

**Identifizierung von Hexosecarriern
und
Regulation des Phosphoketolasewegs in
*Oenococcus oeni***

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Tanja Zaunmüller

Mainz, Dezember 2007

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	2
3. Material und Methoden	13
3.1 Stämme und Plasmide.....	13
3.2 Medien.....	14
3.3 Primer.....	17
3.4 Bakterienzucht.....	19
3.5 Molekularbiologische Methoden.....	21
3.6 Biochemische Methoden.....	30
3.7 Analyse der Zellproteine durch Shotgun Proteomanalysen.....	32
3.8 Bioinformatische Methoden.....	35
4. Ergebnisse	37
Teil I: Hexosetransport in <i>O. oeni</i>	37
4.1.1 Eigenschaften des Transports und Auswahl von Kandidaten.....	37
4.1.2 Bestimmung der relativen Genexpression im Stamm <i>O. oeni</i> PSU-1.....	39
4.1.3 Bestimmung der relativen Genexpression im Stamm <i>O. oeni</i> B1.....	42
4.1.4 Vergleich der relativen Genexpression der Stämme PSU-1 und B1.....	43
4.1.5 Versuche zur Komplementation des Glucosetransports einer <i>E. coli</i> Negativmutante.....	45
4.1.6 Induktion der Kandidatengene bei pH 4.....	47
4.1.7 Expression der Hexose-Phosphotransferasesysteme.....	48
4.1.8 Analyse der Carriergene von <i>O. oeni</i> mit Hilfe der IMG-Datenbank.....	50
4.1.9 Analyse der Zellproteine durch Shotgun Proteomanalysen.....	56
Teil II Regulation des Zentralstoffwechsels	63
4.2.1 Analyse der Proteine des Zentralstoffwechsels durch Proteomanalyse.....	63
4.2.2 Expression der Gene des Zentralstoffwechsels.....	75
4.2.3 Pyruvat als zentrales Stoffwechselprodukt.....	77
5. Diskussion	83
5.1 Hexosetransport in <i>O. oeni</i>	83
5.2 Regulation des Zentralstoffwechsels.....	93
6. Literaturverzeichnis	102
7. Veröffentlichungen	110
8. Anhang	111

1. Zusammenfassung

Oenococcus oeni ist ein heterofermentatives Milchsäurebakterium, das Hexosen über den Phosphoketolaseweg zu Lactat, Acetyl-P und CO₂ umsetzt. In Anhängigkeit von der C-Quelle werden Ethanol, Acetat, Mannit und geringe Mengen an Erythrit gebildet.

Im Genom von *O. oeni* PSU-1 wurden neun Gene für sekundäre Carrier identifiziert, die aufgrund ihrer Sequenz und Lage im Genom als Kandidaten für Hexosecarrier in Frage kommen. In Stamm *O. oeni* B1 wurde die Expression der Gene OEOE_0819 und OEOE_1574 stark durch Glucose induziert. Die Gene konnten jedoch Hexosetransport-Defektmutanten von *E. coli* nicht komplementieren. Die deutliche Induktion der Gene deutet auf ihre Funktion im Hexosetransport hin. Bei den Carriern 819 und 1574 handelt es sich vermutlich um früher identifizierte Δp -getriebene sekundäre Hexosetransporter. Die Expression der Kandidaten zeigte teilweise Unterschiede bei verschiedenen *O. oeni* Stämmen. Auch die Funktion von Phosphotransferasesystemen bei der Aufnahme von Hexosen wurde durch Expressionsmessungen untersucht. Einige Systeme weisen Ähnlichkeit zu Glucose- und Fructose-transportierenden Systemen auf und kommen als Aufnahmesysteme für Hexosen in Frage. Das Phosphotransferasesystem OEOE_0464-0466 wird besonders durch Fructose induziert.

O. oeni bildet in Abhängigkeit von der C-Quelle unterschiedliche Wege zur Reoxidation des im zentralen Phosphoketolaseweg entstandenen NAD(P)H aus. Die Regulation des Zentralstoffwechsels und des peripheren Stoffwechsels wurde durch Bestimmung der relativen Genexpression und durch Proteomanalysen untersucht. Die Anwesenheit von Citrat und Pyruvat ändert die Expression der Gene deutlich. Bei Zucht mit Ribose, Glucose oder Fructose jedoch bleibt die Expression der meisten Gene konstant. Am stärksten wird der Ethanolweg reguliert, der hauptsächlich nach Zucht mit Glucose zur Reoxidation des NAD(P)H genutzt wird. Die Expression des *adhE*-Gens der Acetaldehyd- und Alkohol-Dehydrogenase nimmt bei Zucht auf anderen C-Quellen stark ab.

Pyruvat ist ein zentrales Intermediat des Energiestoffwechsels und Ausgangsprodukt für Reaktionen des Bausstoffwechsels. Die Expression einiger Pyruvat-liefernder und Pyruvat-verbrauchender Reaktionen wurde bestimmt, um so die Entstehung und den Verbrauch des Pyruvats abhängig von der Stoffwechselsituation beurteilen zu können.

2. Einleitung

Oenococcus oeni ist ein Gram-positives Milchsäurebakterium. Es setzt Zucker in einer heterofermentativen Milchsäuregärung über den Phosphoketolaseweg zu Lactat, Ethanol und CO₂ um. Je nach vorhandener Kohlenstoffquelle und Redoxsituation in der Zelle entstehen die Nebenprodukte Acetat, Mannit, geringe Mengen an Erythrit und auch Glycerin.

Besondere Bedeutung hat *O. oeni* durch seine Verwendung in der Weinherstellung erlangt. Es ist besonders säure- und alkoholresistent und somit optimal an das Habitat Wein adaptiert. *O. oeni* wird zur Durchführung des biologischen Säureabbaus (BSA), der Malolactatfermentation, eingesetzt. Die im Wein vorkommende Äpfelsäure wird hierbei durch das Malolactatenzym decarboxyliert und es entsteht L-Lactat. CO₂ diffundiert aus der Zelle und das Lactat gelangt mit einem Proton nach außen (Salema *et al.*, 1994), was zum Aufbau eines Protonengradienten führt. Über eine ATPase kann dieser zur ATP-Synthese verwendet werden (Salema *et al.*, 1996). Die damit gewonnene Energie alleine reicht jedoch zum Wachstum nicht aus. Hierzu müssen auch die im Wein vorhandenen Zucker umgesetzt werden. Die Malolactatfermentation findet entweder spontan im Wein statt oder kann vom Winzer gezielt durch Zugabe von *O. oeni* in Form von Starterkulturen hervorgerufen werden. Besonders in Regionen mit kälterem Klima ist der BSA aufgrund des hohen Säuregehalts der Weine gewünscht. Die Reduktion des Säuregehaltes bringt eine sensorische Verbesserung des Weines mit sich.

Allerdings können während der Malolactatfermentation neben der Äpfelsäure auch andere im Wein vorhandene Stoffe von *Oenococcus* umgesetzt werden und den Wein negativ beeinflussen (Lonvaud-Funel, 1999; Liu, 2002). So kann beispielsweise Citrat zu Diacetyl abgebaut werden und dem Wein ein Butteraroma verleihen. Auch entsteht durch die Umsetzung von Citrat und im Wein noch vorhandener Zucker Acetat, welches den Wein ab Überschreitung einer Konzentration von 1 g/l verdirbt (Lonvaud-Funel, 1999). Wird im Wein vorhandene Fructose durch *O. oeni* verstoffwechselt, entsteht Mannit. Auch dieses kann zu einem Weinfehler führen (Dittrich und Großmann, 2005). Deshalb erfordert die Malolactatfermentation eine genaue Kontrolle, um eine Verbesserung des Weins zu erzielen.

Das Genom von *O. oeni* PSU-1 wurde durch das „Lactic Acid Bacteria Genome Consortium“ sequenziert und annotiert (Mills *et al.*, 2005). In diesem Projekt wurde zusammen mit dem Joint Genome Institute (JGI) des Department of Energy im Jahr 2002 die Sequenzierung der Genome von elf Milchsäurebakterien begonnen, darunter Vertreter der Gattung *Lactobacillus*

und *Lactococcus* sowie beispielsweise die Spezies *Leuconostoc mesenteroides* ATCC8293, *Pediococcus pentosaceus* ATCC25745 und *Bifidobacterium longum* DJ010A. Alle Stämme sind von industrieller Bedeutung. Sie werden u. a. bei der Herstellung von Lebensmitteln wie Molkereiprodukten, Sauerteig, Wurst und Käse sowie in der Getränketechnologie eingesetzt. Die Kenntnis der Genomsequenz soll das Verständnis für mikrobiologische Prozesse fördern und in Zukunft helfen, die Herstellung von Produkten zu verbessern.

Das Genom von *O. oeni* PSU-1 enthält ca. 1800 kBasen und 1864 kodierte Gene. Für 75 Prozent der Gene konnte eine Vorhersage über deren mögliche Funktion gemacht werden, indem das Gen einem COG (Cluster of Orthologous Groups) zugeordnet wurde (Mills *et al.*, 2005). Ein COG beinhaltet sequenzähnliche Gene, die einen gemeinsamen Stammbaum haben und für die man eine ähnliche Funktion erwartet. Diese Vorhersage ermöglicht es, bisher beobachtete Stoffwechselreaktionen einzelnen Genen zuzuordnen und darüber hinaus potentielle Reaktionen des Stoffwechsels vorherzusagen. Das Genom gibt somit einen Überblick über das, was in der Zelle laut der kodierten Gene möglich ist. Die hier enthaltene Information kann als Beleg für bereits bekannte Phänomene dienen oder aber als Ausgangspunkt für neue Fragestellungen genutzt werden. Auch für molekularbiologische Anwendungen ist die Kenntnis der Nucleotidsequenz von Genen und ihrer Umgebung unerlässlich. Die durch das Joint Genome Institute zur Verfügung gestellte Datenbank IMG (Integrated Microbial Genomes) stellt bei der Untersuchung der im Genom vorliegenden Information eine wichtige Hilfe dar. So ist es möglich, das Genom nach bestimmten Kriterien, etwa dem Vorhandensein von Genen und Stoffwechselwegen, zu durchsuchen oder mit den Genomen anderer Bakterien zu vergleichen.

Hexosetransport in *O. oeni*

Der Transport von Monosacchariden in die Zelle ist der erste Schritt für ihre Nutzung und ein wichtiger Teil des Energiestoffwechsels. In vorangegangenen Arbeiten wurde die Aufnahme der Hexosen Glucose und Fructose in Zellen von *O. oeni* untersucht (Abb. 1; Richter, 2004). Der Transport beider Zucker zeigte viele Gemeinsamkeiten auf. So ist die Aufnahme der Zucker bei einem pH-Wert von 5 energieabhängig und erst nach der Energetisierung der Zellen oder der Bildung eines Protonenpotentials möglich. Wird das Potential über der Membran durch Protonophore oder Ionophore abgebaut, so geht auch der Transport bis auf ein geringes Grundniveau zurück. Glucose wurde durch den aktiven Transport bis zu einem Faktor 55 angereichert. Auch dies spricht für eine aktive Aufnahme der Glucose. Der Transport von Glucose folgt einer Michaelis-Menten-Kinetik. Mit einem K_m -Wert von 9 μM

und einem v_{\max} von 9 U/g TG ist er affiner als der Transport von Fructose mit einem K_m -Wert von 38 μM und einem V_{\max} von 5,8 U/g TG. Bei höheren Substratkonzentrationen arbeitet wahrscheinlich ein passiver Carrier, der die Substrate durch Diffusion in die Zelle bringt. Dieser Transport erreicht keine Sättigung (Richter, 2004).

Die Ergebnisse sprechen für mindestens einen hochaffinen sekundären Glucosecarrier, der gleichzeitig eine niedrigere Affinität zu Fructose hat. Neben diesem Transporter scheint bei pH 7 ein Membranpotential-unabhängiger Transporter zu arbeiten. Dieser wird nur nach Zucht bei höherem pH-Wert gebildet. Der Transport ist ebenfalls aktiv (Richter, 2004).

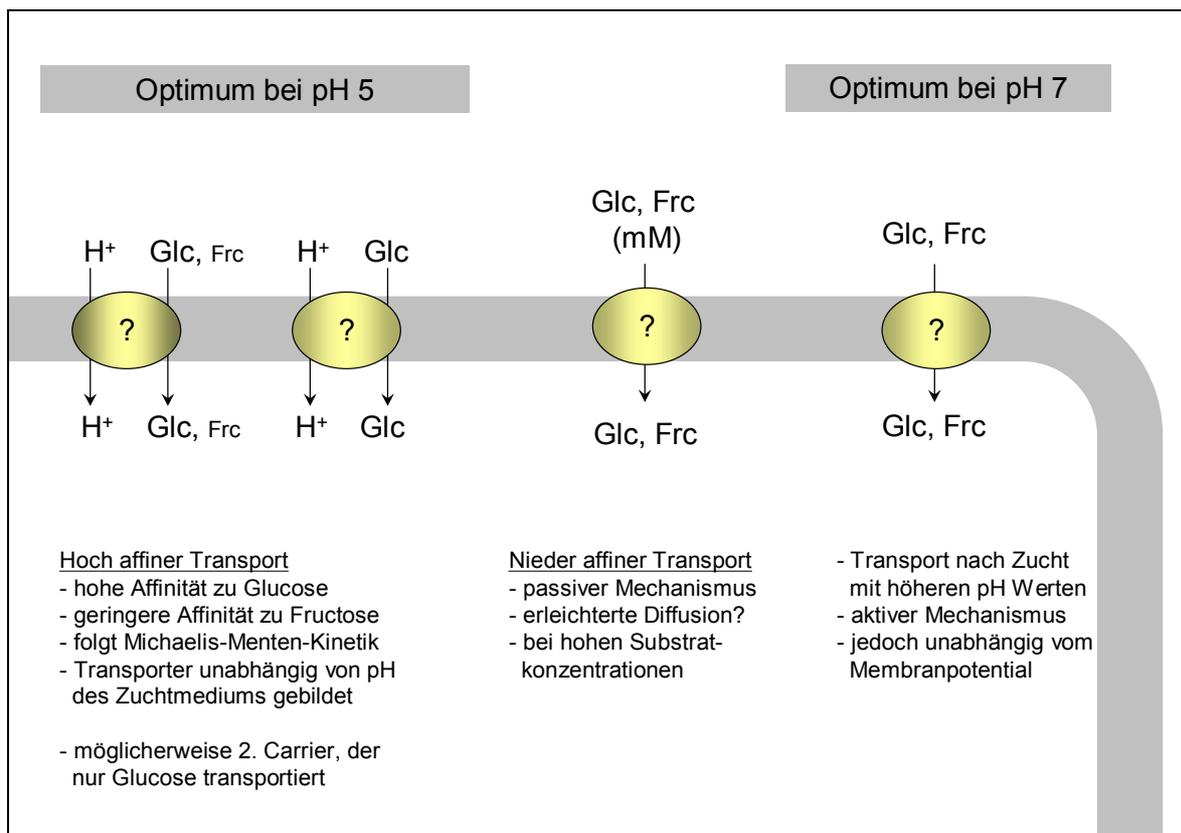


Abb. 1: Hexosetransporter in *O. oeni* nach Richter (2004): Die Aufnahme von Hexosen in *O. oeni* wird wahrscheinlich durch mehrere Carrier katalysiert. Transportmessungen von ^{14}C -Hexosen deuteten auf die Existenz mehrerer Carrier mit unterschiedlichen Eigenschaften hin. So gibt es einen hochaffinen Glucosetransporter, der durch das Membranpotential getrieben wird. Auch Fructose wird transportiert. Bei höheren Substratkonzentrationen im millimolaren Bereich scheinen die Hexosen passiv in die Zelle zu gelangen, möglicherweise durch erleichterte Diffusion. Wachsen die Zellen bei pH 5,8, wird zusätzlich ein Carrier induziert, der sein Optimum bei pH 7 hat. Diese Aktivität ist unabhängig vom Membranpotential.

Ein Transport, der vom Membranpotential abhängt, wird in Bakterien durch sekundäre Carrier katalysiert. Diese werden auch als „Electrochemical Potential-driven Transporters“ bezeichnet und sind in der gleichnamigen Transporterklasse der „Transport Classification Database“ eingeordnet (Saier *et al.*, 2006). In dieser Datenbank werden alle Transportproteine in mehr als 400 Familien eingeteilt. Jedem Transporter wird eine Klasse, eine Unterklasse, eine Familie und eine Unterfamilie zugeteilt, die der Analyse von Transportproteinen dienen.

In der Unterklasse der Porter, welche Uniporter, Symporter und Antiporter umfasst, stellt die „Major Facilitator Superfamily“ (MFS) die wichtigste Familie für am Transport von Zuckern beteiligte Proteine dar. Innerhalb der MFS werden die Carrier abhängig von ihrem transportierten Substrat in Unterfamilien eingeteilt. Die „Sugar-Porter-Family“ und die „Fucose: H⁺-Symporter-Family“ transportieren Glucose und andere Zucker. Ihre Mitglieder zeichnen sich durch eine Größe von ca. 400-800 Aminosäuren und zwölf Transmembranhelices (meistens 2 x 6) aus. Die Sequenzähnlichkeit innerhalb einer Familie ist dabei höher als die zu anderen Familien der MFS (Pao *et al.*, 1998).

Bisher ist über die Struktur der Transporter und ihre Beziehung zur Funktion wenig bekannt, so dass zunächst Länge und Ähnlichkeit der Sequenz sowie die Anzahl der vorhergesagten Transmembranhelices zu einer ersten Klassifizierung herangezogen werden können. Die Substratspezifität kann aus der Aminosäuresequenz nicht abgeleitet werden, ebenso sind Substratbindestellen wenig charakterisiert. Bisher gibt es nur wenige Transporter, deren Struktur bekannt ist. Strukturell am besten untersucht ist die Lactose-Permease LacY von *Escherichia coli*, deren Kristallisation gelungen ist (Abramson *et al.*, 2003). LacY gehört ebenfalls zur „Major Facilitator Superfamily“, jedoch zu der Unterfamilie der Oligosaccharid: H⁺-Symporter. Auch die Struktur des Glycerin-3-Phosphat-Transporters GlpT wurde bestimmt (Huang *et al.*, 2003). Bisher gibt es jedoch noch keine Strukturen bekannter Zuckertransporter wie Glf von *Zymomonas mobilis*, der Glucose durch erleichterte Diffusion in die Zelle bringt, oder auch GlcP, einem Glucose/Mannose: H⁺-Symporter aus *Bacillus subtilis*.

Die physiologische Charakterisierung hat zu keiner eindeutigen Identifizierung von Hexosecarriern von *O. oeni* geführt (Richter, 2004). Deshalb sollte versucht werden, jene Gene zu bestimmen, die für spezifische Glucose- oder Fructosecarrier kodieren. Das Genom von *O. oeni* PSU-1 wurde nach Kandidatengenen für sekundäre Carrier durchsucht, die für die Aufnahme von Glucose und Fructose zuständig sein könnten. Um zu überprüfen, ob eines dieser Gene eine Rolle für den Transport der Hexosen spielt, wurde deren relative Genexpression nach Zucht auf Ribose, Glucose und Fructose bestimmt. Die quantitative Real-time PCR vergleicht den Gehalt an mRNA eines bestimmten Gens unter verschiedenen Bedingungen. Aus den Transportmessungen (Richter, 2004) war bekannt, dass beim Wachstum mit Hexosen eine Aufnahmeaktivität von ¹⁴C-Glucose und -Fructose induziert wird. Man kann somit davon ausgehen, dass die Genexpression der Carrier durch das entsprechende Substrat induziert wird. Die Bestimmung der relativen Genexpression eines Kandidaten kann somit Hinweise auf die Rolle eines Gens bei der Aufnahme von Hexosen

geben. Wird ein Gen nach Zucht auf Glucose oder Fructose deutlich induziert, durch Ribose aber nicht, so kommt es als Transporter für diese Zucker in Frage.

O. oeni ist bisher nicht genetisch zugänglich. Eine Herstellung von Knock-out-Mutanten zur Überprüfung der Kandidaten für sekundäre Carrier ist nicht möglich. Somit stellt die quantitative Real-time PCR eine der wenigen Methoden dar, die eine genaue Expressionsmessung (und damit Funktionszuordnung) ermöglichen. Auch Northern-blot Analysen sind wegen ihrer schlechten Quantifizierbarkeit für genauere Expressionsanalysen nicht geeignet.

Neben Genen für sekundäre Carrier findet man im Genom von *O. oeni* auch zahlreiche Phosphotransferasesysteme. Auch diese können bei der Aufnahme von Zuckern in die Zelle eine Rolle spielen. Hierbei wird das Substrat beim Eintritt in die Zelle phosphoryliert. Der Phosphatrest wird von Phosphoenolpyruvat über eine Kaskade von fünf Schritten auf den Zucker übertragen. An diesem Transport sind die unspezifischen Komponenten EI und HPr und die für ein Phosphotransferasesystem spezifischen Komponenten EIIABC beteiligt (Abb. 2).

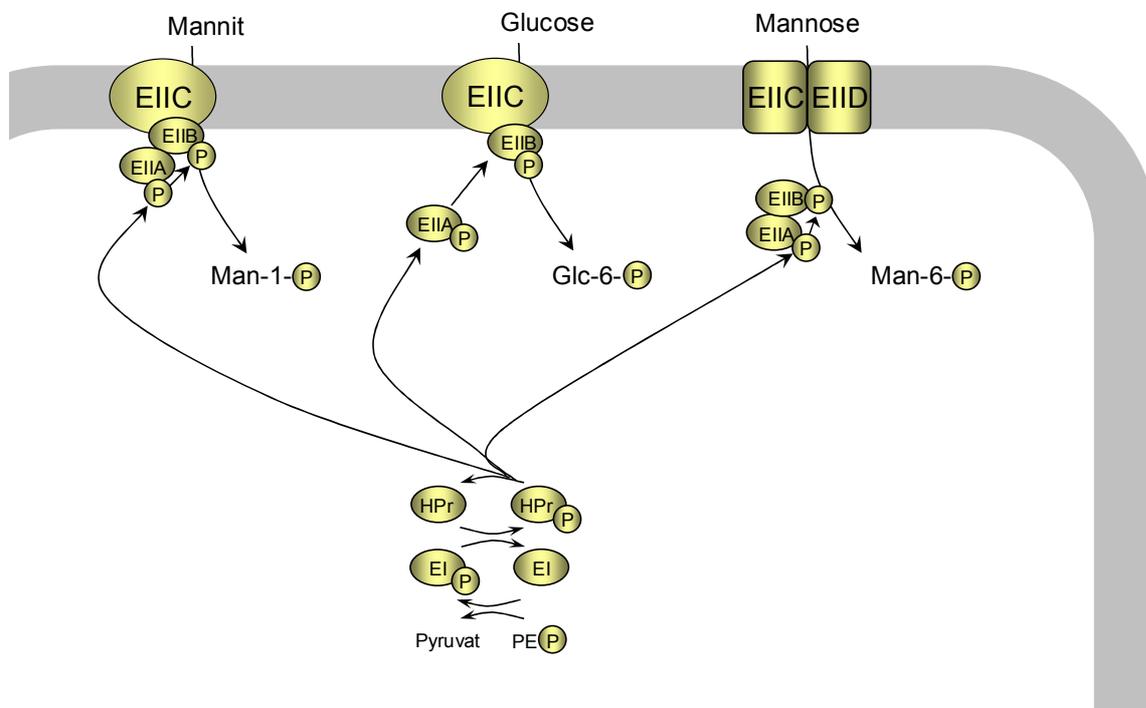


Abb. 2: Verschiedene Typen von Phosphotransferasesystemen (Lengeler und Jahreis, 1996). Die universellen Komponenten HPr und EI übertragen den Phosphatrest von Phosphoenolpyruvat (PEP) auf die spezifischen EIIABC-Systeme. Im Mannit-spezifischen System sind alle drei Domänen fusioniert. Im Glucose-spezifischen System ist die Komponente EIIB mit der Transporterdomäne EIIIC fusioniert. Das Mannose-spezifische System besteht aus den membranständigen Komponenten EIIIC und EIID. Die cytoplasmatischen Domänen EIIA und EIIB sind fusioniert.

EIIC ist ein integrales Membranprotein und katalysiert den Transport des Substrats. Die Komponenten EIIA und EIIB sind cytoplasmatische Proteine. Sie können entweder mit EIIC fusioniert sein oder separat im Cytoplasma vorliegen (Abb. 2). In manchen Systemen ist das Membranprotein aus den zwei Domänen EIIC und EIID aufgebaut. EIIA und EIIB leiten den Phosphatrest von Hpr zur membranständigen Komponente EIIC, welche das Substrat in die Zelle transportiert. Das Substrat wird beim Eintritt in die Zelle von EIIB phosphoryliert.

In heterofermentativen Milchsäurebakterien, die Hexosen über den Phosphoketolaseweg abbauen, sollten Phosphotransferasesysteme nicht für Hexosen des Energiestoffwechsels genutzt werden (Romano *et al.*, 1979). Dennoch sollten auch Phosphotransferasesysteme in dieser Arbeit genauer betrachtet werden. In einer Genomanalyse werden die in *O. oeni* kodierten Phosphotransferasesysteme zusammengestellt und auf ihre Substratspezifität hin untersucht. Die Bestimmung der relativen Expression von Genen, deren Produkte Ähnlichkeiten zu Glucose- oder Fructose-transportierenden Systemen haben, sollte auch hier Auskunft über eine mögliche Rolle bei der Aufnahme von Hexosen in *O. oeni* geben.

Eine weitere Möglichkeit für Bakterien, Hexosen in die Zelle zu transportieren, sind ABC-Transporter. Das Substrat wird hierbei unter Verbrauch von ATP in die Zelle transportiert. Durch die Umsetzung von Glucose über den Phosphoketolaseweg entsteht jedoch nur 1 ATP. Im Genom sind zwar mehrere ABC-Carrier kodiert, doch dieser Mechanismus sollte für *O. oeni* aus energetischen Gründen für den Transport von Hexosen nicht in Frage kommen (Richter, 2004).

Ziel dieser Arbeit

Durch Bestimmung der relativen Genexpression ausgewählter Kandidaten für sekundäre Carrier und einiger Phosphotransferasesysteme soll die Rolle dieser Gene und dazugehörigen Transportproteine für die Aufnahme von Hexosen in die Zelle geklärt werden. Die Ergebnisse sollen in Einklang mit den Daten gebracht werden, die durch die ¹⁴C-Transportmessungen erhalten wurden, um potentielle Carrier für den Hexosetransport im fermentativen Stoffwechsel zu bestimmen.

Regulation des Phosphoketolasewegs

Als heterofermentatives Milchsäurebakterium setzt *O. oeni* Hexosen und Pentosen über den Phosphoketolaseweg um - die Enzyme und Produkte sind hierbei bekannt. Abhängig von den Kohlenstoffquellen, die der Zelle zur Verfügung stehen, werden unterschiedliche Endprodukte gebildet.

Zentrale Produkte des Phosphoketolasewegs sind Acetyl-P, Lactat, CO₂ und 2 NAD(P)H. Das NAD(P)H wird standardmäßig durch Reduktion von Acetyl-P zu Ethanol reoxidiert. Bei Wachstum auf verschiedenen C-Substraten stehen aber alternative Wege zur Reoxidation des NAD(P)H zur Verfügung (Abb. 3).

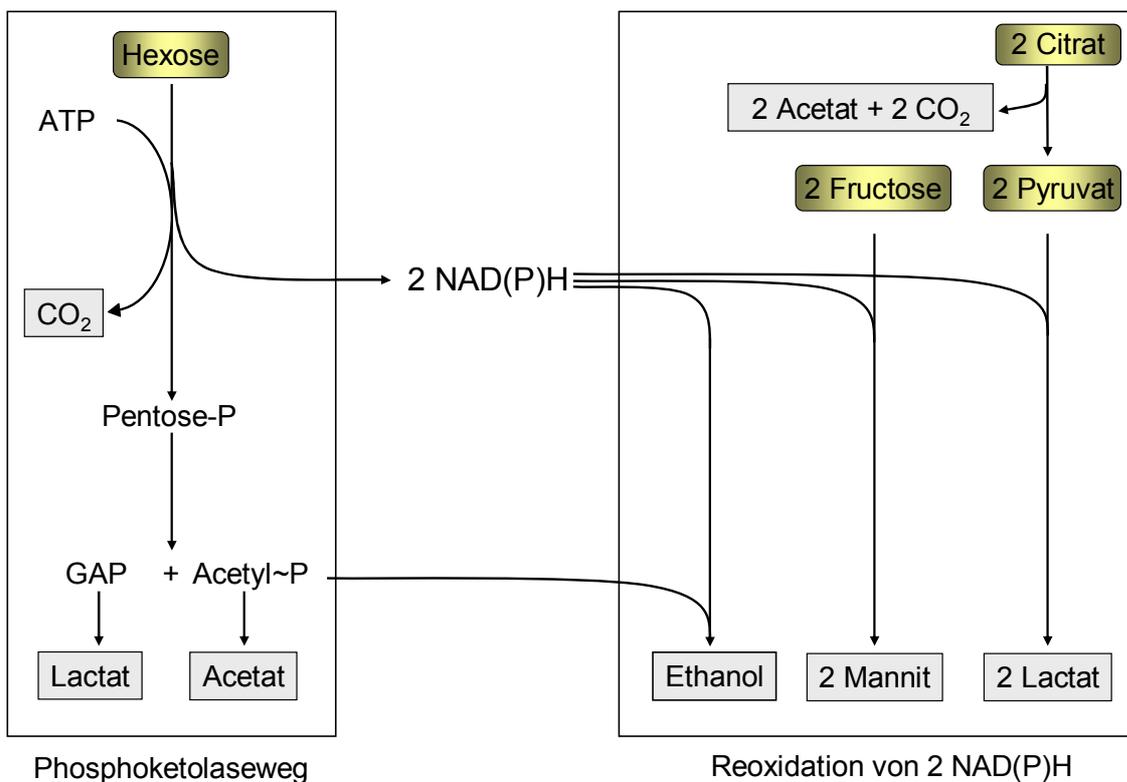


Abb. 3: Reoxidation von NAD(P)H. Während der Oxidation von Hexosen entstehen im Phosphoketolaseweg zwei NAD(P)H. Im Ethanolweg wird Acetyl-P zu Ethanol reduziert und so zwei NAD(P)H regeneriert. Stehen jedoch externe Elektronenakzeptoren wie Fructose, Citrat oder Pyruvat zur Verfügung, so werden diese zur Reoxidation genutzt.

Da der Ethanolweg oft limitierend ist, werden die in der Abbildung gezeigten Alternativen je nach Verfügbarkeit als Elektronenakzeptoren genutzt. Bei Zucht auf Glucose beispielsweise entstehen geringe Mengen an Erythrit (Veigha-da-Cunha *et al.*, 1993). Auch auf diese Weise kann NADH reoxidiert werden. Für den Winzer können hier jedoch unerwünschte Produkte entstehen, im Fall von Pantothen säuremangel etwa größere Mengen Acetat, die den Wein sensorisch negativ beeinflussen. Pantothen säure wird zur Synthese von Coenzym A benötigt, dem Cosubstrat der Acetaldehyd-Dehydrogenase im Ethanolweg. Steht dieses Vitamin nicht ausreichend zur Verfügung, nimmt die Aktivität des Ethanolwegs ab (Richter, 2000). Wenn

O. oeni in Gegenwart von Fructose wächst, kann diese ebenfalls reduziert werden und es entsteht Mannit (Salou *et al.*, 1994; Richter *et al.*, 2003_a). Auf diese Weise kann ein NAD(P)H dem Stoffwechsel wieder in oxidierter Form zur Verfügung gestellt werden. Fructose kann jedoch auch als alleinige C-Quelle umgesetzt. Etwa ein Drittel des Substrats wird dann über den Phosphoketolaseweg zu Lactat, Acetat und CO₂ umgesetzt. Zwei Drittel der Fructose dienen der Reoxidation der dort anfallenden Reduktionsäquivalente und werden zu Mannit reduziert. In diesem Fall entfällt die Reoxidation über den limitierenden Ethanolweg, und das Acetyl-P kann als Acetat unter Gewinnung von einem ATP ausgeschieden werden (Richter *et al.* 2003_a, Richter, 2004). Abbildung 4 gibt einen Überblick über bisher bekannte Regulationen des Phosphoketolaseweg. Neben der beschriebenen Steuerung des Stoffwechsels durch alternative Akzeptoren ist auch die Phosphoglucose-Isomerase eine wichtige Stelle der Regulation. Sie dient als Vermittler zwischen dem Mannitweg und dem Phosphoketolaseweg bei Wachstum auf Fructose. Diese Regulation erfolgt allosterisch durch die Zwischenprodukte 6-Phosphogluconat und Erythrose-4-Phosphat (Hamann, 2003; Richter *et al.*, 2003_b).

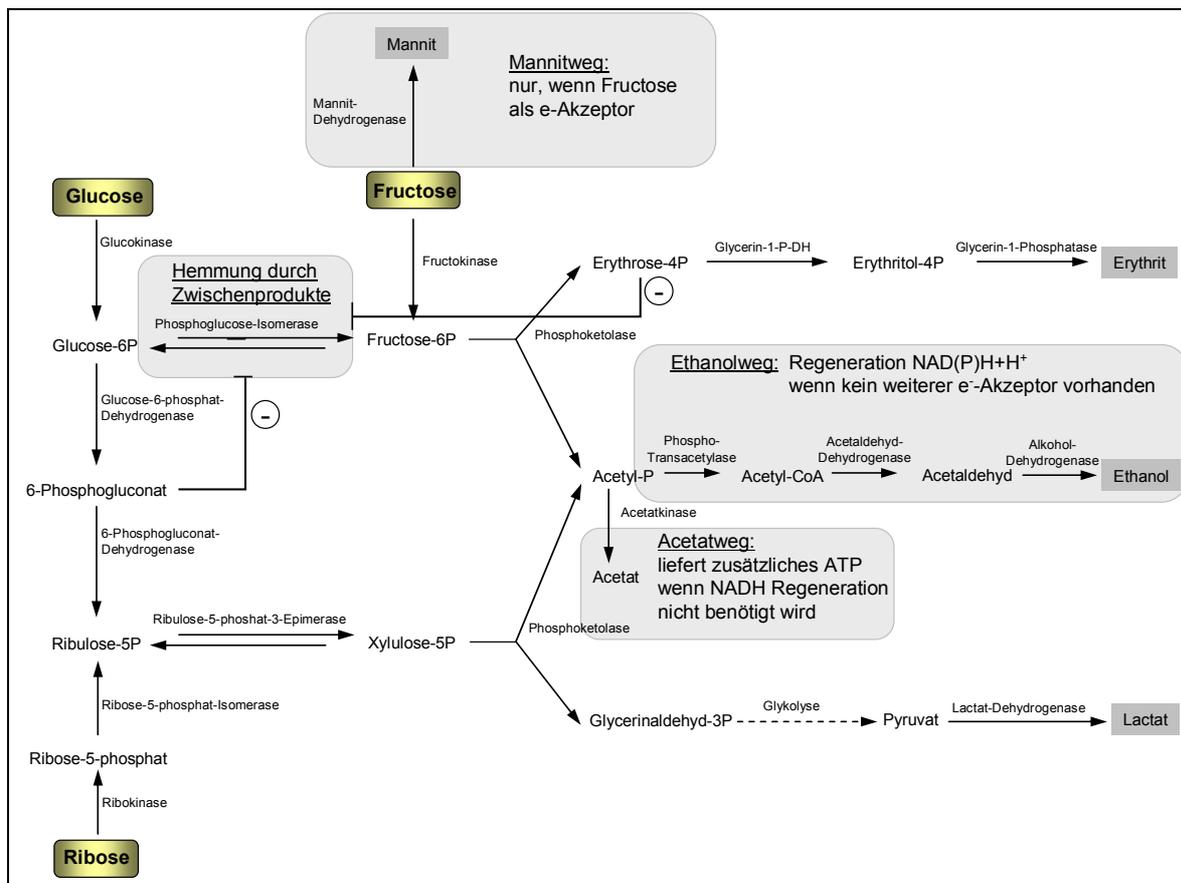


Abb. 4: Bekannte Regulationsmechanismen des Phosphoketolasewegs. Der Fluss von Fructose in den Phosphoketolaseweg wird über die Phosphoglucose-Isomerase reguliert, welche kompetitiv durch 6-Phosphogluconat und Erythrose-4-phosphat gehemmt wird. Der Fluss in den Ethanolweg ist abhängig von der Notwendigkeit NAD(P)H zu regenerieren. Zuckersubstrate sind gelb unterlegt, Endprodukte grau.

Eine Sonderstellung im Stoffwechsel von *O. oeni* nimmt Pyruvat ein. Es kann entweder in Cofermentation mit Glucose als Elektronenakzeptor genutzt werden und so die Reoxidation der Reduktionsäquivalente beschleunigen oder als alleinige Kohlenstoffquelle umgesetzt werden. Pyruvat wird dann disproportioniert und dabei zu gleichen Teilen zu Lactat reduziert und zu Acetyl-CoA und CO₂ oxidiert. Acetyl-CoA wird dann als Acetat ausgeschieden, wodurch ATP gewonnen wird (Wagner *et al.*, 2005). Zudem entsteht Pyruvat auch bei der Umsetzung von Pentosen und Hexosen als Zwischenprodukt im Phosphoketolaseweg; es wird zu Lactat reduziert und dient zur Regeneration von Reduktionsäquivalenten. Auch aus Citrat, das im Cometabolismus mit Glucose verstoffwechselt wird, entsteht Pyruvat, welches dann als Elektronenakzeptor dient. Somit kann Pyruvat aus einer Vielzahl von Reaktionen entstehen und auch in einer Reihe von Reaktionen in der Zelle weiter umgesetzt werden.

Ziel dieser Arbeit

Die Bestimmung der relativen Genexpression mittels quantitativer Real-time PCR stellt eine Möglichkeit dar, Regulationen im Stoffwechsel auf Ebene der Transkription zu untersuchen. Da in der Regulation des Zentralstoffwechsels die zur Verfügung stehende Kohlenstoffquelle und die daraus resultierenden Möglichkeiten zur Reoxidation von NAD(P)H eine entscheidende Rolle spielen, soll die Expression wichtiger Gene nach Zucht auf verschiedenen Zuckern mit und ohne Elektronenakzeptor untersucht werden. So wird die Expression der Gene für die bifunktionelle Acetaldehyd- und Alkohol-Dehydrogenase AdhE, die Lactat-Dehydrogenase, die Pyruvat-Kinase, die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, die Acetat-Kinase und die Mannit-Dehydrogenase nach Zucht auf Ribose, Glucose, Fructose sowie Glucose plus Citrat, Glucose plus Pyruvat und Pyruvat als alleinige C-Quelle bestimmt. Auch die Regulation der Genexpression pyruvatbildender und pyruvatverbrauchender Enzyme wird betrachtet. So wird die relative Expression der Oxalacetat-Decarboxylase, der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase *ppcA*, der E1 β -Untereinheit der Pyruvat-Dehydrogenase und von zwei Kandidatengen für eine Pyruvatoxidase nach Zucht auf verschiedenen Zuckern ermittelt. Änderungen der Expression dieser Gene sollen einen Hinweis darauf geben, durch welche Reaktionen Pyruvat unter bestimmten Bedingungen zur Verfügung gestellt beziehungsweise verbraucht wird.

Shotgun Proteomanalysen

Die Methode der Shotgun Proteomanalyse bietet die Möglichkeit, die in der Zelle vorliegenden Proteine zu betrachten. Hierbei werden die Zellproteine mit Trypsin verdaut. Die entstandenen Peptide werden gereinigt und durch Massenspektrometrie analysiert. Durch die Methode der **Multidimensional Protein Identification Technology** (MudPIT) können die Peptidfragmente durch zwei aufeinander folgende Verfahren der Flüssigchromatographie voneinander getrennt werden. In der direkt anschließenden ersten Massenspektrometrie wird ihre Masse bestimmt. In einer zweiten Massenspektrometrie kann sogar die Aminosäuresequenz dieser Peptide ermittelt und mit dem Genom von *O. oeni* PSU-1 verglichen werden. Jedes Peptid kann somit dem Protein, aus dem es stammt, zugeordnet werden. Die Kenntnis des Bakteriengenoms ist Voraussetzung für die Anwendbarkeit dieser Methode. Alle in der Zelle vorliegenden Proteine können so durch Abgleich der Peptidsequenzen mit dem Genom bestimmt werden. Je häufiger ein Peptid einem einzelnen Protein auf diese Weise zugeordnet wird, desto häufiger liegt dieses Ursprungsprotein in der Regel auch in der Zelle vor. Somit bietet auch diese Proteomanalyse die Möglichkeit, Gehalte eines Proteins nach Zucht auf verschiedenen Kohlenstoffquellen zu bestimmen und damit seine Expression unter diesen Bedingungen zu ermitteln. Im Gegensatz zur Bestimmung der relativen Genexpression kann hier eine Vielzahl von Proteinen auf einen Blick beurteilt werden, während beim Vergleich der mRNA-Gehalte nur einzelne Gene betrachtet werden können. Proteinen, die in hoher Konzentration vorliegen, kann eine Rolle im Zellstoffwechsel zugeordnet werden.

Ziel dieser Arbeit

Die Methode der Shotgun Proteomanalysen soll für *O. oeni* etabliert werden. Sie bietet einen Gesamtüberblick über das, was in einer Zelle unter einer Stoffwechselsituation vorgehen kann und ist dadurch bei einer Reihe von Fragestellungen nützlich. So sollen die in der Zelle exprimierten Proteine nach Zucht auf Ribose, Glucose und Fructose bestimmt werden, um auch auf dieser Ebene Einblicke in die Regulationsmechanismen zu erhalten. Die Ergebnisse der Proteomanalysen stellen somit eine Ergänzung der Expressionsmessungen dar. Der Schwerpunkt der Auswertung der Proteom-Daten liegt auf der Regulation des Phosphoketolasewegs und der Betrachtung von Hexose-Transportsystemen.

