

**Charakterisierung des Fructoseexports in**  
*Corynebacterium glutamicum*

**Inaugural - Dissertation**

zur

**Erlangung des Doktorgrades**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

**Natalie Brühl**

aus Haan

Köln 2015

**Berichterstatter:** Professor Dr. Reinhard Krämer  
Professor Dr. Ulf-Ingo Flügge

Tag der Disputation 19.06.2015

## Zusammenfassung

*Corynebacterium glutamicum* ist einer der bedeutendsten Mikroorganismen der industriellen Biotechnologie. Bei der biotechnologischen Herstellung von Aminosäuren durch *C. glutamicum* stellt Saccharose die meist genutzte Kohlenstoffquelle dar (Kelle et al., 2005; Leuchtenberger et al., 2005). Als Alternative zu reiner Saccharose wird auch Melasse, ein Nebenprodukt der Zuckerherstellung, bei der Produktion von L-Lysin und L-Glutamat durch *C. glutamicum* kosteneffektiv genutzt (Kelle et al., 2005; Kimura, 2005).

Da *C. glutamicum* keine Fructokinaseaktivität besitzt, setzt die vollständige Nutzung von Saccharose als Kohlenstoffquelle, den Export und Reimport des entstehenden unphosphorylierten Fructosemoleküls voraus. Der Reimport von Fructose über ein Phosphoenolpyruvat-abhängiges Phosphotransferase System (PTS) geht mit der für die Nutzung des Fructosemoleküls als Kohlenstoffquelle erforderlichen Phosphorylierung einher. Das Vorhandensein eines Exporters für Fructose wurde aufgrund der bisherigen Datenlage zwar angenommen, jedoch auf biochemischer Ebene bisher nicht untersucht und bestätigt. Der Fructoseexporter stellt sowohl ein interessantes Target zur Optimierung von Produktionsstämmen in Richtung der Saccharoseverwertung dar, als auch bei der Entwicklung von genomreduzierten Produktionsstämmen, die als Ziel die Herstellung eines Chassis-Organismus haben, der auf die wichtigsten metabolischen Eigenschaften beschränkt ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Modellstamm *C. glutamicum* FIMS konstruiert, der die Charakterisierung des Fructoseexports ermöglichte. Der Modellstamm wurde auf Basis von Untersuchungen zur Fructoseaufnahme und zur intrazellulären Umwandlung von Fructose in andere Metabolite konstruiert. Dieser Stamm ist defizient in der Wiederaufnahme von Fructose und der Reduktion von Fructose zu Mannitol, welche den intrazellulären Verlust von Fructose herbeiführen würde. Zur biochemischen Charakterisierung des Fructoseexports wurde eine radiochemische Methode entwickelt, die eine Messung des Exports von Fructose spezifisch ermöglicht. Auf Basis dieser Methode wurde der Export von Fructose mithilfe des Modellstamms charakterisiert. Fructose wird sowohl spezifisch über mindestens zwei Transportproteine, als auch unspezifisch über mechanosensitive Kanäle exportiert. Der spezifische Efflux von Fructose erfolgt höchstwahrscheinlich über *facilitated diffusion* und mit einer Geschwindigkeitskonstanten  $k$  von  $0,109 \pm 0,025 \text{ min}^{-1}$ . Als Hauptexportsystem von Fructose wurde der MFS-Transporter Cg0772 identifiziert, welcher mit 60-80% am spezifischen Export beteiligt ist. Darüber hinaus ist mindestens ein weiteres, bisher nicht identifiziertes Transportsystem am spezifischen Efflux beteiligt. Anhand der erlangten Daten zum Fructoseexport wurde ein kinetisches Modell erstellt, welches die Modellierung des Fructoseefflux ermöglichte und somit zur Unterstützung der Datenanalyse herangezogen wurde. Damit trug das Modell signifikant zum Verständnis des Fructoseefflux bei.

## Abstract

As one of the most important microorganisms in biotechnology, *Corynebacterium glutamicum* is widely used for the industrial production of amino acids. As carbon source for fermentation processes, sucrose is predominantly applied (Kelle et al., 2005; Leuchtenberger et al., 2005). For the production of L-lysine and L-glutamate by *C. glutamicum*, Sucrose is used cost efficiently as molasses, a by-product of the refining of sugarcane or sugar beets into sugar (Kelle et al., 2005; Kimura, 2005).

*C. glutamicum* does not possess fructokinase activity. Following to sucrose uptake, phosphorylation and hydrolysis, complete sucrose utilization implies export and reuptake of the liberated unphosphorylated fructose. Fructose is imported over a phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system (PTS), which couples uptake and concomitant phosphorylation. Based on previous data the existence of a fructose export system was assumed, but not biochemically proven. The respective fructose-transporter would be an interesting target, not only for metabolic engineering towards efficient sucrose utilization, but also for development of a genome-reduced production strain, that aims design of a chassis-organism reduced to the most important metabolic features.

Within the present study a model strain was constructed, *C. glutamicum* FIMS, which allowed characterization of fructose export. This strain was constructed based on analyses of fructose-import characteristics and intracellular conversion of fructose to other metabolites. The model strain was deficient in fructose uptake as well as in the ability of the reduction from fructose to mannitol, which otherwise causes loss of fructose by an alternative pathway. For biochemical export-characterization a radiochemical method was developed, which allows specific measurement of fructose export. By combining this method together with the constructed *C. glutamicum* model strain, fructose was found to be excreted by at least two specific transporters, as well as by unspecific efflux via mechanosensitive channels. Specific fructose efflux occurs most likely by facilitated diffusion showing a first-order rate constant of  $0.109 \pm 0.025 \text{ min}^{-1}$ . As the main contributor to fructose export the MFS-transporter Cg0772 was identified. Cg0772 participates with 60-80% to specific fructose export. Furthermore, minimum one additional, so far non characterized export system is involved in specific export of fructose. By means of the data obtained a kinetic model was developed, which allowed modelling of fructose efflux. This model supported data analysis and contributed significantly to the understanding of fructose efflux kinetics.

# Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Das biotechnologische Potential von <i>C. glutamicum</i></b> .....	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Der Kohlenhydratstoffwechsel von <i>C. glutamicum</i></b> .....	<b>3</b>
1.2.1	Kohlenhydrate als Substrat in der industriellen Biotechnologie.....	3
1.2.2	Verstoffwechselung von Saccharose, Fructose und Glucose .....	4
1.2.3	Regulation des Kohlenhydrat-Stoffwechsels .....	7
<b>1.3</b>	<b>Transportsysteme in <i>C. glutamicum</i></b> .....	<b>9</b>
1.3.1	Substratexport in <i>C. glutamicum</i> .....	13
<b>1.4</b>	<b>Zuckerexport in Bakterien</b> .....	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>Ziele der Arbeit</b> .....	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>19</b>
<b>3.1</b>	<b>Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide</b> .....	<b>19</b>
3.1.1	Bakterienstämme.....	19
3.1.2	Plasmide .....	21
3.1.3	Oligonukleotide.....	22
<b>3.2</b>	<b>Nährmedien und Kultivierung von <i>E. coli</i> und <i>C. glutamicum</i></b> .....	<b>24</b>
3.2.1	Medien und Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	24
3.2.2	Medien und Kultivierung von <i>C. glutamicum</i> .....	24
3.2.3	Antibiotika und IPTG.....	25
<b>3.3</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>26</b>
3.3.1	Herstellung und Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> .....	26
3.3.2	Herstellung und Transformation elektrokompenter <i>C. glutamicum</i> .....	26
3.3.3	Isolierung genomischer DNA aus <i>C. glutamicum</i> .....	27
3.3.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> und <i>C. glutamicum</i> .....	28
3.3.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	28
3.3.6	Klonierungen.....	28
3.3.7	Agarose-Gelelektrophorese .....	29
3.3.8	Herstellung von <i>C. glutamicum</i> Deletionsmutanten.....	29
3.3.9	Isolierung von RNA.....	30
3.3.10	cDNA-Synthese .....	31
3.3.11	Quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR) .....	31

<b>3.4</b>	<b>Analytische Methoden</b> .....	<b>31</b>
3.4.1	Quantitative Bestimmung von Saccharose und Glucose.....	31
3.4.2	Quantitative Fructosebestimmung.....	31
3.4.3	Quantitative Mannitolbestimmung.....	33
3.4.4	Messung der spezifischen Mannitoldehydrogenase-Aktivität.....	34
3.4.5	Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	34
3.4.6	Bestimmung der Osmolalität .....	35
<b>3.5</b>	<b>Biochemische Methoden</b> .....	<b>35</b>
3.5.1	Messung der Substrataufnahme .....	35
3.5.2	Messung des Fructoseexports .....	36
3.5.3	Messung des Fructoseexports bei hypoosmotischen Schock.....	36
3.5.4	Silikonölzentrifugation.....	37
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>39</b>
<b>4.1</b>	<b>Saccharose als Kohlenstoffquelle für <i>C. glutamicum</i></b> .....	<b>39</b>
4.1.1	Biochemische Charakterisierung der Saccharoseaufnahme .....	40
4.1.2	Physiologische Untersuchung des Wachstums mit Saccharose.....	41
4.1.3	Akkumulation von Fructose im Cytoplasma .....	42
<b>4.2</b>	<b>Biochemische Messung des Fructoseexports in <i>C. glutamicum</i></b> .....	<b>43</b>
4.2.1	Etablierung einer Methode zur Messung des Fructoseexports .....	44
4.2.2	<i>Pulse-Chase</i> -Experimente im <i>C. glutamicum</i> Wildtyp.....	46
<b>4.3</b>	<b>Entwicklung eines Stammes zur Charakterisierung des Fructoseexports</b> .....	<b>49</b>
4.3.1	Fructose und Glucose als Kohlenstoffquelle für <i>C. glutamicum</i> .....	50
4.3.2	Biochemische Charakterisierung der Fructoseaufnahme in <i>C. glutamicum</i> .....	52
4.3.3	<i>C. glutamicum</i> $\Delta ptsF \Delta ptsG$ als Ausgangspunkt für einen Modellstamm.....	55
4.3.4	Die Mannitoldehydrogenase von <i>C. glutamicum</i> .....	57
4.3.5	Physiologische Charakterisierung der <i>C. glutamicum</i> FIM-Mutante .....	62
4.3.6	Relevanz von SugR auf die Saccharoseverwertung von <i>C. glutamicum</i> FIM.....	64
4.3.7	<i>in trans</i> -Expression von <i>ptsS</i> im Fructoseexport-Modellstamm .....	66
4.3.8	Akkumulation von Fructose im Cytoplasma von Wildtyp und Modellstamm.....	69
<b>4.4</b>	<b>Charakterisierung des Fructoseexports in <i>C. glutamicum</i> FIMS</b> .....	<b>70</b>
4.4.1	Etablierung der radiochemischen Messung des Fructoseefflux.....	70
4.4.2	Erstellung eines kinetischen Modells zum Fructoseexport.....	76
4.4.3	Regulation des Fructoseexports .....	81

4.4.4	Energieabhängigkeit des Fructoseexports.....	83
<b>4.5</b>	<b>Export von Fructose über mechanosensitive Kanäle.....</b>	<b>84</b>
4.5.1	Efflux von Fructose durch einen hypoosmotischen Schock.....	85
4.5.2	Einfluss von MscCG und MscL auf den Fructoseefflux .....	86
<b>4.6</b>	<b>Export von Fructose über einen spezifischen Transporter.....</b>	<b>90</b>
4.6.1	Identifikation putativer Targets für den Fructoseexporter .....	90
4.6.2	Physiologische Untersuchung putativer Targets des Fructoseexports .....	91
4.6.3	Biochemische Untersuchung putativer Targets des Fructoseexports.....	95
<b>4.7</b>	<b>Relevanz von Cg0772 für den Fructoseexport.....</b>	<b>97</b>
4.7.1	Inaktivierung und Überexpression von <i>cg0772</i> in <i>C. glutamicum</i> FIMS .....	97
4.7.2	Inaktivierung von <i>cg0772</i> im <i>C. glutamicum</i> Wildtyp.....	99
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>103</b>
<b>5.1</b>	<b>Die Besonderheit des Saccharosestoffwechsels von <i>C. glutamicum</i> .....</b>	<b>103</b>
<b>5.2</b>	<b>Der Fructoseexport als Teil des Metabolismus von Saccharose .....</b>	<b>105</b>
<b>5.3</b>	<b>Phosphorylierung von Fructose durch eine unspezifische Kinase .....</b>	<b>108</b>
<b>5.4</b>	<b>Ein Modellstamm zur Charakterisierung des Fructoseefflux .....</b>	<b>110</b>
5.4.1	Der Fructoseimport in <i>C. glutamicum</i> .....	110
5.4.2	Reduktion von Fructose zu Mannitol durch die MtIDH .....	114
5.4.3	Auswirkung der Inaktivierung des Fructoseimports auf den Metabolismus .....	116
5.4.4	Charakterisierung des Fructoseefflux mit <i>C. glutamicum</i> FIMS.....	121
<b>5.5</b>	<b>Der Efflux von Fructose über <i>facilitated diffusion</i> .....</b>	<b>122</b>
<b>5.6</b>	<b>Ein kinetisches Modell zur Beschreibung des Fructoseexports.....</b>	<b>127</b>
<b>5.7</b>	<b>Regulation des Fructoseexports.....</b>	<b>129</b>
<b>5.8</b>	<b>Der Efflux von Fructose über mechanosensitive Kanäle.....</b>	<b>130</b>
<b>5.9</b>	<b>Cg0772 als Hauptakteur des Fructoseefflux in <i>C. glutamicum</i> .....</b>	<b>132</b>
<b>5.10</b>	<b>Schlussbetrachtung.....</b>	<b>138</b>
<b>6</b>	<b>Quellen.....</b>	<b>141</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>162</b>

## Abkürzungen

2TY	Trypton-Hefeextrakt-Medium
$\Delta$	Deletion
$\mu\text{M}$	Mikromolar [ $\mu\text{mol/l}$ ]
ABC	ATP <i>binding cassette</i>
<i>atlR</i>	Gen für den Regulator AtIR
ATP	Adenosintriphosphat
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BLASTP	<i>Basic local alignment search tool</i>
bp	Basenpaar
Cam <sup>R</sup>	Chloramphenicolresistenz
cDNA	<i>complementary</i> (komplementäre) Desoxyribonukleinsäure
CCCP	Carbonylcyanid 3-chlorophenylhydrazon
cpm	<i>counts per Minute</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	Enzym I, allgemeines Enzym der PTS
EII <sub>Substrat</sub>	Enzym II, substratspezifisches Enzym der PTS
F-1-P	Fructose-1-phosphat
F-1,6-PP	Fructose-1,6-bisphosphat
F-6-P	Fructose-1-phosphat
Fru	Fructose
GC-Gehalt	prozentualer Anteil an Guanin und Cytosin
Glc	Glucose
h	Stunde
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPr	Histidin Protein, allgemeines Enzym der PTS
IM	Integrationsmutante
INT	Iodnitrotetrazolium-Violett
<i>iolT1/iolT2</i>	Gene für die <i>myo</i> -Inositol-Transporter
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
k	Geschwindigkeitskonstante einer Reaktion erster Ordnung
Kan <sup>R</sup>	Kanamycinresistenz
K <sub>1/2</sub>	Halbsättigungskonstante
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
KOH	Kaliumhydroxid
M	Molar [ $\text{mol/l}$ ]
ManDH	Mannitoldehydrogenase
min	Minute

MFS	Transporter der <i>Major Facilitator Superfamily</i>
mM	Millimolar [mmol/l]
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
<i>mtlD</i>	Gen für die Mannitoldehydrogenase
OD <sub>600</sub>	optische Dichte, gemessen bei 600 nm
P	Phosphat
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEP	Phosphoenolpyruvat
PIPES	Piperazin-N,N'-bis-(2-ethansulfonsäure)
PTS	Phosphoenolpyruvat-abhängiges Phosphotransferase System
<i>ptsF</i>	Gen für das fructosespezifische EII
<i>ptsG</i>	Gen für das glucosespezifische EII
<i>ptsS</i>	Gen für das saccharosespezifische EII
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
S-6-P	Saccharose-6-phosphat
<i>scrB</i>	Gen für die Saccharose-6-phosphat Hydrolase ScrB
sec	Sekunde
SET	<i>Sugar Efflux Transporter</i>
SP	<i>Sugar Porter</i>
Suc	Saccharose
<i>sugR</i>	Gen für den DeoR-Typ Repressor SugR
TAE	Tris-Acetat/EDTA-Puffer
TG	Zelltrockenmasse
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
V <sub>max</sub>	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
WT	Wildtyp

### 1 Einleitung

Mikroorganismen sind aus der industriellen Biotechnologie nicht mehr wegzudenken. Schon seit Jahrtausenden werden sie für die Herstellung fermentativer Produkte wie Brot, Käse und Bier eingesetzt. Mitte des letzten Jahrhunderts begann die Weiterentwicklung von der traditionellen hin zur industriellen Biotechnologie. Diese Phase der Biotechnologie lieferte Innovationen im Bereich der Fermentation, Biokonversion und enzymatischer Prozesse zur Produktion einer Vielzahl an Produkten. Dazu zählen heute Aminosäuren, Nukleotide, Vitamine, Lösungsmittel, organische Säuren, Polysaccharide und Impfstoffe (Demain, 2007). Anfang der 1970er Jahre setzte die dritte Phase ein, in welcher die traditionelle industrielle Mikrobiologie um molekularbiologische Methoden erweitert wurde. Das Produktportfolio konnte weiter ausgebaut und die Erträge optimiert werden (Demain, 2000b). Durch die Entwicklung verschiedener Methoden zur Untersuchung der mikrobiellen Physiologie, zum *Genetic-* und *Metabolic Engineering* und für Hochdurchsatzverfahren zum Screening neuer Metabolite und Produktionsstämme, nimmt die moderne industrielle Biotechnologie einen Platz unter den größten globalen Industriemärkten ein (Demain, 2000a). Die Nachfrage an biotechnologisch hergestellten Chemikalien und Produkten nimmt immer mehr zu. 2017 soll die Menge biotechnologisch produzierter Chemikalien und Polymere mit einem Umsatz von 340 Milliarden Euro bereits 15% der Gesamtproduktionsmenge ausmachen (Vertès et al., 2013).

#### 1.1 Das biotechnologische Potential von *C. glutamicum*

Zu den industriell bedeutsamen Mikroorganismen zählen neben Hefe und gramnegativen Bakterien wie *Escherichia coli* auch grampositive Bakterien wie *Corynebacterium glutamicum*. *C. glutamicum* wurde in den 1950er Jahren als natürlicher Glutamatproduzent entdeckt (Kinoshita et al., 1957). Seitdem wurde er konsequent weiterentwickelt und gehört heute, vor allem durch seine führende Stellung bei der Aminosäureproduktion, zu den bedeutendsten industriell genutzten Mikroorganismen. Die Gattung *Corynebacterium*, erstmals 1896 durch Lehmann und Neumann beschrieben (Lehmann und Neumann, 1896), gehört zu den *Actinobacteria*, die eine der artenreichsten Abteilungen der Domäne der Bakterien bilden. Die Gemeinsamkeit der grampositiven *Actinobacteria* ist neben ihrem hohen GC-Gehalt (51-68 mol%) (Liebl, 2005) die charakteristische Mycolsäureschicht. Diese stellt neben der Plasmamembran eine zusätzliche Permeabilitätsbarriere, ähnlich der äußeren Membran gramnegativer Bakterien, dar (Daffé, 2005). Bekannte humanpathogene

Vertreter der *Actinobacteria* sind *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* und *Corynebacterium diphtheriae* (Stackebrandt et al., 1997). Neben seiner industriellen Bedeutung ist *C. glutamicum* ein ideal geeigneter Modellorganismus für seine pathogenen Verwandten, da er ihnen in Bezug auf Zellwandaufbau und Stoffwechselwege stark ähnelt (Yokota und Lindley, 2005).

Mit einem Umsatz von 8,8 Milliarden US-Dollar pro Jahr und einer jährlichen Wachstumsrate von 6-8% stellt die Produktion von L-Aminosäuren den wichtigsten Anteil der industriellen Nutzung von *C. glutamicum* dar (Becker und Wittmann, 2012a; Becker und Wittmann, 2012b; Vertès et al., 2013). Grund für die dominierende Rolle dieses Organismus in der Aminosäureproduktion sind die hohen Titer die bei der Produktion erzielt werden können. 32% der mit *C. glutamicum* produzierten Aminosäuren entfallen auf die Nahrungsmittelzusatzstoffe L-Glutamat, L-Aspartat und L-Phenylalanin (Leuchtenberger et al., 2005). Insgesamt werden 2,5 Millionen Tonnen des Geschmacksverstärkers L-Glutamat pro Jahr mit einem Wert von über 2,5 Milliarden US-Dollar produziert (Becker und Wittmann, 2012b; Vertès et al., 2013). Die Produktion der essentiellen Aminosäuren L-Lysin, DL-Methionin, L-Threonin und L-Tryptophan als Futtermittelzusatzstoffe macht mit 56% den größten Teil des Gesamtmarkts an Aminosäuren aus. Mit Ausnahme von DL-Methionin werden diese Aminosäuren biotechnologisch hergestellt. Allein die biotechnologische Produktion an L-Lysin beträgt pro Jahr 1,5 Millionen Tonnen (Becker und Wittmann, 2012a; Leuchtenberger et al., 2005; Vogt et al., 2014). Insbesondere der Bedarf an limitierenden Aminosäuren (insbesondere Lysin und Methionin) als Futtermittelzusatzstoffe steigt immer weiter an (Kelle et al., 2005; Leuchtenberger et al., 2005). Das ist maßgeblich auf die global wachsende Nachfrage nach möglichst günstig produziertem Fleisch zurückzuführen. Zudem finden Aminosäuren immer mehr Anwendung als Zusatzstoffe in Kosmetika und Lebensmitteln sowie als Ausgangsstoffe für die chemische Synthese von Herbiziden. Auch aus dem medizinischen Bereich sind sie nicht mehr wegzudenken und kommen als Infusionen für parenterale Ernährung und in Pharmazeutika vor (Park et al., 2007; Park und Lee, 2010; Sahm et al., 1995).

Ursprünglich basierte die Entwicklung von *C. glutamicum* Stämmen für die Produktion des gewünschten Produkts auf der wiederholten Durchführung von Zufallsmutagenese und Selektion (Ikeda und Nakagawa, 2003). Durch die ungewollte Akkumulation von Nebenmutationen weisen diese Stämme häufig Wachstumsdefizite und eine geringere Stresstoleranz auf. Die Produktionseffizienz wird darüber hinaus durch die Entstehung vieler Nebenprodukte eingeschränkt (Ohnishi et al., 2002; Park et al., 2008). In den 1990er Jahren entwickelte

molekularbiologische und genetische Methoden halfen bei der gezielten Entwicklung neuer Produktionsstämme. Durch diese rationale Vorgehensweise werden fitte Wildtypen zu hocheffizienten Produzenten optimiert. Die Sequenzierung des Genoms von *C. glutamicum* (Kalinowski et al., 2003) brachte völlig neue Optionen für die Stammoptimierung mit sich. In den letzten Jahren wurden viele verschiedene Stoffwechselwege, Transportsysteme für Substrat und Produkt sowie eine Vielzahl an Regulationsmechanismen identifiziert. Diese können als potentielle Targets zur Optimierung von Parametern der Biosyntheserate oder der Transportkapazität dienen. *Genetic-* und *Metabolic Engineering* führen gemeinsam mit synthetischer Biologie zu einer Erweiterung des natürlichen Produktportfolios von *C. glutamicum*. Neben einer Vielzahl an L-Aminosäuren können heute mit *C. glutamicum* auch Diamine, Nukleotide, Polymere, Ethanol und höhere Alkohole produziert werden (Becker und Wittmann, 2012a).

Um mit rationalem Stammdesign die Leistungsfähigkeit traditioneller Produktionsstämme erreichen zu können, müssen die komplexen Interaktionen des gesamten Stoffwechsels berücksichtigt werden. Grundvoraussetzung dafür ist ein umfassendes Wissen über Physiologie und Stoffwechsel von *C. glutamicum*. Um die Nutzung der Kohlenstoffquelle zu optimieren bildet das Verständnis des zentralen Kohlenstoffmetabolismus die Basis der Entwicklung eines Produktionsstamms.

## **1.2 Der Kohlenhydratstoffwechsel von *C. glutamicum***

### **1.2.1 Kohlenhydrate als Substrat in der industriellen Biotechnologie**

Das Hauptziel der mikrobiellen Biotechnologie ist die Entwicklung effizienter und kostengünstiger Fermentationsprozesse. Etwa 50% der bei der biotechnologischen Herstellung von Aminosäuren anfallenden Kosten sind auf die eingesetzte Kohlenstoffquelle und die Energiekosten zurückzuführen (Kelle et al., 2005). Die effiziente Nutzung der Kohlenstoffquelle ist daher ein essentieller Faktor um die Kosten zu kontrollieren. *C. glutamicum* ATCC13032 (im Folgenden als *Wildtyp* bezeichnet) kann eine Vielzahl verschiedener Zucker als Kohlenstoffquelle verwenden. Dazu zählen Hexosen (Glucose, Fructose), Disaccharide (Saccharose, Maltose) und die Pentose D-Ribose, sowie organische Säuren (L-Lactat, Acetat) und Alkohole (Ethanol) (Arndt und Eikmanns, 2008; Blombach und Seibold, 2010).

Als Rohmaterialien für die Fermentationsprozesse mit *C. glutamicum* wird die Kohlenstoffquelle in reiner Form zugesetzt. Erneuerbare Rohstoffe, welche zum Beispiel als Abfall- oder Nebenprodukte bei der landwirtschaftlichen Produktion anfallen, stellen eine preiswerte und umweltfreundliche Alternative zu reinen

Zuckern als Energie- und Kohlenstoffquelle dar (Hermann, 2003). So finden beispielsweise Stärkehydrolysate, je nach geographischer Lage aus Mais, Kartoffeln oder Maniok gewonnen, Anwendung in der mikrobiellen Biotechnologie. Stärkehydrolysate enthalten hauptsächlich Glucose als Kohlenstoffquelle. Eine Alternative ist hydrolysierte Lignocellulose aus Holz oder Getreide, die als Kohlenstoffquelle bereits Verwendung findet. Lignocellulose ist ein komplexes Heteropolymer, welches neben Hexosen wie Glucose, Galactose und Mannose auch aus Pentosen wie Xylose und Arabinose aufgebaut ist (Hermann, 2003; Peters-Wendisch und Wendisch, 2015). Lignocellulose besteht zu fast einem Viertel aus Pentosen (Aristidou und Penttila, 2000). Da der *C. glutamicum* Wildtyp, wie die meisten Bakterien, Xylose und Arabinose nicht verwerten kann, würde die hydrolysierte Lignocellulose nicht komplett verbraucht. Zudem müssen Stärke und Lignocellulose für die Verwendung als Kohlenstoffquelle für *C. glutamicum* zuvor hydrolysiert werden. Dies ist mit zusätzlichen Kosten verbunden. Eine weitere Alternative ist die Verwendung von Melasse, einem flüssigen Nebenerzeugnis der Produktion von Saccharose aus Zuckerrohr oder Zuckerrüben. Melasse enthält selbst noch einen Anteil von bis zu 47% Zucker, zum Großteil Saccharose, der für die Zuckerproduktion meist ungenutzt bleibt und sich bei der biotechnologischen Verwendung von *C. glutamicum* hervorragend als Kohlenstoffquelle nutzen lässt. Neben Zucker enthält Melasse auch Proteine, Nährstoffe und Spurenelemente. Bei der Produktion von L-Lysin und L-Glutamat durch *C. glutamicum* wird Melasse bereits kosteneffektiv genutzt (Kelle et al., 2005; Kimura, 2005).

### 1.2.2 Verstoffwechslung von Saccharose, Fructose und Glucose

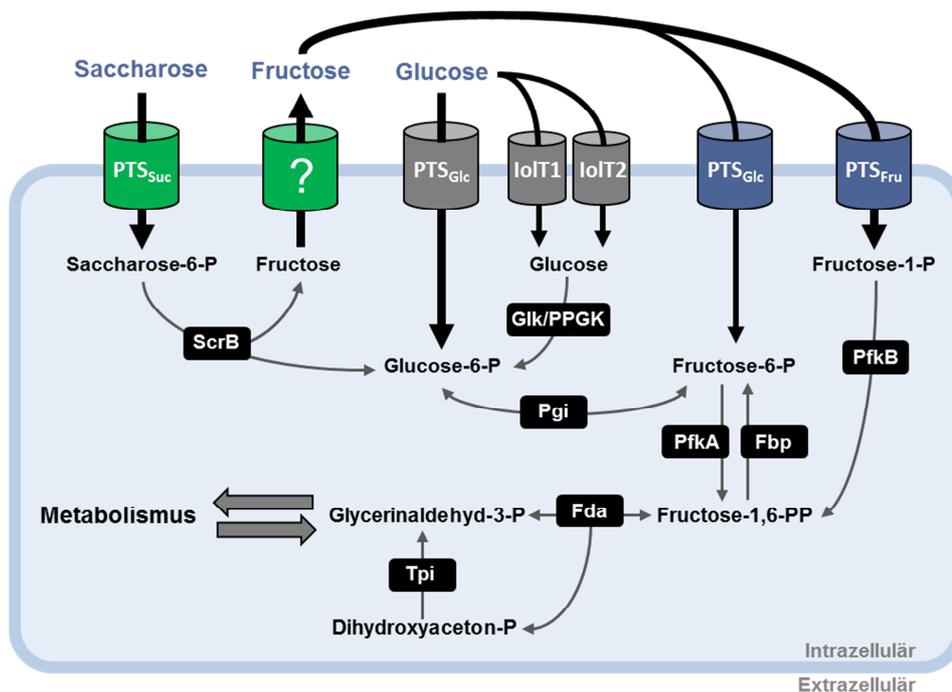
Aufgrund ihrer biotechnologischen Relevanz sind die Stoffwechselwege für Saccharose, Fructose und Glucose in *C. glutamicum* intensiv untersucht worden. Alle drei Zucker werden mittels Gruppentranslokation über sogenannte Phosphoenolpyruvat-abhängige Phosphotransferase Systeme (PTS) in die Zelle aufgenommen. Diese Art von Transport koppelt die Aufnahme des Substrats an dessen Phosphorylierung (siehe Abschnitt 1.3, Abbildung 2). Während der Umwandlung von PEP zu Pyruvat wird der Phosphatrest zunächst auf die allgemeinen PTS-Enzyme Enzym I (EI) und Histidin Protein (HPr) übertragen. Im Anschluss erfolgt die Übertragung des Phosphorylrests von HPr auf das substratspezifische Enzym II (EII), welches sowohl für die Translokation als auch für die Phosphorylierung des Substrats verantwortlich ist (Postma et al., 1993). Der *C. glutamicum* Wildtyp besitzt vier substratspezifische Enzyme zur Aufnahme und Phosphorylierung von Saccharose (EII<sub>Suc</sub>), Fructose (EII<sub>Fru</sub>), Glucose (EII<sub>Glc</sub>) und einem weiteren, bisher nicht identifizierten Substrat (Dominguez und Lindley, 1996;

Malin und Bourd, 1991; Moon et al., 2005; Shiio, 1990). Die vier substratspezifischen PTS-Enzyme werden durch die Gene *ptsS* (EII<sub>Suc</sub>), *ptsF* (EII<sub>Fru</sub>) und *ptsG* (EII<sub>Glc</sub>) codiert, die allgemeinen Enzyme EI und HPr durch *ptsI* und *ptsH*.

Der Stoffwechsel der drei PTS-Zucker Saccharose, Fructose und Glucose ist zusammenfassend in Abbildung 1 dargestellt. Glucose wird über EII<sub>Glc</sub> aufgenommen und zu Glucose-6-phosphat (G-6-P) phosphoryliert. Außerdem kann Glucose auch über die *myo*-Inositol-Transporter IolT1 und IolT2 aufgenommen werden (Lindner et al., 2011). Die PTS-unabhängige Aufnahme erfordert die Phosphorylierung von Glucose durch die ATP- und/oder Polyphosphat-abhängigen Glucokinasen PPGK oder Glk (Gourdon et al., 2003; Lindner et al., 2010; Park et al., 2000). Die Phosphoglucose Isomerase (Pgi) wandelt im Folgenden G-6-P in Fructose-6-phosphat (F-6-P) um, welches in der Glykolyse und im Pentosephosphatweg weiter verstoffwechselt werden kann (Wittmann et al., 2004). Fructose hingegen wird über EII<sub>Fru</sub> aufgenommen und zu Fructose-1-phosphat (F-1-P) phosphoryliert (Moon et al., 2005). Neben dem fructosespezifischen PTS besitzt auch das glucosespezifische PTS die Fähigkeit zur Aufnahme von Fructose, welche mit der Phosphorylierung zu Fructose-6-phosphat einhergeht (Moon et al., 2005). Die physiologische Relevanz der Fructoseaufnahme über EII<sub>Glc</sub> ist bislang unklar. Die *myo*-Inositol-Transporter IolT1 und IolT2 importieren Fructose ebenfalls, jedoch mit einer geringen Affinität (Bäumchen et al., 2009). Kalinowski et al. (2003) konnten zeigen, dass das Genom von *C. glutamicum* kein Gen für eine Fructokinase aufweist. Ergänzend konnten Dominguez und Lindley (1996) in *C. glutamicum* keine Fructokinaseaktivität nachweisen. Demnach ist die weitere Verstoffwechslung der unphosphorylierten Fructose nicht möglich.

Der Stoffwechsel des PTS-Zuckers Saccharose ist eng mit dem Fructosestoffwechsel verbunden. Saccharose wird zunächst über EII<sub>Suc</sub> in die Zelle transportiert und am Glucosemolekül zu Saccharose-6-phosphat (S-6-P) phosphoryliert. Direkt im Anschluss findet die glykosidische Hydrolyse durch die Saccharose-6-phosphat Hydrolase ScrB statt (Engels et al., 2008a). Die ScrB spaltet S-6-P in G-6-P und Fructose. Die Deletion der Gene *scrB* oder *ptsS* in *C. glutamicum*, codierend für ScrB und EII<sub>Suc</sub>, unterbindet das Wachstum der entsprechenden Mutanten mit Saccharose als Kohlenstoffquelle (Engels et al., 2008a; Moon et al., 2005). Das durch Hydrolyse entstandene G-6-P kann, wie für den Glucose-Metabolismus beschrieben, weiter verstoffwechselt werden. Die effiziente und vollständige Nutzung von Saccharose setzt die Phosphorylierung des unphosphorylierten Fructosemoleküls voraus. Da *C. glutamicum*, wie bereits erwähnt, keine Fructokinaseaktivität besitzt, ist der Export des unphosphorylierten Fructosemoleküls und der Reimport über EII<sub>Fru</sub> oder EII<sub>Glc</sub>

obligat für die vollständige Nutzung von Saccharose als Kohlenstoffquelle (Dominguez und Lindley, 1996; Moon et al., 2005). Aufgrund der beobachteten Akkumulation von Fructose im Wachstumsmedium des *C. glutamicum* Wildtyps während des Wachstums mit Saccharose als Substrat, wird die Existenz eines Exportsystems für Fructose angenommen (Dominguez und Lindley, 1996; Moon et al., 2005). Auf biochemischer Ebene wurde die Existenz eines Fructoseexporters in *C. glutamicum* bisher nicht bestätigt. Der Fructoseexporter stellt daher eine wichtige Unbekannte im Metabolismus von Saccharose, Fructose und Glucose dar.



**Abbildung 1. Übersicht der beteiligten Stoffwechselvorgänge von *C. glutamicum* bei Wachstum mit Saccharose, Fructose und Glucose als Kohlenstoffquelle.** Dargestellt sind die Transportsysteme welche am Stoffwechsel von Saccharose (grüne Zylinder), Fructose (blaue Zylinder) und Glucose (graue Zylinder) beteiligt sind sowie die dazugehörigen Enzyme (schwarze Rechtecke) und Metabolite (schwarze Schrift). Der ebenfalls mögliche Import von Fructose über die *myo*-Inositol-Transporter IolT1 und IolT2 geht nicht mit einer Phosphorylierung von Fructose einher und ist aus Platzgründen nicht dargestellt. Enzyme: *Fbp* fructose-1,6-bisphosphatase, *Fda* Fructosebisphosphat Aldolase, *Glk* Glucokinase, *PfkA/PfkB* 6- bzw. 1-Phosphofruktokinase, *Pgi* Phosphoglucose Isomerase, *ScrB* Saccharose-6-phosphat Hydrolase, *Tpi* Triosephosphat Isomerase. Modifiziert nach Blombach und Seibold (2010).

Saccharose ist bei der biotechnologischen Nutzung von *C. glutamicum* eine der meist genutzten Kohlenstoffquellen (Leuchtenberger et al., 2005). Die Produktion von L-Lysin beruht fast ausschließlich auf dem Einsatz von Saccharose als Substrat (Kelle et al., 2005). Die Stammoptimierung in Richtung der Saccharoseverwertung, sowohl auf dem Level des Katabolismus als auch der beteiligten Transportvorgänge, ist von

großer Bedeutung. Um die Verfügbarkeit der unphosphorylierten Fructose zu verbessern, statteten Moon et al. (2005) *C. glutamicum* mit dem Fructokinase-Gen *scrK* aus *Clostridium acetobutylicum* aus. Die Überexpression von *scrK* im *C. glutamicum* Wildtyp und einer *C. glutamicum ptsF*-Deletionsmutante ermöglichte die intrazelluläre Phosphorylierung der unphosphorylierten Fructose zu Fructose-6-phosphat (Moon et al., 2005). Im *C. glutamicum* Wildtyp brachte die Expression von *scrK* jedoch eine Verlängerung der *lag*-Phase mit sich. Die Ursache des verminderten Wachstums ist unverstanden.

Als einer der ersten Schritte im Zuckerstoffwechsel von *C. glutamicum* wäre daher der Fructoseexporter ein interessantes Target bei der Optimierung des Produktionsprozesses mit Hinblick auf die Nutzung von Saccharose als Kohlenstoffquelle. Bei Identifizierung des Exporters ließen sich mittels *Metabolic Engineering* die Stoffflüsse bei Wachstum mit Saccharose ermöglichen. Des Weiteren ist der Fructoseexporter im Hinblick auf die Erstellung eines genomreduzierten *C. glutamicum* Produktionsstamms von großem Interesse. Die systematische Reduktion des Genoms auf essentielle Gene beschränkt den Metabolismus auf die für die Produktion relevanten und essentiellen metabolischen Vorgänge. Für die biotechnologisch relevanten Organismen *Bacillus subtilis*, *E. coli* und *Pseudomonas putida* existieren bereits sogenannte Chassis-Stämme. Einige der genomreduzierten Stämme finden bereits Anwendung in der Biotechnologie (Fehér et al., 2007; Juhas et al., 2014; Lieder et al., 2015; Morimoto et al., 2008). Für *C. glutamicum* gibt es bereits ebenso Ansätze zur Reduktion des Genoms um eine Basis für einen biotechnologisch interessanten und hoch spezifizierten Organismus zu erhalten (Unthan et al., 2015). Da Saccharose, als reine Kohlenstoffquelle und in Form des erneuerbaren Rohstoffs Melasse, bei der biotechnologischen Herstellung von Aminosäuren durch *C. glutamicum* die meist genutzte Kohlenstoffquelle darstellt (Kelle et al., 2005; Leuchtenberger et al., 2005), ist der für den Saccharosestoffwechsel essentielle Fructoseexporter ein wichtiges Target zur Erstellung eines biotechnologisch relevanten *C. glutamicum* Chassis-Organismus.

### 1.2.3 Regulation des Kohlenhydrat-Stoffwechsels

Kohlenhydrate stellen für *C. glutamicum* die wichtigste Quelle zur Energiegewinnung dar. Die meisten Mikroorganismen besitzen Regulationsmechanismen, welche die konsequente Nutzung von Kohlenstoffquellen und damit die Verwertung bevorzugter Kohlenstoffquellen ermöglichen. Im Gegensatz zu anderen Bakterien, wie *E. coli* und *B. subtilis*, zeigt *C. glutamicum* bei Wachstum auf den meisten Mischsubstraten allerdings keine Diauxie und somit keine Präferenz für eine bestimmte

Kohlenstoffquelle (Cocaign et al., 1993; Dominguez et al., 1993; Frunzke et al., 2008; Wendisch et al., 2000). Im Allgemeinen bevorzugt *C. glutamicum* leicht verwertbare Kohlenstoffquellen wie Saccharose, Fructose und Glucose nicht gegenüber anderen Kohlenstoffquellen. Ausnahmen sind jedoch beispielsweise die Verwertung von Glucose mit Glutamat, Glucose mit Ethanol sowie Acetat mit Ethanol (Arndt und Eikmanns, 2007; Arndt und Eikmanns, 2008; Kotrbova-Kozak et al., 2007; Krämer et al., 1990; Kronemeyer et al., 1995). Bei Wachstum mit einer dieser Kombinationen als Kohlenstoffquelle konnte Diauxie beobachtet werden. Als Ursache der Katabolitrepression bei Wachstum mit Glucose und Glutamat bzw. Ethanol wird der Einfluss des Repressors GlxR angenommen (Arndt und Eikmanns, 2007; Auchter et al., 2009; Park et al., 2010). Eine GlxR-Deletionsmutante zeigt eine Derepression der Gene, welche für den Glutamat-Transporter codieren (Park et al., 2010).

Neben der Regulation durch GlxR ist der Kohlenstoffmetabolismus von *C. glutamicum* durch eine Vielzahl weiterer Transkriptionsregulatoren kontrolliert. Dazu zählen unter anderem SugR, FruR, GntR1 und GntR2 sowie RamA und RamB (Auchter et al., 2011; Engels et al., 2008b; Engels und Wendisch, 2007; Frunzke et al., 2008; Gaigalat et al., 2007; Tanaka et al., 2008b; Teramoto et al., 2011). FruR und SugR regulieren unter anderem die Aufnahme der PTS-Substrate Saccharose, Fructose und Glucose. Der DeoR-Repressor SugR ist ein pleiotroper Transkriptionsrepressor aller spezifischen (*ptsS*, *ptsF*, *ptsG*) und allgemeinen (*ptsI*, *ptsH*) PTS-Gene. Er reprimiert deren Expression während des Wachstums auf Kohlenstoffquellen der Gluconeogenese, wie Acetat und Pyruvat (Engels und Wendisch, 2007; Gaigalat et al., 2007; Tanaka et al., 2008b) und nimmt eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zuckerstoffwechsels von *C. glutamicum* ein. Neben der Regulation der Aufnahmesysteme ist SugR auch an der Regulation einiger Gene beteiligt, welche für Enzyme der Glykolyse codieren. So bindet SugR beispielsweise an die Promotorregionen von *gapA*, *pfkA* und *pyk*, welche für die Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase, die Phosphofruktokinase A und die Pyruvatkinase codieren (Engels et al., 2008b; Toyoda et al., 2008). Die Anwesenheit einer der drei bekannten PTS-Substrate ermöglicht durch Derepression der entsprechenden Gene deren parallele Metabolisierung.

Als Effektormoleküle von SugR wurden die Zuckerphosphate Fructose-1-phosphat, Glucose-6-phosphat, Fructose-6-phosphat und Fructose-1,6-bisphosphat beschrieben (Engels und Wendisch, 2007; Gaigalat et al., 2007; Teramoto et al., 2011). Deren Bindung an SugR bewirkt das Ablösen des Repressors von der Promotorregion des Zielgens. Die Stärke des Effektors ist von der jeweiligen Promotorregion abhängig. Als stärkstes Effektormolekül für SugR wurde Fructose-1-phosphat (F-1-P) identifiziert (Gaigalat et al., 2007). Die Anwesenheit von Saccharose und Fructose,

beziehungsweise die Aufnahme von Fructose über  $EII_{\text{Fru}}$ , hat demnach den stärksten induzierenden Effekt auf die *pts*-Gene.

### 1.3 Transportsysteme in *C. glutamicum*

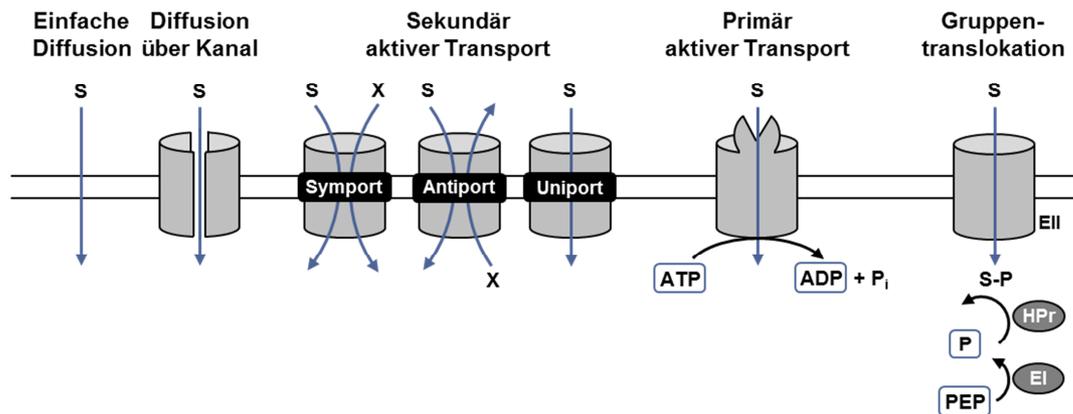
Als größte Permeabilitätsbarriere erschwert die Cytoplasmamembran den unerwünschten und unkontrollierbaren Fluss von Molekülen. Darüber hinaus wird der transmembranäre Fluss in *C. glutamicum* und anderen *Actinomyceten* durch die Impermeabilität ihrer charakteristischen Mycolsäureschicht weiter eingeschränkt. Somit setzen Import und Export der meisten Stoffe über die Membran das Vorhandensein spezifischer Transportproteine voraus. Etwa 18% aller Proteine aus *C. glutamicum* weisen eine Transmembrandomäne, 22% sogar zwei oder mehr Transmembrandomänen, auf (Winnen et al., 2005). Diese Angabe beruht auf der Vorhersage mittels der bioinformatischen Programme TMHMM (Krogh et al., 2001) und WHAT (Zhai und Saier, 2001). Winnen et al. (2005) identifizierten in *C. glutamicum* insgesamt 260 verschiedene Transportsysteme. Die weiterführende bioinformatische Analyse unserer Arbeitsgruppe ergab 106 zusätzliche hypothetische Membranproteine, welche im Genom von *C. glutamicum* codiert sind. *C. glutamicum* verfügt demnach über insgesamt 366 putative Transportproteine.

Transportproteine und Transportprozesse können aufgrund von Struktur, Kinetik oder energetischen Aspekten unterschieden werden. Auf Basis der *Transporter Classification Database* (TCDB) (Busch und Saier, 2002; Saier et al., 2014) lassen sich in *C. glutamicum*, wie auch in anderen Bakterien, fünf klar definierte Transportklassen unterscheiden: Kanäle, primär aktive Transporter, sekundär aktive Transporter, Gruppentranslokatoren und Elektronencarrier (Winnen et al., 2005). Die vier erstgenannten Klassen spielen für den Transport von Substraten und Metaboliten eine Rolle (Saier, 2000b). Eine Übersicht über die Transportklassen und deren Funktionsweise ist in Abbildung 2 gegeben. Mit Ausnahme von einigen kleinen Molekülen (Gase, Wasser) zeigen nur apolare, hydrophobe Stoffe, wie Tryptophan oder Glycerin, eine signifikante Permeabilität für die bakterielle Zellmembran (Krämer, 1994). Poren oder Kanäle erlauben den passiven Flux eines Stoffes ausschließlich entlang des Konzentrationsgradienten in die Zelle oder aus der Zelle heraus. Ausschlaggebend ist dabei die Konzentrationsdifferenz einer Substanz. Ein Beispiel ist der Efflux von kompatiblen Soluten über die mechanosensitiven Kanäle MscCG und MscL (Börngen et al., 2010; Nottebrock et al., 2003). Der Carrier-vermittelte Transport einer Substanz entlang des Konzentrationsgradienten ist als Uniport oder *facilitated diffusion* bekannt und vom Konzentrationsquotienten

abhängig. Aufgrund der Ähnlichkeit in Energieabhängigkeit und Mechanismus wird er jedoch dem sekundär aktiven Transport zugeschrieben.

Die Akkumulation von Substanzen gegen den Konzentrationsgradienten ist nur durch aktiven Transport, beispielsweise durch primär und sekundär aktive Transporter möglich, welche die deutliche Mehrheit in *C. glutamicum* bilden (Winnen et al., 2005). Die Triebkraft des sekundär aktiven Transports ist die Nutzung des elektrochemischen Potentials eines Stoffes (häufig  $H^+$ ,  $Na^+$ - oder  $K^+$ -Ionen), die für den Transport eines zweiten Stoffes eingesetzt wird. Zum Aufbau eines elektrochemischen Potentials werden Ionen durch die Membran gepumpt. Bei sekundär aktiven Transportern kann man zwischen Symport und Antiport unterscheiden (Abbildung 2). Auch der bereits erwähnte Uniport zählt zum sekundär aktiven Transport, wird aber, im Gegensatz zu Symport und Antiport, von seinem eigenen elektrochemischen Gradienten getrieben. Das Substrat kann daher nicht gegen seinen Konzentrationsgradienten transportiert werden. Im Gegensatz zum primär aktiven Transport sind sekundär aktive Systeme reversibel, was bei niedrigen Substratkonzentrationen oder eingeschränkter Energieverfügbarkeit zum Reexport oder Reimport des Substrats führen kann. Bei geringen Substratkonzentrationen ist die Triebkraft sekundär aktiver Transporter oft nicht hoch genug, um eine ausreichende Akkumulation des Substrats gewährleisten zu können. Häufig liegt die *accumulation ratio* nicht höher als  $10^2$  bis  $10^3$  (Krämer et al., 1994). Eine Ausnahme bildet beispielsweise der sekundär aktive Transporter BetP aus *C. glutamicum*. BetP nimmt sein Substrat Glycin-Betain im Symport mit zwei  $Na^+$ -Ionen auf. Die maximale *steady-state* Akkumulation von Glycin-Betain liegt bei etwa  $4 \times 10^6$  (Farwick et al., 1995).

Die Klassifizierung von Membranproteinen ist aufgrund von phylogenetischen und funktionellen Gemeinsamkeiten möglich. Sie erlaubt, mithilfe bioinformatischer Analysen, die Einteilung von Transportern in Transporterklasse, -subklasse, -familie und -subfamilie (Busch und Saier, 2002; Saier et al., 2006). Zusätzlich können Transporter nach Substratspezifitäten eingeordnet werden. Auf Basis der Aminosäuresequenz kann nach Strukturkriterien gesucht werden, welche die Einteilung eines Proteins in eine dieser Kategorien ermöglicht (Saier et al., 2006). Mit etwa 40% wird der größte Anteil der sekundär aktiven Transporter in *C. glutamicum* durch Transportsysteme der *Major Facilitator Superfamily* (MFS) repräsentiert (Winnen et al., 2005). Die 45 MFS-Transporter in *C. glutamicum* gehören insgesamt elf verschiedenen Familien an (Winnen et al., 2005), die jeweils für einen bestimmten Substrattyp spezifisch sind und zwölf oder mehr Transmembrandomänen aufweisen (Reddy et al., 2012; Winnen et al., 2005).



**Abbildung 2. Schematischer Vergleich der am Import und Export von Soluten beteiligten bakteriellen Transportsysteme.** Der Transport von Soluten in die Zelle oder aus der Zelle heraus kann aktiv oder passiv und unter Beteiligung verschiedener Transportklassen geschehen. Je nach Ladung des Solut (S) ist die passive Diffusion direkt durch die Membran (einfache Diffusion) oder über ein Membranprotein (Pore oder Kanal) möglich. Der aktive Transport lässt sich in primär und sekundär aktiven Transport unterteilen. Letzterer ermöglicht den Import oder Export von Soluten (S) durch Symport, Antiport oder Uniport (*facilitated diffusion*) mit einem zweiten Solut (X). Des Weiteren ist der Transport über Gruppentranslokation in Form von Phosphoenolpyruvat-abhängigen Phosphotransferase Systemen (PTS) möglich. PTS bestehen aus den allgemeinen Enzymen Enzym I (EI) und HPr sowie aus dem substratspezifischen Enzym II (EII).

Primär aktive Transportsysteme können ihr Substrat durch direkte Kopplung an eine chemische Reaktion, das heißt unter Nutzung einer primären Energiequelle, gegen den Konzentrationsgradienten transportieren. Sie weisen häufig eine hohe Substrataffinität auf und arbeiten unidirektional. Dies erlaubt die Akkumulation großer Mengen an Substrat. Ein Beispiel ist die ATP-abhängige Glutamataufnahme von *C. glutamicum*, die eine  $2 \times 10^5$ -fache Akkumulation gegen den Konzentrationsgradienten ermöglicht (Krämer und Lambert, 1990). Auch die Kohlenstoffquellen Ribose und Maltose werden über primär aktiven Transport aufgenommen. Verantwortlich dafür ist jeweils ein ABC-Transporter (Henrich, 2011; Nentwich et al., 2008). ABC steht für ATP-Binding Cassette, ein gemeinsames Strukturelement dieser Transporterfamilie, welches für die Hydrolyse von ATP als Energiequelle verantwortlich ist. *C. glutamicum* besitzt insgesamt 153 ABC-Transporter (Winnen et al., 2005).

Die vierte Klasse der am Transport von Substraten und Metaboliten beteiligten Transporter stellt die Gruppentranslokation über Phosphoenolpyruvat-abhängige Phosphotransferase Systeme (PTS) dar. PTS sind ausschließlich in Bakterien zu finden. Sie koppeln den Transport eines Substrats an dessen Phosphorylierung. PTS setzen sich aus den allgemeinen Enzymen Enzym I (EI) und Histidin Protein (HPr) sowie dem substratspezifischen Enzym II (EII<sub>Substrat</sub>) zusammen. EI wird durch

Umwandlung von PEP zu Pyruvat phosphoryliert und überträgt den Phosphorylrest auf HPr. HPr phosphoryliert wiederum EII, welches für Translokation und Phosphorylierung des Substrats verantwortlich ist (Postma et al., 1993). Durch die Phosphorylierung wird das Substrat dem Gleichgewicht entzogen. Je nach Organismus besteht der substratspezifische Enzymkomplex EII aus drei bis vier Proteinuntereinheiten oder Domänen (Robillard und Broos, 1999). In *C. glutamicum* bildet die membranständige Domäne EIIC die Permease (Moon et al., 2007). Die Domänen EIIA und EIIB transferieren die Phosphorylgruppe auf das Substrat. Im Gegensatz zu *E. coli* sind die EIIA-Domänen bei *C. glutamicum* kovalent an die Transmembrandomäne gebunden. EIIA wird durch die PTS-Phosphotransferase HPr phosphoryliert, und überträgt die Phosphorylgruppe auf die Domäne EIIB (Moon et al., 2007). Viele PTS EII-Komplexe weisen eine hohe Affinität zu ihrem Substrat auf. Der  $K_m$ -Wert des  $EII_{Glc}$  von *E. coli* oder *Salmonella typhimurium* liegt im unteren mikromolaren Bereich (Misset et al., 1983; Stock et al., 1982). Der bisher einzig bekannte  $K_m$ -Wert eines EII in *C. glutamicum* ist der  $K_m$  der Glucoseaufnahme über  $EII_{Glc}$  mit 14  $\mu$ M (Lindner et al., 2011).

Für den Transport eines Substrats sind oft mehrere Transportsysteme verantwortlich. Ein Beispiel ist der Import von Glutamat in *C. glutamicum*. Die Aufnahme von Glutamat erfolgt sowohl über einen primär als auch einen sekundär aktiven Transporter (Burkovski et al., 1996 ; Krämer und Lambert, 1990; Kronemeyer et al., 1995). Unter typischen Fermentationsbedingungen mit Glucose oder Saccharose als Kohlenstoffquelle ist der primär aktive Import von Glutamat unter anderem aufgrund von Katabolitrepression herunterreguliert (Kronemeyer et al., 1995). Auch für den Substratexport gibt es verschiedene Varianten. Die Exkretion der Aminosäure Threonin erfolgt in *C. glutamicum* sowohl über zwei verschiedene Carrier, als auch zu einem nicht unerheblichen Anteil über Diffusion (Palmieri et al., 1996). Die Existenz zweier Transportsysteme für ein Substrat ist für die Zelle ein Vorteil bei der Anpassung an ihre Umwelt. Für metabolisch wertvolle Substrate verfügen Bakterien häufig über mindestens zwei Aufnahmesysteme: ein mäßig affines System mit moderater Spezifität und ein hoch affines, spezifisches System. Das mäßig affine System ist häufig konstitutiv exprimiert, wohingegen der spezifische Importer in Abhängigkeit der Substratverfügbarkeit reguliert ist. *E. coli* und *C. glutamicum* besitzen beispielsweise jeweils sowohl ein hoch affines als auch ein weniger affines Aufnahmesystem für Methionin (Ayling et al., 1979; Kadner, 1974; Kadner und Watson, 1974; Trötschel et al., 2008). *S. typhimurium* verfügt sogar über drei Methioninimporter. Diese unterscheiden sich stark in ihrer Affinität zu Methionin (Ayling et al., 1979). Die Redundanz zweier Transporter führt jedoch zu

Komplikationen bei der Analyse und Identifizierung unbekannter Import- und Exportsysteme, da man zur Identifikation eines Transporters die Funktion eines zweiten Transporters als potentielle Störgröße berücksichtigen muss.

### 1.3.1 Substratexport in *C. glutamicum*

Der Transport von Stoffen und Metaboliten über die Membran ist nicht nur für die Versorgung der Zelle von Bedeutung, sondern auch im Hinblick auf den Export metabolischer Neben- bzw. Abfallprodukte, kompatibler Solute zur Osmoregulation oder toxischer Stoffe. Dazu zählen die Exkretion von Fermentationsendprodukten, wie Mono- oder Dicarbonsäuren, Alkoholen und Ketonen, sowie von Metaboliten die durch *Overflow*-Metabolismus entstehen. Eine Besonderheit ist der Export eines Metabolits als obligater Teil eines Stoffwechselwegs. Ein Beispiel dafür ist der Export von Fructose im Saccharosemetabolismus von *C. glutamicum*. Der Reimport über einen PTS-Transporter geht mit der für die Metabolisierung von Fructose erforderlichen Phosphorylierung einher (Dominguez und Lindley, 1996; Kalinowski et al., 2003; Moon et al., 2005) (vgl. Abschnitt 1.2).

Bisher sind in *C. glutamicum* weitaus weniger Exportsysteme als Importsysteme identifiziert. Zu den identifizierten Exportsystemen zählen einige Aminosäure-exporter, Exporter für kompatible Solute sowie einige Multidrugexporter. (Börngen et al., 2010; Kaidoh et al., 1997; Kennerknecht et al., 2002; Nottebrock et al., 2003; Simic et al., 2001; Tauch et al., 2000; Trötschel et al., 2005; Vrljić et al., 1996). Ein Beispiel für zwei bekannte und gut charakterisierte Exporter in *C. glutamicum* sind die mechanosensitiven Kanäle MscCG und MscL, die eine wichtige Rolle bei der Osmoregulation spielen (Börngen et al., 2010; Nottebrock et al., 2003). Um eine Zellyse bei einem hypoosmotischen Schock als Folge des unkontrollierten Einströmens von Wasser zu vermeiden, werden mechanosensitive Kanäle aktiviert, welche die Freisetzung von Ionen und kompatiblen Soluten wie Glycin-Betain und Prolin vermitteln (Ruffert et al., 1997). Die Aktivierung mechanosensitiver Kanäle erfolgt durch eine erhöhte Membranspannung. Neben diesen Kanälen sind in *C. glutamicum* auch einige sekundär aktive Exporter bekannt. Beispiele sind die Aminosäureexporter LysE (Lysin), ThrE (Threonin) und BrnFE (Methionin und verzweigtkettige Aminosäuren), welche wichtige Targets der Stammoptimierung für die Aminosäureproduktion darstellen (Kennerknecht et al., 2002; Simic et al., 2001; Trötschel et al., 2005; Vrljić et al., 1996). Durch eine Erhöhung der Exportrate wird beispielsweise eine bessere Trennung der Zellmasse vom Produkt ermöglicht. Zudem können durch eine Verringerung der internen Aminosäureakkumulation ungewollte *feedback*-Reaktionen, die Einfluss auf Wachstum und Produktivität haben,

vermindert werden (Ikeda und Katsumata, 1995; Trötschel, 2005). Der Export von Substanzen kann, wie der Import auch, über mehrere Transportsysteme erfolgen. So beruht der Export von Threonin nicht nur auf dem Export über den Transporter ThrE, sondern auch auf dem Export über einen zweiten bisher unbekanntem Carrier, sowie freier Diffusion (Palmieri et al., 1996).

Der Export von Zuckern hingegen ist bisher weitgehend unverstanden. Für *C. glutamicum* wird die Existenz von mindestens zwei Zuckerexportern angenommen. Zum einen wird ein Transportsystem für den Export des für *Actinomyceten* typischen Zellwandbausteins Trehalose benötigt, da die Veresterung der Mycolate mit Trehalose im Periplasma stattfindet (Brand et al., 2003; De Sousa-D'Auria et al., 2003), zum anderen setzt die vollständige Nutzung von Saccharose als Substrat, wie in Abschnitt 1.2 bereits erwähnt, das Vorhandensein eines Exportsystems für Fructose voraus (Dominguez et al., 1998; Moon et al., 2005). Beide Exporter sind bisher unbekannt.

### 1.4 Zuckerexport in Bakterien

Über den Export von Kohlenhydraten und die beteiligten Exportsysteme in Prokaryoten ist bisher wenig bekannt. In einigen Fällen ist der Mechanismus des Transports identifiziert, jedoch das entsprechende Transportsystem nicht. Ausnahmen bilden einige Zuckertransporter aus *E. coli*. Es bleibt anzumerken, dass diese Untersuchungen in den meisten Fällen aufgrund fehlender oder unzulänglicher biochemischer Charakterisierung wenig verlässlich sind. Auch über ihre physiologische Funktion wird noch spekuliert. *E. coli* verfügt über sogenannte *Sugar Efflux Transporter* (SET) (Liu et al., 1999a; Liu et al., 1999b), die alle der Klasse der *Major Facilitator Superfamily* (MFS) zugehörig sind (Saier et al., 1999). Proteine der SET-Familie sind in vielen Bakterien zu finden. In *E. coli* existieren beispielsweise fünf *Sugar Efflux Transporter*, in *B. subtilis* drei und in *Mycobacterium tuberculosis* sowie *Yersinia pestis* jeweils ein SET-Protein (Saier et al., 1999). Mit Ausnahme der Zuckerexporter aus *E. coli* sind diese nicht weiter charakterisiert. Für drei der fünf bekannten SET-Proteine aus *E. coli* (SetA, SetB, SetC) sind mögliche Substrate identifiziert worden (Liu et al., 1999a; Liu et al., 1999b). SetA und SetB exportieren beide Lactose und Glucose. SetA katalysiert auch den Export von IPTG und einer Vielzahl an Glucosiden und Galactosiden, weshalb auf ein breites Substratspektrum rückgeschlossen wurde (Liu et al., 1999b). Neben den Proteinen der SET-Familie existieren in *E. coli* der MFS-Transporter YdeA, ein putativer Exporter für Arabinose (Bost et al., 1999; Carolé et al., 1999), sowie 13 weitere putative Arabinose-Exporte (Koita und Rao, 2012). Über die physiologische Relevanz der Zuckerexporter in

*E. coli* herrscht bisher Unstimmigkeit. Aufgrund der erhöhten Expression des Gens *setA* bei Zuckerphosphatstress wird SetA die Funktion eines „Notfallventils“ bei der Antwort auf erhöhte interne Konzentrationen an Glucosephosphat zugesprochen (Sun und Vanderpool, 2011). Über die Möglichkeit der Beteiligung der Zuckerexporter am Overflow-Metabolismus wird ebenfalls diskutiert (Koita und Rao, 2012).

Zwei Beispiele für den Zuckerexport aufgrund eines Overflow-Metabolismus sind der Export von Galaktose beziehungsweise Glucose durch *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FD1 und *Lactobacillus sanfrancisco*. Die Nutzung von Lactose als Kohlenstoffquelle durch *L. lactis* subsp. *cremoris* FD1, geht mit der Aufnahme von Lactose über einen PTS-Transporter einher (Hengstenberg et al., 1989). Nach Aufnahme und hydrolytischer Spaltung tritt das Glucosemolekül als Glucose-6-phosphat in die Glykolyse ein, wohingegen Galactose-6-phosphat (Gal-6-P) über den Tagatose-6-phosphat Stoffwechsel auf Höhe von Dihydroxyacetonphosphat beziehungsweise Glycerinaldehyd-3-phosphat in die Glykolyse eintritt (van Rooijen et al., 1991). Aufgrund des langsamen Fluxes durch den Tagatose-6-phosphat Stoffwechsel wird Gal-6-P dephosphoryliert und die unphosphorylierte Galactose exportiert (Benthin et al., 1994). Die Wiederaufnahme und Verwertung von Galactose beginnt jedoch erst, wenn Lactose komplett verbraucht ist. Ein weiteres Beispiel für Overflow-Metabolismus ist der Glucoseefflux von *L. sanfrancisco* bei Wachstum mit Maltose als Substrat. Die Entstehung von intrazellulärer Glucose durch Hydrolyse von Maltose ist schneller als die nachfolgenden Schritte des Stoffwechsels, weshalb etwa die Hälfte der intrazellulär anfallenden Glucose über einen Uniporter exportiert und anschließend wiederaufgenommen wird (Neubauer et al., 1994). Die Transportsysteme für Galactose und Glucose sind jedoch in beiden Fällen nicht bekannt. Ein weiteres Beispiel für Zuckerexport ist der Export des Galactosemoleküls des grampositiven Bakteriums *Streptococcus thermophilus* bei Wachstum mit Lactose als Substrat (Hutkins und Ponne, 1991). *S. thermophilus* kann Lactose zwar als Substrat nutzen, jedoch nur das bei der Hydrolyse anfallende Glucosemolekül verwerten. Der Export von Galactose, welcher höchstwahrscheinlich auf Antiport von Lactose und Galactose beruht, bedeutet daher keinen energetischen Verlust für die Zelle. Auch dieser Transporter ist bisher nicht identifiziert.

Der Export von Fructose als obligater Teil eines bakteriellen Saccharosestoffwechsels ist, mit Ausnahme von *C. glutamicum*, bisher nicht bekannt. Jedoch wird der Export von Fructose in einer Fructokinase-defizienten Mutante von *Aerobacter aerogenes* bei Wachstum mit Saccharose angenommen. Bei Wachstum mit Saccharose phosphoryliert das gramnegative Bakterium *A. aerogenes* die aus der Hydrolyse von

Saccharose entstehende unphosphorylierte Fructose über eine ATP-abhängige Fructokinase (Kelker und Anderson, 1972). Im Gegensatz zum *A. aerogenes* Wildtyp konnte im Medium einer *A. aerogenes* Fructokinase-Mutante nach Zugabe von spezifisch am Fructosemolekül  $^{14}\text{C}$ -markierter Saccharose die Akkumulation von radioaktiv markierter Fructose beobachtet werden (Kelker und Anderson, 1972). Aufgrund der externen Akkumulation von Fructose, wurde der Export von Fructose angenommen. Die Abnahme an externer radioaktiv markierter Fructose sprach für die Wiederaufnahme von Fructose über einen fructosespezifischen PTS-Transporter, welche mit der Phosphorylierung von Fructose einhergeht (Kelker und Anderson, 1972). Das am Export von Fructose beteiligte Transportsystem in *A. aerogenes* ist, wie in *C. glutamicum*, nicht identifiziert.

Über die Eigenschaften des Exports von Fructose in *C. glutamicum* ist bisher nichts bekannt. Im Allgemeinen kann die Exkretion eines Stoffes durch passive Diffusion, durch Reversibilität des Aufnahmeprozesses aufgrund der Umkehrung der Konzentrationsverhältnisse, oder durch spezifische Exportsysteme erfolgen. Die Stoffeigenschaften von Fructose schließen die Möglichkeit der passiven Diffusion durch die Membran aus. Aufgrund der Irreversibilität von PTS-Transportern kann die Reversibilität des Aufnahmeprozesses ebenso ausgeschlossen werden. Die meisten Bakterien besitzen eine Fructokinase um unphosphorylierte Fructose zu phosphorylieren. Damit Export und Reimport von Fructose über einen PTS-Transporter energetisch und dadurch evolutiv keinen Nachteil gegenüber einer direkten Phosphorylierung darstellen, sollte der Vorgang des In- und Exports energetisch äquivalent zur direkten Phosphorylierung sein. Würde Fructose beispielsweise durch primär aktiven Transport exportiert, würde sowohl eine primäre Energiequelle, z.B. ein Molekül ATP, als auch ein Molekül PEP für Import und Phosphorylierung von Fructose verbraucht. Energetisch wäre der Efflux von Fructose über einen Kanal oder mittels Uniport sinnvoller, da der Export durch seinen eigenen Konzentrationsgradienten getrieben würde. Durch die Wiederaufnahme von Fructose aus dem Medium sollte der Konzentrationsgradient erhalten bleiben. Die Familie der MFS-Transporter, auch Uniporter-Symport-Antiporter-Familie genannt (Goswitz und Brooker, 1995; Pao et al., 1998), beinhaltet einige bekannte Zuckertransporter. Neben den Transportern der SET-Familie ist auch die Familie der *Sugar Porter* (SP) bekannt. Die hoch konservierten *Sugar Porter* transportierten ihr Substrat entweder durch Uniport oder  $\text{H}^+$ -Symport. Als Substrate der SP-Familie sind eine Vielzahl an Mono- und Disacchariden, unter anderem Glucose, Fructose, Mannose, Galactose und Maltose, bekannt (Saier, 2000a). *C. glutamicum* verfügt über insgesamt 45 MFS-Transporter (Winnen et al., 2005).

Auf Basis dieser Annahmen wäre zu erwarten, dass der gesuchte Fructoseexporter von *C. glutamicum* über folgende Eigenschaften verfügt: Der Transporter sollte neben der Fähigkeit zum Fructoseexport möglichst kein ATP verbrauchen. Ein primär aktiver Export und ein Reimport über ein PTS wären energetisch unwirtschaftlich für die Zelle. Der Export sollte zusammen mit dem Import, soweit möglich, energetisch äquivalent zur intrazellulären Phosphorylierung sein. Die bei Wachstum mit Saccharose beobachtete Akkumulation von Fructose im Medium könnte ein Hinweis auf ein Exportportsystem mit hoher Transportrate sein, welche größer der Wiederaufnahme von Fructose ist. Übersteigt die interne Fructosekonzentration die externe Konzentration an Fructose, wäre ein Export über einen Kanal oder Carrier-vermittelte *facilitated diffusion* denkbar.

### 2 Ziele der Arbeit

Im Zentrum dieser Arbeit stand die Untersuchung des Exports von Fructose in *C. glutamicum*. Aufgrund der bisherigen Datenlage wurde der Export von Fructose bei Wachstum mit Saccharose als Substrat zwar angenommen, konnte aber biochemisch nicht belegt werden. Um die Existenz des Fructoseexports zu belegen, sollte eine biochemische Messmethode entwickelt werden, die die Untersuchung der Transportcharakteristika ermöglicht. Die biochemische Untersuchung sollte Aufschluss über die Natur des Transporters und dessen kinetische Parameter, und somit Hinweise auf beteiligte Transportsysteme, geben. Des Weiteren sollte eine Targetanalyse zur Identifizierung des Fructoseexporters vorgenommen werden.

