

**Carrier und Regulatoren
des Tartrat- und C₄-Dicarboxylatstoffwechsels
von *Escherichia coli***

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Ok Bin Kim

geboren in Seoul

Mainz, Januar 2006

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 02. März 2006

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	2
2.1 C ₄ -Dicarboxylatstoffwechsel von <i>Escherichia coli</i>	2
2.2 C ₄ -Dicarboxylattransport von <i>Escherichia coli</i>	4
2.3 Tartratstoffwechsel	7
Der anaerobe Tartratstoffwechsel von <i>E. coli</i>	9
Der aerobe Tartratstoffwechsel von <i>E. coli</i>	10
2.4 Untersuchte Fragestellung	10
3 Material und Methoden	13
3.1 Verwendete Stämme von <i>Escherichia coli</i>	13
3.2 Medien und Zucht	15
3.3 Molekulargenetische Methoden	20
3.4 Biochemische Methoden	30
4 Ergebnisse	36
4.1 Potentielle Gene für Tartratcarrier und Regulatoren des Tartratstoffwechsels	36
4.2 Das <i>ttdAB ygjE</i> -Operon des anaeroben Tartratstoffwechsels	42
4.2.1 Das <i>ygjE</i> -Gen benutzt keinen eigenen Promotor	43
4.2.2 Expression des <i>ttdAB ygjE</i> -Operons	47
4.2.3 Tartratspezifische Regulation durch den LysR-Typ Regulator YgiP	49
4.3 Der anaerobe Tartratcarrier YgjE	52
4.3.1 Konstruktion der <i>ygjE</i> Mutante	53
4.3.2 Wachstumsverhalten der Carriermutanten	56
4.3.3 Eigenschaft des Tartratcarriers YgjE	61
4.4 Die potentiellen aeroben Tartratcarrier YfaV und YeaV	76
4.4.1 Hypothetische Organisation des <i>yeaTUVWX</i> und des <i>yfaXWVU</i> -Genclusters	76
4.4.2 Expression des <i>yeaU</i> Gens	77
4.4.3 Expression des <i>yfaWVU</i> -Operons	81

4.5	Suche nach weiteren C4-Dicarboxylatcarriern in <i>E. coli</i> durch globale Expressionsanalyse	83
4.5.1	DNA-Microarray	85
4.5.1.1	Alternativer Succinateffluxcarrier in der Glucosefermentation	87
4.5.1.2	Alternativer aerober Aufnahme carrier für Succinat bei pH 6	91
4.5.2	Genexpressionsstudie mit lacZ-Reporterfusion von Kandidatengen	94
4.5.3	Physiologische Charakterisierung der Deletionsmutanten von der Succinatcarrier	97
5	Diskussion	103
5.1	C4-Dicarboxylatcarrier von <i>Escherichia coli</i>	103
5.1.1	Anaerober Tartratcarrier TtdT (YgjE) von <i>E. coli</i>	106
5.1.2	Aerober Tartratcarrier YfaV und YeaV von <i>E. coli</i>	109
5.1.3	Alternative anaerobe Succinateffluxcarrier von <i>E. coli</i>	113
5.1.4	Alternative aerobe Succinataufnahme carrier von <i>E. coli</i>	115
5.2	Die DcuSR unabhängige Tartratregulatoren YgiP und YeaT von <i>E. coli</i>	117
6	Literatur	123
7	Anhang	135
8	Veröffentlichungen	136

1 Zusammenfassung

Der aerobe und anaerobe Tartratstoffwechsel von *Escherichia coli* und seine Beziehung zum allgemeinen C₄-Dicarboxylatstoffwechsel wurden untersucht. Unter anaeroben Bedingungen wird L-Tartrat zu Succinat umgesetzt. Der sekundäre Carrier TtdT (YgjE) von *E. coli* katalysiert den elektroneutralen L-Tartrat/Succinat-Antiport. TtdT besitzt eine hohe Substratspezifität und katalysiert den Transport von L-Tartrat und Succinat, nicht aber von meso- und D-Tartrat. Der Transport von D-Tartrat erfolgt durch die allgemeinen C₄-Dicarboxylatcarrier (Dcu).

Das Gen *ttdT* (*ygjE*) bildet mit den Genen *ttdA* und *ttdB*, die für L-Tartratdehydratase kodieren, ein Operon. Das benachbarte Gen *ttdR* (*ygiP*) kodiert für einen Tartrat-spezifischen Regulator vom LysR-Typ, TtdR (YgiP). TtdR reguliert die L-Tartratermentation direkt durch Induktion des *ttdABT*-Operons und des eigenen Gens *ttdR*. Dagegen reguliert das Zweikomponentensystem DcuSR die Gene des allgemeinen C₄-Dicarbonsäurenstoffwechsels, *frdABCD* (Fumaratreduktase), *dcuB* (Fumarat/Succinat-Antiporter) und *fumB* (Fumarase), wodurch die L-Tartratermentation ebenfalls beeinflusst wird. DcuSR erkennt verschiedene C₄-Dicarbonsäuren, einschließlich D- und L-Tartrat. TtdR stellt damit den Tartrat-spezifischen Regulator dar, der für die Expression des *ttdR ttdABT*-Genclusters spezialisiert ist. Zusätzlich wird die L-Tartratermentation durch die globalen Regulatoren FNR und CRP reguliert.

YfaV und YeaV sind potentielle Tartrattransporter im aeroben Wachstum. YfaV katalysiert vermutlich den Transport von C₄-Dicarboxylaten, einschließlich Tartrat, unter aeroben und anaeroben Bedingungen. YeaV wird nur in Anwesenheit von L- und meso-Tartrat und unter aeroben Bedingungen gebildet. Die *yeaUVWX*-Gene unterliegen der transkriptionellen Regulation durch YeaT, dessen Gen *yeaT* vor *yeaU* liegt. YeaT ist wie TtdR ein Tartrat-spezifischer Regulator und besitzt eine signifikante Ähnlichkeit zu TtdR.

Die *dctA dcuA dcuB dcuC dcuD*-Fünffachmutante scheidet in der Glucosefermentation noch soviel Succinat aus wie der Wildtypstamm. Die Mutante wächst unter aeroben Bedingungen bei pH < 6 noch mit Succinat. Durch Genom- und Expressionsanalysen wurden Gene identifiziert, die für potentielle alternative Carrier kodieren. Der Formiateffluxcarrier FocA sowie die möglichen Transportproteine YeiH und YbiO sind potentielle alternative Succinattransporter für den Efflux in der Fermentation. YfaV (potentieller Tartrattransporter), YfdV (potentieller C₃-Di-/Monocarboxylate-Transporter), YjcG (Prolin- oder Acetat-Transporter) und GltP (Glutamat/Aspartat-Transporter) sind gute Kandidaten für den aeroben alternativen Succinatcarrier.

2 Einleitung

2.1 C₄-Dicarboxylatstoffwechsel von *Escherichia coli*

Escherichia coli ist ein fakultativ anaerobes Enterobakterium, und kann sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen C₄-Dicarboxylate als Substrate für den Energiestoffwechsel nutzen. In der aeroben Atmung werden C₄-Dicarboxylate wie Succinat, Fumarat und Malat im Citratzyklus zu CO₂ oxidiert. Die Aufnahme von C₄-Dicarboxylaten erfolgt durch den DctA-Carrier (Kay & Kornberg, 1971; Davies *et al.*, 1999), der unter aeroben Bedingungen bei Wachstum auf C₄-Dicarboxylaten gebildet wird.

Unter anaeroben Bedingungen ist der C₄-Dicarboxylatstoffwechsel wegen des unvollständigen Citratzyklus auf die Fumaratatmung angewiesen (Abb. 1). Fumarat wird dabei als terminaler Elektronenakzeptor genutzt und durch die Fumaratreduktase zu Succinat reduziert. Succinat kann nicht weiter umgesetzt werden und wird ausgeschieden (Böck & Sawers, 1996; Janausch *et al.*, 2002). Die Aufnahme von Fumarat und der Efflux von Succinat erfolgen durch den DcuB-Carrier, der den Fumarat/Succinat-Antiport elektroneutral katalysiert (Engel *et al.*, 1994; Janausch *et al.*, 2002; Uden & Kleefeld, 2004). Die Bildung des DcuB-Carriers wird unter Anaerobiose durch C₄-Dicarboxylate induziert (Golby *et al.*, 1998; Zientz *et al.*, 1998).

Succinat entsteht als ein Endprodukt der Fumaratatmung, der Glucose-, Citrat- und vermutlich auch der Tartratfermentation (Abb. 1). In der Glucosefermentation wird Glucose zu Phosphoenolpyruvat umgesetzt, das zu Oxalacetat carboxyliert wird. Oxalacetat wird über Malat zu Fumarat umgesetzt, Fumarat wird schließlich zu Succinat reduziert (Kanehisa, 1995; Karp, 2005). In der Citratfermentation wird Citrat durch die Citratlyase zu Acetat plus Oxalacetat umgesetzt, das wie in der Glucosefermentation unter Einbeziehung der Fumaratreduktion zu Succinat umgesetzt wird (Bott, 1997; Pos *et al.*, 1998). L-Tartrat wird

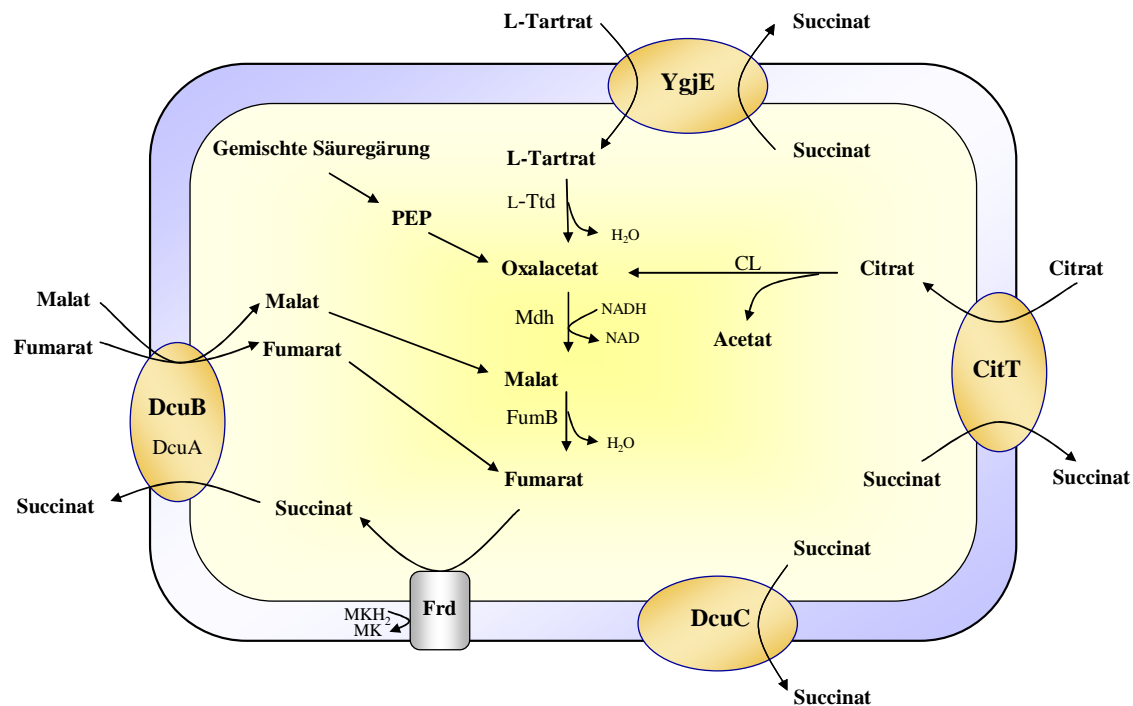


Abb. 1. Anaerober C₄-Dicarboxylatstoffwechsel und Fumaratatemung. Unter anaeroben Bedingungen werden C₄-Dicarboxylate zu Fumarat umgesetzt. Fumarat wird durch die Fumaratreduktase zu Succinat reduziert. Die Fumaratatemung ist verschiedenen Wegen des anaeroben C₄-Dicarboxylatstoffwechsel gemeinsam. Succinat wird je nach Vorläufer durch verschiedene Carrier exportiert. DcuB, Fumarat/Succinat-Antiporter; DcuA, konstitutiver C₄-Dicarboxylatcarrier; DcuC, Succinateffluxcarrier; CitT, Citrat/Succinat-Antiporter; YgjE, möglicher Tartrat/Succinat-Antiporter; CL, Citratlyase; Frd, Fumaratreduktase; FumB, (anaerobe) Fumarase; Mdh, Malatdehydrogenase; MK, Menachinon; PEP, Phosphoenolpyruvat; L-Ttd, L-Tartratdehydratase

unter anaeroben Bedingungen durch die L-Tartratdehydratase ebenfalls zu Oxalacetat umgesetzt (Reaney *et al.*, 1993), das wie beschrieben zu Succinat reduziert wird. Succinat von der Glucosefermentation wird durch den Effluxcarrier DcuC exportiert (Zientz *et al.*, 1996, 1999, Janusch *et al.*, 2002). Der Export von Succinat in der Citratfermentation dagegen erfolgt durch den Citrat/Succinat-Antiporter CitT (Pos *et al.*, 1998). Es wurde vorgeschlagen, dass in der L-Tartratfermentation der potentielle YgjE-Carrier einen Antiport von L-Tartrat gegen Succinat katalysiert (Pos *et al.*, 1998).

Der C₄-Dicarboxylatstoffwechsel wird auf Transkriptionsebene durch verschiedene Elektronenakzeptoren reguliert. Die Regulation erfolgt hierarchisch, um eine maximale ATP-Ausbeute zu gewährleisten (Unden & Bongaerts, 1997). O₂ ist der bevorzugte Elektronenakzeptor, gefolgt von Nitrat. Fumaratatmung kann erst in Abwesenheit von O₂ und Nitrat stattfinden (Gunsalus & Park, 1994; Unden *et al.*, 1994; Unden & Bongaerts, 1997; Goh *et al.*, 2005). Die hierarchische Kontrolle wird durch transkriptionelle Regulatoren erzielt. Die Regulation durch O₂ erfolgt durch FNR (fumarate nitrate reductase regulator) und das ArcAB-Zweikomponentensystem (aerobic regulation control) (Gunsalus & Park, 1994). Nitrat-Regulation wird durch das NarXL- oder NarPQ-Zweikomponentensystem vermittelt (Rabin & Stewart, 1993; Darwin & Stewart, 1995). Die Regulation durch C₄-Dicarboxylate erfolgt durch das DcuSR-Zweikomponentensystem (Zientz *et al.*, 1998; Golby *et al.*, 1999; Janausch *et al.*, 2002). Die Expression der aeroben und anaeroben C₄-Dicarboxylatcarrier, DctA und DcuB, unterliegt der Regulation durch DcuSR (Zientz *et al.*, 1998; Davies *et al.*, 1999; Janausch *et al.*, 2002, 2004). Neben den Genen für die Transporter kontrolliert DcuSR die Expression der Stoffwechselgene der Fumaratatmung, *frdABCD* (Fumaratreduktase) und *fumB* (Fumarase), wobei *fumB* von dem *dcuB*-Promotor mittranskribiert wird (Golby *et al.*, 1999).

2.2 C₄-Dicarboxylattransport von *Escherichia coli*

E. coli besitzt verschiedene Transportsysteme für C₄-Dicarboxylate, um die Aufnahme von C₄-Dicarboxylaten und den Efflux von Succinat unter verschiedenen Wachstumsbedingungen zu katalysieren (Abb. 2). Der C₄-Dicarboxylattransport erfolgt durch sekundäre Carrier und ihre Bildung wird je nach Wachstumsbedingung via transkriptionelle Regulatoren reguliert.

Unter aeroben Bedingungen katalysiert der DctA-Carrier die Aufnahme von C₄-Dicarboxylaten wie Succinat, Fumarat, Malat, Aspartat und Tartrat (Kay & Kornberg, 1971; Davies *et al.*, 1999). DctA ist ein sekundärer Carrier der DAACS-Familie (Paulsen, 1998). Die Aufnahme von C₄-Dicarboxylaten durch DctA erfolgt durch einen Symport mit Protonen

und der Transport ist von einem Protonenpotential abhängig (Gutowski & Rosenberg, 1975; Unden & Kleefeld, 2004). Ein weiterer Carrier ist DcuA, der konstitutiv gebildet wird (Golby *et al.*, 1998). DcuA katalysiert die Aufnahme von C₄-Dicarboxylaten im Symport mit Protonen (Six *et al.*, 1994; Engel *et al.*, 1994). Die *dct dcu*-Mutante ist nicht mehr in der Lage bei neutralem pH unter aeroben Bedingungen auf C₄-Dicarboxylaten zu wachsen (Janausch *et al.*, 2001). Das aerobe Wachstum der *dct dcu*-Mutante kann jedoch in saurem pH (pH < 6) auf Succinat wiederhergestellt werden, aber nicht auf Fumarat (Janausch *et al.*, 2001). Es sollte daher einen alternativen Succinatcarrier geben. Dafür wurde ein Monocarboxylatcarrier vorgeschlagen, da Succinat bei saurem pH als Monoanion vorliegt (Janausch *et al.*, 2001).

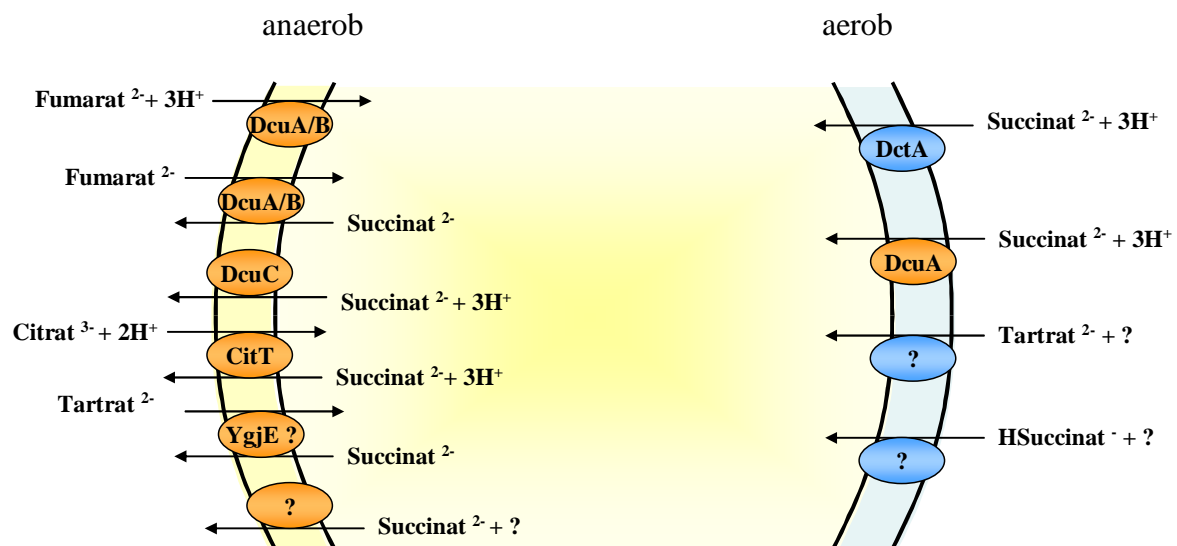


Abb. 2. Die aeroben und anaeroben C₄-Dicarboxylatcarrier von *E. coli*. Unter aeroben Bedingungen erfolgt die Aufnahme von C₄-Dicarboxylaten hauptsächlich durch DctA. Es sollte noch weitere aerobe C₄-Dicarboxylatcarrier für die Tartrat- bzw. Succinataufnahme geben. Die alternativen Succinatcarrier sollten in der *dct*-Mutante bei saurem pH-Wert die Aufnahme von Succinat katalysieren. Unter anaeroben Bedingungen werden die Aufnahme, Gegentauch und Efflux der C₄-Dicarboxylaten durch Dcu-Carrier katalysiert. Davon ist DcuB für den Fumarat/Succinat-Antipport und DcuC für den Succinatefflux spezialisiert. CitT ist der Citrat/Succinat-Antiporter. YgjE ist ein potentieller Carrier, der homolog wie CitT den Tartrat/Succinat-Antipport katalysieren könnte. In *E. coli* sollte noch ein alternativer anaerober Carrier vorhanden sein, der den Succinatefflux in der *dcu*-Mutante katalysiert.

Unter anaeroben Bedingungen katalysieren die anaerob gebildeten Carrier DcuA, DcuB und DcuC die Aufnahme, den Gegentausch und den Efflux von C₄-Dicarboxylaten (Six *et al.*, 1994; Zientz *et al.*, 1996). DcuA und DcuB sind sekundäre Carrier der Dcu-Familie, katalysieren hauptsächlich den Fumarat/Succinat-Antiport, dessen Aktivität in der Fumaratatmung notwendig ist (Janausch *et al.*, 2002). DcuB wird unter Bedingungen der Fumaratatmung induziert, DcuA wird dagegen konstitutiv gebildet (Golby *et al.*, 1998 & 1999; Zientz *et al.*, 1998). DcuB zeigt die höchste Aktivität in dem Fumarat/Succinat-Antiport und stellt den Hauptcarrier des Fumarat/Succinat-Antiports dar (Zientz *et al.*, 1996). Der Gegentausch ist elektroneutral und wird durch den Konzentrationsgradienten von Substraten getrieben (Engel *et al.*, 1992, 1994). DcuA und DcuB katalysieren die Aufnahme von C₄-Dicarboxylaten, die im Symport mit Protonen erfolgt. Für die Aufnahme ist daher ein Protonenpotential notwendig (Engel *et al.*, 1994; Zientz *et al.*, 1996). DcuA und DcuB können auch den Efflux von Succinat katalysieren. Der Succinatefflux bildet ein Membran-Potential ($\Delta\psi$) aus (Engel *et al.*, 1994; Uden & Kleefeld, 2004).

DcuC ist der sekundäre Carrier für den Succinatefflux während der Glucosefermentation (Zientz *et al.*, 1996 & 1999). Die Expression des *dcuC* Genes erfolgt nur unter anaeroben Bedingungen, sie wird durch Glucose nicht reprimiert. DcuC bildet mit DcuD die DcuC-Familie sekundärer Carrier, aber das Gen *dcuD* ist vermutlich ein stilles Gen (Janausch & Uden, 1999). Die Carrier der DcuC-Familie finden sich in Bakterien, die Hexose fermentieren und Succinat bilden (Uden & Kleefeld, 2004). Trotz der spezialisierten Funktionen können sich DcuA, DcuB und DcuC in ihrer Funktion gegenseitig ersetzen (Zientz *et al.*, 1996). Die *dct dcu*-Mutante ist immer noch in der Lage, Succinat in der Glucosefermentation zu exportieren. Es muss daher ein alternativer Carrier vorgeschlagen werden, der den Succinatefflux in der Glucosefermentation katalysieren und DcuC ersetzen kann (Kim, 2000).

Der Citrat/Succinat-Antiporter CitT und ein möglicher Tartrat/Succinat-Antiporter YgjE gehören zusammen zur DASS-Familie. CitT katalysiert den Gegentausch von Citrat gegen

Succinat in der Citratfermentation (Pos. *et al.*, 1998). Das Gen *citT* liegt in der Nachbarschaft der Strukturgene der Citratfermentation. YgjE weist eine hohe Sequenzähnlichkeit mit CitT auf (Tab. 27), und das Gen *ygjE* liegt im Genom stromab der Gene für die L-Tartratdehydratase (*ttdAB*) (Abb. 6). YgjE könnte analog zu CitT den Tartrat/Succinat-Antiport katalysieren.

2.3 Tartratstoffwechsel

Weinsäure ist in vielen Pflanzen und Früchten vorhanden, besonders in *Vitaceae*, *Geraniaceae* und *Leguminosae*. In den Blättern einiger *Pelargonium*-Arten ist die Weinsäure in Gehalten bis zu 150g/kg TG enthalten (Würdig & Woller, 1989). Wie der Name sagt, stellt die Weinsäure zusammen mit der Apfelsäure die Hauptsäurekomponente des Weins dar. Der Anteil der Weinsäure in Wein liegt bei 0,5 bis 4,4 g/l bei 15°C (Würdig & Woller, 1989). Die Weinsäure wird in Trauben der *Vitis*-Arten aus Glucose und Zuckersäure synthetisiert (Abb. 32 in Anhang) (Ruffner & Rast, 1974; Würdig & Woller, 1989). Glucose und Glyoxylat sind für die Synthese des Tartrats gute Ausgangssubstanzen. Glucose wird über Gluconat, 5-Ketogluconat, Enolisierung und Umwandlung in 4-Ketogluconat zur Prätersäure (1,2-Dihydroxy-ethylhydrogen-L-Tartrat) umgesetzt. Diese wird zu L-Tartrat und Glykolaldehyd gespalten. Der Glykolaldehyd wird über Glykolat zu Glyoxylat umgewandelt. Zwei Moleküle des Glyoxylat werden zu Oxalglykolat gekoppelt, welches zu L-Tartrat reduziert wird (Ruffner & Rast, 1974; Würdig & Woller, 1989). Ferner entsteht Weinsäure in einigen Pflanzen durch Abbau der L-Ascorbinsäure (Saito *et al.*, 1997; Green & Fry, 2005). Der maximale Weinsäuregehalt in Wein hängt von der geringen Löslichkeit des Salzes der Weinsäure ab. Tartrat (2,3-Dihydroxysuccinat) ist das Salz der Weinsäure, und tritt in drei Stereoisomeren auf: L-, D- und meso-Tartrat (Abb. 3). Die L(+)-Form ist die häufigste Form von Tartrat (2R,3R). Die D(-)-Form des Tartrats (2S,3S) kommt in der Natur sehr selten vor, sie findet sich in den Blättern des westafrikanischen Baums *Bauhinia reticula* (Römpp, 1999). meso-Tartrat ist eine nicht natürlich vorkommende Form von Tartrat.

Die Möglichkeit des Tartratabbaus durch Mikroorganismen wurde trotz früher Veröffentlichungen von Pasteur (Pasteur, 1858, 1860 und 1863) bis zum Nachweis des Tartratabbaus durch Reinkulturen von Coliformen-Bakterien (Grimbert & Ficquet, 1897, 1898 und 1899; Nijdam, 1907) ignoriert (Vaughn *et al.*, 1946). Tartrat kann unter aeroben und anaeroben Bedingungen durch verschiedene Bakterien, z.B. *Klebsiella* (Grimbert & Ficquet, 1897, 1898 ; Nijdam, 1907; Barker, 1936), *Escherichia coli* (Sakaguchi & Tada, 1940; Vaughn *et al.*, 1946; Reaney *et al.*, 1993), *Rhodopseudomonas* (van Niel, 1944), *Clostridium* (Mercer & Vaughn, 1951), *Pseudomonas* (Shilo & Stainer, 1957), *Lactobacillus* (Radler & Yannissis, 1972), *Bacteriodes* (Wagner & Pfennig, 1987; Janssen, 1991) und *Agrobacterium* (Crouzet & Otten, 1995; Salomone & Otten, 1999; Rid *et al.*, 2000) abgebaut werden. Die Abbauewege der drei Stereoisomeren des Tartrats durch Bakterien können in drei mögliche Wege zusammengefaßt werden: (1) Tartratdehydratase-Weg (Shilo, 1957; Rode & Giffhorn, 1982a & 1982b; Janssen, 1991; Reaney *et al.* 1993), (2) Tartratdehydrogenase-Weg (Kohn *et al.*, 1968; Kohn & Jakoby, 1968; Tripton Beecher, 1994; Karsten *et al.*, 2002) und (3) Tartratdecarboxylase-Weg (Furuyoshi *et al.*, 1991; Tipton & Beecher, 1994; Ruszczycky & Anderson, 2004).

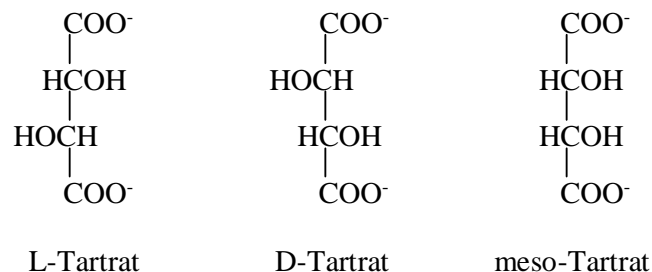


Abb. 3. Die drei Stereoisomere von Tartrat. L-Tartrat (2R,3R) kommt in vielen Pflanzen häufig vor, D-Tartrat (2S,3S) ist in der Natur selten. meso-Tartrat stellt eine nicht natürlich vorkommende Form des Tartrats dar.

Der anaerobe Tartratstoffwechsel von *E. coli*

E. coli kann unter anaeroben Bedingungen mit Tartrat nur wachsen, wenn ein Cosubstrat, z. B. Glycerin, als Elektronendonator zugegeben wird. Unter anaeroben Bedingungen erfolgt der Abbau von L- und D-Tartrat in *E. coli* über den Tartratdehydratase-Weg (Abb. 1). Die L-Tartratdehydratase wird von den Genen *tttAB* kodiert und katalysiert die Umsetzung des L-Tartrats zu Oxalacetat (Reaney *et al.*, 1993). Die L-Tartratdehydratase (L-Ttd) wird durch L- und meso-Tartrat unter anaeroben Bedingungen induziert, die D-Tartratdehydratase (D-Ttd) durch alle drei Stereoisomere. Die L-Ttd bzw. D-Ttd katalysieren jedoch stereospezifisch nur die Dehydratisierung von L-Tartrat bzw. D-Tartrat. In *E. coli* wurde keine meso-Tartratdehydrataseaktivität gefunden (Reaney *et al.*, 1993).

Das Oxalacetat wird durch die Malatdehydrogenase zu Malat reduziert und weiterhin durch die anaerobe Fumarase zu Fumarat dehydratisiert. Schließlich wird Fumarat durch die Fumaratreduktase zum Endprodukt Succinat reduziert (Abb. 1). Für diesen Stoffwechselweg sind L-Tartrat/Succinat- und D-Tartrat/Succinat-Antiporter erforderlich. Mögliche Kandidaten für den Tartrat/Succinat-Antiport sind das Protein YgjE, das Produkt des *ygjE*-Gens, oder der Fumarat/Succinat-Antiporter DcuB.

In anderen Bakterien, in denen Tartrat über die Tartratdehydratase abgebaut wird, wird Oxalacetat entweder zu Pyruvat decarboxyliert oder zu Malat reduziert. In *Pseudomonas* werden L-, D- und meso-Tartrat durch die L-, D- bzw. meso-Tartratdehydratase zu Oxalacetat umgesetzt und dann zu Pyruvat decarboxyliert (Shilo, 1957). In Milchsäurebakterien wird Oxalacetat unterschiedlich umgesetzt. In *L. plantarum* wird Oxalacetat zu Pyruvat decarboxyliert, und dann weiter zu Laktat oder Acetat umgesetzt (homofermentativ). Aber in *L. brevis* wird ein Drittel des Oxalacetat über Malat zu Succinat, die restlichen zwei Drittel über Pyruvat zu Acetat umgesetzt (heterofermentativ) (Radler & Yannissis, 1972).

Der aerobe Tartratstoffwechsel von *E. coli*

Das aerobe Wachstum von *E. coli* mit L-, D- und meso-Tartrat wurde von Vaughn (1946) gezeigt. Die Reaktionen des aeroben Tartratabbaus bleiben aber bis heute unklar, und viele Stämme von *E. coli* scheinen nicht in der Lage zu sein, Tartrat unter aeroben Bedingungen abzubauen. Der mögliche Weg für den Tartratabbau durch *E. coli* wurde in Anlehnung an Abbauewege anderer Bakterien formuliert (Abb. 4). Unter aeroben Bedingungen wird der Abbau von L- und meso-Tartrat durch *E. coli* vermutlich durch eine Tartratdehydrogenase eingeleitet, da eine potentielle Tartratdehydrogenase (Produkt des *yeaU*-Gens) zu finden ist, die eine signifikante Ähnlichkeit zur Tartratdehydrogenase von *Yersinia pestis*, *Pseudomonas putida* und *Agrobacterium vitis* aufweist (Abb. 28). Die Tartratdehydrogenase oxidiert Tartrat zu Oxalglykolat, das anschließend zu D-Glycerat reaktiv decarboxyliert wird. Diese Tartratdehydrogenasen besitzen auch Tartratdecarboxylase-Aktivität, die eine direkte Umsetzung von Tartrat zu D-Glycerat katalysiert (Furuyoshi *et al.*, 1991; Tipton & Beecher, 1994). D-Glycerat wird weiter zu Pyruvat umgesetzt und schließlich im Citrat- und Glyoxylatzyklus zu CO₂ oxidiert. Die L-Tartratdehydratase von *E. coli* ist ein sehr O₂-labiles Enzym, aber die D-Tartratdehydratase ist vermutlich O₂-stabil (Reaney *et al.*, 1993). D-Tartrat kann deshalb durch die D-Tartratdehydratase zu Oxalacetat umgesetzt werden. Oxalacetat wird direkt oder über Pyruvat und Acetyl-CoA im Citrat- und Glyoxylatzyklus zu CO₂ oxidiert. Die Tartrataufnahme kann unter aeroben Bedingungen durch den aeroben C₄-Dicarboxylatcarrier DctA katalysiert werden (Kay *et al.*, 1971), dennoch könnte in *E. coli* ein weiterer Carrier vorhanden sein, der den Tartrattransport spezifisch katalysiert.

2.4 Untersuchte Fragestellung

In dieser Arbeit sollten zunächst die aeroben und anaeroben Tartratcarrier identifiziert werden. Der erste Schritt dieser Suche bestand in einer Datenbank-Analyse von Genen oder Proteinen, die als potentielle Carrier in Frage kommen. Die besten Kandidaten aufgrund ihrer Sequenz

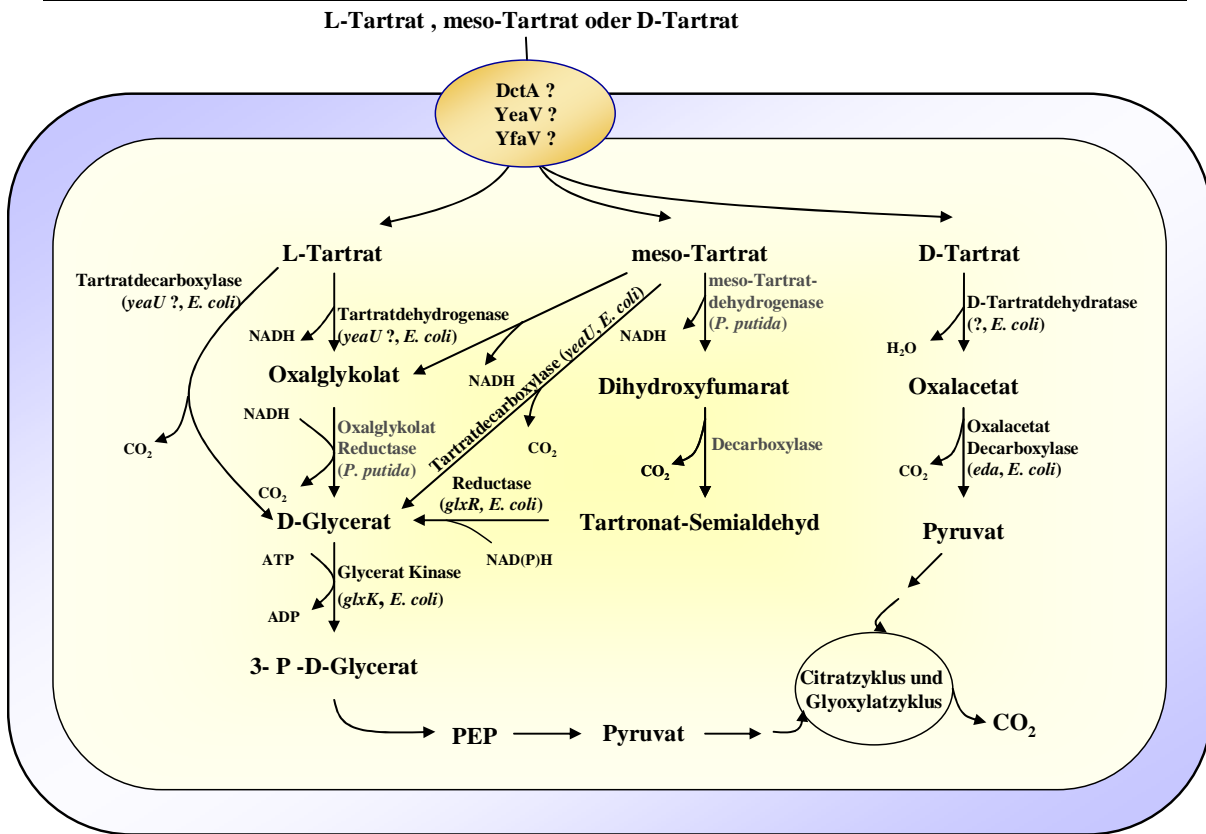


Abb. 4. Mögliche Tartratabbauwege in *E. coli* unter aeroben Bedingungen. Unter aeroben Bedingungen werden L-, D- und meso-Tartrat durch DctA oder weitere mögliche Tartrattransporter aufgenommen. L- und meso-Tartrat werden vermutlich durch den Tartratdehydrogenase- oder Tartratdecarboxylase-Weg abgebaut. D-Tartrat könnte durch eine O₂-stabile D-Tartratdehydratase umgesetzt werden. Schließlich wird dann im Citratzyklus und Glyoxylatzyklus zu CO₂ oxidiert.

und der Lage im Genom waren YgjE, YeaV und YfaY. YgjE ist ein potentieller Tartrat/Succinat-Antiporter des anaeroben Stoffwechsels. Der Operon-Aufbau des Genclusters von *E. coli*, das *ygjE* enthält, seine Genexpression und Genregulation wurden untersucht. Die Funktion von YgjE als anaerober Tartrattransporter wurde durch Wachstumsversuche mit der *ygjE*-Deletionsmutante bestätigt. Schließlich wurde die Funktion von YgjE als Tartrat/Succinat-Antiporter durch Transportmessung mit dem radioaktiv-markierten Succinat bzw. Tartrat untersucht. YeaU und YfaV als mögliche aerobe Tartratcarrier wurden durch Expressionsstudien untersucht.

Weiterhin sollten die alternativen C₄-Dicarboxylatcarrier in dieser Arbeit gesucht werden. Der aerobe Aufnahme carrier für Succinat bei pH < 6 und der anaerobe Efflux carrier in der Glucosefermentation wurden durch Untersuchung der globalen Expression mittels DNA-Microarray gesucht. Zur Identifizierung dieser alternativen Aufnahme carrier wurde die Expression von A) Wildtypstämmen aus der Zucht der induzierbaren Bedingungen gegenüber der Zucht der nicht-induzierbaren Bedingungen, B) der *dctA dcuA dcuB dcuC dcuD*-Mutante gegenüber dem Wildtypstamm aus den Zuchten der induzierbaren Bedingungen und C) der *dctA dcuA dcuB dcuC dcuD*-Mutanten nach der Zucht unter induzierten Bedingungen gegenüber der Zucht unter nicht-induzierten Bedingungen verglichen. Die alternativen C₄-Dicarboxylatcarrier sollten in der *dctA dcuA dcuB dcuC dcuD*-Mutante unter induzierbaren Bedingungen hochreguliert werden. Gute Kandidaten wurden dann anhand von Expressionsstudien mit *lacZ*-Reporterfusionen genauer untersucht. Weiterhin wurde das physiologische Verhalten der Carriermutanten, in der das jeweilige Kandidatengen zusätzlich zu den *dctA dcuA dcuB dcuC*-Genen deletiert wurde, biochemisch untersucht.

3 Material und Methode

3.1 Verwendete Stämme von *Escherichia coli*

Tab. 1. Verwendete *E. coli* Stämme, Plasmide und Phagen.

	Genotyp und Characteristica	Referenz/Quelle
<u>Stämme</u>		
AN387	Wildtyp	Wallace & Young, 1977
MG1655	CGSC 6300, <i>fnr</i> ⁻ , λ- F- P1-sensitiv	Jensen, 1993
LJ1	<i>fnr</i> ⁺ Derivat von MG1655	Jahreis, 1994 (unveröffentlicht)
MC4100	F ⁻ <i>araD139</i> Δ(<i>argF-lac</i>)U169, <i>rpsL150</i> , (Δ <i>lacZ</i>), <i>relA1 flbB530 deoC1 ptsF25 rbsR</i>	Silhavy <i>et al.</i> , 1984
MDO1100	AN387, aber <i>dctA::spc</i> ^R <i>dcuA::spc</i> ^R <i>dcuB::kan</i> ^R	Davies <i>et al.</i> , 1999
JRG2814	AN387, aber <i>dcuA::spc</i> ^R <i>dcuB::kan</i> ^R	Six <i>et al.</i> , 1994
IMW151a	MC4100, aber <i>fnr::tet</i>	Becker, 1995
IMW157	AN387, aber <i>dcuC::miniTn10 (cam</i> ^R <i>)</i>	Zientz <i>et al.</i> , 1996
IMW159	AN387, aber <i>dcuA::spc</i> ^R <i>dcuC::miniTn10 (cam</i> ^R <i>)</i>	Zientz <i>et al.</i> , 1996
IMW213b	AN387, aber <i>dctA::spc</i> ^R <i>dcuA::spc</i> ^R <i>dcuB::kan</i> ^R , <i>dcuC::miniTn10 (cam</i> ^R <i>)</i>	Janausch <i>et al.</i> , 1999
IMW235	MC4100, aber λ[Φ(b2374 ⁻ <i>lacZ</i>)], <i>amp</i> ^R	Diese Arbeit
IMW244	AN387, aber <i>dct::spc</i> ^R <i>dcuA::spc</i> ^R <i>dcuB::kan</i> ^R , <i>dcuC::mini Tn10, cam</i> ^R <i>yhcL::amp</i> ^R	Janausch & Uden, 1999
IMW262	MC4100, aber <i>dcuS::cam</i> ^R	Zientz <i>et al.</i> , 1998
IMW277	AN387, aber <i>dcuA:: spc</i> ^R <i>dcuB::kan</i> ^R , <i>dcuC::miniTn10 (cam</i> ^R <i>)</i> , <i>citT::kan</i> ^R	Janausch <i>et al.</i> , 2001
IMW418	MC4100, aber λ[Φ(ygjU ⁻ <i>lacZ</i>)], <i>amp</i> ^R	Diese Arbeit
IMW422	MG1655, aber <i>dctA::spc</i> ^R <i>dcuA::spc</i> ^R , <i>dcuB::Kan</i> ^R <i>dcuC::miniTn10 (cm</i> ^R <i>)</i> , <i>dcuD::amp</i> ^R	Janausch, 2002 (unveröffentlicht)
IMW424	MG1655, aber <i>dctA::spc</i> ^R <i>dcuA::spc</i> ^R , <i>dcuB::kan</i> ^R	Janausch, 2002 (unveröffentlicht)
IMW425	MG1655 aber <i>dctA::spc</i> ^R <i>dcuA::spc</i> ^R , <i>dcuB::kan</i> ^R <i>dcuC::miniTn10 (cm</i> ^R <i>)</i>	Janausch, 2002 (unveröffentlicht)
IMW426	MC4100, aber λ[Φ(<i>focA</i> ⁻ <i>lacZ</i>)], <i>amp</i> ^R	Diese Arbeit
IMW477	MG1655, aber <i>ybiO::cam</i> ^R	Diese Arbeit
IMW478	MG1655, aber <i>xasA::cam</i> ^R	Diese Arbeit
IMW479	IMW424, aber <i>xasA::cam</i> ^R	Diese Arbeit
IMW481	MG1655, aber <i>ydgR::cam</i> ^R	Diese Arbeit
IMW482	IMW424, aber <i>ydgR::cam</i> ^R	Diese Arbeit
IMW483	IMW424, aber <i>ybiO::cam</i> ^R	Diese Arbeit
IMW484	MG1655, aber Δ <i>ybiO</i>	Diese Arbeit
IMW485	MG1655, aber Δ <i>xasA</i>	Diese Arbeit
IMW486	MG1655, aber Δ <i>ydgR</i>	Diese Arbeit
IMW487	IMW424, aber Δ <i>ybiO</i>	Diese Arbeit
IMW488	IMW424, aber Δ <i>xasA</i>	Diese Arbeit
IMW489	IMW424, aber Δ <i>ydgR</i>	Diese Arbeit
IMW494	P1(IMW157) x IMW487,	Diese Arbeit

	MG1655, aber <i>dctA::spc^R</i> , <i>dcuA::spc^R</i> , <i>dcuB::kan^R</i> , <i>dcuC::miniTn10 (cam^R)</i> , <i>ΔybiO</i>	
IMW495	P1(IMW157) x IMW488,	Diese Arbeit
	MG1655 aber <i>dctA::spc^R</i> , <i>dcuA::spc^R</i> , <i>dcuB::kan^R</i> , <i>dcuC::Tn10 (cam^R)</i> , <i>ΔxasA</i>	
IMW496	P1(IMW157) x IMW489	Diese Arbeit
	MG1655 aber <i>dctA::spc^R</i> , <i>dcuA::spc^R</i> , <i>dcuB::kan^R</i> , <i>dcuC::Tn10 (cam^R)</i> , <i>ΔygdR</i>	
IMW509	IMW424, aber <i>yfaV::cam^R</i>	Diese Arbeit
IMW510	IMW424, <i>ΔyfaV</i>	Diese Arbeit
IMW511	P1(IMW157) x IMW510,	Diese Arbeit
	MG1655 aber <i>dctA::spc^R</i> , <i>dcuA::spc^R</i> , <i>dcuB::kan^R</i> , <i>dcuC::Tn10 (cam^R)</i> , <i>ΔyfaV</i>	
IMW513	P1(IMW516) x MC4100, MC4100 aber <i>yjE::cam^R</i>	Diese Arbeit
IMW516	IMW424, aber <i>yjE::cam^R</i>	Diese Arbeit
IMW517	P1(IMW516) x IMW510,	Diese Arbeit
	IMW424, aber <i>ΔyfaV</i> , <i>yjE::cam^R</i>	
IMW518	P1 (JRG2814) x LJ1, LJ1, aber <i>dcuA::spc^R</i> , <i>dcuB::kan^R</i>	Diese Arbeit
IMW519	P1 (IMW516) x LJ1, LJ1, aber <i>yjE::cam^R</i>	Diese Arbeit
IMW520	P1 (IMW157) x IMW518, LJ1, aber <i>dcuA::spc^R</i> , <i>dcuB::kan^R</i> , <i>dcuC::Tn10 (cam^R)</i>	Diese Arbeit
IMW521	P1 (JRG2814) x IMW519 <i>dcuA::spc^R</i> , <i>dcuB::kan^R</i> , <i>yjE::cam^R</i>	Diese Arbeit
IMW522	IMW521, aber <i>ΔyjiE</i>	Diese Arbeit
IMW524	P1(IMW157) x IMW522, LJ1, aber <i>dcuA::spc^R</i> , <i>dcuB::kan^R</i> , <i>dcuC::Tn10</i> <i>(cam^R)</i> , <i>yjE::cam^R</i>	Diese Arbeit
IMW528	P1(IMW277) x IMW518, LJ1, aber <i>dcuA::spc^R</i> , <i>dcuB::kan^R</i> , <i>dcuC::miniTn10</i> <i>(cam^R)</i> , <i>citT::kan^R</i>	Diese Arbeit
IMW529	P1(IMW277) x IMW522, LJ1, aber <i>dcuA::spc^R</i> , <i>dcuB::kan^R</i> , <i>dcuC::miniTn10</i> <i>(cam^R)</i> , <i>citT::kan^R</i> , <i>ΔyjiE</i>	Diese Arbeit
<u>Plasmide</u>		
pJL28	p(<i>'lacZ</i> , <i>bla⁺</i>), Proteinfusionsvektor	Lucht & Bremer, 1992 (unveröffentlicht)
pJL29	p(<i>'lacZ</i> , <i>bla⁺</i>), Proteinfusionsvektor	Lucht & Bremer, 1992 (unveröffentlicht)
pJL30	p(<i>'lacZ</i> , <i>bla⁺</i>), Proteinfusionsvektor	Lucht & Bremer, 1992 (unveröffentlicht)
pKD3	<i>oriRy</i> , <i>cat</i> , <i>bla</i> , <i>BW25141 F-</i> , <i>Δ(araD-araB)567</i> , <i>ΔlacZ4787(::rrnB-4)</i> , <i>lacIp-4000(lacIQ)</i> , <i>Δ(phoB-</i> <i>phoR)580</i> , <i>λ-</i> , <i>galU95</i> , <i>ΔuidA3::pir+</i> , <i>rpoS396(Am)</i> , <i>ΔendA)::FRT</i> , <i>rph-1</i> , <i>Δ(rhaD-rhaB)568</i> , <i>rrnB-4</i> , <i>hsdR514</i>	Datsenko & Wanner, 2000
pKD46	<i>oriR101</i> , <i>repA101</i> (temperatursensitiv), <i>araBp-gam-</i> <i>bet-exo</i> , <i>bla</i> , <i>BW24113 F-</i> , <i>Δ(araD-araB)567</i> ,	Datsenko & Wanner, 2000

	<i>AlacZ4787(::rrnB-4), lacIp-4000(lacIQ), λ-, rpoS396(Am), rph-1, Δ(rhaD-rhaB)568, rrnB-4, hsdR514</i>	
pCP20	<i>FLP⁺, λcI857, λ p_{RR}Rep^{ts}</i> (temperatursensitiv), <i>cat, bla</i>	Datsenko & Wanner, 2000
pMW254	<i>ygjU</i> -Promotor Region (658 bp) über EcoRI und HindIII in pJL29; <i>ygjU</i> ⁻ <i>lacZ</i> ; <i>amp^R</i>	Diese Arbeit
pMW255	<i>ygjE</i> -Promotor Region (290 bp) über SalI und HindIII in pJL29 ; <i>ttdT</i> ⁻ <i>lacZ</i> ; <i>amp^R</i>	Diese Arbeit
pMW256	<i>ybhI</i> -Promotor Region (333 bp) über SalI und HindIII in pJL30; <i>ybhI</i> ⁻ <i>lacZ</i> ; <i>amp^R</i>	Diese Arbeit
pMW257	<i>atoE</i> -Promotor Region (326 bp) über SalI und HindIII in pJL29; <i>atoE</i> ⁻ <i>lacZ</i> ; <i>amp^R</i>	Diese Arbeit
pMW258	<i>yfaV</i> -Promotor Region (513 bp) über SalI und HindIII in pJL28; <i>yfaV</i> ⁻ <i>lacZ</i> ; <i>amp^R</i>	Diese Arbeit
pMW259	<i>yfdV</i> -Promotor Region (256 bp) über SalI und HindIII in pJL28; <i>yfdV</i> ⁻ <i>lacZ</i> ; <i>amp^R</i>	Diese Arbeit
pMW260	<i>b2374</i> -Promotor Region (682 bp) über SalI und HindIII in pJL28 ; <i>b2374</i> ⁻ <i>lacZ</i> ; <i>Amp^R</i>	Diese Arbeit
pMW261	<i>focA</i> -Promotor Region (561 bp) über SalI und HindIII in pJL29; <i>focA</i> ⁻ <i>lacZ</i> ; <i>amp^R</i>	Diese Arbeit
pMW262	<i>yjiO</i> -Promotor Region (710 bp) über SalI und HindIII in pJL29; <i>yjiO</i> ⁻ <i>lacZ</i> ; <i>amp^R</i>	Diese Arbeit
pMW263	<i>yhiU</i> -Promotor Region (560 bp) über SalI und HindIII in pJL28; <i>yhiU</i> ⁻ <i>lacZ</i> ; <i>amp^R</i>	Diese Arbeit
pMW322	<i>ttdA</i> -Promotor Region (586 bp) über EcoRI und SalI in pJL28; <i>ttdA</i> ⁻ <i>lacZ</i> ; <i>amp^R</i>	Diese Arbeit
pMW323	<i>yeaU</i> -Promotor Region (1066 bp) über SalI und EcoRI in pJL30; <i>yeaU</i> ⁻ <i>lacZ</i> ; <i>amp^R</i>	Scheu, 2004 (Laborpraktikum)
pMW357	<i>ttdA</i> -Promotor bis <i>ttdT</i> -Promotor Region (2039bp) über EcoRI und HindIII in pJL29; <i>ttdT</i> ⁻ <i>lacZ</i> ; <i>amp^R</i>	Diese Arbeit
<u>Phagen</u>		
P1 _{kc}		Miller, 1992
λRZ5	<i>λ bla, lacZ, lacY⁺</i>	Ostrow <i>et al.</i> , 1986

3.2 Medien und Zucht

Zucht von *Escherichia coli*

Für genetische Arbeiten sowie für Vorkulturen wurden die Bakterien in LB-Medium gezüchtet, dem nach Bedarf Antibiotika zugesetzt wurden. Bei Zugabe von mehreren Antibiotika wurde deren Konzentration jeweils halbiert. Die Zucht für Expressionsstudien, Wachstumsexperimente, Transportmessungen und Stoffwechsel-Produktanalysen erfolgte in angereichertem M9-Medium mit jeweils 50 mM Substrat. Diese wurde mit 1% Vorkultur angeimpft. Für die anaerobe Zucht wurde entweder 5 ml Medium in gasdichten Sovirell

Röhrchen oder 50 ml Medium in gasdichten Müller-Krempel-Flaschen 3 x 15 min evakuiert, anschließend mit 1,2 atm Stickstoff (5.0, Linde) begast und bei 37°C inkubiert. Für die aerobe Zucht wurde 50 ml Medium in 300 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen bei 170 Upm und 37°C geschüttelt (Innova 4000, New Brunswick Scientific). Zucht der Vor- und Hauptkultur für DNA-Microarray erfolgte in M9-Medium ohne Aminosäurezusatz.