Insgesamt sollen in dieser Arbeit folgende Aspekte untersucht werden:

- Identifikation der für den Hexosetransport verantwortlichen Carrier und Gene
- Untersuchung der Rolle von Phosphotransferasesystemen bei der Aufnahme von Hexosen für den Energiestoffwechsel
- Aufklärung der Regulation des Zentralstoffwechsels und der Nutzung alternativer Wege zur Reoxidation des NAD(P)H
- Analyse der Rolle von Pyruvat als zentralem Intermediat des Energie- und Baustoffwechsels

Dabei sollen die folgenden Methoden eingesetzt werden:

- Genomanalyse
- Quantitative Real-time PCR
- Messung von Enzymaktivitäten
- Shotgun Proteomanalysen

3. Material und Methoden

3.1 Stämme und Plasmide

Tabelle 1: Verwendete Stämme und Plasmide

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>O. oeni</i> B1	Wildtyp	Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Universität Mainz
<i>O. oeni</i> PSU-1 (ATCC-BAA-331)	Wildtyp	Beelman <i>et al.</i> (1977)
<i>Escherichia coli</i> LJ141	<i>E. coli</i> K-12 F ⁻ $\Delta(ptsHIcrr)::kan\ galP::cat$ $mgl-500::Tn10Tet$	Lengeler (1981)
<i>E. coli</i> JM105	<i>thi strA endA sbcB15 hsdR4</i> $\Delta(lac-proAB)$ F'[<i>traD36</i> <i>proAB</i> ⁺ <i>lacIq lacZ</i> Δ M15]	Yanisch-Perron (1985)

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pASK-IBA 13 plus	Tetracyclin Promotor Induktion durch Anhydrotetracyclin, <i>amp</i> ^R	Fa. IBA (Göttingen)
pASK-819a	pASK-IBA 13 plus mit Gen OEOE_0819, Insert 1245 bp (<i>O. oeni</i> B1)	diese Arbeit
pASK-819b	pASK-IBA 13 plus mit Gen OEOE_0819, Insert 1279 bp (<i>O. oeni</i> B1)	diese Arbeit
pASK-1574	pASK-IBA 13 plus mit Gen OEOE_1574 (<i>O. oeni</i> B1)	diese Arbeit
pASK-1766a	pASK-IBA 13 plus mit Gen OEOE_1766, Insert 1274 bp (<i>O. oeni</i> B1)	diese Arbeit
pASK-1766b	pASK-IBA 13 plus mit Gen OEOE_1766, Insert 1403 bp (<i>O. oeni</i> B1)	diese Arbeit

3.2 Medien

Tomatensaftmedium (DSMZ, Medium 264) verändert

abzentrifugierter Tomatensaft (Schloss Veldenz)	250 ml
Fleischextrakt (Gibco, 152-00004)	5 g
Trypton aus Casein (BD, 211705)	20 g
Hefeextrakt (Serva, 24540)	5 g
Tween 80	1 g
ad 1000 ml H ₂ O dest.	

Der pH-Wert des Mediums beträgt 6,0. Für Agarplatten wurden dem Medium 1,5 g/l Agar zugegeben. Das Medium wurde durch Autoklavieren bei 121 °C für 20 Minuten sterilisiert.

MRS-Medium (DSMZ, Medium 11) verändert

Casein Pepton, tryptisch verdaut (BD, 211705)	10 g
Fleischextrakt (Gibco, 152-00004)	10 g
Hefeextrakt (Serva, 24540)	5 g
Tween 80	1 g
K ₂ HPO ₄	2 g
Na-Acetat	5 g
(NH ₄) ₂ Citrat	2 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,2 g
MnSO ₄ x H ₂ O	0,05 g
ad 1000 ml H ₂ O dest.	

Der pH-Wert wurde mit HCl auf pH 5,5 eingestellt. Das Medium wurde durch Autoklavieren bei 121 °C für 20 Minuten sterilisiert. Für die Proteomexperimente wurden die folgenden Komponenten benutzt: Bacto Casitone (BD, 225930) als Casein Pepton, Beef Extract (MP Biomedicals, 100883) als Fleischextrakt und Bacto Yeast Extract (Difco, 212750) als Hefeextrakt.

MLD-Medium (Cavin *et al.*, 1989), verändert

Casamino acids (BD, 223050)	5 g
Hefeextrakt (Marcor)	4 g
KH ₂ PO ₄	0,6 g
KCl	0,45 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,13 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,13 g
MnSO ₄	0,003 g
Tween 80	2 ml
ad 1000 ml H ₂ O dest.	

Der pH-Wert wurde mit HCl auf pH 5,5 bzw. pH 4 eingestellt und das Medium für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert.

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

Pepton (Gibco, Nr. 140)	10 g
Hefeextrakt (Serva, 24540)	5 g
NaCl	5 g
ad 1000 ml H ₂ O dest.	

Für Agarplatten wurden dem Medium 1,5 g/l Agar zugegeben. Das Medium wurde durch Autoklavieren bei 121 °C für 20 Minuten sterilisiert.

M9-Medium (Miller, 1992)

Stammlösung (10-fach), pH 7

Na ₂ HPO ₄	6 g
KH ₂ PO ₄	3 g
NaCl	1 g
NH ₄ Cl	1 g
ad 1000 ml H ₂ O dest.	

Zusätze

CaCl ₂ , 10 mM	10 ml/l
MgSO ₄ , 1 M	1 ml/l
säurehydrolysiertes Casein, 10 % (Gibco, 80007-057)	10 ml/l
Tryptophan, 1 %	5 ml/l

Die Stammlösung und die Zusätze wurden getrennt bei 121 °C für 20 Minuten autoklaviert.

SOC-Medium

Trypton (BD, 211705)	20 g
Hefeextrakt (Serva, 24540)	5 g
NaCl	0,584 g
KCl	0,19 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	2,03 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2,46 g
Glucose x H ₂ O	3,96 g
ad 1000 ml H ₂ O dest.	

Methylrot-Voges-Proskauer Bouillon (Merck, 105712)

Das Fertigmedium wurde laut Hersteller angesetzt und mit 1,5 % Agar versetzt.

Zusätzlich wurden dem Medium 2 ml einer Methylrotlösung (0,02 g in 30 ml Ethanol) zugegeben.

C-Quellen

Die C-Quellen (Ribose, Glucose, Fructose, Pyruvat) wurden als 1 M Stammlösung getrennt autoklaviert und den Medien steril zugegeben. Wurde mit Citrat als C-Quelle gezüchtet wurde, so wurde Tri-Natrium-Citrat direkt in das Medium eingewogen und anschließend der pH-Wert des Mediums eingestellt.

Antibiotikazusätze

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	50 mg/ml in H ₂ O	100 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in H ₂ O	50 µg/ml
Chloramphenicol	20 mg/ml in EtOH	20 µg/ml
Tetracyclin	15 mg/ml in EtOH/H ₂ O 1:1	15 µg/ml

Bei Zugabe mehrerer Antibiotika wurde die Konzentration halbiert.

Anhydrotetracyclin (AHT) zur Induktion des pASK-IBA 13 plus Vektors wurde als 20 µg/ml Stammlösung in N,N-Dimethylformamid angesetzt.

3.3 Primer

Tabelle 2: Verwendete Oligonucleotide für die quantitative Real-time PCR. Die mit * markierten Primer entstammen der Arbeit Desroche *et al.* (2005) und die mit # gekennzeichneten Primer Richter (2004). Unter der Spalte Zielgen sind die aktuellen Nummern der Gene von *O. oeni* angegeben (www.doe.jgi.gov). Die Benennung der Primer erfolgte teilweise vor der Fertigstellung der Annotation des Genoms, so dass hier noch die alten Bezeichnungen der Gene verwendet wurden.

Primer	Sequenz 5' → 3'	T _m (°C)	Zielgen
ldh for (HKG)*	GCC GCA GTA AAG AAC TTG ATG	57,9	OEOE_0413
ldh rev*	TGC CGA CAA CAC CAA CTG TTT	57,9	
gyrA for (HKG)*	CGC CCG ACA AAC CGC ATA AA	59,4	OEOE_0006
gyrA rev*	CAA GGA CTC ATA GAT TGC CGA A	58,4	
829 Beacon for	CTC CCC GCT GGC TGA TTA TG	61,4	OEOE_0478
829 Beacon rev	TTG AGT GAC TTC TTG TTG GCT TTG	59,3	
Ooe 839-5#	CGC CAA TCA GCA GCT ATA TTA TG	58,9	OEOE_0819
Ooe 839-6#	GAA TGA CTA GTG GTG CAA GAA C	58,4	
Ooe 1047-1#	GGA GCC TTC CTT GTA AAC TGG	59,8	OEOE_1574
Ooe 1047-2#	CCT TCA TTT AAC AGC TGT CGT GG	60,6	
1719 for	CCA TCA GGG AAT TGT CAG TCC	59,8	OEOE_1766
1719 rev	TAA GCA AAG GAT ATA TCA GGC TG	57,1	
1349 for	ATT GTT ATC ACC TGT ACG ATG CTG	59,3	OEOE_1681
1349 rev	CAA CGC CGA AGT CCA TTA TCC	59,8	
1629 for	TTT TAC TTT TGC CCG TCC AG	55,3	OEOE_1682
1629 rev	TGC CGA CTG AGA TCC AGA TA	57,3	
acet for	GCA CAC TTT GCT CGA AAT GA	55,3	OEOE_1248
acet rev	TTG GAT TTG TCG TTG GAA CA	53,2	
E1 for	TTA TTG GAA ATT GCC GAA GG	53,2	OEOE_0647
E1 rev	TTT CTT CGC TTG ACG GAA CT	55,3	
Hpr for	GCG ACG ATG CTT GTT CAA A	54,5	OEOE_0643
Hpr rev	GCG CCA AGA CTC ATT ACA C	56,7	
414 for	CCA AGT GAG CTG CAA CAA AA	55,3	OEOE_0382
414 rev	GGC AGC CAA TAT CCT AGT CG	59,4	
1138 for	GTG TTT CGA TGA TCG CTT CC	57,3	OEOE_0296
1138 rev	CGT AAA ACC TTC CCC ATG CAA A	58,4	
808 for	GGA AAT TGC CAC TCA TAT AAT CG	57,1	OEOE_0464
808 rev	GAA TCC ACT CGA GCC AAA AC	57,3	
136Beacon for	ATC GTT CTT GTC ATT GGT GAG ATG	59,3	OEOE_0136
136 Beacon rev	CAT TCC CTG TCC TTG AAA CTG	60,3	
1706 for	GCA ACA TCA AAA ACA GAA CCA A	54,7	OEOE_1706
1706 rev	TAA GCG CAT CTC CGA AGT TT	55,3	
1714 for	GGA CAA CAA TTC AGA TGT GG	55,3	OEOE_1714
1714 rev	GCA TGT AGC CGA TTG TTG AA	55,3	
mdh for	AAG GAG CGC AAG TCT TGA TG	57,3	OEOE_1707
mdh rev	CTC GAC AAC AAT GCC AAA GAA TC	58,9	
g6p-dh for	GGA ATG GCG TTT CTA TCT CC	57,3	OEOE_0135
g6p-dh rev	CAG TCT CAG CCA ACA AAC GA	57,3	
AK for	ACT CCA TAA TCC TGC GAA CG	57,3	OEOE_1249
AK rev	CTC TTT CGG CAT CGT TTG AT	55,3	

Fortsetzung Tabelle 2: Verwendete Oligonucleotide für die quantitative Real-time PCR.

Primer	Sequenz 5' → 3'	T_m (°C)	Zielgen
892for	TGC CCT AAA AGG ACC ATC AC	57,3	OEOE_0892
892rev	CCG TTT TCA CCA CAG AAG GT	57,3	
PK2 for	GTT TCC GAT GGT TTG ATG GT	55,3	OEOE_1002
PK2 rev	TCA TCG AAT CAA GCA TTT GG	53,2	
PpcA2for	TTG GCA TTC TCG GTT ATT CC	55,3	OEOE_1798
PpcA2rev	TGC CAG TTC TTC AGC ATT CA	55,3	
PyrE1beta2for	ATT TGC GAA CTG TTT CAC CC	55,3	OEOE_0329
PyrE1beta2rev	ACC ATC CAA TCG TTT TCT GC	55,3	
OAADec2for	GTA ACT GAT GGG TCG GCT GT	59,4	OEOE_0418
OAADec2rev	ACC TGG TCG ATT GCT ACA GG	59,4	
POX936-2for	GTT GCC ACG GTT GTT TTA CC	57,3	OEOE_0936
POX936-2rev	GAT GTT TAG CGG CTT TCA GC	57,3	
POX1818-2for	TGG TCT GTA CGA TGC CAA AA	55,3	OEOE_1812
POX1818-2rev	CTG ATG AAA TCG TGC GGT TA	55,3	

Tabelle 3: Oligonucleotide, die zur Klonierung der Kandidatengene verwendet wurden. Die fettgedruckten Basenpaare geben die jeweils eingeführte Schnittstelle für den Restriktionsverdau an. Die Primer sind noch nach den alten Gennummern der Draftversion der *O. oeni* Genomsequenzierung benannt. Die Zahlen im Klammern geben die aktuellen Gennummern wieder.

Primer	Sequenz	Schnittstelle	T_m (°C)
Ooe 839-2 (rev) (OEOE_0819)	TGT TAT TAG TCC TTA AAG CTT TTT CC	HindIII	56,9
Ooe 839-3 (for) (OEOE_0819) Produktgröße 1279 bp	TTG TTT GGC TAG CAT CTT TTT CTG	NheI	57,6
Ooe 839-4 (for) (OEOE_0819) Produktgröße 1245 bp	AAT TCG GCT AGC AAT TTC ATT GTG	NheI	57,6
1047 XbaI for (OEOE_1574)	TTG GAG GTA TCT AGA ATG CAA GAA G	XbaI	59,7
1047 Hind3 rev 2 (OEOE_1574)	GTT TGC ATA AGC TTT TCC CCA TTC	HindIII	59,3
1719 NheI for 1 (OEOE_1766) Produktgröße 1274 bp	CCG AGA TAC AAG CTA GCA TAA AGT TAT TG	NheI	62,4
1719 NheI for 2 (OEOE_1766) Produktgröße 1403 bp	GAG CCT TGG CTA GCA TGA GTA	NheI	59,8
1719 Hind3 rev (OEOE_1766)	CTC TCT CAA GCT TTA ATT ACT CTC	HindIII	57,6

Die Primer wurden über die Firma MWG (MWG Biotech, Ebersberg) bezogen.

3.4 Bakterienzucht

Vorkulturen

10 ml Tomatensaftmedium wurden mit einer Kolonie oder mit 0,2 ml einer Vorkultur von *O. oeni* beimpft und bei 30°C (Stamm B1 und PSU-1) oder bei 37°C (RNA-Isolation Stamm PSU-1) bebrütet. Nachdem eine ausreichende Trübung vorhanden war ($\Delta OD_{578} = \text{ca.} 0,8$), wurden die Vorkulturen in Hauptkulturen oder Vorzuchten zur RNA-Isolierung überimpft.

Vorkulturen von *E. coli* wurden in 5 ml LB-Medium in Reagenzgläsern mit einer Kolonie beimpft und aerob bei 37°C als Schüttelkultur gezüchtet. Antibiotika wurden entsprechend dazugegeben.

Vorzucht *O. oeni* zur RNA-Isolation

Tomatensaftmedium	1 ml
C-Quelle (1 M)	0,5-2 ml entsprechend Endkonzentration
Inokulum	0,1 ml
MRS- (PSU-1)/MLD- (B1) Medium	ad 50 ml

Die Zucht erfolgte anaerob in 100 ml Müller-Krempel-Flaschen. Hierzu wurde die Luft aus den Flaschen nach Beimpfung über eine sterile Kanüle und einen Membranfilter mittels Vakuumpumpe entfernt und anschließend durch Stickstoff (5.0, Linde) ersetzt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Die Inkubation erfolgte bei 30°C bzw. 37°C.

Für alle Zuchtbedingungen und C-Quellen wurden im Vorfeld Wachstumsversuche durchgeführt. Die Zucht erfolgte mit Ribose (40 mM), Glucose (40 mM), Fructose (40 mM), Glucose (40 mM) plus Citrat (40 mM), Glucose (10 mM) plus Pyruvat (20 mM) und Pyruvat (40 mM). Die Überimpfung der Kulturen in die Hauptzucht und die RNA-Isolation erfolgten jeweils in der Mitte der logarithmischen Wachstumsphase. Nachdem die Bakterien die jeweilige ΔOD_{578} (in den meisten Fällen etwa $\Delta OD_{578} = 0,5$) erreicht hatten, wurden diese als Inokulum für die Hauptzuchten zur RNA-Isolierung verwendet.

Hauptzucht *O. oeni* zur RNA-Isolation

C-Quelle (1 M)	0,5-2 ml entsprechend Endkonzentration
Inokulum	0,1 ml
MRS-/MLD-Medium	ad 50 ml

Auch diese Kulturen wurden wie oben beschrieben anaerobisiert und inkubiert.

Hauptkulturen für Wachstumsversuche, Enzymaktivitätsbestimmungen und Proteomanalysen

Die anaeroben Hauptkulturen für Wachstumsversuche und zur Bestimmung von Stoffwechselprodukten und Fermentationsbilanzen wurden genauso angesetzt. Für die Proteomexperimente wurde *O. oeni* PSU-1 aerob in stehenden Kulturen (Falcon Tube conical, 50 ml) bei 30°C in MRS-Medium bei pH 5,5 gezüchtet ebenfalls in einem Volumen von 50 ml mit 40 mM Ribose, Glucose oder Fructose. Für die Bestimmungen der Enzymaktivitäten im Stamm PSU-1 wurden die Kulturen unter den selben Bedingungen wie für die Proteomexperimente gezüchtet, um die Aktivitäten mit den Daten der Proteomanalyse vergleichen zu können. Das Gesamtvolumen betrug 400 ml, um eine ausreichende Proteinkonzentration für die Enzymtests zu erhalten.

Wachstum: Komplementation des Glucosetransports in *E. coli* LJ141

Das Wachstum erfolgte aerob in M9-Medium (30 ml) mit 10 mM Glucose als C-Quelle in 300 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen bei 37°C in einem Schüttelinkubator (Innova 4000, New Brunswick Scientific) bei 180 Upm. Die Plasmide pASK-IBA 13 plus, pASK-819a, pASK-819b, pASK-1574, pASK-1766a und pASK-1766b wurden in den Stamm *E. coli* LJ141 transformiert und mit verschiedenen Konzentrationen an AHT induziert (0, 5, 10 und 20 ng/ml). Als Positivkontrolle wurde *E. coli* LJ141 pASK-IBA 13 plus ohne Insert mit 10 mM Glycerin gezüchtet und als Negativkontrolle mit 10 mM Glucose jeweils ohne Zugabe des Induktors.

Zellsuspensionen: Komplementation des Glucosetransports in *E. coli* LJ141

E. coli LJ141 pASK-IBA 13 plus, LJ141pASK-819a, LJ141pASK-819b, LJ141pASK-1574, LJ141pASK-1766a und LJ141pASK-1766b wurden aerob in M9-Medium mit 10 mM Glycerin bei 37°C in einem Schüttelinkubator (Innova 4000, New Brunswick Scientific) bei 180 Upm gezüchtet. Nach Erreichen einer OD₅₇₈ von 0,6-0,7 wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (15 min, 3000 x g, 4°C) und das Pellet anschließend in 7 ml MOPS Medium (100 mM MOPS, pH 7) mit 10 mM Glucose resuspendiert. Jedes Konstrukt wurde sowohl ohne Induktion überprüft als auch mit einer Induktorkonzentration von 5 ng/ml AHT. Die Zellsuspensionen wurden in Reagenzgläser oder in Erlenmeyerkolben überführt und bei 37°C und 180 Upm geschüttelt, um eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff zu gewährleisten. Proben zur Bestimmung der Glucosekonzentration wurden von 0 bis 9 h entnommen und 5 Minuten bei 11000 x g zentrifugiert. Die Glucosekonzentration im Überstand wurde mittels HPLC bestimmt.

Komplementation des Glucosetransports in *E. coli* LJ141 auf MR-VP Agar

E. coli LJ141 pASK-IBA 13 plus, LJ141pASK-819a, LJ141pASK-819b, LJ141pASK-1574, LJ141pASK-1766a und LJ141pASK-1766b wurden auf Methylrot-Voges-Proskauer-Agar ausplattiert und anaerob bei 37°C inkubiert. Das Medium enthält Glucose als einzige verwertbare C-Quelle. Bei der Umsetzung von Glucose in der gemischten Säuregärung bildet *E. coli* saure Produkte. Das im Agar enthaltene Methylrot schlägt im Bereich von pH 4,4-6,2 von gelb zu rot um. Agar im Bereich von Kolonien, die Glucose umsetzen, färbt sich daher rot.

3.5 Molekularbiologische Methoden

RNA-Isolation

Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte nach Erreichen der gewünschten ΔOD_{578} von ca. 0,5 in der Mitte der logarithmischen Wachstumsphase mit dem Qiagen RNeasy Kit nach den Angaben des Herstellers.

Zu Beginn der Isolation wurde die anaerobe Bakterienkultur mit dem RNA-Protect Reagenz (Qiagen) versetzt, um die mRNA zu stabilisieren. Das hierzu verwendete Volumen der Bakterienkultur richtete sich nach der Zelldichte der Kultur, da pro Säule maximal 1×10^9 Zellen zur Isolation verwendet werden sollen. Bei einer ΔOD_{578} von 0,5 wurden je zweimal 0,5 ml Bakterienkultur zu 1 ml vorgelegter RNA-Protect Lösung in ein Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben. Die Zellen wurden gevortext und 5 Minuten bei Raumtemperatur mit dem RNA-Protect Reagenz inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (10 min, 5000 x g) wurde das Pellet in Lysepuffer (10 mM Tris, pH 8, 1 mM EDTA, 15 mg/ml Lysozym) aufgenommen und 15 Minuten bei 37°C und 180 Upm inkubiert. Der Verdau von DNA erfolgte auf der Säule mit DNase (Qiagen, RNase-Free DNase Set) für 15 Minuten. Die Elution der RNA erfolgte mit 30 μ l H₂O.

Der Gehalt an RNA wurde mittels Biophotometer (Eppendorf) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

RT-PCR zur cDNA Synthese

Die Herstellung der cDNA erfolgte durch Reverse Transkription mit dem iScript cDNA Synthesis Kit von Biorad. Die Reaktion erfolgte im iCycler der Firma Biorad. Pro 20 μ l Reaktionsansatz wurden 200 ng bzw. 500 ng der isolierten Gesamt-RNA eingesetzt. Die so hergestellte cDNA wurde in die quantitative Real-time PCR eingesetzt.

Quantitative Real-time PCR

Die quantitative Real-time PCR dient der Quantifizierung von mRNA. Die PCR ist eine Methode zur Amplifizierung von DNA. Theoretisch verdoppelt sich bei jedem PCR-Zyklus die DNA-Menge. In diesem Fall beträgt die Effizienz 100 % und man erhält nach n Zyklen die 2^n -fache Menge der ursprünglichen DNA-Menge. Diese Vervielfältigung geht jedoch nicht unbegrenzt weiter, sondern erreicht eine Plateauphase. Mit zunehmender Zyklenzahl nimmt die Effizienz der Amplifizierung immer weiter ab. Die Quantifizierung der mRNA erfolgt deshalb in der exponentiellen Phase zu Beginn der PCR. In dieser Phase ist die vorhandene Menge an Produkt proportional zur Anfangsmenge. Durch Einsatz eines Fluoreszenzfarbstoffes, in diesem Fall SYBR Green (Biorad), der sich in doppelsträngige DNA einlagert, kann während jedes Zyklus' die Menge an DNA und somit gebildetem Produkt anhand der Signalstärke verfolgt werden. Ab einer bestimmten Menge an DNA überschreitet die Fluoreszenz das Hintergrundrauschen. Den Zyklus, bei dem der Schwellenwert überschritten wird, nennt man Threshold Cycle oder C_T -Wert. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich in jeder Probe exakt die gleiche Menge an amplifizierter DNA. Je größer die Anfangsmenge an DNA ist, desto früher wird dieser Zyklus erreicht. Der C_T -Wert wird zur Auswertung der Proben herangezogen.

Zur Analyse der Daten stehen zwei Quantifizierungsmechanismen zur Verfügung, die absolute und relative Quantifizierung. Bei der absoluten Quantifizierung wird eine Kalibrierungskurve mit bekannten DNA-Mengen mit den zu testenden Proben gemessen. In dieser Arbeit soll die Menge an vorhandener mRNA mit der mRNA nicht-regulierter Haushaltsgene normalisiert werden. Bei dieser relativen Quantifizierung wird nicht die absolute Menge an vorhandener mRNA bestimmt, sondern die Expression eines Gens in Relation zu einem mitgeführten Haushaltsgen, dessen Expression unter allen Zuchtbedingungen gleich ist.

Bestimmung der relativen Genexpression

Die relative Genexpression jedes Kandidatengens wurde aus drei unabhängigen Zuchten und somit RNA-Isolationen bestimmt. Von jeder Probe wurde wiederum eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Doppelbestimmungen sollten jeweils die selben C_T -Werte liefern. Als Haushaltsgene dienten die *gyrA* (Gyrase A, OE0E_0006) und die *ldhD* (Lactat-Dehydrogenase, OE0E_0413) (Desroche *et al.*, 2005). Die Lactat-Dehydrogenase erwies sich nur für die Zuchten mit Ribose, Glucose oder Fructose als C-Quelle als stabiles Haushaltsgen. Für alle anderen Zuchten wurde nur die Gyrase A als Haushaltsgen zur Auswertung

herangezogen. Die PCRs wurden auf 96-well Platten so durchgeführt, dass die Test- und Haushaltsgene zusammen in der selben PCR-Reaktion gemessen und anschließend ausgewertet wurden.

	<i>gyrA</i>			<i>ldhD</i>			Kandidat 1			Kandidat 2		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Rib1	Rib2	Rib3	Rib1	Rib2	Rib3	Rib1	Rib2	Rib3	Rib1	Rib2	Rib3
B	Rib1	Rib2	Rib3	Rib1	Rib2	Rib3	Rib1	Rib2	Rib3	Rib1	Rib2	Rib3
C	Glc1	Glc2	Glc3	Glc1	Glc2	Glc3	Glc1	Glc2	Glc3	Glc1	Glc2	Glc3
D	Glc1	Glc2	Glc3	Glc1	Glc2	Glc3	Glc1	Glc2	Glc3	Glc1	Glc2	Glc3
E	Frc1	Frc2	Frc3	Frc1	Frc2	Frc3	Frc1	Frc2	Frc3	Frc1	Frc2	Frc3
F	Frc1	Frc2	Frc3	Frc1	Frc2	Frc3	Frc1	Frc2	Frc3	Frc1	Frc2	Frc3
G	nt			nt			nt			nt		
H												

Abb. 5: Beispiel für ein Plate set-up einer 96-well Platte. Jedes Kästchen entspricht einem PCR-Ansatz, der SYBR Green, Primer für das zu amplifizierende Gen und die angegebene cDNA als Template enthält. Die Expression der Gene wurde aus drei unabhängigen RNA-Isolationen (Ribose 1-3; Glucose 1-3 und Fructose 1-3) jeweils in Doppelbestimmung ermittelt. Zur Berechnung der relativen Genexpression wurden in der selben PCR (selbe 96-well Platte) auch die C_T -Werte der Haushaltsgene ermittelt. Für jedes Primerpaar wurde eine no-template Kontrolle (nt) mitgeführt.

Primerdesign für die quantitative Real-time PCR

Die Primer für die Real-time PCR wurden mit dem Programm „Primer 3“ ausgewählt (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi). Die Größe des amplifizierten Fragments sollte für die quantitative Real-time PCR zwischen 90 und 200 Basenpaaren liegen. Anschließend wurden die Primer mit den Programmen „OligoAnalyzer“ und „Oligonucleotide Properties“ auf die Ausbildung Sekundärstrukturen untersucht. Ein zusätzliches Programm „mfold“ (Zuker, 2003) stellte sicher, dass ausgewählte Primer nicht im Bereich möglicher Sekundärstrukturen der Template-DNA lagen. Dies kann zu einer schlechteren Bindung des Primers und damit zu einer geringeren Effizienz der Amplifikation führen.

Überprüfung der Primerpaare auf ihre Spezifität und Effizienz

Das verwendete SYBR Green erlaubt eine Quantifizierung der DNA. Da es sich jedoch unspezifisch in doppelsträngige DNA interkaliert, muss sichergestellt werden, dass während der quantitativen Real-time PCR nur das gewünschte Produkt amplifiziert wird.

Schmelztemperatur

Im Anschluss an alle PCR Reaktionen wurde eine Schmelzkurve der Amplifikationsprodukte aufgenommen. Der Schmelzpunkt des PCR-Produkts ist abhängig von seiner Größe und dem GC-Gehalt. Somit kann man die Uniformität des Produkts anhand der Schmelztemperatur überprüfen. Wurden während der Reaktion mehrere Produkte oder Fremd-DNA amplifiziert, so kann dies anhand der Schmelzkurven erkannt werden. Entstehen Primerdimere, die ebenfalls zum C_T -Wert beitragen und diesen somit verfälschen, erkennt man dies an niedrigeren Schmelztemperaturen. Die Bildung von Primerdimeren kann am besten in der no-template Kontrolle beobachtet werden.

Vor der Bestimmung der relativen Genexpression wurden von jedem Primerpaar ein Temperaturgradient und eine cDNA-Verdünnungsreihe aufgenommen, um zu überprüfen, ob die Qualität der Primer ausreichend ist.

Temperaturgradient

Der Temperaturgradient wurde von jedem Primerpaar mit einer Primerkonzentration von 100 nM aufgenommen. Hierzu wurde die PCR Reaktion bei acht verschiedenen Annealingtemperaturen von 55-61°C durchgeführt. Über diesen Bereich sollte das Primerpaar ein stabiles Produkt bilden, d.h. die C_T -Werte für diese acht PCR Reaktionen sollten sehr eng beieinander liegen. Alle folgenden Versuche wurden bei einer Annealingtemperatur von 61°C durchgeführt. Bei dieser Temperatur erzielten die Primerpaare optimale Ergebnisse, d. h. die C_T -Werte waren niedriger als bei den anderen Temperaturen und die Amplifikationskurve verlief möglichst steil, was einer guten Produktbildung entspricht. Eine Ausnahme stellen die Gene OE0E_0329, OE0E_0478 und OE0E_1002 dar, welche bei einer Annealingtemperatur von 60°C getestet wurden, da hier die Amplifikation am besten verlief.

cDNA-Verdünnungsreihe

Die Effizienz der Primerpaare kann mittels einer cDNA-Verdünnungsreihe bestimmt werden. Hierzu werden cDNA Verdünnungen von 10^0 - 10^{-4} in die PCR Reaktion eingesetzt. Die Annealingtemperatur betrug hierbei 61°C bzw. 60°C. Ist der cDNA-Gehalt in einer Reaktion

um den Faktor 10 niedriger als in der vorhergehenden Reaktion, so erwartet man einen C_T -Wert, der 3,3 Zyklen größer ist ($2^{\text{Anzahl } \Delta\text{Zyklen}} = \text{Unterschied DNA Menge}$, somit $2^{3,3} \approx 10$). Dieser Wert entspricht einer Effizienz von 100 % bzw. dem Faktor 2, d. h. die DNA Menge verdoppelt sich in jedem Zyklus der PCR. Ist der Wert größer als 3,3 ist die Effizienz entsprechend niedriger, da mehr als die theoretischen Zyklen zur Verdopplung der DNA benötigt werden. Die berechnete Effizienz geht in die Berechnung der relativen Genexpression ein, denn ein Unterschied in der Effizienz der Primerpaare kann zu großen Unterschieden in der berechneten relativen Genexpression führen. Eine Verdopplung um 90 bzw. 80 % entspricht einer Effizienz von 1,9 bzw. 1,8. Die Effizienz eines Primerpaares sollte größer als 1,8 sein. Die Effizienz der Primerpaare wird aus den Verdünnungsreihen durch Auftragen der C_T -Werte auf der Y-Achse gegen die logarithmische Funktion der cDNA-Konzentrationen auf der X-Achse berechnet (Pfaffl, 2001). Um eine gute Effizienz zu erzielen, wurden verschiedene Primerkonzentrationen (100 und 200 nM) für die Amplifikation getestet. Die Konzentration, die die bessere Effizienz hervorbrachte, wurde für die Expressionsmessungen eingesetzt.

Zusätzlich wurden die PCR-Produkte der Temperaturgradienten und der cDNA-Verdünnungsreihen auf ein Agarosegel (2 %) aufgetragen. Hier wurde sowohl die Produktgröße kontrolliert als auch nochmals sichergestellt, dass nur ein Produkt gebildet wird.

No-template Kontrolle

Um zusätzlich zu kontrollieren, ob nur die gewünschte DNA amplifiziert wurde, wurde bei allen Versuchen für jedes Primerpaar eine no-template Kontrolle mitgeführt, in der statt DNA H_2O eingesetzt wurde. In dieser PCR darf kein Produkt gebildet werden.

Reaktionsansätze für die quantitative Real-time PCR (Gesamtvolumen 25 μ l)

Mix für Primerkonzentration (μl)	100 nM	200 nM
iQ SYBR Green Supermix (Biorad)	12,5	12,5
Primer 1 (10 μ M)	0,25	0,5
Primer 2 (10 μ M)	0,25	0,5
H_2O (Sigma, W4502)	7	6,5
cDNA template	5	5

Programm für die quantitative Real-time PCR (*iCycler*, Biorad)

Cycle	Repeats	Step	Dwell Time	Setpoint	
1	1	1	3:00	95°	
2	40	1	0:30	95°	
		2	0:30	61° bzw. 60°C	
		3	0:30	72°	→ Aufzeichnung Fluoreszenz
3	1	1	1:00	95°	
4	1	1	1:00	55°	
5	80	1	0:10	55°	<input type="checkbox"/> Melt Curve +0,5*

* Im Anschluss an die PCR wird eine Schmelzkurve der Produkte aufgenommen.

Relative Quantifizierung

Die Auswertung der Daten erfolgte nach dem effizienzkorrigierten relativen Quantifizierungsmodell, welches aus dem $\Delta\Delta C_T$ -Modell unter Einbezug der Primereffizienzen entwickelt wurde (Pfaffl, 2001).

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta C_T_{\text{Zielgen}}(\text{Kontrolle-Behandlung})}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta C_T_{\text{Referenzgen}}(\text{Kontrolle-Behandlung})}}$$

E_{Zielgen} und $E_{\text{Referenzgen}}$ bezeichnen dabei die durch die cDNA-Verdünnungsreihe bestimmte Effizienz der Primerpaare. Diese Werte werden mit den ΔC_T -Werten der Gene exponiert. Die ΔC_T -Werte ergeben sich durch Bildung der Differenz des C_T -Wertes des Ziel- oder Referenzgens unter der Kontroll- und unter der Testbedingung (= Behandlung). Bei den Expressionsmessungen der Kandidaten für Hexosecarrier ist die Kontrolle Zucht mit Ribose und die Behandlung Zucht mit Glucose oder Fructose.

Wurden zwei Haushaltsgene gemessen, wurde der Mittelwert aus beiden Ergebnissen gebildet. Für die Kontrolle errechnet sich immer der Wert 1. Zusätzlich wurde auch die relative Genexpression der Haushaltsgene berechnet. Hierzu wurden einmal die *gyrA* als Zielgen eingesetzt und die relative Genexpression gegen die *ldh* als Referenzgen und umgekehrt. Auf diese Weise kann die Stabilität der Haushaltsgene überprüft werden.

Tabelle 4: Charakterisierung der Primer für die quantitative Real-time PCR. Für jedes Primerpaar wurde eine optimale Konzentration und die Effizienz der Amplifikation bei dieser Konzentration bestimmt. Dies wurde für die beiden Stämme PSU-1 und B1 bei einer Annealingtemperatur von 61°C gemacht. Für einige Primer wurde die Annealingtemperatur 60°C gewählt.

Zielgen	Produktgröße	Schmelztemperatur (°C)	Primerkonzentration (nM)	Effizienz (%)
OEOE_0006 (HKG, <i>gyrA</i>)	95	83	100 (PSU-1)	75 (PSU-1)
			200 (B1)	84,7 (B1, 61°C)
				85,5 (B1, 60°C)
OEOE_0136	93	82,5	100 (B1)	75,5 (B1)
OEOE_0296	116	82	200 (B1)	92,1 (B1)
OEOE_0329	206	87	200 (B1)	84,8 (B1, 60°C)
OEOE_0382	126	83,5	200 (B1)	88,7 (B1)
OEOE_0413 (HKG, <i>ldh</i>)	102	85,5	200 (PSU-1)	84,3 (PSU-1)
			200 (B1)	82,3 (B1, 61°C)
				95 (B1, 60°C)
OEOE_0418	134	84,5	100 (B1)	81,8 (B1)
OEOE_0464	181	84	200 (B1)	84,8 (B1)
OEOE_0478	101	80,5	100 (PSU-1)	66,3 (PSU-1, 60°C)
OEOE_0643	110	81,5	100 (B1)	74,6 (B1)
OEOE_0647	184	83,5	100 (B1)	60,5 (B1)
OEOE_0819	120	80,5	100 (PSU-1)	80 (PSU-1)
			100 (B1)	55,8 (B1)
OEOE_0892	135	84,5	100 (B1)	85,4 (B1)
OEOE_0936	154	83,5	100 (B1)	88,9 (B1)
OEOE_1002	148	83	200 (B1)	85,8 (B1, 60°C)
OEOE_1248	202	83,5	200 (B1)	80,1 (B1)
OEOE_1249	112	83	200 (B1)	82 (B1)
OEOE_1574	125	81	100 (PSU-1)	73,7 (PSU-1)
			100 (B1)	75,7 (B1)
OEOE_1681	157	85,5	100 (PSU-1)	71,2 (PSU-1)
			100 (B1)	59,3 (B1)
OEOE_1682	155	83,5	100 (PSU-1)	86,5 (PSU-1)
			100 (B1)	61,9 (B1)
OEOE_1706	196	83	100 (B1)	78 (B1)
OEOE_1707	147	81,5	200 (B1)	92,3 (B1)
OEOE_1714	160	86	100 (B1)	77 (B1)
OEOE_1766	143	81	100 (PSU-1)	65,4 (PSU-1)
			100 (B1)	80,4 (B1)
OEOE_1798	149	85	100 (B1)	82,8 (B1)
OEOE_1818	152	82	100 (B1)	86,2 (B1)

Klonierung von Kandidaten für sekundäre Hexosecarrier

Die Gene OEOE_0819, OEOE_1574 und OEOE_1766 sind Kandidaten für sekundäre Carrier, die für die Aufnahme von Hexosen verantwortlich sein könnten. Sie wurden aus dem Chromosom von *O. oeni* B1 amplifiziert und in den Vektor pASK-IBA 13 plus kloniert. Für die Gene OEOE_0819 und OEOE_1766 wurde neben dem in der Annotation des Genoms angegebenen Startkodons noch ein weiteres im Leseraster befindliches Startkodon gefunden. Für diese Gene wurden je zwei Konstrukte amplifiziert und kloniert, welche sich in ihrer Größe unterscheiden.

Die molekularbiologischen Standardmethoden wurden nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Der Restriktionsverdau wurde mit Restriktionsenzymen der Firma Fermentas durchgeführt. Die Dephosphorylierung des Vektors erfolgte mit der Calf Intestine Alkaline Phosphatase (Fermentas) nach Angaben des Herstellers, die anschließende Inaktivierung der Phosphatase durch Reinigung der DNA mittels des PCR Purification Kits der Firma Qiagen. Vektor und PCR Produkt wurden mit der T4-Ligase der Firma Fermentas im molaren Verhältnis 1:3 über Nacht bei 16°C ligiert. Der Ligationsansatz wurde durch Butanolfällung gereinigt. Die Herstellung elektrokompetenter Zellen und die Transformation wurden nach Farinha *et al.* (1990) durchgeführt. Die Plasmidisolierung wurde nach Angaben des Herstellers mit dem Plasmid Mini Kit der Firma Qiagen durchgeführt.

Isolation genomischer DNA aus *O. oeni* B1 (Zuniga *et al.*, 1996, verändert)

Die Zucht der Zellen erfolgte anaerob in 50 ml Tomatensaftmedium. In der spätlogarithmischen Phase (ca. OD₅₇₈ 0,6) wurden die Zellen steril 15 Minuten bei 5000 x g abzentrifugiert und das Pellet mit sterilem Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml Lyse-Puffer (25 mM Tris pH 8,0, 50 mM EDTA, 50 mM Glucose, 5 mg/ml Lysozym) aufgenommen und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellsuspension wurde in Aliquots je 500 µl verteilt und mit 20 µl Proteinase K (20 mg/ml), 25 µl SDS (10 % w/v) und 40 µl RNase A (5 mg/ml) bei 37°C für eine weitere Stunde inkubiert. Die anschließende DNA Extraktion erfolgte dreimal (zweimal davon mit 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1 und die dritte mit einem Chloroform/Isoamylalkoholgemisch 24:1). Der Niederschlag wurde jeweils für 5 Minuten bei 15000 x g abzentrifugiert und die wässrige Phase in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt, woraufhin die nächste Extraktion erfolgte. Die wässrige Phase wurde zum Schluss mit 50 µl Na-Acetatlösung (3 M, pH 5,2) versetzt. Die Fällung der DNA erfolgte nach Zugabe von 1 ml eiskaltem Ethanol (100 %) bei -20°C für mindestens 1 Stunde. Nach Zentrifugation (20 Minuten, 15000 x g, 4°C) wurde der Überstand

verworfen und das Pellet in 75%-igem kalten Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde luftgetrocknet und anschließend in 100 µl Elutionspuffer (5 mM Tris, Qiagen) aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Amplifikation der Kandidatengene:

Die Amplifikation der Kandidatengene OEOE_0819, 1574 und 1766 von chromosomaler DNA erfolgte mit der PfuUltra Polymerase von Stratagene.

PCR Ansatz (50 µl)

	5 µl	10 x Puffer
	1,25 µl	dNTPs (10 mM, Endkonzentration je 250 µM)
	x µl	DNA (50-100 ng)
	2,5 µl	Primer 1 (0,5 µM)
	2,5 µl	Primer 2 (0,5 µM)
	2 µl	DMSO
ad	50 µl	H ₂ O

Amplifikation (myCycler, Biorad)

1 x	Initiale Denaturierung	95°C	3 min
30 x	Denaturierung	95°C	30 sek
	Annealing	T _m -5°C	30 sek
	Elongation	72°C	1 min pro kb
1 x	Finale Elongation	72°C	10 min

Die Größe der amplifizierten Fragmente wurde über ein Agarosegel überprüft. Sind mehrere Fragmente amplifiziert worden, wurde mittels QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) die Bande mit der erwarteten Größe aus dem Agarosegel ausgeschnitten und daraus die DNA extrahiert.

3.6 Biochemische Methoden

Komplementation des Glucosetransports

Es sollte überprüft werden, ob eines der Kandidatengene für einen Transporter kodiert, der die Aufnahme von Glucose in einem Phosphotransferasesystem-defizienten *E. coli* Stamm wieder herstellen kann. Die hergestellten Plasmide (pASK-IBA 13 plus Vektor + Kandidatengen) wurden hierzu in *E. coli* LJ141 transformiert. Die so entstandenen Stämme wurden als LJ141pASK-819a, LJ141pASK-819b, LJ141pASK-1574, LJ141pASK-1766a und LJ141pASK-1766b bezeichnet. Die Funktion der Carrier wurde sowohl in Wachstumsexperimenten in Minimalmedium mit Glucose als einziger Kohlenstoffquelle überprüft als auch durch Bestimmung des Verbrauchs von Glucose in einer Zellsuspension.

Bestimmung von Substrat- und Produktkonzentrationen mittels HPLC

Zur Aufstellung von Fermentationsbilanzen und zur Bestimmung von Substratumsatz in Zellsuspensionen wurden von den Kulturen jeweils 600 µl entnommen und bei 11000 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur Messung bei -20°C gelagert. Die Substrate und Produkte wurden mittels einer HPLC Säule (Animex HPX 87H, 300 x 7,8 mm, Biorad, München) aufgetrennt. Die Betriebstemperatur der Säule betrug 65°C. Das Laufmittel (6,5 mM H₂SO₄) wurde mit einer Geschwindigkeit von 0,55 ml/min über die Säule transportiert (Richter, 2001).