Um den Fructoseexport eindeutig biochemisch belegen zu können, sowie die biochemische Charakterisierung des Fructoseexports zu ermöglichen, sollte zunächst eine Messmethode entwickelt werden, die eine spezifische Analyse des Fructoseexports erlaubt. Die Erfahrungen bisheriger Untersuchungen zum Export von Substanzen zeigten, dass ein geeigneter Modellstamm zur Charakterisierung des Exports von Vorteil ist. Aufgrund der bisherigen Datenlage war anzunehmen, dass sich die Messung des Fructoseefflux im *C. glutamicum* Wildtyp als zu unübersichtlich erweisen könnte. Ein Ziel dieser Arbeit war daher die Konstruktion eines *C. glutamicum* Modellstamms zur Messung des Fructoseefflux mit Saccharose als Substrat. Dieser Stamm sollte genetisch so vereinfacht sein, dass der Export von Fructose aus der Zelle spezifisch verfolgt werden kann. Um einen Stamm zu designen, der defizient in der Wiederaufnahme von Fructose ist, sollte zunächst die Charakterisierung der an der Aufnahme von Fructose beteiligten Transportsysteme vorgenommen werden. Um den intrazellulären Verlust von Fructose im Modellstamm zu vermeiden, sollte eine Untersuchung zur Relevanz der intrazellulären Umwandlung von Fructose in andere Metabolite stattfinden. Die Konstruktion des Modellstamms sollte auf Grundlage der dabei erhaltenen Daten realisiert werden.

Der konstruierte *C. glutamicum* Modellstamm sollte der umfassenden biochemischen und physiologischen Charakterisierung des Fructoseexports, sowie als Basis zur Identifizierung des Fructoseexporters dienen. Anhand von Proteinsequenzen bekannter (putativ) am Export von Zuckern beteiligter Transportsysteme sollte des Weiteren eine Homologiesuche durchgeführt werden, um putative Zuckerexporter in *C. glutamicum* identifizieren zu können. Die dabei erhaltenen Targets sollten auf ihren Einfluss am Export von Fructose untersucht werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

##### 3.1.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme von *Escherichia coli* und *Corynebacterium glutamicum* sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die Zellen wurden mittels Roti®-Store Cryoröhrchen (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers bei -80°C gelagert.

**Tabelle 1. In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme**

Stamm	Genotyp	Quelle
<i>E. coli</i>		
DH5α	<i>endA1 supE44 thi-1 λ-recA1 gyrA96 relA1 deoR Δ(lacZYA-argF) U196 φ80DlacZ ΔM15mcrA Δ(mmr hsdRMS mcrBC)</i>	(Grant et al., 1990)
<i>C. glutamicum</i>		
ATCC 13032	Wildtyp (WT)	(Abe et al., 1967)
Δ <i>atlR</i>	WT mit Deletion von <i>atlR</i>	(Laslo et al., 2012)
Δ <i>mtlD</i>	WT mit Deletion von <i>mtlD</i>	diese Arbeit
Δ <i>ptsF</i>	WT mit Deletion von <i>ptsF</i>	diese Arbeit
Δ <i>ptsG</i>	WT mit Deletion von <i>ptsG</i>	diese Arbeit
Δ <i>ptsS</i>	WT mit Deletion von <i>ptsS</i>	diese Arbeit
Δ <i>scrB</i>	WT mit Deletion von <i>scrB</i>	(Engels et al., 2008a)
Δ <i>ptsF</i> Δ <i>ptsG</i>	WT mit Deletion von <i>ptsF</i> und <i>ptsG</i>	diese Arbeit
Δ <i>iolT1</i> Δ <i>iolT2</i>	WT mit Deletion von <i>iolT1</i> und <i>iolT2</i>	(Krings et al., 2006)
Δ <i>mscL</i> Δ <i>mscCG</i>	WT mit Deletion von <i>mscL</i> und <i>mscCG</i>	(Börngen, 2009)
Δ <i>iolT1</i> Δ <i>iolT2</i> Δ <i>ptsG</i>	WT mit Deletion von <i>iolT1</i> , <i>iolT2</i> , <i>ptsG</i>	diese Arbeit
FI	WT mit Deletion von <i>ptsF</i> , <i>ptsG</i> , <i>iolT1</i> , <i>iolT2</i>	diese Arbeit
FIM	WT mit Deletion von <i>ptsF</i> , <i>ptsG</i> , <i>iolT1</i> , <i>iolT2</i> , <i>mtlD</i>	diese Arbeit
FIMS	WT mit Deletion von <i>ptsF</i> , <i>ptsG</i> , <i>iolT1</i> , <i>iolT2</i> , <i>mtlD</i> mit (pXMJ19_ptsS) bzw. (pEKEx2_ptsS)	diese Arbeit
IMcg0772	WT mit Insertion von pDrive in <i>cg0772</i>	diese Arbeit
FIM IMcg0206	WT mit Deletion von <i>ptsF</i> , <i>ptsG</i> , <i>iolT1</i> , <i>iolT2</i> , <i>mtlD</i> und Insertion von pDrive in <i>cg0206</i>	diese Arbeit
FIM IMcg0340	WT mit Deletion von <i>ptsF</i> , <i>ptsG</i> , <i>iolT1</i> , <i>iolT2</i> , <i>mtlD</i> und Insertion von pDrive in <i>cg0340</i>	diese Arbeit
FIM IMcg0501	WT mit Deletion von <i>ptsF</i> , <i>ptsG</i> , <i>iolT1</i> , <i>iolT2</i> , <i>mtlD</i> und Insertion von pDrive in <i>cg0501</i>	diese Arbeit
FIM IMcg0772	WT mit Deletion von <i>ptsF</i> , <i>ptsG</i> , <i>iolT1</i> , <i>iolT2</i> , <i>mtlD</i> und Insertion von pDrive in <i>cg0772</i>	diese Arbeit
FIM IMcg1289	WT mit Deletion von <i>ptsF</i> , <i>ptsG</i> , <i>iolT1</i> , <i>iolT2</i> , <i>mtlD</i> und Insertion von pDrive in <i>cg1289</i>	diese Arbeit
FIM IMcg1399	WT mit Deletion von <i>ptsF</i> , <i>ptsG</i> , <i>iolT1</i> , <i>iolT2</i> , <i>mtlD</i> und Insertion von pDrive in <i>cg1399</i>	diese Arbeit
FIM IMcg1526	WT mit Deletion von <i>ptsF</i> , <i>ptsG</i> , <i>iolT1</i> , <i>iolT2</i> , <i>mtlD</i> und Insertion von pDrive in <i>cg1526</i>	diese Arbeit

## Material und Methoden

Stamm	Genotyp	Quelle
<i>C. glutamicum</i>		
FIM IMcg2618	WT mit Deletion von <i>ptsF</i> , <i>ptsG</i> , <i>iolT1</i> , <i>iolT2</i> , <i>mtlD</i> und Insertion von pDrive in <i>cg2618</i>	diese Arbeit
FIM IMcg2739	WT mit Deletion von <i>ptsF</i> , <i>ptsG</i> , <i>iolT1</i> , <i>iolT2</i> , <i>mtlD</i> und Insertion von pDrive in <i>cg2739</i>	diese Arbeit
FIM IMcg2893	WT mit Deletion von <i>ptsF</i> , <i>ptsG</i> , <i>iolT1</i> , <i>iolT2</i> , <i>mtlD</i> und Insertion von pDrive in <i>cg2893</i>	diese Arbeit
FIM IMcg2971	WT mit Deletion von <i>ptsF</i> , <i>ptsG</i> , <i>iolT1</i> , <i>iolT2</i> , <i>mtlD</i> und Insertion von pDrive in <i>cg2971</i>	diese Arbeit
FIM IMcg3038	WT mit Deletion von <i>ptsF</i> , <i>ptsG</i> , <i>iolT1</i> , <i>iolT2</i> , <i>mtlD</i> und Insertion von pDrive in <i>cg3038</i>	diese Arbeit
FIM IMcg3240	WT mit Deletion von <i>ptsF</i> , <i>ptsG</i> , <i>iolT1</i> , <i>iolT2</i> , <i>mtlD</i> und Insertion von pDrive in <i>cg3240</i>	diese Arbeit
FIM IMcg3245	WT mit Deletion von <i>ptsF</i> , <i>ptsG</i> , <i>iolT1</i> , <i>iolT2</i> , <i>mtlD</i> und Insertion von pDrive in <i>cg3245</i>	diese Arbeit
FIM IMcg3245	WT mit Deletion von <i>ptsF</i> , <i>ptsG</i> , <i>iolT1</i> , <i>iolT2</i> , <i>mtlD</i> und Insertion von pDrive in <i>cg3245</i>	diese Arbeit
FIM IMcg3301	WT mit Deletion von <i>ptsF</i> , <i>ptsG</i> , <i>iolT1</i> , <i>iolT2</i> , <i>mtlD</i> und Insertion von pDrive in <i>cg3301</i>	diese Arbeit
FIM IMcg3353	WT mit Deletion von <i>ptsF</i> , <i>ptsG</i> , <i>iolT1</i> , <i>iolT2</i> , <i>mtlD</i> und Insertion von pDrive in <i>cg3353</i>	diese Arbeit
FIM IMcg3387	WT mit Deletion von <i>ptsF</i> , <i>ptsG</i> , <i>iolT1</i> , <i>iolT2</i> , <i>mtlD</i> und Insertion von pDrive in <i>cg3387</i>	diese Arbeit
FIM IMcg3395	WT mit Deletion von <i>ptsF</i> , <i>ptsG</i> , <i>iolT1</i> , <i>iolT2</i> , <i>mtlD</i> und Insertion von pDrive in <i>cg3395</i>	diese Arbeit
FIMS IMcg0206	WT mit Deletion von <i>ptsF</i> , <i>ptsG</i> , <i>iolT1</i> , <i>iolT2</i> , <i>mtlD</i> und Insertion von pDrive in <i>cg0206</i> (pXMJ19_ptsS)	diese Arbeit
FIMS IMcg0340	WT mit Deletion von <i>ptsF</i> , <i>ptsG</i> , <i>iolT1</i> , <i>iolT2</i> , <i>mtlD</i> und Insertion von pDrive in <i>cg0340</i> (pXMJ19_ptsS)	diese Arbeit
FIMS IMcg0501	WT mit Deletion von <i>ptsF</i> , <i>ptsG</i> , <i>iolT1</i> , <i>iolT2</i> , <i>mtlD</i> und Insertion von pDrive in <i>cg0501</i> (pXMJ19_ptsS)	diese Arbeit
FIMS IMcg0772	WT mit Deletion von <i>ptsF</i> , <i>ptsG</i> , <i>iolT1</i> , <i>iolT2</i> , <i>mtlD</i> und Insertion von pDrive in <i>cg0772</i> (pXMJ19_ptsS)	diese Arbeit
FIMS IMcg1289	WT mit Deletion von <i>ptsF</i> , <i>ptsG</i> , <i>iolT1</i> , <i>iolT2</i> , <i>mtlD</i> und Insertion von pDrive in <i>cg1289</i> (pXMJ19_ptsS)	diese Arbeit
FIMS IMcg1526	WT mit Deletion von <i>ptsF</i> , <i>ptsG</i> , <i>iolT1</i> , <i>iolT2</i> , <i>mtlD</i> und Insertion von pDrive in <i>cg1526</i> (pXMJ19_ptsS)	diese Arbeit
FIMS IMcg2618	WT mit Deletion von <i>ptsF</i> , <i>ptsG</i> , <i>iolT1</i> , <i>iolT2</i> , <i>mtlD</i> und Insertion von pDrive in <i>cg2618</i> (pXMJ19_ptsS)	diese Arbeit
FIMS IMcg2893	WT mit Deletion von <i>ptsF</i> , <i>ptsG</i> , <i>iolT1</i> , <i>iolT2</i> , <i>mtlD</i> und Insertion von pDrive in <i>cg2893</i> (pXMJ19_ptsS)	diese Arbeit
FIMS IMcg2971	WT mit Deletion von <i>ptsF</i> , <i>ptsG</i> , <i>iolT1</i> , <i>iolT2</i> , <i>mtlD</i> und Insertion von pDrive in <i>cg2971</i> (pXMJ19_ptsS)	diese Arbeit
FIMS IMcg3038	WT mit Deletion von <i>ptsF</i> , <i>ptsG</i> , <i>iolT1</i> , <i>iolT2</i> , <i>mtlD</i> und Insertion von pDrive in <i>cg3038</i> (pXMJ19_ptsS)	diese Arbeit
FIMS IMcg3240	WT mit Deletion von <i>ptsF</i> , <i>ptsG</i> , <i>iolT1</i> , <i>iolT2</i> , <i>mtlD</i> und Insertion von pDrive in <i>cg3240</i> (pXMJ19_ptsS)	diese Arbeit
FIMS IMcg3245	WT mit Deletion von <i>ptsF</i> , <i>ptsG</i> , <i>iolT1</i> , <i>iolT2</i> , <i>mtlD</i> und Insertion von pDrive in <i>cg3245</i> (pXMJ19_ptsS)	diese Arbeit
FIMS IMcg3301	WT mit Deletion von <i>ptsF</i> , <i>ptsG</i> , <i>iolT1</i> , <i>iolT2</i> , <i>mtlD</i> und Insertion von pDrive in <i>cg3301</i> (pXMJ19_ptsS)	diese Arbeit

Stamm	Genotyp	Quelle
<i>C. glutamicum</i>		
FIMS IMcg3353	WT mit Deletion von <i>ptsF</i> , <i>ptsG</i> , <i>iolT1</i> , <i>iolT2</i> , <i>mtlD</i> und Insertion von pDrive in <i>cg3353</i> (pXMJ19_ <i>ptsS</i> )	diese Arbeit
FIMS IMcg3395	WT mit Deletion von <i>ptsF</i> , <i>ptsG</i> , <i>iolT1</i> , <i>iolT2</i> , <i>mtlD</i> und Insertion von pDrive in <i>cg3395</i> (pXMJ19_ <i>ptsS</i> )	diese Arbeit

### 3.1.2 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2 aufgeführt.

**Tabelle 2. In dieser Arbeit verwendete Plasmide**

Name	Beschreibung	Quelle
pDrive	Shuttlevektor ( <i>Kan<sup>R</sup></i> , <i>lacZ</i> )	Qiagen, Hilden
pDrive_IMcg0206	kodiert ~ 500 bp von <i>cg0206</i> aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pDrive_IMcg0501	kodiert ~ 500 bp von <i>cg0501</i> aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pDrive_IMcg0772	kodiert ~ 500 bp von <i>cg0772</i> aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pDrive_IMcg1289	kodiert ~ 500 bp von <i>cg1289</i> aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pDrive_IMcg1399	kodiert ~ 500 bp von <i>cg1399</i> aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pDrive_IMcg1526	kodiert ~ 500 bp von <i>cg1526</i> aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pDrive_IMcg2618	kodiert ~ 500 bp von <i>cg2618</i> aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pDrive_IMcg2739	kodiert ~ 500 bp von <i>cg2739</i> aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pDrive_IMcg2893	kodiert ~ 500 bp von <i>cg2893</i> aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pDrive_IMcg2971	kodiert ~ 500 bp von <i>cg2971</i> aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pDrive_IMcg3038	kodiert ~ 500 bp von <i>cg3038</i> aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pDrive_IMcg3240	kodiert ~ 500 bp von <i>cg3240</i> aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pDrive_IMcg3245	kodiert ~ 500 bp von <i>cg3245</i> aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pDrive_IMcg3301	kodiert ~ 500 bp von <i>cg3301</i> aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pDrive_IMcg3353	kodiert ~ 500 bp von <i>cg3353</i> aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pDrive_IMcg3387	kodiert ~ 500 bp von <i>cg3387</i> aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pDrive_IMcg3395	kodiert ~ 500 bp von <i>cg3395</i> aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pEKEx2	Expressionsvektor ( <i>Kan<sup>R</sup></i> , <i>lacI<sup>Q</sup></i> , <i>tacP</i> , <i>ori of pBL1</i> , <i>pUC18 mcs</i> )	(Eikmanns et al., 1991)
pEKEx2_ <i>ptsS</i>	kodiert <i>ptsS</i> aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pK18mobsacB	Deletionsvektor ( <i>Kan<sup>R</sup></i> , <i>oriV<sub>E.c.</sub></i> , <i>oriT</i> , <i>mob</i> , <i>sacB</i> )	(Schäfer et al., 1994)
pK18mobsacB_ <i>mtlD</i>	Zur Deletion von <i>mtlD</i> aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pK19mobsacB	Deletionsvektor ( <i>Kan<sup>R</sup></i> , <i>oriV<sub>E.c.</sub></i> , <i>oriT</i> , <i>mob</i> , <i>sacB</i> )	(Schäfer et al., 1994)
pK19mobsacB_ <i>ptsF</i>	Zur Deletion von <i>ptsF</i> aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pK19mobsacB_ <i>ptsG</i>	Zur Deletion von <i>ptsG</i> aus <i>C. glutamicum</i>	(Henrich, 2011)
pK19mobsacB_ <i>ptsS</i>	Zur Deletion von <i>ptsS</i> aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pK19mobsacB_ <i>sugR</i>	Zur Deletion von <i>sugR</i> aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pVWEx1	Expressionsvektor ( <i>Kan<sup>R</sup></i> , <i>P<sub>tac</sub></i> , <i>lacI<sup>q</sup></i> , <i>pHM1519</i> , <i>oriV<sub>E.c.</sub></i> , <i>oriV<sub>C.gl.</sub></i> )	(Peters-Wendisch et al., 2001)
pVWEx1_ <i>ptsF</i>	kodiert <i>ptsF</i> aus <i>C. glutamicum</i>	Lindner, S. (unpubliziert)
pVWEx1_ <i>ptsG</i>	kodiert <i>ptsG</i> aus <i>C. glutamicum</i>	Lindner, S. (unpubliziert)
pXMJ19	Expressionsvektor ( <i>Cam<sup>R</sup></i> , <i>P<sub>tac</sub></i> , <i>lacI<sup>q</sup></i> , <i>pK18 OriV<sub>E.c.</sub></i> , <i>pBLoriV<sub>C.gl.</sub></i> )	(Jakoby et al., 1999)
pXMJ19_ <i>ptsS</i>	kodiert <i>ptsS</i> aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pXMJ19_ <i>cg0772</i>	kodiert <i>cg0772</i> aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pXMJ19_ <i>ptsS_cg0772</i>	kodiert <i>ptsS</i> und <i>cg0772</i> aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit

### 3.1.3 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (Primer) sind in Tabelle 3 aufgeführt.

**Tabelle 3. In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide (Primer).** Die Ribosomenbindestellen sind fett gedruckt, die in den Oligonukleotiden enthaltenen Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen. Das jeweilige Restriktionsendonuklease ist in Klammern dargestellt. Alle Primer stammen von Eurofins MWG Synthesis GmbH (Ebersberg) und wurden entsprechend der Angaben des Herstellers mit Wasser verdünnt um eine Konzentration von 100 nmol/ml zu erhalten.

Oligonukleotid	Sequenz 5' - 3'	Anwendung
Del_ <i>iolT1</i> _T_F	CTGAACCCGCTAGGGTTTG	Kontrolle <i>ΔiolT1</i>
Del_ <i>iolT1</i> _T_R	GTTTCGGTAGCACGGTTTAG	Kontrolle <i>ΔiolT1</i>
Del_ <i>iolT2</i> _T_F	CTTGCCCTGGAGCACATGG	Kontrolle <i>ΔiolT2</i>
Del_ <i>iolT2</i> _T_R	TGCGGAGGCGAAGGATACTG	Kontrolle <i>ΔiolT2</i>
Del_ <i>mtlD</i> _1_F	ATTG <u>TCTAG</u> ATTCTAGCGGGTTGTGGAAAG (XbaI)	Deletion <i>mtlD</i>
Del_ <i>mtlD</i> _1_R	TTATGGATCCGCGTTGGGATTCTTCCTAC (BamHI)	Deletion <i>mtlD</i>
Del_ <i>mtlD</i> _2_F	TGACGGATCCGTGTCAGGAGAACTTTAGTG (BamHI)	Deletion <i>mtlD</i>
Del_ <i>mtlD</i> _2_R	GAGT <u>CCCGGG</u> TGTGTTACTCAGCGTCAAGG (XmaI)	Deletion <i>mtlD</i>
Del_ <i>mtlD</i> _T_F	TGTCAACCGAGCAGAGTTTC	Kontrolle <i>ΔmtlD</i>
Del_ <i>mtlD</i> _T_R	CTTCCGCAATCGCTGCTC	Kontrolle <i>ΔmtlD</i>
Del_ <i>ptsF</i> _1_F	GAGG <u>TCTAGA</u> ACAGGTGCTTGTACCTTG (XbaI)	Deletion <i>ptsF</i>
Del_ <i>ptsF</i> _1_R	GATCGGATCCAGGACAGATACGGCTTCGG (BamHI)	Deletion <i>ptsF</i>
Del_ <i>ptsF</i> _2_F	GATCGGATCCCGATGTCTGGTCGGACATTG (BamHI)	Deletion <i>ptsF</i>
Del_ <i>ptsF</i> _2_R	GAGT <u>CCCGGG</u> TGTGTTACTCAGCGTCAAGG (SmaI)	Deletion <i>ptsF</i>
Del_ <i>ptsF</i> _T_F	CTGCTCCGAACCTGATTAAG	Kontrolle <i>ΔptsF</i>
Del_ <i>ptsF</i> _T_R	CTTGAATGCACGAATCCCTCAC	Kontrolle <i>ΔptsF</i>
Del_ <i>ptsS</i> _1_F	<u>GGATCCC</u> GCAACCACGGATCTATCA (BamHI)	Deletion <i>ptsS</i>
Del_ <i>ptsS</i> _1_R	CCAACCTCCATACTCCATTCCGTTGCTTCGCCCCAAT GT	Deletion <i>ptsS</i>
Del_ <i>ptsS</i> _2_F	GGAATGGAGTATGGAAGTTGGAGCGTCAGCGATGCCAT GTT	Deletion <i>ptsS</i>
Del_ <i>ptsS</i> _2_R	<u>TCTAG</u> ACCGAGGCATGACCTGGTTGA (XbaI)	Deletion <i>ptsS</i>
Del_ <i>ptsS</i> _T_F	CCCTGCTCCATATCTTCAAC	Kontrolle <i>ΔptsS</i>
Del_ <i>ptsS</i> _T_R	GCAGGATGATACCCAACAG	Kontrolle <i>ΔptsS</i>
Del_ <i>sugR</i> _1_F	GCT <u>GGATC</u> CTCCGTCGCGCAATGATTGACG (BamHI)	Deletion <i>sugR</i>
Del_ <i>sugR</i> _1_R	CGT <u>AAGCTT</u> CAGCCGTTAATGAGGCAATCTG (HindIII)	Deletion <i>sugR</i>
Del_ <i>sugR</i> _2_F	CGT <u>AAGCTT</u> GATCGTGAGCTTGGCGCAATC (HindIII)	Deletion <i>sugR</i>
Del_ <i>sugR</i> _2_R	GCT <u>GAGCTT</u> CTCTCGACGCACCACTAGATCAC (SacI)	Deletion <i>sugR</i>
Del_ <i>sugR</i> _T_F	GCCGCACAGTTAAGACCTTG	Kontrolle <i>ΔsugR</i>
Del_ <i>sugR</i> _T_R	AACACCCACGCGCATCTTC	Kontrolle <i>ΔsugR</i>
IM_ <i>cg0206</i> _F	TCAACGTGCCCTTAGGAATC	Insertion <i>cg0206</i>
IM_ <i>cg0206</i> _R	AATACCAAGGCGCCAGCAGC	Insertion <i>cg0206</i>
IM_ <i>cg0206</i> _T	GCAATGATCGGTCCTTTAG	Kontrolle IM <i>cg0206</i>
IM_ <i>cg0340</i> _F	TGGCATCCACATGCATCG	Insertion <i>cg0340</i>
IM_ <i>cg0340</i> _R	TGCGTAGCTGATGGAGAAGG	Insertion <i>cg0340</i>
IM_ <i>cg0340</i> _T	ATCCTGCGAGACTTAC	Kontrolle IM <i>cg0340</i>
IM_ <i>cg0501</i> _F	CTTTGGAGCACGCCGATGAG	Insertion <i>cg0501</i>
IM_ <i>cg0501</i> _R	ACACTGGTCGGCGACCAATG	Insertion <i>cg0501</i>
IM_ <i>cg0501</i> _T	ACAGGACTGCAGACAGAAAAC	Kontrolle IM <i>cg0501</i>
IM <i>cg0772</i> _F	CTTCATCGCTGGTCTG	Insertion <i>cg0772</i>

## Material und Methoden

Oligonukleotid	Sequenz 5' - 3'	Anwendung
IM_cg0772_R	CCACCGACGTAGTTTC	Insertion cg0772
IM_cg0772_T	GCCCGACAGAATATCACTGG	Kontrolle IMcg0772
IM_cg1289_F	AGGCGATCCACCAATCGTC	Insertion cg1289
IM_cg1289_R	TGCCAACGGCGAAAAGTC	Insertion cg1289
IM_cg1289_T	CTTCCATGGCGTTCATTCCG	Kontrolle IMcg1289
IM_cg1399_F	CTTCCATGGCGTTCATTCCG	Insertion cg1399
IM_cg1399_R	GGTGCAGCTCTTGGAGTGTG	Insertion cg1399
IM_cg1399_T	GCGGACCTTTAAGGCTTTAC	Kontrolle IMcg1399
IM_cg1526_F	TATCGCTCCAGCGACAC	Insertion cg1526
IM_cg1526_R	ACGGAGCCAACCAGAAG	Insertion cg1526
IM_cg1526_T	CAGTAGTACCGGCATAAG	Kontrolle IMcg1526
IM_cg2618_F	TGCATCACAGTGGTGATCAG	Insertion cg2618
IM_cg2618_R	GATGATGCCCTGCTGTTCTG	Insertion cg2618
IM_cg2618_T	CCGCGATGTGTTCTTCTCTG	Kontrolle IMcg2618
IM_cg2739_F	ATACCGCCGATCACGAGTCC	Insertion cg2739
IM_cg2739_R	GTGTGGCTGGTTTCGTAATC	Insertion cg2739
IM_cg2739_T	GAAGGAACTTCCCGCTGTG	Kontrolle IMcg2739
IM_cg2893_F	GCGTTTGCTCCAATG	Insertion cg2893
IM_cg2893_R	AACCACACCGCCTAAG	Insertion cg2893
IM_cg2893_T	CCGACCATTTCGTTACAG	Kontrolle IMcg2893
IM_cg2971_F	TGCTGATGACGGTTACG	Insertion cg2971
IM_cg2971_R	TGGTGGTCAAGGAGAAG	Insertion cg2971
IM_cg2971_T	GCTTCATGCTGTGAAAGG	Kontrolle IMcg2971
IM_cg3038_F	CGTGGTGGTGATTG	Insertion cg3038
IM_cg3038_R	GATGCGGTGTGGATG	Insertion cg3038
IM_cg3038_T	GAAAGGCCTGCTCGTTG	Kontrolle IMcg3038
IM_cg3240_F	TCCGGCGTGCATACTTC	Insertion cg3340
IM_cg3240_R	AGGATTCGCCAATGAGC	Insertion cg3340
IM_cg3240_T	TGGCGCATGATGAACTC	Kontrolle IMcg3340
IM_cg3245_F	CTGCACCTGCATTCGAAATC	Insertion cg3345
IM_cg3245_R	TGCTGCTATGCCCAGTTG	Insertion cg3345
IM_cg3245_T	AAGTAGCTGCTGGTCGAGTC	Kontrolle IMcg3345
IM_cg3301_F	GCCGCATGGTCGTTATCCTG	Insertion cg3301
IM_cg3301_R	GCAACCGCATAGCCTGGAAG	Insertion cg3301
IM_cg3301_T	TGCTTATCGACGCCACTTC	Kontrolle IMcg3301
IM_cg3353_F	AAAGCAGCGGTGATTGG	Insertion cg3353
IM_cg3353_R	GAGCAGGGTGACAAATGTG	Insertion cg3353
IM_cg3353_T	ACCAGAATCGGGAGGAC	Kontrolle IMcg3353
IM_cg3387_F	TCTACGGACCAGGATTTG	Insertion cg3387
IM_cg3387_R	ACGAACCAGCCATTTG	Insertion cg3387
IM_cg3387_T	GGGCTAAATGCTCCAAAC	Kontrolle IMcg3387
IM_cg3395_F	CACGCGTCACTCCACATAC	Insertion cg3395
IM_cg3395_R	GAGGTTTCTTCGGAGCTTC	Insertion cg3395
IM_cg3395_T	GCGGGCTTACGGTTATGCG	Kontrolle IMcg3395
M13_F	TGTA AACGACGGCCAGT	Kontrolle Insertion
M13_R	CAGGAAACAGCTATGAC	Kontrolle Insertion
pEKEx2_Kontr_F	GCCGACATCATAACGGTTCTGG	Kontrolle Klonierungen
pEKEx2_Kontr_R	TTATCAGACCGCTTCTGCGTTC	Kontrolle Klonierungen
pXMJ19_Kontr_F	GCGCACTCCCGTTTGG	Kontrolle Klonierungen
pXMJ19_Kontr_R	GCGCTACGGCGTTCAT	Kontrolle Klonierungen
ÜE_cg0772_F	GATCAATGAATCTCTATGAGAGGAGTATGCGAGGAT GAGCGGACTATGAG (EcoRI)	Überexpression cg0772

Oligonukleotid	Sequenz 5' - 3'	Anwendung
ÜE_cg0772_R	AGGAATTCATATCGGGAAGATCTGAGATGTG (EcoRI)	Überexpression <i>cg0772</i>
ÜE_ptsS_cg0772_F	ACACCATAAGAAAAGGAGGGTATGTCATGACTGCCCTCG CAC TC	Überexpression <i>pstS</i> mit <i>cg0772</i>
ÜE_ptsS_cg0772_R	CAAGCTGAATTCGAGCTTTATGTGCGTTTACGCAAGG	Überexpression <i>pstS</i> mit <i>cg0772</i>
ÜE_ptsS_pXMJ19_F	GATCAATGTCGACAGGAGAGTATCTGTATGCGCTTCTT CCCGGTTAAGGAG (Sall)	Überexpression <i>pstS</i>
ÜE_ptsS_pXMJ19_R	AGGAGCTCTACTGTGTGCGAACACTCAAGG (SacI)	Überexpression <i>pstS</i>
ÜE_ptsS_pEKEx2_F	GATCAATCAGCTGTGTCGTCGACAGGAGTATGCTCATGGA CCATAAGGACCTC (Sall)	Überexpression <i>pstS</i>
ÜE_ptsS_pEKEx2_R	AGGAGCTCTAGGTGTCAAAGATGCGTAGAG (SacI)	Überexpression <i>pstS</i>

### 3.2 Nährmedien und Kultivierung von *E. coli* und *C. glutamicum*

Die angegebenen Medien und Medienzusätze wurden durch Autoklavierung oder Mikrofiltration (Porengröße 0,22 µm) sterilisiert. Für die Herstellung von Agar-Platten wurde dem Medium vor Sterilisation 15 g/l Agar-Agar hinzugefügt. Falls notwendig, wurde dem abgekühlten Medium (Temperatur höchstens 50°C) eine entsprechende Menge Antibiotikum zugesetzt (Abschnitt 3.2.3).

#### 3.2.1 Medien und Kultivierung von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in LB-Komplexmedium (Sambrook et al., 1989) bei einer Temperatur von 37°C und 125 rpm. Die Kultivierung wurde in Reagenzgläsern mit 5 ml Nährmedium durchgeführt. Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurden die Zellen in 21 Schüttelkolben mit Schikanen und 500 ml Nährmedium kultiviert (Abschnitt 3.3.1).

#### LB-Medium

Trypton	10	g/l
Hefeextrakt	5	g/l
NaCl	10	g/l

#### 3.2.2 Medien und Kultivierung von *C. glutamicum*

Die Anzucht von *C. glutamicum* erfolgte in Komplex- oder Minimalmedium bei einer Temperatur von 30°C und 125 rpm im Reagenzglas oder Schüttelkolben mit Schikanen. Für die jeweiligen Versuche wurde eine *C. glutamicum* Einzelkolonie zunächst für 8 Stunden in 5 ml 2TY-Komplexmedium vorkultiviert. Es folgte eine weitere Vorkultivierung über mindestens 12 Stunden in 250 ml Schüttelkolben mit 50 ml 2TY-Komplexmedium. Vor Inokulation der Hauptkultur wurden die

vorkultivierten Zellen mit 0,9% NaCl-Lösung gewaschen. Die Kultivierung der Zellen für die entsprechenden Versuche wurde, soweit nicht anders erwähnt, mit 50 ml CgC-Minimalmedium und Zugabe von 2% einer Kohlenstoffquelle durchgeführt. Die Bestimmung der optischen Zelldichte (OD<sub>600</sub>) erfolgte photometrisch einer Wellenlänge von 600 nm (*Ultrospec 2100 pro UV/Visible Spectrometer*, Amersham Biosciences, USA).

<u>2TY-Medium</u>		<u>CgC-Medium</u>		<u>Spurenelementlösung</u>	
Trypton	16 g/l	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 g/l	FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	10 g/l
Hefeextrakt	10 g/l	Harnstoff	5 g/l	MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	10 g/l
NaCl	5 g/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g/l	ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1 g/l
		K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g/l	CuSO <sub>4</sub>	0,2 g/l
		MOPS	21 g/l	NiCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,02 g/l
		pH 6,8 (NaOH), autoklavieren		pH 1,0 (konz. HCl)	
		Zugabe von:			
		MgSO <sub>4</sub> (25 g/l)	10 ml		
		CaCl <sub>2</sub> (1 g/l)	10 ml		
		Biotin (0,2 g/l)	1 ml		
		Protocatechuat (30 mg/l in 10 N NaOH)	1 ml		
		Spurenelementlg.	1 ml		

### 3.2.3 Antibiotika und IPTG

Alle Antibiotika wurden sterilfiltriert (Porengröße 0,22 µm) und gegebenenfalls den sterilen Nährmedien (abgekühlt auf etwa 50°C) zugegeben. Die Lagerung der Antibiotika-Stocklösungen fand bei -20°C statt.

#### Antibiotika und IPTG

	<i>E. coli</i>	<i>C. glutamicum</i>	Lösungsmittel	Zugabe je
Kanamycin	100 mg/ml	50 mg/ml	Wasser	1:1000
Chloramphenicol	50 mg/ml	30 mg/ml	Ethanol	1:1000
IPTG	100 mM	25 mM	Wasser	1:1000

### 3.3 Molekularbiologische Methoden

#### 3.3.1 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Zur Transformation von *E. coli* DH5 $\alpha$  Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte zunächst die Präparation chemisch kompetenter Zellen. Dazu wurde 5 ml LB-Medium mit einer *E. coli* Einzelkolonie inokuliert und 8 Stunden bei 37°C inkubiert. Zur nachfolgenden Inokulation von 250 ml SOB-Medium wurde 1 ml der Vorkultur verwendet. Dieser Ansatz wurde für mindestens 12 Stunden bei 20°C inkubiert und bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,6 auf 4°C abgekühlt. Nach Zentrifugation (2500 rpm, 10 min, *Centrifuge 5810 R*, Eppendorf AG, Hamburg) wurden die sedimentierten Zellen in 20 ml TB-Puffer aufgenommen, 10 min auf Eis inkubiert und wiederholt zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 10 ml TB-Puffer aufgenommen und der Suspension anschließend 1,4 ml DMSO (Dimethylsulfoxid) hinzugefügt. Die Zellsuspension wurde zu 100  $\mu$ l in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Für die Transformation wurden die präparierten Zellen zunächst 15 min auf Eis aufgetaut, bevor etwa 50 ng DNA oder 10  $\mu$ l eines Ligationsansatzes (Abschnitt 3.3.6) den Zellen hinzugefügt wurde. Nach weiteren 15 min Inkubation wurden die Zellen 45 sec bei 42°C inkubiert, anschließend mit 600  $\mu$ l LB-Medium versetzt und 5 min auf Eis gelagert. Nach Inkubation über 60 min bei 37°C im Schüttler (*Thermomixer 5436*, Eppendorf AG, Hamburg) wurden die Zellen auf entsprechenden Selektivmedien ausplattiert.

<u>SOB-Medium</u>		<u>TB-Puffer</u>	
Trypton	5 g/l	PIPES	10 mM
Hefeextrakt	1,25 g/l	CaCl <sub>2</sub>	15 mM
NaCl	0,125 g/l	KCl	250 mM
KCl x H <sub>2</sub> O	2,5 mM	MnCl <sub>2</sub>	55 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM		

#### 3.3.2 Herstellung und Transformation elektrokompetenter *C. glutamicum*

Um die Aufnahme von Plasmid-DNA zu ermöglichen, wurde *C. glutamicum* entsprechend präpariert. Dazu wurden zunächst 5 ml 2TY-Medium mit einer *C. glutamicum* Einzelkolonie inokuliert und 8 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Hauptkultur mit 100 ml BHIS-Medium wurde mit der Vorkultur auf eine OD<sub>600</sub> von ~0,2 inokuliert und für etwa 16 h bei 20°C in einem 2 l Schüttelkolben kultiviert. Nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von ~1,8 - 2,5 wurden die Zellen auf 4°C abgekühlt. Alle

weiteren Schritte erfolgten auf Eis bzw. bei 4°C. Nach Zentrifugation der Zellen (2500 rpm, 10 min, *Centrifuge 5810 R*, Eppendorf AG, Hamburg) wurden die sedimentierten Zellen in 50 ml 10%igem Glycerol aufgenommen und wiederholt zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 1 ml 10%igem Glycerol aufgenommen, zu Aliquots á 100 µl in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Transformation von *C. glutamicum* wurde ein Zellaliquot für etwa 10 min auf Eis aufgetaut und etwa 1,5 µg Plasmid-DNA hinzugegeben. Nach weiteren 20 min Inkubation auf Eis wurde der Ansatz in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (2 mm Küvette, Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 2,5 kV/200 Ω/25 µF mit einem Elektroporator (Micro Pulser™, Bio-Rad Laboratories GmbH, München). Direkt im Anschluss wurden die Zellen in 4 ml vorgewärmtem BHIS-Medium aufgenommen und für exakt 6 min bei 46°C inkubiert. Nach Regeneration der Zellen für 2 Stunden unter Schütteln bei 30°C wurden die Zellen auf entsprechenden 2TY-Agar-Platten ausplattiert.

### BHIS-Medium

Brain Heart Infusion*	23,5	g/l
Sorbitol	91	g/l

\*BD Bacto™ (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg)

### **3.3.3 Isolierung genomischer DNA aus *C. glutamicum***

Zur Isolierung genomischer DNA aus *C. glutamicum* wurden 10 ml einer Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von etwa 20 zentrifugiert und das Zellpellet in 1 ml TE-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 70 µl Lysozym (200 mg/ml) und 100 µl RNaseA (2 mg/ml) wurden die Zellen zunächst 2 h bei 37°C inkubiert, bevor nach weiterer Zugabe von 200 µl 10%iger SDS-Lösung, 150 µl Proteinase K (20 mg/ml) und 3 ml TE-Puffer die Inkubation der Zellen für 3 h bei gleicher Temperatur fortgesetzt wurde. Anschließend wurden der Suspension 2 ml NaCl (6 M) hinzugefügt. Nach Zentrifugation des Ansatzes (35 min, 4000 rpm, 20°C, *Centrifuge 5810 R*, Eppendorf AG, Hamburg) wurde der Überstand mit einem 2,5-fachem Volumen an Ethanol versetzt und für mindestens 12 h bei -20°C gelagert. Im Anschluss wurde das Präzipitat zentrifugiert (20 min, 4000 rpm, 4°C), mit eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen und in 200 µl TE-Puffer aufgenommen.

### TE-Puffer

TRIS            10 mM

EDTA           1 mM

pH 8,6 (HCl)

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

Die Isolierung vom Plasmid-DNA aus *E. coli* und *C. glutamicum* Stämmen wurde mittels des *High Pure Plasmid Isolation Kits* (Roche Diagnostics International AG, Schweiz) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Um den Zellaufschluss von *C. glutamicum* Zellen zu verbessern, wurde das Zellpellet einer 4 ml Kultur nach Zentrifugation in *Resuspension-Buffer* (im DNA-Isolations-Kit enthalten) mit 10 µg/ml Lysozym für 3 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.

### **3.3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente erfolgte durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis et al., 1986). Die Reaktion wurde im *Thermocycler TProfessional Basic* (Biometra GmbH, Göttingen) durchgeführt. Die für die Reaktion verwendeten Oligonukleotide (Primer) stammten von Eurofins MWG Synthesis GmbH, Ebersberg. Für die präparative Verwendung der PCR-Produkte wurde die PCR mittels *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Durchführung der PCR für analytische Zwecke diente der *EconoTaq® PLUS GREEN 2x Master Mix* (BioCat GmbH, Heidelberg). Auch in diesem Fall erfolgte die Durchführung der PCR nach Angaben des Herstellers. Als Template dienten ~ 0,1 ng/µl gereinigte genomische DNA bzw. 1 µl einer in 100 µl H<sub>2</sub>O suspendierten und 10 min bei 95 °C inkubierten Einzelkolonie.

### **3.3.6 Klonierungen**

Zur Klonierung eines DNA-Fragments in den Zielvektor wurde zunächst eine Zwischenklonierung mithilfe des *CloneJet PCR Cloning Kits* (Thermo Fisher Scientific, USA) vorgenommen. Das Plasmid der Zwischenklonierung wurde in kompetente *E. coli* DH5α transformiert. Nach Isolierung des Plasmids erfolgte die Kontrolle des DNA-Fragments mittels DNA-Sequenzierung (GATC Biotech AG, Konstanz). Zur Überführung des Fragments in den Zielvektor, wurden ein Restriktionsverdau mit Hilfe von spezifischen *FastDigest™* Restriktionsendonukleasen (Thermo Fisher Scientific, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Im Anschluss der Restriktion des Klonierungsvektors *pJET* (im Klonierungs-Kit enthalten) und des

Zielvektors wurde das DNA-Fragment mithilfe der T4-DNA-Ligase (Thermo Fisher Scientific, USA) nach Angaben des Herstellers in den Zielvektor ligiert. Der Ligationsansatz wurde in kompetente *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert und das Plasmid im Anschluss isoliert. Die Kontrolle der Klonierung erfolgte über eine Kolonie-PCR mit Vektor-spezifischen Primern.

Für die Klonierung von zwei PCR-Produkten in einen Vektor wurde der *Gibson Assembly*<sup>®</sup> *Master Mix* (New England Biolabs, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet.

### 3.3.7 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung und Isolierung von PCR-Produkten und verdauter Plasmid-DNA wurde eine Agarose-Gelelektrophorese mit 1% Agarose (Agarose NEEO Ultra-Quality, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) in TAE-Puffer bei 85 V durchgeführt (Sambrook et al., 1989). Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit einem Ladepuffer (*6x DNA Loading Dye*, Thermo Fisher Scientific, USA) versetzt. Anschließend wurde das Agarose-Gel mit einer Ethidiumbromid-Färbelösung (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in H<sub>2</sub>O) für 15-30 min inkubiert. Zur Visualisierung der DNA diente das *UVP*<sup>®</sup> *BioDoc-It*<sup>®</sup> *Imaging System* (Ultra-Violet Products Ltd./Analytik Jena, Jena, Germany). Die DNA-Fragmente wurden mittels *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche Diagnostics International AG, Schweiz) nach Angaben des Herstellers aus den Agarose-Gelen extrahiert.

### 3.3.8 Herstellung von *C. glutamicum* Deletionsmutanten

Die Inaktivierung chromosomaler Gene wurde durch Gendeletion bzw. mittels Integrations-Mutagenese erreicht. Die Deletionsmutanten wurden auf Basis der Methode nach Schäfer et al. (1994) hergestellt. Wie durch Eggeling und Reyes (2005) beschrieben, basiert die Methode auf eine durch den Vektor pK18mobsacB bzw. pK19mobsacB (Schäfer et al., 1994) vermittelte Kanamycinresistenz sowie den zusätzlichen negativen Selektionsmarker Levansucrase (*sacB*), der zu einem Umsatz von Saccharose zu Glucose und dem lethalen Levan führt.

Etwa 500 bp der flankierenden Regionen des zu deletierenden Genbereichs wurden mittels PCR amplifiziert, einem Restriktionsverdau unterzogen und in einen Deletionsvektor ligiert. Alternativ zur Anwendung der Ligation zweier PCR-Produkte wurden die Fragmente durch Verwendung eines Oligonukleotid-*Linkers* (5'-GGAATGGAGTATGGAAGTTGG-3') in einer zweiten PCR miteinander verbunden. Die Transformation von *C. glutamicum* mit dem entsprechenden Deletions-

vektor wurde auf Kanamycinplatten selektiert (erstes Rekombinationsereignis). Einzelklone wurden anschließend auf LB-Agar-Platten ohne Selektionsdruck ausgestrichen und etwa 16 h bei 30°C inkubiert. Durch Überimpfen auf LB-Agar-Platten mit 10% Saccharose wurde ein zweites Mal selektiert (zweites Rekombinationsereignis). Die Kontrolle der Deletion erfolgte mittels PCR und Primern, die etwa jeweils 500 bp außerhalb des Bereichs der flankierenden Regionen lagen, sowie über Verlust der Kanamycinresistenz.

Die Inaktivierung chromosomaler Gene mittels Integrations-Mutagenese wurde unter Verwendung des Vektors *pDrive* erreicht. Dieser wurde durch homologe Rekombination in das Zielgen integriert. Um dies zu erreichen, wurde ein etwa 500 bp langes DNA-Fragment mittels des *QIAGEN PCR Cloning Kits* (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers in den Vektor kloniert. Das DNA-Fragment sollte homolog einem in der Mitte des Zielgens befindlichen Genbereichs sein. Nach Transformation von *C. glutamicum* mit dem Integrations-Plasmid wurden die Zellen auf LB-Agar-Platten mit 25 µg/µml Kanamycin ausgestrichen. Die Kontrolle der Deletion erfolgte durch Selektion auf Basis der Kanamycinresistenz sowie mittels PCR und einer Kombination aus einem genspezifischen und plasmidspezifischen Primer.

### 3.3.9 Isolierung von RNA

Die Isolierung von RNA aus *C. glutamicum* erfolgte mithilfe des *Nucleo Spin RNA II Kits* (Macherey Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers. Eine Abweichung vom Protokoll bildete der Zellaufschluss, welcher wie folgt durchgeführt wurde: Nach Zentrifugation der Zellen wurde das Zellpellet in 350 µl Puffer RA1 (im RNA-Isolierungs-Kit enthalten) und 3,5 µl β-Mercaptoethanol resuspendiert. Im Anschluss wurden die Zellen in 2 ml-Schraubverschlussgefäße überführt, welche mit 250 g Glasperlen (Durchmesser 0,1 mm, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) befüllt wurden. Der Zellaufschluss wurde im Homogenisator (Precellys® 24, Bertin Technologies SAS, USA) durchgeführt (30 sec, Speed 6.5, 4°C). Dieser Vorgang wurde viermal wiederholt und die Zellen zwischen den Einheiten jeweils 5 min auf Eis gelagert. Im Anschluss wurden die Gefäße zentrifugiert (10 min, 15.000 rpm, *Centrifuge 5417 R*, Eppendorf AG, Hamburg) und der Überstand mit 350 µl 70%igem Ethanol versetzt. Die weitere RNA-Isolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Zum Verdau der DNA wurden abweichend 4 U *DNase1 RNase free* (Thermo Fisher Scientific, USA) verwendet. Zur Überprüfung von DNA-Kontamination wurde eine PCR mit genspezifischen Primern durchgeführt.

### 3.3.10 cDNA-Synthese

Die Synthese von cDNA aus *C. glutamicum*-RNA wurde mittels reverser Transkription unter Verwendung des *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kits* (Thermo Fisher Scientific, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Synthese wurden *random hexamer* Primer (im cDNA-Synthese-Kit enthalten) verwendet. Die RNA-Proben wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### 3.3.11 Quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR)

Zur Bestimmung des relativen Gehalts an mRNA wurde eine Realtime-PCR Analyse durchgeführt. Die Reaktion erfolgte mit *iTaq™ universal SYBR® Green 2x supermix* (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) im *CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) nach Angaben des Herstellers und nach folgendem Temperaturprofil: Initiale Denaturierung bei 95°C für 3 min, 40 Zyklen von 95°C für 10 sec und 55°C für 30 sec, sowie anschließender Schmelzkurvenanalyse des amplifizierten Produkts zur Überprüfung der Spezifität. Die Auswertung wurde mit Hilfe des Programms *Bio-Rad CFX Manager 3.1* (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) vorgenommen.

## 3.4 Analytische Methoden

### 3.4.1 Quantitative Bestimmung von Saccharose und Glucose

Zur Quantifizierung der Zucker Saccharose und Glucose im Kulturüberstand wurde eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*High-performance liquid chromatography*, HPLC) durchgeführt. Zur Auftrennung wurde ein *LaChrom Elite® System* (Hitachi, Japan) verwendet, welches mit einem RI- Detektor (RI = *refractive index*) ausgestattet war. Die stationäre Phase bildeten die Vorsäule *ChromCart 30 x 4 mm Nucleogel® Sugar 810 H* und die Hauptsäule *300 x 7,8 mm Nucleogel® Sugar 810 H* (Macherey-Nagel, Düren). Die Auftrennung wurde, mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10 mM) als mobiler Phase, bei 40 °C und einer Flussrate von 0,5 ml/min erlangt. Diese Methode eignet sich für Konzentrationen zwischen 1 mM und 100 mM

### 3.4.2 Quantitative Fructosebestimmung

Die Bestimmung der extrazellulären Fructosekonzentration aus Kulturüberständen oder der intrazellulären Konzentration an Fructose durch Silikonölzentrifugation (Abschnitt 3.5.4) erfolgte photometrisch mittels eines Enzymtests. Die zu einem Molekül Fructose äquimolare Bildung von NADPH wurde durch ein Plattenlesegerät

(*Infinite*<sup>®</sup> M200 PRO, Tecan, Schweiz) bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen. Pro Versuchsansatz wurden folgende Volumina pipettiert:

TRIS-Puffer	60 µl	
NADP <sup>+</sup>	10 µl	
ATP	10 µl	
Probe*	10 µl	*Standard oder Versuchsprobe

Nach Zugabe von 10 µl der Enzymlösung 1 wurden die Proben in einer 96-Well-Platte für 30 min bei 25°C inkubiert und anschließend der Messwert E1 bestimmt. Nach Zugabe der Enzymlösung 2 wurden die Proben nochmals für 30 min bei 25°C inkubiert. Im Anschluss wurde der Messwert E2 gemessen. Über eine Standardreihe lässt sich aus der Differenz von E2 und E1 die Fructosekonzentration in den Proben bestimmen. Der Test eignet sich für Konzentrationen zwischen 50 und 5000 µM. Bei Konzentrationen kleiner 50 µM wurde folgende Variation des Enzymtests vorgenommen:

Vor Reaktionsstart wurden dem Versuchsansatz zusätzlich 10 µl INT (8 mM) (Iodnitrotetrazolium-Violett) und 0,5 µl Diaphorase-Lösung (Diaphorase aus *Clostridium kluyveri* [0,8 U], Sigma-Aldrich Co. LLC., USA) hinzugefügt und bereits zu diesem Zeitpunkt der Messwert E1 bei einer abweichenden Wellenlänge von 492 nm bestimmt. Anschließend wurden sowohl Enzymlösung 1, als auch Enzymlösung 2 zugefügt, für 30 min bei 25°C inkubiert und der Messwert E2 gemessen. Die Reduktion von INT durch die Diaphorase unter Oxidation von NADH führt zur Bildung des violetten Farbstoffs Formazan. Die Detektion von Formazan bei 492 nm erhöht die Sensitivität des Enzymtests, so dass Fructosekonzentrationen von knapp 10 µM detektiert werden können.

<u>TRIS-Puffer</u>		<u>NADP<sup>+</sup></u>		<u>ATP</u>		<u>INT</u>	
TRIS	200 mM	NADP <sup>+</sup>	6 mM	ATP	18 mM	INT	8 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM	(in TRIS-Puffer)		(in TRIS-Puffer)		(in H <sub>2</sub> O)	
pH 7,7 (HCl)							

### Enzymlösung 1

Hexokinase/Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase\* (1:20 in TRIS-Puffer)

### Enzymlösung 2

Phosphoglucose Isomerase\* (1:10 in TRIS-Puffer)

\*Roche Diagnostics International AG, Schweiz

### 3.4.3 Quantitative Mannitolbestimmung

Die Bestimmung der Mannitolkonzentration erfolgte photometrisch mittels eines Enzymtests. Der Enzymtest basierte auf einer abgewandelten Version des Protokolls eines Mannitol/Arabitol-Enzymtestkits (Megazyme International, Irland). Die zu einem Molekül an Mannitol äquimolare Bildung von NADH wurde durch Zugabe von INT (Iodnitrotetrazolium-Violett) und einer Diaphorase-Lösung (Diaphorase aus *Clostridium kluyveri* [0,8 U], Sigma-Aldrich Co. LLC., USA) sensitiviert. Die Reduktion von INT durch die Diaphorase unter Oxidation von NADH führt zur äquimolaren Bildung des violetten Farbstoffs Formazan. Mittels eines Plattenlesegeräts (*Infinite*<sup>®</sup> M200 PRO, Tecan, Schweiz) wurde bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen. Pro Versuchsansatz wurden folgende Volumina pipettiert:

H <sub>2</sub> O	91 µl	
ManDH-Puffer	5 µl	
NAD <sup>+</sup>	10 µl	
INT	10 µl	
Diaphorase	0,5 µl	
Probe*	10 µl	*Standard oder Versuchsprobe

Nach Zusammenfügen des Versuchsansatzes in eine 96-Well-Platte wurde der Messwert E1 bestimmt. Durch Zugabe von 10 µl der Mannitoldehydrogenase-Enzymlösung wurde die Reaktion gestartet und für exakt 20 min bei 25°C inkubiert. Anschließend wurde der zweite Messwert E2 bestimmt. Über eine Standardreihe lässt sich aus der Differenz von E2 und E1 die Fructosekonzentration in den Proben bestimmen. Der Test eignet sich für Konzentrationen zwischen 10 und 5000 µM.

<u>NAD<sup>+</sup></u>	<u>INT</u>
NAD <sup>+</sup> 6 mM (in H <sub>2</sub> O)	INT 8 mM (in H <sub>2</sub> O)

#### Enzymlösung

Mannitoldehydrogenase\* (1:10 in ManDH-Puffer)

#### Puffer

ManDH-Puffer

\*Megazyme International, Irland

### 3.4.4 Messung der spezifischen Mannitoldehydrogenase-Aktivität

Zur Bestimmung der Mannitoldehydrogenase-Aktivität in *C. glutamicum* nach Laslo et al. (2012) wurden die Zellen zunächst in CgC-Minimalmedium mit der entsprechenden Kohlenstoffquelle kultiviert. 50 ml einer Kultur mit Zellen der exponentiellen Wachstumsphase wurden zentrifugiert (10 min, 4000 rpm, 4°C, *Centrifuge 5810 R*, Eppendorf AG, Hamburg) und in 20 ml TRIS-Puffer resuspendiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen in 1 ml TRIS-Puffer aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml-Schraubverschlussgefäße überführt, welche mit 250 g Glasperlen (Durchmesser 0,1 mm, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) befüllt wurden. Der Zellaufschluss wurde im Homogenisator (*Precellys® 24*, Bertin Technologies SAS, USA) durchgeführt (30 sec, Speed 6.5, 4°C). Dieser Vorgang wurde viermal wiederholt und die Zellen zwischen den Einheiten jeweils 5 min auf Eis gelagert. Im Anschluss wurden die Gefäße zentrifugiert (10 min, 15.000 rpm, 4°C, *Centrifuge 5417 R*, Eppendorf AG, Hamburg) und der Überstand in die Enzymtests eingesetzt.

Die Bestimmung der Mannitoldehydrogenase-Aktivität erfolgte photometrisch mittels eines Plattenlesegeräts (*Infinite® M200 PRO*, Tecan, Schweiz) bei einer Wellenlänge von 340 nm. Pro Versuchsansatz wurden folgende Volumina pipettiert:

TRIS-Puffer	91	µl
NAD <sup>+</sup>	5	µl
Zellextrakt	10	µl

Nach Zusammensetzung des Versuchsansatzes in einer 96-Well-Platte wurden dem jeweils 100 mM D-Mannitol hinzugefügt und der Anstieg der zu einem Molekül Mannitol äquimolaren Bildung von NADH wurde über einen Zeitraum von 5 min verfolgt. Durch Bestimmung der Proteinkonzentration des Zellysats (Abschnitt 3.4.5) konnte die spezifische Aktivität der Mannitoldehydrogenase in den Proben berechnet werden.

<u>TRIS-Puffer</u>		<u>NAD<sup>+</sup></u>
TRIS	50 mM	NAD <sup>+</sup> 4 mM
pH 8,0 (HCl)		(in TRIS-Puffer)

### 3.4.5 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde auf Basis der *Roti®-Nanoquant*-Lösung (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Mithilfe einer Standardreihe an Rinderserumalbumin (BSA) wurden die Proben quantifiziert.

### 3.4.6 Bestimmung der Osmolalität

Die Osmolalität von Nährmedien und Puffern wurde mit Hilfe eines Osmometers (*Osmomat*<sup>®</sup> 030, Gonotec GmbH, Berlin) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Die Kalibrierung des Osmometers wurde vor jeder Messung mit Lösungen zwischen 0,1 und 2,5 osmol/kg durchgeführt.

## 3.5 Biochemische Methoden

### 3.5.1 Messung der Substrataufnahme

Die Messung der Substrataufnahme erfolgte mithilfe von <sup>14</sup>C-markiertem Substraten. Zur Messung der Substrataufnahme wurden *C. glutamicum* Zellen, wenn nicht anders angegeben, in CgC-Minimalmedium mit der entsprechenden Kohlenstoffquelle kultiviert. Die Kultur mit Zellen aus der exponentiellen Wachstumsrate wurde zentrifugiert (5 min, 4000 rpm, 4°C, *Centrifuge 5810 R*, Eppendorf AG, Hamburg). Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit kaltem CgC-Medium (ohne Zusätze) gewaschen, auf eine OD<sub>600</sub> von etwa 1,5 resuspendiert und bis zur Messung auf Eis gelagert. Vor Beginn der Messung wurden die Zellen 3 min bei 30°C unter Rühren inkubiert. Nach Zugabe des <sup>14</sup>C-markierten Substrats (Tabelle 4) wurden zu definierten Zeitpunkten jeweils 200 µl Zellsuspension entnommen und über einen Glasfaserfilter mit 2,5 ml LiCl (0,1 M) gewaschen.

Anschließend wurden die Filter in 3,8 ml Szintillationsflüssigkeit (*Rotiszint*<sup>®</sup> *eco plus*, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) mindestens 1 h inkubiert und im Szintillationszähler *LS 6500* (Beckman Instruments GmbH, München) gemessen. Als Bezugswert wurden 200 µl nicht filtrierter Zellsuspension vermessen.

**Tabelle 4. In dieser Arbeit zur verwendete <sup>14</sup>C-markierte Substrate**

<sup>14</sup> C-markiertes Substrat	Spezifische Aktivität [mCi/mmol]	Hersteller
Saccharose [ <sup>14</sup> C(U)]	500-700	American Radiolabeled Chemicals, USA
Saccharose [Fructose- <sup>14</sup> C(U)]	300	American Radiolabeled Chemicals, USA
Fructose D-[ <sup>14</sup> C(U)]	250-360	American Radiolabeled Chemicals, USA

### 3.5.2 Messung des Fructoseexports

Die Messung des Fructoseexports in *C. glutamicum* wurde mit spezifisch am Fructosemolekül  $^{14}\text{C}$ -markierter Saccharose durchgeführt (Tabelle 4). Die im Rahmen dieser Arbeit etablierte Methode zur Messung des Fructoseexports wird im Folgenden als *Pulse-Chase-Experiment* bzw. als *Saccharoseaufnahme-Messung zur Bestimmung des Fructoseefflux* bezeichnet. Diese beiden Methoden unterscheiden sich insofern voneinander, dass die Abnahme der intrazellulären radioaktiven Markierung in einem *Pulse-Chase-Experiment* durch Zugabe eines Überschusses an unmarkierter Saccharose (*Chase*) herbeigeführt wird. Wird auf die Zugabe eines *Chase* verzichtet, setzt die Abnahme der internen Radioaktivität ein, sobald die externe radioaktiv markierter Saccharose komplett aufgenommen wurde. Bis auf diesen Unterschied ist die Durchführung beider Methoden identisch.

Die Messung des Fructoseexports beruht auf einer ähnlichen Vorgehensweise wie die Methode zur Messung des Substratimports. Die Vorbereitung der Zellen für die Messung ist zu der in Abschnitt 3.5.1 beschriebenen Methode identisch. Nach Inkubation der Zellen für 3 min bei 30°C wurde dem Versuchsansatz eine definierte Menge an  $^{14}\text{C}$ -markierter Saccharose hinzugefügt. Direkt im Anschluss wurde zu definierten Zeitpunkten jeweils 200  $\mu\text{l}$  Zellsuspension entnommen und über einen Glasfaserfilter mit 2,5 ml LiCl (0,1 M) oder Medium (ohne Zusätze) definierter Osmolalität gewaschen. Für die *Pulse-Chase-Messung* erfolgte, soweit nicht als Abweichung zur Methode vermerkt, durch Zugabe eines 100-fachen Überschusses an unmarkierter Saccharose. Bei den *Saccharoseaufnahme-Messungen zur Bestimmung des Fructoseefflux* wurde auf Zugabe von unmarkierter Saccharose verzichtet. Die Messung wurde über den gesamten Versuchszeitraum bei 30°C unter ständigem Rühren durchgeführt.

Anschließend wurden die Filter, wie in Abschnitt 3.5.1 beschrieben, in 3,8 ml Szintillationsflüssigkeit (*Rotiszint® eco plus*, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) für mindestens 1 h inkubiert und im Szintillationszähler LS 6500 (Beckman Instruments GmbH, München) gemessen. Als Bezugswert wurden auch hier 200  $\mu\text{l}$  nicht filtrierter Zellsuspension vermessen.

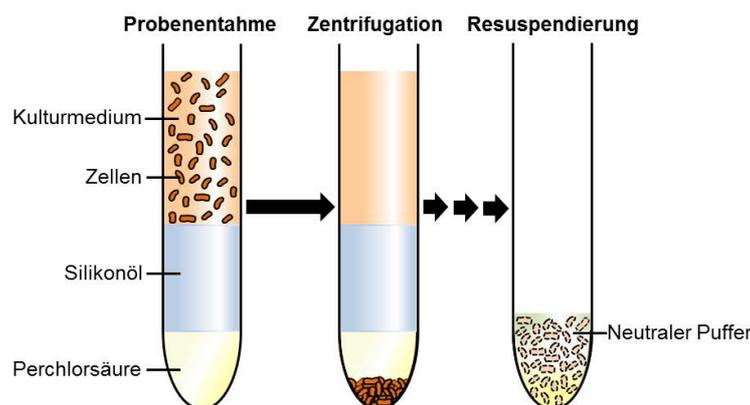
### 3.5.3 Messung des Fructoseexports bei hypoosmotischen Schock

Die Messung des Fructose- und Glycin-Betainexports bei plötzlicher Abnahme der externen Osmolalität wurde in zwei parallelen Ansätzen sowohl mit radioaktiv markiertem Glycin-Betain, als auch mit unmarkiertem Glycin-Betain mittels Silikonölzentrifugation durchgeführt. Durch Kultivierung in CgC-Medium mit

150 mM NaCl und 2% Saccharose wurden die Zellen auf eine erhöhte Osmolalität des Mediums eingestellt, sowie mit Fructose beladen. Bei Erreichen der mittleren exponentiellen Phase wurden jeweils 1,2 ml der Kultur zwei neue Kultivierungsgefäße überführt. Im Anschluss wurde in einen Ansatz 0,5 mM  $^{14}\text{C}$ -markiertes Glycin-Betain und in den zweiten Ansatz 0,5 mM unmarkiertes Glycin-Betain gegeben. Durch nachfolgende Inkubation bei 30°C nahmen die Zellen Glycin-Betain als kompatibles Solut auf. Nach 40 min Inkubation wurde dem Ansatz ein 3-facher Überschuss an Wasser mit 25 mM unmarkiertem Glycin-Betain hinzugefügt. Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben entnommen. Die Probenverarbeitung des Ansatzes mit  $^{14}\text{C}$ -markiertem Glycin-Betain wurde wie in Abschnitt 3.5.1 durchgeführt. Zur Bestimmung der Fructosekonzentration im Medium des unmarkierten Ansatzes wurden die Proben mittels Silikonölzentrifugation (Abschnitt 3.5.4) zentrifugiert und die Fructosekonzentration im Überstand vermessen (Abschnitt 3.4.2).

### 3.5.4 Silikonölzentrifugation

Zur Quantifizierung von intrazellulären Metaboliten wurde zunächst eine Silikonölzentrifugation vorgenommen. Die Methode der Silikonölzentrifugation erlaubt eine akkurate Separation von Biomasse und Flüssigkeit. Die Zellen werden durch weitere Probenverarbeitung aufgeschlossen. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Methode beruht auf leichter Abwandlung der Methode von Klingenberg und Pfaff (1967). In Abbildung 3 ist eine schematische Übersicht der Silikonölzentrifugation dargestellt.



**Abbildung 3. Schematische Darstellung der Silikonölzentrifugation.** Durch Zentrifugation sammeln sich die Zellen aus der entnommenen Probe unter dem vorgelegten Silikonöl in der Perchlorsäurephase, während das Kulturmedium Flüssigkeit eine zweite Oberphase bildet. Mittels Perchlorsäure und Ultraschall werden die Zellen aufgeschlossen und durch weitere Probenverarbeitung vom Silikonöl getrennt sowie durch Zugabe von KOH neutralisiert.

Zur Probennahme wurden pro Messzeitpunkt jeweils 200  $\mu\text{l}$  Kulturvolumen in drei 400  $\mu\text{l}$  Mikrozentrifugenröhrchen (Milian AG, Schweiz) überführt. Diese wurden zuvor mit 30  $\mu\text{l}$  20%iger Perchlorsäure und 70  $\mu\text{l}$  Silikonöl ( $\delta = 1,04 \text{ g/cm}^3$ ) (Wacker Chemie AG, München) beschickt und für 10 sec zentrifugiert (*Microfuge E*, Beckman Coulter, ehemals Beckmann Instruments, USA). Direkt nach Zugabe der Kultur wurden die Proben für 45 sec in der *Microfuge E* zentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt und konnten ohne Weiterverarbeitung vermessen werden. Die drei Mikrozentrifugenröhrchen einer Probenentnahme wurden oberhalb des Zellpellets in der Silikonölphase durchtrennt und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch erneute Zentrifugation (1 min, 15.000 rpm, *Centrifuge 5417 R*, Eppendorf AG, Hamburg) sammelten sich Zellen, Perchlorsäure und Silikon am Boden des Gefäßes. Im Anschluss wurde das Zellpellet in 135  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  und 100  $\mu\text{l}$  Silikonöl ( $\delta = 1,06 \text{ g/cm}^3$ ) (Wacker Chemie AG, München) resuspendiert. Um einen vollständigen Zellaufschluss zu erreichen, wurden die Proben im Ultraschallbad bei stärkster Stufe inkubiert (20°C, 15 min). Durch Zugabe von 75  $\mu\text{l}$  KOH/Triethanolamin (5M/1M) wurde der Ansatz neutralisiert und emulgiert. Es folgte eine Inkubation von mindestens 30 min bei 4°C und eine anschließende Zentrifugation (20 min, 15.000 rpm, 4°C, *Centrifuge 5417 R*, Eppendorf AG, Hamburg) der Proben. Die wässrige Phase wurde in neue Reaktionsgefäße überführt. Die Proben wurden gegebenenfalls bei -20 °C gelagert.

## 4 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung des Fructoseexports als obligatorisches Element des Saccharosestoffwechsels in *C. glutamicum*. Das Vorhandensein eines Fructoseexporters wurde aufgrund der bisherigen Datenlage zwar angenommen, jedoch auf biochemischer Ebene nie bestätigt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Export von Fructose biochemisch belegt und charakterisiert werden. Darüber hinaus sollte eine Targetanalyse Hinweise auf die Identität des Fructoseexporters liefern. Die Ergebnisse lassen sich in drei Teilbereiche gliedern, die gedanklich aufeinander aufbauen. Den ersten Teilbereich bildet die Charakterisierung des Wachstums mit Saccharose sowie der biochemische Nachweis eines Fructoseexporters in *C. glutamicum* (Abschnitt 4.1 und 4.2). Der zweite Teil legt die Konstruktion eines geeigneten *C. glutamicum* Modellstamms zur Charakterisierung des Fructoseexports und die Charakterisierung selbst dar (Abschnitt 4.3 und 4.4). Der dritte und abschließende Teil besteht in einer umfassenden Targetanalyse der am Export von Fructose beteiligten Transporter (Abschnitten 4.5, 4.6 und 4.7).

### 4.1 Saccharose als Kohlenstoffquelle für *C. glutamicum*

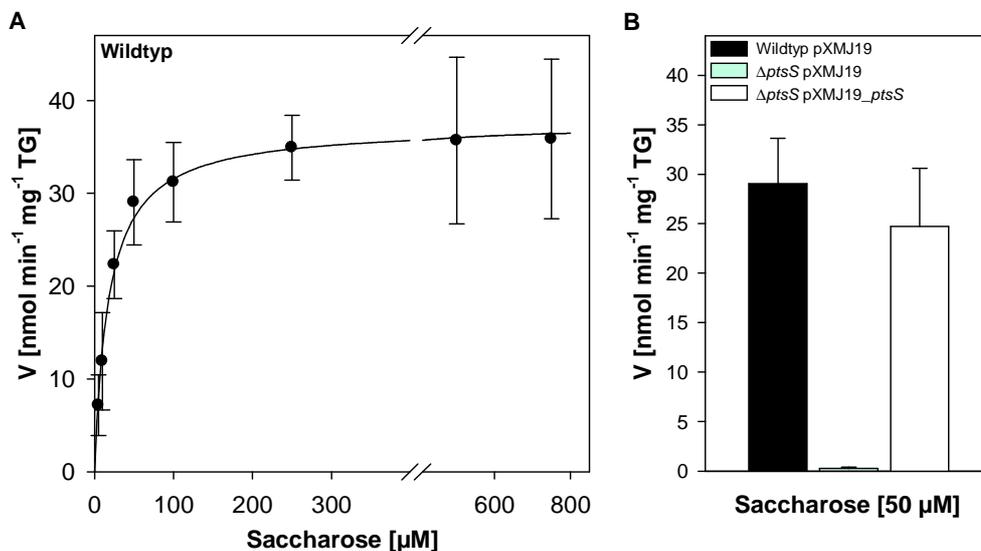
Die Nutzung einer Kohlenstoffquelle als Substrat für *C. glutamicum* setzt voraus, dass diese zunächst in die Zelle gelangt, um nachfolgend als Energiequelle zur Verfügung stehen zu können. Die Monosaccharide Fructose und Glucose, sowie das Disaccharid Saccharose werden durch spezifische Phosphoenolpyruvat-abhängige Phosphotransferase Systeme (PTS) aufgenommen und zeitgleich phosphoryliert. Neben den allgemeinen PTS-Phosphotransferasen Enzym I (EI) und dem Histidin Protein (HPr) verfügt *C. glutamicum* über vier substratspezifische Enzym II-Proteine (EII). Neben den für die genannten Zucker spezifischen EII, existiert ein viertes EII für ein bisher nicht identifiziertes Substrat.