LB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989)

10 g/l Pepton (Gibco, Nr. 140)

5 g/l Hefeextrakt (Serva)

5 g/l NaCl

LB Agar

LB-Medium mit 15 g/l Agar (Fluka)

M9-Medium (Miller, 1992)

Stammlösung (10 x konzentriert):

60 g/l Na₂HPO₄

30 g/l KH₂PO₄

5 g/l NaCl

10 g/l NH₄Cl

Zusätze:

10 ml/l CaCl₂, 10 mM

1 ml/l MgSO₄, 1M

10 ml/l AHC, 10% (säurehydrolysiertes Casein, Serva, Nr.48614)

5 ml/l L-Tryptophan, 1%

Die Stammlösung und die Zusätze wurden getrennt autoklaviert. Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt.

Antibiotikazusätze

Ampicillin	100 µg/ml
Chloramphenicol	25 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Spectinomycin	50 µg/ml
Tetracyclin	15 µg/ml

Beim gleichzeitigen Einsatz von zwei oder drei verschiedenen Antibiotika wurden die Konzentrationen halbiert.

Pl_{Kc}-Phagen Vermehrung (Miller, 1992)

R-Agar

10 g/l	Bacto-Trypton (Difco)
1 g/l	Hefeextrakt (Serva)
8 g/l	NaCl
1 g/l	Glucose
12 g/l	Agar (Difco)

R-Top-Agar

wie R-Agar aber nur 6,5 g/l Agar (Difco)	
nach dem autoklavieren hinzufügen:	
10 ml/l	MgSO ₄ , 1M
10 ml/l	CaCl ₂ , 0,5 M

λ-Phagen Vermehrung (Miller, 1992)

TB-Medium

10 g/l	Pepton (Gibco, Nr. 140)
5 g/l	NaCl

TB-Agar

TB-Medium mit 10 g/l Agar	
---------------------------	--

TB-Top-Agar

TB-Medium mit 6,5 g/l Agar

YM-Medium

TB-Medium

20 ml/l Maltose, 10 % (sterilfiltriert)

10 ml/l Hefeextrakt, 1 %

LB-Amp-Citrat-X-Gal Agarplatten

LB-Medium

25 µg/ml Ampicillin

20 mM Na₃-Citrat

20 µg/ml X-Gal

15 g/l Agar

Geninaktivierung (Datsenko & Wanner, 2000)

SOC Medium

20 g/l Bactotrypton

5,5 g/l Hefeextrakt

10 ml 1 M NaCl

10 ml 1 M KCl

pH zu 7 eingestellt

nach dem Autoklavieren zugegeben:

10 ml 2 M Mg²⁺ (1M MgSO₄, 1M MgCl₂)

10 ml 2 M Glucose

SOB Medium

20 g/l Trypton

5 g/l Hefeextrakt

2 g/l NaCl

2,5 ml 1 M KCl

nach dem Autoklavieren zugegeben:

5 ml 2 M MgCl₂

Arabinose 0,5 M (sterilfiltriert)

bd H₂O pH 7-8,5 (bideionisiert)MOPS-Medium (Neidhardt *et al.*, 1974)

Stammlösung (10 x konzentriert):

10 ml/l FeSO₄, 0,01 M50 ml/l NH₄Cl, 1,9 M10 ml/l K₂SO₄, 0,276 M10 ml/l CaCl₂, 5 x 10⁻⁴ M10 ml/l MgSO₄, 0,528 M

100 ml/l NaCl, 5 M

400 ml/l MOPS, 1 M

40 ml/l Tricine, 1 M

10 ml/l Metallsalzlösung

Metallsalzlösung:

3 x 10⁻⁶ M Na₂MoO₄4 x 10⁻⁴ M H₃BO₃3 x 10⁻⁵ M CoCl₂8 x 10⁻⁵ M MnCl₂1 x 10⁻⁵ M ZnSO₄

Die Lösungen wurden getrennt autoklaviert. Ein Liter MOPS-Medium enthält 100 ml Stammlösung und 10 ml K₂HPO₄ (0,123 M). Der pH-Wert wurde auf 7 eingestellt.

3.3 Molekulargenetische Methoden

Standardmethoden

Molekularbiologische Standardmethoden wurden nach Sambrook & Russel (2001) durchgeführt. Die Restriktionsenzyme und die Ligase wurden von der Firma MBI Fermentas bezogen. Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte mit dem Nucleospin C+T Kit (Macherey-Nagel). Die Isolierung von Plasmiden erfolgte mit den Qiaprep System (Qiagen). Die Extraktion der PCR-Produkte aus dem Agarosegel erfolgte mit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Die Reinigung der PCR-Produkte erfolgte mit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Die Ligation wurde nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt und erfolgte über Nacht bei 16°C. Dabei betrug das Verhältnis von Vektor zu Insert 1:3 bis 1:7. Die Herstellung der elektrokompenter Zellen und die Transformation wurden nach Farinha *et al.* (1990) durchgeführt.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion wurde entweder im Progene Themocycler (Techne) oder im iCycler (Bio-Rad) durchgeführt. Die benötigten Oligonucleotide wurden von den Firmen MWG Biotech synthetisiert und sind in Tab. 2 aufgelistet. Für Klonierung wurden die PLATINUM Pfx-DNA-Polymerase (GibcoBRL) und Pfu Ultra DNA-Polymerase (Stratagene) eingesetzt. Ein Reaktionsansatz von 50µl enthielt je 15 bzw. 25 pmol Primer, ca. 100 ng DNA-Template (genomische DNA), 1,5 mM Mg²⁺, je 0,3 mM dNTP, Reaktionspuffer zu einfacher Konzentration und 1 - 2,5 U DNA-Polymerase. Für Geninaktivierung wurde Taq-DNA-Polymerase Ready-Mix (Sigma) verwendet, wobei Reaktionsvolumen von 100 µl (für Geninaktivierung) oder 25 µl (für Überprüfung) angesetzt.

Tab. 2. Verwendete Oligonukleotide

Pimer	Sequenz (5'→3')	Tm (°C)	Zielgen
b2247_hin20	AAGTCGAAGCTTAAAACGGC	55,3	<i>yfaW</i>
b2247_sal20	GAAGTTGCTGTCGACGAGT	46,7	<i>yfaW</i>
ygjU_eco20	CTGGCGGGAATTCTGGTGTT	59,4	<i>ygjU</i>
ygjU_hin20	ATGCCAGAAGCTTCCCCAGA	59,4	<i>ygjU</i>
ttdT_sal20	CAGGTCGACGAGATTGAAGA	57,3	<i>ygjE</i>
ttdT_hin20	CGCAAGCTTTCGCCACCATT	59,4	<i>ygjE</i>
ybhI_sal20	CGACAAGTCGACCCTTCTGT	59,4	<i>ybhI</i>
ybhI_hin20	CCAGTTCGCTTAAGCTTGCC	59,4	<i>ybhI</i>
atoe_sal20	ATGGATCTGTGACCGGGTC	61,4	<i>atoE</i>
atoe_hin20	GGGAAGCTTCCGGCTGACAA	61,4	<i>atoE</i>
YFAV-HIN20	GCCGTTTTAAGCTTCGACTT	55,3	<i>yfaV</i>
YFAV-SAL20	TACTCGTCGACAGCAACTTC	57,3	<i>yfaV</i>
YFDV-HIN20	TGCCCAAGCTTGATCTTCTG	57,3	<i>yfdV</i>
YFDV-SAL20	ATGTGGTCGTCGACCCTGCA	61,3	<i>yfdV</i>
B2374-HIN20	GAGTACAAGCTTGGCCAGAT	57,3	<i>b2374</i>
B2374-SAL20	GATGGAATCGTCGACGATAG	57,3	<i>b2374</i>
FOCA-HIN20	GTCTTAAGCGGAAGCTTCGT	57,3	<i>focA</i>
FOCA-SAL20	GTTGAAGGTCGACGAAAAGC	57,3	<i>focA</i>
YJIO-HIN20	ATGATCCCAAGCTTGATCAG	55,3	<i>yjiO</i>
YJIO-SAL20	TCGCACAGTCGACGTAATC	57,3	<i>yjiO</i>
YHIU-HIN20	CGGAAGCTTCATAAGGAACG	57,3	<i>yhiU</i>
YHIU-SAL20	ACATCGTCGACCTGGGTATC	59,4	<i>yhiU</i>
yhjX-hin20	CATCAAGCTTGGCGGAAAGC	59,4	<i>yhjX</i>
yhjX-sal20	CTTAGGCTGGCGTGTGACT	61,4	<i>yhjX</i>
yjiO-eco20	GACAAAGCTGGCGAATTCCA	57,3	<i>yjiO</i>
ygju_test_rev	CGCAGCTTATGGGTAATGGC	59,4	<i>ygjU</i>
foca_test-rev	GGATAAGAGCACGTTTCAGC	57,3	<i>focA</i>
ybiO_H2P2	TGGACCTTTATGAACGACGAGCAGCGCCG CCGTTTTGTCAATCGCCAGCGCATATGAAT ATCCTCCTTAG	>75	<i>ybiO</i>
ybiO_H1P1	TGTAGGACGGATAAGGCGTTCACGCCGCA TCCGGCAAAAAGCCCCGACGGTGTAGGC TGGAGCTGCTTC	>75	<i>ybiO</i>
ybiO_test_for	CTACCCTTCCGAACCTTCTG	57,3	<i>ybiO</i>
ybiO_test_rev	TAGTGAAACCAGCAGCCAGG	59,3	<i>ybiO</i>
xasA_H2P2	AAGGGAGCGATGAATTATCGCTCCCTTGTC TTATAACCATTTCAGACATGGCATATGAATA TCCTCCTTAG	>75	<i>xasA</i>
xasA_H1P1	AGAACAACACAGGTGCGGTTCCGACAGGA ATACCGTTTTAGGGGGATAATGTGTAGGCT GGAGCTGCTTC	>75	<i>xasA</i>
xasA_test_for	GGCCGTATGAGTTCATCTGT	57,3	<i>xasA</i>
xasA_test_rev	AAGACCGTGTTTATGCCGAG	57,3	<i>xasA</i>
H1P1_ydgR	AACGCGAGAAAGCACCCCCGTTAATATGG GATGTAAAAAAGAGGGTAAAAGTGTAGGC TGGAGCTGCTTC	>75	<i>ydgR</i>
H2P2_ydgR	AAAAGCCGCTAACGAAAAGTTAGCGGCTT GTAAAAGAGTTTCCCTGAATTCATATGAAT ATCCTCCTTAG	>75	<i>ydgR</i>

ydgR_test_for	TATCGCCGTTAAGCCATCAC	57,3	<i>ydgR</i>
ydgR_test_rev	TGCAGCTCGGTGGCGATGTA	61,3	<i>ydgR</i>
yfaV_H1P1	TAACCACTAATTAACACAGGCCACAGCC GATCCCCATGGGCCTTTGATAGTGTAGGCT GGAGCTGCTTC	>75	<i>yfaV</i>
yfaV_H2P2	ACTGTTGCGCAGACCGACGTGGCACATCA TTAAATAGGTTAAGGAACACGCATATGAA TATCCTCCTTAG	>75	<i>yfaV</i>
yfaV_test_for	GTAATGTGCGCAGCGCTGACA	59,4	<i>yfaV</i>
yfaV_test_rev	GAGATTGTGCTGGCGACAAC	59,4	<i>yfaV</i>
ttdT_H1P1/2	TAACCCTCCCGGAGAGGCTCACCCCTCTCC TTTTTCGCAGGCATAACACGGTGTAGGCTG GAGCTGCTTC	>75	<i>ygjE</i>
ttdT_H2P2/2	TGCGTAAACTATTGGGTGCGCCAGAGCA ATTTCCGGCACCGTCTCACTCATATGAAT ATCCTCCTTAG	>75	<i>ygjE</i>
ttdT_test_for	CGACAACCAGTATGCGTAAG	57,3	<i>ygjE</i>
ttdT_test_rev	AGTGCTAACCGTACGTTACG	57,3	<i>ygjE</i>
yeaU_eco20_for	CGCGCAGAGAATTCGGTAAT	57,3	<i>yeaU</i>
yeaU_sal20_rev	CCGATTCCTGAATGTGCGACT	57,3	<i>yeaU</i>
ttdA_eco20	TGGGTGAGGAATTCCAACGC	59,4	<i>ygjE</i>
ttdA_sal20	CATCGTCGACGTTTCGGCAT	59,4	<i>ygjE</i>
ttdA_frd_RT	GATGAGCGAAAGTAATAAGC	53,2	<i>ttdA</i>
ttdA_rev_RT	TCGAAGACGAATTCACCAC	55,3	<i>ttdA</i>
ttdB_frd_RT	CGATCAAAGCTGAAGATCTG	55,3	<i>ttdB</i>
ttdB_rev_RT	TGATGTAATGGACGTGCTCG	57,3	<i>ttdB</i>
ttdT_frd_RT	GTCATCGCCATTATTGCTCT	55,3	<i>ygjE</i>
ttdT_rev_RT	CGTATGGTGTAAGAATGCTC	55,3	<i>ygjE</i>
cat_mitte	CTCTGGAGTGAATACCACGAC	54,5	<i>cat</i>
cat-frd	GAGATTATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCC	65,4	<i>cat</i>
cat-rv	CTATCCCATATCACCAGCTCACCGTCTTTC	68,1	<i>cat</i>
DCUAfor-18	CTGCAGTTGAACGTTATG	51,4	<i>dcuA</i>
DCUArev-18	GAAGTGCTGCAAAGTAGC	53,7	<i>dcuA</i>
dcub-testA-18	GGTGCCTGGTAGATAAAG	53,7	<i>dcuB</i>
dcub-testB-18	GCCGCTGCTTTAATCAGC	56,0	<i>dcuB</i>
dcuB_for	ATGACATCTGCCCTGAGAAC	57,3	<i>dcuB</i>
dcuB_rev	TCGTTTTCGCTGGCTTCTGG	59,4	<i>dcuB</i>
7/842-861	CTGGTGCAGGCGCATTATCC	61,4	<i>dcuC</i>
1/4395-4414	CCGCGCATCGATTAAAGATG	61,4	<i>dcuC</i>
citT_xho24	ATTTCTCGAGTCAGGCGTACCATC	62,7	<i>citT</i>
citT_pst24	AGAAGCGGTACTGCAGGGATTACG	64,4	<i>citT</i>
MalBamHI	GAGCGGATCGATGATCCCGGAAAAG	66,3	<i>fnr</i>
GstSalI	GTTATGTGCGACAAATCAGGCAACGTTACG	65,3	<i>fnr</i>

Im Abhängigkeit von der Länge der zu amplifizierenden DNA und dem Schmelzpunkt der verwendeten Primer wurde das jeweilige Programm modifiziert (Tab. 3). Je 1 kb der zu amplifizierenden Nukleotide wurde 30 Sekunden Elongationszeit eingesetzt, aber 1 Minute pro 1 kb für Taq Polymerase Ready Mix (Sigma). Der Schmelzpunkt T_m der Primer wurde

nach folgender Formel berechnet: $T_m = 69,3 + 0,41 \times GC \% - 650/n$ (n = Anzahl der Nukleotide der Primer). Für die Hybridisierung wurde die Temperatur 2-5°C unter dem niedrigsten T_m -Wert der beiden Primer eingesetzt, wobei auch eine Gradienten-PCR für Hybridisierung durchgeführt wurde.

Tab. 3. Programm der Polymerasekettenreaktion. Zur Amplifizierung wurden folgende Zyklen durchlaufen:

DNA-Polmerase	Denaturierung	Hybridisierung	Elongation	Zyklus
Pfx Polymerase (GibcoBRL)	94°C, 2 min			1 x
	94°C, 15 sec	55-60°C, 30 sec	68°C, 1-3 min	30 x
			68°C, 10 min	1 x
Pfu Ultra Polymerase (Stratagene)	95°C, 2 min			1 x
	95°C, 30 sec	55-60°C, 30 sec	72°C, 1-3 min	30 x
			72°C, 10 min	1 x
Taq Polymerase Ready Mix (Sigma)	94°C, 2 min			1 x
	94°C, 1 min	50-52°C, 45 sec	72°C, 1-3 min	30 x
			72°C, 4 min	1 x

RT-PCR mit SuperScript™ III Invitrogen

RNA-Isolierung

Für die RT-PCR wurde RNA aus dem Wildtypstamm LJ1 isoliert. Dieser wurde unter anaeroben Bedingungen auf L-Tartrat und Glycerin bis zu einer OD_{578} von 0,7 gezüchtet. 500 µl der Kultur wurde durch Zugabe von 1 ml RNA protect Bacteria Reagent (Qiagen) stabilisiert und die Zellen mit 100 µl Lysozym (1mg/ml in TE: 10 mM Tris·HCl, 1 mM EDTA, pH8) für 5 min bei RT behandelt. Die RNA wurde anschließend mit RNeasy Mini Kit (Qiagen) aufgeschlossen, präpariert und gereinigt.

Genspezifische RT-PCR mit SuperScript™ III (Invitrogen)

RNA/Primer-Mix und cDNA-Synthese-Mix wurden wie folgende Schema hergestellt.

<u>RNA/Primer-Mix:</u>	1 pg - 5 µg Gesamt-RNA	
	2 µM Primer ttdT_rev_RT	1 µl
	10 mM dNTP	1 µl
	Mit DEPC-behandeltem Wasser auf 10 µl auffüllen	

<u>cDNA-Synthese-Mischung</u>	10x Revers Transcription Puffer	2 µl
	25 mM MgCl ₂	4 µl
	0,1 M DTT	2 µl
	RNase OUT™ (40U/µl)	1 µl
	Super Script™ III RT (200U/µl)	1 µl

Die RNA/Primer-Mix wurde für 5 min auf 65°C erhitzt und anschließend für 1 min auf Eis abgekühlt. Die Reverse-Transkription wurde durch Zugabe von cDNA-Synthese-Mix zum RNA/Primer-Mix gestartet und für 5 min bei 50°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung für 5 min bei 85 °C terminiert. Nach anschließender Abkühlung auf Eis wurde die RNA durch RNase-Behandlung (1 µl RNaseH, bei 37 °C, 20 min) abgebaut. Die erhaltene cDNA wurde mit den Primern *ttdA_frd_RT*, *ttdA_rev_RT*, *ttdB_frd_RT*, *ttdB_rev_RT*, *ttdT_frd_RT* und *ttdT_rev_RT* amplifiziert.

DNA Microarray Analyse

Zucht

Die Zucht der Vor- und Hauptkultur für DNA-Array erfolgte in M9-Medium ohne Aminosäurezusätze. Die Hauptkultur wurde mit einer OD₅₇₈ von 0,04 aus der Vorkultur angeimpft und bis OD₅₇₈ 0,4 gezüchtet. Die Hauptkulturen wurden in gleichem Medium dreimal überimpft, damit die Bakterien immer in der frühen exponentiellen bleiben und ungefähr in der zehnten Generation geerntet werden können. Zur Ermittlung der globalen Genexpression wurde Wildtyp und *dct dcu*-Mutante im M9 Medium mit den zu untersuchenden C₄-Dicarboxylate unter aeroben und anaeroben Bedingungen gezüchtet.

RNA Isolierung

Zur Isolierung der RNA wurde eine Kultur von 35 ml (OD₆₀₀ 0,3 – 0,45) mit 15 g Eis in ein vorgekühltes Zentrifugeröhrchen (-20 °C) gegeben und durch Zentrifugation für 5 min bei 4000-5000 x g und bei 4°C geerntet. Nachdem die Zellen in RLT-Puffer (RNeasy Mini Kit, Qiagen) plus Mercaptoethanol resuspendiert wurden, erfolgte ein mechanischer Zellaufschluß

durch Vortexen mit Glaskügelchen (0,1 mm zirkonia/silica bead, Cat. Nr. 11079101z, ROTH). Anschließend wurde die RNA-Präparation mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) weiter durchgeführt, wobei die DNase-Behandlung auf Säulen mit RNase-Free DNase Set (Qiagen) kombiniert, um die restliche DNA in der Probe abzubauen. Nachdem die RNA mit neutralisiertem Wasser (pH 7-8,5) eluiert wurde, wurden die Konzentration und die Reinheit durch die Messung der Absorption bei 260 und 280 nm bestimmt.

DNA Microarray Analyse

DNA Microarray Analyse wurde von A. Veit in der AG Wendisch am Institut für Biotechnologie 1, Forschungszentrum Jülich durchgeführt. Das DNA-Microarray enthielt 96% der in *E. coli* K12 MG1655 vorkommenden Gene. Dazu wurden PCR Produkte von 4108 Genen (vom gesamten 4290 ORFs in *E. coli* K12) mit Hilfe des Genosys ORFmer Primer Sets (Sigma-Genosys) amplifiziert (Richmond *et al.*, 1999) und auf Poly-Lysin (Sigma) beschichtete Glasobjektträger gespottet. Zur DNA Microarray Analyse wurde die gesamte RNA zu cDNA revers transkribiert. Dazu wurde 20 - 25 μg RNA mit Random Hexamer Primern, Revers Transkriptase (SuperscriptII, Life Technologies) und dNTP eingesetzt, davon 60 % des dTTP Anteils wurde durch aa-UTP (aminoallyl-UTP) ersetzt. Nach Hydrolyse und Waschen wurde der cDNA-Ansatz mit Cy3- oder Cy5-dUTP (Amersham Pharmacia) fluoreszent markiert. Die Cy3- oder Cy5- markierte cDNA der zu vergleichenden Kulturen wurde gemischt und auf die DNA-Microarrays hybridisiert (Wendisch *et al.*, 2001). Die Fluoreszenz wurde mittels Laserscanners (Axon Genepix 4000) gemessen. Zur Berechnung der Fluoreszenzintensität und des Hintergrundsignals wurde die GenePix Software benutzt. Das Scannen und die Normalisierung der Werte wurde nach Khodursky *et al.* (2000) durchgeführt. Die Berechnung der p-Werte basiert auf dem t-Test nach Arfin *et al.* (2000). In der Auswertung wurde nur die Gene berücksichtigt, deren Fluoreszenz ein zweifach stärkeres Signal als der Hintergrund lieferten.

Geninaktivierung nach Datsenko & Wanner (Datsenko & Wanner, 2000)

Um ein Gen im Chromosom von *E. coli* zu inaktivieren, wurde zuerst die Chloramphenicolresistenzkassette aus dem Plasmid pKD3, die von FRT-Sequenzen (FLP recognition target) umgeben ist, anhand der PCR mit 2 Primern amplifiziert. Die Primer bestanden aus 50 Nukleotiden, die am 5'-Ende zum Randbereich des Zielgens homolog sind (H1 bzw. H2). Am 3'-Ende trugen die Primer Homologiebereiche von 20 Nukleotiden zu den „priming site“ (P1 bzw. P2) (Abb. 5). Zur Amplifikation wurden pro PCR-Ansatz ca. 50 ng DNA von pKD3 als Template in 100 µl Endvolumen angesetzt, wobei Taq Polymerase Ready Mix System (Sigma) verwendet wurde. Das daraus resultierte PCR-Produkt war die von FRT-Sequenzen umgebene Chloramphenicol-Resistenzkassette, die an beiden Enden Homologiebereiche zum Randbereich des Zielgenes trägt.

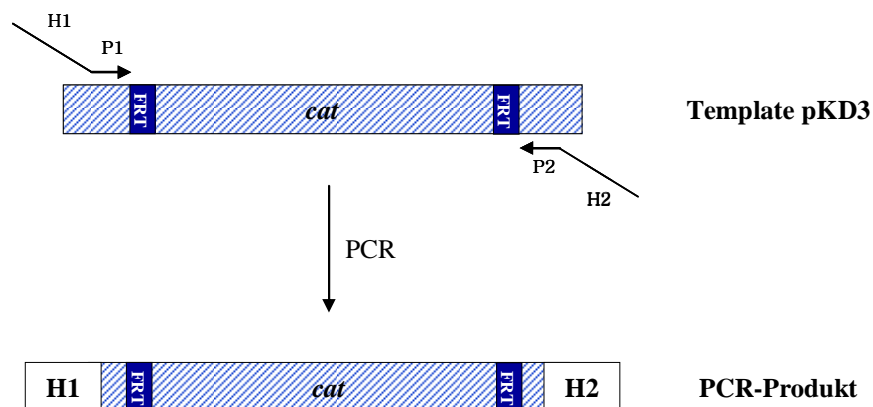


Abb. 5. Der Homologiebereich- und das FRT-flankierte Amplikat zur Geninaktivierung.

Das gewünschte PCR-Produkt aus dem PCR-Ansatz (200 µl) wurde nach der Agarosegelelektrophorese aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem MinElute™ Gel Extraction Kit (Qiagen) aufgereinigt. Am Ende der Extraktion wurde das PCR-Produkt in 25 µl H₂O von pH 7-8,5 eluiert (12,5 µl H₂O x 2 Säulen), danach mit DpnI (MBI Fermentas) Restriktionsenzym 1,5 h bei 37°C verdaut, um Template-DNA (pKD3) abzubauen, da DpnI methylierte und hemimethylierte 5'-GA TC-3 Sequenzen schneidet. Nach dem DpnI-Verdau wurde die DNA mit Min Elute™ PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt und in 16 ~ 30 µl H₂O (pH 7-8,5) in einer DNA-Konzentration von ca. 300 ng/µl eluiert.

In einen Zielstamm wurde zunächst das Helferplasmid pKD46 transformiert (30°C), das die λ Red Rekombinase γ , β , exo unter Kontrolle des Arabinose-induzierbaren Promotor exprimiert und neben dem temperatursensitiven Replikationsorigin oriR101 eine Ampicillinresistenz trägt. Der pKD46-haltige Stamm wurde in eine Vorkultur (10ml SOB) in 100 ml Erlenmeyerkolben angeimpft und über Nacht bei 30°C gezüchtet. Von dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur (30 ml SOB, 10 mM Arabinose) mit dem 0,5 % Inoculum beimpft und bis zur $\text{OD}_{620} \sim 0,55$ gezüchtet. Anschließend wurde die Kultur in ein vorgekühltes Zentrifugeröhrchen überführt. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen bei $5000 \times g$ für 20 min bei 2°C geerntet (Sigma 2K 15), das Zellpellet wurde zweimal mit vorgekühltem dH_2O gewaschen und in 320 μl 10 % (W/V) Glycerin resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in vorgekühlte Eppendorfgefäße zu 40 μl aliquotiert. In die elektro-kompetenten Zellen wurde das vorbehandelte PCR-Produkt > 1000 ng in maximale 5 μl Volumen transformiert. Die Transformation wurde durch Elektroporation (Easyjec Prima, Peqlab) in 1 mm Küvetten bei 1,8 kV durchgeführt. Innerhalb 30 sec nach der Elektroporation wurde 1 ml SOC zugegeben und 1 h bei 37°C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz kurz zentrifugiert und der Überstand abgenommen, damit nur ca. 200 - 400 μl Restvolumen verblieb. Nachdem die Zelle resuspendiert wurde, wurde die Hälfte auf Chloramphenicol-LB-Platte (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ausplattiert bei 37°C bebrütet. Die andere Hälfte wurde über Nacht bei RT inkubiert, am folgenden Tag auf gleichen Platte ausplattiert und bei 37°C bebrütet. Die Mutante, in der Chloramphenicolresistenzkassette das Zielgen durch homologe Rekombination ersetzt, bildet 24 - 48 h nach der Inkubation eine große unförmige Kolonie. Die Ersatz der Resistenzkassette wurde durch PCR überprüft und die Empfindlichkeit gegen Ampicillin getestet. Falls die Mutante auf Ampicillin-LB-Platte noch wachsen konnte, wurde sie erneut auf Chloramphenicol-LB-Platte ausgestrichen und bei 37°C über Nacht bebrütet. Wenn die Ampicillinresistenz trotzdem noch nicht verloren gegangen ist, wurde das Ausstreichen und Bebrüten bei 43°C wiederholt. Um die Chloramphenicolresistenzkassette zu eliminieren, wurde das FLP-Helferplasmid pCP20 in die Mutante konventionell transformiert, auf Ampicillin-LB-Platte ausplattiert und bei 30°C selektiert, da pCP20 einen temperatursensitiven Replikationsori und eine Ampicillin-

resistenzkassette trägt. Die Deletion der Chloramphenicol-resistenzkassette erfolgt durch die FLP Rekombinase vom pCP20, die die FRT-Sequenzen flankierend zur Chloramphenicol-resistenzkassette erkennt. Die Deletion der Resistenzkassette wurde auf Chloramphenicol-LB-Platte und mit PCR überprüft. Die Entfernung des Helferplasmides pCP20 wurde durch Bebrütung bei 43°C erreicht.

Konstruktion von *lacZ*-Reporterfusionen

Um die Expression der Gene zu untersuchen, wurde der jeweilige intergenische Bereich mit dem Promotor in den Proteinfusionsvektor pJL28, pJL29 oder pJL30 vor dem *lacZ*-Gen ins Leserraster kloniert.

Herstellung rekombinanter λ RZ5 Lysate

Zur Herstellung rekombinanter λ RZ5 Phagen wurde der *E. coli* Stamm MC4100 mit dem oben konstruierten Fusionsplasmid transformiert und anschließend mit λ RZ5 infiziert. Dazu wurde MC4100 mit dem Fusionsplasmid in 5 ml YM Medium über Nacht bei 37 °C im Schüttler gezüchtet. Die Zellen wurden für 1 min bei 10000 x g zentrifugiert und in gleichem Volumen SM-Puffer resuspendiert. Nachdem je 100 μ l Zellsuspension mit 100 μ l Phagenverdünnungen in SM Puffer (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ..., 10^{-7} ; ca. 1000 Phagen optimal) für 30 min bei 37°C infiziert wurde, wurde die Suspension in 3 ml TB-Top-Agar auf einer TB-Agarplatte ausplattiert und bei 37°C inkubiert, bis deutliche Plaques zu erkennen waren. 4 bis 6 Plaques wurden mit sterilen Pasteurpipetten ausgestochen, in 0,5 ml SM-Puffer aufgenommen, mit 25 μ l Chloroform versetzt, kräftig gemischt und 2 min bei 10000 x g zentrifugiert. Zur Identifizierung der rekombinanten Phagen wurde MC4100 mit diesem Minilysat infiziert und in 3 ml TB-Top-Agar mit 25 μ l 40 mg/ml X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranosid) auf TB-Agar ausplattiert, anschließend entweder 5 bis 8 Stunden bei 37°C oder über Nacht bei 30°C inkubiert. Rekombinante Phagen bilden blaue Plaques auf X-Gal-haltigen Platten. Blaue Plaques wurden ausgestochen und MC4100 wurde weiter mit frischem Minilysat infiziert und ausplattiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, bis

rekombinante Phagen von nicht rekombinanten Phagen komplett getrennt wurde. Von der erfolgreich isolierten Phagen wurde Plattenlysate hergestellt.

Lysogenisierung von *E. coli* Stämmen

Zur Lysogenisierung von *E. coli* wurde eine Übernachtskultur des Rezipientenstammes in YM-Medium abzentrifugiert und in 1 ml der MgSO_4 -Lösung (10 mM) resuspendiert. Nachdem diese Bakteriensuspension mit den rekombinanten Phagen (10^{-1} - 10^{-3}) für 10 min bei Raumtemperatur infiziert wurde, wurde die Zellsuspension auf LB-Ampicillin- Na_3 -Citrat-X-Gal-Platte ausplattiert. Lysogenisierte Stämme bilden blaue Kolonien. Mehrfache Lysogene sind durch eine intensivere Blaufärbung zu erkennen. Zur Identifizierung der einfachen Lysogenen wurden β -Galaktosidase-Tests unter induzierenden Bedingungen durchgeführt. Die einfach-lysogenen Stämme unterschieden sich von mehrfach-lysogenen Stämme durch die geringere β -Galaktosidaseaktivität.

Stammkonstruktion durch Transduktion mit P1_{kc} -Phagen

Zur Herstellung eines Phagenlysates wurden 5 ml LB-Übernachtskulturen des Donorstammes mit dem gleichen Volumen MC-Puffer (10 mM MgSO_4 , 5 mM CaCl_2) versetzt und 30 min bei 37°C geschüttelt. 100 μl dieser Bakteriensuspension wurden mit 100 μl P1_{kc} -Phagenverdünnung (10^{-3} bis 10^{-7}) 15 min bei 37°C infiziert und zusammen mit 3 ml R-Top-Agar, 5 mM CaCl_2 und 10 mM MgSO_4 auf einer R-Agarplatte ausplattiert und bis zum Eintritt der konfluenten Lyse bei 37°C bebrütet. Anschließend wurde 2 ml LB-Medium auf Platte zugegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die Flüssigkeit zusammen mit R-Top-Agar in ein Zentrifugenröhrchen überführt wurde, wurde 0,5 ml Chloroform zugesetzt und 10 sec kräftig geschüttelt. Nach einer Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur wurde die Suspension abzentrifugiert (10000 x g, 15 min, 4°C) und der zellfreie Überstand mit 50 $\mu\text{l}/\text{ml}$ Chloroform bei 4°C gelagert. Der Titer dieses transduzierenden Phagenlysats betrug ca. 10^8 - 10^{10} p.f.u. (plaque forming units).

Zur Transduktion wurden 5 ml LB-Übernachtskultur des Rezipientenstammes mit dem gleichen Volumen MC-Puffer versetzt und 30 min bei 37°C geschüttelt. Nach dem

Abzentrifugieren (10000 x g, 1 min, RT) wurden die Zellen in 1 ml LB-Medium resuspendiert. Zu 100 µl dieser Bakteriensuspension wurde 100 µl Phagenlysatverdünnung (10^{-1} - 10^{-7}) und 10 µl von 0,1 M CaCl_2 gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 0,2 ml von 0,1M $\text{Na}_3\text{-Citrat}$ und 0,5 ml LB-Medium wurden die Zellen 60 - 90 min bei 37°C geschüttelt. Die Zellsuspension wurde durch kurze Zentrifugation auf ca. 0,2 ml aufkonzentriert und schließlich auf selektiven Antibiotikaplatten ausplattiert. Zusätzlich zu der erworbenen Antibiotikaresistenz wurden die entstandene Kolonien durch PCR weiter überprüft, ob die Antibiotikaresistenzkassette ins Zielgen integriert worden war.

DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde von der Firma Genterprise (Mainz) durchgeführt.

3.4 Biochemische Methoden

Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität

Zur Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität wurde eine Hauptkultur mit 1% beimpft. Das Kulturvolumen betrug für aerobe Zucht 30 ml und für anaerobe Zucht 5 ml M9-Medium oder LB-Medium. Die spezifische Aktivität wurde von Kulturen aus der exponentielle Phase ($\text{OD}_{578\text{nm}}$ von 0,5 – 0,8) bestimmt. Alle Messungen wurden von mindestens zwei unabhängigen Kulturen und vier Paralleltest pro Kultur durchgeführt. Die Messung und Berechnung der β -Galaktosidaseaktivität wurden nach Miller (1992) durchgeführt.

TransportmessungLösungen

Na/K-Pi-Puffer 100 mM Na₂HPO₄/KH₂PO₄-Puffer, 1 mM MgSO₄, pH 5, 6, 7 und 8

Energetisierung: 1 M Glucose
 1 M Glycerin + DMSO (jeweils 1M)

Gegentauchsubstrat & Kompetitor:

1 M L-, D- und meso-Tartrat

1 M Succinat

1 M Fumarat

1 M Malat

1 M Citrat

1 M Butyrat

Entkoppler: 20 mM CCCP (in Ethanol)

Radioaktivmarkierte Chemikalien:

100 mM [2,3-¹⁴C]-Succinat (Moravek Biochemicals, Inc., MC-268)

100 mM [1,4-¹⁴C]-D,L-Tartrat (American Radiolabeled Chemicals,
Inc., ARC 1037)

Stopplösung: 0,1 M LiCl

Scintillationslösung (Rotiscint ecoplus, Roth)

Herstellung der Zellsuspension

Die Zucht der Zellen erfolgte unter anaeroben Bedingungen in M9-Medium mit L-Tartrat (50 mM) und Gluconat (50 mM). Die Zellen wurden in der spätlogarithmischen Phase (OD_{578nm} von 0,7 bis 0,8) durch 20 minütige Zentrifugation (10000 x g, 4°C) geerntet und ab hier auf Eis gehalten. Nachdem die Zellen mit anaerobisiertem Na/K-Pi-Puffer gewaschen wurden, wurde eine Zellsuspension mit einer OD_{578nm} von 8 bis 9 mit dem Na/K-Pi-Puffer hergestellt und anschließend anaerobisiert. Für die pH-Optimierung wurden Na/K-Pi-Puffer von pH 5, 6, 7 und 8 zum Waschen und Resuspension der Zellen verwendet. Um die Zellen zu energetisieren, wurde vor der Messung anaerobisierter Glucoselösung in einer Konzentration

von 20 mM zu der Zellsuspension zugegeben und 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach 3 min dieser Inkubation wurde bei Bedarf das Protonophor CCCP (20 µM) zugesetzt und 2 min bis zur Transportmessung inkubiert.

Aufnahmemessung

Zur Memessung der Aufnahme von 100 µM Succinat oder D,L-Tartrat wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß 250 µl einer 200 µM [¹⁴C]-Succinat- oder [¹⁴C]-D,L-Tartratlösung vorgelegt und auf 37°C erwärmt. Die Radioaktivität der [¹⁴C]-Succinat- und [¹⁴C]-D,L-Tartratlösung betrug 2004 bzw. 1452 dpm/nmol. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 250 µl energetisierter Zellsuspension. Die Endkonzentration von [¹⁴C]-Succinat- und [¹⁴C]-D,L-Tartratlösung betrug dabei 100 µM, und OD₅₇₈ lag zwischen 4 und 5. Nach 20 Sekunden, 1 min, 2 min, 5 min und 10 min wurde 100µl Zellsuspension entnommen und mit 0,9 ml eiskalter Stopplösung (0,1 M LiCl) gemischt. Die Zelle wurde mit einem Vakuum-Filtrationsgerät (FH 225V Ten-Place Filter Manifold, Pharmacia Biotech) filtriert. Dazu wurden die Membranfilter aus Cellulosenitrat (Ø 25 mm, 0,2 µm Porengröße, Schleicher & Schuell) vor der Filtration mit 0,1 M LiCl-Lösung befeuchtet. Nach der Filtration wurden die Zellen auf dem Filter mit 1 ml LiCl-Lösung dreimal gewaschen.

Zur konzentrationsabhängigen Aufnahmemessung wurde 50 µl von jeder Konzentration der [¹⁴C]-Succinat- oder [¹⁴C]-D,L-Tartratlösung vorgelegt und auf 37°C erwärmt. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 50 µl energetisierter Zellsuspension. Die Endkonzentration von [¹⁴C]-Succinat oder [¹⁴C]-D,L-Tartrat betrug dabei 50 µM, 100 µM, 500 µM, 1 mM und 2 mM. Nach 20 Sekunden wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml 0,1 M LiCl-Lösung gestoppt.

Gegentauschmessung

Für Gegentauschmessung wurde 200 µM von einer [¹⁴C]-Succinat- oder [¹⁴C]-D,L-Tartratlösung in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß 460 µl vorgelegt und auf 37°C erwärmt. Der Start der Aufnahme erfolgte durch Zugabe von 460 µl energetisierter Zellsuspension und die aufgenommene Menge an Substrat wurde nach 1 min, 2 min, 5 min, 10 min und 15 min

bestimmt. Nach 10 minütiger Aufnahme erfolgte der Start der Gegentauschreaktion dadurch, dass 405 µl der Zellen 8,2 µl einer vorwärmten Lösung mit unmarkierten Substrat (100 mM) zugesetzt wurde. Die Endkonzentration dieser unmarkierten Substrate, L-Tartrat, Succinat, Fumarat, Citrat und Butyrat lag bei 2 mM. Die Reaktion wurde nach 20 Sekunde, 1 min, 2 min und 5 min wie beschrieben gestoppt und gemessen. Die Gegentausch wurde durch die Abnahme der intrazellulären Radioaktivität bestimmt. Der 10 und 15 minütige Aufnahmewert diente als Ausgangspunkt für die Gegentauschmessung bzw. negative Kontrolle.

Bestimmung der Radioaktivität in der Zelle

Zur Bestimmung der Radioaktivität in der Zelle wurden die Membranfilter in Probenröhrchen mit 4 ml Scintillationslösung überführt. Die Radioaktivität wurde im Scintillationszähler (Perkin Elmer) bestimmt. Zur Bestimmung der Aufnahmeaktivität wurde für jede Substratkonzentration ein Blindwert (unspezifische Bindung) bestimmt. Dazu wurden im Reaktionsgefäß die 1 ml Stopplösung (0,1 M LiCl) und [¹⁴C]-Succinat- oder [¹⁴C]-D,L-Tartrat vorgelegt, und dann erst die Zellen zugegeben.

Berechnung der Transportaktivität

Von den Gehalten der Zelle an radioaktiver Substraten (in dpm) wurde der jeweilige Blindwert abgezogen und die Transportaktivität in U/g TG (nmol/min/mg TG) angegeben. Dazu wurde für jede Transportmessung der OD₅₇₈-Wert der Zellsuspension bestimmt, Probevolumen für die Messung betrug 100 µl. OD_{578 nm} von 1 entspricht in *E. coli* 281 mg TG/l. Die Radioaktivität der [¹⁴C]-Succinat- und [¹⁴C]-D,L-Tartratlösung betrug 2004 bzw. 1452 dpm/nmol. Die Transportaktivität kann wie folgend berechnet werden:

Transportaktivität für D,L-Tartrat:

$$\text{U/g TG (nmol/min/mg TG)} = \frac{(\text{gemessene Radioaktivität der Probe} - \text{BW}) [\text{dpm}] \times 10000}{1452 [\text{dpm/nmol}] \times \text{OD}_{578} \times 281 [\text{mg TG}] \times \text{Zeit} [\text{min}]}$$

Transportaktivität für Succinat:

$$\text{U/g TG (nmol/min/mg TG)} = \frac{(\text{gemessene Radioaktivität der Probe} - \text{BW}) [\text{dpm}] \times 10000}{2004 [\text{dpm/nmol}] \times \text{OD}_{578} \times 281 [\text{mg TG}] \times \text{Zeit} [\text{min}]}$$

Analyse der Stoffwechselprodukte durch HPLC

Herstellung der Zellsuspension

Zur Untersuchung der Kinetik des Succinateffluxes bzw. zur Analyse der Stoffwechselprodukte während der Glucosefermentation wurden die Bakterien unter anaeroben Bedingungen in M9-Medium mit Glucose bis zu einer $OD_{578\text{ nm}}$ von 0,8 bis 1,0 gezüchtet. Nachdem die Zellen geerntet wurden (6000 Upm, 10 min, 30°C), wurden die Zellen mit anaerobisiertem und auf 30°C vorgewärmtem MOPS-Medium gewaschen und zu $OD_{578\text{ nm}}$ 10-12 in MOPS aufkonzentriert. Alle Schritte wurden bei 30°C durchgeführt. Anschließend wurde die Zellsuspension erneut anaerobisiert und mit Stickstoff begast.

Kinetik des Succinatefflux

Die anaerobisierte Zellsuspension (5 ml) und die anaerobisierte 20 mM Glucoselösung wurden bei 30°C vorinkubiert. Der Start der Kinetik erfolgte durch Zugabe von 5 ml der 20 mM Glucoselösung zu 5 ml Zellsuspension, sodass die Zellsuspension eine $OD_{578\text{ nm}}$ von 5-6 hatte. Vor der Zugabe (t_0 -Wert) und nach der Zugabe von Glucose (2 min, 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 60 min und am Ende) wurden 700 μ l Suspensionen mit einer Kanüle entnommen und möglichst schnell abzentrifugiert (bei 16000 x g, 1 min). Die Überstände wurden in neue Eppendorfgefäße überführt und nochmals abzentrifugiert (bei 16000 x g, 15min). Erneut wurden die Überstände in Eppendorfgefäße überführt und für die Analyse durch HPLC bei -20°C eingelagert.

Analyse durch HPLC

Die Stoffwechselprodukte im Überstand wurden anhand von HPLC analysiert. Dazu wurden die Überständen mit einer HPLC-Säule (Aminex HPX 87H, 300 x 7,8 mm, sulfonated divinyl benzenestyrene copolymer, Biorad, München) chromatographisch getrennt (Ionenaustauschchromatographie). Die Flußrate der mobilen Phase (6 mM H₂SO₄, entgast) betrug 550 μ l/min. Die Säule arbeitete bei einer Betriebstemperatur von 65°C. Glucose,

Succinat, Fumarat, Acetat, Laktat, Formiat, Ethanol, Malat und L-Tartrat wurden mit einem Refraktometer und einem Photometer im UV-Bereich (215 nm) detektiert und quantifiziert.

Berechnung des Succinatefflux

Der lineare Bereich der Succinatbildung in allen Stämmen, 10 min bis 30 min nach der Inkubation mit Glucose, wurde zur Bestimmung des Succinatefflux wie folgt berechnet. Eine OD_{578 nm} von 1,0 für *E. coli* entspricht 280 mg TG/l.

$$\text{Succinateffluxaktivität (U/g TG)} = \frac{(\text{Succinat}_{t=30} - \text{Succinat}_{t=10}) [\text{mmol/l}] \times 10^6}{\text{OD}_{578}\text{-Wert} \times 281 [\text{mg TG/l}] \times 20 [\text{min}]}$$

4 Ergebnisse

4.1 Potentielle Gene für Tartratcarrier und Regulatoren des Tartratstoffwechsels

E. coli kann unter aeroben und anaeroben Bedingungen die drei Stereoisomere von Tartrat (L-, D- und meso-Tartrat) als Substrat für das Wachstum verwenden (Vaughn *et al.*, 1946; Reaney *et al.*, 1993). Unter anaeroben Bedingungen werden L- und D-Tartrat zunächst durch die L- bzw. D-Tartratdehydratase zu Oxalacetat umgesetzt (Reaney *et al.*, 1993), und dann über Malat und Fumarat zu Succinat reduziert (Abb. 1). Der Stoffwechsel des anaeroben Abbaus von meso-Tartrat ist dagegen noch unklar. Die Reaktionen im aeroben Abbau von Tartrat sind ebenfalls noch weitergehend unklar (Reaney *et al.*, 1993). Im Genom von *E. coli* ist ein Gen *yeaU* zu finden, dessen offener Leserahmen Ähnlichkeit zur Tartratdehydrogenase oder Tartratdecarboxylase aufweist. Die Tartratdehydrogenase oxidiert L-Tartrat zu Oxalglykolat, das zu D-Glycerat decarboxyliert wird. Die Tartratdecarboxylase katalysiert die direkte Umwandlung von L-Tartrat zu D-Glycerat (Abb. 4) (Kohn *et al.*, 1968; Kohn & Jakoby, 1968; Furuyoshi *et al.*, 1991; Tripton Beecher, 1994). Trotz Vorhandensein des Gens scheinen viele *E. coli* Stämme nicht zum aeroben Abbau von Tartrat in der Lage zu sein (Grimpo *et al.*, unveröffentlicht).

