

**Pyruvat-Produktion durch
acetatauxotrophe
Escherichia coli - Stämme**

**Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

**vorgelegt von
Tanja Gerharz
aus Duisburg**

Jülich, 2003

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Referent: Prof. Dr. M. Bott

Korreferent: Prof. Dr. K.E. Jäger

Tag der mündlichen Prüfung: 28.05.2003

Inhaltsverzeichnis

I	Zusammenfassung.....	1
II	Einleitung	2
III	Material und Methoden.....	11
1	Materialien.....	11
2	Bakterienstämme.....	11
3	Plasmide	12
4	Oligonukleotide	13
5	Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung von Bakterien	15
5.1	Nährmedien und Kultivierungsbedingungen	15
5.2	Stammhaltung.....	16
5.3	Bestimmung von Wachstums- und Stoffwechselfparametern.....	16
5.3.1	Bestimmung des Wachstums von Bakterien-Kulturen	16
5.3.2	Bestimmung des pH-Wertes.....	16
5.3.3	Enzymatische Bestimmung der Glucose- und Pyruvat-Konzentration.....	17
5.4	Bestimmung der Konzentration organischer Säuren.....	18
6	Mikrobiologische und molekularbiologische Methoden.....	19
6.1	DNA-Isolierung.....	19
6.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA.....	19
6.1.2	Isolierung chromosomaler DNA	20
6.1.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	20
6.2	Reinigung von DNA.....	20
6.3	Restriktion von DNA	21
6.4	Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen	21
6.5	Agarose-Gelelektrophorese	21
6.5.1	DNA-Agarose-Gelelektrophorese	21
6.5.2	RNA-Agarose-Gelelektrophorese	22
6.6	Klonierungsexperimente mit <i>E. coli</i>	22
6.6.1	Herstellung kompetenter Zellen nach der Calciumchlorid-Methode	22
6.6.2	Herstellung kompetenter Zellen nach der Rubidiumchlorid-Methode.....	23
6.6.3	Herstellung elektrokompenter Zellen	23
6.6.4	Ligation	24
6.6.5	Transformation von <i>E. coli</i>	24
6.7	Amplifikation von DNA-Fragmenten durch Polymerasekettenreaktion (PCR) ..	25
6.7.1	Standard-PCR.....	25
6.7.2	Kolonie-PCR	26
6.8	Konstruktion von Deletionsmutanten mit Hilfe des pKO3-Systems	26
6.9	P1vir-Phagentransduktion	27

6.9.1	Herstellung des Phagenlysates	27
6.9.2	Bestimmung des Phagentiters	27
6.9.3	Durchführung der Phagentransduktion	28
6.10	Tn5-Transposonmutagenese.....	28
6.11	Southern-Blot-Analyse.....	29
7	Biochemische Methoden	30
7.1	Zellaufschluß und -fraktionierung.....	30
7.2	Bestimmung der Lactat-Dehydrogenase-Aktivität.....	31
7.3	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	31
7.4	Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen.....	32
7.4.1	Zweidimensionale Gelelektrophorese von Proteinen.....	32
7.4.2	Proteindetektion mit kolloidalem Coomassie Brilliant Blau G-250	33
7.5	MALDI-TOF-Massenspektrometrie	33
7.5.1	Probenaufbereitung für die Massenspektrometrie.....	33
7.5.2	MALDI-TOF-Massenspektrometrie	34
8	Genexpressionsanalysen	35
8.1	Isolierung und Analyse von RNA	35
8.2	Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden.....	36
8.3	DNA-Chip-Hybridisierung.....	36
8.4	Auswertung von DNA-Chips	39
IV	Ergebnisse	41
1	Charakterisierung des acetatauxotrophen <i>Escherichia coli</i>-Stammes YYC202 41	
1.1	Bestätigung der Acetat-Auxotrophie von YYC202	42
1.2	Co-Verstoffwechselung von Glucose und Acetat durch <i>E. coli</i> YYC202	42
1.3	Acetat-Toleranz von <i>E. coli</i> YYC202	44
2	Versuche mit wachsenden <i>E. coli</i> YYC202-Kulturen..... 45	
2.1	Pyruvat-Bildung durch <i>E. coli</i> YYC202	45
2.2	Einfluss der Acetat-Konzentration auf Wachstum und Pyruvat-Produktion	46
2.3	Einfluss der Glucose-Konzentration auf Wachstum und Pyruvat-Produktion.....	47
3	Versuche zur Glucose-Umsetzung mit Zellsuspensionen von <i>E. coli</i> YYC202... 50	
3.1	Einfluss des pH-Wertes auf die Pyruvat-Bildung durch Zellsuspensionen	50
3.2	Einfluss der Zelldichte auf die Pyruvat-Produktion durch Zellsuspensionen	51
3.3	Umsetzung hoher Glucose-Konzentrationen (100 mM) durch Zellsuspensionen.....	52
3.4	Glucose-Umsetzung durch Zellsuspensionen von <i>E. coli</i> YYC202 im Fermenter	54
4	Konstruktion und Charakterisierung eines <i>E. coli</i> YYC202-Stammes mit fehlender D-Lactat-Dehydrogenase-Aktivität (YYC202<i>ldhA</i>)..... 56	
5	Einfluss der Pyruvat-Konzentration auf das Wachstum von MG1655	59

6	Untersuchungen zum Pyruvat-Transport in <i>E. coli</i>	61
6.1	Co-Verstoffwechslung von Glucose und Pyruvat durch MG1655.....	61
6.2	Einfluss von Inhibitoren auf den Pyruvat-Export	63
6.2.1	Einfluss von Arsenat auf den Pyruvat-Export.....	63
6.2.2	Einfluss von N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid auf den Pyruvat-Export.....	63
6.2.3	Einfluss von Carbonylcyanid- <i>m</i> -chlorphenylhydrazon auf den Pyruvat-Export	64
6.2.4	Einfluss von Trichlordiphenylharnstoff auf den Pyruvat-Export.....	67
6.3	Auswirkung einer <i>acrAB</i> -Mutation auf die Pyruvat-Produktion	68
6.4	Suche nach dem Gen für den Pyruvat-Importer.....	69
7	Vergleichende Transkriptom-Analyse durch DNA-Chips	71
7.1	Vergleich der Genexpression von <i>E. coli</i> YYC202-pBR322 (<i>aceEF</i>) und <i>E. coli</i> YYC202-pGS87 (<i>aceEF</i> ⁺) bei Wachstum in Glucose-Minimalmedium mit Acetat	72
7.2	Vergleich des Transkriptoms von Pyruvat-Produzent (YYC202) und Wildtyp (MG1655) bei Wachstum in Glucose-Minimalmedium mit Acetat.....	79
7.3	Vergleich der Genexpression von <i>E. coli</i> YYC202-pGS87 und <i>E. coli</i> MG1655 bei Wachstum in Glucose-Minimalmedium mit Acetat.....	83
7.4	Auswirkung eines Pyruvat-Pulses auf die globale Genexpression in MG1655...	86
8	Vergleichende Proteomanalysen durch zweidimensionale Gelelektrophorese und Peptidmassenfingerprint-Analyse	89
8.1	Vergleich von <i>E. coli</i> MG1655 und <i>E. coli</i> YYC202 bei Wachstum in Minimalmedium mit Glucose und Acetat	89
8.2	Vergleich des Proteinmusters von <i>E. coli</i> YYC202 <i>ldhA</i> zu unterschiedlichen Zeitpunkten einer Fed-Batch-Fermentation	92
8.2.1	Fed-Batch-Fermentation unter acetatlimitierenden Bedingungen	92
8.2.2	Fed-Batch-Fermentation unter acetatakkumulierenden Bedingungen	97
V	Diskussion	104
1	Parallele Umsetzung von Glucose und Acetat durch <i>E. coli</i> YYC202	104
2	Die Acetat-Toleranz von <i>E. coli</i> YYC202	105
3	Vergleich der Pyruvat-Produktion aus Glucose durch verschiedene Organismen ..	106
4	Bildung von Lactat als Nebenprodukt.....	109
5	Globale Genexpressionsveränderungen in Pyruvat-Produktions- und Nicht-Produktions-Stämmen	109
	Veränderte Expression von Genen der Säureschutzantwort	109
	Veränderte Expression der Chemotaxis- und Flagellen-Gene	111
	Erhöhte Expression der NADH-Dehydrogenase.....	112
6	Einfluss von Pyruvat auf die globale Genexpression in MG1655	112
	Reduzierte Expression von Genen für den Transport alternativer Kohlenstoff-Quellen.....	112
7	Proteomanalyse	114
VI	Literaturverzeichnis	116

Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
Amp ^R	Ampicillinresistenz
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin, Kohlenstoff
CCCP	Carbonylcyanid- <i>m</i> -chlorphenylhydrazon
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cm	Zentimeter
Cm ^R	Chloramphenicolresistenz
d	Dicke der Küvette
ddH ₂ O	doppeltdestilliertes Wasser
Da	Dalton
DCCD	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DH	Dehydrogenase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
E	Extinktion
ε	Extinktionskoeffizient
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
Δ	delta
ΔG	Änderung der freien Energie
<i>g</i>	-fache Erdbeschleunigung (9.81 m/s ²)
g	Gramm
G	Guanin
G-6-P	Glucose-6-Phosphat
k	Kilo (10 ³)
<i>K_m</i>	Michaelis-Konstante
kb	Kilobasenpaare
Kan ^R	Kanamycinresistenz
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LDH	Lactat-Dehydrogenase
μ	mikro- (10 ⁻⁶)
m	milli- (10 ⁻³)
M	molar (mol/l)
MALDI-TOF	matrix assisted laser desorption ionisation-time of flight
<i>M_r</i>	relatives Molekulargewicht
min	Minute

MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
n	nano- (10^{-9})
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, oxidiert
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, reduziert
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat, reduziert
OD _x	Optische Dichte bei der Wellenlänge von x nm
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PEP	Phosphoenolpyruvat
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sm ^R	Streptomycinresistenz
T	Thymin
T _M	Schmelztemperatur der DNA
TMP	Tris-Maleat-Puffer
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat/EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tet ^R	Tetracyclinresistenz
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit; Einheit der Enzymaktivität ($\mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$)
UE	Untereinheit
ÜN	über Nacht
U.p.m.	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	volume per volume (Volumen pro Volumen)
wt	Wildtyp
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)

Drei- und Ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren

Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Asparaginsäure	Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q	Serin	Ser	S
Glutaminsäure	Glu	E	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V

I ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war die Konstruktion und Charakterisierung von rekombinanten *Escherichia coli*-Stämmen, die Glucose möglichst effizient zu Pyruvat umsetzen und dieses ins Medium ausscheiden. Als Ausgangsstamm diente *E. coli* YYC202, der aufgrund von Mutationen in den Genen für den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex ($\Delta aceEF$), die Pyruvat-Formiat-Lyase (*pfl-1*), die Pyruvat:Chinon-Oxidoreduktase (*poxB1*) sowie die Phosphoenolpyruvat-Synthetase (*pps*) nicht mehr in der Lage ist, Pyruvat zu Acetyl-CoA, Acetat oder Phosphoenolpyruvat umzusetzen. In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass der Stamm bei Wachstum auf Glucose-Minimalmedien acetatauxotroph ist und diese Auxotrophie durch das Plasmid pGS87, welches die Gene für den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex trägt, komplementiert wird. Im Gegensatz zu *E. coli* MG1655 verstoffwechselt YYC202 Glucose und Acetat parallel und zeigt eine höhere Resistenz gegenüber Acetat als MG1655.

Untersuchungen mit aerob wachsenden Kulturen von *E. coli* YYC202 ergaben, dass in Abhängigkeit von der eingesetzten Glucose-Konzentration, der eingesetzten Acetat-Konzentration und dem pH-Wert bis zu 1,7 Mol Pyruvat/Mol Glucose gebildet wurden. Mit nicht-wachsenden Zellen konnte eine fast vollständige Umsetzung von Glucose in Pyruvat erreicht werden ($>1,9$ Mol/Mol). Da bei höheren Glucose-Konzentrationen sowie bei O₂-Mangel beträchtliche Mengen an Lactat als Nebenprodukt auftraten, wurde das *ldhA*-Gen für die NAD⁺-abhängige D-Lactat-Dehydrogenase inaktiviert. Im daraus resultierenden Stamm YYC202*ldhA* war die Lactat-Bildung vollständig eliminiert, was zu einer Steigerung der molaren Ausbeute und der Raum-Zeit-Ausbeute führte.

Bei vergleichenden Transkriptomanalysen zwischen *E. coli* YYC202-pBR322 (Pyruvat-Produzent) und YYC202-pGS87, der aufgrund eines aktiven Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes kein Pyruvat bildete, zeigte sich, dass u.a. die mRNA-Level von Säurestress-Genen in YYC202-pBR322 erhöht waren. Die Pyruvat-Bildung aus Glucose führt also zu einer Ansäuerung des Cytoplasmas. Außerdem waren in YYC202-pBR322 die mRNA-Level von einigen Genen für Transportproteine erhöht, darunter der Na⁺/Serin-Symporter SstT und der noch nicht charakterisierte Transporter YbgH. Ob diese beiden Proteine am Import oder Export von Pyruvat beteiligt sind, muss in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden.

Da *E. coli* MG1655 Pyruvat und Glucose gleichzeitig als C-Quelle verwendet, muss der Pyruvat-Importer permanent aktiv sein. Versuche zur Identifizierung des entsprechenden Gens waren bisher nicht erfolgreich. Untersuchungen zum Einfluss von Inhibitoren auf die Pyruvat-Bildung durch *E. coli* YYC202 zeigten, dass das Protonophor Carbonylcyanid-*m*-chlorphenylhydrazon die Glucose-Umsetzung zu Pyruvat in Abhängigkeit vom pH stark hemmte. Dies deutet auf einen sekundär aktiven Export des Pyruvats aus der Zelle hin.

II EINLEITUNG

Pyruvat, das Salz der Brenztraubensäure, ist in vielen katabolen und anabolen Stoffwechselwegen involviert, z.B. in der Glykolyse, der Gluconeogenese oder in der Aminosäure-Biosynthese. Daher ist es ein zentrales Intermediat im zellulären Stoffwechsel. Industriell wird Pyruvat als Vorstufe für eine Vielzahl von Chemikalien und Pharmazeutika verwendet, wie beispielsweise L-DOPA (Park *et al.*, 1998), L-Ephedrin (Rogers *et al.*, 1997) oder L-Tryptophan (Nakazawa *et al.*, 1972). In einigen Studien wurde behauptet, dass Pyruvat den Abbau körpereigener Fette stimuliert sowie zu einer effektiven Reduktion des Cholesterin-Spiegels führt (Stanko *et al.*, 1990, 1992, 1994). Pyruvat soll deswegen als „Schlankmacher“ wirken und wird als Nahrungsergänzungsmittel angeboten und verwendet. Die Arzneimittelkommission der Deutschen Ärzteschaft widersprach allerdings diesen Behauptungen (<http://www.akdae.de/47/Archiv/2000/Pyruvat.html>). Eine Reihe neuerer Untersuchungen deuten darauf hin, dass Brenztraubensäure als Antioxidationsmittel wirkt und zur Behandlung von Erkrankungen eingesetzt werden kann, die durch oxidativen Stress verursacht werden und mit einem vermehrten Zelltod (Apoptose) verbunden sind (Borle & Stanko, 1996; DeBoer *et al.*, 1993).

Herstellung von Pyruvat

Das klassische Verfahren der Brenztraubensäure-Herstellung ist das Brenzen von Traubensäure mit Kaliumhydrogensulfat (Abb. 1; Howard, 1932). In diesem Prozess wird Traubensäure durch Dehydratisierung und Decarboxylierung zu Pyruvat umgesetzt. Diese "Brenzreaktion", die auch als trockene Destillation oder Pyrolyse bezeichnet wird, ist noch heute eines der wichtigsten Verfahren zur Produktion von Pyruvat im industriellen Maßstab. Nachteile dieses Verfahrens sind unter anderem die begrenzte Verfügbarkeit des Edukts Traubensäure sowie die geringe Ausbeute von 0,5 Mol Pyruvat/Mol Traubensäure. Außerdem wird für dieses Verfahren sehr viel Energie benötigt, da der Siedepunkt von Traubensäure bei etwa 200°C liegt.

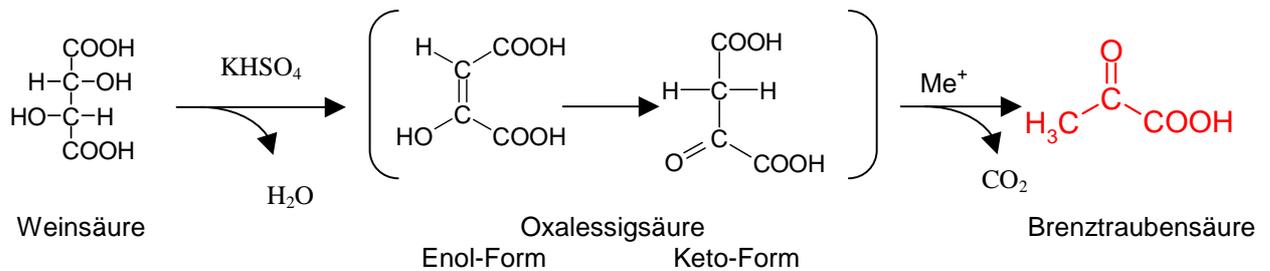


Abb. 1: Schematische Darstellung der Pyrolyse von Traubensäure zu Pyruvat. Me^+ = Metallionen

In den letzten Jahren wurden mehrere biotechnologische Prozesse zur Pyruvat-Synthese aus Lactat und Glucose veröffentlicht und patentiert (Li *et al.*, 2001a). Ein Verfahren zur Produktion von Pyruvat aus Lactat verwendet permeabilisierte Zellen der methylotrophen Hefen *Hansenula polymorpha* oder *Pichia pastoris*, die das Gen für die (*S*)-Hydroxysäure-Oxidase aus Spinat exprimieren (Anton *et al.*, 1996; Eisenberg *et al.*, 1997). Das bei der Lactat-Oxidation gebildete toxische H_2O_2 wird durch die endogene Katalase zu H_2O und O_2 umgesetzt (Abb. 2). Mit diesem Prozess konnte eine 1 M Lösung von Natrium- oder Ammonium-L-Lactat zu über 98 % in Pyruvat umgesetzt werden. Burdick & Schaeffer (1987) beschrieben auch die Möglichkeit zur zellfreien Oxidation von Lactat zu Pyruvat mit immobilisierter (*S*)-Hydroxysäure-Oxidase und Katalase. Ein weiteres Verfahren ist die Umsetzung von Lactat zu Pyruvat mit ruhenden, anaerob kultivierten Zellen von *Proteus mirabilis* oder *P. vulgaris* (Schinschel & Simon, 1993). Mit diesem System konnte eine 0,65 M Lactat-Lösung in 1 h zu 94 % in Pyruvat umgesetzt werden. Ein Nachteil der mikrobiellen Herstellung von Pyruvat aus Lactat besteht darin, dass das Edukt zunächst selbst hergestellt werden muss, z.B. aus Glucose mit Milchsäurebakterien.

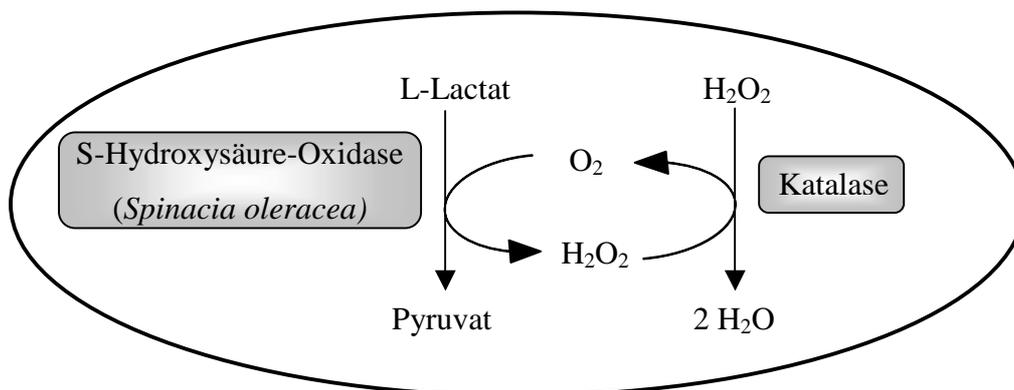


Abb. 2: Schema der katalytischen Oxidation von Lactat durch S-Hydroxysäure-Oxidase aus Spinat mittels permeabilisierter Hefe-Zellen.

Alternativ zu Lactat wird Glucose als Substrat für die Pyruvat-Produktion mittels Ganzzell-Biotransformation eingesetzt. Dazu werden Stämme verwendet, bei denen die Decarboxylierung des Pyruvats zu Acetyl-CoA durch geeignete Auxotrophien reduziert ist. In einem der beschriebenen Verfahren werden vitaminauxotrophe Hefe-Stämme verwendet, z.B. *Torulopsis glabrata* (Miyata *et al.*, 1990; Yonehara & Miyata, 1994; Miyata & Yonehara, 1996). Diese Stämme sind z.T. sowohl thiamin-, nicotinsäure-, biotin- als auch pyridoxaminauxotroph. Wurden beispielsweise limitierende Mengen Thiamin oder Nicotinamid eingesetzt, so führte dies zu einer Reduktion der Pyruvat-Dehydrogenase-Aktivität und damit zu einer reduzierten oxidativen Decarboxylierung des in der Glykolyse gebildeten Pyruvats. Da Thiaminpyrophosphat ebenfalls als Cofaktor der Transketolase benötigt wird, hatte eine reduzierte Thiamin-Konzentration auch einen reduzierten Pentosephosphatweg zur Folge, so dass die eingesetzte Glucose vorwiegend in der Glykolyse umgesetzt wurde. Die Aktivität der Pyruvat-Carboxylase, die Pyruvat zu Oxalacetat umsetzt, wurde durch limitierende Mengen Biotin reduziert, da diese Reaktion biotinabhängig ist. Ein Pyridoxamin-Mangel führte zu einem reduzierten Aminosäure-Stoffwechsel, da viele dieser Enzyme (Transaminasen, Decarboxylasen, Dehydratasen) Pyridoxalphosphat benötigen. Durch eine Optimierung der Vitamin-Kombination wurden mit vitaminauxotrophen *T. glabrata*-Stämmen maximal 0,57 g Pyruvat pro g Glucose im Schüttelkolben-Maßstab gebildet, was einer Ausbeute von 1,17 Mol Pyruvat/Mol Glucose entspricht (Yonehara & Miyata, 1994). In Fed-Batch-Fermentationen betrug die maximal erreichte Pyruvat-Konzentration 67,8 g/l. Die Ausbeute betrug aber lediglich 1 Mol Pyruvat/Mol Glucose (Miyata & Yonehara, 1996).

Eine vergleichbare Methode zur Pyruvat-Produktion aus Glucose wurde auch für liponsäureauxotrophe *Escherichia coli*-Stämme beschrieben (Abb. 3; Yokota *et al.*, 1994a, 1994b, Yokota, 1997). Bei den beschriebenen Prozessen erfolgt die Pyruvat-Bildung ausgehend von Glucose unter aeroben Bedingungen. Die Glucose wird dabei zunächst über das Phosphotransferase-System (PTS) in die Zelle aufgenommen und in der Glykolyse zu Pyruvat umgesetzt. Der überwiegende Teil des gebildeten Pyruvats wird unter aeroben Bedingungen durch den PDH-Komplex zu Acetyl-CoA und CO₂ umgesetzt. Dieses Enzym benötigt Liponsäure als prosthetische Gruppe. Setzt man nun liponsäureauxotrophen Stämmen limitierende Mengen an Liponsäure zu, so führt dies zu einer Reduktion der PDH-Aktivität und damit zu einer verminderten Umsetzung des in der Glykolyse gebildeten Pyruvats. Dadurch kommt es zu einem Anstau und das Pyruvat wird ausgeschieden. Hierbei wurden maximal 25,5 g/l Pyruvat aus 50 g/l Glucose in 32 Stunden gebildet (1 Mol

Pyruvat/Mol Glucose). Unter optimierten Bedingungen und mit einem zusätzlichen F₁-ATPase-Defekt, der unter anderem zu erhöhten Aktivitäten der Phosphoglycerat-Kinase und der Pyruvat-Kinase führte, stieg in diesen Stämmen die Ausbeute um 10 % auf 30 g/l Pyruvat aus 50 g/l Glucose in 24 h (1,2 Mol Pyruvat/Mol Glucose; Yokota *et al.*, 1994a, 1994b, Yokota, 1997).

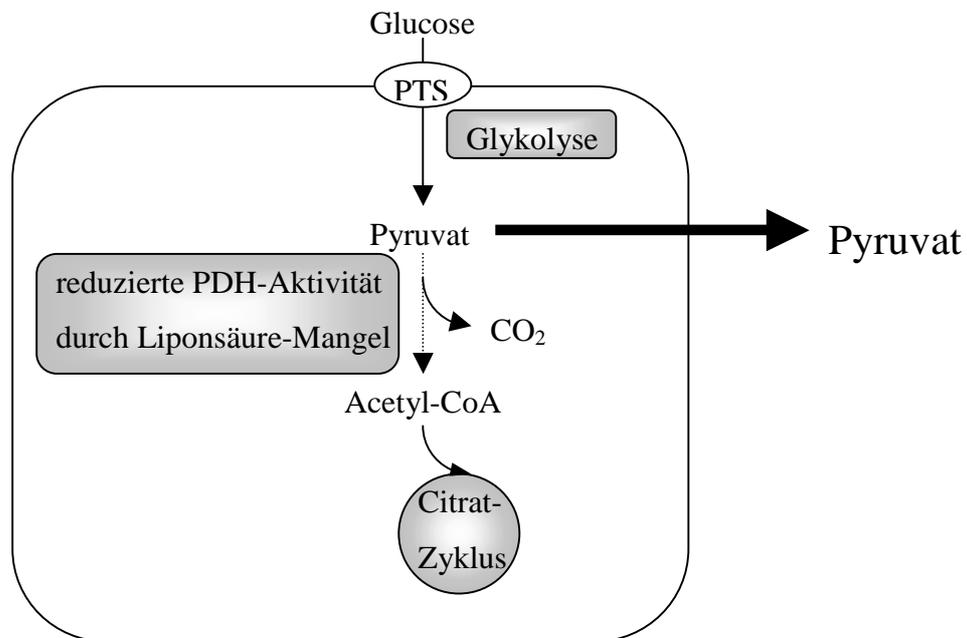
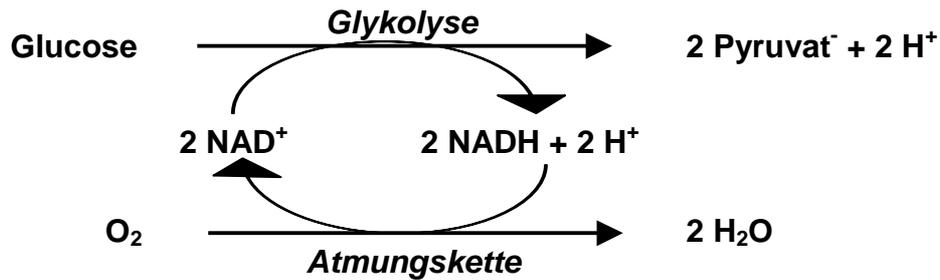


Abb. 3: Schema der Pyruvat-Produktion aus Glucose unter Verwendung liponsäureauxotropher Hefen oder *E. coli*.

Auffällig ist bei den bisher beschriebenen Verfahren zur mikrobiellen Pyruvat-Bildung aus Glucose, dass die erreichten Ausbeuten weit unter der theoretisch maximal erreichbaren Ausbeute von 2 Mol Pyruvat/Mol Glucose liegen. Außerdem müssen Vitamine in gut definierten Konzentrationen zugesetzt werden, um eine optimale Pyruvat-Bildung zu ermöglichen. In dieser Arbeit sollte getestet werden, ob ein alternativer Ansatz eine Steigerung der Pyruvat-Ausbeute ermöglicht. Im Gegensatz zu den liponsäureauxotrophen *E. coli*-Stämmen, bei denen die Aktivität der Pyruvat-Dehydrogenase nur reduziert wurde, sollten dabei Stämme eingesetzt werden, bei denen die Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-CoA oder Acetat durch geeignete Mutationen vollständig blockiert ist. Die daraus resultierende Acetat-Auxotrophie in Glucose-Minimalmedium könnte genutzt werden, um Zellwachstum und Produktbildung durch kontrollierte Zugabe des essentiellen Co-Substrats Acetat zu regulieren. Unter nicht-wachsenden Bedingungen könnten solche Zellen eine vollständige Umsetzung von Glucose in Pyruvat gemäß nachfolgendem Schema katalysieren:



Pyruvat-Stoffwechsel von *E. coli*

Da die in diesem Projekt angestrebte Pyruvat-Produktion mit *E. coli* erfolgen sollte, wird im folgenden der Pyruvat-Stoffwechsel dieser Spezies detaillierter beschrieben. In Abb. 4 ist dargestellt, dass Pyruvat in *E. coli* ein zentrales Intermediat und Ausgangssubstanz vieler Stoffwechselwege ist.

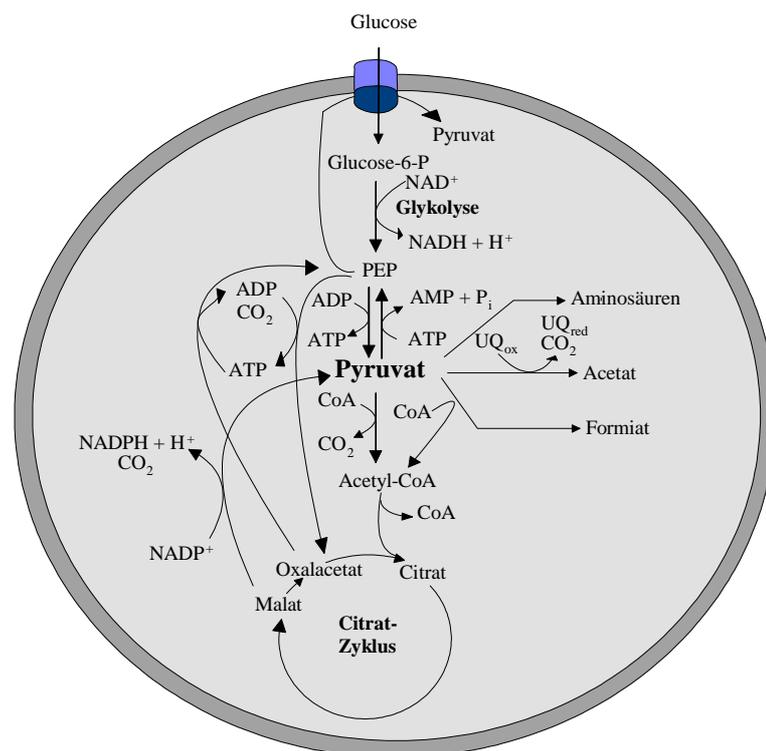


Abb. 4: Pyruvat-Stoffwechsel in *E. coli*. Die beteiligten Enzyme sind im Text beschrieben.

Wenn *E. coli*-Zellen auf Glucose wachsen, wird diese über das Phosphotransferase-Transportsystem (PTS) aufgenommen und in der Glykolyse zu Pyruvat umgesetzt. *E. coli* besitzt verschiedene katabole pyruvatumsetzende Enzyme. Der überwiegende Teil des

Pyruvats wird zu Acetyl-CoA bzw. Acetat oxidiert. Dabei spielen drei Reaktionen eine bedeutende Rolle:

1. $\text{Pyruvat} + \text{CoA-SH} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{Acetyl-CoA} + \text{CO}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+$
2. $\text{Pyruvat} + \text{CoA-SH} \rightarrow \text{Acetyl-CoA} + \text{Formiat}$
3. $\text{Pyruvat} + \text{UQ}_{\text{ox}} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Acetat} + \text{CO}_2 + \text{UQ}_{\text{red}}$

Reaktion 1 wird vom Pyruvat-Dehydrogenase-Multienzymkomplex (PDH) katalysiert. Dieser Komplex wird in *E. coli* durch die Gene *aceE*, *aceF* und *lpdA* kodiert (Quail *et al.*, 1994). Das *aceE*-Gen kodiert für die Pyruvat-Dehydrogenase, das *aceF*-Gen für die Dihydroliponamid-Acetyltransferase und das *lpdA*-Gen für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase. Unter aeroben Bedingungen wird der überwiegende Teil des gebildeten Pyruvats durch diesen Enzymkomplex zu Acetyl-CoA decarboxyliert, welches dann über den Citratzyklus zu CO_2 oxidiert wird.

Reaktion 2 wird von der Pyruvat-Formiat-Lyase (*pflB*) katalysiert (Knappe *et al.*, 1969). Die Pyruvat-Umsetzung zu Acetyl-CoA und Formiat erfolgt nur unter anaeroben Bedingungen, da dieses Enzym äußerst sauerstoffempfindlich ist (Knappe & Sawers, 1990). Die Expression von *pfl* wird von sieben Promotoren kontrolliert. Die Transkription der Pyruvat-Formiat-Lyase wird durch FNR, NarL und ArcA reguliert. Auf Enzym-Ebene wird Pfl durch die Aktivasen PflA und PflC aktiviert (durch Einführung eines Glycin-Radikals) und durch die Alkohol-Dehydrogenase AdhE inaktiviert (Kessler *et al.*, 1991). Eine *pfl*-Mutante ist in der Lage, anaerob auf Glucose als alleiniger C-Quelle zu wachsen (Mat-Jan *et al.*, 1989).

Reaktion 3 wird durch die Pyruvat-Oxidase katalysiert. Diese Pyruvat:Chinon-Oxidoreduktase wird vom *poxB*-Gen kodiert (Chang & Cronan, 1982; Chang & Cronan, 1983; Grabau & Cronan, 1986b). Die Expression des *poxB*-Gens ist in der frühen stationären Phase maximal und strikt abhängig vom *rpoS*-kodierten Sigmafaktor (σ^{38} , σ^S). *E. coli*-Stämme, denen die Gene *aceEF* fehlen und die daher keine Pyruvat-Dehydrogenase mehr bilden können, benötigen unter aeroben Bedingungen Acetat zum Wachstum. Nach Transformation dieser Stämme mit *poxB*-Expressionsplasmiden kann auf die Acetat-Supplementation verzichtet werden (Grabau & Cronan, 1984). Das zeigt, dass die Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-CoA unter aeroben Bedingungen ausschließlich durch die Pyruvat-Dehydrogenase katalysiert wird, aber prinzipiell auch durch die Pyruvat-Oxidase erfolgen kann.

Bei anaerobem Wachstum auf Glucose führt *E. coli* eine gemischte Säuregärung durch, bei der als Produkte Lactat, Succinat, Acetat, Formiat, Ethanol, CO₂ und H₂ gebildet werden. Die Umsetzung von Pyruvat zu Lactat (Pyruvat + NADH + H⁺ → D-Lactat + NAD⁺) erfolgt in *E. coli* durch eine NAD⁺-abhängige D-Lactat-Dehydrogenase, welche von dem Gen *ldhA* kodiert wird. LdhA wird durch eine Kombination aus Anaerobiose und Säure induziert (Bunch *et al.*, 1997), ist aber auch unter aeroben Bedingungen vorhanden, wenn auch mit geringerer Aktivität (Jiang *et al.*, 2001). LdhA wird allosterisch durch Pyruvat aktiviert (Pecher *et al.*, 1983; Tarmy & Kaplan, 1968b). Der K_m-Wert für Pyruvat liegt je nach pH-Wert zwischen 4,4 mM (pH 6,7) und 7,2 mM (pH 7,5) (Tarmy & Kaplan, 1968b). Pyruvat stimuliert die Expression des *ldhA*-Gens zwei- bis vierfach (Jiang *et al.*, 2001). *E. coli*-Stämme, die Mutationen in den Genen *ldhA* und *pfl* haben, können anaerob nicht auf Glucose oder anderen Zuckern als alleiniger C-Quelle wachsen. Sie benötigen zusätzlich Acetat zum Wachstum. Einzelmutationen von *pfl* oder *ldhA* führen dagegen nicht zu einer Acetat-Auxotrophie (Mat-Jan *et al.*, 1989). Bei der Ethanol-Bildung wird das aus Pyruvat gebildete Acetyl-CoA zunächst zu Acetaldehyd und dieses anschließend zu Ethanol reduziert. Beide Reaktionen werden von der Alkohol-Dehydrogenase katalysiert, die außerdem auch als Pyruvat-Formiat-Lyase-Deaktivase wirkt. Die Alkohol-Dehydrogenase wird durch das *adhE*-Gen kodiert, das unter anaeroben Bedingungen in Abwesenheit von Nitrat induziert wird (Membrillo-Hernandez & Lin, 1999). Succinat entsteht nach Carboxylierung von PEP zu Oxalacetat (PEP-Carboxylase) durch die Reaktionen der Malat-Dehydrogenase, Fumarase und Fumarat-Reduktase. CO₂ und H₂ werden durch die Formiat-Hydrogen-Lyase aus Formiat gebildet.

Ziel der Arbeit

Wie oben bereits kurz beschrieben, war das Ziel dieser Arbeit die Charakterisierung und Optimierung rekombinanter *E. coli*-Stämme, die Glucose unter aeroben Bedingungen möglichst vollständig zu Pyruvat umsetzen und dieses ausscheiden. Mit Glucose als einziger C-Quelle setzt *E. coli* diese zwar zu 80 – 90 % zu Pyruvat um, das Intermediat wird jedoch direkt weiter verstoffwechselt (siehe Abb. 4). Um aus *E. coli* einen effizienten Pyruvat-Produzenten zu machen, muss in erster Linie die oxidative Decarboxylierung des Pyruvats blockiert werden. Ein Stamm, der aufgrund seines Genotyps genau diese gewünschte Eigenschaft aufweisen sollte, wurde in der Literatur bereits beschrieben, nämlich *E. coli*

YYC202 (Abb. 5, Georgiou *et al.*, 1987). Dieser Stamm besitzt eine Deletion der *aceEF*-Gene sowie weitere Mutationen in den Genen für die Pyruvat-Oxidase, für die Pyruvat-Formiat-Lyase und für die Phosphoenolpyruvat-Synthetase (kodiert durch *pps*), die zum Verlust der entsprechenden Enzymaktivitäten führen. Aufgrund dieses Genotyps ($\Delta aceEF pfl-1 poxB1 pps-4 rpsL zbi:Tn10$) sollte *E. coli* YYC202 Pyruvat nicht mehr zu Acetyl-CoA bzw. Acetat umsetzen können und bei Wachstum auf Glucose-Minimalmedium Acetat benötigen. Aufgrund des Transposons *Tn10* und einer Mutation des *rpsL*-Gens ist der Stamm streptomycin- und tetracyclinresistent, was eine selektive Kultivierung ermöglicht.

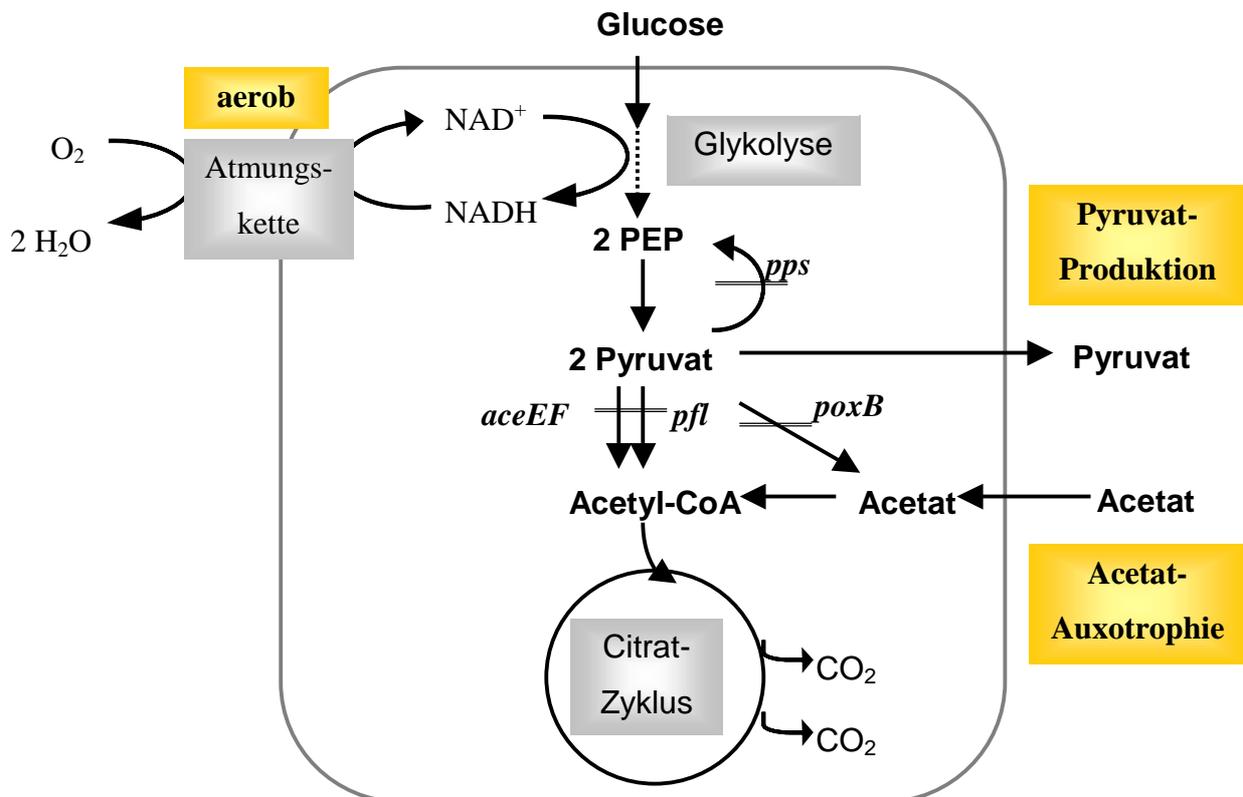


Abb. 5: Schematische Darstellung der Umsetzung von Glucose durch *E. coli* YYC202. Die Enzyme sind im Text beschrieben.

Nach der Kontrolle der Acetat-Auxotrophie von *E. coli* YYC202 sollte zunächst eine Charakterisierung wachsender *E. coli* YYC202-Zellen hinsichtlich ihrer Pyruvat-Bildungseigenschaften erfolgen. Bei Wachstum von *E. coli* auf Glucose-Minimalmedium werden circa 50 % der verbrauchten Glucose für die Biosynthese von neuem Zellmaterial verwendet (Holms, 1996). Eine maximale Pyruvat-Ausbeute von 2 Mol Pyruvat/Mol Glucose ist also nur mit "ruhenden", nicht-wachsenden Zellen möglich. Daher sollte auch die Umsetzung von Glucose durch nicht-wachsende, aber metabolisch noch aktive Zellen von *E. coli* YYC202 untersucht werden.

Neben der Neusynthese von Zellmaterial können noch zwei andere Faktoren einen negativen Einfluss auf die Pyruvat-Bildung haben, nämlich die Bildung von unerwünschten Nebenprodukten als Folge eines möglichen Pyruvat-Anstaus in der Zelle und eine Umsetzung von Glucose über den oxidativen Pentosephosphatweg statt über die Glykolyse. Im Vergleich zur glykolytischen Umsetzung von Glucose, bei der 2 Mol Pyruvat/Mol Glucose entstehen, wird bei einer vollständigen Umsetzung über den oxidativen Pentosephosphatweg theoretisch nur 1 Mol Pyruvat/Mol Glucose gebildet, die restlichen C-Atome gehen in Form von CO₂ verloren. Bisherige Versuche haben gezeigt, dass *E. coli* nur den Teil der Glucose über den oxidativen Pentosephosphatweg umsetzt (10-20 %), der zur Bereitstellung von C₄- und C₅-Zuckern für Biosynthesen erforderlich ist. Allerdings kann nicht vorhergesagt werden, inwieweit dieses Ergebnis auch für wachsende und ruhende Zellen des Stammes YYC202 gilt. Falls sich zeigen sollte, dass die Umsetzung über den Pentosephosphatweg zu einem signifikanten Verlust an Pyruvat führt, sollte versucht werden, den oxidativen Teil dieses Weges durch Deletion des *zwf*-Gens für die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase auszuschalten. Bezüglich der Bildung unerwünschter Nebenprodukte sind nur Spekulationen möglich. Denkbar wäre die oben beschriebene Reduktion von Pyruvat zu D-Lactat durch die NAD⁺-abhängige D-Lactat-Dehydrogenase. Die D-Lactat-Bildung könnte, wenn nötig, durch eine Deletion des *ldhA*-Gens verhindert werden.

Mit Blick auf eine weitere Charakterisierung und Optimierung des Stammes sollte YYC202 durch Transkriptom-Analyse mit DNA-Microarrays und durch Proteomanalysen mit Stämmen verglichen werden, die einen „normalen“ Stoffwechsel besitzen, d.h. Pyruvat zu Acetyl-CoA und CO₂ umsetzen. Auf diese Weise sollten Gene bzw. Proteine identifiziert werden, die als Folge der Pyruvat-Bildung bzw. als Folge der Acetat-Auxotrophie in ihrer Expression bzw. Synthese verändert sind.

III MATERIAL UND METHODEN

1 Materialien

In der vorliegenden Arbeit wurden Chemikalien der Firmen Merck KGaA (Darmstadt), Sigma Chemie (Deisendorf) und Difco Laboratories (Detroit, USA) in p.A.-Qualität verwendet. Biochemikalien und Enzyme, inklusive der zugehörigen Puffer, wurden von den Firmen Roche Diagnostics (Mannheim) und New England Biolabs (Schwalbach) bezogen. Die verwendeten Oligonukleotide stammten von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg). Produkte anderer Hersteller sind jeweils gesondert vermerkt.

2 Bakterienstämme

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tab. 1 aufgeführt. Alle Stämme wurden als Glycerin-Kulturen (siehe 5.2) bei -20°C und -70°C konserviert.

Tab. 1: *Escherichia coli*-Stämme, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Stamm	Genotyp/Phänotyp/Verwendung	Referenz
DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi1</i> <i>relA1</i> ; Stamm für Klonierungen und die Isolation von Plasmiden.	Bethesda Research Laboratories
MG1655	<i>E. coli</i> Wildtyp	(Blattner <i>et al.</i> , 1997), CGSC#6300, http://cgsc.biology.yale.edu/
NZN117	<i>thr1</i> <i>leu6</i> <i>thi1</i> <i>lacY</i> <i>tonA22</i> <i>rpsL</i> <i>ldhA::Kan</i> ; Donorstamm zur P1-Transduktion der <i>ldhA::Kan</i> -Mutation in <i>E. coli</i> YYC202.	(Bunch <i>et al.</i> , 1997)

Stamm	Genotyp/Phänotyp/Verwendung	Referenz
M10 λ Pir	Kan ^R , <i>thi thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-Tc::mu</i> ; lysogener Stamm von SM10 zur Vermehrung und Isolierung von Plasmiden, die zu ihrer Replikation das Pir-Protein benötigen.	(Miller & Mekalanos, 1988)
YYC202	$\Delta aceEF pfl1 poxB1 pps4 rpsL$ (Sm ^R) <i>zbi::Tn10</i> (Tet ^R)	(Georgiou <i>et al.</i> , 1987)
YYC202 $\Delta acrAB::kan$	Derivat von <i>E. coli</i> YYC202; Deletion der <i>acrAB</i> -Gene durch Austausch einer Kanamycinkassette	Diese Arbeit
YYC202-pBR322	Derivat von <i>E. coli</i> YYC202 mit pBR322	Diese Arbeit
YYC202-pGS87	Derivat von <i>E. coli</i> YYC202 mit pGS87; dieser Stamm ist nicht mehr acetatauxotroph	Diese Arbeit
YYC202 <i>ldhA::kan</i>	Derivat von <i>E. coli</i> YYC202; Insertion einer Kanamycinresistenzkassette in <i>ldhA</i>	Diese Arbeit
JZM120	Donorstamm zur P1-Transduktion der <i>acrAB::Kan</i> -Mutation in <i>E. coli</i> YYC202	(Ma <i>et al.</i> , 1995)
MC1061 <i>kgtP::Kan</i>	<i>hsdR mcrB araD139 $\Delta(araABC-leu)7679 \Delta lacX74 galU galK rpsL thi kgtP::Kan$</i> ; Insertion einer Kanamycinkassette in das Gen für die α -Ketoglutarat-Permease <i>kgtP</i>	(Seol & Shatkin, 1991)

3 Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten bzw. konstruierten Plasmide sind in Tab. 2 zusammengestellt.

Tab. 2: In dieser Arbeit verwendete bzw. konstruierte Plasmide.

Plasmid	Merkmale	Größe	Referenz
pAYCY184	Cm ^R , Tet ^R	4245 bp	(Chang & Cohen, 1978)
pBR322	Amp ^R , Tet ^R , <i>rop</i>	4361 bp	(Bolivar <i>et al.</i> , 1977)

Plasmid	Merkmale	Größe	Referenz
pGS87	pBR322-Derivat mit einem ~10,2-kb <i>HindIII</i> - <i>SalI</i> -Fragment aus <i>E. coli</i> , das die <i>aceEF-lpd</i> -Region enthält.	13,9 kb	(Spencer & Guest, 1985)
pKNG101	Sm ^R , <i>oriR6K mobRK2 sacBR</i> , Suizidvektor, der in <i>E. coli</i> und anderen gram-negativen Bakterien nur in Anwesenheit des Pir-Proteins replizieren kann.	6,8 kb	(Kaniga <i>et al.</i> , 1991)
pKNG101-Tn5	pKNG101-Derivat mit einem 8-kb- <i>ApaI</i> -Fragment aus pRJ3405 mit dem Tn5-Transposon.	14,8 kb	Diese Arbeit
pKO3	Cm ^R , Klonierungsvektor für die Konstruktion von Insertions- und Deletionsmutanten von <i>E. coli</i> .	5681 bp	(Link <i>et al.</i> , 1997)
pKO3- <i>ldhA</i>	pKO3-Derivat mit einem 1,2-kb-"Crossover"-PCR-Fragment in den <i>BamHI</i> -Schnittstellen, das die <i>ldhA</i> -flankierenden Bereiche umfasst	6901 bp	Diese Arbeit
pRJ3405	Amp ^R , Kan ^R , Sm ^R , Tn5-tragendes 8-kb- <i>EcoRI</i> -Fragment aus <i>Bradyrhizobium japonicum</i> COX122 in pBluescript KS+	11,0 kb	(Bott <i>et al.</i> , 1991)
pUC18	Amp ^R , Klonierungsvektor	2686 bp	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)

4 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide, die bei Standard- und Kolonie-PCR eingesetzt wurden, sind in Tab. 3 aufgeführt.

Tab. 3 (nächste Seite): Sequenzen der Oligonukleotide, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Alle Sequenzen sind in 5'→3'-Richtung dargestellt. Restriktionsschnittstellen, die mit Hilfe der Oligonukleotide eingeführt wurden, sind durch Fettdruck hervorgehoben, und das entsprechende Enzym ist in der letzten Spalte angegeben.

Name	Sequenz	Enzym
Konstruktion von pKO3-ldhA		
No-ldhA5-BamHI	CGC AGG ATC CGG AGC GGC TGG CGA TTG CTC CG	<i>Bam</i> HI
Ni-ldhA5-21mer	CCC ATC CAC TAA ACT TAA ACA CGG CGA GTT TCA TAA GAC TTT CTC CAG	
Ci-ldhA5-21mer	TGT TTA AGT TTA GTG GAT GGG GGC GAA ACC TGC CCG AAC GAA CTG G	
Co-ldhA5-BamHI	CGC AGG ATC CCT GGA TGG TAC GGC GAT TGG GAT G	<i>Bam</i> HI
Überprüfung der Deletion von <i>acrAB</i>		
acrAB-for1	GTG AAT GTA TGT ACC ATA GCA CG	
acrAB-for2	GAG GGT TTA CGC CTC TGG CG	
acrAB-rev1	GGC CGC TTA CGC GGC CTT AG	
acrAB-rev2	CCA CGA TTG CGG GCA GGT TA	
Oligonukleotide zur Southern-Blot-Analyse		Sonde gegen
KAN-for1	GCC ATA TTC AAC GGG AAA CGT CTT GC	Kan-Kassette
KAN-for1.1	GCA AGA CGT TTC CCG TTG AAT ATG GC	Kan-Kassette
KAN-for2	GGG AAA CGT CTT GCT CGA GGC CGC G	Kan-Kassette
KAN-for2.1	CGC GGC CTC GAG CAA GAC GTT TCC C	Kan-Kassette
No-ldhA-S	GGA GCG GCT GGC GAT TGC TCC G	<i>ldhA</i>
Co-ldhA-S	CTG GAT GGT ACG GCG ATT GGG ATG	<i>ldhA</i>

5 Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung von Bakterien

5.1 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

E. coli-Stämme wurden routinemäßig in Luria-Bertani-Medium (LB: 10 g/l Trypton (Difco), 5 g/l Hefeextrakt (Difco), 5 g/l NaCl), modifiziert nach Sambrook (1989) kultiviert. Zur "phänotypischen Expression" der Antibiotikaresistenz von frisch transformierten Zellen wurde SOC-Komplexmedium eingesetzt (20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,6 g/l NaCl, 0,2 g KCl, nach dem Autoklavieren wurden je 10 ml/l einer 2 M Glucoselösung und einer 2 M Magnesiumsalzlösung (1 M MgCl₂ und 1 M MgSO₄), die zuvor sterilfiltriert wurden, zugeben) (Miller & Nickoloff, 1995). Die acetatauxotrophen *E. coli*-Stämme YYC202 (Georgiou *et al.*, 1987) und YYC202*ldhA* (Gerharz *et al.*, 2002) wurden routinemäßig in M9-Minimalmedium (pH 7) mit Zusatz von 10 mM Glucose und 2 mM Natriumacetat kultiviert (6 g/l Na₂HPO₄, 3 g/l KH₂PO₄, 0,5 g/l NaCl, 1 g/l NH₄Cl, nach dem Autoklavieren wurden 1 mM MgSO₄ und 1 mM CaCl₂ zugeben; Sambrook (1989)). Zur Herstellung von Agarplatten wurden den Medien 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt. Für die selektive Kultivierung wurden die autoklavierten Medien nach dem Abkühlen mit den in Tab. 4 angegebenen Antibiotika-Konzentrationen versetzt.