Beim Wachstum mit Saccharose als Kohlenstoffquelle wird diese zunächst über EII<sub>Suc</sub> in die Zelle transportiert und dabei zu Saccharose-6-phosphat phosphoryliert. Das Enzym Saccharose-6-phosphat Hydrolase ScrB katalysiert im Anschluss die Spaltung von Saccharose-6-phosphat in Glucose-6-phosphat und Fructose. Die Phosphoglucose Isomerase (Pgi) wandelt im Folgenden Glucose-6-phosphat in Fructose-6-phosphat um, welches wiederum weiter in der Glykolyse und dem Pentosephosphatweg verstoffwechselt werden kann (Wittmann et al., 2004). Für die Verstoffwechslung des Fructosemoleküls ist erst der Export und anschließend der Reimport von Fructose über ein PTS notwendig, da *C. glutamicum* das frei gewordene Fructosemolekül nicht phosphorylieren kann. *C. glutamicum* besitzt weder ein

Fructokinase-Gen, noch eine Fructokinaseaktivität (Dominguez und Lindley, 1996; Kalinowski et al., 2003). Nach Export der Fructose über einen bisher unbekanntem Transporter wird diese über  $EII_{\text{Fru}}$  wieder in die Zelle aufgenommen (Moon et al., 2005). Die Beteiligung von  $EII_{\text{Glc}}$  am Import von Fructose wird ebenfalls angenommen (Moon et al., 2005). Die vollständige Nutzung von Saccharose als Substrat für *C. glutamicum* setzt das Vorhandensein eines Fructoseexporters voraus.

#### 4.1.1 Biochemische Charakterisierung der Saccharoseaufnahme

Die Transportcharakteristika von  $EII_{\text{Suc}}$  für Saccharose wurden zunächst im *C. glutamicum* Wildtyp mittels Substrataufnahmemessungen durch Akkumulation von  $^{14}\text{C}$ -markierter Saccharose in den jeweiligen Zellen radiochemisch ermittelt. Zur Untersuchung der zugrunde liegenden Kinetik wurden die Aufnahmezeiten in Abhängigkeit der Saccharosekonzentration bestimmt (Abbildung 4 A). Die kinetischen Parameter wurden mithilfe der Michaelis-Menten-Gleichung modelliert. Dabei ergab sich eine maximale Aufnahmezeit ( $V_{\text{max}}$ ) für Saccharose von  $37,3 \pm 8,4 \text{ nmol}/\text{min} \cdot \text{mg}$  Trockengewicht (TG). Die Halbsättigungskonstante ( $K_m$ ) von  $EII_{\text{Suc}}$  für Saccharose liegt bei  $18,2 \pm 2,2 \mu\text{M}$ .



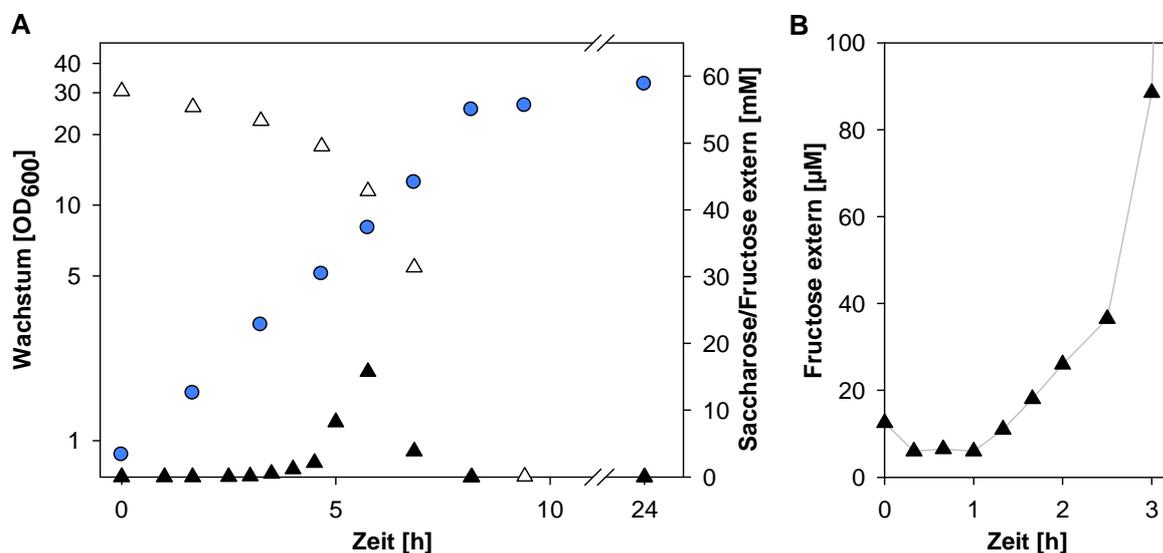
**Abbildung 4. Kinetik des Imports von Saccharose und Aufnahmezeiten mit 50  $\mu\text{M}$   $^{14}\text{C}$ -Saccharose des *C. glutamicum* Wildtyps und von *C. glutamicum*  $\Delta ptsF$ .** Zur Bestimmung der Kinetik der Saccharoseaufnahme im *C. glutamicum* Wildtyp (A) wurden die Zellen in 2 % Saccharose kultiviert und anschließend in CgC-Medium ohne Substrat gewaschen. Für die Messung der Aufnahmezeiten mit 50  $\mu\text{M}$  Saccharose wurden *C. glutamicum*  $\Delta ptsS$  (pXMJ19) und *C. glutamicum*  $\Delta ptsS$  (pXMJ19\_ptsS) (B) abweichend in 2TY-Medium kultiviert.

Die Deletion des für  $EII_{\text{Suc}}$  kodierenden Gens *ptsS* führte zum vollständigen Verlust der Saccharoseaufnahme (Abbildung 4 B). Die entsprechende Deletionsmutante

*C. glutamicum*  $\Delta ptsS$  zeigte auch nach 30 Minuten keinen Anstieg der internen Radioaktivität (Daten nicht gezeigt). Ohne Vorhandensein von  $EII_{Suc}$  gelangt demnach keine Saccharose in die Zelle. Diese Beobachtung ist im Einklang mit bisher publizierten Daten zur Saccharoseaufnahme in *C. glutamicum*, welche belegen, dass  $EII_{Suc}$  das alleinige Aufnahmesystem für Saccharose ist (Dominguez und Lindley, 1996; Parche et al., 2001; Shioo, 1990). Zur Komplementation des Phänotyps der *ptsS*-Mutante, wurde *ptsS* in *C. glutamicum*  $\Delta ptsS$  homolog exprimiert. *C. glutamicum*  $\Delta ptsS$  (pXMJ19\_*ptsS*) zeigte eine Aufnahmerate von  $24,7 \pm 5,8$  nmol/min\*mg TG, welche vergleichbar mit der des Kontrollstamms mit Leerplasmid *C. glutamicum* (pXMJ19) ist ( $29,0 \pm 4,6$  nmol/min\*mg TG) (Abbildung 4 B).

#### 4.1.2 Physiologische Untersuchung des Wachstums mit Saccharose

Beim Wachstum in CgC-Minimalmedium mit 2% Saccharose als alleiniger Kohlenstoffquelle wies der *C. glutamicum* Wildtyp eine durchschnittliche Wachstumsrate von  $0,46 \pm 0,02$  h<sup>-1</sup> auf und erreichte eine maximale Zelldichte (OD<sub>600</sub>) von  $32,2 \pm 2,7$  (Abbildung 5 A). Die Mutante *C. glutamicum*  $\Delta ptsS$  konnte Saccharose nicht mehr als Kohlenstoffquelle nutzen und zeigte auch nach 24 Stunden keinerlei Wachstum (Daten nicht gezeigt). Ursache ist die fehlende Fähigkeit von *C. glutamicum*  $\Delta ptsS$  zur Saccharoseaufnahme (Abbildung 4)



**Abbildung 5. Wachstum, Saccharoseverbrauch und externe Fructoseakkumulation des *C. glutamicum* Wildtyps.** Wachstum (●), Saccharoseverbrauch (△) und Fructoseakkumulation (▲) des *C. glutamicum* Wildtyps in CgC-Medium mit 2% Saccharose (A). Fructoseakkumulation im Medium des *C. glutamicum* Wildtyps über 3 h nach Beginn des Wachstums (B).

Während des Wachstums von *C. glutamicum* mit 2% Saccharose als Substrat ließen sich im Überstand sowohl Saccharose als auch Fructose mittels HPLC-Analyse und

enzymatisch nachweisen (Abbildung 5 A). Glucose konnte nicht detektiert werden. Im Verlauf der exponentiellen Wachstumsphase nahm die Konzentration von Saccharose kontinuierlich ab. Nach etwa einer Stunde konnte eine Akkumulation von Fructose im Medium beobachtet werden (Abbildung 5 A und B). Die externe Fructosekonzentration stieg über die Zeit der Kultivierung auf bis  $15,3 \pm 2,8$  mM an. Dieser Wert wurde nach etwa sechs Stunden Kultivierung erreicht. Ab diesem Zeitpunkt nahm die externe Konzentration an Fructose rasch ab und Saccharose und Fructose wurden parallel von den Zellen aufgenommen (Abbildung 5 A).

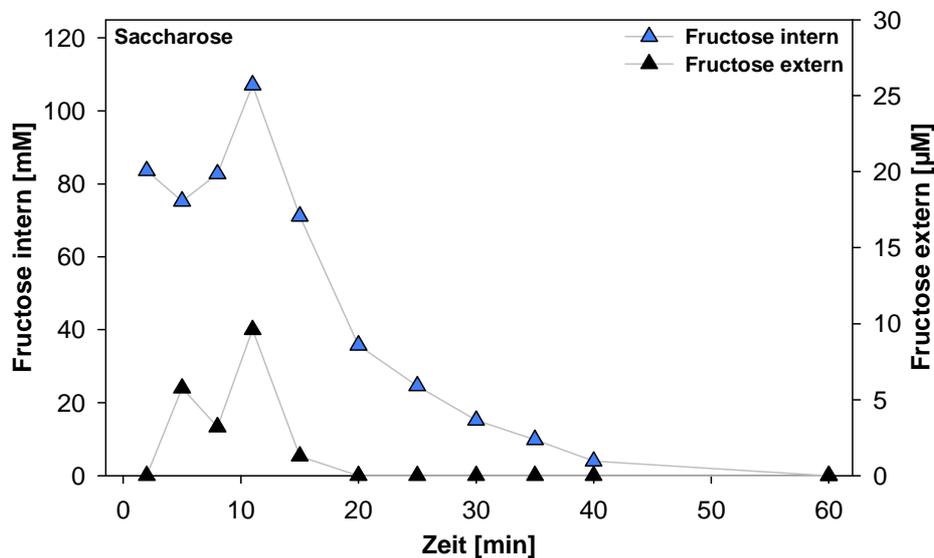
Bisher galt die extern akkumulierende Fructose in *C. glutamicum* während des Wachstums mit Saccharose als Kohlenstoffquelle (Dominguez und Lindley, 1996; Moon et al., 2005) und das Fehlen eines Fructokinase-Gens bzw. einer Fructokinaseaktivität (Dominguez und Lindley, 1996; Kalinowski et al., 2003) als alleiniger Beleg für die Existenz eines bisher unbekanntes Fructoseexporters. Es wurde angenommen, dass die nach Hydrolyse von Saccharose-6-phosphat entstehende Fructose die Zelle durch diesen unbekanntes Transporter verlässt und anschließend wieder aufgenommen wird. Die physiologischen und biochemischen Grundlagen des Exports von Fructose sowie der beteiligte Transporter waren bisher unbekannt.

### 4.1.3 Akkumulation von Fructose im Cytoplasma

Um den Export von Fructose in *C. glutamicum* während des Wachstums mit Saccharose als Kohlenstoffquelle auf zellulärer Ebene nachweisen zu können, war die Etablierung einer biochemischen Messmethode erforderlich, die die Trennung der Zellen vom extrazellulären Medium für eine genaue Bestimmung der zellinternen Fructosekonzentration zuließ. Eine akkurate Separation von Biomasse und Flüssigkeit bietet die Silikonölzentrifugation (Klingenberg und Pfaff, 1967). Bei Vorlegen eines Silikonöls mit der Dichte  $1,04 \text{ g/cm}^3$  passieren die Zellen während der Zentrifugation das Öl und bilden ein Zellpellet in der untersten Phase (20%ige Perchlorsäure) (Abbildung 3, Abschnitt 3.5.4). Das Medium verbleibt dabei als oberste Phase über dem Öl. Auf diese Weise findet sowohl die präzise Abtrennung der Zellen vom Medium als auch ein Abstoppen aller metabolischen Vorgänge statt. Durch weitere Probenverarbeitung erhält man ein definiertes Volumen einer Lösung, welche das Cytoplasma aller Zellen beinhaltet (vgl. Abschnitt 3.5.4).

Die Durchführung der Silikonölzentrifugation mit Zellen des *C. glutamicum* Wildtyps bei Kultivierung mit Saccharose als alleiniger Kohlenstoffquelle zeigte, dass sich Fructose nicht nur im Medium sondern auch intrazellulär anreichert. Dabei konnte nach Zugabe von  $300 \mu\text{M}$  Saccharose zum Medium ein Anstieg auf etwa  $100 \text{ mM}$

Fructose im Cytoplasma des *C. glutamicum* Wildtyps nachgewiesen werden (Abbildung 6). Zeitgleich war eine Akkumulation von Fructose im Medium zu erkennen, welche auf den Export der Fructose zurückzuführen ist (Abbildung 6). Nach elf Minuten Inkubation nahm die Konzentration der internen Fructose exponentiell ab, was ebenso auf dem Export von Fructose aus der Zelle beruht. Zum Zeitpunkt der exponentiellen Abnahme wurde keine Saccharose mehr aus dem Medium aufgenommen. Obwohl die interne Fructose weiter exportiert wurde, sank durch Wiederaufnahme der Fructose auch die externe Konzentration an Fructose. Bei einer internen Konzentration von 35 mM lag die im Medium vorhandene Fructose bereits unter der Nachweisgrenze. Nach 60 Minuten konnte auch intern keine Fructose mehr nachgewiesen werden (Abbildung 6).



**Abbildung 6. Fructosekonzentration in der Zelle und extrazelluläre Akkumulation von Fructose im Medium des *C. glutamicum* Wildtyps.** Der *C. glutamicum* Wildtyp wurde nach Vorkultivierung in CgC-Medium mit 2% Saccharose in CgC-Medium ohne Substrat gewaschen und die interne ( $\blacktriangle$ ) sowie im Medium akkumulierende Fructose ( $\blacktriangle$ ) nach Zugabe von 300  $\mu\text{M}$  Saccharose enzymatisch bestimmt.

#### 4.2 Biochemische Messung des Fructoseexports in *C. glutamicum*

In dieser Arbeit wurde der Export von Fructose in *C. glutamicum* erstmals biochemisch gezeigt. Durch Silikonölzentrifugation und anschließender enzymatischer Bestimmung zeigte sich im *C. glutamicum* Wildtyp eine Korrelation von exportierter und im Überstand akkumulierter Fructose (Abschnitt 4.1.3). Mithilfe der angewandten Methode lassen sich interne Solutkonzentrationen zwar präzise bestimmen, jedoch ist der zeitliche Abstand der Messpunkte durch die Dauer der Probenentnahme mit anschließender Zentrifugation messtechnisch begrenzt. Aus

diesen Gründen beträgt der minimale Abstand der Messzeitpunkte drei Minuten. Um eine verbesserte zeitliche Auflösung erhalten zu können, stellt die Verwendung von spezifisch am Fructosemolekül  $^{14}\text{C}$ -markierter Saccharose eine geeignete Alternative dar.

Nach Zugabe des  $^{14}\text{C}$ -markierten Substrats werden die Zellen zu definierten Zeitpunkten über einen Glasfaserfilter gewaschen und so von extrazellulärer Flüssigkeit separiert. Der Filter wird im Anschluss in einem flüssigen, organischen Szintillator aufgelöst. Auf diese Weise kann die spezifische Radioaktivität des  $^{14}\text{C}$ -markierten Moleküls mittels eines Szintillationsdetektors bestimmt werden. Der minimale Abstand der Probenentnahmepunkte beträgt hier zehn Sekunden. Im Gegensatz zur enzymatischen Bestimmung handelt es sich hierbei jedoch um eine indirekte Messung der internen Fructose, welche durch Korrelation der Abnahme der internen spezifischen Radioaktivität erfasst wird. Die interne Radioaktivität kann nur dann im Nachhinein in eine Konzentration umgerechnet werden, wenn keine Metabolisierung der markierten Substanz stattfindet. Im *C. glutamicum* Wildtyp ist dies aufgrund der komplexen metabolischen Vorgänge nicht möglich. Nur bei Verwendung einer geeigneten Mutante, welche Fructose zwar exportieren, aber nicht metabolisieren oder wiederaufnehmen kann, lässt die interne spezifische Radioaktivität Rückschlüsse auf die interne Fructosekonzentration zu.

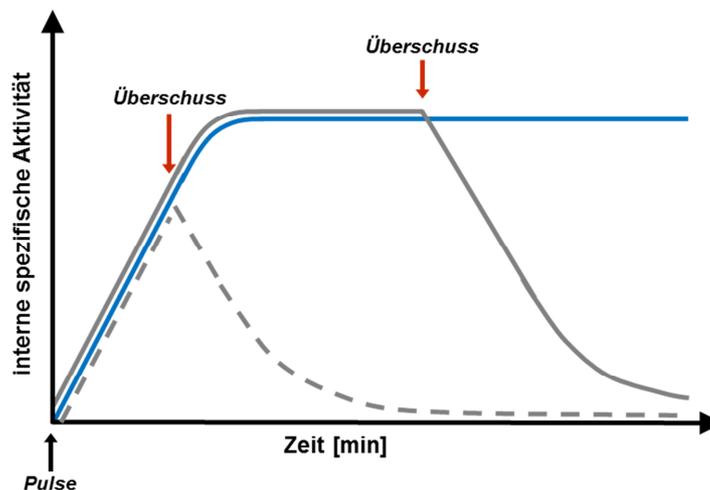
### 4.2.1 Etablierung einer Methode zur Messung des Fructoseexports

#### 4.2.1.1 *Pulse-Chase-Experimente mit $^{14}\text{C}$ -markierter Saccharose*

Zur Messung des Fructoseexports in *C. glutamicum* sollten Saccharoseaufnahme-Experimente etabliert werden, die die Beobachtung des Flux von Fructose aus der Zelle ermöglichen. Diese sogenannten *Pulse-Chase-Experimente* beruhen auf Zugabe einer definierten Menge an spezifisch am Fructosemolekül  $^{14}\text{C}$ -markierter Saccharose (*Pulse*) zu Messungsbeginn. Durch Hinzufügen eines Überschusses an unmarkierter Saccharose (*Chase*) wird die Aufnahme markierten Substrats maskiert. Falls das markierte Molekül exportiert wird, sollte eine Abnahme der internen Radioaktivität eintreten (Abbildung 7). Diese Abnahme ist auf den Export der  $^{14}\text{C}$ -markierten Substanz zurückzuführen.

Durch die Verwendung von  $^{14}\text{C}$ -markierter Saccharose als Substrat, lässt sich nach Hydrolyse von Saccharose-6-phosphat der Weg des markierten Fructosemoleküls verfolgen. Es ist davon auszugehen, dass es sich im *C. glutamicum* Wildtyp bei der intrazellulären radioaktiven Markierung zu Beginn der Messung um unphosphorylierte Fructose handelt. ScrB ist ein für Saccharose-6-phosphat hochaffines Enzym, welches mit einem  $K_m$  von  $40\ \mu\text{M}$  die Hydrolyse von Saccharose-6-phosphat zu

Glucose-6-phosphat und Fructose katalysiert und dessen spezifische Aktivität bei Wachstum auf Saccharose erhöht ist (Engels et al., 2008a). Diese enzymatische Reaktion stellt nicht den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Verwertung von Saccharose dar. Es ist demnach anzunehmen, dass zellintern der Anteil von  $^{14}\text{C}$ -markierter Saccharose gegenüber  $^{14}\text{C}$ -markierter Fructose verschwindend gering ist. Allerdings würde ein Reimport der extrazellulären Fructose über  $\text{EII}_{\text{Fru}}$  oder  $\text{EII}_{\text{Glc}}$  dazu führen, dass neben der  $^{14}\text{C}$ -markierten unphosphorylierten Fructose auch markiertes Fructose-1-phosphat und markiertes Fructose-6-phosphat in der Zelle vorlägen und aufgrund weiterer Metabolisierung als radioaktive Markierung in der Zelle verblieben. Für eine optimale Messung des Exports von Fructose sollte demnach sowohl die Aufnahme von Saccharose, als auch der Reimport von Fructose berücksichtigt und mit einem Überschuss an unmarkierter Saccharose und Fructose maskiert werden.

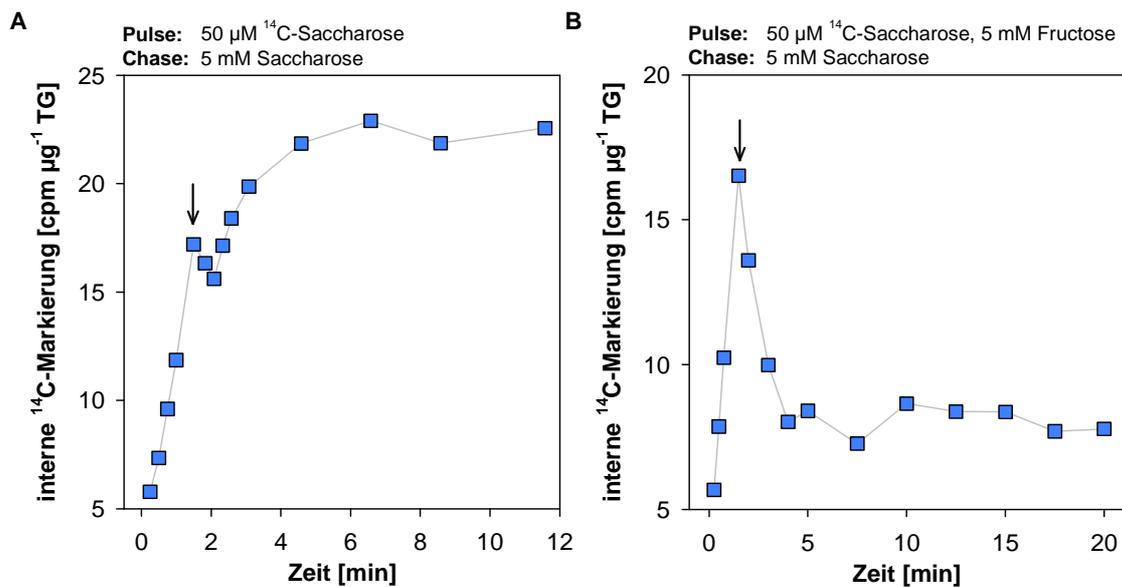


**Abbildung 7. Schematische Darstellung eines *Pulse-Chase*-Experiments mit Saccharose im *C. glutamicum* Wildtyp.** Zum Zeitpunkt  $t = 0$  wird eine definierte Menge  $^{14}\text{C}$ -markierter Saccharose (spezifische Markierung am Fructosemolekül) zur Zellsuspension gegeben (*Pulse*). Wenn davon ausgegangen wird, dass das markierte Molekül exportiert wird, führt die Zugabe eines 100-fachen Überschusses an unmarkierter Saccharose und unmarkierter Fructose zur Abnahme der internen Radioaktivität (graue Linie). Die alleinige Zugabe eines Überschusses an Saccharose sollte aufgrund der Wiederaufnahme markierter Fructose jedoch nicht zur Abnahme der internen Radioaktivität führen (blaue Linie). Wird der Überschuss an Fructose und Saccharose vor der vollständigen Aufnahme von Saccharose gegeben, tritt keine Einstellung eines *steady-state*-Levels ein (graue gestrichelte Linie).

#### 4.2.2 *Pulse-Chase-Experimente im C. glutamicum Wildtyp*

Für die Etablierung der *Pulse-Chase*-Messung zur Charakterisierung des Fructoseexports wurden Messungen mit am Fructosemolekül  $^{14}\text{C}$ -markierter Saccharose im *C. glutamicum* Wildtyp durchgeführt. Um die Notwendigkeit eines Überschusses an Saccharose und Fructose zu prüfen, wurde zunächst nur die Saccharoseaufnahme, jedoch nicht die Wiederaufnahme von Fructose, maskiert. Zu Beginn der Messung wurden  $50\ \mu\text{M}$  radioaktiv markierter Saccharose als *Pulse* zur Suspension hinzugegeben. Bereits 15 Sekunden nach Zugabe des Substrats stieg die zellinterne Radioaktivität rapide an (Abbildung 8 A). Die Aufnahmegeschwindigkeit von Saccharose betrug dabei  $13,3\ \text{nmol}/\text{min}\cdot\text{mg TG}$ . Nach 90 Sekunden wurde die weitere Aufnahme von Saccharose in die Zelle durch Zugabe des *Chase*, eines 100-fachen Überschusses an unmarkierter Saccharose, maskiert. Infolge des Exports der freien Fructose und dem darauffolgenden Reimport war, abhängig von den kinetischen Parametern der Wiederaufnahme von Fructose, eine etwaige leichte Abnahme der intrazellulären spezifischen Radioaktivität zu erwarten. Die entsprechende Messung zeigte eine Abnahme der internen spezifischen Radioaktivität für etwa 30 Sekunden (Abbildung 8 A). Danach stieg die interne Radioaktivität wieder an und erreichte nach sieben Minuten ein Optimum. Aufgrund der maskierten Saccharoseaufnahme war anzunehmen, dass die zweite Zunahme der internen spezifischen Radioaktivität ausschließlich auf die Wiederaufnahme der exportierten Fructose zurückzuführen ist.

Um eine Wiederaufnahme von Fructose zu verhindern, wurden in einem zweiten Versuch sowohl unmarkierte Saccharose, als auch unmarkierte Fructose im 100-fachen Überschuss zur Messung hinzugefügt (Abbildung 8 B). Durch Vorlegen von  $5\ \text{mM}$  unmarkierter Fructose parallel zum *Pulse* mit  $50\ \mu\text{M}$  am Fructosemolekül  $^{14}\text{C}$ -markierter Saccharose, sollte ein erneuter Anstieg der intrazellulären radioaktiven Markierung verhindert werden. Tatsächlich konnte durch diese Vorgehensweise nach Zugabe des Saccharose-*Chase* eine Abnahme der intrazellulären spezifischen Radioaktivität über 2,5 Minuten beobachtet werden (Abbildung 8 B). Danach stellte sich ein *steady-state*-Level an intrazellulärer radioaktiver Markierung ein.

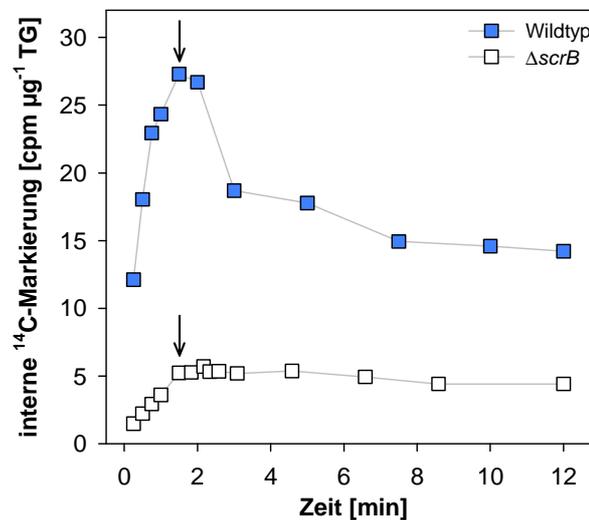


**Abbildung 8** Pulse-Chase-Messung mit 50 µM <sup>14</sup>C-Saccharose im *C. glutamicum* Wildtyp mit Maskierung der Saccharoseaufnahme sowie der Saccharose- und Fructoseaufnahme. Verlauf der zellinternen spezifischen Radioaktivität mit 50 µM am Fructosemolekül <sup>14</sup>C-markierter Saccharose im *C. glutamicum* Wildtyp. Die Zugabe des Saccharose-Chase, eines 100-fachen Überschusses an unmarkierter Saccharose, nach 1,5 min führte eine Maskierung der Aufnahme radioaktiver Markierung und eine Abnahme der internen radioaktiven Markierung herbei (A). Die zusätzliche Maskierung der Fructoseaufnahme, unter Vorlegen von 5 mM unmarkierter Fructose zu Beginn der Messung, führte zu einer deutlicheren Abnahme der internen spezifischen Radioaktivität (B). Die Pfeile markieren die Zugabe des Saccharose-Überschusses nach 1,5 Minuten.

Um zu gewährleisten, dass die Abnahme der intrazellulären spezifischen Radioaktivität tatsächlich auf den Efflux von Fructose zurückzuführen ist, wurde die Pulse-Chase-Messung auch mit *C. glutamicum*  $\Delta$ scrB durchgeführt. Obwohl dieser Stamm aus Saccharose-6-phosphat keine Fructose generieren kann, wurde zur Vergleichbarkeit der Messung mit dem *C. glutamicum* Wildtyp zu Beginn der Messung ein Überschuss an Fructose vorgelegt. Die Aufnahmerate von Saccharose war in *C. glutamicum*  $\Delta$ scrB im Vergleich zum Wildtyp (9,4 nmol/min\*mg TG) mit 3,9 nmol/min\*mg TG deutlich verringert (Abbildung 9). Die weitere Aufnahme von Saccharose konnte durch Zugabe eines Überschusses an Saccharose maskiert werden. Im Gegensatz zum *C. glutamicum* Wildtyp blieb die Radioaktivität in *C. glutamicum*  $\Delta$ scrB konstant, da die weitere Metabolisierung, und damit der Export der radioaktiven Markierung, unterbunden sind.

Aufgrund der Beobachtung, dass in *C. glutamicum*  $\Delta$ scrB keine Abnahme der internen spezifischen Radioaktivität zu messen ist und sich die Wiederaufnahme der internen radioaktiven Markierung im *C. glutamicum* Wildtyp durch Vorlegen eines Überschusses an Fructose maskieren lässt, konnte nachgewiesen werden, dass die beobachtete Abnahme der radioaktiven Markierung im *C. glutamicum* Wildtyp

tatsächlich auf den Export von  $^{14}\text{C}$ -markierter Fructose zurückzuführen ist. Folglich besitzt *C. glutamicum* im Rahmen des intakten Saccharosestoffwechsels die Fähigkeit Fructose zu exportieren.



**Abbildung 9. Pulse-Chase-Messung mit  $50 \mu\text{M}$   $^{14}\text{C}$ -Saccharose im *C. glutamicum* Wildtyp und *C. glutamicum*  $\Delta\text{scrB}$ .** Verlauf der zellinternen radioaktiven Markierung mit  $50 \mu\text{M}$  am Fructosemolekül  $^{14}\text{C}$ -markierter Saccharose im *C. glutamicum* Wildtyp (■) und in *C. glutamicum*  $\Delta\text{scrB}$  (□). Messung unter Vorlegen von  $5 \text{ mM}$  unmarkierter Fructose und Zugabe eines 100-fachen Überschusses an unmarkierter Saccharose. Die Pfeile markieren die Zugabe Überschusses an Saccharose nach  $1,5$  Minuten.

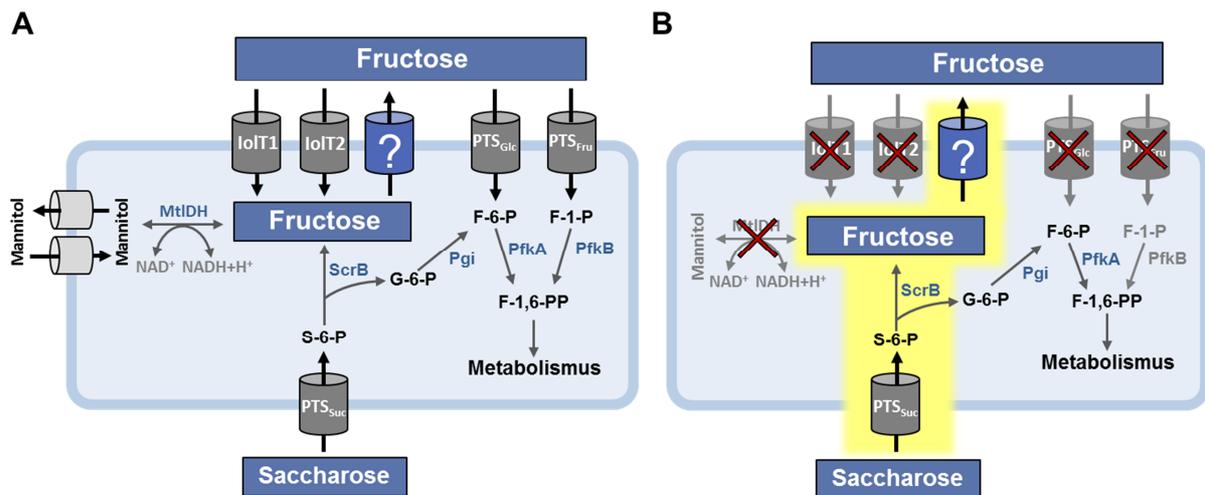
Die durchgeführten *Pulse-Chase*-Experimente und die Silikonölzentrifugation im *C. glutamicum* Wildtyp zur Messung des Fructoseexports belegen das Vorhandensein eines Fructoseexporters. Zur genaueren Charakterisierung des Fructoseexports in *C. glutamicum* bedurfte es weiterer Versuche. Wie bereits in Abschnitt 4.2.1 beschrieben, beträgt der minimale Probenabstand bei der Silikonölzentrifugation aus messtechnischen Gründen drei Minuten. Um einen Überblick über den Verlauf der internen Konzentration zu erhalten, reicht diese zeitliche Auflösung aus. Auch eignet sich diese Messmethode optimal für die Dokumentation des Fructose Steady-State-Levels über einen längeren Kultivierungszeitraum. Für die Aufnahme einer Exportkinetik zur genaueren biochemischen Charakterisierung des Fructoseexporters eignen sich *Pulse-Chase*-Messungen jedoch deutlich besser. Die Ergebnisse in 4.2.2 zeigen, dass eine Probenentnahme im Abstand von 10 Sekunden keine Beeinträchtigung der Messqualität bedeutet. Zudem ermöglicht die schnelle Probenentnahme eine verbesserte kinetische Auflösung, die eine präzise Aufzeichnung von Veränderungen im Efflux-Verhalten erlaubt.

Die *Pulse-Chase*-Messung ist für die Charakterisierung des Fructoseefflux im *C. glutamicum* Wildtyp jedoch nicht optimal. Die extrazelluläre Zugabe eines Überschusses an Fructose zu Beginn der Messung geht mit einer physiologischen Änderung des Systems einher. Für die Optimierung der Messung zur Vermeidung des Reimports von  $^{14}\text{C}$ -markierter Fructose war die Zugabe von unmarkierter Fructose jedoch zwingend notwendig. Trotz des Überschusses an unmarkierter Fructose verblieb etwa ein Viertel der maximal erreichten intrazellulären radioaktiven Markierung als *steady-state*-Level in der Zelle (Abbildung 8 B). Demnach blieb entweder ein erheblicher Anteil der internen Fructose in der Zelle zurück, oder der Reimport von Fructose konnte nicht vollständig maskiert werden. Es ist ebenfalls denkbar, dass die interne Fructose über die Mannitoldehydrogenase (MtlDH) zu Mannitol reduziert wird und als markiertes Mannitol in der Zelle verbleibt.

### 4.3 Entwicklung eines Stammes zur Charakterisierung des Fructoseexports

Die vorhergehenden Ergebnisse zeigen, dass zur genaueren Charakterisierung des Fructoseexports in *C. glutamicum* die Entwicklung eines geeigneten Modellstammes notwendig ist. Um den spezifischen Export beschreiben zu können, muss dieser Modellstamm die Fähigkeit zur konstanten Saccharoseaufnahme besitzen und zusätzlich defizient in der Fähigkeit des Fructoseimports sein. Zusätzlich zur PTS-abhängigen Aufnahme von Fructose kann Fructose auch über die *myo*-Inositol-Transporter IolT1 und IolT2 in die Zelle gelangen (Bäumchen et al., 2009). Neben der Wiederaufnahme der radioaktiven Markierung durch Fructose sind des Weiteren alle anderen Stoffwechselwege, die unphosphorylierte Fructose aus dem Pool entfernen können, zu unterbinden. Dazu zählt die Möglichkeit der NADH-abhängigen Reduktion von D-Fructose zu D-Mannitol durch die Mannitoldehydrogenase MtlDH und darüber hinaus der potentielle Export des markierten Mannitols. Die Deletion des Gens *mtlD* stellt daher einen weiteren notwendigen Schritt bei der Konstruktion des Modellstamms dar (vgl. Abbildung 10).

Für die Konstruktion eines Modellstammes für den Fructoseexport ist die Kenntnis über das Wachstumsverhalten von *C. glutamicum* auf den PTS-Substraten von grundlegender Wichtigkeit. Die damit verbundene Charakterisierung der Saccharose- und Fructoseaufnahme in *C. glutamicum*, insbesondere die der an der Aufnahme von Fructose beteiligten Transporter  $\text{EII}_{\text{Fru}}$  und  $\text{EII}_{\text{Glc}}$ , bildete dabei die Grundlage für die Entwicklung eines solchen Modellstammes.



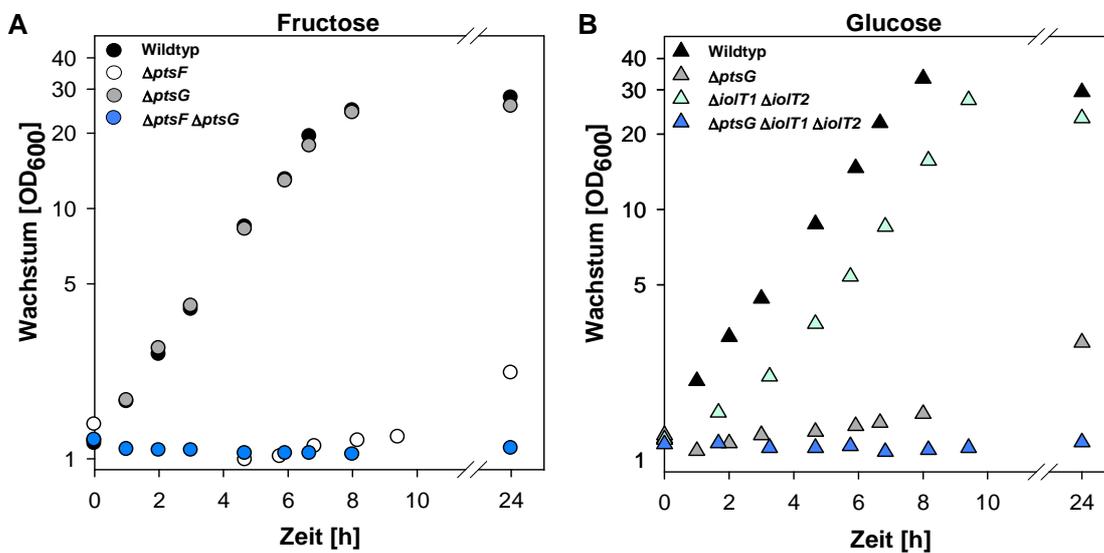
**Abbildung 10. Übersicht der enzymatischen Reaktionen und möglichen Transportvorgänge in *C. glutamicum* bei Wachstum mit Saccharose als Kohlenstoffquelle.** Dargestellt ist eine Übersicht für den *C. glutamicum* Wildtyp (A) und für einen Modellstamm zur Charakterisierung des Fructoseexports (B). Die in (B) mit einem Kreuz versehenen Transporter/Enzyme sollten im Modellstamm inaktiviert sein. Metabolite: S-6-P Saccharose-6-phosphat, G-6-P Glucose-6-phosphat, F-6-P Fructose-6-phosphat, F-1-P Fructose-1-phosphat, F-1,6-P Fructose-1,6-Bisphosphat. Enzyme: *Pgi* Phosphoglucose Isomerase, *PfkA/PfkB* Phosphofruktokinase A und B, *ScrB* Saccharose-6-phosphat Hydrolase, *MtIDH* Mannitoldehydrogenase. Transporter:  $PTS_{FRU}$  fructosespezifisches PTS,  $PTS_{GLC}$  glucosespezifisches PTS, *IoIT1/ IoIT2* *myo*-Inositol-Transporter

#### 4.3.1 Fructose und Glucose als Kohlenstoffquelle für *C. glutamicum*

Die Aufnahme der Monosaccharide Fructose und Glucose geschieht in *C. glutamicum*, wie auch die Aufnahme des Disaccharids Saccharose, über Phosphotransferase Systeme. Dabei ist  $EII_{FRU}$  für die Aufnahme von Fructose und  $EII_{GLC}$  für die Aufnahme von Glucose verantwortlich (Moon et al., 2005). Moon et al. (2005) zeigten auch, dass für beide Monosaccharide, neben dem jeweils substratspezifischen PTS, ein weiterer Transporter für die Aufnahme dieser beiden Substrate in die Zelle existieren muss. Dabei wurde die Beteiligung von  $EII_{GLC}$  an der Fructoseaufnahme angenommen (Dominguez et al., 1998; Lee et al., 1994; Moon et al., 2005).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Deletion von *ptsF* in *C. glutamicum* bewirkte eine deutliche Minderung der Wachstumsfähigkeit mit Fructose als Substrat. Die entsprechende Deletionsmutante, *C. glutamicum*  $\Delta ptsF$ , wies dabei eine Wachstumsrate von  $0,05 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$  auf (Abbildung 11 A). Die erstellte Doppeldeletionsmutante *C. glutamicum*  $\Delta ptsF \Delta ptsG$  konnte Fructose dagegen nicht mehr als Kohlenstoffquelle nutzen (Abbildung 11 A). Dies weist darauf hin, dass neben dem fructosespezifischen  $EII_{FRU}$  tatsächlich auch das glucosespezifische  $EII_{GLC}$  an der Aufnahme von Fructose beteiligt ist. Im Gegensatz dazu zeigte die Einzeldelentionsmutante *C. glutamicum*  $\Delta ptsG$  mit einer Wachstumsrate von  $0,39 \pm$

0,02 h<sup>-1</sup> im Vergleich zum *C. glutamicum* Wildtyp (0,42 ± 0,04 h<sup>-1</sup>) keinen Unterschied im Wachstum mit Fructose. (Abbildung 11A). Bäumchen et al. (2009) konnten zeigen, dass Fructose zusätzlich über die beiden *myo*-Inositol-Transporter IolT1 und IolT2 aufgenommen werden kann. Die Metabolisierung von Fructose ist auf diesem Wege jedoch nicht möglich, da die Aufnahme über IolT1 und IolT2 die Phosphorylierung der Fructose nicht miteinschließt. Die entsprechende Doppeldeletionsmutante wurde ebenfalls mit Fructose als Substrat kultiviert. Der Stamm *C. glutamicum*  $\Delta iolT1 \Delta iolT2$  zeigte jedoch keinen Unterschied zum *C. glutamicum* Wildtyp beim Wachstum mit Fructose. Die Wachstumsrate lag bei 0,40 ± 0,2 h<sup>-1</sup> (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 11. Wachstum von *C. glutamicum* Deletionsmutanten der Fructose- und Glucoseaufnahmesysteme mit Fructose (A) und Glucose (B) als Substrat.** Der *C. glutamicum* Wildtyp (●,▲) und die Deletionsmutanten *C. glutamicum*  $\Delta ptsF$  (○), *C. glutamicum*  $\Delta ptsG$  (○,△), *C. glutamicum*  $\Delta ptsF \Delta ptsG$  (●), *C. glutamicum*  $\Delta iolT1 \Delta iolT2$  (△) sowie *C. glutamicum*  $\Delta ptsG \Delta iolT1 \Delta iolT2$  (▲) wurden in CgC-Medium mit jeweils 2 % Fructose bzw. Glucose kultiviert.

Die Deletionsmutante *C. glutamicum*  $\Delta ptsG$  zeigte im Gegensatz zu Fructose als Substrat mit Glucose als alleiniger Kohlenstoffquelle eine drastisch verminderte Wachstumsfähigkeit, einhergehend mit einer verlängerten *lag*-Phase und einer Wachstumsrate von 0,06 ± 0,02 h<sup>-1</sup> (Vergleich: *C. glutamicum* Wildtyp 0,39 ± 0,03 h<sup>-1</sup>) (Abbildung 11 B). Neben EII<sub>Glc</sub> ermöglichen die beiden *myo*-Inositol-Transporter IolT1 und IolT2 ebenfalls die Aufnahme von Glucose (Lindner et al., 2011). Die Überexpression der Transporter-codierenden Gene *iolT1* und *iolT2* erlaubt in Abwesenheit von *ptsG* ein Wachstum mit Glucose als alleiniger Kohlenstoffquelle. Die entsprechende Mutante *C. glutamicum*  $\Delta ptsG \Delta iolT1 \Delta iolT2$  ist dagegen nicht mehr in der Lage Glucose als alleinige Kohlenstoffquelle zu nutzen (Abbildung 11 B). Der Stamm *C. glutamicum*  $\Delta ptsF \Delta ptsG$  zeigt dagegen, wie die Einzeldelentionsmutante

*C. glutamicum*  $\Delta ptsG$ , weiterhin ein langsames Wachstum mit Glucose als Substrat (Daten nicht gezeigt). Daraus ergibt sich, dass Glucose nicht über  $EII_{Fru}$  in die Zelle aufgenommen werden kann.

#### 4.3.2 Biochemische Charakterisierung der Fructoseaufnahme in *C. glutamicum*

Die Transportcharakteristika von  $EII_{Fru}$  und  $EII_{Glc}$  für Fructose wurden vergleichbar zur Untersuchung der Saccharoseaufnahme durch  $EII_{Suc}$  mithilfe von  $^{14}C$ -markiertem Substrat gemessen. Durch Ermittlung der Aufnahmezeiten von Fructose in Abhängigkeit der Fructosekonzentration, wurde die zugrunde liegende Kinetik bestimmt.

Die gemessenen Aufnahmezeiten von Fructose im *C. glutamicum* Wildtyp ergaben eine Kinetik mit einem sigmoidalen Kurvenverlauf (Abbildung 13 A). Ein Hill-Koeffizient von  $1,9 \pm 0,2$  ließ einen kooperativen Effekt bei der Substrataufnahme annehmen. Die Bestimmung des Hill-Koeffizienten ist in Abbildung 12 für die Fructoseaufnahme des *C. glutamicum* Wildtyps dargestellt. Dieser sigmoidale Kurvenverlauf steht im Gegensatz zur Kinetik der Glucoseaufnahme, welche einer Michaelis-Menten-Kinetik unterliegt (Lindner et al., 2011). Da es sich bei der zugrunde liegenden Kinetik für Fructose nicht um eine Michaelis-Menten-Kinetik handelt, wird die Halbsättigungskonstante als Kenngröße für eine Transportreaktion im Folgenden nicht als Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$  sondern als  $K_{1/2}$  bezeichnet. Die maximale Fructoseaufnahmezeit ( $V_{max}$ ) wurde für den *C. glutamicum* Wildtyp mit  $83,3 \pm 2,6$  nmol/min\*mg TG bestimmt, der  $K_{1/2}$  mit  $51,4 \pm 8,9$   $\mu M$  (Abbildung 13A).

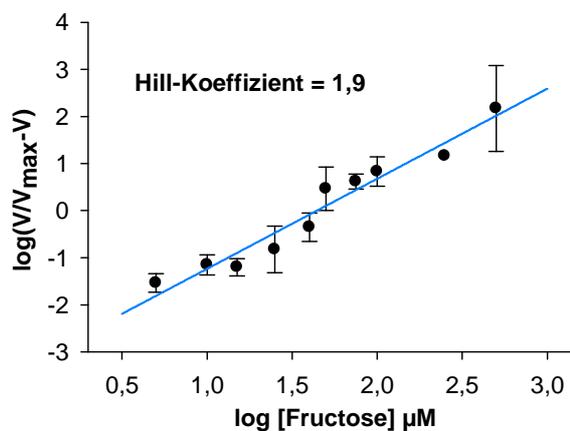
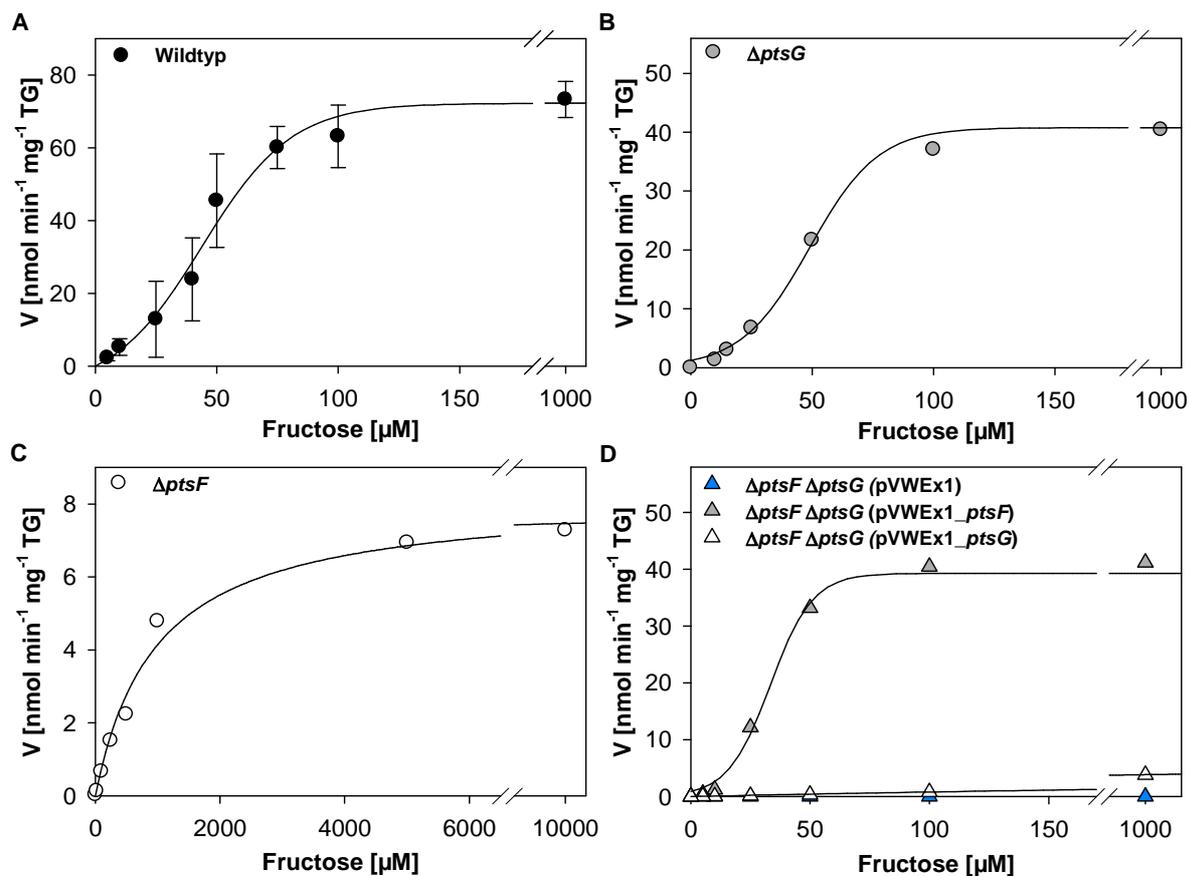


Abbildung 12. Bestimmung des Hill-Koeffizienten der Aufnahmekinetik von Fructose im *C. glutamicum* Wildtyp.

Um den Einfluss von  $EII_{Fru}$  und  $EII_{Glc}$  an der Fructoseaufnahme zu untersuchen, wurde die Fructoseaufnahme in verschiedenen PTS-Deletionsmutanten gemessen. Die Aufnahmekinetiken in *C. glutamicum*  $\Delta ptsF$  und *C. glutamicum*  $\Delta ptsG$  unterschieden sich dabei deutlich voneinander (Abbildung 13). Um den Anteil von  $EII_{Fru}$  an der Aufnahme von Fructose bestimmen zu können, wurden die kinetischen Parameter der Fructoseaufnahme in *C. glutamicum*  $\Delta ptsG$  bestimmt. Die entsprechende Aufnahmekinetik zeigte mit einem Hill-Koeffizienten von 2,38 einen sigmoidalen Kurvenverlauf (Abbildung 13 B). Der dabei bestimmte  $V_{max}$  für  $EII_{Fru}$  lag bei  $41,6 \pm 1,5$  nmol/min\*mg TG. Der  $K_{1/2}$  von  $49,4 \pm 0,8$   $\mu$ M entsprach etwa dem der Fructoseaufnahme des Wildtyps. Die Affinität von  $EII_{Glc}$  für Fructose ist dagegen deutlich geringer. Um eine Sättigung erkennen zu können, wurde in *C. glutamicum*  $\Delta ptsF$  eine 10-fach höhere Fructosekonzentration als maximale Substratmenge zur Bestimmung der kinetischen Parameter eingesetzt. Die Aufnahmekinetik von Fructose über  $EII_{Glc}$  entspricht einer Michaelis-Menten-Kinetik mit einem  $K_m$  von 975  $\mu$ M. (Abbildung 13 C). Der  $K_m$  von  $EII_{Fru}$  ist mit  $49,4 \pm 0,8$   $\mu$ M etwa 20-mal geringer. Neben dem deutlich erhöhten  $K_m$ -Wert wich auch  $V_{max}$  für  $EII_{Glc}$  mit nur 8,2 nmol/min\*mg TG signifikant vom  $V_{max}$  von  $EII_{Fru}$  für Fructose ab ( $41,6 \pm 1,5$  nmol/min\*mg TG).

Die Doppelmutante *C. glutamicum*  $\Delta ptsF \Delta ptsG$  zeigte auch nach fünf Minuten Inkubation mit bis zu 10 mM radioaktiv markierter Fructose keinen signifikanten Anstieg der intrazellulären spezifischen Radioaktivität (Daten nicht gezeigt). Dieser Stamm transportierte bei den getesteten Konzentrationen bis 10 mM keine Fructose in die Zelle. Die Fructoseaufnahme im *C. glutamicum* Wildtyp ist daher allein auf das Vorhandensein von  $EII_{Fru}$  und  $EII_{Glc}$  zurückzuführen. Durch homologe Überexpression von *ptsF* bzw. *ptsG* in *C. glutamicum*  $\Delta ptsF \Delta ptsG$  konnte der Phänotyp komplementiert werden. Vergleichbar mit *C. glutamicum*  $\Delta ptsG$  unterlag die Aufnahmekinetik von *C. glutamicum*  $\Delta ptsF \Delta ptsG$  (pVWEx1\_ptsF) mit einem Hill-Koeffizienten von 2,57 einem sigmoidalen Kurvenverlauf (Abbildung 13 D). Der  $K_{1/2}$  von  $EII_{Fru}$  und die Maximalgeschwindigkeit  $V_{max}$  lagen bei 35,5  $\mu$ M bzw.  $32,4 \pm 3,3$  nmol/min\*mg TG. Die Bestimmung der Kinetik der Fructoseaufnahme bei Überexpression von *ptsG* in *C. glutamicum*  $\Delta ptsF \Delta ptsG$  (pVWEx1\_ptsG), unterlag dagegen einer Michaelis-Menten-Kinetik, anhand welcher ein  $K_m$  von 784  $\mu$ M und ein  $V_{max}$  von  $6,9 \pm 3,3$  nmol/min\*mg TG berechnet wurde (Abbildung 13 D). Die Mithilfe der Überexpression von *ptsF* und *ptsG* ermittelten kinetischen Parameter sind mit denen der entsprechenden Deletionsmutanten vergleichbar (Abbildung 13 B und C). Anhand der ermittelten Daten für  $EII_{Fru}$  mit *C. glutamicum*  $\Delta ptsG$  und *C. glutamicum*  $\Delta ptsF \Delta ptsG$  (pVWEx1\_ptsF) ergab sich für den Hill-Koeffizienten ein Durchschnittswert von 2,48.

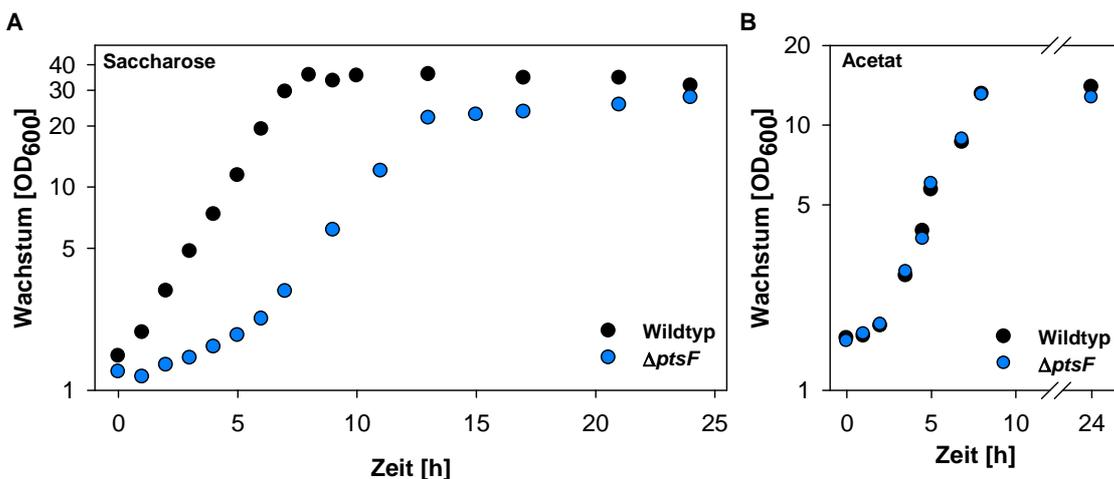


**Abbildung 13. Kinetik des Imports von Fructose verschiedener PTS-Mutanten im Vergleich zum *C. glutamicum* Wildtyp.** Nach Kultivierung von *C. glutamicum* Wildtyp (A, ●) *C. glutamicum*  $\Delta ptsG$  (B, ○) und *C. glutamicum*  $\Delta ptsF$  (C, ○) in CgC-Medium mit 2% Fructose, wurden die Zellen in CgC-Medium ohne Substrat gewaschen und die Aufnahmeraten in Abhängigkeit der Fructosekonzentration gemessen. Die Doppeldeletionsmutante *C. glutamicum*  $\Delta ptsF \Delta ptsG$  (pVWEx1) (▲) und die Stämme zur Komplementation der Doppeldeletion, *C. glutamicum*  $\Delta ptsF \Delta ptsG$  (pVWEx1\_ptsF) (△) und *C. glutamicum*  $\Delta ptsF \Delta ptsG$  (pVWEx1\_ptsG) (△), wurden abweichend in 2TY-Medium kultiviert (D).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden sowohl das für  $EII_{Fru}$  als auch für  $EII_{Glc}$  codierende Gen für die Konstruktion des *C. glutamicum* Modellstamms zur Messung des Fructoseexports deletiert. Dadurch sollte nach Zugabe von Saccharose zum Modellstamm ein Reimport der Fructose nach Verlassen der Zelle verhindert werden. Im Falle der Exportmessung mittels eines Saccharoseaufnahme-Experiments zur Messung des Fructoseefflux mit spezifisch am Fructosemolekül  $^{14}\text{C}$ -markierter Saccharose sollte zudem direkt Rückschluss auf die interne Fructosekonzentration gezogen werden können. Aufgrund dessen sind weitere metabolische Vorgänge, die den intrazellulären Verlust von Fructose herbeiführen könnten, zu unterbinden.

### 4.3.3 *C. glutamicum* $\Delta ptsF \Delta ptsG$ als Ausgangspunkt für einen Modellstamm

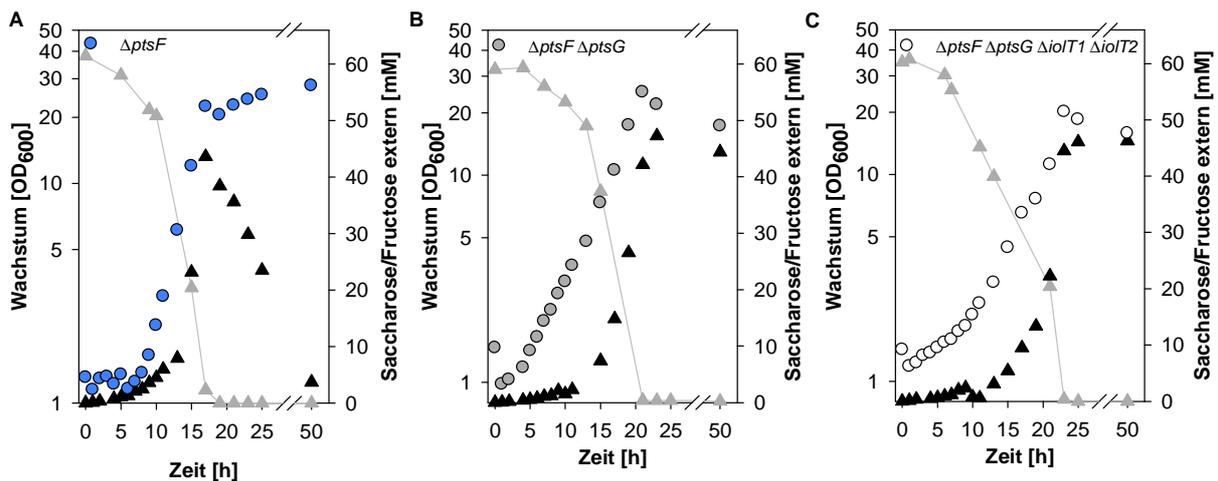
In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass neben  $EII_{Fru}$ , dem Hauptaufnahmesystem für Fructose, auch  $EII_{Glc}$  am Import von Fructose beteiligt ist (Abbildung 13). Die Doppeldeletionsmutante *C. glutamicum*  $\Delta ptsF \Delta ptsG$  zeigte auch nach fünfminütiger Inkubation mit 10 mM markierter Fructose keinen Anstieg der intrazellulären spezifischen Radioaktivität (Abschnitt 4.3.2). Bäumchen et al. (2009) wiesen jedoch die Beteiligung der beiden *myo*-Inositol-Transporter  $IolT1$  und  $IolT2$  am Fructoseimport bei einem entsprechend hohen Konzentrationsgradienten, unter Verwendung von 500 mM extrazellulärer Fructose, nach. Auch wenn die metabolische Verwertung der unphosphorylierten Fructose nicht möglich ist, ist für einen Fructoseexport-Modellstamm die Vermeidung jeglicher Wiederaufnahme von Fructose essenziell.  $IolT1$  und  $IolT2$  waren daher ebenfalls bei der Konstruktion des Fructoseexport-Modellstamms zu berücksichtigen. Die Basis der Arbeit zur Konstruktion eines Modellstamms bildeten daher die Stämme *C. glutamicum*  $\Delta ptsF$  und *C. glutamicum*  $\Delta ptsF \Delta ptsG$ .



**Abbildung 14. Wachstum von *C. glutamicum* Wildtyp und *C. glutamicum*  $\Delta ptsF$  mit Saccharose als Kohlenstoffquelle.** Der *C. glutamicum* Wildtyp (●) und *C. glutamicum*  $\Delta ptsF$  (●) wurden CgC-Medium mit 2% Saccharose (A) bzw. 2% Natrium-Acetat (B) kultiviert.

Es war anzunehmen, dass die Deletion der Fructoseaufnahmesysteme keinen Einfluss auf die Wachstumsrate bei Wachstum mit Saccharose als Substrat hat. Obwohl *C. glutamicum*  $\Delta ptsF$  Fructose nicht mehr als Substrat verwerten kann, sollte das Glucosemolekül der Saccharose, welches in Form von Glucose-6-phosphat zum Wachstum zur Verfügung steht, normal verstoffwechselt werden können. Erwartet wurde eine normale Wachstumsrate sowie eine mit dem *C. glutamicum* Wildtyp vergleichbare maximale Zelldichte ( $OD_{600}$ ), da bei alleiniger Deletion von *ptsF* die extrazelluläre akkumulierende Fructose noch über  $EII_{Glc}$  in die Zelle gelangen kann.

Im Gegensatz zu dieser Annahme wurde beobachtet, dass die chromosomale Deletion von *ptsF* in *C. glutamicum* mit einem deutlichen Wachstumsphänotyp einherging (Abbildung 14 A). Bei Wachstum mit Saccharose als Substrat zeigte *C. glutamicum*  $\Delta ptsF$  im Vergleich zum Wildtyp eine deutliche *lag*-Phase und im Anschluss daran ein Wachstum mit verminderter Wachstumsrate (Abbildung 14). Der *C. glutamicum* Wildtyp konnte Saccharose dagegen ohne erkennbare *lag*-Phase nutzen und wies eine Wachstumsrate von  $0,46 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$  sowie eine maximale optische Dichte ( $OD_{600}$ ) von  $34,8 \pm 1$  auf. Beim Wachstum mit Saccharose als Kohlenstoffquelle zeigte *C. glutamicum*  $\Delta ptsF$  hingegen eine deutliche *lag*-Phase (Abbildung 14 A und Abbildung 15 A). Nach zwei bis fünf Stunden setzte das exponentielle Wachstum mit einer initialen Wachstumsrate von  $0,09 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$  ein. Nach drei weiteren Stunden war ein exponentielles Wachstum mit einer Wachstumsrate von  $0,24 \pm 0,09 \text{ h}^{-1}$  zu beobachten (Abbildung 14 A und Abbildung 15 A).

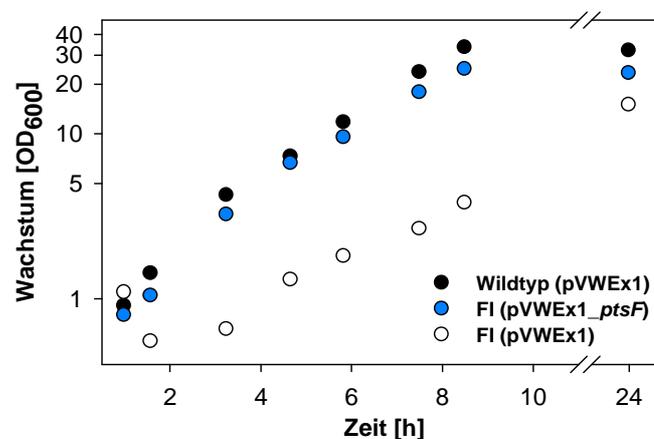


**Abbildung 15. Wachstum, Saccharoseverbrauch und externe Fructoseakkumulation mit Saccharose als Kohlenstoffquelle in *C. glutamicum* Mutanten der Fructoseimporter.** *C. glutamicum*  $\Delta ptsF$  (A, ●), *C. glutamicum*  $\Delta ptsF \Delta ptsG$  (B, ○) und *C. glutamicum*  $\Delta ptsF \Delta ptsG \Delta iolT1 \Delta iolT2$  (C, ○) wurden in CgC-Medium mit 2% (58 mM) Saccharose kultiviert und die externe Abnahme von Saccharose (▲) sowie die extrazellulär akkumulierende Fructose bestimmt (▲).

Nachdem Saccharose nach 13 Stunden verbraucht war, wurde die extra-zelluläre Abnahme der Fructosekonzentration beobachtet. Fructose wurde über  $EII_{Glc}$  aufgenommen und so dem Zentralstoffwechsel zugeführt (Abbildung 15 A). Die dabei gezeigte Wachstumsrate ( $0,04 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ ) war vergleichbar mit der von *C. glutamicum*  $\Delta ptsF$  bei Wachstum auf Fructose (Abschnitt 4.3.1). Nach 50 Stunden Wachstums war die extrazelluläre Fructose nahezu verbraucht und eine Zelldichte  $OD_{600}$  von 27,9 erreicht (Abbildung 15 A). Das Wachstum auf anderen

Kohlenstoffquellen, wie Acetat (Abbildung 14 B) oder dem PTS-Substrat Glucose war nicht gestört (Abbildung 11 B). Das veränderte Wachstumsverhalten war demnach nicht auf eine Beeinträchtigung des Zentralstoffwechsels zurückzuführen.

Im Vergleich zur Wachstumsrate von *C. glutamicum*  $\Delta ptsF$  mit Saccharose als Kohlenstoffquelle ( $0,24 \pm 0,09 \text{ h}^{-1}$ ) war die Wachstumsrate der Mutante *C. glutamicum*  $\Delta ptsF \Delta ptsG$  mit  $0,13 \pm 0,07 \text{ h}^{-1}$  weiter vermindert. Die zusätzlichen Deletionen der für die *myo*-Inositol-Transporter IolT1 und IolT2 codierenden Gene *iolT1* und *iolT2* ergaben einen Stamm, dem alle Fructoseaufnahmesysteme fehlen. Dieser Stamm wurde im Folgenden als *C. glutamicum* FI (Fructose-Importer-defizient) bezeichnet. *C. glutamicum* FI zeigte eine Wachstumsrate von  $0,11 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$  mit Saccharose als Substrat. Nach 24 Stunden erreichten *C. glutamicum*  $\Delta ptsF \Delta ptsG$  und *C. glutamicum* FI eine Zelldichte von  $19,3 \pm 2,4$  bzw.  $18,1 \pm 2,2$ . Im Gegensatz zur Einzeldeletion von *ptsF* wird der Fructoseanteil der Saccharose in beiden Mutanten nicht mehr verwertet. Die Wachstumsrate von *C. glutamicum* FI nimmt zudem im Laufe der Kultivierung zu (Abbildung 15 C). Durch homologe Expression von *ptsF* mit Hilfe des Expressionsplasmids pVWEx1\_ptsF in der *C. glutamicum* FI-Mutante konnte der Phänotyp bei Wachstum auf Saccharose komplementiert werden (Abbildung 16).



**Abbildung 16.** Wachstum mit Saccharose als Kohlenstoffquelle von *C. glutamicum* FI mit und ohne Komplementation mit *ptsF*. *C. glutamicum* (pVWEx1) (●), *C. glutamicum* FI (pVWEx1\_ptsF) (●) und *C. glutamicum* FI (pVWEx1) (○) wurden CgC-Medium mit 2% Saccharose kultiviert.

#### 4.3.4 Die Mannitoldehydrogenase von *C. glutamicum*

Die Charakterisierung des Fructoseefflux kann, wie bereits gezeigt, über verschiedene Ansätze erfolgen. Dazu zählt die enzymatische Bestimmung der extern akkumulierenden Fructose über die Zeit sowie die Messung des Exports unter Verwendung von  $^{14}\text{C}$ -markierter Fructose. Um eine Verfälschung des

Messergebnisses durch Wiederaufnahme der radioaktiven Markierung über Fructoseimportsysteme zu vermeiden, wurden bereits die Gene deletiert, die für Fructoseaufnahmesystem kodieren. Der nächste Schritt bei der Konstruktion des Modellstamms stellte die Deletion von *mtlD* dar, welche für die Mannitoldehydrogenase (MtlDH) codiert. So sollte Verlust der radioaktiven Markierung über Mannitol verhindert werden. Über die physiologische Relevanz der MtlDH von *C. glutamicum* bei Wachstum mit Saccharose als Substrat war bis dato nichts bekannt.

#### 4.3.4.1 Messung des Fructoseexports in *C. glutamicum* $\Delta$ *mtlD*

Experimente zur Messung des Efflux von Fructose mit am Fructosemolekül  $^{14}\text{C}$ -markierter Saccharose in *C. glutamicum*  $\Delta$ *mtlD* ergaben ähnliche Ergebnisse wie für den *C. glutamicum* Wildtyp (Abbildung 8 und Abbildung 17).