Bestimmung von Enzymaktivitäten

Die Bestimmung der Aktivitäten der Alkohol-Dehydrogenase, Acetatkinase und PEP-Carboxylase erfolgte bei 30°C über NAD(P)H-abhängige Tests. Die Enzymaktivitäten wurden über die Extinktionsänderung bei 365 nm mit dem Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{\text{NAD(P)H}} = 3,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ über das Lambert-Beer'sche Gesetz berechnet. Eine spezifische Aktivität von 1 U/g entspricht einem Substratumsatz von 1 µmol Substrat pro Gramm Protein und Minute.

Herstellung der zellfreien Extrakte (Richter, 2001)

Die Kulturen wurden in der spätlogarithmischen Phase durch Zentrifugation (30 min, 17700 x g, 4°C) geerntet und zweimal mit 100 mM Tris/HCl Puffer pH 7,5 gewaschen. Die Zellpellets wurden in 10 ml Tris/HCl Puffer resuspendiert und mit 20 g Glasperlen (Zirkonia-Silica, 0,1 mm, Roth) in einer Zelmühle (Vibrogen V14, Bühler) aufgeschlossen. Der Aufschluss erfolgte in 3 Zyklen von je 3 Minuten mit Pausen von 30 Sekunden bei einer

Temperatur von 4°C. Das Gemisch wurde bei 8500 x g für 20 Minuten abzentrifugiert, um die Zelltrümmer zu trennen. Der Überstand enthielt die löslichen Proteine. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradfordreagenz (Rotiquant, Roth) bestimmt und betrug zwischen 1 und 1,6 mg/ml.

Bestimmung der Aktivität der Alkohol-Dehydrogenase (DeMoss, 1955)

Pipettierschema:

	Tris /HCl (0,1 M, pH 7,5)	700 µl
	NADP (2,4 mM)	100 µl
	ZFE	100 µl
Start	Ethanol (5 M)	100 µl

Bestimmung der Aktivität der Acetatkinase (Bergmeyer, 1983)

Pipettierschema:

	Tris/HCl (0,1 M, pH 7,5)	590 µl
	MgCl ₂ (1 M)	5 µl
	Na-Acetat (3 M)	100 µl
	ZFE	100 µl
	PEP (33 mM)	35 µl
	NADH (10 mM)	50 µl
	PK (ca. 1 U/ µl)	10 µl
	LDH (ca. 1 U/ µl)	10 µl
Start:	ATP (80 mM)	100 µl

Bestimmung der Aktivität der PEP-Carboxylase PpcA (Eikmanns *et al.*, 1989; Riedel *et al.* 2001)

Pipettierschema:

Tris/HCl (0,1 M, pH 8,0)	759 µl
MgCl ₂ (500 mM)	20 µl
NaHCO ₃ (500 mM)	50 µl
DTT (0,1 M)	10 µl
NADH (10 mM)	20 µl
Malat-Dehydrogenase (Sigma, M2634, 1 U/µl)	9 µl
zellfreier Extrakt	100 µl
Start:	
Phosphoenolpyruvat (250 mM)	32 µl

3.7 Analyse der Zellproteine durch Shotgun Proteomanalysen

Die Versuche der Shotgun Proteomanalysen wurden an University of California, Davis im Department of Viticulture and Enology in Zusammenarbeit mit Prof. D. Mills und J. Kim durchgeführt.

Präparation der Zellproteine

Die Zellen wurden in der spätlogarithmischen Wachstumsphase durch Zentrifugation geerntet, zweimal in GIBCO DPBS Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Invitrogen, 14190) gewaschen und die Pellets bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Zur Präparation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und in 20 mM Tris resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert. Das Pellet wurde in ca. 1 ml einer 20 mM Tris/ 8 M Harnstoff Lösung resuspendiert. Harnstoff wirkt als chaotropes Reagenz denaturierend auf Proteine. Tris ist als Puffer gut geeignet, da es in der Massenspektrometrie wenig Hintergrund verursacht. Das Volumen wird so gewählt, dass die OD in allen Proben (Zucht mit Ribose, Glucose oder Fructose) gleich ist. 600 µl dieser Lösung wurden in ein Schraubdeckelreaktionsgefäß mit 300 µg Glasperlen (Ø 50-150 µm) überführt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mittels FastPrep FP 120 (Savant) in 10 Zyklen je 30 Sekunden. Nach jeweils 2 Zyklen wurden die Zellen für 2 Minuten auf Eis gekühlt. Die

Zelltrümmer wurden anschließend durch Zentrifugation (2 Minuten, 2500 x g, RT) vom zellfreien Überstand getrennt. Der Überstand wurde erneut für 5 Minuten bei 10000 x g zentrifugiert. 25 µl des so erhaltenen Überstandes wurden mit 4 µl DTT Lösung (450 mM DTT in 50 mM Ammoniumbicarbonat gelöst) versetzt und für > 1h bei 55°C inkubiert. Anschließend wurden 71 µl 20 mM Tris zugegeben, um die Harnstoffkonzentration auf 2 M für den Trypsinverdau zu verdünnen. Zu diesem Ansatz (100 µl) wurden 5 µg Trypsin (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega) zugegeben. Der Verdau erfolgte über Nacht bei 37°C.

Die Reinigung der Probe für die Massenspektrometrie erfolgte mittels einer ZipTip Pipettenspitze (ZipTip C18, Tip Size 10, Millipore 100116). Die Probe soll somit von Harnstoff und Salzen gereinigt werden. Die Reinheit der Probe ist von entscheidender Bedeutung für die Qualität der Messung. Für die Reinigung soll der pH-Wert der Probe <4 sein. Der pH wurde mit 1%-iger Trifluoressigsäure-Lösung (TFA) eingestellt (pH Papier). Die ZipTip Säule wurde durch Auf- und Abpipettieren der Wetting- (100% Acetonitril (ACN)) und Äquilibriumslösung (0,1 % TFA) equilibriert. Im Anschluss wurde durch Auf- und Abpipettieren (5 Mal) der Proteinlösung die Säule beladen. Die an der Säule haftenden Proteine wurden durch Pipettieren der Waschlösung (0,1 % TFA) von Salzen gereinigt und anschließend eluiert (0,1 % TFA, 50% ACN). Pro Probe wurden drei Spitzen verwendet, um die Ausbeute zu erhöhen. Die so erhaltene Proteinlösung wurde mittels SpeedVac (Eppendorf) getrocknet und mittels Tandem Massenspektrometrie analysiert.

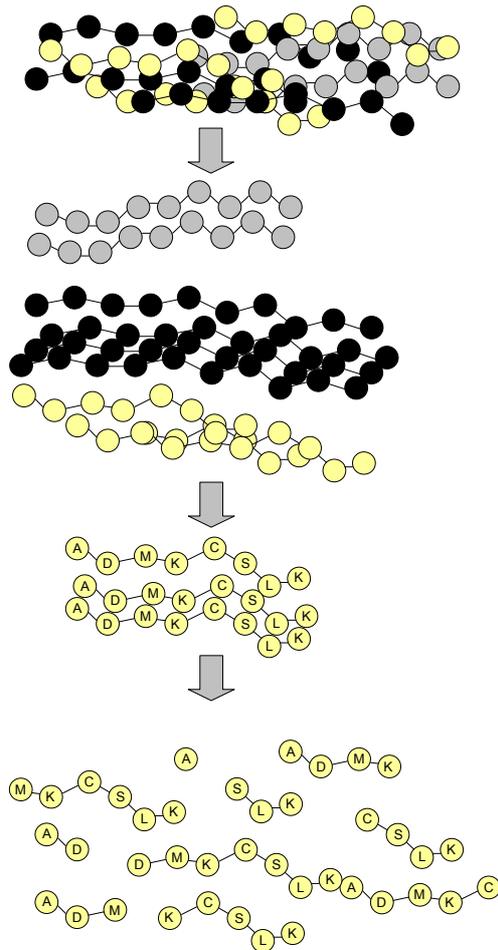
Die Messung wurde wiederholt und hierbei wurde die Präparation leicht verändert, um den Anteil an Membranproteinen zu erhöhen. In diesem Fall wurde DTT schon direkt zur Resuspension der Pellets in 20 mM Tris/ 8 M Harnstoff Lösung zugegeben. Nach dem Aufschluss der Zellen mittels FastPrep FP 120 (Savant) wurden die Zelltrümmer nicht abzentrifugiert. Nach der Inkubation bei 55°C erfolgte der Trypsinverdau in Anwesenheit der Zelltrümmer. Besonders bei Gram-positiven Bakterien kann mit Zentrifugation der Zelltrümmer ein Teil der Membranen mit heruntergerissen werden. Trypsin soll hier möglichst auch vorhandene Membranproteine verdauen. Nach dem Verdau wurden die Zelltrümmer wie in Präparation 1 abzentrifugiert. Die Reinigung des Überstandes erfolgte diesmal mittels Zentrifugation über eine Säule (PepClean C-18, Spin Columns Fa. Pierce, 89870). Bei dieser Präparation war der Proteingehalt wesentlich geringer (ca. 0,3 mg/ml) und somit wurde nicht nur ein Teil der Probe sondern die vollständige Menge zur Messung benötigt. Über die Säule kann ein größeres Volumen gereinigt werden. Das Prinzip der Aufreinigung ist identisch.

Messung: Multidimensional Protein Identification Technology

Die Messung erfolgte durch die Proteomics Facility der University of California, Davis (<http://www.proteomics.ucdavis.edu/>). Die hier angewandte Methode der Shotgun Proteomics ermöglicht die Analyse von komplexen Proteingemischen. In der **Multidimensional Protein Identification Technology** (MudPIT) werden die Peptide in zwei aufeinander folgenden Flüssigchromatographien voneinander getrennt. Direkt im Anschluss folgen zwei massenspektrometrische Analysen. In der 1. Massenspektrometrie (MS) wird jedem Peptid ein Masse-zu-Ladungsverhältnis zugeteilt. Nach Verlassen dieser 1. MS wird jedem Peptid Energie zugeführt (CID, Collision induced dissociation) woraufhin es in Teilstücke zerfällt. Diese Teilstücke, die aus dem ursprünglichen Peptid entstanden sind, werden nun in die 2. MS überführt und jedem dieser Teilstücke wird ein Masse-zu-Ladungsverhältnis zugeordnet. Im Idealfall entstehen aus dem ursprünglichen Peptid Fragmente, die der Abspaltung von einer, zwei, drei, usw. Aminosäuren entsprechen. Diese Fragmente haben dann eine Masse, die dem ursprünglichen Peptid minus der Masse der abgespaltenen Aminosäuren entspricht. Auf diese Weise kann die Reihenfolge der Aminosäuren im ursprünglichen Peptid rekonstruiert werden. Die so ermittelten Sequenzen der in der Mischung enthaltenen Peptidfragmente wird mit der Genomsequenz von *O. oeni* PSU-1 verglichen. Die in der Zelle zum Erntezeitpunkt vorliegenden Proteine können auf diese Weise identifiziert werden. Ein Protein gilt als anwesend, wenn mindestens zwei Peptidfragmente pro Protein gefunden werden. Peptidfragmente, die nicht eindeutig einem Protein zugeordnet werden können, werden verworfen.

Für jede Probe wird eine Liste erhalten, die alle in der Mischung identifizierten Proteine enthält. Zur Auswertung werden folgende Werte herangezogen:

%	gibt an, wie viel Prozent eines Proteins gefunden wurden (= wie viel Prozent der Aminosäuresequenz durch Peptidfragmente abgedeckt wird)
total	Anzahl der gefundenen Peptidfragmente von diesem Protein
log(e)	wird berechnet aus der Anzahl der gefundenen Peptidfragmente eines Proteins und der Angabe wie viel Prozent des Proteins gefunden wurden. Der berechnete Wert wird als neg. dekadischer Logarithmus angegeben. Je negativer der Wert ist, umso häufiger liegt das Protein in der Mischung vor und umso unwahrscheinlicher ist eine falsche Identifikation. Ein Protein gilt als sicher da, wenn der log(e) Wert kleiner als -7 ist.



Proteingemisch nach Trypsinverdau
Verdaute Zellproteine werden in LC/LC/MS/MS analysiert

LC/LC

die beiden hintereinander geschalteten
Flüssigchromatographien trennen die im Gemisch
vorhandenen Peptide voneinander

einzelne Fraktionen werden direkt in MS geleitet

1. Massenspektrometrie

in der 1. MS wird jedem Peptid ein
Masse/Ladungsverhältnis zugeteilt

2. Massenspektrometrie

Peptide, die die 1. MS verlassen, werden durch erneute
Energiezufuhr (Collision induced dissociation) in kleinere
Fragmente zerlegt. Ein bestimmtes Peptid kann an
unterschiedlichen Stellen gespalten werden und es
entstehen kleinere Fragmente aus dem ursprünglichen
Peptid, die der Abspaltung von 1,2, 3 usw. Aminosäuren
entsprechen.

Von diesen Fragmenten wird ebenfalls das
Masse/Ladungsverhältnis bestimmt und so kann die
Reihenfolge in der die AS im Ursprungspeptid vorkamen
rekonstruiert werden.

Abb. 6: Prinzip der **Multidimensional Protein Identification Technology (MudPIT)**

3.8 Bioinformatische Methoden

IMG-Datenbank

Die IMG (integrated microbial genomes system) Datenbank ist eine Plattform, die durch das Joint Genome Institute (JGI) zur Verfügung gestellt wird (<http://img.jgi.doe.gov>). Die Datenbank enthält die Genome von komplett sequenzierten Organismen und Draft Genome, deren Annotation und teilweise auch Sequenzierung noch nicht beendet ist. Sie bietet die Möglichkeit Genome verschiedener Organismen nach bestimmten Merkmalen zu untersuchen und zu vergleichen.

Das Genom von *O. oeni* PSU-1 wurde nach COGs (Cluster of orthologous groups) und Proteinfamilien (Pfams) durchsucht, die mit der Aufnahme von Zuckern assoziiert sind. Hierzu wurde eine Liste erstellt, die alle COGs und Pfams enthält, die Proteine dieser Funktion enthalten. So wurde das Genom von *O. oeni* PSU-1 nach 53 COGs und 26

Proteinfamilien durchsucht, die dieses Kriterium erfüllen. Es wurde eine Übersicht erstellt, die alle potentiellen Gene für Zuckertransporter enthält, sortiert nach sekundären Carriern, Phosphotransferasesystemen und ABC Transportern.

Vorhersage von Operons mittels Softberry

Das Programm Softberry (<http://www.softberry.com/berry.phtml>) bietet die Möglichkeit zu untersuchen, ob benachbarte Gene in einem Operon organisiert sind.

4. Ergebnisse

Teil I: Hexosetransport in *O. oeni*

4.1.1 Eigenschaften des Transports und Auswahl von Kandidaten

Die Aufnahme von ^{14}C -Hexosen wurde an Zellsuspensionen von *O. oeni* B1 untersucht (Richter, 2004). Der Transport der beiden Zucker Glucose und Fructose ist energieabhängig und wird in Anwesenheit von CCCP, einem Protonophor, welches das Protonenpotential über der Membran abbaut, fast zum Erliegen gebracht. Die Ergebnisse der Transportmessungen durch Richter (2004) sprechen für die aktive Aufnahme der Hexosen durch einen oder mehrere sekundäre Carrier, die das Protonenpotential über der Membran als Energie für den Transport nutzen. Der Transport von Glucose und Fructose in die Zelle zeigte große Ähnlichkeiten, so dass möglicherweise ein Carrier für die Aufnahme der beiden Hexosen verantwortlich ist. Eine Transportaktivität war nur nach Zucht auf diesen Zuckern zu messen. Stand hingegen die Pentose Ribose als C-Quelle für das Wachstum zur Verfügung, wurde kaum eine Aufnahme der beiden ^{14}C -Hexosen detektiert. Diese Tatsache spricht dafür, dass der Transport von Glucose und Fructose durch ihre Anwesenheit induziert wird. Eine genaue Identifizierung und Differenzierung der Carrier, die für den Glucose- oder Fructosetransport verantwortlich sind, konnte bislang nicht erreicht werden (Richter, 2004).

Hier sollten mittels Expressionsanalysen die Gene für sekundäre Carrier ermittelt werden, die durch Anwesenheit von Hexosen induziert werden und somit als Carrier für diese in Frage kommen. Dazu wurde das Genom von *O. oeni* nach sekundären Carriern durchsucht, die Ähnlichkeit zu bereits bekannten Zuckercarriern haben (Richter, 2004). Die Gene, die dabei identifiziert wurden, gehören der Familie der „Major Facilitator Superfamily“ (MFS) an. Transporter dieser Familie werden durch das elektrochemische Potential getrieben. Die Kandidaten sollten neben einer Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz zu den bereits bekannten Zuckertransportern folgende Kriterien erfüllen: eine Länge von 400-800 Aminosäuren, die Verwandtschaft zu Hexosecarriern und eine vorhergesagte Sekundärstruktur von 12-14 Transmembranhelices. Die meisten bekannten Mitglieder der Zuckertransporter Familie, einer Unterfamilie der Major Facilitator Superfamily, der die meisten Zucker-transportierenden Carrier zugeordnet sind, haben eine Struktur von 2 x 6 Transmembranhelices. Mit diesen Kriterien wurde eine Liste aus zehn Genen erstellt (Richter, 2004). Die relative Genexpression sechs dieser Kandidaten sollte hier untersucht werden. Die Eigenschaften

dieser Kandidaten sind in Tabelle 5 zusammengefasst. In der Tabelle sind die aktuellen Gennummern der Kandidaten angegeben. Diese entsprechen den Gennummern der Draft Version der Genomannotation, einem vorläufigen Entwurf des Genoms (www.doe.jgi.gov, Stand 2004), von *O. oeni* PSU-1 wie folgt: OEOE_0478 entspricht Kandidat 829, OEOE_0819 entspricht Kandidat 839, OEOE_1574 entspricht 1047, OEOE_1766 entspricht Kandidat 1719, OEOE_1681 entspricht Kandidat 1349 und OEOE_1682 entspricht Kandidat 1629.

Tabelle 5: Kandidatengene für sekundäre Carrier zur Aufnahme von Hexosen von *O. oeni*. Die Gennummern und Annotationen entsprechen den Angaben des Joint Genome Institute (www.doe.jgi.gov) zum vollständig sequenzierten und annotierten Genom von *O. oeni* PSU-1. Die Anzahl der Aminosäuren (AS) und der vorhergesagten Transmembranhelices (TMH) ist angegeben. Für das Gen 1714 wurde mit dem TMHMM Server 2.0 zur Vorhersage von Transmembranhelices ein anderes Ergebnis erhalten als nach Analyse in der „Transport Classification Database“ (www.tcdb.org). Die jeweils vorgeschlagene Anzahl der Transmembranhelices ist angegeben. Bei allen anderen Genen kamen beide benutzten Programme zum selben Ergebnis.

Gen	Annotation	AS	TMH	Benachbarte Gene
0136	Permease der MFS	401	12	Gen 135 Glucose-6-phosphat-1-Dehydrogenase
0478	D-Xylose-Protonen-Symporter	480	2 x 6	
0819	Cyanat-Permease	395	2 x 6	
1574	Permease der MFS	403	2 x 6	
1681	D-Xylose-Protonen-Symporter	464	2 x 6	
1682	D-Xylose-Protonen-Symporter	458	2 x 6	
1706	vorhergesagtes Membranprotein	255	6	Gen 1707 Threonin-Dehydrogenase oder verwandte Zn-abhängige Dehydrogenase
1714	mögliche Glucoseaufnahme Permease	315	9 (TMHMM) 10 (TCDB)	Gen 1708 Fructokinase/ Transkriptionsregulator
1766	D-Xylose-Protonen-Symporter	462	2 x 6	

Neben diesen Kandidaten aus Richter (2004) wurde das Genom nach der Fertigstellung der Sequenzierung und Annotation nach weiteren Genen durchsucht, die ebenfalls Ähnlichkeiten zu sekundären Carriern haben und in der Nähe von Genen des Zentralstoffwechsels liegen

(Tabelle 5). Eine Nachbarschaft zu Genen, die für Glucose oder Fructose umsetzende Enzyme kodieren, könnte auf eine Rolle bei der Aufnahme der entsprechenden Substrate hinweisen. Auf diese Weise wurden drei weitere Kandidaten für Hexosecarrier ausgewählt. Das Gen OEOE_0136 liegt neben dem Gen OEOE_0135, welches für die Glucose-6-phosphat-1-Dehydrogenase kodiert. Die Gene OEOE_1706 und OEOE_1714 liegen in der Nachbarschaft für Gene, die an der Umsetzung von Fructose beteiligt sind. Das Gen OEOE_1708 ist als Fructokinase/ Transkriptionsregulator annotiert ist. Das Gen OEOE_1707 ist als Threonin-Dehydrogenase oder verwandte Zn-abhängige Dehydrogenase annotiert, fungiert aber vermutlich als Mannit-Dehydrogenase. Die zugehörige Aminosäuresequenz ist zu 71,8 % identisch und zu 85,9 % ähnlich zu der Sequenz der Mannit-Dehydrogenase von *Leuconostoc mesenteroides*. Die Mannit-Dehydrogenase von *L. mesenteroides* hat nur geringe Homologie zu Enzymen anderer Bakterien wie beispielsweise der Gattung *Lactococcus* und scheint charakteristisch für heterofermentative Milchsäurebakterien (Aaenikunnas *et al.*, 2002). Die Funktion als Mannit-Dehydrogenase wurde in *L. mesenteroides* durch physiologische Untersuchungen bestätigt. Auch in *Oenococcus* wird Mannit durch eine solche Reaktion aus Fructose gebildet (Hamann, 2003). Im Genom von *O. oeni* befinden sich keine weiteren Gene, die große Sequenzähnlichkeit zu anderen Mannit-Dehydrogenasen haben oder als solche annotiert sind (www.doe.jgi.gov), so dass man davon ausgehen kann, dass dieses Enzym von OEOE_1707 kodiert wird.

4.1.2 Bestimmung der relativen Genexpression im Stamm *O. oeni* PSU-1

Die relative Genexpression der Kandidaten für sekundäre Carrier wurde nach Zucht auf Ribose, Glucose oder Fructose mittels quantitativer Real-time PCR bestimmt. *O. oeni* wurde hierzu mit jeweils einer der C-Quellen gezüchtet. In der exponentiellen Wachstumsphase wurde die RNA isoliert und in cDNA transkribiert. Die cDNA wurde dann zur Quantifizierung in die PCR eingesetzt. Die PCR-Reaktion erfolgt in Anwesenheit des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green. Dieser lagert sich in die doppelsträngigen PCR-Produkte ein und fluoresziert. Je mehr cDNA eines Gens zu Beginn der PCR vorlag, desto früher wird ein Fluoreszenzsignal detektiert. Der PCR-Zyklus bei dem dies geschieht, wird C_T -Wert genannt und zur Auswertung herangezogen. Will man beispielsweise die relative Genexpression eines Kandidaten nach Zucht auf Glucose bestimmen, so vergleicht man den C_T -Wert dieses Gens mit dem C_T -Wert des Haushaltsgens nach Zucht auf diesem Zucker, dessen Expression unabhängig von der Zucht konstant sein sollte. Es wird die Differenz aus diesen beiden C_T -Werten gebildet. Dies entspricht dem Unterschied im mRNA-Gehalt von

Kandidaten- und Haushaltsgen unter einer Zuchtbedingung. Die relative Genexpression wird aus den Differenzen der C_T -Werte durch das effizienzkorrigierte $\Delta\Delta C_T$ -Modell (Pfaffl, 2001) berechnet.

Die relative Genexpression bezieht sich immer auf eine Kontroll- oder Referenzbedingung. Hier wurde die Zucht mit Ribose als Kontrolle gewählt, da unter diesen Bedingungen keine Aufnahme der Hexosen Glucose und Fructose messbar ist (Richter, 2004). Die Expression des gesuchten Carriers sollte unter diesen Bedingungen nur gering sein. Auch für diese Referenz werden die C_T -Werte des Kandidaten- und des Haushaltsgens unter identischen Bedingungen bestimmt. Die Differenz der mRNA-Gehalte unter diesen Bedingungen geht ebenfalls in die Berechnung der relativen Genexpression mit ein. Vereinfacht vergleicht man so die Differenz der C_T -Werte von Haushalts- und Kandidatengen nach Zucht mit Glucose oder Fructose mit der Differenz der Werte nach der Kontrollzucht mit Ribose. Verändert sich diese Differenz, so verändert sich auch die Expression des Kandidatengens. Für die relative Genexpression der Ribosezucht ergibt sich bei der gewählten Auswertungsmethode ($\Delta\Delta C_T$ -Modell) der Wert 1 für alle getesteten Kandidatengene (Abb. 7). Ein induzierter Hexosetransporter sollte somit einen Wert größer 1 erreichen. Als Haushaltsgene dienen die Gene *gyrA* und *ldhD*. Von diesen beiden Genen, die für die Gyrase-Untereinheit A und die Lactat-Dehydrogenase kodieren, ist bekannt, dass sie in *O. oeni* konstant exprimiert werden und somit als Haushaltsgene geeignet sind (Desroche *et al.*, 2005).

Im Stamm PSU-1 wurde die Expression von sechs Kandidatengen bestimmt (Abb. 7). Drei der Kandidatengene wurden besonders deutlich nach Zucht mit Fructose induziert. So wurde für das Gen OEOE_0819 eine relative Genexpression von 6,52 berechnet, d. h. nach Zucht mit der Hexose Fructose ist der mRNA-Gehalt dieses Gens 6,52 mal höher als nach Zucht mit der Pentose Ribose, welche als Kontrolle eine Expression von 1 hat. Die relative Genexpression dieses Gens wurde zusätzlich nach Zucht mit Mannose bestimmt, da das Produkt des Gens enge Verwandtschaft zu GlcP, dem Glucose/ Mannose-Antiporter aus *B. subtilis* aufweist (Richter, 2004). Hier war jedoch keine Induktion zu beobachten. Ähnlich verhält sich das Gen OEOE_1682, welches nach Zucht mit Fructose um den Faktor 6,41 induziert wird. Auch das Gen OEOE_1574 ist unter diesen Zuchtbedingungen induziert. Das Gen weist die größte Änderung der Expression auf, der Gehalt der mRNA steigt fast um das 11-fache.

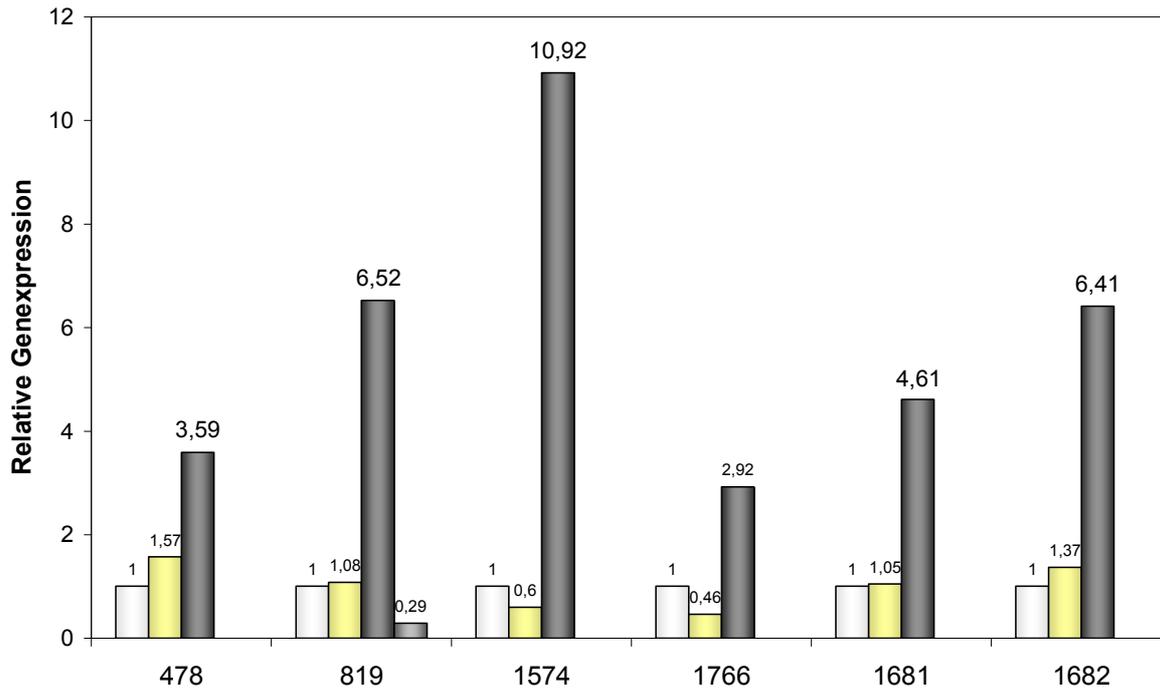


Abb. 7: Relative Genexpression der Kandidaten in Stamm *O. oeni* PSU-1 nach Zucht mit Glucose (gelb) und Fructose (schwarz). Die Expression nach Zucht mit Ribose (weiß) wurde als Kontrollbedingung gewählt und ist somit 1. Die mRNA von Gen OEOE_0819 wurde zusätzlich nach Zucht mit Mannose gemessen (grau).

Auch wenn der mRNA-Gehalt der Haushaltsgene als konstant betrachtet wird, so ist er doch nie identisch. Ein nicht reguliertes Gen sollte idealerweise den Wert 1 für die relative Genexpression aufweisen. Zur Abschätzung wie stark die Expression der Haushaltsgene *gyrA* und *ldhD* variiert, wurde ihre relative Genexpression nach Zucht auf Ribose, Glucose und Fructose berechnet. Dazu wurden parallel zu den Kandidatengenen auch die Haushaltsgene amplifiziert. Aus allen C_T -Werten wurde nun die relative Genexpression von *gyrA* im Vergleich zu *ldhD* kalkuliert und umgekehrt. Hierzu setzt man eines der Haushaltsgene als Kandidatengen in die Berechnung ein. Der erhaltene Wert gibt an, welche relative Genexpression das zweite Haushaltsgen im Vergleich dazu anzeigt. Der maximale Wert lag bei 2,3 für das Verhältnis *ldhD/gyrA* bzw. dem Kehrwert von 0,43 für das Verhältnis *gyrA/ldhD*. Somit wurde als Grenze für eine Induktion der Faktor 3 festgelegt und für eine Repression der Kehrwert von $< 0,33$. Ist die relative Genexpression eines Kandidaten nun größer als 3, kann man von einer Induktion sprechen. Ist der Wert kleiner als 0,33, wird das Gen reprimiert.

Die beiden Kandidatengene OEOE_0819 und OEOE_1574 liegen somit mit ihrer Induktion der Genexpression deutlich über dem Faktor drei. Auch die Gene OEOE_0478, OEOE_1681 und OEOE_1682 sind im Vergleich zu den Kontrollbedingungen nach Zucht mit Fructose induziert.

4.1.3 Bestimmung der relativen Genexpression im Stamm *O. oeni* B1

Die Untersuchungen des Hexosetransports wurden im Stamm *O. oeni* B1 durchgeführt (Richter, 2004). Um die Induktion der Gene besser vergleichen zu können, wurde die relative Genexpression der Kandidatengene auch in diesem Stamm bestimmt. Hier wurden die mRNA-Gehalte von insgesamt neun Kandidatengenen nach Zucht der Bakterien auf Ribose, Glucose oder Fructose verglichen (Abb. 8). Dabei handelte es sich um die gleichen Gene wie in Stamm *O. oeni* PSU-1 und zusätzlich die Gene OEOE_0136, OEOE_1706 und OEOE_1714.

In *O. oeni* B1 zeigten die Kandidaten OEOE_0819 und OEOE_1574 eine deutliche Expressionsänderung. Die Expression aller anderen Gene blieb weitgehend konstant. Im Gegensatz zu Stamm *O. oeni* PSU-1, wo Fructose eine Induktion hervorrief, nahm in Stamm B1 die Induktion nach Zucht mit Glucose zu. Für das Gen OEOE_0819 wurde eine Induktion um den Faktor 10 berechnet und für das Gen OEOE_1574 um den Faktor 6,5. Alle anderen Gene zeigten keinen signifikant erhöhten mRNA-Gehalt im Vergleich zur Zucht mit Ribose.

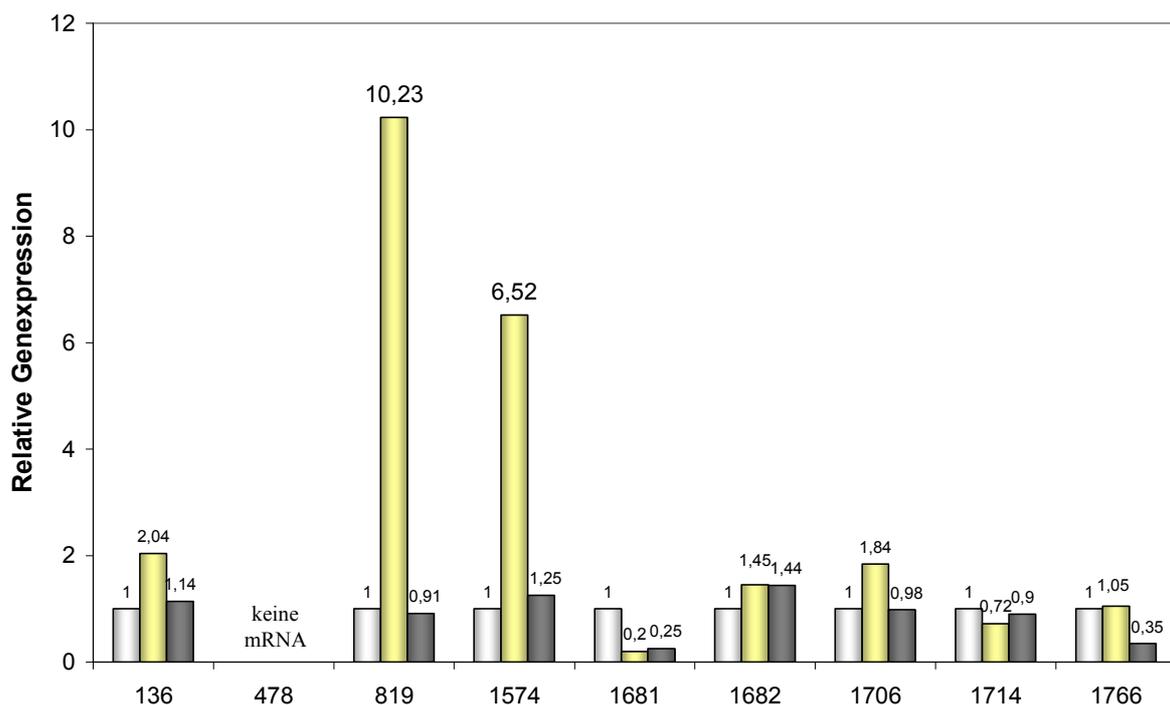


Abb. 8: Relative Genexpression der Kandidaten in Stamm *O. oeni* B1 nach Zucht mit Glucose (gelb) und Fructose (schwarz). Die Expression nach Zucht mit Ribose (weiß) wurde als Kontrollbedingung gewählt und gleich 1 gesetzt.

Das Gen OEOE_0478 wird in Stamm B1 nicht exprimiert. Das Gen konnte von chromosomaler DNA nicht aber von cDNA amplifiziert werden. Das zeigt, dass das Gen vorhanden ist und mit den Primern amplifiziert werden kann. Man kann deshalb davon

ausgehen, dass zumindest unter diesen drei Zuchtbedingungen keine mRNA des Gens in der Zelle vorhanden ist, und der Transporter keine Rolle spielt.

Die Gene OEOE_1766, OEOE_1681 und OEOE_1682, welche im Stamm PSU-1 durch Fructose induziert wurden, zeigten hier weder mit Fructose noch mit Glucose einen Anstieg im mRNA-Gehalt.

Fazit

Die beiden Gene OEOE_0819 und OEOE_1574 zeigten bei beiden Stämmen *O. oeni* PSU-1 und B1 eine Induktion der Genexpression. Diese Gene sind somit gute Kandidaten für einen sekundären Zuckertransporter. Sie unterscheiden sich jedoch hinsichtlich des induzierenden Substrats. So findet man generell im Stamm PSU-1 Gene, die nach Zucht mit Fructose induziert sind und im Stamm B1 Gene, die nach Zucht mit Glucose induziert sind.

4.1.4 Vergleich der relativen Genexpression der Stämme PSU-1 und B1

Die vorhergehenden Versuche zeigten zwei Kandidatengene, die aufgrund ihrer Induzierbarkeit für Zuckertransporter in *O. oeni* geeignet sein sollten. Diese wurden jedoch durch unterschiedliche Substrate induziert. Zur Kontrolle der Methode wurde die Genexpression von zwei Genen zum Vergleich gemessen, die für Enzyme des Zentralstoffwechsels in *O. oeni* kodieren. Die relative Genexpression sollte bei beiden Stämmen ähnlich ausfallen, wenn die relative Quantifizierung der mRNA richtig funktioniert. So wurde die Expression der Gene für die Mannit-Dehydrogenase (OEOE_1707) und für die bifunktionelle Acetaldehyd- und Alkohol-Dehydrogenase AdhE (OEOE_1248) bestimmt (Abb. 9). Die Enzymaktivität dieser beiden Enzyme wurde bereits im Stamm B1 nach Zucht auf Glucose und Fructose bestimmt (Richter, 2004).

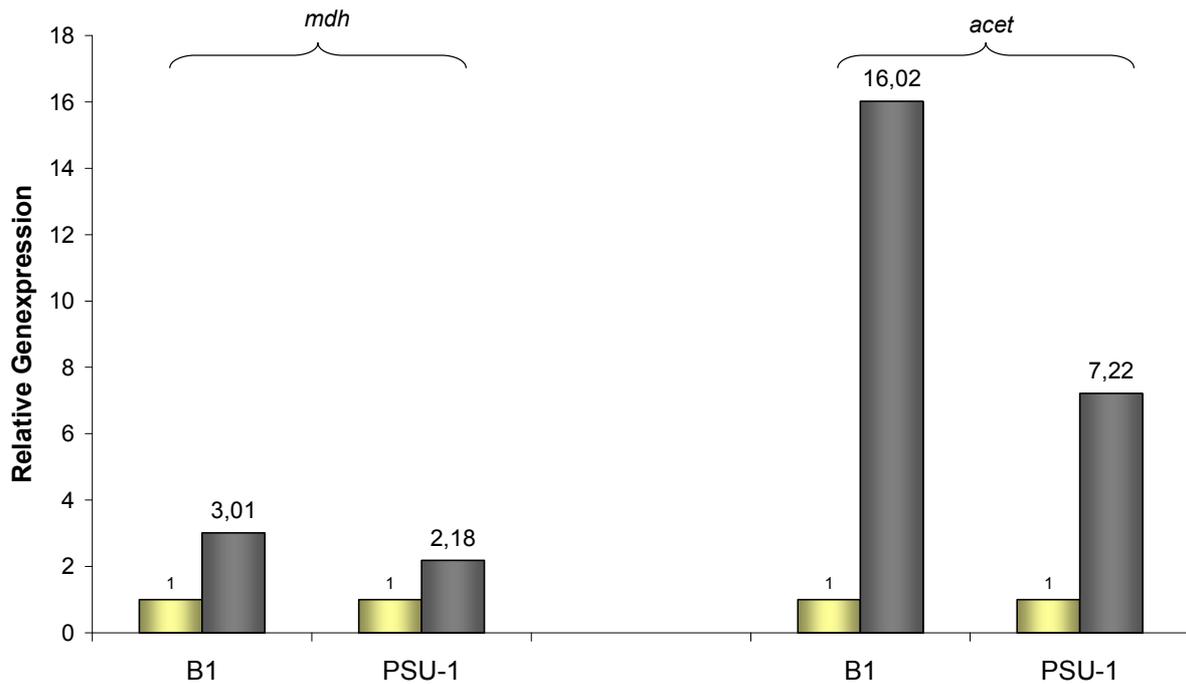


Abb. 9: Relative Expression der Gene für die Enzyme Acetaldehyd-Dehydrogenase (*adhE*, OEOE_1248) und der Mannit-Dehydrogenase (*mdh*, OEOE_1707) in Stamm *O. oeni* B1 und PSU-1. Die relative Genexpression wurde nach Zucht mit Fructose (gelb, Kontrollbedingung = 1) und Glucose (schwarz) bestimmt.

Die Enzymaktivitäten der Mannit-Dehydrogenase in zellfreien Extrakten von *O. oeni* B1 zeigten nach Zucht auf beiden Substraten gleiche Aktivität. Die Expression der Mannit-Dehydrogenase (*mdh*-Gen) wurde in bei beiden Stämmen schwach induziert nach Zucht mit Fructose im Vergleich zu Glucose. Die Ergebnisse der Genexpression weichen somit gering von denen der Bestimmung der Enzymaktivitäten ab, fallen aber für beide Stämme gleich aus. Die AdhE (*adhE*-Gen) zeigte bei beiden Stämmen eine deutliche Induktion nach Zucht mit Glucose (Abb. 9). Die im Stamm B1 bestimmten Aktivitäten der Acetaldehyd-Dehydrogenase ließen eine Induktion um den Faktor 18,3 erwarten, welcher in Stamm B1 auch in ähnlicher Form erreicht wird. Die Genexpression entspricht somit den Erwartungen. Die Induktion des Gens der Acetaldehyd-Dehydrogenase durch Glucose ist in beiden Stämme PSU-1 und B1 hoch.

Die relativ gute Übereinstimmung der Änderungen der Enzymaktivitäten und der mRNA-Gehalte zeigt, dass die quantitative Real-time PCR zuverlässige Werte liefert, die offensichtlich den mRNA-Gehalt widerspiegeln.

4.1.5 Versuche zur Komplementation einer Glucostransport-negativen *E. coli*-Mutante

Die Bestimmung der relativen Genexpression lieferte zwei gute Kandidaten für sekundäre Carrier, die eine Rolle bei der Aufnahme von Hexosen spielen können. Neben der Untersuchung der Expression sollte eine physiologische Charakterisierung dieser Gene erfolgen, um die Funktion der zugehörigen Carrier im Hexostransport zu bestätigen. Hierzu wurden die Gene OEOE_0819 und OEOE_1574 von *O. oeni* B1 in einen *E. coli*-Vektor hinter einen regulierbaren Promotor kloniert. Das Gen OEOE_1766, welches durch Zucht mit Hexosen nicht induziert wird, diente als Vergleich. Die Plasmide wurden in eine *E. coli* Mutante transformiert, in der das *ptsHlcr*-Operon, welches für die Komponenten HPr, E1 und EII^{Glc} von Phosphotransferasesystemen kodiert, das Gen *galP*, welches für den Galactostransporter GalP kodiert und das *mgl*-Operon, welches für ein Methyl-Galactosid-Transportsystems kodiert, durch Antibiotikaresistenzkassetten ausgeschaltet sind. Da alle Aufnahmesysteme für Hexosen fehlen, kann dieser *E. coli*-Stamm kaum auf Glucose oder Fructose wachsen. Die Expression der klonierten Gene wurde durch Zugabe von Anhydrotetracyclin (AHT) induziert. Die Korrektheit der Plasmide wurde durch Sequenzierung überprüft. Die Synthese eines funktionellen Carriers sollte so das Wachstum von *E. coli* LJ141 auf Hexose wieder ermöglichen. Die Abbildung 10 zeigt diesen Wachstumsversuch am Beispiel von Gen OEOE_1574. Das Wachstum auf Glucose wurde durch keines der Plasmide auch nicht nach Zugabe des Induktors wieder hergestellt. Glycerin dagegen, welches als Positivkontrolle diente, ermöglichte ein Wachstum der Stämme.