Tab. 4: Antibiotika-Konzentrationen, die selektiven Medien zugesetzt wurden.

Antibiotikum	Endkonzentration	Stammlösung
Tetracyclin	10 µg ml ⁻¹	4 mg ml ⁻¹ in Ethanol
Streptomycin	25 µg ml ⁻¹	10 mg ml ⁻¹ in H ₂ O
Ampicillin	100 µg ml ⁻¹	100 mg ml ⁻¹ in H ₂ O
Chloramphenicol	40 µg ml ⁻¹	10 mg ml ⁻¹ in Ethanol
Kanamycin	50 µg ml ⁻¹	20 mg ml ⁻¹ in H ₂ O

Falls nicht anders vermerkt, wurden die *E. coli*-Stämme in Schüttelkolben bzw. auf Petrischalen bei 37°C inkubiert. Die Kultivierungen zur DNA-Isolierung erfolgten im Allgemeinen in Reagenzgläsern mit 5 ml Vollmedium (LB oder SOC), die für 15-20 h mit 170 U.p.m. geschüttelt wurden. Für Wachstumsversuche wurden 500-ml-Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen verwendet, die 50 ml Medium enthielten und nach dem Animpfen mit 140 U.p.m. geschüttelt wurden.

Um Zellsuspensionen von YYC202 bzw. YYC202*ldhA* zu erhalten, wurden die Zellen zunächst wie oben beschrieben in M9-Minimal-Medium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit 0,9 % (w/v) NaCl gewaschen und in einem definierten Puffer mit Glucose, aber ohne Acetat, N- oder S-Quelle resuspendiert.

In einem 2-l-KLF2000-Fermenter (Bioengineering, Wald, Schweiz) wurde die CO₂-Produktion durch Zellsuspensionen analysiert. Die CO₂-Konzentration in der Abluft des Fermenters wurde mit Hilfe einer COI-Abgasanalytik (Fischer Analysen, Leipzig) erfasst. Der pH-Wert wurde durch eine automatische Dosierung von 2 N NaOH auf 7,0 konstant gehalten. Die Belüftung erfolgte mit synthetischer Luft (80 % N₂ und 20 % O₂) und einer Rate von 46 l/h. Der O₂-Partialdruck wurde mit einer amperometrischen Elektrode (Mettler-Toledo, Steinbach) bestimmt.

5.2 Stammhaltung

Zur Herstellung von Glycerinkulturen wurde eine 20-ml-LB-Übernacht-Kultur abzentrifugiert (10 min, 5200 g, 4°C) und die Zellen in 2 ml LB-Medium resuspendiert. Nach Zugabe von 2 ml sterilem Glycerin (87 %, v/v) wurde die Probe in zwei Aliquots (2 ml) aufgeteilt und in Cryo-Röhrchen transferiert. Eine der so erhaltenen Glycerinkulturen wurde bei -20°C, die andere bei -70°C gelagert. Diese Dauerkulturen bleiben in der Regel über Jahre hinweg lebensfähig.

5.3 Bestimmung von Wachstums- und Stoffwechselfparametern

5.3.1 Bestimmung des Wachstums von Bakterien-Kulturen

Das Wachstum der Kulturen wurde durch Messung der scheinbar optischen Dichte bei 600 nm mit einem LKB Ultrospec Plus Spectrophotometer (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) verfolgt, wobei die Kulturen so mit Wasser verdünnt wurden, dass die gemessenen OD₆₀₀-Werte nie größer als 0,3 waren.

5.3.2 Bestimmung des pH-Wertes

Der pH-Wert wurde mit einem pH-Meter (Mikroprozessor-pH-Meter 763, Knick, Berlin) gemessen. Dazu wurde das pH-Meter mit Eichlösungen pH 4 und pH 7 bzw. pH 7 und pH 9 kalibriert.

5.3.3 Enzymatische Bestimmung der Glucose- und Pyruvat-Konzentration

Die Bestimmung der Konzentrationen von Glucose und Pyruvat in Kulturüberständen erfolgte enzymatisch nach Bergmeyer (1985). Nach Abzentrifugieren der Zellen (2 min, 13000 g) wurden die Kulturüberstände zunächst 10 - 15 min auf 80°C erhitzt, um eventuell noch vorhandene Enzyme zu inaktivieren.

Glucose wurde in einem gekoppelten enzymatischen Test durch Hexokinase mit ATP zu Glucose-6-Phosphat (G-6-P) und dieses durch die G-6-P-Dehydrogenase von *Leuconostoc mesenteroides* (Roche Diagnostics, Mannheim) mit NAD⁺ zu 6-Phospho-D-glucono- δ -lacton umgesetzt. Der Vorteil der G-6-P-Dehydrogenase von *L. mesenteroides* ist, dass sie nicht nur NADP⁺, sondern auch NAD⁺ als Coenzym akzeptiert. Dadurch ist sie eine kostengünstige Alternative gegenüber G-6-P-Dehydrogenasen, welche nur NADP⁺ als Coenzym akzeptieren. Die gebildete Menge an NADH wurde photometrisch bei 340 nm ($\epsilon = 6,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) mit einem Mikrotiterplatten-Photometer (ThermoMax microplate reader, MWG, Ebersberg) gemessen und war der umgesetzten Glucosemenge direkt proportional. Das Protokoll wurde wie in Tab. 5 angegeben für einen 300- μ l-Mikrotiterplattenansatz angepasst. Es wurden dabei folgende Lösungen verwendet: 50 mM Tris-Maleat-Puffer (TMP, 12,1 g/l Tris, 11,6 g/l Maleinsäure, der pH-Wert wurde mit konzentrierter Natronlauge auf pH 6,8 eingestellt), 100 mM MgCl₂-Lösung in TMP, NAD⁺/ATP-Mix (1,2 mM NAD⁺, 1,2 mM ATP, 4,2 mM MgCl₂ in TMP). Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels einer Eichgerade aus jeweils 8 Glucosestandards (0,1 – 2,5 mM), die für jede Mikrotiterplatten-Messung neu erstellt wurde.

Tab. 5: Testansatz für die Bestimmung der Glucose-Konzentration im Mikrotiterplattenansatz. Der Ansatz wurde 90 Minuten bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert.

Lösung	Volumen	Endkonzentration im Test
ATP/NAD ⁺ -Mix	220 μ l	je 1 mM
Probe bzw. Standard	40 μ l	0,1 – 2,5 mM
Hexokinase	20 μ l	1,5 U
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	20 μ l	0,75 U

Pyruvat wurde mittels L-Lactat-Dehydrogenase (LDH) aus Kaninchen-Muskel in Triethanolamin-Puffer (0,5 M Triethanolamin, 5 mM EDTA, pH 7,6) zu Lactat umgesetzt

(Bergmeyer, 1985). Die Extinktion vor Zugabe der LDH entspricht der zugesetzten NADH-Konzentration. Die Abnahme der NADH-Konzentration wurde photometrisch bei 340 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen und war proportional zur Pyruvat-Konzentration. Das Protokoll wurde, wie in Tab. 6 angegeben, für einen Mikrotiterplattenansatz angepasst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte anhand einer Eichgerade aus 8 Pyruvat-Standards (0,005 – 0,15 mM), die für jede Mikrotiterplatten-Messung neu erstellt wurde.

Tab. 6: Testansatz für die Bestimmung der Pyruvat-Konzentration im Mikrotiterplattenansatz. Der Ansatz wurde 100 Minuten bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert.

Lösung	Volumen	Endkonzentration im Test
Triethanolamin-Puffer	125 μ l	0,25 M
NADH-Lösung (5 mM)	15 μ l	0,28 mM
Probe bzw. Standard	125 μ l	0,005 – 0,15 mM
Bestimmung des Nullwertes bei 340 nm		
L-LDH	8,6 μ l	0,424 U

5.4 Bestimmung der Konzentration organischer Säuren

Der qualitative und quantitative Nachweis organischer Säuren (α -Ketoglutarat, Acetat, Citrat/Isocitrat, Fumarat, Lactat, Pyruvat, Succinat, Oxalacetat) in Kulturüberständen erfolgte mit dem D-7000 HPLC-System von Merck Hitachi (UV-Detektor L7400, Säulenofen L7350, Probengeber L7200, Pumpe L7100, Computerschnittstelle D7000). Die Probenauftrennung erfolgte isokratisch (0,6 ml/min) über eine Aminex-Säule (HPX-87H, 150 x 7,8 mm oder alternativ 300 x 7,8 mm, BioRad, München) bei 65°C. Bei den verwendeten Säulen handelte es sich um Kationenaustauschsäulen, die mit Protonen belegt waren, so dass die Auftrennung auf dem Ionenausschlussprinzip basierte. Als mobile Phase wurde sterilfiltrierte Schwefelsäure (6 mM) verwendet. Es wurden jeweils 50 μ l Standard oder Probe injiziert. Die Laufzeit der Probe betrug 10 min (150-mm-Säule) bzw. 20 min (300-mm-Säule). Die Tot-Volumenzeit (Injektionspeak) lag bei etwa 3 min (150-mm-Säule) bzw. bei etwa 6 min (300-mm-Säule). Die Detektion erfolgte im UV-Bereich bei 215 nm. Die Auswertung erfolgte mit der Multi-HSM-Manager 4.0 Software (Merck Hitachi). Die Zuordnung der organischen Säuren erfolgte durch Vergleich der Retentionszeit (vgl. Tab. 7) mit der des jeweiligen Standards. Die Berechnung der Konzentration erfolgte anhand der Peakfläche durch

Vergleich mit einer Eichgerade (0,1 mM – 10 mM). Routinemäßig wurde bei jeder Serie von HPLC-Läufen ein Standard-Mix aus Pyruvat, Lactat, Succinat und Acetat (jeweils 1 mM) gemessen, um Abweichungen und Schwankungen innerhalb einer Serie zu berücksichtigen. Es wurde darauf geachtet, dass die gemessenen Konzentrationen nie größer als 10 mM waren.

Tab. 7: Retentionszeiten verschiedener organischer Säuren bei Auftrennung auf einer Aminex HPX87H-Säule (150 x 7,8 mm bzw. 300 x 7,8 mm, BioRad, München) unter Verwendung folgender Parameter: mobile Phase 6 mM H₂SO₄, Fluß: 0,6 ml/min, Säulentemperatur: 65°C, Injektionsvolumen: 50 µl; n.b. = nicht bestimmt.

Substanz	Retentionszeit 150-mm-Säule	Retentionszeit 300-mm-Säule
Oxalacetat	3,68 ± 0,05	n.b.
Citrat/Isocitrat	4,34 ± 0,05	n.b.
α-Ketoglutarat	4,47 ± 0,05	n.b.
Pyruvat	5,10 ± 0,05	9,40 ± 0,1
Succinat	6,21 ± 0,05	11,64 ± 0,1
Lactat	6,80 ± 0,05	12,64 ± 0,1
Fumarat	7,42 ± 0,05	n.b.
Acetat	8,05 ± 0,05	14,85 ± 0,1

6 Mikrobiologische und molekularbiologische Methoden

6.1 DNA-Isolierung

6.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung und Reinigung von Plasmiden aus *E. coli* erfolgte im kleinen Maßstab (ausgehend von 5 ml Übernachtskultur) mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep-Kits der Firma Qiagen (Hilden), das auf der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (1979) beruht. Die Isolierung von Plasmiden im größeren Maßstab erfolgte mit Hilfe des Qiagen Plasmid Midi-Kits (ausgehend von 100 ml ÜN-Kultur) bzw. des Qiagen Plasmid Maxi-Kits (ausgehend von 500 ml ÜN-Kultur) nach den Angaben des Herstellers. Die Plasmid-DNA wurde in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,9, 1 mM EDTA) oder in Wasser eluiert bzw. gelöst. Die mit dieser Methode gewonnene Plasmid-DNA konnte außer für Restriktionsanalysen und Transformationen auch direkt zur Sequenzierung eingesetzt werden.

6.1.2 Isolierung chromosomaler DNA

Die Isolierung und Reinigung von chromosomaler DNA aus *E. coli* erfolgte im kleinen Maßstab (ausgehend von 5 ml Übernachtskultur) nach folgendem Protokoll (Ausubel *et al.*, 1992): Abzentrifugierte Zellen aus 1,5 ml ÜN-Kultur wurden in 567 µl TE-Puffer resuspendiert und mit 30 µl SDS (10 %, w/v) sowie 3 µl Proteinase K (20 mg/ml) versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl einer 5 M NaCl-Lösung und 80-µl-CTAB/NaCl-Lösung (auf 60°C erwärmt, 10 % (w/v) CTAB, 0,7 M NaCl) hinzugefügt und 10 min bei 65°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion der genomischen DNA. Dazu wurde die Lösung mit 1 Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1 Volumenanteile, Roth) versetzt, 30 sec gemischt und abzentrifugiert (5 min, 13000 g). Der Überstand wurde nochmals mit 1 Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol extrahiert. Nach Zentrifugation (5 min, 13000 g) wurde die obere wässrige DNA-haltige Phase abgenommen und die DNA durch Zugabe von 0,6 Volumen Isopropanol gefällt und abzentrifugiert (2 min, 13000 g). Das Pellet wurde mit 1 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl H₂O resuspendiert. Die DNA-Konzentration wurde wie unter 6.4 beschrieben bestimmt.

6.1.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach dem Protokoll des Herstellers.

6.2 Reinigung von DNA

Die Reinigung oder/und Aufkonzentrierung von DNA erfolgte durch Ethanol-fällung. Hierzu wurde die DNA-Lösung mit $\frac{1}{10}$ Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 3 Volumina Ethanol gemischt. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation (30 min, 15000 g, 4°C) sedimentiert, mit eiskaltem 70 %-igem (v/v) Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5, 1 mM EDTA) oder Wasser gelöst.

PCR-Produkte, die direkt für die Restriktion bestimmt waren, wurden mit dem PCR Purification-Kit nach den Angaben des Herstellers (Qiagen) gereinigt, um Oligonukleotide und noch vorhandene Nukleotide zu entfernen. Die DNA wurde mit TE-Puffer oder Wasser eluiert.

6.3 Restriktion von DNA

Der Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen (Roche Diagnostics, Mannheim bzw. New England Biolabs, Schwalbach) wurde gemäß den vom Hersteller angegebenen Bedingungen durchgeführt. Die Ansätze enthielten in der Regel etwa 1 µg DNA und ca. 10 U des gewünschten Enzyms und wurden 1 - 2 Stunden bei der erforderlichen Temperatur inkubiert. Zur Kontrolle der Restriktion wurde ein Aliquot des Ansatzes mit 1/5 Volumen Ladepuffer (0,2 % (w/v) Bromphenolblau, 100 mM EDTA, 34,8 % (v/v) Glycerin) versetzt und einer Agarose-Gelelektrophorese unterzogen.

6.4 Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen

Nukleinsäure-Konzentrationen wurden durch die Messung der Extinktion einer wässrigen Nukleinsäurelösung in einer 100-µl-Mikroküvette aus Quarzglas bei 260 nm bestimmt. Dabei wurden folgende Umrechnungsfaktoren verwendet (Sambrook, 1989):

doppelsträngige DNA: $E_{260} = 1$ entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml

einzelsträngige DNA und RNA: $E_{260} = 1$ entspricht einer Konzentration von 40 µg/ml

Die Reinheit der DNA wurde anhand des Quotienten E_{260}/E_{280} bestimmt, der zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte. Er ist ein Maß für die Verunreinigung der DNA mit Proteinen und liegt bei starker Verunreinigung unter 1,8.

6.5 Agarose-Gelelektrophorese

6.5.1 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach Größe wurde eine Agarose-Gelelektrophorese in 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA) durchgeführt. Die Agaroselösung wurde durch Aufkochen des Ultra-Pure-Agarosepulvers (GibcoBRL) in TAE-Puffer hergestellt. Die Laufgeschwindigkeit von DNA-Molekülen ist von ihrer Größe, Konformation (doppelsträngig, einzelsträngig, linear, zirkulär, mit oder ohne Strangbruch) sowie der Agarosekonzentration des Gels (0,8 - 2 %, w/v) und der elektrischen Feldstärke abhängig. Als DNA-Größenstandard wurde *Hind*III geschnittene λ-Phagen-DNA (200 ng/µl)

und *HindIII/EcoRI* geschnittene λ -Phagen-DNA (200 ng/ μ l) verwendet, die im Verhältnis 1:1 gemischt wurden. Damit wurde ein Größenbereich von 0,5 bis 21 kb abgedeckt. Bei Fragmenten zwischen 0,1 und 1 kb wurde der DNA-Molekulargewichtsmarker XIV (100-bp-Leiter, Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet. Die DNA-Proben wurden für die Elektrophorese mit 5 x Ladepuffer (0,2 % (w/v) Bromphenolblau, 100 mM EDTA, 34,8 % (w/v) Glycerin) versetzt. Die Herstellung der Gele und die Durchführung der Elektrophorese erfolgte nach Sambrook (1989). Nach der Elektrophorese wurden die DNA-Moleküle im Agarosegel mit dem interkalierenden, fluoreszierenden Farbstoff Ethidiumbromid (0,5 mg/l) angefärbt (10 min), gewässert (20 min) und das Gel unter UV-Licht mit einem Image Master[®]VDS-System (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) fotografiert.

6.5.2 RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die RNA-Qualität wurden mit Formaldehyd-Gelen in einer denaturierenden Agarose-Gelelektrophorese in 1 x MOPS (40 mM MOPS, 10 mM Essigsäure, 2 mM EDTA in DEPC-Wasser gelöst, pH 7) überprüft. 20,75 ml Agaroselösung (0,25 g Agarose, 5 ml 5x MOPS, 15,75 ml DEPC-H₂O) wurde aufgekocht und anschließend mit 4,25 ml Formaldehyd (37,5 %) versetzt. Der pH-Wert von Formaldehyd wurde vor der Verwendung mit Ionenaustauscher (AG 501-X8 (D) Resin 20-50mesh, BioRad) auf pH >6 eingestellt. Die RNA-Proben wurden vor der Elektrophorese mit 5 x Ladepuffer (50 % Formamid, 9,3 % Formaldehyd, 20 % 5 x MOPS, 50 μ g/ml Bromphenolblau, 0,7 % Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml)) versetzt, 10 min bei 95°C und danach 5 min auf Eis inkubiert. Die Herstellung der Gele und die Durchführung der Elektrophorese erfolgte nach (Sambrook et al., 1989) der Elektrophorese wurden das Formaldehyd-Gel gewässert (20 min) und das Gel unter UV-Licht mit einem Image Master[®]VDS-System (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) fotografiert.

6.6 Klonierungsexperimente mit *E. coli*

6.6.1 Herstellung kompetenter Zellen nach der Calciumchlorid-Methode

Durch eine Calciumchlorid-Behandlung erhielten exponentiell wachsende *E. coli*-Zellen die Kompetenz, freie DNA aus dem Medium aufzunehmen. Die Präparation der kompetenten Zellen erfolgte nach Cohen *et al.* (1972): 50 ml SOC-Medium wurde mit $\frac{1}{50}$ Volumen einer LB-Vorkultur inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von ~0,3 bei 37°C und 160 U.p.m. inkubiert und anschließend abzentrifugiert. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die

pelletierten Zellen wurden in $\frac{1}{4}$ Kulturvolumen eiskalter 50 mM CaCl_2 -Lösung resuspendiert und erneut abzentrifugiert (10 min, 4500 g, 4°C). Das Zellsediment wurde vorsichtig in 0,625 Kulturvolumen eiskalter 50 mM CaCl_2 -Lösung resuspendiert und anschließend 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen wiederum abzentrifugiert, vorsichtig in 0,05 Kulturvolumen eiskalter 50 mM CaCl_2 -Lösung resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 10 % (v/v) zugegeben und vorsichtig gemischt. Die Zellsuspension wurde in 200- μl -Aliquots auf vorgekühlte Eppendorfgläser aufgeteilt und entweder sofort zur Transformation eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

6.6.2 Herstellung kompetenter Zellen nach der Rubidiumchlorid-Methode

Durch eine Rubidiumchlorid-Behandlung erhielten logarithmisch wachsende *E. coli*-Zellen die Kompetenz, freie DNA aus dem Medium aufzunehmen. Die Präparation der kompetenten Zellen erfolgte nach Hanahan (1985): Einige 2 – 3 mm große Kolonien wurden von einer frischen LB- oder SOC-Platte in 1 ml SOC resuspendiert. Damit wurden 50 ml SOC-Medium inokuliert und bis zu einer OD_{600} von ~0,5 bei 37°C und 160 U.p.m inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 10 – 15 min auf Eis abgekühlt und danach geerntet (15 min, 3500 g, 4°C). Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden vorsichtig in $\frac{1}{3}$ Kulturvolumen eiskalter RF1-Lösung (12 g/l RbCl , 9,9 g/l MnCl_2 , 1,5 g/l CaCl_2 , 2,9 g/l Kaliumacetat, 150 g/l Glycerin, pH 5,8 mit 0,2 N Essigsäure eingestellt) resuspendiert, 15 min auf Eis inkubiert und erneut abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde vorsichtig in $\frac{1}{12,5}$ Kulturvolumen eiskalter RF2-Lösung (2,1 g/l MOPS, 1,2 g/l RbCl , 11 g/l CaCl_2 , 150 g/l Glycerin, pH 6,8 mit NaOH eingestellt) resuspendiert und anschließend 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde in 50- μl -Aliquots auf vorgekühlte Eppendorfgläser verteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Auch RbCl -kompetente Zellen, die direkt zur Transformation verwendet wurden, wurden zunächst schockgefroren.

6.6.3 Herstellung elektrokompenter Zellen

Zur Herstellung elektrokompenter *E. coli*-Zellen wurde SOC-Medium (Miller & Nickoloff, 1995) mit $\frac{1}{50}$ Volumen einer Vorkultur inokuliert und bei 37°C und 160 U.p.m inkubiert. Beim Erreichen einer OD_{600} von ~0,5 wurden die Zellen zunächst 30 bis 60 min auf Eis abgekühlt und anschließend geerntet (5 min, 4000 g, 4°C). Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Zur Abtrennung von Salzen wurden die Zellen viermal vorsichtig mit

400 ml eiskaltem 10 %-igem (v/v) Glycerin gewaschen. Bei jedem Waschschrift wurde die zur Sedimentation eingesetzte Zentrifugalbeschleunigung um jeweils 500 g erhöht. Anschließend wurden die Zellen in $\frac{1}{400}$ Kulturvolumen 10 %-igem (v/v) Glycerin aufgenommen, in 50- μ l- Aliquots auf vorgekühlte Eppendorfgefäße verteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

6.6.4 Ligation

Um die 5'-Phosphat-Gruppe von verdauten Plasmiden ("Vektoren") abzuspalten, wurde eine Dephosphorylierung mit *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP, Roche Diagnostics, Mannheim) durchgeführt. Die Dephosphorylierung erfolgte nach der Restriktion (0,5 bis 3 μg DNA in 50 μl) durch Zugabe von 1 μl SAP (1 U). Es folgte eine 45- bis höchstens 60-minütige Inkubation bei 37°C . Der dephosphorylierte "Vektor" wurde ebenso wie das "Insert" (Restriktionsfragmente von Plasmiden oder PCR-Produkte) aus einem Agarosegel isoliert. Für Ligationen wurde der Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) genutzt, wobei die Ligationszeit 10 - 20 min bei Raumtemperatur betrug. Dephosphorylierte Vektor-DNA und Insert-DNA wurden in einem molaren Verhältnis von etwa 1:3 gemischt.

6.6.5 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation mit Ligationsansätzen oder Plasmiden wurden CaCl_2 -kompetente- (siehe 6.6.1) oder RbCl -kompetente-Zellen (siehe 6.6.2) verwendet. Dazu wurden frische kompetente Zellen verwendet (nur CaCl_2 -kompetente-Zellen) oder die bei -70°C gelagerten Aliquots auf Eis aufgetaut. 1 μl Plasmid-DNA oder bis zu 5 μl eines Ligationsansatzes wurden mit 50 μl Zellsuspension gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock von 45 sec bei 42°C , gefolgt von 2 min Inkubation auf Eis. Dann wurden 500 μl SOC-Medium (siehe 5.1) zugegeben und der Ansatz 1 h bei 37°C inkubiert ("phänotypische Expression"). Anschließend wurden Aliquots auf LB-Platten ausplattiert, die das geeignete Antibiotikum enthielten und die Platten ÜN bei 37°C inkubiert.

Zur Transformation intakter Plasmide und für die Transposonmutagenese mit pKNG101-Tn5 wurden elektrokompetente Zellen eingesetzt (siehe 6.6.5). 50 μl Zellsuspension wurde mit bis zu 5 μl DNA gemischt und luftblasenfrei in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette (0,2 cm Elektrodenabstand, Eppendorf, Hamburg) überführt. Anschließend erfolgte sofort ein Strompuls mit folgenden Parametern: Spannung: 2,5 kV, Kapazität: 25 μF , Widerstand: 200 Ω . Die Zeitkonstante lag dabei zwischen 4,7 und 4,9 ms. Dann wurden 500 μl vorgewärmtes SOC-Medium (siehe 5.1) zugegeben und der Ansatz 1 h bei 37°C inkubiert

("phänotypische Expression"). Anschließend wurden Aliquots auf LB-Platten mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert und die Platten ÜN bei 37°C inkubiert.

6.7 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch Polymerasekettenreaktion (PCR)

6.7.1 Standard-PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde zur *in vitro*-Amplifizierung von DNA-Fragmenten (Mullis & Faloona, 1987), zur Kontrolle von Transformanden, Insertions- sowie Deletionsmutanten eingesetzt. Die PCR wurde in einem Thermo-Cycler (Primus 25, MWG Biotech, Ebersberg) durchgeführt. Die Konzentration der eingesetzten Komponenten richtete sich nach den jeweiligen Versuchsbedingungen. Als Anlagerungs-Temperatur wurde eine Temperatur gewählt, die in der Regel 3 - 7°C unter dem niedrigsten T_M -Wert der Oligonukleotide lag. Der T_M -Wert wurde durch die Nukleotid-Zusammensetzung der eingesetzten Oligonukleotide nach folgender Formel bestimmt: $T_M = 4 \times (n_G + n_C) + 2 \times (n_A + n_T)$. Dabei wurden nur die Nukleotide der Primer in die Berechnung einbezogen, die bereits im ersten Zyklus mit der Matrizen-DNA hybridisierten. Der Zeitraum für die DNA-Neusynthese wurde je nach Größe des zu amplifizierenden Fragments variiert, wobei routinemäßig 1 min pro 1000 Basen berechnet wurde. Alle als Primer eingesetzten Oligonukleotide sind in Tab. 3 aufgeführt. Für analytische PCR wurde *Taq*-DNA-Polymerase (Qiagen, Hilden oder Sigma, Deisendorf) eingesetzt. Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten, die für weitere Klonierungsschritte verwendet wurden, wurde der Expand High Fidelity Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) genutzt, der durch die Kombination von *Taq*-DNA-Polymerase mit einer 3'-5'-fehlerkorrigierenden *Pwo*-DNA-Polymerase eine geringere Fehlerrate bewirkt (Fehlerrate von 5×10^{-6} für *Pwo* und 1×10^{-5} für die *Taq*-Polymerase; Barnes, 1994).

Standard-PCR-Ansatz:

DNA-Matrize	0,5-1 µg
dNTP-Mix	je 200 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
Primer-for	25 pmol (Endkonzentration 0,5 µM)
Primer-rev	25 pmol (Endkonzentration 0,5 µM)
10 x Puffer	5 µl
ddH ₂ O	ad 50 µl
<i>Taq</i> -Polymerase	1 µl (5 U)

Reaktionsbedingungen:

Denaturierung der DNA	5 min	95°C	1x
Denaturierung der DNA	30 sec	95°C	} 34 x
Primer-"Annealing"	60 sec	$T_M - 5^\circ\text{C}$	
Primer-Elongation	1 min/kb	68°C	

6.7.2 Kolonie-PCR

Bei diesem Verfahren wurden Zellen der zu untersuchenden Bakterienstämme direkt von der Platte mit einem sterilen Zahnstocher abgenommen, auf einer frischen Agarplatte ausgestrichen und anschließend die restlichen am Zahnstocher haftenden Bakterien in einem PCR-Ansatz resuspendiert. Durch eine initiale Inkubation von 10 min bei 95°C wurden die Zellen lysiert und somit die zu analysierende DNA freigesetzt. Die Reaktion wurde in einem 25- μl -Ansatz durchgeführt. Bei der Kolonie-PCR wurde die Red-*Taq*-Polymerase (Sigma, Deisendorf) eingesetzt. Dadurch konnten die Proben nach der PCR ohne Zugabe von Probenpuffer direkt auf ein Agarosegel aufgetragen und analysiert werden.

6.8 Konstruktion von Deletionsmutanten mit Hilfe des pKO3-Systems

Deletionsmutanten von *E. coli* wurden durch eine Kombination von "Crossover"-PCR mit dem Vektor pKO3 (Link *et al.*, 1997), der in *E. coli* bei 42 - 44°C nicht repliziert, konstruiert. Für die "Crossover"-PCR wurden zunächst zwei etwa 500 bp große PCR-Produkte hergestellt, die den 5'-flankierenden Bereich inklusive der ersten 6-8 Codons (Primer No-... und Ni-...) bzw. den 3'-flankierenden Bereich inklusive der letzten 11-16 Codons (Primer Co-... und Ci-...) des zu deletierenden Gens umfassten. Die äußeren Primer (No-... und Co-...) enthielten eine Restriktionsschnittstelle, die für die Klonierung in pKO3 genutzt wurde. Die inneren Primer enthielten eine 21 bp lange komplementäre Sequenz an ihrem 5'-Ende (Ni-...-21mer und Ci-...-21mer). Die beiden PCR-Fragmente wurden gereinigt (vgl. 6.1.3 bzw. 6.2) und als Matrize in einer zweiten PCR mit den äußeren Primern eingesetzt. Dabei konnten die beiden Fragmente über die 21- bzw. 33-bp-Sequenzen miteinander hybridisieren und verlängert werden, so dass ein Fusionsprodukt entstand. Das Fusionsprodukt wurde verdaut, gereinigt und in den entsprechend verdauten pKO3-Vektor kloniert. Nachdem das durch PCR erhaltene Fragment durch Sequenzierung überprüft worden war, wurden fehlerfreie Plasmide mittels Elektroporation in *E. coli* transferiert und der Transformationsansatz auf LB-Platten

mit Chloramphenicol (20 µg/ml) bei 43°C ausplattiert. Da pKO3 und seine Derivate bei 43°C in *E. coli* nicht repliziert werden, sollte in chloramphenicolresistenten Klonen das Plasmid über homologe Rekombination im Bereich des Deletionskonstrukts in das Chromosom integriert worden sein. Um auf ein zweites Rekombinationsereignis zu selektionieren, wurden chloramphenicolresistente Klone in je 1 ml LB-Medium aufgenommen und sofort auf LB-Medium mit 5 % (w/v) Saccharose ausplattiert und bei 30°C inkubiert. In Anwesenheit von Levansucrase, dem Produkt des *sacB*-Gens von pKO3, sind 5 % Saccharose letal für *E. coli*. Deshalb sollte bei saccharoseresistenten Klonen das Plasmid durch ein zweites Rekombinationsereignis aus dem Chromosom entfernt worden sein, wobei entweder der Wildtyp wiederhergestellt oder die gewünschte Deletion erzeugt wird.

6.9 P1vir-Phagentransduktion

Zur P1vir-Phagentransduktion wurde ein Protokoll von Silhavy *et al.* (1984) modifiziert.

6.9.1 Herstellung des Phagenlysates

Der Donor-Stamm wurde in 5 ml LB mit 0,2 % (w/v) Glucose und 5 mM CaCl₂ bis zu einer OD₆₀₀ von ~1 bei 37°C kultiviert. ¹/₁₀₀ der Vorkultur wurde in 5 ml LB mit 0,2 % (w/v) Glucose und 5 mM CaCl₂ inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von ~0,4 bei 37°C und 170 U.p.m. inkubiert. Anschließend wurde entweder ein einzelner Phagenplaque oder 100 µl des P1vir-Lysates (>5 x 10⁸ Phagen/ml) zugesetzt und etwa zwei Stunden bei 37°C inkubiert, bis die Zellen vollständig lysiert waren. Zum Abstoppen der Lyse wurden 100 µl Chloroform zugefügt, der Ansatz gut gemischt und 10 min bei 4500 g zentrifugiert. Der das Phagenlysat enthaltende wässrige Überstand wurde sterilfiltriert und konnte bei 4°C gelagert werden.

6.9.2 Bestimmung des Phagentiters

Der Empfänger-Stamm wurde in 5 ml LB mit 0,2 % (w/v) Glucose und 5 mM CaCl₂ bis zu einer OD₆₀₀ von ~0,5 - 1 bei 37°C kultiviert und anschließend 10 min bei 1500 g sedimentiert. Das Pellet wurde in 1 ml 0,1 M MgSO₄/5 mM CaCl₂ resuspendiert. Jeweils 50 µl Zellsuspension wurde mit 50 µl verdünntem Phagenlysat (10⁻²-10⁻¹⁰) gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 300 µl geschmolzener, auf 50°C abgekühlter R-Top-Agar (10 g/l Trypton, 1 g/l Hefeextrakt, 8 g/l NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 g/l Glucose, 8 g/l Agar) hinzugefügt, gemischt und sofort auf R-Platten (wie R-Top-Agar, aber mit 15 g/l Agar)

verteilt und ÜN bei 37°C inkubiert. Die gebildeten Plaques wurden gezählt und der Phagentiter in Phagen/ml bestimmt.

6.9.3 Durchführung der Phagentransduktion

Der Empfänger-Stamm wurde in 5 ml LB mit 0,2 % (w/v) Glucose und 5 mM CaCl₂ bis zu einer OD₆₀₀ von ~0,5 - 1 bei 37°C kultiviert und anschließend 10 min bei 1500 g sedimentiert. Das Pellet wurde in 1 ml 0,1 M MgSO₄/5 mM CaCl₂ resuspendiert. Danach erfolgte die Transduktion nach folgendem Schema:

Nr.	Volumen Empfänger-Zellen [µl]	Volumen P1vir-Lysat [µl]
1	100	0
2	100	1
3	100	10
4	100	100
5	0	100

Die Nr. 1 diene dabei der Kontrolle auf entstehende Revertanten und die Nr. 5 diene der Kontrolle auf Kontaminationen im Phagenlysat. Diese Ansätze wurden 30 min bei 30°C inkubiert. In dieser Zeit erfolgte die Infektion der Empfänger-Zellen mit den Phagen. Zum Abstoppen der Infektion wurden 100 µl 1 M Natriumcitrat zu den Ansätzen hinzugefügt, die Zellen abzentrifugiert, in 100 µl LB mit 10 mM Natriumcitrat aufgenommen und zur "phänotypischen Expression" 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Platten mit dem geeigneten Antibiotikum ausplattiert und die Platten ÜN bei 37°C inkubiert.

6.10 Tn5-Transposonmutagenese

Die Transposonmutagenese wurde zur Herstellung fluoro- oder bromopyruvatresistenter *E. coli*-Stämme eingesetzt. Elektrokompetente MG1655-Zellen wurden mit dem Plasmid pKNG101-Tn5 transformiert. Dann wurden 500 µl SOC-Medium (siehe 5.1) zugegeben und der Ansatz 1 h bei 37°C inkubiert ("phänotypische Expression"). Anschließend wurden Aliquots auf LB-Platten bzw. M9-Minimalmedium-Platten (Glucose als C-Quelle) ausplattiert, die Kanamycin und verschiedene Konzentrationen an Fluoro- bzw. Bromopyruvat enthielten und die Platten ÜN bei 37°C inkubiert. Die resistenten Klone

wurden auf M9-Minimalmedium-Platten mit Glucose bzw. mit Pyruvat als C-Quelle übertragen. Bei Kolonien, die auf M9-Minimalmedium mit Glucose, nicht aber auf M9-Minimalmedium mit Pyruvat wuchsen, könnte es sich um Mutanten handeln, bei denen das Transposon ein für die Pyruvat-Aufnahme essentielles Gen inaktiviert hatte. Die Kolonien wurden zur Kontrolle nochmals parallel auf M9-Minimalmedium-Platten mit Glucose bzw. Pyruvat vereinzelt, um den Phänotyp zu bestätigen.

6.11 Southern-Blot-Analyse

Bei der Southern-Blot-Analyse (Southern, 1975) erfolgte der Transfer von DNA aus Agarosegelen auf Nylonmembranen (Hybond N⁺, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) mit Hilfe einer Vakuum-Blot-Transfer-Zelle (LKB VacuGene XL, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) nach Angaben des Herstellers. Aliquots genomischer DNA (15-20 µg) wurden zunächst vollständig mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut und über ein 0,8 %iges (w/v) Agarosegel bei 1 V/cm ÜN aufgetrennt. Bei der Elektrophorese wurde ein Digoxigenin-markierter DNA-Standard II und III (Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet. Vor dem Blotten mußte zunächst die Membran und eine Maske auf Gelgröße zurechtgeschnitten werden. Anschließend wurde der Blot zusammengesetzt: Zuerst wurde die Nylonmembran aufgelegt, dann die Maske, danach wurde die Apparatur fixiert und das Gel aufgelegt, welches die Maske abdichten mußte. Die Apparatur wurde dann an eine Pumpe (Bromma LKB 2016 VacuGene Vacuum Blotting Pump, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) angeschlossen (50 mbar). Zum Vakuum-Blotten wurde zunächst 20 min depuriniert (0,3 M HCl, bis der Blaumarker gelb wurde), dann 15 min denaturiert (1,5 N NaCl, 0,5 N NaOH, bis der Blaumarker wieder blau wurde) und schließlich 20 min neutralisiert (1 M Tris, 1,5 N NaCl, pH 8,0). Der Transfer erfolgte über eine Stunde (20 x SSC = 3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 7,0). Danach wurde die DNA durch dreiminütige UV-Bestrahlung kovalent auf der Nylonmembran fixiert. Anschließend erfolgte die Hybridisierung des Blots mit der Digoxigenin-markierten PCR-Sonde. Die Markierung der als Sonden eingesetzten PCR-Fragmente mit Digoxigenin, die Hybridisierung, das Waschen und die Detektion mit CDP-Star erfolgten mit dem DIG Chem-Link Labeling and Detektion Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Die verwendeten Primer sind in Tab. 3 angegeben. Zunächst wurde der Blot in Hybridisierungsröhren aus Glas transferiert, mit 20 ml/100 cm² Membranfläche Prähybridisierungslösung (5 x SSC; 1 % (v/v) Blockierungsreagenz (Roche) in Maleinsäurepuffer (0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl; mit

NaOH-Plätzchen auf pH 7,5 eingestellt) gelöst; 0,1 % (w/v) N-Lauroylsarcosin; 0,02 % (w/v) SDS) versetzt und die Röhren 2 - 4 Stunden bei 68°C so langsam wie möglich im Hybridisierungssofen (Shake 'n' Stack, Thermo Life Sciences, Egelsbach) gedreht. Die Digoxigenin-markierte Sonde, von der 20-50 ng/ml Hybridisierungslösung (Prähybridisierungslösung + Sonde) eingesetzt wurden, wurde vor Gebrauch denaturiert (10 min, 95°C). Die Hybridisierung erfolgte ÜN bei 68°C. Die Hybridisierungslösung mit der Sonde wurde für eine spätere Wiederverwendung eingefroren. Vor der Detektion wurde die Membran 2 x 5 min in 50 ml 2 x SSC bei RT und 2 x 15 min in 50 ml 0,1 x SSC bei 68°C gewaschen, anschließend kurz in Maleinsäurepuffer gewaschen und 30 min in 80 ml Blockierungslösung inkubiert (bei Raumtemperatur). Danach erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit der Antikörperlösung (1:10000 Verdünnung des Antikörpers (Anti-Digoxigenin-alkalische Phosphatase-Konjugat, Roche Diagnostics, Mannheim) mit Blockierungsreagenz). Anschließend wurde die Membran 2 x 15 min mit 80 ml/100 cm² Waschpuffer (Maleinsäurepuffer mit 0,3 % (v/v) Tween[®]20) gewaschen und 5 min in Detektionspuffer (0,1 M Tris, 0,1 M NaCl, pH 9,5) äquilibriert. Zur Detektion wurde der Blot in eine Plastikfolie gelegt und auf die DNA-Seite 25 Tropfen/100 cm² CDP-Star-ready-to-use-Lösung (Roche Diagnostics, Mannheim) aufgetropft. Nach ca. 5 min Inkubation wurde das Fluoreszenzsignal mit einer CCD-Kamera detektiert. Zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten wurde die AIDA-Software (Version 2.0, Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt) eingesetzt.

7 Biochemische Methoden

7.1 Zellaufschluß und -fraktionierung

Für den Aufschluss von Zellen wurden diese in 10 ml TE-Puffer resuspendiert (4 ml Puffer/g Feuchtzellen). Als Proteaseinhibitor diente Phenylmethylsulfonyl-Fluorid (PMSF), das in einer Konzentration von 2 mM eingesetzt wurde. Zum Abbau der DNA wurde außerdem 0,25 mg/ml DNase I hinzugefügt. Der Zellaufschluß erfolgte durch dreimalige Passage durch eine French-Press-Zelle (SLM AMINCO[®] Spectronic Instruments, Heinemann, Schwäbisch Gmünd) bei einem Druck von 108 MPa. Anschließend wurden intakte Zellen sowie große Zelltrümmer durch Zentrifugation (30 min, 27000 g, 4°C) abgetrennt. Danach erfolgte eine Ultrazentrifugation des zellfreien Überstandes (90 min,

70000 g, 4°C), die zur Sedimentierung der Membranen führte. Der so gewonnene Überstand (Rohextrakt) wurde zur Bestimmung von Enzymaktivitäten (siehe 7.3) oder für die zweidimensionale Gelelektrophorese (siehe 7.4.1) eingesetzt.

7.2 Bestimmung der Lactat-Dehydrogenase-Aktivität

Die Bestimmung der Lactat-Dehydrogenase-Aktivität (LdhA-Aktivität) erfolgte nach Bunch *et al.* (1997). In LB-Medium kultivierte Zellen wurden bei einer $OD_{600} \sim 1,2$ geerntet und in 10 ml 50 mM KH_2PO_4 -Puffer pH 7,4 gewaschen und anschließend in 3 ml Puffer aufgenommen. Diese Zellen wurden wie unter 7.1 beschrieben mit Hilfe einer French-Press-Zelle aufgeschlossen. Anschließend erfolgte eine Ultrazentrifugation (1 h, 145000 g, 4°C). Der Rohextrakt wurde bis zur Bestimmung der LdhA-Aktivität bei $-20^\circ C$ gelagert. Die Proteinkonzentration wurde wie unter 7.3 beschrieben bestimmt. Die LdhA-Aktivität wurde photometrisch mit einem Jasco V560 Spektrophotometer bei 340 nm und $25^\circ C$ bestimmt. Die LdhA katalysiert dabei die Umsetzung von Pyruvat zu Lactat, wobei NADH zu NAD^+ oxidiert wird. Die Durchführung erfolgte in einem 1-ml-Ansatz nach folgendem Schema:

50 mM MOPS pH 7,0	400 μ l
6,4 mM NADH-Lösung	30 μ l
Rohextrakt	10 - 40 μ l
ddH ₂ O	ad 970 μ l

Nach Bestimmung der NADH-Dehydrogenase-Aktivität im Rohextrakt wurde die Messung durch Zugabe von 30 μ l Na-Pyruvat (1 M) gestartet. Zur Berechnung der Aktivität nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz ($E = \epsilon \times d \times c$) wurde ein Extinktionskoeffizient von $6,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ verwendet. 1 U ist die LdhA-Aktivität, die notwendig ist, um 1 μ mol NADH zu NAD^+ pro min umzusetzen.

7.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Bicinchoninsäure (BCA)-Methode (Smith *et al.*, 1985) mit dem Protein-Assay-Kit von Pierce (Rockford, USA). Als Standard wurde Rinder-Serumalbumin verwendet. Nach Zugabe des BCA-Reagenzes zur

Proteinlösung wurden die Ansätze 30 min bei 37°C inkubiert und vor der Messung der Extinktion bei 562 nm 10 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt.

7.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen

7.4.1 Zweidimensionale Gelelektrophorese von Proteinen

Bei der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2D-Elektrophorese) werden Proteingemische zunächst durch eine isoelektrische Fokussierung nach ihrem isoelektrischen Punkt (1. Dimension) und anschließend durch SDS-PAGE nach ihrer Größe (2. Dimension) aufgetrennt. Mit Ausnahme von Thioharnstoff (Sigma, Deisendorf) und des Proteinstandards (New England Biolabs, Schwalbach) wurden alle Reagenzien und Apparaturen für die 2D-Elektrophorese von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen. Vor der isoelektrischen Fokussierung in einem immobilisierten pH-Gradienten (IPG) wurden die Proteine solubilisiert. Dazu wurden 300 µg Protein vakuumgetrocknet und in 350 µl Solubilisierungspuffer (9 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 100 mM Dithiothreitol, 2 % (w/v) CHAPS, 1 % (v/v) Pharmalyte 3-10) gelöst. Die Proteinlösung wurde dann auf einem 18 cm langen IPG-Streifen verteilt, der den pH-Bereich von 4 bis 7 abdeckte. Die isoelektrische Fokussierung wurde in einem IPGphor-Gerät nach folgendem Programm durchgeführt: 6 h 30 V, 6 h 60 V, 1 h 200 V, 1 h 500 V, 1 h 2000 V, ~10 h 8000 V (ergibt in der Summe ~80000 Voltstunden). Nach der 1. Dimension konnte der IPG-Streifen bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden.

Der IPG-Streifen wurde nach der 1. Dimension unter leichtem Schwenken zunächst 20 min in 10 ml Äquibrierungslösung I (Äquibrierungs-Stammlösung (50 mM Tris-HCl pH 6,8, 6 M Harnstoff, 30 % (v/v) Glycerin, 4 % (w/v) SDS), 1 % (w/v) DTT, 50 µl BPB-Lösung (0,1 g Bromphenolblau/ml, 50 % (w/v) Saccharose) und anschließend 20 min in Äquibrierungslösung II (Äquibrierungs-Stammlösung, 4 % (w/v) Iodacetamid, 50 µl BPB-Lösung) inkubiert. DTT und Iodacetamid wurden direkt vor der Anwendung zugesetzt.

Die Auftrennung nach Größe erfolgte mit einem Fertiggel (ExcelGel SDS Gradient XL 12-14 %, Trennungsbereich ca. 5 bis 210 kDa) unter Verwendung des Horizontalgel-Systems Multiphor II. Zur Vorbereitung wurde die Kühlplatte dünn mit Cover-Fluid bedeckt und das Gel luftblasenfrei auf die Kühlplatte aufgelegt. Die ExcelGel[®] SDS-Pufferstreifen wurden ebenfalls luftblasenfrei am Anoden- bzw. Kathoden-Ende des Gels aufgelegt. Der IPG-Streifen wurde nach Äquibrierung mit Lösung II kurz mit Wasser gespült, auf die Kathoden-

Seite des Gels gelegt und der Vorlauf (100 V, 50 W, 20 mA/Gel, 45 min) gestartet. Anschließend wurde der IPG-Streifen entfernt und der Hauptlauf (800 V, 50 W, 40 mA/Gel, 160 min) gestartet. Als Größenstandard wurde der Broad Range Protein Marker von New England Biolabs (Schwalbach) verwendet.

7.4.2 Proteindetektion mit kolloidalem Coomassie Brilliant Blau G-250

Nach der Elektrophorese wurden die Gele mindestens 1 h in 300 ml Fixierlösung schüttelnd inkubiert. Für die Fixierlösung wurden unmittelbar vor Gebrauch Stammlösungen A (25 % (w/v) Ammoniumsulfat, 3 % (v/v) Phosphorsäure) und Stammlösung B (Methanol) im Verhältnis 2:1 gemischt. Anschließend wurde 1 ml Farbstofflösung (5 % (w/v) Coomassie G-250 in Wasser) zugegeben und die Gele ÜN, maximal jedoch 3 Tage in der Farbstofflösung inkubiert. Danach wurden die Gele 3 x 20 min in ddH₂O gewaschen und dann überschüssige Farbstoffe durch Waschen in 30 % (v/v) Methanol (1 min) entfernt. Nach einem weiteren Waschschrift (15 min in dH₂O) wurden die Gele getrocknet.

7.5 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

7.5.1 Probenaufbereitung für die Massenspektrometrie

Für "Peptidmassen-Fingerprint"-Analysen wurden Gelstückchen aus Coomassie-gefärbten 2D-Gelen mit Pasteurpipetten ausgestochen und die Proteine im Gel mit Trypsin verdaut (Fountoulakis & Langen, 1997). Gelstücke, die aus getrockneten Gelen entnommen wurden, wurden zunächst 1 x 15 min mit 350 µl Wasser schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Gelstücke nach 2 x 10 min Waschen mit 350 µl 0,1 M Ammoniumbicarbonat in 30 % (v/v) Acetonitril (ACN) inkubiert. Die entfärbten Gelstücke wurden danach 20 min in einer Speed-Vac (Savant Instruments, Inc., Holbrook, NY) getrocknet, anschließend mit 1 µl 3 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,8) mit 10 ng/µl Trypsin (Sequencing grade modified Trypsin, Promega, Mannheim) rehydratisiert und 30 Minuten inkubiert. Puffer und Gelstückchen wurden anschließend durch kurze Zentrifugation (1 min, 13000 g) sedimentiert und weitere 2 µl 3 mM Tris/HCl (pH 8,8) ohne Trypsin zugegeben und die Proben bei 37°C ÜN verdaut. Die Peptide wurden durch Zugabe von 6 µl Wasser (15 min, RT) und Zugabe von 5 µl 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure (TFA) in 30 % (v/v) ACN (10 min, RT) eluiert und bis zur Massenspektrometrie bei – 20°C gelagert.

7.5.2 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

0,5 μl der so erhaltenen Peptidlösung wurden auf einer Probenplatte mit 0,5 μl einer gesättigten Lösung von α -Cyano-4-hydroxy-*trans*-zimtsäure in 50 % (v/v) ACN, 0,1 % (v/v) TFA gemischt. Für jede Probe erfolgte eine externe Kalibrierung, bei der die Calibration Mixtures 1 und 2 des Sequazyme Peptide Mass Standard Kits (Applied Biosystems, Weiterstadt) unmittelbar neben dem Proben spot aufgetragen wurden. Die Proben wurden in einer Voyager-DE STR Biospectrometry Workstation (Applied Biosystems, Weiterstadt) im positiven Reflektor-Modus mit 20 kV Beschleunigungsspannung, 63 % Gitterspannung und einer Verzögerungszeit von 125 ns analysiert. Zur Steuerung des Geräts und zur Datenanalyse wurden die Voyager Control Panel Software 5.0 und die Voyager Data Explorer Software 3.5 (Applied Biosystems, Weiterstadt) verwendet. Die erhaltenen Peptidmassen wurden zur Identifizierung mit dem MS-Fit-Programm (Clouser *et al.*, 1999) analysiert. Eine sichere Identifizierung wurde angenommen, wenn mindestens vier Peptidmassen mit den vorhergesagten Massen übereinstimmten. Dabei durften die Unterschiede zwischen gemessener und theoretischer Masse maximal 100 ppm betragen und die Massenabweichung der einzelnen Peptide einem Muster folgen, das auf eine ungenaue Kalibrierung zurückgeführt werden konnte. Wenn die Anzahl der zugeordneten Peptide für eine sichere Identifizierung des Proteins nicht ausreichend war, wurde versucht, die Proteinlösung durch eine ZipTip-Behandlung aufzukonzentrieren und vor allem zu entsalzen. Dazu wurde das ZipTip (Millipore, Schwalbach) zweimal mit 10 μl 50 % (v/v) Acetonitril befeuchtet und anschließend zweimal mit Äquilibrierungspuffer (0,1 % (v/v) TFA) gewaschen. Danach wurde die Proteinlösung durch 10maliges Aufziehen und wieder Abgeben an die ZipTip-Matrix gebunden. Die ZipTips wurden dann fünfmal mit 0,1 % (v/v) TFA gewaschen und die Proteine anschließend direkt in der Matrixlösung (gesättigte α -Cyano-4-hydroxy-*trans*-zimtsäure in 50 % (v/v) Acetonitril, 0,1 % (v/v) TFA) durch fünfmaliges Aufziehen und wieder Abgeben eluiert. Ein Aliquot wurde direkt auf die MALDI-Proben-Platte aufgetragen und die Probe nochmals gemessen.

8 Genexpressionsanalysen

8.1 Isolierung und Analyse von RNA

Zur Präparation von RNA für DNA-Chip-Experimente wurde ein Aliquot der zu untersuchenden Kultur (35-120 ml) mit 15 g/35 ml Kultur Eis (auf -20°C vorgekühlt) abzentrifugiert (3 min, 4000 g, 4°C) (Wendisch *et al.*, 2001). Die Pellets wurden entweder sofort zur Präparation von RNA verwendet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Präparation bei -20°C gelagert.