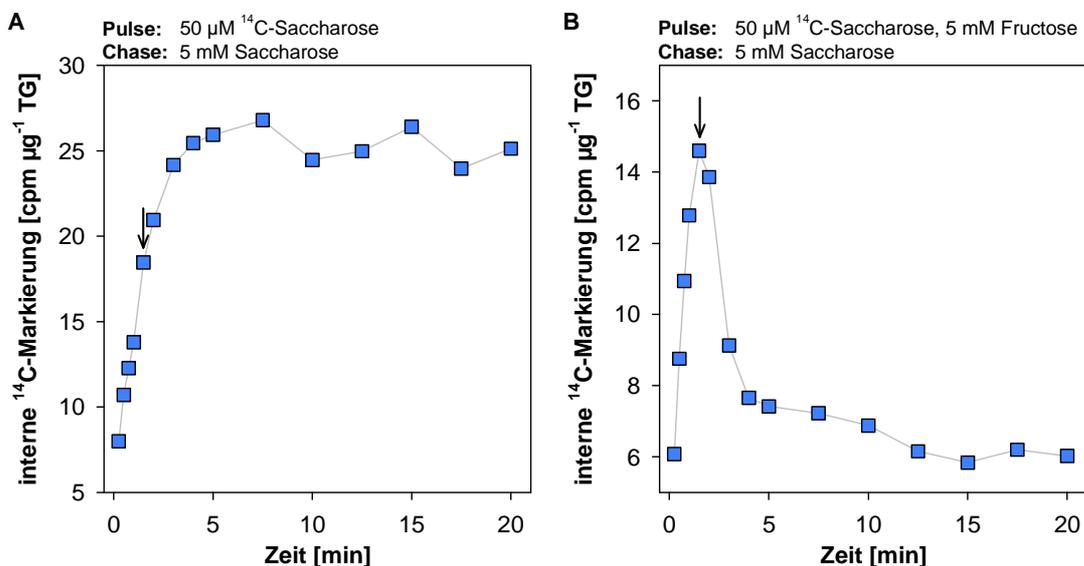


Abbildung 17. Pulse-Chase-Messung mit 50  $\mu\text{M}$   $^{14}\text{C}$ -Saccharose in *C. glutamicum*  $\Delta$ *mtlD* mit Maskierung der Saccharoseaufnahme sowie der Saccharose- und Fructoseaufnahme. Verlauf der zellinternen spezifischen Radioaktivität mit 50  $\mu\text{M}$  am Fructosemolekül  $^{14}\text{C}$ -markierter Saccharose in *C. glutamicum*  $\Delta$ *mtlD*. Gezeigt ist die Messung mit Zugabe eines Saccharose-Chase, ein 100-facher Überschuss an unmarkierter Saccharose nach 1,5 min (A) und die Messung mit zusätzlicher Maskierung der Fructoseaufnahme, unter Vorlegen von 5 mM unmarkierter Fructose zu Messungsbeginn (B). Die Pfeile markieren die Zugabe des Saccharose-Überschusses nach 1,5 Minuten.

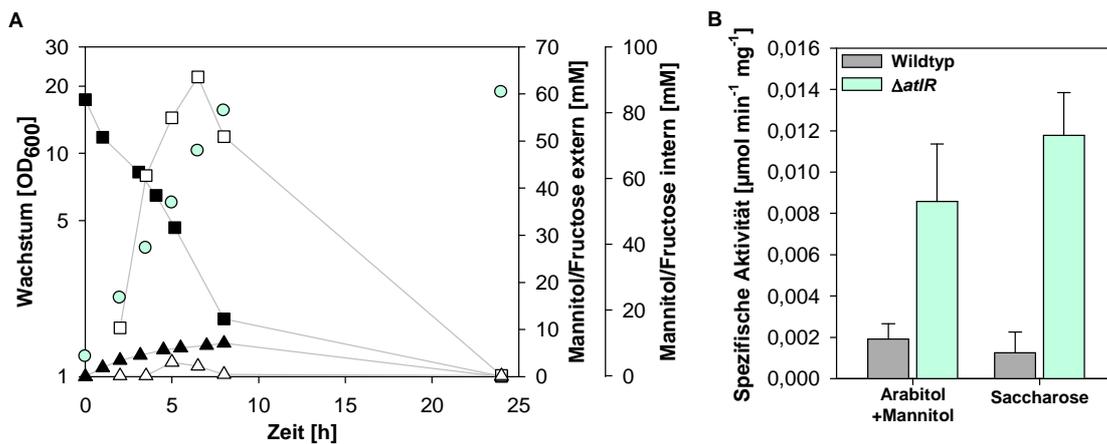
Die alleinige Zugabe eines Überschusses an unmarkierter Saccharose reichte nicht aus, um den Fructoseexport messen zu können (Abbildung 17 A). Durch Vorlegen von 5 mM unmarkierter Fructose zu Beginn der Messung und Zugabe eines Saccharose-Chase war hingegen eine eindeutige Abnahme der internen radioaktiven Markierung sichtbar (Abbildung 17 B). Nach etwa 12,5 Minuten entsprach die intrazelluläre radioaktive Markierung der des gemessenen Anfangswertes. Im

Vergleich zu *C. glutamicum*  $\Delta mtlD$  war die Abnahme der Markierung im *C. glutamicum* Wildtyp weniger eindeutig (Abbildung 8 B). Das sich einstellende *steady-state*-Level an interner  $^{14}\text{C}$ -Markierung [cpm/ $\mu\text{g}$  TG] war in *C. glutamicum*  $\Delta mtlD$  geringer als im *C. glutamicum* Wildtyp und erreichte 15 Minuten nach Messungsbeginn etwa den Anfangswert (vgl. Abbildung 8 B und Abbildung 17 B). Es ist demnach anzunehmen, dass ein gewisser Anteil der intrazellulären radioaktiven Markierung im Wildtyp neben Fructose, Fructose-1-phosphat und Fructose-6-phosphat auch Mannitol darstellt.

#### 4.3.4.2 Reduktion von Fructose zu Mannitol

Im Rahmen der Konstruktion eines Fructoseexport-Modellstamms sollte die physiologische Relevanz der MtlDH von *C. glutamicum* bei Wachstum mit Saccharose als Substrat untersucht werden. Allgemein wird die MtlDH aus *C. glutamicum* für den D-Arabitol- und D-Mannitolstoffwechsel benötigt und ist dabei für die  $\text{NAD}^+$ -abhängige Oxidation von D-Mannitol zu D-Fructose verantwortlich (Laslo et al., 2012). Neben der Dehydrogenaseaktivität weist die MtlDH aber auch die Fähigkeit zur Reduktion von D-Fructose zu D-Mannitol auf. Dabei ist das Reaktionsgleichgewicht auf Seiten des Mannitols. Der  $K_m$  der MtlDH für D-Mannitol liegt bei  $6,4 \pm 0,63$  mM (Laslo et al., 2012). Die Affinität für D-Fructose ist fünfmal geringer (persönliche Kommunikation Dr. Tanja Laslo, Universität Ulm).

Der *C. glutamicum* Wildtyp kann Mannitol nur in Verbindung mit Arabitol als Kohlenstoffquelle nutzen, da die Expression des für die MtlDH kodierenden Gens *mtlD* der Regulation des Transkriptionsregulators AtlR unterliegt (Laslo et al., 2012). Die Anwesenheit von Arabitol führt zur Derepression von *mtlD* durch AtlR und ermöglicht so die Umsetzung von Mannitol zu Fructose (Laslo et al., 2012). Die Deletionsmutante *C. glutamicum*  $\Delta atlR$  kann Mannitol als alleinige Kohlenstoffquelle nutzen. Es wurde angenommen, dass Mannitol in die Zellen aufgenommen und dort durch die MtlDH in Fructose umgewandelt wird (Laslo et al., 2012). Ein im Rahmen dieser Arbeit durchgeführter Versuch mit Mannitol zeigte, dass *C. glutamicum*  $\Delta atlR$  Mannitol mit einer Wachstumsrate von  $0,32 \text{ h}^{-1}$  als alleinige Kohlenstoffquelle nutzen konnte (Abbildung 18 A). Dabei konnte während des Wachstums neben Mannitol extra- und intrazellulär auch Fructose nachgewiesen werden (Abbildung 18 A). Die intrazellulären Konzentrationen von Mannitol und Fructose erreichten dabei Werte von 90,8 bzw. 4,2 mM. Während der exponentiellen Wachstumsphase akkumulierten bis zu 7,1 mM Fructose im Medium (Abbildung 18 A).

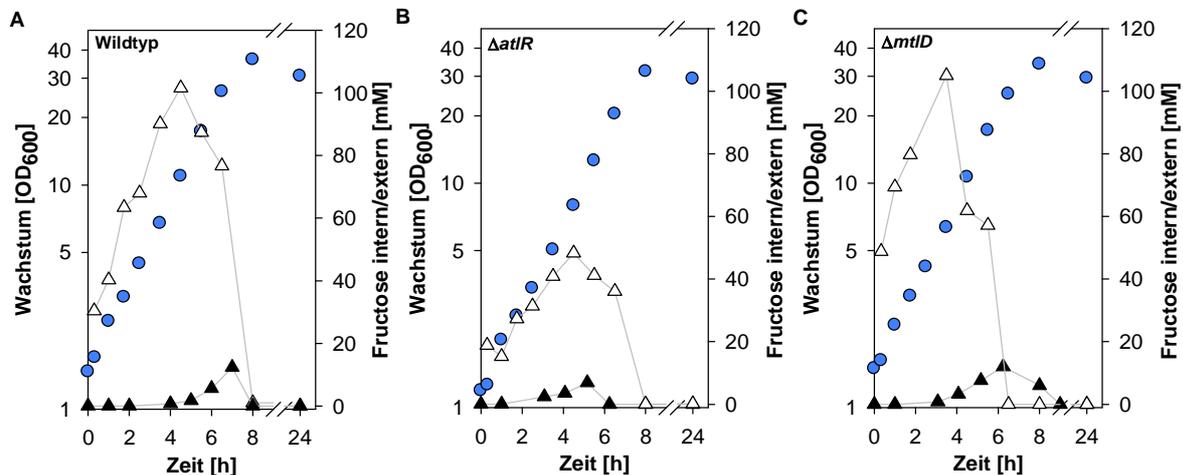


**Abbildung 18** Wachstum von *C. glutamicum*  $\Delta atlR$  mit Mannitol und spezifische Aktivität von MtlDH mit Mannitol und Saccharose als Kohlenstoffquelle im *C. glutamicum* Wildtyp und *C. glutamicum*  $\Delta atlR$ . Wachstum von *C. glutamicum*  $\Delta atlR$  ( $\odot$ ), interne Mannitol- ( $\square$ ) und Fructosekonzentration ( $\Delta$ ), sowie Verbrauch von Mannitol ( $\blacksquare$ ) und externe Akkumulation von Fructose ( $\blacktriangle$ ) (A). Spezifische Aktivität der MtlDH des *C. glutamicum* Wildtyps und *C. glutamicum*  $\Delta atlR$  während des exponentiellen Wachstums in CgC-Medium mit Arabitol und Mannitol (je 1%) bzw. 2% Saccharose als Kohlenstoffquelle (B).

In *C. glutamicum*  $\Delta atlR$  war die spezifische Aktivität der MtlDH, unabhängig von der Kohlenstoffquelle, vier bis zehn Mal so hoch wie im Wildtyp (Abbildung 18 B). Wie oben beschrieben, ermöglicht das Vorhandensein von Arabitol im Medium die Nutzung von Mannitol als Kohlenstoffquelle für den *C. glutamicum* Wildtyp. Die geringe spezifische Aktivität der MtlDH im *C. glutamicum* Wildtyp bei Wachstum auf Arabitol und Mannitol (Abbildung 18 B) reicht demnach aus, um eine Metabolisierung des Mannitols zu ermöglichen. Bei einer ähnlichen spezifischen Aktivität der MtlDH bei Wachstum auf Saccharose ist davon auszugehen, dass die MtlDH ebenso die Formation von Mannitol ermöglichen kann.

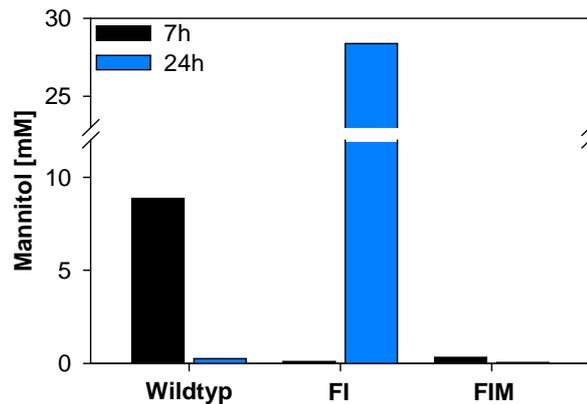
Im Gegensatz zum *C. glutamicum* Wildtyp zeigt *C. glutamicum*  $\Delta atlR$  bei Wachstum mit Saccharose als alleiniger Kohlenstoffquelle eine deutlich verringerte interne als auch externe Fructosekonzentration (Abbildung 19 A und B). Die enzymatische Bestimmung von D-Mannitol mithilfe eines Test-Kits (Megazyme International, Irland) war bei internen Fructosekonzentrationen im zweistelligen millimolaren Bereich nicht möglich. Es wurde jedoch angenommen, dass die etwas verringerte Fructosekonzentration in *C. glutamicum*  $\Delta atlR$  mit einer erhöhten Mannitolkonzentration korreliert. Dafür sprach ebenso, dass die interne Fructosekonzentration in der *mtlD*-Mutante initial sogar höher war als im Wildtyp (Abbildung 19 C). Die Deletion von *mtlD* verhinderte die Bildung von Mannitol aus Fructose. Das Wachstum von *C. glutamicum*  $\Delta mtlD$  auf Saccharose ist nicht eingeschränkt. Die Wachstumsrate entspricht mit  $0,44 \text{ h}^{-1}$  in etwa der des Wildtyps ( $0,46 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$ ). Jedoch konnte im Medium von *C. glutamicum*  $\Delta mtlD$  bereits zu einem

früheren Zeitpunkt Fructose detektiert werden, welche zusätzlich über einen längeren Zeitraum erhalten blieb. Die in summa etwas verringerten internen und externen Fructosekonzentrationen im *C. glutamicum* Wildtyp könnten auf eine teilweise Umwandlung von Fructose zu Mannitol zurückzuführen sein.



**Abbildung 19.** Wachstum, interne Fructose und externe Akkumulation von Fructose des *C. glutamicum* Wildtyps und Mutanten des Mannitolstoffwechsels. Wachstum (●), interne Fructose (Δ), sowie Akkumulation von Fructose im Überstand (▲) von *C. glutamicum* Wildtyp (A), *C. glutamicum*  $\Delta atlR$  (B) und *C. glutamicum*  $\Delta mtlD$  (C) in CgC-Medium mit 2% Saccharose.

Tatsächlich konnte im Medium des *C. glutamicum* Wildtyps nach sieben Stunden Wachstums mit Saccharose bis zu 8,9 mM Mannitol nachgewiesen werden (Abbildung 20). Dabei korrelierte nicht nur die Zunahme des externen Mannitols mit der Zunahme der internen Fructosekonzentration, sondern auch die Abnahme des externen Mannitols mit der Wiederaufnahme von Fructose aus dem Medium (Daten nicht gezeigt). Nach 24 Stunden war kein Mannitol mehr detektierbar. In *C. glutamicum* FI war nach sieben Stunden kein Mannitol nachweisbar, jedoch konnte nach 24 Stunden eine Akkumulation von bis zu 28,4 mM Mannitol im Medium gemessen werden. Als Kontrolle diente der Stamm *C. glutamicum* FI mit zusätzlicher Deletion von *mtlD*. Wie erwartet verhinderte die Deletion von *mtlD* die Bildung von Mannitol im Medium (Abbildung 20).

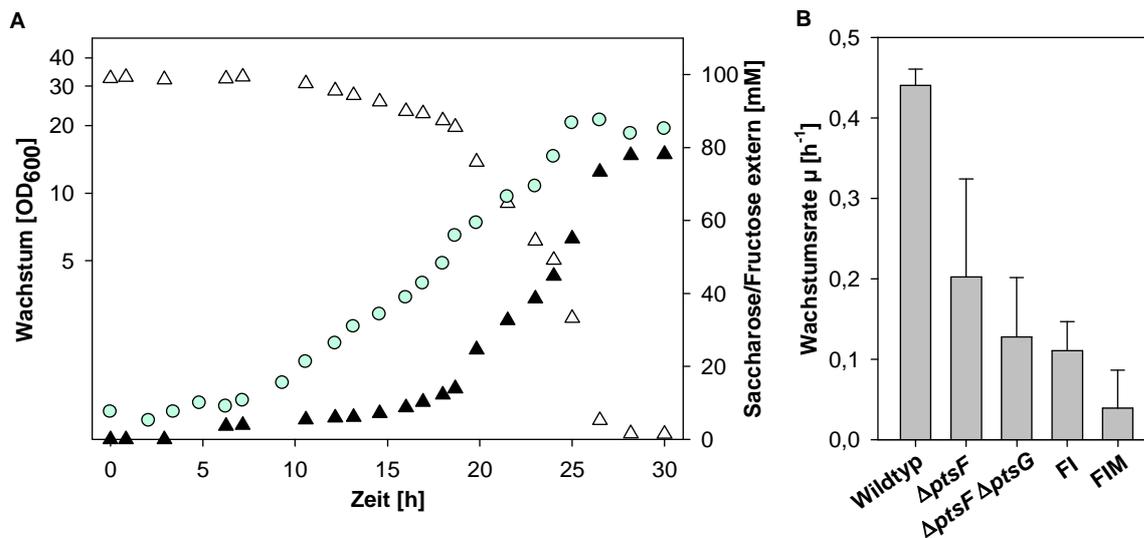


**Abbildung 20. Akkumulation von Mannitol im Medium des *C. glutamicum* Wildtyps sowie von *C. glutamicum* FI und FIM.** Entstehung von Mannitol [mM] im Überstand von *C. glutamicum* Wildtyp, *C. glutamicum* FI und *C. glutamicum* FIM in CgC-Medium mit 2 % Saccharose nach 7 h (schwarz) und 24 h (blau).

Um die Bildung von  $^{14}\text{C}$ -markiertem Mannitol im *C. glutamicum* Modellstamm zu verhindern, war die Deletion von *mtlD* obligat. Der Stamm *C. glutamicum*  $\Delta\text{ptsF}$   $\Delta\text{ptsG}$   $\Delta\text{iolT1}$   $\Delta\text{iolT2}$   $\Delta\text{mtlD}$  wird im Folgenden mit *C. glutamicum* FIM (Fructose-Import und MtlDH-defizient) bezeichnet.

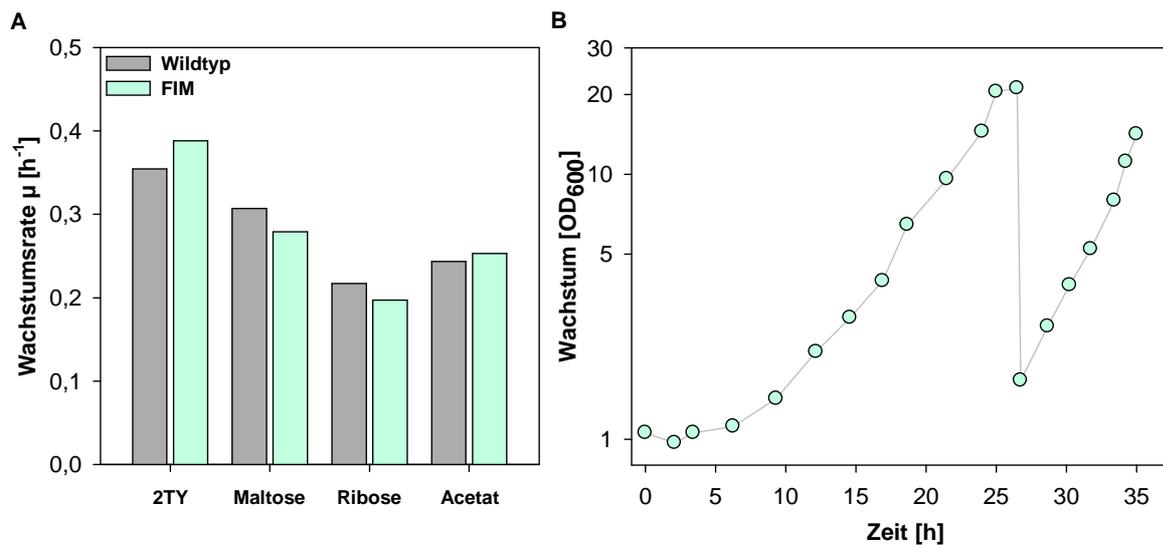
#### 4.3.5 Physiologische Charakterisierung der *C. glutamicum* FIM-Mutante

Vergleichbar mit allen *C. glutamicum* Mutanten, denen die Fructoseimportsysteme fehlen, zeigte auch die darauf aufbauende *C. glutamicum* FIM Mutante einen verschlechtertes Wachstum auf Saccharose (Abbildung 21 A). Die erreichte Wachstumsrate sank im Vergleich zu *C. glutamicum* FI von  $0,11 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$  auf eine durchschnittliche Wachstumsrate von  $0,04 \pm 0,05 \text{ h}^{-1}$  (Abbildung 21 B). Außerdem wurde ebenfalls eine Änderung der Wachstumsrate im Laufe der Inkubation beobachtet. Initial (2 bis 7 Stunden) lag die Wachstumsrate mit Saccharose als Kohlenstoffquelle bei  $0,04 \text{ h}^{-1}$ , stieg dann auf  $0,12 \text{ h}^{-1}$  (7 bis 16 Stunden) und erreichte zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase (16 bis 25 Stunden) einen Wert von  $0,20 \text{ h}^{-1}$  (Abbildung 21 A). Nach einer verlängerten *lag*-Phase begann *C. glutamicum* FIM langsam zu wachsen und Substrat zu verbrauchen. Parallel akkumulierte in Fructose im Medium (Abbildung 21 A).



**Abbildung 21** Wachstum, Saccharoseverbrauch und Fructoseakkumulation in *C. glutamicum* FIM sowie die Wachstumsraten von Fructoseimporter-defizienten Mutanten und *C. glutamicum* FIM im Vergleich zum *C. glutamicum* Wildtyp mit Saccharose als Kohlenstoffquelle. Wachstum (○), Saccharoseverbrauch (Δ) und Fructoseakkumulation (▲) von *C. glutamicum* FIM in CgC-Medium mit 2% Saccharose (A), sowie die durchschnittlichen Wachstumsraten des *C. glutamicum* Wildtyps, *C. glutamicum* ΔptsF, *C. glutamicum* ΔptsF ΔptsG, *C. glutamicum* FI und *C. glutamicum* FIM in CgC Medium mit 2 % Saccharose (B).

Die Grundlage für einen Modellstamm zur Charakterisierung des Fructoseexports ist die optimale Verwertung und Aufnahme von Saccharose. Der Stamm *C. glutamicum* FIM eignete sich aufgrund des Wachstumsdefizits mit Saccharose als Kohlenstoffquelle daher nicht optimal für die Charakterisierung des Fructoseefflux. Um den Stamm für die Fructoseefflux-Messungen optimieren zu können, wurde zunächst überprüft, ob sich das Wachstumsdefizit der *C. glutamicum* FIM Mutante auf Saccharose beschränkt, wie es bei *C. glutamicum* ΔptsF der Fall war (Abbildung 14 B). Dazu wurden der *C. glutamicum* Wildtyp und *C. glutamicum* FIM in 2TY-Vollmedium beziehungsweise CgC-Minimalmedium mit jeweils 2% Maltose, Ribose oder Acetat kultiviert. Das Wachstumsverhalten von Wildtyp und Mutante unterschied sich kaum voneinander. Die dabei erreichten Wachstumsraten waren ähnlich oder sogar identisch (Abbildung 22 A).

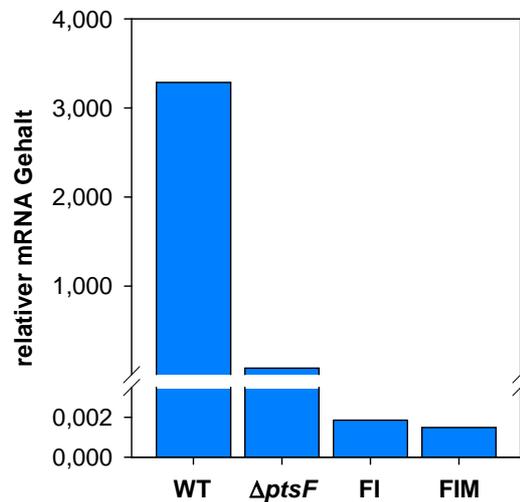


**Abbildung 22** Wachstum von *C. glutamicum* FIM mit Saccharose vor und nach Überimpfen in frisches Medium sowie Wachstum mit verschiedenen Kohlenstoffquellen im Vergleich zum Wildtyp. Wachstumsraten von *C. glutamicum* Wildtyp (grau) und *C. glutamicum* FIM (türkis) in 2TY-Vollmedium, CgC-Medium mit jeweils 1% Maltose, Ribose und Natrium-Acetat (A). Wachstum von *C. glutamicum* FIM (○) in CgC-Medium mit 2% Saccharose und nach Überimpfen in frisches CgC-Medium mit 2% Saccharose bei Erreichen der stationären Phase (B).

#### 4.3.6 Relevanz von SugR auf die Saccharoseverwertung von *C. glutamicum* FIM

Die verminderte Fähigkeit zur Metabolisierung von Saccharose resultiert folglich nicht aus einer Beeinträchtigung im Zentralstoffwechsel. Interessanterweise zeigten in CgC-Medium mit 2% Saccharose kultivierte Zellen nach Waschen und Überimpfen von *C. glutamicum* FIM in frisches CgC-Medium mit 2% Saccharose keine verlängerte *lag*-Phase, wenn dies nach Erreichen der maximalen Wachstumsrate geschah (Abbildung 22 B). Aufgrund dieser Ergebnisse war die Regulation von Genen, die für Enzyme des Saccharosestoffwechsels kodieren, als Ursache für den beobachteten Wachstumsphänotyp von *C. glutamicum* FIM wahrscheinlich. Dadurch, dass lediglich das Wachstum mit Saccharose als Kohlenstoffquelle beeinträchtigt ist, nicht aber in Vollmedium beziehungsweise mit Maltose, Ribose oder Acetat, lässt sich die Auswahl der möglicherweise reprimierten Gene einschränken. Zudem zeigt *C. glutamicum*  $\Delta ptsF$  mit einer Wachstumsrate von  $0,42 \pm 0,04 h^{-1}$  ein zum Wildtyp vergleichbares Wachstum auf Glucose (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund können in *C. glutamicum*  $\Delta ptsF$  bei der Verwertung von Saccharose nur die ersten zwei Schritte beeinträchtigt sein. Dazu zählen die Aufnahme von Saccharose in die Zelle sowie die Phosphorylierung über  $EII_{Suc}$  und die hydrolytische Spaltung des Saccharose-6-phosphats zu Glucose-6-phosphat und Fructose durch ScrB. Der Substratimport stellt zumeist einen Schlüsselpunkt der Regulation des Kohlenstoffmetabolismus dar. Die Durchführung einer quantitativen

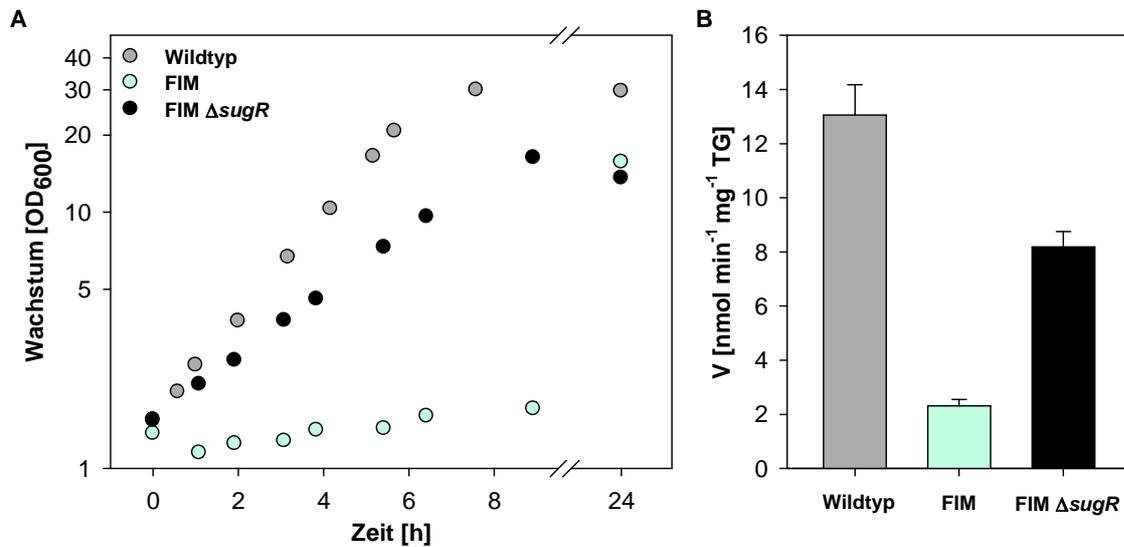
Realtime-PCR ergab eine 40-fache Abnahme des relativen mRNA-Gehalts für *ptsS* in *C. glutamicum*  $\Delta ptsF$  gegenüber des Wildtyps bei Kultivierung mit Saccharose (Abbildung 23). In *C. glutamicum* FI und *C. glutamicum* FIM war der mRNA Gehalt für *ptsS* sogar mehr als 1000-fach verringert (Abbildung 23).



**Abbildung 23. Quantifizierung der Transkriptmenge mittels Realtime PCR-Analyse des Gens *ptsS*.** RNA Proben aus *C. glutamicum* Wildtyp, *C. glutamicum*  $\Delta ptsF$ , *C. glutamicum* FI und *C. glutamicum* FIM wurden mittels RT-PCR und quantitativer Realtime PCR analysiert. Als Referenz für die relative Quantifizierung diente 16S-RNA. Die Proben wurden 5 Stunden nach Wachstumsbeginn in CgC-Medium mit 2% Saccharose entnommen.

Das verschlechterte Wachstum von *C. glutamicum* FIM ist demnach auf eine reduzierte Expression von *ptsS* zurückzuführen. Die Regulation des Kohlenstoffmetabolismus ist durch ein komplexes Regulationsnetzwerk gekennzeichnet. Die Regulation der für die PTS codierenden Gene erfolgt über Masterregulatoren wie GlxR (Kohl und Tauch, 2009), GntR1 und GntR2 (Frunzke et al., 2008) und den DeoR-Regulator SugR (Engels und Wendisch, 2007; Gaigalat et al., 2007; Tanaka et al., 2008b). Einzig die Regulation der Saccharoseaufnahme beschränkt sich auf die Repression des für  $EII_{Suc}$  codierenden *ptsS* und der allgemeinen PTS-Gene *ptsH* und *ptsI* durch SugR (Teramoto et al., 2011).

Die Deletion des Gens *sugR* in *C. glutamicum* FIM führte tatsächlich zu einer Steigerung der Wachstumsrate der entsprechenden Mutante mit Saccharose als alleiniger Kohlenstoffquelle auf einen Wert von  $0,29 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$  (Abbildung 24 A). Jedoch ist die Aufnahmerate von *C. glutamicum* FIM  $\Delta sugR$  mit  $50 \mu\text{M}$  Saccharose mit  $8,2 \pm 0,6 \text{ nmol/min} \cdot \text{mg TG}$  etwas geringer als im Wildtyp (Abbildung 24 B). Die Repression von *ptsS* durch SugR ist demnach, zumindest teilweise, für den Wachstumsphänotyp von *C. glutamicum* FIM mit Saccharose als alleinige Kohlenstoffquelle verantwortlich.



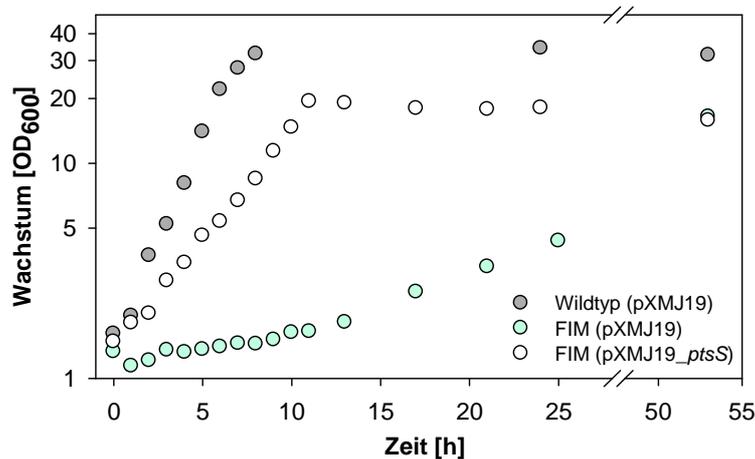
**Abbildung 24.** Wachstum mit Saccharose als Kohlenstoffquelle sowie Aufnahmeraten mit 50  $\mu$ M <sup>14</sup>C-Saccharose in *C. glutamicum* FIM mit und ohne zusätzliche Deletion von *sugR* im Vergleich zum Wildtyp. *C. glutamicum* Wildtyp (○), *C. glutamicum* FIM (◌) und *C. glutamicum* FIM  $\Delta$ sugR (●) wurden in CgC-Medium mit 2% Saccharose kultiviert (A). Für die Messung der Aufnahmeraten mit 50  $\mu$ M Saccharose wurden die Zellen ebenfalls in CgC-Medium mit 2% Saccharose kultiviert und anschließend in CgC-Medium ohne Substrat gewaschen (B).

#### 4.3.7 *in trans*-Expression von *ptsS* im Fructoseexport-Modellstamm

Die signifikant verringerten *ptsS* mRNA-Level in *C. glutamicum*  $\Delta$ *ptsF* sowie *C. glutamicum* FI und FIM ließen den Schluss zu, dass die Expression von *ptsS* in allen drei Mutanten signifikant reduziert ist. Die homologe Überexpression von *ptsS* in *C. glutamicum* FIM führte im Vergleich zum Stamm mit Leerplasmid zu einer Erhöhung der Wachstumsrate bei Wachstum mit Saccharose als Kohlenstoffquelle (Abbildung 25). Die Wachstumsrate von 0,44 h<sup>-1</sup> für den *C. glutamicum* Wildtyp mit Leerplasmid (pXMJ19) wurde durch *C. glutamicum* FIM (pXMJ19\_*ptsS*) mit 0,28  $\pm$  0,04 h<sup>-1</sup> jedoch nicht ganz erreicht. Die Optimierung der Expression sowie die Verwendung alternativer Expressionsvektoren (pEKEx3, pEKEx2) zur homologen Expression von *ptsS* brachte ebenfalls keine höhere Wachstumsrate mit sich (Daten nicht gezeigt).

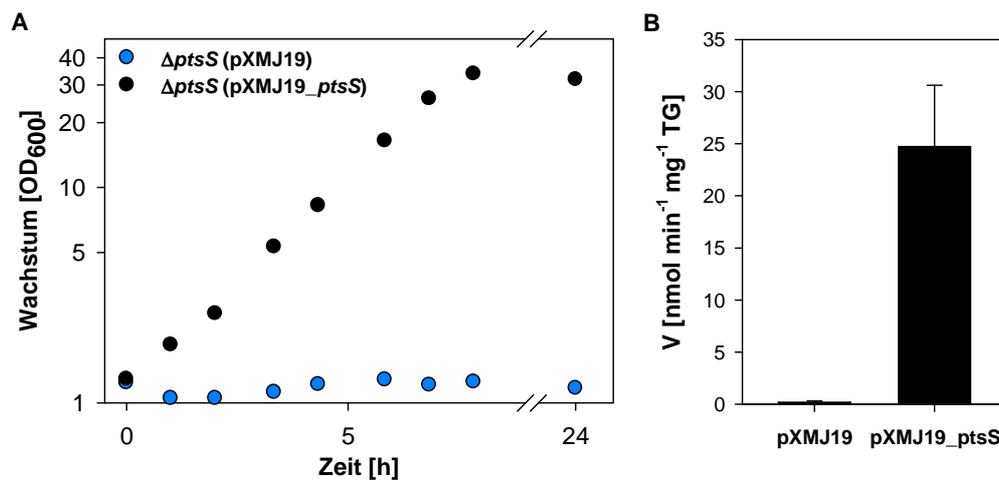
Die Überexpression von *ptsS* in *C. glutamicum*  $\Delta$ *ptsS* zeigt, dass das Expressionslevel, welches durch die Überexpression erreicht wurde, theoretisch für eine mit dem Wildtyp vergleichbare Wachstumsrate ausreichen sollte, da der Stamm *C. glutamicum*  $\Delta$ *ptsS* (pXMJ19\_*ptsS*) bei Wachstum auf Saccharose eine dem Wildtyp ähnliche Wachstumsrate von 0,44  $\pm$  0,02 h<sup>-1</sup> erreichte (Abbildung 26 A). Die Saccharose-aufnahmerate von *C. glutamicum*  $\Delta$ *ptsS* (pXMJ19\_*ptsS*) war ebenfalls vergleichbar mit

der des Wildtyps (Abbildung 4 B und Abbildung 26 B). Der Kontrollstamm *C. glutamicum*  $\Delta ptsS$  mit Leerplasmid (pXMJ19) zeigte keinerlei Aufnahme von Saccharose und konnte Saccharose nicht als Kohlenstoffquelle verwerten (Abbildung 26 A und B).



**Abbildung 25. Wachstum von *C. glutamicum* FIM mit und ohne *ptsS*-Komplementation und Saccharose als Kohlenstoffquelle im Vergleich zum Wildtyp.** Der *C. glutamicum* Wildtyp (○), *C. glutamicum* FIM (pXMJ19) (◐) und *C. glutamicum* FIM (pXMJ19\_ptsS) (◑) wurden in CgC-Medium mit 2% Saccharose kultiviert.

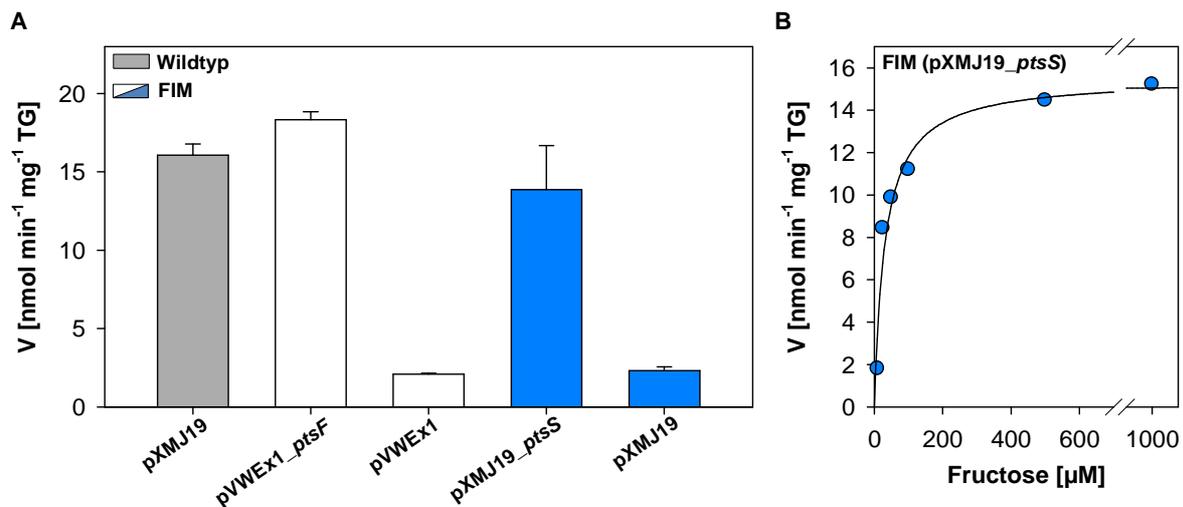
Im Gegensatz zur Überexpression von *ptsS* in *C. glutamicum* FIM ermöglichte die homologe Expression von *ptsF* eine vollständige Komplementation des Wachstumsphänotyps auf Saccharose. Der entsprechende Stamm *C. glutamicum* FIM (pVWEx1\_ptsF) erreichte eine Wachstumsrate von  $0,46 \text{ h}^{-1}$  mit Saccharose als Kohlenstoffquelle (Daten nicht gezeigt). Die homologe Expression von *ptsS* oder *ptsF* in *C. glutamicum* FIM führte demnach in unterschiedlichem Maße zur Verbesserung respektive zur Aufhebung des Wachstumsphänotyps in Gegenwart von Saccharose als Substrat. Zur Bestimmung der Substrataufnahme in den komplementierten Stämmen wurde die Akkumulation von  $^{14}\text{C}$ -markierter Saccharose in den Zellen gemessen. Die Überexpression von *ptsF* bzw. *ptsS* komplementierte die deutlich verringerte Fähigkeit zur Saccharoseaufnahme im Stamm *C. glutamicum* FIM (Abbildung 27 A). *C. glutamicum* FIM (pVWEx1\_ptsF) und *C. glutamicum* FIM (pXMJ19\_ptsS) erreichten mit  $50 \mu\text{M}$  Saccharose Aufnahmeraten von  $18,33 \pm 0,7$  bzw.  $13,9 \pm 2,8 \text{ nmol/min*mg TG}$ , die vergleichbar mit denen des *C. glutamicum* Wildtyps sind ( $16,1 \pm 0,7 \text{ nmol/min*mg TG}$ ). Die Aufnahmeraten in den Kontrollstämmen *C. glutamicum* FIM mit Leerplasmid (pVWEx1 bzw. pXMJ19) waren signifikant geringer ( $2,1 \pm 0,1$  bzw.  $2,8 \pm 0,2 \text{ nmol/min*mg TG}$ ) (Abbildung 27 A).



**Abbildung 26. Wachstum mit Saccharose als Kohlenstoffquelle und Aufnahme mit 50  $\mu\text{M}$  Saccharose von *C. glutamicum*  $\Delta\text{ptsS}$  mit und ohne *ptsS*-Komplementation.** *C. glutamicum*  $\Delta\text{ptsS}$  (pXMJ19) (●) und *C. glutamicum*  $\Delta\text{ptsS}$  (pXMJ19\_ptsS) (●) wurden in CgC-Medium mit 2% Saccharose kultiviert (A). Für die Messung der Aufnahme mit 50  $\mu\text{M}$  Saccharose wurden *C. glutamicum*  $\Delta\text{ptsS}$  (pXMJ19) (links) und *C. glutamicum*  $\Delta\text{ptsS}$  (pXMJ19\_ptsS) (rechts) zunächst in CgC-Medium mit 2% Saccharose kultiviert und anschließend in CgC-Medium ohne Substrat gewaschen (B).

Die Fähigkeit zur Saccharoseaufnahme ist sowohl in *C. glutamicum* FIM (pVWEx1\_ptsF) als auch in *C. glutamicum* FIM (pXMJ19\_ptsS) wiederhergestellt. Die Ermittlung der zugrunde liegenden Kinetik in *C. glutamicum* FIM (pXMJ19) zeigte ein Michaelis-Menten-Verhalten (Abbildung 27 B). Die Halbsättigungskonstante  $K_m$  entspricht der des Wildtyps, die maximale Aufnahme ( $V_{\text{max}}$ ) ist jedoch etwas geringer (vergl. Abbildung 4 A). Die für *C. glutamicum*  $\Delta\text{ptsS}$  (pXMJ19\_ptsS) bestimmte Aufnahme ergab einen Wert von  $24,7 \pm 5,9$  nmol/min\*mg TG und ist damit etwas höher als in *C. glutamicum* FIM (pXMJ19\_ptsS) (Abbildung 26 B).

Das verschlechterte Wachstum von *C. glutamicum* FIM mit Saccharose als Substrat ist auf eine verringerte Expression von *ptsS* sowie eine verringerte Saccharoseaufnahme zurückzuführen. Sowohl durch homologe Expression von *ptsF*, als auch *ptsS*, sowie durch die zusätzliche Deletion von *sugR* in *C. glutamicum* FIM konnte die Aufnahme und damit korrelierend auch die Verwertung von Saccharose signifikant verbessert werden. Im Hinblick auf die Konstruktion eines geeigneten Modellstamms zur Charakterisierung des Fructoseefflux in *C. glutamicum* ist zur Steigerung der Saccharoseaufnahme jedoch einzig die homologe Expression von *ptsS* sinnvoll. Die Deletion eines Masterregulators wie SugR könnte unbekannte regulatorische Effekte mit sich bringen, die auch den Export von Fructose betreffen könnten. Die Expression von *ptsF* stand außer Frage, da dies wieder zu Fructoseaufnahme befähigen würde, welche im Modellstamm jedoch unterbunden werden sollte.



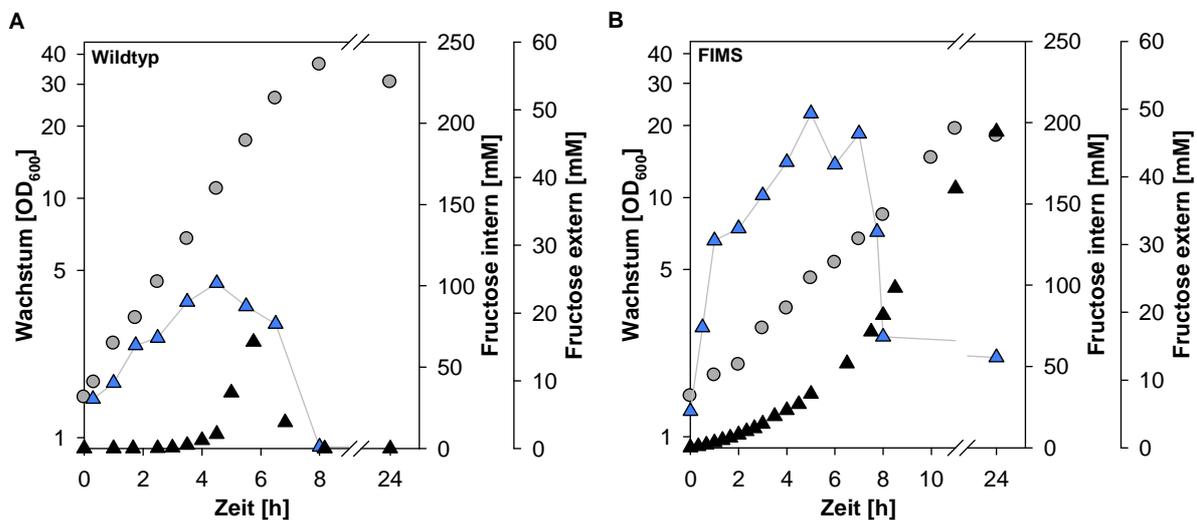
**Abbildung 27. Aufnahmeraten mit 50 μM <sup>14</sup>C-Saccharose in *C. glutamicum* FIM mit und ohne Komplementation mit *ptsF* bzw. *ptsS* sowie Kinetik des Imports von Saccharose mit *ptsS*-Komplementation.** Für die Messung der Aufnahmeraten mit 50 μM Saccharose wurden der *C. glutamicum* Wildtyp (grau), *C. glutamicum* FIM mit (pVWEx1\_ptsF), (pXMJ19\_ptsS) und den Leerplasmiden (pVWEx1) und (pXMJ19) (weiß, blau) in CgC-Medium mit 2% Saccharose kultiviert und anschließend in CgC-Medium ohne Substrat gewaschen (A). Zur Aufnahme einer Kinetik der Saccharoseaufnahme in *C. glutamicum* FIM (pXMJ19\_ptsS) (B) wurden die Zellen identisch behandelt.

Basierend auf den vorhergehenden Ergebnissen wurde ein zur Charakterisierung des Fructoseefflux von *C. glutamicum* optimal zugeschnittener Modellstamm konstruiert. Der in dieser Arbeit verwendete Modellstamm *C. glutamicum* Δ*ptsF* Δ*ptsG* Δ*iolT1* Δ*iolT2* Δ*mtlD* (pXMJ19\_ptsS) bzw. (pEKEx2\_ptsS) wird im Folgenden als *C. glutamicum* FIMS (defizient in Fructoseimport und Mannitoldehydrogenase mit Überexpression von *ptsS*) bezeichnet.

#### 4.3.8 Akkumulation von Fructose im Cytoplasma von Wildtyp und Modellstamm

Während des Wachstums mit Saccharose als Substrat akkumulierte der *C. glutamicum* Wildtyp extrazellulär  $15,3 \pm 2,8$  mM und intrazellulär bis zu 100 mM Fructose (vgl. Abschnitt 4.1.3 und Abbildung 28 A). Nach 3,5 Stunden erreichte die interne Fructosekonzentration einen Wert von 90 mM. Zu diesem Zeitpunkt ist extern etwa 0,5 mM Fructose detektierbar. Nach Erreichen eines Optimums an externer Fructose nach 5,5 Stunden ( $15,3 \pm 2,8$  mM) nimmt die externe Fructosekonzentration im Medium des Wildtyps rasch ab. Dies geht mit einer Abnahme der internen Fructosekonzentration einher (Abbildung 28 A). Nach 8 Stunden Wachstum ist intern keine Fructose mehr zu detektieren (Abbildung 28 A). Im Gegensatz zum Wildtyp akkumulierte der Stamm *C. glutamicum* FIMS nach 30 Minuten intern bereits über 50 mM Fructose und im *steady-state* durchschnittlich etwa 190 mM (Abbildung 28 B). Erst nach Verbrauch der externen Saccharose nimmt intern die Konzentration

an Fructose ab. Das *steady-state*-Level an interner Fructose wird bis zu diesem Zeitpunkt aufrechterhalten (Abbildung 28 B). Dieser Stamm unterscheidet sich von Wildtyp neben der Deletion von *ptsF*, *ptsG*, *iolT1* und *iolT2*, durch die zusätzliche Deletion des Gens der Mannitoldehydrogenase *mtlD* und durch die Überexpression von *ptsS*. Da die Saccharoseaufnahmerate in *C. glutamicum* FIMS vergleichbar zum Wildtyp ist (Abbildung 27 A), ist die Überexpression von *ptsS* als Ursache der erhöhten internen Fructosekonzentration unwahrscheinlich. Die alleinige Deletion von *mtlD* führte in der entsprechenden Mutante *C. glutamicum*  $\Delta mtlD$ , im Vergleich zum Wildtyp, bereits zu einer leichten Erhöhung der intrazellulären Akkumulation von Fructose (Abbildung 19 C). Die Deletion der Fructoseaufnahme-systeme und die Deletion von *mtlD* in der Fructoseaufnahme-defizienten Mutante könnten demnach ein Gründe für die Erhöhung der internen Fructosekonzentration sein.



**Abbildung 28.** Wachstum sowie extra- und intrazelluläre Akkumulation von Fructose des *C. glutamicum* Wildtyps und *C. glutamicum* FIMS. Wachstum (○), externe (▲) und interne Fructosekonzentration (▲) von *C. glutamicum* Wildtyp (A) und *C. glutamicum* FIMS (B) in CgC-Medium mit 2% Saccharose. Dargestellt sind die Mittelwerte der externen und internen Fructosekonzentration des Wildtyps und von *C. glutamicum* FIMS, welche pro Zeitpunkt auf zwei bis fünf unabhängigen Messungen beruhen.

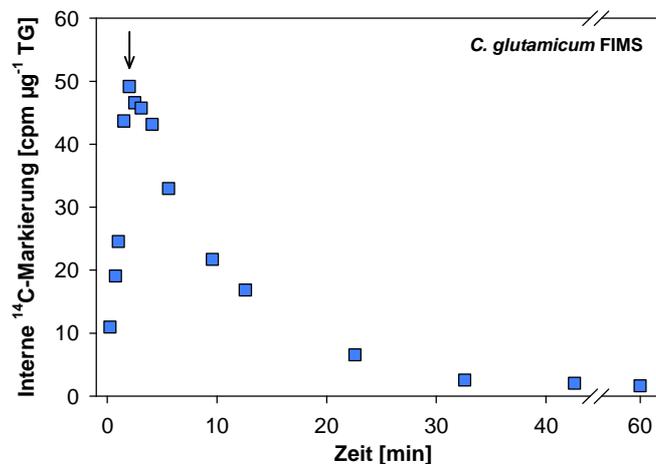
## 4.4 Charakterisierung des Fructoseexports in *C. glutamicum* FIMS

### 4.4.1 Etablierung der radiochemischen Messung des Fructoseefflux

Die physiologische Charakterisierung des Stamms *C. glutamicum* FIMS zeigte, dass die durch Deletion der Fructoseimporter und von *mtlD* herbeigeführte verminderte Wachstumsrate mit Saccharose als Kohlenstoffquelle durch Überexpression von *ptsS* komplementiert werden kann (Abschnitt 4.3.7). Des Weiteren ist dieser Stamm nicht in der Lage, die exportierte Fructose wieder aufzunehmen. Ebenso wenig ist er zur

Reduktion von Fructose zu Mannitol fähig (4.3.4). Mithilfe dieses Stammes, sollte der Export von Fructose in *C. glutamicum* erstmals biochemisch charakterisiert werden.

Mittels *Pulse-Chase*-Experimenten mit  $50 \mu\text{M}$   $^{14}\text{C}$ -Saccharose wurde zunächst die Kinetik des Exports bestimmt. Die Zugabe eines Überschusses an Saccharose nach eineinhalb Minuten führte zur exponentiellen Abnahme der intrazellulären radioaktiven Markierung (Abbildung 29). Im Gegensatz zur Messung mit dem *C. glutamicum* Wildtyp konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei der internen Radioaktivität in *C. glutamicum* FIMS um Fructose handelt (4.2.1).



**Abbildung 29.** *Pulse-Chase*-Messung mit  $50 \mu\text{M}$   $^{14}\text{C}$ -Saccharose in *C. glutamicum* FIMS. Verlauf der zellinternen radioaktiven Markierung mit  $50 \mu\text{M}$  am Fructosemolekül  $^{14}\text{C}$ -markierter Saccharose in *C. glutamicum* FIMS unter Zugabe eines Saccharose-Chase, d.h. einem 100-fachen Überschuss an unmarkierter Saccharose. Der Pfeil markiert die Zugabe des Chase nach 1,5 Minuten.

Zur Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten  $k$  des Fructoseexports in Abhängigkeit der internen radioaktiven Markierung beziehungsweise der internen Fructosekonzentration können zwei verschiedene Methoden zur Auswertung vorgenommen werden. Die Illustration beider Auswertungsmöglichkeiten ist in Abbildung 30 dargestellt. Eine Möglichkeit ist die direkte Ermittlung der Exportraten anhand der erhaltenen Messpunkte. Die Berechnung der Steigung einer Vielzahl an Kombinationen zweier Messpunkte ermöglichte die Bestimmung der Exportrate in Abhängigkeit der internen radioaktiven Markierung. Durch das Legen einer Ausgleichsgeraden konnte die Steigung, das heißt die Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung  $k$ , abgelesen werden (Abbildung 30 B). In diesem Experiment wurde  $k$  mit  $0,1095 \text{ min}^{-1}$  bestimmt. Der Regressionskoeffizient lag mit dieser Auswertungsmethode bei  $0,8534$ . Die andere Möglichkeit ist das Fitting der exponentiellen Abnahme an intrazellulärer radioaktiver Markierung mittels SigmaPlot<sup>®</sup> 10.0 (Systat Software, Inc. 2006) und die Bestimmung der Exportraten zu jedem beliebigen

Zeitpunkt  $x$  (Abbildung 30 A). Mittels einer Regressionsanalyse wurde die Abnahme der internen spezifischen Radioaktivität dieses Experiments mit einem Regressionskoeffizienten von  $R = 0,9981$  der exponentiellen Funktion

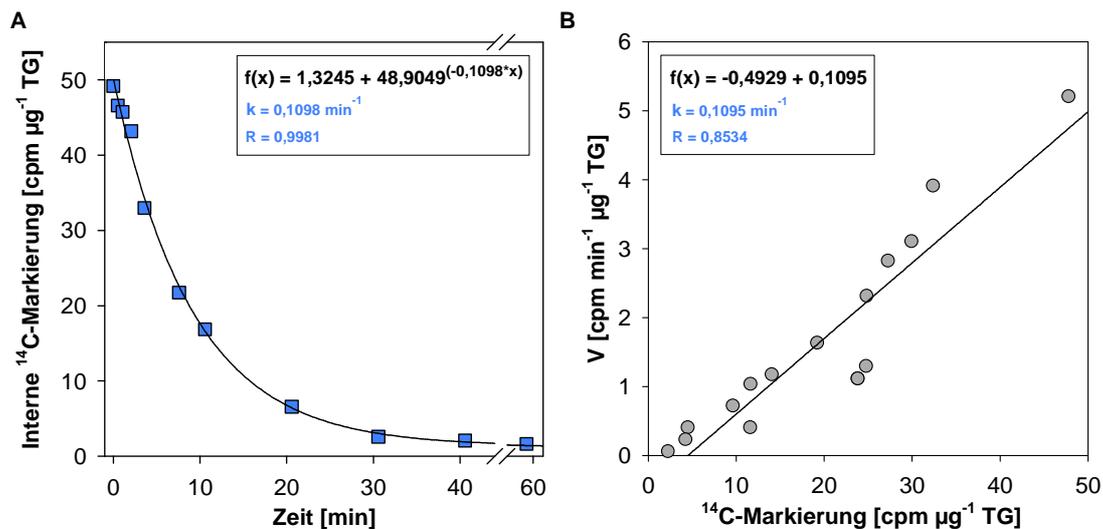
$$f(x) = y_0 + a * e^{(-b*x)} \quad (1)$$

zugeordnet. Durch Fitting der exponentiellen Abnahme an intrazellulären radioaktiven Markierung mittels SigmaPlot® 10.0 (Systat Software, Inc. 2006) konnten die Variablen der exponentiellen Funktion bestimmt werden. Die Berechnung des Differentialquotienten zum Zeitpunkt  $x$  bot außerdem die Möglichkeit, die momentanen Änderungsrate an jedem beliebigen Zeitpunkt zu berechnen. Die Ableitung entspricht der Exportrate der internen  $^{14}\text{C}$ -Markierung in Abhängigkeit der internen radioaktiven Markierung. Die daraus resultierende Gerade unterlag der linearen Funktion mit der Gleichung

$$y = mx + b \quad (2).$$

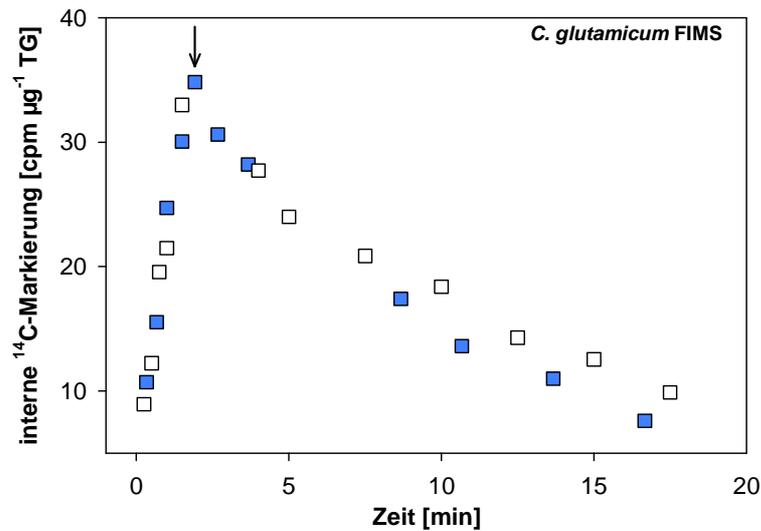
Bei einer Reaktion erster Ordnung ist die zeitliche Konzentrationsänderung, das heißt die Exportrate, direkt abhängig von der intrazellulären  $^{14}\text{C}$ -Markierung und steigt somit proportional zur Menge der internen radioaktiven Markierung an. Die Steigung  $m$  der Geraden (Formel 2) entspricht der Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung  $k$  [ $\text{min}^{-1}$ ]. Mit dieser Auswertungsmöglichkeit wurde  $k$  in diesem Experiment mit  $0,1098 \text{ min}^{-1}$  bestimmt (Abbildung 30 A).

Die Übereinstimmung der Ergebnisse beider Auswertungsmethoden bestätigt die Zulässigkeit der Auswertung mithilfe eines Fittings der Abnahme der radioaktiven Markierung auf Basis von Formel (1). Diese zweite Methode eignet sich besser, um möglicher Ausreißer zu integrieren (Abbildung 30 A). Zur Auswertung der folgenden *Pulse-Chase*-Experimente wurde, aufgrund des allgemein höheren Regressionskoeffizienten, ein auf Formel (1) basierendes Fitting durch SigmaPlot® 10.0 (Systat Software, Inc. 2006) der ersten Methode vorgezogen.



**Abbildung 30. Illustration der Auswertungsmöglichkeiten des Fructoseexports bestimmt durch Pulse-Chase-Messung mit  $50 \mu\text{M}$  am Fructosemolekül  $^{14}\text{C}$ -markierter Saccharose in *C. glutamicum* FIMS.** Abnahme der zellinternen radioaktiven Markierung über die Zeit unter Zugabe eines 100-fachen Überschusses an unmarkierter Saccharose. Das Fitting der exponentiellen Abnahme nach Formel (1) ergibt:  $f(x) = 0,1157 + 5,3213 \cdot (-0,1098^x)$  mit einer Geschwindigkeitskonstanten  $k$  von  $0,1098 \text{ min}^{-1}$  und einem Regressionskoeffizienten  $R$  von  $0,9981$  (A). Die direkte Berechnung der Fructoseexportraten  $[\text{cpm}/\text{min} \cdot \mu\text{g TG}]$  in Abhängigkeit der internen  $^{14}\text{C}$ -Markierung anhand der Messpunkte aus A. Das Legen einer Ausgleichsgeraden der Funktion  $f(x) = -0,431 + 0,1095x$  ergibt  $k = 0,1095 \text{ min}^{-1}$  mit  $R = 0,8534$  (B).

Um die Exportmessung direkt mit den Messungen des *C. glutamicum* Wildtyps vergleichen zu können, wurde das Pulse-Chase-Experiment mit einem Saccharose-Chase und ebenso wie mit zusätzlicher potentieller Maskierung des Reimports von Fructose durchgeführt. Sowohl die Zugabe Saccharose-Chase als auch das zusätzliche Vorlegen von  $5 \text{ mM}$  unmarkierter Fructose zu Messungsbeginn führte zu keiner Veränderung der Kinetik (Abbildung 31). Die Aufnahme vieler, unabhängiger Exportkurven zeigte, dass sich die Pulse-Chase-Messung mit  $50 \mu\text{M}$  Saccharose in *C. glutamicum* FIMS sehr gut reproduzieren ließ und wenig fehlerbehaftet war. Zudem war die kinetische Auflösung der Experimente mit radioaktiv markiertem Substrat ein Vorteil gegenüber der Bestimmung mittels Silikonölzentrifugation. Da zu einem bestimmten Zeitpunkt ein Überschuss an unmarkierter Saccharose hinzugegeben wird, kann die interne Radioaktivität jedoch nicht ohne weiteres in eine Fructosekonzentration  $\mu\text{M}$  umgerechnet werden. Es blieb daher die Frage offen, ob die Messung der Fructoseexportkinetik mit am Fructosemolekül  $^{14}\text{C}$ -markierter Saccharose auch ohne Zugabe eines Überschusses an unmarkierter Saccharose möglich ist.



**Abbildung 31. Pulse-Chase-Messung mit 50  $\mu\text{M}$  Saccharose in *C. glutamicum* FIMS unter Zugabe eines Überschusses an Saccharose bzw. Fructose und Saccharose.** Verlauf der zellinternen radioaktiven Markierung mit 50  $\mu\text{M}$  am Fructosemolekül  $^{14}\text{C}$ -markierter Saccharose in *C. glutamicum*  $\Delta\text{mtlD}$  unter Zugabe eines Saccharose-Chase, ein 100-facher Überschuss an Saccharose, (■) und zusätzliche Maskierung der potentiellen Fructosewiederaufnahme mit 5 mM unmarkierter Fructose (□). Der Pfeil markiert die Zugabe der jeweiligen Überschüsse an nach 1,5 Minuten.

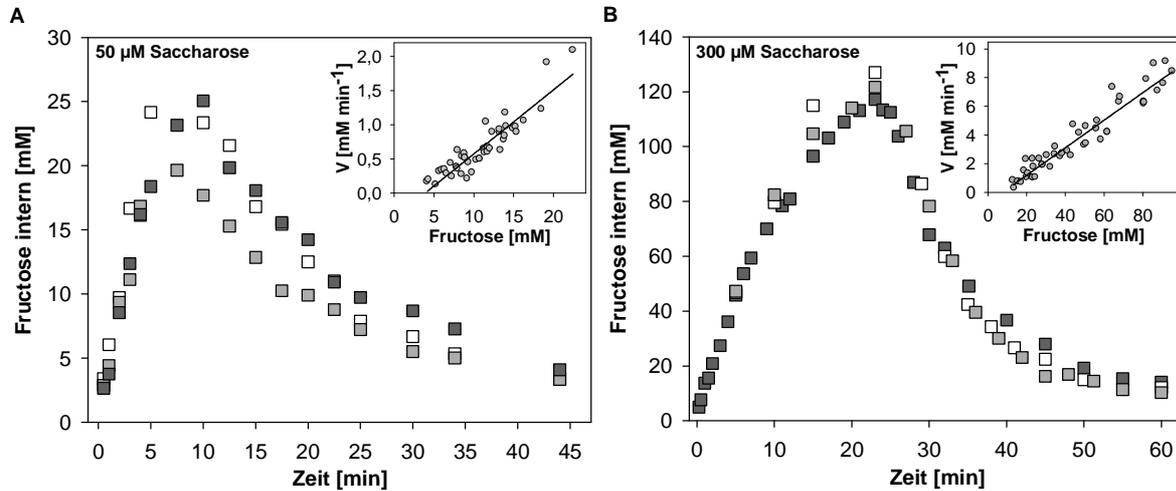
Abbildung 32 zeigt beispielhaft jeweils drei Saccharoseaufnahme-Experimente zur Messung des Fructoseefflux mit 50 bzw. 300  $\mu\text{M}$  spezifisch am Fructosemolekül  $^{14}\text{C}$ -markierter Saccharose ohne Zugabe eines Saccharose-Chase oder eines Überschusses an unmarkierter Fructose. In den folgenden Versuchen zum Fructoseefflux wurde unter Verwendung der Gleichung

$$C_{\text{Fru}} = \frac{n_{\text{Fru}}}{ZTM * F_{IV}} \quad (3)$$

$C_{\text{Fru}}$  = intrazelluläre Konzentration an Fructose [mM],  $n_{\text{Fru}}$  = Stoffmenge an  $^{14}\text{C}$ -markiertem Fructosemolekül [nmol],  $ZTM$  = Zelltrockenmasse [mg],  $F_{IV}$  = Innenvolumenumrechnungsfaktor [ $\mu\text{l mg}^{-1}$ ]

die interne spezifische Radioaktivität in die interne Fructosekonzentration umgerechnet. Um die intrazelluläre Fructosekonzentration berechnen zu können, muss das interne Zellvolumen der Bakterien bekannt sein. Für *C. glutamicum* beträgt der Umrechnungsfaktor des internen Zellvolumens 1,6  $\mu\text{l/mg}$  TG (Botzenhardt, 2004). Nach Zugabe von 50 bzw. 300  $\mu\text{M}$  Saccharose zu Messungsbeginn stieg die intrazelluläre Fructosekonzentration zunächst an. Die Kurve flachte über die Zeit immer mehr ab, bis nach 7,5 bis 10 Minuten (50  $\mu\text{M}$ ) bzw. 20 bis 22 Minuten (300  $\mu\text{M}$ ) eine Abnahme der zellinternen Fructose zu beobachten war (Abbildung 32). Wie auch bei den Pulse-Chase-Messungen mit Zugabe eines Saccharose-Chase ließ sich die Abnahme der internen Fructosekonzentration in allen Experimenten einer

exponentiellen Funktion (Formel 1) zuordnen (Abbildung 33 A und B). Dabei lagen die ermittelnden Regressionskoeffizienten  $R$  für die Messungen mit 50 und 300  $\mu\text{M}$  Saccharose bei  $0,996 \pm 0,003$  bzw.  $0,996 \pm 0,004$ .



**Abbildung 32. Aufnahmemessung mit 50  $\mu\text{M}$  und 300  $\mu\text{M}$   $^{14}\text{C}$ -Saccharose in *C. glutamicum* FIMS.** Der Verlauf der internen  $^{14}\text{C}$ -Fructose wurde in *C. glutamicum* FIMS jeweils drei Mal mit Einsatz von 50  $\mu\text{M}$  (A) und 300  $\mu\text{M}$  (B)  $^{14}\text{C}$ -markierter Saccharose über die Zeit verfolgt. Die Zellen wurden zuvor auf CgC-Medium mit 2% Saccharose kultiviert. Die anhand der Messung berechneten Exportraten sind jeweils in den kleinen Diagrammen dargestellt.

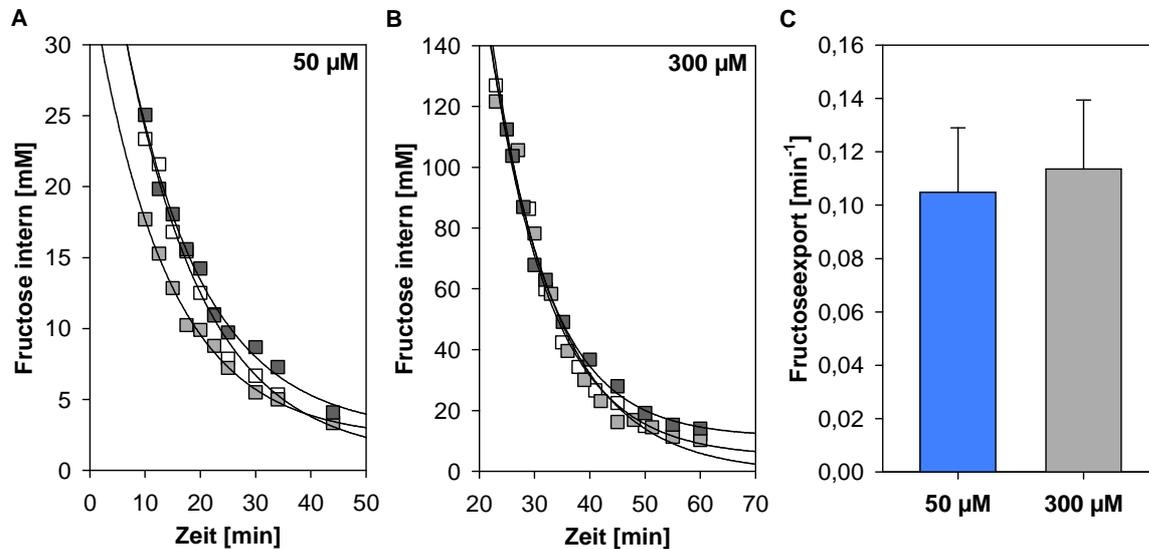
Durch die Berechnung der Ableitung zum Zeitpunkt  $x$  ließ sich auch hier die Exportgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Fructosekonzentration berechnen. Wie zuvor ergab sich auch hier eine lineare Funktion (Formel 2) (Abbildung 32 A und B, kleines Diagramm). Alternativ konnte die Steigung ohne Kurvenfitting jeweils zwischen zwei experimentell ermittelten Werten direkt berechnet werden. Eine lineare Funktion ließ sich auch hier mit einem hohen Regressionskoeffizienten zuordnen. Die lineare Abhängigkeit der Effluxgeschwindigkeit von der Substratkonzentration über einen weiten Bereich indiziert ein passives Transportverhalten. Ein Carrier-vermittelter Transport mit geringer Affinität zu Fructose konnte nicht ausgeschlossen, der  $K_m$  aber aus messtechnischen Gründen radiochemisch nicht bestimmt werden. Im Folgenden wird daher die Steigung der ermittelten Geraden, das heißt die Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung mit  $k = \text{min}^{-1}$ , auf Basis der Formel

$$V = k * C \quad (4)$$

$V$  = Exportrate,  $k$  = Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung,  $C$  = Fructosekonzentration

als Vergleichsgröße verwendet. Zur besseren Vergleichbarkeit der durchgeführten *Pulse-Chase*- und Saccharoseaufnahme-Versuche mit am Fructosemolekül

$^{14}\text{C}$ -markierter Saccharose zur Messung des Fructoseefflux wurde jede einzelne Exportkurve wie beschrieben einer exponentiellen Funktion (Formel 1) zugeordnet.



**Abbildung 33. Kurvenfitting der Aufnahmemessungen in *C. glutamicum* FIMS mit 50 µM und 300 µM  $^{14}\text{C}$ -Saccharose und die Geschwindigkeitskonstanten  $k$  des Fructoseexports.** Dargestellt ist die interne Fructosekonzentration [mM] in Abhängigkeit der Zeit (weiße und graue Quadrate) für jeweils drei beispielhafte Messungen mit 50 µM (A) und 300 µM (B) sowie die berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen der Geschwindigkeitskonstanten  $k$  des Fructoseexports [ $\text{min}^{-1}$ ] aus jeweils 17 unabhängigen Messungen (C).