Neben der Komplementation des Wachstums wurde auch der Verbrauch von Glucose durch Zellsuspensionen untersucht. Falls der Transport nur sehr schwach funktioniert und nicht ausreicht für Wachstum, besteht in Zellsuspensionen hoher Zelldichte die Aussicht, den Verbrauch von Glucose nachzuweisen. Die Zellen wurden im Vorfeld mit Glycerin gezüchtet, um eine ausreichende Menge an Zellen zu erhalten. Nach Waschen der Zellen wurde eine Zellsuspension mit einer OD₅₇₈ von ca. 8-10 hergestellt und mit 10 mM Glucose inkubiert. Die Glucosekonzentration wurde über einen Zeitraum von mehreren Stunden bestimmt. Die Abnahme der Glucosekonzentration entsprach in allen Fällen der der Kontrolle, Plasmid ohne kloniertes Gen. Eine Komplementation des Glucostransports wurde so nicht erreicht. Die Funktion dieser Proteine als Hexostransporter konnte so nicht direkt nachgewiesen werden.

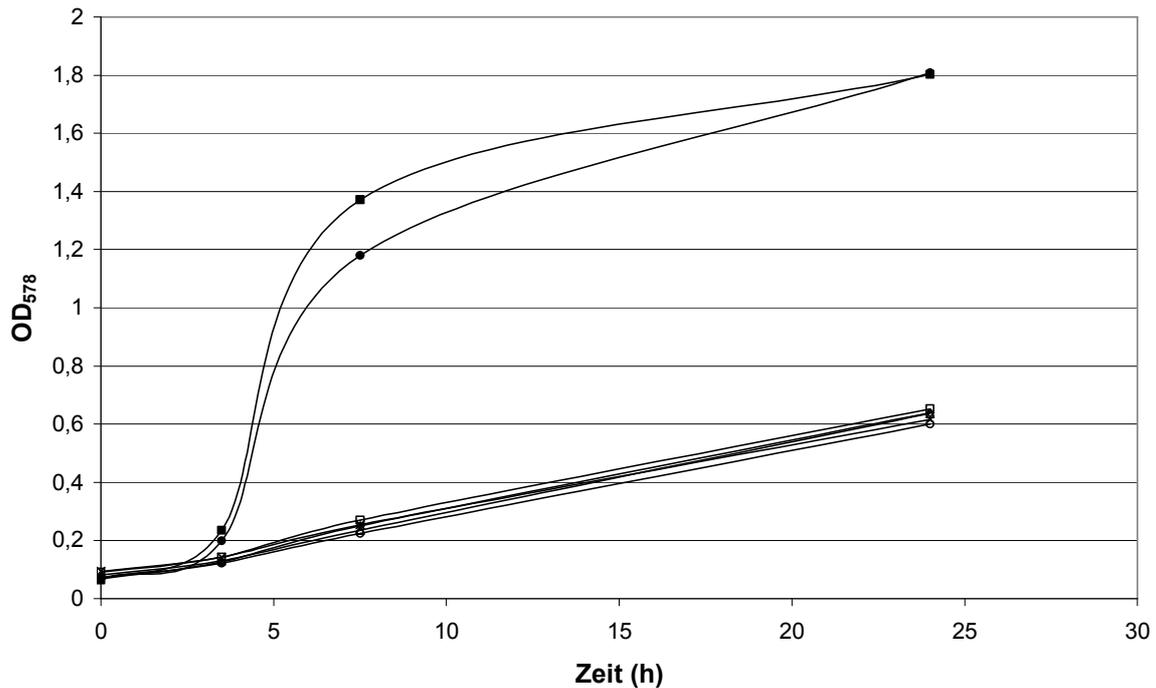


Abb. 10: Wachstum Komplementation des Glucosetransports von *E. coli* LJ141. Der Stamm LJ141pASK-1574 wurde mit 10 mM Glucose gezüchtet und mit verschiedenen Konzentrationen an AHT induziert (Δ ohne AHT, \times 5 ng/ml AHT, \square 10 ng/ml AHT, \circ 20 ng/ml AHT). Als Positivkontrolle wurden die Stämme LJ141pASK-IBA 13 plus (\blacksquare) und LJ141pASK-1574 (\bullet) mit 10 mM Glycerin gezüchtet. Als Negativkontrolle diente der Stamm LJ141pASJ-IBA 13 plus (\diamond) mit 10 mM Glucose. Beide Kontrollen wuchsen ohne Zugabe von Induktor.

Zusätzlich wurde die Umsetzung von Glucose auf Methylrot-Agarplatten überprüft. Die Nährböden enthalten Glucose als einzige vergärbare Kohlenstoffquelle. Findet unter anaeroben Bedingungen ein Verbrauch der Glucose statt, so entstehen in der gemischten Säuregärung von *E. coli* Säuren und der pH-Indikator Methylrot schlägt von gelb nach rot um. Ein Glucoseumsatz kann so anhand eines Farbumschlags nachgewiesen werden. Auf diese Weise wurde eine Komplementation des Hexosecarrier-negativen Stammes durch das Gen für den Glucosetransporter GlcP von *Bifidobacterium longum* NCC2705 (Parche *et al.*, 2006) nachgewiesen. Für die Stämme *E. coli* LJ141pASK-IBA, die Plasmide mit den klonierten Genen OEOE_0819, OEOE_1574 oder OEOE_1766 enthalten, wurde kein Farbumschlag des pH-Indikators beobachtet. Damit konnte auch mit dieser Methode keine Komplementation nachgewiesen werden.

Ein möglicher Grund für das Scheitern einer heterologen Expression ist die unterschiedliche Kodon Nutzung von *E. coli* als Gram-negativem und *O. oeni* als Gram-positivem Organismus.

4.1.6 Induktion der Kandidatengene bei pH 4

Die physiologische Charakterisierung des Hexosetransports zeigte, dass abhängig vom jeweiligen pH-Wert verschiedene Carrier aktiv sind (Richter, 2004). Den Ergebnissen zu Folge existieren mehrere Transporter, die unterschiedliche pH-Optima des Transports haben und abhängig vom pH-Wert der Zellzucht in der Zelle vorliegen. Die Daten ließen vermuten, dass ein Carrier mit einem Optimum für den Glucosetransport bei pH 5 vorliegt und unabhängig vom pH-Wert des Zuchtmediums induziert wird. Ein anderer Carrier hatte das Optimum für den Transport bei pH 7 und wurde nur nach Zucht mit höheren pH-Werten (pH 5,8) induziert, nicht aber bei Zucht mit pH 4 (Richter, 2004). Eine Bestimmung der relativen Genexpression einiger Kandidaten im Stamm B1 sollte Aufschluss darüber geben, ob ihre Expression vom pH-Wert abhängt (Abb. 11).

Die Expression der Gene OEOE_0819 und OEOE_1574 wurde bei Zucht bei pH 4 durch Glucose induziert (Abb. 11). Die Gene OEOE_1766 und OEOE_1682 zeigten keine Änderung des mRNA-Gehalts abhängig von der zur Verfügung stehenden C-Quelle.

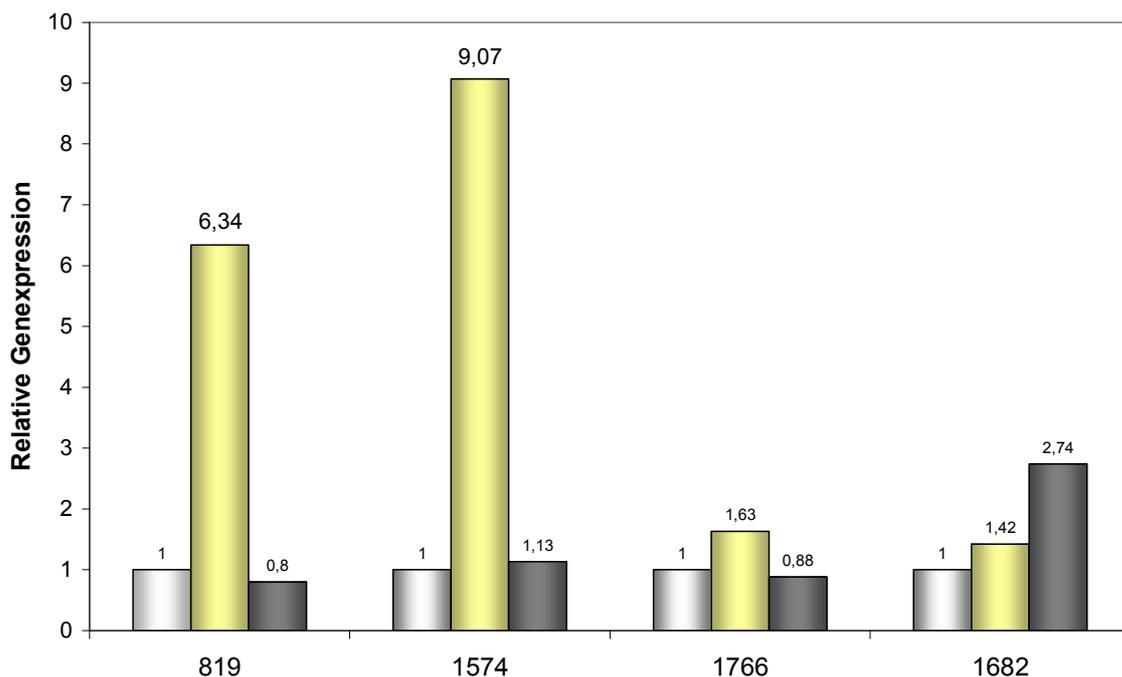


Abb. 11: Relative Genexpression *O. oeni* B1 nach Zucht bei pH 4 mit den C-Quellen Ribose (weiß, Kontrollbedingung = 1), Glucose (gelb) oder Fructose (schwarz).

Das Expressionsmuster war unter diesen Bedingungen ähnlich wie bei pH 5,5 (Vergleich Abb. 8). Glucose verursachte auch bei diesem pH-Wert die stärkste Induktion von OEOE_0819 und OEOE_1574. Sie betrug für OEOE_0819 jedoch nur Faktor 6,3 gegenüber einer 10,2-fachen Induktion bei pH 5,5. Das Gen OEOE_1574 dagegen wurde bei pH 4 stärker induziert, um den Faktor 9 gegenüber 6,5 bei pH 5,5. Die Expression der Gene ist

somit zu gewissen Teilen auch vom pH-Wert des Zuchtmediums abhängig. Die eher geringe Änderung der Expression erklärt jedoch die Änderung der Transporteraktivitäten beim Wechsel von Zucht bei pH 5,8 zu Zucht bei pH 4 nicht ausreichend.

4.1.7 Expression der Hexose-Phosphotransferasesysteme

O. oeni verfügt über eine Reihe von Phosphotransferasesystemen. Im Genom von Stamm PSU-1 sind acht vollständige Systeme zu finden, die jeweils aus den Enzymen EIIA, B, C und teilweise EIID bestehen. EIIA und EIIB sind cytoplasmatische Komponenten und für den Phosphorylgruppentransfer verantwortlich. EIIC ist ein Membranprotein und katalysiert den Transport des Substrats. In einigen Systemen ist die Membrankomponente aus zwei Proteinen, EIIC und EIID, aufgebaut. Phosphotransferasesysteme können für die Aufnahme von Zuckern sowohl Mono- als auch Disacchariden verantwortlich sein. Tabelle 6 zeigt ausgewählte Systeme, die für den Transport von Hexosen in Frage kommen, und ihre Eigenschaften. Diese Systeme haben nach BLAST-Analyse in der „Transport Classification Database“ die höchste Sequenzähnlichkeit zu bekannten Hexose-transportierenden Systemen. Man geht allerdings bisher allgemein davon aus, dass Phosphotransferasesysteme bei heterofermentativen Milchsäurebakterien mit Phosphoketolaseweg zum Hexoseabbau keine Rolle in der Aufnahme von Glucose spielen (Romano *et al.*, 1979). Um zu überprüfen, ob diese Systeme in *O. oeni* eine Funktion besitzen und um diese näher zu charakterisieren, wurde in Stamm *O. oeni* B1 die relative Genexpression der universellen Komponenten eines jeden PTS EI und HPr einer Zelle bestimmt.

Die Gene OEOE_0647 und OEOE_0643 sind im Genom als HPr- und E1-Proteine von Phosphotransferasesystemen annotiert. Neben der relativen Expression dieser Gene wurde auch die Expression jeweils eines Gens der drei Systeme bestimmt, die Ähnlichkeit zu Hexose-transportierenden Phosphotransferasesystemen haben. So kodieren die Gene OEOE_0464 und OEOE_0382 für die Komponenten EIIAB und EIIA von Systemen, die als Mannose/Fructose-spezifisch annotiert sind. Die Annotation des Gens OEOE_0296 gibt keinen Hinweis auf die Substratspezifität des PTS. Das zugehörige Protein hat aber eine hohe Sequenzidentität zu Hexose-spezifischen Systemen. Diese Ähnlichkeit zeigte sich in einem Sequenzvergleich durch BLAST-Analyse in der „Transport Classification Database“.

Tabelle 6: Das Genom von *O. oeni* weist vollständige Phosphotransferasesysteme auf. Die Gennummer und Annotation entsprechen den Angaben im vollständig sequenzierten Genom (www.jgi.doe.gov). Die Größe des Proteins ist durch die Anzahl der Aminosäuren (AS) angegeben. Die Anzahl der Transmembranhelices (TMH) wurde mit dem TMHMM Server 2.0 vorhergesagt. Um zu beurteilen, ob diese Systeme eine Rolle im Stoffwechsel spielen, wurde die Genexpression der mit * markierten Gene bestimmt.

Gen	Komponente	Annotation	AS	TMH
647*	E1	PEP-Proteinkinase (PTS E1 Komponente in Bakterien)	575	
643*	Hpr	Phosphotransferasesystem, HPr-verwandetes Protein	87	
464*	EIIAB	Phosphotransferasesystem, Mannose /Fructose-spezifische Komponente IIA	331	-
465	EIIC	Mannose- spezifische PTS Komponente IIC	271	7
466	EIID	Mannose- spezifische PTS Komponente IID	304	5
382*	EIIA	Phosphotransferasesystem, Mannose/Fructose-spezifische Komponente	139	-
379	EIIB	Phosphotransferasesystem, Mannose/Fructose/N-Acetylgalactosamin- spezifische Komponente	163	-
380	EIIC	Phosphotransferasesystem, Mannose/Fructose/N-Acetylgalactosamin- spezifische Komponente IIC	311	7
381	EIID	Phosphotransferasesystem, Mannose/Fructose/N-Acetylgalactosamin- spezifische Komponente IID	272	5
296*	EIIA	Phosphotransferasesystem IIA Komponente	134	-
297	EIIB	Phosphotransferasesystem IIBC Komponente	236	4

Die beiden universellen Komponenten E1 und HPr zeigten abhängig von der zur Verfügung stehenden C-Quelle nur eine geringe Veränderung der Expression (Abb. 12). Die Änderung der mRNA-Gehalte war bei diesen beiden Genen nach Zucht auf Ribose, Glucose oder Fructose immer kleiner drei. Vergleicht man die C_T -Werte der dazugehörigen PCR Produkte (s. Anhang) mit denen der Haushaltsgene *gyrA* und *ldhD*, so kann man davon ausgehen, dass beide Gene stark exprimiert werden und somit in der Zelle eine Funktion ausüben. Die Gehalte an mRNA liegen im selben Bereich wie die der Haushaltsgene. Die Gene OEOE_0296 und OEOE_0382 zeigen noch geringere Änderungen in ihrer Expression und werden in der Zelle konstant exprimiert. OEOE_0464 hingegen zeigte besonders nach Zucht mit Fructose eine deutliche Induktion (Faktor > 5).

Die Untersuchungen zeigten deutlich, dass die Gene der betrachteten Phosphotransferasesysteme in der Zelle exprimiert und teilweise auch abhängig von den vorhandenen Zuckern reguliert werden. Somit kann man annehmen, dass

Phosphotransferasesysteme eine Funktion im Transport besitzen, eine genaue Zuordnung der Funktion ist an dieser Stelle jedoch nicht möglich.

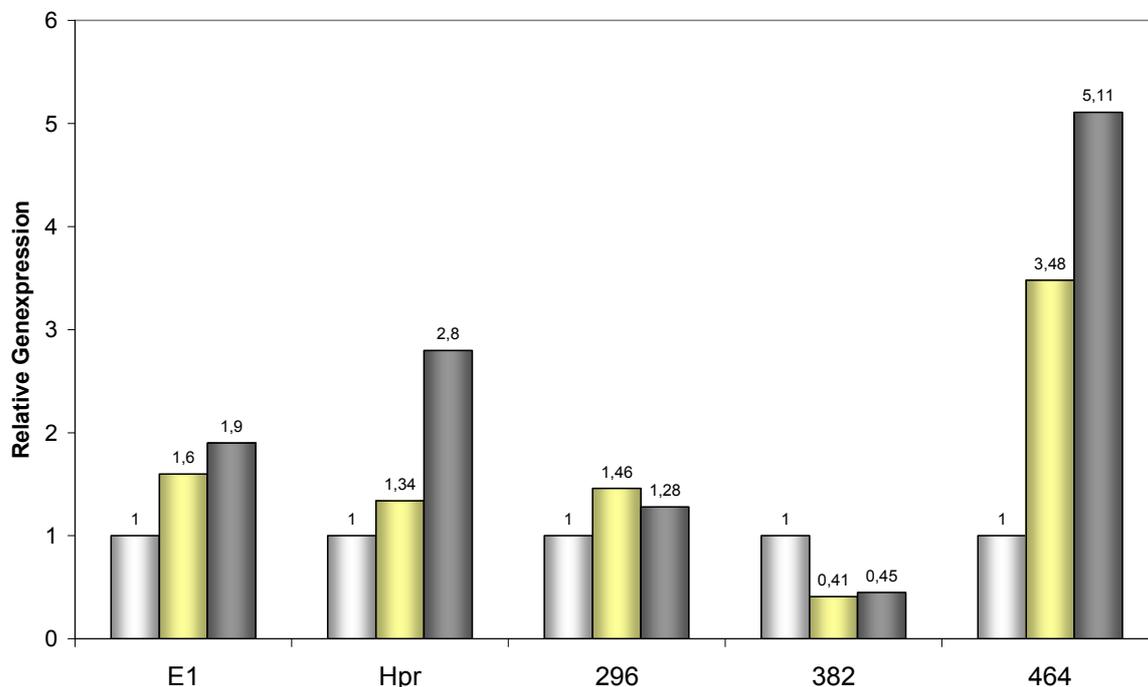


Abb. 12: Relative Genexpression der Komponenten von Phosphotransferasesystemen in Stamm *O. oeni* B1. Die mRNA-Gehalte wurden nach Zucht mit Ribose (weiß), welches als Kontrollbedingung gewählt wurde, sowie nach Zucht mit Glucose (gelb) und Fructose (schwarz) miteinander verglichen. Die relative Genexpression der Kontrollbedingung ist 1.

4.1.8 Analyse der Carriergene von *O. oeni* mit Hilfe der IMG-Datenbank

Das IMG (integrated microbial genomes) System ist eine Plattform zur Analyse von mikrobiellen Genomen, welche durch das Joint Genome Institute (JGI) zur Verfügung gestellt wird (Markowitz *et al.*, 2006). Mit Hilfe der Datenbank wurde das Genom von *O. oeni* PSU-1 nach allen Transportsystemen untersucht, die eine Rolle bei der Aufnahme von Zuckern spielen können. Zur Suche wurde mittels der IMG-Datenbank eine Liste der COGs (Cluster of orthologous groups of proteins) und Proteinfamilien (Pfam) erstellt, die mit dem Transport von Zuckern assoziiert werden (s. Anhang). Ein COG umfasst orthologe Gene bzw. Proteine und orthologe Gruppen von Paralogen. Ortholog bezeichnet man sequenzähnliche Gene in unterschiedlichen Organismen, die einen gemeinsamen Stammbaum haben und für die man dieselbe oder ähnliche Funktion vermutet. Paraloge Gene befinden sich in ein und dem selben Organismus. Sie sind durch Duplikation entstanden und können mittlerweile unterschiedliche Funktionen ausüben. Das System der COGs wurde von Koonin entwickelt (Tatusov *et al.*, 1997) und dient dazu, Proteine von komplett sequenzierten Organismen zu klassifizieren und

mögliche Funktionen vorherzusagen. In der Pfam-Datenbank (Pfam Protein Families Database) werden nicht vollständige Proteine sondern funktionelle Domänen betrachtet, die eine bestimmte Funktion ausüben und so den Proteinen von neu sequenzierten Organismen eine mögliche Funktion zugeordnet. Alle COGs und Pfams sind in der IMG-Datenbank hinterlegt und können zur Suche herangezogen werden.

Das Genom von *O. oeni* PSU-1 wurde auf 53 COGs und 26 Pfams untersucht, welche sekundäre Carrier, Phosphotransferasesysteme und ABC-Transporter enthalten, die mit der Aufnahme von Zuckern in Verbindung gebracht werden (s. Anhang). Die Suche gibt einen Überblick über alle potentiell für die Untersuchungen des Hexosetransports interessanten Gene.

Das Genom enthält insgesamt 34 Gene, die wahrscheinlich für sekundäre Carrier kodieren und eine Rolle bei der Aufnahme von Hexosen spielen können (Tabelle 7). Die meisten dieser Gene gehören dem COG2814 (Arabinose Efflux Permeasen) und Pfam00083 (Sugar_Tr/Sugar (and other) Transporter) an. Laut Annotation gehören 20 dieser Carrier der „Major Facilitator Superfamily“ (MFS) an. Sieben weitere Gene sind als Arabinose- oder Xylose-Carrier annotiert, d. h. als Pentosetransporter. Die Vorhersage der Substratspezifität der Carrier ist generell sehr schwierig, da Sequenzen der Transporter sehr variabel sind und die Sequenz der aktiven Zentren wenig charakterisiert und charakteristisch ist. Deshalb sind genauere Vorhersagen über die Substratspezifität von Carriern kaum möglich. Im Genom von *O. oeni* befinden sich zusätzlich zu den 34 Genen aus Tabelle 7 vier Gene (OEOE_0148, OEOE_0384, OEOE_0705 und OEOE_1777), die als Permeasen der MFS annotiert sind. Sie sind jedoch keinem COG zugeordnet und gehören einer Proteinfamilie an, die nur Proteine unbekannter Funktion enthält. Diese Proteine wurden trotz ihrer Annotation als Carrier nicht in die Liste mit aufgenommen. Aufgrund welcher Eigenschaft die Annotation vergeben wurde, ist nicht ersichtlich.

Neben diesen sekundären Transportern verfügt *O. oeni* PSU-1 über acht vollständige Phosphotransferasesysteme, für die laut Annotation eine Beteiligung am Transport von Mono- oder Disacchariden vorgeschlagen wird (Tabelle 8). Drei dieser Systeme könnten Cellubiose-spezifisch sein. Sie sind entweder im Genom als Cellubiose-spezifisch annotiert und gehören dem entsprechenden COG oder Pfam an, oder die nähere Umgebung der Gene enthält Strukturgene, die mit dem Abbau von Cellubiose assoziiert sind. So befindet sich beispielsweise eine annotierte β -Glucosidase (OEOE_0224) in Nachbarschaft zu dem vermutlich Cellubiose-spezifischen System OEOE_0221 bis OEOE_0223. Auch die Gene OEOE_0340 und OEOE_0341 sind als β -Glucosidase beschrieben und liegen zwischen

Genen für ein PTS. Neben diesen so ermittelten Genen befinden sich im Genom keine weiteren Gene, die als Bestandteile von Phosphotransferasesystemen annotiert sind.

Das Genom von *O. oeni* PSU-1 enthält 127 Gene, die als Komponenten von ABC Transportsystemen annotiert sind. Transporter der ABC-Carrierfamilie (ATP-binding Cassette (ABC) Superfamily) bestehen üblicherweise aus zwei integralen Membranproteinen und zwei cytoplasmatischen Proteinen. Diese können entweder Homo- oder Heterodimere sein. Aufnahmesysteme enthalten zusätzlich ein Substratbindeprotein. Laut Genomannotation findet man 15 vollständige Systeme, die aus mindestens einer extrazellulären Komponente, einer Permease- und einer ATPase-Komponente bestehen, die in unmittelbarer Nähe kodiert sind. Sieben dieser Systeme spielen wahrscheinlich eine Rolle bei der Aufnahme von Aminosäuren, Di- und Oligopeptiden und ähnlichen Substraten. Viele der Systeme sind hingegen unvollständig und bestehen häufig nur aus einer Permease- und ATPase-Komponente. Diese Systeme könnten somit am Export von Substanzen beteiligt sein. Vier der vollständigen Systeme gehören den potentiellen Zuckertransportern an (Tabelle 9). Daneben findet man in der Liste der COGs und Pfams fünf einzelne Komponenten und zwei Systeme, denen eine Komponente für ein vollständiges ABC-System fehlt.

Tabelle 7: Gene für sekundäre Transporter aus *O. oeni* PSU-1. Im Genom wurden 34 Gene für sekundäre Carrier, die eine Rolle im Zuckertransport spielen könnten, identifiziert. Die Zuordnung erfolgte über COGs und Pfams, die mit dieser Funktion assoziiert sind (s. Anhang). ¹ gibt den COG oder Pfam des Gens wieder, wenn dieser nicht in der Liste für Zuckertransporter enthalten war. Die Gene und ihre Annotationen stammen aus der IMG-Datenbank und wurden direkt übernommen. Die Proteingröße ist in Aminosäuren (AS) angegeben.

Gen	Annotation	AS	Zuordnung über COG	Pfam
0041	Permease of the major facilitator superfamily	471	2211	03092 ¹
0049	Arabinose efflux permease	395	2814	00083
0075	Arabinose efflux permease	397	2814	00083
0076	Arabinose efflux permease	387	2814	00083
0097	Permease of the major facilitator superfamily	493	2814	00083
0134	Permease of the major facilitator superfamily	332	2807 ¹	00083
0136	Permease of the major facilitator superfamily	401	2814	00083
0169	Permease of the major facilitator superfamily	411	2814	05977 ¹
0192	Permease of the major facilitator superfamily	456	2814	-
0265	Permease of the major facilitator superfamily	418	2814	00083
0290	Permease of the major facilitator superfamily	463	2814	-
0299	Permease of the major facilitator superfamily	402	-	05977 ¹
0305	Na ⁺ /xyloside symporter or related transporter	479	2211	-
0349	Glycerol uptake facilitator or related permease (Major Intrinsic Protein Family)	250	580	00230
0478	D-xylose proton-symporter	480	2814	00083
0503	Permease of the major facilitator superfamily	568	2814	06609 ¹
0759	Permease of the major facilitator superfamily	554	2814	05977 ¹
0819	Cyanate permease	395	-	00083
0877	Permease of the major facilitator superfamily	496	2814	00083
0886	Permease of the major facilitator superfamily	461	2807 ¹	00083
0937	Permease of the major facilitator superfamily	463	2814	-
1193	Na ⁺ /xyloside symporter or related transporter	437	2211	-
1378	Permease of the major facilitator superfamily	512	2814	-
1536	Permease of the major facilitator superfamily	458	2814	-
1574	Permease of the major facilitator superfamily	403	2814	00083
1614	Fucose permease	448	738	-
1645	Permease of the major facilitator superfamily	409	2814	05977 ¹
1681	D-xylose proton-symporter	464	2814	00083
1682	D-xylose proton-symporter	458	2814	00083
1686	Permease of the major facilitator superfamily	455	2814	06609 ¹
1714	Putative glucose uptake permease	315	4975	06800
1766	D-xylose proton-symporter	462	2814	00083
1832	Glycoside-Pentoside-Hexuronide (GPH):Cation symporter family protein	353	2211	00083
1853	Permease of the major facilitator superfamily	471	2814	00083

Tabelle 8: Gene für Phosphotransferasesysteme aus *O. oeni* PSU-1. Im Genom von *O. oeni* PSU-1 wurden acht vollständige Phosphotransferasesysteme (grau unterlegt) gefunden, die mit der Aufnahme von Zuckern in die Zelle assoziiert sein könnten. Die Zuordnung erfolgte über COGs und Pfams, die mit dieser Funktion assoziiert sind (s. Anhang). Desweiteren wurden eine einzelne Komponente und ein unvollständiges System gefunden. ¹ gibt den COG oder Pfam des Gens wieder, wenn dieser nicht in der Liste für Zuckertransporter enthalten war. Die Gene und ihre Annotationen stammen aus der IMG-Datenbank und wurden direkt übernommen. Die Proteingröße ist in Aminosäuren (AS) angegeben.

Gen	Annotation	AS	Zuordnung über COG	Pfam
0221	Cellobiose-specific PTS system IIC component	450	1455	02378
0222	Cellobiose-specific PTS system IIA component	107	1447	02255
0223	Cellobiose-specific PTS system IIB component	102	1440	02302
0233	Phosphotransferase system mannitol/fructose-specific IIA domain (Ntr-type)	137	1762	00359
0234	Phosphotransferase system galactitol-specific IIA domain (Ntr-type)	153	1762	00359
0235	Galactitol PTS, EIIC	445	3775	03611 ¹
0236	Phosphotransferase system, galactitol-specific IIB component	94	3414	02302
0282	Cellobiose-specific PTS system IIC component	401	1455	02378
0296	Phosphotransferase system IIA component	169	2190	0358
0297	Phosphotransferase system IIBC component	236	1264	00367/02378
0338	Cellobiose-specific PTS system IIB component	102	1440	02302
0339	Cellobiose-specific PTS system IIA component	111	1447	02255
0343	Cellobiose-specific PTS system IIC component	433	1455	02378
0379	Phosphotransferase system, mannose/fructose/N-acetylgalactosamine-specific component IIB	163	3444	03830
0380	Phosphotransferase system, mannose/fructose/N-acetylgalactosamine-specific component IIC	311	3715	03609
0381	Phosphotransferase system, mannose/fructose/N-acetylgalactosamine-specific component IID	272	3716	03613
0382	Phosphotransferase system, mannose/fructose-specific component IIA	139	2893	03610
0464	Phosphotransferase system, mannose/fructose-specific component IIA	331	3444	00367/02378
0465	Mannose-specific PTS system component IIC	271	3715	03609
0466	Mannose-specific PTS system component IID	304	3716	03613
1204	Phosphotransferase system, mannose/fructose-specific component IIA	100	2893	03610
1207	Cellobiose-specific PTS system IIA component	107	1447	02255
1208	Cellobiose-specific PTS system IIB component	102	1440	02302
1341	Beta-glucoside-specific PTS system IIABC component	503	1263	-
1342	Phosphotransferase system IIA component(EC:2.7.1.69)	162	2190	00358
1482	Phosphotransferase system, galactitol-specific IIB component	99	3414	02302
1483	Phosphotransferase system mannitol/fructose-specific IIA domain (Ntr-type)	160	1762	00359

Tabelle 9: Gene für ABC Carrier aus *O. oeni* PSU-1. *O. oeni* PSU-1 verfügt über vier vollständige Sätze an ABC-Transportern, die Ähnlichkeit zu Zuckeraufnahmesystemen haben. Die Zuordnung erfolgte über COGs und Pfams, die mit dieser Funktion assoziiert sind (s. Anhang). ¹ gibt den COG oder Pfam des Gens wieder, wenn dieser nicht in der Liste für Zuckertransporter enthalten war. Die Gene und ihre Annotationen stammen aus der IMG-Datenbank und wurden direkt übernommen. Die Proteingröße ist in Aminosäuren (AS) angegeben.

Gen	Annotation	AS	Zuordnung über COG	Pfam
0020	ABC-type sugar transport system, ATPase component	373	3839	00005
0021	ABC-type sugar transport system, periplasmic component	428	1653	01547
0022	ABC-type sugar transport system, permease component	284	1175	00528
0023	ABC-type maltose transport system, permease component	271	395	00528
0253	ABC-type sugar transport system, periplasmic component	424	2182	01547
0254	ABC-type sugar transport system, permease component	310	1175	00528
0255	ABC-type maltose transport system, permease component	276	395	00528
0267	ABC-type uncharacterized transport system, periplasmic component	359	2984	04392 ¹
0268	Ribose/xylose/arabinose/galactoside ABC-type transport system, permease component	297	4120	02653
0269	ABC-type uncharacterized transport system, ATPase component	256	1101	00005
0517	ATPase component of ABC transporter	352	488	00005
0810	ABC-type sugar transport system, permease component	283	1175	00528
0812	ABC-type maltose transport system, permease component	215	395	00528
1433	ATPase component of ABC transporter with duplicated ATPase domains	523	488	00005/02483 ¹
1456	ABC-type sugar transport system, ATPase component	358	3839	00005
1457	ABC-type sugar transport system, permease component	318	1175	00528
1458	ABC-type sugar transport system, permease component	276	395	00528
1459	ABC-type sugar transport system, periplasmic component	457	1653	01547
1534	ABC-type uncharacterized transport system, ATPase component	309	4152	00005
1540	ABC-type cobalt transport system, ATPase component	562	1123 ¹	00005
1606	Uncharacterized ABC-type transport system, periplasmic component/surface lipoprotein	361	1744	02608 ¹
1607	ABC-type uncharacterized transport system, ATPase component	528	3845	00005
1608	ABC-type uncharacterized transport system, permease component	381	4603 ¹	02653
1609	Uncharacterized ABC-type transport system, permease component	318	1079	02653
1613	ABC-type ribose transport system, auxiliary component	131	1869	05025
1651	ABC-type sugar transport system, ATPase component	402	3839	00005/03459

4.1.9 Analyse der Zellproteine durch Shotgun Proteomanalysen

Allgemeine Betrachtungen und Verwendbarkeit der Methode für *Oenococcus*

Die hier angewandete Methode der Shotgun Proteomanalyse ermöglicht es, einen Einblick in die Proteinzusammensetzung der Bakterienzelle zu erhalten. Sie stellt eine Ergänzung zu den Expressionsmessungen dar, da hierbei die tatsächlich in der Zelle vorliegenden Proteine bestimmt werden.

Zur Analyse wurden die Zellen mit den C-Quellen Ribose, Glucose oder Fructose gezüchtet und durch Zentrifugation geerntet. Im Anschluss an den Zellaufschluss und das Abzentrifugieren der Zelltrümmer wurden die Proteine des zellfreien Extrakts mit Trypsin verdaut. Die so erhaltenen Peptide wurden in die Messung eingesetzt. Die „**Multidimensional Protein Identification Technology**“ (MudPIT) trennt in zwei aufeinander folgenden Flüssigchromatographien die unterschiedlichen Peptide. Die beiden folgenden Schritte der Massenspektrometrie bestimmen zuerst die Masse der Peptide und anschließend ihre Sequenz. So erhaltene Peptidsequenzen werden mit der Genomsequenz von *O. oeni* PSU-1 verglichen. Auf diese Weise konnten aus den Peptidfragmenten die in der Zelle vorliegenden Proteine nach Zucht mit den Zuckern Ribose, Glucose oder Fructose ermittelt werden. Je häufiger Peptide gefunden werden, die aus einem bestimmten Protein stammen, desto häufiger hat dieses zum Erntezeitpunkt in der Zelle vorgelegen. So können durch diese Methode Gehalte einzelner Proteine nach verschiedenen Zuchtbedingungen verglichen und Hinweise auf die Regulation von Stoffwechselprozessen in der Zelle erhalten werden.

Diese Methode wurde bisher noch nicht auf *O. oeni* angewandt. Das hier verwendete Präparationsverfahren der Peptide wurde von J. Kim (University of California, Davis) entwickelt und ist bereits für andere Milchsäurebakterien etabliert (Kim, unveröffentlicht). Ein kritischer Punkt bei der Durchführung des Versuchs ist die Dauer des Zellaufschlusses. Dauert dieser zu lange, so können die Proteinmuster verändert werden. Doch auch für *O. oeni* gelang der Aufschluss durch hochfrequentes Schütteln mit Glasperlen in der entsprechenden Zeit. Das Verfahren ist für *O. oeni* geeignet und kann in dieser Form eingesetzt werden. Mit der ersten Präparation wurden in den Zellen aller Zuchten mehr als 200 Proteine identifiziert. So wurden nach Zucht mit Ribose 224 Proteine zugeordnet, nach Zucht mit Glucose 199 und nach Zucht mit Fructose 226. Proteine, die nicht nachgewiesen wurden, liegen entweder nicht in den Zellen vor oder sie werden aufgrund des geringen Gehalts nicht detektiert.

Die Präparationsmethode ist speziell für cytoplasmatische Proteine geeignet. Da aber auch den Zuckertransportern großes Interesse galt, wurde das Verfahren in der zweiten Präparation leicht verändert, um den Anteil an Membranproteinen zu erhöhen, ohne dabei die Ausbeute

an cytoplasmatischen Proteinen zu reduzieren. Bei dieser Präparationsweise wurden aber weitaus weniger Proteine detektiert. Nach Zucht mit Ribose wurden 130 identifiziert, nach Zucht mit Fructose 128 und mit Glucose nur 88 Proteine. Die Anzahl der detektierten Proteine war zwar niedriger, jedoch waren die relativen Gehalte der einzelnen Proteine nach Zucht auf Ribose, Glucose oder Fructose in beiden Präparationen ähnlich. Dies spricht für die Reproduzierbarkeit der Methode. Eine Doppelbestimmung der ersten Präparation soll dies in Zukunft noch unterstützen. Zudem wurden in der zweiten Präparation keine Proteine detektiert, die nicht in der ersten bereits bestimmt werden konnten. Es werden somit keine neuen Proteine gefunden, lediglich werden viele Zellproteine mit der zweiten Präparationsmethode nicht gefunden, was die niedrigere Anzahl der detektierten Proteine erklärt. Wichtig ist, dass der Gehalt der Proteine relativ zueinander für eine Präparation immer reproduzierbar ist. Das zweite Präparationsverfahren ist weniger gut geeignet. Um für zukünftige Versuche eine bessere Bestimmung der Membranproteine zu erzielen, sollten die Membranfraktionen konzentriert und getrennt betrachtet werden. Problematisch ist hierbei, dass die Membranproteine in geringeren Konzentrationen vorliegen und dies Schwierigkeiten bei der Detektion hervorrufen kann.

Die Methode ermöglicht einen detaillierten Einblick in die Bakterienzelle. Von besonderem Interesse waren hier die Unterschiede im Enzymgehalt nach Zucht der Zellen mit den drei C-Quellen Ribose, Glucose und Fructose. Schwerpunkt waren die relativen Gehalte der Enzyme des Phosphoketolasewegs und anderer Weges des Energiestoffwechsels. Die Ergebnisse werden in Zusammenhang mit weiteren Versuchen, die zur Untersuchung dieser Fragestellungen durchgeführt wurden, besprochen.

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt in tabellarischer Form. Die detektierten Proteine werden mit ihrer zugehörigen Gennummer angegeben. Wurde ein Protein unter einer bestimmten Zuchtbedingung gefunden, so ist der $\log(e)$ -Wert angegeben. Dieser ist ein Maß für die Häufigkeit des Proteins in der Zelle. Je negativer dieser Wert ist, desto häufiger kommt das Protein in der Zelle vor. Bei $\log(e)$ -Werten bis -7 kann von einem eindeutigen Nachweis des Proteins ausgegangen werden. Werte darüber (0 bis -7) sind in Klammern angegeben. Das Protein wurde in diesen Fällen nachgewiesen, aber die vorliegende Menge war nicht ausreichend, um eine definitive Zuordnung zu ermöglichen. Wurde ein Protein unter einer der Zuchtbedingungen nicht nachgewiesen, ist dieses mit n. n. gekennzeichnet. Die obere Reihe einer Zeile zeigt die $\log(e)$ -Werte des ersten Experiments, die zweite Zeile die der zweiten Präparation.

Komponenten von Phosphotransferasesystemen

Die Tabelle 10 zeigt die Bestandteile von Phosphotransferasesystemen, die durch Shotgun-Proteomanalyse nachgewiesen wurden. Neben den universellen Komponenten des Phosphotransferasesystems EI und HPr wurden neun weitere Komponenten aus fünf Systemen detektiert. EnzymI und das HPr-Protein liegen nach Zucht mit Ribose, Glucose oder Fructose etwa zu gleichen Anteilen in den Zellen vor. Ihr Gehalt wird somit nicht oder kaum reguliert (< Faktor 1,4). Die Gehalte der spezifischen Transportkomponenten unterscheiden sich jedoch. Bei den meisten der detektierten Proteine handelt es sich um die cytoplasmatischen Komponenten, die durch die Methode besser detektiert werden können als Membrankomponenten. Die Gene OEOE_0233 bis OEOE_0236 kodieren für ein Phosphotransferasesystem, welches aufgrund seiner Annotation für den Transport von Fructose oder Mannose verantwortlich sein könnte. Die Komponenten EIIA und EIIB dieses Systems wurden in beiden Experimenten nur nach Zucht mit Fructose detektiert. Auch die Produkte der Gene OEOE_0464 bis OEOE_0466 sind als Fructose-spezifisches Phosphotransferasesystem annotiert. Die Proteine EIIA und EIIB des Clusters wurden in hohen Gehalten nach Zucht mit Fructose gefunden. Die Komponente EIIB wurde im ersten Experiment auch in geringen Mengen nach Zucht mit Glucose und Ribose detektiert. Dieses Protein ist eines der wenigen Membranproteine, die in den Proteomexperimenten detektiert wurden. Die Daten sprechen für eine Induktion der beiden Phosphotransferasesysteme durch Fructose.

Die Proteine des vermutlich Cellubiose-spezifischen PTS-Systems der Gene OEOE_0338, OEOE_0339 und OEOE_0343 wurden ebenfalls detektiert. Die Komponente EIIB wurde nach Zucht mit Ribose, Glucose und Fructose in großer Menge gefunden, während die beiden anderen Komponenten nicht unter allen Bedingungen nachgewiesen wurden. Das Gen OEOE_0343 kodiert ebenfalls für ein membranständiges Protein. Dieses Phosphotransferasesystem wird vermutlich konstant in den Zellen exprimiert. Die Komponente EIIA liegt hierbei in Konzentrationen um den Schwellenwert vor und kann somit nicht immer identifiziert werden.

Tabelle 10: Nachweis von Proteinen aus Phosphotransferasesystemen durch Shotgun Proteomanalyse. Vollständige PTS sind grau unterlegt. Die log(e)-Werte der beiden Präparationen sind in den Spalten entsprechend der Zucht mit Ribose, Glucose oder Fructose angegeben. Der obere Wert stammt aus der ersten Präparation, der untere aus der zweiten. Die Abkürzung n. n. steht für nicht nachgewiesene Proteine.