Frisch abzentrifugierte oder gefrorene Zellen wurden in 10 µl/ml Kulturvolumen RLT-Puffer (RNeasy, Qiagen, Hilden) resuspendiert und mit 1 g/70 ml Kulturvolumen Zirkonium/Silica-Perlen (Durchmesser 0,1 mm, ROTH, Karlsruhe) mechanisch aufgeschlossen (3 x 30 s, Silamat S5, Vivadent, Ellwangen). Nach Zentrifugation (1 min, 13000 g) wurde der Überstand zur Isolierung von Gesamt-RNA auf Membranen, die auf Silica-Gelen basieren (Säulenchromatographie-System, RNeasy, Qiagen), aufgetragen. Diese Membranen binden in Anwesenheit von Ethanol und einer speziellen hoch konzentrierten Salz-Puffer-Lösung (RNeasy, Qiagen) selektiv einzelsträngige RNA-Moleküle ab einer Größe von 200 Basenpaaren. Entsprechend den Herstellerangaben (Qiagen, Hilden) wurde nach drei Waschschritten die adsorbierte RNA mit 2 x 50 µl H₂O von der Membran eluiert. Anschließend erfolgte der Abbau vorhandener DNA mit 30 U DNase I (RNase-frei, Roche Diagnostics, Mannheim) für 20 min bei 37°C in DNase-Puffer (1 M Na-Acetat, 50 mM MgSO₄, pH 5,0). Die DNase I wurde anschließend hitzeinaktiviert (70°C, 10 min). Zur weiteren Reinigung der RNA wurde die RNA-Lösung mit 1 Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1 Volumenanteile, Roth) versetzt, 30 s gemischt und 5 min bei 15000 g abzentrifugiert. Die Zentrifugation erfolgte dabei mit einem Gel (Phase Lock Gel, Eppendorf). Hierbei wurde die organische von der wässrigen RNA-haltigen Phase getrennt, wobei sich die Gelphase nach Zentrifugation zwischen organischer und wässriger Phase befand. Durch diese Trennung wurde die wässrige Phase mit RNA quantitativ zurückgewonnen und in einer zweiten Extraktion mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 Volumenanteile) nochmals extrahiert. Nach Zentrifugation (15 min, 13000 g) wurde die obere, wässrige, RNA-haltige Phase abgenommen und die RNA ÜN durch Zugabe von $\frac{1}{10}$ Volumen 3 M Natriumacetat und 3 Volumina Ethanol bei -20°C gefällt und danach abzentrifugiert (15 min, 12000 g). Die RNA wurde mit 1 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, bei 70°C im Thermoblock (Eppendorf) getrocknet und in 50 µl H₂O resuspendiert. Die RNA-

Konzentration wurde wie unter 6.4 beschrieben bestimmt. Die Qualität (E_{260}/E_{280} i.d.R. 1,6 - 1,8) wurde außerdem mittels Formaldehyd-Gelen (s. 6.5.2) überprüft. Die Lagerung von präparierter RNA erfolgte bei -20°C .

8.2 Synthese fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden

Für den Vergleich genomweiter Genexpressionsmuster wurden fluoreszenzmarkierte cDNA-Sonden ausgehend von gleichen Mengen der zu vergleichenden RNA-Proben (25 μg) synthetisiert (Wendisch *et al.*, 2001). Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden jeweils die dUTP-Analoga Cy3-dUTP ($\lambda_{\text{Absorption max}}$ 550 nm, $\lambda_{\text{Fluoreszenz max}}$ 570 nm, grün, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) oder Cy5-dUTP ($\lambda_{\text{Absorption max}}$ 649 nm, $\lambda_{\text{Fluoreszenz max}}$ 670 nm, rot, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) verwendet. Die RNA (25 μg Gesamt-RNA in H_2O gelöst) wurde mit 500 ng Zufalls-Hexanukleotid-Primern (in ddH_2O gelöst, Amersham Pharmacia) inkubiert (65°C , 10 min) und anschließend 2 min auf Eis abgekühlt. Die reverse Transkription wurde in einem Puffer durchgeführt, der 0,1 mM Cy3-dUTP oder Cy5-dUTP, 50 mM Tris-HCl, pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl_2 , 10 mM DTT, 0,5 mM dATP, 0,5 mM dGTP, 0,5 mM dCTP, 0,2 mM dTTP und 400 U Superscript-II Reverse Transcriptase (Life Technologies, Inc., Rockville, MD) enthielt (Wendisch *et al.*, 2001). Der 30 μl Ansatz wurde 10 min bei Raumtemperatur und anschließend 110 min bei 42°C inkubiert. Nach der reversen Transkription wurde die RNA durch Zusatz von 10 μl NaOH (0,1 N) 10 min bei 70°C hydrolysiert. Die Lösung wurde mit 10 μl HCl (0,1 N) neutralisiert. Die Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide erfolgte durch Ultrazentrifugationseinheiten (Microcon YM-30, Millipore, Schwalbach). Der 50 μl Ansatz wurde mit Wasser auf 500 μl aufgefüllt und durch Zentrifugation (7 min, 13000 g) auf etwa 20 μl eingengt. Danach wurden die für eine Hybridisierung vorgesehenen Cy3- und Cy5-markierte Sonde vereinigt und es erfolgten, wie beschrieben, zwei weitere Ultrafiltrationszentrifugationen (8 min, 13000 g). Die so erhaltene etwa 14 μl cDNA-Sonde wurde entweder $\ddot{\text{U}}\text{N}$ eingefroren oder sofort in Hybridisierungsexperimenten eingesetzt.

8.3 DNA-Chip-Hybridisierung

Die in dieser Arbeit verwendete DNA-Chip-Technologie zur Untersuchung differentieller Genexpressionsmuster und das verwendete Robotersystem zur Herstellung von DNA-Chips beruht auf dem an der Stanford University entwickelten System (Shalon *et al.*, 1996) und

wurde im Institut für Biotechnologie durch Dr. Volker Wendisch und Dr. Tino Polen etabliert (Lehnen *et al.*, 2002; Polen, 2002; Wendisch *et al.*, 2001). Die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Chips wurden von Tino Polen zur Verfügung gestellt. Sie enthielten 4108 (95,8 %) aller 4290 ORF's von *E. coli* MG1655. Da man zur Herstellung von *E. coli*-Genom-DNA-Chips PCR-Produkte jedes *E. coli*-Gens in ausreichender Menge benötigt, wurden ausgehend von genomischer *E. coli* MG1655-DNA als Template die Gene/ORFs von *E. coli* MG1655 (Blattner *et al.*, 1997) durch PCR mit spezifischen Primerpaaren (ORFmer Primer Set, Genosys Biotechnologies, Cambridgeshire, England) amplifiziert (Richmond *et al.*, 1999). Für die spätere Immobilisierung von DNA wurden die DNA-Chip-Glasobjektträger zunächst mit Poly-L-Lysin beschichtet (Shalon *et al.*, 1996; Zimmer *et al.*, 2000). Anschließend erfolgte mit Hilfe eines computergesteuerten Robotersystems die Auftragung der PCR-Produkte (150-300 ng/ μ l) auf eine Fläche von 2 cm x 2 cm auf den Objektträger (siehe auch <http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide/>). Dabei wurden etwa 0,1 - 1 nl PCR-Produkt pro Spot aufgetragen. Die Spots hatten einen Durchmesser von etwa 60 – 120 μ m. Außer den PCR-Produkten der amplifizierten *E. coli*-Gene wurden zusätzlich Hybridisierungskontrollen (λ -DNA und PCR-Produkte von Genen aus *Corynebacterium glutamicum*) und für die Datennormalisierung (siehe 8.4) genomische *E. coli*-DNA an verschiedenen Stellen mehrmals auf dem Chip angeordnet.

Um in Hybridisierungsexperimenten eine gleichmäßigere Verteilung der Fluoreszenzintensitäten innerhalb der Spot-Fläche zu erzielen, wurden die DNA-Chips im ersten Schritt der Nachbehandlung durch Inkubation in einer Feuchtigkeitskammer (Sigma, Deisendorf) über der Oberfläche einer 1 x SSC-Lösung inkubiert (100 ml, 15 min). Da die aufgetragene DNA zur Herstellung der DNA-Chips ursprünglich in 3 x SSC-Lösung gelöst vorlag, zieht das getrocknete Salz und die DNA innerhalb jeder Spot-Fläche Wasser aus der umgebenden feuchten Kammerluft an. Die Spots auf den DNA-Chips wurden so rehydratisiert, was an der Bildung von die Spot-Fläche umspannenden Wassertröpfchen zu erkennen war. Während der Inkubation (15 min) verteilen sich infolge der Brown'schen Molekularbewegung die DNA-Moleküle, deren negativ geladene Phosphatreste noch nicht ausreichend durch die positiv geladenen ϵ -Aminogruppen der Poly-L-Lysin-Seitenketten fixiert wurden. Zur Fixierung der DNA-Moleküle auf der Oberfläche erfolgte nach dem Rehydratisieren eine Blitztrocknung für fünf Sekunden bei 100°C (Shalon *et al.*, 1996). Danach wurde die DNA durch UV-Bestrahlung (650 μ J, UVStratalinker, Stratagene) erneut auf den Objektträger immobilisiert. Zum Blocken der freien Poly-L-Lysin beschichteten Oberfläche, die nicht mit DNA bedeckt war, erfolgte eine 25minütige Inkubation in 2-Methyl-

Pyrrolidinon-Lösung (0,2 M Bernsteinsäure-Anhydrid, 50 mM Na-Borat, 0,6 M H₂O), um die ϵ -Aminogruppen der freien Seitenketten des Poly-L-Lysins durch chemische Reaktion mit Bernsteinsäure-Anhydrid hinsichtlich potentieller Bindung von Nukleinsäuren zu inaktivieren (Shalon *et al.*, 1996). Unmittelbar danach wurden die DNA-Chips für 2 min in 95°C heißem Wasser zum Denaturieren der DNA-Doppelstränge inkubiert. Um eine anschließende Renaturierung der DNA-Doppelstränge zu verhindern, erfolgte eine Fixierung der hybridisierungskompetenten DNA-Einzelstränge durch Inkubation in eiskaltem Ethanol (2 min, 95 % Ethanol, 4°C; Shalon *et al.*, 1996). Danach erfolgte zur Trocknung eine Zentrifugation (5 min, 50 g). Die trockene Lagerung der nachbehandelten DNA-Chips erfolgte bis zur Verwendung im Exsikkator.

Zur Bestimmung relativer mRNA-Verhältnisse wurden die aus den beiden zu vergleichenden RNA-Proben erhaltenen Cy3- und Cy5-fluoreszenzmarkierten cDNA-Sonden gleichzeitig auf einen DNA-Chip hybridisiert. Dazu wurden die vereinigten und aufgereinigten markierten cDNA-Sonden in 20 μ l Hybridisierungslösung (40 μ g *E. coli* rRNA (Roche Diagnostics, Mannheim) oder 2,5 μ g Poly-A (Sigma, Deisendorf), 3 x SSC, 25 mM HEPES pH 7,0, 0,23 % (w/v) SDS) denaturiert (2 min, 100°C) und anschließend 5-10 min bei Raumtemperatur inkubiert (Zimmer *et al.*, 2000). *E. coli* rRNA oder Poly-A wurde als Kompetitor zur Verringerung unspezifischer Hintergrundfluoreszenz eingesetzt. Die Endkonzentration von 3 x SSC sicherte stringente Hybridisierungsbedingungen (Zimmer *et al.*, 2000). Zur Hybridisierung wurde auf dem DNA-Chip über dem Bereich mit immobilisierter DNA ein Spezialdeckgläschen platziert, um eine gleichmäßige Verteilung der Probenlösung über der DNA-Chip-Fläche zu gewährleisten (LifterSlip, Erie Scientific, New Hampshire, USA). Um ein Austrocknen der Probenlösung während der Hybridisierung bei 65°C zu verhindern, wurden mehrfach kleine Tropfen 3 x SSC-Lösung am Rand des Objektträgers aufgetragen, dann die vorbereitete Hybridisierungslösung unter das Deckglas pipettiert und der DNA-Chip in einer wasserdichten Hybridisierungskammer (Die Tech Inc., York Haven, USA) 4,5 h bis 12 h bei 65°C im Wasserbad inkubiert (Zimmer *et al.*, 2000). Zum Entfernen der Hybridisierungslösung und unspezifisch gebundener DNA erfolgte nach der Hybridisierung ein stringentes Waschen der DNA-Chips zuerst in 1 x SSC/0,03 % (w/v) SDS und danach in 0,05 x SSC bei RT (Zimmer *et al.*, 2000). Durch Zentrifugation (5 min, 50 g) wurde der DNA-Chip getrocknet und anschließend die Fluoreszenz auf der DNA-Chip-Oberfläche bestimmt.

8.4 Auswertung von DNA-Chips

Zur Bestimmung relativer mRNA-Spiegel wurde die Cy3- und Cy5-Fluoreszenz der Spots gemessen. Das Verhältnis von Cy3- und Cy5-Fluoreszenz eines Spots korreliert direkt mit dem Verhältnis der Anzahl der mRNA-Moleküle in den verglichenen RNA-Proben (Shalon *et al.*, 1996). Die DNA-Chips wurden unter Verwendung des Axon GenePix 4000A Laser-Scanners und der GenePix Pro 3.0 Software (Axon Inc., Union City, USA) ausgewertet. Der Laser-Scanner bestrahlt die DNA-Chip-Oberfläche mit monochromatischem Licht von 532 nm (Anregung von Cy3-dUTP) und 635 nm (Anregung von Cy5-dUTP) und registriert die daraufhin emittierte Cy3-Fluoreszenz bei 570 nm und die Cy5-Fluoreszenz bei 670 nm mit lichtempfindlichen Kathoden. Diese wandeln die Cy3- und Cy5-Fluoreszenz in elektrischen Strom um, der weiter verstärkt wird. Die gemessene Stromstärke korreliert direkt mit der Cy3- bzw. Cy5-Fluoreszenz. Mit Hilfe der Software wurde die orts aufgelöste Information für die Cy3- und Cy5-Fluoreszenz anhand der numerischen Werte als Fluorogramm bildlich dargestellt und im 16-bit-TIFF-Format elektronisch gespeichert. Hierdurch wurden die Roh-Fluoreszenz-Daten erhalten. Die 'GenePix Array List' (erstellt von T. Polen) erlaubte eine Zuordnung jedes einzelnen detektierten DNA-Spots zu dem entsprechenden *E. coli*-Gen bzw. zu den entsprechenden Hybridisierungskontrollen (genomische *E. coli*-DNA, λ -DNA und PCR-Produkte von Genen aus *Corynebacterium glutamicum*). Die Daten wurden anschließend nach folgendem Schema analysiert: Zunächst erfolgte eine Berechnung des Signal zu Rausch-Verhältnisses für Cy3- und Cy5-Fluoreszenzsignale durch Bildung des Quotienten $\text{Signalintensität}_{\text{Spot}}/\text{Signalintensität}_{\text{Spothintergrund}}$. Wenn das Signal/Rausch-Verhältnis für die Cy3- und die Cy5-Fluoreszenz kleiner als drei war, wurden die Signale als zu schwach angenommen, um zuverlässig ausgewertet werden zu können und in weiteren Analysen nicht berücksichtigt (Khodursky *et al.*, 2000). Um die durch die Cy5-/Cy3-Fluoreszenz-Verhältnisse repräsentierten relativen mRNA-Spiegel verschiedener DNA-Chip-Experimente besser miteinander vergleichen zu können, wurden die Werte normalisiert (Eisen *et al.*, 1998). Die Normalisierung der Ergebnisse erfolgte für jeden DNA-Chip anhand des Cy5-/Cy3-Fluoreszenz-Verhältnisses, das bei Hybridisierung der Sonden mit chromosomaler DNA von *E. coli* MG1655 gemessen wurde und gleich 1 sein sollte (Eisen *et al.*, 1998). Es wurde der Korrekturfaktor ermittelt, der bei Multiplikation mit dem experimentellen Ergebnis ein Verhältnis von 1 für die chromosomale DNA ergab und die Verhältnisse aller genspezifischen Spots wurden dann mit diesem Faktor multipliziert (Khodursky *et al.*, 2000). Für die im

Ergebnis-Teil angegebenen relativen RNA-Level wurden nur die durch das Programm GenePix 3.0 ermittelte "Ratio of Mean" berücksichtigt. Beruhend auf einem von W. S. Gosset (1876-1937) entwickelten statistischen Verfahren zur Berechnung von Wahrscheinlichkeiten bezüglich Übereinstimmung oder Verschiedenheit zweier Datensätze erfolgte für Gene, deren relativer mRNA-Spiegel mehrfach bestimmt wurde, die Berechnung von p-Werten mit dem t-Test (TTEST-Tabellenfunktion, EXCEL 2000, Microsoft). Dabei wurde die Streuung der mehrfach gemessenen und normalisierten Cy3-/Cy5-Fluoreszenzverhältnisse eines Gens mit der Streuung der normalisierten Cy3-/Cy5-Fluoreszenzverhältnisse genomischer DNA verglichen (Khodursky *et al.*, 2000). Veränderte relative mRNA-Spiegel von Genen mit p-Werten $>0,05$ wurden als statistisch nicht signifikant verändert gegenüber der genomischen DNA betrachtet. Ein p-Wert von 0,05 bedeutet, dass die ermittelten relativen RNA-Level sich mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % von den mRNA-Leveln genomischer DNA unterscheiden.

.

IV ERGEBNISSE

1 Charakterisierung des acetatauxotrophen *Escherichia coli*-Stammes YYC202

Ziel dieser Arbeit war die Konstruktion und Charakterisierung von rekombinanten *Escherichia coli*-Stämmen, die Glucose möglichst effizient in Pyruvat umsetzen und diese Verbindung dann ins Medium ausscheiden. Pyruvat ist in eine Vielzahl von katabolen und anabolen Stoffwechselwegen involviert, z.B. Glykolyse, Gluconeogenese, Aminosäurebiosynthesen etc., und daher ein zentrales Intermediat im zellulären Stoffwechsel. Glucose wird von *E. coli* über das PEP-abhängige Phosphotransferase-System (PTS-System) in die Zelle aufgenommen und zu 80-90 % in der Glykolyse zu Pyruvat umgesetzt. Dieses wird dann einerseits für Biosynthesen eingesetzt, der überwiegende Teil wird jedoch unter aeroben Bedingungen durch den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex zu Acetyl-CoA oxidiert, das dann seinerseits entweder im Citratzyklus zu CO₂ oxidiert oder für Biosynthesen verwendet wird. Außer durch den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex kann Pyruvat auch durch die Pyruvat-Oxidase (Pyruvat-Chinon-Oxidoreduktase) zu Acetat und CO₂ oxidiert werden, wobei die Elektronen auf Ubichinon und nicht auf NAD⁺ übertragen werden. Um also aus *E. coli* einen effizienten Pyruvat-Produzenten zu machen, muss in erster Linie die oxidative Decarboxylierung des Pyruvats blockiert werden. Ein Stamm, der aufgrund seines Genotyps genau diese gewünschte Eigenschaft aufweisen sollte, wurde in der Literatur bereits beschrieben, nämlich *E. coli* YYC202 (Georgiou *et al.*, 1987). Dieser Stamm besitzt eine Deletion der *aceEF*-Gene, die für die Pyruvat-Decarboxylase- und die Dihydrolipoyltransacetylase-Komponente des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes kodieren, sowie weitere Mutationen in den Genen für die Pyruvat-Oxidase (kodiert durch *poxB*), für die Pyruvat-Formiat-Lyase (kodiert durch *pflB*) und für die Phosphoenolpyruvat-Synthetase (kodiert durch *pps*), die zum Verlust der entsprechenden Enzymaktivitäten führen. Aufgrund dieses Genotyps ($\Delta aceEF pfl-1 poxB1 pps-4 rpsL zbi::Tn10$) sollte *E. coli* YYC202 Pyruvat nicht mehr zu Acetyl-CoA bzw. Acetat umsetzen können und bei Wachstum auf Glucose-Minimalmedium Acetat benötigen.

1.1 Bestätigung der Acetat-Auxotrophie von YYC202

In Abb. 6 ist das aerobe Wachstum von *E. coli* YYC202 in M9-Glucose-Minimalmedium ohne bzw. mit 2 mM Acetat gezeigt. In Anwesenheit von 2 mM Acetat hatte YYC202 eine Wachstumsrate von $0,37 \text{ h}^{-1}$ und eine End-OD₆₀₀ von 0,7, während in Abwesenheit von Acetat kein Wachstum erkennbar war. Somit konnte die Acetat-Auxotrophie von YYC202 bestätigt werden. Es wurde außerdem festgestellt, dass YYC202 nicht auf Acetat als alleiniger C-Quelle wachsen kann. Eine mögliche Ursache für diesen Phänotyp könnte ein fehlender oder reduzierter Glyoxylatzyklus sein (siehe 7.1 und 7.2 bzw. 8.1)

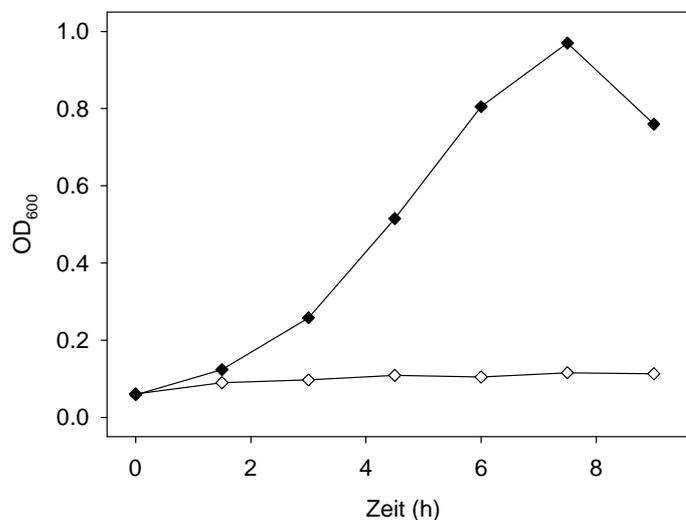


Abb. 6: Wachstum von *E. coli* YYC202 in M9-Glucose-Minimalmedium (10 mM Glucose) ohne (◇) bzw. mit 2 mM Na-Acetat (◆).

1.2 Co-Verstoffwechslung von Glucose und Acetat durch *E. coli* YYC202

Bei Wachstum auf Glucose und Acetat verwertet *E. coli* die beiden C-Quellen nicht gleichzeitig, sondern setzt zuerst Glucose und anschließend das Acetat um (Walsh & Koshland, 1984; Walsh & Koshland, 1985). Für das Wachstum auf Acetat als einziger C-Quelle ist der Glyoxylatzyklus als anaplerotische Reaktion essentiell. Bei fehlendem Glyoxylatzyklus würde Acetat durch den Citratzyklus vollständig zu CO₂ umgesetzt und es ständen keine Intermediate des Citratzyklus für Biosynthesen und Gluconeogenese zur Verfügung. Etwa ein Drittel des gesamten Kohlenstoffes wird bei Wachstum auf Acetat durch den Glyoxylatzyklus geleitet. Die Schlüsselenzyme des Glyoxylatzyklus, Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase, unterliegen einer Glucose-Repression (Walsh & Koshland, 1985). Im

folgenden wurde die Umsetzung von Glucose und Acetat durch die *E. coli*-Stämme MG1655 und YYC202 verglichen.

Wie in Abb. 7 dargestellt, zeigte MG1655 das in der Literatur bereits beschriebene Verhalten, d.h. zunächst wurde nur die Glucose umgesetzt und dabei Acetat gebildet und erst nach Verbrauch der Glucose wurde Acetat umgesetzt. Dies führte zu dem klassischen diauxischen Wachstumsverlauf. Demgegenüber setzte YYC202 Glucose und Acetat von Beginn des Wachstum an parallel um. Die Wachstumskurve war folglich nicht diauxisch. Die deutliche geringere End-OD wird durch die starke Pyruvat-Bildung bedingt (siehe unten). Die parallele Verstoffwechslung von Glucose und Acetat durch YYC202, die aufgrund der zuvor beschriebenen Acetat-Auxotrophie erwartet worden war, zeigt, dass die im Wildtyp funktionierenden Regulationsmechanismen in YYC202 ausgeschaltet sein müssen. Ob der Glyoxylatzyklus unter den genannten Bedingungen aktiv ist, wurde nicht getestet. Auffällig war, dass nach Verbrauch der Glucose das Wachstum stoppte, obwohl noch 4 mM Acetat vorhanden war und auch verstoffwechselt wurde.

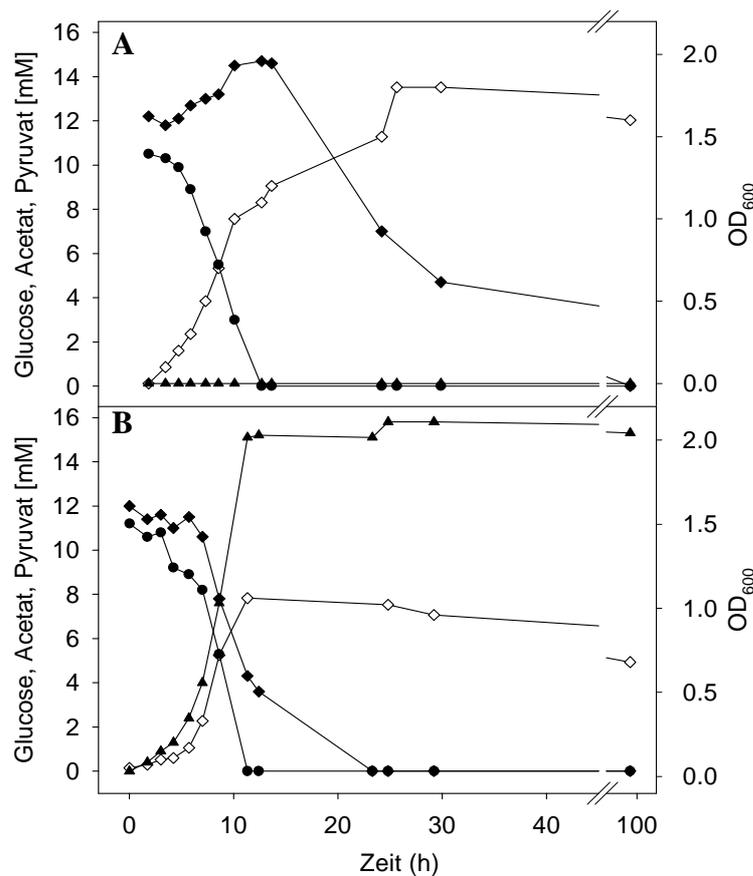


Abb. 7: Vergleich der Umsetzung von Glucose (●, ~11 mM) und Acetat (◆, ~12 mM) durch MG1655 (A) und YYC202 (B) bei Wachstum (OD₆₀₀, ◇) in Minimalmedium. MG1655 setzte die Glucose mit einer maximalen Rate von 4,2 $\mu\text{mol min}^{-1}$ (mg Protein)⁻¹ um. Acetat wurde zunächst mit einer maximalen Rate von 1,3 $\mu\text{mol min}^{-1}$ (mg Protein)⁻¹ gebildet und anschließend mit einer maximalen

Rate von $0,6 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ wieder umgesetzt. Pyruvat wurde nicht gebildet. YYC202 setzte Glucose mit einer maximalen Rate von $3,7 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ um und Acetat mit einer maximalen Rate von $2,8 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$. Pyruvat (\blacktriangle) wurde mit einer maximalen Rate von $3,9 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ gebildet. Die Proteinkonzentration zur Bestimmung der spezifischen Raten wurde nach folgender Formel berechnet: $\text{OD}_{600} = 1,4 \equiv 0,15 \text{ mg Protein/ml}$.

1.3 Acetat-Toleranz von *E. coli* YYC202

Untersuchungen mit dem *E. coli*-Wildtyp-Stamm MG1655 ergaben, dass Acetat-Konzentrationen $>10 \text{ mM}$ die Wachstumsrate und die Zellausbeute verringern (V. Wendisch, persönliche Mitteilung). Um zu überprüfen, ob diese Effekte auch bei dem acetatauxotrophen Stamm YYC202 auftreten, wurde das Wachstum in LB-Medium mit verschiedenen Acetat-Konzentrationen getestet.

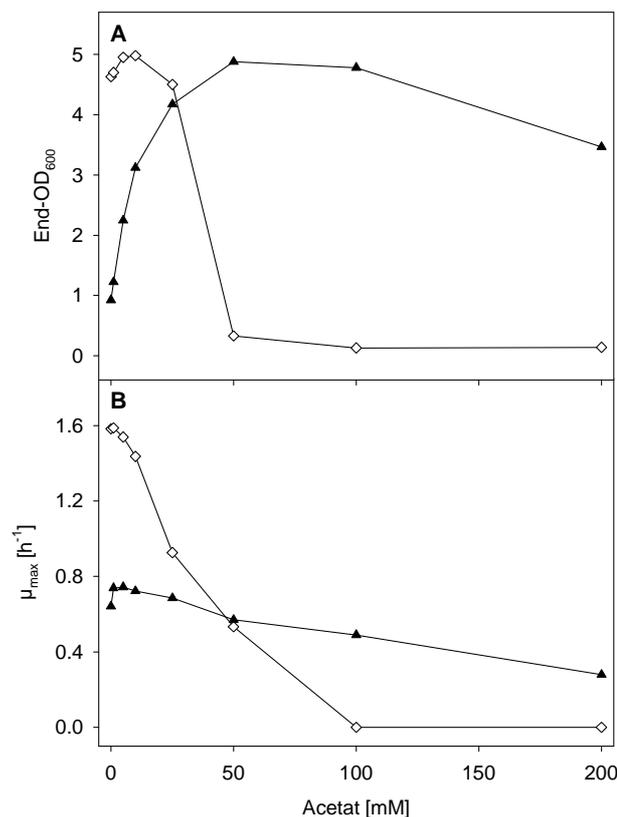


Abb. 8: Vergleich der End-OD₆₀₀ (A) und der maximalen Wachstumsrate (μ_{max} , B) von MG1655 (\diamond) und YYC202 (\blacktriangle) bei Wachstum auf LB-Medium mit unterschiedlichen Na-Acetat-Konzentrationen. Die Stämme wurden in 500-ml-Erlenmeyerkolben mit zwei Schikanen und 50 ml LB-Medium bei 37°C und 140 U.p.m. inkubiert.

Wie in Abb. 8 zu sehen, gab es sowohl bezüglich der Zellausbeute als auch bezüglich der Wachstumsrate sehr deutliche Unterschiede zwischen MG1655 und YYC202. Niedrige

Acetat-Konzentrationen bis zu 5 mM führten bei MG1655 noch zu einer geringfügigen Zunahme der End-OD, bei höheren Konzentrationen kam es dagegen zu einer drastischen Abnahme und bei 50 mM Acetat war das Wachstum praktisch völlig gehemmt. Demgegenüber war die Zellausbeute von YYC202 ohne Acetat circa 5-fach geringer als die von MG1655, nahm aber mit steigenden Acetat-Konzentrationen kontinuierlich zu. Bei 50 mM Acetat schließlich erreichte YYC202 die gleiche End-OD, die MG1655 maximal erreicht hatte (bei 5 mM Acetat). Höhere Acetat-Konzentrationen bis 200 mM führten dann wieder zu einer leichten Abnahme der End-OD. Die maximale Wachstumsrate von YYC202 in LB-Medium ohne Acetat war etwa 60 % geringer als die von MG1655. Während jedoch bei MG1655 die Wachstumsrate mit steigenden Acetat-Konzentrationen kontinuierlich abnahm, war bei YYC202 bis zu einer Konzentration von ~5 mM Acetat eine Zunahme der Wachstumsrate zu beobachten, erst bei höheren Konzentrationen kam es dann zu einer stetigen, langsamen Abnahme der Wachstumsrate. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Stamm YYC202 deutlich resistenter gegenüber Acetat ist als der Stamm MG1655.

2 Versuche mit wachsenden *E. coli* YYC202-Kulturen

2.1 Pyruvat-Bildung durch *E. coli* YYC202

Zunächst erfolgte eine Charakterisierung aerob wachsender YYC202-Zellen hinsichtlich ihrer Pyruvat-Bildungseigenschaften. Wie in Abb. 9 gezeigt, produzierte YYC202 bei Wachstum in M9-Minimalmedium mit 11 mM Glucose und 2 mM Acetat 15 mM Pyruvat. Die erreichte Pyruvat-Ausbeute von 1,4 Mol Pyruvat/Mol Glucose lag damit deutlich höher als bei den in der Einleitung beschriebenen liponsäureauxotrophen *E. coli*-Stämmen, die lediglich 1,2 Mol Pyruvat/Mol Glucose produzierten (Yokota *et al.*, 1994a; Yokota *et al.*, 1994b; Yokota *et al.*, 1997). Die Verwendung von PAN-Minimalmedium (Pan *et al.*, 1987) anstelle von M9-Minimalmedium ergab nahezu identische Resultate, so dass für die weiteren Versuche M9-Minimalmedium verwendet wurde.

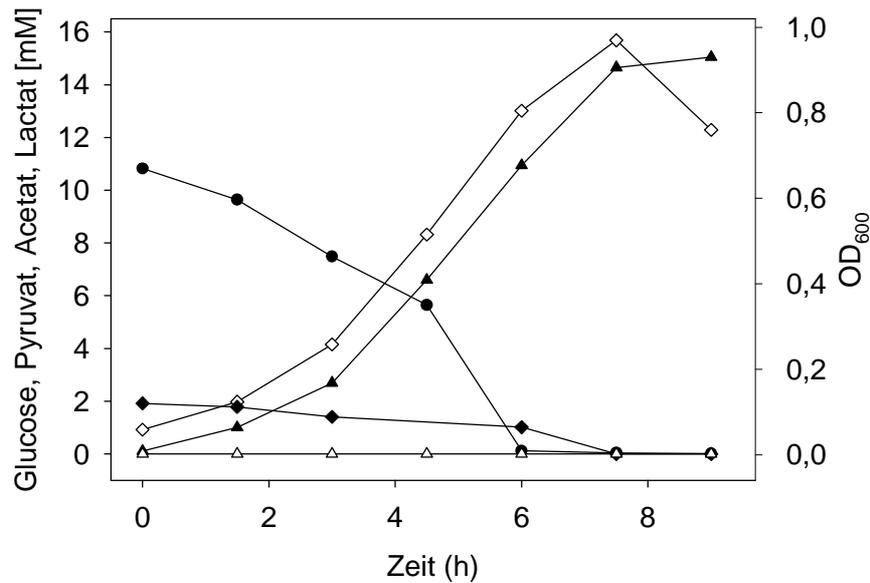


Abb. 9: Wachstum (◇), Glucose-Umsetzung (●) und Pyruvat-Bildung (▲) bei Kultivierung von YYC202 in M9-Minimalmedium mit 11 mM Glucose und 2 mM Acetat (◆). Der pH-Wert blieb konstant bei pH 7. Dabei wurden maximal $0,75 \mu\text{mol Glucose min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ und $0,07 \mu\text{mol Acetat min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ verbraucht sowie $0,65 \mu\text{mol Pyruvat min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ gebildet. Es wurde kein Lactat (△) gebildet. Die Pyruvat-Ausbeute betrug $\sim 1,4 \text{ Mol Pyruvat/Mol Glucose}$.

2.2 Einfluss der Acetat-Konzentration auf Wachstum und Pyruvat-Produktion

Um den Einfluss der Acetat-Konzentration auf Wachstum und Pyruvat-Bildung zu untersuchen, wurden Versuche mit 1 mM, 2 mM, 6 mM und 10 mM Acetat sowie ohne Acetat durchgeführt. Wie in Abb. 10 und Tab. 8 dargestellt, waren Wachstum und Pyruvat-Bildung abhängig von der eingesetzten Acetat-Konzentration. Bei gleicher Glucose-Ausgangskonzentration führten steigende Acetat-Konzentrationen zu einer höheren Zellausbeute, einer höheren Wachstumsrate und einer geringeren Pyruvat-Ausbeute. Die Acetat-Konzentration erwies sich also als kritischer Parameter zur Regulation von Wachstum und Pyruvat-Bildung. Unter Acetat-limitierenden Bedingungen wurden bis zu 1,7 Mol Pyruvat/Mol Glucose gebildet.

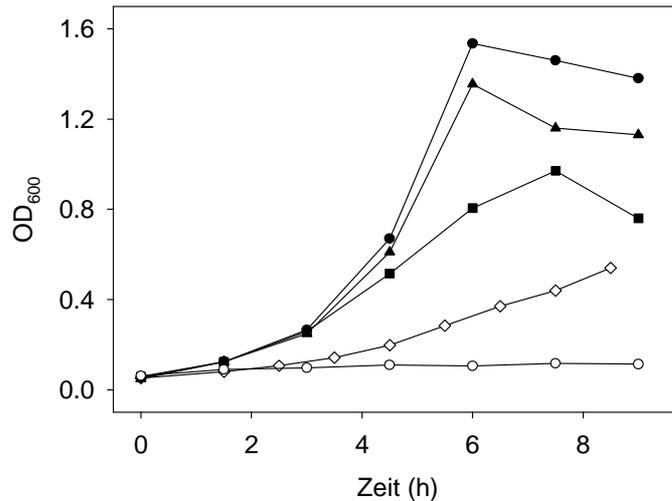


Abb. 10: Wachstum von YYC202 in M9-Minimalmedium mit 10 mM Glucose und verschiedenen Acetat-Konzentrationen. Es wurden 0 mM (○), 2 mM (◇), 4 mM (■), 6 mM (▲) bzw. 10 mM (●) Acetat zugesetzt.

Tab. 8: Maximale Wachstumsrate, OD₆₀₀ und Pyruvat-Ausbeute von *E. coli* YYC202 in M9-Minimalmedium mit 10 mM Glucose und verschiedenen Acetat-Konzentrationen.

Acetat-Konzentration	Maximale OD ₆₀₀	Maximale Wachstumsrate	Pyruvat-Ausbeute (Mol Pyruvat/Mol Glucose)
1 mM	0,6	0,45 h ⁻¹	1,7
2 mM	1,0	0,69 h ⁻¹	1,5
6 mM	1,2	0,77 h ⁻¹	1,4
10 mM	1,5	0,81 h ⁻¹	1,3

2.3 Einfluss der Glucose-Konzentration auf Wachstum und Pyruvat-Produktion

Um den Einfluss höherer Glucosekonzentrationen auf das Wachstum und die Pyruvat-Bildung von YYC202 zu untersuchen, wurden Wachstumsversuche in M9-Minimalmedium mit 60 mM Glucose und 11 mM Acetat sowie mit 106 mM Glucose und 21 mM Acetat durchgeführt. In Abb. 11 ist exemplarisch die Glucose-Umsetzung bei 106 mM dargestellt. Es stellte sich heraus, dass die zugesetzte Glucose nicht vollständig verbraucht wurde. Die Bildung von Pyruvat (pK_a 2,5) und Lactat (pK_a 3,9) führte zu einer Ansäuerung des Mediums von pH 7,0 auf pH 5,0, was den Glucose-Verbrauch stoppte und eine Hemmung des Wachstums bewirkte. Außerdem sank im Vergleich zu dem in 2.1 dargestellten Experiment

sowohl die spezifische Glucose-Verbrauchsrate als auch die spezifische Pyruvat-Bildungsrate. Die Pyruvat-Ausbeute sank ebenfalls um ~30 %.

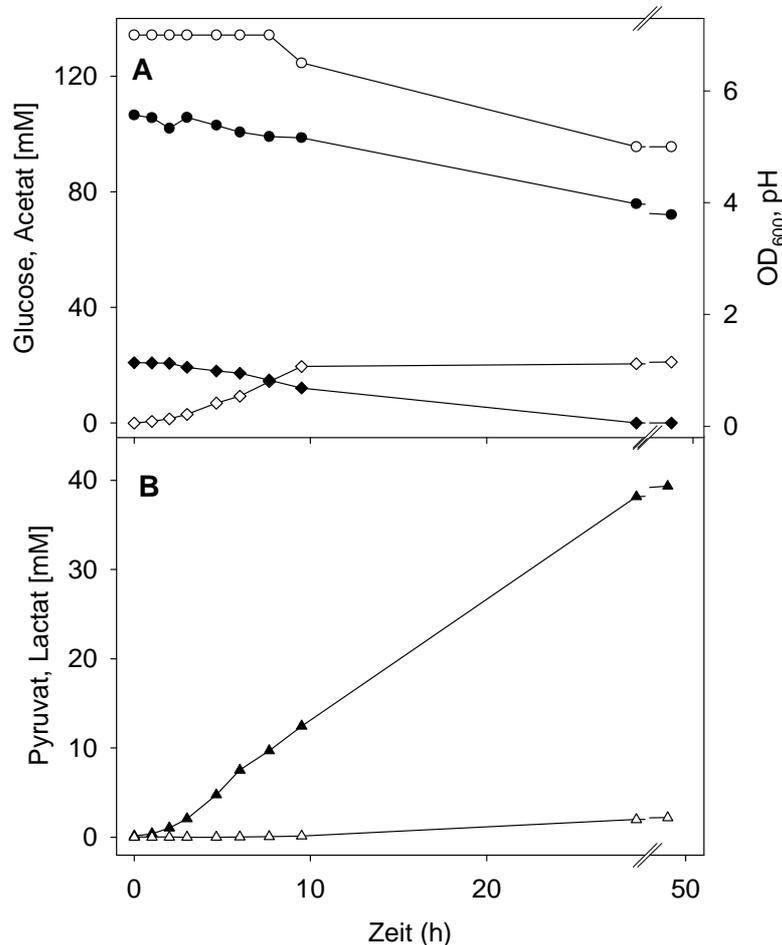


Abb. 11: Wachstum, pH, Glucose- und Acetat-Verbrauch (A) sowie Pyruvat- und Lactat-Bildung (B) bei Wachstum von YYC202 in Minimalmedium mit 106 mM Glucose und 22 mM Acetat. Es wurden maximal $0,27 \mu\text{mol Glucose min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ und $0,34 \mu\text{mol Acetat min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ verbraucht sowie $0,42 \mu\text{mol Pyruvat min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ gebildet. Es wurde kein Lactat gebildet. Die Pyruvat-Ausbeute betrug $\sim 1,1$ Mol Pyruvat/Mol Glucose. Die Proteinkonzentration zur Bestimmung der spezifischen Raten wurde nach folgender Formel berechnet: $\text{OD}_{600} = 1,4 \equiv 0,15 \text{ mg Protein/ml}$. Es wurden folgende Symbole verwendet: Glucose (●), OD_{600} (◇), Pyruvat (▲), Acetat (◆), Lactat (△), pH (○).

Die Produktion von Lactat führte zu einer geringeren Pyruvat-Ausbeute. Ein weiterer Grund hierfür war, dass ein Teil des verbrauchten Kohlenstoffs für die Produktion von mehr Biomasse verwendet wurde. Diese Anteile am Kohlenstoff sind aber verhältnismäßig gering, denn ~ 42 % des verbrauchten Kohlenstoffs wurden keinem Produkt zugeordnet (Tab. 9). Bei den Versuchen mit 11 mM Glucose waren es im Gegensatz dazu nur 22 %. Als

Nebenprodukte kommen unter anderem Aminosäuren in Betracht, da in dem verwendeten Medium unter anderem 7,6 mM Ammoniumchlorid vorhanden war, welches als N-Quelle benutzt werden kann. Die Aminosäure Alanin kann durch eine Aminosäure-Transferase direkt aus Pyruvat gebildet werden. Untersuchungen der 50-Stunden-Probe (100 mM Glucose), mittels HPLC und H^1 -NMR lieferten jedoch widersprüchliche Ergebnisse. HPLC-Analysen zeigten, dass genau zur selben Retentionszeit wie bei dem verwendeten Alanin-Standard ein Peak detektiert wurde, der einer Endkonzentration von etwa 5 mM Alanin entsprechen hätte. Zur Identifizierung weiterer Nebenprodukte wurde dieselbe Probe ebenfalls einer H^1 -NMR-Analyse unterzogen. Dabei konnten allerdings keine weiteren Nebenprodukte identifiziert werden. Außerdem wurde für Alanin kein NMR-Signal detektiert. Eine enzymatische Alanin-Bestimmung bestätigte, dass kein Alanin gebildet wurde. Durch die Umsetzung von Glucose-6-Phosphat im Pentosephosphatweg könnte CO_2 als weiteres Nebenprodukt gebildet werden. Durch fehlende analytische Messtechniken konnte dieses im Schüttelkolbenversuch nicht nachgewiesen werden.

Tab. 9: Vergleich der Kohlenstoff-Bilanzen bei Wachstum von YYC202 in Minimalmedium mit 11 mM Glucose und 2 mM Acetat bzw. mit 106 mM Glucose und 21 mM Acetat. Der C-Gehalt der Biomasse wurde wie folgt berechnet: $OD_{600} = 1,4 \equiv 0,15 \text{ mg C/ml}$. * Die Angaben für die Zellbildung sind in mg/ml. Die maximal erreichte OD_{600} betrug 1 bzw. 1,32.

	11 mM Glucose/2 mM Acetat			106 mM Glucose/21 mM Acetat		
	mM	mmol C	Σ mmol C	mM	mmol C	Σ mmol C
Glucose-Verbrauch	10,8	6,5		32,3	19,4	
Acetat-Verbrauch	2,0	0,4	6,9 (100 %)	21,0	4,2	23,6 (100 %)
Biomasse	0,11 *	0,9		0,13 *	1,1	
Lactat-Bildung	0,0	0,0		2,2	0,7	
Pyruvat-Bildung	15,0	4,5	5,4 (78 %)	39,3	11,8	13,6 (58 %)
Differenz C			1,5 (22 %)			10,0 (42 %)

3 Versuche zur Glucose-Umsetzung mit Zellsuspensionen von *E. coli* YYC202

3.1 Einfluss des pH-Wertes auf die Pyruvat-Bildung durch Zellsuspensionen

Bei Wachstum von *E. coli* in Glucose-Minimalmedium werden circa 50 % der verbrauchten Glucose für die Biosynthese von neuem Zellmaterial verwendet (Holms, 1996). Eine maximale Pyruvat-Ausbeute, d.h. 2 Mol Pyruvat/Mol Glucose, ist also nur mit nicht-wachsenden Zellen möglich. Daher erfolgte neben der Charakterisierung von wachsenden YYC202-Zellen auch die Untersuchung von Zellsuspensionen (nicht-wachsende, aber metabolisch aktive Zellen). Zu diesem Zweck wurden Zellen, die in Minimalmedium mit Glucose und Acetat kultiviert worden waren, in einem Puffer mit Glucose resuspendiert, der weder Acetat noch weitere Nährstoffe, wie z.B. Stickstoff- und Schwefelquellen, enthielt. Zunächst wurde der Einfluss verschiedener Puffersubstanzen auf Glucose-Verbrauch und Pyruvat-Bildung durch Zellsuspensionen getestet. Dabei wurde 100 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7, MOPS-Puffer pH 7 (mit NaOH eingestellt) und Tris-Puffer pH 7 (mit HCl eingestellt) mit jeweils 10 mM Glucose eingesetzt, die OD_{600} betrug jeweils etwa 1. In MOPS und Phosphat-Puffer wurden Ausbeuten von 1,8 und 1,4 Mol Pyruvat/Mol Glucose erreicht, in Tris-Puffer dagegen nur 0,6 Mol Pyruvat/Mol Glucose. Ursache für diese Diskrepanz war der pH-Wert, der im Fall von MOPS und Phosphat konstant bei 7 blieb, während er bei Tris auf 6 sank. Daher wurde in einem weiteren Versuch die Abhängigkeit der Glucose-Umsetzung vom pH-Wert getestet. Um einen Einfluss der Puffersubstanz auszuschließen, wurde in diesem Fall ein Puffergemisch bestehend aus 50 mM MES ($pK_a = 6,15$), 50 mM MOPS ($pK_a = 7,2$) und 50 mM TRICINE ($pK_a = 8,12$) verwendet, das auf pH-Werte von 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 und 8,0 eingestellt wurde. Dem Puffergemisch wurde 10 mM Glucose zugesetzt und die YYC202-Zellen zu einer OD_{600} von circa 1 resuspendiert.

Tab. 10 zeigt, dass die Glucose-Umsetzung durch Zellsuspensionen von YYC202 pH-abhängig war. Bei $pH > 7$ sank die Pyruvat-Ausbeute deutlich, während sie im Bereich von pH 6 – 7 konstant blieb. Es konnte allerdings nicht festgestellt werden, was aus der Glucose entsteht, die nicht zu Pyruvat umgesetzt wurde. Durch HPLC-Analytik konnte nur festgestellt werden, dass keine weiteren organischen Säuren, wie Lactat gebildet wurden. Es konnte bestätigt werden, dass Zellsuspensionen höhere Ausbeuten als wachsende Zellen lieferten. Unter optimalen Bedingungen (pH 7) konnte sogar eine fast vollständige Umsetzung der eingesetzten Glucose zu Pyruvat erzielt werden (Abb. 12).

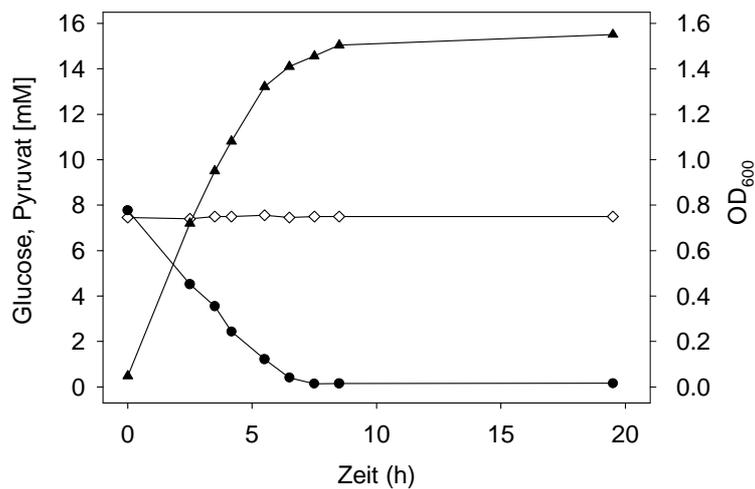


Abb. 12: Glucose-Verbrauch (●) und Pyruvat-Bildung (▲) durch eine Zellsuspension von YYC202 ($OD_{600} = 0,75, (\diamond)$) in einem Puffergemisch (je 50 mM MES, MOPS, und TRICINE, eingestellt auf pH 7) mit 8 mM Glucose.

Tab. 10: Pyruvat-Ausbeute durch YYC202-Zellsuspensionen in Abhängigkeit vom pH-Wert. In Glucose-Minimalmedium mit Acetat kultivierte Zellen wurden in 0,9 % NaCl gewaschen und in einem Puffer aus 50 mM MES, 50 mM MOPS und 50 mM TRICINE mit ~10 mM Glucose zu einer OD_{600} von 1 resuspendiert (50 ml Zellsuspension in 500-ml-Erlenmeyer-Kolben mit zwei Schikanen) und bei 37°C und 160 U.p.m. inkubiert. Während der Experimente sank der pH-Wert jeweils um 0,4 Einheiten. Die Glucose wurde aber vollständig verstoffwechselt. Die Werte stellen Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dar.

pH	Pyruvat-Ausbeute [Mol Pyruvat/Mol Glucose]
6,0	1,84 ± 0,07
6,5	1,87 ± 0,06
7,0	1,83 ± 0,15
7,5	1,51 ± 0,15
8,0	1,50 ± 0,14

3.2 Einfluss der Zelldichte auf die Pyruvat-Produktion durch Zellsuspensionen

In weiteren Versuchen wurde der Einfluss höherer Zelldichten auf die Glucose-Umsetzung untersucht. Dabei zeigte sich, dass bei einer achtfachen Erhöhung der OD_{600} von 0,7 auf 5,8 die spezifische Glucose-Verbrauchsrate annähernd konstant blieb (circa $0,25 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$), dass jedoch bis zur vollständigen Umsetzung der Glucose (10 mM) außer circa 7 mM Pyruvat auch circa 7 mM Lactat gebildet wurde (Abb. 13). Das Lactat wurde in der Folge langsam wieder zu Pyruvat umgesetzt. Dies deutet darauf hin, dass es bei hohen Zelldichten

zu Sauerstoffmangel kam, der dazu führte, dass NADH nicht mehr durch die Atmungskette reoxidiert wurde, sondern durch Reduktion von Pyruvat zu Lactat durch die NAD⁺-abhängige Lactat-Dehydrogenase. Für die im Vergleich zur Lactat-Bildung deutlich langsamere Lactat-Oxidation könnte es zwei Gründe geben: (i) die Oxidation mit NAD⁺ als Elektronenakzeptor ist thermodynamisch sehr ungünstig und das könnte sich auf die Reaktionsgeschwindigkeit auswirken, (ii) die Oxidation mit Ubichinon als Elektronenakzeptor ist thermodynamisch günstig, erfordert aber die Aktivität eines separaten Enzyms, der chinonabhängigen Lactat-Dehydrogenase, die normalerweise erst bei Wachstum auf Lactat induziert wird und daher wahrscheinlich nur in geringer Aktivität in den Zellen vorhanden ist. Nach dem vollständigen Glucoseverbrauch (10 mM) wurden nur je 7 mM Pyruvat und Lactat gebildet, am Ende des Versuchs aber 18 mM Pyruvat. Dies deutet darauf hin, dass während der Glucose-Umsetzung neben Pyruvat und Lactat noch ein weiteres Zwischenprodukt entstanden sein muss, das später ebenfalls zu Pyruvat umgesetzt wurde. Untersuchungen mit Zellsuspensionen mit OD₆₀₀ ~3 ergaben vergleichbare Resultate zu den Versuchen mit OD₆₀₀ = 5,8.

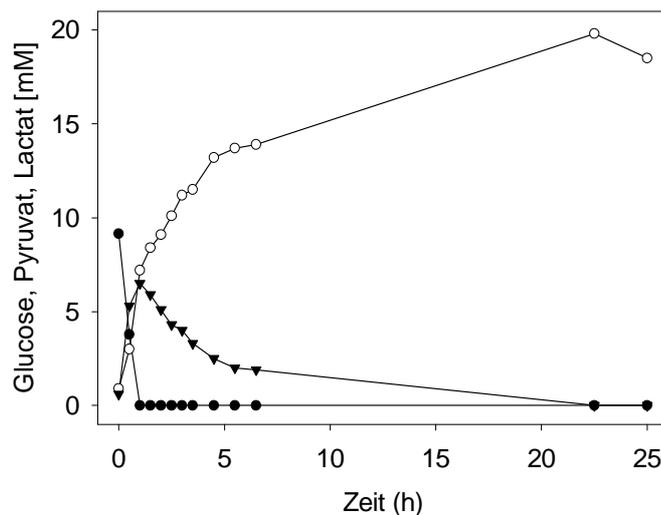


Abb. 13: Glucose-Verbrauch (●) sowie Pyruvat- (○) und Lactat-Bildung (▼) durch eine YYC202-Zellsuspension (50 ml in einem 500-ml-Erlenmeyer-Kolben mit 2 Schikanen) mit einer OD₆₀₀ von 5,8, die bei 37°C und 160 U.p.m. inkubiert wurde. Die Zellen wurden in einem Puffer (pH 7) aus 50 mM MES, 50 mM MOPS und 50 mM TRICINE inkubiert, der 10 mM Glucose enthielt.