Tartrat liegt unter physiologischen Bedingungen als Dianion (Tartrat^{2-}) vor ($\text{pK}_{a1} = 2,98$, $\text{pK}_{a2} = 4,34$). Deshalb erfordert die Aufnahme von Tartrat in die Zelle einen Carrier. Um die Tartratcarrier zu identifizieren, wurde Kandidatengene für sekundäre Carrier gesucht. Dazu wurde das Genom von *E. coli* nach Genen durchgesucht, deren Produkte im Idealfall folgenden drei Kriterien gehorchen sollten: 1. Substratspezifität des Transporters: Die „Transport Protein Database“ (Paulsen, 1998; Saier, 1998) wurde nach Genen für sekundäre Carrier durchsucht, die Tartrat, C_4 -Dicarboxylat oder strukturell ähnliche Substrate transportieren. Da die Datenbank nur sehr wenige bekannte Tartratcarrier erhielt, wurden bei der Zuordnung des vermutlichen Substrats auch die Gene in der Nachbarschaft der Carrier berücksichtigt. Wenn diese für Gene des Tartratstoffwechsels kodieren, wurde angenommen, dass der zugehörige Carrier ein Tartratcarrier sein könnte. 2. Genorganisation: Sekundäre

Carrier, deren Strukturgene in der Nachbarschaft der Gene des Tartratstoffwechsels von *E. coli* liegen, wurden als besonders gute Kandidaten betrachtet. So ist YeaV ein unbekannter sekundärer Carrier, der der Betain/Carnitin/Cholin-Transporter-Familie (BCCT) zugeordnet ist. Der Carrier YeaV weist im Sequenzvergleich signifikante Homologie zu Betain-, Cholin- und Carnitintransporter auf. Trotzdem könnte es sich bei YeaV um einen aeroben Tartratcarrier handeln, da das Gen *yeaV* unmittelbar stromab des Gens *yeaU* liegt, das für die potentielle Tartratdehydrogenase kodiert. Ähnlich liegt das Gen *ygjE*, das für den potentiellen Tartrat/Succinat-Antiporter kodiert, auch direkt stromab der Gene für die L-Tartratdehydratase, *ttdA* und *ttdB*.

3. Phylogenie des Transportsystems: Tartratcarrier anderer Organismen wurden zur Suche nach Sequenzen ähnlicher Carrier in *E. coli* verwendet. Für die Suche nach Kandidatengenen wurden neben der Transport-Datenbank (Paulsen, 1998; Saier, 1998) auch die KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, Ogata *et al.*, 1999), STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins, Mering *et al.*, 2003) und SwissProt Datenbanken verwendet. Die besten Kandidaten für Tartratcarrier in *E. coli* sind in Tab. 4 dargestellt.

Der Citrat/Succinat-Antiporter CitT erfüllt die genannten Anforderungen gut. In der Citratfermentation von *E. coli* wird Citrat zunächst durch die Citratlyase zu Acetat und Oxalacetat gespalten. Oxalacetat wird weiter über Malat zu Fumarat umgesetzt, das dann zu Succinat reduziert wird. In der Nachbarschaft der Gene für die Citratlyase, *citE* und *citF*, befindet sich das Transportergen *citT*. CitT katalysiert den Citrat/Succinat-Antiport (Pos *et al.*, 1998). CitT ist ein typisches Beispiel für einen Vorläufer/Produkt-Antiporter. Es ist gut vorstellbar, dass der Tartrattransport durch einen ähnlichen Transportmodus, d.h. einen Tartrat/Succinat-Antiporter in die Zelle aufgenommen wird. Tatsächlich wird der Gemisch von D- und L-Tartrat durch CitT mit niedriger Aktivität (0,62 U/g Protein CitT) transportiert (Pos *et al.*, 1998). YbhI und YgjE gehören zusammen mit CitT zu der DASS-Familie (Divalent Anion:Na⁺ Symporter), sie weisen Homologien zu CitT auf, YbhI mit 35% Identität und YgjE mit 44% Identität, und könnten daher die gesuchten Transporter darstellen. In der Nachbarschaft des Gens *ybhI* (801110-802543 bp auf der *E. coli*-Genomkarte) befindet sich

aber kein Gen, das mit den Tartratstoffwechsel in Zusammenhang steht. Außerdem wurde in der Expressionsstudie keine Induktion des *ybhI* Gens durch C₄-Dicarboxylate nachgewiesen (Tab. 22). Das Gen *ygjE* (3206046-3207509 bp im *E. coli* Genom) liegt in der Nachbarschaft der Gene *ttdA*, *ttdB* und *ygiP* (Abb. 6). Das *ttdAB* Operon kodiert für die L-Tartratdehydratase, die die Umwandlung von L-Tartrat zu Oxalacetat katalysiert. Das Gen *ygiP* kodiert für einen transkriptionellen Regulator vom LysR-Typ. Da LysR-Typ Regulatoren typischerweise oft unmittelbar in entgegengesetzter Orientierung zu den von ihnen regulierten Genen liegen (Schell, 1993), könnte der potentielle Regulator YgiP die Expression der Gene *ttdA*, *ttdB* und *ygjE* regulieren. In diesen Fall würden die Gene ein Gencluster für den anaeroben Tartratstoffwechsel bilden, der aus einem Regulatorgen *ygiP*, den Stoffwechselgenen *ttdA*, *ttdB* und einem Transportergen *ygjE* besteht.

Tab. 4. Kandidatengene für Tartratcarrier in *E. coli*

Gen Nr.	Protein Name	SwissProt Nr.	TC Nr.	Familie	Länge (As.)	TM	Funktion
b0612	CitT	P77405	2.A.47.3.2	DASS	487	13	Citrat/Succinat Antiporter
b0770	YbhI	P75763	2.A.47.x.x	DASS	477	15	Tricarboxylat Transporter ?
b3063	YgjE	P39414	2.A.47.3.3	DASS	487	12	Tartrate/Succinat Antiporter ?
b4138	DcuA	P04539	2.A.13.1.1	Dcu	433	11	C ₄ -Dicarboxylat Transporter
b4123	DcuB	P14409	2.A.13.1.2	Dcu	446	11	Fumarat/Succinat Antiporter
b0621	DcuC	Q47134	2.A.61.1.1	DcuC	461	12	C ₄ -Dicarboxylat Transporter
b3528	DctA	P37312	2.A.23.1.3	DAACS	428	8	Na ⁺ /C ₄ -Dicarboxylat Symporter
b3089	YgjU	P42602	2.A.23.4.1	DAACS	414	8	Na ⁺ /Serin (Threonin) Symporter ?
b1801	YeaV	P76252	2.A.15.2.x	BCCT	481	10	Carnitin Transporter ?
b2246	YfaV	P76420	2.A.1.14.x	MFS	442	12	Tartrat Transporter ?

TC Nr.: x, noch nicht weiter classifisiert ; Familie: DASS (Divalent Anion: Na⁺ Symporter), Dcu (C₄-dicarboxylate Uptake), DcuC (C₄-dicarboxylate Uptake C), DAACS (Dicarboxylate/Amino Acid:Cation Symporter), BCCT (Betaine/Carnitine/Choline Transporter), MFS (Major Facilitator Superfamily) ; TM: Anzahl der Transmembrandomäne nach TMHMM Server version 2.0 ; Funktion: ?, nicht experimental nachgewiesen

In *E. coli* könnte Tartrat auch durch die bekannten C₄-Dicarboxylatcarrier DctA (C₄-Dicarboxylat-Transporter, aerob), DcuA (C₄-Dicarboxylat-Transporter, konstitutiv), DcuB (Fumarat/Succinat- Antiporter, anaerob) und DcuC (Succinat-Efflux-Transporter, anaerob)

transportiert werden, da Tartrat von der Struktur her ein typisches C₄-Dicarboxylat, wie Succinat, Fumarat und Malat, darstellt. Außerdem werden L- und D-Tartrat von dem DcuSR-Zweikomponentensystem, das die Anwesenheit der C₄-Dicarboxylate registriert und die Expression von *dctA* und *dcuB* reguliert, wahrgenommen (Zientz *et al.*, 1998; Kneuper *et al.*, 2005). YgjU gehört zur DAACS-Familie (Dicarboxylate/Amino Acid:Cation (Na⁺ or H⁺) Symporter) und weist Ähnlichkeit zu Dicarboxylat-Transportern in verschiedenen Organismen auf. Expressionsstudien zeigten die Induktion des *ygjU* Gens durch C₄-Dicarboxylate (Tab. 22; Tab. 23). Obwohl diese C₄-Dicarboxylatcarrier (DctA, DcuA, DcuB, DcuC und YgjU) den Tartrattransport katalysieren könnten, ist der Transport vermutlich nicht Hauptaktivität sondern eine Nebenaktivität, da es keine weiteren Hinweise aus Genorganisation oder Sequenzvergleich gibt, die mit dem Tartratstoffwechsel in Zusammenhang stehen.

Das Gen *yeaV* kodiert für einen sekundären Carrier und befindet sich unmittelbar stromabwärts von *yeaU*, das die potentielle aerobe Tartratdehydrogenase kodiert (Abb. 7). YeaU von *E. coli* weist signifikante Homologien zur Tartrat-Dehydrogenase/Decarboxylase

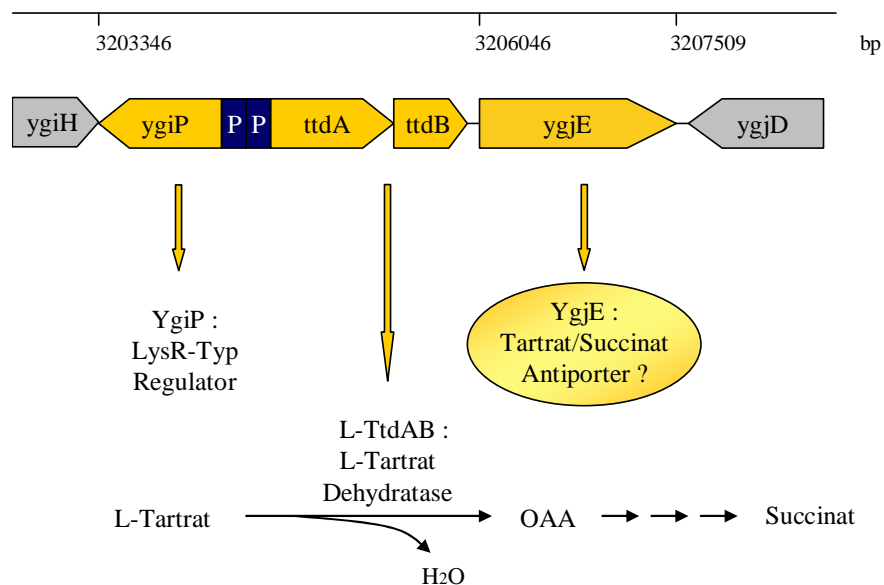


Abb. 6. Lokalisation und Organisation der Gene für den anaeroben Tartratstoffwechsel und benachbarte Gene für einen potentiellen Tartratcarrier (*ygjE*) und Tartratregulator (*ygiP*). Die Gene *ttdAB* (L-Tartrat Dehydratase) und *ygjE* (potentieller L-Tartrat/Succinat-Antiporter) liegen möglicherweise in einem Operon, das Gen *ygiP* (Regulator) liegt unmittelbar stromaufwärts von *ttdAB* und *ygjE* in entgegengesetzter Orientierung.

anderer Organismen auf, z.B. Tartratdehydrogenase Q8ZDR0 von *Yersinia pestis* mit 81% Identität, Tartrat-Dehydrogenase/Decarboxylase TtuC von *Pseudomonas putida* mit 77% Identität, und Tartrat-Dehydrogenase/Decarboxylase TtuC von *Agrobacterium vitis* mit 50% Identität. Das Gen *yeaT*, das für einen transkriptionellen Regulator vom LysR-Typ kodiert, liegt stromaufwärts vor *yeaU* in entgegengesetzter Orientierung, und ist wahrscheinlich für die Regulation der Expression von *yeaU* bzw. *yeaV* zuständig. YeaT besitzt 49% Sequenzidentität mit YgiP, dem Tartratregulator der Tartratfermentation (Kap. 4.2.3). In der Nachbarschaft dieses potentiellen aeroben Tartratgenclusters *yeaTUV* befinden sich die Strukturgene der Enzyme, die den weiteren aeroben Tartratabbau nach der Tartrat-Oxidation bzw. Decarboxylierung katalysieren könnten: ein Gen für eine potentielle Kinase (Gen b1772) und potentielle Oxidoreduktase (Gene b1774, b1776). Dies lässt vermuten, dass die Gene *yeaT*, *yeaU* und *yeaV* ein Gencluster für den aeroben Tartratstoffwechsel bilden.

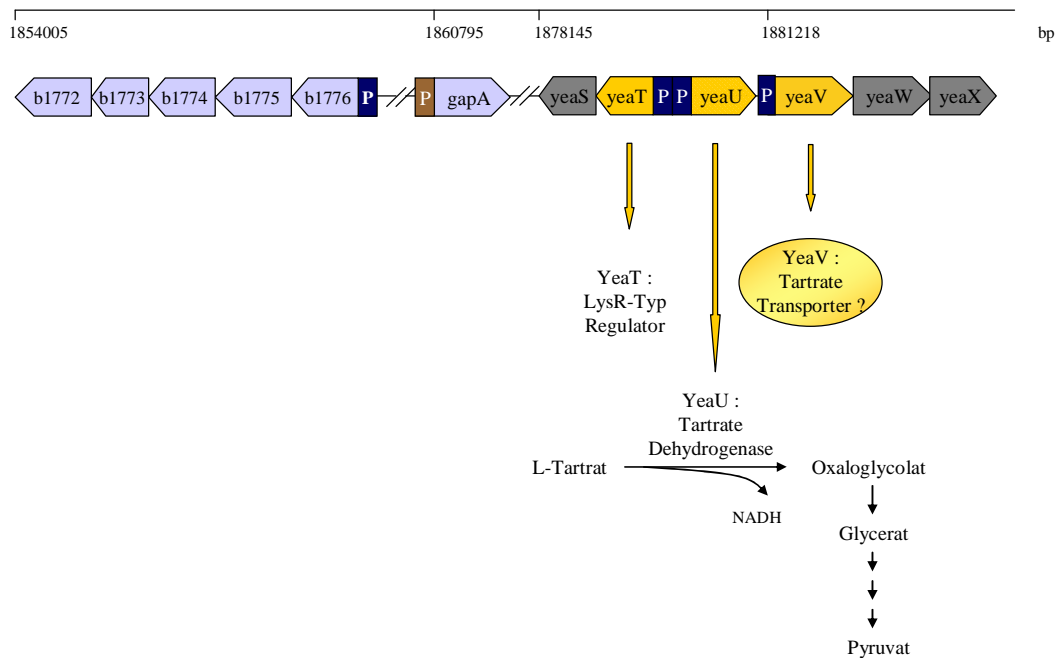


Abb. 7. Die Nachbarschaft des potentiellen Genclusters für den aeroben Tartratstoffwechsels (*yeaSTUVWX* Gene). Das potentielle aerobe Tartratcarriergen *yeaV* liegt stromab des Gen *yeaU* für die potentielle Tartratdehydrogenase. Es ist unklar, ob die beiden Gene ein Operon bilden. Das Gen *yeaT* (potentieller Regulator) liegt stromaufwärts in entgegengesetzter Orientierung vor *yeaU*. Postulierte Funktionen der benachbarten Gene: b1772 (Kinase); b1773 (Aldolase); b1774 (Oxidoreduktase); b1775 (Transporter); b1776 (Oxidoreduktase); *gapA*, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (nachgewiesen); *yeaD*, unbekannt; *yeaS* (Membranprotein); und *yeaWX* (Dioxygenase).

YfaV besitzt eine hohe Ähnlichkeit zum Tartratcarrier TtuB von *Agrobacterium vitis* mit 40% Sequenzidentität, und gehört zu ACS-Familie (Anion:Cation Symporter), die der 14. Untergruppe der MFS (Major Facilitator Superfamily) zu zuordnen ist (Pao *et al.*, 1998). Die Transporter der ACS-Familie katalysieren die Aufnahme von Hexuronat, Glukarat, 4-Hydroxyphenylacetat, Phthalat, Tartrat und Galactonat in Prokaryonten. Das Gen *yfaV* liegt zwischen den Genen *yfaW* und *yfaU*, die möglicherweise für eine Dehydratase bzw. eine Pyruvatkinase oder eine Aldolase kodieren (Abb. 8). Die Gene *yfaW*, *yfaV* und *yfaU* bilden wahrscheinlich ein Operon. Das Gen für einen potentiellen Regulator von IclR-Typ liegt stromabwärts dieses Genclusters. In der Nachbarschaft befinden sich die Gene für anaeroben Glycerinstoffwechsel. Carrier der ACS-Familie besitzen eine Aufnahmeaktivität im Symport- oder Uniportmodus. Dieser Transportmodus ist im aeroben Tartratstoffwechsel angebracht, da unter aeroben Bedingungen Tartrat vollständig zu CO₂ oxidiert werden sollte (Abb. 4). Aus diesen Gründen ist es denkbar, dass *yfaV* für einen Carboxylatcarrier kodiert. YfaV stellt daher einen Kandidaten für einen Tartratcarrier dar.

Die drei Carrier YgjE, YeaV und YfaV wurden hier als beste Kandidaten für die gesuchten Tartratcarrier angenommen. Der YgjE ist der beste Kandidat für einen anaeroben Tartratcarrier. Die Gründe sind die Homologie zum Citratcarrier CitT, der neben seiner eigentlichen spezifischen Aktivität, dem Citrat/Succinat-Antiport, auch die Aktivität für Tartrataufnahme und Citrat/Tartrat-Antiport aufweist (Pos *et al.*, 1998). Deshalb könnte YgjE den Tartrat/Succinat-Antiport katalysieren, der für die Tartratfermentation benötigt wird. YeaV und YfaV sind dagegen wegen ihres Symportmodus Kandidaten für die aeroben Tartrataufnahmecarrier. Obwohl YeaV Sequenzähnlichkeit zu Betain-, Cholin- und Carnitintransporter aufgeweist, könnte YeaV wegen der direkter Nachbarschaft des Gens *yeaU* zu Genen des Tartratstoffwechsels für einen Tartratcarrier kodieren. YfaV ist dagegen wegen seiner hohen Homologie zu Tartratcarriern in verschiedenen Organismen ein guter Kandidat für einen Tartratcarrier.

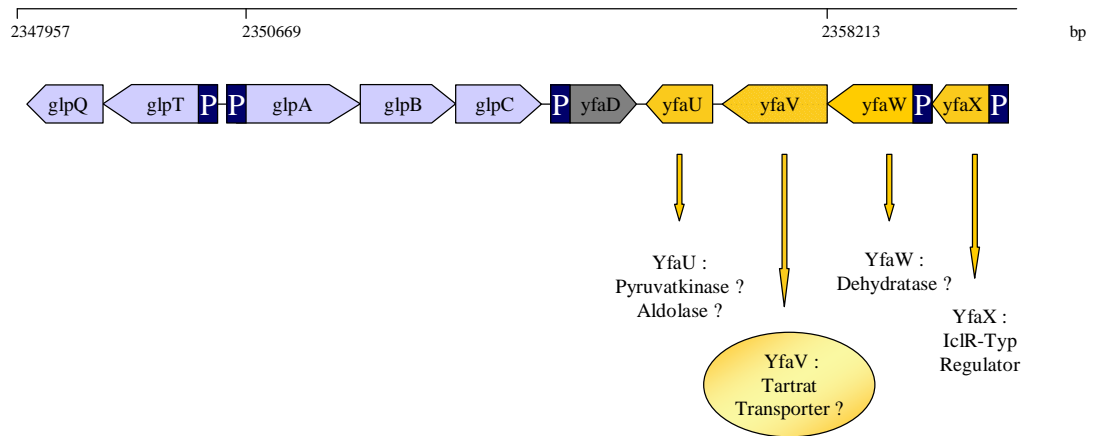


Abb. 8. Das potentielle Transportergen *yfaV* und seine benachbarten Gene. Das Gen für den potentielle Tartratcarrier, *yfaV*, liegt vermutlich zusammen mit *yfaU* (potentielle Pyruvatkinase oder Aldolase) und *yfaW* (potentielle Dehydratase) in einem Operon vor. Das Gen *yfaX* kodiert einen potentiellen Regulator. Die Funktionen der weiteren benachbarten Genen: *glpQ*, anaerobe Glycerol-3-Phosphat-Diesterase; *glpT*, anaerober Glycerol-3-Phosphat-Transporter; *glpABC*, anaerobe Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase; *yfaD*, unbekannte Funktion.

4.2 Das *ttdAB ygjE*-Operon des anaeroben Tartratstoffwechsels

Die Arbeiten von Reaney *et al.* (1993) hatten gezeigt, dass die anaerobe L-Tartratdehydratase von *E. coli* durch die *ttdAB* Gene kodiert wird. Der beste Kandidat für das Strukturgen des L-Tartratcarriers war YgjE aufgrund seiner Sequenzähnlichkeit zu CitT und wegen der Lage des *ygjE*-Gens im Anschluß an *ttdAB*. Es wurde deshalb zunächst untersucht, ob *ygjE* mit *ttdAB* cotranskribiert wird. Dazu wurde mit Reportergenfusionen geklärt, ob *ygjE* einen eigenen Promotor benutzt. Anschließend wurde mit bioinformatischen Methoden nach potentiellen Promotorbereichen im *ttdAB ygjE*-Genbereich gesucht, und durch Analyse der Transkripte die Operonstruktur des Genbereich untersucht.

4.2.1 Das *ygjE*-Gen benutzt keinen eigenen Promotor

Die experimentelle Bestimmung der Promotoren erfolgte durch Herstellung von Reporterfusionen des *ttdA*-Promotors und des potentiellen *ygjE*-Promotorbereichs. Dazu wurde zunächst der hypothetische Promotorbereich (290 bp) vor dem *ygjE* Gen in das *lacZ*-Fusionsplasmid pJL29 translationell vor das *lacZ*-Gen fusioniert. Die Fusion reicht bis 26 bp in den kodierenden Bereich von *ygjE*. Die Expression dieses *ygjE*-*lacZ* Fusionsplasmids wurde in *E.coli* MC4100 gemessen, der keine eigene β -Galaktosidase trägt, für die relevanten Regulatoren aber im Wildtyp-Zustand ist. Die Expression von *ygjE*-*lacZ* ist unter allen Bedingungen, auch im aeroben und anaeroben Wachstum mit C₄-Dicarboxylat oder Tartrat vernachlässigbar (Tab. 5). Die *ttdA*-*lacZ* Fusion wird dagegen durch L-Tartrat unter anaeroben Bedingungen stark exprimiert. Anaerobiose oder Anwesenheit von L-Tartrat führen nur zu einer starken Induktion. Unter Aerobiose oder mit Fumarat ist die Induktion wesentlich schwächer. Der intergenische Bereich zwischen *ttdAB*-Operon und *ygjE*-Gen beträgt nur 47 bp. Es wurde deshalb eine Fusion der *ttdAB ygjE*-Gene mit *lacZ* hergestellt, in der *lacZ* mit *ygjE* translationell fusioniert ist, zusätzlich aber *ttdAB* vor *ygjE* vorhanden war.

Tab. 5. Expression der Fusionen *ygjE*-*lacZ*, *ttdA*-*lacZ* und *ttdAB ygjE*-*lacZ*. Die β -Galaktosidase Aktivität der *ygjE*-*lacZ*, *ttdA*-*lacZ* und *ttdAB ygjE*-*lacZ* Fusionen wurde von den Fusionsplasmiden in MC4100 bestimmt. Die Zucht erfolgte in angereichertem M9-Minimalmedium mit den angegebenen Substraten unter aeroben (O₂) bzw. anaeroben (N₂) Bedingungen.

Zuchtbedingung	β -Galaktosidase [MU]		
	pMW255 (<i>ygjE</i> - <i>lacZ</i>)	pMW322 (<i>ttdA</i> - <i>lacZ</i>)	pMW357 (<i>ttdAB ygjE</i> - <i>lacZ</i>)
Glucose (O ₂)	1	4	3
Glucose (N ₂)	2	113	16
Succinat (O ₂)	3	15	7
Glycerin + Fumarat (N ₂)	4	125	22
L-Tartrat (O ₂)	1	68	25
Glycerin + L-Tartrat (N ₂)	2	17325	37

Die Expression dieser Reporterfusion (*ttdAB ygjE*-*lacZ*) war deutlich schwächer als die Expression von *ttdA*-*lacZ*. Sie wurde aber durch Anaerobiose und C₄-Dicarboxylate induziert. Die stärkste Induktion war bei anaeroben Wachstum auf L-Tartrat zu erkennen. Die Expression war damit ähnlich der Expression von *ttdA*-*lacZ*, wenngleich deutlich schwächer. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass *ygjE* keinen eigenen Promotor benutzt, sondern vom *ttdAB*-Promotor transkribiert wird.

Vorhersage von Promotorbereich im *ttdAB ygjE*-Gencluster

Die DNA-Sequenz eines Promotorbereichs besitzt einige Eigenschaften, mit denen sich dieser von Nicht-Promotorbereichen (kodierenden Bereichen und intergenischen Bereich ohne Promotor) eindeutig unterscheiden lässt. Ein Hauptunterschied zwischen Promotor- und Nicht-Promotorbereichen ist die Stabilität der doppelsträngigen DNA. Die durchschnittliche freie Energie des Aufschmelzens von 227 untersuchten Promotorbereichen in *E.coli* beträgt -17,48 kcal/mol gegenüber -20,19 kcal/mol in entsprechenden Genbereichen (Kanhere & Bansal, 2005). Die niedrige DNA Stabilität des Promotorbereichs beruht auf seinem niedrigen G+C-Gehalt und einer niedrigen „stacking energy“. Dies Phänomen steht im Einklang damit, dass die Doppelhelix-DNA des Promotorbereichs während der Initiation der Transkription eröffnet werden muss. Intergenische Bereiche von *E. coli* mit Promotor weisen die niedrigste „stacking energy“ auf, gefolgt von intergenischen Bereichen ohne Promotor, und von kodierenden Bereichen (Perdersen *et al.*, 2000). Mit dem Genome Browser Pro V.2.02 von PRODORIC (**Pro**karyotic **D**atabase of **G**ene **R**egulation, Münch *et al.*, 2003) kann eine DNA-Struktur auf den G+C-Gehalt und die „stacking energy“ untersucht werden. Da das *E. coli* Genom einen G+C-Gehalt von 51% besitzt, ist es optimal geeignet, nach diesen Kriterien auf Promotorbereiche getestet zu werden. Andere Methoden zur Vorhersage des Promotors, die auf Sequenzmotiven, z.B. der Pribnow Box oder der -35 Sequenz, beruhen, schlagen oft falsche potentielle Promotoren vor. Eine PRODORIC-Analyse des *ttdAB ygjE*-Genbereich zeigt vor dem *ttdA* Gen einen deutlich erniedrigten G+C-Gehalt und eine niedrige „stacking energy“ an und weist damit auf einen Promotor hin. Vor dem *ygjE* Gen dagegen weisen G+C-Gehalt und „stacking energy“-Werte wie bei anderen Nicht-Promotorbereichen auf (Abb. 9).

Die Methode sagt vor *ttdB* ebenfalls keinen Promotor vorher. Dies weist darauf hin, dass *ttdA*, *ttdB* und *ygjE* von einem gemeinsamen Promotor vor *ttdA* exprimiert werden, und dass die drei Gene in einen Operon liegen.

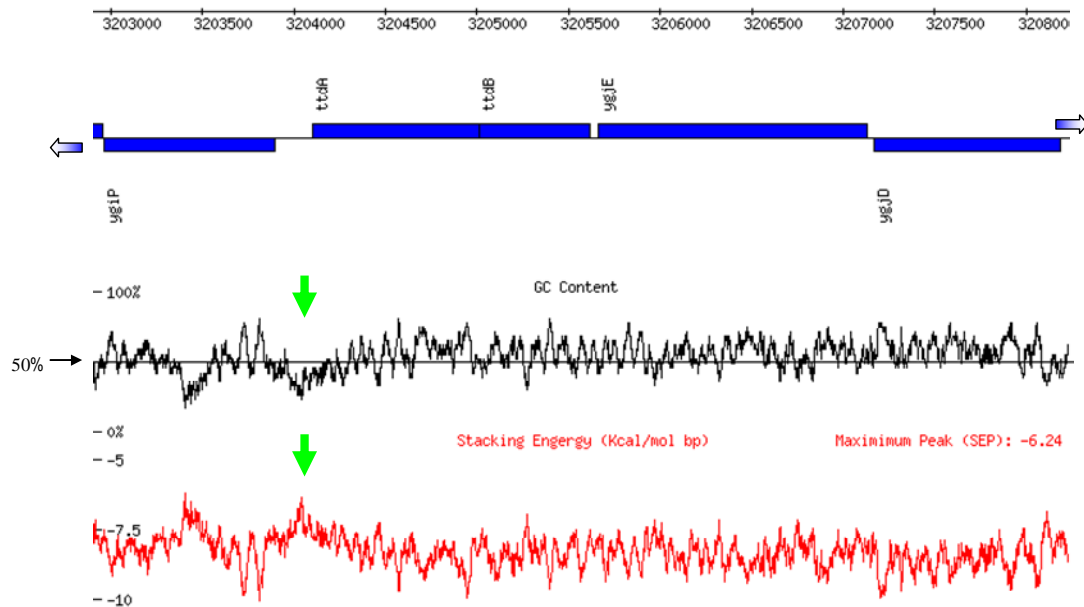


Abb. 9. Vorhersage von Promotorbereichen in den *ttdA ttdB ygjE* Umgebung von *E. coli*. Im Genome Browser Pro V.2.02 von PRODORIC wurde der G+C-Gehalt und die „stacking energy“ in der Umgebung von *ttdA ttdB ygjE* ermittelt. Der G+C-Gehalt ist in % und die „stacking energy“ in kcal/mol bp angegeben. Der vorhergesagte Promotorbereich vor *ttdA* mit der Abnahme des G+C-Gehaltes und der „stacking energy“ ist gekennzeichnet.

Nachweis des gemeinsamen *ttdAB ygjE*-Transkripts

Um die Gene *ttdA*, *ttdB* und *ygjE* als ein Operon nachzuweisen, wurde hier untersucht, ob die drei Gene als ein gemeinsames Transkript exprimiert werden. Dazu wurde Gesamt-mRNA aus dem Wildtyp *E. coli* LJ1 isoliert, der unter anaerober Bedingung in Minimalmedium mit L-Tartrat und Glycerin gezüchtet wurde. Da unter dieser Zuchtbedingung die L-Tartratdehydratase und der L-Tartrat/Succinat Antiporter benötigt werden, sollten die drei Gene verstärkt transkribiert werden. Dies sollte den Nachweis der Gene erleichtern. Die isolierte mRNA wurde mit Reverse-Transkriptase in die cDNA umgeschrieben. Dazu wurde nur ein Primer (*ttdT_rev_RT*) eingesetzt, der am 3'-Ende des *ygjE* Gens bindet und

komplementär zur *ygjE*-mRNA ist. In der cDNA sollten dann die Gene *ttdA*, *ttdB* und *ygjE* gemeinsam in einem großen Transkript vorliegen, wenn die Gene *ttdA*, *ttdB* und *ygjE* in einer gemeinsamen mRNA cotranskribiert werden. Wenn das Gen *ygjE* nur allein transkribiert wird und die mRNA monocistronisch ist, werden nur kleine cDNA-Fragmente gebildet (ca. 1,4 kb) (Abb. 10). Die cDNA wurde mit verschiedenen Primern amplifiziert, die im Gen *ttdA*, *ttdB* oder *ygjE* binden. Damit sollten die Gene einzelnen und bei Vorlage von gemeinsamen Transkripten in verschiedenen Kombination erhalten werden. Alle drei Gene wurden in einzelnen und in verschiedenen Kombinationen (*ttdAB*, *ttdB ygjE* und *ttdAB ygjE*) wieder gefunden (Abb. 11). Dadurch ist nachgewiesen, dass die Gene *ttdA*, *ttdB* und *ygjE* in einem Transkript exprimiert werden und in einem Operon liegen.

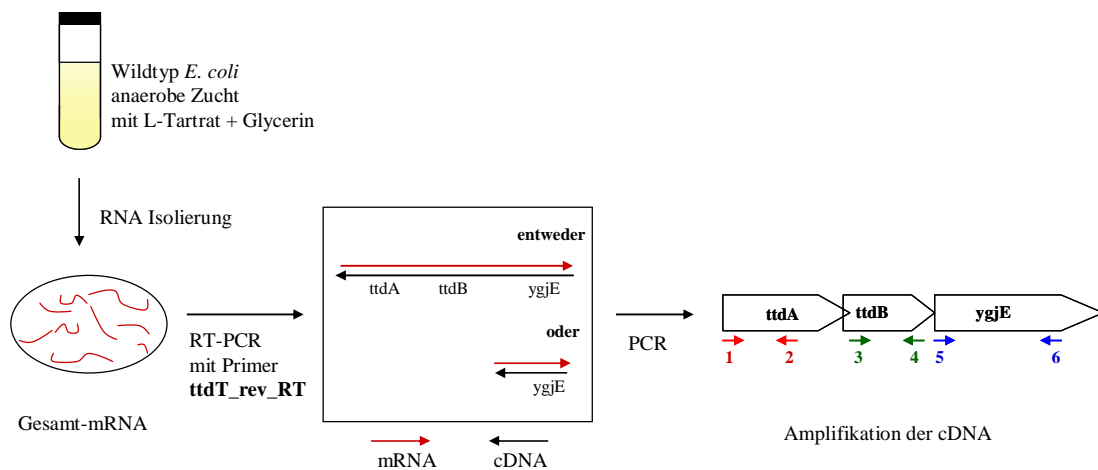
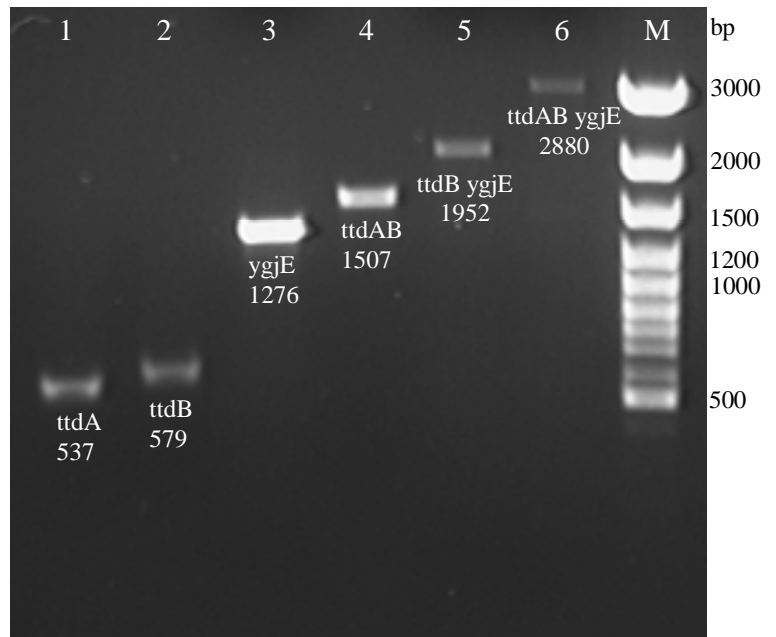


Abb. 10. Schematische Darstellung des Vorgehens zum Nachweis des *ttdAB ygjE*-Operons anhand von RT-PCR. Verwendete Primer: **1.** *ttdA_frd_RT*; **2.** *ttdA_rev_RT*; **3.** *ttdB_frd_RT*; **4.** *ttdB_rev_RT*; **5.** *ttdT_frd_RT*; **6.** *ttdT_rev_RT* *ttdT*, früher *ygjE*

Abb. 11. Nachweis der Gene *ttdA*, *ttdB* und *ygjE* als ein Transkriptionseinheit durch RT-PCR.

Die cDNA, die von der Gesamt-mRNA aus LJ1 Zucht der Tartratfermentation mit dem Primer *ttdT_rev* durch Reverse Transkriptase umgeschrieben wurde, wurde mit den folgenden Primern amplifiziert:

1. Primer *ttdA_frd_RT* und *ttdA_rev_RT*
 2. Primer *ttdB_frd_RT* und *ttdB_rev_RT*
 3. Primer *ttdT_frd_RT* und *ttdT_rev_RT*
 4. Primer *ttdA_frd_RT* und *ttdB_rev_RT*
 5. Primer *ttdB_frd_RT* und *ttdT_rev_RT*
 6. Primer *ttdA_frd_RT* und *ttdT_rev_RT*
- M. DNA Größenmarker
ttdT, früher *ygjE*



4.2.2 Expression des *ttdAB ygjE*-Operons

Die Expression des *ttdAB ygjE*-Operons wurde mit einer *ttdA*-*lacZ* Fusion in MC4100 untersucht (Tab. 6). Die Fusion lag auf dem Fusionsplasmid pMW322 vor. Die *ttdA*-*lacZ* Fusion wird unter anaeroben Bedingungen durch Tartrat stark induziert. L-Tartrat ist der stärkste Induktor, gefolgt von meso-Tartrat und D-Tartrat. Mit L-Tartrat nimmt die Induktion um den Faktor 94 im Vergleich zum Medium ohne Effektor zu. Andere C₄-Dicarboxylate wie Fumarat und Malat zeigten keine signifikante Induktion. Unter aeroben Bedingungen war die Expression dieses Operons dagegen insgesamt sehr niedrig, und war niedriger als unter der anaeroben Expression ohne Effektor. Das weist darauf hin, dass das *ttdAB ygjE*-Operon durch Tartrat spezifisch induziert wird, besonders durch L- und meso-Tartrat, wenn die Zelle unter anaeroben Bedingungen gezüchtet wird.

Tab. 6. Die Expression des *ttdAB ygjE*-Operons: Induktion durch Tartrat. Die β -Galaktosidaseaktivität der *ttdA*'-*lacZ*-Fusion wurde mit dem Plasmid pMW322 in *E. coli* MC4100 bestimmt. Die Zucht erfolgte in angereichertem M9-Minimalmedium mit den angegebenen Substraten (50mM). Für die anaerobe Zucht enthielt das Medium zusätzlich Glycerin (50mM) und DMSO (20mM) als Wuchssubstrate.

Substrate	Expression von <i>ttdA</i> '- <i>lacZ</i> [MU]	
	aerob	anaerob
Glucose	4	113
Fumarat	12	125
Succinat	5	n.d.
Malat	n.d.	270
L-Tartrat	68	17352
D-Tartrat	39	484
meso-Tartrat	60	2139
Keine	n.d.	185

n.d., nicht durchgeführt

Weiterhin wurde die Glucoserepression des *ttdAB ygjE*-Operons untersucht (Tab. 7). Dazu wurde die Expression von *ttdA*'-*lacZ* nach anaerober Zucht mit den Stereoisomeren von Tartrat, mit und ohne Glucose oder der Zuckersäure oder dem Alkohol der Glucose (Gluconat bzw. Sorbitol) gemessen. Durch Zugabe von Glucose nahm die Induktion durch die Tartratisomere jeweils stark ab und betrug dann nur noch 8% bis 21% der Ausgangswerte. Mit Sorbitol wurde eine ähnliche Repression erreicht, während Gluconat keine Repression verursacht. Diese Befunde sind ein deutlicher Hinweis, dass die Expression von *ttdA* einer Katabolit- oder Glucoserepression unterliegt.

Da die Expression des *ttdAB ygjE*-Operons nicht durch C₄-Dicarboxylate, sondern nur durch Tartrat induziert wird (Tab. 6), wird diese vermutlich nicht durch DcuSR Zweikomponentensystem reguliert. Die Induktion erfolgt außerdem nur unter Anaerobiose mit FNR als möglichem Regulator. Der Effekt von FNR und DcuSR auf der Expression des *ttdAB ygjE*-Operons wurde deshalb in *fnr*- und *dcuS*-Mutanten untersucht (Tab. 8). Das Expressionsmuster der *ttdA*'-*lacZ* Fusion der *dcuS*-Mutante ist im Vergleich mit dem

Wildtyp unverändert, und die Induktion durch L- und meso-Tartrat erfolgt in gleicher Weise wie im Wildtyp. In der *fnr*-Mutante war die Expression im Vergleich zum Wildtyp sehr stark reduziert, es fand keine Induktion mehr statt. Damit wird bestätigt, dass die Expression des *ttdAB ygjE*-Operons durch FNR reguliert, aber von DcuSR unabhängig ist.

Bei dem Tartratregulator könnte es sich um YgiP handeln. YgiP wird von dem Gen *ygiP* kodiert, das stromaufwärts des *ttdAB ygjE*-Operon liegt.

Tab. 7. Katabolitrepression des *ttdAB ygjE*-Operons. Die β -Galaktosidaseaktivität der *ttdA*'-*lacZ* Fusion wurde mit dem Plasmid pMW322 in *E. coli* MC4100 bestimmt. Die Zucht erfolgte in angereichertem M9-Minimalmedium unter anaeroben Bedingungen mit Tartrat (50mM), Glycerin (50mM), DMSO (20mM) und den angegebenen Zuckern (20mM).

	Expression von <i>ttdA</i> '- <i>lacZ</i> [MU]			
	ohne Zucker	Glucose	Gluconat	Sorbitol
L-Tartrat	17352	3715	15294	2542
D-Tartrat	484	75	360	58
meso-Tartrat	2139	185	2768	920
Keine	185	113	169	40

4.2.3 Tartratspezifische Regulation durch den LysR-Typ Regulator YgiP

Die Tartrat-abhängige Induktion des *ttdAB ygjE*-Operons erfolgt unabhängig von DcuS, das als Sensorkinase des Zweikomponentensystems die Anwesenheit von externen C₄-Dicarboxylaten erkennt. Dies ist in Einklang mit dem Befund, dass die Expression nur mit Tartrat, nicht mit anderen C₄-Dicarboxylaten erfolgte. Für diese spezifische Tartraterkennung sollte ein anderer Regulator vorliegen. Ein potentielle Regulator dafür ist YgiP, dessen Gen *ygiP* unmittelbar stromaufwärts des *ttdAB ygjE*-Operons in entgegengesetzter Orientierung liegt (Abb. 6). Bei YgiP sollte es sich um einen transkriptionellen Regulator vom LysR-Typ handeln. Der Effekt von YgiP auf die Expression des *ttdAB ygjE*-Operons wurde durch Bestimmung einer β -Galaktosidaseaktivität von *ttdA*'-*lacZ* Fusion in Wildtyp und *ygiP*-Mutante ermittelt (Tab. 9) (Schumacher, 2005). Die Induktion des *ttdAB ygjE*-Operons durch L-Tartrat ist in der *ygiP*-Mutante fast vollständig verloren gegangen. Ebenso nahm die

Induktion durch meso-Tartrat in der *ygiP*-Mutante gegenüber dem Wildtyp stark ab. Die Induktion durch D-Tartrat bleibt dagegen weitergehend erhalten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass YgiP für die die Induktion des *ttdAB ygiE*-Operons durch L- bzw. meso-Tartrat verantwortlich ist.

Tab. 8. Effekt von DcuS und FNR auf der Expression des *ttdAB ygiE*-Operons. Die β -Galaktosidaseaktivität der *ttdA*'-*lacZ* Fusion wurde mit Plasmid pMW322 in *E. coli* MC4100 (*Wt*), IMW262 (*dcuS*) und IMW151a (*fnr*) bestimmt. Die Zucht erfolgte in angereichertem M9-Minimalmedium mit den angegebenen Substraten (50mM). Für die anaerobe Zucht enthielt das Medium zusätzlich Glycerin (50mM), DMSO (20mM) und Gluconat (20mM, nur für anaerobe Tartrat Zucht) als Wuchssubstrate.

Substrate		Expression von <i>ttdA</i> '- <i>lacZ</i> [MU]		
		MC4100 (<i>Wt</i>)	IMW262 (<i>dcuS</i>)	IMW151a (<i>fnr</i>)
Glucose	O ₂	4	12	15
	N ₂	113	118	110
Fumarat	O ₂	12	29	25
	N ₂	125	302	268
Succinat	O ₂	15	22	21
Malat	O ₂	n.d.	24	21
	N ₂	270	416	321
L-Tartrat	O ₂	68	54	78
	N ₂	15294	13958	305
D-Tartrat	O ₂	39	40	59
	N ₂	360	424	192
meso-Tartrat	O ₂	60	44	60
	N ₂	2768	163	289
Keine	O ₂	n.d.	29	35
	N ₂	185	330	137
Gluconat	N ₂	169	137	183

n.d., nicht durchgeführt

Tab. 9. Effekt von YgiP auf der Expression des *ttdAB ygiE*-Operons. Die β -Galaktosidaseaktivität der *ttdA*-*lacZ* Fusion wurde mit dem Plasmid pMW322 in *E. coli* MC4100 (*Wt*) und IMW523 (*ygiP*) bestimmt. Die Zucht erfolgte in angereichertem M9-Minimalmedium unter anaeroben Bedingungen mit den angegebenen Substraten (50mM). Das Medium enthielt zusätzlich Glycerin (50mM), DMSO (20mM) und Gluconat (20mM, nur für anaerobe Tartrat Zucht) als Wuchssubstrate.

Substrate	Expression von <i>ttdA</i> - <i>lacZ</i> [MU]	
	MC4100 (<i>Wt</i>)	IMW523 (<i>ygiP</i>)
Glucose	66	80
L-Tartrat	11595	423
D-Tartrat	345	298
meso-Tartrat	3106	675
Keine	184	174

Wenn der Regulator YgiP die Transkription des *ttdAB ygiE*-Operons reguliert, sollte er in der Lage sein, an die Promotorregion des *ttdAB ygiE*-Operons binden. Die Bindung des YgiP-Proteins an die Promotorregion von *ttdAB ygiE*-Operon wurde durch Gelretardationsexperimente untersucht (Abb. 12) (Schumacher, 2005). Dazu wurde YgiP überproduziert und gereinigt. DNA der Promotorregion des *ttdA* Gens, mit dem gleichen Bereich, der auch in der *ttdA*-*lacZ* Reporterfusion vorliegt, wurde mit steigenden Mengen an YgiP-Protein inkubiert und der nativen Gelelektrophorese unterzogen. Ab 100 nM YgiP wurde die Bande der Promotorregion teilweise retardiert und es bildete sich neben der freien DNA eine zusätzliche Bande. Mit der steigenden Menge an YgiP wurde die retardierte Bande intensiver und die Bande freier DNA nahm ab. Das zeigt, dass YgiP direkt an die Promotorregion von *ttdA* bzw. *ygiP* bindet und dass sich ein langsamer wandernder YgiP-DNA-Komplex bildet.

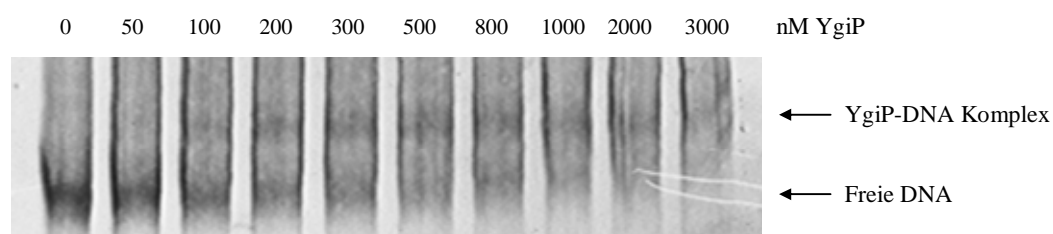


Abb. 12. Gelretardation von *ttdA*-Promotor-DNA durch YgiP. [α - P^{33}]-dATP-markierte *ttdA*-Promotor-DNA wurde mit gereinigtem His₆-YgiP-Protein in steigender Konzentration inkubiert. Pro Ansatz wurden 0,3 pmol DNA und YgiP von 0 nM bis 3000 nM gegeben. Der Nachweis erfolgte mittels Autoradiographie.

4.3 Der anaerobe Tartratcarrier YgjE

Das Gen *ygjE* bildet im *E. coli* Genom zusammen mit den Genen *ttdA* und *ttdB*, die das Enzym L-Tartratdehydratase der L-Tartratfermentation kodieren, ein Operon (Kap. 4.2.1). Die Expression dieses Operons wurde unter anaeroben Bedingungen mit L- und meso-Tartrat spezifisch induziert (Kap. 4.4.2). In der Tartratfermentation von *E. coli* wird Succinat als Endprodukt gebildet (Abb. 1). Für den Substrat/Produkt-Antiport könnte ein Tartrat/Succinat-Antiporter verantwortlich sein. Das Gen *ygjE* kodiert für einen sekundären Carrier, der 487 Aminosäuren groß ist und 12 Transmembrandomänen besitzt. YgjE gehört zu der „carboxylate/C₄-dicarboxylate antiporter“-Familie, die einer Untergruppe der DASS-Familie (divalent anion:Na⁺ symporter) zu zuordnen ist (Saier, 1998; Janausch *et al.*, 2002; Prakash *et al.*, 2003). Die Carrier dieser Familie finden sich in Bakterien, Archaea und Eukaryonten; gut charakterisierte Beispiele dafür sind der Citrat/Succinat-Antiporter CitT von *E. coli* und der 2-Oxoglutarat/Malat-Translocator SOT1 von *Spinacia oleraceae* (Spinat). Außerdem weist der Carrier YgjE signifikante Sequenzhomologie zu CitT und SOT1 auf (Tab. 27). Diese drei Carrier besitzen 12 Transmembrandomänen, die allerdings von dem „6 + 6 Helix“-Motiv abweichen. CitT von *E. coli* katalysiert den heterologen Gegentausch von Citrat gegen Succinat in der Citratfermentation (Pos *et al.*, 1998). Der 2-Oxoglutarat/Malat-Translocator SOT1 katalysiert die Aufnahme von 2-Oxoglutarat durch den Gegentausch von stromalem Malat für die Glutamatsynthese in Chloroplasten (Weber *et al.*, 1995). Deshalb ist es denkbar, dass YgjE den heterologen Gegentausch (Tartrat/Succinat) katalysiert. In diesem Kapitel wurde YgjE als einer anaerober Tartratcarrier bzw. Tartrat/Succinat-Antiporter biochemisch untersucht. Die Funktion von YgjE wurde durch Wachstumsexperimente und Transportmessungen charakterisiert.

