in eine Transposonmutante konnten 21 Klone von M9-Platten mit Pyruvat als C-Quelle isoliert werden. Anschließend wurde mit diesen Klonen ein Wachstumsversuch in Mikrotiterplatten mit M9-Medium mit 50 mM Pyruvat als C-Quelle durchgeführt. Zwei der isolierten Klone wuchsen auf 50 mM Pyruvat als einziger C-Quelle (Abb. 18).

## ERGEBNISSE

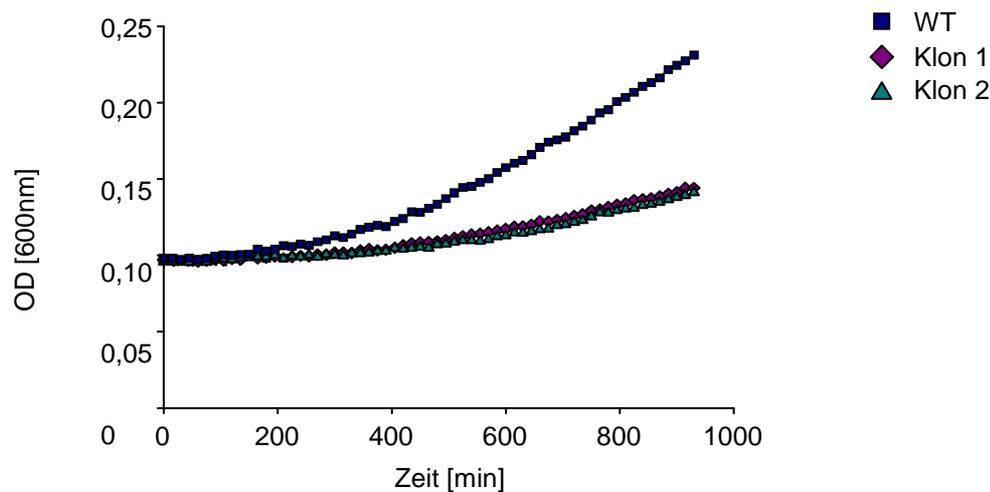


Abb. 18: Wachstum von *E. coli* MG1655 (WT) und Klone, die nach der Transformation isoliert wurden. Das Wachstum erfolgte in Mikrotiterplatten mit M9-Medium mit 50 mM Pyruvat als einziger C-Quelle.

Die Genbankfragmente dieser zwei Klone wurden anschließend sequenziert. Dazu wurden zunächst mit Hilfe flankierender Primer das Genbankfragment mittels PCR amplifiziert und anschließend das PCR Produkt sequenziert. Beide Klone enthielten dasselbe Fragment. Es handelte sich dabei um den Bereich von 87853 bp bis 90255 bp des *E. coli* Genoms. In Abbildung 19 ist das sequenzierte Genbankfragment und dessen Lokalisation im *E. coli* Genom schematisch dargestellt.

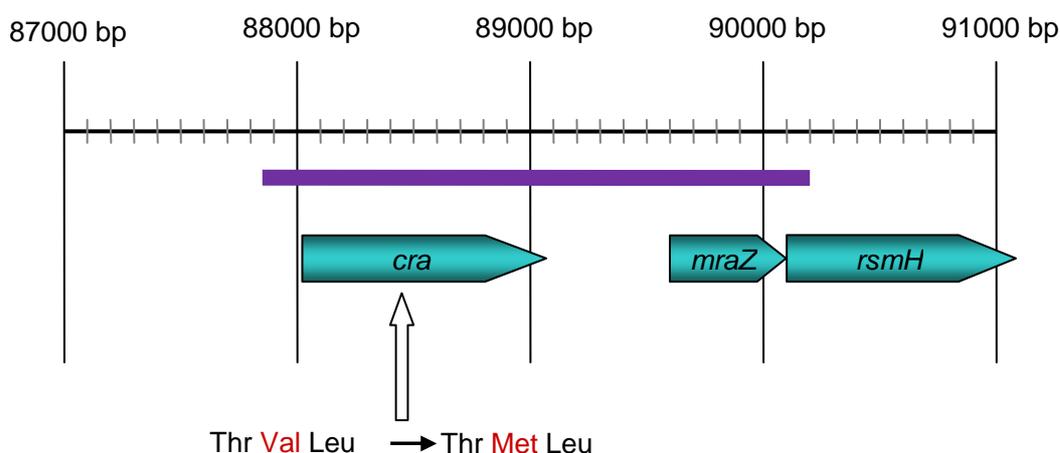


Abb. 19: Schematische Darstellung der Gene des sequenzierten Genbankfragments und dessen Lokalisation im *E. coli* Genom. In violett ist das identifizierte Genbankfragment dargestellt und in grün die enthaltenen Gene. Der Pfeil zeigt den Austausch der Aminosäure Valin zu Methionin, was durch eine Punktmutation im *cra* Gen der Transposonmutanten hervorgerufen wurde.

In violett ist der sequenzierte Bereich des Genbankfragments dargestellt und in grün ist die Lokalisation der in diesem Bereich liegenden Gene des *E. coli* Genoms hervorgehoben. Die Gene *cra* und *mraZ* sind vollständig enthalten sowie die ersten 200 bp des Gens *rsmH* (Abb. 19). Bei *cra*, das auch als *fruR* bezeichnet wird, handelt es sich um ein *catabolite repressor/activator* Protein. Cra reguliert die Expression zahlreicher Gene, die Enzyme codieren, welche an zentralen Wegen des Kohlenstoffmetabolismus beteiligt sind. Cra aktiviert die Transkription von Genen, die Schlüsselenzyme der Gluconeogenese, des TCA-Zyklus sowie des Glyoxylatzyklus codieren (Bledig *et al.*, 1996; Chin *et al.*, 1987; Ramseier *et al.*, 1995, Saier und Ramseier, 1996). Zudem hemmt Cra die Transkription von Genen, die Schlüsselenzyme des Entner-Doudoroff-Weg und der Glykolyse codieren (Bledig *et al.*, 1996; Ramseier *et al.*, 1995; Saier und Ramseier, 1996)

Mutanten, denen das *cra* Gen fehlt, können nicht auf Pyruvat und einigen anderen C-Quellen wie z. B. Alanin, Acetat sowie einigen Zwischenprodukten des TCA-Zyklus, wachsen (Chin *et al.*, 1987), was den Wachstumsphänotyp auf Pyruvat als einziger C-Quelle erklären würde. Die Funktion des Gens *mraZ* ist nicht bekannt.

Anschließend wurden durch Sequenzierung überprüft, ob das *cra* Gen der Transposonmutanten eine Mutation und diese damit ein defektes *cra* Gen besitzen. Dazu wurde von den Transposonmutanten T\_ *yhjE*, T\_ *ybjE* und T\_ *ansP* *cra* mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Als Kontrolle diente die Transposonmutante T\_ *fruA*, eine beliebige Transposonmutante, die nicht am Pyruvatstoffwechsel oder -import beteiligt ist, sowie der Ausgangsstamm *E. coli* DH5 $\alpha$ , der für die Transposonmutagenese verwendet wurde. Es konnte bei allen vier Transposonmutanten eine Punktmutation in *cra* nachgewiesen werden. Diese Punktmutation bewirkt einen Austausch der Aminosäure Valin zu Methionin. Der Stamm DH5 $\alpha$  weist dagegen keine Mutation auf. Daher ist diese Punktmutation im Gen *cra* während der Transposonmutagenese entstanden.

### 3.1.5 Biochemische Charakterisierung der putativen Pyruvatimporter

Für die weitere Charakterisierung der putativen Pyruvatimporter YhjE, AnsP und YbjE wurden Aufnahmemessungen mit radioaktiv markiertem [<sup>14</sup>C]-Pyruvat durchgeführt. Zunächst wurde untersucht, ob die Mutanten  $\Delta yhjE$ ,  $\Delta ansP$  und  $\Delta ybjE$  im Vergleich zum Wildtyp eine niedrigere Pyruvataufnahme zeigten. Dazu wurden Aufnahmemessung mit 50  $\mu$ M Pyruvat durchgeführt. Die Mutante  $\Delta ybjE$  zeigte keine Reduktion der Pyruvataufnahme (Abb. 20). Zusammen mit den in Abschnitt 3.1.3 gewonnenen Ergebnissen gibt es keine Hinweise darauf, dass YbjE am Import von Pyruvat beteiligt ist. Dagegen konnte für die Pyruvataufnahme der Mutanten  $\Delta yhjE$  und  $\Delta ansP$  im Vergleich zum Wildtyp eine um ein Drittel geringere Aufnahmezeit gezeigt werden. Daher wurden im Folgenden die zwei Mutanten  $\Delta yhjE$  und  $\Delta ansP$  genauer charakterisiert.

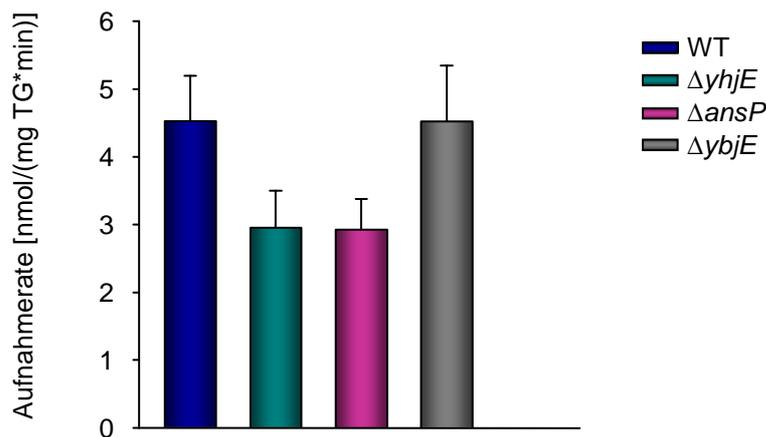


Abb. 20: Aufnahme von [<sup>14</sup>C]-Pyruvat durch *E. coli* MG1655 (WT),  $\Delta yhjE$ ,  $\Delta ansP$  und  $\Delta ybjE$ . Die Aufnahmeraten wurden bei einer Pyruvatkonzentration von 50  $\mu$ M bestimmt (n=3).

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter  $V_{max}$  und  $K_m$  wurden unterschiedliche Pyruvatkonzentrationen zwischen 5 und 100  $\mu$ M eingesetzt. Mit zunehmender Substratkonzentration konnte eine steigende Pyruvataufnahme bis zu einer Sättigung beobachtet werden (Abb. 21). Die kinetischen Parameter wurden mit Hilfe der Software Sigma Plot 10.0 von dem in Abb. 21 gezeigten Michaelis-Menten-Diagramm durch direktes *fitting* bestimmt.

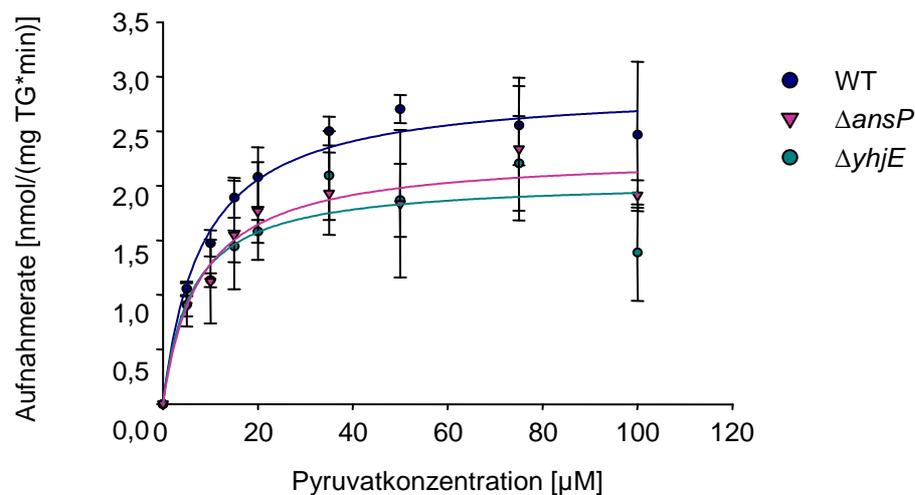


Abb. 21: Aufnahme von [<sup>14</sup>C]-Pyruvat durch *E. coli* MG1655 (WT),  $\Delta yhjE$  und  $\Delta ansP$ . Die Aufnahmeraten wurden in Abhängigkeit von der Substratkonzentration bestimmt (n=3).

Der Wildtyp erreichte einen  $V_{max}$  von 2,91 nmol/(mgTG\*min) und einen  $K_m$  von 8,2  $\mu$ M, für  $\Delta yhjE$  wurde ein  $V_{max}$  von 2,05 (nmol/mgTG\*min) und ein  $K_m$  von 6,06  $\mu$ M bestimmt. Die Mutante  $\Delta ansP$  erreichte einen  $V_{max}$  von 2,29 (nmol/mgTG\*min) und einen  $K_m$  von 7,89  $\mu$ M. Aufgrund der Ergebnisse konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem Wildtyp und den Mutanten  $\Delta yhjE$  und  $\Delta ansP$  beobachtet werden. Vermutlich gibt es neben diesen zwei gering affinen Importern noch mindestens ein weiteres hoch affines Pyruvatimportsystem.

Das Substratspektrum des Pyruvatimporters wurde bereits in Abschnitt 3.1.2 bestimmt. In diesem Abschnitt sollte das Substratspektrum der Mutanten  $\Delta yhjE$  und  $\Delta ansP$  untersucht werden. Dazu wurden radioaktive Aufnahmemessungen mit [<sup>14</sup>C]-Pyruvat in Anwesenheit unterschiedlicher Substrate durchgeführt. Kurz vor Beginn der Messung wurden die nicht radioaktiv markierten, putativen Substanzen in 100-fachem Überschuss zu den Zellen gegeben und die Messung gestartet.

Zunächst wurde die Competition durch die Zugabe von Bromopyruvat zu den Mutanten  $\Delta yhjE$  und  $\Delta ansP$  untersucht. Wie bereits gezeigt wurde, kommt die Pyruvataufnahme im Wildtyp durch Zugabe von Bromopyruvat fast vollständig zum Erliegen. Auch die Mutanten  $\Delta yhjE$  und  $\Delta ansP$  zeigten ebenfalls, wie der Wildtyp, eine Inhibition der Pyruvataufnahme (Abb. 22). Somit besteht die Möglichkeit, dass beide Pyruvatimporter-Kandidaten Bromopyruvat binden oder transportieren. Allerdings konnte nur bei der Mutante  $\Delta yhjE$  eine Resistenz gegenüber Bromopyruvat nachgewiesen werden (Abb. 14). Daher ist es sehr unwahrscheinlich,

dass weitere Transportsysteme auch am Import von Bromopyruvat beteiligt sind. Allerdings zeigt dieser Versuch, dass es mindestens ein weiteres Transportsystem gibt, das Bromopyruvat bindet aber wahrscheinlich nicht in die Zelle transportieren kann.

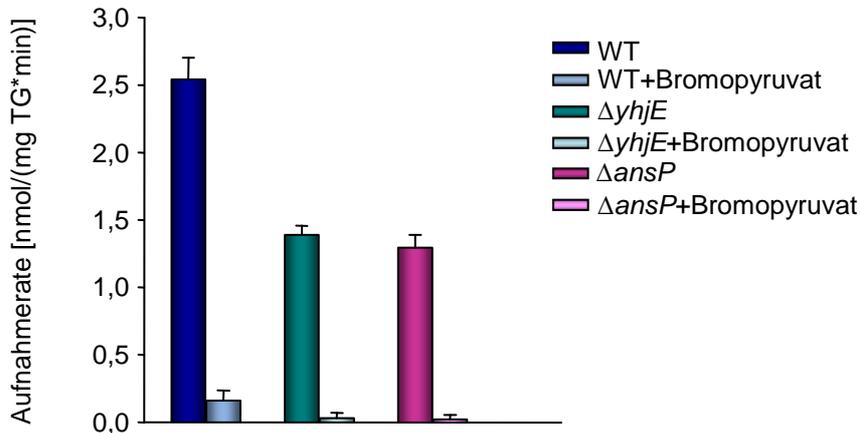


Abb. 22: Konkurrenz der [ $^{14}\text{C}$ ]-Pyruvataufnahme bei *E. coli* MG1655 (WT),  $\Delta yhjE$  und  $\Delta ansP$  ohne und durch Zusatz von Bromopyruvat im 100-fachen Überschuss, sowie ohne Zusatz als Kontrolle (n=3).