Für die Messung mit 50 und 300 µM Saccharose (jeweils  $n = 17$ ) ergab sich ein Fructoseefflux mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeitskonstanten  $k$  von  $0,105 \pm 0,024 \text{ min}^{-1}$  bzw.  $0,114 \pm 0,026 \text{ min}^{-1}$ . Die gemittelte Geschwindigkeitskonstante  $k$  aus allen Messungen, bestimmt mittels Kurvenfitting jeder Messung ( $n = 34$ ), mit 50 oder 300 µM Saccharose ergab  $0,109 \pm 0,025 \text{ min}^{-1}$ .

#### 4.4.2 Erstellung eines kinetischen Modells zum Fructoseexport

Bei der Optimierung der radiochemischen Exportmessung fiel auf, dass sich der Kurvenverlauf trotz gleicher Konzentration an Saccharose zum Teil deutlich unterschied (Abbildung 35). Dabei wichen nicht nur die maximal erreichten Konzentrationen an Fructose voneinander ab, sondern auch die Charakteristik des Anstiegs der Fructosekonzentration sowie die Deutlichkeit des Übergangs von Zuwachs und Abnahme der Menge an interner Fructose. Der Export von Fructose unterlag dabei immer einer exponentiellen Abnahme (Formel 1) mit identischer Transportkinetik.

Die Auswertung aller durchgeführten Effluxversuche ergab nicht nur eine Abhängigkeit des Kurvenverlaufs von der eingesetzten Saccharosekonzentration (50 µM

bzw. 300  $\mu\text{M}$ ), sondern auch von der Saccharoseaufnahme- und der verwendeten Zelldichte. Mithilfe eines anhand dieser Daten erstellten kinetischen Modells lässt sich der Verlauf der Kurve zuverlässig vorhersagen (Abbildung 34). Unter Annahme bekannter Kenngrößen (Zellvolumen,  $V_{\max}$  und  $K_m$  für Saccharose und Exportgeschwindigkeit von Fructose) sowie sich verändernden experimentellen Versuchsparametern (externe Saccharosekonzentration und Zelldichte) (Abbildung 34 A) ließ sich der Verlauf der internen und externen Konzentration an Fructose sowie der externen Saccharosekonzentration modellieren.

Zur Ableitung der externen Konzentration an Saccharose wurde zum Zeitpunkt  $t_n$  mit Hilfe der experimentell ermittelten  $V_{\max}$ - und  $K_m$ -Werte zunächst die Saccharoseaufnahme- und Exportgeschwindigkeit durch

$$V_{up(S)} = \frac{(V_{\max} * C_{ex(S)})}{(K_m + C_{ex(S)})} \quad (5)$$

berechnet [ $\mu\text{M min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{TG}$ ]. Um die externe Saccharosekonzentration kalkulieren zu können, muss zunächst die von den Zellen aufgenommene Saccharose  $Suc_{im}$  [ $\mu\text{M}$ ] zum Zeitpunkt  $t_n$  durch Einsetzen der Saccharoseaufnahme- und Exportgeschwindigkeit  $V_{up(S)}$  und der Zellkonzentration  $C_{Zellen}$  [ $\text{g/l}$ ] mit

$$Suc_{im} \text{ (II)} = (V_{up(S)} * \Delta t) * C_{Zellen} \quad (6)$$

berechnet werden. Die externe Saccharosekonzentration  $C_{ex(S)}$  [ $\mu\text{M}$ ] zum Zeitpunkt  $t_n$  ergibt sich dann aus der Differenz von  $C_{ex(S)}$  [ $\mu\text{M}$ ] zum Zeitpunkt  $t_{n-1}$  und der von den Zellen aufgenommenen Menge an Saccharose  $Suc_{im}$  [ $\mu\text{M}$ ] zum Zeitpunkt  $t_n$  mit der Gleichung

$$C_{ex(S)(n)} = C_{ex(S)(t_{n-1})} - Suc_{im} \text{ (II)}. \quad (7)$$

Für die Kalkulation der internen und externen Fructosekonzentration wird für den Fructoseefflux eine Reaktion erster Ordnung vorausgesetzt (vgl. Abschnitt 4.4.1, Formel 4). Zunächst wird die Fructoseeffluxgeschwindigkeit  $V_{ex(F)}$  [ $\mu\text{M min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{TG}$ ] zum Zeitpunkt  $t_n$  durch Multiplikation der Geschwindigkeitskonstanten  $k$  des Fructoseefflux mit der internen Fructosekonzentration  $C_{in(F)}$  anhand der Gleichung

$$V_{ex(F)} = k * C_{in(F)} \quad (8)$$

ermittelt. Zum Zeitpunkt  $t_0$  befindet sich noch keine Fructose in der Zelle. Um die interne Konzentration an Fructose  $C_{in(F)}$  zum Zeitpunkt  $t_n$  bestimmen zu können, muss zuvor die aufgenommene Menge an Saccharose [ $\mu\text{M g}^{-1} \text{TG}$ ] (Formel 9) und die

exportierte Menge an Fructose [ $\mu\text{M g}^{-1} \text{ TG}$ ] (Formel 10) zwischen zwei Zeitpunkten ( $\Delta t$ ) mit

$$Suc_{im} (I) = (V_{up(S)} * \Delta t) \quad (9)$$

und

$$Fru_{exp} (I) = (V_{ex(F)} * \Delta t) \quad (10)$$

berechnet werden. Durch Einsetzen der Zellkonzentration  $C_{Zellen}$  [g/l] lässt sich unter Verwendung der Gleichung

$$C_{in(F)} = \frac{(C_{in(F)}(t_{n-1}) + Suc_{im} (I) - Fru_{exp} (I))}{C_{Zellen}} \quad (11)$$

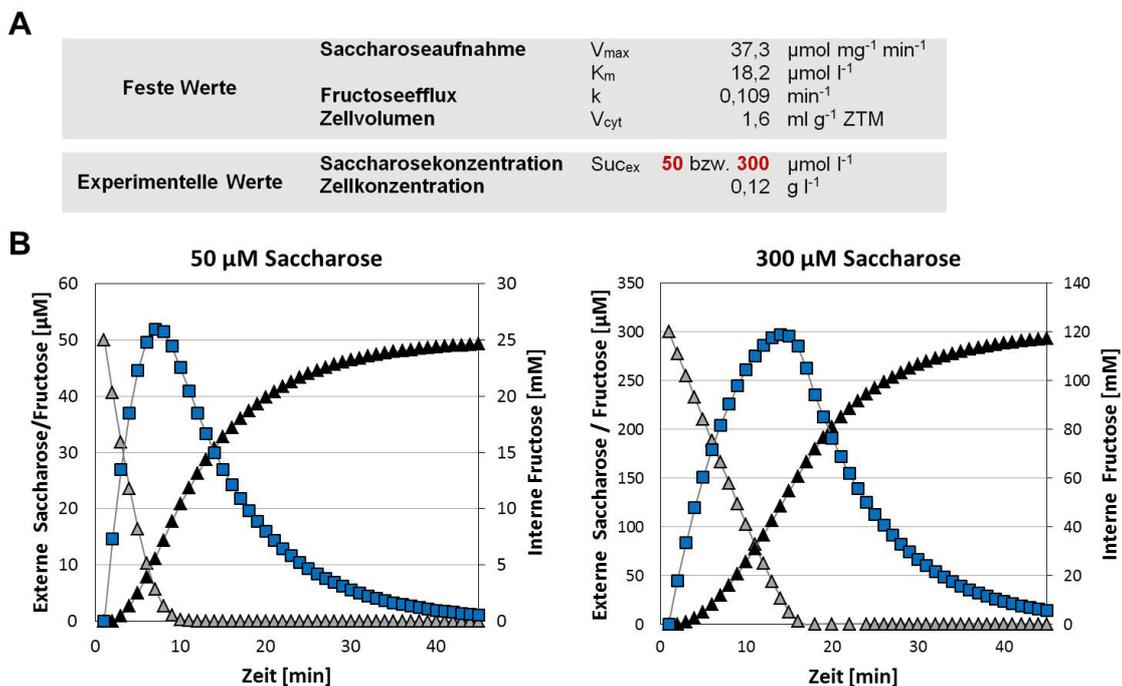
die interne Fructosekonzentration  $C_{in(F)}$  [mM] ermitteln. Die externe Konzentration an Fructose  $C_{ex(F)}$  [ $\mu\text{M}$ ] zum Zeitpunkt  $t_n$  ergibt sich aus der Summe an exportierter Fructose  $Fru_{exp}$  [ $\mu\text{M}$ ] (Formel 12) und der externen Fructosekonzentration zum Zeitpunkt  $t_{n-1}$ , bestimmt durch

$$Fru_{exp} (II) = (V_{ex(F)} * \Delta t) * C_Z \quad (12)$$

und

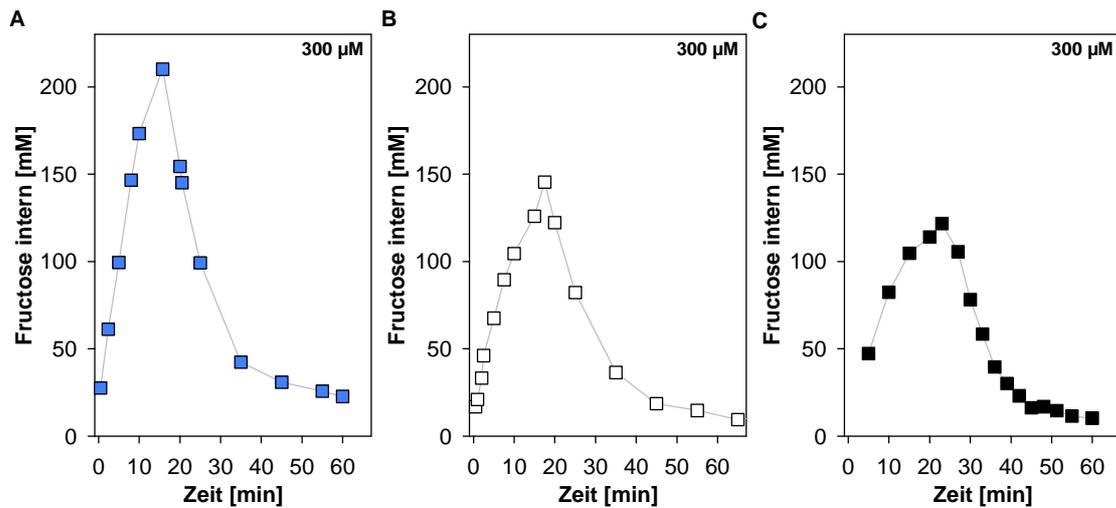
$$C_{ex(F)} = C_{ex(F)}(t_{n-1}) + Fru_{exp} (II). \quad (13)$$

Die Berechnung der externen Saccharose- und Fructosekonzentration sowie der internen Konzentration an Fructose zu einer ausreichenden Anzahl an Zeitpunkten ergibt sich ein Kurvenverlauf, welcher einen direkten Vergleich mit den experimentell ermittelten Daten ermöglicht. In Abbildung 34 B ist beispielhaft der Kurvenverlauf in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration an Saccharose gezeigt. Die alleinige Änderung der Konzentration an eingesetzter Saccharose von  $50 \mu\text{M}$  auf  $300 \mu\text{M}$  führt zu einer Abflachung des Kurvenverlaufs der internen Fructosekonzentration und einer Erhöhung der maximal erreichten internen Konzentration an Fructose.



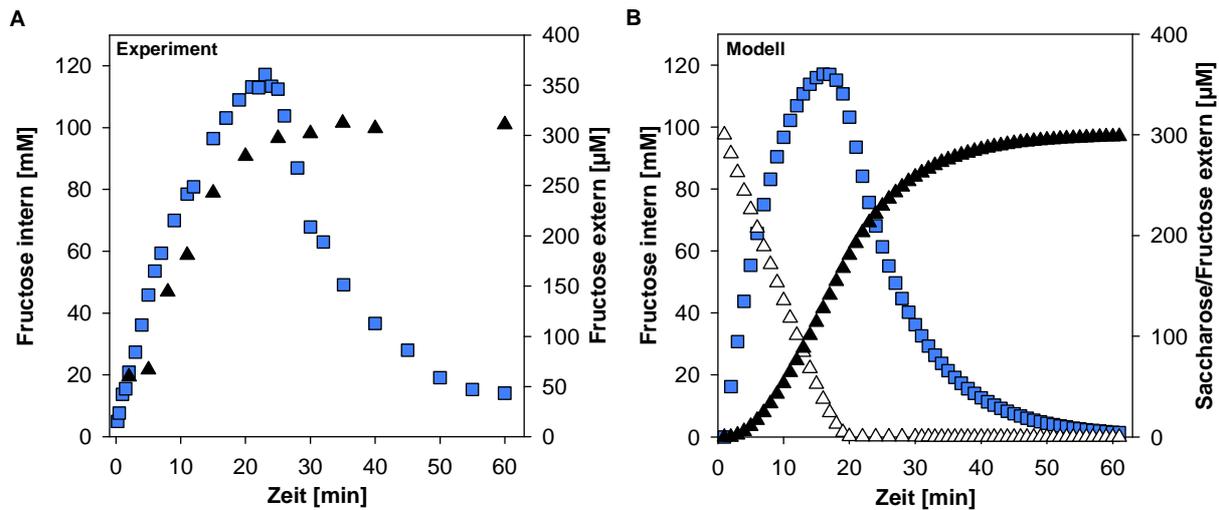
**Abbildung 34. Modellierung der Auswirkung der Saccharosekonzentration auf den Kurvenverlauf der internen Fructosekonzentration für *C. glutamicum* FIMS.** Die anhand des erstellten kinetischen Modells berechneten Werte beruhen auf Annahme einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  (A) und 300  $\mu\text{M}$  (B) Saccharose bei ansonsten konstanten Parametern. Dargestellt ist die Konzentration an externer Saccharose ( $\Delta$ ), externer Fructose ( $\blacktriangle$ ) [mM] und interner Fructose ( $\blacksquare$ ) [mM].

Generell ließ sich aus dem Modell ableiten, dass der Kurvenverlauf ein umso spitzeres Optimum zeigt, je höher die Saccharoseaufnahme ( $V_{max}$ ) und die Zelldichte sind. Je schneller die externe Saccharose in die Zellen gelangt, desto steiler ist der Anstieg der internen Fructose und desto höher ist die maximale interne Fructosekonzentration. Bei Einsatz von 300  $\mu\text{M}$  Saccharose ist demnach ein ausgeprägtes Optimum einzig mit Einsatz extrem hoher Zelldichten erreichbar, da  $V_{max}$  begrenzt ist. Ist die eingesetzte Zelldichte bei ähnlicher Aufnahme rate geringer, flacht der Kurvenverlauf ab, jedoch bleibt die maximale Konzentration an Fructose in etwa gleich. Die durch das kinetische Modell ermittelten Daten konnten in realen Saccharoseaufnahme-Experimenten zur Messung des Fructoseefflux bestätigt werden (Abbildung 35 B und C). Bei konstanter Zelldichte, aber höherer Aufnahme rate ist die maximale Fructosekonzentration höher, wobei der spitzere Kurvenverlauf bestehen bleibt. Auch diese Modellierung des internen Konzentrationverlaufs der Fructose konnte mit Hilfe von realen Experimenten mit spezifisch am Fructosemolekül  $^{14}\text{C}$ -markierter Saccharose belegt werden (Abbildung 35 A und B).



**Abbildung 35. Aufnahmemessung mit 300 µM Saccharose zur Validierung des kinetischen Modells zum Fructoseexport in *C. glutamicum* FIMS.** Dargestellt ist die Änderung des Kurvenverlaufs in Abhängigkeit der Saccharoseaufnahme- und der eingesetzten Zelldichte: Hohe Saccharoseaufnahme- und hohe Zelldichte (A), geringe Saccharoseaufnahme- und hohe Zelldichte (B) sowie geringe Saccharoseaufnahme- und geringe Zelldichte (C).

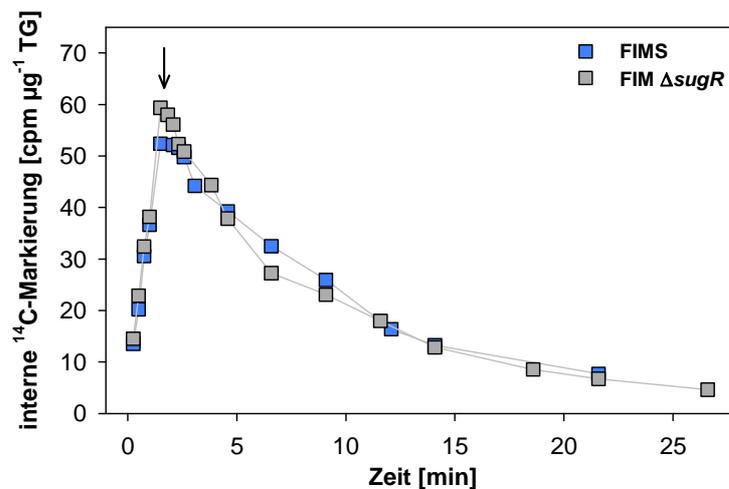
Die Anwendung des kinetischen Modells zur Modellierung der Versuchscharakteristika unterstützte die Deutung und somit die Auswertung der Kurvenverläufe. Mittels des kinetischen Modells konnte nicht nur Charakteristik der Kurvenverläufe zur Fructosekonzentration vorhergesagt werden, sondern auch der Efflux von Fructose ins externe Medium. Der Vergleich von interner und externer Fructose des experimentellen Kurvenverlaufs wies eine große Ähnlichkeit mit dem modellierten Kurvenverlauf auf (Beispielhaft dargestellt in Abbildung 36). Die Annahme, dass der Fructoseefflux auf eine Reaktion erster Ordnung zurückzuführen ist (vgl. Formel 8), wäre demnach plausibel. Voraussetzung für die Modellierung ist die Kenntnis über die eingesetzte Saccharosekonzentration, sowie die Aufnahme- und die experimentell ermittelte Geschwindigkeitskonstante  $k$  des Fructoseefflux und die eingesetzte Zellkonzentration. Übereinstimmend mit dem Modell nahm die Konzentration an externer Fructose langsam zu und erreichte nach etwa 35 Minuten ein Optimum bei 300 µM (Abbildung 36 A). Die Konzentration von 300 µM an akkumulierter Fructose entspricht exakt der eingesetzten Menge an Saccharose. Die zu Beginn der Messung eingesetzte Saccharose wurde folglich vollständig von den Zellen aufgenommen, phosphoryliert, zu Glucose-6-phosphat und Fructose hydrolysiert und das Fructosemolekül schließlich komplett exportiert. Das kinetische Modell konnte somit validiert werden.



**Abbildung 36. Validierung der vorhergesagten Bilanzierung der Aufnahmemessung mit 300 µM  $^{14}\text{C}$ -Saccharose anhand des kinetischen Modells zum Fructoseexport von *C. glutamicum* FIMS.** Dargestellt sind ein realer Saccharoseaufnahme-Versuch zur Messung des Fructoseefflux (A) und die durch das Modell berechneten Werte auf Basis der Versuchsparameter (B) mit interner Fructosekonzentration (■), externer Fructosekonzentration (▲) und die Abnahme der externen Saccharosekonzentration (△).

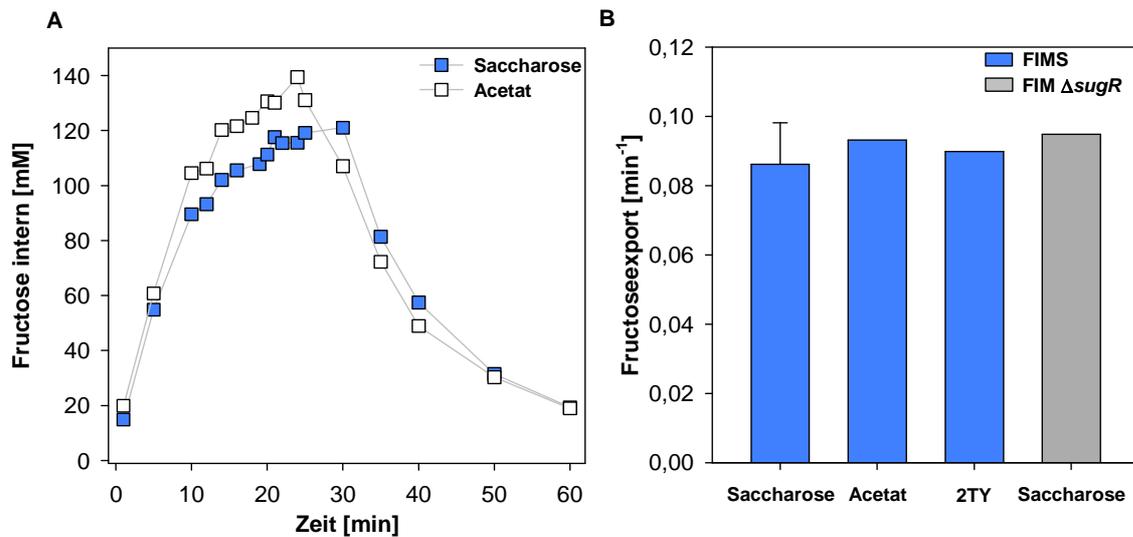
#### 4.4.3 Regulation des Fructoseexports

Der Kohlenstoffmetabolismus unterliegt einem komplexen Regulationsnetzwerk. So wird z.B. die Expression des Gens *ptsS*, welches für  $\text{EII}_{\text{Suc}}$  codiert, mittels des globalen Repressors SugR reguliert. *Pulse-Chase*-Versuche mit *C. glutamicum* FIM  $\Delta\text{sugR}$  zeigten, dass der Export von Fructose bei Wachstum mit Saccharose als alleiniger Kohlenstoffquelle nicht über den Regulator SugR reguliert zu sein scheint (Abbildung 37). Die Geschwindigkeitskonstante  $k$  des Fructoseexports in *C. glutamicum* FIM  $\Delta\text{sugR}$  ist mit  $0,095 \text{ min}^{-1}$  vergleichbar zu der in *C. glutamicum* FIMS ermittelten Geschwindigkeitskonstanten  $k$  von  $0,109 \pm 0,025 \text{ min}^{-1}$  (Abbildung 37). Die Deletion von SugR hat somit keinen Einfluss auf die Exportfähigkeit von Fructose.



**Abbildung 37. Pulse-Chase-Messung in *C. glutamicum* FIMS und *C. glutamicum* FIM  $\Delta$ sugR mit 300  $\mu$ M Saccharose bei Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen.** Der Verlauf der internen  $^{14}$ C-Fructose wurde mit Zugabe von 50  $\mu$ M  $^{14}$ C-Saccharose in *C. glutamicum* FIMS und *C. glutamicum* FIM  $\Delta$ sugR über die Zeit verfolgt. Die Zellen wurden zuvor auf CgC-Medium mit 2% Saccharose kultiviert.

Um die Regulation durch andere Regulatoren ausschließen zu können, wurde der Exportversuch unter Verwendung verschiedener Kohlenstoffquellen zur Kultivierung der Zellen durchgeführt. Dazu wurde *C. glutamicum* FIMS mit Acetat und in Vollmedium (2TY) kultiviert. Im Vergleich zum Fructoseexport bei Wachstum mit Saccharose führte die Kultivierung mit einer abweichenden Kohlenstoffquelle dabei zu keiner Veränderung der Geschwindigkeitskonstanten  $k$  des Fructoseexports (Abbildung 38). Die Exportgeschwindigkeit von Fructose, d.h. die Geschwindigkeitskonstante  $k$  des Fructoseefflux, ist demnach unabhängig von dem für die Kultivierung der Zellen verwendeten Substrat. Die Kurvenverläufe der internen Fructosekonzentration unterschieden sich zwar aufgrund abweichender  $V_{\max}$ -Werte der Saccharoseaufnahme und unterschiedlicher Zelldichten, dennoch waren die Geschwindigkeitskonstanten  $k$  des Fructoseefflux unter allen getesteten Bedingungen gleich (Abbildung 38 B). Der Export von Fructose unterliegt somit keiner transkriptionellen oder translationellen Regulation und scheint nicht mit in das regulatorische Netzwerk des Kohlenstoffmetabolismus eingebunden zu sein.



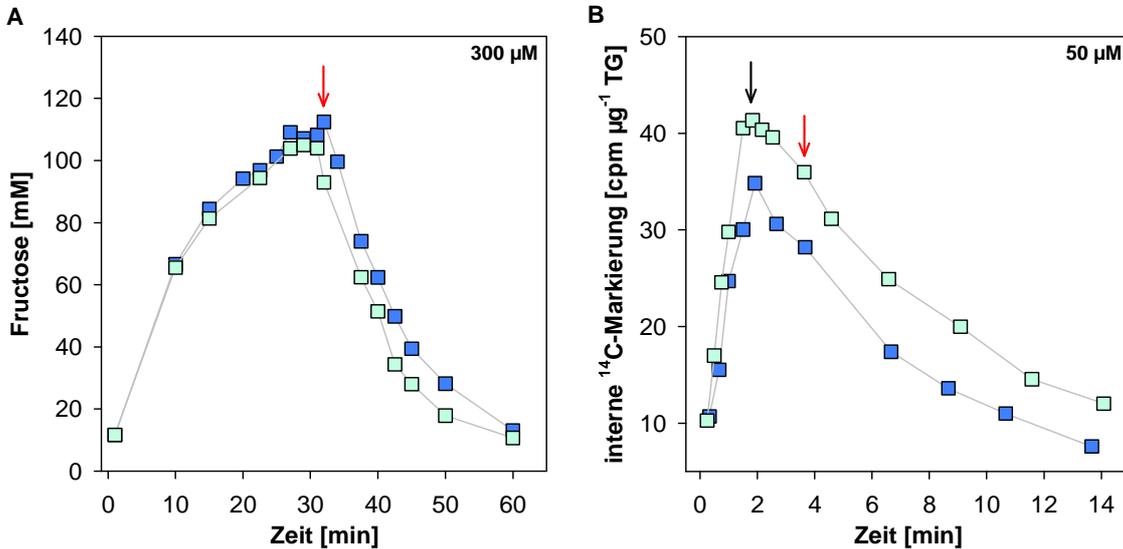
**Abbildung 38. Aufnahmemessung mit 300  $\mu\text{M}$   $^{14}\text{C}$ -Saccharose in *C. glutamicum* FIMS und Fructoseexport von *C. glutamicum* FIMS und *C. glutamicum* FIM  $\Delta\text{sugR}$  unter verschiedenen Bedingungen.** Der Verlauf der internen  $^{14}\text{C}$ -Fructose wurde mit Zugabe von 300  $\mu\text{M}$   $^{14}\text{C}$ -Saccharose in *C. glutamicum* FIMS nach Kultivierung mit CgC-Medium plus 2% Saccharose (■) und 2% Natrium-Acetat (□) verfolgt (A). Die Geschwindigkeitskonstante  $k$  des Fructoseexports [ $\text{min}^{-1}$ ] ist für *C. glutamicum* FIMS nach Kultivierung in CgC-Minimalmedium mit 2% Saccharose, 2% Natrium-Acetat und 2TY-Vollmedium (blau) sowie für *C. glutamicum* FIM  $\Delta\text{sugR}$  mit 2% Saccharose (grau) dargestellt (B).

#### 4.4.4 Energieabhängigkeit des Fructoseexports

Die zuvor gezeigten Ergebnisse zeigten eine lineare Abhängigkeit der Effluxgeschwindigkeit von Fructose zur internen Fructosekonzentration (Abschnitt 4.4.1). Die Möglichkeit des Transports mittels primär- oder sekundär aktiven Transports über ein Transportsystem mit sehr hohem  $K_m$  für Fructose konnte bislang nicht ausgeschlossen werden. Zur Validierung der Annahme wurde die Energieabhängigkeit des Exports mit einem Saccharoseaufnahme-Experiment zur Messung des Fructoseefflux und einem *Pulse-Chase*-Experiment überprüft, wobei während des Exports von Fructose das Kalium-Ionophor Valinomycin zum Ansatz hinzugegeben wurde. Bei entsprechend hoher externer Kaliumkonzentration [50 mM] führt die Zugabe von Valinomycin in den Zellen zum Zusammenbruch des Membranpotenzials. Ein sekundär aktiver Transport würde somit unterbrochen.

Die Messung mit 300  $\mu\text{M}$   $^{14}\text{C}$ -markierter Saccharose mit *C. glutamicum* FIMS führte in der Negativkontrolle (keine Zugabe von Valinomycin) und in der Kultur mit Valinomycin zu einem identischen Kurvenverlauf (Abbildung 39 A). Die Zugabe von 20  $\mu\text{M}$  Valinomycin nach 31 Minuten zeigte keine Abflachung der Exportkurve. Die Geschwindigkeitskonstante  $k$  des Fructoseefflux war trotz Zugabe von Valinomycin

mit  $0,087 \text{ min}^{-1}$  vergleichbar mit der Geschwindigkeitskonstanten  $k$  der Negativkontrolle ( $0,088 \text{ min}^{-1}$ ). Eine Wiederholung des Versuchs führte sogar zu einer leicht erhöhten Geschwindigkeitskonstanten ( $k = 0,117 \text{ min}^{-1}$ ).



**Abbildung 39. Aufnahmemessung mit 300 µM und 50 µM  $^{14}\text{C}$ -Saccharose unter Zugabe des Ionophors Valinomycin in *C. glutamicum* FIMS.** Der Verlauf der internen  $^{14}\text{C}$ -Fructose wurde mit Zugabe von 300 µM (A) und 50 µM (B)  $^{14}\text{C}$ -Saccharose in *C. glutamicum* FIMS mit (□) und ohne (■) Zugabe von 20 µM Valinomycin über die Zeit verfolgt. Die Zellen wurden zuvor auf CgC-Medium mit 50 mM Kalium und 2% Saccharose kultiviert. Der rote Pfeil markiert die Zugabe von 20 µM Valinomycin zum Versuchsansatz, der schwarze Pfeil die Zugabe eines 100-fachen Überschusses an unmarkierter Saccharose (nur für 50 µM Saccharose).

Auch die Zugabe von Valinomycin in einem weiteren Versuch mit 50 µM  $^{14}\text{C}$ -markierter Saccharose zeigte nach Zugabe eines Saccharose-Chase und des Kalium-Ionophors Valinomycin keine veränderte Exportkinetik (Abbildung 39 B). Die Geschwindigkeitskonstante  $k$  des Fructoseefflux bei Verwendung von Valinomycin war mit  $0,114 \text{ min}^{-1}$  etwas höher als die der Negativkontrolle ( $k = 0,100 \text{ min}^{-1}$ ). Der Export von Fructose mittels eines sekundär aktiven Transports konnte somit ausgeschlossen werden.

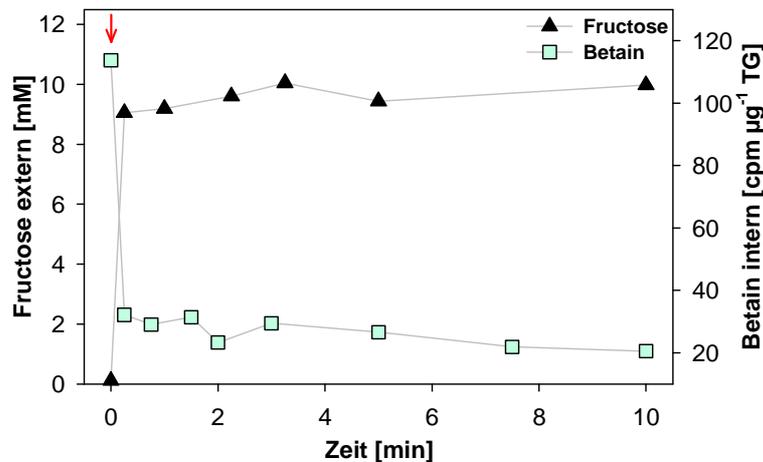
#### 4.5 Export von Fructose über mechanosensitive Kanäle

Bei Wachstum von *C. glutamicum* mit Saccharose als Kohlenstoffquelle akkumulieren intern große Mengen an Fructose. Die maximal erreichte Fructosekonzentration ist dabei abhängig von der externen Konzentration an Saccharose und der Saccharoseaufnahmezeit. Unter physiologischen Bedingungen in CgC-Minimalmedium mit 2% Saccharose erreicht der *C. glutamicum* Wildtyp zellinterne Fructosekonzentrationen von über 100 mM. Die durch Hydrolyse von Saccharose-6-phosphat entstehende Fructose akkumuliert demnach im hohen Maße im

Cytoplasma und könnte damit Auswirkungen auf den Zellturgor haben. Dies wiederum führt zur Verstärkung des hydrostatischen Drucks auf Cytoplasmamembran und Zellwand. Allgemein schützt sich die Zelle vor einer durch rasche Erhöhung des Zellturgors hervorgerufenen Zellyse durch die Aktivierung mechanosensitiver Kanäle. Dies tritt zum Beispiel bei einem plötzlichen Abfall der externen Osmolalität ein. Die mechanosensitiven Kanäle öffnen sich als Folge der angestiegenen Membranspannung und entlassen kompatible Solute ins externe Medium. Es ist bekannt, dass bei einem hypoosmotischen Schock mehr oder weniger spezifisch alle niedrigmolekularen Moleküle ins Medium entlassen werden (Ruffert et al., 1997). Ein möglicher Effekt auf die Membranspannung durch hohe interne Fructosekonzentrationen und ein damit verbundener Efflux von Fructose über die mechanosensitive Kanäle sind somit denkbar. Im Folgenden wird die Rolle der mechanosensitiven Kanäle auf den Efflux von Fructose untersucht.

### **4.5.1 Efflux von Fructose durch einen hypoosmotischen Schock**

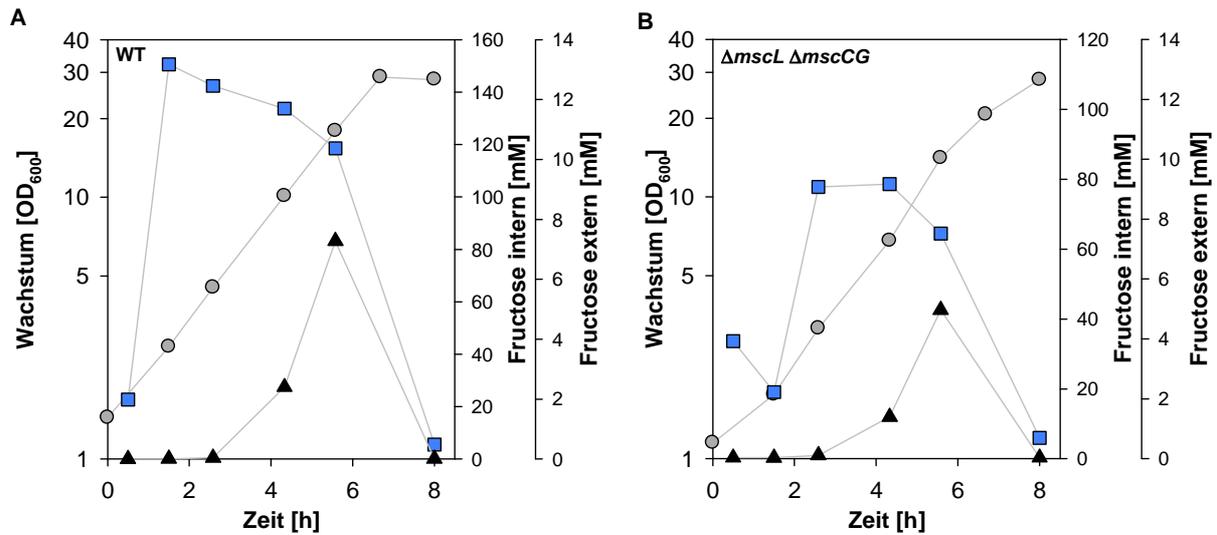
Bei der Anpassung an die externe Osmolalität wirkt in *C. glutamicum* neben Prolin, Glutamat oder Ectoin auch Glycin-Betain als kompatibles Solut. Bei einem hypoosmotischen Schock verlässt Betain die Zelle durch die rasche Aktivierung mechanosensitiver Kanäle. Um herauszufinden, ob Fructose unter stark hypoosmotischen Bedingungen ebenso wie Betain die Zelle verlässt, wurden *C. glutamicum* FIMS Zellen in Minimalmedium mit Saccharose und leicht erhöhter Osmolalität kultiviert. Während der exponentiellen Phase akkumulierten die Zellen genug Fructose um bei einem Efflux im Medium detektiert werden zu können. Als Positivkontrolle wurde dem Medium Betain zugefügt, welches die Zellen als kompatibles Solut akkumulierten. Nach einem hypoosmotischen Schock konnte tatsächlich ein schneller Anstieg von Fructose im Medium und eine rasche Abnahme von Betain aus den Zellen gezeigt werden (Abbildung 40). Die Möglichkeit des Exports von Fructose über mechanosensitive Kanäle ist demnach wahrscheinlich. Ob die mechanosensitiven Kanäle auch unter physiologischen Bedingungen eine Rolle spielen, wurde durch weitere Experimente erörtert.



**Abbildung 40.** Efflux von Glycin-Betain und Fructose bei einem hypoosmotischen Schock in *C. glutamicum* FIMS. Nach Zugabe eines dreifachen Überschusses an Wasser und eines 50-fachen Überschusses an Betain wurde der Verlauf der internen Konzentration an Glycin-Betain und der externen Fructosekonzentration radiochemisch bzw. enzymatisch verfolgt. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt des hypoosmotischen Schocks.

#### 4.5.2 Einfluss von MscCG und MscL auf den Fructoseefflux

Die Deletion der zwei in *C. glutamicum* bekannten mechanosensitiven Kanäle codierenden Gene, *mscCG* und *mscL*, führte zu keiner Erhöhung der internen Konzentration an Fructose mit Saccharose als Kohlenstoffquelle. Es konnte sogar ein gegenteiliger Effekt beobachtet werden (Abbildung 41). Die Menge an extern akkumulierender Fructose war während des Wachstums in CgC-Medium mit 2% Saccharose und 150 mM NaCl für *C. glutamicum*  $\Delta mscCG \Delta mscL$  etwas geringer als im *C. glutamicum* Wildtyp. Entgegen der Erwartung lag die interne *steady-state*-Konzentration an Fructose mit etwa 80 mM in der Mutante deutlich unter dem Level des *C. glutamicum* Wildtyps. Es fiel jedoch auf, dass die interne Fructosekonzentration des *C. glutamicum* Wildtyps bei Wachstum in Medium mit 150 mM NaCl und erhöhter Osmolalität (0,647 osmol/kg) mit 160 mM Fructose, gegenüber etwa 100 mM Fructose in nicht osmolytisch verändertem CgC-Medium (0,423 osmol/kg), deutlich erhöht war (Abbildung 41 A und Abbildung 28 A). Die Wachstumsraten von *C. glutamicum*  $\Delta mscCG \Delta mscL$  und dem *C. glutamicum* Wildtyp mit 150 mM unterschieden sich mit 0,47 und 0,48 h<sup>-1</sup> nicht wesentlich voneinander, noch vom Wachstum des *C. glutamicum* Wildtyps in CgC-Medium ohne zusätzliche Zugabe von NaCl.

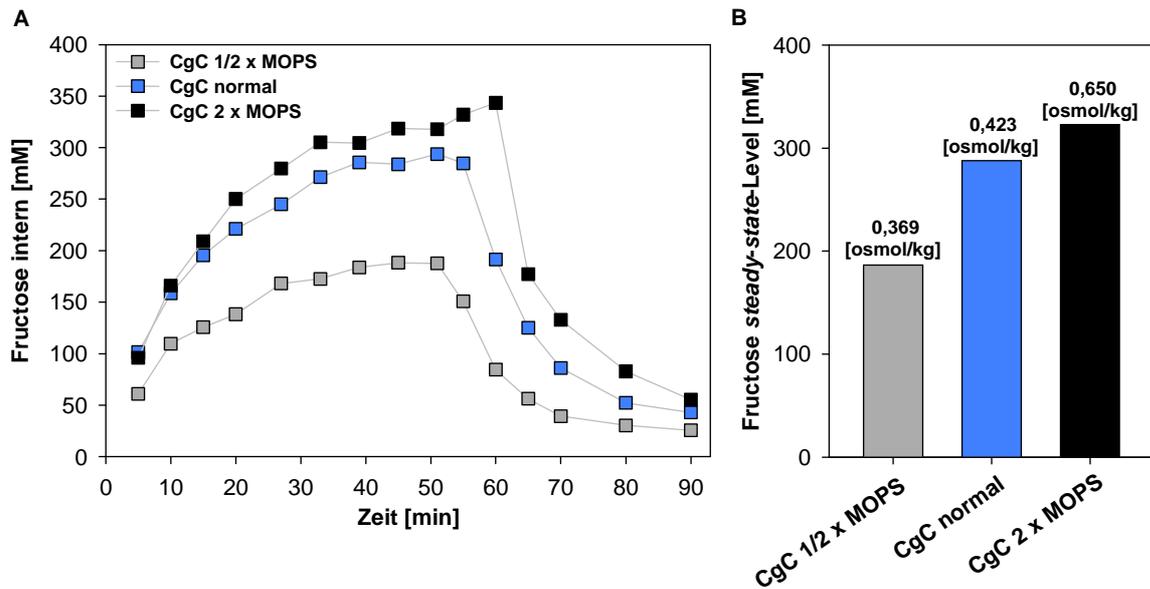


**Abbildung 41. Wachstum sowie interne und externe Fructoseakkumulation in *C. glutamicum* Wildtyp und *C. glutamicum*  $\Delta mscL \Delta mscCG$  in Medium erhöhter Osmolalität.** Wachstum (○) von *C. glutamicum* Wildtyp (A) und *C. glutamicum*  $\Delta mscL \Delta mscCG$  (B) mit externer (▲) sowie interner (■) Fructoseakkumulation in CgC-Medium mit 2% Saccharose + 150 mM NaCl (Osmolalität = 0,647 osmol/kg).

In vorhergehenden Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass zumindest die Deletion von *mscL* keinen Einfluss auf die Zellviabilität oder die Freisetzung von Soluten hat. Trotz Deletion der ORFs, die für die beiden bekannten mechanosensitiven Kanäle codiert, ist *C. glutamicum* in der Lage einen hypoosmotischen Schock zu überleben (Nottebrock et al., 2003). Daher wird die Existenz mindestens eines weiteren Effluxkanals angenommen. Das unveränderte Fructose-Steady-State-Level von *C. glutamicum*  $\Delta mscCG \Delta mscL$  bei Wachstum mit Saccharose als Kohlenstoffquelle spricht demnach nicht unbedingt gegen den Einfluss der mechanosensitiven Kanäle auf die interne Fructosekonzentration. Basierend auf dieser Vermutung und der erhöhten internen Konzentration an Fructose im *C. glutamicum* Wildtyp bei höherer Osmolalität des Mediums wurden weitere Versuche durchgeführt, um die Rolle der Osmolalität auf die interne Fructosekonzentration aufzuklären.

#### 4.5.2.1 Fructose steady-state-Level in Abhängigkeit der externen Osmolalität

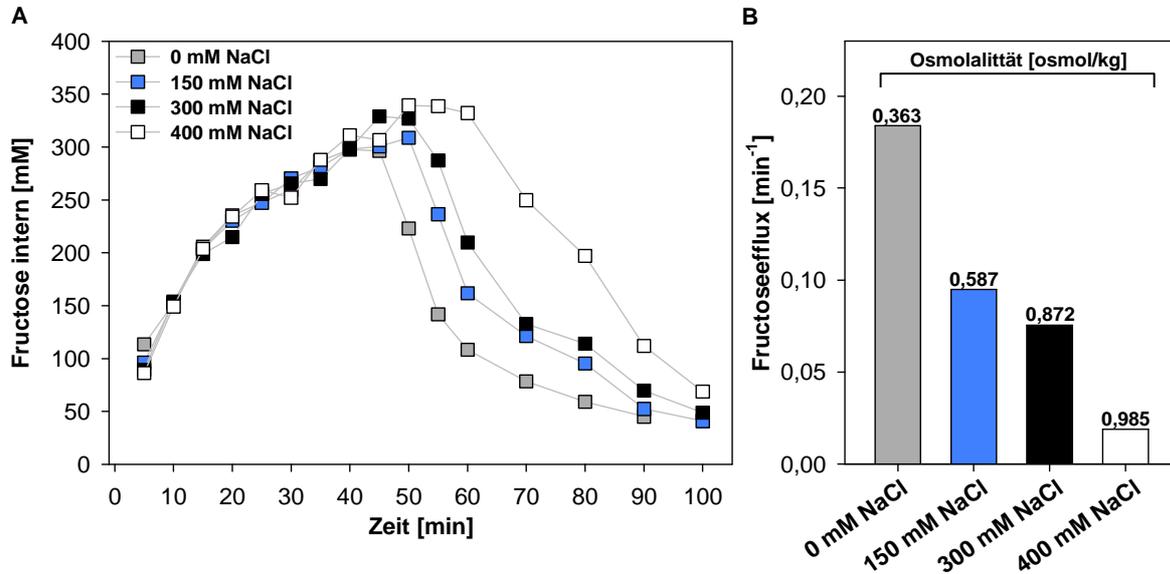
Das erhöhte *steady-state*-Level von Fructose im *C. glutamicum* Wildtyp bei Wachstum in Medium mit höherer externer Osmolalität war ein zusätzlicher Hinweis darauf, dass die mechanosensitiven Kanäle auch physiologisch am Export von Fructose beteiligt sein könnten. Die Durchführung von *Pulse-Chase*-Experimenten mit 1 mM Saccharose ermöglichten die Darstellung des *steady-state*-Levels in Abhängigkeit der externen Osmolalität. Durch Variation der Konzentration Puffersubstanz MOPS wurde die Osmolalität des Minimalmediums eingestellt.



**Abbildung 42.** Aufnahmemessung mit 1 mM  $^{14}\text{C}$ -Saccharose in Abhängigkeit der Osmolalität, eingestellt durch MOPS, in *C. glutamicum* FIMS. Der Verlauf der internen  $^{14}\text{C}$ -Fructose wurde mit Zugabe von 1 mM  $^{14}\text{C}$ -Saccharose in *C. glutamicum* FIMS über die Zeit bei Wachstum in CgC $^{1/2}$ - (□), CgC- (■) und CgC2x-Medium (■) mit 2% Saccharose verfolgt (A). Die Osmolalität des jeweiligen Mediums sowie die dabei erreichten *steady-state*-Level an Fructose sind in (B) dargestellt.

Tatsächlich stellten sich unter Verwendung der Medien unterschiedlicher Osmolalität, welche sowohl zum Wachstum als auch zur Durchführung der Saccharoseaufnahme-Versuche zur Messung des Fructoseefflux verwendet wurden, unterschiedliche *steady-state*-Level an interner Fructose ein (Abbildung 42). Die Saccharoseaufnahme-raten waren dabei nahezu identisch (Daten nicht gezeigt). Der Mittelwert der maximal erreichten internen Konzentration war abhängig von der eingesetzten Menge an MOPS und somit von der Osmolalität des Mediums. Bei Durchführung des Versuchs mit regulärem CgC-Medium, welches 21 g/l MOPS und 1 mM Saccharose enthält und damit eine Osmolalität von 0,423 osmol/kg aufweist, wurde ein *steady-state*-Level von etwa 280 mM Fructose erreicht (Abbildung 42 A und B). Bei Verwendung der doppelten Menge MOPS (42 g/l), im Folgenden CgC2x genannt, wurde eine Osmolalität von 0,650 osmol/kg erzielt. Bei gleicher Saccharoseaufnahme-rates lag die maximale Fructosekonzentration hier bei über 330 mM. Die Verringerung der Osmolalität des Mediums auf 0,369 osmol/kg, die durch Verringerung der MOPS-Konzentration auf nur 10,5 g/l (im Folgenden CgC $^{1/2}$ ) erreicht wurde, ging mit einer deutlichen Verringerung des Fructose-*steady-state*-Level auf etwa 180 mM einher (Abbildung 42 A und B). Der Kurvenverlauf war zudem deutlich abgeflacht, obwohl die eingesetzte Zelldichte und die Saccharoseaufnahme-rates in beiden Versuchsansätzen gleich waren.

Die Geschwindigkeitskonstante  $k$  des Exports von Fructose war mit  $0,134 \text{ min}^{-1}$  für CgC $^{1/2}$ - und  $0,115 \text{ min}^{-1}$  für normales CgC-Medium ähnlich. Für CgC2x-Medium lag die berechnete Konstante des Fructoseexports  $k$  bei  $0,156 \text{ min}^{-1}$ . Aufgrund der wenigen Punkte die für das Kurvenfitting verwendet werden konnten, ist dieser erhöhte Wert der Geschwindigkeitskonstanten  $k$  statistisch jedoch nicht abgesichert.



**Abbildung 43. Aufnahmemessung mit 1 mM <sup>14</sup>C-Saccharose in Abhängigkeit der Osmolalität, eingestellt durch NaCl, in *C. glutamicum* FIMS.** Der Verlauf der internen <sup>14</sup>C-Fructose wurde mit Zugabe von 1 mM <sup>14</sup>C-Saccharose in *C. glutamicum* FIMS über die Zeit bei Wachstum in CgC-Medium mit 0 mM NaCl (□), 150 mM (■) 300mM (■) und 400 mM (□) sowie 2% Saccharose verfolgt (A). Die Osmolalität des jeweiligen Mediums sowie die jeweiligen Geschwindigkeitskonstanten  $k$  des Fructoseefflux sind in (B) dargestellt.

Zur Validierung, dass sich die Fructose *steady-state*-Level in Abhängigkeit der externen Osmolalität einstellen, wurde ein identischer Versuch mit unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen durchgeführt. Die Osmolalität des Mediums hatte dabei keinen Einfluss auf die Wachstumsrate. Auch die Saccharoseaufnahmeraten waren in allen Ansätzen vergleichbar. Die Kurvenverläufe zu Beginn der Messungen waren über einen Zeitraum von 40 Minuten identisch (Abbildung 43 A). Mit steigender Osmolalität konnte ein leichter Anstieg der maximal erreichten internen Fructosekonzentration gezeigt werden (Abbildung 43 A). Mit steigender NaCl-Konzentration, d.h. mit steigender Osmolalität, ist eine Verringerung der Effluxgeschwindigkeit zu beobachten (Abbildung 43 B). Die Geschwindigkeitskonstante  $k$  lag ohne Zugabe von NaCl bei  $0,108 \text{ min}^{-1}$ , für 150 mM NaCl bei  $0,095 \text{ min}^{-1}$  und für 300 mM NaCl bei  $0,076 \text{ min}^{-1}$ . Bei 400 mM NaCl nahm die Konzentration an zellinterner Fructose noch langsamer ab ( $k = 0,019 \text{ min}^{-1}$ ).

## 4.6 Export von Fructose über einen spezifischen Transporter

### 4.6.1 Identifikation putativer Targets für den Fructoseexporter

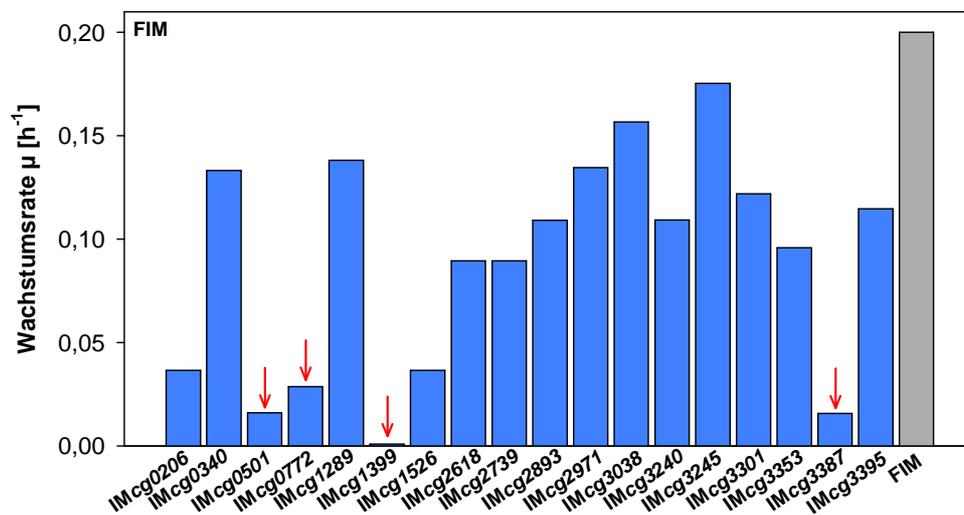
Zur Identifikation des Fructoseexporters wurde ein umfassender Ansatz durchgeführt, welcher auf Inaktivierung putativer Zuckerexporter in *C. glutamicum* FIMS beruht. Über Export von Zuckern in Bakterien gibt es bisher nur wenige Daten. Einzig in *E. coli* sind mehrere (putative) Zuckerexporter bekannt, welche den Export verschiedener Zucker katalysieren. Dazu zählen unter anderem die drei am Export von Glucose, Arabinose und Lactose sowie IPTG beteiligten Proteine SetA, SetB und SetC (*Sugar Efflux Transporter*) (Koita und Rao, 2012; Liu et al., 1999a; Liu et al., 1999b) und ein am Transport von Arabinose und IPTG beteiligtes Protein, welches von *ydeA* codiert wird (Carolé et al., 1999). Des Weiteren wurden bei einem Screening 13 putativ am Export von Pentosen beteiligte Proteine identifiziert (Koita und Rao, 2012). Die Proteinsequenzen aller am Export von Zuckern beteiligten Transporter aus *E. coli* wurden mittels BLASTP-Suche (Altschul et al., 1997) zur Identifikation putativer Zuckerexporter in *C. glutamicum* verwendet (Tabelle 5).

**Tabelle 5. Identifikation putativer Zucker Export Protein in *C. glutamicum*.** Die BLASTP-Analysen wurden auf Basis der Aminosäuresequenzen (putativer) Zuckerexporter aus *E. coli* durchgeführt.

Protein aus <i>E. coli</i> (Annotation/Familie)	Homologes Protein in <i>C. glutamicum</i> (Score, E-value)
MdtD (putativer Arabinoseexporter, MFS)	Cg0206 (194 bits, 6 <sup>-60</sup> ), Cg1399 (161 bits, 6 <sup>-48</sup> ), Cg1289 (160 bits, 1 <sup>-47</sup> ), Cg2893 (132 bits, 8 <sup>-38</sup> ), Cg2739 (127 bits, 2 <sup>-36</sup> )
KgtP (Alpha-Ketoglutarat-Transporter, MFS)	Cg3395 (176 bits, 3 <sup>-53</sup> ), Cg0501 (145 bits, 1 <sup>-42</sup> ), Cg0340 (135 bit, 2 <sup>-39</sup> ), Cg3387 (43 bits, 1 <sup>-0,8</sup> )
YdhP (putativer Transporter, MFS)	Cg0772 (214 bits, 3 <sup>-69</sup> ), Cg3334 (72 bits, 3 <sup>-18</sup> )
SetA (Zuckerexporter, MFS)	Cg3245 (23,5 bits, 0,009)
SetB (Zuckerexporter, MFS)	Cg0772 (32,3 bits, 1 <sup>-05</sup> )
SetC (Zuckerexporter, MFS)	Cg2739 (35 bits, 3 <sup>-06</sup> )
MhpT (putativer 3-Hydroxyphenyl-Propionsäure-Transporter, MFS)	Cg3353 (121 bits, 6 <sup>-35</sup> ), Cg2618 (116 bits, 4 <sup>-33</sup> ), Cg3301 (99 bits, 6 <sup>-27</sup> )
YebQ (putativer Transporter, MFS)	Cg1399 (175 bits, 6 <sup>-53</sup> ), Cg1289 (166 bits, 5 <sup>-50</sup> ), Cg2893 (132 bits, 3 <sup>-38</sup> ), Cg2971 (123 bits, 5 <sup>-35</sup> ), Cg0206 (104 bits, 9 <sup>-29</sup> ), Cg1526 (103 bits, 2 <sup>-28</sup> )
YdhC (putativer Arabinoseexporter, MFS)	Cg3038 (114 bits, 8 <sup>-33</sup> )
YnfM (putativer Arabinoseexporter, MFS)	Cg3240 (268 bits, 3 <sup>-89</sup> )
YdeA (Arabinoseexporter, MFS)	Cg3334 (102 bits, 8 <sup>-29</sup> ), Cg0772 (100 bits, 8 <sup>-28</sup> ), Cg3245 (42 bits, 2 <sup>-08</sup> )

#### 4.6.2 Physiologische Untersuchung putativer Targets des Fructoseexports

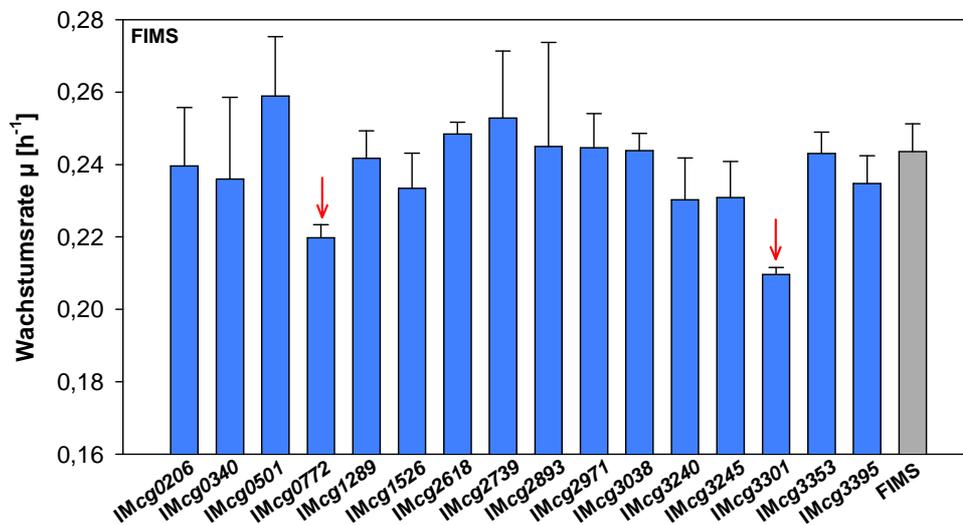
Die Transporter, die die höchste Aminosäureübereinstimmung mit den Referenzproteinen aufwiesen, wurden ausgewählt und zunächst in *C. glutamicum* FIM inaktiviert. Die Inaktivierung der Targetgene brachte für keinen Stamm ein Wachstumsdefizit in Vollmedium mit sich. Der Vergleich des Wachstums von *C. glutamicum* FIM und den jeweiligen Insertionsmutanten mit Saccharose als alleiniger Kohlenstoffquelle zeigte teilweise eine drastische Reduzierung der Wachstumsrate (Abbildung 44).



**Abbildung 44. Wachstumsraten von Mutanten mit Inaktivierung putativer Zuckerexporter in *C. glutamicum* FIM mit Saccharose als Substrat.** Die putativen Targetgene wurden in *C. glutamicum*  $\Delta ptsF \Delta ptsG \Delta iolT1 \Delta iolT2 \Delta mtlD$  (FIM) inaktiviert (blau). Der Vergleichsstamm *C. glutamicum* FIM ist in grau dargestellt. Die Wachstumsraten wurden zwischen 4,5 und 21 Stunden während der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt. Der Pfeil markiert die Insertionsmutanten, die durch eine verminderte Zelldichte nach 52 Stunden Wachstum aufgefallen sind. Alle Stämme wurden in CgC-Medium mit 2% Saccharose kultiviert.

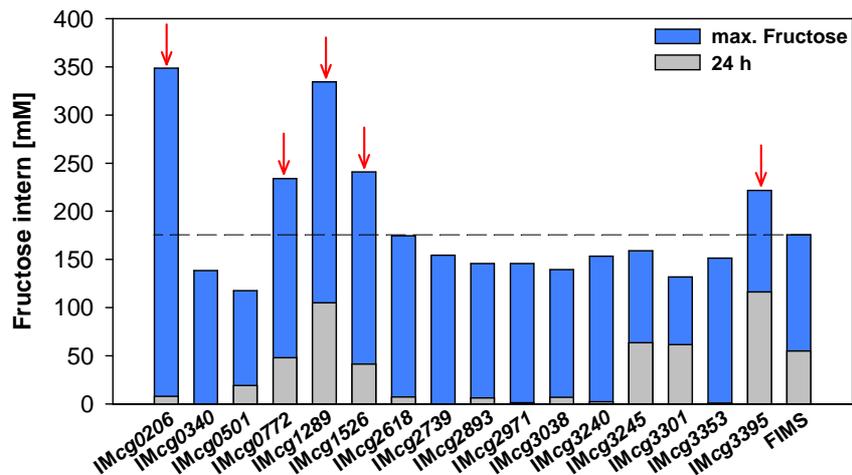
Die Inaktivierung eines für einen Fructoseexporter kodierenden Gens sollte, je nach Grad der Beteiligung am Export von Fructose, mit einer Erhöhung der internen Konzentration an Fructose und des Weiteren mit einer eventuellen Verringerung der Wachstumsrate einhergehen. Eine deutliche Abnahme der Wachstumsrate war in diesem Screening für die sechs Insertionsmutanten *C. glutamicum* FIM IMcg0206, IMcg0501, IMcg0772, IMcg1399, IMcg1526 und IMcg3387 zu beobachten. Nach spätestens 52 Stunden Kultivierung erreichten alle Insertionsmutanten die stationäre Phase. Die maximal erreichte Zelldichte ( $\text{OD}_{600}$ ) lag in den vier Stämmen *C. glutamicum* FIM IMcg0501, IMcg0772, IMcg1399 und IMcg3387 dabei wesentlich unter dem Mittelwert von  $14,18 \pm 0,77$  (Abbildung 44, rote Pfeile). Die Deletion letzterer Targetgene (*cg1399* und *cg3387*) in *C. glutamicum* FIM war erst nach

mehreren Versuchen erfolgreich. Die bei diesem Screening auffälligen Mutanten könnten daher auf putative Fructoseexporter hinweisen.



**Abbildung 45. Wachstumsraten von Mutanten mit Inaktivierung putativer Zuckerexporter in *C. glutamicum* FIMS mit Saccharose als Substrat.** Die putativen Targetgene wurden in *C. glutamicum*  $\Delta ptsF$   $\Delta ptsG$   $\Delta iolT1$   $\Delta iolT2$   $\Delta mtlD$  (pXMJ19\_ptsS) (FIMS) inaktiviert (blau). Der Vergleichsstamm *C. glutamicum* FIMS ist in grau dargestellt. Die Wachstumsraten wurden zwischen 0 und 8 Stunden während der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt. Der Pfeil markiert die Insertionsmutanten, die durch eine verminderte Zelldichte nach 52 h Wachstum aufgefallen sind. Alle Stämme wurden in CgC-Medium mit 2% Saccharose kultiviert.

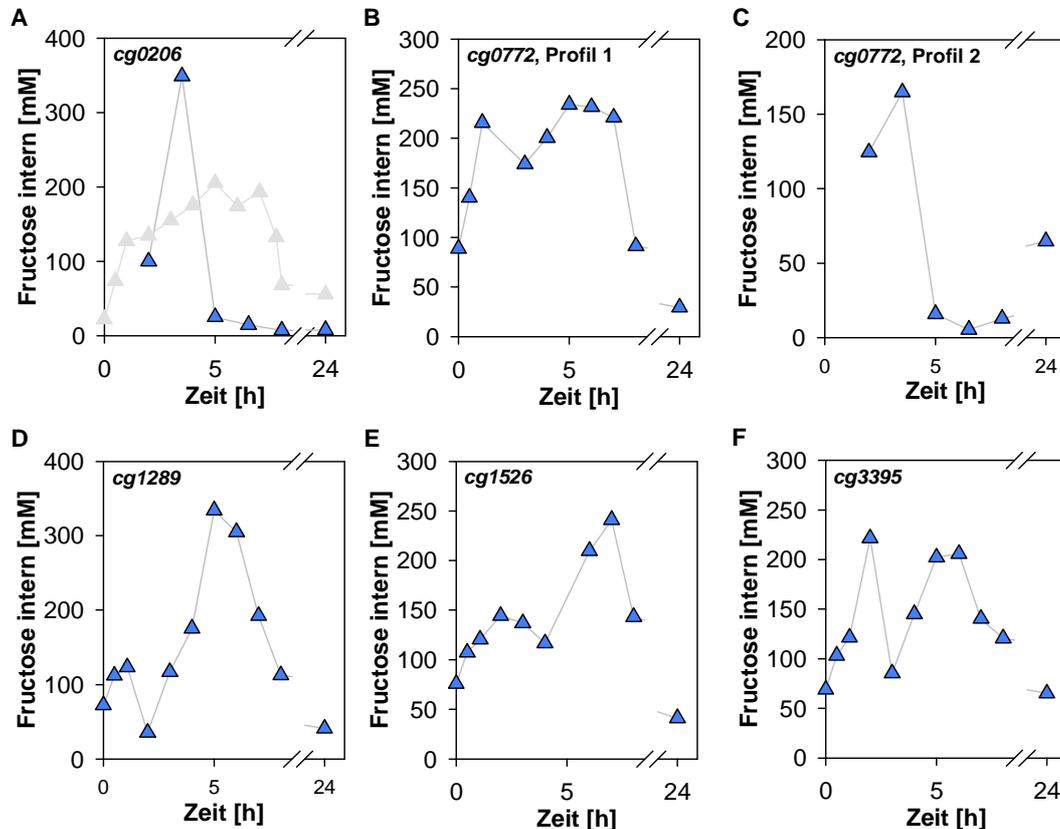
Neben einer verminderten Wachstumsrate sollte die Inaktivierung von Genen, welche am Efflux von Fructose beteiligt sind, mit einer erhöhten internen Fructosekonzentration einhergehen. Ein solcher Effekt konnte für eine *C. glutamicum* Deletionsmutante gezeigt werden, der unter anderem die Gene des Exporters LysE für Lysin und Arginin fehlten. Die entsprechende Mutante akkumulierte bis zu 823 mM Arginin, wohingegen der Wildtyp eine interne Konzentration von lediglich 245 mM aufwies (Bellmann et al., 2001). Um die interne Konzentration an Fructose zu überprüfen, wurden die Targetgene ebenfalls im Stamm *C. glutamicum* FIMS inaktiviert. Die Inaktivierung der Gene, die für die putativen Zuckerexporter codieren, führte im Modellstamm *C. glutamicum* FIMS, welcher *ptsS* homolog exprimiert, bis auf zwei Ausnahmen zu keinem Absinken der Wachstumsrate bei Wachstum mit Saccharose als alleiniger Kohlenstoffquelle (Abbildung 45). Lediglich *C. glutamicum* FIMS IMcg0772 und IMcg3301 zeigten eine verringerte Wachstumsrate. Die maximal erreichte Zelldichte war jedoch nicht beeinträchtigt. Im Gegensatz zur Insertion des Gens *cg0501* in *C. glutamicum* FIM, konnte die entsprechende Insertionsmutante in *C. glutamicum* FIMS auf Saccharose wachsen. Die im ersten Screening besonders auffälligen Targetgene *cg1399* und *cg3387* konnten auch nach mehreren Versuchen in *C. glutamicum* FIMS nicht deletiert werden.



**Abbildung 46. Intrazelluläre Fructoseakkumulation in Mutanten putativer Zuckerexporter im Stammhintergrund *C. glutamicum* FIMS.** *C. glutamicum*  $\Delta ptsF$   $\Delta ptsG$   $\Delta iolT1$   $\Delta iolT2$   $\Delta mtlD$  (pXMJ19\_ptsS) (FIMS) mit Inaktivierung putativer Targetgene wurde in CgC-Medium mit 2% Saccharose kultiviert. Über einen Zeitraum von 24 Stunden wurde die interne Konzentration von Fructose aufgezeichnet. Dargestellt ist die dabei erreichte maximale Fructosekonzentration (blau) und die Konzentration nach 24 Stunden Wachstums (grau) (A). Die schwarze gestrichelte Linie markiert die maximal erreichte Fructosekonzentration in *C. glutamicum* FIMS. Die Pfeile markieren die Mutanten mit erhöhter interner Konzentration an Fructose. Bei allen dargestellten Werten handelt es sich um Mittelwerte aus zwei unabhängigen Messungen.

Die Bestimmung der zellinternen Fructoseakkumulation zeigte in fünf der Mutanten eine zum Teil deutlich erhöhte maximale Fructosekonzentration (Abbildung 46). Die interne Konzentration an Fructose wurde für alle 16 generierten Insertionsmutanten bei Wachstum mit 2% Saccharose über 24 Stunden aufgezeichnet. Der Großteil der Mutanten wies einen mit dem Ausgangsstamm *C. glutamicum* FIMS vergleichbaren zeitlichen Verlauf der Fructosekonzentration, mit einem Maximalwert bzw. *steady-state* von höchstens 190 mM, auf (beispielhaft dargestellt für *C. glutamicum* FIMS in Abbildung 28 B). Einige Mutanten fielen an beiden Versuchstagen durch einen veränderten Kurvenverlauf und erhöhte interne Fructosekonzentrationen auf. *C. glutamicum* FIMS IMcg0206 und IMcg1289 erreichten eine fast doppelt so hohe maximale Fructosekonzentration wie der Ausgangsstamm *C. glutamicum* FIMS (Abbildung 46). Auch *C. glutamicum* FIMS IMcg0772, IMcg1526 und IMcg3395 zeigten eine erhöhte Fructoseakkumulation. Bei vier dieser fünf auffälligen Mutanten lag die Fructosekonzentration auch nach 24 Stunden noch über dem Mittelwert des Ausgangsstamms *C. glutamicum* FIMS (Abbildung 46). Außerdem wiesen zwei weitere Mutanten nach 24 Stunden einen Rest an Fructose in der Zelle auf, welcher über dem Mittelwert lag (IMcg3245 und IMcg3301) (Abbildung 46). Da die Werte für diese zwei Mutanten während des Wachstums jedoch nicht auffällig waren, wurden sie für die weiteren Versuche nicht berücksichtigt. Für die fünf Insertionsmutanten,

welche bei Wachstum auf Saccharose durch eine erhöhte interne Fructosekonzentration auffielen, ist in Abbildung 47 der Verlauf der internen Fructosekonzentration über die Zeit dargestellt.



**Abbildung 47** Intrazelluläre Konzentration an Fructose in Mutanten putativer Zuckerexporter im Stammhintergrund *C. glutamicum* FIMS. Profile der internen Konzentrationen an Fructose über 24 Stunden in *C. glutamicum* FIMS (▲) und den Insertionsmutanten (▲) *C. glutamicum* FIMS IMcg0206 (A) sowie *C. glutamicum* FIMS IMcg0772 mit Profil 1 und 2 der intrazellulären Fructosekonzentration (B, C) und Profile der Fructosekonzentrationen von IMcg1289 (D), IMcg1526 (E) sowie IMcg3395 (F) im Stammhintergrund *C. glutamicum* FIMS. Alle Stämme wurden in CgC-Medium mit 2% Saccharose kultiviert. Dargestellt sind die Mittelwerte der internen Fructosekonzentrationen, welche pro Stamm auf zwei bis vier unabhängigen Messungen beruhen.

Das Profil der intrazellulären Konzentration an Fructose der Mutanten wich dabei mehr oder weniger prägnant vom Ausgangsstamm *C. glutamicum* FIMS ab (Abbildung 47), war jedoch bis auf eine Ausnahme mehrfach reproduzierbar. Die Ausnahme war *C. glutamicum* FIMS IMcg0772 (Abbildung 47 B und C). An jeweils 50% der Versuchstage konnte eine über den gesamten Messzeitraum im Vergleich zum Ausgangsstamm erhöhte Akkumulation an Fructose ermittelt werden (Abbildung 47 B). An den anderen Versuchstagen erreichte die Konzentration an Fructose nach etwa 3,5 Stunden ein Maximum und sank dann auf etwa 15 mM ab (Abbildung 47 C). Ein ähnliches Profil konnte auch für *C. glutamicum* FIMS IMcg0206

(Abbildung 47 A) und *C. glutamicum* FIMS IMcg0501 (Daten nicht gezeigt) beobachtet werden. Dies könnte ein Hinweis auf eine einsetzende gesteigerte Expression eines Gens sein, welches für einen weiteren Fructoseexporter codiert. Als Auslöser wäre eine erhöhte interne Fructosekonzentration zu Beginn des Wachstums denkbar.