4.3.1 Konstruktion der *ygjE* Mutante

Um die Funktion des YgjE Proteins biochemisch zu untersuchen, sollte zuerst eine *ygjE*-Deletionsmutante konstruiert werden, damit das biochemische Verhalten *in vivo* mit und ohne YgjE verglichen werden kann. Andere Carrier, die eventuell an dem anaeroben Tartrattransport beteiligt sein könnten, sind die anaeroben C₄-Dicarboxylatcarrier (DcuA, DcuB, und DcuC) und der Citrat/Succinat-Antiporter CitT. Diese sollten ebenfalls in inaktivierter Form vorliegen, um mögliche Einflüsse anderer Carrier ausschließen zu können. Die Geninaktivierung nach der Methode von Datsenko & Wanner (Datsenko & Wanner, 2000; Ney, 2003) war für die Herstellung der Mehrfachmutante besonders vorteilhaft, da bei dieser Methode nach der Deletion des Zielgens die Resistenzkassette eliminiert werden kann. Durch die Deletion der Resistenzkassette können Mehrfachmutanten ohne Anhäufung der verschiedenen Antibiotikaresistenzgene konstruiert werden. Eine *ygjE*-Mutante, die auf diese Weise hergestellt wurde, kann wegen des Fehlens der Antibiotikaresistenz mit anderen inaktivierten Genen, die eine Resistenzkassette tragen, direkt kombiniert werden.

Zur Konstruktion der Deletionsmutante wurde eine Chloramphenicol-Resistenzkassette, die von FRT-Sequenzen flankiert ist, aus dem Plasmid pKD3 mit den Primern ttdT_H1P1/2 und ttdT_H2P2/2 amplifiziert (Abb. 13. A). Die Primer bestehen aus 20 Nukleotiden, die zu der „priming site“ auf pKD3 für die Amplifikation der Resistenzkassette homolog sind und weiteren 50 Nukleotiden, die homolog zu den beiden Randbereichen des *ygjE* Gens sind. Durch die PCR mit diesen Primern wurde ein DNA-Fragment erhalten, das neben der Resistenzkassette Randbereiche H1 und H2 des *ygjE* Gens zur homologen Rekombination enthält. Dieses PCR-Amplifikat wurde in den *E. coli* Stamm, der das Helferplasmid pKD46 trägt, transformiert. Von pKD46 wird das λ Red Rekombinasesystem exprimiert, das die Rekombination der linearen DNA (PCR-Produkt) in der *E. coli* Zelle ermöglicht. Durch die Doppelrekombination der Homologiebereiche H1 und H2 zwischen dem PCR-Amplifikat und dem Genom wird das Gen *ygjE* durch die Chloramphenicolkassette ersetzt (Abb. 13. B). Diese Rekombinante (*ygjE*-Mutante) wurde auf Chloramphenicolplatten erhalten, und der

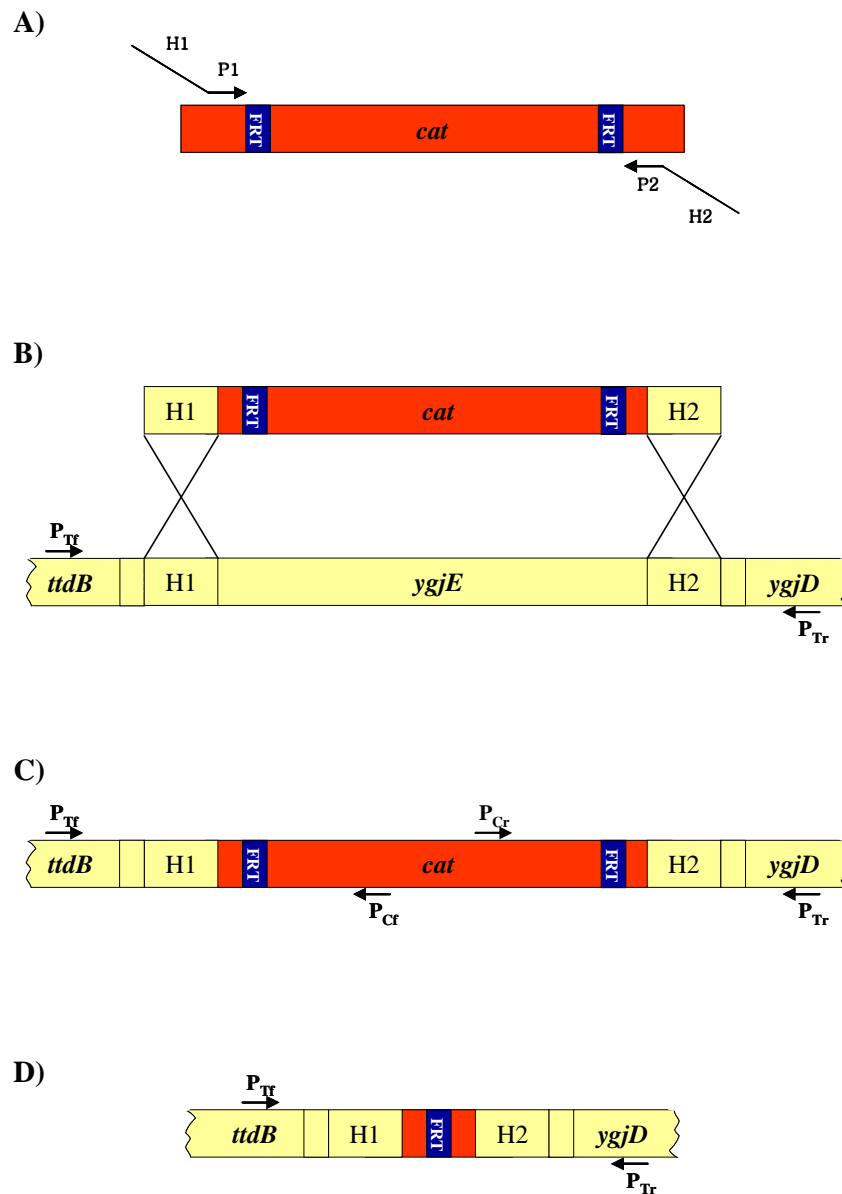


Abb. 13. Schematische Darstellung der Deletion des *ygjE* Gens. A) Amplifikation der Chloramphenicol-Resistenzkassette (*cat*) aus pKD3 mit den homologen flankierenden Primern *ttdT*_{H1P1/2} und *ttdT*_{H2P2/2}. B) Transformation des PCR-Produkts und Doppelrekombination mit Hilfe der λ Red-Rekombinase von pKD46. C) Selektion der Mutante durch Chloramphenicolresistenz. D) Eliminierung der Resistenzkassette mit Hilfe der FLP Rekombinase aus Pcp20. *cat*, Gen für Chloramphenicol acetyltransferase; Primer: P_{Tr}, *ttdT*_{test_frd}; P_{Tr}, *ttdT*_{test_rev}; P_{Cf}, *cat*_{frd}; P_{Cf}, *cat*_{rev}; *ttdT*, früher *ygjE*

Austausch des *ygjE*-Gens gegen *cat* wurde von den einzelnen Klonen durch PCR überprüft (Abb. 13. C). Nachdem die *ygjE*-Mutation in einem Klon durch PCR bestätigt wurde, wurde

das Helferplasmid pKD46 (amp^R) durch Züchten bei 37°C oder 43°C entfernt, da seine Replikation von dem temperatursensitiven Origin abhängt. Der Verlust von pKD46 wurde durch Sensitivität gegen Ampicillin bestätigt. Zur Deletion der Chloramphenicol-Resistenzkassette wurde das Helferplasmid pCP20, von dem die FLP Rekombinase kodiert wird, in die *ygjE*-Mutante (Rekombinante) transformiert. Die FLP Rekombinase erkennt die FRT-Sequenzen, die die Resistenzkassette flankieren und führt durch Rekombination zur Deletion der Chloramphenicol-Resistenzkassette (Abb. 13. D). Das temperatursensitive Helferplasmid pCP20 (amp^R) wurde wieder durch Züchten bei 37°C oder 43°C entfernt, wie im Fall von pKD46.

Die Chloramphenicol-resistente Mutante (*ygjE*, Cam^R) und deren Deletionsmutante (ΔygjE) wurden durch PCR überprüft. Mit den Primern P_{Tf} und P_{Tr} (Abb. 13. B und C), die 424 bp stromaufwärts des *ygjE* Gens bzw. 251 bp stromabwärts des *ygjE* Gens binden, wird ein Fragment von 2137 bp DNA von dem Wildtyp, 1708 bp DNA von der Chloramphenicol-resistenten Mutante und 759 bp DNA von der Deletionsmutante amplifiziert. Die Primer P_{Cf} bzw. P_{Cr} (Abb. 13. C) binden an die Chloramphenicol-Resistenzkassette. Mit den Primerkombinationen P_{Tr} und P_{Cr} bzw. P_{Tf} und P_{Cf} werden 846 bp bzw. 717 bp DNA von der Chloramphenicol-resistenten Mutante und keine DNA vom Wildtyp und der Deletionsmutante amplifiziert. Alle Fragmente, die für die Stämme vorhergesagt wurden, wurden in der PCR erhalten (nicht gezeigt). Deshalb kann man annehmen, dass die Insertions- und Deletionsmutanten von *ygjE* in der gewünschten Form erhalten wurden.

Der Hintergrundstamm dieser Mutagenese, MG1655, war wegen des Fehlens von *fnr* (Soupene *et al.*, 2003) nicht zur biochemischen Untersuchung und Charakterisierung des YgjE Proteins im anaeroben Tartrattransport geeignet. Aus diesem Grund wurde die *ygjE* Mutation (cm^R) via P1-Transduktion in den Stamm LJ1 (Wildtypstamm, *fnr*⁺) übertragen. Durch Wiederholung der P1-Transduktion wurden Mehrfachmutanten konstruiert, in denen die Gene *dcuA*, *dcuB*, *dcuC*, *citT* und *ygjE* in verschiedenen Kombinationen inaktiviert sind. Dabei wurden die Gene *citT::kan^R* und *dcuC::Tn10 (cm^R)* ebenso wie *dcuA::spc^R* und *dcuB::kan^R* auf Grund ihrer Nachbarschaft im Genom kotransduziert. Die Übertragung

der *dcuC* Mutation erfolgte wegen seiner Chloramphenicolresistenz erst nach der Deletion des Resistenzgens aus der *ygjE* Mutation. Auf diese Weise wurden die Stämme zur biochemischen Untersuchung des YgjE Carriers IMW519 (LJ1, aber *ygjE*), IMW522 (LJ1, aber *dcuA dcuB dcuC*), IMW524 (LJ1, aber *dcuA dcuB dcuC ygjE*), IMW528 (JL1, aber *dcuA dcuB dcuC citT*) und IMW529 (LJ1, aber *dcuA dcuB dcuC citT ygjE*) erhalten.

4.3.2 Wachstumsverhalten der Carriermutanten

Die drei Stereoisomere des Tartrats können von verschiedenen Bakterien durch drei mögliche Stoffwechselwege abgebaut werden, (1) über den Oxalacetat-Weg durch die stereospezifische Tartratdehydratase (Shilo, 1957; Rode & Giffhorn, 1982a, 1982b; Janssen, 1991; Reaney *et al.* 1993), (2) über den D-Glycerat-Weg durch die Tartratdehydrogenase und die Oxalglykolatreduktase (Kohn *et al.*, 1968; Kohn & Jakoby, 1968; Tipton & Beecher, 1994; Karsten *et al.*, 2002) und (3) über den D-Glycerat-Weg durch die Tartratdecarboxylase (Furuyoshi *et al.*, 1991; Tipton & Beecher, 1994; Ruszczycky & Anderson, 2004). In *E. coli* wird Tartrat unter anaeroben Bedingungen durch die Tartratdehydratase zu Oxalacetat umgesetzt (Reaney *et al.*, 1993) und vermutlich zu Succinat reduziert. Dazu benötigt *E. coli* ein Cosubstrat, z. B. Glycerin, als Elektronendonator (Reaney *et al.*, 1993). Für die Umsetzung des Tartrats zu Oxalacetat sind die L-Tartratdehydratase (L-Ttd) und die D-Tartratdehydratase (D-Ttd) zuständig. Die L-Tartratdehydratase wird durch L- und meso-Tartrat unter anaeroben Bedingungen induziert, die D-Tartratdehydratase durch alle drei Stereoisomere. Jedoch katalysieren die L-Ttd bzw. die D-Ttd die Dehydratisierung von L-Tartrat bzw. D-Tartrat stereospezifisch. In *E. coli* wurde keine meso-Tartratdehydrataseaktivität nachgewiesen. Es wird daher vermutet, dass meso-Tartrat zunächst durch eine Epimerase zu L- oder D-Tartrat umgewandelt wird (Reaney *et al.*, 1993). Die Tartrataufnahme kann unter aeroben Bedingungen von dem Protein des *dct* (vermutlich *dctA*) Gens katalysiert werden, die Aufnahmeaktivität für Tartrat ist aber sehr niedrig (Kay *et al.*, 1971). Bei DctA handelt es sich um den aeroben C₄-Dicarboxylatcarrier.

Hier wurde das anaerobe Wachstum auf Tartrat untersucht. Um den Carrier des anaeroben Tartratstoffwechsels zu identifizieren wurde das Wachstumsverhalten der verschiedenen Carriermutanten auf den drei Stereoisomeren von Tartrat und auf Fumarat untersucht.

Anaerobes Wachstum auf L-Tartrat oder Fumarat

Der Wildtyp LJ1 konnte unter anaeroben Bedingungen auf L-Tartrat und Glycerin gut wachsen ($t_d = 3,85$ h) (Abb. 14. A). Die Mutante IMW528, in der die Gene für die anaeroben C₄-Dicarboxylatcarrier (*dcuA dcuB dcuC*) und den anaeroben Citrat/Succinat-Antiporter (*citT*) ausgeschaltet sind, konnte unter vergleichbaren Bedingungen weiterhin gut wachsen, das Wachstum war aber etwas langsamer ($t_d = 4,99$ h). Die *ygjE*-Mutante IMW519 war dagegen nicht mehr in der Lage auf L-Tartrat zu wachsen. Dieser Ausfall des Wachstums von IMW519 auf L-Tartrat deutet darauf hin, dass YgjE der Hauptcarrier für den Transport von L-Tartrat ist, und die anaeroben C₄-Dicarboxylatcarrier (DcuA, DcuB und DcuC) und der anaerobe Citratcarrier CitT die Funktion von YgjE als L-Tartrattransporter nicht ersetzen können.

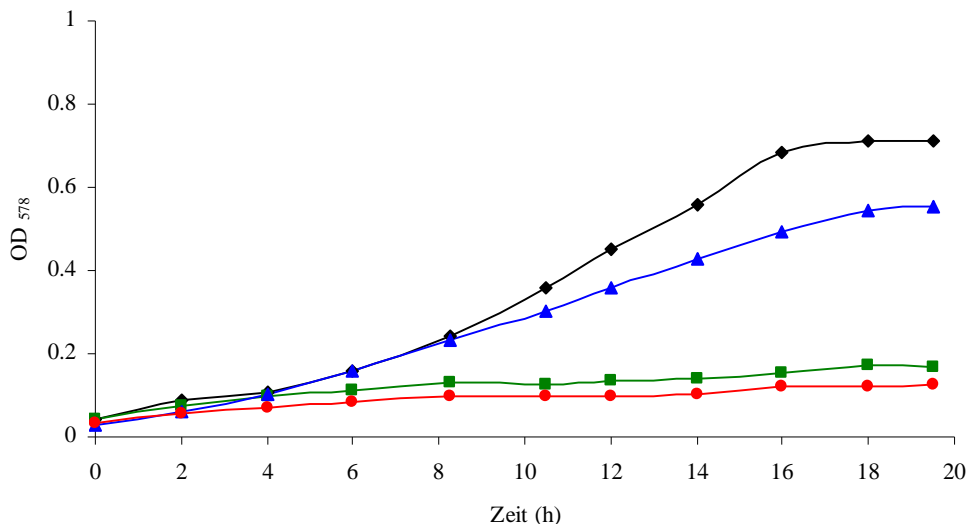
Im anaeroben Wachstum mit Fumarat verhalten sich die Mutanten deutlich anders (Abb. 14. B). Der Wildtyp LJ1 und die *ygjE*-Mutante IMW519 wuchsen auf Fumarat und Glycerin unter anaeroben Bedingungen gleich gut. Das Wachstum der *dcuA dcuB dcuC citT*-Mutante IMW528 fiel dagegen vollständig aus, vergleichbar mit dem Wachstum der *dcuA dcuB dcuC citT ygjE*-Mutante IMW529. YgjE konnte die Funktion von C₄-Dicarboxylatcarriern nicht ersetzen. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Carrier YgjE für den anaeroben Fumarattransport nicht benötigt wird.

Das unterschiedliche Wachstumsverhalten auf L-Tartrat bzw. Fumarat deutet darauf hin, dass YgjE ein tartratspezifischer Carrier ist und für das anaerobe Wachstum auf L-Tartrat notwendig ist. Der Tartratcarrier YgjE und die C₄-Dicarboxylatcarrier (DcuA, DcuB und DcuC) können sich in ihrer Funktion nicht gegenseitig ersetzen.

Die Funktion von YgjE im Tartrattransport oder Tartrat/Succinat-Antiport wurde durch HPLC-Analyse der Kulturüberstände der Wachstumsexperimente bestätigt (Tab. 10). Der

Wildtyp LJ1 setzte L-Tartrat zu äquivalenten Mengen an Succinat um. Dieses Verhältnis des L-Tartratverbrauchs zu Succinatbildung (ca. 1:1) blieb bei der *dcuA dcuB dcuC*-Mutante IMW520 gleich. Die *ygjE*-Mutante hatte dagegen kaum L-Tartrat verbraucht und kaum Succinat gebildet. Der geringe L-Tartrat/Succinat-Antiport wurde vermutlich durch den

A)



B)

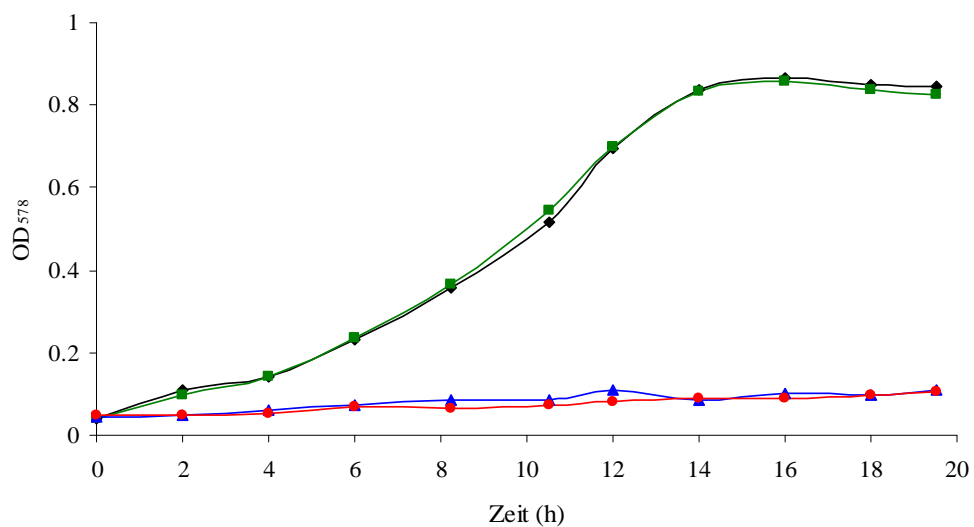


Abb. 14. Anaerobes Wachstum von *E. coli* LJ1 (♦, Wildtyp), IMW519 (■, *ygjE*), IMW528 (▲, *dcuA dcuB dcuC citT*) und IMW529 (●, *dcuA dcuB dcuC citT ygjE*) auf L-Tartrat (20mM) und Glycerin (20mM) (A) und auf Fumarat (20mM) und Glycerin (20mM) (B).

Fumarat/Succinat-Antiporter DcuB katalysiert, da in der *dcuA dcuB dcuC ygjE*-Mutante trotz des intakten CitT kein Verbrauch von Tartrat und damit kein L-Tartrat/Succinat-Antiport stattgefunden hat. In der *dcuA dcuB dcuC ygjE*-Mutante wurden nur sehr kleine Mengen Tartrat verbraucht. Es wurde kein Succinat gebildet, und diese Mutante konnte nicht wachsen. Glycerin dient in L-Tartratfermentation als Elektronendonator und Energiequelle. Es wurde zu Acetat oxidiert, andere Endprodukte der gemischten Säuregärung, z. B. Laktat, Formiat und Ethanol wurden nicht nachgewiesen.

Tab. 10. Substratumsatz und Produkte des anaeroben Wachstums der *dcu*- und *ygjE*-Mutanten auf L-Tartrat (20 mM) und Glycerin (20 mM). Vor und nach der Zucht (26 h) wurden L-Tartrat und die Produkte im Kulturüberstand mit der HPLC bestimmt.

Stämme	verbraucht (mM)		gebildet (mM)		Bilanz (%)
	L-Tartrat	Glycerin	Succinat	Acetat	
LJ1 (<i>wt</i>)	17,51	6,26	16,18	6,58	95,75
IMW519 (<i>ygjE</i>)	0,85	1,05	0,76	0,00	n.a.
IMW520 (<i>dcuABC</i>)	10,92	5,89	12,19	7,33	116,12
IMW524 (<i>dcuA dcuB dcuC ygjE</i>)	0,98	0,76	0,00	0,00	n.a.

n.a., nicht auswertbar

Anaerobes Wachstum auf meso-Tartrat oder D-Tartrat

Das anaerobe Wachstum auf meso-Tartrat und D-Tartrat wurde ebenfalls untersucht. Trotz der Induktion des *tttAB ygjE*-Operons durch meso-Tartrat (Kap. 4.2.2) konnte *E. coli* unter anaeroben Bedingungen auf meso-Tartrat und Glycerin nicht wachsen (Abb. 15. A). Das könnte an dem fehlenden Umsatz des meso-Tartrats durch die L-Tartratdehydratase liegen.

Der Wildtyp LJ1 und die *ygjE*-Mutante IMW519 zeigten anaerobes Wachstum mit D-Tartrat plus Glycerin. Das Wachstum der beiden Stämme war schwach, aber eindeutig positiv im Vergleich zu der *dcuA dcuB dcuC*- und *dcuA dcuB dcuC ygjE*-Mutante (Abb. 15. B). Das anaerobe Wachstum auf D-Tartrat ist damit von den gleichen Carriern abhängig wie das Wachstum mit Fumarat, nicht aber vom Carrier des Wachstums auf L-Tartrat. Dies deutet

darauf hin, dass der Transport von D-Tartrat durch die anaeroben C₄-Dicarboxylatcarrier katalysiert wird, nicht durch YgjE.

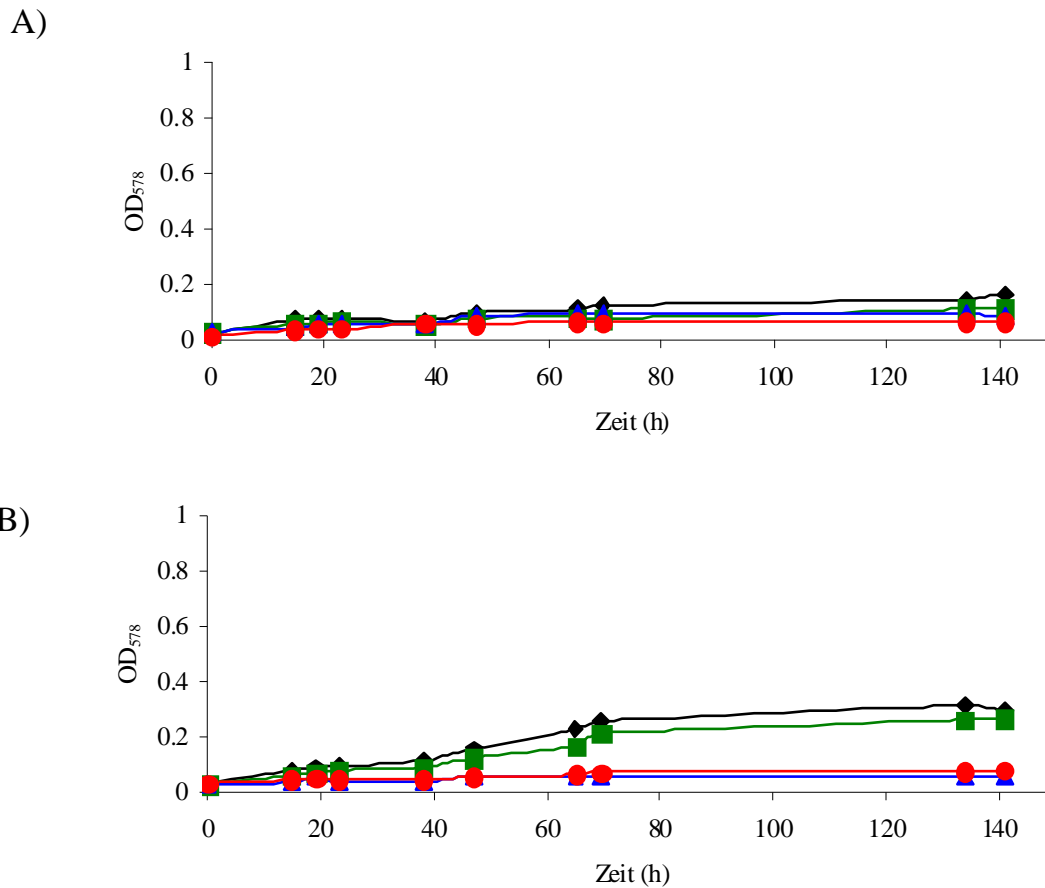


Abb. 15. Anaerobes Wachstum von *E. coli* LJ1 (♦, Wildtyp), IMW519 (■, *ygjE*), IMW520 (▲, *dcuABC*) und IMW524 (●, *dcuABC ygjE*) auf meso-Tartrat (20mM) und Glycerin (20mM) (A) und auf D-Tartrat (20mM) und Glycerin (20mM) (B).

Der anaerobe L-Tartrattransport erfolgte somit hauptsächlich durch YgjE. Die Dcu-Carrier konnten nur einen sehr geringen Anteil von L-Tartrat transportieren, jedoch ohne YgjE war das anaerobe Wachstum auf L-Tartrat nicht möglich. Während der L-Tartratfermentation war die Menge an verbrauchtem L-Tartrat und an gebildetem Succinat äquivalent. Dies weist darauf hin, dass L-Tartrat nach der Umsetzung zu Oxalacetat über Malat und Fumarat zu Succinat reduziert wird, und die L-Tartrataufnahme möglicherweise mit dem Succinatefflux gekoppelt wird. Andererseits erfolgte der anaerobe D-Tartrattransport durch die Dcu-Carrier und war von YgjE unabhängig. Das schwache Wachstum liegt vermutlich an dem schlechten

Umsatz der D-Tartratdehydratase. *E. coli* konnte unter anaeroben Bedingungen mit meso-Tartrat nicht wachsen. Dies ist im Einklang mit den Befunden von Reaney *et al.* (1993), dass keine meso-Tartratdehydratase-Aktivität nachgewiesen wurde.

4.3.3 Eigenschaften des Tartratcarriers YgjE

In *E. coli* sollte die Tartrataufnahme unter anaeroben Bedingungen mit dem Succinatexport gekoppelt sein, weil in der L-Tartratfermentation von *E. coli* äquimolare Mengen Tartrat verbraucht und Succinat gebildet werden (Tab. 10). Für diesen Transport würde sich ein Vorläufer/Produkt-Antiporter eignen. Ein Beispiel dafür ist der Fumarat/Succinat-Antiporter DcuB von *E. coli*, dessen Gegentauch elektroneutral und unabhängig vom Membranpotential getrieben wird (Engel *et al.*, 1992, 1994). Der Oxalat/Formiat-Antiporter OxIT von *Oxalobacter formigenes* ist ein anderes Beispiel für einen elektrogenen Gegentausch aufgrund des Ladungsunterschieds von Oxalat (Dicarboxylat) und Formiat (Monocarboxylat) (Anantharam *et al.*, 1989; Abe *et al.*, 1996).

Die Eigenschaften des Tartrattransports wurden in Stämmen von *E. coli* untersucht, in denen verschiedene C₄-Dicarboxylatcarrier genetisch ausgeschaltet sind. Dazu gehörten der vermutliche Tartratcarrier YgjE und die C₄-Dicarboxylatcarrier des anaeroben Stoffwechsels, DcuA, DcuB, DcuC und CitT. Der Transport wurde durch die Aufnahme von radioaktiv markiertem Substrat gemessen. Weil [¹⁴C]-Tartrat zu Beginn der Versuche kommerziell nicht erhältlich war, wurde [¹⁴C]-Succinat verwendet, das dem Tartrat strukturell ähnlich ist und das vermutliche Gegentauschsubstrat darstellt. Für Transportmessungen wurden die Zellen unter anaeroben Bedingungen mit L-Tartrat plus Gluconat bis zu einer OD₅₇₈ von 0,8 gezüchtet. Vor der Messung wurde eine anaerobe Zellsuspension mit Glucose (20 mM) für 5 min energetisiert. Der Start der Aufnahme erfolgte durch Zugabe einer energetisierten Zellsuspension zu einer vorgelegten [¹⁴C]-Succinatlösung. Die Endkonzentration der [¹⁴C]-Succinatlösung betrug dabei 100 µM, und die OD₅₇₈ lag zwischen 4 und 5. Die Reaktion

wurde durch Zugabe von LiCl-Lösung gestoppt. Die Zellen wurden über einen Membranfilter filtriert, und die Radioaktivität des [^{14}C]-Succinats in der Zelle bestimmt.

Der Wildtyp akkumulierte [^{14}C]-Succinat zunächst in einer schnellen Reaktion, die etwa 1 min dauert. Danach erfolgte eine weitere langsame lineare Zunahme der Radioaktivität in der Zelle (Abb. 16.) Die *ygjE*-Mutante zeigte eine erniedrigte Anfangstransportrate von 0,56 U/g TG im Vergleich mit Wildtyp von 0,76 U/g TG. Ebenso war eine langsame lineare Aufnahme wie beim Wildtyp zu beobachten. In der *dcuA dcuB dcuC*-Mutante war die Anfangstransportrate sogar höher als im Wildtyp und betrug 1,93 U/g TG. Eine Sättigung der Zellen wurde jedoch wie im Wildtyp bei ungefähr 1 $\mu\text{mol Succinat/ g TG}$ erreicht. In der *dcuA dcuB dcuC ygjE*-Mutante war die Transportrate etwa halb so groß (0,80 U/g TG). In den *dcu*- und *dcu ygjE*-Mutanten war der langsame lineare Anstieg der Succinataufnahme des Wildtyp nicht zu beobachten.

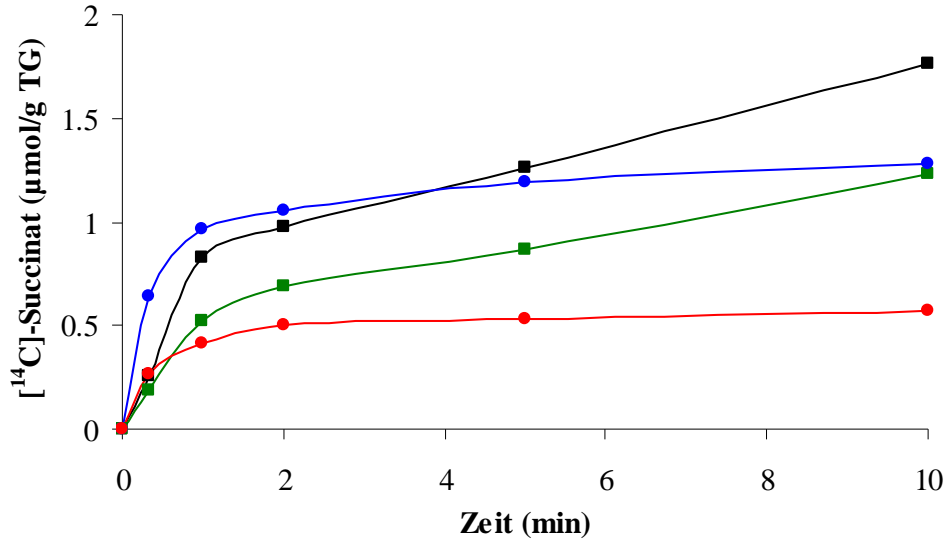


Abb. 16. Die Aufnahme von 100 μM [^{14}C]-Succinat in Zellsuspension von *E. coli* LJ1 (■, Wildtyp), IMW519 (■, *ygjE*), IMW520 (●, *dcuABC*) und IMW524 (●, *dcuABC ygjE*). Die Zucht erfolgte in angereichertem M9-Minimalmedium unter anaeroben Bedingungen mit L-Tartrat (50mM) plus Gluconat (50mM).

Der Carrier YgjE ist deshalb verantwortlich für die verringerte Succinataufnahme der *ygjE*-Mutante gegenüber dem Wildtyp bzw. der *dcu ygjE*-Mutante gegenüber der *dcu*-Mutante. DcuA, DcuB und DcuC scheinen für die langsame lineare Aufnahme verantwortlich zu sein. Die Aufnahme in der *dcuA dcuB dcuC ygjE*-Mutante erfolgte vermutlich durch den Citrat/Succinat-Antiporter CitT.

In genaueren Messungen wurden die Bedingungen bestimmt, die den Transport beeinflussen (Tab. 11). Dazu wurde eine Zellsuspension der *dcuA dcuB dcuC*-Mutante verwendet, um die Aktivität der anaeroben C₄-Dicarboxylatcarrier DcuA, DcuB und DcuC auszuschließen. Nach der anaeroben Zucht der *dcu*-Mutante unter Bedingungen, die gutes Wachstum (Zusatz von Gluconat) und die Induktion des Carriers zur Folge haben (Zusatz von L-Tartrat), wurde die Zellsuspension bei neutralem pH angesetzt, anaerobisiert und zur Energetisierung mit Glucose oder Glycerin plus DMSO bei 37°C inkubiert (Tab. 11. A). Nach der Energetisierung mit Glucose war die Aktivität der Succinataufnahme ähnlich wie ohne Energetisierung. Jedoch war die Aufnahmeaktivität ohne Energetisierung je nach Messung sehr variabel. Die Energetisierung mit Glycerin plus DMSO erbrachte die niedrigsten Aktivitäten. Die

Tab. 11. Optimierung der Transportbedingungen: Energetisierung der Zellen und pH-Optimierung. Zellsuspensionen der *dcuA dcuB dcuC*-Mutante (IMW520) wurden für 1 min mit 100 µM [¹⁴C]-Succinat inkubiert. In Experiment (A) wurden die Zellen mit Glucose (20 mM) für 5 min und mit Glycerin plus DMSO (jeweils 20 mM) für 10 min bei 37°C inkubiert. Dann erfolgte die Aufnahme von 100 µM ¹⁴C-Succinat. In Experiment (B) wurden Zellsuspensionen mit Puffer von pH 5 bis pH 8 hergestellt. Die Aufnahme von 100 µM ¹⁴C-Succinat erfolgte nach der 5 minütigen Energetisierung mit Glucose (20 mM).

A)

[¹⁴ C]-Succinataufnahme (U/g TG)		
Glucose	Glycerin + DMSO	Ohne Energetisierung
0,85	0,45	0,94

B)

[¹⁴ C]-Succinataufnahme (U/g TG)			
pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
0,27	0,54	0,99	1,00

Energetisierung mit Glucose scheint daher für stabile Messungen geeignet zu sein. Zur Suche nach dem optimalen pH-Wert für den Transport wurden Zellsuspensionen in Puffer von pH 5 bis pH 8 hergestellt (Tab. 11. B). Nach der Energetisierung mit Glucose wurde die Succinataufnahme bestimmt. Ein pH-Wert von pH 7 bis 8 war für die Succinataufnahme der *dcuA dcuB dcuC*-Mutante optimal. Für die weiteren Transportmessungen wurden die Zellsuspensionen in Puffer von pH 7 hergestellt und die Zellen wurden vor Messung mit Glucose (20 mM) für 5 min bei 37 °C energetisiert.

Tartrat- und Succinataufnahme in einer *ygjE*-positiven und -negativen Mutante

Zur Charakterisierung des Transporters YgjE wurden die *dcuA dcuB dcuC citT*-Mutante (IMW528) als Versuchsstamm und die *dcuA dcuB dcuC citT ygjE*-Mutante (IMW529) als negativer Referenzstamm verwendet. Der Stamm IMW528 besitzt von den bekannten anaeroben C₄-Dicarboxylatcarriern nur noch YgjE, der in dem negativen Vergleichsstamm IMW529 zusätzlich fehlt. Die meisten Antiporter sind in der Lage, neben dem Antiport auch die reine Aufnahme oder den Export des Substrats zu katalysieren. Bei der Charakterisierung des Transports durch YgjE wurde mit der Bestimmung der Aufnahmeaktivität begonnen. Die Aufnahmeaktivität von IMW528 in Abhängigkeit von der Konzentration von D,L-Tartrat zeigt eine Michaelis-Menten-Kinetik mit einer maximalen Aktivität V_{\max} von 110 U/g TG und einer Michaelis-Menten-Konstante K_m von 700 μM (Abb. 17. A). Für die Versuche wurde D,L-Tartrat verwendet, da radioaktives Tartrat nur als Gemisch dieser Stereoisomere erhältlich ist. Im Lineweaver-Burk-Plot ergibt sich eine fast lineare Beziehung zwischen $1/V$ und $1/S$, was das Vorliegen einer Michaelis-Menten-Kinetik bestätigt. Aus dem Lineweaver-Burk-Plot resultiert eine V_{\max} von 115 U/g TG und ein K_m von 1000 μM . Der relativ hohe K_m -Wert (700 μM bzw. 1000 μM) ist vermutlich teilweise dadurch begründet, dass in dem D,L-Tartratgemisch nur 50 % L-Tartrat als eigentliches Substrat vorliegt.

Falls YgjE ein L-Tartrat/Succinat-Antiporter ist, sollte YgjE auch in der Lage sein, die Aufnahme von Succinat zu katalysieren, d.h. in umgekehrter Transportrichtung zu arbeiten. Für die Aufnahme von Succinat durch den gleichen Stamm (Abb. 17. B) findet man eine

typische hyperbolische Michaelis-Menten-Kinetik mit einer maximalen Aktivität V_{\max} von 16 U/g TG und einer Michaelis-Menten-Konstanten K_m von 400 μM . Aus dem Lineweaver-Burk-Plot resultiert eine V_{\max} von 17 U/g Trockengewicht und eine K_m von 380 μM .

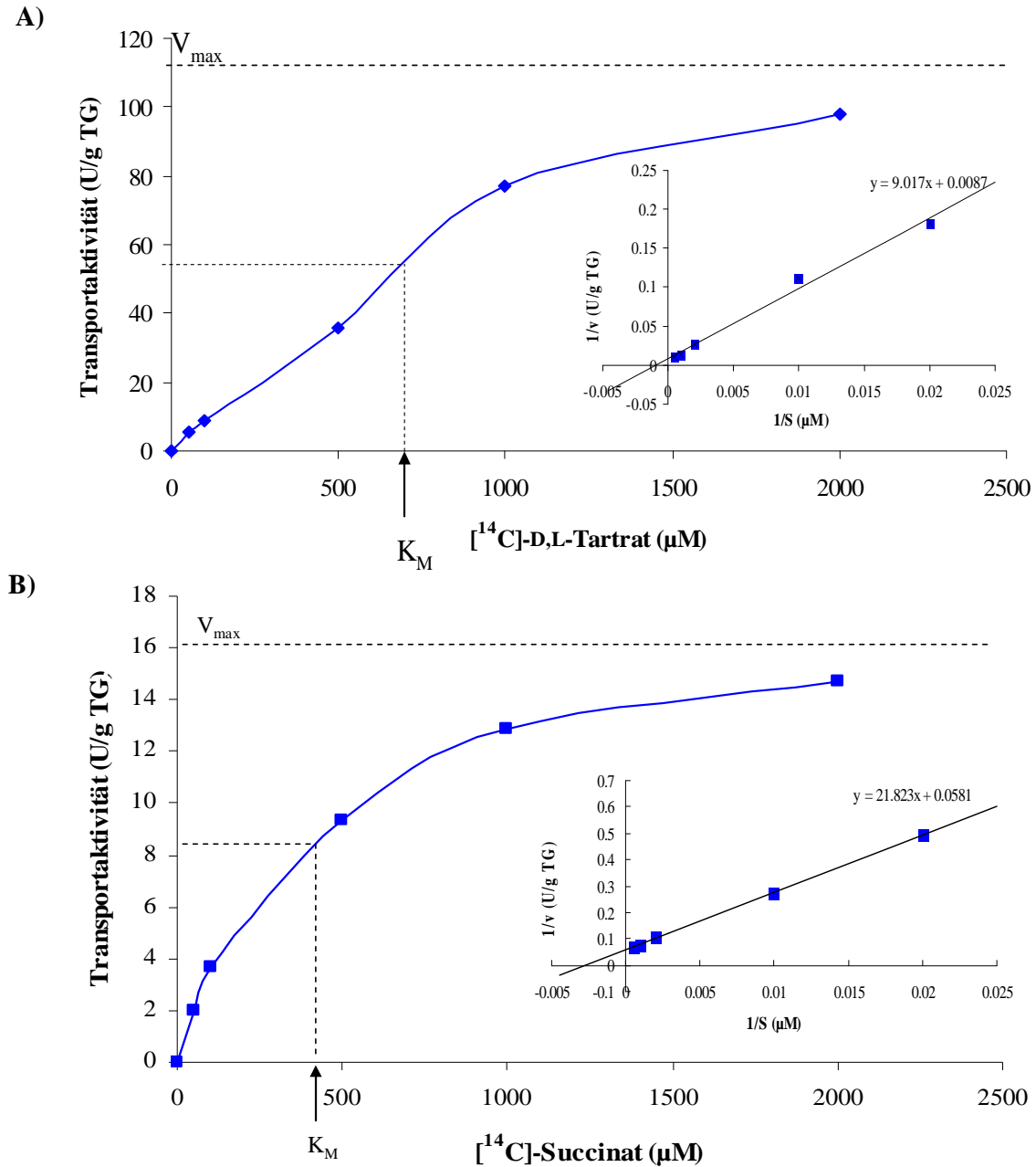


Abb. 17. Aufnahme von ^{14}C -D,L-Tartrat (A) und ^{14}C -Succinat (B) in Abhängigkeit von der Substratkonzentration durch Zellsuspension von *E. coli* IMW528 (*dcuA dcuB dcuC citT*). Die Aufnahmegeschwindigkeit wurde nach einer Reaktionszeit von 20 Sekunden gemessen. Der Lineweaver-Burk-Plot ist innerhalb der Michaelis-Menten-Kurve dargestellt.

Die Akkumulation von [^{14}C]-D,L-Tartrat (100 μM) war in der *ygjE*-Mutante IMW529 nicht schwächer als im *ygjE*⁺ Stamm IMW528 (Abb. 18. A). Bei beiden Stämme war die Anfangsgeschwindigkeit der Aufnahme (IMW528, 12,4 U/g TG; IMW529, 11,2 U/g TG) und die erreichte Aufnahmemenge vergleichbar. Nach 1 - 2 min erreichte die aufgenommene Menge maximale Werte. Die maximale D,L-Tartrat Menge von 10 μmol /g TG von IMW528 (nach 5 min) entspricht einer Konzentration von 4,0 mM D,L-Tartrat in der Zelle, da 1 mg TG zu 2,51 μl cytoplasmischem Volumen entspricht (Engel *et al.*, 1992).

Bei der Aufnahme von [^{14}C]-Succinat (100 μM) waren dagegen deutliche Unterschiede zwischen bei den Stämmen erkennbar (Abb 18. B). Die Transportaktivitäten waren insgesamt deutlich niedriger, in der *ygjE*-Mutante fehlte sie fast vollständig. Die Anfangsgeschwindigkeit der Aufnahme im *ygjE*⁺ Stamm IMW528 betrug 2,0 U/g TG, aber in der *ygjE*-Mutante IMW529 nur 0,2 U/g TG. Der maximale Gehalt von Succinat erreichte im *ygjE*⁺ Stamm 640 μM , in der *ygjE*-Mutante nur 120 μM .

Der Ausfall von YgjE verursachte bei der Succinataufnahme einen deutlichen Unterschied, aber nicht bei der Aufnahme von D,L-Tartrat. Es wird daher die Existenz eines weiteren Carriers vermutet, der die Aufnahme von Tartrat, aber jedoch nicht von Succinat katalysieren kann. Dieser sollte kein Antiporter, sondern ein Aufnahmecarrier sein, da die *ygjE*-Mutante unter anaeroben Bedingungen auf L-Tartrat und Glycerin nicht wachsen konnte (Abb. 14). Die niedrigere Succinataufnahme im Vergleich zur D,L-Tartrataufnahme liegt vermutlich daran, dass die Aufnahme von Succinat unter anaeroben Bedingungen eine unphysiologische Transportrichtung ist.

Gegentausch von Tartrat_{ex}/Succinat_{in} bzw. Succinat_{ex}/Tartrat_{in}

Um den Gegentausch von L-Tartrat (extern) gegen Succinat (innen) zu messen, wurde die Zellsuspension der *dcuA dcuB dcuC citT*-Mutante IMW528 mit 100 μM [^{14}C]-Succinat für 10 min inkubiert. Dadurch wurde die Zelle mit diesem Substrat „vorgeladen“, bis ein konstanter intrazellulärer Gehalt an [^{14}C]-Succinat erreicht wurde (Abb. 19). Bei dem Vorladen mit

100 μM [^{14}C]-Succinat wurde ein intrazellulärer Gehalt von 534 μM erzielt. Durch Zugabe von 2 mM unmarkiertem Substrat (L-Tartrat, Succinat, Fumarat, Citrat oder Butyrat) in das Medium wurde der Gegentausch gestartet. Der Gegentausch wurde durch die Abnahme von intrazellulärem [^{14}C]-Succinat bestimmt. Durch Zugabe von L-Tartrat wurde Succinat am effektivsten exportiert. Die Gegentauschaktivität von L-Tartrat gegen Succinat betrug 2,64 U/g TG (Tab. 12), gefolgt von Succinat gegen Succinat (1,95 U/g TG) und Fumarat gegen

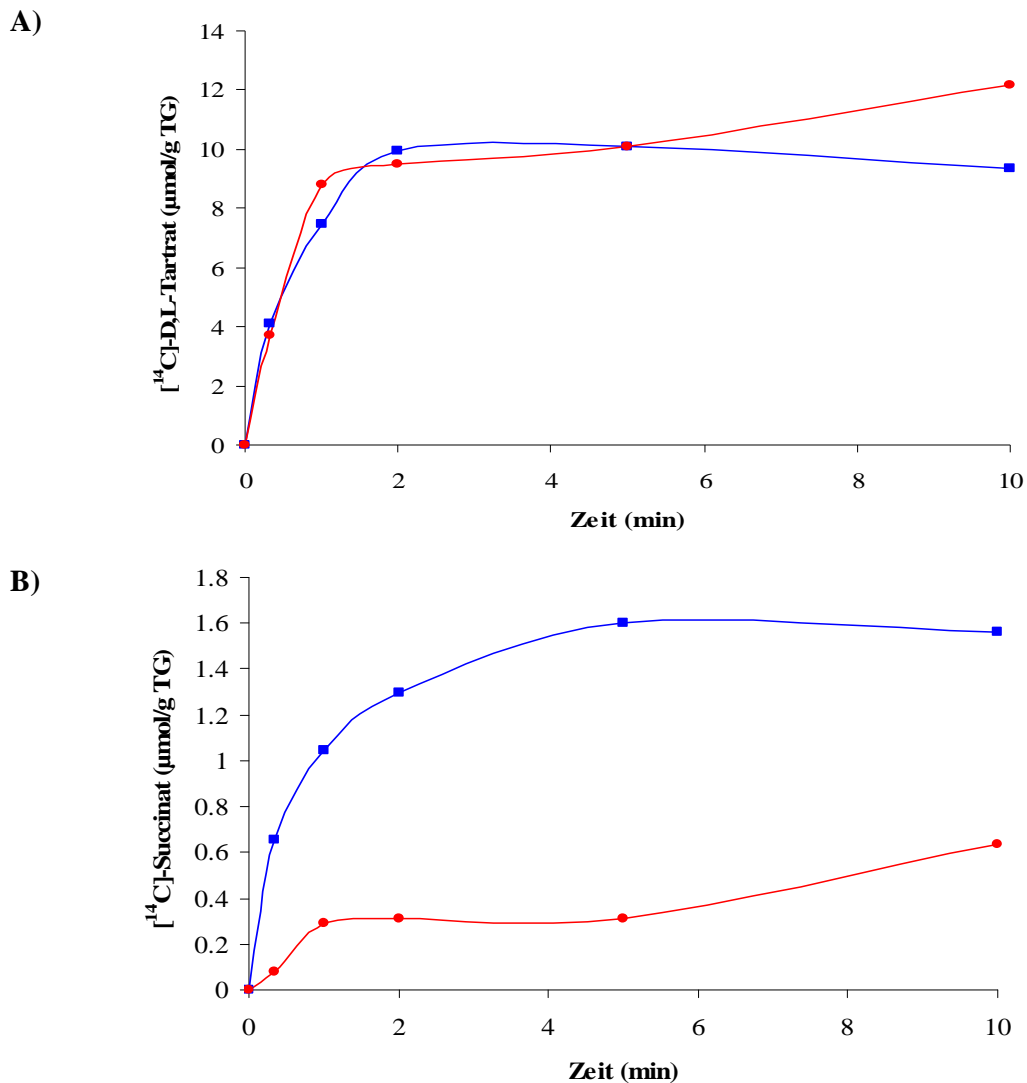


Abb. 18. Kinetik der Aufnahme von 100 μM ^{14}C -D,L-Tartrat (A) und ^{14}C -Succinat (B) durch Zellsuspension von *E. coli* IMW528 (■, *dcuA dcuB dcuC citT*) und IMW529 (●, *dcuA dcuB dcuC citT ygjE*).