Auch zeigte sich bei den Mutanten, wie beim Wildtyp (Abb. 7), nach Zugabe verschiedener Aminosäuren eine unterschiedlich ausgeprägte Inhibition der Pyruvataufnahme. Im Gegensatz zum Wildtyp bewirkte die Zugabe von Valin und Serin zu den Mutanten eine stärkere Hemmung (Abb. 23 und 24), diese lag vermutlich allgemein an den schwankenden Pyruvataufnahmeraten und lieferte keinen weiteren Aufschluss über den Pyruvatimport in den beiden Mutanten. Die Zugabe aller weiteren Aminosäuren des AS 1- und AS 2-Gemischs zeigten eine ähnliche Inhibition der Pyruvataufnahme wie der Wildtyp (Abb. 23 und 24).

Wäre der Kandidat am Import von Pyruvat und einer weiteren, der getesteten Substanz beteiligt, würde man erwarten, dass durch die im Überschuss zugegebene Substanz in der Deletionsmutante keine Hemmwirkung hervorgerufen wird. Es sei denn es gibt mehrere Importer für diese Substanz bzw. noch mindestens ein weiteres Transportsystem, welches diese Substanz binden kann.

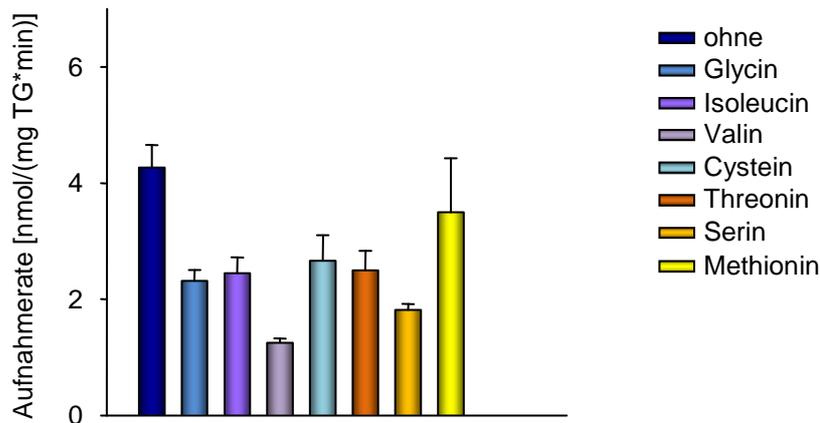


Abb. 23: Konkurrenz der  $[^{14}\text{C}]$ -Pyruvataufnahme bei  $\Delta\text{yhjE}$  ohne und durch Zusatz von Glycin, Isoleucin, Valin, Cystein, Threonin, Serin und Methionin im 100-fachen Überschuss ( $n=3$ ).

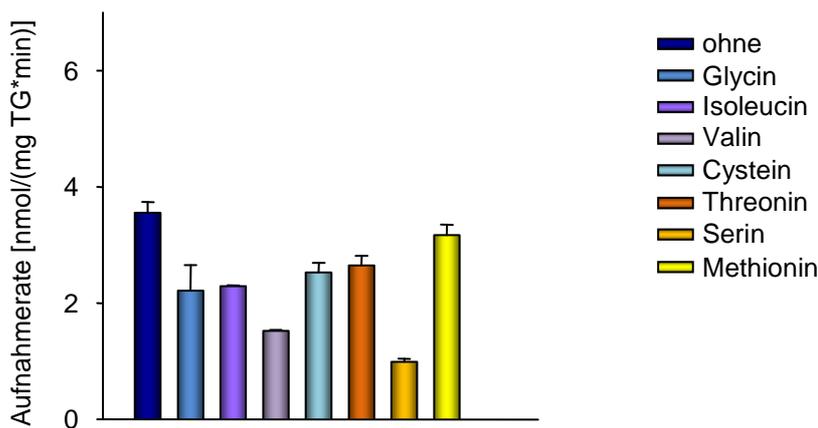


Abb. 24: Konkurrenz der  $[^{14}\text{C}]$ -Pyruvataufnahme bei  $\Delta\text{ansP}$  ohne und durch Zusatz von Glycin, Isoleucin, Valin, Cystein, Threonin, Serin und Methionin im 100-fachen Überschuss ( $n=3$ ).

Durch die Zugabe von Ketovalin kam der Pyruvatimport in den Mutanten  $\Delta\text{yhjE}$  und  $\Delta\text{ansP}$  fast vollständig zum Erliegen. Auch die Zugabe von Acetat, Ketoisoleucin und Ketoleucin bewirkte eine geringe Inhibition der Pyruvataufnahme in den beiden Mutanten (Abb. 25 und 26). Dies zeigten auch die Konkurrenzversuche im Wildtyp (Abb. 9).

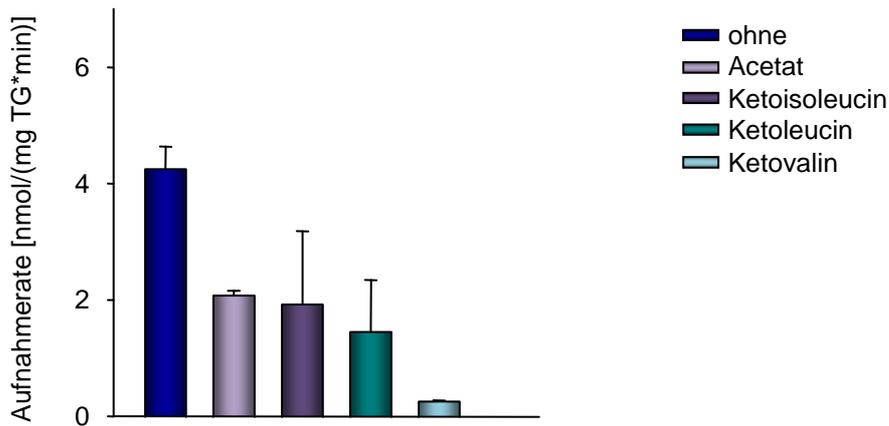


Abb. 25: Konkurrenz der  $[^{14}\text{C}]$ -Pyruvataufnahme bei  $\Delta yhjE$  ohne und durch Zusatz von Acetat, Ketoisoleucin, Ketoleucin und Ketovalin im 100-fachen Überschuss ( $n=3$ ).

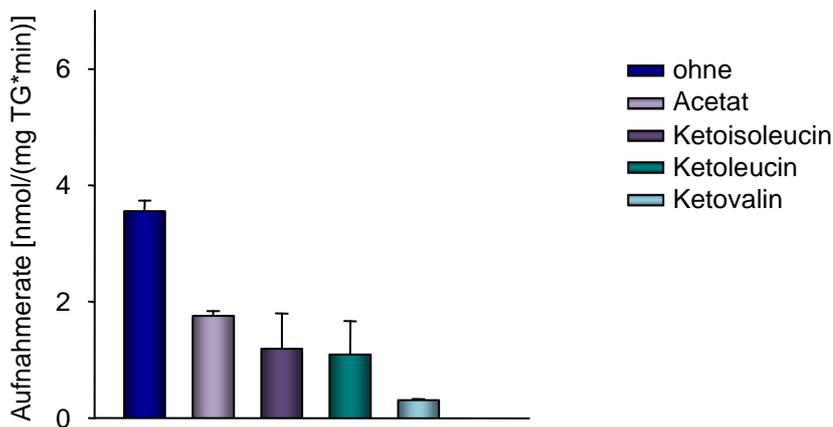


Abb. 26: Konkurrenz der  $[^{14}\text{C}]$ -Pyruvataufnahme bei  $\Delta ansP$  ohne und durch Zusatz von Acetat, Ketoisoleucin, Ketoleucin und Ketovalin im 100-fachen Überschuss ( $n=3$ ).

Die Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass es noch mindestens ein weiteres Pyruvatimportsystem geben muss, welches vermutlich auch am Import von Ketovalin beteiligt ist. Diese Multiplizität der Pyruvataufnahmesysteme erschwert die detaillierte biochemische Analyse der einzelnen Transporter.

### 3.1.6 Komplementation von $\Delta yhjE$

Des Weiteren sollten die Ergebnisse der Inaktivierung von *yhjE* durch Komplementationsversuche kontrolliert werden. Dazu wurde die physiologische Auswirkung der Expression von *yhjE* in dem Stamm  $\Delta yhjE$  untersucht.

Da beschrieben ist, dass das Protein YhjE toxisch für die Zelle ist (ASKA-Datenbank) wurde für die Expression von *yhjE* das *low copy* Plasmid pKESK22 verwendet. Zudem wurde als Kontrolle das Wachstumsverhalten ohne Bromopyruvat untersucht. Sollte YhjE unter diesen Bedingungen toxisch sein, würde der Stamm mit dem Plasmid pKESK22\_ *yhjE* kein oder ein vermindertes Wachstum auf M9-Medium aufweisen. Alle Stämme zeigten aber ein identisches Wachstumsverhalten auf M9-Medium (Abb. 27), somit konnte ausgeschlossen werden, dass das Protein YhjE unter diesen Bedingungen toxisch ist.

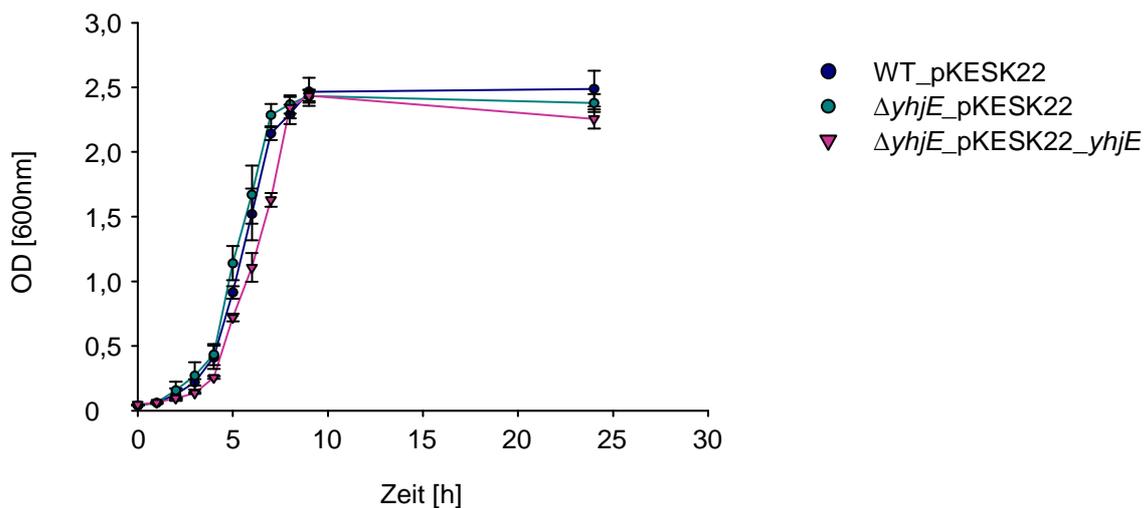


Abb. 27: Wachstum von *E. coli* MG1655\_pKESK22,  $\Delta yhjE$ \_pKESK22 und  $\Delta yhjE$ \_pKESK22\_ *yhjE*. Das Wachstum erfolgte in Kolben mit M9-Medium ohne Bromopyruvat (n=3).

Wie bereits zuvor beschrieben, wuchs die Mutante  $\Delta yhjE$  in Anwesenheit des toxischen Bromopyruvats. Der Wildtyp war dagegen sensitiv gegenüber dieser Substanz. Der Stamm  $\Delta yhjE$ \_pKESK22\_ *yhjE*, der *yhjE* exprimiert zeigte wiederum eine Sensitivität gegenüber Bromopyruvat (Abb. 28). Somit konnte durch die Expression von *yhjE* der bromopyruvatresistente Phänotyp der Mutante  $\Delta yhjE$  bei einer Bromopyruvatkonzentration von 1 mM komplementiert werden. Dies zeigte, dass YhjE am Import von Bromopyruvat beteiligt ist.

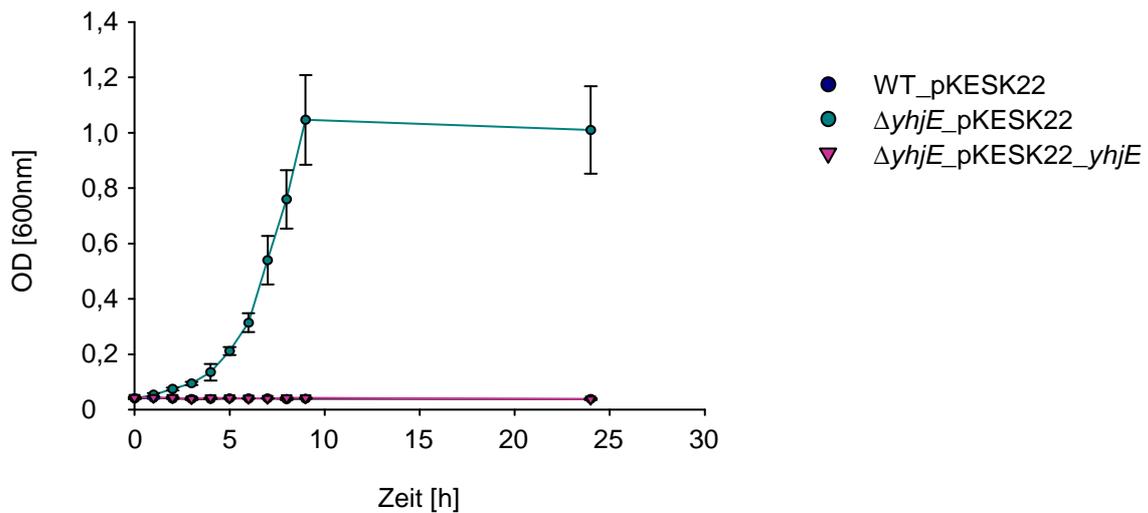


Abb. 28: Wachstum von *E. coli* MG1655\_pKESK22, *ΔyhjE\_pKESK22* und *ΔyhjE\_pKESK22\_yhjE*. Das Wachstum erfolgte in Kolben mit M9-Medium mit 1 mM Bromopyruvat (n=3).

Da das Importsystem für Bromopyruvat mit hoher Wahrscheinlichkeit auch am Import von Pyruvat beteiligt ist, wurde untersucht, ob die Expression von *yhjE* eine Erhöhung der Pyruvataufnahme bewirkt. Dazu wurden Aufnahmemessungen mit radioaktiv markiertem [<sup>14</sup>C]-Pyruvat mit einer Konzentration von 50 μM durchgeführt. Die Stämme WT\_pKESK22\_yhjE und *ΔyhjE\_pKESK22\_yhjE*, die *yhjE* exprimierten, zeigten eine leicht erhöhte Pyruvataufnahme im Vergleich zu den Stämmen WT\_pKESK22 und *ΔyhjE\_pKESK22*, die *yhjE* nicht exprimierten (Abb. 29). Somit bewirkte die Expression von *yhjE* eine höhere Pyruvataufnahme, was ein weiterer Hinweis für die Beteiligung von YhjE am Pyruvatimport ist.