Aufgrund der verminderten Wachstumsraten und erhöhten internen Fructosekonzentrationen entsprechender Mutanten bei Wachstum auf Saccharose, wurden die ORFs *cg0206*, *cg0501*, *cg0772*, *cg1289*, *cg1526* und *cg3395* im Folgenden als mögliche Targetgene, die für am Export von Fructose beteiligte Proteine codieren, untersucht.

#### 4.6.3 Biochemische Untersuchung putativer Targets des Fructoseexports

Die fünf bezüglich des Wachstums und der Fructoseakkumulation auffälligen Insertionsmutanten wurden im Stammhintergrund *C. glutamicum* FIMS auf ihre Fähigkeit zum Fructoseexport untersucht. Dazu wurden Saccharoseaufnahme-Experimente zur Messung des Fructoseefflux mit 50 und 300  $\mu\text{M}$  Saccharose durchgeführt. Durch Bestimmung des Differentialquotienten zum Zeitpunkt  $x$  wurde die Exportgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Fructosekonzentration berechnet. Die ermittelte Geschwindigkeitskonstante  $k$  des Fructoseexports galt als Vergleichsgröße zur Einschätzung der Fähigkeit zum Fructoseexport.

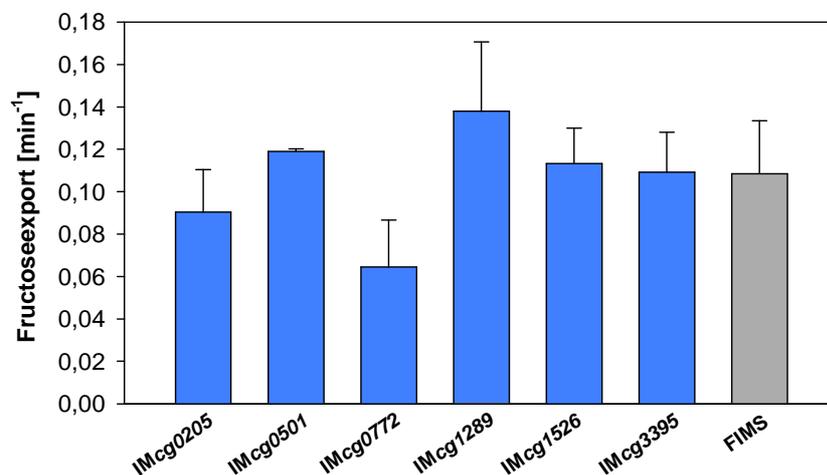
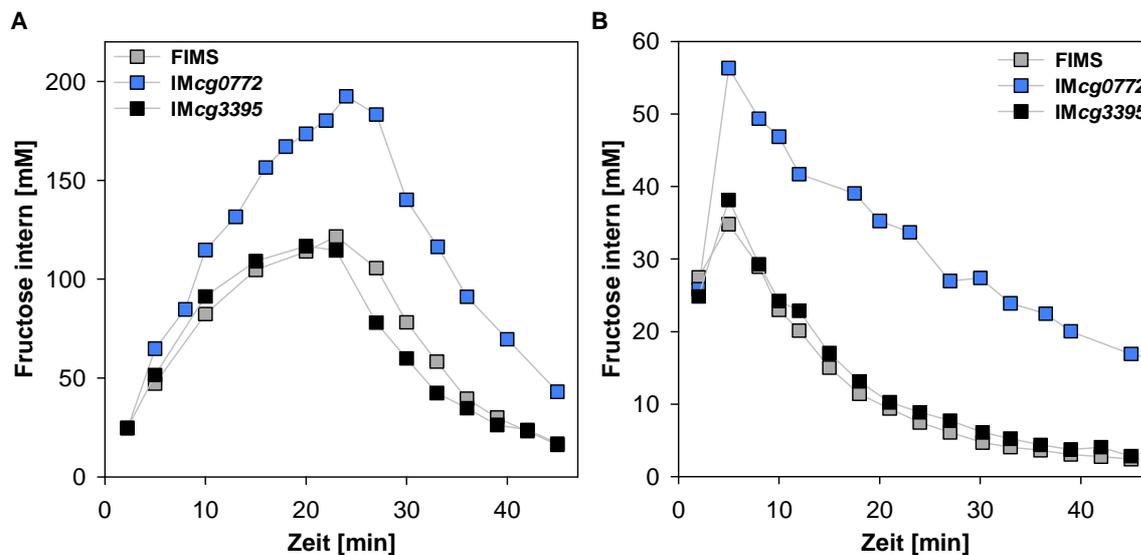


Abbildung 48. Geschwindigkeitskonstante  $k$  der durch Aufnahmemessungen mit 50  $\mu\text{M}$  und 300  $\mu\text{M}$   $^{14}\text{C}$ -Saccharose ermittelten Geraden des Fructoseexports in Mutanten putativer Zuckerexporter im Stammhintergrund *C. glutamicum* FIMS. Fähigkeit zum Fructoseexport der Mutanten IMcg0206, IMcg0501, IMcg0772, IMcg1289, IMcg1526 und IMcg3395 putativer Zuckerexporter im Stammhintergrund *C. glutamicum* FIMS. Die Standardabweichungen wurden aus mindestens vier unabhängigen Messungen berechnet.

Alle Mutanten waren in der Lage Fructose zu exportieren. Dabei entsprach die Exportfähigkeit für *C. glutamicum* FIMS IMcg0206, IMcg0501, IMcg1289, IMcg1526 und IMcg3395 den Charakteristika des Fructoseexports von *C. glutamicum* FIMS. Die Geschwindigkeitskonstante  $k$  des Fructoseexports wich für keine dieser Mutanten signifikant vom Wert des Modellstamms *C. glutamicum* FIMS mit  $0,109 \pm 0,025 \text{ min}^{-1}$  ab (Abbildung 48). Eine Ausnahme war *C. glutamicum* FIMS IMcg0772. Dieser Stamm fiel mit einer verringerten Geschwindigkeitskonstanten  $k$  von  $0,065 \pm 0,022 \text{ min}^{-1}$  und damit durch einen langsameren Fructoseexport auf (Abbildung 48).



**Abbildung 49.** Aufnahmemessung mit  $300 \mu\text{M}$  und  $50 \mu\text{M}$   $^{14}\text{C}$ -Saccharose in Mutanten putativer Zuckerexporter im Stammhintergrund *C. glutamicum* FIMS. Der Verlauf der internen  $^{14}\text{C}$ -Fructose wurde mit Zugabe von  $300 \mu\text{M}$  (A) und  $50 \mu\text{M}$  (B)  $^{14}\text{C}$ -Saccharose in *C. glutamicum* FIMS (□), *C. glutamicum* FIMS IMcg0772 (■) und *C. glutamicum* FIMS IMcg3395 (■) über die Zeit bei Wachstum in CgC-Medium mit 2% Saccharose verfolgt.

In Abbildung 49 A und B ist beispielhaft jeweils eine Messung mit  $50$  und  $300 \mu\text{M}$  Saccharose für den Ausgangsstamm *C. glutamicum* FIMS, einer Mutante mit verlangsamtem Fructoseexport (*C. glutamicum* FIMS IMcg0772) und einer Mutante ohne Effekt auf die Exportgeschwindigkeit (*C. glutamicum* IMcg3395) dargestellt. *C. glutamicum* FIMS IMcg0772 zeigte während der Saccharoseaufnahme-Versuche zur Messung des Fructoseefflux eine erhöhte interne Konzentration an Fructose, welche auf den verlangsamten Fructoseexport zurückzuführen ist (Abbildung 49). Die Aufnahme- und Exportrate von Saccharose war in allen Messungen mit dem Ausgangsstamm vergleichbar. Die für  $100 \text{ mM}$  Fructose berechnete Exportrate des Modellstamms *C. glutamicum* FIMS liegt bei  $12,35 \pm 2,00 \text{ mM/min}$ . Die Inaktivierung des Gens *cg0772* in *C. glutamicum* FIMS hatte eine Verringerung der Exportrate auf  $6,44 \pm 2,06 \text{ mM/min}$  zur Folge, wohingegen eine Inaktivierung von *cg3395* mit einem Wert

von  $10,66 \pm 2,09$  mM/min keine Veränderung der Fructoseexportrate mit sich brachte (Abbildung 49).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Inaktivierung des Gens *cg0772* im Modellstamm *C. glutamicum* FIMS bei Wachstum auf Saccharose sowohl zu einer reduzierten Wachstumsrate, als auch zu einem veränderten Profil der internen Fructosekonzentration führte. Dabei konnten zwei unterschiedliche Profile voneinander unterschieden werden. Zum einen eine über dem gesamten Kultivierungszeitraum erhöhte interne Konzentration an Fructose und zum anderen ein Verlauf mit schnellem Anstieg der internen Konzentration an Fructose, gefolgt von einem plötzlichen Abfall der Konzentration ohne darauffolgende Zunahme (Abbildung 47 C). Des Weiteren konnte für *C. glutamicum* FIMS IM*cg0772* in Saccharoseaufnahme-Versuchen zur Messung des Fructoseefflux eine verringerte Fähigkeit zum Fructoseexport nachgewiesen werden, einhergehend mit einer verminderten Geschwindigkeitskonstanten des Fructoseexports und einer erhöhten internen Fructosekonzentration.

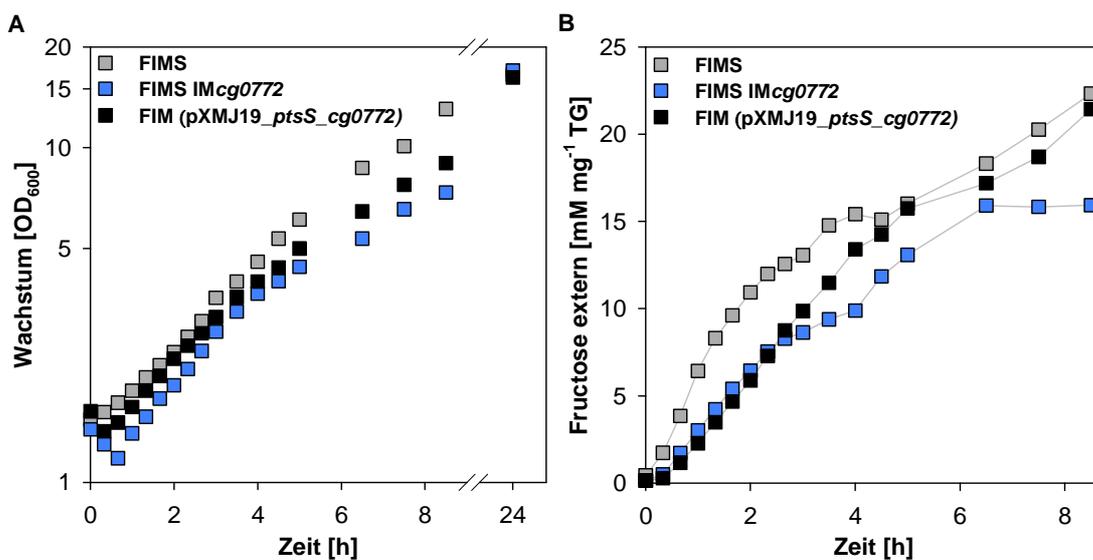
### 4.7 Relevanz von Cg0772 für den Fructoseexport

#### 4.7.1 Inaktivierung und Überexpression von *cg0772* in *C. glutamicum* FIMS

Das Genprodukt des ORFs *cg0772* stellte aus den zuvor genannten Gründen ein attraktives Target für den Fructoseexporter dar. Es codiert für eine Permease der Major Facilitator Superfamily (MFS). Im Folgenden wurden weiterführende Versuche durchgeführt, welche Aufschluss über die Bedeutung von Cg0772 in Bezug auf den Export von Fructose geben sollten.

Die Inaktivierung des Gens *cg0772* in *C. glutamicum* FIMS führte zu einer Verschlechterung des Wachstums mit Saccharose als alleiniger Kohlenstoffquelle (Abbildung 45 und Abbildung 50 A). Eine genauere Auflösung des Wachstums ergab, dass die Inaktivierung von *cg0772* mit einer Veränderung des Wachstumsverhaltens einherging. Nach einer kurzen *lag*-Phase erreichte die Wachstumsrate mit  $0,30 \pm 0,02$  h<sup>-1</sup> einem zum Ausgangsstamm *C. glutamicum* FIMS vergleichbaren Wert ( $0,28 \pm 0,03$  h<sup>-1</sup>), verringerte sich aber nach vier Stunden Wachstums auf  $0,16 \pm 0,01$  h<sup>-1</sup> (Abbildung 50 A). Zudem akkumulierte die Mutante während des Wachstums im Medium weniger Fructose pro mg TG als der Ausgangsstamm *C. glutamicum* FIMS (Abbildung 50 B). Nach etwa 2,5 Stunden verringerte sich die Zunahme der externen Fructose zusätzlich. Die nach 24 Stunden im Medium erreichte Menge an Fructose war jedoch mit der des Wildtyps vergleichbar (Daten nicht gezeigt).

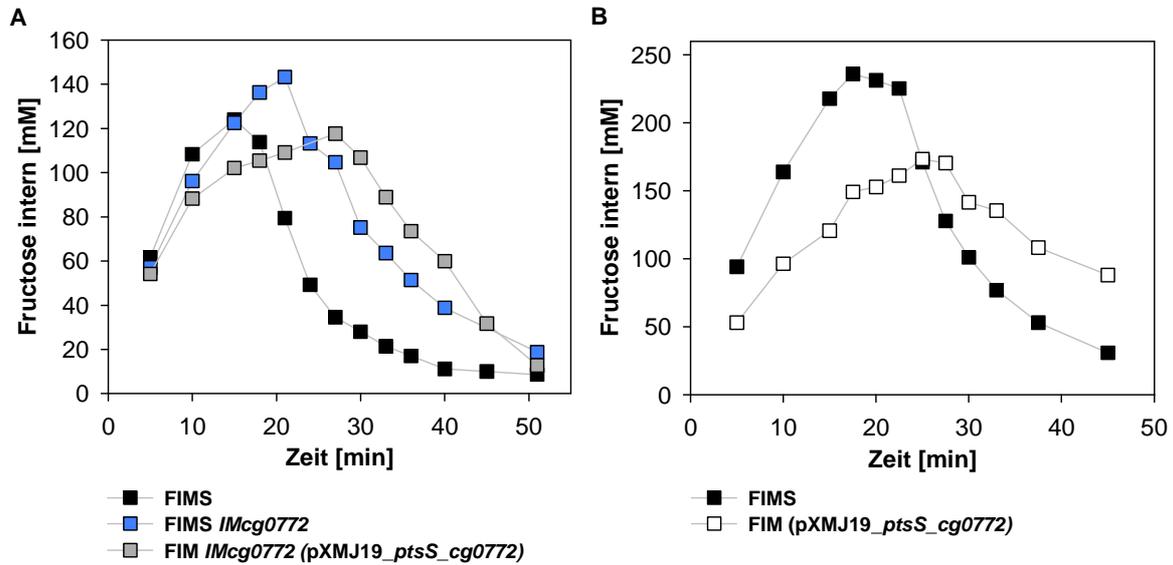
Die Überexpression von *cg0772* in *C. glutamicum* FIM (pXMJ19\_ptsS\_cg0772) brachte keine Steigerung der externen Fructosekonzentration mit sich, sondern führte zu einer Verschlechterung des Wachstums. Die anfängliche Wachstumsrate war mit  $0,30 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$  zwar vergleichbar mit *C. glutamicum* FIMS, jedoch folgte nach etwa vier Stunden ein Abfall auf  $0,16 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$ . Eine mögliche Erklärung könnten polare Effekte der Überexpression von *cg0772* sein, oder ein durch Fehlfaltung inaktiver Transporter. Dennoch wurde im Folgenden der Fructoseexport in *C. glutamicum* FIMS (pXMJ19\_ptsS\_cg0772) biochemisch untersucht.



**Abbildung 50. Wachstum und externe Fructoseakkumulation von verschiedenen *cg0772*-Mutanten.** Dargestellt ist das Wachstum (A) und die extern akkumulierende Fructose (B) von *C. glutamicum* FIMS (□), *C. glutamicum* FIMS IMcg0772 (■) und *C. glutamicum* FIM IMcg0772 (pXMJ19\_ptsS\_cg0772) (■) in CgC-Medium mit 2% Saccharose.

Wie bereits gezeigt, führte die Inaktivierung von *cg0772* sowohl im Langzeitversuch mit 2% Saccharose als auch in Saccharoseaufnahme-Versuchen zur Messung des Fructoseefflux zu einer erhöhten internen Fructosekonzentration. Durch Komplementation der Mutante *C. glutamicum* FIMS IMcg0772 mit pXMJ19\_ptsS\_cg0772 (Stammbezeichnung korrekterweise *C. glutamicum* FIM (pXMJ19\_ptsS\_cg0772)) erreichte die interne Konzentration an Fructose einen zum Ausgangsstamm *C. glutamicum* FIMS vergleichbaren maximalen Wert (Abbildung 51 A). Trotz vergleichbarer Saccharoseaufnahme- und Zelldichte war jedoch der Kurvenverlauf für *C. glutamicum* FIMS IMcg0772 (pXMJ19\_ptsS\_cg0772) im Vergleich zur Mutante und zum Ausgangsstamm deutlich abgeflacht. Dies könnte auf eine durch die Expression von *cg0772* verbesserte Fähigkeit zum Fructoseexport zurückzuführen sein. Die Geschwindigkeitskonstante  $k$  des Fructoseexports wurde für *C. glutamicum* FIMS IMcg0772 (pXMJ19\_ptsS\_cg0772) mit  $0,0347 \text{ min}^{-1}$  berechnet.

Die Exportrate für 100 mM interne Fructose lag bei 6,11 mM/min. Obwohl die ermittelte Geschwindigkeitskonstante deutlich unter dem Wert der entsprechenden Mutante *C. glutamicum* FIMS IMcg0772 ( $k = 0,065 \pm 0,022 \text{ min}^{-1}$ ) lag, war die Exportrate für 100 mM Fructose ähnlich (*C. glutamicum* FIMS IMcg0772 =  $6,44 \pm 2,06 \text{ mM/min}$ ).



**Abbildung 51. Aufnahmemessung mit  $300 \mu\text{M}$   $^{14}\text{C}$ -Saccharose in verschiedenen *cg0772*-Mutanten.** Der Verlauf der internen  $^{14}\text{C}$ -Fructose wurde mit Zugabe von  $300 \mu\text{M}$   $^{14}\text{C}$ -Saccharose in *C. glutamicum* FIMS (■), *C. glutamicum* FIMS IMcg0772 (■) und *C. glutamicum* FIMS IMcg0772 (pXMJ19\_ptsS\_cg0772) (■) (A) sowie *C. glutamicum* FIMS (■) und *C. glutamicum* FIMS (pXMJ19\_ptsS\_cg0772) (□) (B) über die Zeit bei Wachstum in CgC-Medium mit 2% Saccharose verfolgt.

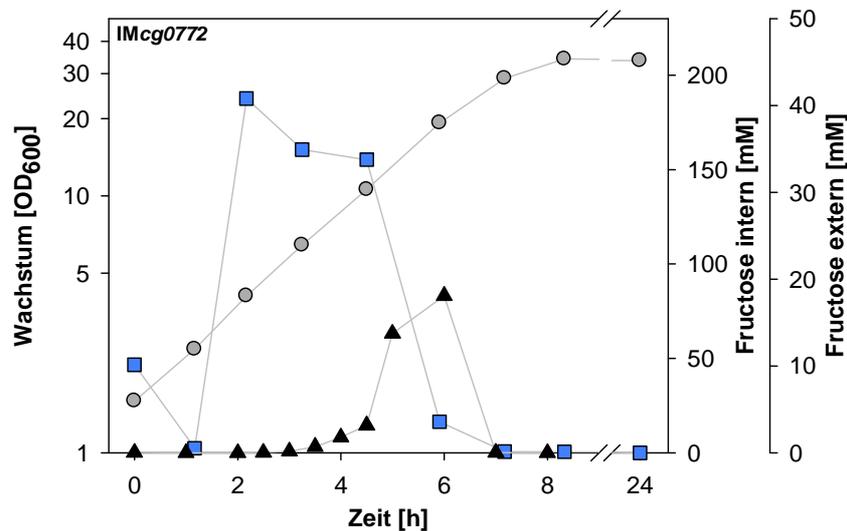
Die homologe Expression von *cg0772* im Ausgangsstamm *C. glutamicum* FIMS brachte ebenso eine Abflachung des Kurvenverlaufs mit sich. Darüber hinaus war die maximal erreichte Konzentration an Fructose im Vergleich zum Ausgangsstamm deutlich verringert. Da die Saccharoseaufnahmeähnlich war, könnte dies ein Hinweis auf einen verbesserten Fructoseexport sein. Im Gegensatz dazu stehen die Beobachtungen, dass sowohl die Abnahme der internen Fructose (Geschwindigkeitskonstante des Fructoseefflux  $k = 0,082 \text{ min}^{-1}$ ) als auch die Exportrate für 100 mM Fructose ( $3,01 \text{ mM/min}$ ) langsamer als im Ausgangsstamm *C. glutamicum* FIMS ( $k = 0,109 \pm 0,025 \text{ min}^{-1}$  und  $V_{\text{ex}[100 \text{ mM Fru}]} = 12,35 \pm 2,00 \text{ mM/min}$ ) sind.

#### 4.7.2 Inaktivierung von *cg0772* im *C. glutamicum* Wildtyp

Im Modellstamm zur Messung des Fructoseexports *C. glutamicum* FIMS ist die interne Menge an Fructose bei Wachstum mit Saccharose als alleiniger Kohlenstoffquelle im Vergleich zum *C. glutamicum* Wildtyp deutlich erhöht. Die

Überexpression und Komplementation der Mutante *C. glutamicum* FIMS IMcg0772 ergab jedoch keine eindeutigen Rückschlüsse auf die Funktion von *cg0772*. Daher wurde der Effekt der Inaktivierung von *cg0772* im Wildtyp untersucht.

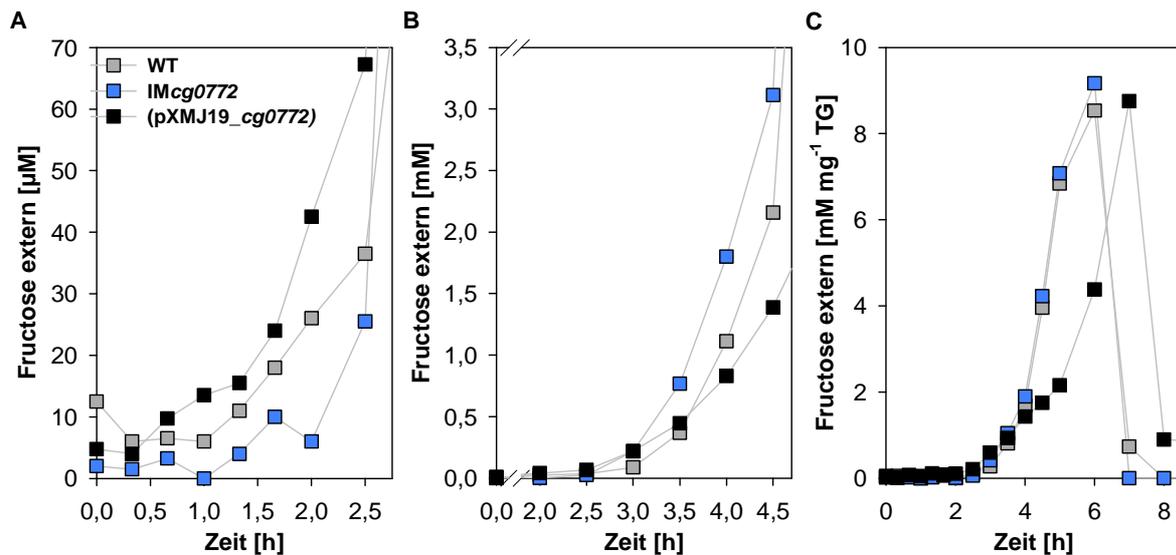
Die Inaktivierung von *cg0772* im *C. glutamicum* Wildtyp führte zu einer Erhöhung der internen Fructosekonzentration (Abbildung 52). Unter identischen Versuchsbedingungen lag der Maximalwert der internen Fructose des *C. glutamicum* Wildtyps bei 100 mM, wohingegen *C. glutamicum* IMcg0772 etwa 190 mM erreichte (Abbildung 28 A und Abbildung 52). Die Wachstumsrate von *C. glutamicum* IMcg0772 auf Saccharose war im Vergleich zum *C. glutamicum* Wildtyp ( $\mu = 0,46 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$ ) mit einem Wert von durchschnittlich  $0,47 \text{ h}^{-1}$  nicht beeinträchtigt. Der mit 18,1 mM maximal erreichte Wert an externer Fructose wich ebenso wenig vom Wert des *C. glutamicum* Wildtyps ab ( $15,3 \pm 2,8 \text{ mM}$ ).



**Abbildung 52.** Wachstum sowie interne und externe Fructoseakkumulation in *C. glutamicum* IMcg0772. Wachstum (○) von *C. glutamicum* FIMS IMcg0772 (B) und externe (▲) sowie interne (■) Fructoseakkumulation in CgC-Medium mit 2% Saccharose.

Eine zeitlich genauere Auflösung der externen akkumulierenden Fructose ergab für *C. glutamicum* IMcg0772 in den ersten 2,5 Stunden der Kultivierung eine verlangsamte Akkumulation im Vergleich zum *C. glutamicum* Wildtyp (Abbildung 53 A). Im Gegensatz dazu konnte die homologe Überexpression des Gens *cg0772* im *C. glutamicum* Wildtyp die Fructoseakkumulation im Medium beschleunigen (Abbildung 53 A). Bei geringen internen Fructosekonzentrationen zu Beginn der Messung scheint die Überexpression von *cg0772* in *C. glutamicum* zu einer Verbesserung des Fructoseexports zu führen. Nach 2,5 Stunden war ein plötzlicher Anstieg der Fructosekonzentration im Medium von *C. glutamicum* IMcg0772

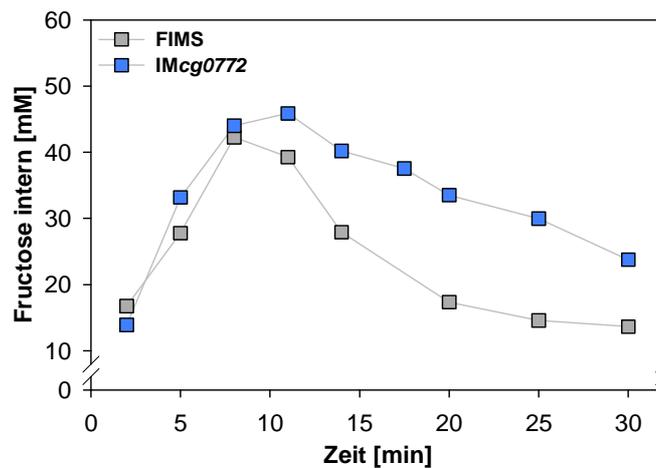
erkennbar (Abbildung 53 B). Ab diesem Zeitpunkt war zwischen *C. glutamicum* Wildtyp und Integrationsmutante kein Unterschied in der Menge an Fructose pro mg TG zu erkennen (Abbildung 53 C). *C. glutamicum* (pXMJ19\_cg0772) akkumulierte nach 4 Stunden Wachstum deutlich weniger Fructose pro mg TG. Dies bekräftigt die zuvor getätigte Annahme eines polaren Effekts durch Überexpression von cg0772 auf den Export von Fructose.



**Abbildung 53.** Externe Fructoseakkumulation bei Wachstum auf Saccharose von *C. glutamicum* mit Inaktivierung sowie Überexpression von cg0772. Dargestellt ist die extern akkumulierende Fructose von *C. glutamicum* Wildtyp ( $\square$ ), *C. glutamicum* IMcg0772 ( $\blacksquare$ ) und *C. glutamicum* (pXMJ19\_cg0772) ( $\blacksquare$ ) in CgC-Medium mit 2% Saccharose von 0 bis 2,5 Stunden (A), 0 bis 4,5 Stunden (B) [mM] und 0 bis 8 Stunden [ $\text{mM mg}^{-1} \text{ TG}$ ] (C). Bei den Werten handelt es sich um Mittelwerte aus zwei unabhängigen Messungen.

Bei der biochemischen Charakterisierung des Exports von Fructose in *C. glutamicum* FIMS IMcg0772 durch Saccharoseaufnahme-Experimente zur Messung des Fructoseefflux, wurde die Geschwindigkeitskonstante  $k$  des Fructoseefflux mit  $0,065 \pm 0,022 \text{ min}^{-1}$  bestimmt (Abbildung 48). Die daraus resultierende Exportrate für 100 mM Fructose war nur etwa halb so groß wie im Ausgangsstamm *C. glutamicum* FIMS (siehe 4.6.3). Es fiel auf, dass in einigen der durchgeführten Versuche die Fähigkeit zum Fructoseexport von *C. glutamicum* IMcg0772 weniger stark beeinträchtigt war als in anderen Versuchen. Die Werte des Ausgangsstamms wurden dabei jedoch nicht erreicht. Dabei variierte auch das Profil der internen Fructoseakkumulation bei Wachstum auf 2% Saccharose (Abbildung 47 B und C). Besonders auffällig ist dabei, dass die interne Konzentration an Fructose in 50% der Messungen nach 5 Stunden konstant unter 20 mM sank (Abbildung 47 C). Dies ließe sich durch Aktivierung eines anderen am Export von Fructose beteiligten Exporters erklären, ausgelöst durch die chromosomale Inaktivierung von cg0772. Zur

Bestätigung dieser Hypothese wurde der Fructoseefflux in *C. glutamicum* IMcg0772 Zellen gemessen, welche für die Messung auf Vollmedium kultiviert wurden. Die Aktivierung eines zweiten Exporters durch erhöhte interne Fructosekonzentrationen könnte somit umgangen werden. Tatsächlich war in *C. glutamicum* FIMS IMcg0772 auf Vollmedium die Abnahme der internen Fructosekonzentration signifikant verlangsamt (Abbildung 54). Die Geschwindigkeitskonstante  $k$  des Fructoseexports lag bei  $0,023 \text{ min}^{-1}$ . Dieses Experiment bestätigt die Annahme, dass das Genprodukt von *cg0772* signifikant am Export von Fructose beteiligt ist.



**Abbildung 54. Aufnahmemessung mit  $50 \mu\text{M } ^{14}\text{C}$ -Saccharose in *C. glutamicum* FIMS IMcg0772 nach Vorkultivierung in Vollmedium.** Der Verlauf der internen  $^{14}\text{C}$ -Fructose wurde mit Zugabe von  $300 \mu\text{M } ^{14}\text{C}$ -Saccharose in *C. glutamicum* FIMS (□) und *C. glutamicum* FIMS IMcg0772 (■) über die Zeit bei Wachstum in 2TY-Vollmedium verfolgt.

## 5 Diskussion

*Corynebacterium glutamicum* nimmt seit seiner Entdeckung vor über 60 Jahren eine herausragende Rolle unter den industriell genutzten Mikroorganismen ein. Traditionell vor allem für die Produktion von L-Aminosäuren eingesetzt, hat sich dieses grampositive Bodenbakterium in den letzten Jahren zu einer flexiblen und effizienten Produktionsplattform für unterschiedlichste Chemikalien, Materialien und Kraftstoffe entwickelt. Das gezielte Vornehmen genetischer Modifikationen des Stoffwechsels ermöglicht die anwendungsbezogene Entwicklung von Stämmen für verschiedenste biotechnologische Anwendungen. Die optimierte Verwertung verschiedener Kohlenstoffquellen stellt dabei einen optimalen Ansatzpunkt für das sogenannte *Metabolic Engineering* dar. Der Stoffwechsel in *C. glutamicum* umfasst eine Vielzahl an Stoffwechselwegen und Importsystemen, die das Wachstum auf den verschiedensten Kohlenstoffquellen erlauben. Der Antrieb für den Wissenszuwachs über die beteiligten Stoffwechselwege ist nicht zuletzt dem wachsenden wirtschaftlichen und ökonomischen Interesse geschuldet.

### 5.1 Die Besonderheit des Saccharosestoffwechsels von *C. glutamicum*

*C. glutamicum* zeigt mit Saccharose als Kohlenstoffquelle gegenüber anderen Zuckern eine leicht erhöhte Wachstumsrate. Die Wachstumsrate mit Saccharose liegt bei  $0,46 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$  (Abschnitt 4.1.1), die von Glucose und Fructose bei  $0,39 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$  bzw.  $0,42 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$  (Abschnitt 4.3.1). Als Rohmaterialien für die entsprechenden Fermentationsprozesse kann Saccharose in purer Form, oder in Form von flüssigen Nebenprodukten der Zuckerproduktion verwendet werden. Bei der Produktion von Saccharose aus Zuckerrohr oder Zuckerrüben fällt Melasse als Nebenerzeugnis an. Das Nebenprodukt Melasse enthält selber noch große Anteile an Saccharose, die sich hervorragend als Kohlenstoffquelle für *C. glutamicum* nutzen lassen. Das Interesse bei der biotechnologischen Herstellung von Produkten liegt vor allem in der Entwicklung effizienter und kostengünstiger Fermentationsprozesse, welche sich zu einem nicht unerheblichen Anteil durch die Auswahl des Substrats beeinflussen lassen. Als erneuerbarer Rohstoff ist Melasse dabei eine preiswerte und umweltfreundliche Alternative zu reiner Saccharose als Energie- und Kohlenstoffquelle.

Der initiale Schritt des Saccharosestoffwechsels in *C. glutamicum* ist die Aufnahme von Saccharose in die Zelle. Wie bei den meisten Saccharose-positiven Bakterien geschieht dies über ein Phosphoenolpyruvat-abhängiges Phosphotransferase System (PTS). Im Falle von *C. glutamicum* über  $EII_{\text{Suc}}$  (Moon et al., 2005), welches die

Aufnahme von Saccharose mit dessen Phosphorylierung koppelt. Die biochemische Charakterisierung dieses hochaffinen Aufnahmesystems für Saccharose in *C. glutamicum* ergab, dass Saccharose durch EII<sub>Suc</sub> mit einem  $K_m$  von  $18,2 \pm 2,2 \mu\text{M}$  und einem  $V_{\text{max}}$  von  $37,3 \pm 8,4 \text{ nmol/min} \cdot \text{mg TG}$  in die Zelle transportiert wird (Abbildung 4 B). Der für EII<sub>Suc</sub> ermittelte  $K_m$  ist vergleichbar mit anderen Saccharose-PTS, wie zum Beispiel dem des gramnegativen Bakteriums *Mannheimia succiniciproducens* ( $55 \mu\text{M}$ ) (Lee et al., 2010) oder dem des plasmidständigen (pUR400) Saccharose-PTS von *Escherichia coli* ( $10 \mu\text{M}$ ) (Schmid et al., 1988). Die Deletion des Gens *ptsS* in *C. glutamicum* führte zum Verlust der Saccharoseaufnahme (Abschnitt 4.1.1). EII<sub>Suc</sub> ist demnach das einzige Aufnahmesystem für Saccharose in *C. glutamicum*. Im Gegensatz zu *C. glutamicum* besitzt *E. coli* neben dem Saccharose-PTS auch die Saccharosepermease CscB, einem Transporter der *Major Facilitator Superfamily* (MFS), dessen  $K_m$  mit  $5,4 \text{ mM}$  jedoch deutlich höher als der des Saccharose-PTS ist (Sahin-Toth et al., 2000).

In Saccharose-positiven Bakterien, welche ein PTS zur Aufnahme von Saccharose besitzen, wird im Anschluss an die Aufnahme und Phosphorylierung von Saccharose, Saccharose-6-phosphat (S-6-P) durch eine Invertase hydrolysiert. In *C. glutamicum* folgt der Aufnahme und Phosphorylierung von Saccharose durch EII<sub>Suc</sub> die Hydrolyse von S-6-P zu Glucose-6-phosphat (G-6-P) und Fructose durch die Saccharose-6-phosphat Hydrolase ScrB (Dominguez und Lindley, 1996). Ein identischer Stoffwechselweg ist nicht nur für die grampositiven Bakterien *Bacillus subtilis* und *Streptococcus mutants* beschrieben (Débarbouillé et al., 1991; Sato et al., 1989), sondern auch für einige gramnegative Bakterien, wie zum Beispiel *Klebsiella pneumoniae* (Sprenger und Lengeler, 1988). Nach der Hydrolyse von S-6-P steht G-6-P der Glykolyse direkt zur Verfügung, wohingegen die weitere Verstoffwechslung von Fructose die Phosphorylierung durch eine Fructokinase voraussetzt. Die Lokalisierung der für eine Fructokinase codierenden Gene der meisten Bakterien ist entweder isoliert im Chromosom (*frk*) (Fennington und Hughes, 1996; Zembrzuski et al., 1992) oder Teil eines Saccharosestoffwechsel-Genclusters (*scrK*, *sacK* oder *cscK*) (Aulkemeyer et al., 1991; Bogs und Geider, 2000; Luesink et al., 1999; Reid et al., 1999). Des Weiteren existieren für *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* Stämme, welche das Plasmid pUR400 tragen und auf diese Weise mit Enzymen des Saccharosestoffwechsels, u.a. einer ATP-abhängigen Fructokinase, ausgestattet sind (Aulkemeyer et al., 1991; Schmid et al., 1988; Schmid et al., 1991; Schmid et al., 1982; Sprenger und Lengeler, 1988).

Im Gegensatz zu den genannten Beispielen und der überwiegenden Zahl der bisher in anderen Organismen bekannten Saccharosestoffwechselwege, konnte in

*C. glutamicum* weder eine Fructokinaseaktivität (Dominguez und Lindley, 1996) noch ein Fructokinase-Gen nachgewiesen werden (Kalinowski et al., 2003; Moon et al., 2005). Aufgrund dieser Daten wurde bisher davon ausgegangen, dass für die effiziente Nutzung von Saccharose, der Export unphosphorylierter Fructose und der anschließende Reimport über ein PTS im Rahmen des Saccharosestoffwechsels Voraussetzung sind.

Der Efflux eines Monosaccharids im Zusammenhang mit einem Disaccharid-Stoffwechselweg wurde bereits für andere Bakterien gezeigt. Beispielsweise exportiert das grampositive Bakterium *Streptococcus thermophilus* bei Wachstum mit Lactose das Galactosemolekül über einen Lactose/Galactose-Antiporter ins Medium (Hutkins und Ponne, 1991). Der Export von Galactose wurde auch für andere Milchsäurebakterien, wie *Lactobacillus bulgaricus* und *Lactococcus lactis* (Benthin et al., 1994; Poolman, 1993), beschrieben. *Lactobacillus sanfrancisco* zeigt einen Glucoseefflux bei Wachstum mit Maltose, wobei die Hälfte der intrazellulär anfallenden Glucose exportiert und anschließend wiederaufgenommen wird (Neubauer et al., 1994). Anders als beim Fructoseefflux von *C. glutamicum*, der essenziell für die Verstoffwechslung des Fructosemoleküls ist, beruht der Export von Monosacchariden bei den genannten Milchsäurebakterien auf einem Overflow-Metabolismus, bei dem die durch Hydrolyse des Disaccharids anfallenden Monosaccharide nicht schnell genug verstoffwechselt werden können.

### 5.2 Der Fructoseexport als Teil des Metabolismus von Saccharose

Die Annahme, dass in *C. glutamicum* nach Hydrolyse von S-6-P das Fructosemolekül zunächst exportiert und dann reimportiert wird, beruhte bisher auf der Beobachtung, dass während des Wachstums extrazellulär unphosphorylierte Fructose akkumuliert (Dominguez und Lindley, 1996; Moon et al., 2005). Diese Beobachtung allein belegt jedoch nicht unbedingt das Vorhandensein eines Fructoseexporters. Bei Wachstum des gramnegativen Bakteriums *Zymomonas mobilis* mit Saccharose akkumuliert ebenfalls Fructose im Medium. Im Gegensatz zu *C. glutamicum* besitzt *Z. mobilis* jedoch keinen Saccharosetransporter, so dass die extrazelluläre Hydrolyse von Saccharose durch Exkretion der zelleigenen Invertase SacA für *Z. mobilis* obligat ist (Gunasekaran et al., 1990; Mortatte et al., 1983; O'Mullan et al., 1991). Die entstehenden Monosaccharide Glucose und Fructose akkumulieren im Medium und gelangen über *facilitated diffusion* in die Zelle, um anschließend im Cytoplasma durch eine Gluco- und eine Fructokinase phosphoryliert zu werden (Doelle, 1982). Für *C. glutamicum* konnte eine zeitgleiche extrazelluläre Akkumulation von Fructose und

Glucose ausgeschlossen werden. Glucose war über den Gesamtzeitraum der Kultivierung mittels HPLC-Analyse nicht detektierbar (Daten nicht gezeigt).

Die Untersuchung der intrazellulären Konzentration an Fructose im *C. glutamicum* Wildtyp ergab nach Zugabe von 300  $\mu$ M Saccharose einen Anstieg auf etwa 100 mM (Abbildung 6). Bei Wachstum mit 2% Saccharose wurde ebenfalls ein Optimum von 100 mM interner Fructose erreicht (Abbildung 28 A). Zeitgleich konnte im Medium die Akkumulation von Fructose beobachtet werden, zurückzuführen auf den Export der internen Fructose (Abbildung 6 und Abbildung 28 A). Die hohen internen Konzentrationen an Fructose führen nicht zu einem osmotisch bedingten Wachstumsdefizit bei Wachstum mit Saccharose als Substrat. Eine ähnliche Toleranz gegenüber hohen intrazellulären Zuckerkonzentrationen wurde auch für Milchsäurebakterien gezeigt, die intern um die 100 mM Glucose ohne Wachstumsdefekt akkumulieren können (Thompson, 1987).

Mittels verschiedener *Pulse-Chase*-Messungen mit radioaktiv markierter Saccharose im *C. glutamicum* Wildtyp konnte sowohl der Export von Fructose als auch der darauffolgende Reimport belegt werden (Abschnitt 4.2.2). Die alleinige Zugabe eines Saccharose-*Chase* (eines 100-fachen Überschusses an unmarkierter Saccharose) nach Zugabe eines *Pulse* mit 50  $\mu$ M radioaktiv markierter Saccharose führte eine kurzzeitige Abnahme der internen  $^{14}\text{C}$ -Markierung herbei (Abbildung 8 A). Durch Vorlegen von 5 mM unmarkierter Fructose in Kombination mit einem Saccharose-*Chase* konnte die *Pulse-Chase*-Messung für den *C. glutamicum* Wildtyp optimiert werden. Durch den 100-fachen Überschuss an extrazellulärer unmarkierter Fructose wurde eine Aufnahme der exportierten, radioaktiv markierten Fructose in die Zelle maskiert und eine deutliche Abnahme der intrazellulären  $^{14}\text{C}$ -Markierung herbeigeführt (Abbildung 8 B). Der im ersten *Pulse-Chase*-Experiment beobachtete Wiederanstieg der internen radioaktiven Markierung ist demnach direkt auf die Wiederaufnahme von Fructose aus dem Medium zurückzuführen. Um den Einfluss der Reduktion von Fructose zu Mannitol mittels der Mannitoldehydrogenase MtIDH auf die interne Fructosekonzentration zu überprüfen, wurde ein identisches *Pulse-Chase*-Experiment, unter Zugabe eines Saccharose-*Chase* und eines Überschusses an unmarkierter Fructose, mit *C. glutamicum*  $\Delta$ mtID durchgeführt. Das im Vergleich zum Wildtyp geringere *steady-state*-Level an interner  $^{14}\text{C}$ -Markierung (Abbildung 17 B) lässt darauf schließen, dass ein Teil der internen radioaktiven Markierung im *C. glutamicum* Wildtyp in Form von Mannitol in der Zelle vorliegt.

Wird der Fructose-Reimport verhindert, wie beispielsweise in den Fructoseimporterdefizienten Mutanten *C. glutamicum*  $\Delta$ ptsF  $\Delta$ ptsG und *C. glutamicum* FI, ist die

maximal erreichte Zelldichte ( $OD_{600}$ ) mit Werten von  $19,3 \pm 2,4$  bzw.  $18,1 \pm 2,2$  im Vergleich im *C. glutamicum* Wildtyp mit  $32,2 \pm 2,7$  deutlich verringert (Abbildung 15 und Abbildung 5 A). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der Reimport von Fructose für die vollständige Nutzung von Saccharose als Kohlenstoffquelle obligat ist.

Wie bereits erwähnt, akkumulierte während des Wachstums mit Saccharose eine nicht unerhebliche Konzentration an Fructose im Medium. Die extrazelluläre Fructosekonzentration im *C. glutamicum* Wildtyp betrug bei Wachstum mit Saccharose bis zu  $15,3 \pm 2,8$  mM (Abbildung 5 A). Aufgrund der in dieser Arbeit ermittelten kinetischen Parameter für  $EII_{Fru}$ , die  $EII_{Fru}$  als hochaffinen Transporter für Fructose charakterisieren, ist eine solch hohe externe Fructosekonzentration unerwartet. Der  $K_{1/2}$  der Fructoseaufnahme im *C. glutamicum* Wildtyp, bestimmt anhand des sigmoidalen Kurvenverlaufs der Fructoseaufnahmekinetik, liegt bei  $51,4 \pm 8,9$   $\mu$ M. Schon bei geringer externer Fructosekonzentration ist die Aufnahme von Fructose mit einem  $V_{max}$  von  $83,3 \pm 2,6$  nmol/min\*mg TG möglich.

Als Ursache der Akkumulation von Fructose im Medium können verschiedene Hypothesen in Betracht gezogen werden. Da Fructose im Medium im millimolaren Bereich akkumuliert, wäre z.B. die Repression des für  $EII_{Fru}$  codierenden Gens *ptsF* denkbar. Ebenso wie die allgemeinen PTS-Gene *ptsH* und *ptsI* wird *ptsF* durch die DeoR- Repressoren SugR und FruR reguliert (Engels und Wendisch, 2007; Gaigalat et al., 2007; Tanaka et al., 2008a; Tanaka et al., 2008b). In Anwesenheit von Saccharose und Fructose sollte die Expression von *ptsF* jedoch induziert sein. Eine alternative Hypothese für die verminderte Fructoseaufnahme kann auch die Konkurrenz von  $EII_{Suc}$  und  $EII_{Fru}$  um phosphoryliertes HPr darstellen. Das hieße, die (PTS-abhängige) Aufnahme von Fructose wäre durch die Saccharoseaufnahme deutlich inhibiert. Generell ist die Inhibition durch den inhibierenden PTS-Zucker besonders stark, wenn das EII des inhibierenden Zuckers im Gegensatz zu dem des inhibierten Zucker induziert ist (Saier, 1985). Eine weitere Hypothese ist die Inaktivierung des Transports von Fructose auf molekularer Ebene durch cytoplasmatische Signalmoleküle. In diesem Fall wäre  $EII_{Fru}$  vorhanden, aber nicht aktiv. Da bezüglich dieser Vermutungen keine Daten vorliegen, könnte auch ein kompetitives Verhalten von Saccharose und Fructose um die Bindestelle von  $EII_{Fru}$  eine hypothetische Ursache für die Akkumulation von Fructose im Medium sein. Die Bindung von Saccharose aufgrund einer höheren Affinität des Transporters zu ebendieser, muss dabei nicht zwingend mit der Fähigkeit zum Transport verbunden sein. Um diese Hypothesen zu bestätigen, müsste zunächst der Einfluss von Saccharose auf Fructoseaufnahme gezeigt werden.

### 5.3 Phosphorylierung von Fructose durch eine unspezifische Kinase

*C. glutamicum* besitzt weder ein Gen für eine Fructokinase (Kalinowski et al., 2003), noch konnten Dominguez und Lindley (1996) eine Fructosekinaseaktivität feststellen. Die Untersuchung der Fructoseaufnahme-defizienten Mutanten mit Saccharose als Substrat lieferte Hinweise darauf, dass *C. glutamicum* eine unspezifische Kinase für Fructose mit geringer Umsatzrate besitzt. Diese Hinweise werden im Folgenden erläutert und diskutiert.

Für alle Wachstumsversuche mit *C. glutamicum* und Saccharose als Substrat wurde eine Konzentration von 2% (58 mM) Saccharose verwendet. Nach 24 Stunden konnte im Medium des *C. glutamicum* Wildtyps weder Saccharose noch Fructose nachgewiesen werden (Abbildung 5). Der Verlust der Fructoseaufnahme führte zu einer deutlichen extrazellulären Fructoseakkumulation im Medium. Es wurde angenommen, dass die Konzentration an Fructose im Medium der Fructoseimporterdefizienten Mutanten nach Beendigung des Wachstums äquimolar zur eingesetzten Saccharosekonzentration ist. Entgegen der Erwartung akkumulierten im Medium von *C. glutamicum*  $\Delta ptsF \Delta ptsG$ , *C. glutamicum* FI und *C. glutamicum* FIMS jedoch durchschnittlich nur etwa 47 mM Fructose (vergl. Abbildung 15 und Abbildung 59, im Anhang). Das entspricht einer Differenz an eingesetzter Saccharose und exportierter Fructose von etwa 19%. Diese Daten stehen in Übereinstimmung mit der Arbeit von Moon et al. (2005). Bei Wachstum von *C. glutamicum*  $\Delta ptsF \Delta ptsG$  war ebenfalls eine Differenz der Konzentration an eingesetzter Saccharose und akkumulierter Fructose zu erkennen (Moon et al., 2005). Es wäre demnach denkbar, dass ein Teil der internen Fructose durch unspezifische Phosphorylierung phosphoryliert würde. Die Daten lassen auf die Existenz einer unspezifischen Kinase mit geringer Umsatzrate für Fructose in *C. glutamicum* schließen. Aufgrund der geringen Aktivität einer solchen Kinase würde ein Enzymtest, wie ihn Dominguez und Lindley (1996) für den *C. glutamicum* Wildtyp durchgeführt haben, keine messbare Aktivität zeigen.

Für die Phosphorylierung von Fructose durch eine unspezifische Kinase kämen verschiedene Möglichkeiten infrage. Eine Option zur Phosphorylierung eines zellinternen Monosaccharids wäre die transportunabhängige Phosphorylierung durch eine PTS-Komponente. Bisher gibt es sowohl Daten, die für eine Phosphorylierung eines intrazellulären Kohlenhydrats durch ein PTS sprechen (Button et al., 1973; Delobbe et al., 1976; Thompson und Chassy, 1985), als auch Daten die diese Annahme widerlegen (Kelker und Anderson, 1972; Lengeler und Steinberger, 1978). So existieren für *Streptococcus lactis* zum Beispiel experimentelle

Hinweise darauf, dass neben einer ATP-abhängigen Glucokinase auch das Mannose-PTS für die Phosphorylierung intrazellulärer Glucose verantwortlich ist (Thompson und Chassy, 1985). Für *B. subtilis* gibt es ebenfalls Daten, die zeigen, dass bei Wachstum mit Sorbitol als Kohlenstoffquelle die intrazellulär entstehende Fructose über das Fructose-PTS phosphoryliert wird (Gay und Delobbe, 1977). Für die *C. glutamicum* Stämme, welche defizient in der Fructoseaufnahme sind und somit einen Hinweis auf die mögliche unspezifische Phosphorylierung lieferten, käme zum Beispiel die Phosphorylierung mittels  $EII_{\text{Suc}}$  infrage.

Eine andere Möglichkeit der transportunabhängigen Phosphorylierung der intrazellulären Fructose wäre die Phosphorylierung durch eine unspezifische cytoplasmatische Kinase. Allgemein katalysieren Glucokinasen die Phosphorylierung von Glucose zu Glucose-6-phosphat. Hexokinasen verfügen über eine geringere Substratspezifität, wodurch häufig verschiedene Phosphoryl-Akzeptoren als Substrat dienen können. In *C. glutamicum* codieren die zwei Gene *glk* und *ppgK* für jeweils eine Glucokinase (Lindner et al., 2010; Park et al., 2000). Im Gegensatz zu der durch *glk*-codierten Glucokinase, welche nur ATP als Phosphoryldonor nutzen kann, akzeptiert die PPGK (*ppgk*) sowohl Polyphosphat als auch ATP als Donor, jedoch mit einer Präferenz für letzteres. Über die biochemischen Charakteristika der Glucokinasen aus *C. glutamicum* ist bisher nichts bekannt. Die Glucokinase aus *E. coli* ist ein Beispiel für eine ATP-abhängige Glucokinase, welche neben Glucose unter anderem auch Fructose als Substrat akzeptiert. Deren  $K_m$  für Fructose ist mit 168 mM im Gegensatz zu Glucose mit 20 mM jedoch deutlich höher. (Fukuda et al., 1984). Des Weiteren wurde im Archaeon *Sulfolobus tokodaii* die ATP-abhängige Hexokinase StoHK identifiziert, die neben Glucose ebenfalls Fructose als Phosphorylakzeptor akzeptiert (Nishimasu et al., 2005). Der  $V_{\text{max}}$  der StoHK ist für Glucose und Fructose mit 67 und 78 U/mg Protein sehr ähnlich. Der  $K_m$  des Enzyms ist für Glucose (50  $\mu\text{M}$ ) zwar deutlich geringer als für Fructose, doch entspricht der  $K_m$  für Fructose (30 mM) in etwa dem der Hexokinase aus *E. coli* für Glucose. Schon im *C. glutamicum* Wildtyp erreichen die internen Fructosekonzentrationen bei Wachstum auf Saccharose um die 100 mM, und in *C. glutamicum* FIMS sogar annähernd 200 mM. Auch nach 24 Stunden Wachstums liegt die interne Konzentration an Fructose in *C. glutamicum* FIMS noch bei etwa 47 mM (Abbildung 28 B). Eine Phosphorylierung von Fructose durch eine unspezifische Glucokinase mit ähnlichen Charakteristika wie die aus *E. coli* und *S. tokodaii* wäre durchaus denkbar.

Es ist demnach möglich, dass die Differenz der Konzentration an eingesetzter Saccharose zu extern akkumulierender Fructose bei Wachstum mit Saccharose in den Fructoseaufnahme-defizienten *C. glutamicum* Stämmen auf die Phosphorylierung der

internen Fructose durch eine Glucokinase zurückzuführen ist. Um die Hypothese der internen Phosphorylierung von Fructose belegen zu können, müssten entsprechende Versuche vorgenommen werden. Eine Möglichkeit stellt die Aufreinigung der Glucokinase sowie der Hexokinase aus *C. glutamicum* dar. Im Anschluss müssen für einen Enzymtest entsprechend hohen Konzentrationen an Fructose eingesetzt werden. Anhand der kinetischen Parameter ließen sich auch Rückschlüsse auf die Relevanz einer unspezifischen Phosphorylierung von Fructose bei Wachstum mit Saccharose im *C. glutamicum* Wildtyp ziehen.

### 5.4 Ein Modellstamm zur Charakterisierung des Fructoseefflux

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Export von Fructose nach intrazellulärer Hydrolyse von S-6-P in *C. glutamicum* erstmals biochemisch belegt (Abschnitt 5.2). Die optimierte Messung des Fructoseefflux im *C. glutamicum* Wildtyp setzte eine *Pulse-Chase*-Messung unter Einsatz einer hohen externen Konzentration an Fructose voraus. Auf diese Weise wurde der Reimport der exportierten  $^{14}\text{C}$ -markierten Fructose verhindert. Eine Messung des Fructoseefflux mit hoher kinetischer Auflösung, wie sie nur durch *Pulse-Chase*-Experimente beziehungsweise Saccharoseaufnahme-Versuche mit spezifisch am Fructosemolekül  $^{14}\text{C}$ -markierter Saccharose erreicht werden kann, war unter physiologischen Bedingungen im *C. glutamicum* Wildtyp jedoch nicht möglich. Aufgrund dessen erforderte die Messung des Fructoseexports die Konstruktion eines Modellstamms. Dieser Modellstamm sollte Saccharose aufnehmen können, aber defizient in der Fructoseaufnahme sein. Des Weiteren sollte die  $\text{NADH}^+$ -abhängige Reduktion von D-Fructose zu D-Mannitol durch die Mannitoldehydrogenase MtlDH unterbunden werden (vergleiche Abbildung 10). Für die Konstruktion des Modellstamms waren verschiedene Schritte notwendig. Unter anderem waren die Beteiligung des glucosespezifischen  $\text{PTS}_{\text{Glu}}$  bei der Fructoseaufnahme sowie die Bedeutung der MtlDH an der Reduktion von Fructose, insbesondere bei Wachstum mit Saccharose, bislang unklar. Die Untersuchung der unbekannt Parameter wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt.

#### 5.4.1 Der Fructoseimport in *C. glutamicum*

##### 5.4.1.1 $\text{PTS}_{\text{Fru}}$ als Hauptaufnahmesystem für Fructose

Die biochemische Charakterisierung der Fructoseaufnahme in *C. glutamicum* bildet die Grundlage bei der Konstruktion eines geeigneten Modellstammes zur Messung des Fructoseexports. Neben Saccharose werden auch die beiden Zucker Fructose und Glucose über ein Phosphoenolpyruvat-abhängiges Phosphotransferase System (PTS)

aufgenommen. Im Gegensatz zu EII<sub>Suc</sub>, welches das alleinige Aufnahmesystem für Saccharose ist (Abschnitt 4.1.1), wurde neben dem fructosespezifischen EII<sub>Fru</sub> die Existenz eines weiteren Transporters für Fructose angenommen (Dominguez et al., 1998; Lee et al., 1994; Moon et al., 2005). Die Deletion des EII<sub>Fru</sub>-Gens *ptsF* führte zu einer Abnahme der Wachstumsrate mit Fructose um etwa 90%. Die Rate sank von  $0,42 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$  auf  $0,05 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$  (Abschnitt 4.3.1, Abbildung 11 A). Da die Doppelmutante *C. glutamicum*  $\Delta ptsF \Delta ptsG$  mit Fructose nicht mehr wachsen konnte, konnte davon ausgegangen werden, dass EII<sub>Glc</sub> für die Aufnahme von Fructose in *C. glutamicum*  $\Delta ptsF$  verantwortlich ist. Diese Hypothese konnte mithilfe der biochemischen Charakterisierung der Fructoseaufnahme in *C. glutamicum* belegt werden (Abschnitt 4.3.2).

Die Analyse des Fructoseimports in *C. glutamicum* Wildtyp und *C. glutamicum*  $\Delta ptsG$  ergab eine Kinetik mit sigmoidaler Funktion. Diese Beobachtung wird in Abschnitt 5.4.1.2 ausführlich diskutiert. Die Aufnahmekinetik von Fructose in *C. glutamicum*  $\Delta ptsF$  konnte einer Michaelis-Menten-Kinetik zugeordnet werden. Die Substratkonzentration bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht ist, wird im Falle einer Michaelis-Menten-Kinetik als  $K_m$  bezeichnet. Korrelierend zum  $K_m$  wird bei einer Aufnahmekinetik mit sigmoidaler Funktion der Parameter  $K_{1/2}$  verwendet.

Die Kinetik der Fructoseaufnahme im *C. glutamicum* Wildtyp lässt sich durch eine sigmoidale Funktion beschreiben. Die ermittelten kinetischen Parameter ergaben einen  $K_{1/2}$  von  $51,4 \pm 8,9 \text{ } \mu\text{M}$  und eine maximale Aufnahme rate  $V_{\max}$  von  $83,3 \pm 2,6 \text{ nmol/min*mg TG}$  (Abbildung 13 A und Tabelle 6). Damit ist der  $K_{1/2}$  von EII<sub>Fru</sub> für Fructose etwas höher als der  $K_m$  von EII<sub>Suc</sub> des *C. glutamicum* Wildtyps für Saccharose ( $18,2 \pm 2,2 \text{ } \mu\text{M}$ , Abschnitt 4.1.1). Der  $K_{1/2}$  von EII<sub>Fru</sub> für Fructose, ermittelt mit *C. glutamicum*  $\Delta ptsG$ , entsprach etwa dem  $K_{1/2}$  der Fructoseaufnahme im *C. glutamicum* Wildtyp (Abbildung 13 B und Tabelle 6). Die Aufnahmekinetik von Fructose über EII<sub>Glc</sub> zeigte im Gegensatz zur Kinetik von EII<sub>Fru</sub> keinen sigmoidalen Kurvenverlauf, sondern ließ sich einer Michaelis-Menten-Kinetik zuordnen. Der  $K_m$  von EII<sub>Glc</sub> für Fructose liegt mit etwa 1 mM deutlich über dem  $K_{1/2}$  von EII<sub>Fru</sub> für Fructose. Der  $K_m$  von EII<sub>Glc</sub> für Glucose ist mit  $14 \text{ } \mu\text{M}$  dagegen erheblich höher als der für Fructose (Lindner et al., 2011). Physiologisch ist die Aufnahme von Fructose über EII<sub>Glc</sub> mit einem  $K_m$  von 1 mM bei Wachstum mit 2% Fructose (entspricht 111 mM) dennoch durchaus relevant (Abbildung 13 C und Tabelle 6).

Der  $V_{\max}$ -Wert von EII<sub>Fru</sub> für Fructose war etwa nur halb so hoch wie der  $V_{\max}$  der Fructoseaufnahme für EII<sub>Fru</sub> und EII<sub>Glc</sub> zusammen (Tabelle 6). Erwartungsgemäß

sollte die Differenz der  $V_{\max}$ -Werte von  $EII_{\text{Fru}}$  und  $EII_{\text{Glc}}$  etwa 50% der maximalen Aufnahmerate des Wildtyps entsprechen. Demnach müsste eine Rate von etwa 40 nmol/min\*mg TG auf die Aufnahme von Fructose über von  $EII_{\text{Glc}}$  zurückzuführen sein. Der  $V_{\max}$  von  $EII_{\text{Glc}}$  für Fructose liegt jedoch nur bei 8,2 nmol/min\*mg TG. Dies entspricht einem Anteil von nur etwa 10% des  $V_{\max}$ -Wertes der im *C. glutamicum* Wildtyp ermittelten Fructoseaufnahme. Als Ursache wäre zum Beispiel ein Einfluss auf die Expressionsregulation von *ptsF* bei Deletion von *ptsG* denkbar.

**Tabelle 6. Übersicht der kinetischen Parameter der Fructoseaufnahme in *C. glutamicum*.** Gezeigt sind die Werte des *C. glutamicum* Wildtyps und Mutanten der PTS-abhängigen Fructoseaufnahme.

Stamm	Wachstumsrate [h <sup>-1</sup> ]	$K_{1/2} / K_m$ [μM]	$V_{\max}$ [nmol/min*mg TG]	Transporter
<i>C. glutamicum</i> Wildtyp	0,42 ± 0,04	$K_{1/2}$ 51,4 ± 8,9	83,3 ± 2,6	$EII_{\text{Fru}} + EII_{\text{Glc}}$
<i>C. glutamicum</i> $\Delta ptsG$	0,39 ± 0,02	$K_m$ 49,4 ± 0,8	41,6 ± 1,5	$EII_{\text{Fru}}$
<i>C. glutamicum</i> $\Delta ptsF$	0,05 ± 0,03	$K_{1/2}$ 975	8,2	$EII_{\text{Glc}}$

Bei Deletion von *ptsF* ist die Wachstumsrate der entsprechenden Mutante *C. glutamicum*  $\Delta ptsF$  um ca. 90% verringert (Abschnitt 4.3.1 und Tabelle 6). Demnach kann durch Aufnahme von Fructose über  $EII_{\text{Glc}}$  nur etwa 10% der maximalen Wachstumsrate des *C. glutamicum* Wildtyps mit Fructose als Substrat erreicht werden. Dieser Wert ist mit der Beteiligung von  $EII_{\text{Glc}}$  von 10% an der maximalen Aufnahmerate im *C. glutamicum* Wildtyp übereinstimmend.

Die ermittelten kinetischen Parameter der Fructoseaufnahme sind vergleichbar mit den PTS anderer Bakterien. Die  $EII_{\text{Fru}}$  der PTS von *Lactobacillus pentosus* und *Lactobacillus reuteri* haben einen  $K_m$  für Fructose von 52 μM und 95 μM (Chaillou et al., 2001; Taranto et al., 1999). Der  $K_m$  und  $V_{\max}$  des glucosespezifischen  $EII_{\text{Glc}}$  von *E. coli* für Glucose liegen bei 3-10 μM bzw. 126 nmol/min\* mg TG und die Werte des mannosenspezifischen  $EII_{\text{Man}}$  aus *E. coli* bei 15 μM bzw. 72 nmol/min\* mg TG für Mannose als Substrat (Misset et al., 1983; Stock et al., 1982).  $EII_{\text{Glc}}$  aus *C. glutamicum* kann neben Glucose auch Fructose (Abschnitt 4.3.2) und N-Acetylglucosamin (Uhde, 2014) als Substrat verwenden.  $EII_{\text{Fru}}$  kann hingegen keine Glucose transportieren (Abschnitt 4.3.2). Dafür spricht die Beobachtung, dass *C. glutamicum*  $\Delta iolT1 \Delta iolT2 \Delta ptsG$  Glucose als Substrat nicht verwenden kann, obwohl  $EII_{\text{Fru}}$  vorhanden ist (Abbildung 11 B).

Für verschiedene Transporter konnte bereits ein erweitertes Substratspektrum, ähnlich dem von  $EII_{\text{Glc}}$  aus *C. glutamicum*, gezeigt werden. Beispielsweise kann das mannosenspezifische  $EII_{\text{Man}}$  aus *E. coli* neben Mannose unter anderem auch Fructose mit gleicher Effizienz transportieren (Curtis und Epstein, 1975). Auch außerhalb der

Familie der PTS-Transporter gibt es Beispiele für Transporter mit erweitertem Substratspektrum. Der Glucose-Facilitator GLF aus *Zymomonas mobilis* akzeptiert nicht allein Glucose als Substrat (Weisser et al., 1995). Die heterologe Expression der Gene des Glucose-Facilitators *glf* und des Fructosekinase-Gens *frk* aus *Z. mobilis* konnten die Fähigkeit eines *E. coli* Stamms, der weder der Aufnahme noch der Phosphorylierung von Fructose fähig ist, zum Wachstum mit Fructose wiederherstellen. Glf ist demnach in der Lage, neben Glucose auch Fructose zu transportieren (Weisser et al., 1995).

#### 5.4.1.2 Fructoseaufnahme durch einen kooperativen Transportmechanismus

Die Aufnahmekinetik von Fructose im *C. glutamicum* Wildtyp zeigte einen sigmoidalen Verlauf der Aufnahmerate in Abhängigkeit der Fructosekonzentration (Abbildung 13 A). Die weitere Charakterisierung des Fructoseimports ergab, dass nur die Aufnahmekinetik von Fructose über  $EII_{\text{Fru}}$  einen solchen sigmoidalen Verlauf zeigt. Die Aufnahmekinetik von Fructose über  $EII_{\text{Glc}}$  lässt sich, wie auch die Aufnahme von Glucose über  $EII_{\text{Glc}}$  (Lindner et al., 2011), einer Michaelis-Menten-Kinetik zuordnen (Abbildung 13 C). Allgemein indiziert ein sigmoidaler Kurvenverlauf, wie er für die Fructoseaufnahme über  $EII_{\text{Fru}}$  gezeigt wurde, eine positive Kooperativität und damit das Vorhandensein mehrerer Bindestellen. Bei der positiven Kooperativität von Enzymen wird durch Bindung eines Liganden die Bindung eines weiteren Liganden begünstigt. Die Aktivität eines Enzyms ist daher direkt durch die Konzentration eines Liganden reguliert. Ein Beispiel dafür ist die HPr-Kinase aus *B. subtilis*, welche eine Kooperativität für ATP und Fructose-1,6-bisphosphat (FBP) zeigt (Jault et al., 2000). Als eines der ersten Intermediate der Glykolyse ist FBP ein ideal geeigneter allosterischer Aktivator der HprK und triggert somit den Mechanismus der Katabolitrepression. Für Transportvorgänge gibt es ebenfalls, wenn auch wenige, Beispiele. Voraussetzung für ein kooperatives Bindungsverhalten ist das Vorhandensein einer oder mehrerer identischer oder pseudoidentischer Monomere oder Domänen. So ist der Efflux von Calcium über eukaryotische Calciumkanäle von der Anzahl der am Kanal gebundenen Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $IP_3$ )-Moleküle abhängig (Meyer et al., 1988). Ein Beispiel für die Kooperativität des Transports in Prokaryonten ist für die gramnegativen Bakterien *E. coli*, *Salmonella typhimurium* und *Pseudomonas aeruginosa* bekannt. Die Aufnahmekinetik des Siderophors Ferric-Enterobactin über das Porin FepA zeigte einen sigmoidalen Kurvenverlauf. Aufgrund mehrerer Substratbindestellen zeigt die Aufnahme von Ferric-Enterobactin über FepA eine Kooperativität in Abhängigkeit der Substratkonzentration (Thulasiraman et al., 1998). Über ein kooperatives Verhalten bei der Aufnahme von Kohlenhydraten ist bisher nichts bekannt.

Die Analyse der Kooperativität bei der Fructoseaufnahme ergab für den *C. glutamicum* Wildtyp einen Hill-Koeffizienten von  $1,9 \pm 0,2$ . Der Hill-Koeffizient für  $EII_{Fru}$  lag bei 2,48. Der Hill-Koeffizient gibt die minimale Zahl an Liganden-Bindestellen an. Demnach wäre es denkbar, dass  $EII_{Fru}$  als Homodimer in der Membran vorliegen könnte. Die Bindung eines Fructosemoleküls würde die Bindung des nächsten Fructosemoleküls beeinflussen. Die Bildung von Homodimeren aus zwei PTS EII-Molekülen wurde zum Beispiel in *E. coli* für das glucosespezifische  $EIIC_{Glu}$ , das mannosespezifische  $EIIC_{Man}$  sowie das  $\beta$ -glucosidspezifische  $EII_{bgl}$  aus *E. coli* gezeigt (Chen und Amster-Choder, 1998; Jeckelmann et al., 2011; Khandekar und Jacobson, 1989; van Montfort et al., 2002). Des Weiteren existieren Daten für die Existenz von Homodimeren des glucosespezifischen  $EII_{Glc}$ - $EIII_{Glc}$  aus *S. typhimurium* (Cao et al., 2011; Erni, 1986). Die Lösung der Kristallstruktur des homodimeren Diacetylchitobiose-spezifischen EIIC aus *Bacillus cereus* durch Cao et al. (2011) veranlasste die Diskussion über eine mögliche Kooperativität bei der Bindung und Freisetzung des Substrats. Die Durchführung einer Blue-Native-PAGE und einer Gelfiltration mit gereinigtem  $EII_{Fru}$  aus *C. glutamicum* könnte Aufschluss über Fähigkeit von  $EII_{Fru}$  zur Bildung von Homodimeren geben.

#### 5.4.2 Reduktion von Fructose zu Mannitol durch die MtlDH

Die Fähigkeit von  $EII_{Glc}$  neben Glucose auch Fructose zu transportieren, macht für die Konstruktion eines Modellstamms neben der Deletion von *ptsF* auch die Deletion von *ptsG* notwendig. Bäumchen et al. (2009) zeigten, dass Fructose bei hohen extrazellulären Fructosekonzentrationen über *IolT1* und *IolT2* in die Zelle gelangen kann. Aufgrund dessen wurden die Gene *iolT1* und *iolT2* für den Modellstamm zusätzlich deletiert. Da der Modellstamm defizient in der Fructoseaufnahme sein und der intrazelluläre Verlust an Fructose unterbunden werden sollte, wurde die Relevanz der Reduktion von Fructose zu Mannitol durch die Mannitoldehydrogenase MtlDH untersucht.