Succinat (1,53 U/g TG). Dagegen war die Abgabe von internem [^{14}C]-Succinat in der *dcuA dcuB dcuC citT ygjE*-Mutante (IMW529) in Gegentausch gegen L-Tartrat, Succinat und Fumarat sehr gering (Abb. 21. B; Tab. 12). Der Vergleich der Gegentauschaktivität zwischen den Stämmen IMW528 und IMW529 bestätigt, dass YgjE ein L-Tartrat/Succinat-Antiporter ist.

In einem entsprechenden Experiment wurde der Gegentausch von Succinat (extern) gegen Tartrat (innen) gemessen (Abb. 20). Dafür wurde eine Zellsuspension von *E. coli* IMW528 (*dcuA dcuB dcuC citT*) mit [^{14}C]-D,L-Tartrat für 10 min vorgeladen. Nach der Zugabe von unmarkiertem externen Substrat wurde die Abgabe von [^{14}C]-D,L-Tartrat gemessen. D,L-Tartrat wurde in der Zelle bis zu einer Konzentration von 3,3 mM angereichert. Deshalb wurden externe unmarkierte Substrate in Konzentration von 20 mM zugesetzt. Dies hatte keinen signifikanten Gegentausch zur Folge: [^{14}C]-D,L-Tartrat wurde durch die Zugabe von Succinat, L-Tartrat und Fumarat nicht ins Medium abgegeben. In ähnlicher Weise verursachten Citrat und Butyrat nur eine sehr geringe Freisetzung von [^{14}C]-D,L-Tartrat. Den Succinat_{ex}/Tartrat_{in}-Gegentausch in der „unphysiologischen“ Richtung katalysiert YgjE vermutlich nicht.

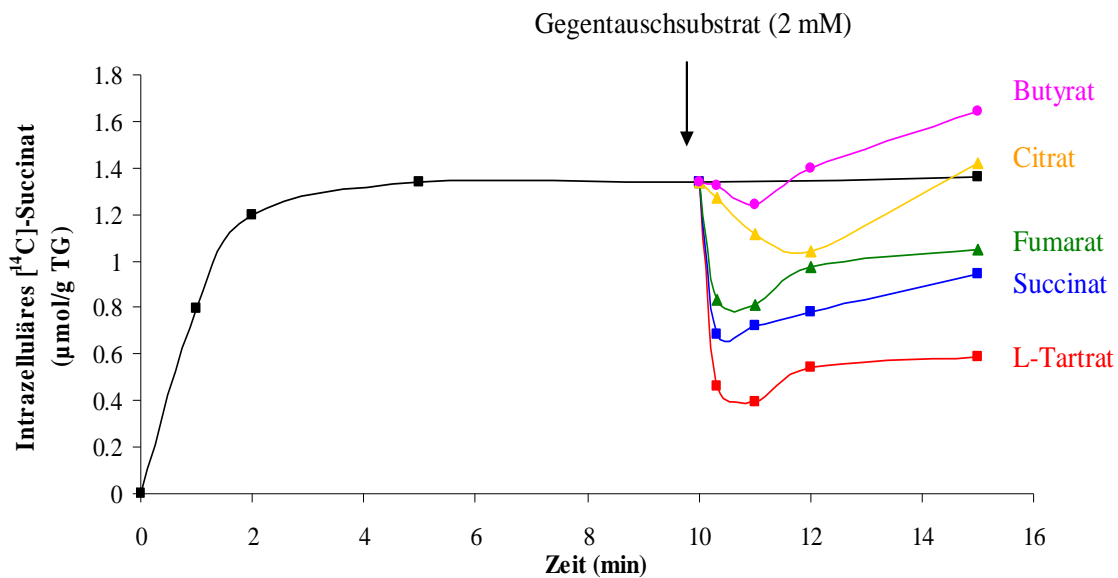


Abb. 19. Gegentausch des vorgeladenen internen [^{14}C]-Succinats gegen unmarkiertes externes Substrat. Nachdem die Zellsuspension von *E. coli* IMW528 (*dcuA dcuB dcuC citT*) mit $100\mu\text{M}$ [^{14}C]-Succinat für 10 min vorgeladen wurde, wurde als unmarkiertes Substrat (2 mM) L-Tartrat (■), Succinat (■), Fumarat (▲), Citrat (▲) und Butyrat (●) zugegeben.

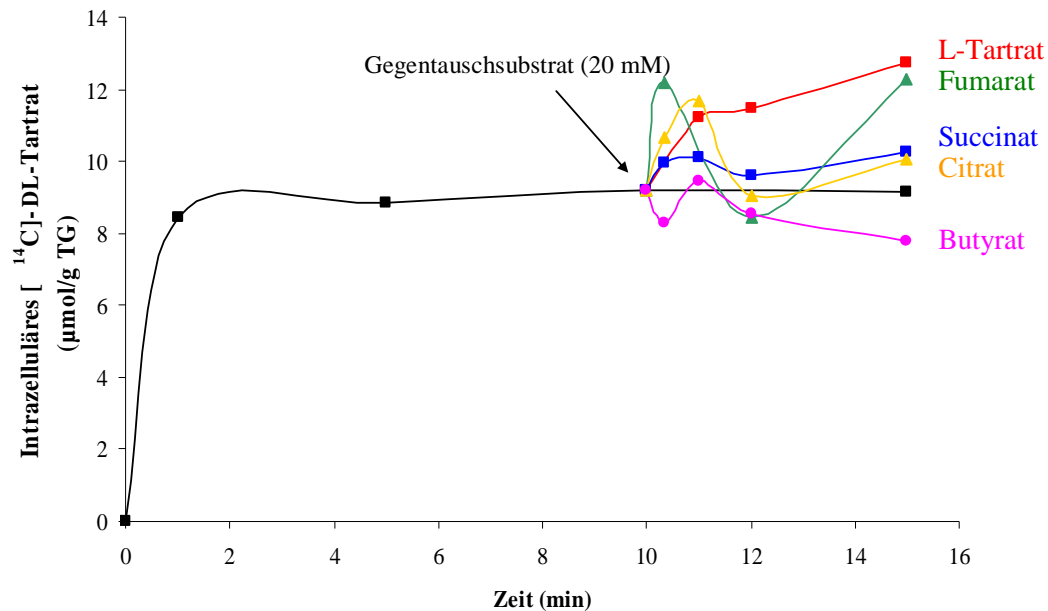


Abb. 20. Gegentauch des vorgeladenen internen [^{14}C]-D,L-Tartrats gegen unmarkiertes externes Substrat. Nachdem die Zellsuspension von *E. coli* IMW528 (*dcuA dcuB dcuC citT*) mit $100\mu\text{M}$ [^{14}C]-D,L-Tartrat für 10 min vorgeladen wurde, wurde als unmarkiertes Substrat (20 mM) L-Tartrat (■), Succinat (■), Fumarat (▲), Citrat (▲) und Butyrat (●) zugegeben.

Durch Messung des Gegentauchs von internem [^{14}C]-Succinat gegen externes unmarkiertes Substrat wurde für IMW520 (*dcuA dcuB dcuC*) und IMW524 (*dcuA dcuB dcuC ygjE*) eine Citrat/Succinat-Antiport-Aktivität von jeweils 1,3 U/g TG bestimmt (Abb. 21. A; Tab. 12). Diese Aktivität beruht vermutlich auf dem Citrat/Succinat-Antiporter CitT, der in der anaeroben L-Tartratzucht gebildet wurde. Sie fehlt in der *citT* Mutante, IMW528 (*dcuABC citT*) und IMW529 (*dcuABC citT ygjE*) (Abb. 19; Abb. 21. B; Tab.12).

Die Befunde in diesem Gegentauchexperiment weisen darauf hin, dass YgjE den Efflux des internen Succinats an die Aufnahme des externen L-Tartrats koppelt. Ebenso scheint der Gegentauch von externem Succinat gegen internes [^{14}C]-Succinat auch durch YgjE katalysiert zu werden. Dennoch war die Aufnahme von externem Succinat gegen internes Tartrat nicht möglich.

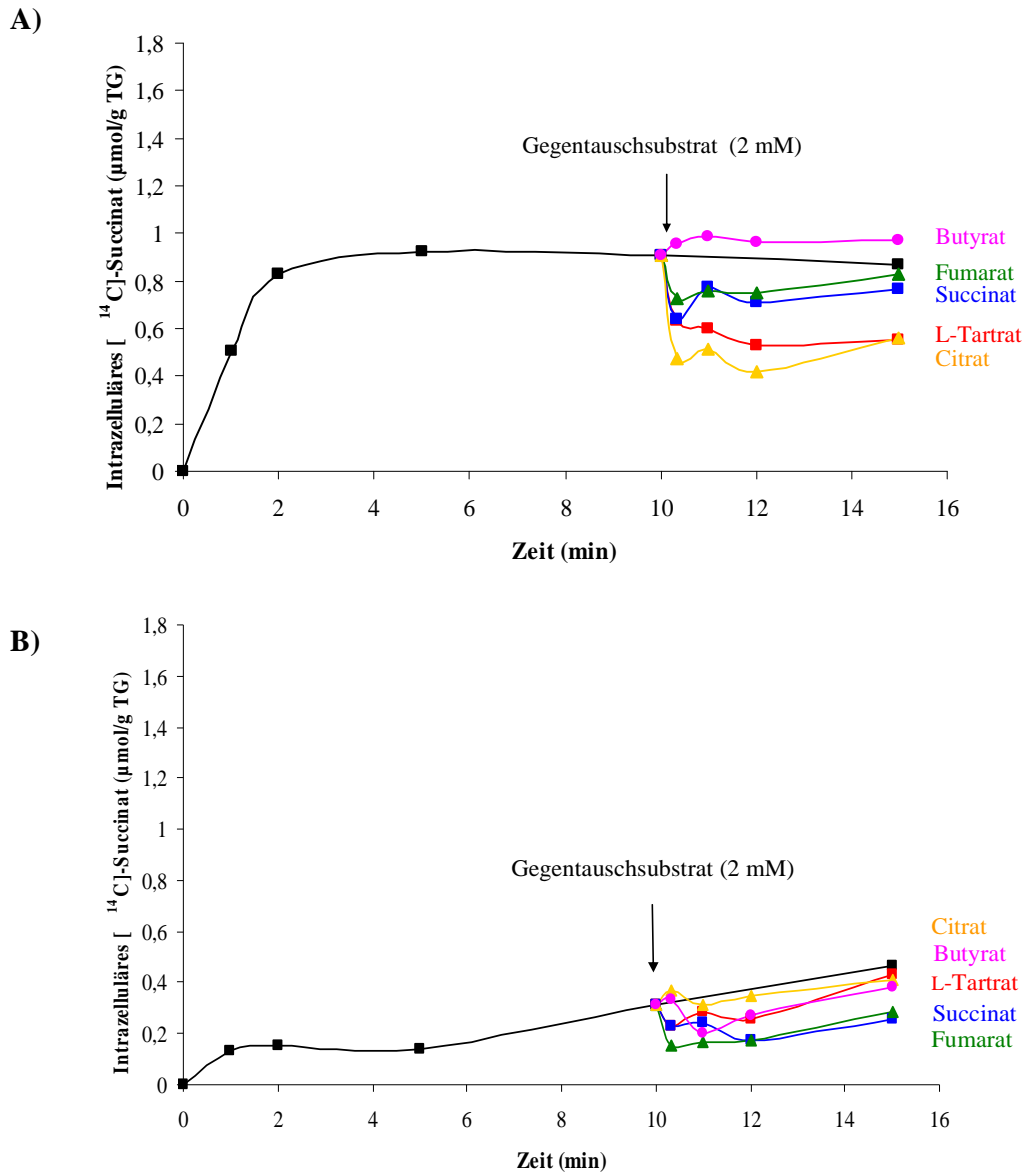


Abb. 21. Gegentauch des vorgeladenen internen [^{14}C]-Succinats gegen unmarkiertes externes Substrat. Nachdem die Zellsuspension von *E. coli* IMW524 (*dcuA dcuB dcuC yjE*) (A) und IMW529 (*dcuA dcuB dcuC citT yjE*) (B) mit $100\mu\text{M}$ ^{14}C -Succinat für 10 min vorgeladen wurde, wurde als unmarkiertes Substrat (2 mM) L-Tartrat (■), Succinat (■), Fumarat (▲), Citrat (▲) und Butyrat (●) zugegeben.

Tab. 12. Gegentauschaktivität Succinat_{in}/Carboxylat_{ex} in verschiedenen Carriermutanten. Die Zellsuspensionen von *E. coli* IMW520 (*dcuABC*), IMW524 (*dcuABC ygjE*), IMW528 (*dcuABC citT*) und IMW529 (*dcuABC citT ygjE*) wurden mit 100µM [¹⁴C]-Succinat für 10 min vorgeladen. Gegentauch wurde durch Zusatz von unmarkierten Substraten (2 mM) (L-Tartrat, Succinat, Fumarat, Citrat oder Butyrat) gestartet. Die Aufnahmeaktivität für Succinat und die Gegentauchaktivität (Effluxaktivität für Succinat) wurden nach 20 Sekunden bestimmt. Die Succinatkonzentration in der Zelle ist auf die [¹⁴C]-Succinatmenge bezogen, die nach der 10 minütigen Inkubation angereichert ist. Die Werte stammen aus Abb. 19 (IMW528) und 21 (IMW524 und IMW529).

	Substrat für Gegentauch	IMW520 <i>dcuABC</i>	IMW524 <i>dcuABC ygjE</i>	IMW528 <i>dcuABC citT</i>	IMW529 <i>dcuABC citT ygjE</i>
Aufnahmeaktivität					
für [¹⁴ C]-Succinat (U/g TG)		1,98	0,8	1,96	0,24
Succinat in der Zelle					
(µM)		570	363	534	124
Export von internem [¹⁴ C]-Succinat (U/g TG)	L-Tartrat	2,61	0,84	2,64	0,24
	Succinat	2,43	0,81	1,95	0,24
	Fumarat	1,38	0,57	1,53	0,48
	Citrat	1,26	1,32	0,21	-0,18
	Butyrat	-0,03	-0,15	0,06	-0,09

Substratspezifität von YgjE

Um die Substratspezifität von YgjE zu untersuchen, wurde die Aufnahme von [¹⁴C]-Succinat in Anwesenheit von unmarkierten Kompetitorsubstraten gemessen, die in einem zehnfachen Überschuss zugesetzt wurden (Abb. 22). Die Aufnahme des Succinats in der *dcuA dcuB dcuC citT*-Mutante IMW528 wurde nur durch L-Tartrat effektiv gehemmt, andere C₄-Dicarboxylate wie Succinat, Fumarat und Malat hemmten nur geringfügig. D-, meso-Tartrat, Butyrat und Citrat zeigten ebenfalls fast keinen Einfluss auf die Succinataufnahme. YgjE besitzt vermutlich eine hohe Stereospezifität, wodurch L-Tartrat von D- und meso-Tartrat unterschieden wird. L-Tartrat hemmte die Succinataufnahme zu 85 %, Succinat nur zu 40%. Dieses Ergebnis zeigt, dass der Carrier YgjE bevorzugt L-Tartrat gegenüber Succinat importiert. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass Succinat eigentlich das Substrat für den

Export darstellt. Dies bedeutet, dass YgjE vermutlich eine Orientierungsspezifität für die Aktivität des L-Tartrat_{ex}/Succinat_{in}-Antiports besitzt.

In der *ygjE*-Mutante IMW529 (*dcuA dcuB dcuC citT ygjE*) war die Hemmung der Succinataufnahme durch L-Tartrat nicht signifikant, und die Effekte der anderen untersuchten Kompetitorsubstrate zeigten vergleichbare Ergebnisse wie bei IMW528 (*dcuA dcuB dcuC citT*). Dies bestätigt die Tatsache, dass die durch L-Tartrat gehemmte Succinataufnahme von IMW528 durch YgjE katalysiert wird.

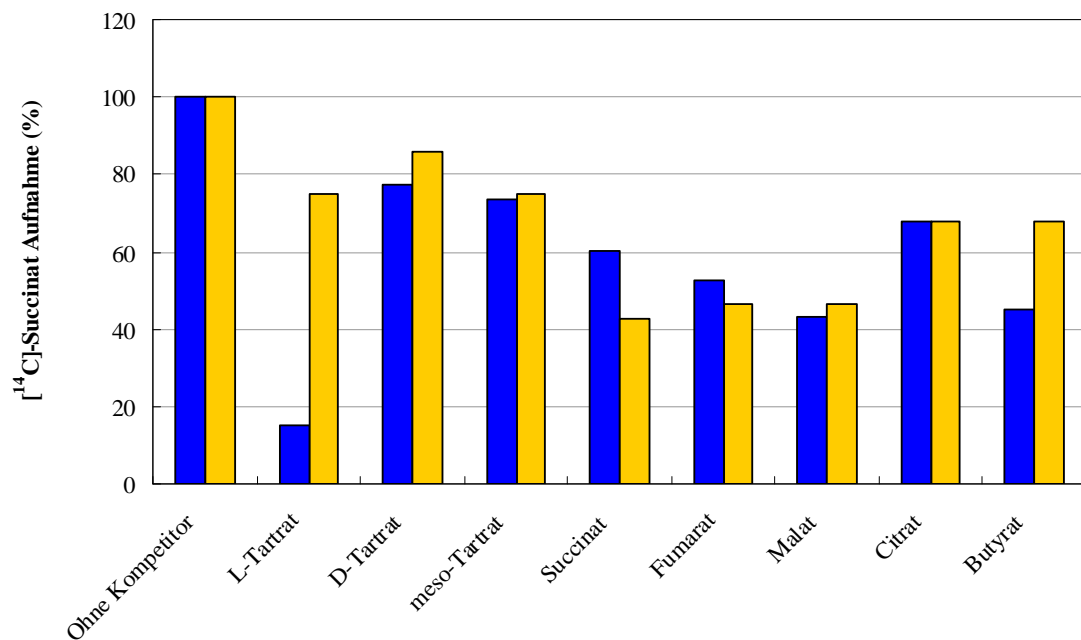


Abb. 22. Einfluss von Kompetitorsubstraten auf die Aufnahme von $[^{14}\text{C}]$ -Succinat. Die Aufnahme von $50\ \mu\text{M}$ $[^{14}\text{C}]$ -Succinat wurde in Anwesenheit von $500\ \mu\text{M}$ unmarkierten Kompetitorsubstraten in IMW528 (■, *dcuABC citT*) und IMW529 (■, *dcuABC citT ygjE*) für 1 min gemessen. Die Aufnahmeaktivitäten ohne Kompetitor für IMW528 ($0,53\ \text{U/g TG}$) und IMW529 ($0,28\ \text{U/g TG}$) wurden jeweils 100% gesetzt.

Vergleichbare Kompetitionsmessungen wurden für die Aufnahme von $[^{14}\text{C}]$ -D,L-Tartrat durchgeführt (Abb. 23). Alle untersuchten unmarkierten Kompetitorsubstrate, die in zehnfachem bzw. fünfzigfachem Überschuss zugesetzt wurden, konnten die D,L-Tartrataufnahme von der *dcuABC citT* Mutante IMW528 nicht hemmen. Es ist unklar, warum die $[^{14}\text{C}]$ -D,L-Tartrataufnahme durch Überschuss von L-Tartrat nicht gehemmt wurde.

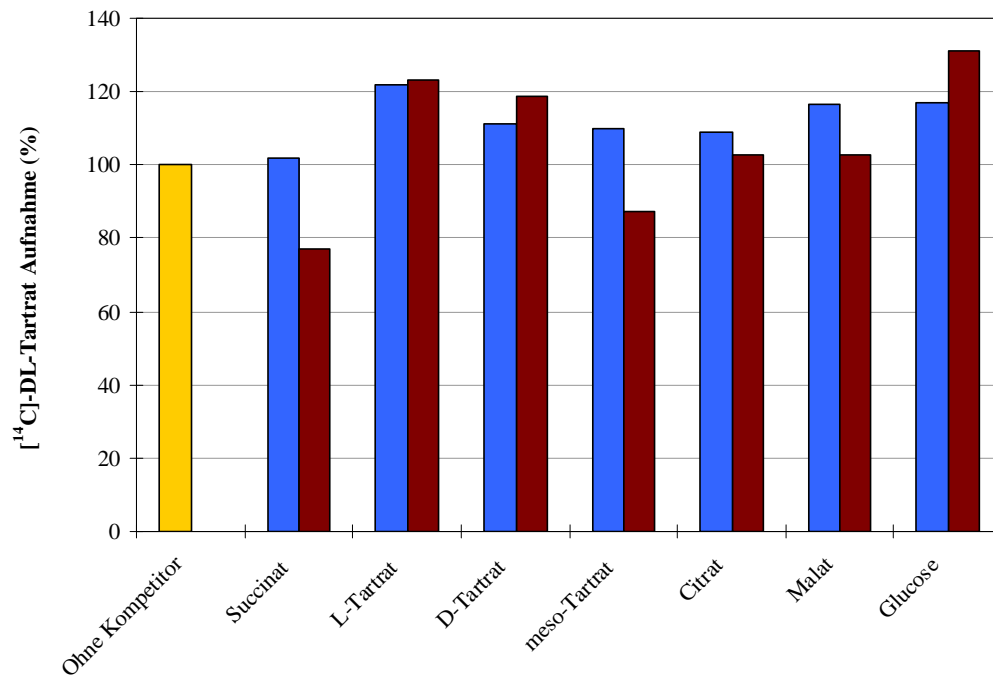


Abb. 23. Einfluss von Kompetitorsubstraten auf die Aufnahme von $[^{14}\text{C}]$ -D,L-Tartrat. Die Aufnahme von $20\ \mu\text{M}$ $[^{14}\text{C}]$ -D,L-Tartrat wurde in Anwesenheit von $200\ \mu\text{M}$ (■, zehnfacher Überschuss) und $1\ \text{mM}$ (■, fünfzigfacher Überschuss) unmarkierten Kompetitorsubstraten in IMW528 (*dcuABC citT*) für 1 min gemessen. Die Aufnahmeaktivitäten ohne Kompetitor (■, 1,5 U/g TG) wurde 100% gesetzt.

Membranpotential und Protonengradienten in Funktion von YgjE

Das Membranpotential $\Delta\psi$ setzt sich aus der elektrischen Komponente $\Delta\psi$ und dem Protonengradienten ΔpH zusammen. Die Zellsuspensionen wurden für die oben beschriebenen Experimente immer durch Inkubation mit Glucose energetisiert, um ein Membranpotential durch den Glucosestoffwechsel aufbauen zu lassen. Hier wurde die Abhängigkeit des Transporters YgjE vom Membranpotential und vom Protonengradienten untersucht. Dazu wurde die Transportaktivität der Zellsuspension ohne und mit Energetisierung der Zellmembran und nach Behandlung mit CCCP untersucht. CCCP ist ein Protonophor, das Protonengradienten über der Membran abbaut (Nicholls & Ferguson, 2002). In den Experimenten wurde die Aufnahme von $[^{14}\text{C}]$ -Succinat und $[^{14}\text{C}]$ -D,L-Tartrat durch *E. coli* IMW528 (*dcuA dcuB dcuC citT*) und IMW529 (*dcuA dcuB dcuC citT ygjE*) gemessen

(Abb. 24). Bei dem Stamm IMW528, der YgjE enthält, zeigte die Energetisierung keine positive Wirkung auf die [^{14}C]-Succinataufnahme (Abb. 24. A). Insgesamt war auch die Hemmung der [^{14}C]-Succinataufnahme im Stamm IMW528 durch den Entkoppler CCCP nicht signifikant. In Stamm IMW529, in dem YgjE fehlt, war die Succinataufnahme erst nach der Energetisierung möglich und dieser Transport fiel nach Entkopplerzusatz völlig aus. Die Succinataufnahme durch den unbekanntes Carrier in IMW529 wurde durch die CCCP-Behandlung vollständig gehemmt.

Bei der Aufnahme von [^{14}C]-D,L-Tartrat durch IMW528 zeigte die Energetisierung wie bei der Succinataufnahme keine Wirkung (Abb. 24. B). Ein unbekannter Carrier in *E. coli* IMW529, der offensichtlich YgjE ersetzt, konnte unabhängig von Energetisierung D,L-Tartrat aufnehmen. Die D,L-Tartrataufnahme im IMW528 und IMW529 war nach der Energetisierung durch die Behandlung von CCCP komplett gehemmt.

Insgesamt weisen alle Transportmessungen darauf hin, dass YgjE in der *dctA dcuA dcuB dcuC citT*-Mutante die Aufnahme von Succinat katalysiert. Diese Succinataufnahme von YgjE wurde durch L-Tartrat kompetitiv gehemmt, was ein Hinweis ist, dass L-Tartrat bevorzugt gegenüber Succinat aufgenommen wird. Außerdem ist diese Aufnahme von Energetisierung und dem Protonenpotential unabhängig. Der Stamm mit funktionellem YgjE katalysierte auch den Gegentausch des externen L-Tartrats gegen internes Succinat, aber der umgekehrte Gegentausch, externes Succinat gegen internes D,L-Tartrat, war nicht möglich. Die Aufnahme von D,L-Tartrat von der *ygjE*⁺-Mutante war wesentlich effektiver als die von Succinat, die Aufnahmeaktivität war jedoch bei der *ygjE*-Mutante vergleichbar dem YgjE-haltigen Stamm. Diese Aufnahme war nicht durch L-Tartrat kompetitiv hemmbar. Außerdem wurde diese Aufnahmeaktivität durch Zugabe von Entkoppler komplett gehemmt, wenn die *ygjE*⁺-Mutante und *ygjE*⁻-Mutante vorher energetisiert wurden. Deshalb wird vermutet, dass durch Energetisierung ein weiterer Tartratcarrier aktiviert wird. Dieser weitere Carrier sollte ein Membranpotential ($\Delta\mu$)-abhängiger Aufnahme-carrier sein.

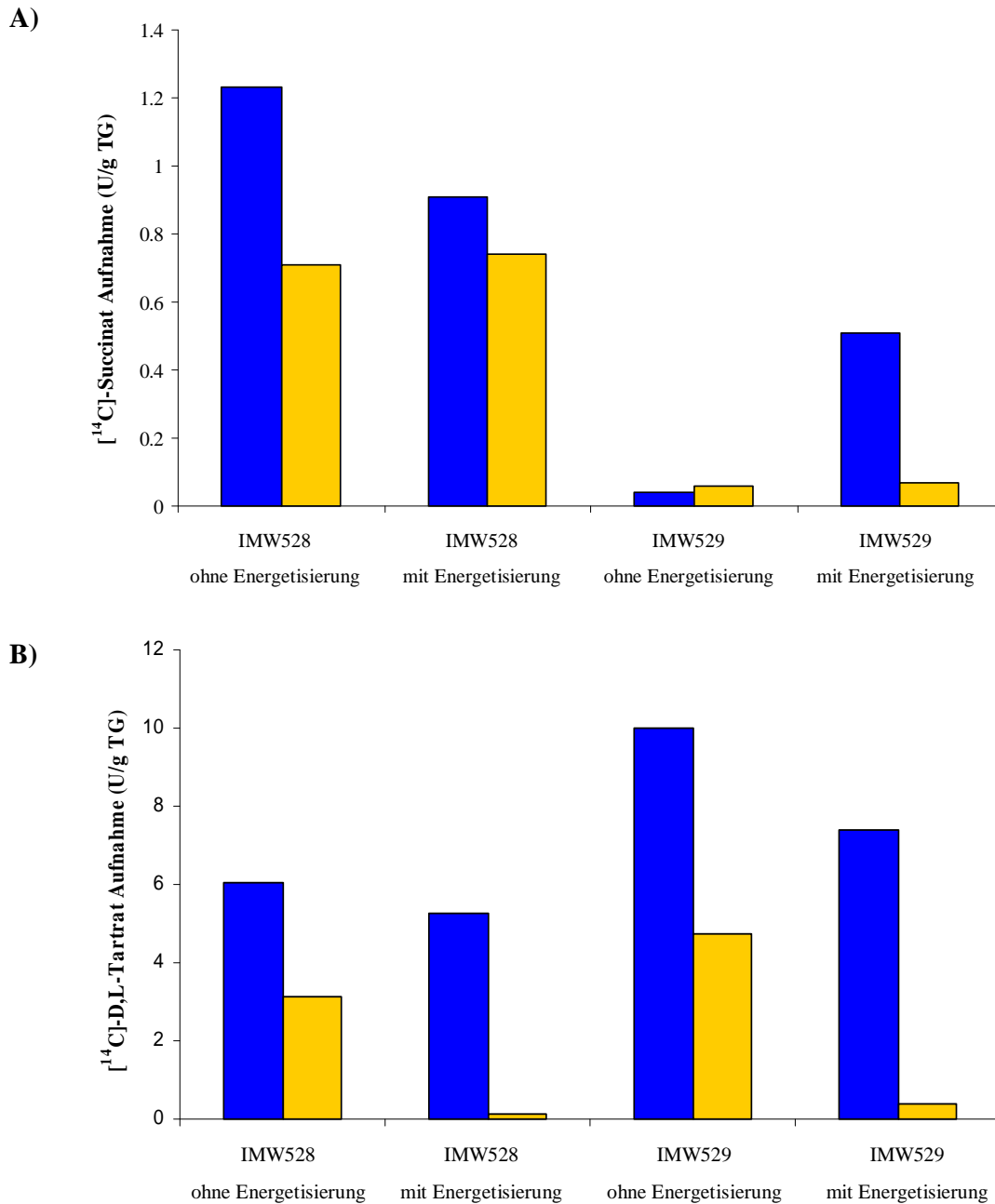


Abb. 24. Einfluss der Energetisierung der Zellmembranen und CCCP-Behandlung bei Transport von YgjE. Die Aufnahme von $100\ \mu\text{M}$ $[^{14}\text{C}]$ -Succinat (A) und $[^{14}\text{C}]$ -D,L-Tartrat (B) wurde in Zellsuspension von IMW528 (*dcuA dcuB dcuC citT*) und IMW529 (*dcuA dcuB dcuC citT ygjE*) für 1 min gemessen. Die Energetisierung der Zellmembranen erfolgte durch Inkubation mit 20 mM Glucose für 5 min. Die Zellsuspension wurde mit 20 μM CCCP für 2 min behandelt (■, ohne CCCP ; ■, mit CCCP).

4.4 Die potentiellen aeroben Tartratcarrier YfaV und YeaV

Der aerobe Abbauweg von Tartrat ist unbekannt. Durch Datenbank-Analyse wurde aber eine potentielle Tartratdehydrogenase gefunden, die an diesem Stoffwechsel beteiligt sein könnte. Das Enzym wird vom Gen *yeaU* kodiert (Kap. 4.1). Sie stellt möglicherweise ein Schlüsselenzym des aeroben Tartratstoffwechsels dar. Es ist daher denkbar, dass weitere Enzyme für diesen Stoffwechselweg in der Nachbarschaft des *yeaU* Gens im *E. coli*-Genom kodiert werden. Ein Gen, *yeaV*, das vermutlich für einen sekundären Carrier kodiert, liegt unmittelbar vor dem *yeaU* Gen (Tab. 4; Abb. 7). Es ist daher möglich, dass *yeaV* für einen aeroben Tartratcarrier kodiert. Die Transport-Datenbank (Paulsen, 1998; Saier, 1998) schlägt für dieses Protein die Funktion eines Carnitin-Transporters vor, der zur BCCT-Familie (Betaine/Carnitine/Choline Transporter) gehört. Die Carrier dieser Familie katalysieren allgemein den Transport von Substraten mit quaternärer Ammoniumgruppe. Ein weiterer Kandidat für einen aeroben Tartratcarrier ist YfaV (Tab. 4; Abb. 8). YfaV ist ein Transporter der ACS-Familie (Anion:Cation Symporter), die Transporter dieser Familie katalysieren den Symport von anorganischen oder organischen Anionen mit Kationen. Die organischen Anionen, die von Carriern der ACS-Familie transportiert werden, sind Tartrat, Glukarat, Hexuronat, Phthalat und Allantoat. Außerdem weist YfaV eine signifikante Homologie zu dem Tartratcarrier TtuB von *Agrobacterium vitis* auf.

Um YeaV und YfaV als potentielle aerobe Tartratcarrier zu identifizieren, wurden hier die Gene *yeaV* und *yfaV* durch Expressionsstudien mit Reporterfusionen untersucht und die Genomstruktur in der Umgebung dieser Gene bioinformatisch analysiert.

4.4.1 Hypothetische Organisation des *yeaTUVWX* und des *yfaXWVU* -Genclusters

Die DNA des Promotorbereichs ist weniger stabil als die DNA des Nicht-Promotorbereichs, diese Eigenschaft beruht auf seinem niedrigen G+C-Gehalt und niedrigen „stacking Energy“ (Kap. 4.2.1). Mit dem Genom Browser Pro V.3.02 der PRODORIC (Prokaryotic Database of Gene Regulation, Münch *et al.*, 2003) kann man eine DNA-Struktur auf den

G+C-Gehalt und die „stacking energy“ ermitteln. Hier wurden die Genomstrukturen des *yfaXWVU* und des *yeaTUVWX*-Genclusters mit diesem Browser analysiert und die möglichen Promotoren bestimmt (Abb. 25).

Die Gene *yeaST* liegen in entgegengesetzter Orientierung zu den Genen *yeaUVWX* auf dem Gegenstrang (Abb. 7). Die möglichen Promotorregionen befinden sich zwischen den *yeaS* und *yeaT* Genen sowie vor dem Gen *yeaT* (Abb. 25. A). Das zeigt, dass das Gen *yeaT*, das für einen Regulator YeaT kodiert, unabhängig von dem Gen *yeaS*, das für einen Transporter der LysE (L-Lysine Exporter)-Superfamilie kodiert, transkribiert werden kann. Aber der G+C-Gehalt und die „stacking energy“ in dem intergenischen Bereich zwischen den Genen *yeaST* sind nur geringfügig erniedrigt, daher kann man die Möglichkeit nicht ausschließen, dass beide Gene ein Operon bilden. In dem Bereich der *yeaUVWX*-Gene sind zwei potentielle Promotorregionen zu finden, eine liegt vor dem Gen *yeaU*, die andere zwischen den Genen *yeaU* und *yeaV*. Dies lässt vermuten, dass das Transportergen *yeaV* und das Tartratdehydrogenasegen *yeaU* nicht gemeinsam transkribiert werden. Es ist aber auch möglich, dass mehr als ein Promotor für die Transkription der *yeaVWX*-Gene zuständig ist.

Die Gene *yfaXWVU* liegen im Genom in komplementärer Richtung (Abb. 8). Die mögliche Promotorregionen in diesem Bereich liegen vor dem Gen *yfaW* und dem Gen *yfaX* (Abb. 25. B). Das zeigt, dass das Regulatorgen *yfaX* getrennt von den Strukturgenen *yfaWVU* transkribiert wird. Das Transportergen *yfaV* bildet mit den Genen *yfaU* und *yfaW* ein Operon, und die Transkription von diesem hypothetischen *yfaWVU*-Operon wird von dem Promotor vor dem Gen *yfaW* reguliert.

4.4.2 Expression des *yeaU* Gens

Aus bioinformatische Analysen wurden die *yeaTUVWX*-Gene als Gencluster des aeroben Tartratstoffwechsels vorgeschlagen (Kap. 4.1). Das Gen *yeaU* kodiert für eine potentielle Tartratdehydrogenase, *yeaV* für einen potentiellen Tartrattransporter und *yeaT* für einen potentiellen Tartratregulator. Um diese Annahme zu bestätigen, wurde eine *lacZ*-

Reportergenfusion mit dem Promotorbereich des *yeaU*-Gens hergestellt. Die Expressionsbedingungen für diese *yeaU*-*lacZ*-Fusion wurden untersucht. Zunächst wurde die Expression der *yeaU*-*lacZ*-Fusion, die auf dem Fusionsplasmid pMW323 vorliegt, unter

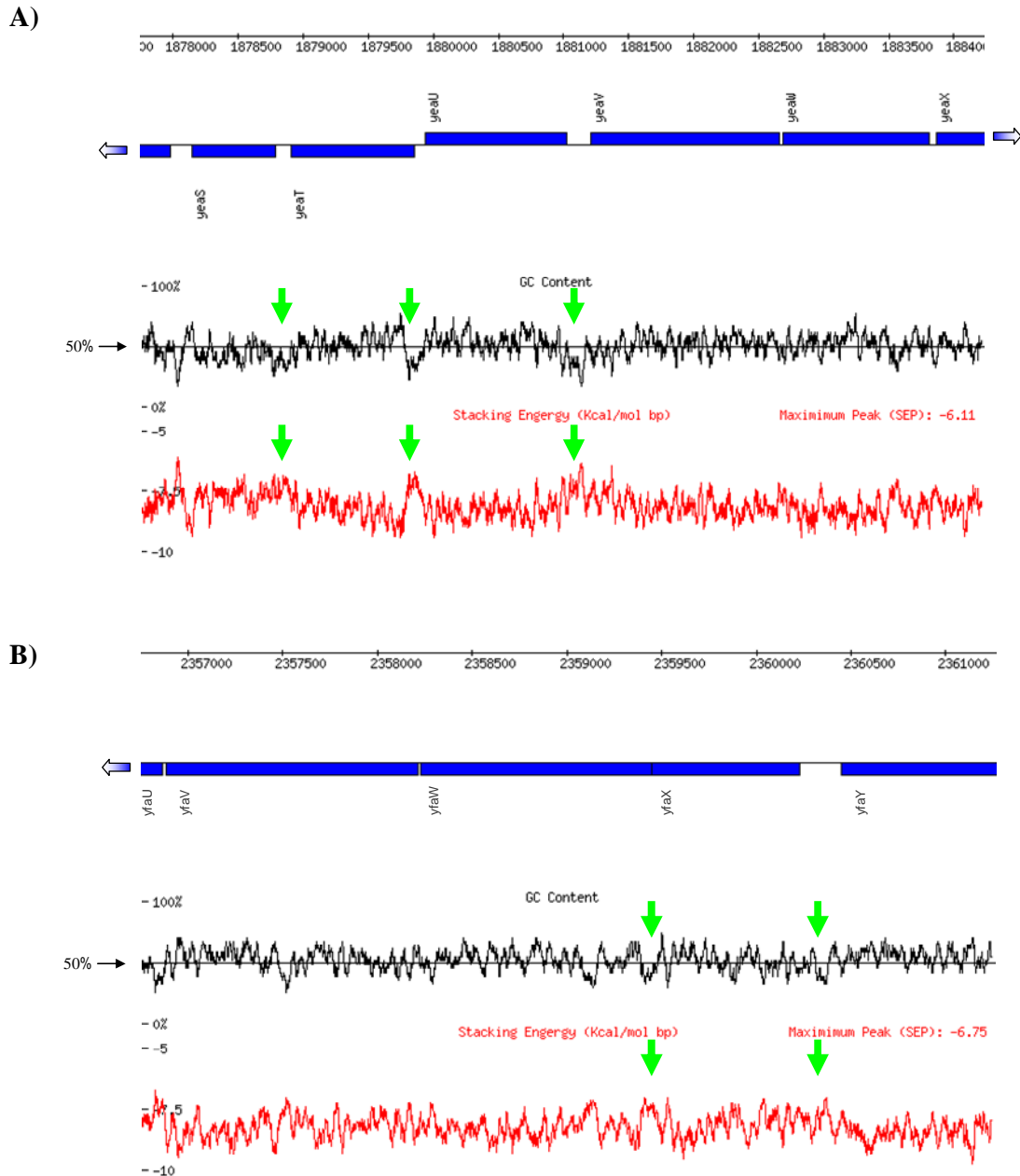


Abb. 25. Vorhersage von Promotorbereichen in der Umgebung der *yeaSTUVWX* (A) und *yfaUVWX* (B) von *E. coli*. In Genome Browser Pro V.2.02 von PRODORIC wurde der G+C-Gehalt und die „stacking energy“ in der Umgebung von *yfaUVWX* und *yeaSTUVWX* ermittelt. Der G+C-Gehalt ist in % und die „stacking energy“ in kcal/mol bp angegeben. Die vorhergesagten Promotorbereiche mit der Abnahme des G+C-Gehaltes und der „stacking energy“ sind gekennzeichnet.

aeroben Bedingungen in *E. coli* MC4100 gemessen (Tab. 13). Das Gen *yeaU* wurde durch Tartrat induziert. L-Tartrat ist der stärkste Induktor, gefolgt von meso- und D-Tartrat. Mit L-Tartrat ist die Induktion um den Faktor 48 höher als in einer Medium ohne Effektor. Die Induktion durch meso-Tartrat ist ebenso signifikant hoch (Faktor 30). Das Gen *yeaU* wurde durch andere C₄-Dicarboxylate, wie Fumarat, Succinat und Malat nicht induziert. Außerdem zeigte sich bei der Expression des *yeaU*-Gens eine Glucoserepression. In Anwesenheit von Glucose war die Expression niedriger als ohne Effektor. Ebenso hat die Induktion mit L-Tartrat durch Zugabe von Glucose um den Faktor 19 abgenommen. Eine Zugabe von Gluconat verursachte dagegen keine Repression.

Tab. 13. Die aerobe Expression des *yeaU* Gens : Induktion durch Tartrat. Die β -Galaktosidaseaktivität der *yeaU*-*lacZ* Fusion wurde von Plasmid pMW323 in *E. coli* MC4100 bestimmt. Die Zucht erfolgte unter aeroben Bedingungen in angereichertem M9-Minimalmedium mit den angegebenen Substraten (50mM). Für Untersuchung der Katabolitrepression erhielt das Medium zusätzlich Glucose oder Gluconat (jeweils 20 mM).

Substrat	Expression von <i>yeaU</i> - <i>lacZ</i> [MU]
Fumarat	367
Succinat	205
Malat	264
L-Tartrat	8620
D-Tartrat	1522
meso-Tartrat	5455
Keine	178
Glucose	39
L-Tartrat + Glucose	456
L-Tartrat + Gluconat	8081

Ferner wurden die Effekte der Regulatoren DcuS, FNR und ArcB auf der Expression des *yeaU*-Gens untersucht (Tab. 14) (Grimpo, 2005). DcuS ist die Sensor kinase des DcuSR Zweikomponentensystems, die die Anwesenheit von C₄-Dicarboxylaten wahrnimmt. Die Sauerstoffregulation erfolgt durch FNR und das Zweikomponentensystem ArcBA (aerobic respiration control). ArcB ist die membranständige Sensor kinase des ArcBA-Systems. Dazu

wurde das Fusionsplasmid pMW323, das *yeaU*-*lacZ* trägt, in MC4100 und in die entsprechenden *dcuS*-, *fnr*-, und *arcB*-Mutanten transformiert. Die Zelle wurden dann mit dem stärksten Induktor L-Tartrat unter aeroben und anaeroben Bedingungen gezüchtet. Die Induktion durch L-Tartrat nahm in der *dcuS*-Mutante nicht ab, d.h. die Induktion durch L-Tartrat wird nicht durch DcuSR vermittelt. Dazu passt, dass die Induktion nicht mit anderen C₄-Dicarboxyaten erfolgte. Es sollte dann einen Regulator geben, der die Anwesenheit von Tartrat wahrnimmt und die Expression von *yeaU* reguliert. Dieser Regulator ist vermutlich YeaT, dessen Gen *yeaT* unmittelbar neben *yeaU* in entgegengesetzter Orientierung liegt. Seine Aminosäuresequenz weist mit dem anaeroben Tartratregulator YgiP eine signifikante Ähnlichkeit auf. Die Induktion von *yeaU*-*lacZ* mit L-Tartrat war in MC4100 unter aeroben Bedingungen um den Faktor 9 stärker als unter anaeroben Bedingungen. Die aerobe Induktion in den *fnr*- und *arcB*-Mutanten war aber unverändert und alle anaeroben Expressionen sind ebenfalls ähnlich. Das zeigt, dass die Sauerstoffregulationssysteme FNR und ArcBA auf die Expression des *yeaU*-Gens keinen Einfluss nehmen.

Tab. 14. Effekt von DcuS und FNR auf der Expression des *yeaU* Gens. Die β -Galaktosidaseaktivität der *yeaU*-*lacZ* Fusion wurde mit dem Plasmid pMW323 in MC4100 (*Wt*), IMW262 (*dcuS*), IMW151a (*fnr*) und RM314 (*arcB*) bestimmt. Die Zucht erfolgte in angereichertem M9-Minimalmedium unter aeroben Bedingungen mit L-Tartrat (50mM) und unter anaeroben Bedingungen mit L-Tartrat (50mM) und Gluconat (20mM).

Stamm	Expression von <i>yeaU</i> - <i>lacZ</i> [MU]	
	aerob	anaerob
MC4100 (<i>Wt</i>)	6715	761
IMW262 (<i>dcuS</i>)	7220	483
IMW151a (<i>fnr</i>)	7910	731
RM314 (<i>arcB</i>)	8498	782

Zusammenfassend kann man feststellen, dass die Expression des *yeaU* Gens unter aeroben Bedingungen mit L-Tartrat am stärksten induziert wird. Diese Induktion mit L-Tartrat ist von dem DcuSR System unabhängig, daher wird YeaT als der tartratspezifische Regulator dieser Gene vorgeschlagen. Die Induktion unter aeroben Bedingungen erfolgte unabhängig von dem

Sauerstoffregulator FNR und ArcBA System. Außerdem findet durch Zugabe von Glucose eine Katabolitrepression statt.

4.4.3 Expression des *yfaWVU*-Operons

Das Gen *yfaV* kodiert für einen potentiellen Tartratcarrier, der zu der ACS-Familie (Anion:Cation Symporter) gehört und der eine signifikante Ähnlichkeit zu einem Tartratcarrier TtuB von *Agrobacterium vitis* aufweist (Kap. 4.1). Um zu testen, ob dieses Transportprotein als Tartratcarrier in Frage kommt, wurden hier Expressionsuntersuchungen mit einer Reporterfusion durchgeführt. Dazu wurde eine *lacZ*-Reporterfusion mit dem Promotorbereich vor dem *yfaW* Gen hergestellt, da die Gene *yfaWVU* vermutlich ein Operon bilden (Kap. 4.4.1). Die Expression der *yfaW-lacZ*-Fusion, die auf dem Fusionsplasmid pMW258 vorliegt, wurde mit C₄-Dicarboxylaten unter aeroben und anaeroben Bedingungen in *E. coli* MC4100 untersucht (Tab. 15). Die Ergebnisse zeigen, dass das *yfaWVU*-Operon mit C₄-Dicarboxylaten induziert wurde und dass diese Induktion unter aeroben und anaeroben Bedingungen unverändert erfolgt. Dies bedeutet, dass das *yfaWVU*-Operon nicht tartratspezifisch induziert wurde.

Tab. 15. Die Expression des *yfaWVU*-Operons: Induktion durch C₄-Dicarboxylate. Die β -Galaktosidaseaktivität der *yfaW-lacZ* Fusion wurde mit Plasmid pMW258 in *E. coli* MC4100 bestimmt. Die Zucht erfolgte in angereichertem M9-Minimalmedium mit den angegebenen Substraten (50mM). Für die anaerobe Zucht enthielt das Medium zusätzlich Glycerin (50mM) als Wuchssubstrat.

Substrat	Expression von <i>yfaW-lacZ</i> [MU]	
	aerob	anaerob
Glucose	76	67
Fumarat	1544	1182
Succinat	1752	n.d.
Malat	1395	n.d.
L-Tartrat	1203	1208
D-Tartrat	926	910
meso-Tartrat	1190	n.d.

n.d., nicht durchgeführt

Zum Test, ob diese allgemeine Induktion durch die C₄-Dicarboxylate über das DcuSR-Zweikomponentensystem vermittelt wird, wurde die Expression in der *dcuS*-Mutante gemessen (Tab. 16). In der *dcuS*-Mutante nahm die Induktion durch C₄-Dicarboxylate nicht ab. Das zeigt, dass die Expression des *yfaWVU*-Operons unabhängig von der allgemeinen C₄-Dicarboxylat-Sensorkinase erfolgt. Die Expression des *yfaWVU*-Operons scheint auch unabhängig von FNR zu sein, da die Induktion unter aeroben und anaeroben Bedingungen unverändert bleibt. Wie vermutet, ist die aerobe Induktion durch Tartrat in der *fnr*-Mutante vergleichbar mit dem Wildtypstamm.

Insgesamt wurde das Transportergen *yfaV* bzw. das *yfaWVU*-Operon also mit allen untersuchten C₄-Dicarboxylaten einschließlich der drei Stereoisomere von Tartrat induziert, und die Induktion erfolgte unabhängig von der Anwesenheit des Sauerstoffs. Der allgemeine C₄-Dicarboxylat-Sensor DcuS zeigte keinen Effekt auf die Induktion des *yfaWVU*-Operons mit C₄-Dicarboxylaten.

Tab. 16. Effekt von DcuS und FNR auf der Expression des *yfaWVU*-Operons. Die β -Galaktosidaseaktivität der *yfaW*-*lacZ* Fusion wurde mit Plasmid pMW258 in MC4100 (*Wt*), IMW262 (*dcuS*) und IMW151a (*fnr*) bestimmt. Die Zucht erfolgte unter aeroben Bedingungen in angereichertem M9-Minimalmedium mit den angegebenen Substraten (50mM).