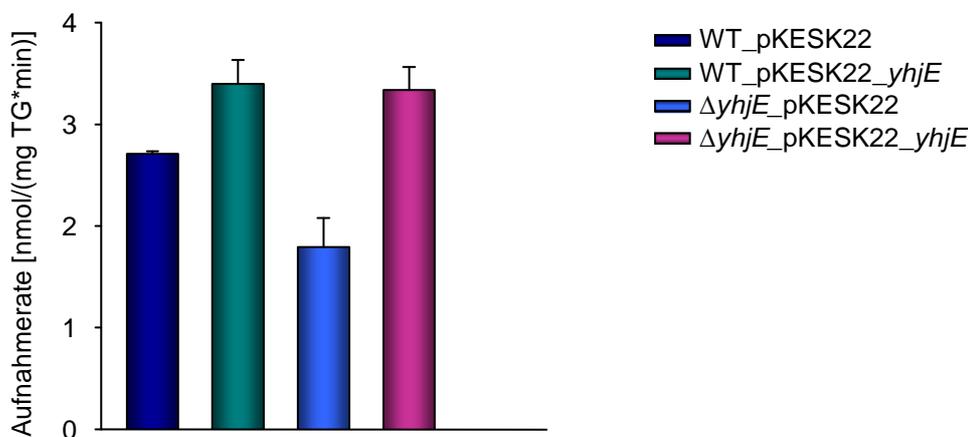


Abb. 29: Aufnahme von [<sup>14</sup>C]-Pyruvat durch *E. coli* MG1655 WT\_pKESK22, *E. coli* MG1655 WT\_pKESK22\_yhjE, *ΔyhjE\_pKESK22* und *ΔyhjE\_pKESK22\_yhjE*. Die Aufnahmeraten wurden bei einer Pyruvatkonzentration von 50 μM bestimmt (n=3).

Ob sowohl YhjE als auch AnsP am Import von Pyruvat beteiligt sind, sollte mit Hilfe der Doppeldeletion  $\Delta yhjE\Delta ansP$  geklärt werden. Diese Mutante wurde freundlicherweise von der AG Sprenger von der Universität Stuttgart, im Stammhintergrund *E. coli* MG1655 hergestellt, und uns zur Verfügung gestellt. Dazu wurden Aufnahmemessungen mit radioaktiv markiertem [ $^{14}\text{C}$ ]-Pyruvat mit einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  durchgeführt. Die Mutante  $\Delta yhjE\Delta ansP$  zeigte keine stärkere Reduktion der Pyruvataufnahme im Vergleich zu den Einzeldelationen (Abb. 30).

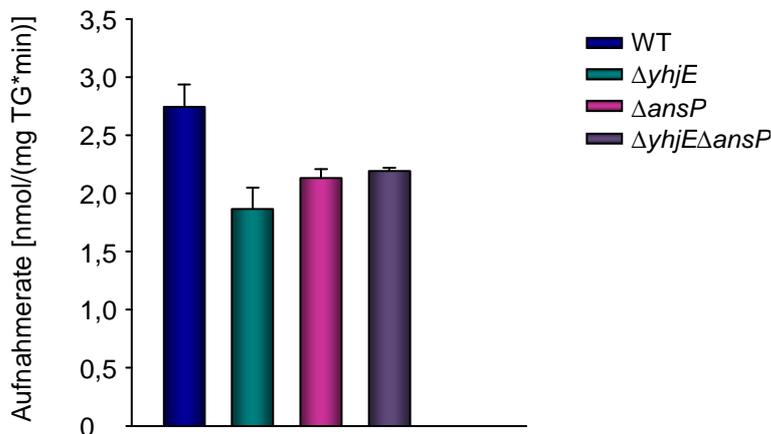


Abb. 30: Aufnahme von [ $^{14}\text{C}$ ]-Pyruvat durch *E. coli* MG1655 (WT),  $\Delta yhjE$ ,  $\Delta ansP$  und  $\Delta yhjE\Delta ansP$ . Die Aufnahmeraten wurden bei einer Pyruvatkonzentration von 50  $\mu\text{M}$  bestimmt (n=3).

Wenn sowohl YhjE und AnsP am Pyruvatimport beteiligt wären, würde die Doppeldeletion dieser beiden Kandidaten eine stärkere Reduktion der Pyruvataufnahme bewirken, als die Einzeldelationen. Dies bestätigt die Vermutung, dass es noch mindestens ein weiteres Pyruvataufnahmesystem geben muss, das möglicherweise bei der Ausschaltung von YhjE und AnsP induziert wird.

### 3.1.7 Identifikation und Untersuchung des TRAP Transporters YiaMNO

Durch Literaturrecherche wurde festgestellt, dass einige TRAP Transporter an der Bindung oder am Import von Pyruvat und anderen Carbonsäuren beteiligt sind. So ist der TRAP Transporter TRAP-T von Cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120, TakP von *R. sphaeroides* und DctPQM von *R. capsulatus* am Import bzw. an der Bindung von Pyruvat und anderer Carbonsäuren beteiligt sind (Pernil *et al.*, 2010; Gonin *et al.*, 2007; Thomas *et al.*, 2006) Mit YiaMNO besitzt auch *E. coli* einen TRAP

## ERGEBNISSE

---

Transporter, dessen mögliche Beteiligung am Pyruvatimport im Folgenden näher untersucht wurde.

Dazu wurden zunächst Aufnahmemessungen mit radioaktiv markiertem [ $^{14}\text{C}$ ]-Pyruvat mit einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  durchgeführt. Dafür wurden die Deletionsmutante  $\Delta yiaM$ ,  $\Delta yiaN$  und  $\Delta yiaO$  (Stammhintergrund *E. coli* K12 BW25113) von der *Keio collection* bezogen. Die drei Mutanten zeigten eine um ein Drittel geringere Pyruvataufnahme als der Wildtyp (Abb. 31). Somit könnte auch das Transportsystem YiaMNO am Pyruvatimport beteiligt sein.

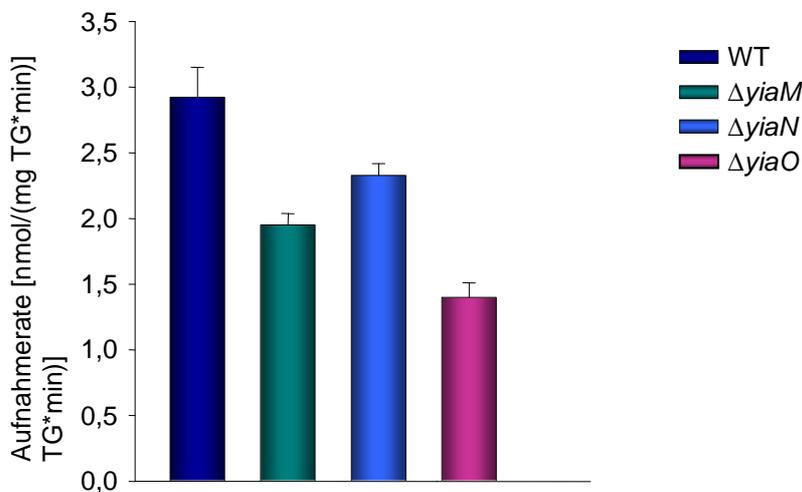


Abb. 31: Aufnahme von [ $^{14}\text{C}$ ]-Pyruvat durch *E. coli* MG1655 (WT),  $\Delta yiaM$ ,  $\Delta yiaN$  und  $\Delta yiaO$ . Die Aufnahmeraten wurden bei einer Pyruvatkonzentration von 50  $\mu\text{M}$  bestimmt (n=3).

Um eine Beteiligung von YiaMNO am Import von Pyruvat abzuklären, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt. Die Ketosäure 2,3-Diketo-L-Gulonat wird als Substrat des Substratbindepotein YiaO des TRAP Transporter YiaMNO beschrieben (Thomas *et al.*, 2006). Es sollte überprüft werden, ob die Bindung von 2,3-Diketo-L-Gulonat den Transport von Pyruvat inhibiert. Binden beide an die gleiche Stelle der Substratbindetasche, so sollte die Pyruvataufnahme durch die Zugabe von 2,3-Diketo-L-Gulonat inhibiert werden. Da diese Substanz kommerziell nicht erhältlich ist, musste diese zunächst selbst synthetisiert werden.

Für die Messungen wurde kurz vor Beginn der radioaktiven Aufnahmemessung, das nicht radioaktive 2,3-Diketo-L-Gulonat in 100-fachem Überschuss zu den Zellen gegeben und die Messung gestartet. Die Zugabe von 2,3-Diketo-L-Gulonat verursachte keine Inhibition der Pyruvataufnahme (Abb. 32). Es besteht aber noch

## ERGEBNISSE

---

die Möglichkeit, dass 2,3-Diketo-L-Gulonat an einer anderen Stelle der Substratbindetasche bindet und somit die Bindung und den Transport von Pyruvat nicht beeinflusst.

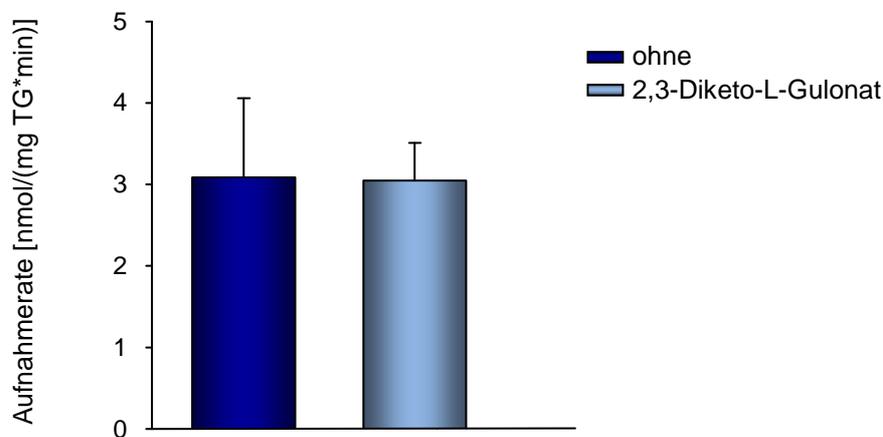


Abb. 32: Konkurrenz der [ $^{14}\text{C}$ ]-Pyruvataufnahme bei *E. coli* MG1655 (WT) durch Zusatz von 2,3-Diketo-L-Gulonat im 100-fachen Überschuss ( $n=3$ ).

Da die Multiplizität der Pyruvataufnahmesysteme die detaillierte biochemische Charakterisierung stark erschwert, sollte das Substratspektrum des Substratbindepotein YiaO *in vitro* näher charakterisiert werden. Dies könnte Rückschlüsse auf eine mögliche, bisher nicht bekannte Beteiligung von YiaO am Pyruvattransport liefern. Dazu wurde zunächst *yiaO* in *E. coli* exprimiert. Das Gen *yiaO* wurde dafür in den Vektor pET52b mit einem C-terminalen 10x His-Tag kloniert und in dem Stamm *E. coli* BL21 exprimiert. Die Aufreinigung erfolgte affinitätschromatographisch im *batch*-Verfahren. Dazu wurde der gesamte Proteinextrakt über Nacht an die Ni-NTA-Matrix gebunden und am nächsten Morgen zweimal mit Waschpuffer ohne Zugabe von Imidazol gewaschen. Die Elution erfolgte in vier Schritten, durch Zugabe des Elutionspuffer mit jeweils 300 mM Imidazol. Eine Proteinbande auf einer Höhe von 33 kDa konnte im SDS-Gel und im dazugehörigen Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 33). Da das Protein nur schlecht an die Ni-NTA-Matrix gebunden hatte und die Zugabe geringster Menge Imidazol das vollständige Ablösen der Proteine von der Ni-NTA-Matrix bewirkte (Daten nicht gezeigt), wurde beim Aufschluss und beim Waschen auf die Zugabe von Imidazol verzichtet.

## ERGEBNISSE

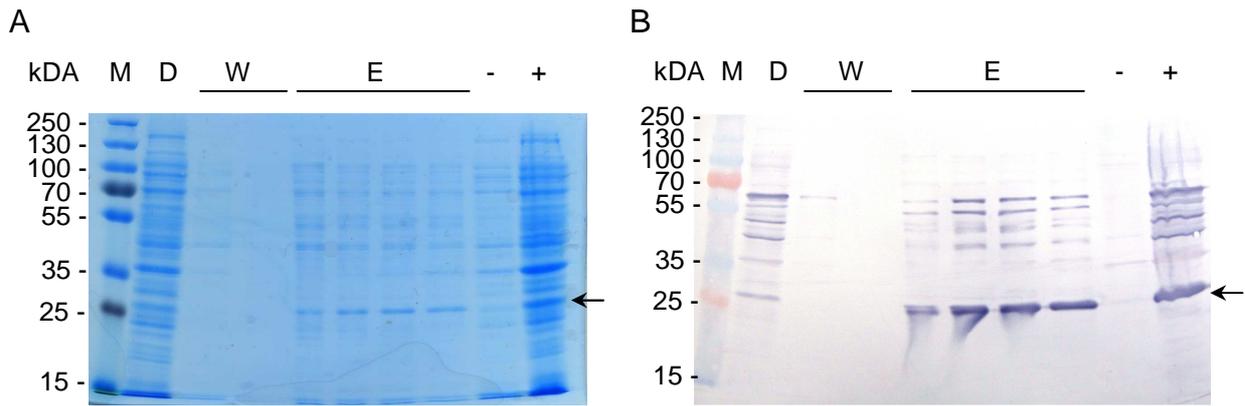


Abb. 33: Aufreinigung von YiaO mittels Affinitätschromatographie. A) SDS-Gel nach Coomassie-Färbung, B) Western Blot; M: Marker, D: Durchfluss, W: Waschung mit Waschpuffer ohne Imidazol, E: Elution mit Elutionspuffer mit jeweils 300 mM Imidazol, -: Zellextrakt vor Induktion, +: Zellextrakt nach Induktion mit 1 mM IPTG.

Anschließend sollten die Bindung von Pyruvat sowie der Ketosäuren Ketovalin, Ketoleucin und Ketoisoleucin an das Substratbindeprotein YiaO mittels Tryptophan-Fluoreszenzmessung untersucht werden. YiaO besitzt drei Tryptophanreste, die als intrinsische Fluorophore verwendet werden können. Durch eine Substratbindung kommt es bei dem Substratbindeprotein zu einer Konformationsänderung, was wiederum eine Veränderung der Tryptophan-Fluoreszenz bewirkt. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen der oben genannten Substrate vermessen. Es konnte jedoch weder mit dem beschriebenen Substrat von YiaO, 2,3-Diketo-L-Gulonat (Thoma *et al.*, 2006), noch mit dem potentiellen Substrat Pyruvat eine veränderte Tryptophan-Fluoreszenz beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Vermutlich ist das gereinigte Protein nicht aktiv und daher kann das Substratspektrum mit dieser Methode nicht untersucht werden.

Mit radioaktiven Aufnahmemessungen konnte eine Reduktion der Pyruvataufnahme der Stämme  $\Delta yiaO$ ,  $\Delta yiaM$  und  $\Delta yiaN$  gezeigt werden, was auf eine Beteiligung des TRAP Transporters am Pyruvatimport hinweist. Zur weiteren Untersuchung, ob AnsP und YiaMNO am Import von Pyruvat in *E. coli* beteiligt sind, sind weitere Untersuchungen notwendig.

### 3.2 Biochemische Charakterisierung des Pyruvatimporters aus *C. glutamicum*

Im Gegensatz zu *E. coli* besitzt *C. glutamicum* ein bereits charakterisiertes Pyruvataufnahmesystem. Es handelt sich dabei um den sekundär aktiven Transporter MctCB. Dieses Transportsystem besteht aus zwei Einheiten, einer großen Untereinheit MctC, und einer kleinen Untereinheit, die als MctB bezeichnet wird (Jolkver *et al.*, 2009). Die Funktion der kleinen Untereinheit ist bislang noch ungeklärt und sollte über Interaktions-Studien *in vivo* und *in vitro* untersucht werden. Die Interaktion *in vivo* wurde mit Hilfe des *Bacterial two hybrid*-System untersucht. Dazu wurden die Gene, die die zwei zu untersuchenden Proteine codieren in die Vektoren pKT25 oder pKNT25 mit dem T25 Fragment und pUT18 mit dem T18 Fragment kloniert. Die zwei Plasmide wurden anschließend in kompetente BTH101 Zellen transformiert. Nach der Transformation wurden 3 µl der Zellen auf LB-X-Gal-Agar getropft und für 2 Tage bei 30°C inkubiert (Abb. 34). Blaue Kolonien zeigten eine Interaktion zweier Proteine, weiße Kolonien wiesen dagegen keine Interaktion der beiden Proteine auf. Mit dieser Methode konnte keine Interaktion der beiden Proteine MctB und MctC nachgewiesen werden (Abb. 34). Möglicherweise wurden die Proteine nicht exprimiert und daher ließ sich keine Interaktion mit Hilfe des *Bacterial two hybrid*-System nachweisen.