Die Mannitoldehydrogenase MtlDH aus *C. glutamicum* besitzt sowohl eine Arabitol- als auch eine Mannitoldehydrogenaseaktivität (Laslo et al., 2012). Der  $K_m$  der MtlDH beider Substrate liegt bei 6,4 mM (Laslo et al., 2012). Des Weiteren ist die MtlDH ebenso in der Lage Fructose zu Mannitol zu reduzieren, mit dem Reaktionsgleichgewicht auf Seiten des Mannitols (persönliche Kommunikation Dr. Tanja Laslo, Universität Ulm). Um eine zur Oxidationsreaktion der MtlDH ähnliche Umsatzrate bei der Reduktion von Fructose zu Mannitol zu erhalten, musste etwa fünfmal mehr Fructose eingesetzt werden (persönliche Kommunikation Dr. Tanja Laslo, Universität Ulm). Da die Verstoffwechslung von Mannitol auf Oxidation zu

Fructose sowie auf Export und Reimport der Fructose beruht (Laslo et al., 2012), ist die Reduktion von Fructose zu Mannitol bei entsprechend hohen Konzentrationen an Fructose biochemisch zwar möglich, physiologisch aber nutzlos. Die hohe interne Fructosekonzentration bei Wachstum mit Saccharose sollte diese Reaktion begünstigen.

Die Relevanz der Reduktionsreaktion von Fructose zu Mannitol durch die MtlDH *in vitro* war bislang unklar. Während des Wachstums mit Saccharose als Substrat konnte unter anderem im *C. glutamicum* Wildtyp neben Fructose auch Mannitol im Medium detektiert werden (Abbildung 20). Nach Beendigung des Wachstums war kein Mannitol mehr im Medium detektierbar. Mannitol kann demnach sowohl exportiert als auch wieder importiert werden. Bei Messung des Fructoseexports mittels *Pulse-Chase*-Messungen bewirkte die Deletion von *mtlD* in *C. glutamicum* ein im Vergleich zum Wildtyp geringeres *steady-state*-Level (Abbildung 17 B). Dies ließ darauf schließen, dass im *C. glutamicum* Wildtyp ein gewisser Anteil der radioaktiv markierten Fructose zu Mannitol reduziert wurde. Im Anschluss wurde Mannitol exportiert (Abbildung 20). Die Fähigkeit der Oxidation von Mannitol zu Fructose und der Reduktion von Fructose zu Mannitol wurde bereits für verschiedene Mannitoldehydrogenasen beschrieben. Die  $K_m$ -Werte der Reduktion von Fructose zu Mannitol schwanken dabei zwischen 12 und 78 mM, die für die Oxidation von Mannitol zu Fructose zwischen 10 und 60 mM (Aarnikunnas et al., 2002; Adachi et al., 1999; Korakli und Vogel, 2003; Martinez et al., 1963; Sakai und Yamanaka, 1968; Slatner et al., 1998). So katalysiert zum Beispiel die Mannitoldehydrogenase des grampositiven Bakteriums *Lactobacillus sanfranciscensis*, sowohl die Reduktion von Fructose zu Mannitol als auch die Oxidation von Mannitol zu Fructose mit einem  $K_m$  von 24 bzw. 78 mM und einem  $V_{max}$  von 29 bzw. 20 U/mg Protein (Korakli und Vogel, 2003). Einige Milchsäurebakterien können Mannitol nicht nur aus Fructose sondern auch aus Saccharose synthetisieren (Yun et al., 1996; Yun und Kim, 1998). Im Rahmen der Konstruktion eines Modellstamms wurde die MtlDH-vermittelte Reduktion von Fructose zu Mannitol von *C. glutamicum* bei Wachstum mit Saccharose untersucht und bestätigt.

Die spezifische Aktivität der MtlDH im *C. glutamicum* Wildtyp bei Wachstum mit Saccharose war etwa genauso hoch wie bei Wachstum mit Arabitol und Mannitol (Abbildung 18 B). Die erhöhte Expression des Gens *mtlD* in *C. glutamicum*  $\Delta$ *atlR* führte, im Vergleich zum *C. glutamicum* Wildtyp, bei Wachstum mit Saccharose zu einer um die Hälfte reduzierten maximalen Fructosekonzentration (Abbildung 19 A und B). Dagegen führte die Deletion von *mtlD* in *C. glutamicum* zu einer leicht erhöhten internen Konzentration an Fructose (Abbildung 19 C). Bei Wachstum mit

Saccharose als Kohlenstoffquelle wird demnach tatsächlich Fructose zu Mannitol reduziert.

Die mit bis zu 100 mM hohen internen Konzentrationen an Fructose im *C. glutamicum* Wildtyp sollten generell die Reduktion von Mannitol zu Fructose unterstützen (Abbildung 28 A). Die Deletion der Fructoseimporter- und Mannitoldehydrogenase-Gene führte zu einer Erhöhung der internen Fructosekonzentration auf etwa 190 mM. So wurden in *C. glutamicum* FIMS im *steady-state* sogar etwa 190 mM Fructose erreicht (Abbildung 28 B), was den Umsatz von Fructose zu Mannitol weiter begünstigen sollte. Die Ursache der erhöhten internen Fructosekonzentration in den Fructoseaufnahme-defizienten Mutanten wird in Abschnitt 5.5 eingehend diskutiert. *C. glutamicum* FI synthetisiert aus Fructose große Mengen an Mannitol und exportiert diese (Abbildung 20). Bei Wachstum von *C. glutamicum* FI mit Saccharose zeigt sich die externe Akkumulation von 28,4 mM Mannitol. Um zu erreichen, dass die interne <sup>14</sup>C-Markierung im Modellstamm nur radioaktiv markierter Fructose entspricht, war die Deletion des Gens der Mannitoldehydrogenase *mtlD* für die Konstruktion eines Modellstamms zur Messung des Fructoseexports zwingend notwendig.

### 5.4.3 Auswirkung der Inaktivierung des Fructoseimports auf den Metabolismus

Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse über den Fructoseimport und der Relevanz der MtlDH bei Wachstum auf Saccharose wurden für die Konstruktion eines Modellstamms zum Fructoseexport sowohl die Gene aller Fructoseaufnahmesysteme als auch die der Mannitoldehydrogenase deletiert. Der resultierende Stamm *C. glutamicum* FIM zeigte bei Wachstum mit Saccharose als Substrat jedoch eine stark verminderte Wachstumsfähigkeit (Abbildung 21). Zurückzuführen ist dieser Wachstumsdefekt auf Deletion von *ptsF*, da schon die Einzeldelentionsmutante *C. glutamicum*  $\Delta ptsF$  eine verminderte Wachstumsfähigkeit mit Saccharose zeigt (Abbildung 14). Das Wachstum der Mutanten *C. glutamicum*  $\Delta iolT1 \Delta iolT2$  sowie *C. glutamicum*  $\Delta ptsG$  und *C. glutamicum*  $\Delta iolT1 \Delta iolT2 \Delta ptsG$  mit Saccharose als Kohlenstoffquelle ist dagegen nicht eingeschränkt (Daten nicht gezeigt). Die verminderte Wachstumsfähigkeit war nicht auf eine Beeinträchtigung des Zentralstoffwechsels zurückzuführen, da sie sich auf das Wachstum mit Saccharose als Substrat beschränkt. Sowohl *C. glutamicum*  $\Delta ptsF$  als auch *C. glutamicum* FIM zeigen auf Kohlenstoffquellen wie Acetat, Maltose, Ribose oder Vollmedium eine zum *C. glutamicum* Wildtyp vergleichbare Wachstumsrate (Abbildung 14 B und Abbildung 22 A).

Die Deletion von *ptsF* führte in der entsprechenden Mutante *C. glutamicum*  $\Delta ptsF$ , im Vergleich zum *C. glutamicum* Wildtyp, zu einer erheblichen Verringerung der *ptsS*-

Transkriptmenge, wenn die Zellen mit Saccharose kultiviert wurden. Die zusätzliche Deletion der Gene *ptsG*, *iolT1*, *iolT2* und *mtlD* brachte eine weitere drastische Verringerung des relativen mRNA-Gehalts von *C. glutamicum* FIM mit sich (Abschnitt 4.3.6). Der Kohlenstoffmetabolismus von *C. glutamicum* ist durch eine Vielzahl an Transkriptionsregulatoren reguliert. Dazu zählen unter anderem SugR, FruR, GntR1 und GntR2 sowie RamA und RamB (Auchter et al., 2011; Engels et al., 2008b; Engels und Wendisch, 2007; Frunzke et al., 2008; Gaigalat et al., 2007; Tanaka et al., 2008b; Teramoto et al., 2011). Als Ursache der verminderten *ptsS*-Expression wurde die Repression des Gens durch den DeoR-Regulator SugR identifiziert. Die Deletion von *sugR* in *C. glutamicum* FIM ging mit einer deutlich erhöhten Wachstumsrate mit Saccharose und einer signifikant gesteigerten Aufnahmerate für Saccharose einher (Abbildung 27).

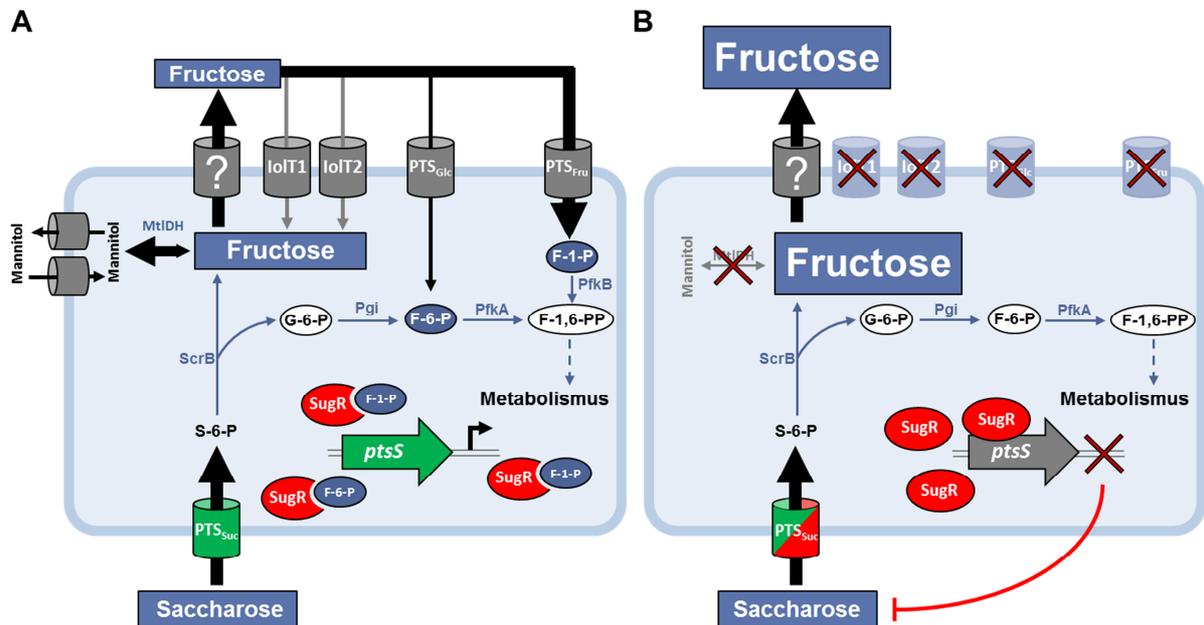
SugR ist ein pleiotroper Transkriptionsrepressor aller spezifischen (*ptsS*, *ptsF*, *ptsG*) und allgemeinen (*ptsI*, *ptsH*) PTS-Gene und reprimiert deren Expression während des Wachstums auf Kohlenstoffquellen der Gluconeogenese, wie Acetat und Pyruvat (Engels und Wendisch, 2007; Gaigalat et al., 2007; Tanaka et al., 2008b). Als negative Effektormoleküle von SugR wurden unter anderem Fructose-1-phosphat und Fructose-6-phosphat beschrieben (Engels und Wendisch, 2007; Gaigalat et al., 2007). Fructose-1-Phosphat (F-1-P) ist das stärkste Effektormolekül für SugR (Gaigalat et al., 2007). Im Gegensatz zu Fructose-6-phosphat (F-6-P) entsteht F-1-P im Metabolismus von *C. glutamicum* ausschließlich bei der Aufnahme von Fructose über das fructosespezifische PTS. Bei Wachstum mit Saccharose liegen alle PTS-Gene im *C. glutamicum* Wildtyp, unter anderem infolge von Export und Wiederaufnahme des Fructosemoleküls über  $\text{PTS}_{\text{Fru}}$  und  $\text{PTS}_{\text{Glc}}$ , dereprimiert vor. In Fructoseimporterdefizienten Mutanten ist die Derepression von *ptsS* mit Saccharose als Substrat durch SugR stark eingeschränkt. Die Abwesenheit des SugR-Effektormoleküls F-1-P in *C. glutamicum*  $\Delta\text{ptsF}$  führte zu einer deutlich verminderten Expression von *ptsS* (Abbildung 23).

Neben F-1-P und F-6-P zeigen auch Fructose-1,6-bisphosphat (F-1,6-PP) und Glucose-6-phosphat (G-6-P) einen negativen Effekt auf die Bindung von SugR, wenn auch im millimolaren Bereich (Engels und Wendisch, 2007; Gaigalat et al., 2007). Während des Wachstums mit Saccharose akkumuliert im *C. glutamicum* Wildtyp intrazellulär 1 mM F-6-P (Georgi et al., 2005). Für die Konzentrationen der beiden Metabolite G-6-P bzw. F-1,6-PP sind für *C. glutamicum* nur Werte mit Glucose bzw. Fructose als Substrat bekannt. Die interne Konzentration an G-6-P beträgt 8 mM, die für F-1,6-PP sogar 46 mM (Gaigalat et al., 2007). Die interne Konzentration an F-6-P liegt bei Wachstum mit Saccharose und Fructose im gleichen Bereich (Georgi et al., 2005). Da

die kinetischen Parameter der Saccharose- und Glucoseaufnahme sehr ähnlich sind und die Spaltung durch ScrB keinen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt, können bei Wachstum mit Glucose und Saccharose als Substrat ähnliche Konzentrationen an G-6-P angenommen werden, wie bei Glucose als Substrat. Der Zufluss an F-1,6-PP ist dagegen etwas höher, da dieses Intermediat sowohl aus dem Glucosemolekül als auch aus dem Fructosemolekül entsteht. Zusammen mit der Konzentration des Effektors F-6-P ist die Konzentration der beiden Effektormoleküle G-6-P und F-1,6-PP in *C. glutamicum*  $\Delta ptsF$  offensichtlich hoch genug, um eine vollständige Repression von *ptsS* durch SugR zu vermeiden (Abbildung 15 A).

In der Doppelmutante *C. glutamicum*  $\Delta ptsF \Delta ptsG$  fehlt neben dem Effektormolekül F-1-P auch ein Zufluss des SugR-Effektors F-6-P, denn die Aufnahme von Fructose über EII<sub>Glc</sub> führt zur Bildung von F-6-P. Bei Deletion des Gens *ptsG* entsteht der Effektor F-6-P nur aus Umwandlung von G-6-P mittels der Phosphoglucose Isomerase (Pgi). Dies macht sich in einer weiteren Verringerung der Wachstumsrate mit Saccharose als Kohlenstoffquelle bemerkbar. Die Einzeldelation von *ptsG* zeigte jedoch keine Auswirkung auf das Wachstum mit Saccharose (Daten nicht gezeigt). Wenn, wie in diesem Fall, das Effektormolekül F-6-P in der Zelle verringert ist, ist die Derepression von SugR durch die verbliebenen Effektormoleküle offensichtlich stark genug, um die ausreichende Expression der PTS-Gene zu ermöglichen. Die zu F-1-P zusätzliche Minderung an F-6-P hat jedoch durchaus einen Einfluss auf das Wachstum von *C. glutamicum*  $\Delta ptsF \Delta ptsG$ . Die im Vergleich zur *ptsF*-Einzelmutante weiter reduzierte *ptsS*-Transkriptmenge der Fructoseaufnahme-defizienten Mutante lässt sich demnach durch die verstärkte Repression der PTS-Gene durch SugR erklären (Abbildung 23). In *C. glutamicum*  $\Delta ptsF \Delta ptsG$  kann der Effektor F-1,6-PP nur aus G-6-P generiert werden, welches wiederum bei Hydrolyse von Saccharose-6-phosphat durch ScrB anfällt. Die Konzentrationen der Intermediate G-6-P, F-6-P und F-1,6-PP scheinen aber noch immer hoch genug, um auch in den *ptsF/ptsG*-Doppeldeletionsmutanten eine vollständige Repression durch SugR zu verhindern (Abbildung 15 B). So ist zumindest ein langsames Wachstum mit Saccharose als Substrat möglich. Die beispielsweise für *C. glutamicum*  $\Delta ptsF$  und *C. glutamicum* FIM beobachtete langsam ansteigende Wachstumsrate (Abbildung 14 A und Abbildung 21 A) könnte auf eine langsam ansteigende Transkriptionsmenge von *ptsS* zurückzuführen sein. Dafür spricht auch die erhöhte Wachstumsrate von *C. glutamicum* FIM gleich nach dem Überimpfen in frisches Medium (Abbildung 22 B). Die Transskriptmenge von *ptsS* ist in den überimpften Zellen bereits hoch genug, um Saccharose direkt in ausreichendem Ausmaße aufnehmen zu können. Um diese Hypothese zu überprüfen, müsste die Aufnahmerate von Saccharose zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums bestimmt werden. Eine Übersicht über

die regulativen Vorgänge des Saccharosestoffwechsels im *C. glutamicum* Wildtyp und *C. glutamicum* FIMS ist in Abbildung 55 dargestellt.



**Abbildung 55. Schematische Darstellung des Saccharosestoffwechselweges im *C. glutamicum* Wildtyp und *C. glutamicum* FIMS.** Dargestellt sind die Zellen von *C. glutamicum* Wildtyp (A) und *C. glutamicum* FIMS (B) mit Saccharose als Substrat und Fructose als Metabolit (blaue Rechtecke), die beteiligten Transportsysteme (Zylinder), Enzyme (blau), Metabolite (schwarz) sowie der Regulator SugR (rote Ellipse) mit Effektormolekülen (weiße und blaue Ellipsen) und das Gen *ptsS* (grüner bzw. grauer Pfeil). Enzyme: *PfkA/PfkB* 6- bzw. 1-Phosphofruktokinase, *Pgi* Phosphoglucose Isomerase, *MtIDH* Mannitoldehydrogenase, *ScrB* Saccharose-6-phosphat-Hydrolase. Metabolite: F-6-P Fructose-6-phosphat, F-1,6-PP Fructose-1,6-bisphosphat, G-6-P Glucose-6-phosphat. Im *C. glutamicum* Wildtyp wird die exportierte Fructose über PTS<sub>Fru</sub> und PTS<sub>Glc</sub> wiederaufgenommen, zunächst zu F-1-P und F-6-P und durch PfkB und PfkA weiter zu F-1,6-PP phosphoryliert. Die Effektormoleküle binden an SugR und verhindern so die Repression von u.a. *ptsS*. Neben F-1-P als wichtiges Effektormolekül für SugR, können auch F-6-P, G-6-P und F-1,6-P als Effektormoleküle wirken (A). In *C. glutamicum* FIMS wird die Wiederaufnahme von Fructose verhindert, was nicht nur zur Erhöhung der internen und externen Fructosekonzentration führt, sondern auch zur Abwesenheit des SugR-Effektormoleküls F-1-P und zur Verringerung des Zuflusses des Effektors F-6-P. Da die Bindung von G-6-P und F-1,6-P an SugR schwächer ist, kann ein Großteil der SugR-Moleküle an den Promotor von *ptsS* sowie *ptsI* und *ptsH* (aus Platzgründen in der Abbildung nicht gezeigt) binden und so die Expression dieser Gene verhindern. Dies bringt eine Verringerung der Saccharoseaufnahme und somit eine verringerte Wachstumsrate mit sich (B).

Um die Hypothese bestätigen zu können, dass die Abwesenheit der Effektormoleküle F-1-P und F-6-P der Grund für das Wachstumsdefizit der Fructoseaufnahme-defizienten Mutanten mit Saccharose als Substrat ist, müsste in den entsprechenden Stämmen ein Fructokinase-Gen heterolog exprimiert werden. Moon et al (2005) exprimierten in *C. glutamicum*  $\Delta ptsF$  das Gen der Fructokinase aus *Clostridium acetobutylicum*. Die entsprechende Mutante *C. glutamicum*  $\Delta ptsF$  (pXFK1\_scrK) erreichte mit Saccharose nicht nur eine höhere Zelldichte, sondern

zeigte auch ein erhöhte Wachstumsrate gegenüber der Kontrolle mit Leerplasmid. Die Wachstumsrate des Wildtyps mit Leerplasmid wurde jedoch nicht erreicht (Moon et al., 2005). Die Erhöhung des Zuflusses am Effektormolekül F-6-P könnte eine teilweise Derepression von *ptsS* durch SugR herbeigeführt haben. Bakterielle Fructokinasen generieren ausschließlich F-6-P. Die heterologe Expression eines eukaryotischen Fructokinase-Gens könnte zu einer weiteren Erhöhung der Wachstumsrate führen. Einige eukaryotische Fructokinasen können Fructose zu F-1-P, dem wichtigsten Effektor für SugR (Gaigalat et al., 2007), phosphorylieren. Als Alternative kämen zum Beispiel die humanen Ketohexokinasen KHK-A oder KHK-C in Frage (Asipu et al., 2003; Diggle et al., 2009; Trinh et al., 2009). Die Entstehung von F-1-P aus unphosphorylierter Fructose ermöglicht die Bindung des Effektors F-1-P an SugR, was eine Ablösung von SugR vom *ptsS*-Promoter mit sich brächte. Die Komplementation des Wachstumsphänotyps würde die Hypothese der Abwesenheit des wichtigsten SugR-Effektors F-1-P als Ursache für das Wachstumsdefizit weiter stützen.

Es gibt jedoch einige Hinweise darauf, dass die Repression der PTS-Gene durch SugR nicht die alleinige Ursache des defizitären Wachstums der Fructoseaufnahme-defizienten Mutanten ist. Die Deletion von *sugR* in *C. glutamicum* FIM bewirkte im Vergleich zum Wildtyp zwar eine Steigerung der Wachstumsrate, jedoch nur um etwa 60% (Abbildung 24). Durch Überexpression des Gens *ptsF* bzw. *ptsS* in *C. glutamicum* FIM konnten Saccharoseaufnahmeraten erreicht werden, die der des Wildtyps entsprachen und damit etwa fünf- bis achtmal höher sind als in *C. glutamicum* FIM (Abbildung 27). Trotz der wiederhergestellten Fähigkeit zur Saccharoseaufnahme erreichte *C. glutamicum* FIM (pXMJ19\_ptsS) eine Wachstumsrate, die nur etwa zu 60% der des Wildtyps entsprach (Abbildung 27). Dieser prozentuale Wert ist identisch mit dem der durch Deletion von *sugR* herbeigeführten Zunahme der Wachstumsrate. Bei Überexpression von *ptsF* erreichte *C. glutamicum* FI dagegen die Wachstumsrate des Wildtyps (Abbildung 16). Somit ist die Deletion von *ptsF* die Ursache für das Wachstumsdefizit der *ptsF*-defizienten *C. glutamicum* Stämme. Neben der Aufnahme von Saccharose könnte daher ein weiterer Reaktionsschritt des Saccharosestoffwechsels negativ reguliert sein, der sich durch Expression von *ptsF* aufheben lässt. Da das Wachstum von *C. glutamicum*  $\Delta$ *ptsF* auf anderen Kohlenstoffquellen wie Glucose und Acetat sowie von *C. glutamicum* FIM mit Acetat, Maltose oder Ribose nicht eingeschränkt war, käme nur die Regulation des Enzyms 1-Phosphofruktokinase (PfkB) in Betracht, welches ausschließlich bei Aufnahme von Fructose über PTS<sub>Fru</sub> erforderlich ist. Das entsprechende Gen *pfkB* wird jedoch ebenfalls durch SugR reguliert (Engels et al., 2008b) und kommt daher nicht als Target infrage. Neben SugR spielt höchstwahrscheinlich ein weiterer, bisher

unbekannter Regulator oder Regulationsmechanismus in der Regulation des Saccharosestoffwechsels eine Rolle.

Eine Möglichkeit für einen involvierten Regulationsmechanismus könnte beispielsweise ein cAMP-abhängiger Regulationsmechanismus sein. In *E. coli* sind cAMP-abhängige Rezeptor-Proteine (CRP) in die Regulation einer Vielzahl am Kohlenstoffmetabolismus beteiligter Gene involviert (Kolb et al., 1993; Körner et al., 2003). CRP bindet an den Promoter der Zielgene und agiert mit cAMP als positiven Effektor. Das Homolog zu CRP in *C. glutamicum* ist GlxR. Die genaue Funktionsweise von GlxR als Regulator im Kohlenstoffmetabolismus von *C. glutamicum* ist noch nicht vollständig aufgeklärt. GlxR spielt jedoch eine globale regulatorische Rolle im Stoffwechsel von *C. glutamicum* (Teramoto et al., 2011). Mittels *in silico* Analysen konnten mehr als 200 putative Bindestellen für GlxR identifiziert werden (Kohl et al., 2008; Kohl und Tauch, 2009). So bindet GlxR beispielsweise an die Regionen direkt *upstream* von *ptsG* und *ptsI/fruR* (Kohl et al., 2008). Es wird angenommen, dass GlxR zusammen mit anderen Regulatoren wie SugR, für die Synchronisation des zentralen Kohlenstoffwechsels verantwortlich ist (Teramoto et al., 2011). Durch direktes Eingreifen in den Kohlenstoffmetabolismus, zum Beispiel durch Deletion von  $EII_{Fru}$  und  $EII_{Glc}$ , könnte die Feinabstimmung des Regulationsnetzwerks gestört werden und ungewollte regulatorische Effekte mit sich bringen. In *E. coli* ist die enge Interaktion von  $PTS_{Glc}$  und der Synthese von cAMP als Effektormolekül für CRP bekannt (Deutscher, 2008; Park et al., 2006).

#### 5.4.4 Charakterisierung des Fructoseefflux mit *C. glutamicum* FIMS

Trotz des unerwarteten Effekts der Deletion von *ptsF* auf die Saccharoseverwertung konnte ein *C. glutamicum* Stamm generiert werden, welcher die Charakterisierung des Fructoseefflux ermöglicht. Die Relevanz der Inaktivierung der Fructoseimporter durch Deletion der Gene *ptsF*, *ptsG*, *iolT1* und *iolT2* sowie der MtlDH durch Deletion des Gens *mtlD* wurden eingehend untersucht. Die zusätzliche Überexpression von *ptsS* in dem resultierenden Stamm *C. glutamicum* FIM garantierte die konstitutive Saccharoseaufnahme. Der Stamm wurde zur Vereinfachung *C. glutamicum* FIMS (defizient in Fruktoseimport und Mannitoldehydrogenase mit Überexpression von *ptsS*) genannt. Aufgrund der durchgeführten Kontrollexperimente konnte ein Reimport von Fructose in *C. glutamicum* FIMS ausgeschlossen werden (Abschnitt 4.4.1). Die Durchführung der Messung des Fructoseefflux ohne Zugabe eines Saccharose-*Chase* erlaubte die Umrechnung der intrazellulären radioaktiven Markierung in eine Fructosekonzentration. Für die biochemische Charakterisierung des Fructoseefflux war dies von großem Vorteil.

Die Ergebnisse der Fructoseefflux-Messungen und den daraus berechneten Geschwindigkeitskonstanten in *C. glutamicum* FIMS wies eine große Konstanz auf. Unabhängig von der eingesetzten Konzentration an  $^{14}\text{C}$ -markierter Saccharose lag die Geschwindigkeitskonstante bei  $k = 0,109 \pm 0,025 \text{ min}^{-1}$ . Die durch die Methode der Silikonölzentrifugation erhaltenen Daten zum Fructoseexport des *C. glutamicum* Wildtyps wurden im Nachhinein berechnet. Auf Basis der Annahme einer Reaktion erster Ordnung ergab sich eine Geschwindigkeitskonstante  $k$  des Fructoseexports im *C. glutamicum* Wildtyp von  $0,111 \text{ min}^{-1}$  (vgl. Abbildung 6). Dieser Wert ist mit dem der Geschwindigkeitskonstanten  $k$  von *C. glutamicum* FIMS vergleichbar. Die genetischen Veränderungen, welche für die Konstruktion des Modellstamms erforderlich waren, zeigten keinen sichtbaren biochemischen Einfluss auf den Fructoseexport. Der Modellstamm *C. glutamicum* FIMS ist daher optimal für die Charakterisierung des Fructoseefflux von *C. glutamicum* geeignet.

### 5.5 Der Efflux von Fructose über *facilitated diffusion*

Eine lineare Funktion, wie sie die Exportrate in Abhängigkeit der internen Fructosekonzentration beschreibt, charakterisiert allgemein den passiven Flux eines Stoffes. Der passive Transport von Soluten durch die Membran kann entweder ohne Beteiligung eines Transmembranproteins erfolgen (einfache Diffusion), oder über einen Kanal oder Carrier. Ein passiver Efflux durch die Zellhülle ist beispielsweise für einige Aminosäuren bekannt. Beispiele für *C. glutamicum* sind die Diffusion der hydrophoben verzweigt-kettigen Aminosäuren Isoleucin, deren Efflux mit einer Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung  $k = 0,08 \text{ min}^{-1}$  abläuft, sowie Phenylalanin ( $k = 0,45 \text{ min}^{-1}$ ) (Krämer et al., 1994; Zittrich und Kämer, 1994). Auch in anderen Organismen wie *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (auch *Streptococcus cremoris*) und *E. coli* wurde die Membranpermeabilität von Aminosäuren, beispielsweise von Tyrosin, Prolin und Alanin, nachgewiesen (Driessen et al., 1987; Milner et al., 1987). Die Diffusion durch die Zellhülle ist ungerichtet und direkt abhängig vom Konzentrationsgradienten. Bei einer intrazellulären Konzentration von ungefähr 170 mM wird die ungeladene Aminosäure Threonin zu 59% über den Transporter ThrE, zu 19% über einen zweiten bisher unbekanntem Carrier exportiert und gelangt zu 22% passiv durch die Membran (Palmieri et al., 1996). Die chemischen Eigenschaften von Fructose schließen die einfache Diffusion durch die Membran jedoch aus. Im Gegensatz zu hydrophoben Aminosäuren sind hydrophile Zucker nicht in der Lage passiv durch die Membran zu diffundieren. Die Zelle ist daher auf ein Transportprotein für den Import und Efflux in die und aus der Zelle angewiesen.

Aufgrund der kinetischen Eigenschaften des Fructoseexports ist der passive Efflux von Fructose durch einen oder mehrere Kanäle oder Carrier (*facilitated diffusion*) denkbar. Eine alternative Möglichkeit zum passiven Efflux wäre ein primär aktiver Transport sowie Symport oder Antiport von Fructose mittels eines Carriers mit einem sehr hohen  $K_m$ . In diesem Fall würde die Exportrate in Abhängigkeit der Fructosekonzentration im Bereich der physiologischen internen Konzentration an Fructose als Gerade erscheinen und kein Abflachen des Verlaufs sichtbar sein. Die Unterscheidung der Energieabhängigkeit eines Transports *in vivo* ist durch Anwendung von Entkopplern der Atmungskette oder Ionophoren möglich.

Durch Zugabe des Kaliumionophors Valinomycin wurde die Höhe des elektrochemischen Kaliumpotentials beeinflusst. Es zeigte sich jedoch keine Auswirkung auf den Fructoseefflux (Abbildung 39). Valinomycin führt, bei entsprechend hohen externen Kaliumkonzentrationen [50 mM], direkt nach Zugabe zu einem Zusammenbruch des Membranpotenzials. Der entsprechende Versuch zeigte, dass der Export von Fructose von der Zugabe von Valinomycin unabhängig verläuft. Der Transportvorgang für Fructose ist demnach unabhängig vom Membranpotenzial. Der Export anderer Substanzen in *C. glutamicum*, wie zum Beispiel der der Aminosäure Isoleucin über den Exporter BrnFE, lässt sich dagegen durch Zugabe von Valinomycin inhibieren (Ebbighausen et al., 1989; Kennerknecht et al., 2002). Die Zugabe von Valinomycin führte dabei zu einer drastischen Reduzierung des Membranpotenzials von -165 zu -40 mV, einhergehend mit einem Abbruch des Isoleucinexports sowie einer deutlichen Zunahme der intrazellulären Konzentration. Da die Zugabe von Valinomycin in *C. glutamicum* keinen Einfluss auf den Export von Fructose zeigte, ist der Fructoseexport in Abhängigkeit des Membranpotenzials auszuschließen. Ein ATP-abhängiger Export von Fructose könnte durch Zugabe von CCCP, einem Entkoppler der Atmungskette, untersucht werden. Beispiele für einen ATP-abhängigen Export sind die Polysaccharid-exportsysteme der gramnegativen Bakterien *E. coli*, *Haemophilus influenzae* und *Neisseria meningitidis* (Reizer et al., 1992).

Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Daten zum Export von Fructose sprechen jedoch für den Export mittels *facilitated diffusion*. Dabei handelt es sich um einen passiven Transportprozess (Uniport) unter Einbindung einer Permease. Durch eine begrenzte Menge an Transportprotein ist die Transportrate limitiert (Ebel, 1985). Der Efflux von Fructose würde durch den Konzentrationsquotienten an intra- und extrazellulärer Fructose beeinflusst. Ein Beispiel für *facilitated diffusion* ist das Aquaglyceroporin GlpF aus *E. coli* welches Wasser und Glycerin durch die innere Cytoplasmamembran schleust (Heller et al., 1980; Stroud et al., 2003a; Stroud et al.,

2003b). Im Gegensatz zu eukaryotischen Organismen ist in Prokaryoten über den Zuckertransport durch *facilitated diffusion* wenig bekannt. In *Arabidopsis* erfolgt beispielsweise der Efflux von Fructose aus der Vakuole über die SWEET-Homologe 16 und 17 durch *facilitated diffusion* (Chardon et al., 2013; Klemens et al., 2013). Hefen weisen ebenso eine Vielzahl an Zuckertransportern auf, die den Transport von Monosacchariden wie Glucose, Fructose, Mannose oder Galactose über *facilitated diffusion* katalysieren (Lagunas, 1993). Ein bekanntes prokaryotisches Beispiel ist der Import von Glucose und Fructose im gramnegativen Bakterium *Zymomonas mobilis* über den Glucose-Facilitator GLF (DiMarco und Romano, 1985; Struch et al., 1991). Der Konzentrationsgradient der Zucker wird durch direkte cytoplasmatische Phosphorylierung durch spezifische Kinasen aufrechterhalten (Doelle, 1982; Scopes et al., 1985; Weisser et al., 1995). GLF zeigt eine niedrige Affinität, aber eine hohe Kapazität, und transportiert neben Glucose auch Fructose, Xylose und Glucoseanaloga (DiMarco und Romano, 1985; Schoberth und de Graaf, 1993; Struch et al., 1991; Weisser et al., 1995). Ein weiteres Beispiel ist der Glucosetransport im grampositiven Bakterium *Streptococcus bovis*, welches Glucose neben einem hochaffinen PTS, mit geringer Affinität aber hoher Kapazität, ebenso über *facilitated diffusion* aufnehmen kann (Russell, 1990). Die Verdopplungszeit von *Streptococcus bovis* beträgt unter optimalen Bedingungen 13 Minuten (Russell und Baldwin, 1979). Dies setzt eine Glucoseaufnahme von 1,5  $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$  Protein voraus, welche allein durch die Importrate über das Glucose-PTS (100  $\text{nmol}/\text{min}\cdot\text{mg}$  Protein) nicht bewerkstelligt werden kann (Martin und Russell, 1987; Russell, 1990). Bei hohen Konzentrationen und einem entsprechenden Konzentrationsgradienten bietet der Glucosetransport über *facilitated diffusion* demnach einen Vorteil gegenüber Carrier-vermittelten Transport.

Die hohen internen Fructosekonzentrationen, wie sie für *C. glutamicum* bei Wachstum mit Saccharose auftreten, würden den Transport von Fructose über einen Kanal oder Carrier (*facilitated diffusion*) durchaus ermöglichen. Durch Wiederaufnahme der Fructose über ein PTS wird der Konzentrationsgradient aufrechterhalten. Ein Hinweis, welcher die Hypothese des Fructoseefflux durch *facilitated diffusion* in *C. glutamicum* stützt, ist die Endkonzentration an intrazellulärer Fructose nach Erreichen der maximalen Zelldichte mit Saccharose als Substrat, welche sich in den Fructoseaufnahme-defizienten Stämmen und dem *C. glutamicum* Wildtyp unterscheidet. Im *C. glutamicum* Wildtyp ist nach Erreichen der stationären Phase intrazellulär nahezu keine Fructose mehr detektierbar (Abbildung 28 A). Die Messung des Verlaufs der internen Fructosekonzentration nach Zugabe von 300  $\mu\text{M}$  Saccharose mit dem *C. glutamicum* Wildtyp bestätigt den vollständigen Export von Fructose (Abbildung 6). In dem Fructoseimporter-defizienten Stamm *C. glutamicum*

FIMS sind nach Beendigung des Wachstums intern dagegen noch immer etwa 55 mM Fructose im Cytoplasma messbar (Abbildung 28 B). Extern können zu diesem Zeitpunkt 47 mM Fructose detektiert werden. Eine ähnlich hohe interne Fructoseakkumulation intern und extern ist auch für einen Großteil der Mutanten putativer Zuckerexporter im Stammhintergrund *C. glutamicum* FIMS zu beobachten (Abbildung 46 und Abbildung 47). Die Tatsache, dass minimal ein Gleichstand an intra- und extrazellulärer Konzentration erreicht wird, spricht dafür, dass lediglich der Konzentrationsgradient einen Einfluss auf den Export von Fructose hat. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese des Fructoseexports in *C. glutamicum* durch *facilitated diffusion*.

Ein weiterer Beleg für den Export von Fructose mittels *facilitated diffusion* ist der deutliche Konzentrationsunterschied an interner Fructose von *C. glutamicum* Wildtyp und *C. glutamicum* FIMS mit Saccharose als Substrat. Schon eine geringe Erhöhung der externen Fructosekonzentration in *C. glutamicum* FIMS führt dazu, dass die intrazelluläre Konzentration an Fructose gegenüber dem Wildtyp deutlich erhöht ist. Dies lässt sich nur durch Efflux über einen vom Konzentrationsquotienten abhängigen Carrier (*facilitated diffusion*) begründen, nicht aber durch Efflux über einen von der Konzentrationsdifferenz abhängigen Kanal (Diffusion). Im Wildtyp akkumulieren, bei normaler Osmolalität des Mediums, während des Wachstums mit Saccharose intrazellulär bis zu 100 mM Fructose (Abbildung 28 A). Die Ursache für diese hohen Werte ist unter anderem ein gegenüber der Saccharoseaufnahme deutlich verringerter Fructoseexport (vgl. Abschnitt 5.7). Im Vergleich zum Wildtyp ist die intrazelluläre Fructosekonzentration in *C. glutamicum* FIMS erhöht. Die maximal erreichten internen Werte sind dabei abhängig von der Höhe der externen Konzentration an Fructose. In Wachstumsversuchen mit 2% Saccharose als Kohlenstoffquelle akkumulieren im *steady-state* intern etwa 190 mM Fructose (Abbildung 28 B). In den Saccharoseaufnahme-Versuchen zur Messung des Fructoseefflux akkumulieren bei Zugabe von 300  $\mu$ M Saccharose dagegen intrazellulär nur etwa 120 mM Fructose (vgl. beispielsweise Abbildung 36 A und Abbildung 38). Diese Differenz ist höchstwahrscheinlich auf den Unterschied der externen Fructosekonzentration in den verschiedenen Versuchstypen zurückzuführen. Bei Erreichen des Maximalwerts von 120 mM in den Saccharoseaufnahme-Versuchen beträgt die externe Konzentration an Fructose etwa 300  $\mu$ M (Abbildung 36 A). In den Wachstumsversuchen mit 2% Saccharose sind über die Zeitspanne des *steady-state*-Levels im Bereich von 190 mM (nach 4 bis 7 Stunden Wachstums) extern 5,5 bis 17,1 mM Fructose detektierbar. Innerhalb eines Versuchstyps sind die maximal erreichten Fructosekonzentrationen konsistent.

Die Differenz der internen Fructosekonzentration des *C. glutamicum* Wildtyps mit 100 mM und *C. glutamicum* FIMS mit etwa 190 mM ist möglicherweise zum Teil auf die Deletion des Gens der Mannitoldehydrogenase zurückzuführen. Die alleinige Deletion von *mtlD* führte bereits zu einer leicht erhöhten intrazellulären Fructosekonzentration von *C. glutamicum*  $\Delta mtlD$  (Abbildung 19 C). Einen größeren Einfluss auf die interne Konzentration an Fructose übt jedoch höchstwahrscheinlich die verstärkte Akkumulation von Fructose im Medium aus. Der Verlust der Fructoseaufnahme führte in den entsprechenden Mutanten zu einer externen Akkumulation von etwa 57 mM Fructose. In den Wachstumsversuchen mit 2% Saccharose war im Medium von *C. glutamicum* FIMS bereits direkt nach Versuchsbeginn Fructose detektierbar (Abbildung 28 B). Im *C. glutamicum* Wildtyp konnte Fructose erst nach 2,5 h detektiert werden (Abbildung 5). Die Differenz der externen Fructosekonzentration zwischen *C. glutamicum* FIMS und Wildtyp betrug zu diesem Zeitpunkt etwa 3 mM. Die Auswirkung dieses Konzentrationsunterschiedes auf die interne Fructoseakkumulation war drastisch: Im Wildtyp waren zu diesem Zeitpunkt intrazellulär 68 mM Fructose messbar, in *C. glutamicum* FIMS etwa doppelt so viel (145 mM). Diese Daten stützen die Hypothese, dass der Efflux von Fructose direkt von der externen Konzentration an Fructose abhängig ist und über *facilitated diffusion* erfolgt. Der Uniport über einen Carrier wird durch den Konzentrationsquotienten dominiert. Das führt dazu, dass schon eine moderate Erhöhung der externen Fructosekonzentration eine drastische Rückwirkung auf den Export von Fructose mit sich bringt. Somit ließe sich die im Gegensatz zum Wildtyp deutlich erhöhte interne Fructosekonzentration in *C. glutamicum* FIMS erklären. Im Unterschied zum Transport über einen Carrier, folgen freie Diffusion und Permeation über einen Kanal der Konzentrationsdifferenz einer Substanz. Dabei müsste eine deutliche Erhöhung der Konzentration auf der *trans*-Seite des Transports eintreten, um zu ähnlichen Rückwirkungen auf den Export von Fructose zu führen.

Die im Rahmen der Fructoseefflux-Messungen ermittelten Daten deuten darauf hin, dass Fructose erst ab einer internen Konzentration von etwa 5 mM exportiert wird. Bei der Bestimmung der ermittelten Geraden zum Fructoseefflux durch Legen einer Ausgleichsgeraden zeigt sich, dass unterhalb einer Konzentration von 4,5 mM kein Export stattfindet (Abbildung 32). Diese Beobachtung konnte mittels einer alternativen Auswertungsmöglichkeit, durch Fitting der abnehmenden Fructosekonzentration (vgl. Abschnitt 4.4.1), bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass es sich bei dem Exporter für Fructose um einen wenig affinen Transporter handelt. Physiologisch bringt ein wenig affines Exportsystem für Fructose und ein langsamer Export weder einen Vorteil, noch einen Nachteil für *C. glutamicum*, da das aus S-6-P generierte G-6-P zum Wachstum zur

Verfügung steht. Zudem bietet ein Export durch *facilitated diffusion* und Wiederaufnahme über  $\text{PTS}_{\text{Fru}}$  auch energetisch keinen Nachteil gegenüber der intrazellulären Phosphorylierung von Fructose. Allein die Konkurrenz durch andere Bakterien in der Umgebung wäre ein Nachteil der Exkretion eines solch energetisch wertvollen Metabolits.

## 5.6 Ein kinetisches Modell zur Beschreibung des Fructoseexports

Im Rahmen der Etablierung der *Pulse-Chase*-Messmethode beziehungsweise der Saccharoseaufnahme-Versuche zur Messung des Fructoseefflux von *C. glutamicum* FIMS wurde, trotz gleicher Geschwindigkeitskonstante  $k$  des Efflux, eine Variabilität der Kurvenverläufe der internen Fructosekonzentration beobachtet. Dabei war die Fructosekonzentration sowohl von der eingesetzten Konzentration an Saccharose abhängig, als auch von der Zelldichte und der Saccharoseaufnahme rate (Abbildung 32 und Abbildung 35). Die Entwicklung eines kinetischen Modells für den Fructoseexport ermöglichte die Modellierung der Stoffflüsse während des Wachstums mit Saccharose (Abschnitt 4.4.2). Das Modell beruht auf Einbeziehung verschiedener Parameter, die unter anderem die Aufnahme von Saccharose und den Export von Fructose betreffen. Dazu zählen die kinetischen Parameter der Saccharoseaufnahme, die sich durch ein Michaelis-Menten-Modell beschreiben lässt. So fließen die experimentell bestimmten Werte für  $K_m$  und  $V_{\max}$  der Saccharoseaufnahme in das Modell mit ein. Für den Fructoseefflux wird zudem eine Reaktion erster Ordnung angenommen. Des Weiteren wird die Hydrolyse von Saccharose-6-phosphat in Glucose-6-phosphat und Fructose als zeitlicher Schritt vernachlässigt, da die Spaltung durch ScrB keinen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt. Durch Einbezug der variablen Zellvolumina und unter Berücksichtigung der Änderung der Stoffkonzentrationen über die Zeit, lassen sich die externen Saccharose- und Fructosekonzentration sowie der Verlauf der internen Fructosekonzentration mit dem Modell abbilden (Abschnitt 4.4.2). Der Vergleich der Daten aus Experiment und Modellierung ergab eine bemerkenswerte Übereinstimmung der Konzentrationsverläufe (Abbildung 36). Die Annahme einer Reaktion erster Ordnung für den Fructoseefflux ist demnach plausibel. Die Verwendung des Modells trug zur Verbesserung des Verständnisses des Kurvenverlaufs und der internen Fructosekonzentration bei und diente der Unterstützung bei der Deutung der Daten aus den *Pulse-Chase*-Messungen und der Saccharoseaufnahme-Versuche zur Messung des Fructoseefflux mit spezifisch am Fructosemolekül  $^{14}\text{C}$ -markierter Saccharose.

Zur Identifikation des Fructoseexportsystems wurden sowohl Kurzzeitmessungen mit radioaktiv markierter Saccharose, als auch Langzeitaufzeichnungen mit unmarkierter Saccharose für die Bestimmung der internen Fructosekonzentration durchgeführt. Diese Untersuchungen sollten Aufschluss über die Beteiligung ausgewählter Transportsysteme auf den Fructoseefflux geben. Das Modell bestätigt, dass eine Erhöhung der internen Fructosekonzentration nicht nur auf einen verringerten Efflux von Fructose zurückzuführen ist (Abschnitt 4.4.2 und Abbildung 35). Die Steigerung der eingesetzten Saccharosekonzentration und/oder der Saccharoseaufnahme sowie die Verringerung der Geschwindigkeitskonstanten  $k$  des Efflux und/oder der Zelldichte bewirken jeweils eine Erhöhung der internen Konzentration an Fructose. Die Höhe der internen Fructosekonzentration ist demnach von einer Vielzahl an Parametern abhängig. Aufgrund dessen ist eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration kein alleiniges Indiz dafür, dass ein getestetes Target am Efflux von Fructose beteiligt ist. Um die Beteiligung eines Targets am Fructoseexport abzusichern, war die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten  $k$  des Efflux mit  $^{14}\text{C}$ -markierter Saccharose essenziell.

Die Modellierung des Fructoseefflux ermöglicht auch die Berechnung der maximal erreichbaren internen Fructosekonzentration. Unter Annahme der für *C. glutamicum* FIMS ermittelten Geschwindigkeitskonstanten des Fructoseefflux von  $0,109 \pm 0,025 \text{ min}^{-1}$  ergibt sich ein Maximalwert von etwa 190 mM, der durch Änderung der oben genannten Parameter nicht überschritten werden kann. Bei Wachstum von *C. glutamicum* FIMS mit 58 mM Saccharose (entspricht 2%) liegt die *steady-state*-Fructosekonzentration tatsächlich bei etwa 190 mM (Abbildung 28 B). Die Fructosekonzentrationen können sich zudem durch Erhöhung der externen Osmolalität steigern. Die Osmolalität des Mediums stellte kein Parameter des kinetischen Modells dar. Die Ursache für die Erhöhung der internen Fructosekonzentration in Abhängigkeit der Osmolalität wird in Abschnitt 5.8 eingehend diskutiert.

Eine Ausnahme, bei der die interne maximale Fructosekonzentration den Wert von 190 mM bei normaler Osmolalität übersteigt, bilden die Saccharoseaufnahme-Experimente zur Bestimmung des Fructoseefflux mit 1 mM Saccharose (Abbildung 42 und Abbildung 43). Auch bei normaler Osmolalität des Mediums liegen die Fructose-*steady-state*-Level dabei im Bereich von 300 mM. Der Grund für die Erhöhung der maximalen Fructosekonzentration in diesen Messungen ist nicht bekannt. Die Bestimmung der Saccharoseaufnahme im Rahmen dieser Versuche ergab keine signifikante Steigerung im Vergleich zu anderen Versuchen mit *C. glutamicum* FIMS

(Daten nicht gezeigt). Eine Änderung der Saccharoseaufnahme kann demnach als Ursache ausgeschlossen werden.

## 5.7 Regulation des Fructoseexports

Bei Wachstum des *C. glutamicum* Wildtyps mit Saccharose als Kohlenstoffquelle akkumulierten intrazellulär hohe Mengen an Fructose. In den ersten 4,5 Stunden nach Beginn der Kultivierung nimmt die Fructosekonzentration konstant zu und erreicht einen Wert von bis zu 100 mM (Abbildung 28 A). Die Akkumulation von Fructose könnte zwei verschiedene Ursachen haben. Eine Möglichkeit ist, dass der Exporter erst bei Wachstum mit Saccharose induziert wird. Die andere Möglichkeit wäre, dass der Import von Saccharose, sowie die Umsatzrate der Saccharose-6-phosphat Hydrolase ScrB, deutlich schneller als der Export von Fructose vorstättgehen müssten. Um erstere Möglichkeit zu überprüfen, wurde untersucht ob der Fructoseefflux einer Regulation unterliegt. In Abschnitt 5.4.3 wurde bereits ausführlich beschrieben, dass der Kohlenstoffmetabolismus durch ein komplexes Regulationsnetzwerk reguliert wird. Da der Export von Fructose einen obligaten Teil des Saccharosestoffwechsels darstellt, wäre die Regulation des/der am Export beteiligten Transporter durchaus denkbar. Die Nutzung von Saccharose als Substrat ist in *C. glutamicum* unter anderem durch die Repression von *ptsS* durch DeoR-Regulator SugR reguliert. Die Untersuchung des Fructoseexports in einer *sugR*-Deletionsmutante ergab jedoch, dass die Geschwindigkeitskonstante  $k$  des Fructoseefflux von *C. glutamicum* FIM  $\Delta$ *sugR* identisch zum Vergleichsstamm *C. glutamicum* FIMS war (Abschnitt 4.4.3). Bei Kultivierung von *C. glutamicum* FIMS mit Acetat oder in Vollmedium konnte ebenfalls kein Unterschied der Geschwindigkeitskonstanten beobachtet werden (Abbildung 38 und Abbildung 54). Die Regulation des Fructoseexports ist somit unwahrscheinlich. Aufgrund dieser Daten scheint der Fructoseexporter konstitutiv exprimiert.

Die zweite Hypothese wurde mit dem kinetischen Modell überprüft. Der  $V_{\max}$  der Saccharoseaufnahme im *C. glutamicum* Wildtyp beträgt  $37,3 \pm 8,4$  nmol/min\*mg TG. Der geringe  $K_m$ -Wert für Saccharose von  $18,2 \pm 2,2$   $\mu$ M ermöglicht die Aufnahme von Saccharose über einen Großteil der Kultivierungszeit im Bereich des  $V_{\max}$ . Auf Basis des kinetischen Modells zum Fructoseexport ergibt sich, dass bei der im *C. glutamicum* Wildtyp maximal erreichten, internen Konzentration an Fructose von 100 mM, die Fructoseeffluxrate bei etwa 17 nmol/min\*mg TG liegt. Der Export von Fructose ist demnach signifikant langsamer als der Import von Saccharose. Ursache für die hohen internen Fructosewerte bei Wachstum mit Saccharose muss demnach die Differenz zwischen Saccharoseaufnahme- und Fructoseexportrate sein.

## 5.8 Der Efflux von Fructose über mechanosensitive Kanäle

Auf die Änderung der externen Osmolalität reagiert *C. glutamicum* durch Efflux oder Akkumulation osmotisch wirksamer Solute, um ein Ein- bzw. Ausströmen von Wasser zu vermeiden. Bei hyperosmotischen Bedingungen erfolgt die Akkumulation kompatibler Solute durch Aufnahme und/oder Biosynthese, um die interne Osmolalität zu erhöhen (Poolman und Glaasker, 1998). So wird zum Beispiel das kompatible Solut Glycin-Betain über den hochaffinen sekundär aktiven Transporter BetP importiert (Rübenhagen et al., 2000). Die Feinabstimmung der internen Betainkonzentration unter hyperosmotischen Bedingungen erfolgt in Zusammenspiel des Transporters BetP mit den osmoregulierten mechanosensitiven Kanälen MscCG und MscL (Börngen et al., 2010; Nottebrock et al., 2003). Untersuchungen zum Substratspektrum der mechanosensitiven Kanäle in *C. glutamicum* zeigten, dass diese eine relativ hohe Substratspezifität aufweisen (Ruffert et al., 1997). Bei einem hypoosmotischen Schock werden bevorzugt Glycin-Betain und Prolin ins Medium entlassen, wohingegen der Efflux der Moleküle ähnlicher Größe, wie Glutamat oder Lysin, eingeschränkt ist (Ruffert et al., 1997).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Fructose bei einem hypoosmotischen Schock die Zelle über mechanosensitive Kanäle verlässt (Abbildung 40). Das Disaccharid Trehalose wird in Folge einer plötzlichen Abnahme der extrazellulären Osmolalität nicht über mechanosensitive Kanäle exportiert (Eck, 2014). Die Deletion der Gene beider bisher bekannten mechanosensitiven Kanäle, MscCG und MscL, führte in der entsprechenden Mutante *C. glutamicum*  $\Delta mscCG \Delta mscL$  zu keiner Erhöhung der intrazellulären Fructoseakkumulation (Abschnitt 4.5.2). Da angenommen wird, dass noch mindestens ein weiterer unbekannter mechanosensitiver Kanal existiert (Nottebrock et al., 2003), spricht dieses Ergebnis nicht gegen die physiologische Relevanz der mechanosensitiven Kanäle am Fructoseefflux.

Der physiologische Einfluss der mechanosensitiven Kanäle am Efflux von Fructose bestätigt sich aus den Ergebnissen der Versuche, bei denen sich die Fructose-*steady-state*-Konzentration in Abhängigkeit der Osmolalität des Mediums einstellt (Abbildung 42 und Abbildung 43). Bei Änderung der externen Osmolalität zeigt die Zelle ein *fine-tuning* der intrazellulären Osmolytkonzentration, welche mit der Öffnungswahrscheinlichkeit der mechanosensitiven Kanäle einhergeht (Börngen et al., 2010). Bei Wachstum des *C. glutamicum* Wildtyps bei erhöhter Osmolalität, in CgC-Medium mit 150 mM NaCl und 2% Saccharose als Substrat (0,647 osmol/kg) erreichte der Wildtyp eine Fructosekonzentration von 160 mM. Diese ist um etwa

60 mM höher als bei Wachstum mit CgC-Medium ohne Zugabe von NaCl (0,423 osmol/kg) (Abbildung 41 A und Abbildung 28 A). Trotz der hohen internen Fructosekonzentration zeigt der *C. glutamicum* Wildtyp keine Beeinträchtigung der Wachstumsrate. Die interne Konzentration an Fructose von bis zu 160 mM ist bei hoher externer Osmolalität offenbar tolerierbar. In diesem Zusammenhang scheint Fructose für *C. glutamicum* als kompatibles Solut wirken zu können. Bei einer hyperosmotischen Stressantwort wurde für *C. glutamicum* bisher die Akkumulation osmotisch aktiver Substanzen wie K<sup>+</sup>-Ionen, Glycin-Betain, Prolin, Glutamat, Ectoin und Trehalose gezeigt (Farwick et al., 1995; Frings et al., 1993; Guillouet und Engasser, 1995a; Guillouet und Engasser, 1995b). Dennoch können allgemein, neben dem Disaccharid Trehalose, auch die Monosaccharide Glucose und Fructose als kompatible Solute agieren. So nutzen einige nicht- und schwach-halophile Bakterien neben K<sup>+</sup>-Ionen und Aminosäuren auch Saccharose, Fructose, Glucose und Trehalose zur Osmoregulation (Detkova und Boltyanskaya, 2007).

In Saccharoseaufnahme-Experimenten zur Messung des Fructoseefflux konnte die direkte Abhängigkeit der Fructose-*steady-state*-Level zur externen Osmolalität mit *C. glutamicum* FIMS gezeigt werden (Abbildung 42 und Abbildung 43). Die bei moderat erhöhter Osmolalität gesteigerten *steady-state*-Level sind auf eine verringerte Öffnungswahrscheinlichkeit der mechanosensitiven Kanäle zurückzuführen. Die Erhöhung der Osmolalität auf 0,650 osmol/kg und 0,587 osmol/kg mit NaCl bzw. der Puffersubstanz MOPS brachte eine Erhöhung der maximal erreichten internen Fructosekonzentration mit sich. Der Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten *k* des Fructoseefflux zeigte keine Verringerung in Abhängigkeit der steigenden externen Osmolalität. Die weitere, deutliche Erhöhung der externen Osmolalität des Wachstumsmediums mit 300 bzw. 400 mM NaCl auf 0,9 bzw. 1 osmol/kg geht jedoch mit einer Verringerung der Geschwindigkeitskonstanten *k* auf 0,076 bzw. 0,019 min<sup>-1</sup> einher. Der deutlich verringerte Efflux von Fructose bei einer Osmolalität von über 0,9 osmol/kg ist höchstwahrscheinlich nicht nur auf einen Verschluss der mechanosensitiven Kanäle zurückzuführen, sondern auch auf eine Inhibition des spezifischen Exportsystems für Fructose. Die Inhibition von Transportsystemen aufgrund einer drastischen Steigerung der externen Osmolalität ist durchaus bekannt. Der Transport von Glycerol und Xylitol mittels *facilitated diffusion* sowie die Aufnahmefähigkeit einer Vielzahl von Zucker- und Aminosäuretransportern wird in *E. coli*, unabhängig von der Transporterklasse und der Energieabhängigkeit des Transports, durch eine plötzliche Erhöhung der Osmolalität des Mediums in Sekundenschnelle inhibiert (Grothe et al., 1986; Houssin et al., 1991; Roth et al., 1985a; Roth et al., 1985b). Der MFS-Transporter ProP aus *E. coli* ist ein Prolin/Betain-Aufnahmesystem, welches die Aufnahme der kompatiblen Solute als Antwort auf

osmotischen Stress katalysiert (Culham et al., 1992; Milner et al., 1988). Bei einer externen NaCl-Konzentration von 200 mM erreicht ProP seine optimale Aktivität. Eine Erhöhung der externen Konzentration auf 500 mM NaCl bringt eine vollständige Inhibition der Prolinaufnahme mit sich (MacMillan, 1998; Wood, 1999).

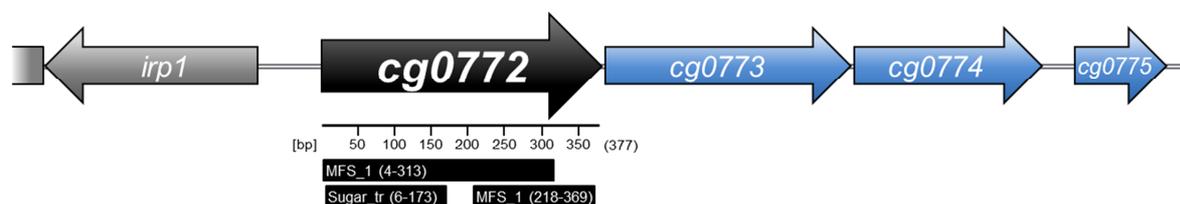
Die Untersuchungen des Einflusses der mechanosensitiven Kanäle zeigen, dass der Export von Fructose sowohl über einen spezifischen Transport durch *facilitated diffusion* über einen Carrier, als auch in Abhängigkeit der externen Osmolalität mittels unspezifischen Efflux über mechanosensitive Kanäle erfolgt. Die Erhöhung der externen Osmolalität führt zu einer Verringerung des Fructoseefflux über mechanosensitive Kanäle.

### 5.9 Cg0772 als Hauptakteur des Fructoseefflux in *C. glutamicum*

Das Wissen über prokaryotischen Zuckerausport ist rar. Um einen Anhaltspunkt für putative Targets zur Identifikation des Fructoseexporters zu erhalten, wurde, ausgehend von den Aminosäuresequenzen bekannter und putativer Zuckerausporter aus *E. coli*, eine gerichtete BLASTP-Homologiesuche durchgeführt. Bei den bekannten (putativen) Zuckerausportern aus *E. coli* handelt es sich durchweg um MFS-Transporter, unter anderem aus der Familie der *Sugar Efflux Transportern* (SET) und der *Sugar Porter* (SP) (Carolé et al., 1999; Koita und Rao, 2012; Liu et al., 1999a; Liu et al., 1999b). Die hoch konservierten Sugar Porter transportierten ihr Substrat entweder durch Uniport oder H<sup>+</sup>-Symport (Saier, 2000a). Da der Efflux von Fructose in *C. glutamicum* höchstwahrscheinlich mittels Uniport (*facilitated diffusion*) erfolgt (Abschnitt 5.5), war die Targetsuche auf Basis der MFS-Transporter aus *E. coli* eine Möglichkeit um in *C. glutamicum* potentielle Zuckerausporter zu identifizieren. Die Homologiesuche ergab 18 Kandidaten putativer Zuckerausportsysteme in *C. glutamicum*. Die jeweiligen Gene wurden in *C. glutamicum* FIM und im Modellstamm *C. glutamicum* FIMS inaktiviert. Bei fünf Kandidaten führte die Inaktivierung zu einer Verminderung der Wachstumsrate und/oder zu einer Erhöhung der maximal erreichten internen Konzentration an Fructose bei Wachstum mit Saccharose als Substrat (Abschnitt 4.6.2). Die Messung des Fructoseexports der *C. glutamicum* FIMS Mutanten mit Inaktivierung der Targetgene *cg0206*, *cg0501*, *cg0772*, *cg1289*, *cg1526* und *cg3395* ergab allein für *C. glutamicum* FIMS IMcg0772 einen signifikanten Unterschied der Geschwindigkeitskonstanten *k* des Fructoseefflux im Vergleich zum Ausgangsstamm *C. glutamicum* FIMS (Abbildung 48). In den entsprechenden Saccharoseaufnahmemessungen zum Fructoseefflux zeigte *C. glutamicum* FIMS IMcg0772, neben einer drastisch verringerten Fähigkeit zum Fructoseexport, zusätzlich eine erhöhte interne Fructosekonzentration

(Abbildung 46, Abbildung 47 B und Abbildung 48). Die Geschwindigkeitskonstante  $k$  von *C. glutamicum* FIMS IMcg0772 war mit  $0,065 \pm 0,022 \text{ min}^{-1}$  im Vergleich zum Ausgangsstamm mit  $k = 0,109 \pm 0,025 \text{ min}^{-1}$  signifikant reduziert. Zusätzlich ergab sich eine durchschnittliche Steigerung der internen Fructosekonzentration von etwa 38% (Abbildung 49). Aufgrund dieser Daten wurde die Relevanz von Cg0772 an der Beteiligung des Fructoseexports eingehender untersucht.

Das Gen *cg0772* codiert für einen Transporter der *Major Facilitator Superfamily* (MFS). Es ist im Genom von *C. glutamicum* als *Sugar Efflux Permease* annotiert. Diese Annotierung beruht auf der bioinformatischen Analyse mittels *Pfam* (*Protein Families*) (27.0) (Finn et al., 2014; Sonnhammer et al., 1997), welche in der Gensequenz von *cg0772* ein Sequenzmotiv für einen Zucker-Exporter identifizierte. *Downstream* von *cg0772* befinden sich im Genom in direkter Nachbarschaft drei unbekannte Proteine, von denen zwei als putative Membranproteine annotiert sind (Abbildung 56). *Upstream* sind die Gene für einen  $\text{Fe}^{3+}$ -ABC-Transporter lokalisiert. Die Bestimmung der Proteintopologie mit TMHMM (Krogh et al., 2001) für Cg0772 ergab zwölf Intermembrandomänen, vergleichbar mit der Lactosepermease LacY aus *E. coli* (Calamia und Manoil, 1990), der am besten charakterisierte Transporter der *Major Facilitator Superfamily*.



**Abbildung 56. Lokalisation von *cg0772* im Genom von *C. glutamicum*.** Das Gen *cg0772* hat eine Größe von 377 bp und befindet sich *downstream* des Operons eines ABC-Transporters für  $\text{Fe}^{3+}$  sowie *upstream* eines unbekannten Proteins (*cg0773*), und zwei putativer Membranproteine (*cg0774* und *cg0775*). Die Vorhersage von Aminosäuresequenzmotiven mittels *Pfam* (27.0) (Finn et al., 2014; Sonnhammer et al., 1997) ergab die Existenz eines Zuckertransporter-Motivs (*Sugar\_tr*, 6-173 bp) sowie zwei Motive für einen Transporter der Major Facilitator Superfamily (MFS) (*MFS\_1*, 4-313 und 218-369 bp).

Die Untersuchung der Mutante *C. glutamicum* FIMS IMcg0772 ergab einen signifikanten Einfluss der Inaktivierung von *cg0772* auf die Wachstumsrate, die Fructoseakkumulation und die Geschwindigkeitskonstante des Fructoseefflux bei Wachstum mit Saccharose als Kohlenstoffquelle (Abschnitt 4.6.2 und 4.6.3). Der Verlauf der internen Fructosekonzentrationen wies für *C. glutamicum* FIMS IMcg0772 zwei verschiedene Profile auf, welche in gleicher Häufigkeit auftraten (Abbildung 47 B und C). Das eine Profil zeigt einen über den gesamten Kultivierungszeitraum konstant erhöhte Fructoseakkumulation. Im zweiten Profil zeigt sich nach

3,5 Stunden ein Optimum von etwa 165 mM, gefolgt von einer rapiden Abnahme der internen Fructosekonzentration auf 5 bis 15 mM. Ein solcher Verlauf könnte für die Expression eines weiteren Exporters für Fructose sprechen, induziert durch eine gesteigerte interne Konzentration an Fructose. Die Expression eines zweiten Exportsystems, herbeigeführt durch die chromosomale Inaktivierung von *Cg0772*, könnte die Schwankung bei der Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten  $k$  des Fructoseefflux für *C. glutamicum* FIMS IMc*g0772* erklären. Die Saccharoseaufnahme-Versuche zur Messung des Fructoseefflux wurden mit Zellen aus der exponentiellen Phase durchgeführt, nach etwa vierstündigem Wachstum mit Saccharose als Kohlenstoffquelle. Die Geschwindigkeitskonstanten  $k$  lagen zwischen  $0,023 \text{ min}^{-1}$  und  $0,099 \text{ min}^{-1}$ , wobei der Median mit  $0,071 \text{ min}^{-1}$  berechnet wurde. Die Sicherheit für die Signifikanz der Verringerung des Wertes für  $k$  ist gegeben. Einen weiteren Hinweis für die Richtigkeit der Hypothese, dass die Expression eines weiteren Exportsystems für Fructose induziert wird, zeigt der Saccharoseaufnahme-Versuch zur Messung des Fructoseefflux nach Vorkultivierung auf Vollmedium. Wenn *C. glutamicum* FIMS IMc*g0772* zuvor nicht mit Saccharose in Berührung gekommen ist, ist die Geschwindigkeitskonstante  $k$  des Efflux im Vergleich zu *C. glutamicum* FIMS mit  $0,023 \text{ min}^{-1}$  signifikant verringert (Abbildung 54). Einen zusätzlichen Hinweis auf die Induktion eines weiteren Exporters bietet der Vergleich der externen Fructoseakkumulation des *C. glutamicum* Wildtyps und *C. glutamicum* IMc*g0772* mit Saccharose als Substrat (Abbildung 53 A und B). Bis zwei Stunden nach Kultivierungsbeginn ist die Exkretion von Fructose der Insertionsmutante verlangsamt. Nach 2,5 Stunden nimmt die Akkumulationsrate zu und übersteigt die des Wildtyps. Als Ursache für die Erhöhung der Akkumulationsrate wäre die Induktion eines weiteren Effluxsystems für Fructose durchaus denkbar.

Die Inaktivierung des Gens *cg0772* in *C. glutamicum* FIMS führte zu einem zweiphasigen Wachstum mit Saccharose als Substrat. Die Insertionsmutante wuchs nach einer kurzen *lag*-Phase mit einer zum Ausgangsstamm vergleichbaren Wachstumsrate. Nach etwa 4 Stunden nahm diese jedoch um etwa die Hälfte ab (Abbildung 50 A). Die Akkumulation von Fructose im Medium war in der ersten Stunde der Kultivierung sowohl für *C. glutamicum* FIMS IMc*g0772* als auch für *C. glutamicum* IMc*g0772* im Vergleich zum jeweiligen Ausgangsstamm ohne Insertion um etwa die Hälfte reduziert (Abbildung 50 B und Abbildung 53 A). Im Gegensatz zur Insertion in *C. glutamicum* FIMS, welche zu einer über den gesamten Kultivierungszeitraum verringerten Akkumulationsrate führte, nahm die Akkumulation von Fructose in *C. glutamicum* IMc*g0772* nach etwa 3 Stunden deutlich zu. Wie bereits diskutiert, könnte letztere Beobachtung auch auf die Induktion eines zusätzlichen Fructoseexporters zurückzuführen sein.

Um die Hypothese der Induktion eines zweiten Exporters belegen zu können, müsste die *de novo* Proteinbiosynthese des putativen zusätzlichen Transporters durch Zugabe von Chloramphenicol verhindert werden. Ein ähnliches Experiment wurde von Weinand et al. (2007) bei der Untersuchung der Expressionsregulation von *betP*, *proP* und *lcoP*, codierend für Importer der kompatiblen Solute Betain, Prolin und Ectoin, durchgeführt. Durch Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  Chloramphenicol, kurz vor einem hyperosmotischen Schock, konnte die *de novo* Proteinbiosynthese der entsprechenden Transporter, als Antwort auf die veränderte externe Osmolalität, verhindert werden. Bei der Identifikation eines möglichen weiteren Fructoseexporters sollten die weiteren vier auffälligen Insertionsmutanten putativer Zuckereporter, insbesondere *C. glutamicum* FIMS IMcg0206, in die Targetsuche miteinbezogen werden. Die leicht verminderte Geschwindigkeitskonstante des Fructoseexports von *C. glutamicum* FIMS IMcg0206 zeigte mit  $k = 0,090 \pm 0,020 \text{ min}^{-1}$  (Werte zwischen 0,069 und 0,109  $\text{min}^{-1}$ ), ebenso wie bei Insertion von *cg0772*, eine Streuung der einzelnen Werte. Der Verlauf des Profils der internen Fructosekonzentration von *C. glutamicum* FIMS IMcg0206 über 24 Stunden war vergleichbar mit dem zweiten Profil von *C. glutamicum* FIMS IMcg0772, jedoch mit einem drastisch höheren Maximalwert auf etwa 350 mM (Abbildung 47 A). Auch hier könnte die mögliche Induktion eines zweiten Exportsystems Ursache für die rasche Abnahme der stark erhöhten internen Fructosekonzentration und die Streuung der Geschwindigkeitskonstanten des Fructoseexports sein.