Substrat	Expression von <i>yfaW</i> - <i>lacZ</i> [MU]		
	MC4100 (<i>Wt</i>)	IMW262 (<i>dcuS</i>)	IMW151a (<i>fnr</i>)
Glucose	76	137	n.d.
Fumarat	1544	2411	n.d.
Succinat	1752	2049	n.d.
Malat	1395	2385	n.d.
L-Tartrat	1203	2489	2090
D-Tartrat	926	2033	1156
meso-Tartrat	1190	1656	1632
Keine	n.d.	2212	n.d.

n.d., nicht durchgeführt

4.5 Suche nach weiteren C₄-Dicarboxylatcarriern in *E. coli* durch globale Expressionsanalyse

E. coli kann C₄-Dicarboxylate als Kohlenstoff- und Energie-Quelle unter aeroben und anaeroben Bedingungen nutzen (Zientz *et al.*, 1996; Janausch *et al.*, 2001). Unter anaeroben Bedingungen wird Fumarat als Elektronenakzeptor in der Fumaratatmung zu Succinat reduziert. Ferner wird Succinat in der Glucosefermentation als ein Endprodukt gebildet und muss ausgeschieden werden. Für den anaeroben Transport von C₄-Dicarboxylaten besitzt *E. coli* die Carrier DcuA, DcuB und DcuC (Engel *et al.*, 1992, 1994; Six *et al.*, 1994; Zientz *et al.*, 1996, 1999). DcuA und DcuB sind hauptsächlich für Aufnahme und Gegentausch verantwortlich. DcuA wird aber auch unter aeroben Bedingungen konstitutiv gebildet. DcuB katalysiert den Gegentausch von Fumarat gegen Succinat in der Fumaratatmung (Engel *et al.*, 1992, 1994; Six *et al.*, 1994). DcuC katalysiert den Efflux von Succinat in der Glucosefermentation (Zientz *et al.*, 1996). Diese anaerobe Carrier DcuA, DcuB und DcuC können sich gegenseitig in ihrer Funktion ersetzen (Six *et al.*, 1994; Zientz *et al.*, 1999). Während der Glucosefermentation bildete die *dctA dcuA dcuB dcuC*-Mutante Succinat in einer Menge und Geschwindigkeit, die dem Wildtyp ähnlich war (Tab. 17) (Kim, 2000). Die Bildungsrate von Succinat in dieser Mutante war ca. 26 U/g TG. Dieser Wert liegt deutlich über einer möglichen Diffusionsrate von Succinat (Kaim & Dimroth, 1998, 1999). Es sollte daher weitere Effluxcarrier (neben DcuA, DcuB und DcuC) geben. Dieser Carrier, der für die Succinatabgabe in der *dcu*-Mutante während der Glucosefermentation verantwortlich ist, sollte unter anaeroben Bedingungen gebildet werden und nicht durch Glucose reprimiert werden.

Unter aeroben Bedingungen werden C₄-Dicarboxylate vollständig zu CO₂ oxidiert. Die aerobe Aufnahme von C₄-Dicarboxylate wird hauptsächlich von DctA katalysiert (Kay & Kornberg, 1971; Davies *et al.*, 1999). Die *dctA*-Mutante ist nicht mehr in der Lage mit Fumarat oder Succinat unter aeroben Bedingungen wachsen. Bei saurem pH-Wert (pH 6) konnte jedoch das Wachstum der *dctA dcuA dcuB dcuC dcuD*-Mutante mit Succinat wieder hergestellt werden,

mit Fumarat jedoch nicht (Janausch *et al.*, 2001). Da der Succinattransport dieser Mutante bei pH 6 eine lineare Abhängigkeit von der Substratkonzentration zeigte, wurde die Möglichkeit des Transports via Succinatdiffusion überprüft (Janausch *et al.*, 2001). Außerdem wurde die Diffusion von Succinat in Form eines zyklischen Monoanions, in dem die negative Ladung maskiert ist, gezeigt (Kaim & Dimroth, 1998, 1999). Da dieser Succinattransport in der Mehrfachmutante bei pH 6 durch Entkoppler gehemmt und durch Glucose reprimiert wurde, wurde ein Carrier-vermittelter Transport für diesen Succinattransport vorhergesagt (Janausch *et al.*, 2001). Die Substratspezifität des Succinattransports der Mutante unterschied sich von der des Wildtyps. Die Succinataufnahme der Mutante wurde durch Monocarboxylate kompetitiv gehemmt. Der Carrier, der die Succinataufnahme der Mutante bei pH 6 katalysiert, sollte daher vermutlich ein Monocarboxylatcarrier sein, dessen Aktivität vom Protonenpotential abhängig ist und dessen Genexpression durch Glucose reprimiert wird (Janausch *et al.*, 2001).

Tab. 17. Stoffwechselprodukte von *dcu*-Mutanten bei anaerober Inkubation mit Glucose in Zellsuspensionen. Die Zucht erfolgte in M9-Medium mit Glucose. In der spät-logarithmischen Phase wurden die Zelle geerntet und in MOPS-Medium zu OD₅₇₈ 2,5 suspendiert. Die Zellsuspension wurde mit 10 mM Glucose bei 30°C 1 Stunde inkubiert. Die Bestimmung erfolgte durch HPLC.

Stamm Genotyp	Glucose- verbrauch (mM)	Stoffwechselprodukte (Mol / Mol Glucose)							C- Bilanz (%)
		Succinat	Laktat	Acetat	Formiat	Ethanol	Fumarat	Malat	
AN387									
Wildtyp	5	0,22	0,32	0,52	0,86	0,66	0,001	0,14	94
IMW213b									
<i>dctA dcuA</i> <i>dcuB dcuC</i>	8,1	0,12	0,22	0,33	0,86	0,54	0,006	0,32	84
MDO1100									
<i>dctA dcuA dcuB</i>	8,9	0,12	0,34	0,36	1,1	0,74	0,006	0,31	101
IMW159									
<i>dcuA dcuC</i>	5,6	0,17	0,36	0,45	1,2	0,63	0,005	0,17	87

Hier wurden Versuche unternommen, diese weiteren C₄-Dicarboxylatcarrier von *E. coli*, d.h. den Succinateffluxcarrier der Glucosefermentation und den aeroben Succinataufnahmecarrier (pH 6) durch DNA-Microarray-Analyse zu identifizieren.

4.5.1 DNA-Microarray

Die DNA-Microarray-Methode ermöglicht es, das Genexpressionsmuster aller Gene des Genoms, im Fall von *E. coli* alle 4290 annotierte offenen Leserahmen, gleichzeitig zu untersuchen. In der DNA-Microarray-Analyse kann man damit die relative Menge an mRNA aller Gene aus zwei unterschiedlichen Kulturen oder Stämmen untersuchen.

Das Ablauf eines DNA-Microarrayexperiments ist in Abb. 26 dargestellt. Zuerst muss das DNA-Microarray hergestellt werden. Dazu wurden PCR-Produkte aller Gene des *E. coli* Genoms auf einen mit Poly-l-Lysin beschichteten Objektträger mit einem Roboter gespottet (AG Wendisch, Forschungszentrum Jülich). Die zu vergleichenden Kulturen A und B wurden für 10 Generationen unter definierten Testbedingungen gezüchtet, wobei das Wachstum immer in der frühen exponentiellen Phase bleiben sollte (OD₅₇₈ 0,35 - 0,45). Nachdem die Gesamt-mRNA aus den Kulturen A und B isoliert wurde, wurde diese mRNA durch Reverse-Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Während dieser reversen Transkription wurde cDNA mit Cy3-dUTP- (grün) bzw. Cy5-dUTP- (rot) Fluoreszenz markiert. Die markierte Cy3-cDNA und Cy5-cDNA wurden mit den DNA an *E. coli*-Microarray-Chip konkurrierend hybridisiert. Die Fluoreszenz des hybridisierten DNA-Arrays wurde bei 532nm (Cy3) und bei 635nm (Cy5) gemessen. Aus dem Verhältnis der Emission bei 532nm:635nm kann man die relative Menge an mRNA für jedes Gen bestimmen.

Für diese Experimente wurden zwei unterschiedlichen *E. coli*-Laborstämme, AN387 und MG1655, und deren jeweilige *dctA dcuA dcuB dcuC dcuD*-Mutante IMW244 und IMW422 verwendet. Der Stamm AN387 wuchs unter aeroben Bedingungen auf Succinat nicht gut, daher sollten die Kandidatengene für den aeroben Succinatcarrier bevorzugt aus Untersuchung der Stämme MG1655/IMW422 abgeleitet werden. Im Stamm MG1655 ist

jedoch ein großer Teil des *fnr* Gens, das für einen übergeordneten Sauerstoff-Regulator FNR kodiert, deletiert (Soupene *et al.*, 2003). Die Deletion des *fnr*-Gens wurde durch PCR mit den Primern MalBamHI und GstSalI, die am 3'-Ende und 5'-Ende des *fnr*-Gens binden, bestätigt (nicht gezeigt). Da viele anaerobe Gene der Kontrolle von FNR unterliegen, sollten die Kandidaten für den anaeroben Succinateffluxcarrier bevorzugt aus der Untersuchung mit den Stämmen AN387/IMW244 abgeleitet werden. Als anaerobe bzw. aerobe Kandidatengene wurde ausschließlich Gene für sekundäre Carrier akzeptiert.

Herstellen des Microarrays

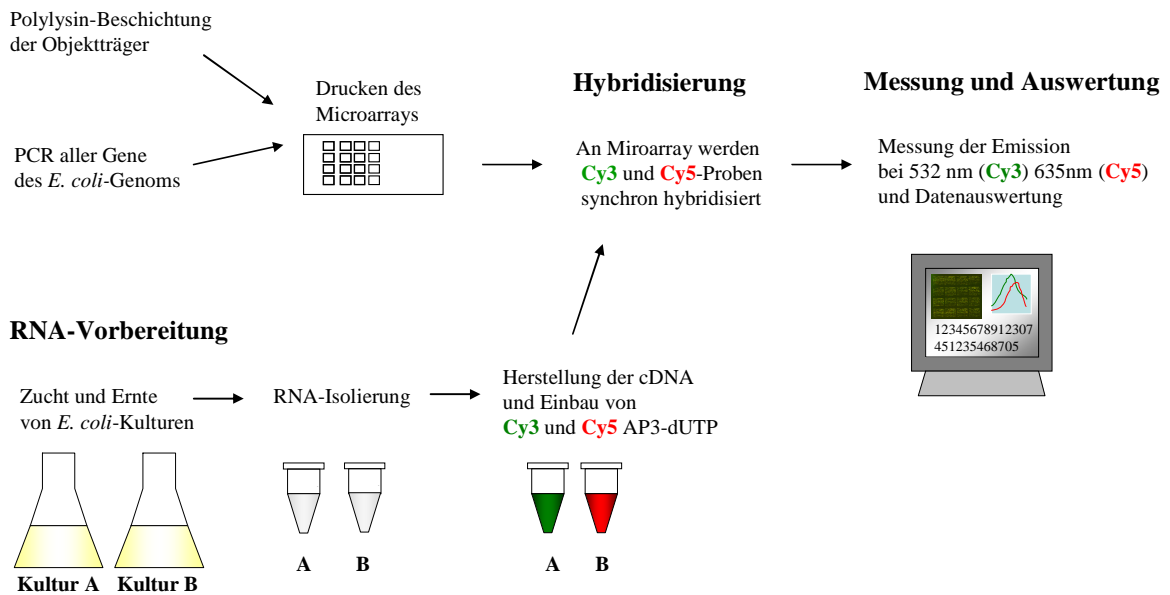


Abb. 26. Schematische Darstellung des Vorgehens bei der Analyse der DNA-Microarray. Außer der RNA-Vorbereitung wurden die Experimente in der AG Wendisch (Forschungszentrum Jülich) durchgeführt.

Zur Suche nach dem anaeroben Carrier, der den Succinatefflux in der *dctA dcuA dcuB dcuC*-Mutante in der Glucosefermentation katalysiert, wurde die Genexpression von zwei Ansätzen verglichen: 1. Anaerobe Glucosezucht gegenüber aerober Glucosezucht des Wildtypstamms und 2. Anaerobe Glucosezucht der *dctA dcuA dcuB dcuC dcuD*-Mutante gegenüber dem Wildtypstamm. Der Succinateffluxcarrier sollte in der Glucosefermentation gebildet werden.

In der Arbeitshypothese wurde angenommen, dass der Carrier in der Mutante induziert wird, um die Funktion der Dcu-Carrier zu ersetzen. Zur Identifizierung des aeroben Succinatcarriers, der bei pH 6 aktiv ist, wurde die Genexpression der folgenden vier Ansätzen verglichen: 1. Aerobe Succinatzucht gegen aerobe Glucosezucht des Wildtypstamms, jeweils bei pH 7; 2. Aerobe Succinatzucht des Wildtypstamms bei pH 6 gegen Zucht unter gleichen Bedingungen bei pH 7; 3. Aerobe Succinatzucht bei pH 6 der *dctA dcuA dcuB dcuC dcuD*-Mutante gegenüber dem Wildtypstamm; und 4. Aerobe Zucht mit Glycerin plus Maleinat gegenüber aerober Zucht mit Glycerin der *dctA dcuA dcuB dcuC dcuD*-Mutante. Maleinat ist das cis-Stereoisomer des Fumarat, wird aber von *E. coli* nicht verstoffwechselt. Daher wurde Maleinat als Induktor für die Bildung des Succinatcarriers zugegeben.

4.5.1.1 Alternativer Succinateffluxcarrier in der Glucosefermentation

Zur Suche nach dem alternativen Succinateffluxcarrier, der in der *dctA dcuA dcuB dcuC dcuD*-Mutante während der Glucosefermentation die Succinatabgabe ermöglicht hat, wurde in Chip 1 die Genexpression der anaeroben Glucosezucht mit der aeroben Glucosezucht des *E. coli*-Wildtypstamms AN387 und in Chip 2 die Genexpression in der Glucosefermentation der *dctA dcuA dcuB dcuC dcuD*-Mutante IMW244 mit Wildtyp AN387 verglichen (Tab. 18).

In der Glucosefermentation von Stamm AN387 werden die Gene für einige Effluxtransporter (*focA*, *setB*, *yhiU*, *yidY* und *yjiO*), Antiporter (*yhjX*) und weitere Transporterproteine (*ybhI* und *yehH*) im Vergleich zu aerober Glucosezucht stärker exprimiert (Tab. 18. Chip1). Die Faktoren liegen im Bereich von 2 bis 40. Die Gene *yhiU*, *yidY* und *yjiO* kodieren für Multidrug-Resistenz-Systeme, die neben Antibiotika verschiedene Schadstoffe aus der Zelle exportieren. Das *focA* Gen kodiert für den Fomiateffluxcarrier FocA der Glucosefermentation (Suppmann & Sawers, 1994) und wurde hier am stärksten induziert (Faktor 38). Der Carrier FocA könnte durch eine Nebenaktivität auch Succinat transportieren, obwohl seine Genexpression in der *dcu*-Mutante wie im Wildtyp gleich bleibt. In diesem Fall ist die relative Genexpression des *focA*-Gens der *dcu*-Mutante und des Wildtyps in der anaeroben Glucosezucht 38-fach stärker exprimiert als der aeroben Glucosezucht. Zu den weiteren

Genen mit verstärkter anaeroben Expression gehört der hypothetische Tricarboxylatcarrier YbhI (Kap. 4.1), der signifikante Ähnlichkeit zu CitT (Citrat/Succinat-Antiporter) und YgjE (L-Tartrat/Succinat-Antiporter, Kap. 4.3) aufweist. Ein weiterer induzierter Carrier ist ein potentieller Oxalat/Formiat-Antiporter (YhjX). Dieser könnte auch eine Effluxaktivität besitzen. Seine Substrate sind Di- und Monocarboxylate.

Tab. 18. Kandidatengene für den anaeroben Succinateffluxcarrier: Gene mit erhöhter Expression in der anaeroben Glucosezucht von Wildtyp AN387 gegenüber aerober Glucosezucht (Chip 1) und in der *dctA dcuA dcuB dcuC dcuD*-Mutante IMW244 gegenüber Wildtyp AN387 in der anaeroben Glucosezucht (Chip 2). Gezeigt sind sekundäre Transportergene, deren relative mRNA-Menge um Faktor ≥ 2 erhöht waren. Die statistische Absicherung der Werte erfolgte mit Hilfe des t-Tests (3.3 DNA-Microarray-Analyse). Die dabei ermittelten p-Werte waren $< 0,05$.

Gene		Protein		Relative Genexpression (-fach)	
B Nr.	Name	Familie	Funktion	Chip 1 AN387 N ₂ Glucose vs. AN387 O ₂ Glucose	Chip 2 IMW244 N ₂ Glucose vs. AN387 N ₂ Glucose
b0770	<i>ybhI</i>	DASS	Tricarboxylat Transporter ?	4,7	0,5
b0904	<i>focA</i>	FNT	Formiat-Effluxcarrier	38,2	1,1
b1492	<i>xasA</i>	APC	L-Glutamat/4-Aminobutyrat Antiporter	n.a.	2,9
b2158	<i>yeiH</i>	n.k.	Transportprotein ?	2,8	3,4
b2170	<i>setB</i>	MFS	Lactose Effluxcarrier	4,5	0,7
b3513	<i>yhiU</i>	n.k.	Membrananchor des Multidrug-Resistenz-Effluxcarriers ?	9,3	0,15
b3547	<i>yhjX</i>	MFS	Oxalat/Formiat Antiporter ?	24,0	0,9
b3710	<i>ydY</i>	MFS	Multidrug-Resistenz-Effluxcarrier ?	2,5	n.a.
b4337	<i>yjiO</i>	MFS	Multidrug-Resistenz-Effluxcarrier ?	17,5	0,7
b4138	<i>dcuA</i>	Dcu	C ₄ -Dicarboxylat Transporter	0,7	0,3
b4123	<i>dcuB</i>	Dcu	Fumarat/Succinat Antiporter	3,8	0,5
b0621	<i>dcuC</i>	DcuC	Succinat Effluxcarrier	2,8	0,8

Familie: APC, Amino Acid-Polyamine-Organocation; DASS, Divalent Anion:Na⁺ Symporter; Dcu, C₄-Dicarboxylate Uptake; FNT, Formate-Nitrite Transporter; MFS, Major Facilitator Superfamily n.k., nicht klassifiziert; n.a., nicht auswertbar; ?, hypothetische Funktion

In der *dcu*-Mutante zeigen nur die Gene *xasA* und *yehH* eine höhere Genexpression im Vergleich zum Wildtyp (Tab. 18. Chip 2). Das Gen *xasA* kodiert für Glutamat/4-Aminobutyrat-Antiporter, seine Substrate sind also ein C₅-Dicarboxylat und C₄-Monocarboxylat. Das Gen *yehH* ist das einzige Gen, das beiden Kriterien dieses Experiments genügt. Dieses Gen kodiert für eine vermutliche Efflux-Pumpe, aber ihre Substrate noch nicht bekannt.

Das Gen *dcuA* exprimiert konstitutiv, daher wird es in der Glucosefermentation nicht höher als in der aeroben Zucht exprimiert (Chip 1). Die Gene für die anaeroben C₄-Dicarboxylatcarrier DcuB und DcuC wurden in der Glucosefermentation induziert. Die Expression des *dcuC* Gens unterliegt keiner Glucoserepression (Zientz *et al.*, 1999). Die erhöhte Expression des *dcuB* Gens, trotz Anwesenheit Glucose (Zientz *et al.*, 1998; Golby *et al.*, 1998), beruht auf der starken Induktion durch FNR. Die Expression der Gene *dcuA*, *dcuB* und *dcuC* fehlt in der *dcu*-Mehrfachmutante (Chip 2).

Die Ergebnisse von entsprechenden Experimenten mit Stämmen MG1655 (Wildtyp) und deren *dcu*-Mutante IMW422 sind in Tab. 19 dargestellt. Aufgrund des inaktiven FNR (Soupene *et al.*, 2003) in diesen Stämmen waren die Genexpressionsmuster verändert. Im Vergleich der anaeroben Glucosezucht von MG1655 mit der aeroben Glucosezucht (Tab. 19. Chip 3) wurden die Gene *focA*, *xasA* und *yhiU*, die von den vergleichbaren Experimente mit AN387 in Frage kamen (Tab. 18. Chip1 und Chip2), stärker exprimiert. Wie vermutet, wurde die Relativität der Expression der Gene, deren Expression von FNR abhängig sind, reduziert, z.B. hat die Expression des *focA*-Gens von Faktor 38 in Chip 1 zu Faktor 4 in Chip 3 abgenommen. Trotzdem zeigten diese Experimente weitere Kandidaten für alternative C₄-Dicarboxylatcarrier. Die Transportergene für Aminosäuren, zyklische Amide und Oligopeptide (*brnQ*, *ybbW* und *ydgR*), ein Gen für ein unbekanntes Transportprotein (*yhiM*) und für einen Ionen-Kanal (*ybiO*) zeigten verstärkte Expression. Das Gen *ybbW* wurde in der *dcu*-Mutante gegenüber dem Wildtyp (Chip 4) stärker exprimiert. Außer dem konstitutiven Gen *dcuA* waren die Genexpressionen von anaeroben C₄-Dicarboxylatcarrier DcuB und DcuC

in dieser Untersuchung mit MG1655 nicht vergleichbar mit AN387. Diese Fehlregulation liegt vermutlich am inaktiven FNR-Regulator.

Tab. 19. Kandidatengene für den anaeroben Succinateffluxcarrier: Gene mit erhöhter Expression in der anaeroben Glucosezucht von Wildtyp MG1655 gegenüber aerober Glucosezucht (Chip 3) und in der *dctA dcuA dcuB dcuC dcuD*-Mutante IMW422 gegenüber Wildtyp MG1655 in der anaeroben Glucosezucht (Chip 4). Gezeigt sind sekundäre Transportergene, deren relative mRNA-Menge mindestens in einem der Chips um Faktor ≥ 2 erhöht waren. Die statistische Absicherung der Werte erfolgte mit Hilfe des t-Tests (3.3 DNA-Microarray-Analyse). Die dabei ermittelten p-Werte waren $< 0,05$.

Gene		Protein		Relative Genexpression (-fach)	
				Chip 3	Chip 4
B Nr.	Name	Familie	Funktion	MG1655 N ₂ Glucose vs. MG1655 O ₂ Glucose	IMW422 N ₂ Glucose vs. MG1655 N ₂ Glucose
b0401	brnQ	LIVCS	Leucin, Valin und Isoleucin-Transporter	3,9	1,2
b0511	ybbW	NCS1	Allantoin Transporter ?	2,0	5,6
b0808	ybiO	MscS	Ionen-Kanal ?	2,9	1,0
b0904	focA	FNT	Formiat-Effluxcarrier	4,1	1,1
b1492	xasA	APC	L-Glutamat/4-Aminobutyrat Antiporter	4,8	0,9
b1634	ydgR	POT	Oligopeptid Transporter?	7,6	1,1
b3491	yhiM	n.k.	Transportprotein ?	8,7	1,3
b3513	yhiU	n.k.	Membrananchor des Multidrug-Resistenz-Effluxcarriers ?	2,1	1,0
b4138	dcuA	Dcu	C ₄ -Dicarboxylat Transporter	0,7	0,1
b4123	dcuB	Dcu	Fumarat/Succinat Antiporter	1,1	0,9
b0621	dcuC	DcuC	Succinat Effluxcarrier	1,2	2,9

Familie: APC, Amino Acid-Polyamine-Organocation; Dcu, C₄-Dicarboxylate Uptake; FNT, Formate-Nitrite Transporter; LIVCS, Branched Chain Amino Acid:Cation Symporter; MscS, Small Conductance Mechanosensitive Ion Channel; NCS1, Nucleobase:Cation Symporter-1; POT, Proton-dependent Oligopeptide Transporter; n.k., nicht klassifiziert; ?, hypothetische Funktion

4.5.1.2 Alternativer aerober Aufnahmecarrier für Succinat bei pH 6

Zur Identifizierung des alternativen aeroben C₄-Dicarboxylatcarriers, der in der *dct*-Mutante bei pH 6 die Succinataufnahme katalysiert, wurde die Expressionen in einer aeroben Succinatzucht mit einer Glucosezucht des *E. coli*-Wildtyps AN387 (Chip 5), in einer aeroben Succinatzucht bei pH 6 gegen pH 7 des Wildtyps AN387 (Chip 6), und in einer aeroben Succinatzucht der *dctA dcuA dcuB dcuC dcuD*-Mutante IMW244 bei pH 6 gegenüber dem Wildtyp AN387 (Chip 7) verglichen (Tab. 20). In der Succinatzucht gegen Glucosezucht (Chip 5) wurden die Gene für einen potentiellen Tartrattransporter (*yfaV*) (Kap. 4.1; Kap. 4.4), einen D-Glukarattransporter (*gudP*) und potentielle Transportproteine (*ydiM* und *yhiP*) stärker exprimiert. Die hochregulierte Expression des *yfaV*-Gens in der Succinatzucht ist im Einklang mit dem Befund, dass seine Expression durch verschiedene C₄-Dicarboxylate induziert wird (Tab. 15). Deshalb stellt YfaV einen guten Kandidaten für weitere C₄-Dicarboxylattransporter dar. Die Expression des Gens *gudP* ist auch in der *dct*-Mutante gegenüber Wildtyp hochreguliert (Chip 7). Es gibt noch ein weiteres Gen *ykgG*, das in der *dct*-Mutante (Chip 7) induziert wurde, seine Funktion ist aber noch unklar. In der Succinatzucht bei pH 6 gegen pH 7 (Chip 6) wurde kein Kandidat gefunden. Zwei Referenzgene, *yeaU* und *dctA*, wurden hier dargestellt. Wie erwartet, wurde das Gen *yeaU* (Kap. 4.4.2) mit Succinat gegenüber Glucose stärker exprimiert (Chip 5), und seine Expression ist gleich geblieben, solange das Medium Succinat enthielt (Chip 6 und Chip 7). Das *dctA* Gen in Chip 5 zeigt jedoch eine unzuverlässige Expression, da seine Induktion mit C₄-Dicarboxylaten erfolgen muss (Zientz *et al.*, 1998). Das liegt vermutlich an Stamm AN387, da dieser unter aeroben Bedingungen auf Succinat nicht gut wachsen konnte. Aus diesem Grund wurde weitere Untersuchungen zur Suche nach aeroben Succinatcarrier mit den Stämmen MG1655 und seine *dctA dcuA dcuB dcuC dcuD*-Mutante IMW422 durchgeführt (Tab. 21). Die Genexpression der Mutante wurde in der aeroben Succinatzucht bei pH 6 gegenüber Wildtyp (Chip 8) und in der aeroben Zucht auf Maleinat plus Glycerin gegenüber Glycerinzucht (Chip 9) verglichen. Maleinat ist ein C₄-Dicarboxylat mit ähnlicher Struktur wie Succinat, wird aber von *E. coli* nicht verstoffwechselt. Daher sollte Maleinat als Induktor für Succinatcarrier dienen. Aus diesem Experiment sind

zwei Transportergene, *gltP* und *yigM*, gefunden, die unter beiden Bedingungen hochreguliert sind. GltP ist ein Transporter für Glutamat oder Aspartat, und gehört gemeinsam mit DctA zur DAACS-Familie. Damit GltP stellt ein guten Kandidat für den Carrier der Succinataufnahme dar. YigM ist ein potentiell Transportprotein der DME-Familie (Drug/Metabolite Exporter). Die bakteriellen Carrier dieser Familie katalysieren möglicherweise den Export der

Tab. 20. Kandidatengene für den aeroben Succinataufnahmecarrier: Gene mit erhöhter Expression in der aeroben Succinatzucht von Wildtyp AN387 gegenüber aerober Glucosezucht (Chip 5), in der aeroben Succinatzucht von Wildtyp AN387 bei pH 6 gegenüber pH 7 (Chip 6) und in der *dctA dcuA dcuB dcuC dcuD*-Mutante IMW244 gegenüber Wildtyp AN387 von der aeroben Succinatzucht bei pH 6 (Chip 7). Gezeigt sind sekundäre Transportergene, deren relative mRNA-Menge um Faktor ≥ 2 erhöht waren. Die statistische Absicherung der Werte erfolgte mit Hilfe des t-Tests (3.3 DNA-Microarray-Analyse). Die dabei ermittelten p-Werte waren $< 0,05$.

Gene		Protein		Relative Genexpression		
B Nr.	Name	Familie	Funktion	Chip 5 AN387 O ₂ Succinat vs. AN387 O ₂ Glucose	Chip 6 AN387 O ₂ Succinat pH6 vs. AN387 O ₂ Succinat pH7	Chip 7 IMW244 O ₂ Succinat pH6 vs. AN387 O ₂ Succinat pH6
b0308	ykgG	n.k.	Transportprotein ?	1,2	0,9	3,4
b1690	ydiM	MFS	Transportprotein ?	2,7	0,4	0,9
b2246	yfaV	MFS	Tartrat Transporter ?	2,8	0,2	n.a.
b2789	gudP	MFS	D-Glukarat Transporter ?	4,4	0,3	2,1
b3496	yhiP	POT	Transportprotein ?	3,6	0,4	1,0
b1800	yeaU	n.k.	Tartrat- Dehydrogenase ?	2,9	1,0	0,6
b3528	dctA	DAACS	C ₄ -Dicarboxylat Transporter	1,2	2,9	1,4

Familie: APC, Amino Acid-Polyamine-Organocation; DASS, Divalent Anion:Na⁺ Symporter; Dcu, C₄-Dicarboxylate Uptake; FNT, Formate-Nitrite Transporter; LIVCS, Branched Chain Amino Acid:Cation Symporter; MFS, Major Facilitator Superfamily, NCS1, Nucleobase:Cation Symporter-1; POT, Proton-dependent Oligopeptide Transporter; DAACS, Dicarboxylate/Amino Acid:Cation Symporter; n.k., nicht klassifiziert; ?, hypothetische Funktion

Tab. 21. Kandidatengene für den aeroben Succinataufnahmecarrier: Gene mit erhöhter Expression in der *dctA dcuA dcuB dcuC dcuD*-Mutante IMW422 gegenüber Wildtyp MG1655 von den aeroben Succinatzuchten bei pH 6 (Chip 8) und in der aeroben Maleinat+Glycerinzucht gegenüber aerober Glycerinzucht von der *dctA dcuA dcuB dcuC dcuD*-Mutante IMW422 bei pH 6 (Chip 9). Gezeigt sind sekundäre Transportergene, deren relative mRNA-Menge um Faktor ≥ 2 erhöht waren. Die statistische Absicherung der Werte erfolgte mit Hilfe des t-Tests (3.3 DNA-Microarray-Analyse). Die dabei ermittelten p-Werte waren $< 0,05$.

Gene		Protein		Relative Genexpression (-fach)	
B Nr.	Name	Familie	Funktion	Chip 8	Chip 9
				IMW422 O ₂ Succinat pH6 vs. MG1655 O ₂ Succinat pH6	IMW422 O ₂ Glycerin + Maleinat pH6 vs. IMW422 O ₂ Glycerin pH6
b2164	yeiM	CNT	Nukleosid Transporter ?	2,2	1,4
b2536	hcaT	MFS	3-Phenylpropionat Transporter	1,9	1,2
b3827	yigM	DME	Drug/Metabolit Transporter ?	2,2	2,0
b4067	yjcG	SSS	Prolin Transporter	2,3	1,0
b4077	gltP	DAACS	Glutamat oder Aspartat Transporter	2,3	4,4
b1800	yeaU	n.k.	Tartratdehydrogenase ?	1,1	2,9
b3528	dctA	DAACS	C ₄ -Dicarboxylat Transporter	0,5	1,2

Familie: BCCT, Betaine/Carnitine/Choline Transporter; CNT, Concentrative Nucleiside Transporter, DAACS, Dicarboxylate/Amino Acid:Cation Symporter; DME, Drug/Metabolite Exporter; MFS, Major Facilitator Superfamily; SSS, Solute:Sodium Symporter; n.k., nicht klassifiziert; ?, hypothetische Funktion

Aminosäure-Metabolite und ihrer toxischen Derivate (Jack *et al.*, 2001). Weiterhin sind ein potentieller Prolintransporter YjcG, der 3-Phenylpropionattransporter HcaT und ein potentieller Nucleosidtransporter YeiM in der aeroben Succinatzucht bei pH 6 der Mutante gegenüber Wildtyp stärker gebildet. Das Transportprotein YjcG ist ebenfalls ein guter Kandidat für alternative aerobe Succinattransporter, da Prolin ein Aminosäure ist, die ein ringförmiges Monocarboxylat darstellt. Die Expressionsmuster der Referenzgene *yeaU* und *dctA* zeigen, dass diese Analyse mit den Stämme MG1655 und IMW422 zuverlässig war.

4.5.2 Genexpressionsstudie mit *lacZ*-Reporterengenfusionen von Kandidatengen

Die Kandidatengene für alternative anaerobe Succinateffluxcarrier bzw. aerobe Succinat-
aufnahmecarrier aus den DNA-Microarray-Experimenten und Datenbank-Analysen wurden
hier durch β -Galaktosidase-Tests mit *lacZ*-Reporterengenfusionen überprüft. Dazu wurde
getestet, ob die Expressionen der Gene unter Bedingungen der Glucosefermentation erfolgt
oder mit C₄-Dicarboxylaten induziert wird (Tab. 22). Dazu wurden entsprechende
Promotorregionen der Kandidatengene in *lacZ*-Fusionsplasmide kloniert. Die β -
Galaktosidase-Aktivität dieser Fusionsplasmide wurde in MC4100 bestimmt.

Die Gene *ybhI*, *yhjX*, *yhiU* und *yjiO* waren die Kandidatengene für anaerobe
Succinateffluxcarrier, die aus der DNA-Microarray-Untersuchung erhalten wurden. Ihre *lacZ*-
Fusionen zeigten keine signifikante Expression unter den gesamten Zuchtbedingungen, d.h.
anaerobe Zucht mit Glucose oder Fumarat (Tab. 22). Die Expression des *focA*-Gens wurde
unter Anaerobiose und mit Di- und Monocarboxylaten induziert. Das *yfdV* Gen kodiert für
einen potentiellen sekundären Carrier, der zur AEC (Auxin Efflux Carrier)-Familie gehört.
Die Carrier dieser Familie kommen meistens in Pflanzen vor, ein Vertreter davon ist der
Auxin-Effluxcarrier PIN1 von *Arabidopsis thaliana*. Die homologen Carrier in Bakterien,
MdcF von *Klebsiella pneumoniae* und MleP von *Oenococcus oeni*, katalysieren den Transport
von Malonat bzw. Malat. Da die Promotorregion dieses Gens unbekannt war, wurden zwei
potentielle Bereiche zur Herstellung von *lacZ*-Reporterengenfusionen (*yfdV*-*lacZ* und *b2374*-
lacZ) verwendet. Die *b2374*-*lacZ*-Fusion zeigte Induktion mit Succinat und Fumarat. Das
Gen für den Acetoacetatcarrier AtoE zeigte unter keiner der Bedingungen signifikante
Expression. Die Expression des Gens *ygjU* (*sstT*), das ein Kandidatengens für aerobe
Succinat-
aufnahmecarrier darstellt, zeigte dagegen eine starke Induktion durch Succinat und
Fumarat unter aeroben Bedingungen. Dieses Gen kodiert für den Na⁺-Symporter YgjU (SstT),
der als Serintransporter charakterisiert wurde (Tab. 4, Ogawa *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2002).

Tab. 22. Die Expression der Kandidatengen für potentielle anaerobe bzw. aerobe Succinatcarrier (Expression von Plasmid). Die β -Galaktosidaseaktivität der *lacZ*-Fusionen der Kandidatengen wurde mit Plasmid pMW256 (*ybhI*-*lacZ*), pMW261 (*focA*-*lacZ*), pMW268 (*yhjX*-*lacZ*), pMW263 (*yhiU*-*lacZ*), pMW262 (*yjiO*-*lacZ*), pMW258 (*yfdV*-*lacZ*), pMW259 (*b2374*-*lacZ*), pMW257 (*atoE*-*lacZ*) und pMW254 (*ygjU*-*lacZ*) in *E. coli* MC4100 bestimmt. Die Zucht erfolgte in angereichertem M9-Minimalmedium mit den angegebenen Substraten (50mM) unter aeroben (O₂) bzw. anaeroben (N₂) Bedingungen. n., nicht durchgeführt

Zucht		Expression der <i>lacZ</i> -Reporterfusion [MU]								
		<i>ybhI</i>	<i>focA</i>	<i>yhjX</i>	<i>yhiU</i>	<i>yjiO</i>	<i>yfdV</i>	<i>b2374</i>	<i>atoE</i>	<i>ygjU</i>
							(<i>b2372</i>)			
LB	O ₂	0	1532	n.	n.	n.	n.	53	n.	n.
LB	N ₂	1	7142	n.	n.	n.	11	81	n.	n.
Glucose	O ₂	2	1164	4	2	2	n.	115	1	641
Glucose	N ₂	3	6360	8	2	1	2,5	38	5	n.
Succinat	O ₂	3	9932	5	n.	n.	12	165	13	2999
Fumarat	O ₂	8	10439	n.	7	3	1	195	8	1773
Fumarat + Glycerin	N ₂	7	10553	12	4	2	n.	114	9	n.
L-Tartrat	O ₂	4	n.	n.	n.	n.	n.	n.	4	n.
L-Tartrat + Glycerin	N ₂	5	n.	n.	n.	n.	n.	n.	4	n.
Pyruvat	O ₂	3	4399	n.	n.	n.	n.	n.	n.	n.
Pyruvat + Glycerin	N ₂	n.	6388	n.	n.	n.	n.	n.	n.	n.
Formiat	O ₂	n.	6940	n.	n.	n.	n.	n.	n.	2464
Formiat + Glycerin	N ₂	n.	7253	n.	n.	n.	n.	n.	n.	n.
Glucose + Fumarat	O ₂	n.	n.	n.	n.	n.	n.	155	n.	n.
Glucose + Fumarat	N ₂	n.	n.	n.	n.	n.	n.	40	n.	n.
Glucose + Succinat	O ₂	n.	n.	n.	n.	n.	n.	142	n.	n.
Glucose + Succinat	N ₂	n.	n.	n.	n.	n.	n.	43	n.	n.
Acetat	O ₂	n.	n.	n.	n.	n.	n.	n.	n.	2473

Die Expression der Gene, die von *lacZ*-Fusionsplasmiden signifikante Induktion zeigten (*focA*, *yfdV* und *ygjU*), wurde weiterhin nach dem Transfer der Fusion in das *E. coli*-Genom untersucht (Tab. 23). Dazu wurden die Fusionen *focA*-*lacZ*, *b2374*-*lacZ* bzw. *ygjU*-*lacZ* durch eine spezielle Transduktion mittels λ -Phagen in das Genom von *E. coli* MC4100 übertragen. Die Expression des *focA*-Gens nahm in der Glucosefermentation um den Faktor 3 im Vergleich zur aeroben Glucosezucht zu. Dies stimmt mit publizierten Werten überein (Sawers *et al.*, 1997).

Über 30% des Produkts der Glucosefermentation ist Formiat. Wenn sich Formiat in der Zelle anhäuft, muss es durch die Formiatdehydrogenase umgesetzt oder durch FocA exportiert werden (Suppmann & Sawers, 1994). Unter anaeroben Bedingungen zeigte das Gen mit Formiat bzw. Fumarat die höchste Expression, gefolgt vom Wachstum auf Pyruvat. Da FocA neben seinem Formiatefflux auch eine Formiataufnahme katalysieren kann, wird das Gen mit Formiat unter Anaerobiose und Aerobiose induziert. Außerdem liegt das Gen *focA* mit *pfl* (Gen für Pyruvat-Formiat-Lyase) in einem Operon, daher war seine Expression in anaerober Pyruvatzucht vergleichbar mit der Glucosefermentation. Diese Ergebnisse zeigten, dass der Carrier FocA in seinem Expressionsverhalten ein guter Kandidat für einen alternativen anaeroben Succinateffluxcarrier ist, da FocA in der Glucosefermentation stark exprimiert ist und seine Expression in der Fumaratatmung vergleichbar wie in der anaeroben Formiatzucht erfolgte. Die Expression des Gens *yfdV* hat unter Aerobiose zugenommen. Sie war mit Pyruvat am stärksten. Da die Carrier der AEC-Familie in Bakterien Malonat- oder Malattransporter darstellen, könnte die Funktion von YfdV der aerobe Transport von Pyruvat, Malonat oder C₃-Di- oder C₃-Monocarboxylate sein.

Für die Expression des *ygjU* Gens waren Fumarat und Citrat die stärkeren Induktoren gegenüber Serin oder Threonin, obwohl das Protein als Na⁺/Serin(Threonin)-Symporter gilt (Ogawa *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2002). Sauerstoff hat scheinbar keinen besonderen Einfluss auf die Expression. In der aeroben Succinatzucht wurde dieses Gen ähnlich wie mit Serin und Threonin exprimiert. Aus seiner niedrigen Expression in der aeroben Glucosezucht und der Induktion in der Carboxylatzucht einschließlich des aeroben Succinatzucht kann der Carrier YgjU als ein Kandidat für aeroben Succinataufnahmecarrier zählen. Außerdem ist seine Na⁺-abhängige Aufnahmeaktivität (Ogawa *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2002) im Einklang mit der Hemmung durch Entkoppler für die aerobe Succinataufnahme bei pH 6 (Janausch *et al.*, 2001).

Tab. 23. Die Expression der Kandidatengen für anaerobe bzw. aerobe Succinatcarrier (Expression von Genom). Die β -Galaktosidaseaktivität der *lacZ*-Fusionen der Kandidatengen wurde in IMW426 (*focA*'-*lacZ*), IMW435 (*b2374*'-*lacZ*) und IMW418 (*ygjU*'-*lacZ*) bestimmt. Die Zucht erfolgte in angereichertem M9-Minimalmedium mit den angegebenen Substraten (50mM) unter aeroben (O₂) bzw. anaeroben (N₂) Bedingungen. n., nicht durchgeführt

Zucht		Expression der <i>lacZ</i> -Reporterfusion [MU]		
		<i>focA</i> '- <i>lacZ</i>	<i>b2374</i> '- <i>lacZ</i>	<i>ygjU</i> '- <i>lacZ</i>
LB	O ₂	83	16	13
LB	N ₂	354	20	21
Glucose	O ₂	63	21	13
Glucose	N ₂	208	6	14
Succinat	O ₂	104	22	47
Fumarat	O ₂	105	21	61
Fumarat + Glycerin	N ₂	271	14	111
Pyruvat	O ₂	119	39	n.
Pyruvat + Glycerin	N ₂	209	10	n.
Formiat	O ₂	209	24	n.
Formiat + Glycerin	N ₂	270	n.	n.
Oxalat	O ₂	n.	12	n.
Citrat	O ₂	n.	n.	132
Citrat + Glycerin	N ₂	n.	n.	96
Serin	O ₂	n.	n.	13
Serin + Glycerin	N ₂	n.	n.	42
Threonin	O ₂	n.	n.	38
Threonin + Glycerin	N ₂	n.	n.	21

4.5.3 Physiologische Charakterisierung der Deletionsmutanten der Succinatcarrier

Die physiologische Funktion der Kandidaten für anaerobe bzw. aerobe Succinatcarrier wurde untersucht. Dazu wurden die Kandidatengene neben bekannten C₄-Dicarboxylatcarrierengen (*dctA dcuA dcuB dcuC*) nach Datsenko & Wanner (Datsenko & Wanner, 2000, Ney, 2003) deletiert. Das physiologische Verhalten dieser Fünffachmutanten (*dctA dcuA dcuB dcuC Kandidatengen*) wurde durch Wachstumsexperimente und Messung der Produkte der

Glucosefermentation untersucht. Die Fünffachmutante, in der jeweils ein Kandidatengen (*xasA*, *ydgR*, *yhjX*, *yhjX*, *brnQ* und *yhiM*) neben *dct*- und *dcu*-Genen inaktiviert wurde, und die *dct dcu*-Mutante IMW425, zeigten keine signifikanten Unterschied beim Wachstum durch Glucosefermentation (Ney, 2003). Die Succinatbildung während der Glucosefermentation zeigte in der Fünffachmutante ebenso keine Änderungen (Tab. 24). Die Succinatbildung von Enterobakterien in der gemischten Säuregärung beträgt bis zu 0,2 Mol / Mol Glucoseverbrauch (Zientz *et al.*, 1999; Janausch *et al.*, 2002), und der *E. coli*-Wildtyp AN387 bildet ca. 0,2 Mol / Mol Glucoseverbrauch in der Glucosefermentation (Tab. 17). Jedoch war die Succinatbildung der hier untersuchten Mutanten einschließlich des Ausgangsstamms MG1655 niedrig (0,1 Mol / Mol Glucoseverbrauch) (Tab. 24).

Weiterhin wurde die Succinatbildung der Carriermutanten in Zellsuspensionen untersucht (Tab. 25). Dazu wurde in MOPS-Medium Zellsuspensionen der Bakterien nach anaerober Glucosezucht hergestellt. Nach 10- bzw. 30-minütiger Inkubation mit Glucose wurden Proben entnommen und die gebildete Succinatmenge wurde durch HPLC analysiert. Aus der gebildeten Succinatmenge und der Zelldichte wurde die Succinat-Effluxaktivität berechnet (Tab. 25). Die Succinateffluxaktivität der Stämme in IMW494 (*dctA dcuA dcuB dcuC ΔybiO*) und IMW455 (*dctA dcuA dcuB dcuC ΔfocA*) war niedriger als in den anderen Stämmen. Bei diesen handelt es sich um Fünffachmutanten, denen neben den *dct dcu*-Genen zusätzlich *xasA* oder *ydgR* fehlte. Sie besaßen die gleiche Succinateffluxaktivität wie der Wildtyp und die Vierfachmutante. Eine erniedrigte Succinatbildung wurde in den Stämmen mit Deletion des *ybiO* bzw. *focA*-Gens gefunden. Das weist darauf hin, dass Succinat in Abwesenheit der Dcu-Carrier durch den Formiateffluxcarrier FocA und den Ionen-Kanal YbiO abgegeben wurde. Bei YbiO handelt sich um einen potentiellen Ionen-Kanal, der zu der MscS-Familie (small conductance mechanosensitive ion channel) gehört. Die Ionen-Kanäle dieser Familie transportieren bevorzugt Anionen und werden durch die elektrische Spannung reguliert. Diese Kanäle öffnen sich durch Depolarisation und spielen bei der Osmoregulation eine Rolle (Paulsen, 1998). Da in der Glucosefermentation viele organische Anionen (Succinat, Lactat,

Tab. 24. Produkte der Glucosefermentation von Wildtyp, der *dcu*-Mutante und den zusätzlichen Carriermutanten. Die Zucht erfolgte in angereichertem M9-Minimalmedium mit 25 mM Glucose unter anaeroben Bedingungen. Während der Zucht wurden Proben entnommen. Die Fermentationsprodukte wurden durch HPLC analysiert.

Stamm Genotyp	Zeit (h)	Glucose- verbrauch (mM)	Fermentationsprodukte (Mol / Mol Glucose)					C- Bilanz (%)
			Succinat	Laktat	Acetat	Formiat	Ethanol	
MG1655	8,3	12,9	0,09	0,26	0,68	1,12	0,64	82
Wildtyp	21,8	25,7	0,13	0,76	0,46	0,52	0,44	85
IMW424	9,5	11,3	0,09	0,23	0,70	1,22	0,73	85
<i>dctA dcuA dcuB</i>	23	24,5	0,11	0,76	0,46	0,64	0,52	88
IMW425	9,5	11,9	0,084	0,18	0,62	1,09	0,67	76
<i>dctA dcuA dcuB</i> <i>dcuC</i>	23	26,3	0,09	0,61	0,37	0,55	0,42	72
IMW495	9,5	10,7	0,11	0,35	0,75	1,29	0,83	98
<i>dctA dcuA dcuB</i> <i>dcuC ΔxasA</i>	23	23,4	0,11	0,77	0,46	0,65	0,53	90
IMW496	9,5	12,3	0,09	0,19	0,65	1,2	0,75	82
<i>dctA dcuA dcuB</i> <i>dcuC ΔydgR</i>	23	24,7	0,11	0,76	0,45	0,62	0,54	88
IMW454*	9	19,6	0,08	0,4	0,7	1,3	0,7	95
<i>dctA dcuA dcuB</i> <i>dcuC ΔyjhX</i>	22,25	27,9	0,08	0,7	0,6	0,6	0,6	105
IMW455*	9	17,3	0,08	0,5	0,7	1,2	0,7	98
<i>dctA dcuA dcuB</i> <i>dcuC ΔfocA</i>	22,5	27,3	0,10	0,8	0,5	0,4	0,7	100
IMW460*	23	27,2	0,09	0,5	0,6	0,3	0,6	90
<i>dctA dcuA dcuB</i> <i>dcuC ΔbrnQ</i>								
IMW471*	9	13,8	0,08	0,1	0,8	1,3	0,7	83
<i>dctA dcuA dcuB</i> <i>dcuC ΔyhiM</i>	23	28,1	0,10	0,7	0,7	0,4	0,6	103

*, Werte von Ney (2003), Das Medium enthielt zusätzliche Aminosäuren (Angereichertes M9-Medium).

Acetat und Formiat) entstehen, könnte die mehrfache Ausschaltung von Carriern osmotische und elektrische Probleme der Zelle auslösen. Es gibt in Pflanzen einen Anionen-spezifischen Kanal, der induzierbar und für Dicarboxylate selektiv durchlässig ist (Reumann *et al.*, 1998). Daher ist es auch denkbar, dass ein Teil Succinat in der Dcu-Mutante durch YbiO abgegeben werden konnte.

Tab. 25. Bestimmung der Succinateffluxaktivität (U/g TG) während der Glucosefermentation in Zellsuspension. Die Bakterien wurden unter anaeroben Bedingungen in M9-Medium mit Glucose gezüchtet, in der spät-logarithmischen Phase geerntet und in MOPS-Medium zu OD₅₇₈ 5-7 resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit 10 mM Glucose bei 30°C inkubiert. Die Succinateffluxaktivität wurde anhand der Succinatbildung zwischen 10 min und 30 min berechnet. Die Bestimmung der Succinatbildung erfolgte durch HPLC.

Stamm Genotyp	Succinateffluxaktivität (U/g TG)
MG1655 Wildtyp	17,5
IMW424 <i>dctA dcuA dcuB</i>	18,8
IMW425 <i>dctA dcuA dcuB dcuC</i>	17,5
IMW494 <i>dctA dcuA dcuB dcuC ΔybiO</i>	14,3
IMW495 <i>dctA dcuA dcuB dcuC ΔxasA</i>	19,6
IMW496 <i>dctA dcuA dcuB dcuC ΔydgR</i>	18,5
IMW455 <i>dctA dcuA dcuB dcuC ΔfocA</i>	11,0*

Succinateffluxaktivität (U/g TG) = Succinatbildung (μM) / [Zeit (min) · g TG/L]

OD₅₇₈ 1 ≈ 280 mg TG/L

*, Werte von Ney J. (2003), Effluxaktivität wurde anhand der Succinatbildung zwischen 5 und 15 min durch Zellsuspension von OD₅₇₈ 13 bestimmt.