Gen	Annotation	Ribose	Glucose	Fructose
		log (e)-Wert		
0643	Phosphotransferase system, HPr related enzyme	-40,6 -68,9	-45,4 -93,7	-50,3 -119,9
0647	Phosphoenolpyruvate kinase (PTS E1 component in bacteria)	-88,1 -4,4	-96,6 -8,2	-101,9 -26,2
0221	cellobiose-specific PTS system IIC component	n. n. n. n.	n. n. n. n.	n. n. n. n.
0222	cellobiose-specific PTS system IIA component	n. n. n. n.	n. n. n. n.	n. n. n. n.
0223	cellobiose-specific PTS system IIB component	n. n. n. n.	n. n. n. n.	-7,2 n. n.
0233	Phosphotransferase system mannitol/fructose-specific IIA domain (Ntr-type)	n. n. n. n.	n. n. n. n.	n. n. n. n.
0234	Phosphotransferase system galacitol-specific IIA domain (Ntr-type)	n. n. n. n.	n. n. n. n.	(-6,9) -7
0235	galacitol PTS, EIIC	n. n. n. n.	n. n. n. n.	n. n. n. n.
0236	Phosphotransferase system, galactitol-specific IIB component	n. d. n. d.	n. d. n. d.	-35,2 -11,2
0282	cellobiose-specific PTS system IIC component	n. n. n. n.	n. n. n. n.	n. n. n. n.
0296	Phosphotransferase system IIA component	n. n. n. n.	n. n. n. n.	n. n. n. n.
0297	Phosphotransferase system IIBC component	n. n. n. n.	n. n. n. n.	n. n. n. n.
0338	cellobiose-specific PTS system IIB component	-53,5 -12	-64,8 -9	-81,2 -47
0339	cellobiose-specific PTS system IIA component	n. n. n. n.	(-2,8) n. d.	-16,8 n. d.
0343	cellobiose-specific PTS system IIC component	n. d. -2,8	n. d. -4	-14,3 -9
0379	Phosphotransferase system, mannose/fructose/N-acetylgalactosamine-specific component IIB	n. n. n. n.	n. n. n. n.	n. n. n. n.
0380	Phosphotransferase system, mannose/fructose/N-acetylgalactosamine-specific component IIC	n. n. n. n.	n. n. n. n.	n. n. n. n.
0381	Phosphotransferase system, mannose/fructose/N-acetylgalactosamine-specific component IID	n. n. n. n.	n. n. n. n.	n. n. n. n.
0382	Phosphotransferase system, mannose/fructose-specific component IIA	n. n. n. n.	n. n. n. n.	n. n. n. n.
0464	Phosphotransferase system, mannose/fructose-specific component IIA	n. d. n. d.	n. d. n. d.	-102,9 -53,2
0465	mannose-specific PTS system component IIC	n. n. n. n.	n. n. n. n.	n. n. n. n.
0466	mannose-specific PTS system component IID	(-2,1) n. d.	-18,6 n. d.	-73,9 -36,3

Fortsetzung Tabelle 10: Nachweis von Proteinen aus Phosphotransferasesystemen durch Shotgun Proteomanalyse.

Gen	Annotation	log (e)-Wert		
		Ribose	Glucose	Fructose
1204	Phosphotransferase system, mannose/fructose-specific component IIA	n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. n.
1207	cellobiose-specific PTS system IIA component	n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. n.
1208	cellobiose-specific PTS system IIB component	n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. n.
1341	beta-glucoside-specific PTS system IIABC component	-11,2	n. d.	-27,7
		n. d.	n. d.	n. d.
1342	Phosphotransferase system IIA component(EC:2.7.1.69)	n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. n.
1482	Phosphotransferase system, galactitol-specific IIB component	n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. n.
1483	Phosphotransferase system mannitol/fructose-specific IIA domain (Ntr-type)	n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. n.

Komponenten von ABC-Transportern

Durch die MudPIT-Proteomanalysen wurden auch Bestandteile von ABC-Transport-Systemen detektiert. In der Tabelle 11 sind lediglich die ABC-Transportsysteme aufgeführt, die in der IMG-Datenbanksuche mit dem Transport von Hexosen assoziiert wurden. In den Proteomexperimenten wurden sechs Komponenten gefunden. Drei davon gehören vollständigen ABC-Transportsystemen an, diese sind in der Tabelle 11 grau unterlegt.

Das ABC-Transportsystem der Genprodukte OE0E_1456 bis OE0E_1459 scheint von Bedeutung zu sein. Es ist als Zucker-transportierendes ABC-Transport-System annotiert. Die lösliche ATPase Komponente und die extrazelluläre Komponente waren nach Zucht mit Glucose nachweisbar, nicht aber nach Zucht auf den anderen beiden C-Quellen. Dies spricht für eine Induktion durch Glucose. Die membranständigen Permease-Komponenten des Systems konnten nicht detektiert werden.

Von dem ABC-Carrier, der von den Genen OE0E_1606 bis 1609 kodiert wird, wurde nach Zucht mit Ribose, Glucose und Fructose das Bindeprotein detektiert. Alle anderen Bestandteile des Systems waren nicht nachweisbar. Das System weist Ähnlichkeit zu Zucker-transportierenden Systemen auf; eine genauere Zuordnung der Substratspezifität ist aber auch in diesem Fall nicht möglich.

Das Genprodukt von OE0E_1613 war nur nach Zucht mit Ribose detektierbar. Das Operon wird in Teil II des Ergebnisteils in Zusammenhang mit dem Ribosestoffwechsel besprochen. Neben diesen mit dem Zuckertransport assoziierten Systemen wurden auch einige andere Komponenten von ABC-Transportern detektiert. So lag z. B. im ersten Experiment das Protein 1188 („ABC type metal ion transport system, periplasmic component“) unter allen

drei Zuchtbedingungen vor. Nach Zucht mit Ribose waren auch mehrere Komponenten von Aminosäure- oder Peptidtransportern vorhanden (Protein 0845: „ABC type oligopeptide transport system ATPase component“, Protein 1634: „ABC type polar amino acid transport system ATPase component“).

Tabelle 11: Nachweis von Proteinen aus ABC-Transportsystemen durch Shotgun Proteomanalyse. Vollständige Systeme sind grau unterlegt. Die log(e)-Werte der beiden Präparationen sind in den Spalten entsprechend der Zucht mit Ribose, Glucose oder Fructose angegeben. Der obere Wert stammt aus der ersten Präparation, der untere aus der zweiten. Die Abkürzung n. n. steht für nicht nachgewiesene Proteine.

Gen	Annotation	Ribose	Glucose	Fructose
		log(e)-Wert		
0020	ABC-type sugar transport system, ATPase component	n. n.	n. n.	n. n.
0021	ABC-type sugar transport system, periplasmic component	n. n.	n. n.	n. n.
0022	ABC-type sugar transport system, permease component	n. n.	n. n.	n. n.
0023	ABC-type maltose transport system, permease component	n. n.	n. n.	n. n.
0253	ABC-type sugar transport system, periplasmic component	n. n.	n. n.	n. n.
0254	ABC-type sugar transport system, permease component	n. n.	n. n.	-3,8
0255	ABC-type maltose transport system, permease component	n. n.	n. n.	n. n.
0267	ABC-type uncharacterized transport system, periplasmic component	n. n.	n. n.	n. n.
0268	Ribose/xylose/arabinose/galactoside ABC-type transport system, permease component	n. n.	n. n.	n. n.
0269	ABC-type uncharacterized transport system, ATPase component	n. n.	n. n.	n. n.
0517	ATPase component of ABC transporter	n. n.	n. n.	n. n.
0810	ABC-type sugar transport system, permease component	n. n.	n. n.	n. n.
0812	ABC-type maltose transport system, permease component	n. n.	n. n.	n. n.
1433	ATPase component of ABC transporter with duplicated ATPase domains	n. n.	n. n.	n. n.
1456	ABC-type sugar transport system, ATPase component	n. n.	-53,7	n. n.
1457	ABC-type sugar transport system, permease component	n. n.	-16,4	n. n.
1458	ABC-type sugar transport system, permease component	n. n.	n. n.	n. n.
1459	ABC-type sugar transport system, periplasmic component	n. n.	-38,3	n. n.
1534	ABC-type uncharacterized transport system, ATPase component	n. n.	n. n.	n. n.
1540	ABC-type cobalt transport system, ATPase component	n. n.	n. n.	n. n.

Fortsetzung Tabelle 11: Nachweis von Proteinen aus ABC-Transportsystemen durch Shotgun Proteomanalyse.

Gen	Annotation	Ribose	Glucose	Fructose
		log(e)-Wert		
1606	Uncharacterized ABC-type transport system, periplasmic component/surface lipoprotein	-54,9	-29,5	-34,1
		-38,9	-33,1	-6,4
1607	ABC-type uncharacterized transport system, ATPase component	n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. n.
1608	ABC-type uncharacterized transport system, permease component	n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. n.
1609	Uncharacterized ABC-type transport system, permease component	n. n.	n. n.	n. n.
		n. n.	n. n.	n. n.
1613	ABC-type ribose transport system, auxiliary component	-54,4	n. n.	n. n.
		-22,3	n. n.	n. n.
1651	ABC-type sugar transport system, ATPase component	n. n.	n. n.	-8,3
		n. n.	n. n.	n. n.

Teil II Regulation des Zentralstoffwechsels

Energiesubstrate werden in *O. oeni* über den Phosphoketolaseweg umgesetzt. In der heterofermentativen Milchsäuregärung entstehen neben Lactat und CO₂ je nach zur Verfügung stehender Kohlenstoffquelle Acetat, Ethanol, Mannit oder geringe Mengen an Erythrit. Eine bedeutende Rolle bei der Entstehung der Endprodukte spielt die Regeneration der Redoxäquivalente, ohne die der Stoffwechsel schnell zum Erliegen kommt. Anfallendes NAD(P)H kann über verschiedene Wege reoxidiert werden. Standardmäßig wird die Reduktion von Acetyl-P zu Ethanol zur Regeneration des NAD(P)H verwendet. Die Aktivität des Ethanolwegs ist jedoch wesentlich niedriger als die des Phosphoketolasewegs. Dadurch kommt es zu einer Limitierung des Wachstums auf Glucose (Richter, 2001). Kann die Zelle andere Wege zur Regeneration des NAD(P)H benutzen, wirkt sich dies in einer höheren Wachstumsrate aus (Zaunmüller *et al.*, 2006). Bei Wachstum auf Fructose wird diese zu Mannit reduziert und auf diese Weise NAD(P)H oxidiert. Auch die Anwesenheit zusätzlicher Elektronenakzeptoren wie z. B. Pyruvat oder Citrat kann zur Entlastung des Ethanolwegs beitragen und das Wachstum beschleunigen.

In diesem Teil soll die Regulation des Zentralstoffwechsels, der zur Bildung dieser Produkte führt, untersucht werden. Es wird getestet, welche Enzyme in der Zelle vorliegen und wie ihre Aktivität und Expression reguliert werden. Die Untersuchung erfolgte durch die Proteomanalysen, welche mit Stamm *O. oeni* PSU-1 durchgeführt wurden. Hier wurden die in der Zelle vorliegenden Proteine nach Zucht auf Ribose, Glucose und Fructose und die Änderung ihrer Gehalte bestimmt. Zusätzlich wurde die Expression wichtiger Gene aus *O. oeni* B1 untersucht. Dazu wurde der mRNA-Gehalt ausgewählter Gene des Phosphoketolasewegs nach Zucht auf verschiedenen von C-Quellen und Elektronenakzeptoren bestimmt.

4.2.1 Analyse der Proteine des Zentralstoffwechsels durch Proteomanalyse

Für alle Enzyme des Phosphoketolasewegs wurden im Genom von *O. oeni* PSU-1 die zugehörigen Strukturgene identifiziert (Abb. 13; Mills *et al.*, 2005; www.doe.jgi.gov). Für manche Enzyme gibt es sogar mehrere Kandidaten oder Isoformen. Die Gene des Phosphoketolasewegs sind nicht in Operons organisiert, sondern über das ganze Genom verteilt (www.doe.jgi.gov). Eine Vorhersage, welcher Kandidat eine Funktion im Stoffwechsel übernimmt, ist somit aus der Lage oder der Nachbarschaft des Gens nicht abzuleiten. Sind mehrere Gene vorhanden, die für ein bestimmtes Enzym kodieren könnten,

so kann man davon ausgehen, dass Gene, deren Produkte in den Zellen durch Proteomanalysen gefunden werden, eine Rolle für den Stoffwechsel spielen. Liegt ein Protein entweder gar nicht oder nur in geringen Mengen vor, spielt dieses Enzym keine oder nur eine geringe Rolle für den Zentralstoffwechsel. Für alle Reaktionen des Phosphoketolasewegs sind ein oder mehrere Gene angegeben, die für die jeweiligen Enzyme kodieren können. In den Proteomanalysen wurde für alle Enzyme mindestens ein Protein gefunden, welches die entsprechende Reaktion katalysiert (Tabellen 12 und 18).

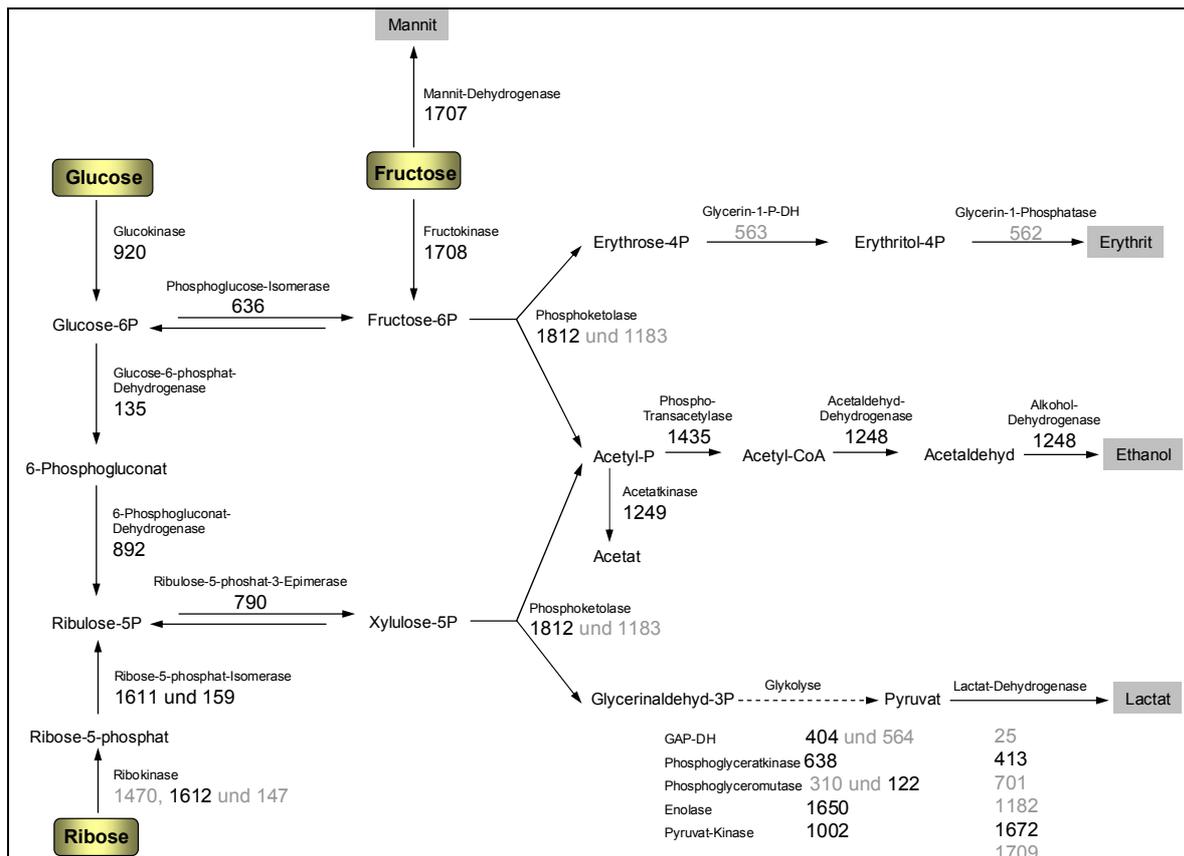


Abb. 13: Der Phosphoketolaseweg und assoziierte Wege zur Regeneration des NAD(P)H. Für die beteiligten Enzyme sind die im Genom von *O. oeni* PSU-1 zugehörigen Gene angegeben. Genprodukte, die in den Proteomexperimenten detektiert wurden, sind schwarz geschrieben, nicht nachgewiesene grau.

In den Proteomanalysen wurden keine für die Entstehung von Erythrit verantwortlichen Proteine detektiert. Die hier beteiligten Gene sind in *O. oeni* nicht bekannt, und es wurden im Genom keine spezifischen Gene für eine Erythrose-4-phosphat-Dehydrogenase und Erythrit-Kinase gefunden. Deshalb wurden die Gene OEOE_0562 und OEOE_0563, welche für eine Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase und eine Phosphatase kodieren, als mögliche Kandidaten für diesen Weg in Betracht gezogen (Zaunmüller *et al.*, 2006). Die Bildung von Glycerin, welches auch als Endprodukt entstehen kann, ähnelt in den Zwischenprodukten und Reaktionen der von Erythrit. Da Erythrit bei Wachstum mit Glucose nur in geringem Mengen gebildet wird, ist es möglich, dass die hierzu benötigten Enzyme in geringem Gehalt in der Zelle vorliegen und deshalb mit dieser Methode nicht nachzuweisen sind.

Phosphoketolase- und Lactatweg

Der Phosphoketolase- und der Lactatweg werden in der Zelle unabhängig von der zur Verfügung stehenden Kohlenstoffquelle oder Redoxsituation genutzt. So wird Lactat unter allen Bedingungen als Endprodukt gebildet.

Für die Lactat-Dehydrogenase gibt es im Genom sechs Annotationen. Im Proteom wurden nur die Produkte der Gene OEEOE_0413 und OEEOE_1672 gefunden (Tabelle 12), nicht aber die Produkte von OEEOE_0025, OEEOE_0701, OEEOE_1182 und OEEOE_1709. Das Lactat-Dehydrogenase-Gen OEEOE_0413 wird für die Expressionsmessungen als Haushaltsgen verwendet. Es ist als „Phosphoglycerat- oder verwandte Dehydrogenase“ annotiert. Im ersten Experiment wurde dieses Protein unter allen drei Bedingungen in hohem Maße gefunden. Im zweiten Experiment fand man das Protein jedoch nur nach Zucht mit Ribose und Fructose, nicht aber mit Glucose (Tabelle 12). Hier ist davon auszugehen, dass dies an der schlechteren zweiten Präparation lag. Das Genprodukt von OEEOE_1672 wurde nur im ersten Experiment nach Zucht mit Ribose detektiert. Der Wert -10,5 liegt nur knapp über dem Schwellenwert (Tabelle 12). Somit kann man davon ausgehen, dass das Protein möglicherweise unter allen Bedingungen vorliegt, aber nur sehr schwach exprimiert wird. Welche Rolle diese Dehydrogenase somit für die Zelle spielt, ist nicht klar. Für den Energiestoffwechsel sollte somit die Lactat-Dehydrogenase OEEOE_0413 verantwortlich sein.

Einige Gene des Phosphoketolaseswegs, für die es keine Alternativen im Genom von *O. oeni* gibt, kommen nur in sehr geringem Maße und nicht unter allen Bedingungen vor. So liegt das Genprodukt von OEEOE_0790 der Pentose-5-phosphat-3-Epimerase im ersten Experiment nur nach Zucht mit Ribose vor (Tabelle 12). Nach Zucht mit Glucose ist es nur unter dem Schwellenwert zu sehen. Im zweiten Experiment kommt das Protein nach Zucht mit Glucose ebenfalls unter dem Schwellenwert vor. Dieses Spektrum wurde getrennt überprüft und bestätigt, dass es sich um das Protein handelt. Da es für dieses Protein keine Alternative gibt, es aber für den Stoffwechsel benötigt wird, ist davon auszugehen, dass dieses Protein unter allen Bedingungen vorliegt, aber der Gehalt so gering ist, dass er im Bereich des Schwellenwertes liegt. Die spezifische Aktivität des Proteins scheint aber für den Stoffwechsel ausreichend zu sein. Ähnlich verhält es sich für die Phosphotransacetylase. Auch dieses Protein ist nicht unter allen Bedingungen zu finden, wird aber für den Stoffwechsel benötigt. Lediglich bei Zucht mit Fructose wurde das Enzym im ersten Experiment in höheren Mengen gefunden.

Tabelle 12: Nachweis von Enzymen des Phosphoketolase- und assoziierter Wege des Zuckerabbaus durch Proteomanalyse. Für die Enzyme sind die log(e)-Werte der beiden Experimente angegeben. Der Wert der ersten Präparation ist in der oberen Zeile, der der zweiten in der unteren Zeile angegeben. Je negativer der log(e)-Wert ist, desto häufiger kommt das Protein in der Zelle vor. Die Enzyme sind entsprechend ihrer Rolle im Stoffwechsel angeordnet. Die Abkürzung n. n. steht für nicht nachgewiesene Proteine.

Gen	Annotation	log(e)-Werte		
		Ribose	Glucose	Fructose
<u>Phosphoketolaseweg</u>				
135	Glucose-6-phosphat-1-Dehydrogenase	n. n. -55,7	-96,8 -33,3	-109,0 -87,3
892	6-Phosphogluconat-Dehydrogenase	-260,9 -96	-369,6 -151,2	-363,2 -173,2
790	Pentose-5-phosphat-3-Epimerase	-9,2 n. n.	(-2,5) -2,7	n. n. n. n.
636	Glucose-6-phosphat-Isomerase	-139,9 -45,8	-144,6 -55,9	-136,8 -61
1812	Phosphoketolase	-414,7 -152,5	-379,4 -137,4	-420,1 -196,8
<u>Lactatweg</u>				
404	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	-254,7 -131,4	-262,4 -105,5	-264,8 -164,6
638	3-Phosphoglycerat-Kinase	-231,3 -74	-278,8 -79,4	-223,5 -80,7
122	Phosphoglyceratmutase 1	-102,3 -51,3	-89,0 -40	-93,6 -54,4
1650	Enolase	-314,2 -307,2	-384,4 -233,5	-335,7 -255,2
1002	Pyruvatkinase	-338,3 -225,9	-328,9 -229,1	-322,3 -307
413	Phosphoglycerat Dehydrogenase oder verwandte Dehydrogenase (Lactat-Dehydrogenase)	-175,0 -104,3	-128,1 n. n.	-145,8 -76,9
1672	Lactat-Dehydrogenase oder verwandtes Enzym	-10,5 n. n.	n. n. n. n.	n. n. n. n.
<u>Ethanolweg</u>				
1435	Phosphotransacetylase	-3,4 n. n.	n. n. -3,6	-41,3 -5,6
1248	Eisen-bindende Alkohol-Dehydrogenase und Domäne der Aldehyd-Dehydrogenase-Familie	-20,7 -4,5	-526,3 -317,5	-152,4 -85,3
<u>Acetatweg</u>				
1249	Acetatkinase	-173,8 -104	-138,3 -80,3	-112,8 -52,7
<u>Mannitweg</u>				
1707	Threonin-Dehydrogenase oder verwandte Zn-abhängige Dehydrogenase (vermutliche Mannit-Dehydrogenase)	-79,2 -12,5	-207,4 -91,3	-132,1 -63,2

Der Gehalt der Proteine des Phosphoketolasewegs ist unter den drei Zuchtbedingungen ähnlich. Entsprechend sind die Quotienten der $\log(e)$ -Werte nach Zucht auf den verschiedenen Substraten nahe 1 (Tabelle 13). Die einzige Ausnahme stellt möglicherweise die Glucose-6-phosphat-1-Dehydrogenase dar. Der Gehalt nach Zucht auf Fructose nimmt im zweiten Experiment auf 38 % des Wertes nach Zucht auf Glucose ab. Für die Pentose-5-phosphat-3-Epimerase kann der Quotient nicht berechnet werden.

Tabelle 13: Quotienten der $\log(e)$ -Werte der Enzyme des Phosphoketolasewegs aus Tabelle 12. Einige Quotienten konnten nicht berechnet werden, da kein $\log(e)$ -Wert vorhanden ist; dies ist durch n. b. gekennzeichnet.

Enzyme des Phosphoketolasewegs		Quotienten $\log(e)$ Werte	
		Glc/Rib	Glc/Frc
135	Glucose-6-phosphat-1-Dehydrogenase	n. b.	0,88
		0,6	0,38
892	6-Phosphogluconat-Dehydrogenase	1,4	1,01
		1,6	0,87
790	Pentose-5-phosphat-3-Epimerase	n. b.	n. b.
		n. b.	n. b.
636	Glucose-6-phosphat-Isomerase	1,03	1,05
		1,22	0,91
1812	Phosphoketolase	0,91	0,9
		0,9	0,96

Auch die Enzyme des Lactatwegs kommen in der Zelle unter den getesteten Bedingungen konstant vor (Tabelle 14). So liegen die Quotienten in einem Bereich von 0,64 bis 1,24, wobei in vielen Fällen die Werte des zweiten Experiments weiter von dem Wert 1 entfernt sind als die des ersten.

Tabelle 14: Quotienten der $\log(e)$ -Werte der Enzyme des Lactatwegs aus Tabelle 12. Einige Quotienten konnten nicht berechnet werden, da kein $\log(e)$ -Wert vorhanden ist; dies ist durch n. b. gekennzeichnet.

Enzyme des Lactatwegs		Quotienten $\log(e)$ Werte	
		Glc/Rib	Glc/Frc
404	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	1,03	0,99
		0,78	0,64
638	3-Phosphoglycerat-Kinase	1,2	1,24
		1,07	1,02
122	Phosphoglyceratmutase 1	0,86	0,95
		0,77	0,73
1650	Enolase	1,22	1,14
		0,76	0,91
1002	Pyruvatkinase	0,97	1,02
		1,01	0,74
413	Phosphoglycerat-Dehydrogenase oder verwandte Dehydrogenase (Lactat-Dehydrogenase)	0,73	0,87
		n. b.	n. b.

Diese nicht regulierten Bereiche des Energiestoffwechsels sind in Abbildung 14 dargestellt. Proteine aus diesem Bereich werden von der Zelle in allen drei Stoffwechselsituationen benötigt und werden deshalb unabhängig von dem Weg der Regeneration der Redoxäquivalente gebraucht. Auch der Gehalt weiterer Enzyme wie der der Acetat-Kinase (Tabelle 12) und der Ribose-5-phosphat-Isomerase (Tabelle 12) ändern sich kaum.

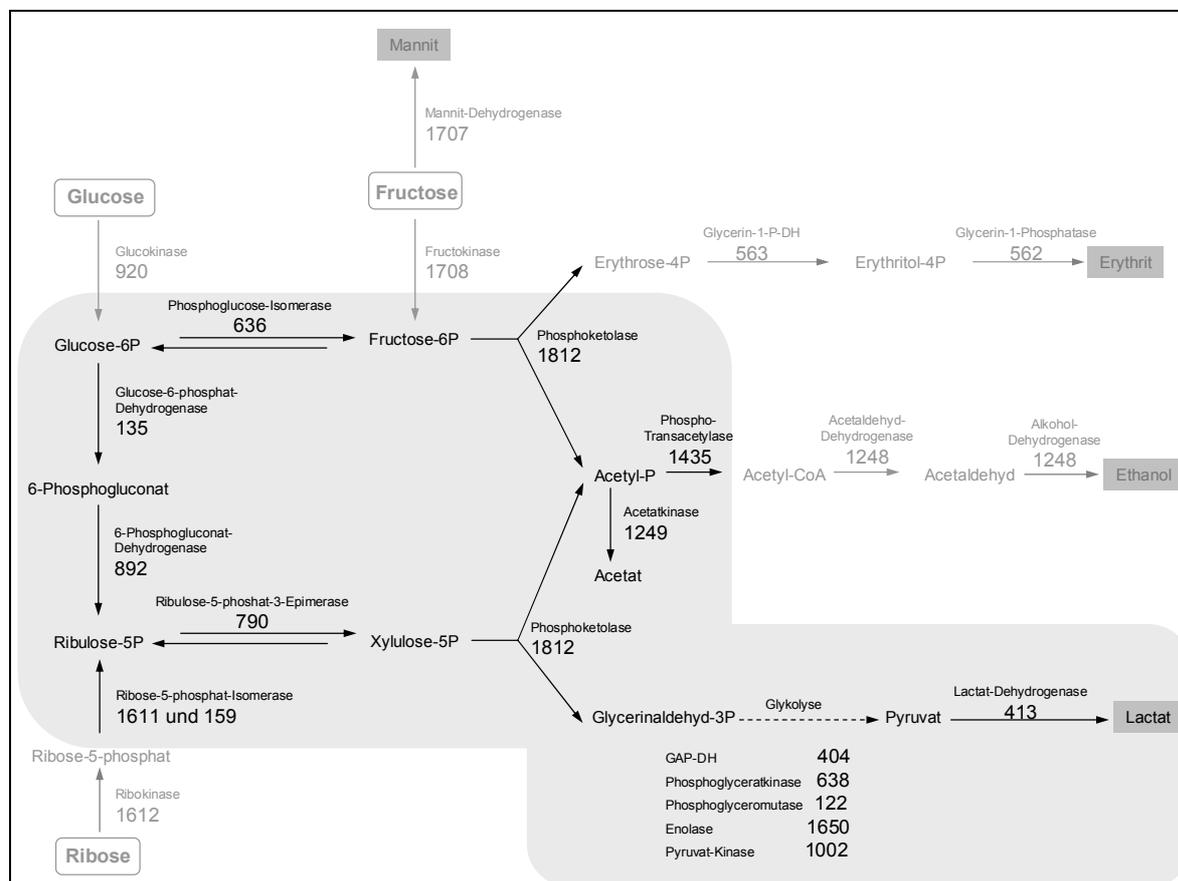


Abb. 14: Konstante Bereiche des Phosphoketolasewegs und assoziierter Zuckerabbauwege (Proteingehalte nach Shotgun Proteomanalyse): Die grau unterlegten Enzyme liegen unter den drei untersuchten Bedingungen konstant in der Zelle vor.

Ethanolweg

Neben den beschriebenen zentralen Teilen des Phosphoketolasewegs, die unabhängig von der vorhandenen C-Quelle in den Zellen gefunden wurden, gibt es auch Wege, deren Proteingehalt sich in Abhängigkeit von der C-Quelle stark ändert. Das Hauptaugenmerk soll hierbei auf den Ethanolweg gelegt werden. Der Ethanolweg nimmt durch seine Limitierung des Stoffwechsels eine interessante Rolle für die Regulation ein. Der Gehalt des bifunktionellen Enzyms AdhE (Genprodukt von OEOE_1248), welches sowohl die Reaktion der Acetaldehyd-Dehydrogenase als auch der Alkohol-Dehydrogenase katalysiert, ändert sich sehr stark in Abhängigkeit von der C-Quelle (Tabelle 12). Das Enzym liegt unter allen drei Zuchtbedingungen vor. Den weitaus höchsten Gehalt findet man jedoch nach Zucht mit

Glucose. Im ersten Experiment ergibt sich für die Zuchten Glucose und Ribose ein Quotient der $\log(e)$ -Werte von 25,4 und für die Zuchten Glucose und Fructose ein Quotient von 3,45 (Tabelle 12). In beiden Experimenten war das Enzym AdhE nach Zucht mit Glucose das häufigste Protein mit dem negativsten $\log(e)$ -Wert.

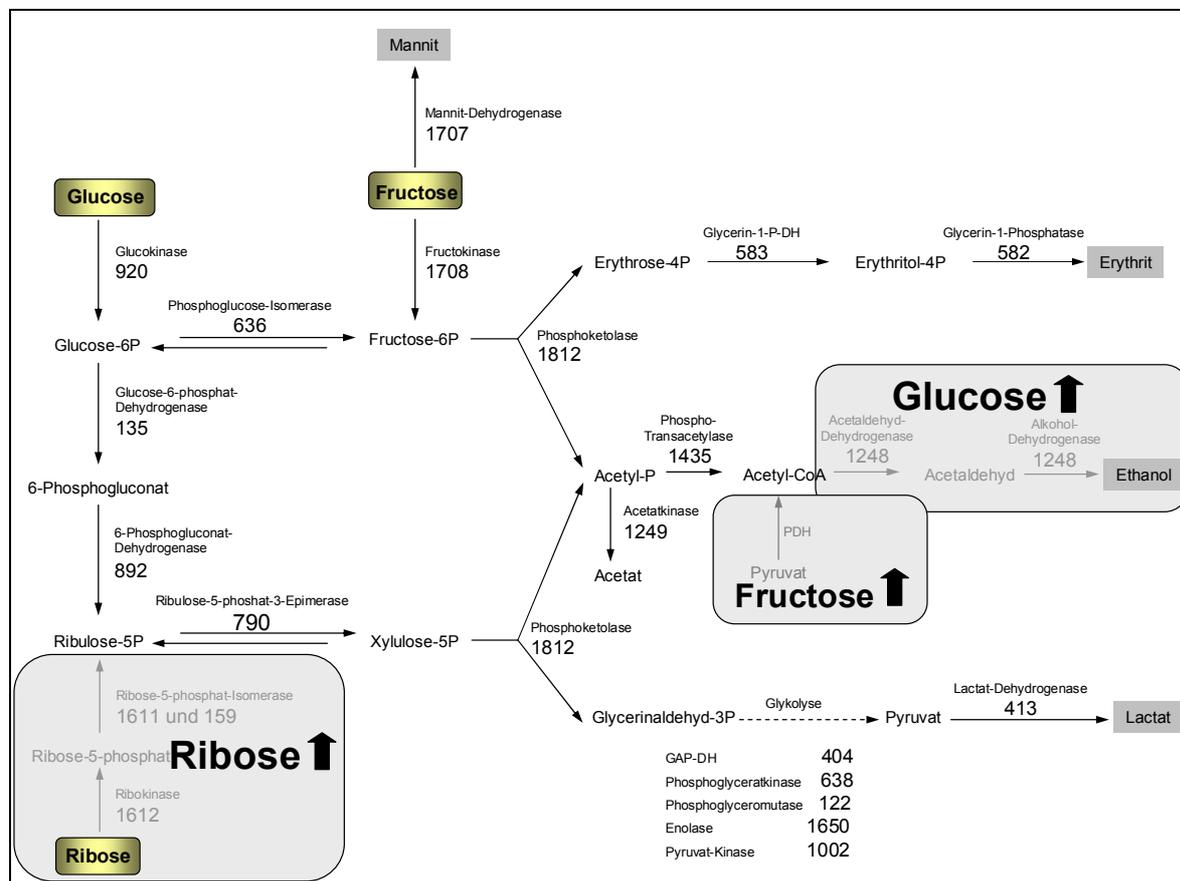


Abb. 15: Variable Bereiche des Phosphoketolasewegs und assoziierter Zuckerabbauwege (Proteingehalte nach Shotgun Proteomanalyse): Die hier grau unterlegten Reaktionen werden von Enzymen katalysiert, die nur in bestimmten Stoffwechselsituationen eine Rolle spielen oder besonders stark reguliert werden.

Neben dem *adhE*-Gen findet man im Genom von *O. oeni* eine Reihe weiterer Gene, deren Produkte als Acetaldehyd-Dehydrogenase oder Alkohol-Dehydrogenase in Frage kommen (Tabelle 15). Die geringere Aktivität der AdhE nach Zucht auf Ribose und Fructose im Vergleich zu Glucose, könnte durch andere Proteine kompensiert werden. So gibt es zwei Gene (OEOE_0324 und OEOE_1299), die als NAD-abhängige Aldehyd-Dehydrogenase annotiert sind. Das Genprodukt von OEOE_0324 ist nur im ersten Experiment schwach über dem Schwellenwert nach Zucht mit Glucose zu finden. OEOE_1299 ist hingegen im ersten Experiment deutlich nach allen drei Zuchten detektiert worden. Der höchste Gehalt wurde nach Zucht mit Fructose bestimmt. Für die Alkohol-Dehydrogenase könnten fünf weitere Gene eine Rolle spielen. Die Produkte der Gene OEOE_0394, OEOE_0745, und OEOE_1330 wurden nicht unter allen Bedingungen gefunden. Vor allem das Protein 1330 kommt in den

Zellen nur in geringer Konzentration vor. Eine wichtige Rolle dieser Proteine im Phosphoketolaseweg ist deshalb unwahrscheinlich. Die Proteine 0527 und 1780 kommen jedoch nach Zucht auf allen C-Quellen in größerer Menge in der Zelle vor. Auch bei diesen beiden Proteinen ist nach Zucht mit Glucose der größte Gehalt festzustellen. Somit ist es möglich, dass auch andere Proteine in der Zelle an der Umsetzung des Acetyl-P zu Ethanol beteiligt sind und die Regulation auf diese Weise kompensiert oder auch verstärkt wird.

Tabelle 15: Nachweis von alternativen Proteinen der Acetaldehyd- und Alkohol-Dehydrogenase durch Proteomanalyse. Für die Enzyme sind die log(e)-Werte der beiden Experimente angegeben. Der Wert der ersten Präparation ist in der oberen Zeile, der der zweiten in der unteren Zeile angegeben. Die Abkürzung n. n. steht für nicht nachgewiesene Proteine.

Gen	Annotation	Ribose	Glucose	Fructose
		log(e)-Wert		
324	NAD-abhängige Aldehyd-Dehydrogenase	n. n.	-11,9	n. n.
		n. n.	n. n.	n. n.
1299	NAD-abhängige Aldehyd-Dehydrogenase	-78,1	-120,7	-363,4
		n. n.	(-5,7)	n. n.
394	Threonin-Dehydrogenase oder verwandte Zn-abhängige Dehydrogenase	n. n.	-29,8	(-2,9)
		n. n.	n. n.	n. n.
527	Zn-abhängige Alkohol-Dehydrogenase	-114,9	-225,0	-181,9
		-19	-89,3	-121,2
745	Threonin-Dehydrogenase oder verwandte Zn-abhängige Dehydrogenase	n. n.	-9,9	-26,0
		n. n.	-7,2	-5
1330	Zn-abhängige Alkohol-Dehydrogenase	n. n.	(-2,2)	-13,4
		n. n.	n. n.	n. n.
1780	Threonin-Dehydrogenase oder verwandte Zn-abhängige Dehydrogenase	-82,9	-144,2	-77,3
		-32,4	-83,4	-44

Die Enzymaktivitäten der Alkohol-Dehydrogenase und der Acetat-Kinase wurden im Stamm *O. oeni* PSU-1 bestimmt. Diese Aktivitäten geben die gesamte Kapazität der Zelle für eine bestimmte Reaktion wieder. Sollte die AdhE das alleinige oder das Hauptenzym darstellen, so sollten sich die unterschiedlichen Enzymgehalte in den Enzymaktivitäten widerspiegeln. Enzymaktivitäten waren bisher nur vom Stamm B1 bekannt. Sie wurden nun in Stamm PSU-1 nach Zucht mit Ribose, Glucose oder Fructose als C-Quelle bestimmt (Tabelle 16).

Tabelle 16: Enzymaktivitäten der Alkohol-Dehydrogenase und Acetat-Kinase in *O. oeni* PSU-1. Die Aktivitäten wurden in zellfreien Extrakten nach Zucht mit Ribose, Glucose oder Fructose bestimmt. Die Enzymaktivitäten sind als spezifische Aktivität in U/g Protein angegeben. 1 U entspricht 1 μmol Substratumsatz pro Minute. Die Aktivitäten geben den Mittelwert mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Zuchten an.

Enzymaktivität U/g	Glucose	Ribose	Fructose
Alkohol-DH	1866 \pm 139	647 \pm 103	1285 \pm 232
Acetat-Kinase	152 \pm 50	245 \pm 56	364 \pm 93

Auch im Falle der Enzymaktivitäten ist eine Änderung abhängig von der angebotenen C-Quelle zu sehen. Tabelle 17 zeigt die Quotienten der Aktivitäten nach Zucht auf Glucose/Ribose und Glucose/Fructose und der entsprechenden Proteingehalte aus den Proteomexperimenten. So ändert sich die Enzymaktivität der Alkohol-Dehydrogenase nach Zucht mit Glucose im Vergleich zu Ribose fast um den Faktor drei. In den Proteingehalten der AdhE ist jedoch eine Änderung um den Faktor 25 (1. Experiment) oder sogar 70 (2. Experiment) zu beobachten. Auch die Änderung der Enzymaktivitäten der Acetat-Kinase gibt die der Proteingehalte nur teilweise wieder. Die Änderung der Aktivität ist hier stärker als nach den Proteomexperimenten zu erwarten. Die Änderungen der Enzymaktivitäten der Alkohol-Dehydrogenase zeigten zwar eine ähnliche Tendenz wie die der Gehalte der AdhE in den Proteomanalysen, jedoch gab es deutliche quantitative Abweichungen. Mögliche Ursachen hierfür sind entweder, dass das Genprodukt von OEOE_1248 nicht als einziges Protein für diese Reaktion verantwortlich ist, dass die Daten der Proteomanalyse nicht für eine solche quantitative Auswertung geeignet sind und somit die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung nicht mit den Proteingehalten vergleichbar sind oder dass die Enzymaktivitäten posttranslational verändert oder reguliert werden.

Tabelle 17: Regulation der Alkohol-Dehydrogenase und Acetat-Kinase in *O. oeni* PSU-1: Vergleich der Quotienten der Enzymaktivitäten und der Ergebnis der Proteomanalyse.

		Alkohol-Dehydrogenase		Acetat-Kinase	
		Glc/Rib	Glc/Frc	Glc/Rib	Glc/Frc
Enzymaktivität		2,88	1,45	0,62	0,41
Proteomanalyse	1. Exp.	25,4	3,5	0,79	1,23
	2. Exp.	70,5	3,7	0,76	1,5

Ribose, Glucose oder Fructose als Substrate für den Zentralstoffwechsel

Zur Einschleusung von Zuckersubstraten in den zentralen Phosphoketolaseweg sind Kinasen, Isomerasen und Transporter nötig (Tabelle 18). Die Phosphorylierung von Glucose übernimmt wahrscheinlich das Genprodukt OEOE_0920. Dieses ist als Zuckerkinase annotiert und zeigt in BLAST-Analysen Ähnlichkeiten zu Glucokinasen. Das Protein ist nach Zucht mit Glucose aber auch Ribose zu finden, besonders aber nach Zucht auf Fructose. Eine potentielle Fructokinase (OEOE_1708) wurde nur nach Zucht auf Fructose nachgewiesen.