Abb. 34: Wachstum der mit beiden Plasmiden (pKT25\_ *mctB* und pUT18\_ *mctC* sowie pKNT25\_ *mctB* und pUT18\_ *mctC*) versehenen BTH101 Zellen, sowie Positiv- und Negativkontrolle auf LB-X-Gal-Agar. Blaue Kolonien zeigen eine Interaktion zweier Proteine, weiße Kolonien dagegen keine.

## ERGEBNISSE

---

Für die Interaktions-Studien *in vitro* wurden zunächst einige Expressionsplasmide erstellt (Tab. 6 und 7) und die Expression von *mctB* und *mctC* unter unterschiedlichen Bedingungen überprüft. Dabei wurden unterschiedliche Medien (Minimal- und Vollmedien), Temperaturen sowie unterschiedliche IPTG- bzw. AHT-Konzentrationen gewählt. Nach einer erfolgreichen Expression sollten die Proteine affinitätschromatographisch gereinigt und in Liposomen rekonstituiert werden. Anschließend sollte der Import von Pyruvat mit radioaktiv markiertem Pyruvat überprüft werden.

Tab. 6: Verwendete Plasmide sowie die Position der jeweiligen Tags für die Expression von *mctB* bzw. *mctC* in *C. glutamicum*. His: Histidin.

<b>Plasmid</b>	<b>Eigenschaft</b>
pEKex2_ <i>mctC</i> -S	C-terminaler Strep-Tag
pEKex2_H- <i>mctC</i>	N-terminaler His-Tag
pEKex2_ <i>mctB</i> -S	C-terminaler Strep-Tag
pEKex2_H- <i>mctB</i>	N-terminaler His-Tag
pXMJ19_ <i>mctB</i> -S	C-terminaler Strep-Tag
pXMJ19_S- <i>mctB</i>	N-terminaler Strep-Tag
pXMJ19_H- <i>mctB</i>	N-terminaler His-Tag
pXMJ19_H- <i>mctC</i>	N-terminaler His-Tag
pXMJ19_S- <i>mctC</i>	N-terminaler Strep-Tag
pEKex3_ <i>mctB</i> -S	C-terminaler Strep-Tag
pEKex3_S- <i>mctB</i>	N-terminaler Strep-Tag
pEKex3_H- <i>mctC</i>	N-terminaler His-Tag
pEKex3_H- <i>mctB</i>	N-terminaler His-Tag
pEKex3_S- <i>mctC</i>	N-terminaler Strep-Tag
pEKex-GFP_ <i>mctB</i>	N-terminales GFP
pEKex-GFP_ <i>mctC</i>	N-terminales GFP

Tab. 7: Verwendete Plasmide sowie die Position der jeweiligen Tags für die Expression von *mctB* bzw. *mctC* in *E. coli*. MBP: Maltosebindeprotein.

Plasmid	Eigenschaft
pASK-IBA5_S- <i>mctC</i>	N-terminaler Strep-Tag
pASK-IBA3_ <i>mctC</i> -S	C-terminaler Strep-Tag
pASK-IBA3_ <i>mctB</i> -S	C-terminaler Strep-Tag
pMAL-p5X_ <i>mctC</i>	N-terminales MBP
pMAL-p5X_ <i>mctB</i>	N-terminales MBP

Es konnte jedoch in keinem der getesteten Systeme eine Expression von *mctB* und *mctC* in *C. glutamicum* bzw. *E. coli* nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Daher konnten die geplanten *in vitro* Studien nicht durchgeführt werden.

### 3.3 Identifikation des Succinatexporters SucE aus *C. glutamicum*

#### 3.3.1 Bioinformatischer Ansatz zur Identifikation potentieller Succinatexporter

Zur Identifikation des Succinatexporters SucE wurde ein bioinformatischer Ansatz gewählt. Dazu wurden die Proteinsequenzen von *C. glutamicum*, *Actinobacillus succinogenes* und *Mannheimia succiniciproducens* miteinander verglichen. Bei *A. succinogenes* und *M. succiniciproducens* handelt es sich um Gram-negative, capnophile Bakterien des Pansen, die unter anaeroben Bedingungen große Mengen von Succinat produzieren (McKinlay *et al.*, 2007). Zunächst wurden alle Proteinsequenzen von *C. glutamicum* (3057 Proteine), *A. succinogenes* (2079 Proteine) und *M. succiniciproducens* (2384 Proteine) miteinander verglichen. Mit Hilfe des Programms TMHMM konnte die Anzahl der Transmembrandomänen der Proteine bestimmt werden, dabei wurden 793 (*C. glutamicum*), 481 (*A. succinogenes*) und 530 (*M. succiniciproducens*) Proteine mit einer oder mehr Transmembrandomänen identifiziert (Huhn *et al.*, 2011). Parallel dazu wurden bidirektionale Vergleiche durchgeführt, um alle Proteinsequenzen von *A. succinogenes* und *M. succiniciproducens*, *A. succinogenes* und *C. glutamicum* sowie alle Proteinsequenzen von *M. succiniciproducens* und *C. glutamicum* miteinander zu vergleichen (Huhn *et al.*, 2011). In den Succinatproduzenten *A. succinogenes* und *M. succiniciproducens* wurden 1684 ähnliche Proteine

gefunden. Beim Vergleich von *C. glutamicum* mit *A. succinogenes* oder *M. succiniciproducens* konnten in beiden Fällen 591 ähnliche Proteine entdeckt werden. In allen drei Organismen wurden 533 ähnliche Proteine identifiziert, von denen 57 Proteine mehr als vier Transmembrandomänen besitzen (Abb. 35). Davon wurden 16 sekundäraktive- und vier ABC-Transporter als putative Exporter identifiziert. Von 12 der 20 Transporter konnten Insertionsmutanten erstellt werden (Huhn *et al.*, 2011). Um die Ausscheidung von Succinat zu bestimmen wurden Wachstumsexperimente mit diesen Mutanten unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Anschließend erfolgte der Nachweis von Succinat im Überstand mittels HPLC-Analyse. Einer dieser Kandidaten zeigte eine signifikant geringere Exkretion von Succinat (Huhn *et al.*, 2011).

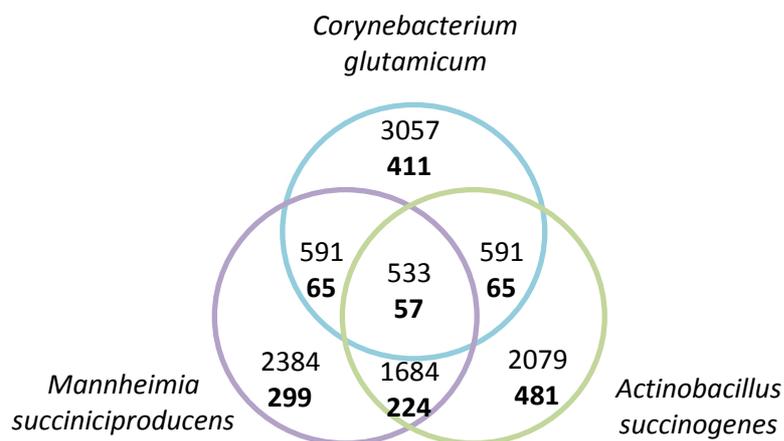


Abb. 35: Anzahl der homologen Gesamtproteine und Proteine mit mehr als drei Transmembrandomänen (Fett) von *C. glutamicum* (blau), *Mannheimia succiniciproducens* (violette) und *Actinobacillus succinogenes* (grün) im Vergleich. In den überlappenden Bereichen sind die ähnlichen Proteine nach der Durchführung von bidirektionale Vergleichen gezeigt (Huhn *et al.*, 2011).

Für die weitere biochemische Charakterisierung von SucE wurde die Akkumulation von radioaktivem Succinat in der Mutante *IsucE* im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Dazu wurden radioaktive Aufnahmemessungen mit [<sup>14</sup>C]-Succinat unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Aufnahme der Mutante *IsucE* doppelt so hoch wie die des Wildtyps ist (Abb. 36), was eine Beteiligung von SucE am Export von Succinat bestätigt.

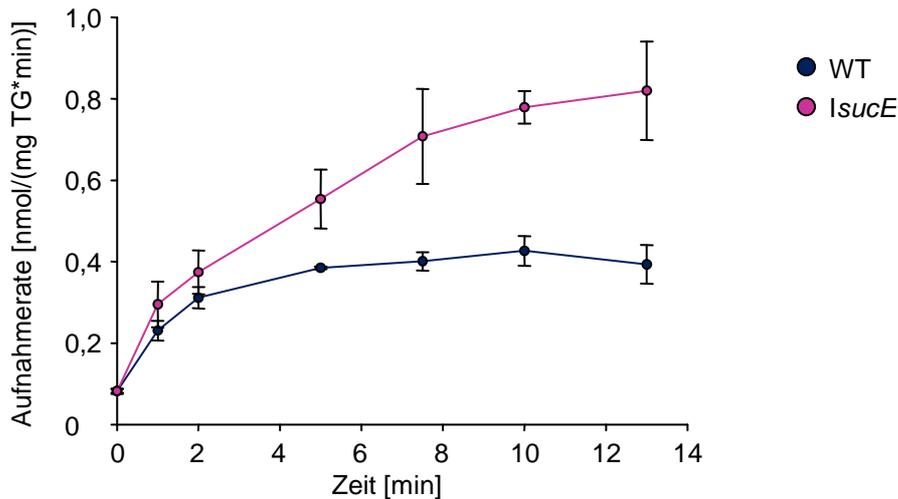


Abb. 36: Aufnahme von [ $^{14}\text{C}$ ]-Succinat durch *C. glutamicum* WT und *IsucE* (n=3).

Mit dieser Messung wurde die Radioaktivität der Probe bestimmt, man konnte aber keine Aussage über eine eventuelle Verstoffwechslung des Succinats treffen. Die Messung lief über einen Zeitraum von 13 min daher ist es möglich, dass ein Teil des Succinats bereits verstoffwechselt wurde und daher das [ $^{14}\text{C}$ ]-Atom Teil dieses Stoffwechselproduktes ist. Um dies auszuschließen wurden Proben vor Beginn der Messung und zum Ende der Messung mittels Dünnschichtchromatographie untersucht. Dabei wurden, anstelle gleicher Volumen, gleiche radioaktive Mengen aufgetragen, da so die Stärker der einzelnen Punkte besser verglichen werden konnten.

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den detektierten Punkten der Probe des Wildtyps und der Probe der Mutante festgestellt werden (Abb. 37). Neben Succinat wurde in allen Proben ein zusätzlicher Punkt beobachtet. Allerdings wurde dieses Signal bereits im Ausgangssubstrat detektiert. Im Verlauf der Messung verstärkte sich dieses Signal im Wildtyp und in der Mutante *IsucE* gleichermaßen (Abb. 37). Somit wurde das Succinat in der Mutante, die das Succinat-Exportsystem nicht besitzt, tatsächlich stärker akkumuliert (Abb. 36).

## ERGEBNISSE

---

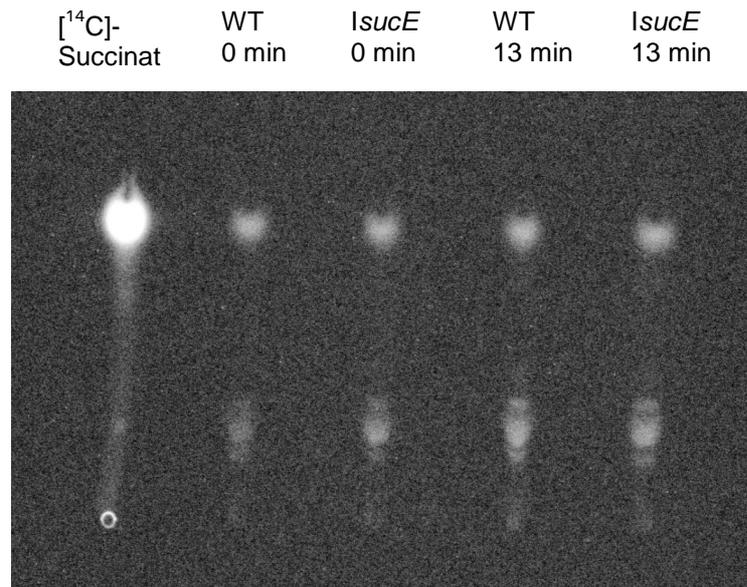


Abb. 37: DC von intrazellulärem Succinat des Wildtyps und der Mutante *IsucE* 1: 0,5 µl [<sup>14</sup>C]-markiertes Succinat; 2: Wildtyp (0 min); 3: *IsucE* (0 min); 4: Wildtyp (13 min); 5: Mutante *IsucE* (13 min).

Mit Hilfe von *Pulse-Chase*-Experimenten sollte zusätzlich der Export von Succinat in der Mutanten *IsucE* und im Wildtyp überprüft werden. Dabei wurden die Zellen zunächst mit dem radioaktiv markierten Succinat bis zum Fließgleichgewicht beladen. Durch Zugabe von unmarkiertem Succinat im Überschuss wurde die weitere Aufnahme des markierten Substrates unterbunden, da dies so stark verdünnt wird, dass es zu keiner messbaren Aufnahme des markierten Succinat kommt. Der Export konnte dann durch die Abnahme des akkumulierten radioaktiven Succinats gemessen werden. Sowohl im Wildtyp als auch in der Mutanten *IsucE* konnte ein Absinken des akkumulierten radioaktiven Succinat festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Da der Mutante *IsucE* das Exportsystem für Succinat fehlt, sollte eigentlich keine Abnahme des radioaktivmarkierten Succinat zu beobachten sein.

Zudem zeigte die Inaktivierung von *sucE* zwar eine Reduktion der Exkretion von Succinat, aber es konnte mit Hilfe von HPLC-Analysen immer noch 690 µmol mg TG<sup>-1</sup> Succinat im Medium nachgewiesen werden, was ungefähr der Hälfte des Wildtyps entsprach (Huhn *et al.*, 2011). Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass von der Existenz eines weiteren Exporters für Succinat ausgegangen werden kann.

Zur Überprüfung, ob SucE neben dem Export auch am Import von Scuccinat beteiligt ist, wurden zunächst Wachstumsversuche mit Succinat als C-Quelle durchgeführt.

## ERGEBNISSE

Dazu wurden die Stämme *C. glutamicum* WT, WT\_pXMJ19\_sucE, der das Succinat Exportsystem SucE überexprimiert und WT\_pVWEx1\_dccT, der den Succinat Importer DccT überexprimiert in MM1-Medium mit 100 mM Succinat als C-Quelle und als Kontrolle MM1-Medium mit 25 mM Glucose als C-Quelle kultiviert. Parallel dazu wurden nach 0, 9 und 24 h Proben entnommen und die Konzentration an Succinat im Medium mittels HPLC-Analyse untersucht. Die Stämme *C. glutamicum* WT und WT\_pXMJ19\_sucE zeigten mit Succinat als einziger C-Quelle kein signifikantes Wachstum, sie erreichen nur eine OD<sub>600</sub> von 1 bzw. 2 nach 24 h Inkubation. Bei dem Stamm WT\_pVWEx1\_dccT konnte dagegen ein deutliches Wachstum mit einer OD<sub>600</sub> von 7 nach 24 h Inkubation beobachtet werden (Abb. 38). Der Verbrauch von Succinat aus dem Medium bestätigte dieses Ergebnis. Der Stamm WT\_pVWEx1\_dccT verbrauchte während des Wachstumsversuchs das im Medium vorhandene Succinat vollständig. Die Stämme *C. glutamicum* WT und WT\_pXMJ19\_sucE zeigten dagegen keinen Succinatverbrauch (Abb. 38).