In der Tab. 26 ist die Charakterisierung weiterer C₄-Dicarboxylatcarrier zusammengefaßt. Die Kandidatengene der alternativen Succinatcarrier aus der DNA-Microarray- und Datenbank-Analyse wurden genetisch und physiologisch untersucht. Der Formiateffluxcarrier FocA und ein Ionen-Kanal YbiO waren vermutlich die alternativen anaeroben Succinatexporter, der in der *dcu*-Mutante eine weitere Ausscheidung des Succinats ermöglichte. YeiH kann wegen seiner vorgeschlagene Funktion als eine Efflux-Pumpe als ein guter Kandidat für den Succinatexporter zählen.

Von den Kandidatencarrier für aerobe Succinataufnahme wurde nur der YgjU-Carrier physiologisch untersucht. YgjU wurde zu der Fünffachmutante (*dctA dcuA dcuB dcuC ΔygjU*) konstruiert und durch aerobes Wachstum auf Succinat bei pH 6 untersucht, zeigte aber unter diesen Bedingungen keine bedeutende Schwächung des Wachstums (Ney, 2003). YjcG, GltP und YfdV sind die guten Kandidaten für den alternativen Succinatcarrier, der in der *dct*-Mutante für das aerobe Wachstum auf Succinat bei pH 6 verantwortlich ist. Da die Expressionsstudie mit dem Gen *yfaV* in Kap. 4.4.3 die Möglichkeit als ein weiterer C₄-Dicarboxylatcarrier unter aeroben und anaeroben Bedingungen gezeigt wurde (Kap. 4.4.3), kann YfaV auch als ein Kadidat für den aeroben Succinatcarrier zählen.

Tab. 26. Kandidatengene für alternative anaerobe und aerobe Succinatcarrier von *E. coli* und die Ergebnisse der Untersuchungen.

Kandidatengene für alternative anaerobe Succinateffluxcarrier									
Gen		Protein				DNA-Microarray	β -Galaktosidase-Test	Untersuchung mit der Deletionsmutante	
B Nr.	Name	Substrat	Familie	Größe (As)	TM			Wachstum	Succinatefflux
b0401	brnQ	Leu., Val., Ile	LIVCS	439	12	+	n.d.	-	n.d.
b0770	ybhI	Tricarboxylat ?	DASS	437	15	+	-	n.d.	n.d.
b0808	ybiO	Anion ?	MscS	741	11	+	n.d.	n.d.	+
b0904	focA	Formiat	FNT	285	6	+	+	+	+
b1492	xasA	Glutamat / 4-Aminobutyrat	APC	511	12	+	n.d.	-	-
b1634	ydgR	Oligopeptid ?	POT	500	14	+	n.d.	-	-
b2158	yeiH	?	n.k.	349	9	+	n.d.	n.d.	n.d.
b2223	atoE	Acetoacetat	MFS	440	9	-	-	n.d.	n.d.
b2372	yfdV	Malat ? Malonat ?	AEC	314	10	-	+/-	n.d.	n.d.
b3063	ygjE	Tartrat / Succinat	DASS	487	12	-	-	n.d.	n.d.
b3491	yhiM	?	n.k.	364	10	+	n.d.	-	n.d.
b3513	yhiU	Mulidrug ?	lipoproteinanchor	385	0	+	-	n.d.	n.d.
b3547	yhjX	Oxalat / Formiat ?	MFS	402	12	+	-	-	n.d.
b4337	yjiO	Mulidrug ?	MFS	410	12	+	-	n.d.	n.d.
b4138	dcuA	C ₄ -Dicarboxylat	Dcu	433	11	+	+	n.d.	n.d.
b4123	dcuB	C ₄ -Dicarboxylat	Dcu	446	11	+	+	n.d.	n.d.
b0621	dcuC	C ₄ -Dicarboxylat	DcuC	461	12	+	+	n.d.	n.d.

Kandidatengene für alternative aerobe Succinataufnahmecarrier									
Gen		Protein				DNA-Microarray	β -Galaktosidase-Test	Wachstumstest mit der Deletionsmutante	
B Nr.	Name	Substrat	Familie	Größe (As)	TM			Wachstum	Deletionsmutante
b1801	yeaV	Tartrat ?	BCCT	481	10	-	+	n.d.	
b2246	yfaV	C ₄ -Dicarboxylat ?	MFS	442	12	+	+	n.d.	
b2536	hcaT	3-Phenylpropionat ?	MFS	379	12	+	n.d.	n.d.	
b3089	ygjU	Serin ?	DAACS	414	8	-	+	-	
b3827	yigM	Drug, Metabolit ?	DME	299	10	+	n.d.	n.d.	
b4067	yjcG	Prolin ?	SSS	549	13	+	n.d.	n.d.	
b4077	gltP	Glutamat, Aspartat	DAACS	437	10	+	n.d.	n.d.	
b3528	dctA	C ₄ -Dicarboxylat	DAACS	428	8	-	+	n.d.	

TM: Anzahl der Transmembrandomäne (TMHMM Server version 2.0) ;Familie: AEC, Auxin Efflux Carrier; APC, Amino Acid-Polyamine-Organocation; BCCT, Betaine/Carnitine/ Choline Transporter; DAACS, Dicarboxylate/Amino Acid:Cation Symporter; DASS, Divalent Anion:Na⁺ Symporter; Dcu, C₄-Dicarboxylate Uptake; DME, Drug/Metabolite Exporter; FNT, Formate-Nitrite Transporter; LIVCS, Branched Chain Amino Acid:Cation Symporter; MFS, Major Facilitator Superfamily; MscS, Small Conductance Mechanosensitive Ion Channel; POT, Proton-dependent Oligopeptide Transporter; SSS, Solute:Sodium Symporter; n.k., nicht klassifiziert; n.d., nicht durchgeführt; ?, hypothetisches Substrat; +, induziert bzw. Transportaktivität vorhanden; -, nicht induziert bzw. Transportaktivität nicht vorhanden

5 Diskussion

5.1 C₄-Dicarboxylatcarrier von *Escherichia coli*

Transport-Systeme spielen eine essentielle Rolle im Zellstoffwechsel. Transporter sind notwendig für die Akquisition der organischen Nährstoffe, das Aufrechterhalten der ionischen Homöostase, den Export toxischer Abfallstoffe und für die Zell-Kommunikationen. Die Klassifikation der Transporter basiert auf den verwendeten Transportmodi und Mechanismen der Energie-Kopplung, der molekularen Phylogenie und Substrat-Spezifität (Paulsen *et al.*, 2000). Transporter werden bezüglich der Energie-Kopplungsmechanismen in vier Klassen eingeteilt: Kanäle, primär aktive Transporter, sekundäre Transporter und Gruppen-Translokatoren (Saier, 2000). *E. coli* besitzt insgesamt 345 Transporter, und 231 Transporter (66 %) davon gehören zu den sekundären Transportern. Von den sekundären Transportern sind in 51 Familien bekannt (Paulsen, 1998). Carrier innerhalb einer Familie transportieren meist ähnliche Substrate. Für ein Substrat sind in *E. coli* und anderen Bakterien häufig mehrere Carrier vorhanden (Janausch, 2001). Primärer Transport wird mit der freien Energie, die durch die Hydrolyse des ATP freigesetzt wird, getrieben. Dagegen benutzen sekundäre Transporter für den Substrattransport die freie Energie von elektrochemischen Protonen- oder Natriumionen-Gradienten über der Membran (Lolkema *et al.*, 1998). Der C₄-Dicarboxylattransport des anaeroben Stoffwechsels sollte wegen der geringen Energieausbeute des anaeroben C₄-Dicarboxylatstoffwechsels (< 1 ATP / C₄-Dicarbonsäure) durch sekundäre Carrier katalysiert werden.

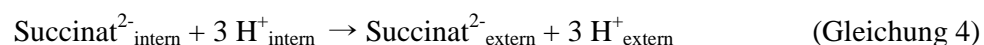
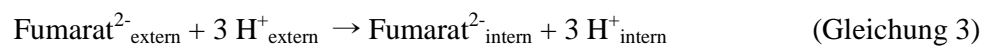
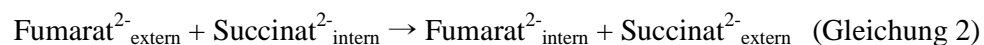
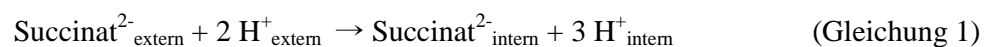
E. coli besitzt verschiedene C₄-Dicarboxylatcarrier, die für verschiedene Stoffwechselsituationen genutzt werden. Die bekannten C₄-Dicarboxylatcarrier sind DctA, DcuA, DcuB, DcuC und CitT (Kay *et al.*, 1971; Golby *et al.*, 1998; Davies *et al.*, 1999; Engel *et al.*, 1992, 1994; Six *et al.*, 1994; Zientz *et al.*, 1996, 1999; Pos *et al.*, 1998). Diese Carrier gehören zu den DAACS-, Dcu-, DcuC- und DASS-Carrierfamilien. In *E. coli* finden sich ein potentielles weiteres C₄-Dicarboxylattransportsystem aus der TRAP-T-Familie (Tripartite ATP-

independent periplasmic transporter), das homolog zu DctPQM von *Rhodobacter capsulatus* ist (Forward *et al.*, 1997).

Der aerobe DctA-Carrier der DAACS-Familie katalysiert die Aufnahme von C₄-Dicarboxylaten hauptsächlich im Symport mit H⁺-Ionen (Gleichung 1). Der K_m-Wert für C₄-Dicarboxylate beträgt 10 - 30 µM und V_{max} 25 – 50 U/g TG (Unden & Kleefeld, 2004).

Die anaeroben DcuA- und DcuB-Carrier der Dcu-Familie kommen nur in anaeroben und fakultativ anaeroben Bakterien vor, in denen Fumaratatmung stattfindet. DcuA und DcuB katalysieren hauptsächlich den elektroneutralen Fumarat/Succinat-Antiport (Gleichung 2), können aber auch Aufnahme und Efflux von C₄-Dicarboxylaten katalysieren. DcuB ist der Hauptcarrier für den Fumarat/Succinat-Antiport in der Fumaratatmung. Der K_m-Wert für Fumarat und Succinat für Antiport und Aufnahme beträgt ca. 100 µM. Die Aufnahme erfolgt im Symport mit H⁺-Ionen (Gleichung 3) und ist vom Protonenpotential abhängig (Unden & Kleefeld, 2004).

Carrier der DcuC-Familie befinden sich in Bakterien, die eine Hexose-Fermentation durchführen und Succinat bilden (Unden & Kleefeld, 2004). Die Hauptfunktion des anaeroben DcuC-Carriers ist der Efflux von C₄-Dicarboxylaten (Zientz *et al.*, 1996; 1999). DcuC katalysiert den Efflux von Succinat im Symport mit H⁺-Ionen (Gleichung 4), wodurch ein Membranpotential generiert wird (Unden & Kleefeld, 2004). DcuC kann aber auch die Aufnahme und den Gegentauch von C₄-Dicarboxylaten katalysieren (Zientz *et al.*, 1996, 1999). DcuD von *E. coli* ist ein weiterer potentieller Transporter der DcuC-Familie, das *dcuD*-Gen scheint jedoch ein stilles Gen zu sein (Janusch *et al.*, 1999).



Die biologische Funktion des CitT-Carriers der DASS-Familie ist der heterologe Gegentauch von externem Citrat gegen internes Succinat in der Citratfermentation (Pos *et al.*, 1998). CitT gehört zu einer Untergruppe „carboxylate/C₄-dicarboxylate antiporter“ der DASS-Familie.

Carrier dieser Familie befinden sich in Eukaryonten und Bakterien und katalysieren den Gegentausch von Di- oder Tricarboxylaten (Janausch *et al.*, 2002).

In dieser Arbeit können einige neue Transporter als alternative C₄-Dicarboxylatcarrier von *E. coli* eingeordnet werden (Abb. 25). TtdT (früher YgjE) ist ein strikt anaerober Carrier und katalysiert den L-Tartrat/Succinat-Antiport elektroneutral. Der Formiateffluxcarrier FocA, ein Ionen-Kanal YbiO und eine unbekannte Efflux-Pumpe YeiH sind potentielle weitere Kandidaten für anaerobe Transporter, die Succinat in der *dct dcu*-Mutante während der Glucosefermentation ausscheiden. YfaV ist vermutlich ein C₄-Dicarboxylatcarrier, der unabhängig von der Anwesenheit oder Abwesenheit von Sauerstoff gebildet wird. YeaV ist ein strikt aerober Carrier, der vermutlich den Transport von L- und meso-Tartrat katalysieren

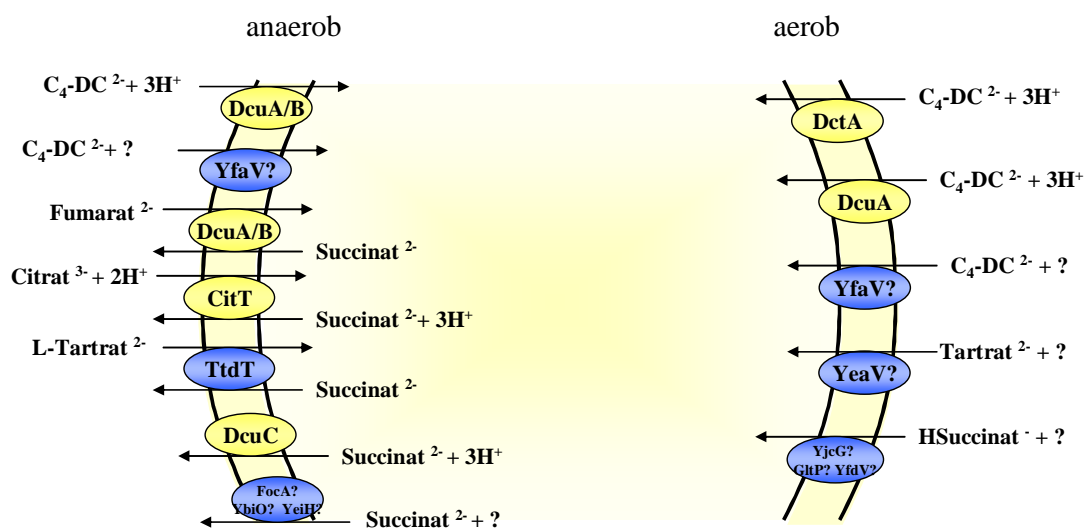


Abb. 25. Die aeroben und anaeroben C₄-Dicarboxylatcarrier von *E. coli*. Unter anaeroben Bedingungen werden die Aufnahme, Gegentauch und Efflux der C₄-Dicarboxylate durch Dcu Carrier katalysiert. Davon ist DcuB für den Fumarat/Succinat-Antiporter und DcuC für Succinatefflux spezialisiert. CitT ist der Citrat/Succinat-Antiporter. YfaV katalysiert vermutlich die Aufnahme von C₄-Dicarboxylaten unter aeroben und anaeroben Bedingungen. TtdT (YgjE) ist der L-Tartrat/Succinat-Antiporter. FocA, YbiO und YeiH sind die Kandidaten für den alternativen anaeroben Transporter, der Succinat in der *dct*-Mutante ausscheidet. Unter aeroben Bedingungen erfolgt die Aufnahme von C₄-Dicarboxylaten hauptsächlich durch DctA. YeaV ist ein potentieller aerober Tartrattransporter. YjcG, GltP und YfdV sind weitere alternative Succinatcarrier, die die Aufnahme von Succinat in der *dct*-Mutante bei saurem pH-Wert katalysieren. Die bekannten Carrier sind in gelb und die neuen Carrier in blau dargestellt. C₄-DC, C₄-Dicarboxylate

kann. Der Glutamattransporter GltP, der vermutliche Acetattransporter YjcG und ein potentieller Di- oder Monocarboxylattransporter YfdV sind einschließlich des YfaV gute Kandidaten für den alternativen aeroben Succinatcarrier, der die Succinataufnahme unter pH 6 in der *dct dcu*-Mutante ermöglicht.

5.1.1 Anaerober Tartratcarrier TtdT (YgjE) von *E. coli*

Das Gen *ygjE* liegt in einem offenen Leserahmen im *E. coli*-Genom (3206046 bis 3207509 bp) in der Nachbarschaft der Gene *ttdA*, *ttdB* und *ygiP* (Abb. 26), und bildet zusammen mit diesen Genen ein Operon. Die Gene *ttdA* und *ttdB* kodieren für die L-Tartratdehydratase, die die Umwandlung von L-Tartrat zu Oxalacetat in der L-Tartratfermentation katalysiert. Das Gen *ygiP* kodiert für einen Tartrat-spezifischen Regulator vom LysR-Typ. Das Gen *ygjE* kodiert für einen Transporter YgjE von 487 Aminosäuren, der 12 Transmembranhelices besitzt. Der Carrier YgjE ist für das anaerobe Wachstum von *E. coli* auf L-Tartrat plus Glycerin notwendig (Kap. 4.3.2). YgjE katalysiert als L-Tartrat/Succinat-Antiporter den Transport von L-Tartrat und Succinat (Kap. 4.3.3). V_{\max} für D,L-Tartrat des *ygjE*⁺-Stamm IMW528 (*dcuA dcuB dcuC citT*) beträgt 110 U/g TG, der K_m -Wert 700-1000 μM , V_{\max} für Succinat dagegen 16-17 U/g TG mit einem K_m -Wert von 380-400 μM . Die Anfangsgeschwindigkeit der Aufnahme in Anwesenheit von 100 μM D,L-Tartrat bzw. 100 μM Succinat in IMW528 ist 12 U/g TG bzw. 2,0 U/g TG. Die Succinataufnahme von YgjE wird durch L-Tartrat kompetitiv gehemmt (Kap. 4.3.3). L-Tartrat hemmt die Succinataufnahme in dem *ygjE*⁺-Stamm IMW528 zu 85 %, Succinat nur zu 40 %. D- und meso-Tartrat zeigen fast keinen Einfluß auf die Succinataufnahme. YgjE katalysiert die Aufnahme von Tartrat effektiver als Succinat, da für YgjE als L-Tartrat/Succinat-Antiporter die Aufnahme von Succinat eine unphysiologische Transportrichtung darstellt. YgjE besitzt eine Gegentauschaktivität von $\text{Tartrat}_{\text{ex}}/\text{Succinat}_{\text{in}}$ von 2,64 U/g TG in IMW528, aber keine Aktivität in der umgekehrten Richtung, $\text{Succinat}_{\text{ex}}/\text{Tartrat}_{\text{in}}$. Succinat- oder Tartrattransport durch YgjE ist von dem Membranpotential Δp und dem Protonengradienten ΔpH unabhängig.

Der anaerobe Transport für L-Tartrat erfolgt durch YgjE, von D-Tartrat aber durch die Dcu-Carrier (Kap. 4.3.2). In der *ygiE*-Mutante IMW529 fällt die Succinataufnahme fast aus, die Aufnahme des D,L-Tartrat ist jedoch nicht schwächer als von dem *ygiE*⁺-Stamm IMW528. Es wird eine Existenz eines weiteren Carriers vermutet, der die Aufnahme von Tartrat, aber nicht von Succinat katalysieren kann. Der Transport dieses weiteren Carriers ist abhängig von dem Protonengradienten (Kap. 4.3.3).

Insgesamt kann man feststellen, dass der sekundäre Carrier YgjE von *E. coli* der L-Tartrat/Succinat-Antiporter ist, der für die L-Tartratfermentation *in vivo* absolut benötigt wird. Seine Funktion kann *in vivo* nicht durch die Dcu-Carrier oder andere Carrier ersetzt werden. Seine Funktion kann *in vivo* nicht durch die Dcu-Carrier oder andere Carrier ersetzt werden. Das Gen *ygiE* bildet mit dem *ttdAB*-Genen ein Operon (*ttdABT*) und kodiert für den Tartrat/Succinat-Antiporter. Das Gen und das Protein sollten deshalb in *ttdT* bzw. TtdT umbenannt werden (Abb. 26).

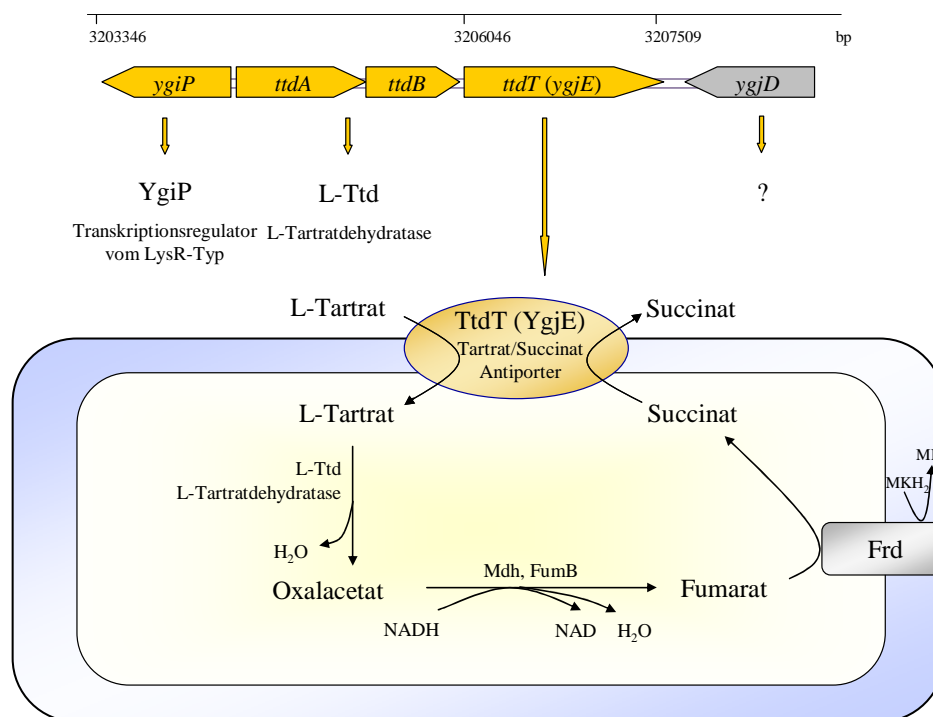


Abb. 26. L-Tartrat-Gencluster und der anaerobe Stoffwechsel in *E. coli*.

Frd, Fumaratreduktase; FumB, (anaerobe) Fumarase; Mdh, Malatdehydrogenase; MK, Menachinon; L-Ttd, L-Tartratdehydratase

TtdT gehört zu der „carboxylate/C₄-dicarboxylate antiporter“-Familie, die einer Untergruppe der DASS-Familie (divalent anion:Na⁺ symporter) zu zuordnen ist (Saier, 1998; Jansusch *et al.*, 2002; Prakash *et al.*, 2003). Gut charakterisierte Carrier dieser Familie sind der Citrat/Succinat-Antiporter CitT von *E. coli* und der 2-Oxoglutarat/Malat-Translocator SOT1 von *Spinacia oleraceae* (Spinat). TtdT (YgjE) besitzt eine 45 %-ige Identität zu CitT von *E. coli* und eine 37%-ige Identität zu SOT1 von *S. oleraceae* (Tab. 27; Abb. 27). CitT von *E. coli* katalysiert den heterologen Gegentausch von Citrat gegen Succinat in der Citratfermentation (Pos *et al.*, 1998). Citrat, Fumarat oder Tartrat können neben Succinat als Gegentauschsubstrate fungieren. Der 2-Oxoglutarat/Malat-Translocator SOT1 katalysiert die Aufnahme von 2-Oxoglutarat im Gegentausch gegen stromales Malat für die Glutaminsynthese in Chloroplasten (Weber *et al.*, 1995). Statt Malat können auch Succinat, Fumarat oder 2-Oxoglutarat in der Transportmessung der Aufnahme von 2-Oxoglutarat auch als Gegentauschsubstrat exportiert. In der L-Tartratfermentation von *E. coli* wird Succinat als Endprodukt gebildet (Abb. 26). Der heterologe Gegentausch von L-Tartrat gegen Succinat

Tab. 27. Die YgjE-ähnlichen Carrier der DASS-Familie. Die Sequenzvergleich wurde anhand von dem Programm Clustal W erstellt (Thompson *et al.* 1994).

Protein Name	SwissProt Nr.	Organismus	Länge (As.)	TM	Identität mit YgjE (%)	Funktion	Referenz
TtdT (YgjE)	P39414	<i>E. coli</i>	487	12	100	Tartrat/Succinat Antiporter	Diese Arbeit
CitT	P77405	<i>E. coli</i>	487	13	45	Citrat/Succinat Antiporter	Pos <i>et al.</i> , 1998
YbhI	P75763	<i>E. coli</i>	477	15	40	Tricarboxylat Transporter ?	-
HI0020	Q57048	<i>H. influenzae</i>	479	13	40	Citrat/Succinat Antiporter ?	-
YfiS	O34726	<i>B. subtilis</i>	478	12	38	Malat Transporter ?	Tanaka <i>et al.</i> , 2003
SOT1	Q41364	<i>S. oleraceae</i>	569	13	37	2-Oxoglutarat/Malat Antiporter	Weber <i>et al.</i> , 1995

E. coli, *Escherichia coli*; *H. influenzae*, *Haemophilus influenzae*; *B. subtilis*, *Bacillus subtilis*; *S. oleraceae*, *Spinacia oleraceae*; ?, postulierte Funktion

von TtdT (YgjE) ist im Einklang damit, dass Carrier innerhalb einer Familie meist ähnliche Substrate mit ähnlichen Transportmodi transportieren (Paulsen *et al.*, 2000).

YbhI von *E. coli* weist 40 %-ige Identität zu TtdT (YgjE) auf und ist ein möglicher Tricarboxylatcarrier. Das Gen *ybhI* wird aber nicht durch C₄-Dicarboxylate induziert (Kap. 4.5.2), eine Induktion durch Tricarboxylate wurde noch nicht getestet. HI0020 von *H. influenzae* weist 40 %-ige Identität zu TtdT (YgjE) auf. Trotz seiner hohen Sequenzähnlichkeit mit SOT1 wird HI0020 wie CitT als ein Citrat/Succinat-Antiporter vorgeschlagen, weil das Gen HI0020 im Genom in direkter Nachbarschaft zu dem Gen für Citratlyase liegt (Pos *et al.*, 1998). YfIS von *B. subtilis* weist eine 38 %-ige Identität zu TtdT (YgjE) auf und ist ein potentieller Malattransporter (Tanaka *et al.*, 2003).

Die Aminosäuren R₁₂₄, R₁₆₁, R₁₈₇, K₂₆₃, R₂₈₅, E₂₈₆ und D₃₃₀ von TtdT(YgjE) sind in den anderen Carriern der „carboxylate/C₄-dicarboxylate antiporter“-Familie konserviert (Abb. 27). Die Reste R₁₂₄ und D₃₃₀ liegen möglicherweise in cytoplasmatischen Domänen (grüne Balken) und die Reste R₁₆₁, R₁₈₇, K₂₆₃, R₂₈₅ und E₂₈₆ in periplasmatischen Domänen (blaue Balken) von TtdT. Neben diesen sehr stark konservierten Aminosäureresten sind die Reste R₂₃, R₁₇₁, D₁₈₃, R₂₈₅ und D₃₂₉ konserviert ausgetauscht. Diese geladenen konservierten Aminosäurereste von TtdT könnten bei der Erkennung und Bindung der Substrate eine Rolle spielen.

5.1.2 Aerober Tartratcarrier YfaV und YeaV von *E. coli*

Die sekundären Carrier YeaV und YfaV wurden wegen ihrer Phylogenie, Substratspezifität oder Genorganisation neben YgjE als Kandidaten für Tartratcarrier ausgewählt (Kap. 4.1). Wegen des vermutlichen Symportmodus sind YeaV und YfaV Kandidaten für die aerobe Tartrataufnahme. Trotz der Sequenzähnlichkeit zu Betain-, Cholin- und Carnitintransportern könnte YeaV wegen der direkten Nachbarschaft zu Genen des Tartratstoffwechsels, insbesondere *yeaU*, für einen Tartratcarrier kodieren (Kap. 4.1; Kap. 4.4). YeaU weist eine signifikante Homologie zu Tartratdehydrogenasen oder Tartratdecarboxylasen anderer

Bakterien auf (Abb. 28). Q8ZDR0 ist eine potentielle Tartratdehydrogenase von *Yersinia pestis* und besitzt eine 81 %-ige Sequenzidentität zu YeaU. Die Tartratdehydrogenase TuuC von *Pseudomonas putida* ist multifunktionell und katalysiert neben der Oxidation von L-Tartrat zu Oxalglykolat auch die Umsetzung des meso-Tartrat zu D-Glycerat und die oxidative Decarboxylierung des Malat zu Pyruvat (Tipton & Beecher, 1994; Karsten *et al.*,

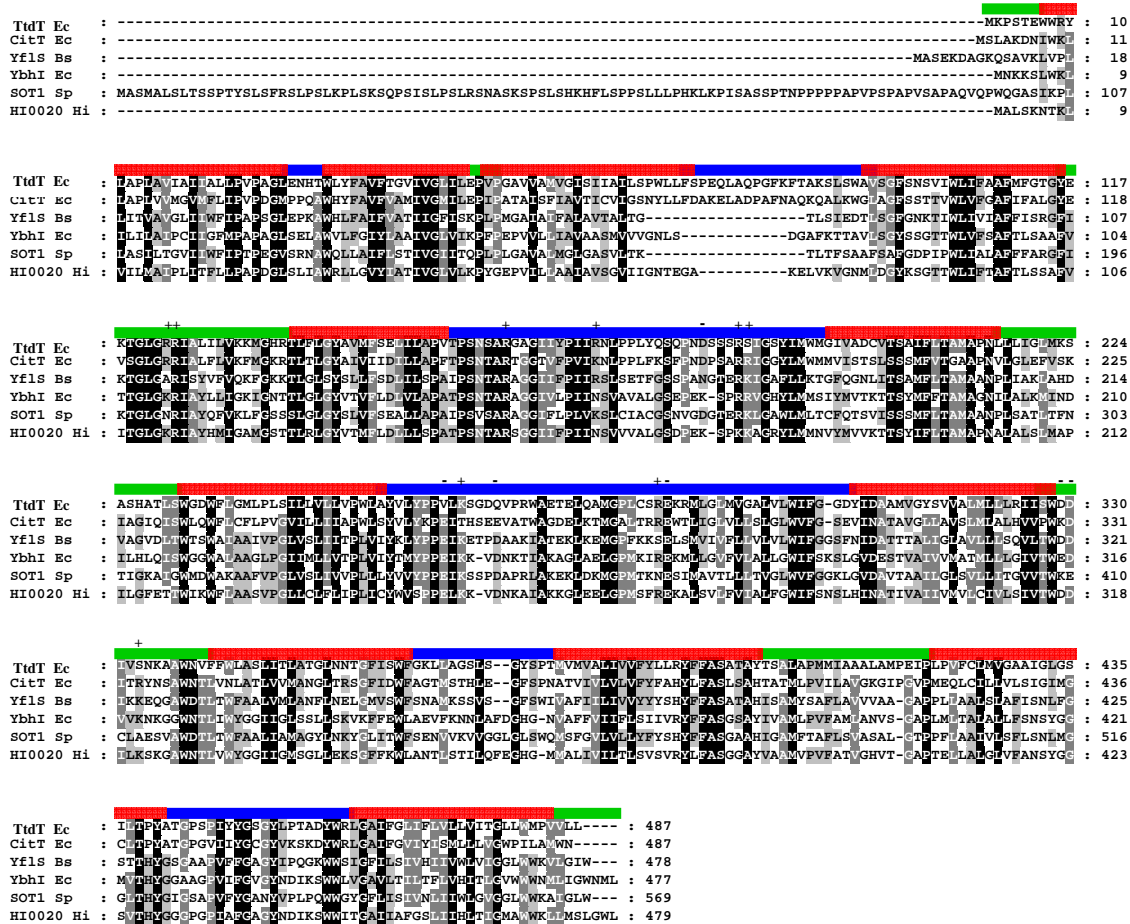


Abb. 27. Sequenzvergleich des Tartrat/Succinat-Antiporters TtdT (YgjE) von *E. coli* mit dem Citrat/Succinat-Antiporter CitT von *E. coli* und weiteren ähnlichen Proteinen in Eubakterien und Pflanzen. Das Alignment erfolgt mit dem „Clustal W (1.82) multiple sequence alignment“ (Thompson. *et al.*, 1994). Die konservierten Aminosäurereste sind schwarz, die über 80 %-ige und 60 %-ige konservierten Aminosäureaustausche sind dunkelgrau bzw. hellgrau markiert. Die potentielle Transmembrandomäne von TtdT wird als roter Balken dargestellt; die potentielle cytoplasmatische und periplasmatische Domäne als grüne bzw. blaue Balken. Konservierte geladene Aminosäuren in der periplasmatischen und cytoplasmatischen Domäne sind durch + oder - gekennzeichnet. Ec, *Escherichia coli*; Bs, *Bacillus subtilis*; Sp, *Spinacia oleraceae*; Hi, *Haemophilus influenzae*.

2002). *TtuC* von *P. putida* weist 77 %-ige Identität zu *YeaU* auf. *Agrobacterium vitis* besitzt zwei Gene für Tartratdehydrogenasen, *ttuC* und *ttuC'* (Salomone & Otten, 1999). Beide Tartratdehydrogenasen weisen 50 %-ige Identität zu *YeaU* auf. Die Funktion der Tartratdehydrogenase von *A. vitis* ist eine NAD^+ -abhängige Oxidation von L-Tartrat zu Oxalglykolat (Crouzet & Otten, 1995). Außerdem wird die Expression des Gens *yeaU* von *E. coli* unter aeroben Bedingungen mit L-Tartrat am stärksten induziert (Kap. 4.4.2).

```

YeaU Ec : ---MMKIMRIIAAIPCDGIGKEVLEEGIRVLOAAERWGFALSFQMEWASCEYVSHHGKMPDWHHQLSRFDALYFGA : 76
Q8ZDR0 Yp : MRLAMKTYRIAAPCDGIGHEVMPGGINVLQAAALRWDLDFSEFENIEWASCEYVQHHGKMPDWHQRLQCFDALYFGA : 80
TtuC Pp : ---PAHSFRIAAIPCDGIGKEVLEEGIRVLEAAALKHLLALDFDTFEWASCDYVYVQHGKMPDWHBQLKQYDALYFGA : 76
TtuC Av : ----MREYKIAAIFADGIGFEVLAAGLVLEALEKRSDFSIHTETFDWGSYVYKKNVMMPEHGLQLKRFDAIFFGA : 75

YeaU Ec : YGVPDIVPDHISLWGSLLKFRREFDQVNLRPVRLPGVPCPLAGKQFGDIDFVYVRENTGEGYSLGGVNEGTEHEVY : 156
Q8ZDR0 Yp : YGVPAIVPDHISLWGSLLKFRREFDQVNLRPVRLPGIPCPPLVKGQFGDIDFVYVRENTGEGYSVGGRLFEQTEQEMV : 160
TtuC Pp : YDVPAIVPDHISLWGSLLKFRREFDQVNLIRPVRLPGVPCALANRKYVDIDFVYVRENTGEGYSLGGIMFENTENEIV : 156
TtuC Av : YGAPD-VPDHITLWGLRPEPICQGFQVAVNRPTKVPGITPELRNCGEGLDLWVYVRENTGEGYSGHGGRHKLPEVVG : 154

YeaU Ec : IQESVFTRRGVDRILRYAFELACSRERKRLTSAFKSNGLAISMVWDERVEAMENYPERWDRKQIDILCARFVMPER : 236
Q8ZDR0 Yp : IQASIFTRRGVDRILKYAFELACMRERKRLTSAFKSNGLAFSMPWDERFEVMAAYPCISADKQIDILCARFVLPER : 240
TtuC Pp : IQESIFTRRGVDRILKYAFELAEKREKRLTSAFKSNGLAISMVWDRKTEAMAAHYPHVSWDRKQIDILCARFVLPER : 236
TtuC Av : TEVAIFTRVGVTRIMRYAFELACARERKRLTVAFKSNAQRHGVMWMDHIAAEVSKPEFVITWDRMLVDAMTVRMTLQPCS : 234

YeaU Ec : EDVWVASN-LFGDILSDLGEGAGTIGIAPSANLPERPFSLEFEPVHGSAEDIKRNIANPIATWAGAMMLDFLGNP : 315
Q8ZDR0 Yp : EDVWVASN-LFGDILSDLGEGAGTIGIAPSANLPERPFSLEFEPVHGSAEDIKRNIANPIAMWAGAMMLDFLGGCD : 319
TtuC Pp : EDVWVASN-LFGDILSDLGEGAGTIGIAPSANLPERPFSLEFEPVHGSAEDIKRNIANPIAMWSGAMMLDFLGGCD : 316
TtuC Av : LDTIVATN-LHADILSDLGAGLAGSLGVAPTANIDPERPFSMFEPVHGSAEDITEKNIANPVATFWTAQMLEHLLGKQ : 313

YeaU Ec : EREQAHHNGILAAIEVVAHGPKTPDMKENATPEOVADALCKIILR---- : 361
Q8ZDR0 Yp : ERYHAHHNGILNAIECVVAQCPKTPDMCEDASTQVGSALVQVLSH---- : 365
TtuC Pp : ERYQRAHHDMLNAIEBRVVAQGSVTPDMCGEELSTQVGAALSDTLARLD-- : 364
TtuC Av : ----NATRLMSAVBRVTEACHLTPDVGGTNTQVTDVAVCEALAGSNIL : 358

```

Abb. 28. Sequenzvergleich der potentiellen Tartratdehydrogenase *YeaU* von *E. coli* mit den ähnlichen Proteinen in Eubakterien. Das Alignment erfolgt mit dem „Clustal W (1.82) multiple sequence alignment“ (Thompson. *et al.*, 1994). Die konservierten Aminosäurereste sind schwarz, die über 80 % und 60 % konservierte Aminosäureaustausche dunkelgrau bzw. hellgrau markiert. Ec, *Escherichia coli*; Yp, *Yersinia pestis*; Pp, *Pseudomonas putida*; Av, *Agrobacterium vitis*.

Der sekundäre Carrier YfaV der ACS-Familie (Kap. 4.1; Kap. 4.4) weist eine signifikante Homologie zu den Tartratcarriern verschiedener Bakterien auf (Abb. 29), insbesondere zu dem Tartratcarrier TtuB von *Agrobacterium vitis* (40 %-ige Identität). Die postulierten Tartrattransporter Q66AH2 der MFS-Familie von *Yersinia pseudotuberculosis*, Q8YB05 von *Brucella melitensis* und Q48IW6 *Pseudomonas syringae* weisen eine Identität von 36 %, 36 % und 32 % der Aminosäuren zu YfaV auf. In den potentiellen periplasmatischen bzw. cytoplasmatischen Schleifen von YfaV befinden sich mehrere konservierte geladene Aminosäurereste, K, R, D und E (Abb. 29). Außerdem besitzen potentielle

Transmembranhelices ebenfalls geladene Aminosäurereste, R und E. Die Expression des *yfaV* Gens wird durch C₄-Dicarboxylate einschließlich der drei Stereoisomere von Tartrat unter aeroben und anaeroben Bedingungen induziert (Kap 4.4.3).

Entgegen früherer Publikationen (Vaughn *et al.*, 1946; Reaney *et al.*, 1993) können *E. coli*-Laborstämme, MG1655, LJ1 oder W3110 nicht mit Tartrat unter aeroben Bedingungen wachsen (Grimpo, unveröffentlicht), obwohl das *yeaU* Gen unter aeroben Bedingungen Tartrat-spezifisch (L- und meso-Tartrat) (Kap. 4.4.2) und das *yfaV* Gen durch C₄-

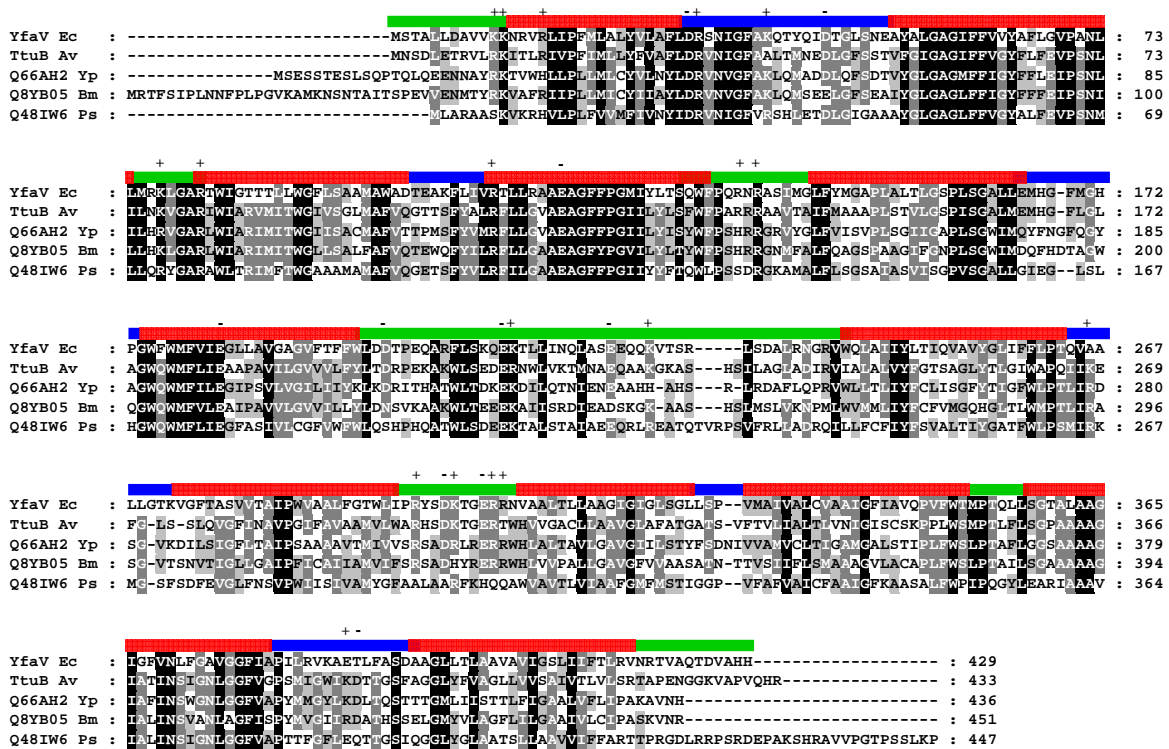


Abb. 29. Sequenzvergleich des potentiellen Tartratcarrier YfaV von *E. coli* mit den Tartratcarrier TtuB von *Agrobacterium vitis* und weiteren ähnlichen Proteinen in Eubakterien. Das Alignment erfolgt mit dem „Clustal W (1.82) multiple sequence alignment“ (Thompson. *et al.*, 1994). Die konservierten Aminosäurereste sind schwarz, die über 80 % und 60 % konservierte Aminosäureaustausche dunkelgrau bzw. hellgrau markiert. Potentielle Transmembranhelices von YfaV sind durch rote Balken markiert; potentielle cytoplasmatische und periplasmatische Scheifen als grüne bzw. blaue Balken. Konservierte geladene Aminosäuren sind durch + oder – gekennzeichnet. Ec, *Escherichia coli*; Av, *Agrobacterium vitis*; Yp, *Yersinia pseudotuberculosis*; Bm, *Brucella melitensis*; Ps, *Pseudomonas syringae*.

Dicarboxylate (Kap. 4.4.3) induziert werden. Die Ursache für das fehlende Wachstum ist unbekannt. Die Funktion der potentiellen Tartratdehydrogenase YeaU und des sekundären Carriers YeaV sollte weiter untersucht werden. Außerdem erfolgt die Induktion des YeaU nur durch L- und meso-Tartrat, weder durch anderen C₄-Dicarboxylate (Kap. 4.4.2) noch durch Betain, Cholin und Carnitin (Grimpo, unveröffentlicht).

Trotz einer signifikanten Homologie zu Tartrattransportern könnte YfaV einen C₄-Dicarboxylattransporter darstellen (Kap. 4.4.3). Dieser Carrier YfaV könnte für die Aufnahme von D,L-Tartrat in der *ygjE*-Mutante verantwortlich sein (Kap. 4.3.3). Da es verschiedene mögliche Carrier für die aerobe Tartrataufnahme, DctA (Kay & Kornberg, 1971), YfaV oder YeaV, gibt, könnte das fehlende aerobe Wachstum auf Tartrat von *E. coli* an einem fehlenden Stoffwechselenzym der möglichen Tartratstoffwechselwege (Kap. 2.3) liegen.

5.1.3 Alternative anaerobe Succinateffluxcarrier von *E. coli*

Die *dctA dcuA dcuB dcuC dcuD*-Fünffachmutate scheidet bei anaerobem Wachstum auf Glucose immer noch soviel Succinat aus wie der Wildtypstamm (Kap. 4.5; Kim, 2000; Jausch *et. al.*, 2001). Expressionsanalyse mit DNA-Microarray und Reporterfusionen zeigten, dass unter diesen Bedingungen die sekundären Carrier FocA (Formiateffluxcarrier), XasA (Glutamat/4-Aminobutyrat-Antiporter), das unbekannte Transportprotein YeiH und der Ionen-Kanal YbiO induziert werden (Kap. 4.5; Tab. 28).

Die Induktion des FocA erfolgt nicht nur während der Glucosefermentation, sondern auch in der Fumaratatmung (Kap. 4.5.1.1; Kap. 4.5.2). Die Aktivität des Succinateffluxes in der *focA*-Mutante IMW455 (*dctA dcuA dcuB dcuC ΔfocA*) (11,0 U/g TG) ist etwas niedriger als in den anderen *focA*⁺-Stämmen (17,5-19,6 U/g TG) (Kap. 4.5.3). Das zeigt, dass der Carrier FocA möglicherweise nicht nur dem Efflux von Formiat, sondern auch dem Efflux von Succinat zur Verfügung stehen kann. Trotzdem ist die Funktion des FocA als alternativer Succinateffluxcarrier unklar, da Succinat strukturell wesentlich größer als Formiat ist. Die Erniedrigung der Effluxaktivität des Succinat könnte nicht nur an dem Ausfall des FocA

liegen, sondern könnte auch indirekt verursacht sein, z.B. durch eine Verschiebung der Stoffwechselwege in der gemischten Säuregärung, wodurch weniger Succinat gebildet wird.

Außer der *focA*-Mutante ist die Aktivität des Succinateffluxes in der *ybiO*-Mutante IMW494 (*dctA dcuA dcuB dcuC ΔybiO*) (14,3 U/g TG) niedriger als in den anderen *ybiO*⁺-Stämmen (17,5-19,6 U/g TG) (Kap. 4.5.3). In der Mehrfach-Carriermutante sollten sich die Endprodukte von der Glucosefermentation in der Zelle anhäufen. Diese organischen Anionen (Succinat, Lactat, Acetat und Formiat) könnten ein osmotisches und elektrisches Signal bilden. Wie bei einem Dicarboxylat-spezifischen Kanal in Pflanzen (Reumann *et al.*, 1998), ist es möglich, dass dadurch der Ionen-Kanal YbiO induziert wird, wodurch ein Teil des Succinat auslaufen kann. Außerdem wird Formiat in der *focA*-Mutante IMW455 (*dctA dcuA dcuB dcuC ΔfocA*) wie in den *focA*⁺-Stämmen gebildet und ausgeschieden (Tab. 24). Dieser Formiatefflux könnte ebenfalls durch YbiO erfolgen.

Die Substrate des Glutamat/4-Aminobutyrat-Antiporters XasA sind ein C₅-Dicarboxylat und ein C₄-Monocarboxylat. Jedoch wird in der *xasA*-Mutante IMW495 (*dctA dcuA dcuB dcuC*

Tab. 28. Die alternativen Succinateffluxcarrier während der Glucosefermentation in der *dctA dcuA dcuB dcuC dcuD*-Mutante.

Kandidatengene für alternative anaerobe Succinateffluxcarrier							
Gen		Protein			Induktion im Microarray (Tab. 18,19)	Induktion im β-Galaktosidase-Test (Tab. 22, 23)	Erniedrigung des Succinateffluxes mit der Deletionsmutante (Tab. 25)
Name	benachbarte Gene	Familie	TM	Substrate			
ybiO (b0808)	glnQPH (Glutamin-Transportsystem)	MscS	11	Anionen ?	+	n.d.	+
focA (b0904)	pflAB (Pyruvat-Formiat-Lyase und Activator)	FNT	6	Formiat, Succinat ?, Fumarat ?, Pyruvat ?	+	+	+
xasA (b1492)	gadB (Glutamat-Decarboxylase)	APC	12	Glutamat, 4-Aminobutyrat	+	n.d.	-
yehH (b2158)	lysP (Lysin-Permease), lysE (LTTR für lysP),	n.k.	8	?	+	n.d.	n.d.

Familie: APC, Amino Acid-Polyamine-Organocation; FNT, Formate-Nitrite Transporter; MscS, Small Conductance Mechanosensitive Ion Channel; n.k., nicht klassifiziert; n.d., nicht durchgeführt; ?, hypothetisches Substrat, +, Induktion in der Glucosefermentation und mit C₄-Dicarboxylate unter anaeroben Bedingungen bzw. Besitz der Funktion als Succinatefflux; -, ohne Besitz der Funktion als Succinatefflux

XasA) Succinat vergleichbar zum Wildtyp ausgeschieden (Kap. 4.5.3). Deshalb ist *XasA* nicht für den Succinatefflux in der *dcu*-Mutante verantwortlich.

In der DNA-Microarray-Experimente erfüllte nur das Gen *yeiH* beide Kriterien für einen potentiellen Succinatefflux-Carrier der Glucosefermentation (Kap. 4.5.1.1): Induktion in der Glucosefermentation gegenüber der aeroben Glucosezucht von Wildtypstämmen, und Induktion in der *dct dcu*-Mutante gegenüber dem Wildtypstamm in der Glucosefermentation. Das Gen *yeiH* kodiert für ein unbekanntes Transportprotein YeiH, das der 9-PME-Familie (9 TMS putative metabolite efflux) unklassifizierter Transportproteine zu zuordnen ist (Saier, 1998). Da dieses Protein als eine mögliche Efflux-Pumpe vorgeschlagen ist, sollte die Expression des Gens *yeiH* und/oder die Funktion des Proteins YeiH weiter untersucht werden.