In Anwesenheit von Ribose fiel die Induktion von Genen auf, die mit dem Ribosestoffwechsel assoziiert sind. So ist die Expression der beiden Kandidaten für eine Ribose-5-phosphat-Isomerase unter allen Bedingungen nachweisbar. Die Genprodukte OEOE_0159 und

OEOE_1611 liegen beide in niedrigen Konzentrationen in der Zelle vor, so dass beide für die Umsetzung von Ribose-5-phosphat zu Ribulose-5-phosphat verantwortlich sein könnten. Im Genom stromabwärts von OEOE_1611 folgt ein Operon aus drei Genen, welches beim Stoffwechsel und der Aufnahme von Ribose eine Rolle spielt. Das Gen OEOE_1612 kodiert für eine Ribokinase, das Gen OEOE_1613 für eine Ribose-spezifische Komponente eines ABC-Transporters und das Gen OEOE_1614 für einen sekundären Carrier. Das Gen OEOE_1613 gehört der Proteinfamilie der „RbsD_FucU Transportprotein Familie“ an. Zu dieser Familie gehören der hochaffine Ribosetransporter von *E. coli* und FucU, ein Protein, das an der Aufnahme von Fucose beteiligt ist. In *E. coli* wird dieser Transporter durch das *rbsDACBKA* Operon kodiert. RbsA ist dabei die ATPase-Komponente des Systems, RbsC die membranständige Permease, RbsB das periplasmatische Bindepotein, RbsK die Ribokinase und RbsR ein Regulator. Die Funktion von RbsD war lange unbekannt. Nach Kristallisation des Proteins aus *B. subtilis* wird eine mögliche Funktion als cytoplasmatisches Bindepotein vorgeschlagen, welches beim Transport von Ribose in die Zellen hilft (Kim *et al.*, 2003).

Tabelle 18: Nachweis von Enzymen, die Zucker in den Phosphoketolaseweg einschleusen, durch Proteomanalyse. Für die Enzyme sind die log(e)-Werte der beiden Experimente angegeben. Der Wert der ersten Präparation ist in der oberen Zeile, der der zweiten in der unteren Zeile angegeben. Die Abkürzung n. n. steht für nicht nachgewiesene Proteine.

Gen	Annotation	Ribose	Glucose	Fructose
		log(e)-Wert		
<u>Glucose als Substrat</u>				
920	Transkriptionsregulator/ Zuckerkinase	(-6,4) n. n.	-11,1 n. n.	-33,5 -40,5
<u>Fructose als Substrat</u>				
1708	Transkriptionsregulator und Fructokinase	n. n. n. n.	n. n. n. n.	-7,6 n. n.
<u>Ribose als Substrat</u>				
1611	Ribose-5-phosphat-Isomerase	-15,4 -7,2	-9,2 n. n.	(-2,7) n. n.
159	Ribose-5-phosphat-Isomerase	-18,6 n. n.	-17,2 n. n.	-28,9 n. n.
1612	Zuckerkinase, Ribokinase Familie	-101,2 -4,4	n. n. n. n.	n. n. n. n.
1613	ABC-Typ Ribose-Transport-System, zusätzliche Komponente	-45,4 -22,3	n. n. n. n.	n. n. n. n.
1614	Fucose-Permease	-14,1 -5,3	n. n. n. n.	n. n. n. n.
1615	ABC-Typ Dipeptid/Oligopeptid/Nickel Transport-system, periplasmatische Komponente	-55,9 n. n.	n. n. n. n.	n. n. n. n.

OEOE_1614 ist als Fucose-Permease annotiert, jedoch aufgrund der Lage des Gens und der Induktion durch Ribose ist dieser Carrier möglicherweise für die Aufnahme von Ribose zuständig. Dies ist der einzige sekundäre Carrier, der im gesamten Proteomexperiment detektiert werden konnte. Das Gen OEOE_1615 ist als extrazelluläre Komponente eines ABC-Transporter-Systems annotiert. Die Induktion nach Zucht auf Ribose deutet ebenfalls auf eine Rolle bei der Aufnahme dieses Substrats hin.

Pyruvat-Stoffwechsel

Pyruvat entsteht im Lactatweg durch die Pyruvat-Kinase (OEOE_1002) und wird durch die Lactat-Dehydrogenase (OEOE_0413) reduziert. Steht Pyruvat alleine als C-Quelle zur Verfügung erfolgt die Umsetzung über die Pyruvat-Dehydrogenase (Wagner *et al.*, 2005). Im Genom von *O. oeni* PSU-1 befindet sich lediglich ein Operon, welches Ähnlichkeit zu einer Pyruvat-Dehydrogenase besitzt. Dieses ist aber als Acetoin-Dehydrogenase annotiert. Acetoin-Dehydrogenasen katalysieren die oxidative Spaltung von Acetoin zu Acetaldehyd und Acetyl-CoA analog zur oxidativen Decarboxylierung von Pyruvat. Das Enzym besteht aus vier Untereinheiten, welche durch die Gene OEOE_0328, OEOE_0329, OEOE_0330 und OEOE_0331 kodiert werden. Diese zeigen ein interessantes Expressionsmuster, sie wurden lediglich nach Zucht mit Fructose detektiert (Tabelle 19). Andere zur Pyruvat-Dehydrogenase analoge Gene sind im Genom nicht erkennbar. Das Genprodukt OEOE_1818 besitzt Ähnlichkeiten zu einer Pyruvatoxidase. Pyruvatoxidasen setzen Pyruvat mit Sauerstoff zu Acetyl-P um. Das Protein wurde nur nach Zucht auf Ribose detektiert (Tabelle 19).

Tabelle 19: Nachweis von Proteinen, die mit der Umsetzung von Pyruvat assoziiert sind. Für die Enzyme sind die log(e)-Werte der beiden Experimente angegeben. Der Wert der ersten Präparation ist in der oberen Zeile, der der zweiten in der unteren Zeile angegeben. Die Abkürzung n. n. steht für nicht nachgewiesene Proteine.

Gen	Annotation	Ribose	Glucose	Fructose
		log(e)-Wert		
328	Acetoin-Dehydrogenase-Komplex, E1 Komponente, alpha-Untereinheit	n. n.	n. n.	-107,0
		n. n.	n. n.	n. n.
329	Acetoin-Dehydrogenase-Komplex, E1 Komponente, beta-Untereinheit	n. n.	n. n.	-88,4
		n. n.	n. n.	-22,9
330	Acetoin/Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex, E2	n. n.	n. n.	-84,5
		n. n.	n. n.	-49,7
331	Acetoin/Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex, E3	(-5,5)	n. n.	-54,5
		n. n.	n. n.	-16,8
1818	TPP-abhängiges Enzym (Acetolactat-Synthase, Pyruvat-Dehydrogenase (Cytochrom), Glyoxylat-Carboligase, Phosphonopyruvat-Decarboxylase)	-84,7	n. n.	n. n.
		-2,8	n. n.	n. n.

Citrat-Stoffwechsel

Auch Proteine, die in der Verwertung von Citrat eine Rolle spielen, sind in diesen Versuchen nachgewiesen worden. Das verwendete MRS-Medium enthält geringe Mengen an Citrat, was die Expression dieser Proteine erklären kann. Citrat kann zu Pyruvat umgesetzt werden und dieses neben Lactat zu Acetoin und Butandiol. Insgesamt wurden acht Proteine nachgewiesen, die an der Verstoffwechslung von Citrat beteiligt sein könnten (Tabelle 20). Die Gene OEOE_0418 bis OEOE_0423 kodieren für die Malat-Oxidoreduktase, die als Oxalacetat-Decarboxylase arbeitet (Strößinger, 2006) und für die vier Untereinheiten der Citratlyase. Das Gen für die γ -Untereinheit des Enzyms wurde nicht gefunden. Ebenso liegen eine Acetolactat-Synthase (OEOE_1703) und zwei Kandidaten für eine Acetoin-Reduktase (OEOE_0693 und OEOE_1602) in den Zellen vor. Das Gen OEOE_1818, welches schon in Zusammenhang mit dem Pyruvat-Stoffwechsel besprochen wurde, besitzt auch Ähnlichkeit zu einer Acetolactat-Synthase. Dieses Protein könnte möglicherweise auch mit dem Citratstoffwechsel assoziiert sein. Die hier dem Citratstoffwechsel zugeordneten Proteine spielen somit wahrscheinlich bei der Umsetzung von Citrat eine Rolle. Zuchtexperimente mit oder ohne Citrat sollten in Zukunft zeigen, welche der Gene durch Citrat induziert werden.

Tabelle 20: Ergebnisse der Proteomexperimente, Enzyme des Pyruvat- und Citratstoffwechsels. Für die Enzyme sind die log(e)-Werte der beiden Experimente angegeben. Der Wert der ersten Präparation ist in der oberen Zeile, der der zweiten in der unteren Zeile angegeben. Die Abkürzung n. n. steht für nicht nachgewiesene Proteine.

Gen	Annotation	Ribose	Glucose	Fructose
		log(e)-Wert		
<u>Citratstoffwechsel</u>				
418	Malat-Oxidoreduktase	n. n.	-23,8	(-5,5)
		n. n.	n. n.	n. n.
420	Citrat-Lyase-Synthetase	-23,9	(-5,1)	(-5,6)
		n. n.	n. n.	n. n.
422	Citrat-Lyase, beta-Untereinheit	-118,5	-88,1	-133,3
		-24,1	-23,5	-59
423	Citrat-Lyase, alpha-Untereinheit	-206,6	-225,2	-215,2
		-54,4	-15,4	-54,8
1703	Acetolactat-Synthase	-121,7	-116,6	-125,9
		-110,5	-28,8	-53,8
693	Acetoin-Reduktase	-78,9	-121,7	-79,4
		-55,5	-100,7	-64
1602	Acetoin-Reduktase	-72,4	-97,4	-85,7
		-38,9	-33	-57,1
1818	TPP-abhängiges Enzym (Acetolactat-Synthase, Pyruvat-Dehydrogenase (Cytochrom), Glyoxylat-Carboligase, Phosphonopyruvat-Decarboxylase)	-84,7	n. n.	n. n.
		-2,8	n. n.	n. n.

4.2.2 Expression der Gene des Zentralstoffwechsels

Wegen der fehlenden genetischen Methoden sind Reporteranalysen zur Untersuchung der Genexpression in *O. oeni* nicht möglich. Die transkriptionelle Regulation der Enzyme des Phosphoketolasewegs kann aber durch quantitative PCR untersucht werden. Dazu wurden die mRNA-Gehalte der Gene für die Lactat-Dehydrogenase (OEOE_0413), die bifunktionelle Alkohol-Dehydrogenase und Acetaldehyd-Dehydrogenase (OEOE_1248), die Acetat-Kinase (OEOE_1249), die Pyruvat-Kinase (OEOE_1002) und die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (OEOE_0892) bestimmt. Die mRNA-Gehalte wurden nach Zucht auf Glucose, Fructose, Ribose, Glucose plus Citrat, Glucose plus Pyruvat und Pyruvat verglichen. Die Zucht mit Glucose diente in diesem Fall als Referenz.

Einige Gene des Phosphoketolasewegs werden transkriptionell durch die Kohlenstoffquelle reguliert. Besonders stark werden die Gene der Lactat-Dehydrogenase (OEOE_0413) und der *AdhE* (OEOE_1248) reguliert (Abb. 16). Das Gen OEOE_0413 für die **Lactat-Dehydrogenase** wird bei Zucht mit den Zuckern Ribose, Glucose oder Fructose relativ konstant exprimiert. Unter diesen drei Bedingungen ändert sich der mRNA-Gehalt maximal um den Faktor 2,13, wobei die Expression mit Fructose am stärksten ist. In Anwesenheit der zusätzlichen Elektronenakzeptoren Citrat oder Pyruvat zum Zucker Glucose sinkt die Expression um den Faktor 3,44 bzw. 2,2. Steht Pyruvat alleine zur Verfügung, geht der mRNA-Gehalt um den Faktor 8,33 zurück.

Eine noch deutlichere Regulation ist bei der **AdhE** zu beobachten. Bereits bei Zucht mit den Zuckern Glucose, Fructose und Ribose ändert sich das Expressionsmuster. So ist nach Zucht auf Glucose der mRNA-Gehalt in der Zelle am höchsten. Die Anwesenheit von Fructose und Ribose verringert den Gehalt um die Faktoren 10 und 4,3. Unter diesen beiden Bedingungen wird der Ethanolweg kaum gebraucht, was den Rückgang des gebildeten Enzyms erklären kann. Die Anwesenheit von Citrat oder Pyruvat zusammen mit Glucose äußert sich in einer noch deutlicheren Reduktion der *adhE*-Expression. Bei Anwesenheit dieser Substrate geht die Expression um den Faktor 1000 im Vergleich zum Wachstum auf Glucose alleine zurück. Steht Pyruvat als alleinige C-Quelle zur Verfügung, ist immerhin noch ein Rückgang um den Faktor 20 im Vergleich zu Glucose zu sehen.

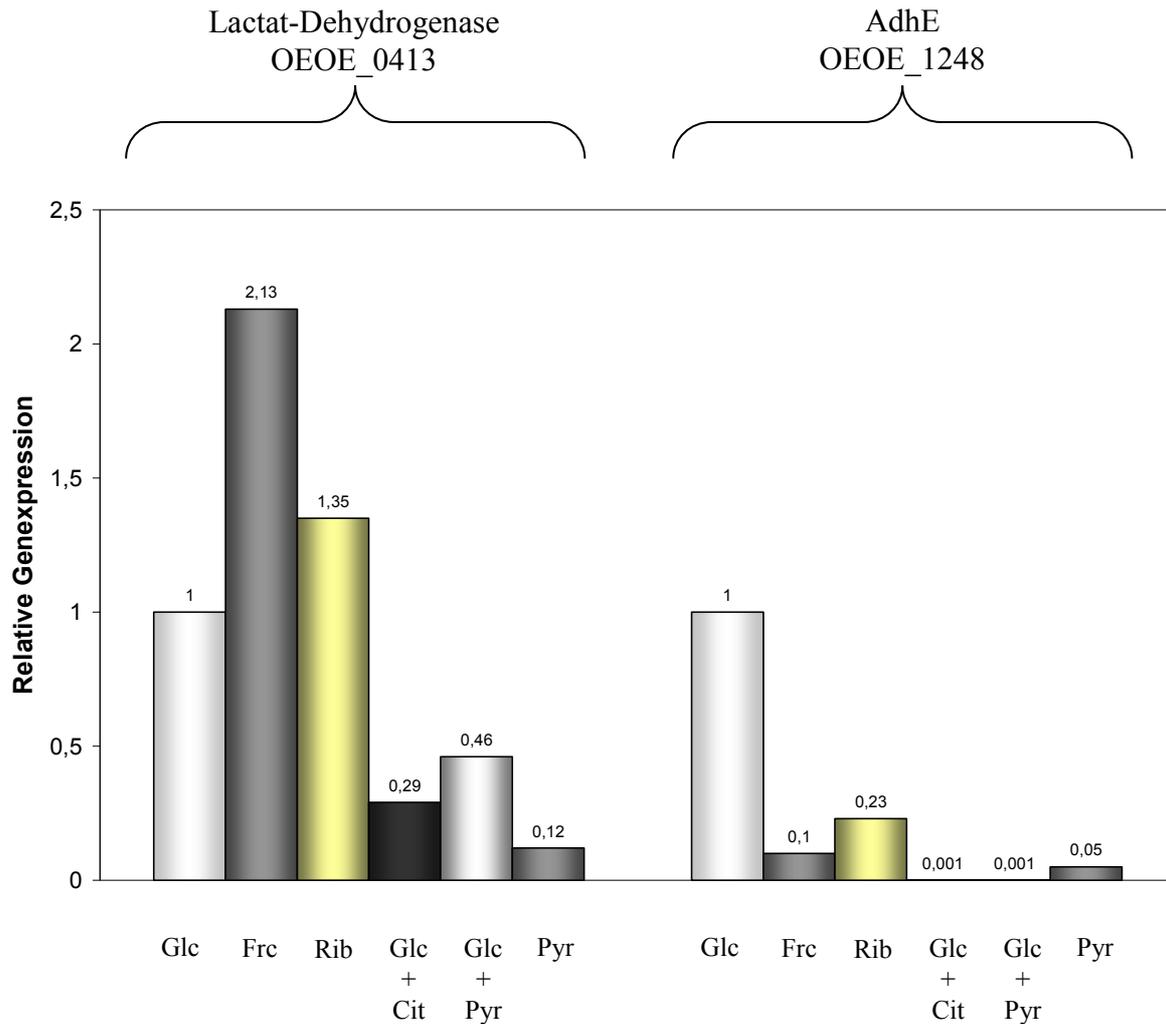


Abb. 16: Relative Genexpression der Gene der Lactat-Dehydrogenase und der AdhE nach Zucht mit verschiedenen Substraten. Die mRNA-Gehalte (relative Genexpression) wurden durch quantitative Real-time PCR bestimmt. Glucose diente hierbei als Referenz (Wert =1).

Eine weitaus geringere Änderung der Expression ist bei den Genen der Pyruvat-Kinase und Acetat-Kinase zu beobachten (Abb. 17). Das Gen für die **Pyruvat-Kinase** zeigt bei Wachstum auf den verschiedenen Substraten nur einen leichten Rückgang des mRNA-Gehalts im Vergleich zu Glucose, die Expression ändert sich maximal um den Faktor 2,4. Lediglich Pyruvat scheint einen starken Einfluss auf die Expression zu haben, die mRNA geht um den Faktor 6,7 zurück. Die **Acetat-Kinase** wird unter allen Bedingungen wenig reguliert. Ihre Expression ändert sich lediglich um den Faktor 2,2 nach Zucht mit Pyruvat. Das Gen für die Acetat-Kinase (OEOE_1249) liegt stromabwärts des Gens für die AdhE (OEOE_1248). Diese beiden Gene werden offensichtlich nicht gemeinsam in einem Operon reguliert. Die **6-Phosphogluconat-Dehydrogenase** wird dahingegen etwas deutlicher reguliert. Hier ist ein ähnliches Expressionsmuster wie bei der Lactat-Dehydrogenase erkennbar. Auch hier hat Pyruvat den stärksten Einfluss auf die Expression; sie geht bei Zucht auf Pyruvat als einziger C-Quelle um den Faktor 20 zurück.

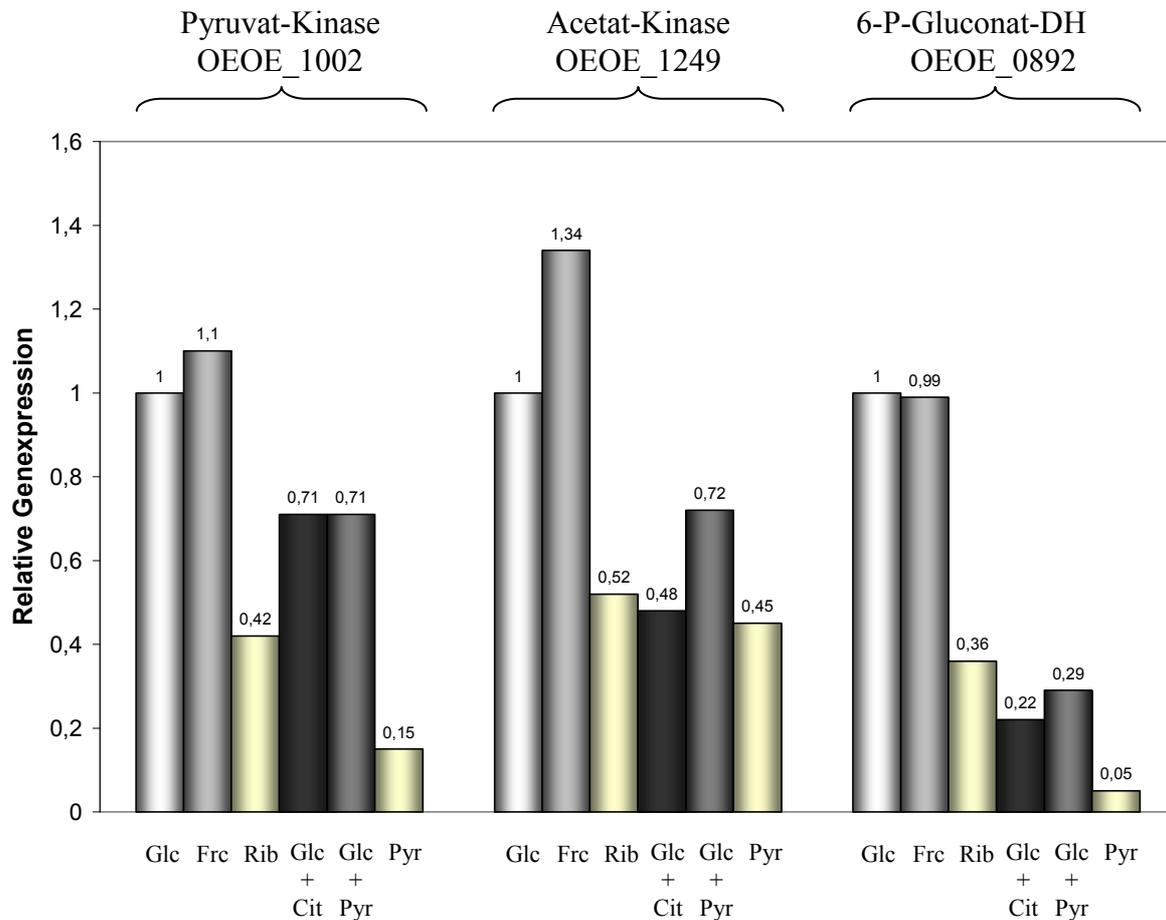


Abb. 17: Relative Genexpression der Gene der Pyruvat-Kinase, Acetat-Kinase und der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase nach Zucht auf verschiedenen C-Quellen. Die mRNA-Gehalte (relative Genexpression) wurden durch quantitative Real-time PCR bestimmt. Glucose diente hierbei als Referenz (Wert =1).

4.2.3 Pyruvat als zentrales Stoffwechselprodukt

Pyruvat nimmt im Stoffwechsel von *O. oeni* eine zentrale Rolle ein (Abb. 18). Es kann neben seiner Funktion in der heterofermentativen Milchsäuregärung als Elektronenakzeptor dienen und damit das Wachstum von *O. oeni* auf Glucose deutlich verbessern. Pyruvat kann auch als C-Quelle für den Energiestoffwechsel als alleiniges Substrat genutzt werden (Wagner *et al.*, 2005). Zudem ist Pyruvat ein Zwischenprodukt des Phosphoketolasewegs und Ausgangspunkt für Reaktionen des Baustoffwechsels. Die Expression einer Reihe von Pyruvat-bildenden und Pyruvat-verbrauchenden Enzymen wurde bestimmt. Der mRNA-Gehalt der zugehörigen Gene wurde nach Zucht auf Glucose (Referenzbedingung), Glucose plus Citrat, Glucose plus Pyruvat und Pyruvat miteinander verglichen. Citrat kann von *O. oeni* nur in Cofermentation verstoffwechselt werden. Durch den Abbau von Citrat entsteht ein zusätzliches Pyruvat,

welches als Elektronenakzeptor die Entsorgung eines Moleküls NADH übernehmen kann. Somit kann *Oenococcus* einen Teil des Acetyl-P als Acetat ausscheiden und zusätzliches ATP gewinnen. Die Anwesenheit von Citrat erhöht die Wachstumsrate, da der limitierende Ethanolweg entlastet wird. Dadurch ändert sich auch der Stoffwechsel der Glucose. Zur Untersuchung der beiden Kandidatengene für eine Pyruvatoxidase OEOE_0936 und OEOE_1818 wurde *O. oeni* unter semi-aeroben Bedingungen gezüchtet, da die Pyruvatoxidase Sauerstoff als Cosubstrat benötigt.

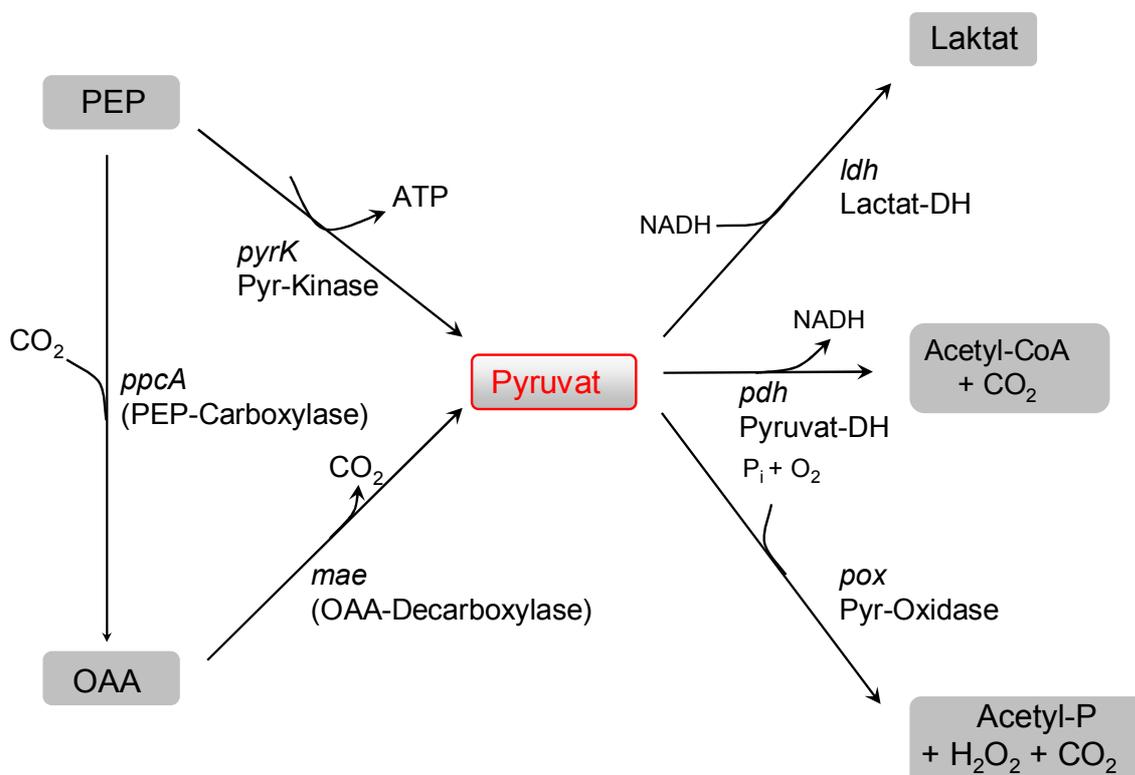


Abb. 18: Pyruvat als zentrales Stoffwechselprodukt. Pyruvat kann im Stoffwechsel durch mehrere Reaktionen gebildet werden: die Pyruvat-Kinase stellt Pyruvat aus PEP (Phosphoenolpyruvat) zur Verfügung, die Oxalacetat-Decarboxylase aus Oxalacetat. Die PEP-Carboxylase (Gen *ppcA*) stellt wiederum zwischen den beiden Produkten Oxalacetat und PEP eine Verbindung her. Entsteht Pyruvat, so kann es durch die Lactat-Dehydrogenase (Gen *ldh*), Pyruvat-Dehydrogenase oder auch die Pyruvatoxidase weiter umgesetzt werden.

Die **Oxalacetat-Decarboxylase** decarboxyliert Oxalacetat zu Pyruvat, welches in den Phosphoketolaseweg eingeschleust werden kann. Steht Citrat zur Cofermentation zur Verfügung, wird dieses durch die Citratlyase zu Oxalacetat und Acetat umgesetzt. Die Expression dieses Gens wurde durch die Anwesenheit von Citrat stark stimuliert (Faktor 65,5) (Abb. 19). Auch bei Zucht mit Pyruvat als einziger C-Quelle wurde die Expression induziert.

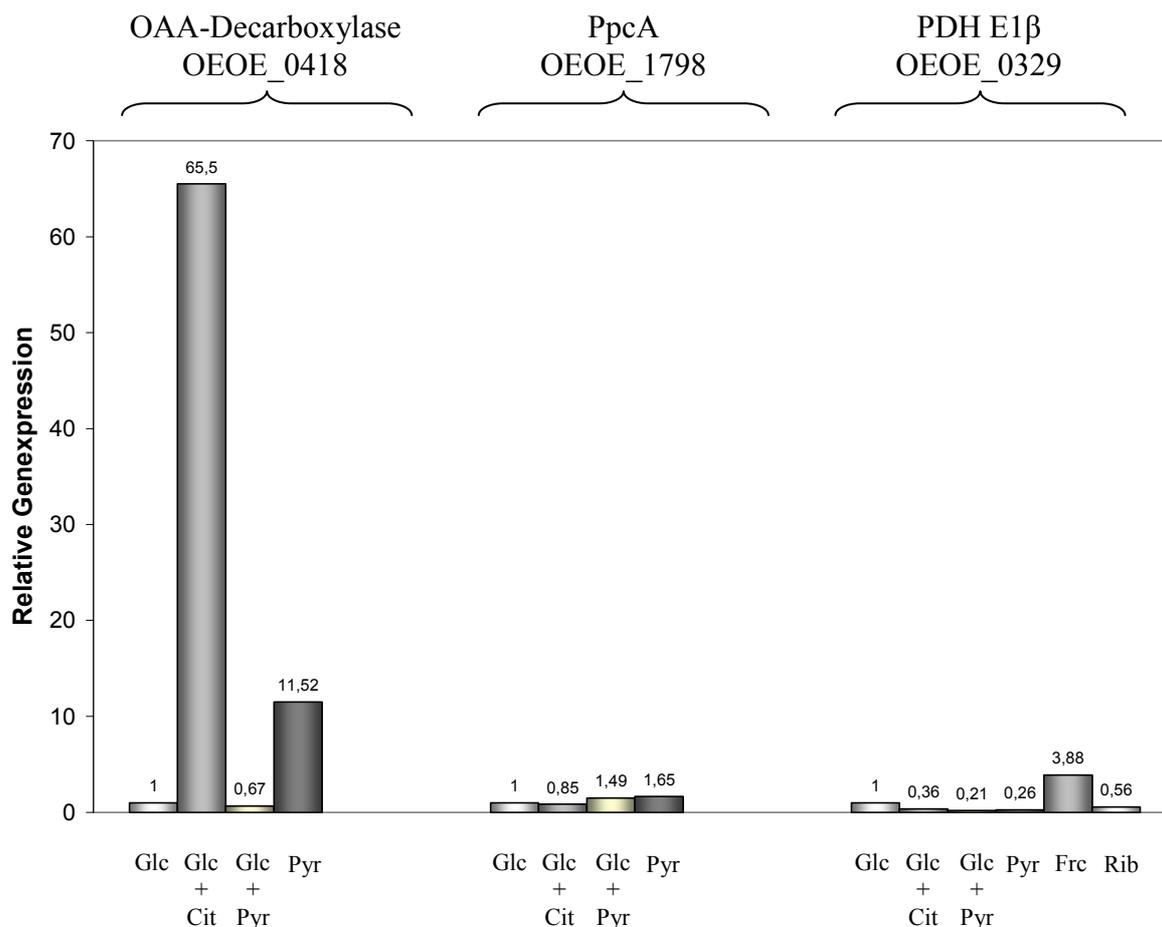


Abb. 19: Relative Expression der Gene für die Oxalacetat-Decarboxylase, PEP-Carboxylase (PpcA) und Pyruvat-Dehydrogenase E1 β -Untereinheit in *O. oeni* B1 nach Zucht auf verschiedenen C-Quellen. Die mRNA-Gehalte (relative Genexpression) wurden durch quantitative Real-time PCR bestimmt. Glucose diente hierbei als Referenz (Wert =1).

Die **PEP-Carboxylase** stellt im Baustoffwechsel Oxalacetat für die Aminosäuresynthese zur Verfügung. Die Genexpression des *ppcA*-Gens war unter allen getesteten Bedingungen konstant und ist somit unabhängig von der Anwesenheit von C-Quellen und Elektronenakzeptoren (Abb. 19). Die Expression des Gens für die E1 β -Untereinheit der **Pyruvat-Dehydrogenase** geht besonders nach Zucht mit Glucose plus Pyruvat und mit Pyruvat als alleiniger C-Quelle zurück. Nach Zucht mit Fructose war hingegen eine Induktion um den Faktor 3,9 zu sehen (Abb. 19). Dies steht nicht in Einklang mit einer Funktion als Pyruvat-Dehydrogenase, deren Reaktion bei Zucht mit Pyruvat als alleiniger C-Quelle benötigt wird.

Im Genom von *O. oeni* finden sich zwei Gene, die Ähnlichkeiten zu **Pyruvatoxidasen** haben. Die Gene OEOE_0936 und OEOE_1818 sind als Pyruvatoxidase bzw. als TPP-abhängige Enzyme annotiert und gehören beide dem COG0028 der Pyruvatoxidasen an. Die Expression dieser beiden Gene wurde auch nach Zucht mit Pyruvat unter mikro-aeroben Bedingungen

bestimmt (Abb. 20). Die Expression dieser beiden Gene war kaum von der vorhandenen C-Quelle abhängig; nur das Gen *OEOE_1818* ist in Anwesenheit von Sauerstoff um den Faktor 2,2 induziert.

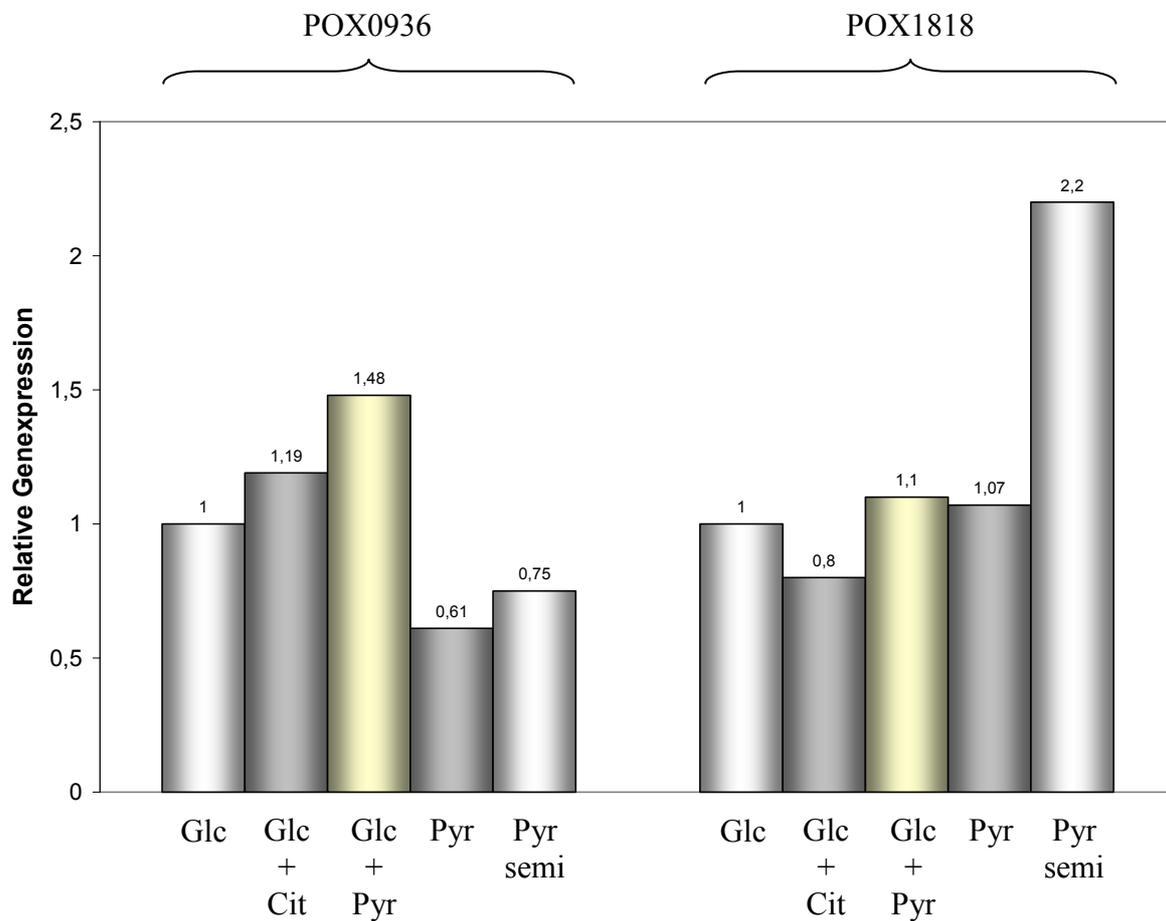


Abb. 20: Relative Genexpression der beiden Kandidatengene *OEOE_0936* und *OEOE_1818* für die Pyruvatoxidase in *O. oeni* B1 nach Zucht auf verschiedenen C-Quellen. Die mRNA-Gehalte (relative Genexpression) wurden durch quantitative Real-time PCR bestimmt. Glucose diente hierbei als Referenz (Wert=1).

Pyruvat, PEP und Oxalacetat als Knotenpunkte für den Energie- und Bausstoffwechsel

Pyruvat, Phosphoenolpyruvat und Oxalacetat sind wichtige Intermediate des Zentralstoffwechsels von Bakterien. Sie stellen eine Verbindung zwischen dem Energie- und Bausstoffwechsel dar. Im Genom von *O. oeni* PSU-1 befinden sich nur wenige Gene, die die Umwandlung dieser C₃- und C₄-Verbindungen ineinander katalysieren können: die Pyruvat-Kinase (OEOE_1002), die PEP-Carboxylase PpcA (OEOE_1798) und eine Oxalacetat-Decarboxylase (OEOE_0418) (Abb. 21, www.doe.jgi.gov; Ströbinger, 2007; Patel *et al.*, 2004; Sauer und Eikmanns, 2005). Gene für eine Pyruvat-Phosphat-Dikinase (PEP-Synthase), PEP-Carboxykinase, oder Pyruvat-Carboxylase (Biotin-abhängig) sind im Genom von *O. oeni* nicht kodiert (www.doe.jgi.gov).

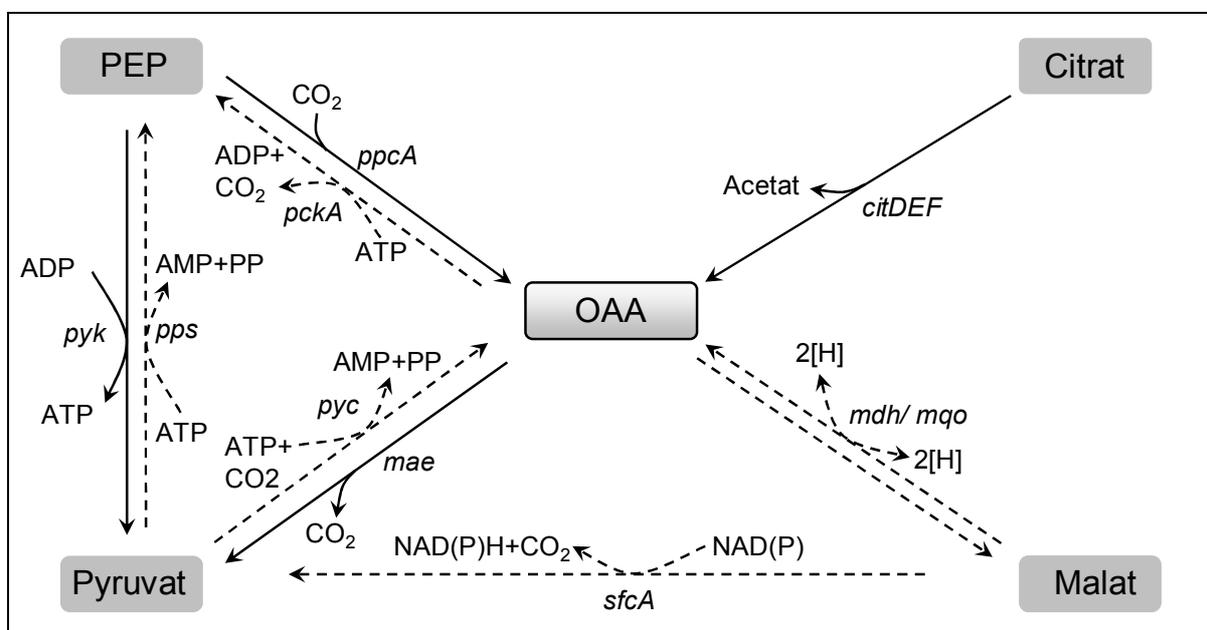


Abb. 21: Reaktionen zur Umsetzung von C₃- zu C₄-Verbindungen in *O. oeni*. C₃- und C₄-Verbindungen werden im Zentralstoffwechsel durch die geeigneten Reaktionen ineinander umgesetzt. Die Reaktionen, für die im Genom von *O. oeni* die entsprechenden Gene gefunden wurden, sind als durchgehende Linien gezeichnet, die die nicht gefunden wurden, sind gestrichelt gezeichnet. *pyk* (Pyruvat-Kinase, *pykA* or *pykF* in *E. coli*), *pps* (Pyruvat-Phosphat-Dikinase, auch *podK*), *ppcA* (PpcA-Typ PEP-Carboxylase), *pckA* (PEP-Carboxykinase), *pyc* (Biotin-abhängige Pyruvat-Carboxylase, auch *pcx*), *mae* (lösliche Oxalacetat-Decarboxylase), *sfcA* (Malatenzym), Die Citratlyase (*citDEF*) stellt aus Citrat Oxalacetat zur Verfügung. Die Gene wurden nach Sauer und Eikmanns (2005) und www.doe.jgi.gov benannt.

In aeroben Organismen entsteht Oxalacetat als Zwischenprodukte des Citratzyklus. Wird es für den Bausstoffwechsel verbraucht, so kann es aus Phosphoenolpyruvat oder Pyruvat durch eine anaplerotische Reaktion wieder zur Verfügung gestellt werden. Oxalacetat dient im Baustoffwechsel beispielsweise als Vorläufer für die Synthese der Aminosäuren der Aspartatfamilie. Über den Anabolismus von *Oenococcus* ist bisher nur wenig bekannt. Oxalacetat ist hier jedoch kein Intermediat des Hexosestoffwechsels. Im Stamm *O. oeni* B1

konnte gezeigt werden, dass Oxalacetat aus Intermediaten des Zuckerstoffwechsels über eine anaplerotische Reaktion gebildet wird (Zaunmüller, 2004). Für diese Reaktion ist wahrscheinlich die PEP-Carboxylase PpcA verantwortlich. Dieses Enzym katalysiert die Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat zu Oxalacetat und hat Ähnlichkeit zu einem neuen Typ von PEP-Carboxylase, welcher in dem Archaeobakterium *Methanothermobacter thermoautotrophicus* entdeckt wurde (Patel *et al.*, 2004) Im Genom von *O. oeni* sind keine homologen Gene zu anderen bekannten PEP-Carboxylasen kodiert. In zellfreien Extrakten von *O. oeni* B1 konnte eine PEP-Carboxylase Aktivität von 8,3 U/g Protein nach Zucht mit Glucose und 15,1 U/g Protein nach Zucht mit Glucose plus Fructose bestimmt werden. Auch für die Umsetzung von Oxalacetat zu Malat und umgekehrt sind die zugehörigen Gene der Malat-Dehydrogenase nicht im Genom kodiert. Oxalacetat kann durch die Verwertung von Citrat durch die Citrat-Lyase zur Verfügung gestellt werden.

5. Diskussion

Zentrale Punkte dieser Arbeit waren die Untersuchung des Hexosetransports und der Regulation des Zentralstoffwechsels von *O. oeni*. Die Fragestellungen wurden durch Messung der Gen- und der Proteinexpression untersucht.