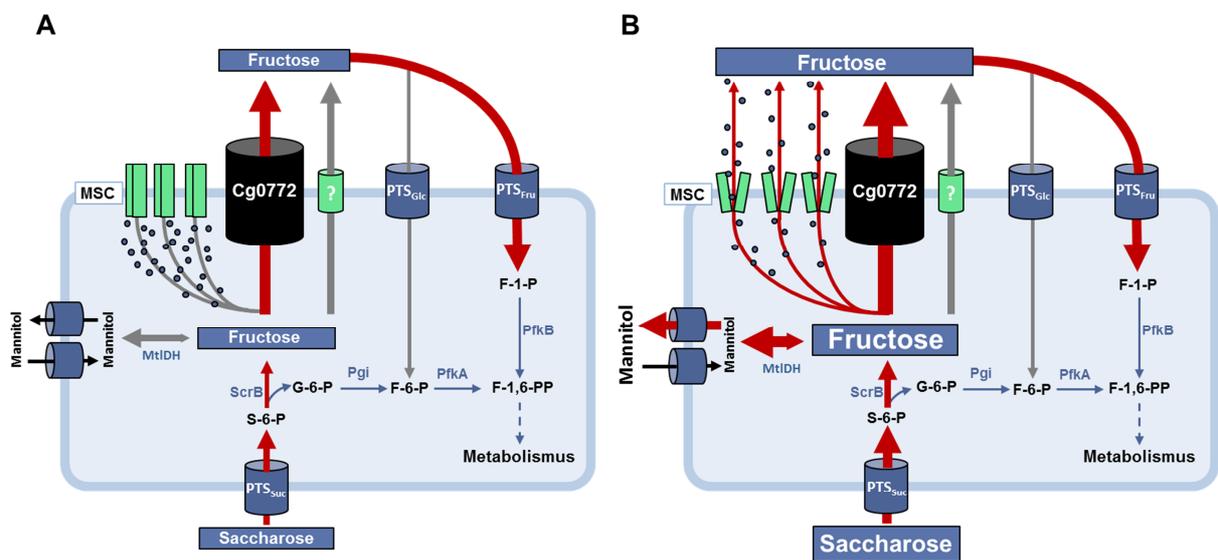
Im Gegensatz zu den Daten der Deletion von *cg0772* sind die Daten der Überexpression in *C. glutamicum* FIMS und *C. glutamicum* Wildtyp schwierig zu interpretieren. Die Überexpression eines putativen Fructoseexporters sollte mit einer Erhöhung der Effluxrate einhergehen. Bei Komplementation sollte zumindest die ursprüngliche Rate erreicht werden. Offensichtlich bringt die Überexpression des Gens *cg0772* in *C. glutamicum* pleiotrope Effekte mit sich. Bei Modellierung des Fructoseefflux führt die alleinige Erhöhung der Geschwindigkeitskonstanten  $k$  des Efflux zu einer Verringerung des *steady-state*-Levels, einhergehend mit einem weniger deutlichen Übergang von *steady-state*-Level und einsetzender Abnahme der Fructosekonzentration (Modellierung nicht gezeigt). Die Daten der Saccharoseaufnahme-Versuche zur Messung des Fructoseefflux bei Komplementation von *cg0772* in *C. glutamicum* FIMS IMcg0772 stimmen zwar in diesen Punkten mit der Modellierung überein, doch ist die anhand der Messpunkte berechnete Geschwindigkeitskonstante  $k$  des Fructoseefflux verringert (Abbildung 51 A). Ein ähnlicher Kurvenverlauf, mit verringertem *steady-state*-Level und flacherem Kurvenverlauf, ist auch bei Überexpression von *cg0772* in *C. glutamicum* FIMS zu

erkennen (Abbildung 51 B). Auch hier ist die berechnete Geschwindigkeitskonstante geringer als im Ausgangsstamm.

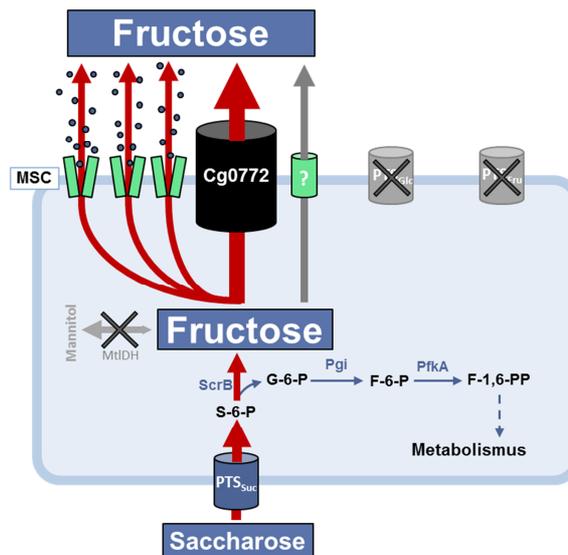
Des Weiteren brachte die Überexpression von *cg0772* weder eine Verbesserung des Wachstums mit sich, noch eine konstante Erhöhung der externen Akkumulation an Fructose. Die Überexpression in *C. glutamicum* FIMS führte nach etwa 4 Stunden Kultivierung sogar zu einem Abknicken der Wachstumskurve (Abbildung 50 A). Die Exkretion von Fructose blieb trotz Einbruch des Wachstums konstant (Abbildung 50 B). Die Überexpression von *cg0772* in *C. glutamicum* Wildtyp dagegen führte in den ersten 2,5 Stunden der Kultivierung bei Wachstum mit Saccharose als Substrat zu einer gesteigerten Fructoseexkretion (Abbildung 53 A). Im weiteren Versuchsverlauf verlangsamte sich die Akkumulation der externen Fructose von *C. glutamicum* IM*cg0772* im Gegensatz zum Wildtyp. Zusammenfassend führen die Daten der Komplementation und Überexpression von *cg0772* zu der Vermutung, dass die Expression des Gens negative Auswirkungen auf den Export von Fructose hat. Die Überexpression von Membranproteinen ist kompliziert, da eine zu hohe Expression häufig toxisch auf die Zellen wirkt. Es wäre daher sinnvoll, dass Expressionslevel von *cg0772* zu reduzieren. Eine Möglichkeit ist die Expression von *cg0772* durch ein *low-copy* Plasmid. Um das Einbringen eines weiteren Plasmids zu vermeiden, könnte alternativ das Startcodon von *cg0772* (ATG) durch das Startcodon GTG ersetzt werden. Der Austausch von ATG zu GTG des Gens *icd*, codierend für die Isocitratdehydrogenase aus *C. glutamicum*, führte zu einer Aktivitätsverringering um 70% (Becker et al., 2009), was vermutlich auf ein verringertes Expressionslevel zurückzuführen ist.

Aufgrund der überzeugenden Ergebnisse bei Inaktivierung von *cg0772* ist die Beteiligung des Genprodukts Cg0772 am Fructoseexport anzunehmen. Die im Vergleich zum Ausgangsstamm signifikante Verringerung der Geschwindigkeitskonstanten  $k$  des Fructoseefflux von *C. glutamicum* FIMS IM*cg0772* um bis zu 80% ( $0,023 \text{ min}^{-1}$ ) deutet auf Cg0772 als Hauptexportsystem für Fructose hin. In Abschnitt 5.8 wurde zudem über den Einfluss der mechanosensitiven Kanäle am Export für Fructose diskutiert. Neben dem Efflux über Cg0772 sind sowohl ein weiterer, bisher unbekannter Carrier beteiligt, als auch mechanosensitive Kanäle (vgl. Abbildung 57). Cg0772 ist dabei das Hauptexportsystem für Fructose. Der Anteil der mechanosensitiven Kanäle am Fructoseefflux ist sowohl von der internen Fructosekonzentration abhängig, als auch von der externen Osmolalität des Mediums. Bei niedriger interner Fructosekonzentration, ist deren Einfluss auf den Fructoseefflux verschwindend gering (Abbildung 57 A). Eine Steigerung der internen Fructosekonzentration, z.B. durch eine hohe externe Saccharosekonzentration, erhöht

den Anteil des Efflux von Fructose über mechanosensitive Kanäle. Der Efflux über Cg0772 stellt noch immer den größeren Anteil dar (Abbildung 57 B). Es wurde gezeigt, dass die Inaktivierung der Fructoseaufnahme und des Gens der MtlDH in *C. glutamicum* FIMS zu einer Steigerung der internen Fructosekonzentration führen. Dadurch erhöht sich die Öffnungswahrscheinlichkeit der mechanosensitiven Kanäle zusätzlich (Abbildung 58). Die moderate Steigerung der externen Osmolalität führt zum Verschluss der mechanosensitiven Kanäle, was sich in einer Erhöhung der *steady-state*-Level bemerkbar macht (nicht Teil des Modells in Abbildung 57 und Abbildung 58). Die weitere Steigerung der Osmolalität des Mediums auf 1 osmol/kg führt zu einer fast vollständigen Inhibition des Fructoseefflux (vgl. Abschnitt 5.8).



**Abbildung 57. Schematische Darstellung der am Fructoseefflux beteiligten Systeme im Rahmen des Saccharosestoffwechselweges im *C. glutamicum* Wildtyp.** Dargestellt sind die Stoffflüsse bei niedriger (A) und hoher interner Fructosekonzentration (B) im *C. glutamicum* Wildtyp, mit Saccharose als Substrat und Fructose als Metabolit (blaue Rechtecke bzw. blaue Punkte), sowie die beteiligten Transportsysteme (Zylinder bzw. grüne Rechtecke), Enzyme (blau), Metabolite (schwarz). Bei geringer Saccharosekonzentration im Medium ist auch die intrazelluläre Fructosekonzentration gering. In diesem Fall wird Fructose hauptsächlich über den MFS-Transporter Cg0772 exportiert (A). Die Erhöhung der externen Saccharosekonzentration bringt eine Umleitung der Stoffflüsse mit sich. Durch eine erhöhte interne Konzentration an Fructose steigert sich die Öffnungswahrscheinlichkeit der mechanosensitiven Kanäle (MSC) und ermöglicht einen teilweisen unspezifischen Efflux von Fructose. Der Efflux über Cg0772 stellt noch immer den größeren Anteil dar. Die erhöhte interne Fructosekonzentration begünstigt zudem die Reduktion eines Teils der internen Fructose zu Mannitol, welches daraufhin exportiert wird (B). Der Export von Fructose über einen zweiten unbekanntem Transporter nimmt in beiden Fällen nur einen geringen Anteil ein. Enzyme: *PfkA/PfkB* 6- bzw. 1-Phosphofruktokinase, *Pgi* Phosphoglucose Isomerase, *MtlDH* Mannitoldehydrogenase, *ScrB* Saccharose-6-phosphat-Hydrolase. Metabolite: *F-1-P* Fructose-1-phosphat, *F-6-P* Fructose-6-phosphat, *F-1,6-PP* Fructose-1,6-bisphosphat, *G-6-P* Glucose-6-phosphat, *S-6-P* Saccharose-6-phosphat. Transporter: *PTS<sub>Fru</sub>* fructosespezifisches PTS, *PTS<sub>Glc</sub>* glucosespezifisches PTS.



**Abbildung 58. Schematische Darstellung der am Fructoseefflux beteiligten Systeme in *C. glutamicum* FIMS.** Dargestellt sind die Stoffflüsse bei hoher externer Saccharosekonzentration in *C. glutamicum* FIMS mit Fructose als Metabolit (blaue Rechtecke bzw. blaue Punkte), sowie die beteiligten Transportsysteme (Zylinder bzw. grüne Rechtecke), Enzyme (blau), Metabolite (schwarz). Durch Inaktivierung der Fructosewiederaufnahme sowie der Deletion des Gens der Mannitoldehydrogenase tritt eine Steigerung der internen Fructosekonzentration gegenüber der des Wildtyps auf. Dadurch erhöht sich in dieser Mutante die Öffnungswahrscheinlichkeit der mechanosensitiven Kanäle (MSC). Der Hauptanteil des Fructoseexports erfolgt jedoch über Cg0772. Der Export über einen zweiten unbekanntem Transporter nimmt nur einen geringen Anteil ein. Enzyme: PfkA/PfkB 6- bzw. 1-Phosphofruktokinase, Pgi Phosphoglucose Isomerase, MtlDH Mannitoldehydrogenase, ScrB Saccharose-6-phosphat-Hydrolase. Metabolite: F-6-P Fructose-6-phosphat, F-1,6-PP Fructose-1,6-bisphosphat, G-6-P Glucose-6-phosphat, S-6-P Saccharose-6-phosphat. Transporter:  $PTS_{Fru}$  fructose-spezifisches PTS,  $PTS_{Glc}$  glucosespezifisches PTS.

## 5.10 Schlussbetrachtung

Die Charakterisierung des Fructoseexports setzte die Konstruktion eines geeigneten Modellstammes voraus, welcher defizient in der Fructoseaufnahme und möglichen Nebenreaktionen ist, und den intrazellulären Verlust von Fructose herbeiführen könnten. Die Analyse des Fructoseimports charakterisierte  $PTS_{Fru}$  als Hauptaufnahmesystem für Fructose unter Beteiligung von  $PTS_{Glc}$ . Des Weiteren konnte der signifikante Einfluss der Reduktion von Fructose zu Mannitol, durch die Mannitoldehydrogenase MtlDH, bei hohen internen Fructosekonzentrationen, zum Beispiel bei Wachstum auf Saccharose, bestätigt werden. Aufgrund dieser Daten und unter Einbezug der Daten von Bäumchen et al. (2009), welche die Fähigkeit der myo-Inositol-Transporter zur Fructoseaufnahme zeigten, wurde der Stamm *C. glutamicum*  $\Delta ptsF \Delta ptsG \Delta iolT1 \Delta iolT2 \Delta mtlD$  konstruiert und zur Vereinfachung als *C. glutamicum* FIMS (defizient in Fructoseimport und Mannitoldehydrogenase mit Überexpression von  $ptsS$ ) bezeichnet. Unter Verwendung von *C. glutamicum* FIMS konnte eine

biochemische Messmethode entwickelt werden, welche auf der Verwendung von spezifisch am Fructosemolekül  $^{14}\text{C}$ -markierter Saccharose beruht. Anhand der erlangten Daten des Fructoseexports wurde ein kinetisches Modell erstellt, welches die Modellierung des Fructoseefflux ermöglichte und somit sowohl zur Unterstützung der Datenanalyse herangezogen wurde. Damit trägt es signifikant zum Verständnis des Fructoseefflux bei.

Neben dem Efflux von Fructose über mindestens zwei spezifische Carrier konnte auch der Einfluss der mechanosensitiven Kanäle am Export von Fructose gezeigt werden. Fructose wird, höchstwahrscheinlich über *facilitated diffusion*, bei Wachstum in CgC-Medium mit einer Geschwindigkeitskonstanten  $k$  von  $0,109 \pm 0,025 \text{ min}^{-1}$  exportiert. Als Hauptexportsystem des spezifischen Efflux von Fructose wurde der MFS-Transporter Cg0772 identifiziert. Aufgrund der Energieabhängigkeit des Exports alleinig vom Konzentrationsgradienten, stellen der Export von Fructose und der PTS-abhängige Reimport energetisch keinen Nachteil gegenüber der intrazellulären Phosphorylierung von Fructose dar. Durch den gegenüber dem Efflux von Fructose signifikant schnelleren Import von Saccharose über  $\text{PTS}_{\text{Suc}}$  mit anschließender Hydrolyse, akkumulieren im Cytoplasma des *C. glutamicum* Wildtyps während des Wachstums mit Saccharose als Substrat bis zu 100 mM Fructose. Werden der Reimport von Fructose und/oder die Reduktion von Fructose zu Mannitol verhindert, können bei normaler Osmolalität intrazellulär sogar um die 190 mM Fructose akkumulieren.

Eine Steigerung der externen Osmolalität von 0,423 osmol/kg auf 0,647 osmol/kg führt im *C. glutamicum* Wildtyp zu einer Erhöhung der internen Fructosekonzentration auf 160 mM. Bei einer Osmolalität von etwa 1 osmol/kg sind in *C. glutamicum* FIMS sogar Werte von knapp 350 mM möglich. Die Höhe der internen Fructosekonzentration im *steady-state* ist demnach abhängig von der externen Osmolalität und belegt die Beteiligung der mechanosensitiven Kanäle am Fructoseexport, deren Öffnungswahrscheinlichkeit mit steigender Osmolalität abnimmt. Der unspezifische Export von Fructose über die mechanosensitiven Kanäle konnte spezifisch in einem separaten Experiment biochemisch belegt werden. Bei einer Steigerung der Osmolalität des Mediums auf 1 osmol/kg war neben dem Efflux über mechanosensitive Kanäle auch der spezifische Efflux fast vollständig inhibiert.

Der Export von Fructose in *C. glutamicum* basiert demnach nicht auf der Beteiligung eines einzigen spezifischen Transporters. Im Rahmen dieser Arbeit konnten der unspezifische Efflux über die mechanosensitiven Kanäle und der spezifische Efflux

über den MFS-Transporter Cg0772 nachgewiesen werden. Dieser ist mit 60-80% am spezifischen Efflux beteiligt. Darüber hinaus muss mindestens ein weiteres, bisher nicht identifiziertes Transportsystem am spezifischen Efflux beteiligt sein. Bei der biotechnologischen Herstellung von Aminosäuren durch *C. glutamicum* stellt Saccharose die meist genutzte Kohlenstoffquelle dar. Die Identifikation von Cg0772 als Hauptexportsystem für Fructose in *C. glutamicum* ist demnach sowohl ein interessantes Target zur Optimierung von Produktionsstämmen in Richtung der Saccharoseverwertung, als auch bei der Entwicklung von genomreduzierten Produktionsstämmen, die als Ziel die Herstellung eines Chassis-Organismus haben, der auf die wichtigsten metabolischen Eigenschaften beschränkt ist.

## 6 Quellen

- Aarnikunnas, J., K. Ronnholm, A. Palva. 2002. The mannitol dehydrogenase gene (*mdh*) from *Leuconostoc mesenteroides* is distinct from other known bacterial *mdh* genes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 59:665-671.
- Abe, S., K. Takayama, S. Kinoshita. 1967. Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *J Gen Appl Microbiol.* 13:279-301.
- Adachi, O., H. Tomoya, K. Matsushita. 1999. Crystalline NADP-dependent D-mannitol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63:402-407.
- Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Aristidou, A., M. Penttila. 2000. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. *Curr Opin Biotechnol.* 11:187-198.
- Arndt, A., B.J. Eikmanns. 2007. The alcohol dehydrogenase gene *adhA* in *Corynebacterium glutamicum* is subject to carbon catabolite repression. *J Bacteriol.* 189:7408-7416.
- Arndt, A., B.J. Eikmanns. 2008. Regulation of carbon metabolism in *Corynebacterium glutamicum*. In *Corynebacteria - Genomics and Molecular Biology*. A. Burkovski, editor. Caister Academic Press, Norfolk, UK. 155-182.
- Asipu, A., B.E. Hayward, J. O'Reilly, D.T. Bonthron. 2003. Properties of normal and mutant recombinant human ketohexokinases and implications for the pathogenesis of essential fructosuria. *Diabetes.* 52:2426-2432.
- Auchter, M., A. Arndt, B.J. Eikmanns. 2009. Dual transcriptional control of the acetaldehyde dehydrogenase gene *ald* of *Corynebacterium glutamicum* by RamA and RamB. *J Biotechnol.* 140:84-91.
- Auchter, M., A. Cramer, A. Huser, C. Ruckert, D. Emer, P. Schwarz, A. Arndt, C. Lange, J. Kalinowski, V.F. Wendisch, B.J. Eikmanns. 2011. RamA and RamB are global transcriptional regulators in *Corynebacterium glutamicum* and control genes for enzymes of the central metabolism. *J Biotechnol.* 154:126-139.
- Aulkemeyer, P., R. Ebner, G. Heilenmann, K. Jahreis, K. Schmid, S. Wrieden, J.W. Lengeler. 1991. Molecular analysis of two fructokinases involved in sucrose metabolism of enteric bacteria. *Mol Microbiol.* 5:2913-2922.

- Ayling, P.D., T. Mojica-a, T. Klopotoski. 1979. Methionine transport in *Salmonella typhimurium*: evidence for at least one low-affinity transport system. *J Gen Microbiol.* 114:227-246.
- Bäumchen, C., E. Krings, S. Bringer, L. Eggeling, H. Sahm. 2009. Myo-inositol facilitators IolT1 and IolT2 enhance D-mannitol formation from D-fructose in *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett.* 290:227-235.
- Becker, J., C. Klopprogge, H. Schröder, C. Wittmann. 2009. Metabolic engineering of the tricarboxylic acid cycle for improved lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol.* 75:7866-7869.
- Becker, J., C. Wittmann. 2012a. Bio-based production of chemicals, materials and fuels - *Corynebacterium glutamicum* as versatile cell factory. *Curr Opin Biotechnol.* 23:631-640.
- Becker, J., C. Wittmann. 2012b. Systems and synthetic metabolic engineering for amino acid production - the heartbeat of industrial strain development. *Curr Opin Biotechnol.* 23:718-726.
- Bellmann, A., M. Vrljić, M. Patek, H. Sahm, R. Krämer, L. Eggeling. 2001. Expression control and specificity of the basic amino acid exporter LysE of *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology.* 147:1765-1774.
- Benthin, S., J. Nielsen, J. Villadsen. 1994. Galactose Expulsion during Lactose Metabolism in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FD1 Due to Dephosphorylation of Intracellular Galactose 6-Phosphate. *Appl Environ Microbiol.* 60:1254-1259.
- Blombach, B., G.M. Seibold. 2010. Carbohydrate metabolism in *Corynebacterium glutamicum* and applications for the metabolic engineering of L-lysine production strains. *Appl Microbiol Biotechnol.* 86:1313-1322.
- Bogs, J., K. Geider. 2000. Molecular analysis of sucrose metabolism of *Erwinia amylovora* and influence on bacterial virulence. *J Bacteriol.* 182:5351-5358.
- Börngen, K. 2009. YggB of *Corynebacterium glutamicum* - Dual function in osmotic stress response and glutamate production. In Institut für Biochemie. Vol. Dissertation. Universität zu Köln, Köln.
- Börngen, K., A.R. Battle, N. Moker, S. Morbach, K. Marin, B. Martinac, R. Krämer. 2010. The properties and contribution of the *Corynebacterium glutamicum* MscS variant to fine-tuning of osmotic adaptation. *Biochim Biophys Acta.* 1798:2141-2149.
- Bost, S., F. Silva, D. Belin. 1999. Transcriptional activation of *ydeA*, which encodes a member of the major facilitator superfamily, interferes with arabinose

- accumulation and induction of the *Escherichia coli* arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol.* 181:2185-2191.
- Botzenhardt, J. 2004. Regulation des Betaintransporters BetP aus *Corynebacterium glutamicum* während der Anpassung an hyperosmotischen Stress. In Institut für Biochemie. Vol. Dissertation. Universität zu Köln, Köln.
- Brand, S., K. Niehaus, A. Pühler, J. Kalinowski. 2003. Identification and functional analysis of six mycolyltransferase genes of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032: the genes *cop1*, *cmt1*, and *cmt2* can replace each other in the synthesis of trehalose dicorynomycolate, a component of the mycolic acid layer of the cell envelope. *Arch Microbiol.* 180:33-44.
- Burkovski, A., B. Weil, R. Krämer. 1996 Characterization of a secondary uptake system for L-glutamate in *Corynebacterium glutamicum* *FEMS Microbiol Lett.* 136:169-173.
- Busch, W., M.H. Saier, Jr. 2002. The transporter classification (TC) system, 2002. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 37:287-337.
- Button, D.K., J.B. Egan, W. Hengstenberg, M.L. Morse. 1973. Carbohydrate transport in *Staphylococcus aureus*. IV. Maltose accumulation and metabolism. *Biochem Biophys Res Commun.* 52:850-855.
- Calamia, J., C. Manoil. 1990. *lac* permease of *Escherichia coli*: topology and sequence elements promoting membrane insertion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:4937-4941.
- Cao, Y., X. Jin, E.J. Levin, H. Huang, Y. Zong, M. Quick, J. Weng, Y. Pan, J. Love, M. Punta, B. Rost, W.A. Hendrickson, J.A. Javitch, K.R. Rajashankar, M. Zhou. 2011. Crystal structure of a phosphorylation-coupled saccharide transporter. *Nature.* 473:50-54.
- Carolé, S., S. Pichoff, J.P. Bouch. 1999. *Escherichia coli* gene *ydeA* encodes a major facilitator pump which exports L-arabinose and isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside. *J Bacteriol.* 181:5123-5125.
- Chaillou, S., P.W. Postma, P.H. Pouwels. 2001. Contribution of the phosphoenolpyruvate:mannose phosphotransferase system to carbon catabolite repression in *Lactobacillus pentosus*. *Microbiology.* 147:671-679.
- Chardon, F., M. Bedu, F. Calenge, P.A. Klemens, L. Spinner, G. Clement, G. Chietera, S. Leran, M. Ferrand, B. Lacombe, O. Loudet, S. Dinant, C. Bellini, H.E. Neuhaus, F. Daniel-Vedele, A. Krapp. 2013. Leaf fructose content is controlled by the vacuolar transporter SWEET17 in *Arabidopsis*. *Curr Biol.* 23:697-702.

- Chen, Q., O. Amster-Choder. 1998. BglF, the sensor of the bgl system and the beta-glucosides permease of *Escherichia coli*: evidence for dimerization and intersubunit phosphotransfer. *Biochemistry*. 37:8714-8723.
- Cocaign, M., C. Monnet, N.D. Lindley. 1993. Batch kinetics of *Corynebacterium glutamicum* during growth on various carbon substrates: use of substrate mixtures to localise metabolic bottlenecks. *Appl Microbiol Biotechnol*. 40:526-530.
- Culham, D.E., B. Lasby, A.G. Marangoni, J.L. Milner, B.A. Steer, R.W. van Nues, J.M. Wood. 1992. Isolation and Sequencing of *Escherichia coli* Gene *proP* reveals unusual structural features of the osmoregulatory proline/betaine transporter, ProP. *J Mol Biol*. 229:268-276.
- Curtis, S.J., W. Epstein. 1975. Phosphorylation of D-glucose in *Escherichia coli* mutants defective in glucosephosphotransferase, mannosephosphotransferase, and glucokinase. *J Bacteriol*. 122:1189-1199.
- Daffé, M. 2005. The cell envelope of *corynebacteria*. In *Handbook of Corynebacterium glutamicum*. L. Eggeling und M. Bott, editors. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA. 121-148.
- De Sousa-D'Auria, C., R. Kacem, V. Puech, M. Tropis, G. Leblon, C. Houssin, M. Daffé. 2003. New insights into the biogenesis of the cell envelope of *corynebacteria*: identification and functional characterization of five new mycoloyltransferase genes in *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett*. 224:35-44.
- Débarbouillé, M., I. Martin-Verstraete, M. Arnaud, A. Klier, G. Rapoport. 1991. Positive and negative regulation controlling expression of the *sac* genes in *Bacillus subtilis*. *Res Microbiol*. 142:757-764.
- Delobbe, A., H. Chalumeau, J.M. Claverie, P. Gay. 1976. Phosphorylation of intracellular fructose in *Bacillus subtilis* mediated by phosphoenolpyruvate-1-fructose phosphotransferase. *Eur J Biochem*. 66:485-491.
- Demain, A.L. 2000a. Microbial biotechnology. *Trends Biotechnol*. 18:26-31.
- Demain, A.L. 2000b. Small bugs, big business: the economic power of the microbe. *Biotechnol Adv*. 18:499-514.
- Demain, A.L. 2007. The business of biotechnology. *Industrial Biotechnology*. 3:269-283.
- Detkova, E.N., Y.V. Boltyanskaya. 2007. Osmoadaptation of haloalkaliphilic bacteria: role of osmoregulators and their possible practical application. *Mikrobiologiya*. 76:581-593.

- Deutscher, J. 2008. The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Opin Microbiol.* 11:87-93.
- Diggle, C.P., M. Shires, D. Leitch, D. Brooke, I.M. Carr, A.F. Markham, B.E. Hayward, A. Asipu, D.T. Bonthron. 2009. Ketohexokinase: expression and localization of the principal fructose-metabolizing enzyme. *J Histochem Cytochem.* 57:763-774.
- DiMarco, A.A., A.H. Romano. 1985. D-Glucose Transport System of *Zymomonas mobilis*. *Appl Environ Microbiol.* 49:151-157.
- Doelle, H.W. 1982. Kinetic characteristics and regulatory mechanisms of glucokinase and fructokinase from *Zymomonas mobilis*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 14:241-246.
- Dominguez, H., M. Cocaign-Bousquet, N.D. Lindley. 1993. Simultaneous consumption of glucose and fructose from sugar mixtures during batch growth of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol.* 47:600-603.
- Dominguez, H., N.D. Lindley. 1996. Complete Sucrose Metabolism Requires Fructose Phosphotransferase Activity in *Corynebacterium glutamicum* To Ensure Phosphorylation of Liberated Fructose. *Appl Environ Microbiol.* 62:3878-3880.
- Dominguez, H., C. Rollin, A. Guyonvarch, J.L. Guerquin-Kern, M. Cocaign-Bousquet, N.D. Lindley. 1998. Carbon-flux distribution in the central metabolic pathways of *Corynebacterium glutamicum* during growth on fructose. *Eur J Biochem.* 254:96-102.
- Driessen, A.J., K.J. Hellingwerf, W.N. Konings. 1987. Mechanism of energy coupling to entry and exit of neutral and branched chain amino acids in membrane vesicles of *Streptococcus cremoris*. *J Biol Chem.* 262:12438-12443.
- Ebbighausen, H., B. Weil, R. Krämer. 1989. Isoleucine excretion in *Corynebacterium glutamicum*: evidence for a specific efflux carrier system. *Appl Microbiol Biotechnol.* 31:184-190.
- Ebel, W. 1985. Carrier facilitated diffusion. *J Math Biol.* 21:243-271.
- Eck, A.W. 2014. Trehalose Transport in *Corynebacterium glutamicum* and its significance for Cell Envelope Synthesis. In Institut für Biochemie. Vol. Dissertation. Universität zu Köln, Köln.
- Eggeling, L., O. Reyes. 2005. Experiments: Chromosomal Integration. In Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. L. Eggeling und M. Bott, editors. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA. 535-565.

- Eikmanns, B.J., M. Metzger, D. Reinscheid, M. Kircher, H. Sahm. 1991. Amplification of three threonine biosynthesis genes in *Corynebacterium glutamicum* and its influence on carbon flux in different strains. *Appl Microbiol Biotechnol.* 34:617-622.
- Engels, V., T. Georgi, V.F. Wendisch. 2008a. ScrB (Cg2927) is a sucrose-6-phosphate hydrolase essential for sucrose utilization by *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS microbiology letters.* 289:80-89.
- Engels, V., S.N. Lindner, V.F. Wendisch. 2008b. The global repressor SugR controls expression of genes of glycolysis and of the L-lactate dehydrogenase LdhA in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol.* 190:8033-8044.
- Engels, V., V.F. Wendisch. 2007. The DeoR-type regulator SugR represses expression of *ptsG* in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol.* 189:2955-2966.
- Erni, B. 1986. Glucose-specific permease of the bacterial phosphotransferase system: phosphorylation and oligomeric structure of the glucose-specific IIGlc-IIIIGlc complex of *Salmonella typhimurium*. *Biochemistry.* 25:305-312.
- Farwick, M., R.M. Siewe, R. Krämer. 1995. Glycine betaine uptake after hyperosmotic shift in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol.* 177:4690-4695.
- Fehér, T., B. Papp, C. Pal, G. Posfai. 2007. Systematic genome reductions: theoretical and experimental approaches. *Chem Rev.* 107:3498-3513.
- Fennington, G.J., Jr., T.A. Hughes. 1996. The fructokinase from *Rhizobium leguminosarum biovar trifolii* belongs to group I fructokinase enzymes and is encoded separately from other carbohydrate metabolism enzymes. *Microbiology.* 142 ( Pt 2):321-330.
- Finn, R.D., A. Bateman, J. Clements, P. Coggill, R.Y. Eberhardt, S.R. Eddy, A. Heger, K. Hetherington, L. Holm, J. Mistry, E.L. Sonnhammer, J. Tate, M. Punta. 2014. Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res.* 42:D222-230.
- Frings, E., H.J. Kunte, E.A. Galinski. 1993. Compatible solutes in representatives of the genera *Brevibacterium* and *Corynebacterium*: Occurrence of tetrahydropyrimidines and glutamine. *FEMS Microbiol Lett.* 109:25-32.
- Frunzke, J., V. Engels, S. Hasenbein, C. Gatgens, M. Bott. 2008. Co-ordinated regulation of gluconate catabolism and glucose uptake in *Corynebacterium glutamicum* by two functionally equivalent transcriptional regulators, GntR1 and GntR2. *Mol Microbiol.* 67:305-322.

- Fukuda, Y., S. Yamaguchi, M. Shimosaka, K. Murata, A. Kimura. 1984. Purification and Characterization of Glucokinase in *Escherichia coli* B. *Agric. Biol. Chem.* 48:2541-2548.
- Gaigalat, L., J.P. Schluter, M. Hartmann, S. Mormann, A. Tauch, A. Puhler, J. Kalinowski. 2007. The DeoR-type transcriptional regulator SugR acts as a repressor for genes encoding the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system (PTS) in *Corynebacterium glutamicum*. *BMC Mol Biol.* 8:104.
- Gay, P., A. Delobbe. 1977. Fructose transport in *Bacillus subtilis*. *Eur J Biochem.* 79:363-373.
- Georgi, T., D. Rittmann, V.F. Wendisch. 2005. Lysine and glutamate production by *Corynebacterium glutamicum* on glucose, fructose and sucrose: roles of malic enzyme and fructose-1,6-bisphosphatase. *Metab Eng.* 7:291-301.
- Goswitz, V.C., R.J. Brooker. 1995. Structural features of the uniporter/symporter/antiporter superfamily. *Protein Sci.* 4:534-537.
- Gourdon, P., M. Raherimandimby, H. Dominguez, M. Cocaign-Bousquet, N.D. Lindley. 2003. Osmotic stress, glucose transport capacity and consequences for glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol.* 104:77-85.
- Grant, S.G., J. Jessee, F.R. Bloom, 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.
- Grothe, S., R.L. Krogsrud, D.J. McClellan, J.L. Milner, J.M. Wood. 1986. Proline transport and osmotic stress response in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 166:253-259.
- Guillouet, S., J.M. Engasser. 1995a. Growth of *Corynebacterium glutamicum* in glucose-limited continuous cultures under high osmotic pressure. Influence of growth rate on the intracellular accumulation of proline, glutamate and trehalose. *Appl Microbiol Biotechnol.* 44:496-500.
- Guillouet, S., J.M. Engasser. 1995b. Sodium and proline accumulation in *Corynebacterium glutamicum* as a response to an osmotic saline upshock. *Appl Microbiol Biotechnol.* 43:315-320.
- Gunasekaran, P., T. Karunakaran, B. Cami, A.G. Mukundan, L. Preziosi, J. Baratti. 1990. Cloning and sequencing of the *sacA* gene: characterization of a sucrase from *Zymomonas mobilis*. *J Bacteriol.* 172:6727-6735.

- Heller, K.B., E.C. Lin, T.H. Wilson. 1980. Substrate specificity and transport properties of the glycerol facilitator of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 144:274-278.
- Hengstenberg, W., B. Reiche, R. Eisermann, R. Fischer, U. Kessler, A. Tarrach, W.M. De Vos, H.R. Kalbitzer, S. Glaser. 1989. Structure and function of proteins involved in sugar transport by the PTS of gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 5:35-42.
- Henrich, A.W. 2011. Characterization of Maltose and Trehalose Transport in *Corynebacterium glutamicum*. In Institut für Biochemie. Vol. Dissertation. Universität zu Köln, Köln.
- Hermann, T. 2003. Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *J Biotechnol.* 104:155-172.
- Houssin, C., N. Eynard, E. Shechter, A. Ghazi. 1991. Effect of osmotic pressure on membrane energy-linked functions in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta.* 1056:76-84.
- Hutkins, R.W., C. Ponne. 1991. Lactose Uptake Driven by Galactose Efflux in *Streptococcus thermophilus*: Evidence for a Galactose-Lactose Antiporter. *Appl Environ Microbiol.* 57:941-944.
- Ikeda, M., R. Katsumata. 1995. Tryptophan Production by Transport Mutants of *Corynebacterium glutamicum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59:1600-1602.
- Ikeda, M., S. Nakagawa. 2003. The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 62:99-109.
- Jakoby, M., C.-E. Ngouoto-Nkili, A. Burkovski. 1999. Construction and application of new *Corynebacterium glutamicum* vectors. *Biotechnol Tech.* 13:437-441.
- Jault, J.M., S. Fieulaine, S. Nessler, P. Gonzalo, A. Di Pietro, J. Deutscher, A. Galinier. 2000. The HPr kinase from *Bacillus subtilis* is a homo-oligomeric enzyme which exhibits strong positive cooperativity for nucleotide and fructose 1,6-bisphosphate binding. *J Biol Chem.* 275:1773-1780.
- Jeckelmann, J.M., D. Harder, S.A. Mari, M. Meury, Z. Ucurum, D.J. Muller, B. Erni, D. Fotiadis. 2011. Structure and function of the glucose PTS transporter from *Escherichia coli*. *J Struct Biol.* 176:395-403.
- Juhas, M., D.R. Reuss, B. Zhu, F.M. Commichau. 2014. *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* essential genes and minimal cell factories after one decade of genome engineering. *Microbiology.* 160:2341-2351.

- Kadner, R.J. 1974. Transport systems for L-methionine in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 117:232-241.
- Kadner, R.J., W.J. Watson. 1974. Methionine transport in *Escherichia coli*: physiological and genetic evidence for two uptake systems. *J Bacteriol.* 119:401-409.
- Kaidoh, K., M. Kimura, S. Miyauchi, T. Nara, N. Kamo. 1997. Drug extrusion in *Corynebacterium glutamicum*. *Microb Drug Resist.* 3:345-350.
- Kalinowski, J., B. Bathe, D. Bartels, N. Bischoff, M. Bott, A. Burkovski, N. Dusch, L. Eggeling, B.J. Eikmanns, L. Gaigalat, A. Goesmann, M. Hartmann, K. Huthmacher, R. Krämer, B. Linke, A.C. McHardy, F. Meyer, B. Mockel, W. Pfefferle, A. Puhler, D.A. Rey, C. Ruckert, O. Rupp, H. Sahm, V.F. Wendisch, I. Wiegrabe, A. Tauch. 2003. The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *Journal of biotechnology.* 104:5-25.
- Kelker, N.E., R.L. Anderson. 1972. Evidence for vectorial phosphorylation of D-fructose by intact cells of *Aerobacter aerogenes*. *J Bacteriol.* 112:1441-1443.
- Kelle, R., T. Hermann, B. Bathe. 2005. L-Lysine Production *In Handbook of Corynebacterium glutamicum*. L. Eggeling und M. Bott, editors. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA. 465-488.
- Kennerknecht, N., H. Sahm, M.R. Yen, M. Patek, M.H. Saier Jr, Jr., L. Eggeling. 2002. Export of L-isooleucine from *Corynebacterium glutamicum*: a two-gene-encoded member of a new translocator family. *J Bacteriol.* 184:3947-3956.
- Khandekar, S.S., G.R. Jacobson. 1989. Evidence for two distinct conformations of the *Escherichia coli* mannitol permease that are important for its transport and phosphorylation functions. *J Cell Biochem.* 39:207-216.
- Kimura, E. 2005. L-Glutamate Production. *In Handbook of Corynebacterium glutamicum*. L. Eggeling und M. Bott, editors. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA. 439-464.
- Kinoshita, S., S. Udaka, M. Shimono. 1957. Studies on the amino acid fermentation: I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J Gen Appl Microbiol.* 3:193-205.
- Klemens, P.A., K. Patzke, J. Deitmer, L. Spinner, R. Le Hir, C. Bellini, M. Bedu, F. Chardon, A. Krapp, H.E. Neuhaus. 2013. Overexpression of the vacuolar sugar carrier AtSWEET16 modifies germination, growth, and stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 163:1338-1352.

- Klingenberg, M., E. Pfaff. 1967. Means of Terminating Reactions. In *Methods in Enzymology*. Vol. 10. R.W. Estabrook und M.E. Pullman, editors. Academic Press, New York/London. 680-684.
- Kohl, T.A., J. Baumbach, B. Jungwirth, A. Pühler, A. Tauch. 2008. The GlxR regulon of the amino acid producer *Corynebacterium glutamicum*: in silico and in vitro detection of DNA binding sites of a global transcription regulator. *J Biotechnol.* 135:340-350.
- Kohl, T.A., A. Tauch. 2009. The GlxR regulon of the amino acid producer *Corynebacterium glutamicum*: Detection of the corynebacterial core regulon and integration into the transcriptional regulatory network model. *J Biotechnol.* 143:239-246.
- Koita, K., C.V. Rao. 2012. Identification and analysis of the putative pentose sugar efflux transporters in *Escherichia coli*. *PLoS One.* 7:e43700.
- Kolb, A., S. Busby, H. Buc, S. Garges, S. Adhya. 1993. Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Annu Rev Biochem.* 62:749-795.
- Korakli, M., R.F. Vogel. 2003. Purification and characterisation of mannitol dehydrogenase from *Lactobacillus sanfranciscensis*. *FEMS Microbiol Lett.* 220:281-286.
- Körner, H., H.J. Sofia, W.G. Zumft. 2003. Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. *FEMS Microbiol Rev.* 27:559-592.
- Kotrbova-Kozak, A., P. Kotrba, M. Inui, J. Sajdok, H. Yukawa. 2007. Transcriptionally regulated *adhA* gene encodes alcohol dehydrogenase required for ethanol and n-propanol utilization in *Corynebacterium glutamicum* R. *Appl Microbiol Biotechnol.* 76:1347-1356.
- Krämer, R. 1994. Systems and mechanisms of amino acid uptake and excretion in prokaryotes. *Arch Microbiol.* 162:1-13.
- Krämer, R., E. Boles, L. Eggeling, A. Erdmann, M. Gutmann, W. Kronemeyer, L. Palmieri, S. Zittrich. 1994. Mechanism and energetics of amino acid transport in *coryneform* bacteria. *Biochim Biophys Acta.* 1187:245-249.
- Krämer, R., C. Lambert. 1990. Uptake of glutamate in *Corynebacterium glutamicum*. 2. Evidence for a primary active transport system. *Eur J Biochem.* 194:937-944.
- Krämer, R., C. Lambert, C. Hoischen, H. Ebbighausen. 1990. Uptake of glutamate in *Corynebacterium glutamicum*. 1. Kinetic properties and regulation by internal pH and potassium. *Eur J Biochem.* 194:929-935.

- Krings, E., K. Krumbach, B. Bathe, R. Kelle, V.F. Wendisch, H. Sahm, L. Eggeling. 2006. Characterization of *myo*-inositol utilization by *Corynebacterium glutamicum*: the stimulon, identification of transporters, and influence on L-lysine formation. *J Bacteriol.* 188:8054-8061.
- Krogh, A., B. Larsson, G. von Heijne, E.L.L. Sonnhammer. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* 305:567-580.
- Kronmeyer, W., N. Peekhaus, R. Kramer, H. Sahm, L. Eggeling. 1995. Structure of the gluABCD cluster encoding the glutamate uptake system of *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol.* 177:1152-1158.
- Lagunas, R. 1993. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev.* 10:229-242.
- Laslo, T., P. von Zaluskowski, C. Gabris, E. Lodd, C. Ruckert, P. Dangel, J. Kalinowski, M. Auchter, G. Seibold, B.J. Eikmanns. 2012. Arabitol metabolism of *Corynebacterium glutamicum* and its regulation by AtlR. *J Bacteriol.* 194:941-955.
- Lee, J.K., M.H. Sung, K.H. Yoon, J.H. Yu, T.K. Oh. 1994. Nucleotide sequence of the gene encoding the *Corynebacterium glutamicum* mannose enzyme II and analyses of the deduced protein sequence. *FEMS Microbiol Lett.* 119:137-145.
- Lee, J.W., S. Choi, J.M. Kim, S.Y. Lee. 2010. Mannheimia succiniciproducens phosphotransferase system for sucrose utilization. *Appl Environ Microbiol.* 76:1699-1703.
- Lehmann, K.B., R. Neumann. 1896. Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik. J. F. Lehmann, München.
- Lengeler, J., H. Steinberger. 1978. Analysis of the regulatory mechanisms controlling the synthesis of the hexitol transport systems in *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet.* 164:163-169.
- Leuchtenberger, W., K. Huthmacher, K. Drauz. 2005. Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol.* 69:1-8.
- Liebl, W. 2005. *Corynebacterium* Taxonomy. In Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. L. Eggeling und M. Bott, editors. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA. 9-34.

- Lieder, S., P.I. Nickel, V. de Lorenzo, R. Takors. 2015. Genome reduction boosts heterologous gene expression in *Pseudomonas putida*. *Microb Cell Factories*. 10:1-14.
- Lindner, S.N., S. Knebel, S.R. Pallerla, S.M. Schoberth, V.F. Wendisch. 2010. Cg2091 encodes a polyphosphate/ATP-dependent glucokinase of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 87:703-713.
- Lindner, S.N., G.M. Seibold, A. Henrich, R. Krämer, V.F. Wendisch. 2011. Phosphotransferase system-independent glucose utilization in *Corynebacterium glutamicum* by inositol permeases and glucokinases. *Applied and environmental microbiology*. 77:3571-3581.
- Liu, J.Y., P.F. Miller, M. Gosink, E.R. Olson. 1999a. The identification of a new family of sugar efflux pumps in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 31:1845-1851.
- Liu, J.Y., P.F. Miller, J. Willard, E.R. Olson. 1999b. Functional and biochemical characterization of *Escherichia coli* sugar efflux transporters. *J Biol Chem*. 274:22977-22984.
- Luesink, E.J., J.D. Marugg, O.P. Kuipers, W.M. de Vos. 1999. Characterization of the divergent *sacBK* and *sacAR* operons, involved in sucrose utilization by *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol*. 181:1924-1926.
- MacMillan, S.V. 1998. The substrate and inhibitor specificity of the osmo-regulatory transporter ProP. Vol. M. Sc. Thesis. University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada.
- Malin, G.M., G.I. Bourd. 1991. Phosphotransferase-dependent glucose transport in *Corynebacterium glutamicum*. *J Appl Microbiol*. 71:517-523.
- Martin, S.A., J.B. Russell. 1987. Transport and phosphorylation of disaccharides by the ruminal bacterium *Streptococcus bovis*. *Appl Environ Microbiol*. 53:2388-2393.
- Martinez, G., H.A. Barker, B.L. Korecker. 1963. A specific mannitol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis*. *J. Biol. Chem*. 238:1598-1603.
- Meyer, T., D. Holowka, L. Stryer. 1988. Highly cooperative opening of calcium channels by inositol 1,4,5-trisphosphate. *Science*. 240:653-656.
- Milner, J.L., S. Grothe, J.M. Wood. 1988. Proline porter II is activated by a hyperosmotic shift in both whole cells and membrane vesicles of *Escherichia coli* K12. *J Biol Chem*. 263:14900-14905.
- Milner, J.L., B. Vink, J.M. Wood. 1987. Transmembrane amino acid flux in bacterial cells. *Crit Rev Biotechnol*. 5:1-47.

- Misset, O., M. Blaauw, P.W. Postma, G.T. Robillard. 1983. Bacterial phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system. Mechanism of the transmembrane sugar translocation and phosphorylation. *Biochemistry*. 22:6163-6170.
- Moon, M.W., H.J. Kim, T.K. Oh, C.S. Shin, J.S. Lee, S.J. Kim, J.K. Lee. 2005. Analyses of enzyme II gene mutants for sugar transport and heterologous expression of fructokinase gene in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *FEMS Microbiol Lett*. 244:259-266.
- Moon, M.W., S.Y. Park, S.K. Choi, J.K. Lee. 2007. The phosphotransferase system of *Corynebacterium glutamicum*: features of sugar transport and carbon regulation. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 12:43-50.
- Morimoto, T., R. Kadoya, K. Endo, M. Tohata, K. Sawada, S. Liu, T. Ozawa, T. Kodama, H. Kakeshita, Y. Kageyama, K. Manabe, S. Kanaya, K. Ara, K. Ozaki, N. Ogasawara. 2008. Enhanced recombinant protein productivity by genome reduction in *Bacillus subtilis*. *DNA Res*. 15:73-81.
- Mortatte, M.P.L., H.H. Sato, Y.K. Park. 1983. Induction and some characteristics of sucrose hydrolyzing enzyme from *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett*. 5:229-232.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, H. Erlich. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 51 Pt 1:263-273.
- Nentwich, S.S., K. Brinkrolf, L. Gaigalat, A.T. Hüser, D.A. Rey, T. Mohrbach, K. Marin, A. Pühler, A. Tauch, J. Kalinowski. 2008. Characterization of the LacI-type transcriptional repressor RbsR controlling ribose transport in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Microbiology*. 155:150-164.
- Neubauer, H., E. Glaesker, W.P. Hammes, B. Poolman, W.N. Konings. 1994. Mechanism of maltose uptake and glucose excretion in *Lactobacillus sanfrancisco*. *J Bacteriol*. 176:3007-3012.
- Nishimasu, H., S. Fushinobu, H. Shoun, T. Wakagi. 2005. Identification and Characterization of an ATP-Dependent Hexokinase with Broad Substrate Specificity from the Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus tokodaii*. *J Bacteriol*. 188:2014-2019.
- Nottebrock, D., U. Meyer, R. Krämer, S. Morbach. 2003. Molecular and biochemical characterization of mechanosensitive channels in *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett*. 218:305-309.

- O'Mullan, P., M. Szakacs-Dobozi, D.E. Eveleigh. 1991. Identification of saccharolytic enzymes of *Zymomonas mobilis* CP4. *Biotechnol. Lett.* 13:137-142.
- Ohnishi, J., S. Mitsuhashi, M. Hayashi, S. Ando, H. Yokoi, K. Ochiai, M. Ikeda. 2002. A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine-producing mutant. *Appl Microbiol Biotechnol.* 58:217-223.
- Palmieri, L., D. Berns, R. Krämer, B.J. Eikmanns. 1996. Threonine diffusion and threonine transport in *Corynebacterium glutamicum* and their role in threonine production. *Arch. Microbiol.* 165:48-54.
- Pao, S.S., I.T. Paulsen, M.H. Saier, Jr. 1998. Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62:1-34.
- Parche, S., A. Burkovski, G.A. Sprenger, B. Weil, R. Kramer, F. Titgemeyer. 2001. *Corynebacterium glutamicum*: a dissection of the PTS. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 3:423-428.
- Park, J.H., K.H. Lee, T.Y. Kim, S.Y. Lee. 2007. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of L-valine based on transcriptome analysis and in silico gene knockout simulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:7797-7802.
- Park, J.H., S.Y. Lee. 2010. Fermentative production of branched chain amino acids: a focus on metabolic engineering. *Appl Microbiol Biotechnol.* 85:491-506.
- Park, J.H., S.Y. Lee, T.Y. Kim, H.U. Kim. 2008. Application of systems biology for bioprocess development. *Trends Biotechnol.* 26:404-412.
- Park, S.Y., H.K. Kim, S.K. Yoo, T.K. Oh, J.K. Lee. 2000. Characterization of *glk*, a gene coding for glucose kinase of *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett.* 188:209-215.
- Park, S.Y., M.W. Moon, B. Subhadra, J.K. Lee. 2010. Functional characterization of the *glxR* deletion mutant of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032: involvement of GlxR in acetate metabolism and carbon catabolite repression. *FEMS Microbiol Lett.* 304:107-115.
- Park, Y.H., B.R. Lee, Y.J. Seok, A. Peterkofsky. 2006. In vitro reconstitution of catabolite repression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 281:6448-6454.
- Peters-Wendisch, P., V.F. Wendisch. 2015. Use of *Corynebacterium glutamicum* for the production of high-value chemicals from new carbon sources. In *Industrial Biocatalysis*. Vol. 1. P. Grunwald, editor. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA. 373-416.

- Peters-Wendisch, P.G., B. Schiel, V.F. Wendisch, E. Katsoulidis, B. Mockel, H. Sahm, B.J. Eikmanns. 2001. Pyruvate carboxylase is a major bottleneck for glutamate and lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 3:295-300.
- Poolman, B. 1993. Energy transduction in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 12:125-147.
- Poolman, B., E. Glaasker. 1998. Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol Microbiol.* 29:397-407.
- Postma, P.W., J.W. Lengeler, G.R. Jacobson. 1993. Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev.* 57:543-594.
- Reddy, V.S., M.A. Shlykov, R. Castillo, E.I. Sun, M.H. Saier, Jr. 2012. The major facilitator superfamily (MFS) revisited. *FEBS J.* 279:2022-2035.
- Reid, S.J., M.S. Rafudeen, N.G. Leat. 1999. The genes controlling sucrose utilization in *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 constitute an operon. *Microbiology.* 145:1461-1472.
- Reizer, J., A. Reizer, M.H. Saier, Jr. 1992. A new subfamily of bacterial ABC-type transport systems catalyzing export of drugs and carbohydrates. *Protein Sci.* 1:1326-1332.
- Robillard, G.T., J. Broos. 1999. Structure/function studies on the bacterial carbohydrate transporters, enzymes II, of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system. *Biochim Biophys Acta.* 1422:73-104.
- Roth, W.G., M.P. Leckie, D.N. Dietzler. 1985a. Osmotic stress drastically inhibits active transport of carbohydrates by *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun.* 126:434-441.
- Roth, W.G., S.E. Porter, M.P. Leckie, B.E. Porter, D.N. Dietzler. 1985b. Restoration of cell volume and the reversal of carbohydrate transport and growth inhibition of osmotically upshocked *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun.* 126:442-449.
- Rübenhagen, R., H. Ronsch, H. Jung, R. Krämer, S. Morbach. 2000. Osmosensor and osmoregulator properties of the betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* in proteoliposomes. *J Biol Chem.* 275:735-741.
- Ruffert, S., C. Lambert, H. Peter, V.F. Wendisch, R. Krämer. 1997. Efflux of compatible solutes in *Corynebacterium glutamicum* mediated by osmoregulated channel activity. *Eur J Biochem.* 247:572-580.

- Russell, J.B. 1990. Low-affinity, high-capacity system of glucose transport in the ruminal bacterium *Streptococcus bovis*: evidence for a mechanism of facilitated diffusion. *Appl Environ Microbiol.* 56:3304-3307.
- Russell, J.B., R.L. Baldwin. 1979. Comparison of substrate affinities among several rumen bacteria: a possible determinant of rumen bacterial competition. *Appl Environ Microbiol.* 37:531-536.
- Sahin-Toth, M., S. Frillingos, M.C. Lawrence, H.R. Kaback. 2000. The sucrose permease of *Escherichia coli*: functional significance of cysteine residues and properties of a cysteine-less transporter. *Biochemistry.* 39:6164-6169.
- Sahm, H., L. Eggeling, B.J. Eikmanns, R. Krämer. 1995. Metabolic design in amino acid producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Rev.* 16:243-252.
- Saier, M.H., Jr. 1985. Mechanisms of Inducer Exclusion. In *Mechanisms and Regulation of Carbohydrate Transport in Bacteria*. M.H. Saier, Jr., editor. Academic Press, Inc. (London) Ltd., London, UK. 110-113.
- Saier, M.H., Jr. 2000a. Families of transmembrane sugar transport proteins. *Mol Microbiol.* 35:699-710.
- Saier, M.H., Jr. 2000b. A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64:354-411.
- Saier, M.H., Jr., J.T. Beatty, A. Goffeau, K.T. Harley, W.H. Heijne, S.C. Huang, D.L. Jack, P.S. Jahn, K. Lew, J. Liu, S.S. Pao, I.T. Paulsen, T.T. Tseng, P.S. Virk. 1999. The major facilitator superfamily. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 1:257-279.
- Saier, M.H., Jr., V.S. Reddy, D.G. Tamang, A. Vastermark. 2014. The transporter classification database. *Nucleic Acids Res.* 42:D251-258.
- Saier, M.H., Jr., C.V. Tran, R.D. Barabote. 2006. TCDB: the Transporter Classification Database for membrane transport protein analyses and information. *Nucleic Acids Res.* 34:D181-186.
- Sakai, S., K. Yamanaka. 1968. Crystalline D-mannitol:NAD<sup>+</sup> oxidoreductase from *Leuconostoc mesenteroides*. *Biochim Biophys Acta.* 151:684-686.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Sato, Y., F. Poy, G.R. Jacobson, H.K. Kuramitsu. 1989. Characterization and sequence analysis of the *scrA* gene encoding enzyme IIScr of the *Streptococcus mutans*

- phosphoenolpyruvate-dependent sucrose phosphotransferase system *J Bacteriol.* 171:263-271.
- Schäfer, A., A. Tauch, W. Jäger, J. Kalinowski, G. Thierbach, A. Pühler. 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene.* 145:69-73.
- Schmid, K., R. Ebner, J. Altenbucher, R. Schmitt, J.W. Lengeler. 1988. Plasmid-mediated sucrose metabolism in *Escherichia coli* K-12: mapping of the *scr* genes of pUR400. *Mol Microbiol.* 2:1-8.
- Schmid, K., R. Ebner, K. Jahreis, J.W. Lengeler, F. Titgemeyer. 1991. A sugar-specific porin, ScrY, is involved in sucrose uptake in enteric bacteria. *Mol Microbiol.* 5:941-950.
- Schmid, K., M. Schupfner, R. Schmitt. 1982. Plasmid-mediated uptake and metabolism of sucrose by *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 151:68-76.
- Schoberth, S.M., A.A. de Graaf. 1993. Use of in vivo <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy to follow sugar uptake in *Zymomonas mobilis*. *Anal Biochem.* 210:123-128.
- Scopes, R.K., V. Testolin, A. Stoter, K. Griffiths-Smith, E.M. Algar. 1985. Simultaneous purification and characterization of glucokinase, fructokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*. *Biochem J.* 228:627-634.
- Shiio, I.S., S. I.; Kawamura, K. . 1990. Effects of carbon source sugars on the yield of amino acid production and sucrose metabolism in *Brevibacterium flavum*. *Agricultural and Biological Chemistry.* 54:1513-1519.
- Simic, P., H. Sahm, L. Eggeling. 2001. L-threonine export: use of peptides to identify a new translocator from *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol.* 183:5317-5324.
- Slatner, M., G. Nagl, D. Haltrich, K.D. Kulbe, B. Nidetzky. 1998. Enzymatic synthesis of mannitol. Reaction engineering for a recombinant mannitol dehydrogenase. *Ann N Y Acad Sci.* 864:450-453.
- Sonnhammer, E.L., S.R. Eddy, R. Durbin. 1997. Pfam: a comprehensive database of protein domain families based on seed alignments. *Proteins.* 28:405-420.
- Sprenger, G.A., J.W. Lengeler. 1988. Analysis of sucrose catabolism in *Klebsiella pneumoniae* and in Scr+ derivatives of *Escherichia coli* K12. *J Gen Microbiol.* 134:1635-1644.

- Stock, J.B., E.B. Waygood, N.D. Meadow, P.W. Postma, S. Roseman. 1982. Sugar transport by the bacterial phosphotransferase system. The glucose receptors of the *Salmonella typhimurium* phosphotransferase system. *J Biol Chem.* 257:14543-14552.
- Stroud, R.M., L.J. Miercke, J. O'Connell, S. Khademi, J.K. Lee, J. Remis, W. Harries, Y. Robles, D. Akhavan. 2003a. Glycerol facilitator GlpF and the associated aquaporin family of channels. *Curr Opin Struct Biol.* 13:424-431.
- Stroud, R.M., P. Nollert, L. Miercke. 2003b. The glycerol facilitator GlpF its aquaporin family of channels, and their selectivity. *Adv Protein Chem.* 63:291-316.
- Struch, T.B., S. Neuss, S. Bringer-Meyer, H. Sahm. 1991. Osmotic adjustment of *Zymomonas mobilis* to concentrated glucose solutions. *Appl Microbiol Biotechnol.* 34:518-523.
- Sun, Y., C.K. Vanderpool. 2011. Regulation and function of *Escherichia coli* sugar efflux transporter A (SetA) during glucose-phosphate stress. *J Bacteriol.* 193:143-153.
- Tanaka, Y., N. Okai, H. Teramoto, M. Inui, H. Yukawa. 2008a. Regulation of the expression of phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system (PTS) genes in *Corynebacterium glutamicum* R. *Microbiology.* 154.
- Tanaka, Y., H. Teramoto, M. Inui, H. Yukawa. 2008b. Regulation of expression of general components of the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system (PTS) by the global regulator SugR in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 78:309-318.
- Taranto, M.P., G. Font de Valdez, G. Perez-Martinez. 1999. Evidence of a glucose proton motive force-dependent permease and a fructose phosphoenolpyruvate:phosphotransferase transport system in *Lactobacillus reuteri* CRL 1098. *FEMS Microbiol Lett.* 181:109-112.
- Tauch, A., A. Puhler, J. Kalinowski, G. Thierbach. 2000. TetZ, a new tetracycline resistance determinant discovered in gram-positive bacteria, shows high homology to gram-negative regulated efflux systems. *Plasmid.* 44:285-291.
- Teramoto, H., M. Inui, H. Yukawa. 2011. Transcriptional regulators of multiple genes involved in carbon metabolism in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol.* 154:114-125.
- Thompson, J. 1987. Regulation of sugar transport and metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 46:221-231.

- Thompson, J., B.M. Chassy. 1985. Intracellular phosphorylation of glucose analogs via the phosphoenolpyruvate: mannose-phosphotransferase system in *Streptococcus lactis*. *J Bacteriol.* 162:224-234.
- Thulasiraman, P., S.M. Newton, J. Xu, K.N. Raymond, C. Mai, A. Hall, M.A. Montague, P.E. Klebba. 1998. Selectivity of ferric enterobactin binding and cooperativity of transport in gram-negative bacteria. *J Bacteriol.* 180:6689-6696.
- Toyoda, K., H. Teramoto, M. Inui, H. Yukawa. 2008. Expression of the gapA gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Corynebacterium glutamicum* is regulated by the global regulator SugR. *Appl Microbiol Biotechnol.* 81:291-301.
- Trinh, C.H., A. Asipu, D.T. Bonthron, S.E. Phillips. 2009. Structures of alternatively spliced isoforms of human ketohexokinase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 65:201-211.
- Trötschel, C. 2005. Methioninaufnahme und -export in *Corynebacterium glutamicum*. In Institut für Biochemie. Vol. Dissertation. Universität zu Köln, Köln.
- Trötschel, C., D. Deutenberg, B. Bathe, A. Burkovski, R. Krämer. 2005. Characterization of methionine export in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol.* 187:3786-3794.
- Trötschel, C., M. Follmann, J.A. Nettekoven, T. Mohrbach, L.R. Forrest, A. Burkovski, K. Marin, R. Krämer. 2008. Methionine uptake in *Corynebacterium glutamicum* by MetQNI and by MetPS, a novel methionine and alanine importer of the NSS neurotransmitter transporter family. *Biochemistry.* 47:12698-12709.
- Uhde, A. 2014. Kontrolle des Aminosuckerstoffwechsels in *Corynebacterium glutamicum*. In Institut für Biochemie. Universität zu Köln, Köln.
- Unthan, S., M. Baumgart, A. Radek, M. Herbst, D. Siebert, N. Brühl, A. Bartsch, M. Bott, W. Wiechert, K. Marin, S. Hans, R. Krämer, G. Seibold, J. Frunzke, J. Kalinowski, C. Ruckert, V.F. Wendisch, S. Noack. 2015. Chassis organism from *Corynebacterium glutamicum* -a top-down approach to identify and delete irrelevant gene clusters. *Biotechnol J.* 10:290-301.
- van Montfort, B.A., G.K. Schuurman-Wolters, J. Wind, J. Broos, G.T. Robillard, B. Poolman. 2002. Mapping of the dimer interface of the *Escherichia coli* mannitol permease by cysteine cross-linking. *J Biol Chem.* 277:14717-14723.
- van Rooijen, R.J., S. van Schalkwijk, W.M. de Vos. 1991. Molecular cloning, characterization, and nucleotide sequence of the tagatose 6-phosphate pathway gene cluster of the lactose operon of *Lactococcus lactis*. *J Biol Chem.* 266:7176-7181.

- Vertès, A.A., M. Inui, H. Yukawa. 2013. The Biotechnological Potential of *Corynebacterium glutamiu*cm, from Umami to Chemurgy. In *Corynebacterium glutamiu*cm - Biology and Biotechnology. H. Yukawa und M. Inui, editors. Springer, Heidelberg. 1-49.
- Vogt, M., S. Haas, S. Klaffl, T. Polen, L. Eggeling, J. van Ooyen, M. Bott. 2014. Pushing product formation to its limit: metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-leucine overproduction. *Metab Eng.* 22:40-52.
- Vrljić, M., L. Eggeling, H. Sahm. 1996. A new type of transporter with a new type of cellular function: L-lysine export from *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol.* 22:815-826.
- Weinand, M., R. Kramer, S. Morbach. 2007. Characterization of compatible solute transporter multiplicity in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 76:701-708.
- Weisser, P., R. Krämer, H. Sahm, G.A. Sprenger. 1995. Functional expression of the glucose transporter of *Zymomonas mobilis* leads to restoration of glucose and fructose uptake in *Escherichia coli* mutants and provides evidence for its facilitator action. *J Bacteriol.* 177:3351-3354.
- Wendisch, V.F., A.A. de Graaf, H. Sahm, B.J. Eikmanns. 2000. Quantitative determination of metabolic fluxes during coutilization of two carbon sources: comparative analyses with *Corynebacterium glutamicum* during growth on acetate and/or glucose. *J Bacteriol.* 182:3088-3096.
- Winnen, B., J. Felce, M.H. Saier, Jr. 2005. Genomic Analyses of Transporter Proteins in *Corynebacterium glutamicum* and *Corynebacterium efficiens*. In *Handbook of Corynebacterium glutamicum*. L. Eggeling und M. Bott, editors. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA. 149-186.
- Wood, J.M. 1999. Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol Mol Biol Rev.* 63:230-262.
- Yokota, A., N.D. Lindley. 2005. Central Metabolism: Sugar Uptake and Conversion. In *Handbook of Corynebacterium glutamicum*. L. Eggeling und M. Bott, editors. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA. 215-276.
- Yun, J.Y., S.C. Kang, S.K. Song. 1996. Microbial Transformation of Fructose to Mannitol by *Lactobacillus* sp. KY-107. *Biotechnol. Lett.* 18:35-40.
- Yun, J.Y., D.H. Kim. 1998. A comparative study of mannitol production by two lactic acid bacteria. *J. Ferment. Bioeng.* 85:203-208.

- Zembrzuski, B., P. Chilco, X.L. Liu, J. Liu, T. Conway, R. Scopes. 1992. Cloning, sequencing, and expression of the *Zymomonas mobilis* fructokinase gene and structural comparison of the enzyme with other hexose kinases. *J Bacteriol.* 174:3455-3460.
- Zhai, Y., M.H. Saier, Jr. 2001. A web-based program (WHAT) for the simultaneous prediction of hydrophathy, amphipathicity, secondary structure and transmembrane topology for a single protein sequence. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 3:501-502.
- Zittrich, S., R. Kämer. 1994. Quantitative discrimination of carrier-mediated excretion of isoleucine from uptake and diffusion in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol.* 176:6892-6899.

## 7 Anhang

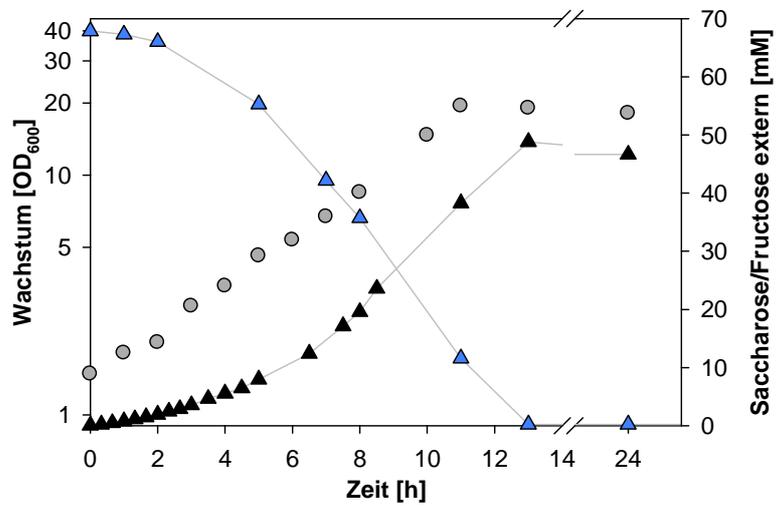


Abbildung 59. Wachstum, Saccharoseverbrauch und extrazelluläre Akkumulation von Fructose von *C. glutamicum* FIMS. Wachstum (○), externe Saccharose- (▲) und externe Fructosekonzentration (▲) in CgC-Medium mit 2% Saccharose. Dargestellt sind die Mittelwerte der externen und internen Fructosekonzentration des Wildtyps und von *C. glutamicum* FIMS, welche pro Zeitpunkt auf zwei bis fünf unabhängigen Messungen beruhen.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Reinhard Krämer für das Bereitstellen dieses spannenden Themas und für seine engagierte Betreuung. Ich bedanke mich herzlich für das Vertrauen, das er mir entgegenbrachte und die vielen fruchtbaren Gespräche und Anregungen. Das hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Ulf-Ingo Flügge danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Bei Herrn Dr. Gerd Seibold möchte ich mich für seine gute Betreuung und die vielen experimentellen sowie konzeptionellen Vorschläge zu meiner Arbeit bedanken. Er hatte stets ein offenes Ohr und hat mir bis zuletzt Zuversicht und Vertrauen entgegengebracht.

Außerdem gilt mein Dank den Mitgliedern der gesamten Arbeitsgruppe, die mich auf verschiedenste Art und Weise bei meiner Arbeit unterstützt haben. Bei Alexander Eck, Andreas Uhde, Anna Bartsch, Benjamin Roenneke, Carolin Lange, Dimitar Petrov, Judith Pinger, Katja Kirsch, Lina Clermont, Markus Becker, Michael Becker, Oliver Goldbeck und Stanislav Maximov bedanke ich mich für die tolle Zusammenarbeit über den gesamten Zeitraum und die vielen schönen gemeinsamen Erlebnisse bei einer Vielzahl an Unternehmungen, Tagungen und Reisen außerhalb des Labors. Besonders möchte ich mich bei Anna und Andreas bedanken, die sich die Zeit zum Korrekturlesen meiner Arbeit genommen haben. Anja Wittmann danke ich für ihre unendliche Erfahrung bei Klonierungsfragen und ihre Unterstützung im Labor. Gabriele Sitek möchte ich für ihre organisatorische Hilfe danken, ohne die die Arbeit im Labor so nicht möglich gewesen wäre. Außerdem bedanke ich mich bei Arthur Reuter für seine Geduld und Hilfe bei sämtlichen IT-Problemen.

Mein größter Dank geht an meine Familie und meine Freunde, die mein Leben neben der Arbeit bereichern. Meinen Eltern Susanne und Lutz Brühl danke ich dafür, dass sie mich uneingeschränkt in meinen Entscheidungen unterstützt und mir immer den Rücken frei gehalten haben. Bei Martina und Frank Rosenfeldt möchte ich mich für ihre stetige moralische Unterstützung bedanken. Mein liebster Dank gilt Jan Philipp Rosenfeldt, auf den ich mich in allen Lebenslagen rückhaltlos verlassen kann. Ich danke ihm für seine Hilfe, sein Verständnis und seine Geduld - insbesondere in der Endphase meiner Arbeit.

## 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 der Promotionsordnung sind mir bekannt.

Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. Reinhard Krämer am Institut für Biochemie der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln betreut worden.

Teilpublikationen:

**Unthan, S., Baumgart, M., Radek, A., Herbst, M., Siebert, D., Brühl, N., Bartsch, A., Bott, M., Wiechert, W., Marin, K., Hans, S., Krämer, R., Seibold, G., Frunzke, J., Kalinowski, J., Rückert, C., Wendisch, V. F., Noack, S. (2015) Chassis organism from *Corynebacterium glutamicum* – a top-down approach to identify and delete irrelevant gene clusters. *Biotechnology Journal* 10(2):290-301**

Ort, Datum

Unterschrift