5.1.4 Alternative aerobe Succinataufnahmecarrier von *E. coli*

Die *dctA dcuA dcuB dcuC dcuD*-Fünffachmutate kann Succinat unter aeroben Bedingungen bei < pH 6 immer noch aufnehmen und damit wachsen (Kap. 4.5; Janausch *et. al.*, 2001). Expressionsanalysen mit DNA-Microarray und Reportergenfusionen zeigten, dass unter diesen Bedingungen die sekundären Carrier YfaV (potentieller Tartrattransporter), YfdV (potentieller C₃-Di-/Monocarboxylat-Transporter), YgjU (Serin/Threonin-Transporter), YjcG (Prolin- oder Acetat-Transporter) und GltP (Glutamat/Aspartat-Transporter) induziert werden (Kap. 4.5.1.2; Kap. 4.5.2; Tab. 29).

Der potentielle Tartrattransporter YfaV der MFS-Familie wurde aus seinem Expressionsmuster als C₄-Dicarboxylattransporter postuliert (Kap. 5.1.2). Für den sekundären Carrier YfdV, der zu der AEC-Familie gehört, wird wegen seiner entsprechenden Expression (Kap. 4.5.2) eine Funktion als ein aerober Transporter für Pyruvat, Malonat oder C₃-Di- oder C₃-Monocarboxylate vorgeschlagen.

Die Induktion des Serin/Na⁺-Symporters YgjU erfolgt durch Succinat, Fumarat und Citrat stärker als durch Serin oder Threonin (Kap. 4.5.2). Jedoch konnte die *ygjU*-Mutante unter aeroben Bedingungen mit Succinat bei pH 6 wie der *ygjU*⁺-Stamm immer noch wachsen (Ney, 2003). Deshalb scheint YgjU nicht der alternative Succinatcarrier unter pH 6 zu sein.

Der sekundäre Carrier YjcG der SSS-Familie wird aufgrund des Sequenzvergleichs als ein möglicher Prolin/Na⁺-Symporter vorgeschlagen (Paulsen, 1998). Prolin ist eine Aminosäure, die ein ringförmiges Monocarboxylat darstellt. Außerdem hat die Arbeit von Gimenez *et al.* (2003) gezeigt, dass das Protein YjcG als Acetatcarrier funktioniert, dessen Transport von Acetat durch Propionat und Glykolat kompetitiv gehemmt wird. Das Gen *yjcG* wird mit dem Gen *acs* (Acetyl-CoA-Synthetase) cotranskribiert. Dieser Monocarboxylatcarrier YjcG ist ein guter Kandidat für einen alternativen Succinatcarrier, da Succinat bei pH 6 ein ringförmiges Monocarboxylat ausbilden kann (Janausch *et al.* 2001).

GltP ist ein H⁺-Symporter für Glutamat oder Aspartat (Wallace *et al.*, 1990; Tolner *et al.*, 1995), und gehört gemeinsam mit DctA zu DAACS-Familie. Dieser C₄-Dicarboxylat-Aminosäuren-Carrier stellt ebenfalls einen möglichen alternativen Succinatcarrier dar.

Tab. 29. Die alternativen Succinataufnahmecarrier unter aeroben Bedingungen bei pH 6 in der *dctA dcuA dcuB dcuC dcuD*-Mutante.

Kandidatengene für alternative anaerobe Succinateffluxcarrier							
Gen		Protein			Induktion im Microarray (Tab. 20, 21)	Induktion im β -Galaktosidase-Test (Tab. 22, 23)	Schwächung des Wachstums der Deletionsmutante
Name	benachbarte Gene	Familie	TM	Substrate			
yfaV b2246	yfaU (Pyruvatkinase oder Aldolase?), yfaW (Dehydratase?), yfaX (Regulator?)	MFS	12	Fumarat?, Succinat?, Malat?, L-/ D-/ meso-Tartrat?	+	+	n.d.
yfdV b2372	b2373 (oxalyl-CoA-Decarboxylase?), b2374 (Formyl-CoA-Transferase?)	AEC	10	Pyruvat?, Malonat?, C ₃ -Di-/Mono-carboxylate?	-	+	n.d.
ygiU b3089	ygiT (Transporter?), ygiV (Transporter?)	DAACS	8	Serin, Threonin, Succinat?, Fumarat?, Citrat?	-	+	-
yjcG b4067	acs (Acetyl-CoA-Synthetase)	SSS	13	Prolin?, Acetat, Propionat, Glykolat	+	n.d.	n.d.
gltP b4077	nrfABCDEF (Formiat-unabhängige Nitritreduktion)	DAACS	10	Glutamat, Aspartat	+	n.d.	n.d.

Familie: DAACS, Dicarboxylate/Amino Acid:Cation Symporter; DME, Drug/Metabolite Exporter; MFS, Major Facilitator Superfamily; SSS, Solute:Sodium Symporter; n.d., nicht durchgeführt; ?, hypothetisches Substrat, +, Induktion durch C₄-Dicarboxylate unter aeroben Bedingungen; -, keine Induktion durch C₄-Dicarboxylate unter aeroben Bedingungen bzw. ohne Besitz der Funktion als Succinataufnahme

5.2 Die DcuSR unabhängigen Tartratregulatoren YgiP und YeaT von *E. coli*

Die Enzyme und Transportproteine des C₄-Dicarboxylatstoffwechsels werden durch die Anwesenheit von C₄-Dicarboxylaten induziert (Janausch *et al.*, 2002). Die Gene des C₄-Dicarboxylatstoffwechsels (Fumaratatmung und C₄-Dicarboxylattransport) unterliegen der transkriptionellen Regulation durch das DcuSR-Zweikomponentensystem, das aus einer membranständigen Sensorkinase DcuS und einem cytoplasmatischen Responseregulator DcuR besteht (Unden & Kleefeld, 2004).

Das *ttdABT*-Operon kodiert die Schlüsselenzyme des anaeroben L-Tartratstoffwechsels, die L-Tartratdehydratase (L-Ttd) und den L-Tartrat/Succinat-Antiporter (TtdT). Die Expression des Operons ist nur durch Tartrat (L- und meso-Tartrat), nicht durch andere C₄-Dicarboxylate induzierbar und seine Induktion ist von DcuS unabhängig (Kap. 4.2.2). Diese Tartrat-spezifische Induktion des *ttdABT*-Operons erfolgt durch den LysR-Typ-Regulator YgiP (Kap. 4.2.3). Die Gene der LysR-Typ-Regulatoren liegen oft unmittelbar stromaufwärts ihrer Zielgene in entgegengesetzter Orientierung, und das Gen des Tartratregulators YgiP liegt ebenso. Mit Ausnahme von Zweikomponentensystemen sind die transkriptionellen Regulatoren vom LysR-Typ wohl die häufigsten positiven Regulatoren in Prokaryonten (Schell, 1993). Durch Expressionsstudien (Kap. 4.2.2) und Wachstumsversuche (Schumacher, 2005) wurde nachgewiesen, dass YgiP als ein Transkriptionsaktivator wirkt. YgiP reguliert außerdem die Transkription des eigenen Gens *ygiP* als Aktivator (Schumacher, 2005).

Die Proteinsequenzen der YgiP-ähnlichen Regulatoren, deren Effektoren eine strukturelle Ähnlichkeit zu Tartrat aufweisen, wurden verglichen (Tab. 30; Abb. 30). Der Regulator YgiP weist eine hohe Sequenzähnlichkeit von 49 % Identität bzw. 67 % Ähnlichkeit zu einem anderen potenziellen Tartrat-Regulator, YeaT von *E. coli*, auf. In dem *yeaTUVWX*-Gencluster des vermutlichen aeroben Tartratstoffwechsels (Abb. 7) liegt das Gen *yeaT* direkt stromauf der Zielgene in divergenter Orientierung. Die Induktion einer *yeaU*-*lacZ* Fusion erfolgt nur mit L- und meso-Tartrat nicht mit anderen C₄-Dicarboxylaten, und diese Induktion ist von DcuS unabhängig (Kap. 4.4.2). Da diese tartratspezifische Induktion der *yeaU*-*lacZ* Fusion

in der *yeaT*-Mutante ausfällt (Grimpo, unveröffentlicht), stellt YeaT ebenfalls einen Tartrat-abhängigen Regulator dar.

Ein bekannter Tartrat-abhängiger Regulator TtuA von *Agrobacterium vitis* (Stamm AB4) weist eine 25 %-ige Identität bzw. 43 %-ige Ähnlichkeit zu YgiP auf. *A. vitis* ist ein Tumorerzeugendes Bacterium in der Tartrat-reichen Weinrebe, und kann Tartrat durch die Genprodukte der Tartratregion (TAR, tartrate utilization region) verstoffwechseln, die sich auf konjugativen Plasmiden befindet (Szedgi & Otten, 1998; Salomone & Otten, 1999). Das Gencluster *ttuABCDE* (tartrate utilization) ist in der Tartratregion des Plasmids pTrAB4 in *A. vitis*-Stamm AB4 vorhanden (Crouzet & Otten, 1995). Das Gen *ttuB* kodiert für einen Tartrattransporter und *ttuC* für eine Tartratdehydrogenase (Salomone & Otten, 1999). Eine mögliche Reduktase TtuD und ein Pyruvatkinase-ähnliches Protein TtuE können weitere Reaktionen des Tartratstoffwechsels katalysieren. Das Gen *ttuA* liegt direkt stromauf des *ttuBCD*-Operons in gegenläufiger Orientierung. TtuA ist für das Wachstum auf Tartrat essentiell, und reguliert die Transkription des *ttuBCDE*-Operons als Aktivator. Das Gen *ttuA* unterliegt wie die meisten LysR-Typ-Regulatoren einer negativen Autoregulation (Crouzet & Otten, 1995).

AaeR ist der *p*-Hydroxybenzoat-Regulator von *E. coli*, der die Expression des *aaeXAB*-Operons positiv reguliert (Dyk *et al.*, 2004). Dieser Regulator besitzt 26 % Identität bzw. 45 % Ähnlichkeit zu YgiP. AaeB ist ein Effluxprotein der PET-Familie (putative efflux transport) (Harley & Saier, 2000), und AaeA ist ein Membran-Fusionsprotein (MFP, membrane fusion protein) (Paulsen, 1998; Saier, 1998). Die Funktion des AaeX-Protein ist noch unbekannt. Dieses Protein könnte aber möglicherweise die Effizienz des AaeAB-Effluxsystems erhöhen (Dyk *et al.*, 2004). Neben *p*-Hydroxybenzoat wird das *aaeXAB*-Operon durch andere aromatische Carboxylate induziert. Diese Induktion wird durch den Regulator AaeR vermittelt, dessen Gen stromab und divergent zum *aaeXAB*-Operon liegt. Im Normalfall ist *p*-Hydroxybenzoat als Zwischenprodukt der Biosynthese des Ubiquinons in der Zelle in niedriger Konzentration vorhanden. Wenn die Konzentration des *p*-Hydroxybenzoats steigt, wird AaeR durch die Bindung des *p*-Hydroxybenzoat in die aktive Form überführt und

induziert die Transkription des *aaeXAB*-Operons für das *p*-Hydroxybenzoat-Effluxsystem (Dyk *et al.*, 2004).

AbgR von *E. coli* ist der Regulator des *abgABT*-Operons, und weist eine 28 %-ige Identität bzw. 47 %-ige Ähnlichkeit zu YgiP auf. Das *abgABT*-Operon (p-aminobenzoyl glutamate) ermöglicht die Verwertung des p-Aminobenzoyl-Glutamat, das als ein Abbauprodukt beim kommerziellen Präparat der Folsäure entsteht (Hussein *et al.*, 1998). p-Aminobenzoat kann zur Biosynthese des Tetrahydrofolat genutzt werden. AbgT ist ein sekundärer Carrier der AbgT-Familie, und die Verwertung des p-Aminobenzoyl-Glutamat ist von AbgT abhängig. Die Gene *abgAB* kodieren für die Aminobenzoylhydrolase, die p-Aminobenzoyl-Glutamat zu p-Aminobenzoat und Glutamat katalysiert. Der intergenische Bereich zwischen *abgR* und dem *abgABT*-Operon enthält die Regulatorsequenzen für beide Promotoren, die scheinbar durch AbgR reguliert werden. AbgR reagiert vermutlich auf p-Aminobenzoyl-Glutamat als Effektor (Hussein *et al.*, 1998).

Tab. 30. Die YgiP-ähnlichen Regulatoren vom LysR-Typ. Der Sequenzvergleich wurde durch BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) der NCBI (National Center for Biotechnology) durchgeführt. Die Identität bezeichnet die Prozentzahl identischer Aminosäuren, die Ähnlichkeit die Prozentzahl ähnlicher Aminosäuren oder konservierter Substitutionen.

Regulator	Organism	Länge (As.)	Identität mit YgiP (%)	Ähnlichkeit mit YgiP (%)	Cofaktor	Zielgene
YgiP	<i>E. coli</i>	310	100	100	Tartrat	<i>ttdABT</i> -Operon
YeaT	<i>E. coli</i>	307	49	67	Tartrat ?	<i>yeaUVWX</i> -Operon
AaeR	<i>E. coli</i>	309	26	45	p-Hydroxybenzoat	<i>aaeXAB</i> -Operon
AbgR	<i>E. coli</i>	302	28	47	p-Aminobenzoyl-Glutamat ?	<i>abgABT</i> -Operon
TtuA	<i>A. vitis</i>	304	25	43	Tartrat	<i>ttdBCDE</i> -Operon

E. coli, *Escherichia coli*; *A. vitis*, *Agrobacterium vitis*; ?, potentielle Substrate

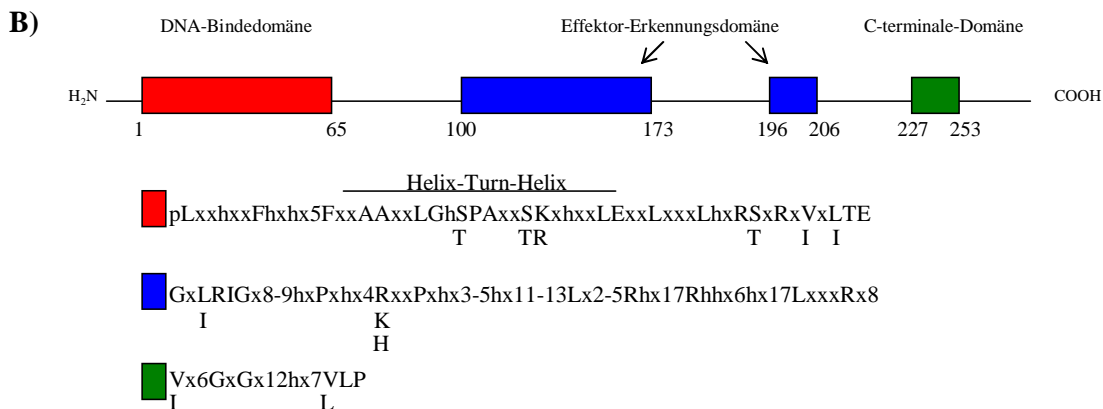
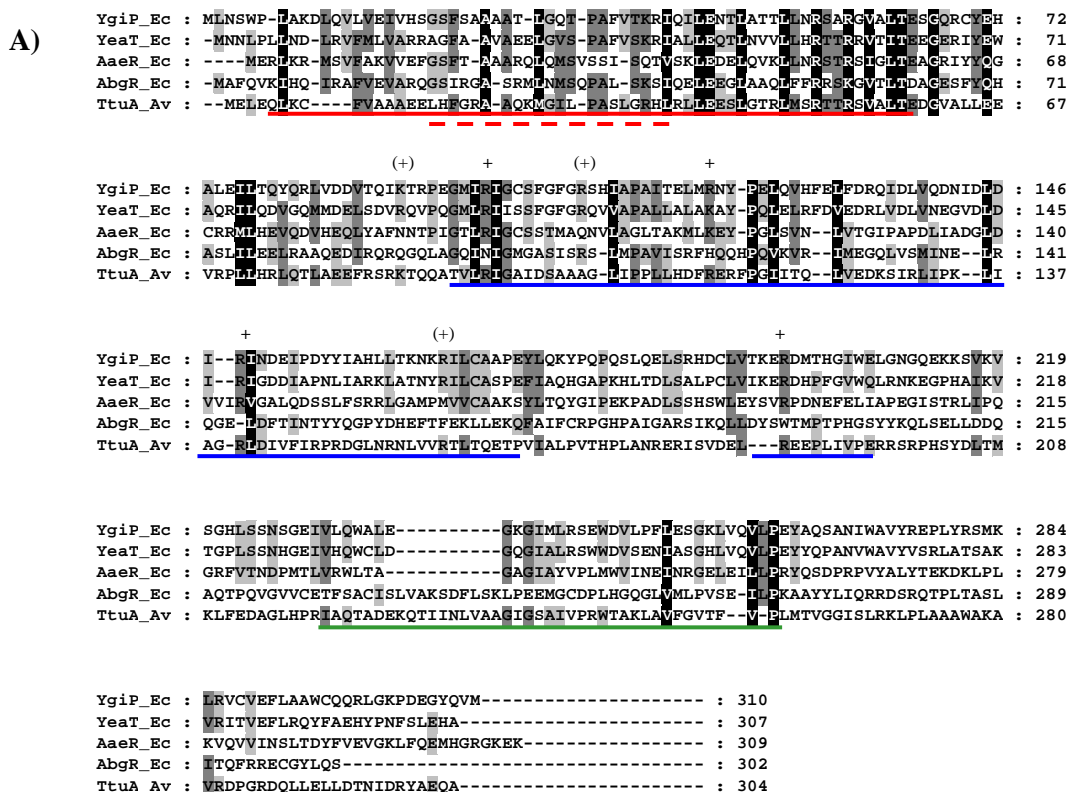


Abb. 30. Sequenzanalyse der YgiP-ähnlichen Regulatoren vom LysR-Typ. (A) Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm GeneDoc (Nicholas *et al.*, 1997) durchgeführt. Über 90 % konservierte Aminosäurereste sind schwarz markiert; über 70 % dunkelgrau; über 50 % hellgrau. Die rote Linie stellt die DNA-Bindedomäne dar, in der sich das Helix-Turn-Helix-Motiv (rote Punktlinie) befindet. Die blauen Linien zeigen die Effektor-Erkennungsdomänen. Die konservierten positiv-geladenen Aminosäurereste (R, K, oder H) innerhalb dieser Domänen sind mit + bezeichnet. Die grüne Linie stellt die C-terminale-Domäne dar. *E. coli*, *Escherichia coli*; *A. vitis*, *Agrobacterium vitis*. (B) Das Schema der Sequenz der LysR-Typ-Regulatoren (Schell, 1993) und die konservierte Aminosäurereste in den fünf YgiP-ähnlichen LysR-Typ-Regulatoren wurden dargestellt. Die konservierten Aminosäurereste der DNA-Bindedomäne (rot), Effektor-Erkennungsdomäne (blau) und C-terminale-Domäne (grün) sind angegeben. x, beliebige Aminosäurereste; h, hydrophobe Aminosäurereste (V, I, L, M); p, hydrophile Aminosäurereste (T, S, N, Q, D, E, K, R, H).

Die LysR-Typ Transkriptionsregulatoren bestehen aus einer N-terminalen DNA-Bindedomäne, einer Effektor-Erkennungs- bzw. Bindedomäne und der C-terminalen Domäne (Abb. 30). Die meisten Sequenzähnlichkeiten innerhalb der LysR-Typ Regulatoren beruhen auf der hoch konservierten DNA-Bindedomäne, die Aminosäurereste in den restlichen Bereichen der Proteine variieren stark (Schell, 1993). Die LysR-Typ Regulatoren, die Tartrat oder ähnliche Substrate binden, sollten konservierte Aminosäurereste in den Effektor-Erkennungsdomänen enthalten (Abb. 30). Die Effektoren der fünf Regulatoren besitzen Di- oder Monocarboxyl-Reste, für deren Erkennung bzw. Bindung positiv-geladenen Aminosäurereste (Arginin-, Lysin- oder Histidinreste) der Regulatoren förderlich sein könnten. Die Effektor-Erkennungs- bzw. Bindedomäne enthalten konservierte Argininreste (R) und positive Aminosäurereste (R, K oder H) (Abb. 30; Tab. 31).

Tab. 31. Konservierte positiv geladene Aminosäurereste innerhalb der Effektor-Erkennungsdomäne der YgiP-ähnliche Regulatoren.

LTTR	Position der konservierte positiv geladene Aminosäurereste			
	R	R, K oder H	R	R
YgiP	99	R120	148	199
YeaT	98	K119	147	198
AaeR	95	K116	144	195
AbgR	-	H118	-	-
TtuA	94	R114	140	188

R, Argininreste; K, Lysinreste; H, Histidinreste; -, besitzt keine positiv geladene Aminosäurereste

Die Expression des *ttdABT*-Operons wird durch L- und meso-Tartrat, aber nicht durch andere C₄-Dicarboxylate induziert. Diese Tartrat-spezifische Induktion erfolgt durch den Regulator YgiP, sie ist unabhängig von dem DcuSR-Zweikomponentensystem (Abb. 31). Die Expression des *ttdABT*-Operons unterliegt auch der transkriptionellen Regulation durch FNR und CRP. Der Sauerstoff-abhängige Regulator FNR reguliert die L-Tartratfermentation durch Induktion der Gene für L-Tartratfermentation, *ttdABT*-Operon, *frdABCD* (Fumaratreduktase) und *fumB* (Fumarase) unter anaeroben Bedingungen (Abb. 26; Abb. 31). CRP (cAMP receptor protein) reguliert die Expression des *ttdABT*-Operons und des *fumB*-Gens durch

Katabolitrepression. Das DcuSR-Zweikomponentensystem reguliert die L-Tartratfermentation über die Expression der Fumarase und Fumaratreduktase (Abb. 31). D.h. DcuSR verbindet die L-Tartratfermentation eng mit der Fumaratatmung, obwohl das *ttdABT*-Operon nicht durch DcuSR reguliert wird. Diese Verbindung des anaeroben L-Tartrastoffwechsels mit der Fumaratatmung ist im Einklang mit dem Befund, dass die Enzyme der Fumaratatmung in Anwesenheit von Tartrat durch DcuSR induziert werden (Zientz *et al.*, 1998). Damit stellt das DcuSR-Zweikomponentensystem einen allgemeinen Regulator für den C₄-Dicarboxylatstoffwechsel dar, YgiP dagegen einen spezifischen Regulator für einen Teilbereich des anaeroben C₄-Dicarboxylatstoffwechsels, den Tartrastoffwechsel.

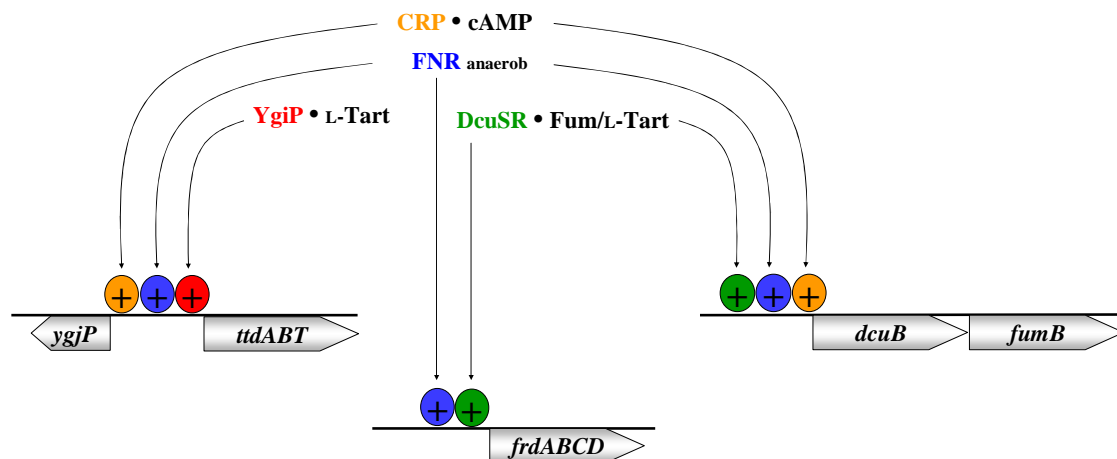


Abb. 31. Die koordinierte Regulation der L-Tartratfermentation durch den Tartrat-spezifischen Regulator YgiP und das DcuSR-Zweikomponentensystem. Die Enzyme der L-Tartratfermentation werden durch die globalen Regulatoren FNR und CRP reguliert. In Anwesenheit von L-Tartrat werden die Regulatoren YgiP und DcuSR aktiviert. Die Induktion der Schlüsselenzyme der L-Tartratfermentation, *ttdABT*-Operon, erfolgt durch YgiP. Die anderen Enzyme der L-Tartratfermentation, *frdABCD* und *fumB*, werden durch DcuSR induziert. In Anwesenheit von Fumarat und Abwesenheit von L-Tartrat werden dann nur die Gene der Fumaratatmung, *frdABCD*, *dcuB* und *fumB*, induziert. +, Induktion

6 Literatur

- Abe K., Ruan Z.-S. and Maloney P.C. (1996)
Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of OxIT, the oxalate:formate exchange protein of *Oxalobacter formigenes*
J. Biol. Chem. 271: 6789-6793
- Anantharam V., Allison M.J. and Maloney P.C. (1989)
Oxalate:formate exchange, the basis for energy coupling in *Oxalobacter*
J. Biol. Chem. 264: 7244-7250
- Arfin S.A., Long A.D., Ito E.T., Toller L., Riehle M.M., Paegle E.S. and Hatfield G.W. (2000)
Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12
J. Biol. Chem. 275: 29672-29684
- Barker H.A.(1936)
One the fermentation of some dibasic C₄-acids by *Aerobacter aerogens*
Proceedings of the academy of science, Amsterdam 39: 674
- Böck A. and Sauwers G. (1996)
Escherichia coli and *Salmonella typhimurium*
Neidhardt (Ed.) ASM Press, Washington, DC pp. 587-593
- Bott M. (1997)
Anaerobic citrate metabolism and its regulation in enterobacteria
Arch. Microbiol. 167: 78-88
- Crouzet P. and Otten L. (1995)
Sequence and mutational analysis of a tartrate utilization operon from *Agrobacterium vitis*
J. Bacteriol. 177: 6518-6526
- Davis S. J., Golby P., Omrani D., Broad S.A., Harrington V.L., Guest J.R., Kelly D.J. and Andrews S. C. (1999)
Inactivation and regulation of the aerobic C₄-dicarboxylate transport gene (*dctA*) of *Escherichia coli*
J. Bacteriol. 181: 5624-5635
- Datsenko K.A. and Wanner B.L. (2000)
One-step inactivation of chromosomal genes in *E. coli* K-12 using PCR products
PNAS 97: 6640-6645

- Darwin A.J. & Stewart V. (1995)
Expression of the *narX*, *narL*, *narP*, and *narQ* genes of *Escherichia coli* K-12: regulation of the regulators
J. Bacteriol. 177: 3865-3869
- Van Dyk T.K., Templeton L.J., Cantera K.A., Sharpe P.L. and Sariaslani F.S. (2004)
Characterization of the *Escherichia coli* AaeAB efflux pump: a metabolic relief valve?
J. Bacteriol. 186: 7196-7204
- Engel P., Krämer R. and Uden G. (1992)
Anaerobic fumarate transport in *Escherichia coli* by an *fnr*-dependent dicarboxylate uptake system which is different from the aerobic dicarboxylate uptake system
J. Bacteriol. 174: 5533-5539
- Engel P., Krämer R. and Uden G. (1994)
Transport of C₄-dicarboxylate by anaerobically grown *Escherichia coli*: energetics and mechanism of exchange, uptake and efflux
Eur. J. Biochem. 222: 605-614
- Forward J.A., Behrendt M.C., Wyborn N. R., Cross R. and Kelly D.J. (1997)
TRAP Transporter: a new family of periplasmic solute transport systems encoded by the *dctPQM* genes of *Rhodobacter capsulatus* and by homologs in diverse gram-negative bacteria
J. Bacteriol. 179: 5482-5493
- Furuyoshi S., Nawa Y., Kawabata N., Tanaka H and Soda K. (1991)
Purification and characterization of a new NAD(+)-dependent enzyme, L-tartrate decarboxylase, from *Pseudomonas* sp. group Ve-2
J. Biochem. (Tokyo) 110:520-5
- Gimenez R., Nunez M. F., Badia J., Aguilar J. and Baldoma L. (2003)
The gene *yjcG*, cotranscribed with the gene *acs*, encodes an acetate permease in *Escherichia coli*
J. Bacteriol. 185:6448-6455
- Goh E.B., Bledsoe P.J., Chen L.L., Gyaneshwar P., Stewart V and Igo M.M. (2005)
Hierarchical control of anaerobic gene expression in *Escherichia coli* K-12: the nitrate-responsive NarX-NarL regulatory system represses synthesis of the fumarate-responsive DcuS-DcuR regulatory system
J. Bacteriol. 187: 4890-4899

- Golby P., Kelly D.J., Guest J.R. and Andrews S.C. (1998)
Topological analysis of DcuA, an anaerobic C₄-dicarboxylate transporter of *Escherichia coli*
J. Bacteriol. 180: 4821-4827
- Golby P., Kelly D.J., Guest J.R. and Andrews S.C. (1998)
Transcriptional regulation and organization of the *dcuA* and *dcuB* genes, encoding homologous anaerobic C₄-dicarboxylate transporters in *Escherichia coli*
J. Bacteriol. 180: 6586-6596
- Golby P., Davies S., Kelly D.J., Guest J.R. and Andrews S.C. (1999)
Identification and characterization of a two-component sensor-kinase and response-regulator system (DcuS-DcuR) controlling gene expression in response to C₄-dicarboxylate in *Escherichia coli*
J. Bacteriol. 181: 1238-1248
- Green M.A. & Fry S.C. (2005)
Vitamin C degradation in plant cells via enzymatic hydrolysis of 4-O-oxalyl-L-threonate
Nature 433: 83-87
- Grimbert L. & Ficquet L. (1897)
Sur un nouveau ferment des tartrates „le *Bacillus tartricus*“
Compt. rend. soc. biol. 49:962-965
- Grimbert L. & Ficquet L. (1898)
Sur un nouveau ferment des tartrates „le *Bacillus tartricus*“
J. Pharm. Chim. (6th series) 7:97-100
- Grimbert L. (1899)
Action du *Bacillus tartricus* sur le tartrate de chaux
Cinquantesime de la Société Biologie. Volume Jubilaire: 419-427
Masson et Cie, Paris
- Grimpo J. R., Kim O. B., Uden G. unveröffentlicht
- Gunsalus R.P. & Park S.J. (1994)
Aerobic-anaerobic gene regulation in *Escherichia coli*: control by the ArcAB and Fnr regulons
Res. Mikrobiol. 145: 437-50
- Gutowski A.R. and Rosenberg H. (1975)
Succinate uptake and related proton movements in *Escherichia coli* K12
Biochem. J. 152: 647-654

- Harley, K.T. & Saier Jr. M.H. (2000)
A novel ubiquitous family of putative efflux transporters
J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2: 195-198
- Hussein M.J., Green J.M and Nichols B.P. (1998)
Characterization of mutations that allow p-aminobenzoyl-glutamate utilization by
Escherichia coli
J. Bacteriol. 180: 6260-6268
- Janausch I.G. and Uden G. (1999)
The *dcuD* (former *yhcL*) gene product of *Escherichia coli* as a member of the DcuC
family of C₄-dicarboxylate carriers: lack of evident expression
Arch. Microbiol. 172: 219-226
- Janausch I.G., Kim O. B., Uden G. (2001)
DctA- and Dcu-independent transport of succinate in *Escherichia coli*: contribution of
diffusion and of alternative carriers
Arch. Microbiol. 176: 224-230
- Janausch I.G. (2001)
Rekonstitution des Fumaratsensors DcuS in Liposomen und Transport von Fumarat
und Succinat in *Escherichia coli*
Dissertation an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- Janausch I.G., Zientz E., Tran Q.H., Kröger A. and Uden G. (2002)
C₄-dicarboxylate carriers and sensors in bacteria
Biochim. Biophys. Acta 1553: 39-56
- Janausch I.G., Garcia-Moreno I., Lehnen D., Zeuner Y and Uden G. (2004)
Phosphorylation and DNA binding of the regulator DcuR of the fumarate-responsive
two-component system DcuSR of *Escherichia coli*
Microbiol. 150: 877-83
- Janssen P.H. (1991)
Fermentation of L-tartrate by a newly isolated gram negative glycolytic bacterium
Antonie Van Leeuwenhoek 59: 191-198
- Jensen, K. F. (1993)
The *Escherichia coli* K-12 "wild type" W3110 and MG1655 have an *rph* frameshift
mutation that leads to pyrimidine starvation due to low *pyrE* expression levels
J. Bacteriol. 175:3401-3407

- Kaim G. & Dimroth P. (1998)
Voltage generated torque drives the motor of the ATP synthase
EMBO J. 17:5887-5895
- Kaim G. & Dimroth P. (1999)
ATP synthesis by F-type ATP synthase is obligatorily dependent on the transmembrane voltage
EMBO J. 18: 4118-4127
- Kanehisa M. (1995)
KEGG pathway database
<http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway.html>
- Kanhere A. and Bansal M. (2005)
A novel method for prokaryotic promoter prediction based on DNA stability
BMC Bioinformatics 6: 1
- Karp P.D. (2005)
SRI International Pathway Tools version 9.5
<http://biocyc.org/server.html>
- Karsten W.E., Tipton P.A. and Cook P.F. (2002)
Tartrate dehydrogenase catalyzes the stepwise oxidative decarboxylation of D-malate with both NAD and Thio-NAD
Biochem. 41: 12193-12199
- Kay W.W. and Kornberg H.L. (1971)
The uptake of C₄-dicarboxylic acids by *Escherichia coli*
Eur. J. Bacteriol. 18: 274-281
- Khodursky A.B., Peter B.J., Cozzarelli N.R., Botstein D., Brown P.O., and Yanofsky C. (2001)
DNA microarray analysis of gene expression in response to physiological and genetic changes that affect tryptophan metabolism in *Escherichia coli*.
PNAS 97: 12170-12175
- Kim O.B. (2000)
Charakterisierung der Effluxcarrier für C₄-Dicarboxylate im anaeroben Stoffwechsel von *Escherichia coli*
Diplomarbeit an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

- Kim Y. M., Ogawa W., Tamai E., Kuroda T., Mizushima T., Tsuchiya T. (2002)
Purification, reconstitution, and characterization of Na(+)/serin symporter, SstT, of
Escherichia coli.
J. Biochem (Tokyo) 132 (1):71-76
- Kohn L.D. & Jakoby W.B. (1968)
Tartaric acid metabolism. V. Crystalline tartrate dehydrogenase
J. Biol. Chem. 243: 2479-2485
- Lolkema J.S., Poolman B. and Konings W.N. (1998)
Bacterial solute uptake and efflux systems
Current Opinion in Microbiol. 1: 248-253
- Mercer W.A. and Vaughn R.H. (1951)
The characteristics of some thermophilic, tartrate-fermentating anaerobes
J. Bacteriol. 62: 27-37
- Miller J.H. (1992)
A short course in bacterial genetics
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Münch R., Hiller K., Barg H., Heldt D., Linz S., Wingender E., Jahn D. (2003)
PRODORIC: prokaryotic database of gene regulation
Nucleic Acid Research 31: 266-269
<http://www.prodoric.de>
- Neidhardt F.C., Bloch P.L. and Smith D.F. (1974)
Cultur medium for *Enterobacteria*
J. Bacteriol. 119: 736-747
- Ney J. (2003)
Inaktivierung und Characterisierung potentieller C₄-Dicarboxylatcarrier in *E. coli*
Diplomarbeit an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- Nicholas, K.B., Nicholas H.B. Jr., and Deerfield, D.W. II. (1997)
GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation
EMBNEW.NEWS 4:14
- Nicholls D.G. & Ferguson S.J. (2002)
Bioenergetics3
Academic press, an imprint of Elsevier Science

- van Niel C.B. (1944)
The culture, general physiology, morphology and classification of the non-sulfur purple and brown bacteria
Bacteriol. Reviews 8: 1-118
- Nijdam H.W.M (1907)
Aerobacter tartarivorum.
Thesis. Leiden, Holland
- Ogata H., Goto S., Sato K., Fujibuchi W., Bono H., Kanehisa M. (1999)
KEGG : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
Nucleic Acid Research 27: 29-34
- Ogawa W., Kim Y. M., Mizusfima T., Tsuchiya T. (1998)
Cloning and expression of the gene for the Na⁺-coupled serine transporter from *Escherichia coli* and characteristics of the transporter
J. Bacteriol. 180: 6749-6752
- Ostrow K.S., Silhavy T.J. and Garrett. S. (1986)
Cis-acting sites required for osmoregulation of ompF expression in *Escherichia coli* K-12
J. Bacteriol. 168: 1165-1171
- Pao S.S., Paulsen I.T., Saier M.H. Jr. (1998)
Major Facilitator Superfamily
Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62(1): 1-34
- Paulsen I.T., Nguyen L., Sliwinski M.K., Rabus R. and Saier M.H. Jr. (2000)
Microbial genome analysis: comparative transport capabilities in eighteen prokaryotes
J. Mol. Biol. 301: 75-100
- Pasteur L. (1858)
Mémoire sur la fermentation de l'acide tartrique.
Compt. rend. 46: 615-618
- Pasteur L. (1860)
Note relative au *Penicillium glaucum* et à la dissymétriemoléculaire des produits organiques naturels
Compt. rend. 51: 298-299
- Pasteur L. (1863)
Nouvel exemple de fermentation déterminée par des animalcules infusoires pouvant vivre sans gaz oxygène libre, et en dehors de tout contact avec l'air de l'atmosphère
Compt. rend. 56: 416-421

- Paulsen I.T. (1998)
Transport database
<http://www.membranetransport.org/index.html>
- Pedersen A.G., Jensen L.J. Brunak S., Stærfeldt H. and Ussery D.W. (2000)
A DNA structural atlas for *Escherichia coli*
J. Mol. Biol. 299: 907-930
- Pos K.M., Dimroth P. and Bott M. (1998)
The *Escherichia coli* citrate carrier CitT: a member of a novel eubacterial transporter family related 2-oxoglutarate/malate translocator from spinach chloroplasts
J. Bacteriol. 180: 4160-4165
- Prakash S., Cooper G., Singhi S. and Saier M.H. Jr. (2003)
The ion transporter superfamily
Biochim. Biophys. Acta 1618: 79-92
- Rabin R.S. & Stewart V. (1993)
Dual response regulators (NarL and NarP) interact with dual sensors (NarX and NarQ) to control nitrate- and nitrite-regulated gene expression in *Escherichia coli* K-12
J. Bacteriol. 175: 3259-3268
- Radler F. and Yannissis C. (1972)
Weinsäureabbau bei Milchsäurebakterien
Arch. Mikrobiol. 82: 219-239
- Reaney S.K., Begg C., Bungard S.J., Guest J.R. (1993)
Identification of L-tartrate dehydratase genes (*ttdA* and *ttdB*) of *Escherichia coli* and evolutionary relationship with the class I fumarase genes
J. Gen. Microbiol. 139:1523-1530
- Richmond C.S., Glasner J.D., Mau R., Jin H. and Blattner F.R. (1999)
Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* K-12
Nucleic Acids Research 27: 3821-3835
- Rode H. and Giffhorn F. (1982)
D-(-)-tartrate dehydratase of *Rhodopseudomonas spheroides*: purification, characterization and application to enzymatic determination of D-(-)-tartrate
J. Bacteriol. 150: 1061-1068
- Rode H. and Giffhorn F. (1982)
Ferrous- or cobalt ion-dependent D-(-)-tartrate dehydratase of *Pseudomonas*: purification and properties
J. Bacteriol. 150: 1602-1604

- RöMPP Lexikon (1999)
10. Auflage, Thieme
- Ruffner H. and Rast D. (1974)
Die Biogenese von Tartrat in der Weinrebe
Z. Pflanzenphysiol. 73: 45-55
- Saier M.H.Jr. (1998)
Transport Classification database
<http://www.tcdb.org/index.php>
- Saier M.H.Jr. (1998)
Molecular phylogeny as a base for the classification of transport proteins from bacteria, archaea and eukarya
Adv. Microb. Physiol. 40: 81-136
- Saier M.H.Jr. (2000)
A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters
Microbial. Mol. Biol. Rev. 64: 354-411
- Saito K., Ohmoto J. and Kuriha N. (1997)
Incorporation of ^{18}O into oxalic, L-threonic and L-tartaric acids during cleavage of L-ascorbic and 5-keto-D-gluconic acids in plants
Phytochem. 44: 805-809
- Sakaguchi K. & Tada S. (1940)
On the formation of succinic acid by *Bakterium succinicum*, nov. sp.
Zentr. Bakt. Parasitenk. II. 101: 341-354
- Salomone J.Y. and Otten L (1999)
Structure and function fo a conserved DNA region coding for tartrate utilization in *Agrobacterium vitis*
FEMS Microbiol. letters 174: 333-337
- Sambroock J. & Russel D.W. (2001)
Molecular cloning: A laboratory manual, 3rd ed.
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Sawers G., Kaiser M., Sirko A., Freundlich M. (1997)
Transcriptional activation by FNR and CRP: reciprocity of binding-site recognition
Mol. Microbiol. 23: 835-843

- Schell M.A. (1993)
Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators
Annu. Rev. Microbiol. 47:597-626
- Schumacher U. (2005)
YgiP- Der Tartratregulator des anaeroben Tartratstoffwechsels in *E. coli*
Diplomarbeit an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- Shilo M. (1957)
The enzymatic conversion of the tartaric acid to oxaloacetic acid
J. Gen. Microbiol. 16: 472-481
- Shilo M. and Stainer R.Y. (1957)
The utilization of the tartaric acids by *Pseudomonads*
J. Gen. Microbiol. 16: 482-490
- Six S., Andrews S.C., Uden G. and Guest J.R. (1994)
Escherichia coli possesses two homologous anaerobic C₄-dicarboxylate transporters (DcuA and DcuB) distinct from the aerobic dicarboxylate transport system (Dct)
J. Bacteriol. 176: 6470-6478
- Soupe E., van Heeswijk W.C., Plumbridge J., Stewart V., Bertenthal D., Lee H., Prasad G., Paliy O., Charernnoppakul P., and Kustu S (2003)
Physiological Studies of *Escherichia coli* Strain MG1655: Growth Defects and Apparent Cross-Regulation of Gene Expression
J. Bacteriol. 185: 5611-5626
- Reumann S., Maier E., Heldt H.W. and Benz R. (1998)
Permeability properties of the porin of spinach leaf peroxisomes
Eur. J. Biochem. 251: 359-366
- Rid M., Rid S., Petit A., Bollet C., Dessaux Y and Gardan L. (2000)
Characterization of plasmid-born and chromosome-ended traits of *Agrobacterium* Biovar 1,2, and 3 strains from France
Appl. and Environ. Microbiol. 66: 1818-1825
- Ruszczky M.W. & Anderson V.E. (2004)
Tartrate dehydrogenase reductive decarboxylation: stereochemical generation of diastereotopically deuterated hydroxymethylenes
Bioorg. Chem. 32: 51-61

- Suppmann B. & Sawers G. (1994)
Isolation and characterization of hypophosphite-resistant mutants of *Escherichia coli*: identification of the FocA protein, encoded by the *pfl* operon, as a putative formate transporter
Mol. Microbiol. 11: 965-982
- Thompson J.D., Higgins D.G. and Gibson T.J. (1994)
CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice
Nucleic Acids Res. 22: 4673-4680
- Tipton P.A. & Beecher B.S (1994)
Tartrat dehydrogenase, a new member of the family of metal-dependent decarboxylating R-Hydroxyacid Dehydrogenase
Arch. Biochem. Biophys. 313: 15-21
- Tolner B., Ubbink-Kok T., Poolman B and Konings W.N. (1995)
Cation-selectivity of the L-glutamate transporters of *Escherichia coli*, *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus caldotenax*: dependence on the environment in which the proteins are expressed.
Mol. Microbiol. 18:123-133
- Uden G. & Bongaerts J. (1997)
Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors.
Biochim. Biophys. Acta. 1320: 217-234.
- Uden G. and Kleefeld A. (2004)
C4-Dicarboxylate degradation in aerobic and anaerobic growth, Module 3.4.5 In R. Curtiss III (Editor in Chief), EcoSal - *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology.
(Online) <http://www.ecosal.org>. ASM Press, Washington, D.C.
- Vaughn R.H. Marsch G.L. Stadmann T.C. and Cantino B.C. (1946)
Decomposition of tartrates by the coliform bacteria
J. Bacteriol. 52: 311-325
- Wagner S. & Pfennig N. (1987)
Monoxenic culture of the anaerobic ciliate *Trimyema compressum* Lackey
Arch. Microbiol. 149:4-11

- Wallace B., Yang Y.J., Hong J. and Lum D. (1990)
Cloning and sequencing of a gene encoding a glutamate and aspartate carrier of *Escherichia coli* K-12
J. Bacteriol. 172: 3214-3220
- Weber A., Menzlaff E., Arbinger B., Gutensohn M., Eckerskorn C. and Flügge U.I. (1995)
The 2-oxoglutarate/malate translocator of chloroplast envelope membranes: molecular cloning of a transporter containing a 12-helix motif and expression of the functional protein in yeast cells.
Biochem. 34: 2621-2627
- Wendisch V.F., Zimmer D.P., Khodursky A., Peter B., Cozzarelli N. and Kustu S. (2001)
Isolation of *Escherichia coli* mRNA and comparison of expression using mRNA and total RNA on DNA microarrays
Analytical Biochemistry 290: 205-213
- Würdig G. and Woller R. (1989)
Chemie des Weins
Eugen Ulmer GmbH & Co.
- Zientz E., Six S. and Uden G. (1996)
Identification of a third secondary carrier (DcuC) for anaerobic C₄-dicarboxylate transport in *Escherichia coli*: Roles of the three Dcu carriers in uptake and exchange
J. Bacteriol. 176: 7241-7247
- Zientz E., Bongaerts J., Uden G. (1998)
Fumarate regulation of gene expression in *Escherichia coli* by DcuSR (*dcuSR* genes) two-component regulatory system
J. Bacteriol. 180:5421-5425
- Zientz E., Jansusch I.G., Six S. and Uden G. (1999)
Functioning of DcuC as the C₄-dicarboxylate carrier during glucose fermentation by *Escherichia coli*
J. Bacteriol. 181: 3716-7220
- Zientz E. (2000)
Identifizierung und Charakterisierung des Fumaratregulationssystems DcuSR aus *Escherichia coli*
Dissertation an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

7 Anhang

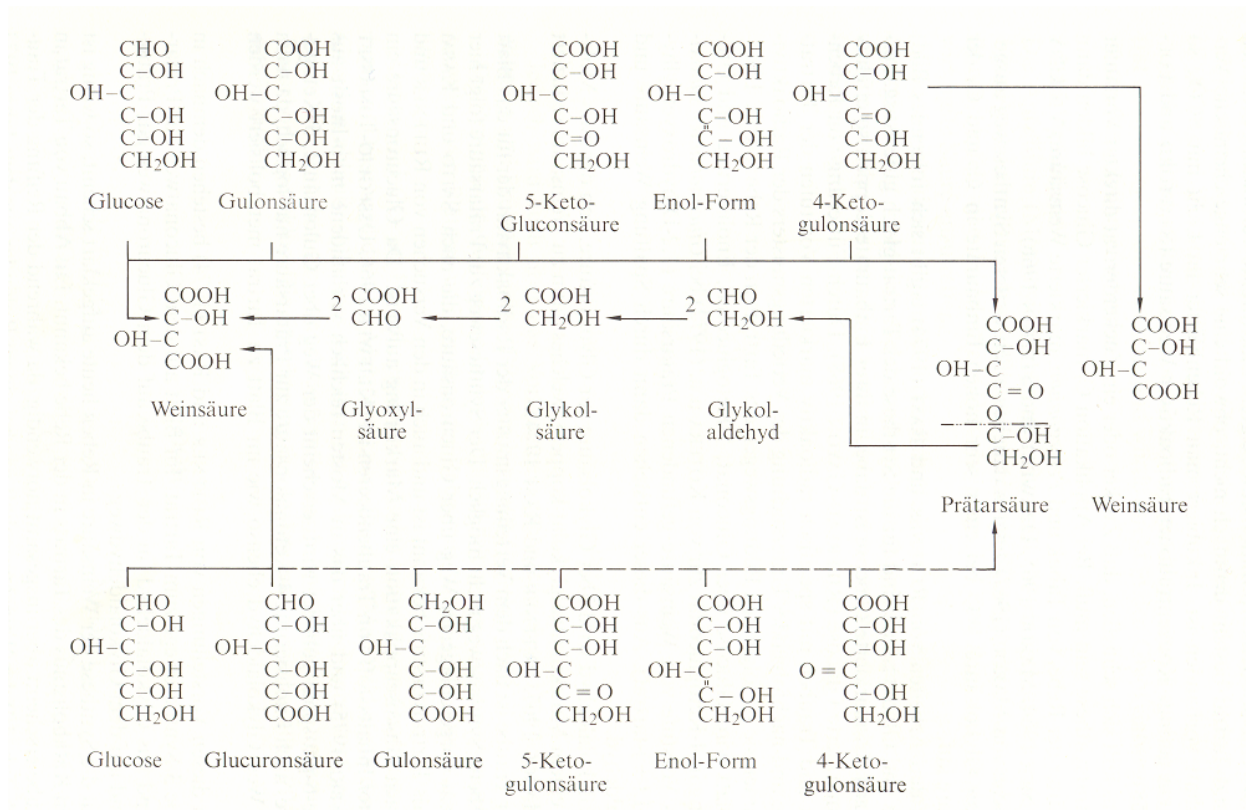


Abb. 32. Alternative Wege zur Synthese von Weinsäure in *V. riparia* x *V. vinifera* (nach Ruffner & Rast, 1974)

8 Veröffentlichungen

Janausch I.G., Kim O. B., Uden G. (2001)

DctA- and Dcu-independent transport of succinate in *Escherichia coli*: contribution of diffusion and of alternative carriers

Arch. Microbiol. 176: 224-230

TtdT, tartrate:succinate exchange protein of *Escherichia coli*

In Bearbeitung

DcuSR-independent Regulators, TtdR and YeaT, in regulation of tartrate metabolism in *Escherichia coli*

In Bearbeitung