5.1 Hexosetransport in *O. oeni*

Untersuchungen des Zuckertransports hatten gezeigt, dass *O. oeni* durch Hexose induzierbare Carrier besitzt, die Charakteristika von sekundären Carriern aufweisen. Folgende Eigenschaften wurden erkannt (Richter, 2004):

- Nach Zucht mit Glucose ist bei pH 5 ein sekundärer Carrier aktiv, der unabhängig vom pH-Wert des Zuchtmediums gebildet wird.
- Der Glucosetransport bei pH 5 ist hoch affin (K_m -Wert = 9,3 μ M, $v_{max} \sim 9$ U/g).
- Zucht mit Fructose stimuliert die Transportaktivität von Glucose (Faktor 2).
- Der Transport von Fructose wird ebenfalls durch einen sekundären Carrier katalysiert. Er ist weniger affin als der Glucosetransport (K_m -Wert = 38 μ M, $v_{max} = 5,8$ U/g).
- Glucose hemmt den Fructosetransport, Fructose den Glucosetransport aber nicht.

Für den hoch affinen Transport von Glucose und Fructose im Stamm *O. oeni* B1 kommen folgende Situationen in Betracht (Richter, 2004):

1. Es gibt **1** sekundären Carrier, der Glucose und Fructose transportiert, aber eine höhere Affinität zu Glucose hat. Das zugehörige Gen wird nach Zucht mit Fructose doppelt so stark induziert wie nach Zucht mit Glucose.
2. Es gibt **2 (oder mehr)** sekundäre Carrier für die Aufnahme von Glucose und Fructose, wobei ein Carrier Glucose, ein weiterer Glucose und Fructose transportiert. Der zweitgenannte Carrier sollte durch Fructose induziert werden, was die Verdopplung des Glucosetransports erklären kann.

Insgesamt wurde die Expression von zehn ausgewählten Genen betrachtet. Die mRNA-Gehalte der Gene OE0E_0819 und OE0E_1574 wurden durch die Anwesenheit von Hexosen beeinflusst. Im Stamm B1 erhöhte Glucose die Expression, im Stamm PSU-1

Fructose. Die besondere Rolle dieser beiden Kandidaten wird dadurch bestärkt, dass ihre Expression bei beiden Stämmen durch Hexosen beeinflusst wird.

Weitere Betrachtungen sollen zum Stamms B1 gemacht werden, da auch die Transportmessungen mit diesem durchgeführt worden waren. Die Gene OEOE_0819 und OEOE_1574 wurden hier durch Glucose deutlich induziert, nicht aber durch Fructose. Sie können deshalb für Glucosecarrier kodieren. Es wurde jedoch kein Gen ermittelt, das durch Fructose induziert wird und die Rolle des zweiten Hexosecarriers übernehmen könnte. Auch in Stamm PSU-1 scheinen mehrere Carrier vorzuliegen, die für den Transport von Hexosen verantwortlich sind. Hier werden neben den Kandidaten OEOE_0819 und OEOE_1574 auch noch drei weitere Gene (OEOE_0478, OEOE_1681 und OEOE_1682) durch Fructose induziert. Da jedoch mit diesem Stamm keine Transportmessungen durchgeführt wurden, können die Expressionsdaten nicht mit physiologischen Daten verglichen werden.

Ein direkter Nachweis, dass die Gene OEOE_0819 und OEOE_1574 für Hexosecarrier kodieren, steht bisher aus. Aufgrund fehlender Genetik ist es in *O. oeni* und vielen anderen heterofermentativen Milchsäurebakterien nicht möglich, Gene im Chromosom zu inaktivieren und ihre Rolle durch Funktionsausfall zu identifizieren. Eine heterologe Expression der Gene in *E. coli* und Komplementation von Hexosecarrier-defekten Mutanten war ebenfalls nicht erfolgreich. Parche *et al.* (2006) gelang eine solche Komplementation des Wachstums mit dem Glucosetransporter GlcP von *Bifidobacterium longum*. Auch die Aufnahme von ¹⁴C-Glucose durch den defizienten *E. coli* Stamm konnte in dieser Arbeit gezeigt werden.

Für zukünftige Versuche soll die Expression der Gene z. B. in *Lactococcus lactis* durchgeführt werden. Für *L. lactis* gibt es Systeme zur heterologen Expression von Proteinen, z. B. das Nisin kontrollierte Expressionssystem (Kuipers *et al.*, 1997). Das System besteht aus zwei Plasmiden. Eines davon, das regulatorische Plasmid, trägt die Gene für ein von Nisin autoreguliertes Zwei-Komponenten-System NisRK. Auf dem zweiten (Expressions-) Plasmid befindet sich das gewünschte Gen, welches hinter den *nisA* Promotor kloniert wird. Dieser Promotor wird von dem Zwei-Komponenten-System reguliert. Das System kann durch Zugabe von Nisin in verschiedenen Konzentrationen gut reguliert werden. Um die Funktion als Hexosecarrier nachzuweisen, sollte auch hier ein Stamm verwendet werden, der Defekte in der Aufnahme von Hexosen aufzeigt. Nur so kann eine Aufnahme von Glucose und Fructose durch die Kandidaten nachgewiesen werden. In *L. lactis* ist es möglich, Gene im Chromosom auszuschalten (Leenhouts *et al.*, 1996 und 1998).

In der Literatur gibt es Beispiele für die erfolgreiche heterologe Expression von Transporterproteinen. So gelang die Expression des Di- und Tripeptid Transporters DlpT aus *Lactobacillus helveticus* in einer Dipeptidtransport-defizienten *E. coli* Mutante. Die Expression wurde hier wahrscheinlich über den Gen-eigenen Promotor gesteuert (Nakajima *et al.*, 1997). Auf ähnliche Weise gelang auch die Komplementation eines *E. coli* Stammes, der nicht in der Lage ist, auf Dicarbonsäuren zu wachsen. Labarre *et al.* (1996) zeigten hier die Funktion der Malat-Permease aus *O. oeni* durch Wiederherstellung des Malattransports. Somit kann vielleicht eine geringe Änderungen der bisherigen Versuche zur Komplementation führen, wie beispielsweise die Nutzung eines anderen Vektors oder die Modifikation der Wachstumsbedingungen.

Durch Analyse des Genoms von *O. oeni* konnte eine Liste mit 34 Genen für sekundären Carrier erstellt werden. Die Genexpression von neun dieser Kandidaten wurde in dieser Arbeit bereits bestimmt. Die verbleibenden Kandidaten können nicht weiter differenziert werden. Insbesondere ist es nicht möglich, über Analyse der Substratbindestellen die Substrate der Transporter zu identifizieren. Bisher ist nur die Struktur von zwei Mitgliedern der Major Facilitator Superfamily bekannt, die der Lactose-Permease aus *E. coli* (Abramson *et al.*, 2003) und die des Glycerin-3-phosphat-Transporters GlpT aus *E. coli* (Huang *et al.*; 2003). Die Sequenzidentität dieser Familien ist trotz konservierter Sekundärstrukturen nur gering (Vardy *et al.*; 2004; Abramson *et al.*, 2004).

Durch Proteomanalyse konnte nur ein sekundärer Carrier nachgewiesen werden, der potentielle Ribosecarrier OEOE_1614. Eine Optimierung der Methode für Membranproteine könnte weitere Hinweise darauf geben, welche Transporter in den Zellen exprimiert werden und auch als Zuckercarrier in Frage kommen können.

Die Expression aller Kandidaten für sekundäre Carrier nach Zucht auf Ribose, Glucose und Fructose sollte auch durch Verwendung von DNA-Microarrays vergleichbar sein. Hier wird der Gehalt an mRNA vieler Gene unter verschiedenen Bedingungen verglichen. Ausgehend von der vorhandenen Genomanalyse von *O. oeni*, wäre es möglich, einen spezifischen Microarray herzustellen, der nur die Gene z. B. der sekundären Carrier trägt. Auch mit dieser Methode könnte man den Gehalt an mRNA der in Frage kommenden Gene nach Zucht auf Ribose, Glucose und Fructose - und damit die Genexpression - vergleichen. Diese Methode erlaubt die problemlose Expressionsanalyse von Membranproteinen.

Rolle eines Phosphotransferasesystems

Phosphotransferasesysteme transportieren Hexosen und Zuckeralkohole wie z. B. Mannit über die Cytoplasmamembran von Bakterien. Hierbei wird eine Phosphorylgruppe in fünf Schritten von Phosphoenolpyruvat (PEP) auf das Substrat übertragen. Das Substrat liegt in der Zelle nach der Aufnahme bereits phosphoryliert vor und kann direkt in den Zuckerabbau eingeschleust werden. Im Phosphoketolaseweg entsteht nur ein Molekül PEP pro Glucose. Deshalb geht man davon aus, dass Bakterien mit Phosphoketolaseweg die Glucose nicht über Phosphotransferasesysteme aufnehmen (Romano *et al.*, 1979). In der Glycolyse entstehen pro Mol Glucose zwei Mol PEP, von denen eines für die Aufnahme von Glucose verbraucht werden kann.

Der Phosphoketolaseweg liefert bei der Verwendung eines Phosphotransferasesystems oder eines sekundären Carrier für den Hexosetransport 1 ATP pro Mol Glucose (Abb. 22). Bei der Nutzung des sekundären Carriers wird zusätzlich 1 H⁺ aus dem Protonenpotential für den Transport verbraucht, das äquivalent zu ~ 1/3 ATP ist. Dadurch ist die ATP-Bilanz bei Verwendung des Phosphotransferasesystems etwas günstiger. Dabei wird jedoch das gesamte PEP aus dem Energiestoffwechsel für den Transport verbraucht, es steht kein PEP für den Baustoffwechsel zur Verfügung. Deshalb muss in diesem Fall zumindest der entsprechende Anteil von Glucose, der für den Baustoffwechsel benötigt wird, über einen sekundären Carrier aufgenommen werden. Im Genom von *O. oeni* sind keine Strukturgene einer Pyruvat-Phosphat-Dikinase (PEP-Synthase), Pyruvat-Carboxylase oder PEP-Carboxykinase kodiert, die eine energieaufwendige Bildung von PEP aus Pyruvat ermöglichen würden.

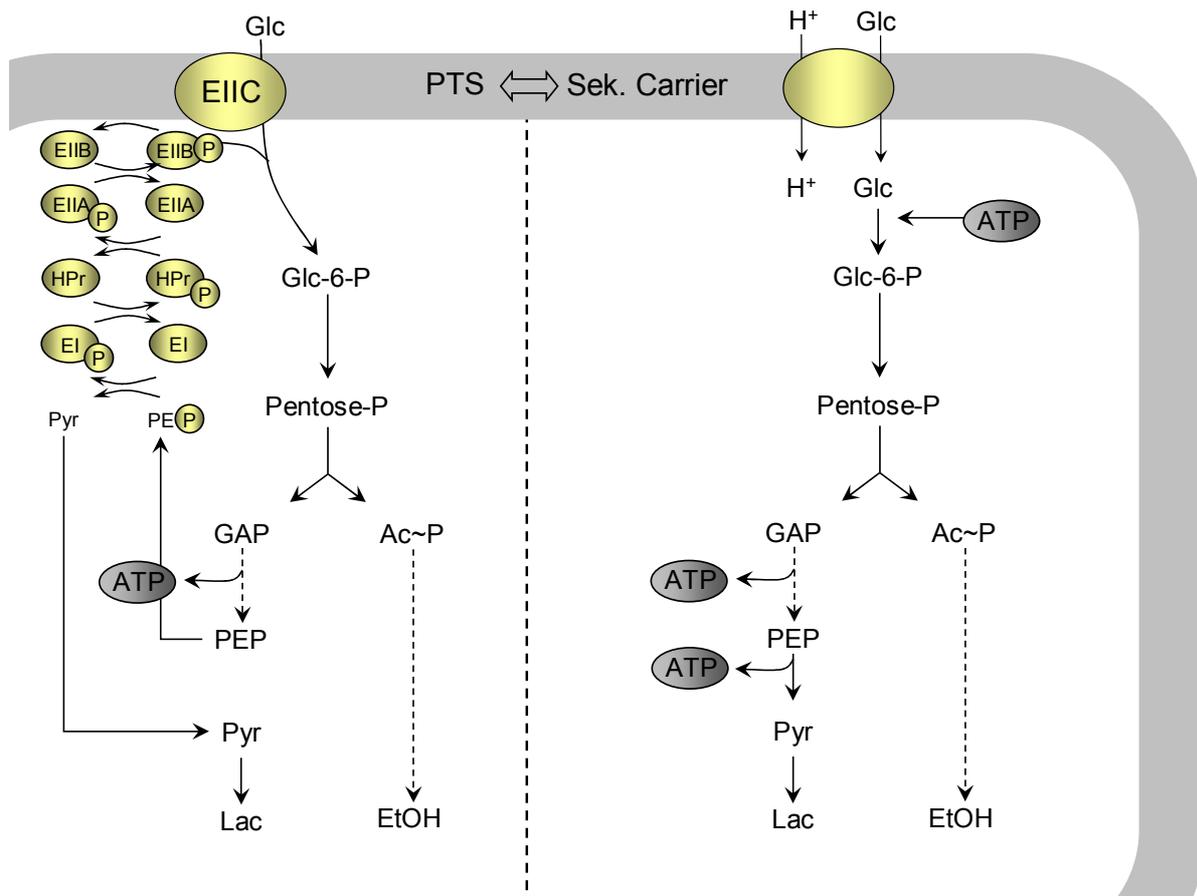


Abb. 22: Aufnahme von Hexosen durch Phosphotransferasesysteme und sekundäre Carrier in *O. oeni*. Die Aufnahme von Hexosen über ein Phosphotransferasesystem oder einen sekundären Carrier würde für die Zelle nur einen geringen Unterschied in der Energieausbeute bedeuten.

Im Genom von *O. oeni* PSU-1 wurden acht vollständige Sätze von Phosphotransferasesystemen gefunden. Vier dieser Systeme zeigen Ähnlichkeiten zu Hexose-spezifischen, drei zu Disaccharid- (z. B. Cellulose-) spezifischen Systemen. Die Proteomanalysen belegten die Expression einiger Komponenten von Phosphotransferasesystemen. So sind die universellen Komponenten EI und HPr nach Zucht auf Ribose, Glucose und Fructose in vergleichbaren Gehalten in der Zelle vorzufinden. Die Gene OEOE_0234 und OEOE_0236, die für die Komponenten EIIA und EIIB eines Fructose/Mannit oder Galactitol-spezifischen Systems kodieren könnten und die Gene OEOE_0646 und OEOE_0466, die für die Komponenten EIIA und EIIB eines Fructose/Mannit-spezifischen Systems kodieren könnten, waren nach Zucht mit Fructose verstärkt nachweisbar.

Die Expressionsmessungen in Stamm *O. oeni* B1 lieferten ähnliche Ergebnisse. Die mRNA-Gehalte der Komponenten EI und HPr ändern sich nur geringfügig. Insgesamt wurde die Expression von drei Systemen getestet, die den Hexosetransportsystemen am ähnlichsten sind. Die Komponenten EIIAB des Systems OEOE_0464-0466 zeigen eine deutliche

Induktion nach Zucht mit Fructose und Glucose im Vergleich zur Zucht mit Ribose. Die beiden anderen Gene OEOE_0296 und OEOE_0382 könnten ebenfalls für ein Hexose-spezifisches System kodieren. Ihre Genexpression wird jedoch nicht durch Hexosen beeinflusst.

Die Aufnahme von ^{14}C -Glucose in *O. oeni* B1 zeigte bei pH 7 ein zusätzliches Optimum für die Aufnahme (Richter, 2004). Diese Aktivität wird nur nach Zucht bei höheren pH-Werten (pH 5,8) induziert. Die Aktivität dieses Systems ist nicht vom Membranpotential abhängig und nur nach Energetisierung der Zellen deutlich messbar. Auch dieser Transport ist also energieabhängig (Richter, 2004). Die Proteomanalysen und auch die Expressionsmessungen wurden nach Zucht bei pH 5,5 durchgeführt. Beide Methoden zeigen, dass Phosphotransferasesysteme von *O. oeni* exprimiert und durch die C-Quelle reguliert werden. Somit kann man von einer Rolle dieser Systeme im Transport von Hexosen ausgehen. In Einklang mit den Transportuntersuchungen nach Richter (2004) könnte es sich bei dem zweiten System, welches bei pH 7 sein Optimum hat, um ein Phosphotransferasesystem handeln. Expressionsmessungen der Kandidaten für Phosphotransferasesysteme nach Zucht bei pH 4 können diese Vermutung unterstützen. Unter diesen Bedingungen sollte dann die Expression dieser Gene deutlich zurückgehen.

Die Ergebnisse sprechen insgesamt dafür, dass *O. oeni* neben sekundären Carriern auch Phosphotransferasesysteme für die Aufnahme von Hexosen nutzt.

Für den Export von Mannit bei Wachstum auf Fructose sollten Phosphotransferasesysteme jedoch nicht geeignet sein. Hierfür sollte ein sekundärer Carrier zur Verfügung stehen.

Auch für Disaccharide ist eine Aufnahme durch Phosphotransferasesysteme möglich. Einige der als Cellubiose-spezifisch annotierten Systeme wurden in den Proteomanalysen auch in Abwesenheit der Disaccharide detektiert. Da jedoch zu der Aufnahme dieser Substrate keine Transportstudien vorliegen, können an dieser Stelle keine weiteren Aussagen über die Rolle als Disaccharidcarrier gemacht werden.

Erleichtere Diffusion

Die Transportmessungen bei höheren Konzentrationen an ^{14}C -Glucose und -Fructose deuteten auf die Existenz eines nieder affinen Carriers hin, der energieunabhängig erleichterte Diffusion vermittelt (Richter, 2004). Der Transport von Glucose und Fructose findet bei diesen Konzentrationen unabhängig vom verwendeten Zuchtsubstrat statt (Richter, 2004). Die Gene OEOE_1682 und OEOE_1714 kommen als Kandidaten für diesen nicht induzierten Carrier in Frage. Aber auch bisher nicht untersuchte sekundäre Carrier können diese Funktion

ausüben. Eine genaue Identifizierung dieses Proteins wird zusätzliche Komplementationsexperimente und ^{14}C -Transportmessungen erfordern.

Ein Beispiel für einen Carrier, der erleichterte Diffusion vermittelt ist der Glucosetransporter Glf von *Zymomonas mobilis* (Barnell *et al.*, 1990). Auch dieses Protein gehört innerhalb der Major Facilitator Superfamily der Sugar-Porter Familie an (Pao *et al.*, 1998) und kann nicht anhand der Sequenz als Diffusionscarrier zugeordnet werden. Auch über die passive Diffusion über Phosphotransferasesysteme wurde berichtet. In *Lactobacillus pentosus* wird Xylose wahrscheinlich auch durch die membranständigen Komponenten EIICD eines Mannose-spezifischen PTS erkannt und transportiert ohne dabei phosphoryliert zu werden. (Chaillou *et al.*, 1999).

Resümee: Hexosetransport

Für den Transport von Hexosen sind wahrscheinlich mehrere sekundäre Carrier verantwortlich. Die Abbildung 23 vereinigt die Daten aus den Transportmessungen (Richter, 2004) und den Expressionsmessungen. Die Gene OEOE_0819 und OEOE_1574 kodieren im Stamm *O. oeni* B1 wahrscheinlich für Glucose-spezifische sekundäre Carrier, die nach Zucht auf diesem Substrat induziert werden. Aufgrund der Ergebnisse der Transportstudien (Richter, 2004) muss es noch mindestens einen weiteren sekundären Carrier geben, der durch Fructose induziert wird. Mittels DNA-Microarrays oder Proteomanalysen der Membranproteine soll der zugehörige Kandidat identifiziert werden.

Proteine, die für die erleichterte Diffusion von Glucose und Fructose im millimolaren Bereich zuständig sind, können mit den hier verwendeten Methoden nicht zugeordnet werden.

Die Expressionsmessungen und Proteomanalysen konnten die Expression von Komponenten von Phosphotransferasesystemen nachweisen und zeigen, dass ihre Synthese durch die Kohlenstoffquelle reguliert wird. Eine Rolle im Transport ist somit nahe liegend. Diese Systeme könnten zusätzliche Transportsysteme besonders bei höheren pH-Werten darstellen. Transportmessungen bei pH 7 deuteten ebenfalls auf die Beteiligung eines Phosphotransferasesystems hin (Richter, 2004).

In *O. oeni* scheinen damit für die Aufnahme von Hexosen in die Zelle mehrere Transporter verantwortlich zu sein. Durch weitere Versuche wie DNA-Microarrays, Proteomanalysen und Komplementationsversuche sollte die Rolle und Substratspezifität der einzelnen Proteine genauer geklärt werden.

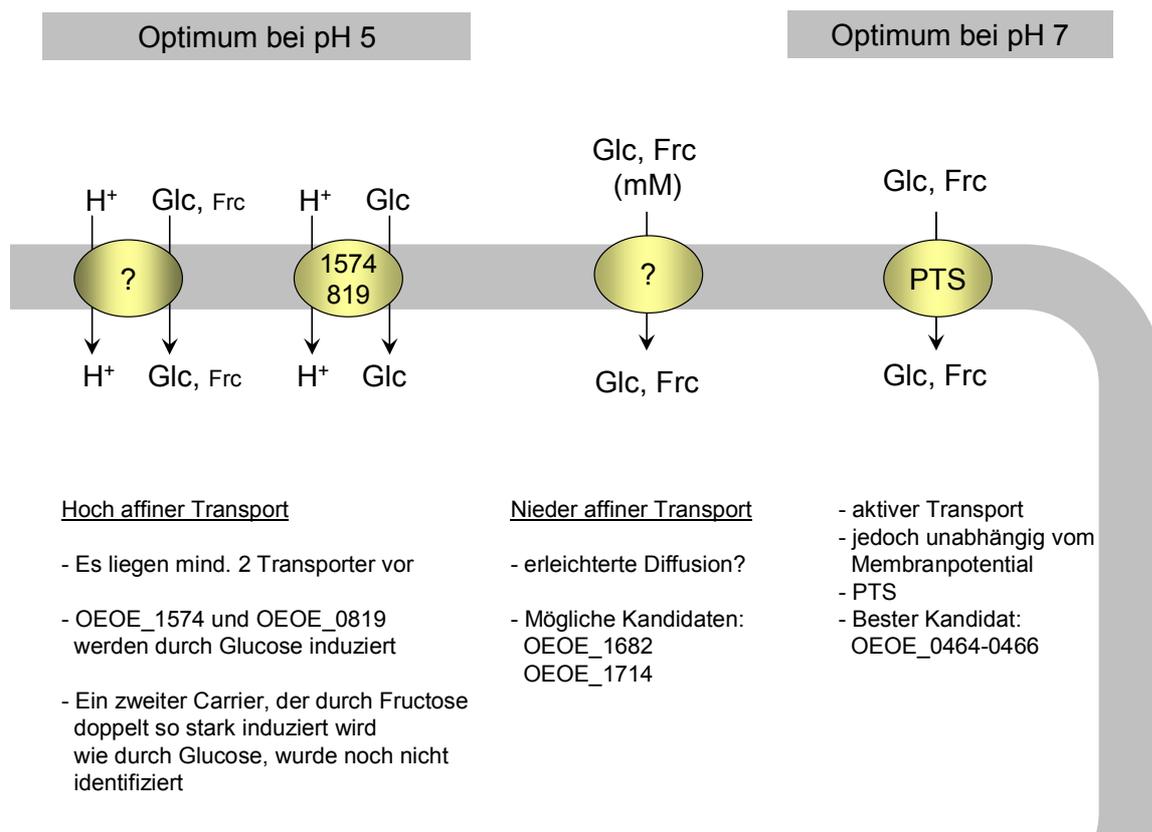


Abb. 23: Vermutliche Transporter für die Aufnahme von Hexosen bei Zucht bei pH 5 und pH 7 in *O. oeni* B1. Die Gene OEEOE_0819 und OEEOE_1574 sind gute Kandidaten für einen sekundären Carrier, der für den Transport von Glucose zuständig ist. Nach den Transportmessungen von Richter (2004) muss es noch mindestens einen weiteren sekundären Carrier geben, der durch Fructose stark induziert wird. Dieser konnte noch nicht identifiziert werden. Auch die verantwortlichen Proteine für eine erleichterte Diffusion der Hexosen konnten noch nicht eindeutig identifiziert werden. Zusätzlich sind auch Phosphotransferasesysteme am Transport beteiligt. Hierbei zeigt das System der Gene OEEOE_0464-0466 eine Regulation in Abhängigkeit der C-Quelle und ist somit ein guter Kandidat für den Transport von Hexosen.

Ausblick

Um die Rolle der Kandidaten bei der Aufnahme von Hexosen endgültig zu klären, sollten folgende Punkte bearbeitet werden:

- Klonierung der Gene OEEOE_0819 und OEEOE_1574 in einen Vektor mit IPTG-induzierbarem Promotor. Die in der Literatur beschriebenen Systeme konnten so erfolgreich eine Komplementation einer *E. coli* Glucose-Defekt-Mutante bewirken.
- Optimierung der Proteomanalysen für Membranproteine oder Microarrays zur Identifizierung des durch Fructose induzierbaren sekundären Carriers.
- Expressionsmessungen der Kandidaten für Phosphotransferasesysteme (besonders OEEOE_0464-0466) nach Zucht bei pH 4. Geht die Expression hier im Vergleich zur Zucht bei pH 5,5 zurück, spricht dies dafür, dass es sich hierbei um das System handelt, das erst bei Zucht auf höheren pH-Werten induziert wird und sein Optimum bei pH 7 hat.

Regulation des Zuckerstoffwechsels durch Phosphotransferasesysteme auch in *O. oeni*?

Auch in Gram-positiven Bakterien haben Phosphotransferasesysteme eine regulatorische Funktion im Zuckerstoffwechsel (Titgemeyer and Hillen, 2002; Poolman, 2002). Die Regulation des C-Stoffwechsels in *O. oeni* ist bisher kaum untersucht. Die meisten C-Substrate scheinen gleichzeitig umgesetzt zu werden (Salou *et al.*, 1994; Richter *et al.*, 2003b; Zhang and Lowitt, 2005; Wagner *et al.*, 2005). Auch Gram-positive Bakterien führen eine Katabolit-Repression durch. Beteiligt daran sind das HPr-Protein, eine HPr-Kinase/Phosphatase und das CcpA-Protein („Catabolite Control Protein“). HPr wird dabei durch die HPr-Kinase an einem Serinrest phosphoryliert. HPr(-Ser-P) bindet den Transkriptionsregulator CcpA, welcher dann an *cre*-Stellen („catabolite responsive element“) im Promotor von Zielgenen bindet (Henkin, 1996; Warner und Lolkema, 2003). Diese Regulation ist in *Bacillus subtilis* (Henkin, 1996), aber auch in Milchsäurebakterien wie *Lactococcus lactis* (Luesink *et al.* 1998) und *Lactobacillus plantarum* (Muscarello *et al.*, 2001) bekannt. Durch dieses System wird beispielsweise die Aufnahme von Glucose gesteuert. Fructose-1,6-bisphosphat, ein Intermediat der Glycolyse, stimuliert bei hohem Gehalt die HPr-Kinase und HPr wird phosphoryliert. HPr(-Ser-P) steht nun nicht mehr für die Phosphorylierung durch EI zur Verfügung und die Aufnahme von Glucose durch das Phosphotransferasesystem wird gedrosselt. Umgekehrt fördert ein niedriger Gehalt an Fructose-1,6-bisphosphat die Aufnahme von Glucose. Ist Glucose vorhanden, so wird durch CcpA die Expression von Genen unterdrückt, die in der Hierarchie tiefer gestellte Substrate umsetzen, wie z.B. Maltose oder Gluconat (Henkin *et al.*, 1991 und 1996).

Auch *O. oeni* verfügt laut Genomannotation über CcpA (Gen OE0E_0684). Wie das entsprechende Protein für *L. plantarum* ist es dem COG1609 für Transkriptionsregulatoren zugeordnet (IMG-Datenbank). Die Proteomanalysen von *O. oeni* zeigten, dass das Protein in den Zellen vorliegt. Nach Zucht mit Fructose ist es eines der häufigsten Proteine. Nach Zucht mit Glucose nimmt der Gehalt etwas ab. Nach Zucht mit Ribose ist der Gehalt am geringsten. Das Genom kodiert für eine HPr-Kinase/Phosphatase (www.doe.jgi.gov; Warner und Lolkema, 2003). Das Gen OE0E_0563 ist als „Serin Kinase des HPr-Proteins“ annotiert. In den Proteomanalysen wurde dieses Protein jedoch nicht detektiert. Die starke Expression von CcpA lässt auf eine wichtige Rolle schließen, obwohl *O. oeni* keine Glycolyse aufweist, den Stoffwechsel, der im typischen Fall durch die Glucoserepression reguliert wird.

Stammspezifische Unterschiede *O. oeni* B1 und PSU-1

Die Stämme B1 und PSU-1 von *O. oeni* werden beide als Wildtyp-Stämme geführt. Bei Wachstum auf Ribose, Glucose und Fructose verhalten sich beide Stämme ähnlich. Bei den Bestimmungen der Genexpression sind jedoch deutliche Unterschiede zu sehen. So waren in beiden Stämmen die Gene OEOE_0819 und OEOE_1574 die besten Kandidaten für einen sekundären Hexosecarrier, sie wurden jedoch in Stamm B1 durch Glucose und in Stamm PSU-1 durch Fructose induziert. Die Gene OEOE_1707 für die Mannit-Dehydrogenase und OEOE_1248 für die bifunktionelle AdhE wurden in beiden Stämmen jedoch in gleicher Weise exprimiert. Somit scheint es deutliche Unterschiede in der Genexpression der möglichen Transporter zu geben, während die Gene des Zentralstoffwechsels hingegen ähnlich exprimiert werden. Auch die Proteomuntersuchungen in Stamm PSU-1 zeigten gute Übereinstimmungen mit den Expressionsmessungen der Acetat-Kinase, Pyruvat-Kinase, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase in Stamm B1. Dies unterstützt die Annahme, dass der Zentralstoffwechsel der beiden Stämme wenige Unterschiede aufweist.

Der Stamm *O. oeni* 5-1 (Richter, 2004; Hamann, 2003) ist nicht in der Lage mit Glucose oder Fructose als alleiniger C-Quelle zu wachsen. Stehen jedoch beide Hexosen zur Verfügung gleicht das Wachstum dem Wildtyp B1. Die Transportmessungen mit ¹⁴C-markierten Hexosen zeigten, dass diesem Stamm wahrscheinlich der hoch affine Glucosecarrier fehlt (Richter, 2004). In diesem Fall könnte der veränderte Transport zu einem unterschiedlichen Verhalten in der Nutzung bestimmter C-Quellen führen.

Stammspezifische Unterschiede im Stoffwechsel sind auch für andere Stoffwechselreaktionen bekannt. So gibt es Unterschiede im Potential zur Malolactatfermentation (Delaherche *et al.*, 2006), in der Fähigkeit verschiedene Zucker umzusetzen (Sato *et al.*, 2001) und Aminosäuren zu synthetisieren (Garvie *et al.*, 1967). Stämme mit unterschiedlichen Eigenschaften können für die Weinfermentation von Interesse sein.

wenn Pyruvat als einzige C-Quelle vorliegt. Die Expression der Lactat-Dehydrogenase geht in Anwesenheit von Citrat bis auf ein Drittel des Glucosewertes zurück, bei Zucht auf Pyruvat wird der mRNA-Gehalt um den Faktor 8 geringer.

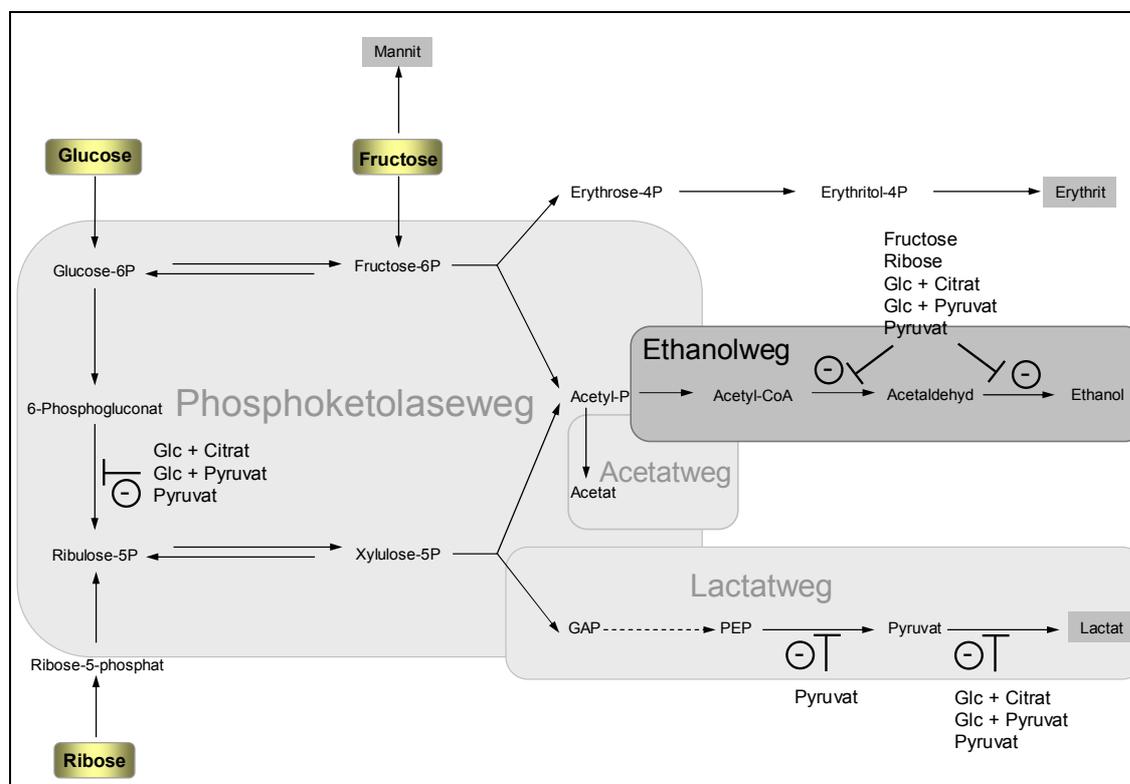


Abb. 25: Regulation des Zentralstoffwechsels in *O. oeni*. Bei Zucht auf Glucose plus Pyruvat, Glucose plus Citrat und Pyruvat geht die Expression der Gene des Phosphoketolasewegs und der peripheren Wege stark zurück. Lediglich die Expression der Actat-Kinase bleibt konstant.

Die Expression des *adhE*-Gens wird im Stoffwechsel am deutlichsten reguliert (s. u.). Die Expression der Acetat-Kinase war dagegen konstant.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Anwesenheit eines Elektronenakzeptors die Expression der peripheren Schritte des Phosphoketolasewegs deutlich beeinflusst. Möglicherweise verändern die Elektronenakzeptoren durch eine schnelle Oxidation des NAD(P)H den NADH/NAD⁺-Quotienten.

Doch sollte auch auf die Fermentation von Ribose und Fructose zur Folge haben, dass der NADH/NAD⁺-Quotient niedriger ist als nach Zucht mit Glucose.

Wird die Expression von Genen des Zentralstoffwechsels durch Pyruvat reguliert?

Pyruvat nimmt im Stoffwechsel von *O. oeni* eine zentrale Position ein. Anwesenheit von Pyruvat hat einen starken Einfluss auf die Expression der Pyruvat-Kinase, der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, der Lactat-Dehydrogenase und der AdhE (Abb. 25).

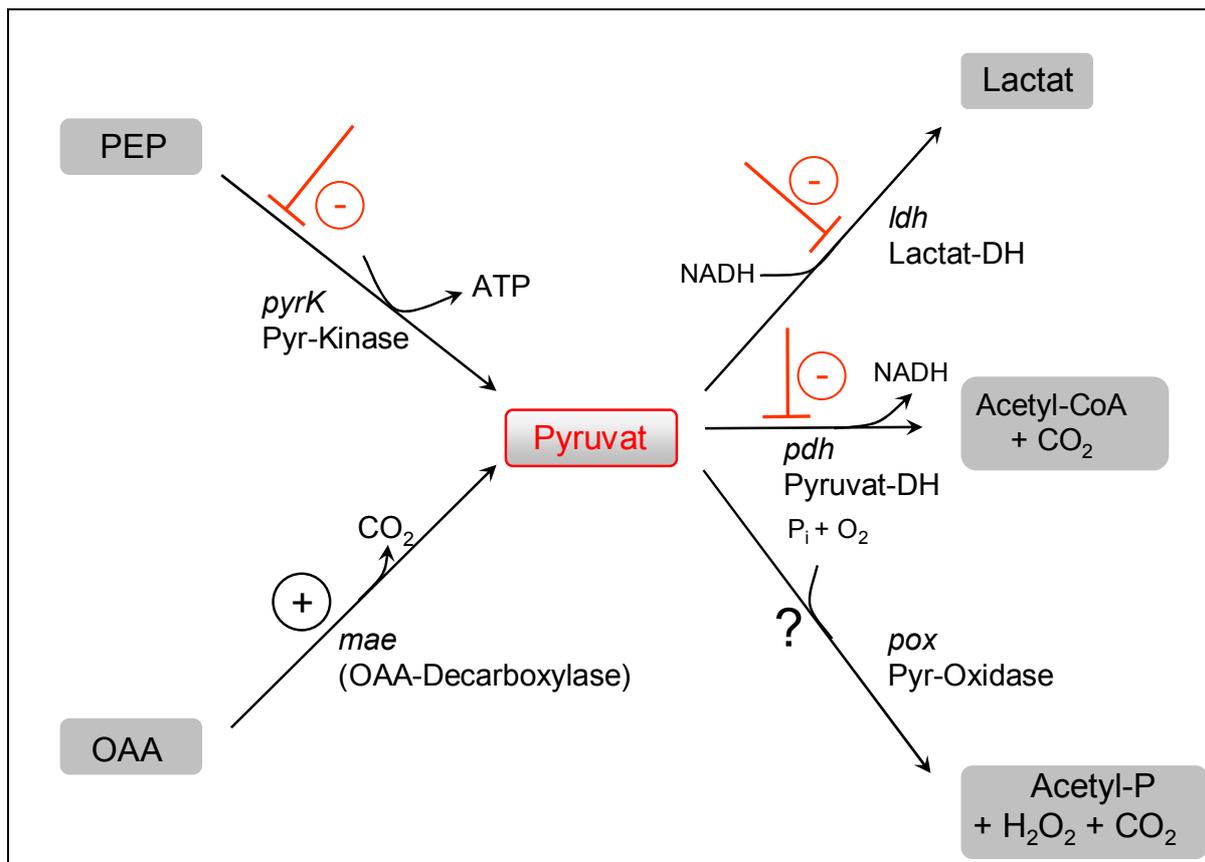


Abb. 26: Einfluss von Pyruvat auf die Genexpression in *O. oeni* B1. Bei Zucht mit Pyruvat als einziger C-Quelle wird die Expression der Gene *pyrK*, *ldh* und *pdh* (E1 β) deutlich reprimiert. Die Expression der Oxalacetat-Decarboxylase wird jedoch stimuliert. Ob die Anwesenheit von Pyruvat einen Einfluss auf eine Pyruvat-Oxidase hat, konnte bisher noch nicht geklärt werden.

Möglicherweise reprimiert Pyruvat direkt oder indirekt die Synthese alternativer Wege. So werden bei Fermentation von Pyruvat die Reaktionen der Pyruvat-Kinase, der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase und der AdhE nicht mehr benötigt, die der Lactat-DH jedoch schon. Ob Pyruvat den NADH/NAD⁺-Quotienten stärker beeinflusst als die anderen Elektronenakzeptoren, ist bisher nicht zu beurteilen. Diese Sonderrolle des Pyruvats könnte auch für eine andere Funktion in der Regulation der Genexpression sprechen. In *E. coli* wird die Expression *ldhA*-Gens für die fermentative Lactat-Dehydrogenase durch anaerobe Bedingungen induziert, aber auch durch die Anwesenheit von Pyruvat (Jiang *et al.*, 2001). Auch hier scheint Pyruvat Einfluss auf die Regulation eines bestimmten Teils des Stoffwechsels zu haben.

Die Expression der Oxalacetat-Decarboxylase wird durch Pyruvat und Citrat stimuliert. Citrat wird durch die Citrat-Lyase zu Oxalactat umgesetzt und anschließend durch die OAA-Decarboxylase zu Pyruvat decarboxyliert. Die Ursache der Stimulierung der Expression des Enzyms durch Pyruvat ist jedoch unklar.

Regulation der Lactat-Dehydrogenase und die Eignung als Haushaltsgen für Expressionsmessungen

Das Gen für die Lactat-Dehydrogenase wurde neben dem für die Gyrase A Untereinheit als Haushaltsgen für die Expressionsmessungen genutzt. Diese beiden Gene sind nach Desroche *et al.* (2005) als Haushaltsgene für *O. oeni* geeignet. In dieser Arbeit wurden jedoch speziell Haushaltsgene gesucht, die für die Untersuchungen von Stressbedingungen, wie z. B. hoher Ethanolkonzentration geeignet sind. Bei Zucht mit den Zuckern Ribose, Glucose oder Fructose war die Expression des Gens konstant. In Anwesenheit von Pyruvat oder Citrat nahm die Expression von *ldhD* stark ab. Aus Untersuchungen des Pyruvat-Stoffwechsels war bekannt, dass die Enzymaktivität der Lactat-Dehydrogenase bei Zucht mit Pyruvat um den Faktor 5 zurückgeht (Wagner *et al.*, 2005). Für zukünftige Untersuchungen des Energiestoffwechsels sollte die *ldhD* somit nicht mehr als Haushaltsgen eingesetzt werden. Die Acetat-Kinase stellt möglicherweise einen besseren Kandidaten für eine Referenz dar. Unter den bisher untersuchten Stoffwechselbedingungen war die Expression dieses Gens sehr konstant.

Rolle der bifunktionellen AdhE und des Ethanolwegs

Die Proteomanalysen im Stamm PSU-1 und die Expressionsmessungen im Stamm B1 zeigten die AdhE als sehr stark reguliertes Protein bzw. Gen. In den Proteomanalysen war die AdhE nach Zucht mit Glucose das häufigste Protein in den Zellen, nach Zucht mit Fructose und Ribose gingen die Gehalte deutlich zurück. Die Expression des *adhE*-Gens OEOE_1248 nimmt nach Zucht mit Fructose und Ribose ebenfalls deutlich ab. Noch deutlicher wird dieser Rückgang nach Zucht auf Glucose plus Citrat oder Pyruvat. Trotz der starken Expression der AdhE bei Zucht mit Glucose reicht die Enzymaktivität offensichtlich nicht zur Regeneration des NAD(P)H und ein Teil wird über den Erythritweg reoxidiert (Richter *et al.*, 2001; Veighada-Cunha *et al.*, 1993). Stehen Citrat, Pyruvat oder Fructose als Elektronenakzeptoren zur Verfügung, wird der limitierende Ethanolweg umgangen. Die schnellere Entsorgung des NAD(H) führt zu einer höheren Wachstumsrate der Bakterien. Auch wenn Ribose als C-Quelle genutzt wird, wird der Ethanolweg nicht benötigt, denn hier fallen keine Redoxäquivalente an.