3.3 Umsetzung hoher Glucose-Konzentrationen (100 mM) durch Zellsuspensionen

Für die Umsetzung hoher Glucose-Konzentrationen (100 mM) durch Zellsuspensionen von *E. coli* YYC202 musste die Kapazität des eingesetzten Puffers erhöht werden, um eine durch Ansäuerung bedingte Hemmung der Glucose-Umsetzung zu verhindern. Es zeigt sich, dass

die Puffer-Kapazität von 0,2 M MOPS nicht ausreichte. Der pH sank von anfänglich pH 7 auf pH 5 und als Folge davon kam es zu einem Stop der Glucose-Umsetzung. Es wurden nur etwa 68 mM der zugesetzten Glucose umgesetzt. Außer 50 mM Pyruvat wurden 31 mM Lactat gebildet, das aber anders als bei den vorher beschriebenen Experimenten nicht wieder zu Pyruvat umgesetzt wurde. Für die in Abb. 14 dargestellten Versuche wurden die Zellen in 0,5 M bzw. 1 M MOPS-Puffer pH 7 mit ~100 mM Glucose suspendiert, und zwar zu einer OD_{600} von 7. Bei Verwendung von 0,5 M bzw. 1 M MOPS-Puffer kam es zwar auch zu einer Ansäuerung auf pH 6,3, die Glucose wurde aber vollständig verstoffwechselt. Die Rate der Glucose-Umsetzung war in 1 M MOPS auf 20 % der Rate in 0,5 M MOPS reduziert (Tab. 11), d.h. die hohe MOPS-Konzentration hemmte den Stoffwechsel bzw. einzelne der beteiligten Reaktionen beträchtlich.

Die Pyruvat-Ausbeute in 0,2 M, 0,5 M und 1,0 M MOPS-Puffer lag bei 0,8, 1,2 und 1,2 Mol Pyruvat/Mol Glucose. Unter der Annahme, dass das gebildete Lactat wieder zu Pyruvat umgesetzt werden kann, liegen die Ausbeuten bei 1,2, 1,3 und 1,5 Mol Pyruvat/Mol Glucose. Das bedeutet, dass ein beträchtlicher Teil der Glucose zu einem anderen unbekanntem Produkt umgesetzt wurde. Ein nachfolgender Versuch in einem Fermenter deutete darauf hin, dass nur ein Bruchteil des fehlenden Kohlenstoffs als CO_2 freigesetzt wurde.

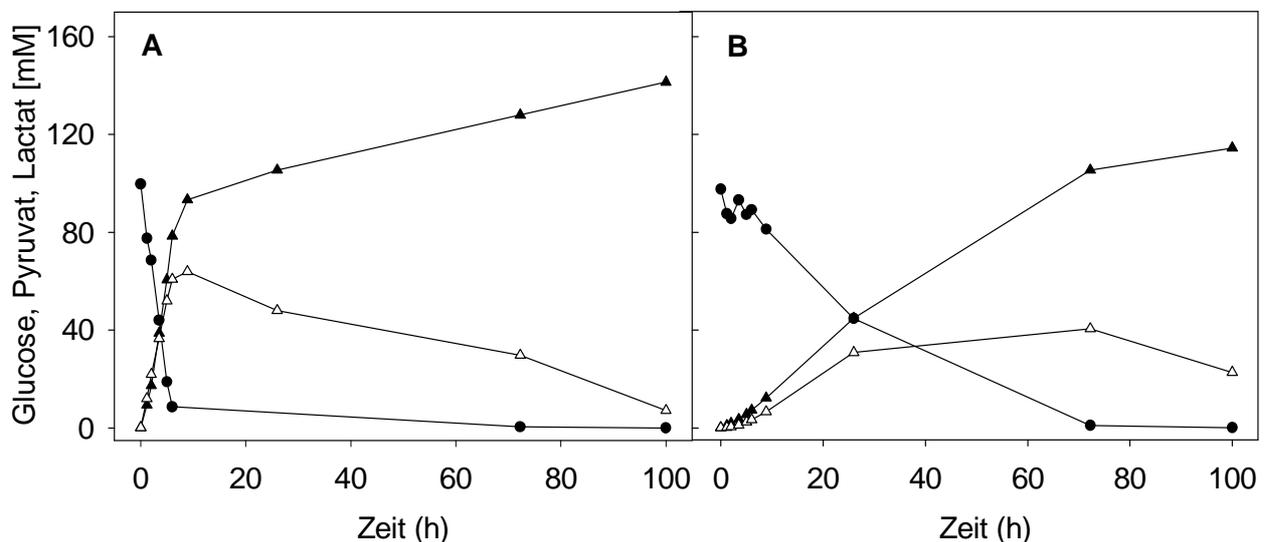


Abb. 14: Glucose-Verbrauch (●) sowie Pyruvat- (▲) und Lactat-Bildung (△) durch Zellsuspensionen von YYC202 ($OD_{600} = 7$) in 0,5 M MOPS-Puffer pH 7 (A) und 1 M MOPS-Puffer pH 7 (B) mit ~100mM Glucose. Die Suspensionen (50 ml) wurden in 500-ml-Erlenmeyer-Kolben mit 2 Schikanen bei 37°C und 160 U.p.m. inkubiert. Der pH-Wert sank in beiden Versuchen von pH 7 auf pH 6,3.

Tab. 11: Maximale Glucose-Aufnahmerate und maximale Pyruvat- und Lactat-Bildungsrate in YYC202-Zellsuspensionen bei unterschiedlichen MOPS-Konzentrationen. Es wurden jeweils ~100 mM Glucose zugefügt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus jeweils zwei Versuchen.

	0,2 M MOPS	0,5 M MOPS	1 M MOPS
maximale Glucose-Verbrauchsrate [$\mu\text{mol Glucose min}^{-1}$ (mg Protein) $^{-1}$]	0,24 \pm 0,02	0,31 \pm 0,01	0,06 \pm 0,00
maximale Pyruvat-Bildungsrate [$\mu\text{mol Pyruvat min}^{-1}$ (mg Protein) $^{-1}$]	0,29 \pm 0,04	0,28 \pm 0,00	0,04 \pm 0,00
Pyruvat-Ausbeute [Mol Pyruvat/Mol Glucose]	0,80 \pm 0,10	1,20 \pm 0,30	1,20 \pm 0,03

3.4 Glucose-Umsetzung durch Zellsuspensionen von *E. coli* YYC202 im Fermenter

Wenn Glucose nicht über die Glykolyse, sondern über den oxidativen Pentosephosphatweg verstoffwechselt wird, entsteht CO₂. Dies führt zu einer Reduktion der Pyruvat-Ausbeute. Um zu bestimmen, wieviel CO₂ bei der Umsetzung von Glucose durch Zellsuspensionen von YYC202 entsteht, wurde ein Versuch in einem Fermenter mit CO₂-Abgasanalytik durchgeführt. Außerdem konnte dabei der pH-Wert und die Sauerstoff-Sättigung der Suspension automatisch reguliert werden. Wie in Abb. 15 gezeigt, lag die gemessene CO₂-Bildungsrate während des gesamten Versuchs relativ konstant bei 0,04 $\mu\text{mol min}^{-1}$ (mg Protein) $^{-1}$. Die Glucose-Verbrauchsrate betrug in den ersten 5 h 0,34 $\mu\text{mol min}^{-1}$ (mg Protein) $^{-1}$, in der Folge nur noch etwa 0,11 $\mu\text{mol min}^{-1}$ (mg Protein) $^{-1}$ (Tab. 12) Das deutet darauf hin, dass in der Anfangsphase etwa 12 % der Glucose über den oxidativen Pentosephosphatweg verstoffwechselt wurde, in der späteren Phase dann 36 %. In der Gesamtbilanz wurden 4,4 % des verbrauchten Kohlenstoffs aus der Glucose als CO₂ wiedergefunden (Tab. 13). Trotz der konstant hohen Sauerstoffsättigung wurde auch in diesem Versuch Lactat als Nebenprodukt gebildet. Die deutet darauf hin, dass die Aktivitäten der Atmungskettenenzyme und nicht der Sauerstoff limitierend für die NADH-Oxidation war und das die D-Lactat-Dehydrogenase auch unter aeroben Bedingungen im Stamm YYC202 stark aktiv war. Die Pyruvat-Ausbeute lag bei 1,0 Mol Pyruvat/Mol Glucose, unter der Annahme das Lactat wieder zu Pyruvat umgesetzt würde bei 1,7 Mol Pyruvat/Mol Glucose. 88 % des verbrauchten Kohlenstoffs konnte in Form von Pyruvat, Lactat und CO₂ wiedergefunden werden, d.h. die Kohlenstoffbilanz war deutlich geschlossener als in den vorangegangenen Versuchen.

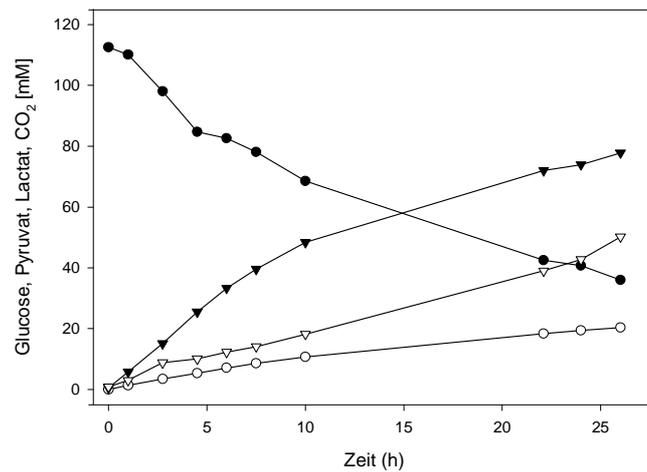


Abb. 15: Glucose-Verbrauch (●) sowie Pyruvat- (▼), Lactat- (▽) und CO₂-Produktion (○) durch eine Zellsuspension von *E. coli* YYC202 (OD₆₀₀ 3,3) in einem 2-l-Fermenter (KLF2000, Bioengineering, Wald, Schweiz). Die Zellsuspension (1 l, 50 mM MOPS-Puffer, 118 mM Glucose) wurde bei 37°C und 550 U.p.m. inkubiert. Der pH wurde durch Titration mit NaOH konstant bei pH 7,0 gehalten und die Sauerstoffsättigung durch Regelung der Luftzufuhr bei durchschnittlich 76 %.

Tab. 12: Maximale Substrat-Verbrauchsrate und Produktbildungsraten bei der Umsetzung von Glucose durch YYC202-Zellsuspension im Fermenter (KLF2000, Bioengineering, Wald, Schweiz). Der pH wurde durch Titration mit NaOH konstant bei pH 7,0 gehalten und die Sauerstoffsättigung durch Regelung der Luftzufuhr bei durchschnittlich 76 %.

	[$\mu\text{mol (mg Protein)}^{-1} \text{min}^{-1}$]
spezifische Glucose-Verbrauchsrate t_1 - $t_{4,5}$	0,34
spezifische Glucose-Verbrauchsrate t_6 - t_{26}	0,11
spezifische Pyruvat-Bildungsrate t_0 – t_{10}	0,23
spezifische Pyruvat-Bildungsrate t_{10} – t_{26}	0,09
spezifische Lactat-Bildungsrate t_0 – t_{26}	0,08
spezifische CO ₂ -Bildungsrate t_0 – t_{26}	0,04

Tab. 13: Kohlenstoff-Bilanz bei der Umsetzung von Glucose durch YYC202-Zellsuspension im Fermenter (KLF2000, Bioengineering, Wald, Schweiz). Der pH wurde durch Titration mit NaOH konstant bei pH 7,0 gehalten und die Sauerstoffsättigung durch Regelung der Luftzufuhr bei durchschnittlich 76 %.

	mmol	mmol C	Σ mmol C
Glucose-Verbrauch	76,5	458,8	459 (100 %)
Lactat-Bildung	49,3	147,8	
CO ₂ - Bildung	20,4	20,4	
Pyruvat- Bildung	77,8	233,4	402 (87,5 %)
Differenz C			57 (12,5 %)

4 Konstruktion und Charakterisierung eines *E. coli* YYC202-Stammes mit fehlender D-Lactat-Dehydrogenase-Aktivität (YYC202*ldhA*)

E. coli besitzt drei verschiedene Lactat-Dehydrogenasen (LDH). Zwei davon sind membranassoziierte Enzyme, die D- bzw. L-Lactat irreversibel zu Pyruvat umsetzen und die Reduktionsäquivalente auf Ubichinon oder Menachinon übertragen (Garvie, 1980). Diese Enzyme werden bei Wachstum auf Lactat benötigt. Die dritte LDH ist ein NAD⁺-abhängiges, D-Lactat-spezifisches Enzym, welches D-Lactat aus Pyruvat bildet (Tarmy & Kaplan, 1968a; Tarmy & Kaplan, 1968b). Die Synthese dieser fermentativen, durch *ldhA* kodierten LDH wird durch eine Kombination aus Anaerobiose und Säure induziert (Bunch *et al.*, 1997). Unter aeroben Bedingungen gibt es eine pH-unabhängige Basis-Expression (Jiang *et al.*, 2001). Pyruvat ist nicht nur Substrat der NAD⁺-abhängigen LDH, sondern wirkt auch als allosterischer Aktivator des Enzyms (Pecher *et al.*, 1983; Tarmy & Kaplan, 1968b) und als Induktor seiner Synthese. Eine neuere Arbeit zeigte, dass Pyruvat die Expression des *ldhA*-Gens zwei- bis vierfach stimuliert (Jiang *et al.*, 2001). Der K_m -Wert für Pyruvat liegt je nach pH-Wert zwischen 4,4 mM (pH 6,7) und 7,2 mM (pH 7,5) (Tarmy & Kaplan, 1968b). Diese Konzentrationen werden in *E. coli*-Wildtyp-Stämmen unter aeroben Bedingungen normalerweise wohl nicht erreicht. Im Stamm YYC202 dagegen wird aufgrund der Blockade des Pyruvat-Abbaus dessen Konzentration wahrscheinlich deutlich größer sein als in einem Wildtyp-Stamm und dann sowohl eine verstärkte *ldhA*-Expression als auch eine erhöhte Aktivität des Enzyms bewirken. Damit lässt sich die signifikante Lactat-Bildung bei Kultivierung von YYC202 mit hohen Glucose-Konzentrationen erklären.

Um die Bildung des Nebenprodukts Lactat zu unterbinden, wurde versucht, das *ldhA*-Gen im Stamm YYC202 zu deletieren bzw. zu inaktivieren. Die Versuche zur Deletion mit der von Link *et al.* (1997) beschriebene Methode mit dem Plasmid pKO3 waren nicht erfolgreich. Es konnte zwar ein pKO3-Derivat mit einem 1,2-kb-„Crossover“-PCR-Fragment konstruiert werden, das die *ldhA*-flankierenden Bereiche umfasste (pKO3-*ldhA*), die Integration des Plasmids in das Chromosom von *E. coli* MG1655 oder YYC202 gelang jedoch nicht. Daher wurde alternativ versucht, eine *ldhA*-Mutante von YYC202 mittels P1vir Transduktion (Silhavy *et al.*, 1984) zu konstruieren. Als Donor diente dabei der Stamm NZN117 (*ldhA*::Kan) (Bunch *et al.*, 1997), in dem das *ldhA*-Gen durch Insertion eines Kanamycin-Resistenzgens inaktiviert wurde. Die erfolgreiche Transduktion in den Stamm YYC202 wurde durch eine Southern-Blot-Analyse bestätigt (Abb. 16). Mit einem DIG-markierten 2,2-kb-DNA-Fragment des *ldhA*-Gens (entspricht dem PCR-Produkt mit den Primern No-*ldhA*-S

und Co-ldhA-S) als Sonde wurde in *EcoRI/HindIII*-verdauter chromosomaler DNA des Ausgangsstammes YYC202 erwartungsgemäß nur ein einziges Fragment von 11 kb Länge nachgewiesen. In *EcoRI/HindIII*-verdauter chromosomaler DNA des Donorstammes NZN117 und von YYC202*ldhA* wurden dagegen zwei Fragmente von 6,2 kb und 6,8 kb Länge detektiert, da in diesen Stämmen durch die Insertion der Kanamycin-Kassette in *ldhA* eine *HindIII*-Schnittstelle hinzugefügt wurde. Mit einem DIG-markierten 0,7-kb-Fragment des Kanamycin-Resistenzgens aus NZN117 (entspricht dem PCR-Produkt mit den Primern KAN-for 1.1 und KAN-rev 2.1) wurde erwartungsgemäß kein Signal in YYC202 nachgewiesen, in YYC202*ldhA* und NZN117 dagegen konnten wiederum Fragmente von 6,2 kb und 6,8 kb Länge detektiert werden.

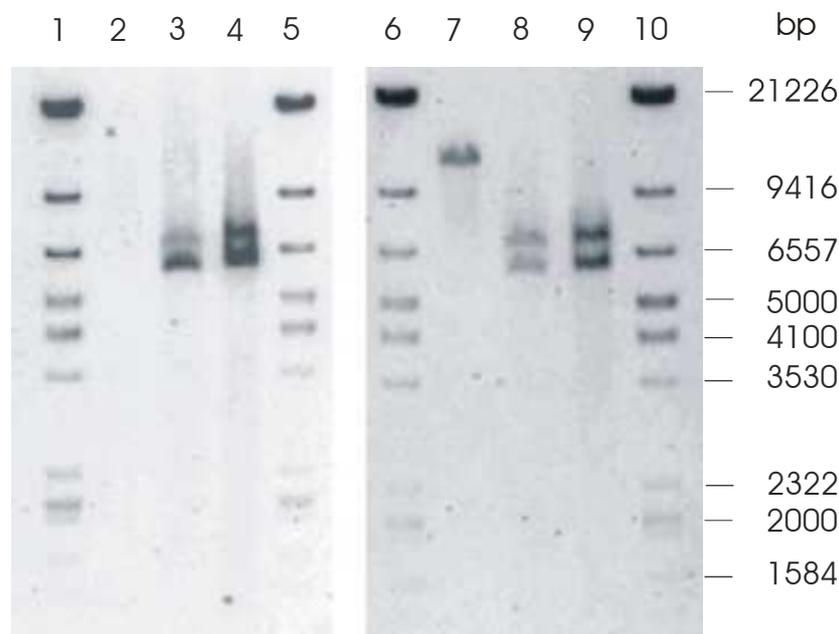


Abb. 16: Southern-Blot-Analyse (Southern, 1975) von YYC202*ldhA* (siehe vorherige Seite). Die Spuren 1, 5, 6 und 10 enthalten je 75 ng DIG-markierten DNA-Standard II und III (Roche Diagnostics). Die Spuren 2 und 7 enthalten chromosomale DNA von YYC202, die Spuren 3 und 8 chromosomale DNA von YYC202*ldhA* und die Spuren 4 und 9 chromosomale DNA von NZN117. Pro Spur wurden jeweils 15 µg chromosomale DNA aufgetragen, die mit *EcoRI* und *HindIII* verdaut worden war. Die DNA-Fragmente wurden auf einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt und nach Denaturierung auf eine Nylon-Membran gebロットet. Der Blot mit den Spuren 1-5 wurde mit einem DIG-markierten 668-bp-Fragment des Kanamycin-Resistenzgens aus NZN117 hybridisiert, der Blot mit den Spuren 6-10 mit einem DIG-markierten 2153-bp-DNA-Fragment des *ldhA*-Gens.

Zur phänotypischen Charakterisierung der *ldhA*-Mutante wurde zunächst die NAD⁺-abhängige Lactat-DH-Aktivität (LdhA-Aktivität) von YYC202 und YYC202*ldhA* nach 6-stündiger Kultivierung in LB-Medium mit 0,4 % (w/v) Glucose bestimmt. Dazu wurden

zellfreie Extrakte hergestellt, die Membranfraktion durch Ultrazentrifugation entfernt und die lösliche Fraktion in einen Enzymtest eingesetzt, bei dem die pyruvatabhängige Oxidation von NADH zu NAD⁺ photometrisch anhand der Abnahme der Extinktion bei 340 nm gemessen wurde (Bunch *et al.*, 1997). Mit diesem Test wurde ermittelt, dass der Stamm YYC202 eine hohe LdhA-Aktivität von etwa 3 $\mu\text{mol min}^{-1}$ (mg Protein)⁻¹ besitzt, während YYC202*ldhA* erwartungsgemäß praktisch keine LdhA-Aktivität mehr aufwies (<0,01 $\mu\text{mol min}^{-1}$ (mg Protein)⁻¹).

Aufgrund seines Genotyps ($\Delta aceEF pfl-1 poxB1 pps-4 rpsL zbi:Tn10 ldhA::Kan$) sollte *E. coli* YYC202*ldhA* Pyruvat nicht mehr zu Acetyl-CoA bzw. Acetat umsetzen können und bei Wachstum auf Glucose-Minimalmedium genau wie der Stamm YYC202 Acetat benötigen. Es konnte gezeigt werden, dass der Stamm YYC202*ldhA* auf Glucose-Minimalmedium-Platten in Anwesenheit von 2 mM Acetat wächst, während in Abwesenheit von Acetat kein Wachstum erkennbar war. Somit konnte auch die Acetat-Auxotrophie von YYC202*ldhA* bestätigt werden.

In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass durch die Inaktivierung des *ldhA*-Gens die Bildung des Nebenprodukts Lactat völlig unterbunden wurde und dadurch deutlich höhere Pyruvat-Ausbeuten erzielt werden konnten. Bei dem in Abb. 17 gezeigten Vergleich der Glucose-Umsetzung durch Zellsuspensionen bildete YYC202 (bedingt durch die langsame Oxidation von Lactat zu Pyruvat) innerhalb von 100 Stunden aus 100 mM Glucose 140 mM Pyruvat, während YYC202*ldhA* bei nur halber Zelldichte innerhalb von 25 Stunden aus 88 mM Glucose 150 mM Pyruvat produziert. Die Ausbeute konnte somit um 21 % gesteigert werden. Die spezifische Glucose-Verbrauchsrate von YYC202*ldhA* war geringer als die von YYC202, was darauf hindeutet, dass in Abwesenheit des „NADH-Überflusventils“ Lactat-Dehydrogenase der Fluss durch die Glykolyse reduziert wird, bedingt vielleicht durch einen höheren NADH-Spiegel in der Zelle. B. Zelić (Institut für Biotechnologie 2) konnte zeigen, dass YYC202*ldhA* auch in Fed-Batch-Fermentationen kein Lactat, aber bis zu 700 mM Pyruvat produzierte, während YYC202 unter vergleichbaren Bedingungen neben 500 mM Pyruvat auch ~300 mM Lactat bildete.

Um zu zeigen, dass die *ldhA*-Mutation allein für die Bildung von Pyruvat aus Glucose nicht ausreicht, wurde der für die Transduktion benutzte Donorstamm *E. coli* NZN117 (Bunch *et al.*, 1997) in Minimalmedium mit 10 mM Glucose und 2 mM Acetat bei 37°C und 140 U.p.m. kultiviert. Zu keinem Zeitpunkt während des Wachstums und in der stationären Phase konnte Pyruvat im Kulturüberstand von NZN117 detektiert werden. Dies zeigt, dass für die Pyruvat-Bildung durch YYC202*ldhA* primär die Deletion der *aceEF*-Gene (Pyruvat-Dehydrogenase-

Komplex) sowie die Inaktivierung von *poxB* (Pyruvat-Oxidase) und *pflB* (Pyruvat-Formiat-Lyase) verantwortlich ist.

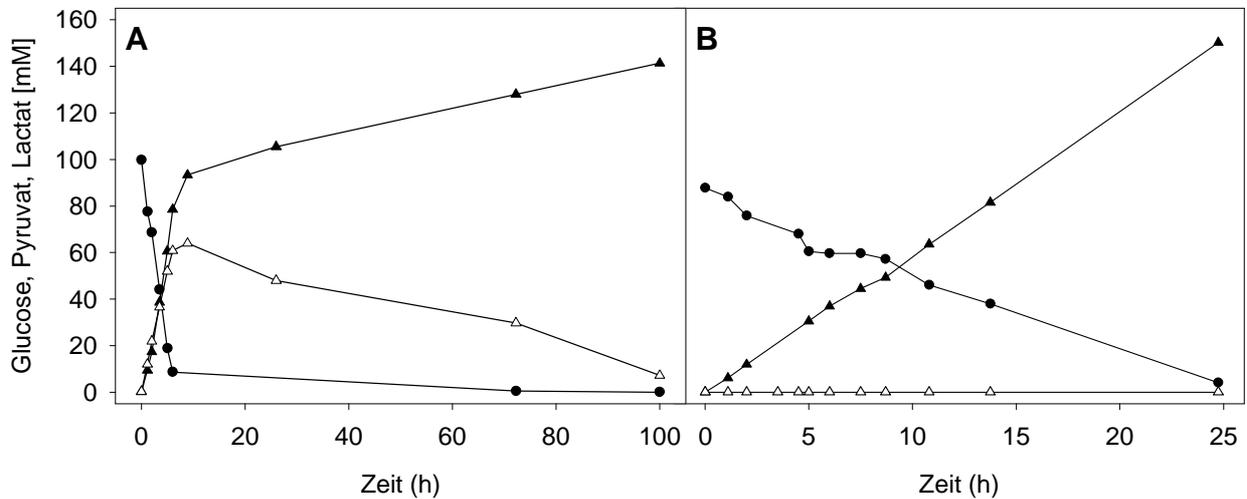


Abb. 17: Vergleich der Umsetzung von Glucose (●) zu Pyruvat (▲) durch Zellsuspensionen von YYC202 (A) und YYC202ldhA (B). In Glucose-Minimalmedium mit Acetat kultivierte Zellen wurden in 0,9 % NaCl gewaschen und in 500 mM MOPS (pH 7,0) mit 100 bzw. 88 mM Glucose zu einer OD₆₀₀ von 7,4 bzw. 3,1 resuspendiert. Der pH-Wert sank während des Experimentes auf pH 6,3 bzw. 6. Die Pyruvat-Ausbeute betrug 1,4 bzw. 1,7 Mol Pyruvat/Mol Glucose. Die Lactat-Bildung ist durch △ gekennzeichnet.

5 Einfluss der Pyruvat-Konzentration auf das Wachstum von MG1655

Bei Fermentationsexperimenten zeigte sich, dass es anscheinend eine obere Grenze von ca. 700 mM für die Pyruvat-Produktion durch *E. coli* YYC202ldhA gibt. Mögliche Ursachen für diese Obergrenze könnten beispielsweise ein durch die erhöhte Pyruvat-Konzentration ausgelöster pyruvatspezifischer Stress und/oder osmotischer Stress sein. Ein durch Pyruvat ausgelöster Stress könnte dazu führen, dass der bisher nicht verstandene Transport des Pyruvats ins Medium bei so hohen extrazellulären Konzentrationen nicht mehr möglich ist. Um herauszufinden, ob hohe Pyruvat-Konzentrationen einen spezifischen Stress für *E. coli* darstellen, wurde der Einfluss verschiedener Konzentrationen (10, 50, 100, 250, 500, 750 und 1000 mM) von Na-Pyruvat, K-Pyruvat, NaCl und KCl auf das Wachstum von MG1655 in M9-Minimalmedium untersucht. Für die Versuche mit NaCl und KCl wurde 50 mM Glycerin

als C-Quelle eingesetzt. Wie in Abb. 18 dargestellt, wirkte Pyruvat in Konzentrationen >250 mM stark hemmend auf das Wachstum, unabhängig davon, ob es als Na- oder K-Salz eingesetzt wurde. Ab 500 mM war praktisch kein Wachstum mehr nachweisbar. Einen Einfluss des pH-Wertes kann ausgeschlossen werden, da er während der gesamten Kultivierung konstant bei pH 7 blieb. Demgegenüber war das Wachstum in Glycerin-Minimalmedium bei Zusatz von 500 mM NaCl oder KCl deutlich weniger beeinträchtigt. Dies spricht dafür, dass die Produktionsgrenze von circa 700 mM Pyruvat sowohl durch osmotischen als auch durch einen pyruvatspezifischen Stress bedingt ist. Bei den Fermentationen durch B. Zelic konnte gezeigt werden, dass *YYC202ldhA*-Zellen, die nach der Pyruvat-Produktion in frisches Minimalmedium mit Glucose und Acetat überimpft wurden, wieder in der Lage waren Pyruvat zu produzieren.

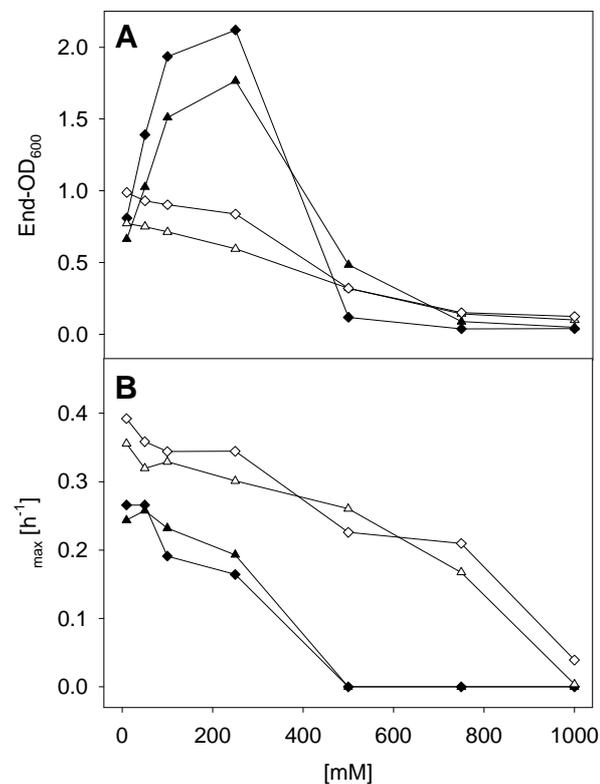


Abb. 18: Einfluss verschiedener Konzentrationen (10, 50, 100, 250, 500, 750 und 1000 mM) von Na-Pyruvat (▲), K-Pyruvat (◆), NaCl (△) und KCl (◇) auf das Wachstum von *E. coli* MG1655 in M9-Minimalmedium. Für die Versuche mit NaCl und KCl wurde 50 mM Glycerin als C-Quelle eingesetzt. Die Mittelwerte wurden aus zwei unabhängigen Experimenten ermittelt. A. End-OD₆₀₀ nach 25 h Inkubation bei 37°C und 140 U.p.m.; B. maximale Wachstumsrate (μ_{max}).

6 Untersuchungen zum Pyruvat-Transport in *E. coli*

Die Pyruvat-Aufnahme von *E. coli* wurde bisher biochemisch mit Zellen und Membranvesikeln charakterisiert (Lang *et al.*, 1987). Für Zellen wurde gezeigt, dass die Pyruvat-Aufnahme mit einem K_m -Wert von 20 μM in der mittleren exponentiellen Phase maximal ist und zu 85-95 % durch Entkoppler wie CCCP und Dinitrophenol gehemmt wird. Auch Cyanid und Azid bewirkten eine 50-60 %ige Hemmung der Pyruvat-Aufnahme. Bei Verwendung des artifiziellen Elektronendonator-Systems Ascorbat/Phenazinmethosulfat konnte Pyruvat in Membranvesikeln 7-10-fach über der externen Pyruvat-Konzentration ankonzentriert werden. Ähnlich wie bei ganzen Zellen lag der K_m -Wert bei 15 μM und der Transport wurde durch CCCP und Dinitrophenol zu 90 % gehemmt. Diese Daten deuten darauf hin, dass Pyruvat in *E. coli* über einen sekundär aktiven Transport in die Zelle aufgenommen wird. Das Gen oder die Gene für diesen Transporter wurden bisher nicht identifiziert.

Im Gegensatz zum Import gibt es bis heute keine Untersuchungen zum Export von Pyruvat. Analysen von Kulturproben einer Fed-Batch-Fermentation mit dem Stamm YYC202 durch B. Zelić (Institut für Biotechnologie 2) ergaben, dass die intrazelluläre Pyruvat-Konzentration während der Fermentation von 30 μM auf etwa 6 mM anstieg, während die extrazelluläre Konzentration von 1,5 mM auf 500 mM anstieg. Demzufolge wäre die interne Pyruvat-Konzentration immer etwa 100-fach niedriger war als externe, was auf einen aktiven Export von Pyruvat hindeuten würde.

6.1 Co-Verstoffwechslung von Glucose und Pyruvat durch MG1655

Um zu untersuchen, ob der Pyruvat-Import einer Glucose-Repression unterliegt, wurde MG1655 in Minimalmedium mit Glucose und Pyruvat kultiviert. Wie in Abb. 19 gezeigt, wurden beide C-Quellen parallel verstoffwechselt. Es ist außerdem das Wachstum mit Glucose bzw. Pyruvat als alleiniger C-Quelle dargestellt. Die maximale spezifische Glucose-Verbrauchsrate war bei Wachstum mit Glucose als einziger C-Quelle und bei Wachstum mit Glucose plus Pyruvat praktisch identisch ($0,31 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$). Demgegenüber war die maximale spezifische Pyruvat-Verbrauchsrate bei Wachstum mit Pyruvat als einziger C-Quelle doppelt so hoch ($0,82 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$) wie bei Wachstum mit Pyruvat plus Glucose ($0,43 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$). Demnach hat Pyruvat keinen Einfluss auf die Umsetzung der Glucose, während Glucose die Pyruvat-Umsetzung partiell hemmt. Trotzdem

ist die Verbrauchsrate von Pyruvat immer noch 39 % höher als die von Glucose und bei Wachstum ohne Glucose sogar 164 % höher. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Fähigkeit von *E. coli* zur Aufnahme von Pyruvat konstitutiv ist, auch wenn Glucose einen hemmenden Einfluss hat.

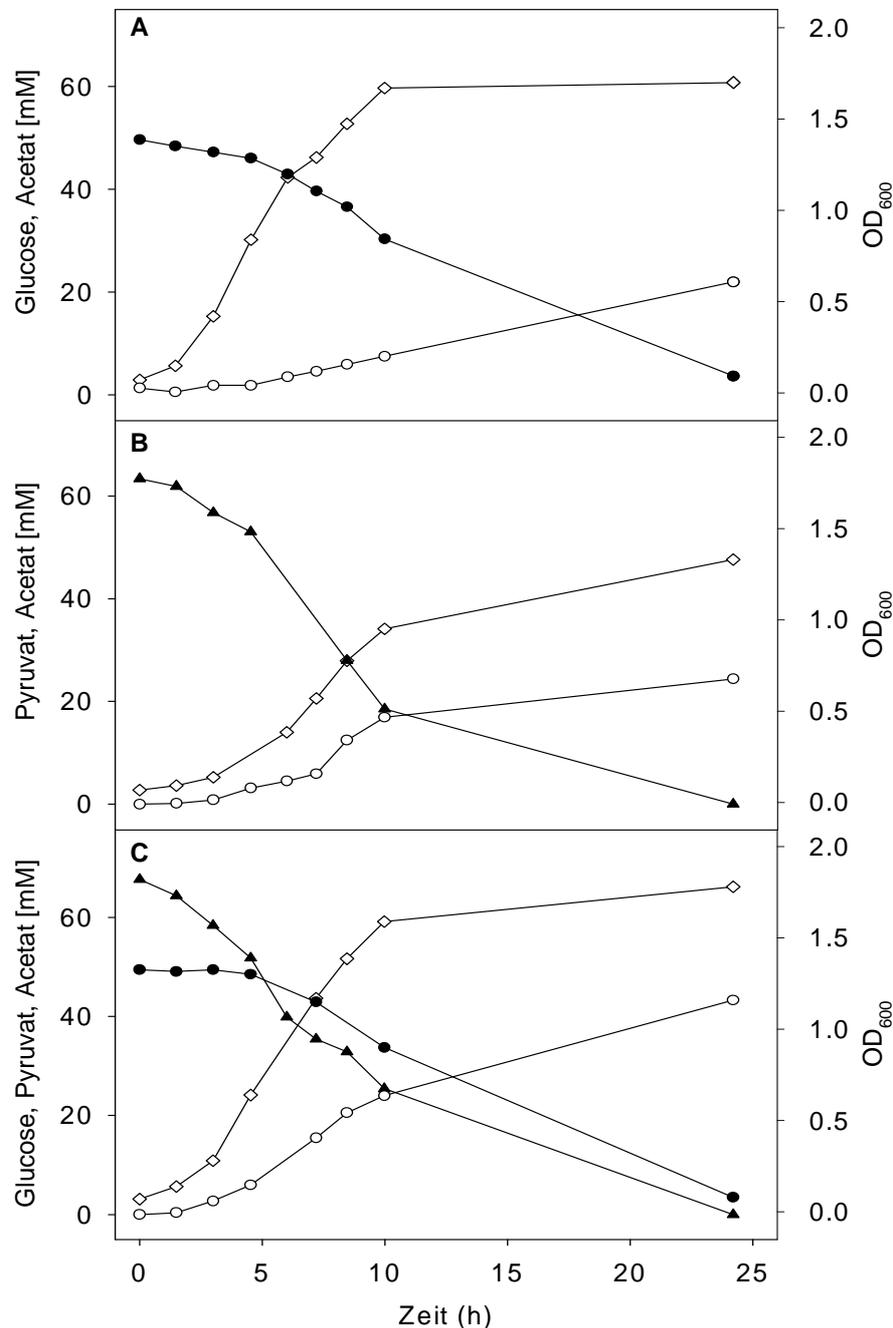


Abb. 19: Umsetzung von Glucose (●) und Pyruvat (▲) sowie Bildung von Acetat (○) in MG1655 bei Wachstum (OD_{600} , ◇) in Minimalmedium (pH 7) mit ~50 mM Glucose und/oder ~60 mM Pyruvat (50 ml Medium im 500-ml-Erlenmeyer-Kolben mit zwei Schikanen, 37°C, 160 U.p.m.). A. Glucose als alleinige C-Quelle, B. Pyruvat als alleinige C-Quelle, C. Glucose und Pyruvat als C-Quellen.

6.2 Einfluss von Inhibitoren auf den Pyruvat-Export

Um Hinweise auf den Mechanismus des Pyruvat-Exports zu erhalten, wurde der Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die Umsetzung von Glucose zu Pyruvat durch Zellsuspensionen von *E. coli* YYC202 untersucht.

6.2.1 Einfluss von Arsenat auf den Pyruvat-Export

Arsenat (AsO_4^{3-}) ähnelt Orthophosphat (PO_4^{3-}) in Struktur und Reaktivität. Bei der Oxidation von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat durch Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase entsteht als Intermediat ein 3-Phosphoglycerat-Thioester, der phosphorolytisch gespalten wird. Arsenat kann das Phosphat beim Angriff auf die energiereiche Thioesterbindung ersetzen, wobei 1-Arseno-3-Phosphoglycerat entsteht. Im Gegensatz zu 1,3-Bisphosphoglycerat ist dieses Produkt instabil und wird sofort zu 3-Phosphoglycerat und Arsenat hydrolysiert: $\text{Glycerinaldehyd-3-Phosphat} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{3-Phosphoglycerat} + \text{NADH} + \text{H}^+$. Somit kann durch diese Reaktion und damit auch in der gesamten Glykolyse netto kein ATP mehr über Substratstufenphosphorylierung (SSP) gewonnen werden. Da aber bei aeroben Umsetzungen der überwiegende Anteil von ATP über Elektronentransportphosphorylierung gewonnen wird und die Hemmung der SSP durch Arsenat nicht vollständig sein muss, kann ein fehlender Effekt von Arsenat auf einen bestimmten Prozess nicht zu der Schlussfolgerung führen, er sei ATP-unabhängig.

Es wurde der Einfluss von 2 mM, 10 mM und 50 mM $\text{Na}_2\text{H-Arsenat}$ auf Glucose-Verbrauch und Pyruvat-Bildung durch Zellsuspensionen von *E. coli* YYC202 getestet. Zellsuspensionen wurden jeweils in 0,5 M MOPS-Puffer pH 7 mit ~100 mM Glucose zu einer OD_{600} von ~2 resuspendiert. Nach 4 Stunden Inkubation bei 37°C und 140 U.p.m. wurden die unterschiedlichen Konzentrationen Arsenat zugesetzt. Kontrollen wurden entsprechende Konzentrationen von Na_2HPO_4 zugesetzt. Obwohl ein leichter Hemmeffekt von Arsenat auf die Glucose-Verbrauchsrate, Pyruvat-Bildungsrate und die Pyruvat-Ausbeute (allerdings nur bei 50 mM Arsenat) zu erkennen war, kann aufgrund dieser Daten keine Schlussfolgerung bezüglich der ATP-Abhängigkeit des Pyruvat-Exports gemacht werden.

6.2.2 Einfluss von N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid auf den Pyruvat-Export

N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD) hemmt den Protonenfluss durch die F_1F_0 -ATP-Synthase, indem es eine kovalente Bindung mit der Carboxylgruppe des Aspartat-Restes 61 in der c-Untereinheit des F_0 -Teils eingeht (Hermolin & Fillingame, 1989).

Es wurde der Einfluss von 10 μ M, 100 μ M und 1 mM DCCD auf Glucose-Verbrauch und Pyruvat-Bildung durch Zellsuspensionen von *E. coli* YYC202 getestet. Zellsuspensionen wurden jeweils in 0,5 M MOPS-Puffer pH 7 mit ~85 mM Glucose zu einer OD₆₀₀ von ~3,1 resuspendiert. Nach 5 Stunden Inkubation bei 37°C und 140 U.p.m. wurden die unterschiedlichen Konzentrationen DCCD zugesetzt. Einer Kontrolle wurde 500 μ l Ethanol zugesetzt, was dem zugesetzten Volumen von 1 mM DCCD entsprach. Ethanol wurde zugesetzt, da DCCD in Ethanol gelöst war. Bei Zusatz von 10 μ M DCCD wurde eine leichte Steigerung der spezifischen Pyruvat-Bildungsrate und der Ausbeute gemessen. Es war jedoch mit zunehmender DCCD-Konzentration kaum ein Einfluss auf die spezifische bzw. absolute Glucose-Verbrauchsrate zu erkennen, wohl aber eine Reduktion der spezifischen Pyruvat-Bildungsrate um Faktor ~2. Die absolute Pyruvat-Produktionsrate war um etwa 30 % reduziert. Die Ausbeute sank ebenfalls um etwa 30 %. Bei allen Versuchen wurde eine 0,1 M DCCD-Stammlösung verwendet, was dazu führt, dass bei allen Versuchen unterschiedliche Volumina DCCD zugegeben wurden und dementsprechend auch unterschiedliche Volumina Ethanol, so dass man einen Effekt durch Ethanol nicht ausschließen kann. Obwohl ein leichter Hemmeffekt von DCCD auf die Pyruvat-Bildungsrate und die Pyruvat-Ausbeute (allerdings nur bei 1 mM DCCD) zu erkennen war, kann aufgrund dieser Daten keine Schlussfolgerung bezüglich der ATP-Abhängigkeit des Pyruvat-Exports gemacht werden.

6.2.3 Einfluss von Carbonylcyanid-*m*-chlorphenylhydrazon auf den Pyruvat-Export

Entkoppler sind chemische Substanzen, die das elektrochemische Protonenpotential über z.B. der Cytoplasmamembran von Bakterien abbauen und damit einerseits die Synthese von ATP aus ADP und P_i durch die F₁F₀-ATP-Synthase, andererseits aber auch sekundär aktive Transportprozesse, die durch das elektrochemische Protonenpotential getrieben werden, inhibieren. Protonophore sind i.d.R. lipophile schwache Säuren, die die Membran aufgrund eines großen delokalisierten π -Elektronensystems sowohl in der protonierten als auch in der deprotonierten Form permeieren können (Nichollas & Ferguson, 1992). Als Entkoppler wirken z.B. Dinitrophenol, Dicumarol oder Carbonylcyanid-*m*-chlorphenylhydrazon (CCCP).

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von CCCP getestet. Eine *E. coli* YYC202*dha*-Zellsuspension wurde in 0,5 M MOPS-Puffer pH 7 mit ~85 mM Glucose zu einer OD₆₀₀ von ~3,1 resuspendiert. Nach fünf Stunden Inkubation bei 37°C und 140 U.p.m. wurde der Zellsuspension 100 μ M CCCP zugegeben. Unter diesen Bedingungen zeigte CCCP keinen Einfluss auf Glucose-Verbrauch und Pyruvat-Bildung.

Die Wirksamkeit des Abbaus des elektrochemischen Protonenpotentials hängt von verschiedenen Faktoren ab, z.B. der Entkoppler-Konzentration, der Rate, mit der der elektrochemische Protonengradient durch die Atmungskette aufgebaut wird und der Protonenkonzentration. Bei höheren Protonenkonzentrationen sollte der Abbau beschleunigt werden. Aus dieser Überlegung heraus wurde der Einfluss von CCCP auf die Glucose-Umsetzung durch Zellsuspensionen von *E. coli* YYC202 bei pH 6, 6,5, 7, 7,5 und 8 getestet. Den Zellsuspensionen wurde bereits zu Beginn der Inkubation 20 μ M CCCP zugesetzt (Abb. 20). Den Kontrollen wurden entsprechende Volumina Ethanol zugesetzt. Es stellte sich heraus, dass die spezifischen Glucose-Verbrauchsdaten zwischen pH 6,5 und 8 ohne bzw. mit CCCP annähernd gleich waren. Bei pH 6 wurde die Glucose von Beginn an sehr langsam und auch nicht vollständig verstoffwechselt. Nach etwa 5 Stunden stoppte die Glucose-Umsetzung. Der Glucose-Transport wird nicht durch die protonenmotorische Kraft (pmf) getrieben. Glucose wird über das PEP-abhängige Phosphotransferase-System (PTS-System) in die Zelle aufgenommen. CCCP sollte demnach keinen direkten Einfluss auf den Glucose-Transport haben und der bei pH 6 beobachtete Effekt könnte demnach direkt mit dem Pyruvat-Transport zusammenhängen. Die Glucose wird zum überwiegenden Teil in der Glykolyse zu Pyruvat umgesetzt. Ist nun wie bei YYC202 die Umsetzung von Pyruvat blockiert und kann Pyruvat aufgrund einer reduzierten pmf nicht mehr mit voller Effizienz exportiert werden, kommt es zu einem Anstau von Glykolyse-Intermediaten, was einen Stop in der Glucose-Aufnahme zur Folge hätte.

Es wurden weitere Experimente bei pH 6, 7 und 8 mit höheren CCCP-Konzentrationen durchgeführt. Hierzu wurden YYC202 dhA -Zellsuspensionen nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden mit 100 μ M CCCP bzw. mit Ethanol als Kontrolle versetzt. Die spezifischen Glucose-Verbrauchsdaten und Pyruvat-Bildungsdaten waren bis zur Zugabe von CCCP bei allen pH-Werten annähernd gleich. Erst nach Zugabe von 100 μ M CCCP zeigte sich ein sehr deutlicher Unterschied. Bei pH 7 und 8 waren die Raten in den Ansätzen mit CCCP und mit EtOH (als Kontrolle) etwa gleich. Bei pH 6 hingegen wurde die Glucose-Umsetzung und damit natürlich auch die Pyruvat-Bildung nach CCCP-Zugabe praktisch vollständig inhibiert (Abb. 21). Trotz einer fünffach erhöhten CCCP-Konzentration trat also auch in diesem Experiment der drastische Hemmeffekt erst bei pH 6 auf.

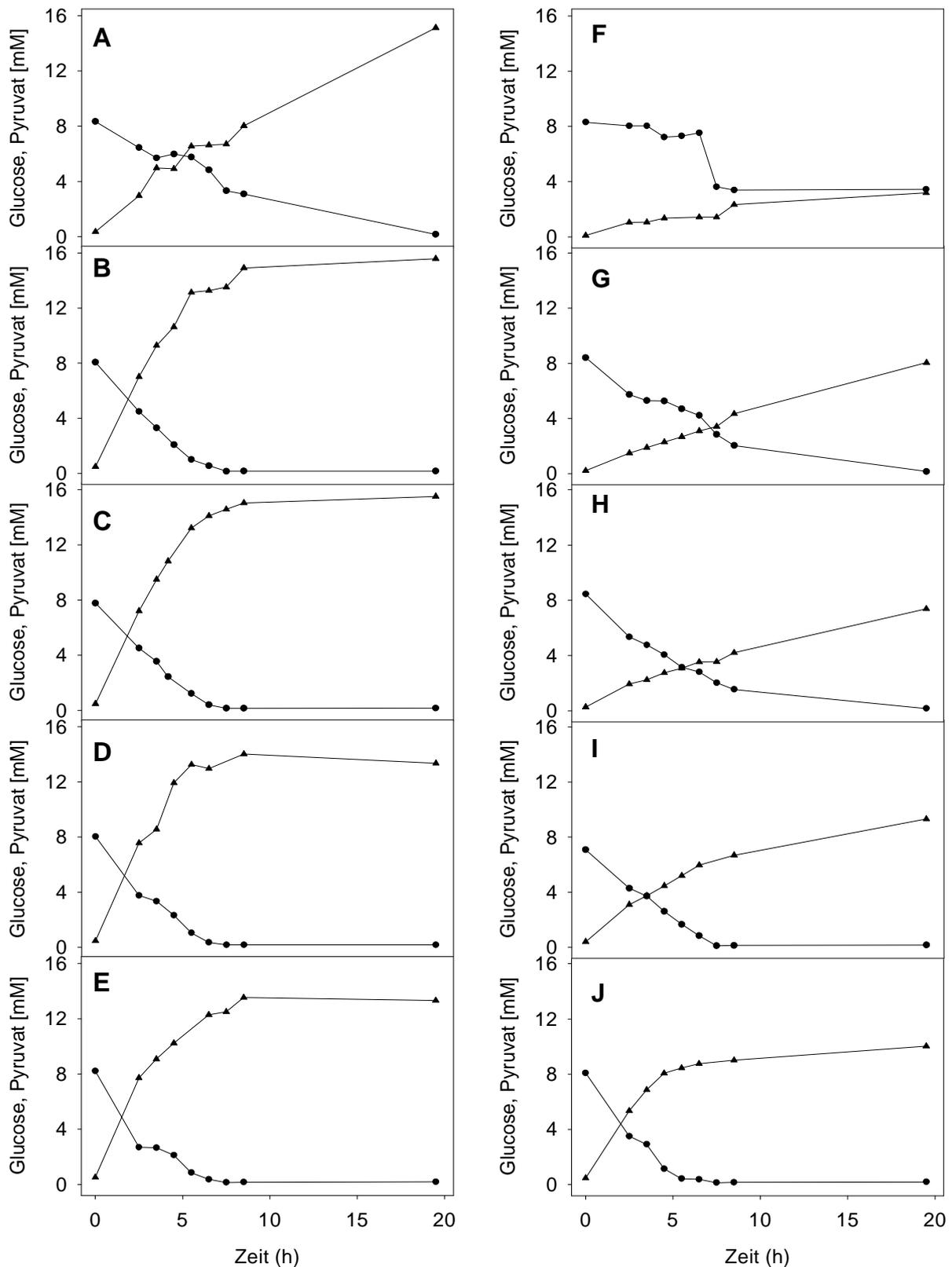


Abb. 20: Einfluss von 20 μM CCCP auf die Glucose-Umsetzung (●) und die Pyruvat-Produktion (▲) durch ruhende YYC202-Zellen in einem Puffergemisch (je 50 mM MES, MOPS, Tricine) bei pH 6 (F), 6,5 (G), 7 (H), 7,5 (I), 8 (J) mit 8 mM Glucose. Das CCCP wurde bereits zu Beginn der Inkubation zugesetzt. Den Kontrollen (pH 6 (A), 6,5 (B), 7 (C), 7,5 (D) und 8 (E)) wurde ein entsprechendes Volumen Ethanol (500 μl) zugesetzt. Die OD_{600} der Zellsuspension betrug jeweils ~ 1 .

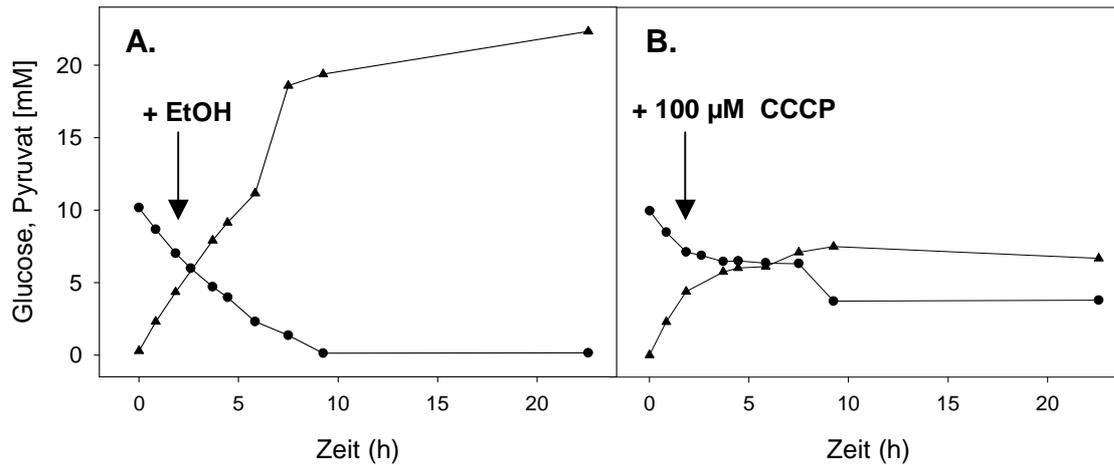


Abb. 21: Einfluss von 100 µM CCCP auf die Glucose-Umsetzung (●) und die Pyruvat-Produktion (▲) durch ruhende *YYC202ldhA*-Zellen in einem Puffergemisch (je 50 mM MES, MOPS, Tricine) bei pH 6 mit 10 mM Glucose. Nach 2 Stunden Inkubation bei 37°C und 140 U.p.m. wurde 100 µM CCCP (B.) bzw. ein entsprechendes Volumen Ethanol (A., 250 µl) zugesetzt. Die OD_{600} der Zellsuspension betrug jeweils 1,3.