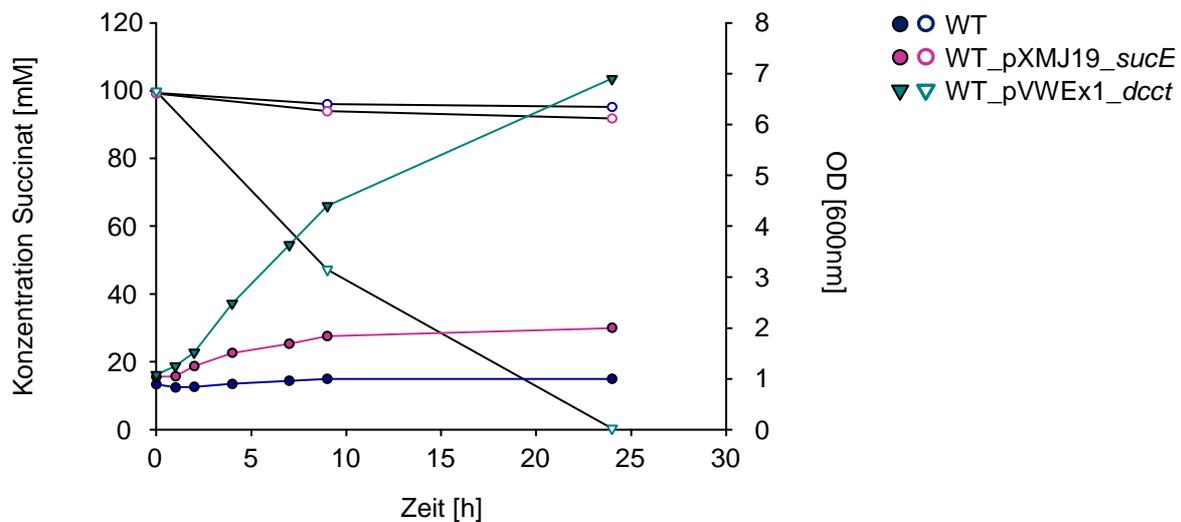


Abb. 38: Wachstum von *C. glutamicum* WT, WT\_pXMJ19\_sucE und WT\_pVWEx1\_dccT in MM1-Medium mit 100 mM Succinat als C-Quelle (farbige Linien) und Verbrauch von Succinat (schwarze Linien).

Bei dem Kontrollversuch mit Glucose als C-Quelle zeigten alle drei Stämme ähnliche Wachstumskurven und einen identischen Verbrauch von Glucose aus dem Medium (Abb. 39).

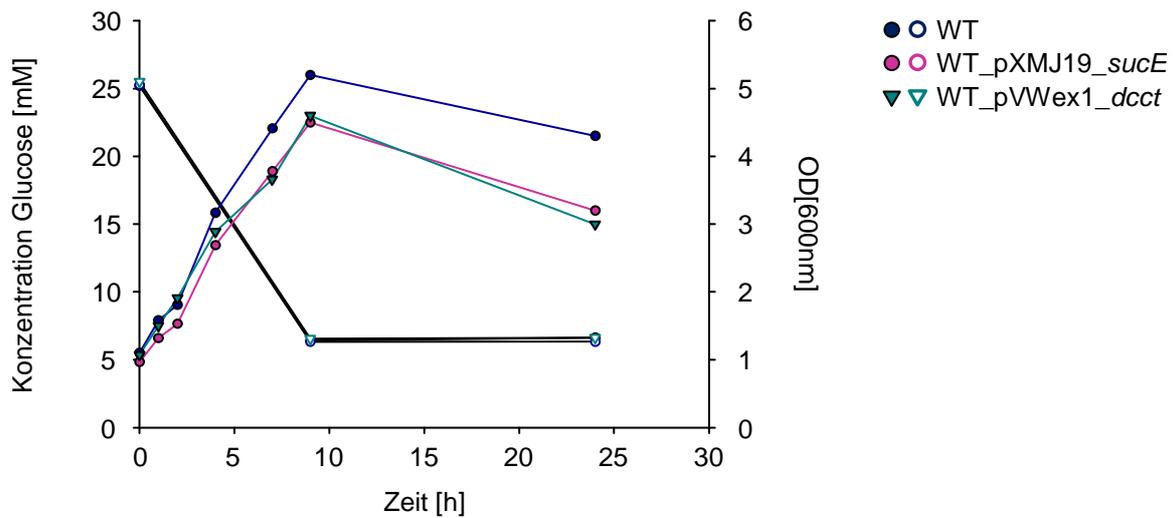


Abb. 39: Wachstum von *C. glutamicum* WT, WT\_pXMJ19\_sucE und WT\_pVWEx1\_dccT in MM1-Medium mit 25 mM Glucose als C-Quelle (farbige Linien) und Verbrauch von Glucose (schwarze Linien).

Neben dem Wachstumsverhalten wurde auch die Aufnahme von Succinat untersucht. Dazu wurden Aufnahmemessungen mit radioaktiv markiertem [<sup>14</sup>C]-Succinat unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Aufnahmerate der Mutante WT\_pXMJ19\_sucE identisch mit der Aufnahmerate des Wildtyps war und nur den sehr geringen Wert von 0,02 nmol/(mg TG\*min) erreichte (Tab. 8). Bei der Mutante WT\_pVWEx1\_dccT konnte dagegen, wie erwartet, eine deutlich größere Aufnahmerate von 32 nmol/(mg TG\*min) gemessen werden (Huhn *et al.*, 2011).

Tab. 8: Succinat Aufnahmerate von *C. glutamicum* WT, WT\_pXMJ19\_sucE und WT\_pVWEx\_dccT.

	WT	WT_pXMJ19_sucE	WT_pVWEx_dccT
Aufnahmerate			
[nmol/(mg TG*min)]	0,02 ± 0,002	0,02 ± 0,002	32 ± 5

Die Ergebnisse zeigen, dass SucE neben weiteren unbekanntem Succinatexportern am Export von Succinat in *C. glutamicum* beteiligt ist. Die Beteiligung von SucE am Import von Succinat konnte dagegen ausgeschlossen werden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Carbonsäure-Import

#### 4.1.1 In *E. coli* sind mehrere Transporter am Pyruvatimport beteiligt

Kenntnisse über Importsysteme sind von großem Interesse für die biotechnologische Produktion. Eine Wiederaufnahme bereits ausgeschiedener Produkte würde die Produktionsrate senken. Durch die Inaktivierung des Importers kann dieser sogenannte *futile cycle* unterbunden werden und die Zellen verbrauchen keine zusätzliche Energie durch die Wiederaufnahme des Produktes (Burkovski und Krämer, 2002).

Bisher sind nur wenige bakterielle Pyruvatimporter bekannt, wie der sekundär aktive Transporter MctCB aus *C. glutamicum* (Jolkver *et al.*, 2009) und der TRAP Transporter TRAP-T von Cyanobacterium *Anabaena sp.* strain PCC 7120 (Pernil *et al.*, 2010). Zudem sind die Substratbindeproteine der TRAP Transporter DctPQM aus *R. capsulatus* (Thomas *et al.*, 2006) und TakPQM aus *R. sphaeroides* (Gonin *et al.*, 2007) an der Bindung von Pyruvat beteiligt.

Bei dem Pyruvatimporter in *E. coli* handelt es sich um ein sekundär aktives Transportsystem. Eine Beteiligung eines primär aktiven Systems am Import von Pyruvat kann sehr wahrscheinlich ausgeschlossen werden, da nach Zugabe von CCCP keine Aufnahme von Pyruvat mehr messbar war. Auch eine Diffusion von Pyruvat konnte ausgeschlossen werden, weil bei der Pyruvataufnahme eine Sättigung beobachtet wurde und nicht, wie bei Diffusion üblich, eine linear ansteigende Substrataufnahme in Abhängigkeit der Substratkonzentration stattfand. Da auch durch Zugabe von CCCP die Pyruvataufnahme in dem gemessenen Konzentrationsbereich nahezu vollständig inhibiert wurde, ist eine Diffusion sehr unwahrscheinlich, da diese trotz Zugabe von CCCP stattgefunden hätte.

Der apparente  $K_m$ -Wert des Pyruvatimports wurde mit  $8,2 \mu\text{M}$  bestimmt und liegt damit in der gleichen Größenordnung wie der zuvor von Lang *et al.* (1987) ermittelte  $K_m$ -Wert von  $18 \mu\text{M}$ . Durch Konkurrenzexperimente mit verschiedenen Aminosäuren und Carbonsäuren konnte zudem gezeigt werden, dass mindestens einer der Pyruvatimporter auch Ketovalin und Bromopyruvat bindet und/oder transportiert.

Zu Beginn der Aufnahmemessungen mit radioaktiv markiertem Pyruvat traten immer wieder starke Schwankungen in den Messungen auf. Nach Überprüfung mittels Dünnschichtchromatographie stellte sich heraus, dass das verwendete Produkt weitere radioaktive Substanzen beinhaltet. Das konnte ebenfalls für alternatives, von einer anderen Firma, geliefertes Pyruvat nachgewiesen werden. Durch Literaturrecherche wurde festgestellt, dass Pyruvat in H<sub>2</sub>O instabil ist und durch Dimerisierung zu Parapyruvat umgewandelt wird (Montgomery *et al.*, 1956; Montgomery und Webb, 1956). Schließlich konnte neusynthetisiertes Pyruvat geliefert werden, welches durch Lagerung bei -80°C stabil blieb und in den aufgeführten Messungen eingesetzt wurde. Auch Lang *et al.* (1987) konnte mittels Dünnschichtchromatographie nachweisen, dass nach 5-10 min nach Start der Aufnahmemessung 30-40 % des Pyruvats in vier unbekannte Substanzen aufgetrennt wurde. Nach 2 min wurde dagegen nur ein Punkt nachgewiesen, was bedeuten würde, dass die vorliegende Substanz rein war. Es wurde allerdings nicht erwähnt, ob die Identität chemisch nachgewiesen wurde.

Für die Messungen in dieser Arbeit konnten Bedingungen etabliert werden, die die Reinheit und Identität des verwendeten Pyruvats sicherstellten.

Zur Identifikation des Pyruvatimporters in *E. coli* wurde eine Transposonmutagenese und anschließende Selektion von Mutanten in Anwesenheit von Bromopyruvat durchgeführt. Dabei konnte eine maximale Transposoneffizienz von 0,368 % erreicht werden. Diese liegt aus unbekanntem Gründen deutlich unter den Literaturwerten, die bei 1-5 % liegen (Madhusudan *et al.*, 2005). Trotz dieser geringen Transposoneffizienz war es möglich, positive Klone zu identifizieren.

Auffällig war, dass bei Selektion auf Bromopyruvat mehr als ein putativer Bromopyruvatimporter bzw. Pyruvatimporter gefunden wurde. Wenn mehr als ein Bromopyruvatimporter existiert, müssten die Zellen in Anwesenheit der toxischen Substanz absterben. Selbst wenn das Transposon in einem Gen lokalisiert ist, das einen Bromopyruvatimporter codiert, kann ein weiteres aktives Aufnahmesystem Bromopyruvat in die Zelle transportieren. Dass nun mehr als ein potentieller Bromopyruvatimporter Kandidat gefunden wurde, hängt vermutlich mit der zusätzlichen Mutation des *cra* Gens zusammen. Weiterhin denkbar ist, dass einige Effluxpumpen induziert sind. Diese Transporter sind am unspezifischen Export von cytotoxischen Substanzen beteiligt und können auch am Ausschleusen von

Bromopyruvat aus der Zelle beteiligt sein, womit die auftretende Resistenz erklärbar ist.

Allerdings konnten vier Gene mit Hilfe der Transposonmutagenese identifiziert werden, die Transportproteine codieren. Dabei handelt es sich um die Gene *fruA*, *ansP*, *ybjE* und *yhjE*. FruA ist die Fructose PTS Permease, die eine Komponente des Fructose-PTS-Transporters ist. Dieser Transporter katalysiert den Import und die gleichzeitigen Phosphorylierung von Fructose (Postma *et al.*, 1993), ist aber nach bisherigen Kenntnissen nicht am Import von Pyruvat beteiligt. Zudem sind PTS-Transporter nicht durch CCCP hemmbar, was hingegen für den gesuchten Pyruvatimporter gezeigt wurde. AnsP wird als L-Asparagin Transporter beschrieben, der zur APC Familie zählt (Jennings *et al.*, 1995). YbjE ist ein vorhergesagtes Transportprotein, über dessen Funktion bislang nichts bekannt ist. Ebenfalls ist für YhjE bislang nur bekannt, dass es zur MFS Transporterfamilie zählt. Für YhjE, AnsP und YbjE aus *E. coli* konnten durch Blast-Analysen jeweils zahlreiche Proteine in der Familie Enterobacteriaceae und dabei hauptsächlich der Gattungen *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Kebsiella* und *Enterobacter* gefunden werden, die eine hohe Ähnlichkeit mit den Proteinen aufweisen, was auf eine konservierte Funktion des jeweiligen Proteins hindeutet.

Die drei Kandidaten *ansP*, *ybjE* und *yhjE* wurden durch Aufnahmemessungen mit [<sup>14</sup>C]-Pyruvat weiter charakterisiert. Dabei konnten für die Mutanten  $\Delta yhjE$  und  $\Delta ansP$ , im Vergleich zum Wildtyp eine um ein Drittel geringere Pyruvataufnahmerate beobachtet werden. Die Mutante  $\Delta ybjE$  zeigte dahingegen eine zum Wildtyp identische Pyruvataufnahmerate und wurde daher nicht weiter als potentieller Pyruvatimporter untersucht. Wachstumsexperimente mit Pyruvat als einzige C-Quelle zeigten ein identisches Wachstumsverhalten der Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp und ergaben keine weiteren Erkenntnisse über die Beteiligung am Pyruvatimport. Wachstumsexperimente in Anwesenheit des toxischen Bromopyruvats ergaben, dass die Mutante  $\Delta yhjE$  als einzige der getesteten Mutanten wachstumsfähig war, was die Vermutung der Beteiligung von YhjE am Pyruvatimport bestärkt. Die durchgeführten Aufnahmemessungen mit [<sup>14</sup>C]-Pyruvat der Doppeldeletion  $\Delta ansP\Delta yhjE$  zeigten, dass immer noch eine Aufnahme von Pyruvat messbar war, was ein eindeutiger Beweis für die Anwesenheit mindestens eines weiteren Pyruvatimporters ist.

Die durch Aufnahmemessungen mit [<sup>14</sup>C]-Pyruvat bestimmten  $K_m$ -Werte des Wildtyps und der Mutanten  $\Delta ansP$  und  $\Delta yhjE$  wiesen keinen deutlichen Unterschied auf, was darauf hindeutet, dass neben zwei möglichen, niedrig affinen Pyruvataufnahmesystemen noch mindestens ein hoch affines Aufnahmesystem existieren muss. Dies ist eher ungewöhnlich, meist liegt ein niedrig- und ein hochaffines System vor, wie beispielsweise die Aufnahmesysteme für Methionin MetD und MetP aus *E. coli* (Kadner, 1974; Kadner und Winkler, 1975) oder auch die Methioninimporter MetQNI und MetPS aus *C. glutamicum* (Trötschel *et al.*, 2008). Häufig existiert auch nur ein einziges Aufnahmesystem. Für *C. glutamicum* ist beispielsweise beschrieben, dass nur MctCB am Import von Pyruvat beteiligt ist (Jolkver *et al.*, 2009).

Diese offensichtliche Multiplizität des Pyruvatimports in *E. coli* macht die Identifikation des Pyruvataufnahmesystems schwierig. Was bisherige erfolglose Versuche auch dokumentieren, so konnte Lang *et al.* (1987) bereits die Charakterisierung des Pyruvatimporters in *E. coli* beschreiben, allerdings konnte sie diesen nicht identifizieren, was auch Gerharz (2003) nicht gelang. In dieser Arbeit ist es gelungen, mit YhjE, AnsP und YiaMNO Kandidaten zu identifizieren, deren Inaktivierung eine deutliche Reduktion der Pyruvataufnahme hervorrufen.