Auch *E. coli* verfügt über eine bifunktionelle AdhE, die in der gemischten Säuregärung Ethanol bildet. Das Gen wird nur unter anaeroben Bedingungen exprimiert. Neben anderen Mechanismen wurde für dieses Enzym auch eine Regulation der Genexpression durch den NADH/NAD⁺-Quotienten in der Zelle vorgeschlagen (Leonardo *et al.*, 1996).

Die Proteomanalysen von *O. oeni* zeigten nach Zucht mit Ribose, Glucose und Fructose noch weitere Proteine, die laut Annotation die Funktion einer Acetaldehyd-Dehydrogenase und Alkohol-Dehydrogenase ausüben könnten. Eine Zuordnung der ADH-Aktivitäten zu einzelnen Kandidaten sollte durch Gelfiltration möglich sein. Liegen in den Zellen verschiedene Enzyme für eine Alkohol-Dehydrogenase vor, so sollten sich diese chromatographisch trennen lassen. Die Tatsache, dass die AdhE nach Zucht mit Glucose das am häufigsten detektierte Protein der Zellen ist, spricht aber dafür, dass diese auch das hauptverantwortliche Enzym für die Umsetzung von Acetyl-CoA zu Ethanol ist.

Funktion der Pyruvat-Dehydrogenase in *O. oeni*

Wächst *O. oeni* mit Pyruvat wird, dieses zu Lactat und Acetat disproportioniert. Letzteres wird wahrscheinlich durch die Pyruvat-Dehydrogenase gebildet (Wagner *et al.*, 2005). Bei der oxidativen Decarboxylierung entsteht aus Pyruvat neben Acetyl-CoA und CO₂ auch ein NADH. Dieses wird durch die Lactat-Dehydrogenase regeneriert. Die Redoxbilanz ist somit ausgeglichen (Abb. 27).

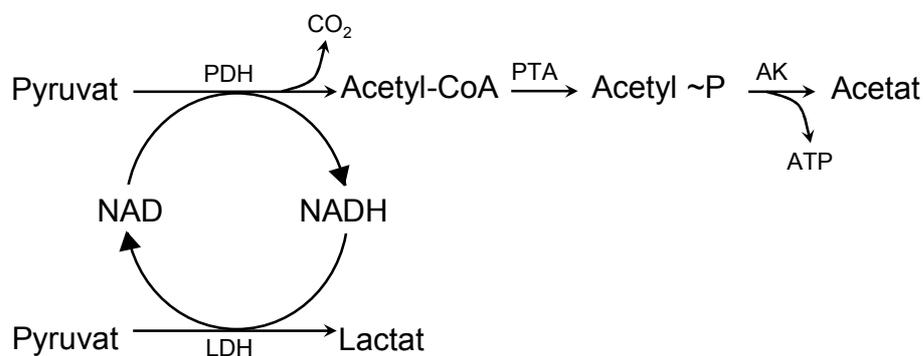


Abb. 27: Fermentation von Pyruvat nach Wagner *et al.* (2005).

Im Genom von *O. oeni* gibt es nur ein Gencluster, welches als Operon für eine Pyruvat-Dehydrogenase in Frage kommt. Die Gene OEOE_0328, OEOE_0329, OEOE_0330 und OEOE_0331 haben Ähnlichkeit zu den Untereinheiten E1 α , E1 β , E2 und E3 einer Pyruvat-Dehydrogenase aus Gram-positiven Organismen (Wagner *et al.*, 2005; Henderson *et al.*, 1980). Laut Annotation der Gene (www.doe.jgi.gov) haben diese auch Ähnlichkeiten zu einer Acetoin-Dehydrogenase, welche die oxidative Spaltung von Acetoin zu Acetaldehyd und Acetyl-CoA katalysiert. In *Clostridium magnum* wurde eine solche Acetoin-Dehydrogenase charakterisiert (Krüger *et al.*; 1994). Auch in *Pelobacter carbinolicus*, einem strikt anaeroben, Gram-negativen Bakterium wurde diese nachgewiesen (Oppermann und Steinbüchel, 1994).

Die Reaktion ist analog zur oxidativen Decarboxylierung von 2-Oxo-Säuren wie Pyruvat. Acetoin-Dehydrogenasen sind auch aus den Domänen E1 α , E1 β , E2 und E3 aufgebaut und haben Ähnlichkeit zur Pyruvat-Dehydrogenase. Die beiden Enzyme haben sich wahrscheinlich aus einem gemeinsamen Vorläufer entwickelt. Eine Umsetzung von Pyruvat wird durch die Acetoin-Dehydrogenase nicht katalysiert (Krüger *et al.*; 1994), sodass eine gleichzeitige Funktion als Pyruvat- und Acetoin-Dehydrogenase auszuschließen ist. In *P. carbinolicus* ermöglicht dieses Enzym das Wachstum auf Acetoin, welches dann zu Acetat und Ethanol fermentiert wird. Für *Oenococcus* gibt es jedoch keine Berichte über die Umsetzung von Acetoin. Acetoin entsteht bei der Cofermentation von Citrat als Endprodukt (Salou *et al.*, 1994). Da für die Umsetzung von Pyruvat keine alternativen Enzyme im Genom von *O. oeni* kodiert sind, ist es wahrscheinlich, dass die Gene OEOE_0328-0331 für eine Pyruvat-Dehydrogenase kodieren.

Expressionsmessungen der E1 β -Untereinheit dieser Pyruvat-Dehydrogenase zeigten, dass das Gen nach Zucht mit Pyruvat nicht wie erwartet induziert wurde, sondern auf etwa ein Fünftel der Expression mit Glucose zurückgeht. Dies ist auch nach Zucht mit Glucose plus Pyruvat zu beobachten. Die Pyruvat-Dehydrogenase wird aber nach Zucht mit Fructose induziert. Welche Bedeutung die Pyruvat-Dehydrogenase unter diesen Wachstumsbedingungen hat, ist noch nicht geklärt. Würde Pyruvat in deutlichen Mengen durch die Pyruvat-Dehydrogenase umgesetzt werden, so sollte sich dies in Fermentationsbilanzen in einer Abnahme von Lactat äußern, was nicht der Fall ist (Tabelle 21). Somit kann diese Reaktion nur einen geringen Anteil an der Umsetzung des Pyruvats haben. Steht Fructose als alleinige C-Quelle zur Verfügung, so wird bei hoher Wachstumsrate etwa ein Drittel der Fructose in den Phosphoketolaseweg geschleust und zwei Drittel werden als Elektronenakzeptor zu Mannit reduziert (Phase I, Tabelle 21, Richter, 2004; Richter *et al.*, 2003_a). Bei niedriger Wachstumsrate hingegen ist der Ethanolweg ausreichend für die Reoxidation des NAD(P)H. Hier entstehen kaum noch Mannit und Acetat, dafür Ethanol (Phase II, Tabelle 21).

Tabelle 21: Fermentation von Fructose nach Richter (2004). Je nach Wachstumsrate entstehen bei der Fermentation von Fructose verschiedene Endprodukte. Bei hohen Wachstumsraten werden 2/3 der Fructose zu Mannit reduziert (Phase I). Bei niedrigen Wachstumsraten ist der Ethanolweg ausreichend, um die Reoxidation des NAD(P)H zu bewerkstelligen (Phase II).

	Produkte (Mol/Mol Fructose)						%C	O/R
	Lactat	Acetat	Ethanol	Mannit	Erythrit	CO ₂		
Phase I	0,32	0,45	0,01	0,68	<0,01	0,32	105	0,91
Phase II	0,76	0,22	0,61	0,05	0,12	0,76	91	1,09

Die Funktion einer Pyruvat-Dehydrogenase im Fructosestoffwechsel hätte zur Folge, dass die stöchiometrischen Mengen an Lactat abnehmen und die an Acetat oder Ethanol zunehmen (Abb. 28). Die Bildung von Acetat aus Pyruvat, welche in Phase I der Fructosefermentation stattfinden könnte (Abb. 28), hätte zur Folge, dass weitere Fructose als alternativer Elektronenakzeptor zu Mannit reduziert würde. Alternativ könnte das Acetyl-CoA in Phase II der Fructosefermentation zu Ethanol reduziert werden (Abb. 28). Tatsächlich wurden aber bisher (Richter, 2004) keine Hinweise erhalten, dass Pyruvat in größerem Umfang nach Schema der Abb. 28 zu Acetat oder Ethanol umgesetzt wird.

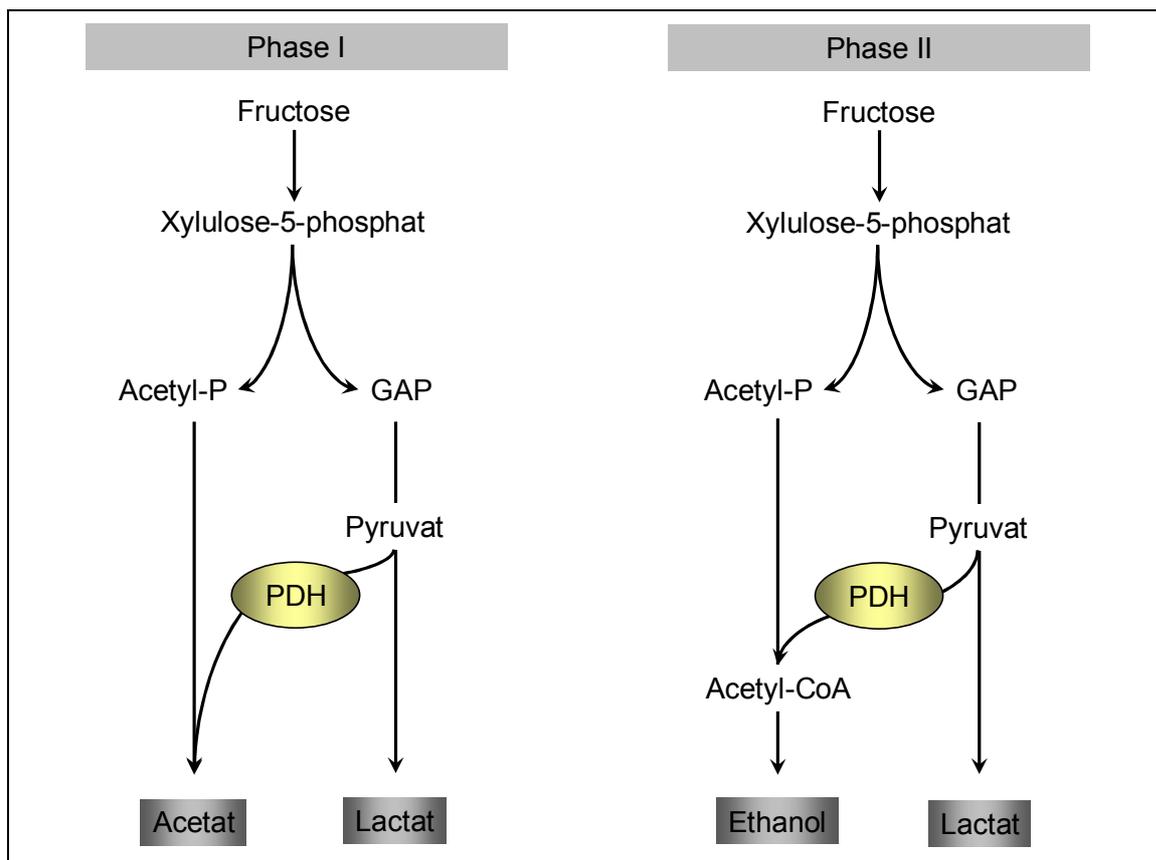


Abb. 28: Mögliche Rolle der Pyruvat-Dehydrogenase bei Wachstum von *O. oeni* auf Fructose. Die Fermentationen sind in Anlehnung an die Ergebnisse von Richter (2004) in die Phase I und Phase II geteilt. Je nachdem, in welcher Phase des Wachstums die PDH eine Funktion ausübt, würden bestimmte Endprodukte entstehen. Da in den Fermentationsbilanzen bisher die Existenz einer solchen Reaktion nicht bemerkt wurde, ist davon auszugehen, dass die Reaktion der PDH nur einen geringen Anteil an der Umsetzung des Pyruvats hat.

Die Rolle der Pyruvat-Dehydrogenase könnte genauer untersucht werden, z. B. durch Umsetzung von $[6^{13}\text{C}]$ -markierter Fructose. Die schweren Isotope sind durch NMR oder durch eine Gaschromatographie-Massenspektrometrie in den Endprodukten nachweisbar. Wachsen die Bakterien mit $[6^{13}\text{C}]$ -Fructose, so kann man die Produkte ermitteln, die aus Glycerinaldehyd-3-phosphat entstehen. Wenn die Pyruvat-Dehydrogenase unter diesen Bedingungen am Energiestoffwechsel teilhat, so ist nicht nur Lactat als markiertes Endprodukt zu finden, sondern auch Acetat oder Ethanol.

Enthält *O. oeni* eine Pyruvatoxidase?

Im Genom von *O. oeni* PSU-1 findet man Gene, die Ähnlichkeiten zu einer Pyruvatoxidase haben und dem entsprechenden COG0028 angehören. Da *O. oeni* bei geringen Sauerstoffkonzentrationen wachsen kann, könnte ein solches Enzym eine Rolle für das semi-aerobe Wachstum spielen. Die Expression der beiden Kandidaten OEOE_0936 und OEOE_1818 wurde nach Zucht auf verschiedenen C-Quellen verglichen. Beide Gene werden konstant in den Zellen exprimiert. Nach Zucht mit Pyruvat unter anaeroben und semi-aeroben Bedingungen ist lediglich im Fall von Gen OEOE_1818 eine geringe Zunahme der Genexpression um den Faktor 2 zu sehen. Bei den Proteomanalysen im Stamm PSU-1 wurde das Protein 1818 nur nach Zucht auf Ribose detektiert. Sowohl die Expressions- als auch die Proteomanalysen können somit bisher keinen Nachweis für die Funktion dieser Gene geben. Möglicherweise hat unter den bisherigen Zuchtbedingungen die Pyruvatoxidase nur geringe Bedeutung. Hat die Pyruvat-Oxidase einen steigenden Anteil an der Umsetzung des Pyruvats, so sollte der Anteil an Lactat in den Produkten zurückgehen. Die Expression der Kandidaten OEOE_0936 und OEOE_1818 sollte unter diesen Bedingungen erneut bestimmt werden.

In *Lactobacillus plantarum*, einem fakultativ heterofermentativen Milchsäurebakterium, spielt die Pyruvatoxidase eine Rolle in der spätlogarithmischen Wachstumsphase bei Wachstum auf Glucose in Gegenwart von Sauerstoff (Sedewitz *et al.*, 1984). Ist in dieser Phase die Glucose verbraucht, wird aus Lactat Acetat gebildet. Diese Regulation führt *L. plantarum* in der spätlogarithmischen Phase durch. Hierzu wird Lactat durch die Lactatoxidase zu Pyruvat oxidiert, welches dann u. a. durch die Pyruvatoxidase zu Acetyl-P und anschließend zu Acetat plus ATP umgesetzt wird. *L. plantarum* besitzt fünf Pyruvatoxidase-Gene, von denen aber bisher nur eine Rolle für die Gene *poxB* und *poxF* nachgewiesen wurde (Goffin *et al.*, 2006). Diese werden durch Sauerstoff induziert und durch Glucose reprimiert. Die Repression erfolgt durch CcpA (Catabolite Control Protein A).

Ausblick

- Durch Proteomanalysen nach Zucht auf Pyruvat soll der Einfluss dieses Substrats weiter untersucht werden. Ein vollständiges Bild, welche Proteine durch Pyruvat in ihrer Expression verändert werden, könnte einen Hinweis auf den Regulationsmechanismus geben.
- Die Rolle der Pyruvat-Dehydrogenase sollte durch ein Markierungsexperiment mit [6¹³C]-Fructose geklärt werden.
- Um die Funktion der Kandidaten für eine Pyruvatoxidase zu klären, muss im Vorfeld eine Zuchtbedingung gefunden werden, in der nach der Fermentationsbilanz eine Pyruvatoxidase-Aktivität vermutet werden kann.

6. Literaturverzeichnis

- Aarnikunnas, J.; Rönnhom, K. and Palva, A. (2002)
 The mannitol dehydrogenase gene (*mdh*) from *Leuconostoc mesenteroides* is distinct from other known bacterial *mdh* genes
Applied Microbiology and Biotechnology 59: 665-671
- Abramson, J.; Smirnova, I.; Kasho, V.; Verner, G.; Kaback, H. R. and Iwata, S. (2003)
 Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*.
Science Aug 1, 301(5633): 610-615
- Abramson, J.; Kaback, H. R. and Iwata, S. (2004)
 Structural comparison of lactose permease and the glycerol-3-phosphate antiporter: members of the major facilitator superfamily
Current Opinion in Structural Biology 14: 413-419
- Barnell, W. O.; Cheol, K. Y. and Conway, T. (1990)
 Sequence and Genetic Organisation of a *Zyomonas mobilis* Gene Cluster That Encodes Several Enzymes of Glucose Metabolism.
Journal of Bacteriology 172 (12): 7227-7240
- Beelman, R.; Gavin III, A. and Keen, R. (1977)
 A new strain of *Leuconostoc oenos* for induced malolactic fermentation in eastern wines.
American Journal of Enology and Viticulture 28: 159-165
- Bergmeyer, H. U. (1983)
 Enzymes: Acetate kinase from *Escherichia coli*.
 Methods of Enzymatic Analysis, Vol III, 3rd edition, Verlag Chemie: 127-128
- Cavin, J. F.; Prevost, H.; Lin, J.; Schmitt, P. and Divies, C. (1989)
 Medium for screening *Leuconostoc oenos* strains defective in malolactic fermentation
Applied and Environmental Microbiology 55: 751-753
- Chaillou, S.; Pouwels, P. H. and Postman, P. W. (1999)
 Transport of D-Xylose in *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus casei*, and *Lactobacillus plantarum*: Evidence of Facilitated Diffusion via the Phosphoenolpyruvate: Mannose Phosphotransferase System.
Journal of Bacteriology 181 (16): 4768-4773
- Delaherche, A.; Bon, E.; Dupe, A.; Lucas, M.; Arveiler, B.; De Daruvar, A. and Lonvaud-Funel, A. (2006)
 Intraspecific diversity of *Oenococcus oeni* strains determined by sequence analysis of target genes.
Applied and Environmental Microbiology 73: 394-403
- DeMoss, R. D. (1955)
 TPN-Alcoholic Dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*
Methods in Enzymology Vol I

- Desroche, N.; Beltramo, C. and Guzzo, J. (2005)
Determination of an internal control to apply reverse transcription quantitative PCR to study stress response in the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*
Journal of Microbiological Methods 60: 325-333
- Dittrich, H. H. und Großmann, M. (2005)
Mikrobiologie des Weines
3. neu bearbeitete Auflage, Verlag Eugen Ulmer
- Eikmanns, B. J.; Follettie, M. T.; Griot, M. U. and Sinskey, A. J. (1989)
The phosphoenolpyruvate carboxylase gene of *Corynebacterium glutamicum*: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression.
Molecular and General Genetics 218: 330-339
- Farinha, M. A. and Kropinski, A. M. (1990)
High efficiency electroporation of *Pseudomonas aeruginosa* using frozen cell suspensions
FEMS Microbiology Letters 58: 221-225
- Garvie, E. I. (1967)
The Growth Factor and Amino Acid Requirements of the Genus *Leuconostoc*, including *Leuconostoc paramesenteroides* (sp. nov.) and *Leuconostoc oenos*.
Journal of General Microbiology 48: 439-447
- Goffin, P.; Muscariello, L.; Lorquet, F.; Stukkens, A.; Prozzi, D.; Sacco, M., Kleerebezem, M. and Hols, P. (2006)
Involvement of Pyruvat Oxidase Activity and Acetat Production in the Survival of *Lactobacillus plantarum* during the Stationary Phase of Aerobic Growth.
Applied and Environmental Microbiology 72 (12): 7933-7940
- Hamann, I. (2003)
Redoxstoffwechsel von *Oenococcus oeni*
Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung an der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
Arbeitsgruppe Prof. Dr. G. Unden
- Henderson, C. E. and Perham, R. N. (1980)
Purification of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex of *Bacillus stearothermophilus* and resolution of its four component polypeptides.
Biochemical Journal 189: 161-172
- Henkin, T. M.; Grundy, F. J.; Nicholson, W. L. and Chambliss, G. H. (1991)
Catabolite repression of alpha-amylase gene expression in *Bacillus subtilis* involves a trans-acting gene product homologous to the *Escherichia coli lacI* and *galR* repressors.
Molecular Microbiology 5 (3): 575-584
- Henkin, T. M. (1996)
The role of CcpA transcriptional regulator in carbon metabolism in *Bacillus subtilis*.
FEMS Microbiology Letters 135: 9-15

- Huang, Y.; Lemieux, M. J.; Song, J.; Auer, M. and Wang, D. N. (2003)
Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli*.
Science 301(5633): 616-620
- Jiang, G. R.; Nikolova, S. and Clark, D. P. (2001)
Regulation of the *ldhA* gene, encoding the fermentative lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*.
Microbiology 147 (Pt 9): 2437-46
- Kim, M.-S.; Shin, J.; Lee, W.; Lee, H.-S. and Oh, B.-H. (2003)
Crystal Structures of RbsD Leading to the Identification of Cytoplasmic Sugar-binding Proteins with a Novel Folding Architecture
Journal of Biological Chemistry 278 (30): 28173-28180
- Krüger, N.; Oppermann, F. B.; Lorenzl, H. and Steinbüchel, A. (1994)
Biochemical and Molecular Characterization of the *Clostridium magnum* Acetoin Dehydrogenase Enzyme System
Journal of Bacteriology 176 (12): 3614-3630
- Kuipers, O. P.; de Ruyter, P. G. G. A.; Kleerebezem, M. and de Vos, W. M. (1997)
Controlled overproduction of proteins by lactic acid bacteria.
Trends in Biotechnology 15: 135-140
- Labarre, C.; Guzzo, J.; Cavan, J. F. and Divies, C. (1996)
Cloning and Characterization of the Genes Encoding the Malolactic Enzyme and the Malate-Permease of *Leuconostoc oenos*
Applied and Environmental Microbiology 62 (4): 1274-1282
- Leenhouts, K.; Buist, G.; Bolhuis, A.; ten Berge, A.; Kiel, J.; Mierau, I.; Dabrowska, M.; Venema, G. and Kok, J. (1996)
A general system for generation unlabelled gene replacements in bacterial chromosomes
Molecular and General Genetics 253(1-2): 217-24
- Leenhouts, K.; Bolhuis, A.; Venema, G. and Kok, J. (1998)
Construction of a food-grade multiple-copy integration system for *Lactococcus lactis*
Applied Microbiology and Biotechnology 49(4): 417-23
- Lengeler, J.; Auburger, A.-M.; Mayer, R. and Pecher, A. (1981)
The Phosphoenolpyruvate-Dependent Carbohydrate: Phosphotransferase System Enzymes II as Chemoreceptors in Chemotaxis of *Escherichia coli* K12
Molecular and General Genetics 183: 163-170
- Lengeler, J. and Jahreis, K. (1996)
Phosphotransferase Systems or PTSs as Carbohydrate Transport and as Signal Transduction Systems.
Handbook of Biological Physics
Volume 2, edited by W. N. Konings, H. R. Kaback and J. S. Lolkema
Elsevier Science B. V.

- Leonardo, M. R.; Dailly, Y. and Clark, D. P. (1996)
Role of NAD in Regulating the *adhE* Gene of *Escherichia coli*.
Journal of Bacteriology 178 (20): 6013-6018
- Luesink, E. J., van Herpen, R. E., Grossiord, B. P., Kuipers, O. P. and De Vos, W. M. (1998)
Transcriptional activation of the glycolytic *las* operon and catabolite repression of the *gal* operon in *Lactococcus lactis* are mediated by the catabolite control protein CcpA.
Molecular Microbiology 30: 789-798
- Liu, S.-Q. (2002)
Malolactic fermentation in wine – beyond deacidification
Journal of Applied Microbiology 92: 589-601
- Lonvaud-Funel, A. (1999)
Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine
Antonie van Leeuwenhoek 76: 317-331
- Markowitz, V. M.; Korzeniewski, F.; Palaniappan, K.; Szeto, E.; Werner, G.; Padki, A.; Zhao, X.; Dubchak, I.; Hugenholtz, P.; Anderson, I.; Lykidis, A.; Mavromatis, K.; Ivanova, N. and Kyrpides, N. (2006)
The integrated microbial genomes (IMG) system
Nucleic Acids Research 34 Database issue
- Miller, J.H. (1992)
A short course in bacterial genetics
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Mills, D. A.; Rawsthorne, H.; Parker, C.; Tamir, D. and Makarova, K. (2005)
Genomic analysis of *Oenococcus oeni* PSU-1 and its relevance to winemaking
FEMS Microbiology Reviews 29: 465-475
- Muscariello, L.; Marasco, R.; De Felice, M. and Sacco, M. (2001)
The functional *ccpA* gene is required for carbon catabolite repression in *Lactobacillus plantarum*.
Applied and Environmental Microbiology 67: 2903-2907
- Nakajima, H.; Hagting, A.; Kunji, E. R. S.; Poolman, B. and Konings, W. N. (1997)
Cloning and Functional Expression in *Escherichia coli* of the Gene Encoding the Di- and Tripeptide Transport Protein of *Lactobacillus helveticus*
Applied and Environmental Microbiology 63 (6): 2213-2217
- Oppermann, F. B. and Steinbüchel, A. (1994)
Identification and Molecular Characterization of the *aco* Gene Encoding the *Pelobacter carbinolicus* Acetoin Dehydrogenase Enzyme System
Journal of Bacteriology 176 (2): 469-485
- Parche, S.; Belet, M.; Rezzonico, E.; Jacobs, D.; Arigoni, F.; Titgemeyer, F. and Jankovic, I. (2006)
Lactose-over-Glucose Preference in *Bifidobacterium longum* NCC2705: *glcP*, Encoding a Glucose Transporter, Is Subject to Lactose Repression
Journal of Bacteriology 188 (4): 1260-1265

- Patel, H. M.; Kraszewski, J. L. and Mukhopadhyay, B. (2004)
The Phosphoenolpyruvate Carboxylase from *Methanothermobacter thermoautotrophicus* Has a Novel Structure.
Journal of Bacteriology 186 (15): 5129-5137
- Pao, S. S.; Paulsen, I. T. and Saier, M. H. Jr. (1998)
Major Facilitator Superfamily
Microbiology and Molecular Biology Reviews 62 (1): 1-34
- Pfaffl, M.W. (2001)
A new mathematical model for relative quantification on real-time RT-PCR
Nucleic Acids Research 29 (9): 2002-2007
- Poolman, B. (2002)
Transporters and their roles in LAB cell physiology
Antonie van Leeuwenhoek 82: 147-164
- Richter, H. (2000)
Bedeutung von Pantothenensäure für die Unterdrückung der Bildung von Erythrit und Essigsäure bei der Fermentation von Glucose durch *Oenococcus oeni*.
Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung an der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
Arbeitsgruppe Prof. Dr. G. Uden
- Richter, H.; Vlad, D. and Uden, G. (2001)
Significance of pantothenate for glucose fermentation by *Oenococcus oeni* and for suppression of the erythritol and acetate production
Archives of Microbiology 175 (1): 26-31
- Richter, H.; Hamann, I. and Uden, G. (2003)_a
Use of the mannitol pathway in fructose fermentation of *Oenococcus oeni* due to limiting redox regeneration capacity of the ethanol pathway
Archives of Microbiology 179: 227-233
- Richter, H.; De Graaf, A. A.; Hamann, I. and Uden, G. (2003)_b
Significance of phosphoglucose isomerase for the shift between heterolactic and manniol fermentation of fructose by *Oenococcus oeni*
Archives of Microbiology 180: 465-470
- Richter, H. (2004)
Zuckertransport und Regulation des Hexosestoffwechsels bei *Oenococcus oeni*
Promotion am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung an der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
Arbeitsgruppe Prof. Dr. G. Uden
- Riedel, C.; Rittmann, D.; Dangel, P.; Möckel, B.; Petersen, S.; Sahm, H. and Eikmanns, B. J. (2001)
Characterization of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene from *Corynebacterium glutamicum* and significance of the enzyme for growth and amino acid production.
Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology 3: 573-583

- Romano, A. H.; Trifone, J. D. and Brustolon, M. (1979)
Distribution of the Phosphoenolpyruvate:Glucose Phosphotransferase System in Fermentative Bacteria
Journal of Bacteriology 139 (1): 93-97
- Saier, M. H. Jr.; Tran, C. V. and Barabote, R. D. (2006)
TCDB: the Transporter Classification Database for membrane transport protein analyses and information
Nucleic Acids Research Vol. 34 Database issue
- Salema, M.; Poolman, B.; Lolkema, J.; Loureiro Dias, M. and Konings, W. (1994)
Uniport of monoanionic L-malate in membrane vesicles from *Leuconostoc oenos*
European Journal of Biochemistry 225: 289-295
- Salema, M.; Lolkema, J.; San Romao, M. and Loureiro Dias, M. (1996)
The Proton Motive Force Generated in *Leuconostoc oenos* by L-Malate Fermentation
Journal of Bacteriology 178 (11): 3127-3132
- Salou, P.; Loubiere, P. and Pareilleux, A. (1994)
Growth and Energetics of *Leuconostoc oenos* during Cometabolism of Glucose with Citrate and Fructose.
Applied Environmental Microbiology 60: 1459-1466
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989)
Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed.
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sauer, U. and Eikmanns, B. J. (2005)
The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria.
FEMS Microbiology Reviews 29 (4): 765-794
- Sato, H.; Yanagida, F.; Shinohara, T.; Suzuki, M. and Yokotsuka, K. (2001)
Intraspecific diversity of *Oenococcus oeni* isolated during red wine-making in Japan
FEMS Microbiology Letters 202 (1): 109-114
- Sedewitz, B.; Schleifer, K. H. and Götz, F. (1984)
Physiological Role of Pyruvate Oxidase in the Aerobic Metabolism of *Lactobacillus plantarum*
Journal of Bacteriology 160 (1): 462-465
- Strößinger, S. (2007)
Zucker- und Citratstoffwechsel von *Oenococcus oeni*
Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung an der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
Arbeitsgruppe Prof. Dr. G. Unden
- Tatusov, R. L.; Koonin, E. V. and Lipman, D. J. (1997)
A Genomic Perspective on Protein Families
Science 278: 631-637

- Titgemeyer, F. and Hillen, W. (2002)
Global control of sugar metabolism: a Gram-positive solution.
Antonie van Leeuwenhoek 82: 59-71
- Vardy, E.; Arkin, I. T.; Gottschalk, K. E.; Kaback, H. R. and Schuldiner, S. (2004)
Structural conservation in the major facilitator superfamily as revealed by comparative modeling.
Protein Science 13: 1832-1840
- Veigha-da-Cunha, M.; Santos, H. and Schaftingen, van E. (1993)
Pathway and Regulation of Erythritol Formation in *Leuconostoc oenos*
Journal of Bacteriology 175 (13): 3941-3948
- Wagner, N.; Tran, Q. H.; Richter, H.; Selzer, P. M. and Uden, G. (2005)
Pyruvate Fermentation by *Oenococcus oeni* and *Leuconostoc mesenteroides* and Role of Pyruvate Dehydrogenase in Anaerobic Fermentation
Applied and Environmental Microbiology 71 (9): 4966-4971
- Warner, J. B. and Lolkema, J. S. (2003)
CcpA-Dependent Carbon Catabolite Repression in Bacteria.
Microbiology and Molecular Biology Reviews 67(4): 475-490
- Yanisch-Perron, C. J.; Vierara, J. and Messing, J. (1985)
Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors
Gene 33: 103-119
- Zaunmüller, T.
Stoffwechselflussanalyse mit ¹³C-markierten Substraten von *Oenococcus oeni* und Menachinon-abhängige Succinatdehydrogenase von *Desulfovibrio desulfuricans* und *Desulfovibrio vulgaris*
Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Weinforschung an der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
Arbeitsgruppe Prof. Dr. G. Uden
- Zaunmüller, T.; Eichert, M.; Richter, H. and Uden, G. (2006)
Variations in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organic acids
Applied Microbiology and Biotechnology 72: 421-429
- Zhang, D.-S. and Lovitt, R. W. (2005)
Studies on growth and metabolism of *Oenococcus oeni* on sugars and sugar mixtures
Journal of Applied Microbiology 99: 565-572
- Zuker, M. (2003)
Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction
Nucleic Acids Research 31 (13): 3406-3415

Zuniga, M.; Pardo, I. and Ferrer, S. (1995)
Transposons Tn916 and Tn925 can transfer from *Enterococcus faecalis* to
Leuconostoc oenos
FEMS Microbiology Letters 135: 179-185

Internetadressen

<http://www.jgi.doe.gov/>

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=Retrieve&dopt=Protein+Table
&list_uids=20018](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=Retrieve&dopt=Protein+Table&list_uids=20018)

IMG-Datenbank

<http://img.jgi.doe.gov/>

Primeranalyse für die Real-time quantitative PCR

http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi

<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>

<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/>

<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>

Vorhersage von Transmembranhelices

<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

Vorhersage von Operonstrukturen

<http://www.softberry.com/berry.phtml>

Transport Classification Database

<http://www.tcdb.org/>

Medien

www.dsmz.de/

7. Veröffentlichungen

Zaunmüller, T., Kelly, D. J., Glöckner, F. O. and Uden, G. (2006)

Succinate dehydrogenase functioning by a reverse redox loop mechanism and fumarate reductase in sulphate-reducing bacteria.

Microbiology 152: 2443-2453

Zaunmüller, T.; Eichert, M.; Richter, H. and Uden, G. (2006)

Variations in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organic acids

Applied Microbiology and Biotechnology 72: 421-429

Zaunmüller, T.; Fischer, E.; Sauer, U. and Uden, G.

Limited amino acid synthesis by *Oenococcus oeni* B1: Role for an archaeal PpcA-type phosphoenolpyruvate-carboxylase in oxaloacetate synthesis
eingereicht

8. Anhang

Tabelle 22: COGs, die zur Suche von Transportern im Genom von *O. oeni* PSU-1 in der IMG-Datenbank herangezogen wurden. Alle COGs beinhalten sekundäre Transporter, Phosphotransferasesysteme und ABC-Transporter, die mit der Aufnahme von Hexosen assoziiert sind. Die Angaben entsprechen der IMG-Datenbank Version vom 26.07.2007

COG	Beschreibung
395	ABC -type sugar transport system, permease component
488	ATPase components of ABC transporters with duplicated ATPase domains
580	Glycerol uptake facilitator and related permeases (Major Intrinsic Protein Family)
697	Permeases of the drug/metabolite transporter (DMT) superfamily
738	Fucose permease
1101	ABC -type uncharacterized transport system, ATPase component
1079	Uncharacterized ABC -type transport system, permease component
1129	ABC -type sugar transport system, ATPase component
1134	ABC -type polysaccharide/polyol phosphate transport system, ATPase component
1175	ABC -type sugar transport systems, permease components
1123	ATPase components of various ABC -type transport systems, contain duplicated ATPase
1263	Phosphotransferase system IIC components, glucose/maltose/N-acetylglucosamine-specific
1264	Phosphotransferase system IIB components
1299	Phosphotransferase system , fructose-specific IIC component
1440	Phosphotransferase system cellobiose-specific component IIB
1445	Phosphotransferase system fructose-specific component IIB
1455	Phosphotransferase system cellobiose-specific component IIC
1447	Phosphotransferase system cellobiose-specific component IIA
1653	ABC -type sugar transport system, periplasmic component
1744	Uncharacterized ABC -type transport system, periplasmic component/surface lipoprotein
1762	Phosphotransferase system mannitol/fructose-specific IIA domain (Ntr-type)
1869	ABC -type ribose transport system, auxiliary component
1879	ABC -type sugar transport system, periplasmic component
2182	Maltose-binding periplasmic proteins/domains
2190	Phosphotransferase system IIA components
2211	Na ⁺ /melibiose symporter and related transporters
2213	Phosphotransferase system , mannitol-specific IIBC component
2252	Permeases
2814	Arabinose efflux permease
2893	PTS system fructose IIA component
2984	ABC -type uncharacterized transport system, periplasmic component
3414	Phosphotransferase system , galactitol-specific IIB component
3444	Phosphotransferase system , mannose/fructose/N-acetylgalactosamine-specific component IIB
3715	Phosphotransferase system , mannose/fructose/N-acetylgalactosamine-specific component IIC
3716	Phosphotransferase system , mannose/fructose/N-acetylgalactosamine-specific component IID

Fortsetzung Tabelle 22

3730	Phosphotransferase system sorbitol-specific component IIC
3731	Phosphotransferase system sorbitol-specific component IIA
3732	Phosphotransferase system sorbitol-specific component IIBC
3775	Phosphotransferase system , galactitol-specific IIC component
3822	ABC -type sugar transport system, auxiliary component
3833	ABC -type maltose transport systems, permease component
3839	ABC -type sugar transport systems, ATPase components
3845	ABC -type uncharacterized transport systems, ATPase components
4158	Predicted ABC -type sugar transport system, permease component
4209	ABC -type polysaccharide transport system, permease component
4211	ABC -type glucose/galactose transport system, permease component
4213	ABC -type xylose transport system, periplasmic component
4120	ABC -type uncharacterized transport system, permease component
4152	ABC -type uncharacterized transport system, ATPase component
4214	ABC -type xylose transport system, permease component
4603	ABC -type uncharacterized transport system, permease component
4668	Mannitol/fructose-specific phosphotransferase system , IIA domain
4975	Putative glucose uptake permease

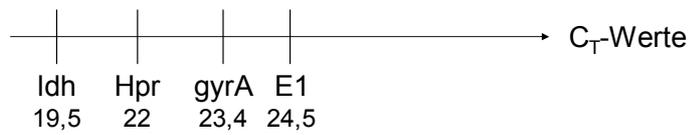
Tabelle 23: Proteinfamilien, die zur Suche von Transportern im Genom von *O. oeni* PSU-1 in der IMG-Datenbank herangezogen wurden. Alle Pfams enthalten sekundäre Transporter, Phosphotransferasesysteme und ABC-Transporter, die mit der Aufnahme von Hexosen assoziiert sind. Die Angaben entsprechen der IMG-Datenbank Version vom 26.07.2007

Pfam	Beschreibung
00005	ABC transporter
00083	Sugar (and other) transporter (Mitglied des Major Facilitator Superfamily clans)
00230	Major intrinsic protein (MIP) MIP family proteins exhibit essentially two distinct types of channel properties: (1) specific water transport by the aquaporins, and (2) small neutral solutes transport, such as glycerol by the glycerol facilitators. A number of transmembrane channel proteins can be grouped together on the basis of sequence similarities. These include among others: Bacterial glycerol facilitator protein (gene <i>glpF</i>), which facilitates the movement of glycerol across the cytoplasmic membrane. MIP family proteins are thought to contain 6 TM domains.
00358	phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system , EIIA 1
00359	Phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system , EIIA 2
00367	phosphotransferase system , EIIB
00528	Binding-protein-dependent transport system inner membrane component The alignments cover the most conserved region of the proteins, which is thought to be located in a cytoplasmic loop between two transmembrane domains. The members of this family have a variable number of transmembrane helices
00664	ABC transporter transmembrane region This family represents a unit of six transmembrane helices. Many members of the ABC transporter family (pfam00005) have two such regions

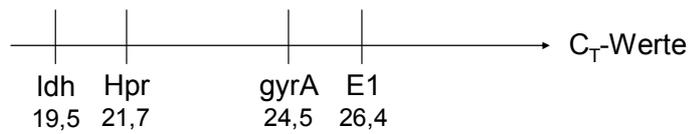
Fortsetzung Tabelle 23

- 01061 **ABC-2 type transporter**
A number of bacterial transport systems have been found to contain integral membrane components that have similar sequences: these systems fit the characteristics of ATP-binding cassette transporters. The proteins form homo- or hetero-oligomeric channels, allowing ATP-mediated transport. Hydrophathy analysis of the proteins has revealed the presence of 6 possible transmembrane regions. These proteins belong to family 2 of ABC transporters.
- 01547 **Bacterial extracellular solute-binding protein**
On the basis of sequence similarities, the vast majority of these solute-binding proteins can be grouped into eight families of clusters, which generally correlate with the nature of the solute bound. Family 1 currently includes the periplasmic proteins maltose/maltodextrin-binding proteins of Enterobacteriaceae (*malE*) and *Streptococcus pneumoniae* malX; multiple oligosaccharide binding protein of *St. mutans* (*msmE*); *E. coli* glycerol-3-phosphate-binding protein; *Serratia marcescens* iron-binding protein and *E. coli* thiamine-binding protein.
- 02255 **PTS system, Lactose/Cellobiose specific IIA subunit**
The lactose/cellobiose-specific family is one of four structurally and functionally distinct group IIA PTS system enzymes. This family of proteins normally function as a homotrimer.
- 02302 **PTS system, Lactose/Cellobiose specific IIB subunit**
- 02378 **Phosphotransferase system, EIIC**
- 02379 **PTS system, Fructose specific IIB subunit**
- 02653 **Branched-chain amino acid transport system / permease component**
This is a large family mainly comprising high-affinity branched-chain amino acid transporter proteins such as *E. coli* LivH and LivM. Also found with in this family are **proteins from the galactose transport system permease, and a ribose transport system**
- 03608 **PTS system enzyme II sorbitol-specific factor**
- 03609 **PTS system sorbose-specific iic component**
- 03610 **PTS system fructose IIA component**
- 03611 **PTS system Galactitol-specific IIC component**
- 03612 Sorbitol **phosphotransferase** enzyme II N-terminus
- 03613 **PTS system mannose/fructose/sorbose family IID component**
- 03829 **PTS system, glucitol/sorbitol specific IIA component**
- 03830 **PTS system sorbose subfamily IIB component**
- 04215? SgaT_UlaA - Putative sugar-specific **permease**
- 05025 **RbsD / FucU transport protein family**
The *E. coli* high-affinity ribose-transport system consists of six proteins encoded by the rbs operon. This family also includes FucU a protein from the fucose biosynthesis operon that is presumably also involved in fucose transport by similarity to RbsD
- 06800 **Sugar transport protein**
This is a family of bacterial sugar transporters approximately 300 residues long. Members include glucose uptake proteins, ribose transport proteins, and several putative and hypothetical membrane proteins probably involved in sugar transport across bacterial membranes
-

Ribose



Glucose



Fructose

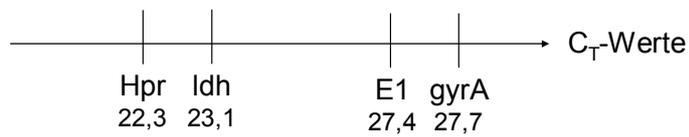


Abb 29: Vergleich der CT-Werte der Haushaltsgene gyrA und IdhD mit den CT-Werten der universellen Komponenten von Phosphotransferasesystemen E1 und Hpr nach Zucht mit Ribose, Glucose und Fructose. Die CT-Werte liegen in ähnlichen Bereichen. Somit kann man davon ausgehen, dass die beiden Proteine E1 und Hpr in ausreichendem Maß in der Zelle exprimiert werden und eine Funktion übernehmen können.