6.2.4 Einfluss von Trichlordiphenylharnstoff auf den Pyruvat-Export

Die protonenmotorische Kraft setzt sich aus zwei Komponenten zusammen, der chemischen (ΔpH) und der elektrischen Potentialdifferenz ($\Delta \psi$). Ob der Pyruvat-Export nach dem Abbau des pH-Gradienten zum Erliegen kommt, wurde mit Trichlordiphenylharnstoff (TCC) überprüft. TCC ist ein Ionophor, das elektroneutral Anionen wie beispielsweise Chlorid gegen OH^- austauscht und dadurch spezifisch den ΔpH abbaut. Im Gegensatz zu Nigericin, welches ebenfalls den ΔpH abbaut, brauchen die Zellen nicht mit EDTA behandelt werden (Ahmed & Booth, 1983). Es konnte gezeigt werden, dass eine Konzentration von 200 µM TCC den ΔpH von *E. coli* fast vollständig abbaut (Ahmed & Booth, 1983). *YYC202ldhA*-Zellsuspensionen mit einer OD_{600} von 2,7 (0,5 M MOPS, 100 mM KCl, pH 7 mit ~100 mM Glucose) wurde nach 4 Stunden Inkubation bei 37°C und 140 U.p.m. 200 µM TCC zugesetzt. Der Kontrolle wurde ein entsprechendes Volumen Ethanol (85 µl) zugesetzt, da TCC in Ethanol gelöst war. Die spezifische Glucose-Verbrauchsrate betrug sowohl vor als auch nach TCC- bzw. Ethanol-Zugabe $\sim 0,33 \mu\text{mol Glucose min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$. Die Pyruvat-Bildungsrate sank nach TCC-Zugabe um 20 % ($0,5$ bzw. $0,4 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$), die Pyruvat-Ausbeute blieb jedoch im Vergleich zur Kontrolle unverändert ($1,45 \text{ Mol Pyruvat/Mol Glucose}$). Ein Wiederholungsexperiment ergab vergleichbare Resultate. Da man nicht ausschließen kann, dass es unter den genannten Bedingungen, d.h. pH 7, gar keinen ΔpH gibt, kann aufgrund

dieser Daten keine Schlussfolgerung bezüglich der Δ pH-Abhängigkeit des Pyruvat-Exports gemacht werden.

6.3 Auswirkung einer *acrAB*-Mutation auf die Pyruvat-Produktion

Um zu untersuchen, ob Pyruvat durch das Multidrug-Efflux-System AcrAB-TolC transportiert wird, wurde eine *acrAB* Mutation mittels P1vir Transduktion (Silhavy *et al.*, 1984) im Pyruvat-Produzenten YYC202 eingeführt. Als Donor wurde dabei *E. coli* JZM120 (Ma *et al.*, 1995) verwendet. In diesem Stamm ist der größte Bereich von *acrAB* deletiert und durch das Kan^R-Gen aus dem Transposon Tn903 ersetzt worden. Der Austausch der Wildtyp-Gene *acrAB* in YYC202 gegen Δ *acrAB*::Kan wurde mittels PCR überprüft (Abb. 22). Mit den Primern *acrAB*-for2 und *acrAB*-rev2 (Tab. 3) und chromosomaler DNA von *E. coli* YYC202 wurde wie erwartet ein 3,3 kb großes Fragment amplifiziert (Abb. 22, Spur 1), mit chromosomaler DNA von YYC202 Δ *acrAB*::Kan dagegen ein 1,7-kb-Fragment (Abb. 22, Spur 2). Damit wurde die erfolgreiche Transduktion bestätigt.

Versuche zur Pyruvat-Produktion mit wachsenden Kulturen der Stämme YYC202, YYC202*ldhA* und YYC202 Δ *acrAB*::kan ergaben, dass YYC202 Δ *acrAB*::kan keine veränderte Pyruvat-Produktion aufwies. Die Ausbeuten lagen für YYC202 bei 1,7, für YYC202*ldhA* bei 1,9 sowie für YYC202 Δ *acrAB*::kan bei 1,8 Mol Pyruvat/Mol Glucose. Demnach wird der Transport von Pyruvat nicht durch das Multidrug-Efflux-System AcrAB-TolC vermittelt.

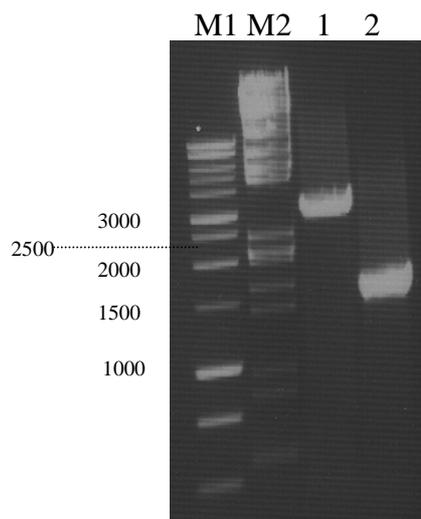


Abb. 22: 1 %-iges Agarosegel zur Überprüfung der *acrAB* Mutation. Es wurden folgende Proben aufgetragen: 1-kb-DNA-Standard von Promega (Spur M1), (II + III)-Standard von Roche (Spur M2), *acrAB*-PCR-Produkt des Ausgangstammes YYC202 (Spur 1) und *acrAB*::Kan-PCR-Produkt von YYC202 Δ *acrAB*::Kan (Spur 2). Als Primer wurden jeweils *acrAB*-for2 und *acrAB*-rev2 verwendet (siehe Tab. 3).

6.4 Suche nach dem Gen für den Pyruvat-Importer

Wie bei den Experimenten zur Untersuchung des Einflusses der Pyruvat-Konzentration auf das Wachstum von MG1655 beschrieben wurde, ist eine Ursache für die bei Fermentationsexperimenten beschriebene Produktionsgrenze von circa 700 mM Pyruvat sowohl durch osmotischen als auch durch einen pyruvatspezifischen Stress bedingt. Eine weitere Ursache für diese Produktionsgrenze kann sein, dass exportiertes Pyruvat wieder in die Zelle transportiert wird. Wie bereits beschrieben, wurde der Pyruvat-Importer in *E. coli* bisher jedoch nur biochemisch charakterisiert (Lang *et al.*, 1987). Einen eventuell vorhandenen "futile cycle" könnte man durch die Deletion eines bisher nicht identifizierten Gens für einen Pyruvat-Importer unterbinden und dadurch eventuell die Pyruvat-Produktion erhöhen. Die Identifizierung des entsprechenden Gens sollte durch Selektion von Transposon-Mutanten erfolgen, die in Gegenwart von Bromopyruvat oder Fluoropyruvat wachsen können. Beide Substanzen wirken in geeigneten Konzentrationen toxisch, z.B. durch Hemmung des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes (Flournoy & Frey, 1989; Lowe & Perham, 1984). Bei der Analyse des Pyruvat-Imports war gezeigt worden, dass Bromopyruvat und Fluoropyruvat den Pyruvat-Transport inhibieren. Das deutet darauf hin, dass der Transporter auch Bromopyruvat und Fluoropyruvat als Substrate erkennt. Wenn das entsprechende Transportergen durch ein Transposon inaktiviert würde, sollte dies zu einer Resistenz gegenüber Bromopyruvat und Fluoropyruvat führen, vorausgesetzt, es gibt tatsächlich nur ein Transportsystem für diese Verbindungen. Mit Hilfe dieses Selektionssystem konnte vor kurzem auch das JEN1-Gen für den Pyruvat-Transporter von *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert werden (Akita *et al.*, 2000).

Zunächst wurden Wachstumsversuche mit *E. coli* MG1655 in Flüssigkultur mit Glucose-Minimalmedium und unterschiedlichen Konzentrationen von Fluoropyruvat durchgeführt. Das Wachstum von MG1655 war bei Zusatz von 4 mM Fluoropyruvat halbmaximal (Abb. 23). Bei Zusatz von 100 mM war kein Wachstum mehr zu beobachten. Auf Glucose-Minimalmedium-Platten war das Wachstum mit 50 mM Fluoropyruvat leicht inhibiert, mit 100 mM vollständig. Im Fall von Bromopyruvat war das Wachstum in Glucose-Minimalmedium bereits bei 0,4 mM zu 50 % gehemmt und bei 10 mM gab es kein Wachstum mehr (Abb. 23). Auf Glucose-Minimalmedium-Platten mit 0, 0,5, 1, 5, 10 bzw. 20 mM Bromopyruvat war ab einer Konzentration von 5 mM kein Wachstum mehr zu beobachten.

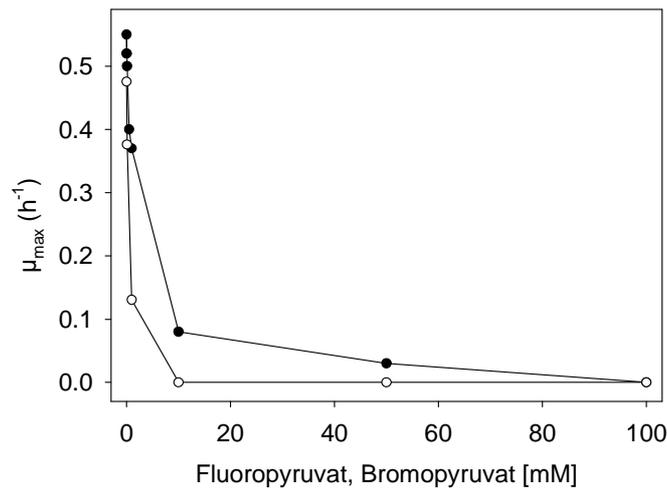


Abb. 23: Vergleich der maximalen Wachstumsraten (μ_{max}) von *E. coli* MG1655 bei Wachstum auf Glucose-Minimalmedium mit verschiedenen Konzentrationen Fluoropyruvat (●) bzw. Bromopyruvat (○).

Zur Transposon-Mutagenese wurde das Plasmid pKNG101-Tn5 konstruiert, das ein Tn5-tragendes 8,0-kb-*ApaI*-Fragment aus pRJ3405 im Vektor pKNG101 trägt. Dieser Vektor kann in *E. coli* nicht replizieren, außer in eigens dafür konstruierten Stämmen, die das Pir-Protein bilden. Das Plasmid pKNG101-Tn5 wurde mittels Elektroporation in *E. coli* MG1655 transferiert und die transformierten Zellen auf LB-Platten mit Kanamycin (15 μ g/ml) selektioniert. Die so erhaltenen ~26000 Transposon-Mutanten wurden auf Minimalmedium-Platten mit 50 mM Glucose, 5 mM Bromopyruvat und 15 μ g/ml Kanamycin überimpft, jedoch konnte keine einzige Mutante unter diesen Bedingungen wachsen. *E. coli* hat 4400 Gene, die ~26000 getesteten Kolonien entsprachen somit ungefähr einer sechsfachen Abdeckung. Unter der Voraussetzung, dass die Transposon-Insertionen ungerichtet waren, sollte jedes Gen mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,9 % getroffen worden sein. Eine mögliche, wenn auch eher unwahrscheinliche Erklärung für das Nicht-Wachstum aller Transposon-Mutanten könnte sein, dass das gesuchte Pyruvat-Importer-Gen unter den getesteten Bedingungen essentiell ist. Andererseits könnten auch die experimentellen Bedingungen allein Ursache für das negative Ergebnis sein. Um die zur vollständigen Wachstumshemmung notwendige Bromopyruvat-Hemmkonzentration genauer zu bestimmen, wurde das Wachstum von MG1655 auf Glucose-Minimalmedium-Platten mit 0, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 1,25, 1,6, 2, 2,5 sowie 4 mM Bromopyruvat überprüft. Dabei zeigte sich, dass bereits eine Konzentration von 2 mM für eine vollständige Inhibierung des Wachstums ausreichend war.

Es wurden weitere Transposon-Mutagenesen durchgeführt, bei denen die Selektion direkt auf LB-Platten mit 15 μ g/ml Kanamycin und 2 mM oder 3 mM Bromopyruvat erfolgte oder

auf LB-Platten mit 15 µg/ml Kanamycin und 80 mM Fluoropyruvat (hemmt das Wachstum von MG1655 vollständig). Dabei konnten ~150 bzw. ~1000 Klone erhalten werden, was zeigt, dass die Selektion prinzipiell möglich ist. Die erhaltenen Klone wurden auf Glucose-Minimalmedium-Platten (50 mM Glucose) mit 15 µg/ml Kanamycin ausgestrichen. Die Klone, die auf LB mit Bromopyruvat wuchsen, zeigten wiederum kein Wachstum auf Glucose-Minimalmedium. Von den ~400 getesteten Klonen, die auf LB mit Fluoropyruvat selektioniert worden waren, wuchsen etwa 90 % auf Glucose-Minimalmedium mit Kanamycin. Diese Klone wurden anschließend auf Pyruvat-Minimalmedium (50 mM) überimpft. Klone, die nicht auf Pyruvat-Minimalmedium, aber auf Glucose-Minimalmedium sowie auf LB-Medium mit Fluoropyruvat wachsen, könnten einen Defekt im Pyruvat-Import haben. Es zeigte sich, dass 8 Klone einen deutlichen Wachstumsdefekt auf Pyruvat-Minimalmedium-Platten hatten. Bei den so erhaltenen Klonen wurde untersucht, ob sie Pyruvat verstoffwechseln können. Es zeigte sich allerdings, dass alle Klone in einem Glucose-Minimalmedium mit Pyruvat beide Substanzen umsetzen konnten und damit auch in der Lage waren, Pyruvat aufzunehmen. Da die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden kann, dass der Pyruvat-Transporter speziell bei Wachstum auf Glucose essentiell ist, sollte bei weiteren Experimenten vielleicht eine Selektionierung auf Lactat-Minimalmedium-Platten erfolgen.

7 Vergleichende Transkriptom-Analyse durch DNA-Chips

Durch Transkriptomanalysen mit DNA-Microarrays sollte untersucht werden, welchen spezifischen Einfluss die Pyruvat-Produktion auf die genomweite Genexpression in *E. coli* YYC202 besitzt, welche Unterschiede es in der Genexpression von YYC202 und dem Wildtyp MG1655 gibt (stamm- und pyruvatspezifische Unterschiede) und welche Unterschiede es in der Genexpression eines modifizierten YYC202-Stammes, der nicht mehr Pyruvat produziert, und MG1655 gibt (stammsspezifische Unterschiede). Im Anhang ist eine Zusammenstellung aller mRNA-Level von Genen, die in einem dieser Experimente einen veränderten mRNA-Level aufwiesen, enthalten. Diese Liste wurde mit den relativen mRNA-Leveln der anderen Experimenten ergänzt (Tab. 24). Darüber hinaus wurde analysiert, welchen Einfluss ein Pyruvat-Puls auf die Genexpression von MG1655 hat.

Für den Vergleich genomweiter Genexpressionsmuster wurden fluoreszenzmarkierte cDNA-Sonden der zu vergleichenden RNA-Proben synthetisiert (Wendisch *et al.*, 2001). Dabei wurde eine Probe mit einem grünen Fluoreszenzfarbstoff (Cy3), die andere Probe mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff (Cy5) markiert. Zur Bestimmung relativer mRNA-Spiegel

wurden die beiden fluoreszenzmarkierten cDNA-Sonden mit DNA-Chips hybridisiert, die PCR-Produkte von circa 96 % aller 4290 ORF's von *E. coli* MG1655 trugen.

7.1 Vergleich der Genexpression von *E. coli* YYC202-pBR322 (*aceEF*⁻) und *E. coli* YYC202-pGS87 (*aceEF*⁺) bei Wachstum in Glucose-Minimalmedium mit Acetat

Um den spezifischen Einfluss der Pyruvat-Produktion auf die Genexpression von *E. coli* YYC202 zu untersuchen, wurden die mRNA-Menge aller Gene der Stämme YYC202-pBR322 und YYC202-pGS87 durch Transkriptom-Analyse mit DNA-Microarrays miteinander verglichen. Das Plasmid pGS87 (Abb. 24), das freundlicherweise von J. R. Guest (University of Sheffield) zur Verfügung gestellt wurde, ist ein Derivat von pBR322 und enthält auf einem ~10,2 kb *Hind*III-*Sal*I-Insert die *E. coli*-Gene *aceEF* und *lpdA* für die drei Untereinheiten des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes (Spencer & Guest, 1985). Aufgrund der Expression dieser Gene war der Stamm YYC202-pGS87 nicht mehr acetatauxotroph (Abb. 25) und bildete nachweislich auch kein Pyruvat mehr (Abb. 26). Außerdem enthält das Insert auch das *yacH*-Gen, dessen Funktion unbekannt ist und Teile der Gene für die Aconitase (*acnB*) und des Pyruvat-Dehydrogenase-Repressors (*pdhR*). Um Effekte des Vektors bei dem Stammvergleich auszuschließen, wurde als Referenz nicht YYC202, sondern YYC202-pBR322 verwendet, der erwartungsgemäß acetatauxotroph war (Abb. 25) und Pyruvat bildete (Abb. 26).

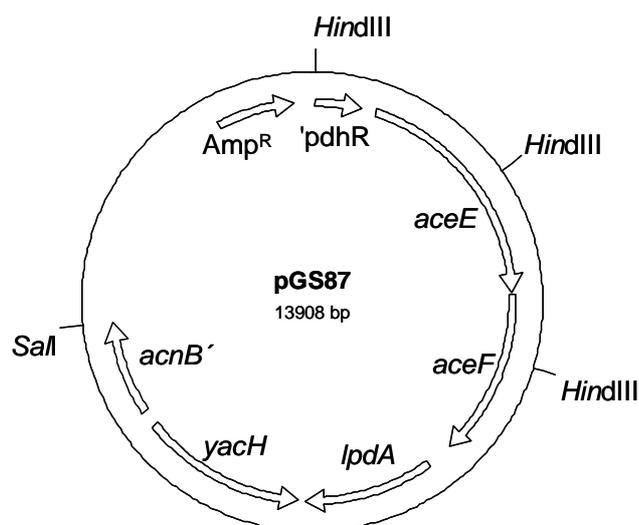


Abb. 24: Plasmid pGS87, ein Derivat von Plasmid pBR322 (Bolivar *et al.*, 1977) mit einem ~10,2-kb-*Hind*III-*Sal*I-Fragment mit den *E. coli*-Genen *aceEF*, *lpdA*, *yacH* sowie Teilen der Gene *acnB* und *pdhR* (Spencer & Guest, 1985).

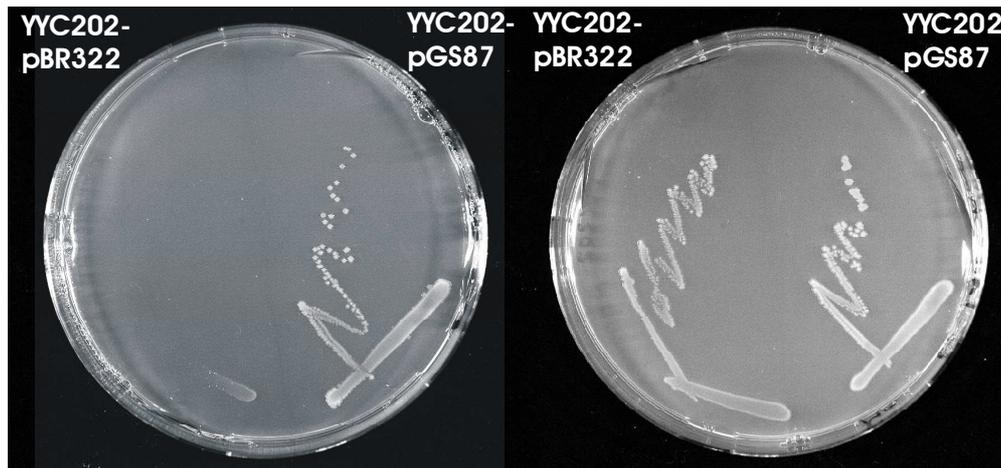


Abb. 25: Wachstum von YYC202-pGS87 und YYC202-pBR322 auf Minimalmedium mit 10 mM Glucose (links) bzw. auf Minimalmedium mit 10 mM Glucose und 2 mM Acetat (rechts).

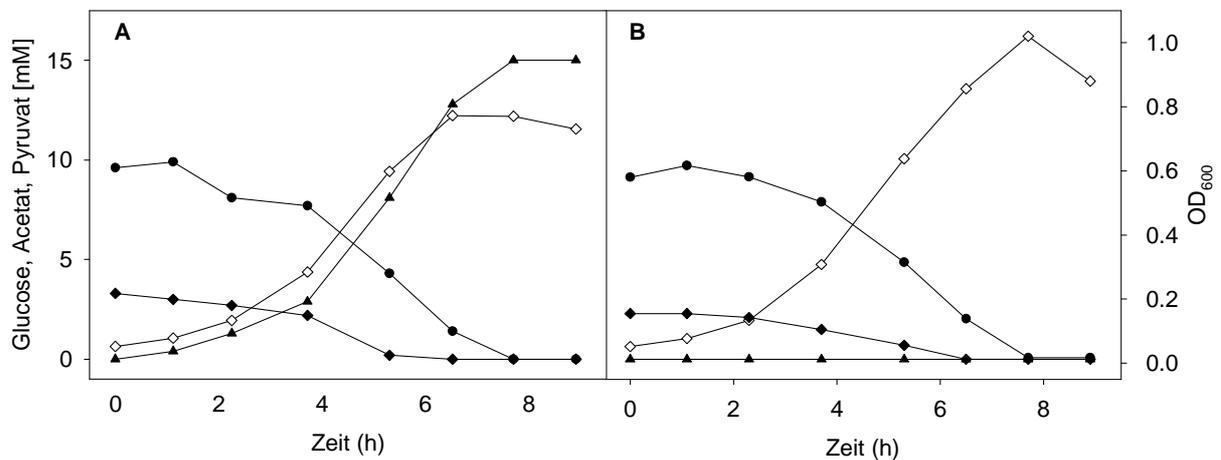


Abb. 26: Wachstum (◇), Glucose- (●) und Acetat-Umsetzung (◆) sowie Pyruvat-Bildung (▲) bei Kultivierung von YYC202-pBR322 (A) bzw. YYC202-pGS87 (B) in M9-Minimalmedium mit ~10 mM Glucose und ~2 mM Acetat. Die Pyruvat-Ausbeute von YYC202-pBR322 betrug ~1,6 Mol Pyruvat/Mol Glucose. YYC202-pGS87 bildete kein Pyruvat.

Die Stämme wurden in M9-Minimalmedium mit 10 mM Glucose und 2 mM Acetat kultiviert. Unter diesen Bedingungen produziert YYC202-pBR322 Pyruvat, nicht aber YYC202-pGS87. Die Kultivierung erfolgte über vier Tage (~200 Generationen) durch fünfmaliges Überimpfen, um eine Adaptation an das entsprechende Medium zu gewährleisten. Die Kulturen zur Isolierung von RNA wurden bei einer OD_{600} zwischen 0,2 und 0,4 in der exponentiellen Phase geerntet. Die Zellen hatten eine durchschnittliche Wachstumsrate von $0,47 \text{ h}^{-1}$ (YYC202-pBR322) bzw. $0,50 \text{ h}^{-1}$ (YYC202-pGS87). Die Auswertung der DNA-Chips ergab, dass 27 Gene in YYC202-pBR322 eine >3-fach erhöhte mRNA-Menge gegenüber YYC202-pGS87 besaßen und 24 Gene eine >3-fach reduzierte mRNA-Menge (Tab. 14).

Die Gen-Gruppe mit erniedrigtem RNA-Spiegel im YYC202-pBR322 beinhaltet erwartungsgemäß die auf pGS87 lokalisierten Gene, d.h. *aceE*, *aceF* und *lpdA* sowie ein putatives Transportprotein (YdgR) und ein hypothetisches Protein (YkfE). Weiterhin enthielt diese Gruppe 19 Gene, die an der Flagellenbiosynthese und der Chemotaxis von *E. coli* beteiligt sind. Diese Gene sind in mehreren Operons organisiert, die auf 4 Regionen im Genom verteilt sind: *flgAMN*, *flgBCDEFGHIJK*, *tar-tap-cheRBYZ*, *fliFGHIJK*, *fliLMNOQR*, *flhDC*, *flhAB* und *motAB-cheAW*. Um zu zeigen, dass fast alle diese Gene eine reduzierte mRNA-Menge aufwiesen, wurden die mRNA-Level dieser Gene in Tab. 15 zusammengestellt. Hier sind auch mRNA-Level, von Genen die einen p-Wert >0,05 aufwiesen oder nur einmal gemessen wurden, aufgeführt.

In der Gengruppe mit erhöhtem RNA-Level in YYC202-pBR322 waren insbesondere eine Reihe von Genen auffällig, deren Expression in *E. coli* bekanntermaßen als Antwort auf Säurestress induziert werden, nämlich *gadA*, *gadB*, *hdeA*, *hdeB* und *yhiE* (Masuda & Church, 2002; Tucker *et al.*, 2002). Die Gene *gadA* und *gadB* kodieren für zwei Glutamat-Decarboxylase-Isoenzyme, die Glutamat zu γ -Aminobutyrat decarboxylieren. Dabei wird ein Proton verbraucht, was der Ansäuerung des Cytoplasmas entgegenwirkt. Die Gene *hdeA* und *hdeB* kodieren für zwei kleine (ca. 12 kDa) periplasmatische Proteine, die wahrscheinlich eine ähnliche Struktur besitzen. Für HdeA wurde gezeigt, dass es bei saurem pH von der Dimer- in die Monomer-Form übergeht. Es wird postuliert, dass HdeA als Chaperon an säure-denaturierte Proteine bindet und dadurch ihre irreversible Aggregation verhindert, so dass sie bei neutralem pH wieder in die native Form zurückfalten können. Auch für *yhiE* wurde kürzlich beschrieben, dass es in die Säurestressantwort involviert ist. Mutationen von *yhiE* führen zu einer reduzierten Säure-Resistenz. Die Überproduktion von *yhiE* führt zu einer signifikant erhöhten Säure-Resistenz. Tucker *et al.* (2002) postulieren deswegen, dass *yhiE* einen Aktivator der Glutamat-abhängigen Säure-Resistenz kodieren könnte. Zum Zeitpunkt der RNA-Isolierung lag der pH-Wert der Kulturen bei pH 7, so dass die verstärkte Expression des Säurestress-Gene wohl durch eine Ansäuerung des Cytoplasmas induziert wird, bedingt dadurch, dass bei der Umsetzung von Glucose zu zwei Pyruvat auch zwei Protonen entstehen. Neben den Säurestress-Genen zeigten noch zwei weitere Stress-Gene in YYC202-pBR322 einen erhöhten RNA-Level, die für das Chaperon GroEL und die Protein-Methioninsulfoxid-Reduktase kodieren. Eine zweite Gruppe von Genen mit erhöhtem RNA-Level beinhaltet Gene, die für Stoffwechsellzyme kodieren, nämlich eine putative 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase (YfeY), eine Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase (GabD), die Transketolase B (TktB) sowie eine putative Ornithin-Aminotransferase (YgjG). GabD könnte als Folge der Bildung

von γ -Aminobutyrat durch die Glutamat-Decarboxylasen A und B induziert werden. Allerdings wurde kein erhöhter RNA-Level von *gabT* gemessen, das für die γ -Aminobutyrat-Aminotransferase kodiert, die γ -Aminobutyrat und α -Ketoglutarat zu Succinat-Semialdehyd und Glutamat umsetzt. Das *gabT*-Gen liegt unmittelbar unterhalb von *gabD*. Die erhöhte Expression von *tktB* könnte für eine erhöhte Aktivität des Pentosephosphat-Wegs sprechen, allerdings zeigten auch in diesem Fall die anderen Gene dieses Wegs keine erhöhten RNA-Level. Eine dritte Gruppe von Genen mit erhöhtem RNA-Level im Pyruvat-Produzenten YYC202-pBR322 kodierte für Transkriptionsregulatoren bzw. Signaltransduktionsproteine, nämlich AppY, die Sensor kinase BasS, MprA, sowie das bei den Säurestress-Genen bereits beschriebene YhiE-Protein. AppY induziert u.a. die Expression der Gene für eine saure Phosphatase sowie für eine putative terminale Oxidase vom Cytochrom-*bd*-Typ, allerdings zeigten diese Gene keinen erhöhten RNA-Level. MprA fungiert als Repressor der *emrAB*-Gene, kodierend für einen Multidrug-Exporter, die allerdings keinen erniedrigten RNA-Level zeigten. Die Funktion des Zweikomponenten-Systems, bestehend aus der Sensor kinase BasS und BasR, ist bisher noch nicht im Detail bekannt. Eine fünfte Gruppe von Genen (*artM*, *mtlA*, *ybgH* und *sstT*) mit erhöhtem RNA-Level in YYC202-pBR322 kodierte für Transporter. Da nur dieser Stamm Pyruvat bildete, nicht aber der Vergleichsstamm YYC202-pGS87, könnten darunter Gene für den Pyruvat-Importer und/oder einen hypothetischen Pyruvat-Exporter sein. SstT wurde vor kurzem als Na⁺/Serin-Symporter identifiziert (Kim *et al.*, 2002; Ogawa *et al.*, 1998). YbgH zeigt Ähnlichkeit zu Transportproteinen aus der H⁺-abhängigen Oligopeptid-Transporter-Familie (POT- oder PTR-Familie, TC 2.A.17), insbesondere zu DtpT aus *Lactobacillus helveticus* (Nakajima *et al.*, 1997). Obwohl aufgrund dieser Daten anscheinend weder SstT noch YbgH am Pyruvat-Transport beteiligt sind, wäre es doch sinnvoll, die entsprechenden Gene in YYC202 zu deletieren und den Einfluss auf die Pyruvat-Bildung zu testen.

Tab. 14 (nächste Seite): Gene, deren mRNA-Level von *E. coli* YYC202-pBR322 (Y-pBR322) im Vergleich zu YYC202-pGS87 (Y-pGS87) mindestens 2,5-fach erhöht bzw. erniedrigt waren. Die RNA wurde aus exponentiell wachsenden Zellen isoliert, die in Minimalmedium (10 mM Glucose, 2 mM Acetat) kultiviert wurden. Die Daten stellen die Mittelwerte aus Mehrfach-Bestimmungen dar, wobei jeweils von separaten Kulturen ausgegangen wurde. Spalte n gibt die Anzahl der Experimente an. DH = Dehydrogenase

B	Gen	Funktion	mRNA-Level (Y-pBR322/Y-pGS87)	n	p- Wert
Stressantwort					
b1493	<i>gadB</i>	Glutamat-Decarboxylase A (L-Glutamat ⁻ + H ⁺ → γ -Aminobutyrat + CO ₂)	9,21 ± 2,70	2	0,027
b3509	<i>hdeB</i>	möglicherweise ähnliche Funktion wie HdeA; liegt im <i>hdeAB</i> -Operon	5,22 ± 0,73	4	0,007
b3510	<i>hdeA</i>	Chaperon für säuredenaturierte Proteine	7,39 ± 1,31	3	0,000
b3517	<i>gadA</i>	Glutamat-Decarboxylase A (L-Glutamat ⁻ + H ⁺ → γ -Aminobutyrat + CO ₂)	6,15 ± 0,03	2	0,000
b4143	<i>groEL</i>	Chaperon, das unter Stressbedingungen die Fehlfaltung von Proteinen verhindert und die Rückfaltung von entfaltenen Proteinen katalysiert	3,95 ± 0,01	2	0,000
b4219	<i>msrA</i>	Protein-Methionin-Sulfoxid-Reduktase (Protein-L-Methioninsulfoxid + reduziertes Thioredoxin → Protein-L-Methionin + oxid. Thioredoxin); Reparatur-Enzym für durch Oxidation inaktivierte Proteine	3,99 ± 0,11	2	0,000
Stoffwechsellenzyme					
b0219	<i>yafV</i>	putatives Enzym, enthält eine Hydrolase-Domäne	3,61 ± 0,68	2	0,025
b0489	<i>ybbK</i>	putative Protease	3,36 ± 0,41	2	0,011
b0897	<i>ycaC</i>	Hydrolase mit unbekannter Spezifität	3,81 ± 0,14	2	0,000
b2342	<i>yfcY</i>	putative 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase (Acyl-CoA + Acetyl-CoA ↔ CoA + 3-Ketoacyl-CoA)	6,01 ± 1,43	2	0,025
b2465	<i>tktB</i>	Transketolase B (Sedoheptulose-7-P + GAP ↔ Ribose-5-P + Xylulose-5-P); Enzym des Pentosephosphat-Wegs	5,63 ± 0,53	2	0,003
b2661	<i>gabD</i>	Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase (Succinat-Semialdehyd + NAD(P) ⁺ + H ₂ O → Succinat + NAD(P)H)	5,45 ± 1,61	2	0,036

B	Gen	Funktion	mRNA-Level (Y-pBR322/Y-pGS87)	n	p- Wert
b3073	<i>ygjG</i>	putative Ornithin-Aminotransferase (L-Ornithin + 2-Ketosäure → L-Glutamat-5-semialdehyd + L-Aminosäure)	5,84 ± 1,53	2	0,030
b3830	<i>ysgA</i>	putative Dienlacton-Hydrolase	3,93 ± 0,85	2	0,029
b0114	<i>aceE</i>	Pyruvat-DH (1. UE)	0,05 ± 0,01	2	0,016
b0115	<i>aceF</i>	Pyruvat-DH (2. UE)	0,10 ± 0,10	4	0,006
b0116	<i>lpdA</i>	Pyruvat-DH (3. UE)	0,05 ± 0,01	4	0,000
Transkriptionsregulatoren und Signaltransduktionsproteine					
b0564	<i>appY</i>	Transkriptionsregulator; induziert <i>appA</i> (saure Phosphatase), <i>appBC</i> (Cytochrom- <i>bd</i> -Oxidase-II) u.a. Gene, fungiert auch als Repressor von Genen	3,54 ± 0,26	2	0,001
b2684	<i>mprA</i>	Negativer Transkriptions-Regulator der Multidrug-Resistenz-Gene <i>emrAB</i>	3,61 ± 0,64	2	0,023
b3512	<i>yhiE</i>	putativer Aktivator der Glutamat-abhängigen Säure-Resistenz	5,51 ± 2,90	3	0,014
b4112	<i>basS</i>	Sensorkinase zu <i>basR</i> ; liegt in einem Operon mit <i>basSR</i>	7,12 ± 2,36	2	0,036
Transport-Proteine					
b0709	<i>ybgH</i>	putatives Transportprotein aus der H ⁺ -abhängigen Oligopeptid-Transporter-Familie (POT- oder PTR-Familie, TC 2.A.17)	12,63 ± 6,04	2	0,043
b0861	<i>artM</i>	Membranprotein eines ABC-Transporters für Arginin	6,16 ± 1,77	2	0,032
b3089	<i>sstT</i>	Na ⁺ -Serin-Symporter (<i>ygjU</i>) (Dicarboxylat/Aminosäure:Kation (Na ⁺ oder H ⁺)-Symporter-Familie (DAACS, TC 2.A.23)	7,92 ± 2,32	2	0,029
b3599	<i>mtlA</i>	Mannitol-spezifisches PTS-System; liegt im <i>mtlADR</i> -Operon	4,82 ± 0,53	2	0,006
b1634	<i>ydgR</i>	putatives Transportprotein	0,28 ± 0,02	2	0,000

B	Gen	Funktion	mRNA-Level (Y-pBR322/Y-pGS87)	n	p- Wert
Sonstige					
b3990	<i>thiH</i>	Thiamin-Biosynthese; liegt im <i>thiCEFGH</i> -Operon	3,33 ± 0,46	2	0,016
b2335	<i>yfcR</i>	putatives Fimbrien-Protein (enthält Signalpeptid)	17,99 ± 2,11	2	0,003
b0006	<i>yaaA</i>	ORF	5,93 ± 0,63	2	0,004
b2660	<i>ygaF</i>	ORF	3,52 ± 0,59	2	0,021
b4378	<i>yjjV</i>	ORF	4,46 ± 0,96	2	0,027

Tab. 15 (nächste Seite): mRNA-Verhältnis YYC202-pBR322/YYC202-pGS87 von Genen, die in der Flagellensynthese und Chemotaxis von *E. coli* involviert sind. Die RNA wurde aus exponentiell wachsenden Zellen isoliert, die in Minimalmedium (10 mM Glucose, 2 mM Acetat) kultiviert wurden. Die Daten stellen die Mittelwerte aus Mehrfach-Bestimmungen dar, wobei jeweils von separaten Kulturen ausgegangen wurde. Die Gene wurden nach den Regionen auf dem *E. coli*-Genom geordnet. mRNA-Level, die einen p-Wert >0,05 hatten oder nur einmal gemessen wurden, sind fett hervorgehoben. n.b. = nicht bestimmbar, p = p-Wert

A	Region I			Region II			Region IIIa			Region IIIb		
	Gen	mRNA-Level	p									
	<i>flgA</i>	0,50 ± 0,13	0,03	<i>flhA</i>	0,76 ± 0,09	0,10	<i>fliS</i>	0,22 ± 0,28	0,19	<i>fliF</i>	0,38 ± 0,27	0,09
	<i>flgB</i>	0,25 ± 0,21	0,12	<i>flhB</i>	0,42 ± 0,24	0,04	<i>fliT</i>	0,42 ± 0,24	0,14	<i>fliG</i>	0,48 ± 0,26	0,08
	<i>flgC</i>	0,29 ± 0,07	0,00	<i>flhC</i>	0,87 ± 0,22	0,23	<i>fliY</i>	0,94 ± 0,20	0,36	<i>fliH</i>	0,40 ± 0,16	0,00
	<i>flgD</i>	0,29 ± 0,10	0,00	<i>flhD</i>	0,81 ± 0,29	0,23	<i>fliZ</i>	0,40 ± 0,07	0,04	<i>fliI</i>	0,63 ± 0,12	0,03
	<i>flgE</i>	0,27 ± 0,17	0,01	<i>cheA</i>	0,43	n.b.	<i>fliA</i>	0,17	n.b.	<i>fliJ</i>	0,48 ± 0,08	0,01
	<i>flgF</i>	0,30 ± 0,16	0,00	<i>cheR</i>	0,66 ± ,23	0,08	<i>fliC</i>	0,51 ± 0,83	0,03	<i>fliK</i>	0,41 ± 0,10	0,00
	<i>flgH</i>	0,39 ± 0,11	0,00	<i>cheW</i>	0,23	n.b.	<i>fliD</i>	0,28 ± 0,13	0,08	<i>fliL</i>	0,36 ± 0,10	0,01
	<i>flgI</i>	0,34 ± 0,28	0,16	<i>cheY</i>	0,60	n.b.				<i>fliM</i>	0,46 ± 0,45	0,22
	<i>flgJ</i>	0,45 ± 0,22	0,01	<i>tap</i>	0,41 ± 0,06	0,00				<i>fliO</i>	0,45	n.b.
	<i>flgK</i>	0,48 ± 0,27	0,02	<i>tar</i>	0,59 ± 0,54	0,16				<i>fliP</i>	0,71	n.b.
	<i>flgL</i>	0,46 ± 0,25	0,02	<i>motA</i>	0,46	n.b.				<i>fliR</i>	1,02	n.b.
	<i>flgM</i>	0,57 ± 0,05	0,01	<i>motB</i>	0,65 ± 0,28	0,11						

7.2 Vergleich des Transkriptoms von Pyruvat-Produzent (YYC202) und Wildtyp (MG1655) bei Wachstum in Glucose-Minimalmedium mit Acetat

In einer zweiten Serie von Transkriptomanalysen mit DNA-Chips wurde der Stamm YYC202 mit dem Wildtyp-Stamm MG1655 verglichen. Dabei sollten sowohl pyruvatspezifische als auch stamm-spezifische Unterschiede detektiert werden. Die Stämme wurden in M9-Minimalmedium mit 10 mM Glucose und 2 mM Acetat kultiviert. Unter diesen Bedingungen produziert YYC202 Pyruvat, nicht aber MG1655. Die Kultivierung erfolgte über vier Tage (~200 Generationen) durch fünfmaliges Überimpfen, um eine Adaptation an das entsprechende Medium zu gewährleisten. Die Hauptkultur zur Isolierung von RNA wurde in der exponentiellen Phase bei einer OD₆₀₀ zwischen 0,2 und 0,4 geerntet. Die Kulturen von YYC202 und MG1655 hatten beide eine durchschnittliche Wachstumsrate von 0,58 h⁻¹. Die Auswertung der 3 DNA-Chips ergab, dass in YYC202 20 Gene eine >2,5-fach erhöhte mRNA-Menge gegenüber MG1655 aufwiesen und 25 Gene eine >2,5-fach reduzierte mRNA-Menge (Tab. 16).

Die Gengruppe mit erniedrigtem RNA-Level in YYC202 enthielt wie erwartet *aceEF*, da diese beiden Gene in YYC202 deletiert sind ($0,45 \pm 0,17$ bzw. $0,15 \pm 0,00$). Daneben zeigten mehrere *gat*-Gene einen stark erniedrigten RNA-Level in YYC202, auch bei dem nachfolgend beschriebenen Stammvergleich YYC202-pGS87 vs. MG1655. Die Proteine, die durch die *gat*-Gene kodiert werden, sind für die Aufnahme (*via* PTS) und Verstoffwechslung von Galactitol, einem C6-Zuckeralkohol, verantwortlich. Möglicherweise fehlt das *gat*-Operon in YYC202. Dies könnte man durch eine Hybridisierung verdauter chromosomaler DNA von YYC202 mit dem MG1655-DNA-Chip analysieren. Ähnlich wie die *gat*-Gene zeigten auch die *pyrBIL*-Gene sowohl im Vergleich YYC202 vs. MG1655 als auch im Vergleich YYC202-pGS87 vs. MG1655 erniedrigte RNA-Level. Da die Aspartat-Carbamoyl-Transferase (PyrBI) aber an der Pyrimidin-Biosynthese beteiligt ist, erscheint es in diesem Fall unwahrscheinlich, dass die *pyrBI*-Gene auf dem Chromosom von YYC202 deletiert sind. Auffällig war auch die stark reduzierte Expression der Gene *aceA* (Isocitrat-Lyase) und *aceK* (Isocitrat-Dehydrogenase-Kinase/Phosphatase) in YYC202. Das promotor-proximale *aceB*-Gen (Malat-Synthase) des *aceBAK*-Operons war in keinem der Experimente auswertbar, da das Signal-zu-Rausch-Verhältnis für die Cy3- und die Cy5-Fluoreszenz in allen Experimenten kleiner als drei war. Daher wurden die Signale als zu schwach angenommen, um zuverlässig ausgewertet werden zu können. Da die Gene des *aceBAK*-Operons aus YYC202 amplifiziert werden konnten, deutet alles daraufhin, dass der Glyoxylatzyklus in YYC202 stark reduziert ist. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass auch das *glcB*-Gen einen reduzierten RNA-Level aufwies, das für die Malat-Synthase G kodiert, die durch Glycolat und Glyoxylat induziert wird und ebenso wie die durch *aceB* kodierte Malat-Synthase A die Umsetzung von Acetyl-CoA, Glyoxylat und H₂O zu L-Malat und CoA katalysiert.

Die Gen-Gruppe mit erhöhtem RNA-Level in YYC202 enthielt mehrere Gene (*flgCDEF*, *fliC*) aus der Flagellen-Biosynthese sowie mehrere Gene (mit unbekannter Funktion) des *yhfSTUVWXYZ*-Genclusters (YhfT könnte ein Transporter sein). Das *yliB*-Gen, das einen 2,7-fach erhöhten RNA-Level zeigte, ist Bestandteil des *ybiK-yliABCDEF*-Genclusters. Die *yliABCD*-Gene bilden ein Bindeprotein-abhängiges Transportsystem, wobei YliB das periplasmatische Bindeprotein darstellt. Das Gen *yliC* zeigte ebenfalls einen 2,7-fach erhöhten RNA-Level, wurde aber aufgrund seines p-Wertes von 0,06 als nicht signifikant verändert angesehen. Die Gene *ybiK* und *yliD* zeigten keine signifikant veränderten mRNA-Level. Das *yliA*-Gen war nicht auf dem DNA-Chip vorhanden.

Vom *appCBA*-Operon zeigten zwei Gene einen erhöhten RNA-Level, *appB* war nicht auswertbar. AppC und AppB sind die beiden Untereinheiten einer terminalen Oxidase vom

Cytochrom-*bd*-Typ, AppA ist ein periplasmatische saure Phosphatase. Interessanterweise wird das *appCBA*-Operon durch AppY induziert, welches beim Vergleich YYC202-pBR322 vs. YYC202-pGS87 einen erhöhten RNA-Level im Pyruvat-Produzenten zeigte. Bei letzterem waren die *appCBA*-Gene aber nicht signifikant verändert, ebenso wenig wie in diesem Experiment die *appY*-mRNA-Menge. Das *ndh*-Gen kodiert für die NADH-Dehydrogenase II und zusammen mit der verstärkten Bildung von AppBC spricht dies für eine erhöhte Aktivität der Atmungskette. Die erhöhte Expression des *udp*-Gens, kodierend für die Uridin-Phosphorylase, spricht für einen verstärkten Abbau von Pyrimidinnukleosiden, eine Annahme, die mit dem reduzierten RNA-Level der Pyrimidin-Biosynthese-Gene *pyrBI* korrelieren würde. Das *ycdZ*-Gen (4,3-fach erhöhter RNA-Level) kodiert für ein Membranprotein, bei dem es sich um einen Ionen-Kanal handeln könnte.

Tab. 16: Gene, für die ein erhöhtes (> 2,5) bzw. verringertes (< 0,4) mRNA-Verhältnis im Pyruvat-Produzent *E. coli* YYC202 im Vergleich zum Wildtyp MG1655 bei Kultivierung auf Glucose-Minimalmedium mit Acetat ermittelt wurde. Die Daten stellen die Mittelwerte aus einer Doppelbestimmung bzw. einer Dreifach-Bestimmung dar (Spalte n), wobei jeweils von separaten Kulturen ausgegangen wurde. UE = Untereinheit, DH = Dehydrogenase, P = Phosphat

B	Gen	Funktion	relativer mRNA-Level (YYC202/MG1655)	n	p-Wert
Galactitol-Stoffwechsel					
b2092	<i>gatC</i>	Galactitol-spezifisches IIC-Enzym des PTS-Systems, integrales Membranprotein, liegt im <i>gatYZABCD</i> -Operon	0,07 ± 0,06	3	0,025
b2094	<i>gatA</i>	Galactitol-spezifisches IIA-Enzym des PTS-Systems	0,13 ± 0,09	3	0,017
b2095	<i>gatZ</i>	Tagatose-6-P-Kinase (ATP + D-Tagatose-6-P → ADP + D-Tagatose-1,6-bisphosphat)	0,06 ± 0,01	3	0,000
b2096	<i>gatY</i>	Tagatose-bisphosphat-Aldolase (D-Tagatose-1,6-bisphosphat → Dihydroxyaceton-P + D-Glycerinaldehyd-3-P)	0,16 ± 0,03	2	0,020
Pyrimidin-Stoffwechsel					
b3831	<i>udp</i>	Uridin-Phosphorylase (Uridin + P _i → Uracil + α-D-Ribose-1-P)	2,72 ± 0,64	3	0,009
b4244	<i>pyrI</i>	Aspartat-Carbamoyltransferase, regulatorische UE; liegt im <i>pyrBI</i> -Operon	0,10 ± 0,06	3	0,022

B	Gen	Funktion	relativer mRNA-Level (YYC202/MG1655)	n	p-Wert
b4245	<i>pyrB</i>	Aspartat-Carbamoyltransferase, katalytische UE (Carbamoyl-P + L-Aspartat → N-Carbamoyl-L-Aspartat + P _i)	0,14 ± 0,04	3	0,004
b4246	<i>pyrL</i>	<i>pyrBI</i> -Operon-Leader-Peptid	0,17 ± 0,03	2	0,022
Stoffwechsellenzyme					
b0980	<i>appA</i>	saure Phosphatase	2,79 ± 0,28	2	0,018
b0978	<i>appC</i>	Cytochrom- <i>bd</i> -Oxidase II, UE I; liegt im <i>appCBA</i> -Operon	3,97 ± 1,13	2	0,047
b1109	<i>ndh</i>	NADH-Dehydrogenase (NADH + UQ → NAD ⁺ + UQH ₂)	2,61 ± 0,09	3	0,000
b0115	<i>aceF</i>	Pyruvat-DH (2. UE); liegt im <i>pdhR-aceEF-lpdA</i> -Operon	0,15 ± 0,00	2	0,000
b2976	<i>glcB</i>	Malat-Synthase G (Acetyl-CoA + H ₂ O + Glyoxylat → L-Malat + CoA)	0,15 ± 0,04	3	0,002
b3774	<i>ilvC</i>	Acetohydroxysäure-Isomero-Reduktase (Biosynthese von Valin und Leucin)	0,46 ± 0,15	3	0,029
b4015	<i>aceA</i>	Isocitrat-Lyase (Isocitrat → Succinat + Glyoxylat) liegt im <i>aceBAK</i> -Operon	0,15 ± 0,11	3	0,018
b4016	<i>aceK</i>	Isocitrat-DH-Kinase/Phosphatase (ATP + [Isocitrat-DH] → ADP + [Isocitrat-DH]-P)	0,12 ± 0,01	3	0,000
Flagellen-Biosynthese					
b1074	<i>flgC</i>	Flagellen-Biosynthese; liegt im <i>flgBCDEFGHIJK</i> -Operon	10,77 ± 1,27	2	0,009
b1075	<i>flgD</i>	Flagellen-Biosynthese	15,19 ± 8,52	2	0,05
b1076	<i>flgE</i>	Flagellen-Biosynthese	12,71 ± 5,03	2	0,036
b1077	<i>flgF</i>	Flagellen-Biosynthese	2,67 ± 0,33	2	0,025
b1923	<i>fliC</i>	Flagellen-Biosynthese	6,44 ± 3,83	3	0,016
Transportproteine					
b0572	<i>cusC</i> (<i>ylcB</i>)	Bestandteil eines putativen Cu-Effluxsystems; aktiviert durch CusSR, das aber keine veränderte Expression zeigt	4,78 ± 0,39	2	0,007
b0830	<i>yliB</i>	periplasmatisches Bindeprotein eines ABC-Transportsystems	2,73 ± 0,18	2	0,008
b1036	<i>ycdZ</i>	putatives Transportprotein, Ionen-Kanal	4,33 ± 1,30	3	0,006
b0112	<i>aroP</i>	Transportprotein aromatischer AS	0,07 ± 0,02	3	0,003
b1037	<i>csgG</i>	Curli-Transportsystem	0,23 ± 0,02	2	0,009
b1857	<i>znuA</i>	ABC-Transportsystem für Zink	0,11 ± 0,03	2	0,023
b1859	<i>znuB</i>	ABC-Transportsystem für Zink	0,30 ± 0,05	2	0,028

B	Gen	Funktion	relativer mRNA-Level (YYC202/MG1655)	n	p-Wert
Sonstiges					
b1379	<i>hslJ</i>	Hitzeschock-Protein	2,80 ± 0,60	2	0,047
b3376	<i>yhfS</i>	Hypothetisches Protein	7,10 ± 3,74	3	0,011
b3377	<i>yhfT</i>	putatives Transportsystem	6,05 ± 1,88	3	0,005
b3379	<i>yhfV</i>	putative Hydrolase	12,75 ± 3,72	3	0,002
b3380	<i>yhfW</i>	putative Mutase	6,14 ± 2,33	3	0,009
b3382	<i>yhfY</i>	hypothetisches Protein	16,92 ± 11,16	3	0,012
b3716	<i>yieI</i>	hypothetisches Protein	4,71 ± 1,67	3	0,008
b3717	<i>yieJ</i>	hypothetisches Protein	4,24 ± 0,15	2	0,000
b0812	<i>dps</i>	Fe-Speicherprotein, bindet unspez. an DNA u. schützt sie vor oxidativer Zerstörung	0,39 ± 0,02	2	0,002
b1145	<i>ymfK</i>	putativer Phagenrepressor;	0,06 ± 0,02	2	0,032
b1178	<i>ycgK</i>	hypothetisches Protein	0,20 ± 0,02	2	0,007
b1856	<i>yebA</i>	Hypothetische Metalloprotease, event. beteiligt am Zellwandabbau oder -bildung, benötigt Zn ²⁺ als Cofaktor	0,26 ± 0,08	2	0,047
b1974	<i>yodB</i>	integrales Membranprotein, gehört zur Cytochrom <i>b</i> ₅₆₁ Familie	0,24 ± 0,00	2	0,000
b2442	<i>intZ</i>	putative Prophagenintegrase	0,10 ± 0,08	3	0,040
b2450	<i>yffS</i>	hypothetisches Protein	0,07 ± 0,06	3	0,018
b3811	<i>xerC</i>	Rekombinase	0,34 ± 0,05	3	0,002
b4243	<i>yjgF</i>	hypothetisches Protein	0,25 ± 0,03	2	0,019

7.3 Vergleich der Genexpression von *E. coli* YYC202-pGS87 und *E. coli* MG1655 bei Wachstum in Glucose-Minimalmedium mit Acetat

Bei dem Vergleich von YYC202-pGS87 mit MG1655 sollten stamm-spezifische Unterschiede sowie pGS87-bedingte Unterschiede detektiert werden, während pyruvatbedingte Unterschiede hier nicht auftreten sollten, da keiner der Stämme Pyruvat produziert. In Tab. 17 sind die Gene aufgelistet, deren Expression in YYC202-pGS87 im Vergleich zu MG1655 erhöht bzw. erniedrigt waren.