Die Analyse des Imports lässt auch Schlussfolgerung über den Export zu. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen, dass eine Diffusion von Pyruvat in dem gemessenen Konzentrationsbereich keine Rolle spielt, was bedeutet, dass ein aktiver Export von Pyruvat erforderlich ist.

### **4.1.2 YhjE ist zusätzlich am Import von Bromopyruvat beteiligt**

Die Mutante  $\Delta yhjE$  zeigte im Vergleich zum Wildtyp bei Wachstum in Anwesenheit von Bromopyruvat eine erhöhte Resistenz gegenüber dieser toxischen Substanz. Zudem konnte durch die Expression von *yhjE* der bromopyruvatresistente Phänotyp der Mutante  $\Delta yhjE$  komplementiert und damit die Sensitivität gegenüber der toxischen Substanz wiederhergestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass YhjE am Import von Bromopyruvat beteiligt ist. Dabei stellt diese toxische Substanz sehr wahrscheinlich nur das Nebensubstrat dieses Importsystems dar. Die eigentlichen Hauptsubstrate sind sehr wahrscheinlich Pyruvat und Ketovalin.

Die Selektion mit toxischen Strukturanalogen, die in dieser Arbeit angewendet wurde, ist eine gängige Methode zur Identifizierung von Import- oder Exportsystemen, da diese häufig, wie das eigentlich gesuchte Hauptsubstrat von dem Transportsystem gebunden und/oder transportiert werden.

Um eine endgültige Beteiligung von YhjE am Import von Bromopyruvat zu bestätigen, müsste das Protein YhjE aufgereinigt und in Liposomen rekonstituiert werden, um anschließend radioaktive Aufnahmemessungen mit [<sup>14</sup>C]-Bromopyruvat durchzuführen. Bromopyruvat ist allerdings kommerziell nicht in markierter Form erhältlich, so dass ein radioaktiver Aufnahmenachweis nicht möglich ist.

Zudem könnte eine heterologe Expression von YhjE in einem Stamm, in dem nachweislich keine Bromopyruvataufnahme stattfindet, untersucht werden. Nach erfolgreicher Expression könnten mittels Wachstumsexperimenten in Anwesenheit von Bromopyruvat die endgültige Beteiligung von YhjE am Import von Bromopyruvat bestätigt werden.

### **4.1.3 Für die Charakterisierung von YiaMNO und AnsP sind weitere biochemische Untersuchungen notwendig**

Da bei der Doppeldeletion  $\Delta yhjE \Delta ansP$  die Pyruvataufnahme nur reduziert, diese aber nicht vollständig unterbunden war, müssen weitere Pyruvataufnahmesysteme existieren. Einige TRAP Transporter sind am Import bzw. an der Bindung von Pyruvat beteiligt. Daher wurde in dieser Arbeit überprüft, ob der TRAP Transporter YiaMNO aus *E. coli* ebenfalls den Import von Pyruvat katalysiert. Dazu wurden zunächst Aufnahmemessungen mit [<sup>14</sup>C]-Pyruvat durchgeführt. Die Pyruvataufnahmerate in den Mutanten  $\Delta yiaM$ ,  $\Delta yiaN$  und  $\Delta yiaO$  war um ein Drittel geringer als die des Wildtyps, was auf eine Beteiligung von YiaMNO am Import von Pyruvat hindeutet.

Durch Experimente, mit dem gereinigtem Substratbindeprotein YiaO konnte bereits gezeigt werden, dass dieses 2,3-Diketo-L-Gulonat bindet (Thomas *et al.*, 2006). Daher sollte mit der gleichen Methode ebenfalls eine Bindung von Pyruvat überprüft werden. Dazu wurde das Protein zunächst mittels Affinitätschromatographie gereinigt und anschließend Messungen der Tryptophanfluoreszenz durchgeführt. Dabei konnte weder mit dem beschriebenen Substrat 2,3-Diketo-L-Gulonat, noch mit den untersuchten potentiellen Substraten Pyruvat und Ketovalin eine veränderte

Tryptophan-Fluoreszenz gemessen werden. Die Aufreinigung des Proteins war bereits problematisch und es konnte nur eine, mit anderen Proteinen, verunreinigte Probe eingesetzt werden, die diese Messung möglicherweise störten. Zudem besteht die Möglichkeit, dass das gereinigte Protein nicht aktiv war und daher keine Bindung stattfand. Man könnte in weiteren Experimenten das Protein mit anderen Tags versehen, z. B. mit einem Strep-Tag, um so eine bessere Aufreinigung zu erzielen und eine mögliche Bindung nachzuweisen.

Der weitere Kandidat AnsP zeigte ebenfalls bei Aufnahmemessungen mit [<sup>14</sup>C]-Pyruvat im Vergleich zum Wildtyp eine Reduktion der Aufnahmerate um ungefähr ein Drittel, was eine Beteiligung am Import von Pyruvat vermuten lässt. Bei AnsP handelt es sich um einen putativen L-Asparagin Transporter, der zur APC Familie zählt. Dieser wurde aufgrund der Sequenzähnlichkeit zu *ansP* aus *Salmonella enterica* als solcher eingeordnet (Jennings *et al.*, 1995). Durch radioaktive Aufnahmemessungen mit 100 µM [<sup>14</sup>C]-Asparagin konnten Jennings *et al.* (1995) nach 30minütiger Messung lediglich eine L-Asparagin Aufnahmerate von 2,5 nmol (mg Protein)<sup>-1</sup> nachweisen. Bei geringeren Substratkonzentrationen, sowie bei Messungen unter 30 min wurde hingegen keine Aufnahme von L-Asparagin beobachtet (Jennings *et al.*, 1995). Daher lässt sich nicht eindeutig klären, ob AnsP tatsächlich am Export von L-Asparagin in *S. enterica* beteiligt ist. Ob AnsP aus *E. coli* überhaupt an einer Aufnahme von L-Asparagin beteiligt ist, müsste zunächst durch Aufnahmemessungen mit [<sup>14</sup>C]-L-Asparagin geklärt werden. Die Wettbewerbsversuche mit verschiedenen Aminosäuren in Abschnitt 3.1.2 zeigten bereits, dass eine Zugabe von Asparagin die Pyruvataufnahme nicht inhibiert, was den Import von Asparagin durch das Pyruvataufnahmesystem sehr unwahrscheinlich macht.

Um die Beteiligung von YhjE, AnsP und YiaMNO am Import von Pyruvat zu bestätigen, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Dabei könnten beispielsweise Zweifach- und Dreifachdeletionen von *yhjE*, *ansP* und *yiaO* weitere Erkenntnisse über die Beteiligung der drei Kandidaten am Pyruvatimport liefern. Nach Herstellung dieser Mutanten könnten durch Wachstumsversuche auf Pyruvat als einzige C-Quelle und Aufnahmemessungen mit [<sup>14</sup>C]-Pyruvat überprüft werden,

ob die Kandidaten tatsächlich am Import beteiligt sind bzw. ob es weitere Pyruvataufnahmesysteme gibt.

Außerdem könnte die heterologe Expression jeweils von *yhjE*, *ansP* und *yiaMNO* in dem Stamm *C. glutamicum*  $\Delta mctCB$  zusätzliche Beweise liefern. Der Stamm  $\Delta mctCB$  besitzt kein Pyruvataufnahmesystem und ist nicht in der Lage auf Pyruvat als einzige C-Quelle zu wachsen (Jolkver *et al.*, 2009). Bei einer Expression des putativen Pyruvatimporters sollte dieser Stamm in der Lage sein Pyruvat als C-Quelle zu verwerten. Diese *in vivo* Ansätze setzen allerdings voraus, dass *yhjE*, *ansP* und *yiaMNO* in *C. glutamicum* exprimiert werden.

Des Weiteren könnten in einem *in vitro* System mit der Rekonstitution der Proteine in Liposomen und anschließenden Aufnahmemessungen mit radioaktiv markiertem Pyruvat weitere Erkenntnisse liefern. Dies setzt allerdings voraus, dass die Proteine erfolgreich gereinigt werden können und in ihrer Aktivität nicht beeinflusst sind.

Sollte sich zeigen, dass weitere Pyruvatimporter vorhanden sind, könnten diese mit Hilfe einer *E. coli* Genbank identifiziert werden. Dazu könnten die durch Restriktion hergestellten *E. coli*-Fragmente aus dem Genom der Tripelmutante  $\Delta yhjE\Delta ansP\Delta yiaMNO$ , in einen *C. glutamicum* Vektor (pKEKEx2, pXMJ19) kloniert und in den Stamm *C. glutamicum*  $\Delta mctCB$  transformiert werden. Dieser Stamm besitzt kein Pyruvataufnahmesystem (Jolkver *et al.*, 2009), so dass eine Selektion auf Pyruvat als einzige C-Quelle möglich ist. Durch eine Komplementation könnten weitere Gene identifiziert werden, die möglicherweise den bzw. die Pyruvatimporter codieren.

#### **4.1.4 Die *cra*-abhängige Regulation der Gluconeogenese könnte für die biotechnologische Produktion genutzt werden**

Keine der durch Selektion auf Bromopyruvat gewonnenen Mutanten konnte Pyruvat als C-Quelle verwerten. Die Deletionsmutanten der ausgewählten Kandidaten konnten hingegen unter denselben Bedingungen wachsen. Für diesen Wachstumsphänotyp muss eine weitere Mutation verantwortlich sein. Da es sich hierbei um eine Mutation in dem gesuchten Pyruvatimporter handeln könnte, wurde nach dem betroffenen Gen gesucht. Dazu wurde eine Genbank, bestehend aus *E. coli* Genomfragmenten, in eine beliebige Transposonmutante transformiert und auf

M9-Agarplatten mit Pyruvat als C-Quelle selektioniert. Die Sequenzierung zweier Mutanten zeigte, dass das enthaltene Genbankfragment die Gene *mraZ* und *cra*, sowie die ersten 200 bp des Gens *rsmH* enthält. Das *mra* (*murein region A*) Gencluster codiert Proteine, die an der Zellwandbiosynthese und Zellteilung beteiligt sind. Zu diesem Gencluster zählt auch das Gen *mraZ*, dessen Funktion bislang nicht bekannt ist. Aufgrund seiner Lokalisation wird vermutet, dass es eine Rolle in der Zellwandbiosynthese und Zellteilung spielt (Adams *et al.*, 2005).

Bei *cra* handelt es sich um ein *catabolite repressor/activator* Protein (siehe nächster Absatz). Anschließend wurden die *cra* Gene einiger Transposonmutanten sequenziert und dabei festgestellt, dass alle untersuchten Mutanten eine Punktmutation in diesem Gen besaßen. Der Ausgangsstamm *E. coli* DH5 $\alpha$  beinhaltet keine Mutation in dem Gen *cra* und konnte auch Pyruvat als C-Quelle verwerten. Daher muss diese Mutation erst während der Transposonmutagenese erfolgt sein und ist möglicherweise aufgrund des Selektionsdrucks durch Bromopyruvat entstanden.

Cra reguliert die Expression zahlreicher Gene, die Enzyme codieren, die an zentralen Wegen des Kohlenstoffmetabolismus beteiligt sind. Dabei aktiviert Cra die Transkription von Genen, die Schlüssel-Enzyme der Gluconeogenese, des TCA-Zyklus sowie des Glyoxylatzyklus codieren (Bledig *et al.*, 1996; Chin *et al.*, 1987; Ramseier *et al.*, 1995; Saier und Ramseier, 1996). Demgegenüber hemmt Cra die Transkription von Genen, die Schlüssel-Enzyme des Entner-Doudoroff-Weg und der Glykolyse codieren (Bledig *et al.*, 1996; Ramseier *et al.*, 1995; Saier und Ramseier, 1996).

Mutanten, denen das *cra* Gen fehlt, können nicht auf Pyruvat und einigen anderen C-Quellen wie z. B. Alanin, Acetat sowie einigen Zwischenprodukten des TCA-Zyklus, wachsen (Chin *et al.*, 1987). Die Kenntnis über die Funktion von *cra* könnte für die biotechnologische Produktion von Pyruvat und allen anderen aus der Glykolyse und vom TCA-Zyklus abgeleiteten Substraten genutzt werden. Zurzeit wird zur Pyruvatproduktion der Stamm *E. coli* Y2C202 $\Delta$ *ldhA* verwendet. Dieser Stamm besitzt Inaktivierungen einiger Gene und ist nicht mehr in der Lage, Pyruvat zu Acetyl-CoA, Acetat, Formiat, Phosphoenolpyruvat und Lactat umzusetzen (Sahm *et al.*, 2004; Bott *et al.*, 2001; Gerharz *et al.*, 2001). Mit diesem Stamm kann eine Maximalausbeute von 1,78 mol Pyruvat/mol Glucose erreicht werden (Zelic *et al.*,

2003). Damit entspricht diese bereits der maximalen theoretischen Ausbeute von 2 mol Pyruvat/mol Glucose. Eine Erhöhung der Pyruvatproduktionsrate ist auch aufgrund der Ansäuerung des Cytoplasmas kaum möglich.

Die Inaktivierung von *cra* bewirkt, dass der hemmende Effekt auf die Enzyme der Glykolyse und des Entner-Doudoroff-Weg entfällt, so dass möglicherweise mehr Pyruvat und weitere Metabolite der Glykolyse und davon abgeleitete Substanzen produziert werden. Desweiteren fehlt der, durch *cra* hervorgerufene, aktivierende Effekt auf Enzyme der Gluconeogenese und des TCA-Zyklus, also Stoffwechselwegen, die Pyruvat verbrauchen. Dies könnte eine Erhöhung von Zwischenstufen der Glykolyse und davon abgeleiteten Substraten bewirken.

#### **4.1.5 Pyruvataufnahmesystem MctCB aus *C. glutamicum***

In *C. glutamicum* ist das Aufnahmesystem für Pyruvat bereits identifiziert und charakterisiert worden (Jolkver *et al.*, 2009). Es handelt sich um den sekundär aktiven Transporter MctCB, der aus zwei Komponenten, einer großen Untereinheit MctC und einer kleinen Untereinheit MctB besteht.

Auch der sekundär aktive Methionimporter MetPS aus *C. glutamicum* ist wie MctCB aufgebaut und besteht aus zwei Untereinheiten (Trötschel *et al.*, 2008). Transportsysteme mit zwei membrangebundenen Untereinheiten findet man zudem z. B. bei dem BrnFE Exportsystem für Methionin in *C. glutamicum* oder bei den TRAP Transportern (Trötschel *et al.*, 2005; Rabus *et al.*, 1999). Die kleine Untereinheit dieser Transportsysteme besitzt allerdings im Gegensatz zu MctCB meist mehrere Transmembransegmente. Die einzigen, bislang bekannten Transportsysteme mit zwei Untereinheiten, bei der die kleine Untereinheit eine vergleichbare Größe hat, sind die in Eukaryoten vorkommenden Aminosäuretransporter der HAT Familie. Dabei fungiert die große Untereinheit, die aus 12 Transmembransegmenten besteht, als Permease und eine kleine Untereinheit, bestehend aus einem Transmembransegment, vermittelt die Substratspezifität (Chillaron *et al.*, 2001).

Die Funktion der kleinen Untereinheit von MctCB ist bislang noch ungeklärt und sollte über Interaktions-Studien *in vivo* und *in vitro* untersucht werden. Dabei konnte mit Hilfe des *Bacterial two hybrid*-System keine Interaktion nachgewiesen werden. Dies

kann bedeuten, dass beide Proteine nicht miteinander interagieren, oder aber auch dass eines oder beide Gene nicht exprimiert werden.

Auch konnte keine Expression der Gene, die für die *in vitro* Studien benötigt wurden, nachgewiesen werden. Möglicherweise lassen sich beide Proteine nur zusammen exprimieren, was die erfolglosen Einzel-Expressionsversuche erklären könnte. Denkbar ist zudem, dass MctB ähnlich wie beispielsweise KdpF, einen stabilisierenden Effekt auf das gesamte Transportsystem hat. KdpF stabilisiert den KdpFABC-Komplex, ein hochaffiner ATP-abhängiger Kaliumtransporter in *E. coli* (Gaßel *et al.*, 1999). Fungiert MctB beispielsweise als Chaperon, wäre es zudem möglich, dass *mctC* nur zusammen mit *mctB* exprimiert werden kann. Allerdings würde man in diesem Fall erwarten, dass *mctB* alleine exprimiert werden kann.