Wie bereits im vorhergehenden Stammvergleich traten in der Gen-Gruppe mit reduziertem RNA-Level in YYC202-pGS87 wieder die *gat*-Gene, die *pyrBIL*-Gene, *yffS*, sowie *aceB* auf. Der RNA-Level von *aceK* konnte nur einmal ausgewertet werden, zeigte aber mit 0,19 ebenfalls eine deutliche Reduktion in YYC202-pGS87. Im Fall von *aceA* lag das RNA-Verhältnis bei $0,7 \pm 0,1$ mit einem p-Wert von 0,1.

In der Gen-Gruppe mit erhöhtem RNA-Level in YYC202-pGS87 sollten alle durch pGS87 kodierten *E. coli*-Gene enthalten sein (Teile von *pdhR*, *aceE*, *aceF*, *lpdA*, *yacH* und Teile von *acnB*), jedoch zeigte nur *aceF* das erwartete Ergebnis. Im Fall von *lpdA* ($21,4 \pm 12,9$) und *acnB* ($4,7 \pm 2,6$) wurden zwar ebenfalls erhöhte RNA-Level gefunden, die p-Werte lagen jedoch $>0,05$ aber $<0,09$. Die p-Werte von *aceE* und *yacH* waren $>0,2$, so dass man den mRNA-Leveln von $1,97 \pm 1,49$ bzw. $3,76 \pm 3,42$ nicht trauen kann. Das *pdhR*-Gen zeigte trotz der erhöhten Kopienzahl ein RNA-Verhältnis nahe eins ($0,85 \pm 0,02$, p-Wert 0,000). Ebenso wie im vorhergehenden Stammvergleich zeigten wieder viele Gene aus der Flagellenbiosynthese und der Chemotaxis einen erhöhten RNA-Level in YYC202-pGS87. Von den Genen, die für die Chemotaxis eine Rolle spielen, war nur *cheY* auswertbar. Alle anderen Gene (*cheABRWZ*) zeigten zwar ebenfalls eine erhöhte Expression, wurden aber aufgrund ihres p-Wertes ($>0,09$) als nicht signifikant verändert angesehen. Von allen 48 Genen, die an der Flagellen-Biosynthese und Bewegung beteiligt sind, zeigten 36 Gene ein Verhältnis >2 . Ebenso wie in dem vorhergehenden Stammvergleich zeigt auch das *ndh*-Gen für die NADH-Dehydrogenase einen erhöhten RNA-Level in YYC202-pGS87 ($5,07 \pm 2,5$), allerdings lag der p-Wert bei 0,07.

Tab. 17: Gene, für die mindestens eine 2-fache Erhöhung bzw. Verringerung des mRNA-Niveaus beim Vergleich zwischen YYC202-pGS87 (Y-pGS87) und Wildtyp (MG1655) bei Kultivierung in Minimalmedium mit 10 mM Glucose und 2 mM Acetat gemessen wurde. Die Werte stellen Mittelwerte aus zwei unabhängigen Messungen dar. Es wurden jeweils separate Kulturen verwendet. UE = Untereinheit, DH = Dehydrogenase

B	Gen	Funktion	relativer mRNA-Level (Y-pGS87/MG1655)	p-Wert
Galactitol-Stoffwechsel				
b2091	<i>gatD</i>	Galactitol-1-P-DH (Galactitol-1-P + NAD ⁺ → L-Tagatose-6-P + NADH); liegt im <i>gatYZABCD</i> -Operon	$0,43 \pm 0,09$	0,047
b2093	<i>gatB</i>	galactitolspezifisches IIB-Enzym des PTS-Systems	$0,60 \pm 0,08$	0,040
b2094	<i>gatA</i>	galactitolspezifisches IIA-Enzym des PTS-Systems	$0,06 \pm 0,02$	0,022
b2095	<i>gatZ</i>	putative Tagatose-6-P-Kinase (ATP + D-Tagatose-6-P → ADP + D-Tagatose-1,6-bisphosphat)	$0,07 \pm 0,01$	0,004
b2096	<i>gatY</i>	Tagatose-Bisphosphate-Aldolase 1 (D-Tagatose-1,6-bisphosphat → Dihydroxyaceton-P + D-Glycerinaldehyd-3-P)	$0,38 \pm 0,05$	0,019

B	Gen	Funktion	relativer mRNA-Level (Y-pGS87/MG1655)	p-Wert
Pyrimidin-Stoffwechsel				
b4244	<i>pyrI</i>	Aspartat-Carbamoyltransferase, regulatorische UE: liegt im <i>pyrIBL</i> -Operon	0,09 ± 0,05	0,047
b4245	<i>pyrB</i>	Aspartat-Carbamoyltransferase, katalytische UE (Carbamoyl-P + L-Aspartat → N- Carbamoyl-L-Aspartat + P _i)	0,07 ± 0,01	0,011
b4246	<i>pyrL</i>	<i>pyrBI</i> Operon-Leader-Peptid	0,35 ± 0,05	0,024
Transport- und Bindeproteine				
b0811	<i>glnH</i>	periplasmatische Glutamin-Bindeprotein eines Glutamin-Transporters	2,42 ± 0,45	0,043
b0830	<i>yliB</i>	periplasmatisches Bindeprotein eines ABC- Transportsystems	2,98 ± 0,40	0,020
b0929	<i>ompF</i>	Porin, das die passive Diffusion von kleinen hydrophilen Molekülen über die äußere Membran vermittelt	2,37 ± 0,28	0,020
b4002	<i>yjaI</i>	periplasmatisches Zn-Bindeprotein, welches Zn-abhängig exprimiert wird	2,06 ± 0,36	0,050
b1243	<i>oppA</i>	periplasmatisches Bindeprotein eines Oligopeptid-Transporters, das Peptide bis zu 5 AS mit hoher Affinität bindet; liegt im <i>oppABCD</i> -Operon	0,48 ± 0,01	0,000
Zentralstoffwechsel				
b0115	<i>aceF</i>	Pyruvat-DH (2. UE)	1,91 ± 0,15	0,009
b1380	<i>ldhA</i>	D-Lactat-DH (Pyruvat + NADH + H ⁺ → D- Lactat + NAD ⁺)	2,19 ± 0,20	0,013
b2296	<i>ackA</i>	Acetat-Kinase (ATP + Acetat → ADP + Acetyl-P)	3,06 ± 0,36	0,015
b4014	<i>aceB</i>	Malat-Synthase A (Acetyl-CoA + H ₂ O + Glyoxylat → L-Malat + CoA); liegt im <i>aceBAK</i> -Operon	0,12 ± 0,04	0,035
Flagellen-Biosynthese und Chemotaxis				
b1076	<i>flgE</i>	Flagellen-Biosynthese	6,57 ± 2,30	0,042
b1083	<i>flgL</i>	Flagellen-Biosynthese	3,89 ± 0,87	0,034
b1882	<i>cheY</i>	Chemotaxis-Regulator	3,68 ± 1,06	0,049
b1922	<i>fliA</i>	Flagellen-Biosynthese	6,66 ± 2,19	0,039
b1923	<i>fliC</i>	Flagellen-Biosynthese	15,60 ± 1,72	0,004
Sonstige				
b0954	<i>fabA</i>	β-Hydroxydecanoylthioester-Dehydrase (3- Hydroxydecanoyl-[Acyl-Carrierprotein] → 2,3-Decenoyl-[Acyl-Carrierprotein] oder 3,4- Decenoyl-[Acyl-Carrierprotein] + H ₂ O)	2,21 ± 0,02	0,000
b2450	<i>yffS</i>	hypothetisches Protein	0,25 ± 0,01	0,000

7.4 Auswirkung eines Pyruvat-Pulses auf die globale Genexpression in MG1655

Um den Einfluss von Pyruvat auf die globale Genexpression von *E. coli* MG1655 zu untersuchen, wurden der Stamm zunächst in M9-Minimalmedium mit 50 mM Glycerin bis zu einer $OD_{600} \sim 0,4$ kultiviert. Anschließend wurde der Kultur 50 mM Na-Pyruvat zugesetzt und nach zweiminütiger Inkubation die RNA isoliert. Der Kontrollkultur wurde anstelle von Na-Pyruvat das gleiche Volumen Wasser zugesetzt. Vor Zugabe von Pyruvat bzw. Wasser hatten die beiden Kulturen eine Wachstumsrate von $0,36 \text{ h}^{-1}$.

Tab. 18: Gene für die mindestens ein 2-fach erhöhtes bzw. erniedrigtes mRNA-Verhältnis nach Zugabe von 50 mM Na-Pyruvat gemessen wurde. Der Referenz wurden anstelle von Pyruvat Wasser zugesetzt. Die RNA wurde aus exponentiell wachsenden Zellen isoliert, die in Minimalmedium mit 50 mM Glycerin kultiviert wurden. Die Werte stellen Mittelwerte aus drei Experimenten dar, darunter 1 "colour-swap"-Experiment. UE = Untereinheit, DH = Dehydrogenase, Pyr = Pyruvat

B	Gen	Funktion	relativer mRNA-Level (+Pyr/-Pyr)	n	p-Wert
Transport- und Bindeproteine					
b4111	<i>proP</i>	Prolinpermease II	$2,46 \pm 0,02$	2	0,024
b0760	<i>modF</i>	Molybdät-Transportsystem	$0,48 \pm 0,05$	2	0,024
b1101	<i>ptsG</i>	glucosespezifisches IIBC-Komponente des PTS-Systems	$0,45 \pm 0,05$	3	0,002
b2416	<i>ptsI</i>	PEP-Proteinphosphotransferase-System Enzym I	$0,44 \pm 0,07$	3	0,005
b1440	<i>ydcS</i>	putatives ABC-Transportprotein	$0,37 \pm 0,04$	3	0,001
b1817	<i>manX</i>	mannosespezifisches Enzym IIAB des PTS-Systems; liegt im <i>manXYZ</i> -Operon	$0,50 \pm 0,12$	3	0,017
b2091	<i>gatD</i>	Galactitol-1-P-DH (Galactitol-1-P + $\text{NAD}^+ \rightarrow \text{L-Tagatose-6-P} + \text{NADH}$); liegt im <i>gatYZABCD</i> -Operon	$0,88 \pm 0,15$	3	0,225
b2149	<i>mglA</i>	Methyl-Galactosid-Transport und Galactose-Taxis	$0,43 \pm 0,08$	3	0,007
b2150	<i>mglB</i>	Galactose-Transportprotein	$0,20 \pm 0,04$	3	0,001
b3528	<i>dctA</i>	C_4 -Dicarbonsäuretransporter (Fumarat, Malat und mit geringerer Affinität Succinat)	$0,45 \pm 0,09$	3	0,010
b3748	<i>rbsD</i>	D-Ribose-Transportsystem; liegt im <i>rbsDACBK</i> -Operon	$0,42 \pm 0,08$	3	0,006
b3750	<i>rbsC</i>	D-Ribose-Transportsystem	$0,49 \pm 0,08$	2	0,049

B	Gen	Funktion	relativer mRNA-Level (+Pyr/-Pyr)	n	p-Wert
Glycerin-Aufnahme und -Verwertung					
b2239	<i>glpQ</i>	Glycerin-Phosphodiester-Esterase; liegt im <i>glpTQ</i> -Operon (Glycerinphosphodiester + H ₂ O → Alkohol + Glycerin-3-P)	0,42 ± 0,09	3	0,008
b2240	<i>glpT</i>	Glycerin-3-Phosphat-Permease	0,23 ± 0,10	3	0,016
b2241	<i>glpA</i>	Glycerin-3-Phosphat-DH, große UE; liegt im <i>glpABC</i> -Operon (Glycerin-3-P + Akzeptor → Dihydroxyaceton-P + Akzeptor reduziert)	0,29 ± 0,06	3	0,004
b2242	<i>glpB</i>	Glycerin-3-Phosphat-DH, membranassoziierte UE	0,45 ± 0,06	3	0,004
b3927	<i>glpF</i>	vermittelt Glycerin-Diffusion	0,55 ± 0,04	2	0,011
Regulatoren					
b0113	<i>pdhR</i>	transcriptioneller Regulator des PDH-Komplex; liegt im <i>pdhR-aceEF-lpdA</i> -Operon	2,80 ± 0,81	3	0,013
b0880	<i>cspD</i>	Kälteschock-Protein	0,40 ± 0,06	3	0,003
b1422	<i>ydci</i>	putativer LysR-Typ-Regulator	0,38 ± 0,07	3	0,006
b2151	<i>galS</i>	Repressor der <i>mgl</i> -Gene	0,45 ± 0,10	3	0,010
b2535	<i>csiE</i>	Protein, das in der stationären Phase und bei Kohlenstoff-Mangel induziert wird	0,50 ± 0,17	3	0,043
b3934	<i>cytR</i>	Katabolismus-Regulator	0,35 ± 0,04	3	0,002
b3418	<i>malT</i>	positiver Regulator des <i>mal</i> -Regulons	0,25 ± 0,12	3	0,016
Stoffwechselenzyme					
b0031	<i>dapB</i>	Dihydrodipicolinat-Reduktase (2,3,4,5-Tetrahydrodipicolinat + NAD(P) ⁺ → 2,3-Dihydrodipicolinat + NAD(P)H)	0,45 ± 0,01	2	0,000
b0722	<i>sdhD</i>	Succinat-Dehydrogenase-Untereinheit;	0,39 ± 0,21	3	0,043
b1415	<i>aldA</i>	Aldehyd-DH (Lactaldehyd + NAD ⁺ + H ₂ O → Lactat + NADH)	0,44 ± 0,06	2	0,036
b3588	<i>aldB</i>	Aldehyd-DH (Lactaldehyd + NAD ⁺ + H ₂ O → Lactat + NADH)	0,49 ± 0,14	3	0,026
b2096	<i>gatY</i>	Tagatose-Bisphosphat-Aldolase (D-Tagatose-1,6-bisphosphat → Dihydroxyaceton-P + D-Glycerinaldehyd-3-P)	0,36 ± 0,05	3	0,002
b2844	<i>yqeF</i>	putative Acetyl-CoA-Acetyltransferase (2 Acetyl-CoA → CoA + Acetoacetyl-CoA)	0,12 ± 0,05	3	0,006
b3671	<i>ilvB</i>	Acetohydroxysäure-Synthase I; Acetolactat-Synthase; große UE	0,49 ± 0,02	2	0,001

B	Gen	Funktion	relativer mRNA-Level (+Pyr/-Pyr)	n	p-Wert
b3774	<i>ilvC</i>	Acetohydroxysäure-Isomero-Reduktase, Valin und Isoleucin-Biosynthese	0,40 ± 0,06	3	0,005
Atmungskette					
b1109	<i>ndh</i>	NADH-Dehydrogenase	5,06 ± 2,45	3	0,024
b3739	<i>atpI</i>	ATP-Synthase-UE; liegt im <i>atpIBEFHAG</i> -Operon	0,43 ± 0,06	3	0,003
Sonstige					
b2659	<i>ygaT</i>	hypothetisches Protein	0,46 ± 0,15	3	0,032
b1423	<i>ycdJ</i>	hypothetisches Protein	0,32 ± 0,07	3	0,005
b1856	<i>yebA</i>	putative Metalloprotease	0,38 ± 0,18	3	0,042
b1973	<i>yodA</i>	hypothetisches Protein	0,40 ± 0,04	2	0,016
b1976	<i>yeeI</i>	hypothetisches Protein	0,37 ± 0,08	3	0,009
b2175	<i>spr</i>	putatives Lipoprotein	0,37 ± 0,02	2	0,001
b3636	<i>rpmG</i>	50S ribosomales Protein L33 liegt im <i>rpmBG</i> -Operon	0,62 ± 0,08	3	0,011
b3637	<i>rpmB</i>	50S ribosomales Protein L28	0,49 ± 0,19	3	0,038
b3832	<i>yigN</i>	putative α -Helixkette	0,45 ± 0,07	2	0,041
b4216	<i>ytfJ</i>	hypothetisches Protein	0,47 ± 0,14	3	0,027
b0628	<i>lipA</i>	Lipoat-Synthese	2,04 ± 0,58	3	0,004
b0950	<i>pqiA</i>	Paraquat-induzierbares Protein A	2,14 ± 0,45	3	0,013

Zwei Minuten nach der Pyruvat-Zugabe zeigten im Vergleich zur Kontrolle mit Wasser nur 5 Gene einen um den Faktor >2 erhöhten RNA-Level, wohingegen 39 Gene einen >2-fach reduzierten mRNA-Level aufwiesen (Tab. 17). Auffallend war, dass 11 der 39 Gene für Transportproteine kodieren. Dies deutet auf die Existenz einer pyruvatvermittelten Katabolit-Repression hin.

Für eine Vielzahl der Gene (*glpAB*, *glpQT*, *glpF*), die an der Aufnahme und Umsetzung von Glycerin beteiligt sind, wurde ein mindestens zweifach reduzierter mRNA-Level gemessen. Die Gene *glpC*, *glpG* und *glpX* hatten lediglich einen 1,4-fach reduzierten mRNA-Level. Das Regulatorgen *glpR* war nur einmal auswertbar, zeigte hier aber ein 5,2-fach erhöhtes mRNA-Verhältnis, was den reduzierten RNA-Level von *glpQT* erklärt, welche durch GlpR reprimiert werden. Das ebenfalls mit *glpF* in einem Operon liegende *glpK* war nicht auswertbar. Die Reduktion der Expression der *glp*-Gene nach Pyruvat-Zugabe deutet ebenfalls auf eine pyruvatvermittelte Katabolit-Repression hin.

Die mRNA-Level der Gene, die für die Aldehyd-Dehydrogenasen AldA und AldB kodieren, waren erniedrigt. Obwohl die Gene *aldA* und *aldB* an unterschiedlichen Regionen im Genom von *E. coli* lokalisiert sind, katalysieren beide Enzyme zum einen die Umsetzung von L-Lactaldehyd zu L-Lactat und zum anderen die Umsetzung von Methylglyoxal zu Pyruvat (<http://www.genome.ad.jp/kegg/kegg2.html>).

Unter den Genen mit erhöhtem RNA-Level nach Pyruvat-Zugabe befand sich *proP*, das für eine Prolin-Permease kodiert, *pdhR*, das für den transkriptionellen Regulator des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes kodiert, *ndh* für die NADH-Dehydrogenase II, sowie *lipA* und *pqiA*.

8 Vergleichende Proteomanalysen durch zweidimensionale Gelelektrophorese und Peptidmassenfingerprint-Analyse

8.1 Vergleich von *E. coli* MG1655 und *E. coli* YYC202 bei Wachstum in Minimalmedium mit Glucose und Acetat

Um Veränderungen im Proteinmuster bei dem *E. coli* Wildtyp-Stamm MG1655 und dem Pyruvat-Produzenten YYC202 festzustellen, wurden die Proteine durch 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Dabei werden Proteingemische zunächst durch eine isoelektrische Fokussierung nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt (1. Dimension) und anschließend durch SDS-PAGE nach ihrer Größe (2. Dimension). Für die Proteomanalyse wurden die Stämme zunächst in Minimalmedium mit 10 mM Glucose und 2 mM Acetat kultiviert. Unter diesen Bedingungen produziert YYC202 im Gegensatz zu MG1655 Pyruvat. Zur Herstellung des Proteinrohextraktes wurden Zellen in der exponentiellen Phase (durchschnittliche Wachstumsrate $0,45 \text{ h}^{-1}$) bei einer OD_{600} von $\sim 0,4$ geerntet, mittels French-Press aufgeschlossen und anschließend zentrifugiert, um noch intakte Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Danach erfolgte zur Abtrennung der Membranen eine Ultrazentrifugation des zellfreien Extraktes. Der daraus resultierende Überstand, der die löslichen Proteine enthielt, wurde zur 2D-Elektrophorese verwendet (Abb. 27). Die Protein-Muster von YYC202 und MG1665 wurden visuell miteinander verglichen, dabei wurden je 2 Gele für jeden Stamm gemacht und ausgewertet. Proteine, die in ihrer Intensität verändert waren, wurden durch eine Peptidmassenfingerprint-Analyse identifiziert. Hierzu wurden die aus dem Gel ausgestanzten Proteinspots mit Trypsin verdaut, die tryptischen Peptide aus dem Gel eluiert und danach mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert. Die so erhaltenen

Peptidmassenfingerprints wurden mit Hilfe der Software MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu/ucshtml4.0/msfit.htm>) mit Proteindatenbanken verglichen und damit Proteinen zugeordnet.

Bei dem Pyruvat-Produzenten YYC202 fehlten erwartungsgemäß die beiden Untereinheiten AceE und AceF der Pyruvat-Dehydrogenase, da die entsprechenden Gene ja deletiert wurden (Tab. 19). Einen deutlichen Unterschied gab es bei den Schlüsselenzymen des Glyoxylatzyklus, Isocitrat-Lyase (AceA) und Malat-Synthase (AceB). Beide Proteine konnten nur in MG1655 detektiert werden, nicht aber in YYC202. Auch in den oben beschriebenen DNA-Chip-Experimenten wurde gezeigt, dass die Expression des *aceBAK*-Operons in YYC202 gegenüber MG1655 stark reduziert war (Tab. 19). Somit gibt es in diesem Fall eine gute Übereinstimmung zwischen mRNA- und Protein-Daten: beide deuten darauf hin, dass der Glyoxylatzyklus in YYC202 möglicherweise völlig fehlt oder zumindest stark reduziert ist. Im Pyruvat-Produzenten war gegenüber dem Wildtyp die Acetohydroxysäure-Isomerase (kodiert durch *ilvC*) in geringeren Konzentrationen vorhanden. Dieses Enzym ist an der Biosynthese der verzweigt-kettigen Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin sowie von Pantothenat beteiligt. Ursache dafür könnte eine erhöhte intrazelluläre Pyruvat-Konzentration in YYC202 sein. Auch bei den DNA-Chip-Experimenten war der *ilvC*-RNA-Level in YYC202 gegenüber MG1655 reduziert (Tab. 19).

Tab. 19 (nächste Seite): Unterschiede im Proteom von *E. coli* YYC202- und *E. coli* MG1655-Zellen (Y bzw. MG) welche in Minimalmedium mit 10 mM Glucose und 2 mM Acetat kultiviert und bei einer OD_{600} von ~0,4 geerntet wurden. Die Proteine wurden durch 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt, Coomassie-gefärbt und visuell analysiert. Proteine mit deutlich unterschiedlichen Intensitäten in den beiden Stämmen wurden aus dem Gel ausgestanzt, mit Trypsin verdaut und die resultierenden Peptide durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert. Anhand des Peptidmassenfingerprints konnten die Proteine identifiziert werden. Proteine, die in zwei unabhängigen Experimenten veränderte Intensitäten zeigten, sind fett hervorgehoben. Die Proteine aus den Spots 2 und 5 (s. Abb. 27) konnten nicht identifiziert werden. Zum Vergleich sind auch die RNA-Verhältnisse der Gene, die für diese Proteine kodieren, angegeben, wie sie aus den DNA-Microarray-Experimenten in drei unabhängigen Experimenten ermittelt wurden. Molekulare Masse (in kDa) und der pI wurden der Colibri-Datenbank entnommen (<http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>). n.a. = nicht auswertbar, UE = Untereinheit.

Nr.	Identifiziertes Protein	Gen	Masse	pI	Protein (Y/MG)	relativer mRNA-Level (Y/MG)
11	Isocitrat-Lyase	<i>aceA</i>	47,4	5,0	↓	0.15
13	Malat-Synthase	<i>aceB</i>	60,1	5,3	↓	n.a.
7, 8	Pyruvat-Dehydrogenase (1. UE)	<i>aceE</i>	99,6	5,5	↓	0.45
10	Pyruvat-Dehydrogenase (2. UE)	<i>aceF</i>	66,1	5,1	↓	n.a.
12	Acetohydroxysäure-Isomeroreduktase	<i>ilvC</i>	53,9	5,0	↓	0.46
1, 3, 4, 6	β-UE der RNA-Polymerase	<i>rpoB</i>	150,6	5,2	↓	~1
9	Colin I Rezeptor	<i>cirA</i>	73,9	5,1	↓	~1
14	Alkylhydroxyperoxid-Reduktase	<i>ahpF</i>	54,1	5,2	↓	~1
16	Hyperosmotisch induzierbares periplasmatisches Protein	<i>osmY</i>	21,1	6,3	↑	~1
17	β-UE der Glycin-Synthetase	<i>glyS</i>	76,8	5,3	↑	~1

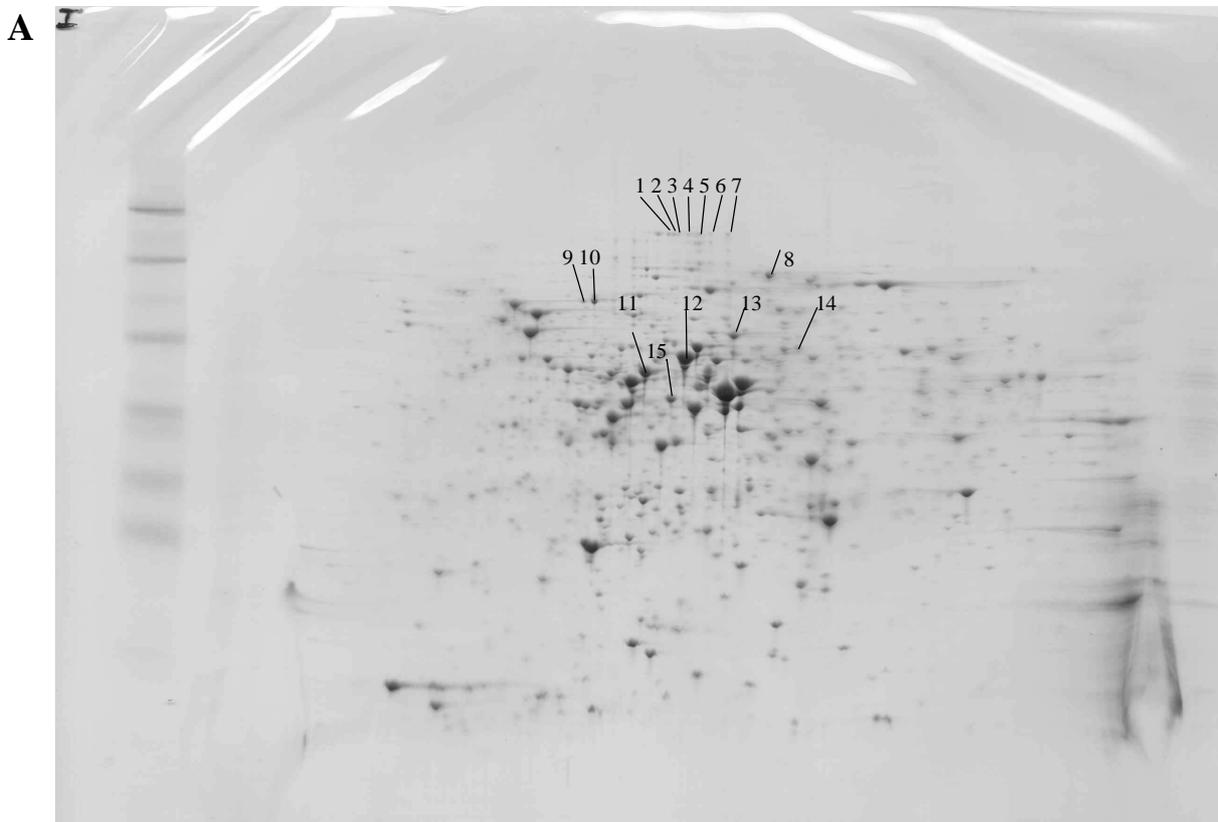




Abb. 27: Coomassie-gefärbte 2D-Gele von *E. coli* MG1655 (A, siehe vorherige Seite) und YYC202 (B). 300 µg lösliche Proteine wurden unter Verwendung von IPG-Strips mit einem pH-Gradienten von 4 - 7 isoelektrisch fokussiert und anschließend in einer SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt. Die markierten Proteinspots wurden durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert. Die Proteine mit den Spot-Nr. 1 - 15 zeigten in YYC202 eine stark reduzierte Intensität oder fehlten völlig, die Proteine mit den Spot-Nr. 16 - 17 wiesen dagegen eine erhöhte Intensität in YYC202 auf.

8.2 Vergleich des Proteinmusters von *E. coli* YYC202*ldhA* zu unterschiedlichen Zeitpunkten einer Fed-Batch-Fermentation

8.2.1 Fed-Batch-Fermentation unter acetatlimitierenden Bedingungen

In Vorversuchen durch B. Zelić (IBT2) war gezeigt worden, dass die CO₂-Produktion bei der Fermentation von YYC202 in Minimalmedium mit Glucose und Acetat proportional zum Acetat-Verbrauch war. Mit Hilfe der online gemessenen CO₂-Konzentration im Abgas konnte der Acetat-Zugabe so reguliert werden, dass Acetat limitierend war oder im Überschuss vorlag. Um die Veränderung des Proteinmusters in *E. coli* YYC202*ldhA* im Verlauf einer Acetat-limitierten Fermentation festzustellen, wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten während der Fermentation (wurde von B. Zelić, Institut für Biotechnologie 2 durchgeführt) Proben genommen: zu Beginn der Pyruvat-Produktionsphase nach 8 h (40 mM Pyruvat im

Kulturüberstand), mitten in der Pyruvat-Produktionsphase nach 12 h (216 mM Pyruvat) und am Ende der Fermentation nach 35 h (243 mM Pyruvat) (Abb. 28). Von den Proben der drei Zeitpunkte wurden jeweils drei 2D-Gele angefertigt. In Abb. 29 sind exemplarisch zwei solcher 2D-Gele zu verschiedenen Zeitpunkten dargestellt. Die identifizierten Proteinspots sind durch Pfeile gekennzeichnet. Unterschiede im Proteinmuster wurden mittels der ProteomWeaver-Software (Definiens Imaging GmbH, München) identifiziert und quantifiziert. Dazu wurden die relativen Intensitäten der einzelnen Proteine (Anteil an der Gesamtintensität aller Spots auf dem Gel) von den drei Gelen eines Zeitpunkts gemittelt und mit den gemittelten Werten der beiden anderen Zeitpunkte verglichen.

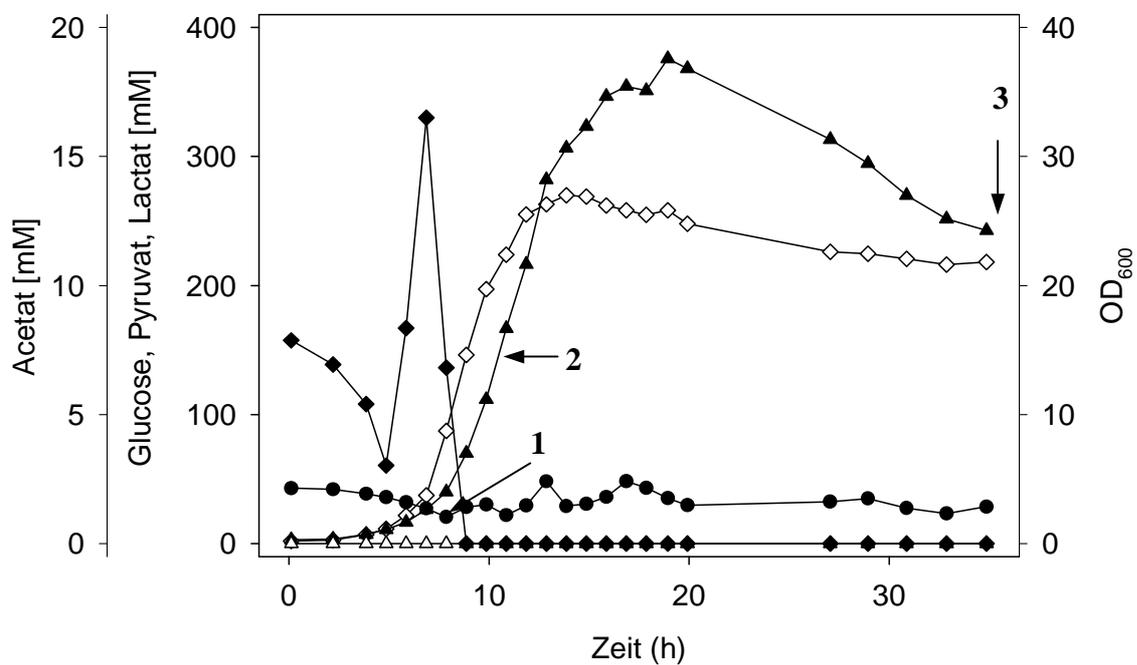


Abb. 28: Fed-Batch-Kultivierung von *E. coli* YYC202*ldhA* in Minimalmedium mit online-Regulation der Glucose- und Acetat-Zugabe. Die Sauerstoffsättigung betrug immer $\geq 40\%$, der pH wurde konstant bei 7 gehalten. Es wurden folgende Symbole verwendet: Glucose (●), Pyruvat (▲), Lactat (△), Acetat (◆), OD₆₀₀ (◇). Die Probenahme für die Proteomanalyse erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten 1 (7,8 h), 2 (11,9 h) und 3 (34,9 h).

Abb. 29 (vorherige Seite): Coomassie-gefärbte 2D-Gele zur Analyse des Proteinmusters von *E. coli* YYC202/*dhA* während einer Acetat-limitierten Fed-Batch-Fermentation. Hier ist das Proteinexpressionsmuster 8 h (A) bzw. 35 h (B) nach Start der Fermentation dargestellt (s. Abb 28). 300 µg lösliche Proteine wurden mit IPG-Strips mit einem pH-Gradienten von 4 - 7 isoelektrisch fokussiert und anschließend durch SDS-PAGE nach Größe aufgetrennt. Die Proteinmuster nach 8, 12 und 35 h (s. Abb 28) wurden mit dem Programm ProteomWeaver (Definiens Imaging GmbH, München) ausgewertet. Proteine, deren Intensität sich im Verlauf der Fermentation änderte, sind markiert und wurden anhand ihres Peptidmassenfingerprints identifiziert (mit Ausnahme von Spot-Nr. 2).

In Tab. 20 sind die Proteine, deren Intensitäten sich im Verlauf der Fermentation signifikant änderte, zusammengefasst. Es fällt auf, dass die Konzentration des Glykolyse-Enzyms Fructosebisphosphat-Aldolase während der Fermentation stark abnahm, während ein Enzym des oxidativen Pentosephosphat-Wegs, die Gluconat-6-Phosphat-Dehydrogenase, in seiner Konzentration zunahm. Man könnte diese Veränderungen so deuten, dass die Glucose zunehmend über den oxidativen Pentosephosphatweg und nicht über die Glykolyse abgebaut wird. Allerdings muss beachtet werden, dass Veränderungen einzelner Enzyme eines Stoffwechselweges nicht notwendigerweise mit Änderungen der entsprechenden Flüsse korreliert sein müssen. Bei den Citratzyklus-Enzymen wurden Veränderungen bei Isocitrat-Dehydrogenase (Icd) und Malat-Dehydrogenase beobachtet. Die Icd konnte an zwei Positionen auf dem Gel mit etwa der gleichen Masse, aber einem pI-Unterschied von ~0,1 identifiziert werden (Spot-Nr. 11 und 13). Es ist bekannt, dass die Icd durch die Icd-Kinase/Phosphatase an Serin-113 phosphoryliert und dadurch inaktiviert wird (Thorsness & Koshland, 1987). Bei dem Icd-Spot Nr. 11 mit niedrigerem pI handelt es sich höchstwahrscheinlich um die phosphorylierte Form. Die Intensität dieses Spots erhöhte sich im Verlauf der Fermentation leicht. Bei dem Icd-Spot mit dem höherem pI handelt es sich wahrscheinlich um die unphosphorylierte Form, deren Konzentration sich im Verlauf der Fermentation halbierte. Auch die Konzentration der Malat-Dehydrogenase, reduzierte sich im Verlauf der Fermentation um die Hälfte.

Neben der Icd konnte auch der Elongationsfaktor TufA an zwei Positionen im Gel mit etwa der gleichen Masse, aber einem pI-Unterschied von ~0,1 identifiziert werden (Spot-Nr. 14 und 20). Von TufA ist bekannt, dass es phosphoryliert werden kann, und zwar an Threonin-382 (Lippmann *et al.*, 1993). Spot 14, der wahrscheinlich phosphoryliertes TufA darstellt,

zeigte eine steigende Intensität im Verlauf der Fermentation, während die unphosphorylierte TufA-Form (Spot 20) abnahm.

Zwei Stressproteine zeigten eine zunehmende Intensität im Verlauf der Fermentation, nämlich das Chaperon DnaK und das universelle Stressprotein UspA. Demgegenüber nahm die Intensität der Glutamat-Decarboxylase GadA, einem Protein gegen Säurestress, im Verlaufe der Fermentation um etwa die Hälfte ab.

Tab. 20: Proteine, deren Konzentration sich während einer acetatlimitierten Fed-Batch-Fermentation von *E. coli* YYC2021*dhA* änderte. Unterschiede in den Proteinintensitäten wurden mit Hilfe der ProteomWeaver-Software (Definiens Imaging GmbH, München) festgestellt. Die Identifizierung der Proteine erfolgte durch Peptidmassenfingerprint-Analyse. Die Nummerierung bezieht sich auf die Proteinspots in Abb. 28. Es wurden drei Phasen einer acetatlimitierten Fermentation von YYC2021*dhA* verglichen. Von jeder Phase wurden drei unabhängige 2D-Gele angefertigt. Spalte n gibt an, in wieviel der neun Gele die Proteinspots gefunden wurden. Die relative mittlere Proteinintensität gibt den Mittelwert der Proteinintensität nach 8 h, 12 h und 35 h an. Die molekulare Masse M (in kDa) und der pI wurden aus der Colibri-Datenbank entnommen (<http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>). Bei den Proteinen, bei denen keine Zuordnung durch Peptidmassenfingerprint-Analyse möglich war, wurden Masse und pI aus dem 2D-Gel abgeschätzt. n.n. = nicht nachweisbar

Nr.	B	Gen	Beschreibung	n	relative mittlere Proteinintensität			M	pI
					8 h	12 h	35 h		
Glykolyse und Pentose-Phosphat-Weg									
3	b2925	<i>fbaA</i>	Fructose-Bisphosphat-Aldolase	7	3,4	1,4	0,6	39,0	5,5
5	b2029	<i>gnd</i>	Gluconat-6-Phosphat-Dehydrogenase	9	4,5	6,1	7,3	51,3	4,9
Citratzyklus									
11	b1136	<i>icd</i>	Isocitrat-Dehydrogenase (phosphoryliert)	6	1,5	n.n.	2,0	45,6	5,0
13	b1136	<i>icd</i>	Isocitrat-Dehydrogenase (dephosphoryliert)	9	10,9	5,0	5,4	45,6	5,0
6	b3236	<i>mdh</i>	Malat-Dehydrogenase	9	3,3	1,9	1,6	32,2	5,5
Stressproteine									
10	b0014	<i>dnak</i>	Chaperon	9	5,2	5,4	7,7	68,9	4,6
17	b1237	<i>hns</i>	DNA-Bindeprotein	9	2,6	4,0	3,9	15,4	5,2
16	b2579	<i>yfiD</i>	Radikalprotein, induziert durch Säurestress	9	1,8	3,3	0,8	14,1	4,9
8	b3495	<i>uspA</i>	Universelles Stressprotein	9	3,1	4,1	5,0	15,9	4,9
22	b3517	<i>gadA</i>	Glutamat-Decarboxylase	8	5,5	2,6	2,1	52,5	5,0
Aminosäure-Stoffwechsel									

Nr.	B	Gen	Beschreibung	n	relative mittlere Proteinintensität			M	pI
					8 h	12 h	35 h		
					4	b0930	<i>asnS</i>		
9	b2422	<i>cysA</i>	Cystein-Synthase A	9	2,2	1,3	1,2	34,3	5,7
1	b2551	<i>glyA</i>	Serinhydroxymethyltransferase	8	2,6	1,3	2,0	45,2	6,0
21	b3172	<i>argG</i>	Argininosuccinat-Synthetase	8	1,4	1,5	1,1	49,7	5,1
7	b3774	<i>ilvC</i>	Acetohydroxysäure-Isomero-reduktase	9	5,5	2,4	1,7	53,9	5,0
12	b2942	<i>metK</i>	Methionin-Adenosyltransferase	8	1,4	3,9	1,1	41,8	4,9
Sonstige									
18	b0170	<i>tsf</i>	Elongationsfaktor EF-Ts	9	4,2	3,2	2,2	30,3	5,0
14	b3339	<i>tufA</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	8	4,2	8,0	7,9	43,2	5,2
20	b3339	<i>tufA</i>	Elongationsfaktor EF-Tu	9	16,3	6,5	8,4	43,1	5,2
8	b1236	<i>galU</i>	UTP-Glucose-1-Phosphat-Uridylyltransferase	9	3,1	4,1	5,0	32,8	4,9
9	b0775	<i>bioB</i>	Biotin-Synthetase	9	2,2	1,3	1,2	38,5	5,2
19	b1920	<i>fliY</i>	Cystein-Bindeprotein; Regulation von FliA	9	3,8	2,2	0,3	28,9	6,2
15	b3460	<i>livJ</i>	Leu/Ile/Val-Bindeprotein	9	8,1	2,7	0,4	38,9	5,4
23	b3316	<i>rpsS</i>	ribosomales Protein der 30S-UE	6	n.n.	2,2	4,1	61,0	4,7
2			keine Zuordnung möglich	7	0,4	2,1	0,5	~6	~4,7

8.2.2 Fed-Batch-Fermentation unter acetatakkumulierenden Bedingungen

Um eine Veränderung des Proteinmusters im Verlauf einer acetatakkumulierenden Fermentation bei dem Pyruvat-Produzenten YYC2021*dhA* festzustellen, wurden zu Beginn, im Verlauf und zum Ende der Fermentation (Abb. 28) Proben entnommen. Zu Zeitpunkt 1 waren 58 mM Pyruvat im Kulturüberstand vorhanden, zum Zeitpunkt 2 298 mM und zum Zeitpunkt 3 wurden 672 mM Pyruvat gemessen. Von jeder Probe zu jedem Zeitpunkt wurden jeweils drei 2D-Gele angefertigt. Unterschiede in der Proteinintensität und damit in der Konzentration wurden mittels der ProteomWeaver-Software identifiziert. Die ermittelten Protein-Intensitäten der jeweiligen drei Gele wurden gemittelt (Tab. 20). Abb. 29 zeigt exemplarisch zwei solcher 2D-Gele, in dem die analysierten Proteinspots durch Pfeile markiert sind.

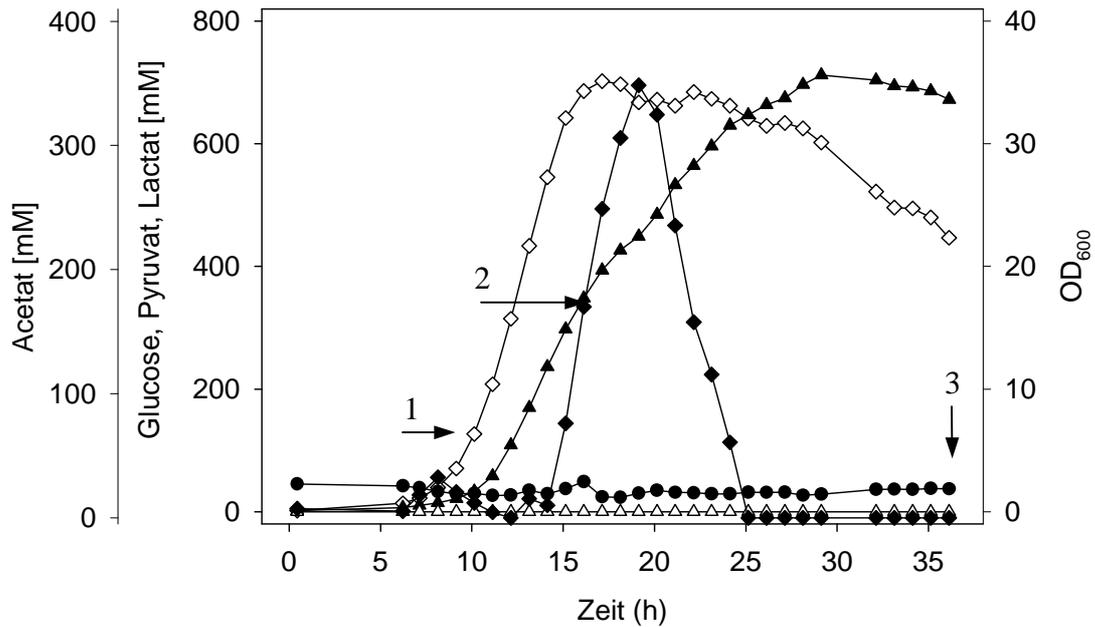


Abb. 30: Fed-Batch-Kultivierung von *E. coli* YYC202ldhA in Minimalmedium mit online-Regulation der Glucose- und Acetat-Zugabe. Die Sauerstoffsättigung betrug immer $\geq 40\%$, der pH wurde konstant bei 7 gehalten. Es wurden folgende Symbole verwendet: Glucose (●), Pyruvat (▲), Lactat (△), Acetat (◆), OD₆₀₀ (◇). Die Probenahme für die Proteomanalyse erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten 1 (11,1 h), 2 (15,1 h) und 3 (36,1 h).

kDa

pI 4

7



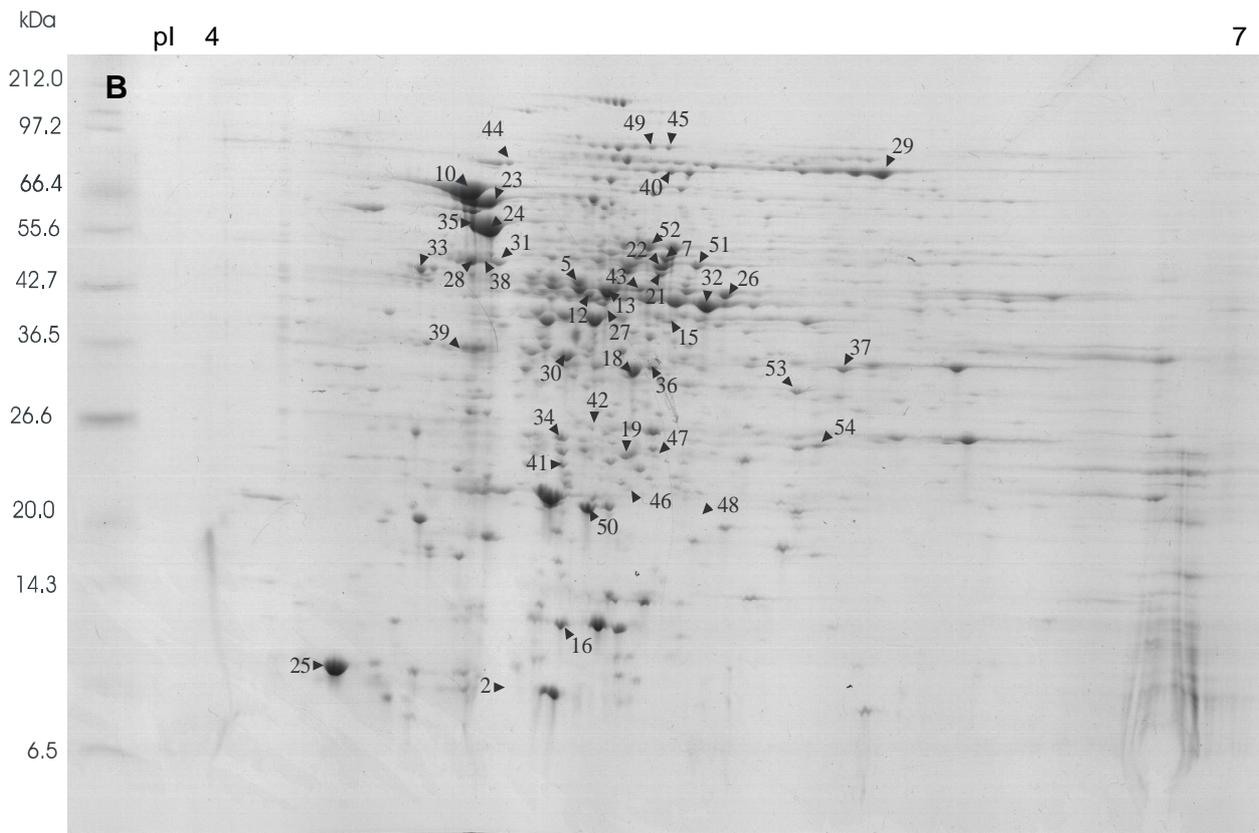


Abb. 31: Coomassie-gefärbte 2D-Gele zur Analyse des Proteinmusters von *E. coli* YYC202ldhA während einer Acetat-akkumulierenden Fed-Batch-Fermentation. Hier ist das Proteinmuster 11 h (A, siehe vorherige Seite) bzw. 36 h (B) nach Start der Fermentation dargestellt (s. Abb. 30). 300 µg lösliche Proteine wurden mit IPG-Strips mit einem pH-Gradienten von 4 - 7 isoelektrisch fokussiert und anschließend durch SDS-PAGE nach Größe aufgetrennt. Die Proteinmuster nach 11, 15 und 36 h (s. Abb. 30) wurden mit dem Programm ProteomWeaver ausgewertet. Proteine, deren Intensität sich im Verlauf der Fermentation änderte, sind markiert und wurden anhand ihres Peptidmassenfingerprints identifiziert (mit Ausnahme von Spot-Nr. 25, 26 und 41).

Bei der acetatakkumulierenden Fermentation fällt auf, dass sich im Vergleich zur acetatlimitierenden Fermentation das Proteinmuster im Verlauf der Fermentation wesentlich stärker veränderte. Bei 53 Proteinen wurden Intensitätsveränderungen im Verlaufe der Fermentation festgestellt, von denen vier nicht identifiziert werden konnten. 25 Proteine nahmen im Verlauf der Fermentation ab. 3 Proteine nahmen im Verlauf der Fermentation zu. Bei 3 Proteinen erhöhte sich die Intensität erst nach der Pyruvat-Produktionsphase. Die Auswertung der resultierenden Peptidmassenfingerprints (Tab. 21) ergab, dass es sich hierbei um DnaK, ElaB und Glutamin-Synthetase handelte. Im Gegensatz zur acetatlimitierten Fermentation, in der die Konzentration an 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase stieg, sank sie in der acetatakkumulierten Fermentation (Tab. 20, 21, 22). Die Spot-Intensität der

Transaldolase, ebenfalls ein Enzym des Pentosephosphat-Wegs, sank ebenfalls geringfügig. Bei den Citratzyklus-Enzymen wurden Intensitätsänderungen bei Aconitase B, Isocitrat-Dehydrogenase und Malat-Dehydrogenase beobachtet, und zwar reduzierte sich in allen Fällen die Intensität. Aconitase B wurde in zwei Spots (Nr. 45 und 49) mit annähernd gleicher Masse, aber einem pI-Unterschied von etwa 0,1 identifiziert. Eine Phosphorylierung von Aconitase B als mögliche Erklärung für das Auftreten der beiden Spots wurde bisher nicht beschrieben.

Es gab eine Vielzahl von Proteinen, die bei beiden Fermentationen gleiche Veränderungen aufwiesen (Tab. 21), z.B. Argininosuccinat-Synthase, das Leu/Ile/Val-Bindeprotein, Methioninadenosyl-Transferase oder Acetohydroxysäure-Isomerase. Weitere Proteine, wie das Histidin-Bindeprotein, Isopropylmalat-Dehydrogenase, Isopropylmalat-Isomerase, Tetrahydropteroyl-triglutamat-Methyltransferase oder Threonin-Synthase änderten nur in der acetatakkumulierenden Fermentation ihre Intensität. Alle diese Proteine nahmen im Verlauf der Fermentation ab.

Im Gegensatz zur acetatlimitierten Fermentation konnten in den Zellen der acetatakkumulierenden Kultur die Glutamat-Decarboxylase an zwei Positionen (Spot-Nr. 22 und 51) mit etwa der gleichen Masse, aber einem pI-Unterschied von ~0,1 identifiziert werden. *E. coli* besitzt zwei Glutamat-Decarboxylase-Isoenzyme GadA und GadB. Sie unterscheiden sich zwar nur in fünf Aminosäuren, dies führt jedoch zu einem pI-Unterschied von 0,07 (GadA pI 5,06; GadB pI 5,13). Für den Spot Nr. 22 konnte gezeigt werden, dass es sich um GadA handelt, da ein unvollständig verdautes Peptid mit der Masse 1564 Da (Sequenz: LLTDFRSELLDSR) detektiert wurde, welches in GadB nicht vorhanden ist. Die Intensität von GadA halbiert sich etwa im Verlauf der Fermentation. Im Fall von Spot-Nr. 51 war aufgrund des Peptidmassenfingerprints keine eindeutige Zuordnung zu GadA oder GadB möglich, der höhere pI spricht jedoch eindeutig dafür, dass es sich dabei um GadB handelt. Im Gegensatz zu GadA stieg die Intensität von GadB im Verlauf der Fermentation. Dies deutet darauf hin, dass die Expression von *gadA* und *gadB* unterschiedlich reguliert wird.

Der Trigger-Faktor Tig, der sowohl als Chaperon als auch als Prolyl-Isomerase fungiert, wurde ebenfalls in zwei Spots (Nr. 28 und 33) identifiziert, die einen pI-Unterschied von etwa 0,15 aufwiesen. Da die Masse von Spot 33 etwas kleiner zu sein schien als die von Spot 28, könnte der pI-Unterschied auf einer proteolytischen Spaltung beruhen. Eine Phosphorylierung von Tig wurde bisher nicht beschrieben, im Gegensatz zu den Chaperonen GroEL und DnaK (McCarty & Walker, 1991; Sherman & Goldberg, 1994). Beide Tig-Spots nahmen im

Verlauf der Fermentation in ihrer Intensität um ca. 75 % ab, während die Intensität des Chaperons DnaK im Verlauf der Fermentation um den Faktor 2 anstieg.

Tab. 21: Proteine, die ein verändertes Proteinexpressionsmuster in *YYC202ldhA* während einer acetatakkumulierenden Fermentation zeigten. Die Unterschiede wurden mit Hilfe der ProteomWeaver-Software festgestellt. Die Identifizierung der Proteine erfolgte durch Peptidmassenfingerprint-Analyse. Die Nummerierung bezieht sich auf die Proteinspots in Abb. 31. Es wurden drei Phasen einer acetatlimitierten Fermentation von *YYC202ldhA* verglichen. Von jeder Phase wurden drei unabhängige 2D-Gele angefertigt. Spalte n gibt die Anzahl an, in wieviel der 9 Gele die Proteinspots gefunden wurden. Die relative mittlere Proteinintensität ist der Mittelwert der Intensität der Gele aus Phase 1, 2 bzw. 3 (Zeitpunkte der Phasen s. Abb. 30). Die molare Masse M ist in kDa angegeben, die Daten stammen aus der Colibri-Datenbank (<http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>). Bei den Proteinen, bei denen keine Zuordnung durch Peptidmassenfingerprint-Analyse möglich war, wurde das Mw und der pl aus dem 2D-Gel abgeschätzt. n.n. = nicht nachweisbar, DH = Dehydrogenase

Nr. B	Gen	Beschreibung	n	relative mittlere Proteinintensität			M	pI	
				11 h	15 h	36 h			
Glykolyse, Gluconeogenese und Pentosephosphatweg									
43	b2779	<i>eno</i>	Enolase	5	1,2	n.n.	0,9	45,5	5,2
44	b1702	<i>ppsA</i>	Phosphoenolpyruvat-Synthetase	9	1,1	0,6	0,4	87,2	4,8
30	b0008	<i>talB</i>	Transaldolase	9	2,8	2,1	2,0	35,1	4,9
5	b2029	<i>gnd</i>	Gluconat-6-Phosphat-DH	9	5,1	3,6	3,8	51,3	4,9
Citratzyklus									
45	b0118	<i>acnB</i>	Aconitase B	9	0,9	1,5	0,4	93,3	5,1
49	b0118	<i>acnB</i>	Aconitase B	9	0,7	0,9	0,5	93,3	5,1
13	b1136	<i>icd</i>	Isocitrat-DH	9	10,9	7,8	4,3	45,6	5,0
37	b3236	<i>mdh</i>	Malat-DH	9	1,6	1,1	0,8	32,2	5,5
Stressproteine									
10	b0014	<i>dnaK</i>	Chaperon	9	9,4	9,3	19,2	68,9	4,6
28	b0436	<i>tig</i>	Trigger-Faktor (Chaperon/Prolyl-Isom.)	9	4,8	1,9	1,3	48,0	4,6
33	b0436	<i>tig</i>	Trigger-Faktor (Chaperon/Prolyl-Isom.)	9	1,9	1,6	0,5	48,0	4,6
51	b1493	<i>gadB</i>	Glutamat-Decarboxylase	9	0,3	2,6	1,9	52,5	5,1
22	b3517	<i>gadA</i>	Glutamat-Decarboxylase	8	5,5	2,6	2,1	52,5	5,0
16	b2579	<i>yfiD</i>	Radikalprotein, säurestress-induziert	9	2,3	5,4	1,2	14,1	4,9
47	b3229	<i>sspA</i>	Starvation-Protein A	6	0,9	0,6	n.n.	24,2	5,1

Nr. B	Gen	Beschreibung	n	relative mittlere Proteinintensität			M	pI
				11 h	15 h	36 h		
24	b4143	<i>groEL</i> Chaperon	9	12,8	6,9	10,2	57,2	4,7
35	b4143	<i>groEL</i> Chaperon	8	1,7	1,0	4,1	57,2	4,7
48	b4376	<i>osmY</i> Hyperosmotisch induzierbares Protein	6	0,7	0,8	n.n.	20,9	6,4
Translation								
18	b0170	<i>tsf</i> Elongationsfaktor EF-Ts	9	5,0	3,9	2,8	30,3	5,0
40	b3340	<i>fusA</i> Elongationsfaktor EF-G	9	1,6	0,8	1,3	77,4	5,1
Aminosäure-Stoffwechsel								
32	b0004	<i>thrC</i> Threonin-Synthase	8	1,9	2,2	0,4	47,0	5,1
34	b0004	<i>thrC</i> Threonin-Synthase	9	1,8	2,0	0,9	47,0	5,1
46	b0071	<i>leuD</i> Isopropylmalat-Isomerase	9	0,9	0,5	0,2	22,3	5,0
27	b0073	<i>leuB</i> 3-Isopropylmalat-DH	7	4,2	1,6	0,8	39,5	5,0
21	b3172	<i>argG</i> Argininosuccinat-Synthetase	9	1,4	0,7	1,1	49,7	5,1
7	b3774	<i>ilvC</i> Acetohydroxysäure-Isomero-reduktase	8	5,5	2,6	2,1	53,9	5,0
29	b3829	<i>metE</i> Methionin-Synthase	8	3,1	7,7	4,2	84,5	5,5
52	b3870	<i>glnA</i> Glutamin-Synthetase	9	0,3	0,6	2,8	51,7	5,1
1	b2942	<i>metK</i> Methionin-Adenosyltransferase	9	6,7	7,9	3,6	41,8	4,9
Transport- und Bindeproteine								
39	b1123	<i>potD</i> Spermidin/Putrescin-Bindeprotein	6	1,5	1,0	n.n.	38,7	5,1
53	b1857	<i>znuA</i> Zn ²⁺ -Bindeprotein	8	0,2	1,5	0,4	35,7	5,8
42	b2309	<i>hisJ</i> Histidin-Bindeprotein	9	1,2	0,5	0,1	28,3	5,3
15	b3460	<i>livJ</i> Leu/Ile/Val-Bindeprotein	9	6,1	1,4	0,4	38,9	5,4
19	b1920	<i>fliY</i> Cystein-Bindeprotein; Regulation von FliA	8	2,5	1,4	0,1	28,9	6,2
Sonstige								
50	b2266	<i>elaB</i> putative Isochorismat-Hydroxymutase	9	0,4	0,3	2,5	11,2	5,2
23	b3316	<i>rpsS</i> ribosomales Protein der 30S-UE	9	13,3	5,7	4,7	61,0	4,7
36	b1207	<i>prsA</i> Ribose-Phosphat-Pyrophosphokinase	9	1,8	0,9	0,7	34,1	5,1
38	b3732	<i>atpD</i> β -UE des F1-Teils der ATP-Synthase	7	1,4	1,3	0,6	50,2	4,7
31	b3738	<i>atpB</i> ATP-Synthase, F ₀ - α UE,	9	2,5	1,4	0,8	30,2	6,4

Nr. B	Gen	Beschreibung	n	relative mittlere Proteinintensität			M	pI
				11 h	15 h	36 h		
				2		keine Zuordnung möglich		
25		keine Zuordnung möglich	9	11,6	8,9	6,4	~10	~4,3
26		keine Zuordnung möglich	9	7,2	5,9	3,4	~43	~5,5
41		keine Zuordnung möglich	9	1,2	0,9	0,5	~25	~5

Tab. 22: Vergleich der Proteine, die sowohl in der acetatlimitierten als auch in der acetatakkumulierenden Fermentation eine Veränderung aufwiesen. Die Werte stellen Mittelwerte der relativen Proteinintensitäten zu den verschiedenen Zeitpunkten dar.

Spot- Nr.	Gen	acetatakkumulierende Fermentation			acetatlimitierte Fermentation		
		8 h	12 h	35 h	11 h	15 h	36 h
2	?	0,62	1,16	0,49	0,35	2,10	0,53
5	<i>gnd</i>	5,10	3,60	3,79	4,54	6,08	7,31
7	<i>ilvC</i>	5,48	2,59	2,05	5,51	2,35	1,70
10	<i>dnaK</i>	9,41	9,29	19,17	5,18	5,43	7,65
12	<i>metK</i>	6,70	7,91	3,61	1,37	3,91	1,07
13	<i>icd</i>	10,88	7,81	4,28	10,86	5,01	5,44
15	<i>livJ</i>	6,14	1,35	0,37	8,14	2,69	0,42
16	<i>yfiD</i>	2,33	5,36	1,19	1,82	3,26	0,75
18	<i>tsf</i>	5,01	3,86	2,78	4,22	3,15	2,18
19	<i>fliY</i>	2,48	1,37	0,08	3,80	2,20	0,33
21	<i>argG</i>	1,39	0,69	1,14	1,42	1,54	1,05
23	<i>rpsS</i>	13,31	5,74	4,74	n.n.	2,20	4,07

V DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war die Konstruktion und Charakterisierung von rekombinanten *Escherichia coli*-Stämmen, die Glucose möglichst effizient in Pyruvat umsetzen und diese Verbindung dann ins Medium ausscheiden. Bisher wurden dazu Hefe- oder *E. coli*-Stämme eingesetzt, die eine Auxotrophie für Vitamine (Thiamin, Liponsäure) besitzen, die bei der Decarboxylierung von Pyruvat benötigt werden. Durch geeignete Limitierung der Vitamine kann die Aktivität des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes und der Pyruvat-Decarboxylase verringert werden, was zu einem Anstau und Export von Pyruvat aus der Zelle führt. Bei diesen Ansätzen konnten bisher maximal bis zu 1,2 Mol Pyruvat pro Mol Glucose gebildet werden (Li *et al.*, 2001a). Im Unterschied dazu wurde in dieser Arbeit der acetatauxotrophe *E. coli*-Stamm YYC202 für die Umsetzung von Glucose zu Pyruvat eingesetzt, bei dem die Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA oder Acetat durch Deletion oder Inaktivierung der Gene für den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex, die Pyruvat-Oxidase und die Pyruvat-Formiat-Lyase völlig blockiert ist. Die primäre Charakterisierung dieses Stammes bezüglich Acetat-Verwertung und Acetat-Toleranz zeigte, dass er sich drastisch von dem *E. coli*-Wildtyp-Stamm MG1655 unterschied.

1 Parallele Umsetzung von Glucose und Acetat durch *E. coli* YYC202

Die Verwertung von verschiedenen Kohlenstoff-Quellen unterliegt in *E. coli* Wildtyp-Stämmen oft der Glucose-Repression, d.h. bei Anwesenheit mehrerer C-Quellen wird zunächst Glucose abgebaut und erst nach deren vollständigem Verbrauch werden die alternativen C-Quellen umgesetzt, was zu einem diauxischen Wachstum führt. Dieses Phänomen wurde auch bei der Umsetzung von Glucose und Acetat durch *E. coli* MG1655 beobachtet (Abb. 7), wobei in der Phase der Glucose-Umsetzung sogar noch Acetat gebildet wurde. Demgegenüber wurden Glucose und Acetat durch *E. coli* YYC202 parallel verstoffwechselt (Abb. 7), was zeigt, dass die im Wildtyp funktionierenden Regulationsmechanismen in YYC202 ausgeschaltet bzw. verändert sein müssen. Die Mutationen, die zu einer parallelen Verstoffwechslung führen, wurden durch die Acetat-Auxotrophie des Stammes bei Wachstum auf Glucose-Acetat-Minimalmedium erzwungen, da nur dann ein Wachstum überhaupt möglich ist. Welche Mutationen dies sind, ist bisher jedoch nicht bekannt.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass der Stamm YYC202 nicht auf Acetat als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen konnte. Für das Wachstum auf Acetat ist der Glyoxylatzyklus als anaplerotische Reaktion essentiell sowie die PEP-Carboxykinase, die Oxalacetat und ATP in PEP, CO₂ und ADP umsetzt und somit die Gluconeogenese ermöglicht. Das Malat-Enzym, das Malat zu CO₂ und Pyruvat umsetzt, kann in YYC202 die PEP-Carboxykinase nicht ersetzen, da aufgrund der Inaktivierung des *pps*-Gens die Bildung von PEP aus Pyruvat durch die PEP-Synthetase nicht möglich ist. Eine mögliche Ursache für das fehlende Wachstum von YYC202 auf Acetat könnte eine völlig fehlende oder stark reduzierte Aktivität des Glyoxylatzyklus sein. Beim Vergleich von YYC202- und MG1655-Zellen, die auf Minimalmedium mit Glucose und Acetat kultiviert worden waren, zeigte sich, dass der mRNA-Level von *aceA* (Isocitrat-Lyase), *aceB* (Malat-Synthase A) und *aceK* (Isocitrat-DH-Kinase/Phosphatase) in YYC202 z.T. fast 10-fach reduziert war im Vergleich zu MG1655 (Tab. 19) und dass Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase zwar auf 2D-Gelen von MG1655 präsent waren, nicht aber auf 2D-Gelen von YYC202 (Abb. 27). Die Expression des *aceBAK*-Operons unterliegt einer komplexen Kontrolle durch mehrere Proteine: das Katabolit-Repressor/Aktivator-Protein Cra und der Integration host factor IHF fungieren als Aktivatoren, IclR als Repressor. Das stromaufwärts vom *aceBAK*-Operon gelegene *iclR*-Gen wird seinerseits durch den Regulator des Fettsäureabbaus FadR aktiviert (Clark & Cronan, 1996). Falls das Fehlen von Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase die einzige Ursache für das fehlende Wachstum von YYC202 auf Acetat ist, sollte nach Transformation mit einem *aceBAK*-Expressionsplasmid das Wachstum wieder möglich sein. Welche Mutationen letztendlich zur veränderten Regulation des *aceBAK*-Operons in YYC202 führten, wurde bisher nicht untersucht. Auch die Frage, ob diese veränderte Regulation wichtig ist für die parallele Umsetzung von Glucose und Acetat, ist noch offen. Wiederum könnte der mit einem *aceBAK*-Expressionsplasmid transformierte YYC202-Stamm Hinweise zur Antwort liefern.

2 Die Acetat-Toleranz von *E. coli* YYC202

E. coli YYC202 hat eine ungewöhnlich hohe Resistenz gegenüber Acetat im Vergleich zu anderen *E. coli*-Stämmen wie beispielsweise MG1655. Der toxische Effekt von Acetat wird damit erklärt, dass die protonierte Form, also die neutrale Essigsäure, über die Cytoplasmamembran diffundieren kann. Wenn der intrazelluläre pH alkalischer ist als der extrazelluläre, dissoziiert die Essigsäure im Cytoplasma und setzt ein Proton frei. Dadurch wird der intrazelluläre pH reduziert und der transmembrane pH-Gradient abgebaut, was zu einer Reduktion der protonenmotorischen Kraft und somit der ATP-Synthese führen sollte.

Parallel sollte die Ansäuerung des Cytoplasmas den beobachteten toxischen Effekt bewirken (Salmond *et al.*, 1984).

E. coli-Stämme wie K-12 besitzen bei einem niedrigen extrazellulären pH-Wert einen hohen transmembranen pH-Gradienten ($\Delta\text{pH} \sim 0,9$ Einheiten), da sie im allgemeinen nicht in der Lage sind, ihren internen pH-Wert anzupassen (Padan *et al.*, 1981). Aufgrund der Diffusion der Essigsäure kann folglich die intrazelluläre Acetat-Konzentration um etwa den Faktor 10 größer sein als die extrazelluläre (Diez-Gonzalez & Russell, 1997). Viele Bakterien, die bei einem niedrigen pH-Wert in Anwesenheit von Acetat wachsen, können ihren intrazellulären pH an den extrazellulären anpassen, d.h. senken (Kashket, 1987; Russell, 1991). Russell (1992) postulierte, dass der niedrige ΔpH einen Adaptationsmechanismus darstellt, der die Akkumulation von Acetat-Ionen in einem ansonsten stärker alkalischen Zellinneren verhindert. Dieses Phänomen wurde z.B. auch für den *E. coli* Stamm O157:H7 beschrieben, der wie YYC202 eine ungewöhnlich hohe Acetat-Toleranz besitzt (Conner & Kotrola, 1995). *E. coli* O157:H7 ist in der Lage, seinen ΔpH von 0,9 auf 0,2 zu senken, wenn Na-Acetat dem Medium hinzugefügt wird (Diez-Gonzalez & Russell, 1997). Unabhängig von der extrazellulären Acetat-Konzentration übersteigt die intrazelluläre Acetat-Konzentration in *E. coli* O157:H7 300 mM nicht. Wenn jedoch die Hypothese einer erhöhten Acetat-Resistenz durch einen verringerten ΔpH richtig ist, dann kann die Ansäuerung des Cytoplasmas nicht die Ursache für den toxischen Effekt des Acetats sein.

Um Hinweise auf den Mechanismus der Acetat-Resistenz von *E. coli* YYC202 zu erhalten, wäre es sinnvoll, die intrazelluläre Acetat-Konzentration sowie den intrazellulären pH bei Wachstum auf Glucose und Acetat zu bestimmen, und zwar im Vergleich zum komplementierten Stamm YYC202-pGS87 und zum Wildtypstamm MG1655.

3 Vergleich der Pyruvat-Produktion aus Glucose durch verschiedene Organismen

In der Einleitung wurden bereits verschiedene Verfahren zur Herstellung von Pyruvat aus Glucose mit Hilfe von vitaminoxotrophen Hefe- bzw. *E. coli*-Stämmen vorgestellt. Daneben wurden in der Literatur auch Verfahren beschrieben, bei denen die Pyruvat-Produktionsphase erst nach der Wachstumsphase startete. Beispielsweise wurde *Xanthomonas campestris* zunächst in einem Medium mit Glycerin und NaNO_3 als C- bzw. N-Quelle kultiviert und nach dem Ende des Wachstums aufgrund von Nitrat-Mangel Glucose hinzugefügt, die zu Pyruvat umgesetzt wurde (Behrens & Fiedler, 1979). Die Ausbeute war allerdings mit 0,47 Mol

Pyruvat/Mol Glucose nicht sehr hoch. Bei einem anderen Verfahren dieser Art wurden *Candida*-Stämme zunächst in einem Glucose-Medium bei pH 5,5 kultiviert und nach Erreichen der gewünschten Biomasse der pH-Wert auf 4,5 reduziert (Besnainou *et al.* 1989, 1990). Dies führte zu einer Hemmung der α -Ketoglutarat-Bildung und damit zu einer verminderten Citratzyklus-Aktivität, was zu einem Anstau des in der Glykolyse gebildeten Pyruvats führte, welches dann ausgeschieden wurde. Die Ausbeute bei diesem Prozess lag bei 0,84 Mol Pyruvat/Mol Glucose.

In Tab. 23 sind bisher beschriebene Pyruvat-Produktionsprozesse zusammengestellt, die von Glucose ausgehen, und zwar in der Reihenfolge steigender molarer Ausbeute. Daraus wird deutlich, dass die in dieser Arbeit beschriebenen Stämme *E. coli* YYC202 und *E. coli* YYC202*ldhA* die besten bisher beschriebenen Ausbeuten liefern. Mit nicht-wachsenden Zellen und einer geringen Glucose-Konzentration konnte sogar annähernd das theoretische Maximum von 2 Mol Pyruvat/Mol Glucose erreicht werden. Ein weiterer Vorteil des in dieser Arbeit beschriebenen Prozesses ist, dass auf den Einsatz teurer Vitamine wie Thiamin, Liponsäure oder Nicotinamid verzichtet werden kann, die bei den Prozessen mit *T. glabrata* oder liponsäureauxotrophen *E. coli*-Stämmen essentiell sind.

B. Zelić erreichte bei Fed-Batch-Fermentationsexperimenten mit YYC202*ldhA* einen maximalen Pyruvat-Titer von ~700 mM Pyruvat (62 g/l) mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 42 g Pyruvat l⁻¹ d⁻¹, die deutlich höher lag als z.B. bei der Pyruvat-Produktion mit vitaminauxotrophen *T. glabrata*-Stämmen, bei der maximal 32,7 g Pyruvat l⁻¹ d⁻¹ gebildet wurden (Miyata *et al.*, 2000). Bei repetitive Fed-Batch-Fermentationen mit YYC202*ldhA* konnte die Raum-Zeit-Ausbeute sogar auf 145 g Pyruvat l⁻¹ d⁻¹ erhöht werden, die Pyruvat-Ausbeute betrug hierbei 1,74 Mol Pyruvat/Mol Glucose (Tab. 23).

Sowohl bei *E. coli* als auch bei *T. glabrata* lagen die maximal erreichten Pyruvat-Konzentrationen bei etwa 700 mM (Li *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001b). Im Fall von *E. coli* YYC202*ldhA* konnte B. Zelić zeigen, dass die Zellen nach Abtrennung des Pyruvats wieder in der Lage waren, Pyruvat zu bilden. Die Pyruvat-Konzentration von ~700 mM hemmte also einen oder mehrere Schritte bei der Umsetzung von Glucose zu Pyruvat, führte aber nicht zu einer irreversiblen Schädigung der Zellen. Eine Möglichkeit zur Vermeidung der Pyruvat-Hemmung bietet eine integrierte Aufarbeitung des Pyruvats. Tatsächlich gelang dies mit *E. coli* YYC202*ldhA* durch Integration einer Elektrodialyse-Einheit (B. Zelić, unveröffentlicht).

Tab. 23: Vergleich von in der Literatur und in dieser Arbeit beschriebenen Pyruvat-Produktions-Prozessen, die Glucose als Substrat verwenden. In der Spalte Kultivierung wurde aufgeführt, ob es sich dabei um Versuche im Schüttelkolben (SK) oder im Fermenter (F) handelte. Außerdem wurde berücksichtigt, ob bei den Prozessen wachsende Kulturen (WK) oder Zellsuspensionen (ZS) verwendet wurden. Für die Versuche aus dieser Arbeit wurde außerdem die Konzentration der C-Quelle angegeben: a) 10 mM Glucose, 2 mM Acetat, b) 10 mM Glucose, c) 100 mM Glucose, d) 88 mM Glucose.

Stamm	Phänotyp	Kultivierung	Mol Pyruvat/ Mol Glucose	Referenz
<i>Candida</i> sp.	thiaminauxotroph	F, ZS	0,8	(Besnainou <i>et al.</i> , 1989; Besnainou <i>et al.</i> , 1990)
<i>Candida lipolytica</i> AJ14353	thiaminauxotroph methioninauxotroph	SK, WK	0,9	(Uchio <i>et al.</i> , 1976)
<i>E. coli</i> W1485lip2	liponsäureauxotroph	F, WK	1,0	(Yokota <i>et al.</i> , 1994a)
<i>Torulopsis glabrata</i> ACII33	thiamin-, biotin-, pyridoxin-, nicotinsäure- auxotroph	SK, WK	1,1	(Miyata <i>et al.</i> , 1990)
<i>E. coli</i> YYC202ldhA	acetatauxotroph, D-LDH-negativ	F, WK	1,1	(Gerharz <i>et al.</i> , 2002)
<i>E. coli</i> AJ12631	liponsäureauxotroph, F ₁ -ATPase-Defekt	SK, WK	1,1	(Tomita & Yokota, 1993)
<i>E. coli</i> TBLA-1	liponsäureauxotroph, F ₁ -ATPase-Defekt	F, WK	1,2	(Yokota <i>et al.</i> , 1994b)
<i>E. coli</i> YYC202	acetatauxotroph	SK, ZS c	1,4	(Bott <i>et al.</i> , 2001; Gerharz <i>et al.</i> , 2001)
<i>Yarrowia lipolytica</i>		SK, ZS	1,5	(Saeki, 1997)
<i>Enterobacter</i> <i>aerogenes</i> SM-18	liponsäureauxotroph, NaAsO ₄	ZS	1,6	(Yokota, 1989)
<i>E. coli</i> YYC202ldhA	acetatauxotroph, D-LDH-negativ	SK, ZS d	1,7	(Gerharz <i>et al.</i> , 2002)
<i>E. coli</i> YYC202	acetatauxotroph	SK, WK a	1,7	(Bott <i>et al.</i> , 2001; Gerharz <i>et al.</i> , 2001)
<i>E. coli</i> YYC202ldhA	acetatauxotroph, D-LDH-negativ	F	1,7	B. Zelić, persönliche Mitteilung
<i>E. coli</i> YYC202	acetatauxotroph	SK, ZS b	2,0	(Bott <i>et al.</i> , 2001; Gerharz <i>et al.</i> , 2001)

4 Bildung von Lactat als Nebenprodukt

Bei den Versuchen mit *E. coli* YYC202 zeigte sich, dass unter bestimmten Bedingungen Lactat als Nebenprodukt gebildet wurde. Dafür gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten, die sich nicht gegenseitig ausschließen: (i) Aufgrund der Blockade des Pyruvat-Abbaus steigt dessen intrazelluläre Konzentration und aktiviert allosterisch die NAD^+ -abhängige D-Lactat-Dehydrogenase (LdhA), die auch unter aeroben Bedingungen vorhanden ist. (ii) Die erhöhte Pyruvat-Konzentration verstärkt die Expression des *ldhA*-Gens, was zu einer erhöhten Konzentration der LdhA führt. (iii) Eine Limitation der Sauerstoffkonzentration oder der Atmungskettenaktivität im Vergleich zur Glykolyse-Aktivität führt zu einem Anstieg des NADH/NAD^+ -Verhältnisses und verstärkt die LdhA-Aktivität. Eine Inaktivierung des *ldhA*-Gens in YYC202 führte zu einer vollständigen Eliminierung der Lactat-Bildung. Die spezifische Glucose-Verbrauchsrate von YYC202*ldhA* war geringer als die von YYC202, was darauf hindeutet, dass tatsächlich die Aktivität der Atmungskettenenzyme limitierend sein könnte. In Abwesenheit des „NADH-Überflussventils“ Lactat-Dehydrogenase könnte es zu einem erhöhten NADH/NAD^+ -Verhältnis kommen, das in der Folge einen reduzierten Fluss durch die Glykolyse bewirken könnte. Es wäre interessant zu testen, ob eine Steigerung der Atmungskettenaktivität zu einer erhöhten spezifischen Glucose-Verbrauchsrate in YYC202*ldhA* führt.

5 Globale Genexpressionsveränderungen in Pyruvat-Produktions- und Nicht-Produktions-Stämmen

Durch Transkriptomanalysen mit DNA-Microarrays sollte untersucht werden, welchen spezifischen Einfluss die Pyruvat-Produktion auf die genomweite Genexpression in *E. coli* YYC202 hat und wie sich YYC202 vom Wildtyp-Stamm MG1655 unterscheidet. Um ausschließlich pyruvatspezifische Effekte zu detektieren, wurde YYC202-pBR322 mit YYC202-pGS87 verglichen. Um stamm- und pyruvatspezifische Effekte zu differenzieren, wurde YYC202 sowie YYC202-pGS87 auch mit dem Wildtyp-Stamm MG1655 verglichen.

Veränderte Expression von Genen der Säureschutzantwort

Die Gene *gadA*, *gadB*, *hdeAB* und *yhiE* kodieren für Gene, die eine Schutzfunktion bei Säure-Stress ausüben. Die mRNA-Level dieser Gene waren in dem Stamm YYC202-pBR322, der Pyruvat produziert, mindestens 5-fach höher als im Stamm YYC202-pGS87, der kein

Pyruvat produziert. Die Gene *gadA* und *gadB* kodieren für zwei Glutamat-Decarboxylase-Isoenzyme, die Glutamat zu γ -Aminobutyrat decarboxylieren und dabei ein Proton „verbrauchen“, somit also der Ansäuerung des Cytoplasmas entgegenwirken. Stromaufwärts von *gadB* liegt *gadC*, welches für einen γ -Aminobutyrat-Antiporter kodiert (Hersh *et al.*, 1996). Der *gadC*-mRNA-Level war beim Vergleich YYC202-pBR322 und -pGS87 nicht signifikant verändert. Die Expression von *gadA*, *gadB* und *gadC* wird durch σ^S reguliert und wird normalerweise durch niedrigen extrazellulären pH während der stationären Wachstumsphase induziert. Die beiden Glutamat-Decarboxylasen und der GadC-Antiporter sind wahrscheinlich notwendig, um einen annähernd neutralen intrazellulären pH zu erreichen, wenn *E. coli* extremen Säure-Bedingungen ausgesetzt ist (Hersh *et al.*, 1996; Small & Waterman, 1998). Bei pH 2,5 wird nur GadA oder GadB benötigt, damit *E. coli* überleben kann. Bei einem pH von 2,0 werden dagegen beide Glutamat-Decarboxylasen benötigt, um ein Überleben von *E. coli* zu ermöglichen (Castanie-Cornet *et al.*, 1999). Da bei dem Transkriptom-Vergleich von YYC202-pBR322 und YYC202-pGS87 die RNA zu einem Zeitpunkt isoliert wurde, wo der externe pH noch nahezu bei 7 lag, muss für die Induktion von *gadA* und *gadB* ein cytoplasmatischer Säurestress verantwortlich sein. Dieser cytoplasmatische Säurestress wird wahrscheinlich durch die Freisetzung von zwei Protonen bei der Umsetzung von Glucose zu Pyruvat bedingt.

Die Gene *hdeA* und *hdeB* zeigten in YYC202-pBR322 einen mindestens 5-fach höheren mRNA-Level als in YYC202-pGS87. Diese Gene und ein drittes Gen, *hdeD*, das in den dargestellten Experimenten nicht ausgewertet werden konnte, werden in *hns*-Deletionsmutanten exprimiert (*hde* = *hns*-dependent expression, Yoshida *et al.*, 1993). Die Expression aller drei Gene, die durch σ^S reguliert wird, steigt normalerweise während der stationären Phase (Arnqvist *et al.*, 1994; Waterman & Small, 1996; Yoshida *et al.*, 1993). Das *hdeA*-Genprodukt vermittelt sowohl in *S. flexneri* (Waterman & Small, 1996) als auch in *E. coli* (Gajiwala & Burley, 2000) eine Säure-Resistenz in der stationären Phase. Gajiwala und Burley (2000) zeigten, dass HdeA eine Chaperon-Funktion bei pH 2, jedoch nicht bei neutralem pH ausübt, und postulierten, dass HdeA die irreversible Denaturierung von periplasmatischen Proteinen verhindert und damit eine Renaturierung bei neutralem pH erlaubt. HdeB ist vermutlich ein Strukturhomolog von HdeA und kann mit diesem evtl. Heterodimere bilden (Gajiwala und Burley, 2000).

Das Gen *yhiE* zeigte eine 5-fach erhöhte Expression im Pyruvat-Produzenten YYC202-pBR322 im Vergleich zu YYC202-pGS87. Auch für *yhiE* wurde kürzlich beschrieben, dass es in der Säurestressantwort involviert ist. Mutationen von *yhiE* führten zu einer reduzierten

Säure-Resistenz, während die *yhiE*-Überproduktion zu einer signifikant erhöhten Säure-Resistenz führte. Tucker *et al.* (2002) postulierten, dass *yhiE* einen Aktivator der Glutamat-abhängigen Säure-Resistenz kodieren könnte. Die erhöhte Expression von *yhiE* könnte also für die erhöhte Expression von *gadA* und *gadB* verantwortlich sein.

Beim Transkriptom-Vergleich von YYC202-pGS87 und dem Wildtypstamm MG1655 waren die mRNA-Level aller o. g. Säurestress-Gene in MG1655 deutlich höher als in YYC202-pGS87, allerdings lagen die p-Werte über 0,05 (*gadA* $0,38 \pm 0,34$; *gadB* $0,39 \pm 0,30$; *hdeA* $0,24 \pm 0,10$; *hdeB* $0,34 \pm 0,22$; *yhiE* $0,40 \pm 0,21$). Möglicherweise hängt der erhöhte mRNA-Level im Wildtyp MG1655 mit einer erhöhten Acetat-Konzentration zusammen. Die Kultivierung von YYC202-pGS87 und MG1655 erfolgte in Minimalmedium mit Glucose und Acetat. Beim Wildtyp wird aufgrund der Katabolit-Repression zunächst nur Glucose verstoffwechselt, was mit einer Ausscheidung von Acetat verbunden ist, während bei YYC202-pGS87 Glucose und Acetat parallel verstoffwechselt werden. Somit dürfte beim Wildtyp zum Zeitpunkt der RNA-Präparation eine höhere Acetat-Konzentration im Medium vorgelegen haben als in YYC202-pGS87. Die Annahme, dass Acetat bei der Expression von *gadA*, *gadB*, *hdeA* und *hdeB* eine Rolle spielt, wurde zuvor von Arnold *et al.* (2001) beschrieben. Allerdings zeigten in diesen Experimenten auch andere Gene in Gegenwart von Acetat einen erhöhten mRNA-Level, die beim Vergleich YYC202-pGS87 vs. MG1655 unverändert waren.

Veränderte Expression der Chemotaxis- und Flagellen-Gene

Die meisten der etwa 40 Gene, die an der Flagellen-Synthese und der Chemotaxis beteiligt sind, zeigten einen reduzierten mRNA-Level in YYC202-pBR322 im Vergleich zu YYC202-pGS87. Diese Beobachtung lässt sich wiederum mit einem internen Säurestress im Pyruvat-Produzenten erklären, da Soutourina *et al.* (2002) zeigen konnten, dass die Expression der Flagellen-Gene durch niedrige pH-Werte inhibiert wird. Die Flagellen-Biosynthese steht in *E. coli* unter der Kontrolle des *flhDC*-Master-Operons, welches wahrscheinlich durch H-NS reguliert wird. Hommais *et al.* (2001) beobachteten, dass in einem *hns*-negativen Hintergrund die Expression der Flagellen-Gene sank, während die Expression von Genen, die eine Schutzfunktion bei Säurestress ausüben, erhöht war. Im Pyruvat-Produzenten YYC202 konnte das gleiche Verhalten beobachtet werden, obwohl die Expression von *hns* unverändert war. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Stamm YYC202 Mutationen im *hns*-Gen enthält, die dessen Funktion beeinträchtigen.

Zu der Hypothese, dass die Expression der Flagellengene in YYC202 durch internen Säurestress reduziert wird, passt allerdings nicht, dass beim Transkriptom-Vergleich von YYC202 mit MG1655 die Flagellen-Gene in YYC202 und nicht in MG1655 einen erhöhten mRNA-Level zeigten. Das gleiche Resultat ergab sich auch beim Vergleich von YYC202-pGS87 mit MG1655. Möglicherweise sind stammspezifische Unterschiede für diese widersprüchlichen Ergebnisse verantwortlich.

Erhöhte Expression der NADH-Dehydrogenase

Die mRNA-Level des *ndh*-Gens für die NADH-Dehydrogenase II und des *appC*-Gens für eine Untereinheit der Cytochrom-Oxidase AppBC waren in YYC202 und YYC202-pGS87 im Vergleich zu MG1655 deutlich erhöht. Das Signal für *appB* war leider nicht auswertbar. Demgegenüber waren die mRNA-Level von *ndh* und *appBC* beim Vergleich von YYC202-pBR322 mit YYC202-pGS87 unverändert. Dies deutet darauf hin, dass es sich dabei um stammspezifische Expressionsunterschiede handelt, die als Folge der Anpassung von YYC202 an den veränderten Stoffwechsel aufgetreten sind. Ob eine verstärkte Bildung von Ndh und AppBC zu einer erhöhten Aktivität der Atmungskette führt, wurde nicht untersucht. Wie bereits diskutiert, scheint die Aktivität der Atmungskette in YYC202 nicht auszureichen, um eine ausreichend schnelle Reoxidation von NADH zu gewährleisten, so dass die NAD⁺-abhängige D-Lactat-Dehydrogenase als „Überflusssventil“ genutzt wird. Tatsächlich war die Expression des *ldhA*-Gens in YYC202-pGS87 gegenüber MG1655 ebenfalls 2,2-fach erhöht. Beim Vergleich der Transkriptome von YYC202 und MG1655 war die Expression des *ldhA*-Gens leider nicht auswertbar, während sie beim Vergleich YYC202-pBR322 mit YYC202-pGS87 im Pyruvat-Produzenten YYC202-pBR322 nur leicht erhöht war ($1,45 \pm 1,0$ mit $p = 0,221$).

6 Einfluss von Pyruvat auf die globale Genexpression in MG1655

Reduzierte Expression von Genen für den Transport alternativer Kohlenstoff-Quellen

Mittels DNA-Chip-Experimenten sollten Gene identifiziert werden, deren Expression durch die Zugabe von Pyruvat verändert wird. Dazu wurden die Zellen in einem Glycerin-Minimalmedium kultiviert und in der exponentiellen Phase 50 mM Na-Pyruvat zugegeben. Nach zwei Minuten wurde die RNA isoliert und mit einer Kultur verglichen, der anstelle von Pyruvat Wasser zugesetzt worden war. Bei der Analyse fiel auf, dass die mRNA-Konzentration von 12 Genen reduziert war, die für Transportproteine kodieren, nämlich *ptsI*

(Enzym I des Phosphotransferase-Systems), *ptsG* (Enzym IIBC des Glucose-PTS), *manX* (Enzym IIAB des Mannose-PTS), *mglAB* (Untereinheiten eines Galactose-ABC-Transportsystems), *rbsC* und *rbsD* (Untereinheiten eines Ribose-Transportsystems), *dctA* (C₄-Dicarboxylatcarrier), *glpF* (Glycerol-Facilitator), *glpT* (Glycerin-3-Phosphat-Permease), *modF* (Untereinheit eines ABC-Transporters für Molybdän) und *ydcJ* (b1423, nicht charakterisiertes Transportprotein). Daneben zeigten Genprodukte, die an der Verstoffwechslung von Glycerin bzw. Glycerin-3-Phosphat beteiligt sind, einen reduzierten mRNA-Level, nämlich *glpQ* (Glycerophosphoryldiester-Phosphodiesterase) und *glpAB* (Untereinheiten der anaeroben Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase). Die Reduktion des *glpQT* RNA-Levels lässt sich durch den erhöhten mRNA-Level von *glpR* erklären (einmal auswertbar, hier aber 5,2-fach erhöhter mRNA-Level nach Pyruvat-Puls), dessen Genprodukt als Regulator von *glpQT* fungiert. Die experimentellen Daten sprechen dafür, dass Pyruvat in *E. coli* eine Katabolit-Repression auslöst, ein Befund, der bisher nicht in der Literatur zu diesem Thema beschrieben wurde (Wanner *et al.*, 1978; Kolb *et al.*, 1993; Postma *et al.*, 1993; Saier & Ramseier, 1996). Erstaunlich war vor allem, dass auch *ptsI* und *ptsG* nach Pyruvat-Zugabe einen reduzierten RNA-Level zeigten, da Glucose ja generell als die bevorzugte C-Quelle von *E. coli* betrachtet wird. In weiteren Experimenten wäre es sinnvoll zu testen, ob die beobachteten Phänomene auch dann auftreten, wenn die Zellen mit Glucose anstelle von Glycerin kultiviert werden.

Bei der beobachteten Katabolit-Repression könnte eventuell der Transkriptionsregulator Mlc eine Rolle spielen, der die Expression der Gene des Glucose-, Maltose- und Mannose-Stoffwechsels reguliert (Lee *et al.*, 2000; Tanaka *et al.*, 2000). Mlc inhibiert die Expression seines eigenen Gens, des glucosespezifischen *ptsG*-Gens, der generellen PTS-Gene *ptsHI* sowie des *malT*-Gens, das für den Aktivator des Maltose-Regulons und des mannoseverwertenden Operons *manXYZ* kodiert (Decker *et al.*, 1998). Dass in dem DNA-Chip-Experiment die Gene *ptsG*, *ptsI*, *malT* sowie *manX* in Anwesenheit von Pyruvat einen reduzierten mRNA-Level zeigten, spricht für eine Beteiligung von Mlc. Allerdings wurde für das *mlc*-Gen selbst kein reduzierter mRNA-Level beobachtet. Möglicherweise tritt dieser Effekt erst zu einem späteren Zeitpunkt und nicht schon nach 2 Minuten auf. Die Rolle des *mlc*-Gens bei der pyruvatvermittelten Katabolit-Repression könnte durch eine entsprechende Transkriptom-Analyse mit einer *mlc*-Deletionsmutante experimentell getestet werden.

7 Proteomanalyse

Die in den Fermentationen eingesetzte Glucose sollte vorwiegend in der Glykolyse zu Pyruvat umgesetzt werden. Wenn Glucose nicht über die Glykolyse, sondern über den oxidativen Pentosephosphatweg verstoffwechselt wird, entsteht CO₂. Dies führt zu einer Reduktion der Pyruvat-Ausbeute. Die Erhöhung der Gluconat-6-Phosphat-Dehydrogenase im Verlauf der acetatlimitierenden (al) Fermentation könnte für eine erhöhte Aktivität des Pentosephosphat-Wegs sprechen, allerdings zeigten keine weiteren Enzyme dieses Weges eine erhöhte Protein-Konzentration. Es fällt auch auf, dass in der acetatakkumulierenden (ak) Fermentation zwei Enzyme (Gnd, TalB) des Pentosephosphatweges im Verlauf der Fermentation reduziert wurden. Das spricht für eine reduzierte Aktivität des Pentosephosphat-Wegs. Das Verhältnis al/ak der relativen Proteinintensität der Gluconat-6-Phosphat-Dehydrogenase betrug am Anfang der Fermentation 0,88, in der Produktionsphase 1,7 und am Ende der Fermentation 1,92. Die Pyruvat-Ausbeute war in der ak-Fermentation mit ~670 mM deutlich höher als in der al-Fermentation, wo nur ~380 mM Pyruvat gebildet wurden. Die geringere Ausbeute in der al-Fermentation könnte mit einer erhöhten Aktivität des Pentosephosphatweges zusammenhängen.

Indizien für einen Säurestress, wie sie bereits bei den DNA-Chip-Experimenten beobachtet wurden, gab es auch bei den Proteomanalysen. So wurden z.B. die Proteine YfiD und GadB in der Produktionsphase vermehrt gebildet. Das YfiD-Protein ist ein Protein, dass bei Säurestress induziert wird und bei neutralem bis alkalischem pH-Wert bisher noch nicht durch Proteomanalyse identifiziert wurde (Blankenhorn *et al.*, 1999). Da die Fermentationen bei einem neutralen externen pH-Wert durchgeführt wurden, ist es deswegen um so erstaunlicher, dass das YfiD-Protein dabei in relativ hoher Intensität detektiert wurde. Das Ergebnis unterstützt den Befund, dass die Pyruvat-Bildung zu einer cytoplasmatischen Ansäuerung führt. YfiD ist ein Radikal-Enzym, wobei das Radikal wie bei der Pyruvat-Formiat-Lyase (PFL) durch die Aktivasen PflA mittels Adenosylmethionin eingeführt wird. Im Gegensatz zur PFL fungiert AdhE aber bei YfiD nicht als Deaktivase. YfiD kann das katalytische Zentrum von PFL wiederherstellen, wenn es durch Sauerstoffeinwirkung zerstört wurde (Wagner *et al.*, 2001). Da in YYC202 das *pflB*-Gen für PFL durch eine Mutation inaktiviert ist, bleibt es fraglich, ob diese Reaktivierungsfunktion von YfiD in YYC202 eine Rolle spielt. Unter Sauerstoffmangel scheiden *yfiD*-Mutanten verstärkt organische Säuren wie Pyruvat, Lactat, Succinat oder Formiat aus (Wyborn *et al.*, 2002). Es wäre daher interessant zu untersuchen, ob eine *yfiD*-Mutation in YYC202 *ldhA* einen Einfluss auf die Pyruvat-Produktion hätte. Bei der ak Fed-Batch-Kultur kam es im Verlauf der Fermentation zu einer

Zunahme der Glutamat-Decarboxylase GadB (von 0,3 auf 1,9) bei gleichzeitiger Abnahme der Glutamat-Decarboxylase GadA (von 5,5 auf 2,1). Dies deutet auf eine unterschiedliche Regulation von *gadA* und *gadB* sowie eventuell auch auf unterschiedliche Eigenschaften der Enzyme hin.

Auffällig war bei den Proteomanalysen der Fed-Batch-Fermentationen, dass mehrere Proteine, die in einer phosphorylierten und einer dephosphorylierten Form vorliegen können, veränderte Intensitäten zeigten (Icd, DnaK, YfiD, GroL, TufA, UspA). Die Proteinphosphorylierung ist ein wichtiger Mechanismus für die Kontrolle von Protein-Aktivitäten. In Eukaryonten gibt es Proteinkinasen, die durch verschiedenste Umweltstresse aktiviert werden und eine Adaptation an diese Stressbedingungen ermöglichen (Tamura *et al.*, 2002; Tibbles & Woodgett, 1999). Das universelle Stressprotein UspA von *E. coli* (Freestone *et al.*, 1997) wird unter anderem dann vermehrt gebildet, wenn die Zelle toxischen Substanzen wie Schwermetallen, Säuren oder Antibiotika ausgesetzt ist (Nystrom & Neidhardt, 1992). Die Zunahme der UspA-Konzentration im Verlaufe der al-Fermentation kann also wiederum als Folge des Säurestresses betrachtet werden. In Zellen der al-Fermentation war UspA schon zum Zeitpunkt der ersten Probennahme in relativ hoher Intensität nachweisbar und nahm im Verlauf der Fermentation noch weiter zu.

Das DNA-bindende Protein H-NS beeinflusst die Expression vieler Gene. Es wird postuliert, dass es eine Rolle bei der Virulenz, beim Kälteschock, beim pH-Stress und der Osmoregulation spielt (Higgins *et al.*, 1990). Die Zunahme von H-NS in der al-Kultur könnte die negative Autoregulation widerspiegeln, die in der logarithmischen Wachstumsphase, nicht aber in der stationären Phase beobachtet wurde (Falconi *et al.*, 1993).

VI LITERATURVERZEICHNIS

- Ahmed, S. and Booth, I.R. (1983) The use of valinomycin, nigericin and trichlorocarbanilide in control of the protonmotive force in *Escherichia coli* cells. *Biochem J*, **212**, 105-112.
- Akita, O., Nishimori, C., Shimamoto, T., Fujii, T. and Iefuji, H. (2000) Transport of pyruvate in *Saccharomyces cerevisiae* and cloning of the gene encoded pyruvate permease. *Biosci Biotechnol Biochem*, **64**, 980-984.
- Anton, D.L., Dicosimo, R. and Witterholt, V.G. (1996) Process for the preparation of pyruvic acid using permeabilized transformants of *H. polymorpha* and *P. pastoris* which express glycolate oxidase and catalase. *United States Patent*. E. I. Du Pont de Nemours and Company (Wilmington, DE).
- Arnold, C.N., McElhanon, J., Lee, A., Leonhart, R. and Siegele, D.A. (2001) Global Analysis of *Escherichia coli* Gene Expression during the Acetate-Induced Acid Tolerance Response. *J Bacteriol*, **183**, 2178-2186.
- Arnqvist, A., Olsen, A. and Normark, S. (1994) Sigma S-dependent growth-phase induction of the *csgBA* promoter in *Escherichia coli* can be achieved *in vivo* by sigma 70 in the absence of the nucleoid-associated protein H-NS. *Mol Microbiol*, **13**, 1021-1032.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J. and Struhl, K. (1992) Short Protocols in molecular biology. *John Wiley and sons*.
- Barnes, W.M. (1994) PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 2216-2220.
- Behrens, U. and Fiedler, S. (1979) Recovery of pyruvate. *East Germany Patent*, East Germany.
- Bergmeyer, H. (1985) In *Methods of Enzymatic Analysis*. Third. Ed. Vol.7.
- Besnainou, B., Giani, D. and Sahut, C. (1989) Process for the production of pyruvic acid by fermentation. *EP patent*.
- Besnainou, B., Giani, D. and Sahut, C. (1990) Method for the producing pyruvic acid by fermentation. *US patent*, US.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-1523.
- Blankenhorn, D., Phillips, J. and Slonczewski, J.L. (1999) Acid- and base-induced proteins during aerobic and anaerobic growth of *Escherichia coli* revealed by two-dimensional gel electrophoresis. *J Bacteriol*, **181**, 2209-2216.
- Blattner, F.R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B. and Shao, Y. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, **277**, 1453-1474.
- Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L. and Boyer, H.W. (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene*, **2**, 95-113.

- Borle, A.B. and Stanko, R.T. (1996) Pyruvate reduces anoxic injury and free radical formation in perfused rat hepatocytes. *Am J Physiol*, **270**, G535-540.
- Bott, M., Gerharz, T., Takors, R. and Zelic, B. (2001) Verfahren zur fermentativen Herstellung von Pyruvat. *Deutsche Patentanmeldung 101 29 711.4-42 vom 22.06.2001*.
- Bott, M., Ritz, D. and Hennecke, H. (1991) The *Bradyrhizobium japonicum cycM* gene encodes a membrane-anchored homolog of mitochondrial cytochrome c. *J Bacteriol*, **173**, 6766-6772.
- Bunch, P.K., Mat-Jan, F., Lee, N. and Clark, D.P. (1997) The *ldhA* gene encoding the fermentative lactate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Microbiology*, **143**, 187-195.
- Burdick, B.A. and Schaeffer, J.R. (1987) Co-immobilized coupled enzyme systems on nylon mesh capable of gluconic and pyruvic acid production. *Biotechnol Lett*, **9**, 253-258.
- Castanie-Cornet, M.P., Penfound, T.A., Smith, D., Elliott, J.F. and Foster, J.W. (1999) Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **181**, 3525-3535.
- Chang, A.C. and Cohen, S.N. (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J Bacteriol*, **134**, 1141-1156.
- Chang, Y.Y. and Cronan, J.E., Jr. (1982) Mapping nonselectable genes of *Escherichia coli* by using transposon Tn10: location of a gene affecting pyruvate oxidase. *J Bacteriol*, **151**, 1279-1289.
- Chang, Y.Y. and Cronan, J.E., Jr. (1983) Genetic and biochemical analyses of *Escherichia coli* strains having a mutation in the structural gene (*poxB*) for pyruvate oxidase. *J Bacteriol*, **154**, 756-762.
- Clark, D.P. and Cronan, J.E. (1996) Two-carbon compounds and fatty acids as carbon sources. In Neidhardt, F.C. (ed.), *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C., pp. 343-357.
- Clauser, K.R., Baker, P. and Burlingame, A.L. (1999) Role of accurate mass measurement (+/- 10 ppm) in protein identification strategies employing MS or MS/MS and database searching. *Anal Chem*, **71**, 2871-2882.
- Cohen, S.N., Chang, A.C. and Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **69**, 2110-2114.
- Conner, D. and Kotrola, J. (1995) Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 under acidic conditions. *Appl Environ Microbiol*, **61**, 382-385.
- DeBoer, L.W., Bekx, P.A., Han, L. and Steinke, L. (1993) Pyruvate enhances recovery of rat hearts after ischemia and reperfusion by preventing free radical generation. *Am J Physiol*, **265**, H1571-1576.
- Decker, K., Plumbridge, J. and Boos, W. (1998) Negative transcriptional regulation of a positive regulator: the expression of *malT*, encoding the transcriptional activator of the maltose regulon of *Escherichia coli*, is negatively controlled by Mlc. *Mol Microbiol*, **27**, 381-390.
- Diez-Gonzalez, F. and Russell, J. (1997) The ability of *Escherichia coli* O157:H7 to decrease its intracellular pH and resist the toxicity of acetic acid. *Microbiology*, **143**, 1175-1180.
- Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O. and Botstein, D. (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 14863-14868.

- Eisenberg, E., Seip, J.E., Gavagan, J.E., Payne, M.S., Anton, D.L. and DiCosimo, R. (1997) Pyruvic acid production using methylotrophic yeast transformants as catalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2**, 223-232.
- Falconi, M., Higgins, N.P., Spurio, R., Pon, C.L. and Gualerzi, C.O. (1993) Expression of the gene encoding the major bacterial nucleotide protein H-NS is subject to transcriptional auto-repression. *Mol Microbiol*, **10**, 273-282.
- Flournoy, D.S. and Frey, P.A. (1989) Inactivation of the pyruvate dehydrogenase complex of *Escherichia coli* by fluoropyruvate. *Biochemistry*, **28**, 9594-9602.
- Fountoulakis, M. and Langen, H. (1997) Identification of proteins by matrix-assisted laser desorption ionization-mass spectrometry following in-gel digestion in low-salt, nonvolatile buffer and simplified peptide recovery. *Anal Biochem*, **250**, 153-156.
- Freestone, P., Nystrom, T., Trinei, M. and Norris, V. (1997) The universal stress protein, UspA, of *Escherichia coli* is phosphorylated in response to stasis. *J Mol Biol*, **274**, 318-324.
- Gajiwala, K.S. and Burley, S.K. (2000) HDEA, a periplasmic protein that supports acid resistance in pathogenic enteric bacteria. *J Mol Biol*, **295**, 605-612.
- Garvie, E.I. (1980) Bacterial lactate dehydrogenases. *Microbiol Rev*, **44**, 106-139.
- Georgiou, C.D., Fang, H. and Gennis, R.B. (1987) Identification of the *cydC* locus required for expression of the functional form of the cytochrome d terminal oxidase complex in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **169**, 2107-2112.
- Gerharz, T., Bott, M., Takors, R. and Zelic, B. (2002) Verfahren sowie Mikroorganismen zur mikrobiellen Herstellung von Pyruvat aus Kohlenhydraten sowie Alkoholen. *Deutsche Patentanmeldung 10220234.6 vom 04.04.2002*.
- Gerharz, T., Zelic, B., Takors, R. and Bott, M. (2001) Produktion von Pyruvat aus Glucose mit *Escherichia coli*. *BIOspektrum, Sonderausgabe Biokatalyse*, **1**, 29-32.
- Grabau, C. and Cronan, J.E., Jr. (1984) Molecular cloning of the gene (*poxB*) encoding the pyruvate oxidase of *Escherichia coli*, a lipid-activated enzyme. *J Bacteriol*, **160**, 1088-1092.
- Grabau, C. and Cronan, J.E., Jr. (1986) Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *Escherichia coli* pyruvate oxidase, a lipid-activated flavoprotein. *Nucleic Acids Res*, **14**, 5449-5460.
- Hanahan, D. (1985) In *DNA cloning*. IRL Press, Oxford, Band 1.
- Hermolin, J. and Fillingame, R.H. (1989) H⁺-ATPase activity of *Escherichia coli* F₁F₀ is blocked after reaction of dicyclohexylcarbodiimide with a single proteolipid (subunit c) of the F₀ complex. *J Biol Chem*, **264**, 3896-3903.
- Hersh, B.M., Farooq, F.T., Barstad, D.N., Blankenhorn, D.L. and Slonczewski, J.L. (1996) A glutamate-dependent acid resistance gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **178**, 3978-3981.
- Higgins, C.F., Hinton, J.C., Hulton, C.S., Owen-Hughes, T., Pavitt, G.D. and Seirafi, A. (1990) Protein H1: a role for chromatin structure in the regulation of bacterial gene expression and virulence? *Mol Microbiol*, **4**, 2007-2012.
- Holms, H. (1996) Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev*, **19**, 85-116.