## 4.2 Carbonsäure-Export

### 4.2.1 SucE ist der erste identifizierte bakterielle Carbonsäure-Exporter

Neben dem Import sind auch Kenntnisse über den Mechanismus von Exportern für die biotechnologische Produktion wichtig. Ein gezielter Export von Succinat ermöglicht beispielsweise eine bessere Trennung des Produkts von den Zellen. Zudem wird die interne Konzentration an Succinat verringert, die sonst einen negativen Effekt auf die Synthese von Succinat haben könnte. Daher führt eine Verringerung der internen Succinatkonzentration auch zu einer höheren Produktivität.

Obwohl der Export von Lactat, Succinat, Acetat, Malat und Pyruvat beobachtet wurde (Inui *et al.*, 2004; Blombach *et al.*, 2007; Jolkver 2008) war für *C. glutamicum* bislang kein Exporter für Carbonsäuren bekannt.

Die Importer für Succinat in *C. glutamicum* sind dagegen bereits beschrieben (Youn *et al.*, 2008; 2009). *C. glutamicum* ist nicht in der Lage, Intermediate des TCA-Zyklus, wie Succinat, Fumarat und Malat als C-Quelle zu nutzen. Die beiden Transportsysteme DccT und DctA, die unter anderem den Import von Succinat katalysieren, wurden mittels Spontanmutanten identifiziert. Dazu wurden Zellen über einen längeren Zeitraum auf Succinat, Fumarat bzw. Malat kultiviert. In den entstandenen Spontanmutanten konnte DccT und DctA als Carbonsäure Transporter charakterisiert werden (Youn *et al.*, 2008; 2009).

Während einige Aufnahmesysteme für Succinat bereits bekannt sind, sind bakterielle Succinat Exporter bislang nicht identifiziert und charakterisiert. In *E. coli* sind Transporter der DcuAB und DcuC Familie am Import von Dicarbonsäuren beteiligt, wobei sie zudem an einen Gegentausch von Succinat beteiligt sind (Janausch *et al.*, 2002). Auch für die Succinatproduzenten *A. succinogenes*, *M. succiniciproducens* und *A. succiniciproducens* sind keine Exportsysteme für Succinat beschrieben. *A. succinogenes* und *M. succiniciproducens* besitzen homologe Proteine zu DcuA-C, allerdings sind diese nicht am Transport von Carbonsäuren beteiligt. *C. glutamicum* besitzt keine zu DcuA-C homologen Proteine (Huhn *et al.*, 2011).

Das von E. Jolkver in *C. glutamicum* identifizierte Succinatexportsystem SucE wurde in dieser Arbeit genauer charakterisiert. Das Gen *cgl2211* codiert den Succinatexporter SucE. Bei SucE handelt es sich um einen sekundär aktiven Transporter, der zur Familie der *aspartate:alanine exchanger* (AAE)-Familie gehört (Huhn *et al.*, 2011). Die in dieser Arbeit durchgeführten Akkumulationsversuche in dem Stamm *IsucE* mit radioaktiv markiertem Succinat, bestätigen die Beteiligung von SucE am Export von Succinat. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Zellen des Stammes *IsucE* doppelt so viel Succinat wie die Zellen des Wildtyps akkumulieren konnten. In einer später erschienenen Veröffentlichung von Fukui *et al.* (2011) konnte ebenfalls gezeigt werden, dass SucE aus *C. glutamicum* am Export von Succinat beteiligt ist. Da der Stamm  $\Delta dhA$  hauptsächlich Succinat und kein Lactat produziert (Inui *et al.*, 2004) hat Fukui *et al.* (2011) postuliert, dass die Expressionslevel der Gene für die Succinatproduktion in dem Stamm  $\Delta dhA$  höher als im Wildtyp sind und daher den Stamm  $\Delta dhA$  für die Versuche verwendet. Für die Messung der Succinatproduktion der Stämme  $\Delta dhA$  und  $\Delta dhA\Delta sucE$  wurden diese in Fermentern unter anaeroben Bedingungen kultiviert. Dabei wurde gezeigt, dass der Stamm  $\Delta dhA\Delta sucE$  eine höhere interne Akkumulation von Succinat aufweist und weniger Succinat als der Stamm  $\Delta dhA$  produzierte. Zudem wurden von Fukui *et al.* (2011) das Protein SucE in Proteoliposomen rekonstituiert und Gegentausch-Experimente mit [<sup>3</sup>H]-Succinat durchgeführt. Dabei konnte eine Austauschrate von 2,4 nmol min<sup>-1</sup> mg Protein<sup>-1</sup> beobachtet werden (Fukui *et al.*, 2011).

Damit konnte der erste bakterielle Exporter für Succinat identifiziert werden. Mit diesen Kenntnissen könnte eine höhere Produktivität bei der biotechnologischen Produktion von Succinat erzielt werden. Durch die Überexpression des Exporters kommt es zu einem verstärkten Export von Succinat, wodurch eine Akkumulation des

Produktes und damit eine mögliche Repression der Biosynthese verhindert wird. Zudem kann durch einen erhöhten Export auch eine bessere Trennung des Produktes von den Zellen erfolgen.

Da die Transporter der DcuA-C Familie in *E. coli* sowohl am Import als auch am Export von Succinat beteiligt sind, wurde überprüft, ob SucE auch die Aufnahme von Succinat katalysiert. Durch Wachstumsexperimenten und radioaktive Aufnahmemessungen konnte eine Beteiligung von SucE am Import von Succinat ausgeschlossen werden.

### 4.2.2 Neben SucE gibt es weitere Succinatexporter

Durch die Inaktivierung von *sucE* konnte eine Reduktion der Exkretion von Succinat erzielt werden. Im Vergleich zum Wildtyp konnte für die Mutante *IsucE* aber immer noch halb so hohe Mengen Succinat im Medium nachgewiesen werden (Huhn *et al.*, 2011). Daher wurde mit Hilfe von *Pulse-Chase*-Experimenten in der Mutante *IsucE* und im Wildtyp der Export von Succinat genauer untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass weitere Transportsysteme am Export von Succinat beteiligt sein müssen.

Auch Fukui *et al.* (2011) konnte zeigen, dass neben SucE mindestens ein weiteres Transportsystem am Export von Succinat beteiligt sein muss. Dabei wurden Wachstumsversuche in Fermentern mit den Stämmen  $\Delta IdhA$  und  $\Delta IdhA\Delta sucE$  durchgeführt. Durch Messung der Succinatkonzentration im Medium wurde demonstriert, dass der Stamm  $\Delta IdhA\Delta sucE$ , dem der Succinat Exporter SucE fehlt, weiterhin Succinat produziert. (Fukui *et al.*, 2011).

Daher kann davon ausgegangen werden, dass neben SucE mindestens ein weiteres Exportsystem für Succinat in *C. glutamicum* existiert.

In *C. glutamicum* gibt es ein weiteres Protein, welches wie SucE zur AAE-Familie zählt und durch das Gen *cg0683* codiert wird. Da sich beide Proteine sehr ähnlich sind, wurde getestet, ob dieses am Export von Succinat beteiligt ist. Durch Inaktivierung dieses Transportproteins und anschließenden radioaktiven Aufnahmemessungen konnte allerdings eine Beteiligung am Export von Succinat ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).

Um den zusätzlichen Exporter auffindig zu machen, könnte man beispielsweise Wachstumsversuche in Anwesenheit eines toxischen Strukturanalogons von

Succinat durchführen. Ziel wäre hierbei eine Spontanmutante zu erhalten, die gegenüber der toxischen Substanz resistent ist. Dazu müsste man eine Mutante verwenden, die einen oder beide Importer für Succinat exprimiert, da im Wildtyp diese inaktiv sind. Bei diesem Experiment besteht die Möglichkeit, dass es zu einer spontanen Mutation des Exporters für das toxische Analogon von Succinat und damit auch des Succinatexporters kommt. Es ist allerdings auch möglich, dass bei der Spontanmutante eine Inaktivierung des Importers vorliegt und damit die toxische Substanz nicht in die Zelle gelangt. Außerdem könnten auch Gene des Stoffwechsels betroffen sein, was dazu führt, dass die jeweiligen Enzyme nicht mehr durch das toxische Strukturanalogon gehemmt werden und daher eine Resistenz gegenüber dieser Substanz auftritt. Das betroffene Gen könnte dann mit Hilfe einer Genbank ausfindig gemacht werden.

### 5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollten weitere Kenntnisse über bakterielle Carbonsäure-Transporter gewonnen werden. Dazu sollte das Pyruvataufnahmesystem in *E. coli* identifiziert und charakterisiert werden, parallel dazu sollte der Succinatexporter in *C. glutamicum* charakterisiert werden.

Zunächst erfolgte die biochemische Charakterisierung des Pyruvatimports mit Hilfe radioaktiver Aufnahmemessungen mit [<sup>14</sup>C]-Pyruvat. Dabei konnte gezeigt werden, dass es sich um ein sekundär aktives Aufnahmesystem handelt, das einen  $K_m$  von 8,2  $\mu$ M besitzt. Die Aufnahme von Pyruvat durch Diffusion konnte in dem gemessenen Konzentrationsbereich ausgeschlossen werden. Durch Kompetitionsversuche mit allen Aminosäuren und einigen Carbonsäuren konnte lediglich eine Hemmung durch die strukturverwandte Ketosäure Ketovalin beobachtet werden, damit wird diese Substanz ebenso wie Bromopyruvat von dem Pyruvatimporter gebunden und/oder transportiert.

Für die Identifikation des Pyruvatimporters wurde eine Transposonmutagenese mit anschließender Selektion auf Bromopyruvat etabliert. Es konnten drei Kandidaten als potentielle Pyruvatimporter identifiziert werden. Dabei zeigten die Deletionsmutanten der Kandidaten YhjE, AnsP und YiaMNO jeweils eine um ein Drittel reduzierte Pyruvataufnahme. Wegen dieser Multiplizität der Pyruvataufnahmesysteme konnte bislang noch keine detaillierte biochemische Analyse des Beitrags der einzelnen Transporter durchgeführt werden. Für YhjE konnte die direkte Beteiligung am Import des toxischen Bromopyruvats durch Wachstumsexperimente untermauert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde mit Hilfe eines bioinformatischen Ansatzes der Succinatexporters SucE identifiziert. Die Proteinsequenzen der Succinatproduzenten *Actinobacillus succinogenes* und *Mannheimia succiniciproducens* wurden dazu mit der Proteinsequenz von Transportern aus *C. glutamicum* verglichen. Dabei konnten einige Transporter als putative Succinatexporter identifiziert werden. Eine Mutante, der eines dieser Transportsysteme fehlt, wies eine signifikant geringere Exkretion von Succinat auf. Nach eingehender Untersuchung konnte die Funktion als Succinatexporter bestätigt werden. Dabei konnte durch Akkumulationsversuche mit radioaktivmarkiertem [<sup>14</sup>C]-Succinat gezeigt werden, dass diese Mutante im Vergleich zum Wildtyp eine doppelt so hohe Akkumulation von Succinat erreichte. Die Beteiligung des Succinatexportersystems am Import von Succinat wurde durch

## ZUSAMMENFASSUNG

---

Wachstumsexperimente und radioaktive Aufnahmemessungen ausgeschlossen. Damit gelang die Identifikation und Charakterisierung des ersten bakteriellen Succinatexportsystems, für das der Name SucE vorgeschlagen wurde. Neben SucE existieren allerdings noch weitere Succinatexportsysteme in *C. glutamicum*.

## 6 Literaturverzeichnis

**Abe S, Takayama K, and Kinoshita S (1967)** Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 13:279-301.

**Adams, M. A., Udell, C., M., Pada G. P., Jia, Z (2005)** MraZ from *Escherichia coli*: cloning, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 61 378-380.

**Baba., T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L., Mori, H. (2006)** Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* 2: 1-11.

**Berovic, M., Legisa, M. (2007)** Citric acid production. *Biotechnol. Annu. Rev.* 13: 303-343.

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

**Bledig, S. A., Ramseier, T. M., Saier, M. H. (1996)** FruR mediates catabolite activation of pyruvate kinase (pykF) gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178: 280-283.

**Blombach, B., Schreiner, M. E., Moch, M., Oldiges, M., Eikmanns, B. J. (2007)** Effect of pyruvate dehydrogenase complex deficiency on L-lysine production with *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76: 615-23.

**Bonacorsi, S., Bingen, E. (2005)** Molecular epidemiology of *Escherichia coli* causing neonatal meningitis. *Int. J. Med. Microbiol.* 295: 373-81.

**Bordignon, E., Grote, M., Schneider, E. (2010)** The maltose ATPbinding cassette transporter in the 21st century - towards a structural dynamic perspective on its mode of action. *Mol. Microbiol.* 77: 1354-1366.

**Bott M., Gerharz, T., Takors, R. and Zelic, B. (2001)** Verfahren zur fermentativen Herstellung von Pyruvat. Deutsche Patentanmeldung 101 29 711.4-42.

**Bozell, J. J., Petersen, G. R. (2009)** Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates – the US Department of energy’s “Top 10” revisited. *Green Chem.*12: 539-554.

**Bunch, P. K., Mat-Jan, F., Lee, N., Clark, D. P. (1997)** The *IdhA* gene encoding the fermentative lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Microbiol.* 143: 187-195.

**Burkovski, A., Krämer, R. (2002)** Bacterial amino acid transport proteins: occurrence, functions, and significance for biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58: 265-274.

**Chun, K.T., Edenberg, H.J., Kelley, M.R., Goebel, M. G. (1997)** Rapid amplification of uncharacterized transposon-tagged DNA sequences from genomic DNA. *Yeast* 13: 233-240.

**Chillaron, J., Roca, R., Valencia, A., Zorzano, A., Palacin, M. (2001)** Heteromeric amino acid transporters; biochemistry, genetics, and physiology. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 281: 995-1018.

**Chin, A. M., Feucht, B. U., Saier, M. H. (1987)** Evidence for regulation of gluconeogenesis by the fructose phosphotransferase system in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 169: 897-899.

**Claes, W. A., Pühler, A., Kalinowski, J. (2002)** Identification of two *prpDBC* gene clusters in *Corynebacterium glutamicum* and their involvement in propionate degradation via the 2-methylcitrate cycle. *J. Bacteriol.* 184: 2728-2739.

**Clark, D. P., Cronan, J. E. (1996)** Two-carbon compounds and fatty acids as carbon sources, S. 343-357. In: Neidhardt, F.C. Curtiss III, R., Ingraham, J. L., Lin E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M., Umberger, H. E., *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington D. C.

**Datsenko, K.A., Wanner, B.L. (2000)** One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. PNAS. 97: 6640-6645.

**De Kok, A., Hengeveld, A. F., Marin, A., Westphal, A. H. (1998)** The pyruvate dehydrogenase multi-enzyme complex from Gram-negative bacteria. Biochem. Biophys. Acta 1385: 353-366.

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

**Eikmanns B. J., Kleinertz E., Liebl W. und Sahm H. (1991)** A family of *Corynebacterium glutamicum*/*Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing. Gene 102: 93-8.

**Escherich, T. (1886)** Die Darmbakterien des Säuglings und ihre Beziehung zur Physiologie der Verdauung. Halbilitationsschrift.

**Everett, H.S., Vosberg, G.A., Davis, J.M. (1948)** The treatment of *E. coli* urinary infections with sulfathalidine (phthalylsulfathiazole). J Urol. 59: 83-91.

**Fukui, K., Koseki, C., Yamamoto, Y., Nakamura, J., Sasahara, A., Yuji, R., Hashiguchi, K., Usuda, Y., Matsui, K., Kojima, H., Abe, K. (2011)** Identification of succinate exporter in *Corynebacterium glutamicum* and its physiological roles under anaerobic conditions. J. Biotechnol. 154: 25-34.