- Hommais, F., Krin, E., Laurent-Winter, C., Soutourina, O., Malpertuy, A., Le Caer, J.P., Danchin, A. and Bertin, P. (2001) Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS. *Mol Microbiol*, **40**, 20-36.
- Howard JW, F.W. (1932) Preparation of pyruvic acid. *Org Synth Coll*, **1**, 475-480.
- 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**, 2437-2446.
- Kaniga, K., Delor, I. and Cornelis, G.R. (1991) A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene*, **109**, 137-141.
- Kashket, E.R. (1987) Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiol Rev*, **46**, 233-244.
- Kessler, D., Leibrecht, I. and Knappe, J. (1991) Pyruvate-formate-lyase-deactivase and acetyl-CoA reductase activities of *Escherichia coli* reside on a polymeric protein particle encoded by *adhE*. *FEBS Lett*, **281**, 59-63.
- Khodursky, A.B., Peter, B.J., Cozzarelli, N.R., Botstein, D., Brown, P.O. and Yanofsky, C. (2000) DNA microarray analysis of gene expression in response to physiological and genetic changes that affect tryptophan metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 12170-12175.
- Kim, Y.M., Ogawa, W., Tamai, E., Kuroda, T., Mizushima, T. and Tsuchiya, T. (2002) Purification, reconstitution, and characterization of Na⁺/serine symporter, SstT, of *Escherichia coli*. *J Biochem (Tokyo)*, **132**, 71-76.
- Knappe, J. and Sawers, G. (1990) A radical-chemical route to acetyl-CoA: the anaerobically induced pyruvate formate-lyase system of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev*, **6**, 383-398.
- Knappe, J., Schacht, J., Mockel, W., Hopner, T., Vetter, H. and Edenharder, R. (1969) Pyruvate formate-lyase reaction in *Escherichia coli*. The enzymatic system converting an inactive form of the lyase into the catalytically active enzyme. *Eur J Biochem*, **11**, 316-327.
- Lang, V.J., Leystra-Lantz, C. and Cook, R.A. (1987) Characterization of the specific pyruvate transport system in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, **169**, 380-385.
- Lee, S.J., Boos, W., Bouche, J.P. and Plumbridge, J. (2000) Signal transduction between a membrane-bound transporter, PtsG, and a soluble transcription factor, Mlc, of *Escherichia coli*. *Embo J*, **19**, 5353-5361.
- Lehnen, D., Blumer, C., Polen, T., Wackwitz, B., Wendisch, V.F. and Uden, G. (2002) LrhA as a new transcriptional key regulator of flagella, motility and chemotaxis genes in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, **45**, 521-532.
- Li, Y., Chen, J., Liang, D.F. and Lun, S.Y. (2000) Effect of nitrogen source and nitrogen concentration on the production of pyruvate by *Torulopsis glabrata*. *J Biotechnol*, **81**, 27-34.
- Li, Y., Chen, J. and Lun, S.Y. (2001a) Biotechnological production of pyruvic acid. *Appl Microbiol Biotechnol*, **57**, 451-459.
- Li, Y., Chen, J., Lun, S.Y. and Rui, X.S. (2001b) Efficient pyruvate production by a multi-vitamin auxotroph of *Torulopsis glabrata*: key role and optimization of vitamin levels. *Appl Microbiol Biotechnol*, **55**, 680-685.

- Link, A.J., Phillips, D. and Church, G.M. (1997) Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J Bacteriol*, **179**, 6228-6237.
- Lippmann, C., Lindschau, C., Vijgenboom, E., Schroder, W., Bosch, L. and Erdmann, V.A. (1993) Prokaryotic elongation factor Tu is phosphorylated *in vivo*. *J Biol Chem*, **268**, 601-607.
- Lowe, P.N. and Perham, R.N. (1984) Bromopyruvate as an active-site-directed inhibitor of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **23**, 91-97.
- Ma, D., Cook, D.N., Alberti, M., Pon, N.G., Nikaido, H. and Hearst, J.E. (1995) Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, **16**, 45-55.
- Masuda, N. and Church, G.M. (2002) *Escherichia coli* gene expression responsive to levels of the response regulator EvgA. *J Bacteriol*, **184**, 6225-6234.
- Mat-Jan, F., Alam, K.Y. and Clark, D.P. (1989) Mutants of *Escherichia coli* deficient in the fermentative lactate dehydrogenase. *J Bacteriol*, **171**, 342-348.
- McCarty, J.S. and Walker, G.C. (1991) DnaK as a thermometer: threonine-199 is site of autophosphorylation and is critical for ATPase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 9513-9517.
- Membrillo-Hernandez, J. and Lin, E.C.C. (1999) Regulation of Expression of the *adhE* Gene, Encoding Ethanol Oxidoreductase in *Escherichia coli*: Transcription from a Downstream Promoter and Regulation by Fnr and RpoS. *J Bacteriol*, **181**, 7571-7579.
- Miller, E.M. and Nickoloff, J.A. (1995) *Escherichia coli* electrotransformation. *Methods Mol Biol*, **47**, 105-113.
- Miller, V.L. and Mekalanos, J.J. (1988) A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J Bacteriol*, **170**, 2575-2583.
- Miyata, R., Igarashi, H. and Yonehara, T. (2000) Manufacture of pyruvic acid with (halogenated) pyruvic acid-resistant microorganisms. *JP patent*. 2000078996, Japan.
- Miyata, R. and Yonehara, T. (1996) Improvement of fermentative production of pyruvate from glucose by *Torulopsis glabrata* IFO 0005. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **82**, 475-479.
- Miyata, R., Yonehara, T., Yotsumoto, K. and Tsutsui, H. (1990) Method for producing pyruvic acid by fermentation. *United States Patent*. Toray Industries (Tokyo, JP).
- Mullis, K.B. and Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, **155**, 335-350.
- Nakajima, H., Hagting, A., Kunji, E.R., 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*. *Appl Environ Microbiol*, **63**, 2213-2217.
- Nakazawa, H., Enei, H. and Okumura, S. (1972) Synthesis of L-tryptophan from pyruvate, ammonia and indole. *Agr Biol Chem*, **36**, 2523-2528.
- Nichollas, D.G. and Ferguson, S.J. (1992) *Bioenergetics 2*. Academic Press, London.
- Nystrom, T. and Neidhardt, F.C. (1992) Cloning, mapping and nucleotide sequencing of a gene encoding a universal stress protein in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, **6**, 3187-3198.

- Ogawa, W., Kim, Y.M., Mizushima, T. and Tsuchiya, T. (1998) Cloning and expression of the gene for the Na⁺-coupled serine transporter from *Escherichia coli* and characteristics of the transporter. *J Bacteriol*, **180**, 6749-6752.
- Padan, E., Zilberstein, D. and Schuldiner, S. (1981) pH homeostasis in bacteria. *Biochim Biophys Acta*, **650**, 151-166.
- Pan, J., Joon, S. and Lebeault, J. (1987) Physiological constraints in increasing biomass concentration of *E. coli* B in fed-batch culture. *Biotechnology letters*, **9**, 89-94.
- Park, H.S., Lee, J.Y. and Kim, H.S. (1998) Production of L-DOPA(3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine) from benzene by using a hybrid pathway. *Biotechnol Bioeng*, **58**, 339-343.
- Pecher, A., Zinoni, F., Jatisatienr, C., Wirth, R., Hennecke, H. and Bock, A. (1983) On the redox control of synthesis of anaerobically induced enzymes in enterobacteriaceae. *Arch Microbiol*, **136**, 131-136.
- Polen, T. (2002) Genomweite Genexpressionsanalyse mit DNA-Chips zur Charaktisierung des Glucose-Überflussmetabolismus von *Escherichia coli*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Postma, P.W., Lengeler, J.W. and Jacobson, G.R. (1993) Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev*, **57**, 543-594.
- Quail, M.A., Haydon, D.J. and Guest, J.R. (1994) The *pdhR-aceEF-lpd* operon of *Escherichia coli* expresses the pyruvate dehydrogenase complex. *Mol Microbiol*, **12**, 95-104.
- Richmond, C.S., Glasner, J.D., Mau, R., Jin, H. and Blattner, F.R. (1999) Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res*, **27**, 3821-3835.
- Rogers, P.L., Shin, H.S. and Wang, B. (1997) Biotransformation for L-ephedrine production. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, **56**, 33-59.
- Russell, J.B. (1991) Resistance of *Streptococcus bovis* to acetic acid at low pH: relationship between intracellular pH and anion accumulation. *Appl Environ Microbiol*, **57**, 255-259.
- Russell, J.B. (1992) Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. *J Appl Bacteriol*, **73**, 363-370.
- Saeki, H. (1997) Manufacture of pyruvic acid with *Yarrowia*. *JP patent*. 09252790, Japan.
- Saier, M., Jr and Ramseier, T. (1996) The catabolite repressor/activator (Cra) protein of enteric bacteria. *J Bacteriol*, **178**, 3411-3417.
- Salmond, C.V., Kroll, R.G. and Booth, I.R. (1984) The effect of food preservatives on pH homeostasis in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol*, **130**, 2845-2850.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Schinschel, C. and Simon, H. (1993) Preparation of pyruvate from (R)-lactate with *Proteus species*. *Journal of Biotechnology*, **31**, 191-203.
- Seol, W. and Shatkin, A.J. (1991) *Escherichia coli kgtP* encodes an alpha-ketoglutarate transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 3802-3806.
- Shalon, D., Smith, S.J. and Brown, P.O. (1996) A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res*, **6**, 639-645.

- Sherman, M. and Goldberg, A.L. (1994) Heat shock-induced phosphorylation of GroEL alters its binding and dissociation from unfolded proteins. *J Biol Chem*, **269**, 31479-31483.
- Silhavy, J., Berman, M. and Enquist, L. (1984) Experiments with gene fusions. *Cold Spring Harbor Laboratory*.
- Small, P.L. and Waterman, S.R. (1998) Acid stress, anaerobiosis and *gadCB*: lessons from *Lactococcus lactis* and *Escherichia coli*. *Trends Microbiol*, **6**, 214-216.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, **150**, 76-85.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, **98**, 503-517.
- Soutourina, O.A., Krin, E., Laurent-Winter, C., Hommais, F., Danchin, A. and Bertin, P.N. (2002) Regulation of bacterial motility in response to low pH in *Escherichia coli*: the role of H-NS protein. *Microbiology*, **148**, 1543-1551.
- Spencer, M.E. and Guest, J.R. (1985) Transcription analysis of the *sucAB*, *aceEF* and *lpd* genes of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*, **200**, 145-154.
- Stanko, R.T., Reynolds, H.R., Hoyson, R., Janosky, J.E. and Wolf, R. (1994) Pyruvate supplementation of a low-cholesterol, low-fat diet: effects on plasma lipid concentrations and body composition in hyperlipidemic patients. *Am J Clin Nutr*, **59**, 423-427.
- Stanko, R.T., Robertson, R.J., Galbreath, R.W., Reilly, J.J., Jr., Greenawalt, K.D. and Goss, F.L. (1990) Enhanced leg exercise endurance with a high-carbohydrate diet and dihydroxyacetone and pyruvate. *J Appl Physiol*, **69**, 1651-1656.
- Stanko, R.T., Tietze, D.L. and Arch, J.E. (1992) Body composition, energy utilization, and nitrogen metabolism with a 4.25-MJ/d low-energy diet supplemented with pyruvate. *Am J Clin Nutr*, **56**, 630-635.
- Tamura, S., Hanada, M., Ohnishi, M., Katsura, K., Sasaki, M. and Kobayashi, T. (2002) Regulation of stress-activated protein kinase signaling pathways by protein phosphatases. *Eur J Biochem*, **269**, 1060-1066.
- Tanaka, Y., Kimata, K. and Aiba, H. (2000) A novel regulatory role of glucose transporter of *Escherichia coli*: membrane sequestration of a global repressor Mlc. *Embo J*, **19**, 5344-5352.
- Tarmy, E.M. and Kaplan, N.O. (1968a) Chemical characterization of D-lactate dehydrogenase from *Escherichia coli* B. *J Biol Chem*, **243**, 2579-2586.
- Tarmy, E.M. and Kaplan, N.O. (1968b) Kinetics of *Escherichia coli* B D-lactate dehydrogenase and evidence for pyruvate-controlled change in conformation. *J Biol Chem*, **243**, 2587-2596.
- Thorsness, P.E. and Koshland, D.E., Jr. (1987) Inactivation of isocitrate dehydrogenase by phosphorylation is mediated by the negative charge of the phosphate. *J Biol Chem*, **262**, 10422-10425.
- Tibbles, L.A. and Woodgett, J.R. (1999) The stress-activated protein kinase pathways. *Cell Mol Life Sci*, **55**, 1230-1254.
- Tomita, F. and Yokota, A. (1993) Manufacture of pyruvic acid with *Escherichia* and pyruvic acid-producing mutant of *Escherichia*. *Japan Patent*, Japan.

- Tucker, D.L., Tucker, N. and Conway, T. (2002) Gene Expression Profiling of the pH Response in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **184**, 6551-6558.
- Uchio, R., Kikuchi, K., Enei, H. and Hirose, Y. (1976) Process for producing pyruvic acid by fermentation. *US patent*. 3993543, USA.
- Wagner, A.F., Schultz, S., Bomke, J., Pils, T., Lehmann, W.D. and Knappe, J. (2001) YfiD of *Escherichia coli* and Y06I of bacteriophage T4 as autonomous glyceryl radical cofactors reconstituting the catalytic center of oxygen-fragmented pyruvate formate-lyase. *Biochem Biophys Res Commun*, **285**, 456-462.
- Walsh, K. and Koshland, D.E. (1984) Determination of flux through the branch point of two metabolic cycles. The tricarboxylic acid cycle and the glyoxylate shunt. *J Biol Chem*, **259**, 9646-9654.
- Walsh, K. and Koshland, D.E. (1985) Branch point control by the phosphorylation state of isocitrate dehydrogenase. A quantitative examination of fluxes during a regulatory transition. *J Biol Chem*, **260**, 8430-8437.
- Wanner, B.L., Kodaira, R. and Neidhardt, F.C. (1978) Regulation of lac operon expression: reappraisal of the theory of catabolite repression. *J Bacteriol*, **136**, 947-954.
- Waterman, S.R. and Small, P.L. (1996) Identification of sigma S-dependent genes associated with the stationary-phase acid-resistance phenotype of *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol*, **21**, 925-940.
- Wendisch, V.F., Zimmer, D.P., Khodursky, A., Peter, B., Cozzarelli, N. and Kustu, S. (2001) Isolation of *Escherichia coli* mRNA and comparison of expression using mRNA and total RNA on DNA microarrays. *Anal Biochem*, **290**, 205-213.
- Wyborn, N.R., Messenger, S.L., Henderson, R.A., Sawers, G., Roberts, R.E., Attwood, M.M. and Green, J. (2002) Expression of the *Escherichia coli* yfiD gene responds to intracellular pH and reduces the accumulation of acidic metabolic end products. *Microbiology*, **148**, 1015-1026.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, 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.
- Yokota, A., Henmi, M., Takaoka, N., Hayashi, C., Takezawa, Y., Fukumori, Y. and Tomita, F. (1997) Enhancement of glucose metabolism in pyruvic acid-hyperproducing *Escherichia coli* mutant defective in F₁-ATPase activity. *J Ferm Bioeng*, **83**, 132-138.
- Yokota, A., Shimizu, H., Terasawa, Y., Takaoka, N. and Tomita, F. (1994a) Pyruvic-Acid Production by a Lipoic Acid Auxotroph of *Escherichia coli* W1485. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **41**, 638-643.
- Yokota, A., Terasawa, Y., Takaoka, N., Shimizu, H. and Tomita, F. (1994b) Pyruvic acid production by an F₁-ATPase-defective mutant of *Escherichia coli* W1485lip2. *Biosci Biotechnol Biochem*, **58**, 2164-2167.
- Yokota, A.T., S. (1989) Pyruvic acid production by lipoic acid auxotrophs of *Enterobacter aerogenes*. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 705-711.
- Yonehara, T. and Miyata, R. (1994) Fermentative Production of Pyruvate from Glucose by *Torulopsis glabrata*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **78**, 155-159.
- Yoshida, T., Ueguchi, C., Yamada, H. and Mizuno, T. (1993) Function of the *Escherichia coli* nucleoid protein, H-NS: molecular analysis of a subset of proteins whose expression is enhanced in a hns deletion mutant. *Mol Gen Genet*, **237**, 113-122.

Zimmer, D.P., Soupene, E., Lee, H.L., Wendisch, V.F., Khodursky, A.B., Peter, B.J., Bender, R.A. and Kustu, S. (2000) Nitrogen regulatory protein C-controlled genes of *Escherichia coli*: scavenging as a defense against nitrogen limitation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 14674-14679.

Tab. 24: Gene, deren mRNA-Level in in den Vergleichen von *E. coli* YYC202-pGS87/YYC202-pBR322, YYC202/MG1655 oder/und YYC202-pGS87/MG1655 mindestens zweifach erhöht bzw. erniedrigt waren. Diese Liste wurde mit den relativen mRNA-Leveln der anderen Experimenten ergänzt. Die RNA wurde aus exponentiell wachsenden Zellen isoliert, die in Minimalmedium (10 mM Glucose, 2 mM Acetat) kultiviert wurden. Spalte n gibt die Anzahl der Experimente an. Die Daten stellen die Mittelwerte aus der Anzahl der Experimente dar, wobei jeweils von separaten Kulturen ausgegangen wurde. p-Wert > 0,05 sind fett markiert. Die Orientierung der Gene auf dem *E. coli*-Chromosom ist in der Spalte * angegeben, + bedeutet im Uhrzeigersinn, - entgegen dem Uhrzeigersinn. DH = Dehydrogenase

B-Nr.	Gen	*Funktion	mRNA-Level (Y-pBR322/Y-pGS87)			mRNA-Level (YYC202/MG1655)			mRNA-Level (Y-pGS87/MG1655)		
			Wert	n	p-Wert	Wert	n	p-Wert	Wert	n	p-Wert
b0006	<i>yaaA</i>	- ORF	5,93 ± 0,63	2	0,004	1,08 ± 0,23	3	0,373	1,46 ± 1,09	2	0,399
b0112	<i>aroP</i>	- Transportprotein aromatischer AS	5,44	1		0,07 ± 0,02	3	0,003	0,09 ± 0,09	2	0,096
b0113	<i>pdhR</i>	+ Pyruvat-DH-Repressor; liegt in einem Operon mit <i>pdhR-aceEF-lpdA</i>	0,53 ± 0,26	5	0,040	0,59 ± 0,22	2	0,138	0,85 ± 0,02	2	0,000
b0114	<i>aceE</i>	+ Pyruvat-DH (1. UE)	0,05 ± 0,01	2	0,016	0,45 ± 0,17	3	0,037	1,97 ± 1,49	2	0,283
b0115	<i>aceF</i>	+ Pyruvat-DH (2. UE)	0,10 ± 0,10	4	0,006	0,53 ± 0,65	3	0,118	1,91 ± 0,15	2	0,009
b0116	<i>lpdA</i>	+ Pyruvat-DH (3. UE)	0,05 ± 0,01	4	0,000	0,77 ± 0,16	3	0,067	21,39 ± 14,90	2	0,058
b0117	<i>yacH</i>	- putatives Membranprotein unbekannter Funktion	0,54 ± 0,47	3	0,167	1,08 ± 0,19	3	0,329	3,76 ± 3,42	2	0,203
b0118	<i>acnB</i>	+ Aconitase B (Citrat → cis-Aconitat + H ₂ O)	0,57 ± 0,25	6	0,011	1,15 ± 0,44	3	0,382	4,74 ± 2,61	2	0,087
b0219	<i>yafV</i>	- putatives Enzym, enthält eine Hydrolase Domäne	3,61 ± 0,68	2	0,025	0,97 ± 0,15	3	0,321	1,68 ± 1,06	2	0,284
b0489	<i>ybbK</i>	- putative Protease	3,36 ± 0,41	2	0,011	1,10 ± 0,12	3	0,178	1,44 ± 0,97	2	0,379
b0564	<i>appY</i>	+ Transkriptionsregulator; induziert <i>appA</i> (saure Phosphatase), <i>appBC</i> (Cytochrom-bd-Oxidase-II) u.a. Gene, fungiert auch als Repressor von Genen	3,54 ± 0,26	2	0,001	1,55 ± 0,26	2	0,087	1,94 ± 1,41	2	0,275
b0572	<i>ylcB</i>	+ Bestandteil eines putativen Cu-Effluxsystems; aktiviert durch CusSR, das aber keine veränderte Expression zeigt	0,75 ± 0,42	3	0,230	3,94 ± 1,48	3	0,017	1,41 ± 0,82	2	0,348

B-Nr.	Gen	*Funktion	mRNA-Level	n	p-	mRNA-Level	n	p-	mRNA-Level	n	p-
			(Y-pBR322/Y-pGS87)		Wert	(YYC202/MG1655)		Wert	(Y-pGS87/MG1655)		Wert
b0709	<i>ybgH</i>	- putatives Transportprotein aus der H ⁺ -abhängigen Oligopeptid-Transporter-Familie (POT- oder PTR-Familie, TC 2.A.17)	12,63 ± 6,04	2	0,043	1,39 ± 0,20	3	0,029	1,50 ± 0,96	2	0,344
b0809	<i>glnQ</i>	- membranassoziiertes Glutamin-Binde-Domäne eines hoch-affinen Glutamin-Transporters; liegt im <i>glnHPQ</i> -Operon	1,46 ± 0,77	6	0,104	1,62 ± 0,44	3	0,047	2,56 ± 2,01	2	0,226
b0810	<i>glnP</i>	- integrales Membranprotein eines hoch-affinen Glutamin-Transporters	0,96 ± 0,26	7	0,401	1,67 ± 0,56	3	0,063	2,39 ± 1,75	2	0,220
b0811	<i>glnH</i>	- periplasmatische Glutamin-Binde-Domäne eines Glutamin-Transporters	0,90 ± 0,28	7	0,230	1,72 ± 0,67	3	0,083	2,42 ± 0,45	2	0,043
b0812	<i>dps</i>	- Fe-Speicherprotein, bindet unspez. an DNA und schützt sie vor oxidativer Zerstörung	1,51 ± 0,50	7	0,009	0,61 ± 0,37	3	0,097	0,42 ± 0,31	2	0,159
b0828	<i>ybiK</i>	+ L-Asparagin-Amidohydrolase (L-Asparagin + H ₂ O → L-Aspartat + NH ₃)	1,63 ± 1,28	7	0,059	1,55 ± 0,36	3	0,051	2,04 ± 1,53	2	0,269
b0829	<i>yliA</i>	+ periplasmatisches Bindeprotein eines ABC-Transportsystems									
b0830	<i>yliB</i>	+ periplasmatisches Bindeprotein eines ABC-Transportsystems	0,90 ± 0,32	7	0,224	2,42 ± 0,57	3	0,013	2,98 ± 0,40	2	0,020
b0831	<i>yliC</i>	+ Integral Membranprotein eines ABC-Transportsystems	1,60 ± 1,50	5	0,218	2,78 ± 0,70	2	0,056	2,72 ± 2,08	2	0,206
b0832	<i>yliD</i>	+ Integral Membranprotein eines ABC-Transportsystems	1,39 ± 1,14	7	0,296	1,76 ± 0,72	3	0,108	2,56 ± 1,30	2	0,132
b0833	<i>yliE</i>	+ ORF							2,63	1	
b0834	<i>yliF</i>	+ ORF	2,38 ± 2,21	3	0,164	1,72 ± 1,09	2	0,273	1,30 ± 0,61	2	0,347
b0861	<i>artM</i>	- Membranprotein eines ABC-Transporters für Arginin	6,16 ± 1,77	2	0,032	1,35 ± 0,08	3	0,003	1,86 ± 1,46	2	0,315
b0862	<i>artQ</i>	- periplasmatische Domäne eines ABC-Transporters für Arginin	2,47 ± 2,37	3	0,166	1,21 ± 0,33	3	0,232	1,64 ± 1,43	2	0,404
b0863	<i>artI</i>	- membranassoziiertes Protein eines ABC-Transporters für Arginin	0,77	1					1,52 ± 1,11	2	0,376
b0864	<i>artP</i>	- integrales Membranprotein eines ABC-Transporters für Arginin	1,69 ± 1,34	6	0,133	1,36 ± 0,24	3	0,053	1,21 ± 0,79	2	0,468
b0897	<i>ycaC</i>	- Hydrolase mit unbekannter Spezifität	3,81 ± 0,14	2	0,000	1,32 ± 0,82	3	0,393	1,55 ± 0,86	2	0,284

B-Nr.	Gen	*Funktion	mRNA-Level	n	p-	mRNA-Level	n	p-	mRNA-Level	n	p-
			(Y-pBR322/Y-pGS87)		Wert	(YYC202/MG1655)		Wert	(Y-pGS87/MG1655)		Wert
b0929	<i>ompF</i>	- Porin, das die passive Diffusion von kleinen hydrophilen Molekülen über die äußere Membran vermittelt	1,31 ± 0,80	7	0,281	2,21 ± 2,19	3	0,263	2,37 ± 0,28	2	0,020
b0954	<i>fabA</i>	- β-Hydroxydecanoylthioester-Dehydrase (3-Hydroxydecanoyl-[Acyl-Carrierprotein] → 2,3-Decenoyl-[Acyl-Carrierprotein] oder 3,4-Decenoyl-[Acyl-Carrierprotein] + H ₂ O)	0,75 ± 0,37	7	0,051	1,25 ± 0,23	3	0,110	2,21 ± 0,02	2	0,000
b0978	<i>appC</i>	+ Cytochrom-bd-Oxidase II, UE I; liegt im <i>appCBA</i>	1,83 ± 0,80	3	0,076	3,42 ± 1,24	3	0,015	1,84 ± 0,52	2	0,107
b0979	<i>appB</i>	+ Cytochrom-bd-Oxidase II, UE II							1,99		1
b0980	<i>appA</i>	+ saure Phosphatase	1,57 ± 1,63	5	0,375	2,25 ± 0,96	3	0,067	0,87		1
b1036	<i>ycdZ</i>	+ putatives Transportprotein, Ionen-Kanal	1,15	1		4,33 ± 1,30	3	0,006	2,23 ± 1,89	2	0,285
b1037	<i>csgG</i>	- Curli Transportsystem	1,07 ± 0,34	4	0,355	0,33 ± 0,18	3	0,027	0,59 ± 0,25	2	0,151
b1071	<i>flgM</i>	- Anti-Flia Faktor	0,57 ± 0,05	2	0,010	3,17 ± 2,99	3	0,118	5,46 ± 3,91	2	0,111
b1072	<i>flgA</i>	- Flagellen-Biosynthese	0,50 ± 0,13	3	0,026	2,18 ± 1,26	3	0,081	3,14 ± 2,33	2	0,173
b1073	<i>flgB</i>	+ Flagellen-Biosynthese	0,25 ± 0,21	3	0,119	7,30 ± 7,96	3	0,069	6,58 ± 3,00	2	0,057
b1074	<i>flgC</i>	+ Flagellen-Biosynthese; liegt im Operon mit <i>flgBCDEFGHIJK</i>	0,29 ± 0,07	3	0,004	10,77 ± 1,27	2	0,009	5,26 ± 2,23	2	0,060
b1075	<i>flgD</i>	+ Flagellen-Biosynthese	0,29 ± 0,10	4	0,003	10,82 ± 9,67	3	0,050	7,90 ± 4,42	2	0,066
b1076	<i>flgE</i>	+ Flagellen-Biosynthese	0,27 ± 0,17	5	0,005	9,21 ± 7,04	3	0,042	6,57 ± 2,30	2	0,042
b1077	<i>flgF</i>	+ Flagellen-Biosynthese	0,30 ± 0,16	6	0,003	2,32 ± 0,65	3	0,021	2,08 ± 0,42	2	0,059
b1079	<i>flgH</i>	+ Flagellen-Biosynthese	0,39 ± 0,11	4	0,002	1,86 ± 1,69	2	0,365	1,65 ± 0,31	2	0,080
b1080	<i>flgI</i>	+ Flagellen-Biosynthese	0,34 ± 0,28	2	0,155	0,50	1		1,57 ± 0,75	2	0,242
b1081	<i>flgJ</i>	+ Flagellen-Biosynthese	0,45 ± 0,22	5	0,008	1,57	1		1,15 ± 0,28	2	0,334
b1082	<i>flgK</i>	+ Flagellen-Biosynthese	0,48 ± 0,27	5	0,020	4,16 ± 3,19	3	0,054	7,53 ± 6,38	2	0,118
b1083	<i>flgL</i>	+ Flagellen-Biosynthese	0,46 ± 0,25	5	0,019	2,44 ± 1,19	2	0,132	3,89 ± 0,87	2	0,034

B-Nr.	Gen	*Funktion	mRNA-Level	n	p-	mRNA-Level	n	p-	mRNA-Level	n	p-
			(Y-pBR322/Y-pGS87)		Wert	(YYC202/MG1655)		Wert	(Y-pGS87/MG1655)		Wert
b1109	<i>ndh</i>	+NADH-Dehydrogenase (NADH + QH → NAD ⁺ + QH ₂)	1,20 ± 0,22	7	0,008	2,61 ± 0,09	3	0,000	5,07 ± 2,50	2	0,073
b1145	<i>ymfK</i>	- putativer Phagenrepressor				0,06 ± 0,02	2	0,032	0,15 ± 0,18	2	0,143
b1178	<i>ycgK</i>	- ORF	1,50 ± 0,22	7	0,000	0,54 ± 0,60	3	0,117	1,47 ± 0,94	2	0,348
b1243	<i>oppA</i>	+periplasmatisches Bindeprotein eines Oligopeptid-Transporter; liegt im <i>oppABCD</i> -Operon	0,73 ± 0,32	5	0,134	0,53 ± 0,04	2	0,017	0,48 ± 0,01	2	0,000
b1244	<i>oppB</i>	+integrales Membranprotein eines Oligopeptid-Transporter	0,93 ± 0,17	2	0,407	0,84 ± 0,14	3	0,092	1,11 ± 0,66	2	0,488
b1245	<i>oppC</i>	+integrales Membranprotein eines Oligopeptid-Transporter	0,83 ± 0,23	5	0,128	0,84 ± 0,10	3	0,045	1,40 ± 0,32	2	0,155
b1246	<i>oppD</i>	+membranassoziierte Komponente eines Oligopeptid-Transporter	0,63 ± 0,39	5	0,062	1,00	1		1,36 ± 0,89	2	0,401
b1379	<i>hslJ</i>	+Hitzeschock-Protein	1,05 ± 0,35	6	0,381	2,32 ± 0,92	3	0,045	1,61 ± 1,12	2	0,332
b1380	<i>ldhA</i>	+D-Lactat-DH (Pyruvat + NADH + H ⁺ → D-Lactat + NAD ⁺)	1,45 ± 1,00	6	0,221				2,19 ± 0,20	2	0,013
b1493	<i>gadB</i>	- Glutamat-Decarboxylase A (L-Glutamat ⁻ + H ⁺ → γ-Aminobutyrat + CO ₂)	9,21 ± 2,70	2	0,027	1,01 ± 0,87	3	0,333	0,39 ± 0,30	2	0,157
b1634	<i>ydgR</i>	+putatives Transportprotein	0,28 ± 0,02	2	0,000	1,19 ± 0,43	3	0,314	1,52 ± 0,22	2	0,072
b1856	<i>yebA</i>	- Hypothetische Metalloprotease, event. beteiligt am Zellwandabbau oder -bildung, benötigt Zn ²⁺ als Cofaktor	0,93 ± 0,27	6	0,317	0,26 ± 0,08	2	0,047	1,34 ± 0,21	2	0,117
b1857	<i>znuA</i>	- ABC-Transportsystem für Zink	1,27 ± 0,35	6	0,051	0,11 ± 0,03	2	0,023	1,10 ± 0,55	2	0,494
b1858	<i>znuC</i>	+ABC-Transportsystem für Zink	0,87 ± 0,27	5	0,212	0,30 ± 0,05	2	0,028	1,69 ± 0,46	2	0,120
b1859	<i>znuB</i>	+ABC-Transportsystem für Zink									
b1879	<i>flhA</i>	- Flagellen-Biosynthese	0,76 ± 0,09	2	0,096	0,61 ± 0,01	2	0,000	2,20 ± 1,88	2	0,292
b1880	<i>flhB</i>	- putativer Teil des Flagellen-Apperatus-Exporter	0,42 ± 0,24	4	0,039	0,94 ± 0,37	2	0,382	2,73 ± 1,46	2	0,132
b1881	<i>cheZ</i>	- Chemotaktische Antwort				0,85	1		3,73 ± 2,62	2	0,140
b1882	<i>cheY</i>	- Chemotaxis-Regulator	0,60	1		2,14 ± 1,24	2	0,187	3,68 ± 1,06	2	0,049

B-Nr.	Gen	*Funktion	mRNA-Level			mRNA-Level			mRNA-Level		
			(Y-pBR322/Y-pGS87)	n	p-Wert	(YYC202/MG1655)	n	p-Wert	(Y-pGS87/MG1655)	n	p-Wert
b1883	<i>cheB</i>	- Antwort-Regulator der Chemotaxis				1,20	1		3,39 ± 2,89	2	0,198
b1884	<i>cheR</i>	- Antwort-Regulator der Chemotaxis	0,66 ± 0,23	3	0,080	2,30 ± 1,76	3	0,126	3,92 ± 2,89	2	0,145
b1885	<i>tap</i>	- Methyl-akzeptierendes Chemotaxis Protein	0,41 ± 0,06	3	0,003	6,81 ± 7,14	2	0,180	8,98 ± 8,97	2	0,143
b1886	<i>tar</i>	- Methyl-akzeptierendes Chemotaxis Protein	0,59 ± 0,54	3	0,158	5,98 ± 8,72	3	0,230	4,43 ± 3,65	2	0,155
b1887	<i>cheW</i>	- koppelt CheA zu den Chemorezeptoren kontrolliert durch CheW/CheA/Tsr	0,23	1		20,91	1		9,62 ± 8,63	2	0,115
b1888	<i>cheA</i>	- Sensorkinase der Chemotaxis	0,43	1		2,68 ± 1,62	2	0,154	7,09 ± 4,84	2	0,090
b1889	<i>motB</i>	- Flagellen Rotation	0,65 ± 0,28	3	0,113	3,94 ± 4,74	3	0,173	3,82 ± 2,37	2	0,118
b1890	<i>motA</i>	- Flagellen Rotation	0,46	1		2,14	1		5,64 ± 4,85	2	0,142
b1891	<i>flhC</i>	- Regulator der Flagellen-Biosynthese	0,87 ± 0,22	4	0,228	2,40 ± 1,90	3	0,136	2,71 ± 1,73	2	0,164
b1892	<i>flhD</i>	- Regulator der Flagellen-Biosynthese	0,81 ± 0,29	3	0,232	1,51 ± 0,91	3	0,230	2,12 ± 1,61	2	0,261
b1920	<i>fliY</i>	- putatives periplasmatisches Bindepotein	0,94 ± 0,20	7	0,355	0,89 ± 0,08	2	0,135	1,45 ± 0,41	2	0,174
b1921	<i>fliZ</i>	- σ-Faktor F	0,40 ± 0,07	2	0,037	3,27 ± 2,49	3	0,084	3,73 ± 2,48	2	0,130
b1922	<i>fliA</i>	- Flagellen-Biosynthese	0,17	1					6,66 ± 2,19	2	0,039
b1923	<i>fliC</i>	- Flagellen-Biosynthese	0,51 ± 0,83	5	0,034	6,44 ± 3,83	3	0,016	15,60 ± 1,72	2	0,004
b1925	<i>fliS</i>	+ Flagellen-Biosynthese	0,22 ± 0,28	2	0,187	10,11 ± 12,20	2	0,209	3,20 ± 2,45	2	0,179
b1926	<i>fliT</i>	+ Flagellen-Biosynthese	0,42 ± 0,24	2	0,139	0,95	1		1,52 ± 0,17	2	0,046
b1938	<i>fliF</i>	+ Flagellen-Biosynthese	0,38 ± 0,27	3	0,089	1,01 ± 0,40	2	0,446	1,27 ± 0,00	2	0,000
b1939	<i>fliG</i>	+ Flagellen-Biosynthese	0,48 ± 0,26	3	0,076	2,19 ± 1,79	3	0,161	2,25 ± 1,24	2	0,168
b1940	<i>fliH</i>	+ Flagellen-Biosynthese	0,40 ± 0,16	6	0,002	1,10 ± 0,10	2	0,218	1,40 ± 0,18	2	0,079
b1941	<i>fliI</i>	+ Flagellen-Biosynthese	0,63 ± 0,12	3	0,028	1,95 ±	1		2,30 ± 1,49	2	0,199
b1943	<i>fliK</i>	+ Flagellen-Biosynthese	0,41 ± 0,10	4	0,003	9,36 ± 8,36	2	0,115	3,72 ± 2,84	2	0,158

B-Nr.	Gen	*Funktion	mRNA-Level			mRNA-Level			mRNA-Level		
			(Y-pBR322/Y-pGS87)	n	p-Wert	(YYC202/MG1655)	n	p-Wert	(Y-pGS87/MG1655)	n	p-Wert
b1944	<i>fliL</i>	+ Flagellen-Biosynthese	0,36 ± 0,10	3	0,010	2,00 ± 1,01	2	0,174	2,18 ± 1,14	2	0,163
b1945	<i>fliM</i>	+ Flagellen-Biosynthese	0,46 ± 0,45	2	0,217	0,97 ± 0,18	2	0,377	1,29 ± 0,30	2	0,211
b1946	<i>fliN</i>	+ Flagellen-Biosynthese				0,74	1		0,60	1	
b1947	<i>fliO</i>	+ Flagellen-Biosynthese	0,45	1		0,85	1		1,04 ± 0,28	2	0,497
b1948	<i>fliP</i>	+ Flagellen-Biosynthese	0,71	1		1,49 ± 1,17	2	0,402	1,59 ± 1,12	2	0,341
b1949	<i>fliQ</i>	+ Flagellen-Biosynthese				0,98	1		2,08 ± 1,53	2	0,258
b1974	<i>yodB</i>	+ integrales Membranprotein, gehört zur Cytochrom <i>b₅₆₁</i> Familie	2,60 ± 2,67	4	0,101	0,24 ± 0,00	2	0,000	1,51 ± 1,11	2	0,379
b2087	<i>gatR</i>	- Repressor des <i>gat</i> -Operons	1,01	1		0,99 ± 0,31	2	0,435	1,09	1	
b2090	<i>gatR₂</i>	- Repressor des <i>gat</i> -Operons	0,90 ± 0,13	4	0,228	0,89 ± 0,38	3	0,265	0,79 ± 0,29	2	0,231
b2091	<i>gatD</i>	- Galactitol-1-P-DH (Galactitol-1-P + NAD ⁺ → L-Tagatose-6-P + NADH); liegt im <i>gatYZABCD</i>				0,65 ± 0,78	2	0,272	0,43 ± 0,09	2	0,047
b2092	<i>gatC</i>	- galactitolspezifisches IIC-Enzym des PTS-Systems, integrales Membranprotein	3,27 ± 4,26	3	0,255	0,07 ± 0,06	3	0,025	0,14	1	
b2093	<i>gatB</i>	- galactitolspezifisches IIB-Enzym des PTS-Systems	6,72	1		0,31 ± 0,44	3	0,087	0,60 ± 0,08	2	0,040
b2094	<i>gatA</i>	- galactitolspezifisches IIA-Enzym des PTS-Systems	0,99	1		0,13 ± 0,09	3	0,017	0,06 ± 0,02	2	0,022
b2095	<i>gatZ</i>	- Tagatose-6-P-Kinase (ATP + D-Tagatose-6-P → ADP + D-Tagatose-1,6-bisphosphat)				0,06 ± 0,01	3	0,000	0,07 ± 0,01	2	0,004
b2096	<i>gatY</i>	- Tagatose-bisphosphat-Aldolase (D-Tagatose-1,6-bisphosphat → Dihydroxyaceton-P + D-Glycerinaldehyd-3-P)	0,92 ± 0,40	6	0,270	0,16 ± 0,03	2	0,020	0,38 ± 0,05	2	0,019
b2296	<i>ackA</i>	+ Acetat-Kinase (ATP + Acetat → ADP + Acetyl-P)	1,61 ± 1,37	7	0,232	1,87 ± 0,44	3	0,025	3,06 ± 0,36	2	0,015
b2297	<i>pta</i>	+ Phosphotransacetylase (Acetyl-CoA + P _i → CoA + Acetyl-P)	2,13 ± 1,76	6	0,058	1,66 ± 0,51	3	0,053	2,02 ± 1,34	2	0,237
b2335	<i>yfcR</i>	- putatives Fimbrien-Protein (enthält Signalpeptid)	17,99 ± 2,11	2	0,003				0,62	1	

B-Nr.	Gen	*Funktion	mRNA-Level	n	p-	mRNA-Level	n	p-	mRNA-Level	n	p-
			(Y-pBR322/Y-pGS87)		Wert	(YYC202/MG1655)	Wert	(Y-pGS87/MG1655)	Wert		
b2342	<i>yfcY</i>	- putative 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase (Acyl-CoA + Acetyl-CoA ↔ CoA + 3-Ketoacyl-CoA)	6,01 ± 1,43	2	0,025	1,68 ± 0,05	3	0,000	1,79 ± 1,33	2	0,310
b2442	<i>intZ</i>	+ putative Prophagenintegrase				0,10 ± 0,08	3	0,040	0,28 ± 0,22	2	0,125
b2450	<i>yffS</i>	+ ORF				0,07 ± 0,06	3	0,018	0,25 ± 0,01	2	0,000
b2465	<i>tktB</i>	+ Transketolase B (Sedoheptulose-7-P + GAP → Ribose-5-P + Xylulose-5-P); Enzym des Pentosephosphatweges	5,63 ± 0,53	2	0,003	0,66 ± 0,45	3	0,161	0,87 ± 0,57	2	0,333
b2660	<i>ygaF</i>	+ ORF	3,52 ± 0,59	2	0,021	1,00 ± 0,64	3	0,356	1,42 ± 1,22	2	0,458
b2661	<i>gabD</i>	+ Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase (Succinat-Semialdehyd + NAD(P) ⁺ + H ₂ O → Succinat + NAD(P)H)	5,45 ± 1,61	2	0,036				1,21 ± 0,97	2	0,487
b2662	<i>gabT</i>	+ γ-Aminobutyrat-Aminotransferase (γ-Aminobutyrat + 2-Ketoglutarate → Succinat-Semialdehyd + L-Glutamat)	1,10	1					1,49	1	
b2663	<i>gabP</i>	+ γ-Aminobutyrat-Transporter	2,63 ± 3,19	6	0,090	0,96 ± 0,44	3	0,347	1,36 ± 0,97	2	0,425
b2684	<i>mprA</i>	+ Negativer Transkriptions-Regulator der Multidrug-Resistenz-Gene <i>emrAB</i>	3,61 ± 0,64	2	0,023				1,10 ± 0,69	2	0,474
b2976	<i>glcB</i>	- Malat-Synthase G (Acetyl-CoA + H ₂ O + Glyoxylat → L-Malat + CoA)				0,15 ± 0,04	3	0,002	0,50 ± 0,17	2	0,102
b3073	<i>ygjG</i>	+ putative Ornithin-Aminotransferase (L-Ornithin + 2-Ketosäure → L-Glutamat-5-semialdehyd + L-Aminosäure)	5,84 ± 1,53	2	0,030	1,08 ± 0,69	3	0,417	0,77 ± 0,60	2	0,295
b3089	<i>sstT</i>	+ Na ⁺ -Serin-Symporter (Dicarboxylat/Aminosäure:Kation (Na ⁺ oder H ⁺)-Symporter-Familie (DAACS, TC 2.A.23)	7,92 ± 2,32	2	0,029	1,27 ± 0,46	3	0,249	1,40 ± 1,02	2	0,411
b3376	<i>yhfS</i>	- ORF	0,87 ± 0,22	5	0,201	7,10 ± 3,74	3	0,011	4,59 ± 4,75	2	0,221
b3377	<i>yhfT</i>	- putatives Transportsystem	0,92 ± 0,29	5	0,313	6,05 ± 1,88	3	0,005	5,30 ± 5,84	2	0,230
b3378	<i>yhfU</i>	- ORF	1,17 ± 0,43	3	0,310				2,45 ± 1,95	2	0,240

B-Nr.	Gen	*Funktion	mRNA-Level			mRNA-Level			mRNA-Level		
			(Y-pBR322/Y-pGS87)	n	p-Wert	(YYC202/MG1655)	n	p-Wert	(Y-pGS87/MG1655)	n	p-Wert
b3379	<i>yhfV</i>	- putative Hydrolase	1,08 ± 0,31	6	0,272	12,75 ± 3,72	3	0,002	6,46 ± 6,23	2	0,159
b3380	<i>yhfW</i>	- putative Mutase	1,16 ± 0,15	6	0,007	6,14 ± 2,33	3	0,009	4,67 ± 3,71	2	0,142
b3381	<i>yhfX</i>	- ORF									
b3382	<i>yhfY</i>	- ORF	1,94 ± 1,20	7	0,014	16,92 ± 11,16	3	0,012	3,47 ± 2,80	2	0,179
b3509	<i>hdeB</i>	- möglicherweise ähnliche Funktion wie HdeA; liegt in einem Operon mit <i>hdeAB</i>	7,97 ± 6,17	2	0,007	0,92 ± 0,54	3	0,294	0,34 ± 0,22	2	0,124
b3510	<i>hdeA</i>	+ Chaperon für säuredenaturierte Proteine	7,39 ± 1,31	3	0,005	0,92 ± 0,47	3	0,289	0,24 ± 0,10	2	0,065
b3512	<i>yhiE</i>	+ Aktivator der Glutamat-abhängigen Säure-Resistenz	5,51 ± 2,90	3	0,014	1,07 ± 0,77	3	0,401	0,40 ± 0,21	2	0,115
b3517	<i>gadA</i>	- Glutamat-Decarboxylase A (L-Glutamat + H ⁺ → γ-Aminobutyrat + CO ₂)	6,15 ± 0,03	2	0,000	0,85 ± 0,67	3	0,250	0,38 ± 0,34	2	0,172
b3599	<i>mtlA</i>	+ mannitolspezifisches PTS-System; liegt in einem Operon mit <i>mtlADR</i>	4,82 ± 0,53	2	0,066	0,92 ± 0,05	3	0,040	1,98 ± 1,79	2	0,346
b3715	<i>yieH</i>	+ ORF									
b3716	<i>yieI</i>	+ ORF	0,68 ± 0,19	4	0,039	4,71 ± 1,67	3	0,008	4,56 ± 4,32	2	0,189
b3717	<i>yieJ</i>	+ ORF	0,75 ± 0,20	6	0,038	3,67 ± 1,00	3	0,009	4,63 ± 4,44	2	0,192
b3774	<i>ilvC</i>	- Acetohydroxysäure-Isomero-Reduktase (Biosynthese von Valin und Leucin)	1,00 ± 0,57	7	0,340	0,46 ± 0,15	3	0,029	1,29 ± 1,04	2	0,481
b3811	<i>xerC</i>	+ Rekombinase	0,78 ± 0,37	3	0,203	0,34 ± 0,05	3	0,002	0,82 ± 0,24	2	0,223
b3830	<i>ysgA</i>	- putative Dienlacton-Hydrolase	3,93 ± 0,85	2	0,029	0,69 ± 0,09	3	0,017	0,93 ± 0,36	2	0,358
b3831	<i>udp</i>	+ Uridin-Phosphorylase (Uridin + P _i → Uracil + α-D-Ribose-1-P)	1,08 ± 0,33	7	0,244	2,33 ± 0,94	3	0,037	3,11 ± 2,02	2	0,147
b3990	<i>thiH</i>	- Thiamin-Biosynthese; liegt in einem Operon mit <i>thiCEFGH</i>	2,27 ± 0,27	2	0,016	0,94 ± 0,43	2	0,385	1,73 ± 1,45	2	0,366
b4002	<i>yjal</i>	- periplasmatisches Zn-Bindeprotein, welches Zn ²⁺ -abhängig exprimiert wird	0,44 ± 0,02	2	0,000				2,06 ± 0,36	2	0,050

B-Nr.	Gen	*Funktion	mRNA-Level			mRNA-Level			mRNA-Level			
			(Y-pBR322/Y-pGS87)	n	p-Wert	(YYC202/MG1655)	n	p-Wert	(Y-pGS87/MG1655)	n	p-Wert	
b4014	<i>aceB</i>	+ Malat-Synthase A (Acetyl-CoA + H ₂ O + Glyoxylat → L-Malat + CoA)	2,42 ± 2,46	4	0,115					0,12 ± 0,04	2	0,035
b4015	<i>aceA</i>	+ Isocitrat-Lyase (Isocitrat → Succinat + Glyoxylat); liegt im <i>aceBAK</i> -Operon	1,01 ± 0,36	4	0,459	0,15 ± 0,11	3	0,018		0,70 ± 0,13	2	0,095
b4016	<i>aceK</i>	+ Isocitrat-DH-Kinase/Phosphatase (ATP + [Isocitrat-DH] → ADP + [Isocitrat-DH]-P)	4,71 ± 4,86	2	0,207	0,12 ± 0,01	3	0,000		0,19	1	
b4112	<i>basS</i>	- Sensorkinase zu <i>basR</i> ; liegt in einem Operon mit <i>basSR</i>	7,12 ± 2,36	2	0,036					2,17 ± 2,00	2	0,326
b4142	<i>groES</i>	- Chaperon, das bei der Assemblierung von Enzymkomplexen hilft	1,75 ± 0,62	6	0,006	0,81 ± 0,09	2	0,095		1,85 ± 1,47	2	0,321
b4143	<i>groEL</i>	- Chaperon, das unter Stressbedingungen die Fehlfaltung von Proteinen verhindert und die Rückfaltung von entfaltenen Proteinen katalysiert	3,95 ± 0,01	2	0,000	0,97 ± 0,31	3	0,355		1,80 ± 1,19	2	0,273
b4219	<i>msrA</i>	- Protein-Methionin-Sulfoxid-Reduktase (Protein-L-Methioninsulfoxid + reduziertem Thioredoxin → Protein-L-Methionin + oxidiertes Thioredoxin); Reparatur-Enzym für durch Oxidation inaktivierte Proteine	3,99 ± 0,11	2	0,000	0,84 ± 0,09	3	0,041		1,29 ± 1,03	2	0,480
b4243	<i>yjgF</i>	- ORF	0,99 ± 0,09	5	0,277	0,32 ± 0,12	3	0,014		0,31 ± 0,23	2	0,128
b4244	<i>pyrI</i>	- Aspartat-Carbamoyltransferase, regulatorische UE; liegt im <i>pyrBI</i> -Operon	0,80 ± 0,21	3	0,165	0,18 ± 0,07	3	0,007		0,09 ± 0,05	2	0,047
b4245	<i>pyrB</i>	- Aspartat-Carbamoyltransferase, katalytische UE (Carbamoyl-P + L-Aspartat → N-Carbamoyl-L-Aspartat + P _i)	1,85 ± 2,11	5	0,232	0,27 ± 0,19	3	0,030		0,07 ± 0,01	2	0,011
b4246	<i>pyrL</i>	- <i>pyrBI</i> -Operon-Leader-Peptid				0,43 ± 0,13	2	0,078		0,35 ± 0,05	2	0,024
b4378	<i>yjv</i>	+ ORF	4,46 ± 0,96	2	0,158	2,51	1			1,42 ± 1,21	2	0,453

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Michael Bott danke ich für die Überlassung des Themas, für die sorgfältige Durchsicht meiner Arbeit, die erstklassige Betreuung und für das mir entgegengebrachte Vertrauen. Ich danke ihm auch für seine ständige Unterstützung bei den verschiedensten Problemen.

Ich danke natürlich auch allen anderen in der Arbeitsgruppe von Michael Bott, als da wären: Melanie Brocker, Sabine Engels, Armin Kabus, Andreas Krug, Axel Niebisch, Martina Mičková, Kerstin Morjan, Steffen Schaffer, Brita Weil und Mirja Wessel. Ohne sie alle wäre der Laboralltag sicher sehr langweilig geworden. Ich bedanke mich aber auch für die zahlreichen kritischen und weniger kritischen Gespräche.

Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Bei Axel Niebisch, Steffen Schaffer und Brita Weil bedanke ich mich vor allem für die Hilfe bei der Durchführung der 2D-Gelelektrophorese und des MALDI-TOF-MS-Analyse.

Tino Polen danke ich für die sorgfältige Einarbeitung in die DNA-Chip-Technologie und für die kritischen und weniger kritischen Gespräche.

Bei allen anderen Mitarbeitern des Institutes bedanke ich mich für die praktischen Tipps und Tricks, die mir den Laboralltag erleichtert haben.

Verena Rumpf und Michael Gombert danke ich für die Freundschaft, auch über das Studium hinaus, deren Hilfe, Aufmunterung, Ratschläge und Unterstützung von unschätzbarem Wert für mich sind.

Christian und meiner Familie danke ich für die liebevolle Unterstützung und dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für meine Sorgen und Probleme hatten.