**Gaßel, M., Möllenkamp, T., Puppe, W., Altendorf, K. (1999)** The KdpF Subunit is part of the K<sup>+</sup>-translocating Kdp complex of *Escherichia coli* and is responsible for stabilization of the complex in vitro. J. Biol. Chem. 274: 37901-37907.

**Gerharz, T., Zelic, B., Takors, R., Bott, M. (2001)** Produktion von Pyruvat aus Glucose mit *Escherichia coli*. BIOSpektrum, Sonderausgabe Biokatalyse 1: 29-32.

**Gerharz, T. (2003)** Pyruvat-Produktion durch acetat-auxotrophe *Escherichia coli*-Stämme. Dissertation, Universität Düsseldorf.

**Gimenez, R., Nuñez, M.F., Badia, J., Aguilar, J., Baldoma, L. (2003)** The gene *yjcG*, cotranscribed with the gene *acs*, encodes an acetate permease in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 185: 6448-55.

**Gonin, S., Arnoux, P., Pierru, B., Lavergne, J., Alonso, B., Sabaty, M., Pignol, D. (2007)** Crystal structure of an extracytoplasmic solute receptor from a TRAP transporter in its open and closed forms reveal a helix-swapped dimer requiring a cation for  $\alpha$ -keto acid binding. BMC Struct. Biol. 7: 11.

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

**Hatti-Kaul, R., Törnvall, U., Gustafsson, L., Börjesson, P. (2007)** Industrial biotechnology for the production of bio-based chemicals - a cradle-to-grave perspective. Trends Biotechnol. 25: 119-24.

**Howard, J. W., Fraser, W. A. (1932)** Pyruvic acid. Org. Synth. Coll. 1: 475-476.

**Huhn S, Jolkver E, Krämer R, Marin K. (2011)** Identification of the membrane protein SucE and its role in succinate transport in *Corynebacterium glutamicum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 89: 327–335.

**Inui, M., Murakami, S., Okino, S., Kawaguchi, H., Vertes, A. A., Yukawa, H. (2004)** Metabolic analysis of *Corynebacterium glutamicum* during lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 7: 182-96.

**Jakoby, M., Ngouoto-Nkili, C. E., Burkovski, A. (1999)** Construction and application of new *Corynebacterium glutamicum* vectors. *Biotechnol. Tech.* 13: 437-441.

**Janausch, I. G., Kim, O. B., Uden, G. (2001)** DctA- and Dcu-independent transport of succinate in *Escherichia coli*: contribution of diffusion and of alternative carriers. *Arch. Microbiol.* 176: 224-230.

**Janausch, I. G., Zientz, E., Tran, Q. H., Kröger, A., Uden, G. (2002)** C<sub>4</sub>-dicarboxylate carriers and sensors in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* 1553: 39-56.

**Jennings, M. P., Anderson, J.K., Beacham, I.R. (1995)** Cloning and molecular analysis of the *Salmonella enterica ansP* gene, encoding an L-asparagine permease. *Microbiol.* 141: 141-146.

**Jolkver, E. (2008)** Identification and characterization of carboxylate transporters in *Corynebacterium glutamicum*. Doktorarbeit, Universität zu Köln.

**Jolkver, E., Emer, D., Ballan, S., Krämer, R., Eikmanns, B., 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: 940-948.

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

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

**Kagawa, Y. (1962)** Enzymatic studies on ascorbic acid catabolism in animals. *J. B.* 51: 134-144.

**Kalinowski, J., Bathe, B., Bartels, D., Bischoff, N., Bott, M., Burkovski, A., Dusch, N., Eggeling, L., Eikmanns, B. J., Gaigalat, L., Goesmann, A., Hartmann, M., Huthmacher, K., Krämer, R., Linke, B., McHardy, A. C., Meyer, F., Möckel, B., Pfefferle, W., Pühler, A., Rey, D. A., Rückert, C., Rupp, O., Sahm, H., Wendisch, V. F., Wiegrabe, I., Tauch, A. (2003)** The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J. Biotechnol.* 104: 5-25.

**Karimova, G., Dautin, N., Ladant, D. (2005)** Interaction network among *Escherichia coli* membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis. *J. Bacteriol.* 187: 2233-2243.

**Kell, D.B., Peck, M.W., Rodger, G., Morris, J.G. (1981)** On the permeability to weak acids and bases of the cytoplasmic membrane of *Clostridium pasteurianum*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 99: 81-88.

**Kelly, D. J., Thomas, G. H. (2001)** The tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporter of bacteria and archaea. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 405-424.

**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.

**Knappe, J., Sawers, G. (1990)** A radical-chemical route to acetyl-CoA: the anaerobically induced pyruvate formate-lyase system of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* 6: 383-398.

**Kronemeyer, W., Peekhaus, N., Krämer, R., Sahm, H., Eggeling, L. (1995).** Structure of the *gluABCD* cluster encoding the glutamate uptake system of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 177: 1152-1158.

**Ladant, D., Ullmann, A. (1999)** *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends Microbiol.* 7: 172-176.

**Lang, V. J., Leystra-Lantz, C., Cook, R. A. (1987)** Characterization of the specific pyruvate transport system in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 169: 380-385

**Laemmli, U. K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

**Lee, P. C., Lee, W. G., Lee, S.Y., Chang, H. N. (2001)** Succinic acid production with reduced by-product formation in the fermentation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* using glycerol as a carbon source. Biotechnol. Bioeng. 72: 41-48.

**Leuchtenberger W., Huthmacher K. und Drauz K. (2005)** Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. Appl. Microbiol. Biotechnol. 69: 1-8.

**Li, Y., Chen, J., Lun, S.Y. (2001a)** Biotechnological production of pyruvic acid. Appl. Microbiol. Biotechnol. 57: 451-459.

**Li, Y., Chen, J., Lun, S.Y., Rui, X. S. (2001b)** Efficient pyruvate production by a multi-vitamin auxotroph of *Torulopsis glabrata*: Key role and optimization of vitamin levels. Appl. Microbiol. Biotechnol. 55: 680-685.

**Liebl W., Bayerl A., Schein B., Stillner U. und Schleifer K. H. (1989)** High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells. FEMS Microbiol. Lett. 65: 299-330.

**Litsanov, B., Kabus, A., Brocker, M., Bott, M. (2011)** Efficient aerobic succinate production from glucose in minimal medium with *Corynebacterium glutamicum*. Microb. Biotechnol. (Epub ahead of print).

**Lowe, P. N. and Perham, R. N. (1984)** Bromopyruvate as an active-site-directed inhibitor of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex from *Escherichia coli*. Biochem. 23: 91-97.

**Maas, R. H., Bakker, R. R., Eggink, G., Weusthuis, R. A. (2006)** Lactic acid production from xylose by the fungus *Rhizopus oryzae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 72: 861-8.

**Madhusudan, S., Paukner, A., Klingen, Y., Schnetz, K. (2005)** Independent regulation of H-NS-mediated silencing of the *bgl* operon at two levels: upstream by BglJ and LeuO and downstream by DnaKJ. Microbiol. 151: 3349-3359.

**Marin, K., Krämer, R. (2007)** Amino acid transport systems in biotechnologically relevant bacteria. Microbiol. Monogr. 5: 289-325.

**McKinlay, J. B., Vieille, C., Zeikus, J. G. (2007)** Prospects for a bio-based succinate industry. Appl. Microbiol. Biotechnol. 76: 727-740.

**Minnikin D. (1982)** The biology of the mycobacteria. Academic. Pr. 1: 95-184.

**Montgomery, C. M., Webb, J. L. (1956)** Metabolic studies on heart mitochondria. II The inhibitory action of parapyruvate on the tricarboxylic acid cycle. J. Biol. Chem. 221: 359-368.

**Montgomery, C. M., Fairhurst, A. S., Webb, J. L. (1956)** Metabolic studies on heart mitochondria. III The action of parapyruvate on  $\alpha$ -ketoglutaric oxidase. J. Biol. Chem. 221: 369-376.

**Mulligan, C, Fischer, M., Thomas, G. (2010)** Tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters in bacteria and archaea. FEMS Microbiol. Rev. 35: 68-86.

**Okino, S., Inui, M., Yukawa, H. (2005)** Production of organic acids by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 68: 475-480.

**Papagianni, M. (2007)** Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnol. Adv.* 25: 244-263.

**Pernil, R., Herrero, A., Flores, E. (2010)** A TRAP transporter for pyruvate and other monocarboxylate 2-oxoacids in the Cyanobacterium *Anabaena sp.* strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* 192: 6089-6092.

**Peters-Wendisch P. G., Kreutzer, C., Kalinowski, J., Pátek, M., Sahm, H., Eikmanns, B. J. (1998)** Pyruvate carboxylase from *Corynebacterium glutamicum*: characterization, expression and inactivation of the *pyc* gene. *Microbiol.* 144: 915-927.

**Peters-Wendisch P. G., Schiel B., Wendisch V. F., Katsoulidis E., Möckel B., Sahm H., Eikmanns B.J. (2001)** Pyruvate carboxylase is a major bottleneck for glutamate and lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3: 295-300.

**Polen, T. D., Schluesener, A., Poetsch, A., Bott, M., Wendisch, V. F. (2007)** Characterization of citrate utilization in *Corynebacterium glutamicum* by transcriptome and proteome analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 273: 109-119.

**Pos, K. M., Dimroth, P., Bott, M. (1998)** The *Escherichia coli* citrate carrier CitT: a member of novel eubacterial transporter family related to the 2-oxoglutarate/malate translocator from spinach chloroplasts. *J. Bacteriol.* 180: 4160-4165.

**Postma, P. W., Lengeler, J. W., Jacobson, G. R. (1993)** Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate Phosphotransferase system of bacteria. *Microbiol. Rev.* 57: 543-594.

**Quick, M., Stölting, S., Jung, H. (1999)** Role of conserved Arg40 and Arg117 in the Na<sup>+</sup>/proline transporter of *Escherichia coli*. *Biochem.* 38: 13523-9.

**Rabus, R., Jack, D. L., Kelly, D. J., Saier, M. H. (1999)** TRAP transporters: an ancient family of extracytoplasmic solute-receptor-dependent secondary active transporters. *Microbiol.* 145: 3431-3445.

**Rademacher, E. (2005)** Untersuchungen zur Fettsäure- und Zellwandsynthese sowie zur Glutamatbildung mit *Corynebacterium glutamicum*. Schriften des Forschungszentrums Jülich Reihe Lebenswissenschaften/Life Sciences Band 15.

**Ramseier, T. M., Bledig, S., Michotey, V., Saier M.H. (1995)** The global regulatory protein FruR modulates the direction of carbon flow in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 16: 1157-69.

**Riley, L.W., Remis, R. S., Helgerson, S.D., McGee, H.B., Wells, J.G., Davis, B.R., Hebert, R.J., Olcott, E.S., Johnson, L.M., Hargrett, N.T., Blake, P.A., Cohen, M.L. (1983)** Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New Engl. J. Med.* 308: 681-685.

**Sahm H., Bott M., Gerharz T., Takors R., Zelic B., Faurie R., (2004)** Abschlussbericht: Entwicklung eines modellhaften biotechnologischen Verfahrens zur umweltverträglichen fermentativen Produktion von Brenztraubensäure, Forschungszentrum Jülich.

**Saier, M. H., Ramseier, T. M. (1996)** The catabolite repressor/activator (Cra) Protein of enteric bacteria. *J. Bacteriol.* 178: 3411-3417.

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

**San, K. Y., Bennett, G. N., Berrios-Rivera, S. J., Vadali, R. V., Yang, Y. T., Horton, E., Rudolph, F. B., Sariyar, B., Blackwood, K. (2002)** Metabolic engineering through cofactor manipulation and its effects on metabolic flux redistribution in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* 4: 182-192.

**Sauer, U., Eikmanns, B. J. (2005)** The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 29: 765-794.

**Sauer, M., Porro, D., Mattanovich, D., Branduardi, P. (2008)** Microbial production of organic acids: expanding the markets. *Trends Biotechnol.* 26:100-8.

**Song, H., Lee, S. Y. (2006)** Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* 39: 353-361.

**Stratmann, T., Madhusudan, S., Schnetz, K. (2008)** Regulation of the *yjjQ-bglJ* operon, encoding LuxR-type transcription factors, and the divergent *yjjP* gene by H-NS and LeuO. *J. Bacteriol.* 190:926.

**Studier F. W., Moffatt B. A. (1986)** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189: 113-130.

**Textor, S., Wendisch, V. F., De Graaf, A. A. Müller, U., Linder, M. I., Linder, D., Buckel, W. (1997)** Propionate oxidation in *Escherichia coli*: evidence for operation of a methylcitrate cycle in bacteria. *Arch. Microbiol.* 168: 428-436.

**Thomas, G. H., Southworth, T., Leon-Kempis, M. R., Leech, A., Kelly, D. J. (2006)** Novel ligands for the extracellular solute receptors of two bacterial TRAP transporters. *Microbiol.* 152: 187-198.

**Trötschel, C., Kandirali, S., Diaz-Achirica, P., Meinhardt, A., Morbach, S., Krämer, R., Burkovski, A. (2003)** GltS, the sodium-coupled L-glutamate uptake system of *Corynebacterium glutamicum*: identification of the corresponding gene and impact on L-glutamate production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 738-742.

**Trötschel, C., Deutenberg, D., Bathe, B., Burkovski, A., Krämer, R. (2005)** Characterization of methionine export in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 187: 3786-3794.

**Trötschel, C., Follmann, M., Nettekoven, J. A., Mohrbach, T., Forrest, L. R., Burkovski, A., Marin, K., Krämer, R. (2008)** Methionine uptake in *Corynebacterium glutamicum* by MetQNI and by MetPS, a novel methionine and alanine importer of the NSS neurotransmitter transporter family. *Biochem.* 47: 12698-12709.

**Viitanen, P., Newman, M. J., Foster, D. L., Wilson, T. H., Kabacke, H. R. (1986)** Purification, reconstitution, and characterization of the lac permease of *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 125: 429-452.

**Wendisch, V. F., Bott, M., Eikmanns, B. J. (2006)** Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for biotechnological production of organic acids and amino acids. *Curr. Opin. Microbiol.* 9: 268-274.

**Wilke, D. (1995)** What should and what can biotechnology contribute to chemical bulk production? *FEMS Microbiol. Rev.* 16: 89-100.

**Willke, T., Vorlop, K. D. (2004)** Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66: 131-142.

**Wimley, W. C., White, S. H. (2000)** Designing transmembrane  $\alpha$ -helices that insert spontaneously. *Biochem.* 39: 4432-4442.

**Youn, J.-W., Jolkver, E., Krämer, R., Marin, K., Wendisch, V. F. (2008)** Identification and characterization of the dicarboxylate uptake system DccT in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 190: 6458-6466.

**Youn, J.-W., Jolkver, E., Krämer, R., Marin, K., Wendisch, V. F. (2009)** Characterization of the dicarboxylate transporter DctA in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 191: 5480-5488.

**Zelić, B., Gostović, S., Vuorilehto, K., Vasić-Rački, D., Takors, R. (2007)** Process strategies to enhance pyruvate production with recombinant *Escherichia coli*: From repetitive fed-batch to in situ product recovery with fully integrated electro dialysis. *Biotechnol. Bioeng.* 85: 638-646.

**Zeikus, J. G., Jain, M. K., Elankovan, P. (1999)** Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 545-552.

**Zientz, E., Six, S., Uden, G. (1996)** Identification of a third secondary carrier (DcuC) for anaerobic C<sub>4</sub>-dicarboxylate transport in *Escherichia coli*: roles of the three Dcu carriers in uptake and exchange. *J. Bacteriol.* 178: 7241-7247.

## Erklärung

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

### Teilpublikationen:

**Huhn S, Jolkver E, Krämer R, Marin K. (2011)** Identification of the membrane protein SucE and its role in succinate transport in *Corynebacterium glutamicum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 89:327–335.

Ich versichere, dass ich alle Angaben wahrheitsgemäß nach bestem Wissen und Gewissen gemacht habe und verpflichte mich, jedmögliche, die obigen Angaben betreffende Veränderung dem Dekanat unverzüglich mitzuteilen.

Datum: Köln, Dezember 2011

Unterschrift: