

**Untersuchungen zur Fettsäure- und Zellwandsynthese  
sowie zur Glutamatbildung  
mit *Corynebacterium glutamicum***

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

vorgelegt von  
Eva Radmacher  
aus Meerbusch

Jülich 2004

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

Referent: Prof. Dr. H. Sahm

Koreferent: Prof. Dr. K.-E. Jäger

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Dezember 2004

---

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>I. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>II. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>6</b>
<b>1. Bakterienstämme und Plasmide</b>	<b>6</b>
<b>2. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen</b>	<b>9</b>
2.1 Nährmedien	9
2.2 Kultivierung der Bakterien	10
<b>3. Molekulargenetische Methoden</b>	<b>10</b>
3.1 Isolierung von DNA	10
3.2 Restriktion, Modifikation und Rekombination von DNA	11
3.3 Transformation von <i>E. coli</i> und <i>C. glutamicum</i>	11
3.4 Polymerasekettenreaktion	13
3.5 Konstruktion von Integrations- und Deletionsmutanten von <i>C. glutamicum</i>	14
3.6 Sequenzierung und computergestützte Sequenzanalysen	15
<b>4. mRNA-Quantifizierung mittels <i>Real-time</i> quantitativer RT PCR</b>	<b>15</b>
4.1 Isolierung von bakterieller Gesamt-RNA	15
4.2 <i>Real-time</i> PCR	17
4.3 Auswertung der Ergebnisse durch absolute Quantifizierung	18
<b>5. Biochemische Methoden</b>	<b>21</b>
5.1 Proteinbestimmung	21
5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	22
5.3 MALDI-TOF-Massenspektrometrie	22
<b>6. Quantitative Bestimmung von Aminosäuren mittels <i>reversed phase</i> HPLC</b>	<b>23</b>
<b>7. Analyse der Mycolsäuren</b>	<b>23</b>
<b>8. Analyse des Arabinogalaktans</b>	<b>24</b>
<b>9. Transmissionselektronenmikroskopie</b>	<b>25</b>

<b>III. ERGEBNISSE</b>	<b>26</b>
<b>1. Screening nach Glutamatausscheidung induzierenden Substanzen</b>	<b>26</b>
1.1 Isonikotinsäurehydrazid, Hexachlorophen und Triclosan	27
1.2 Cerulenin	28
<b>2. Untersuchungen zur Wirkung von Ethambutol</b>	<b>29</b>
2.1 Einfluss von Ethambutol auf das Wachstum von <i>C. glutamicum</i>	30
2.2 Der Einfluss von Ethambutol auf die Glutamataxkretion	31
2.3 Elektronenmikroskopische Untersuchung Ethambutol-behandelter Zellen	32
2.4 Biochemische Untersuchungen der Wirkung von Ethambutol auf die Zellwandsynthese	33
<b>3. Untersuchungen zur Arabinosyltransferase in <i>C. glutamicum</i></b>	<b>36</b>
3.1 Überexpression von <i>emb</i> in <i>C. glutamicum</i>	36
3.2 Inaktivierung von <i>emb</i>	42
3.4 Expression von <i>emb</i> unter Kontrolle des <i>tetA</i> -Promotors	46
3.5 Deletion des <i>emb</i> -Gens	48
3.6 Untersuchungen zu den mycobakteriellen <i>emb</i> -Genen	56
<b>4. Untersuchungen zur Fettsäuresynthese</b>	<b>62</b>
4.1 Konstruktion einer <i>fasA</i> - und einer <i>fasB</i> -Mutante sowie einer <i>fasAB</i> -Doppelmutante	62
4.2 Untersuchungen zum Wachstum der <i>fas</i> -Mutanten	63
4.3 Untersuchungen zur Glutamataxkretion der <i>fas</i> -Mutanten	66
4.4 Analyse der Lipidzusammensetzung der <i>fas</i> -Mutanten	67
4.5 Untersuchungen zur Mycolsäuresynthese in <i>C. glutamicum</i>	69
4.6 Untersuchung der Funktion der zwei Fas-Enzyme bei Wachstum auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen	71
<b>IV. DISKUSSION</b>	<b>79</b>
<b>1. Ethambutol-induzierte Glutamataxkretion</b>	<b>79</b>
<b>2. Arabinosyltransferase und Arabinogalaktan</b>	<b>81</b>
<b>3. Fettsäuresynthese</b>	<b>83</b>
<b>V. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>86</b>



---

<b>VI. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>87</b>
<b>VII. ANHANG</b>	<b>101</b>
1. Oligonukleotidsequenzen	101
2. Plasmidkarten	104
3. Daten der LightCycler-Analysen	112

**ABKÜRZUNGEN**

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ACP	Acylcarrierprotein
ATCC	Stammsammlung ( <i>American Type Culture Collection</i> )
bp	Basenpaare
Brij 35	Polyoxyethylenlaurylether
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
C	Cytosin
cDNA	Komplementär-DNA ( <i>complementary DNA</i> )
C-/N-Terminus	Carboxy-/Aminoterminus von Proteinen
CoA	Coenzym A
CP	<i>crossing point</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
EMB	Ethambutol
F	Farad
FAMES	Fettsäuremethylester ( <i>fatty acid methylester</i> )
FAS I	Fettsäuresynthase Typ I
FAS II	Fettsäuresynthase Typ II
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde(n)
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid
Kan <sup>R</sup>	Kanamycin-Resistenz
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
L	Liter
LAM	Lipoarabinomannan
LED	Licht emittierende Diode
MALDI-TOF-MS	<i>Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionisation-Time of Flight-Mass Spectrometry</i>
MAMES	Mycolsäuremethylester ( <i>mycolic acid methylester</i> )
min	Minute(n)

---

MOPS	3-( <i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger RNA</i> )
nm	Nanometer
OD <sub>600</sub>	optische Dichte gemessen bei 600 nm
ORF	offenes Leseraster ( <i>open reading frame</i> )
<i>ori</i>	Replikationsursprung ( <i>origin of replication</i> )
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PLG	<i>Phase Lock Gel</i> -Eppendorfreaktionsgefäß
RNA	Ribonukleinsäure
RT PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecylsulfate</i> )
SOOL	dünne elektronendichte äußere Schicht ( <i>small opaque outer layer</i> )
Sp <sup>cR</sup>	Spectinomycin-Resistenz
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tc <sup>R</sup>	Tetracyclin-Resistenz
TFA	Trifluoressigsäure
TG	Trockengewicht
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 60	Polyoxyethylensorbitanmonostearat
Tween 80	Polyoxyethylensorbitanmonooleat
U	spezifische Enzymaktivität (units) [ $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ Protein]
Upm	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen ( <i>volume per volume</i> )
WHO	World Health Organisation
WTOL	breite elektronendurchlässige äußere Schicht ( <i>wide transparent outer layer</i> )
w/v	Gewicht pro Volumen ( <i>weight per volume</i> )



## I. EINLEITUNG

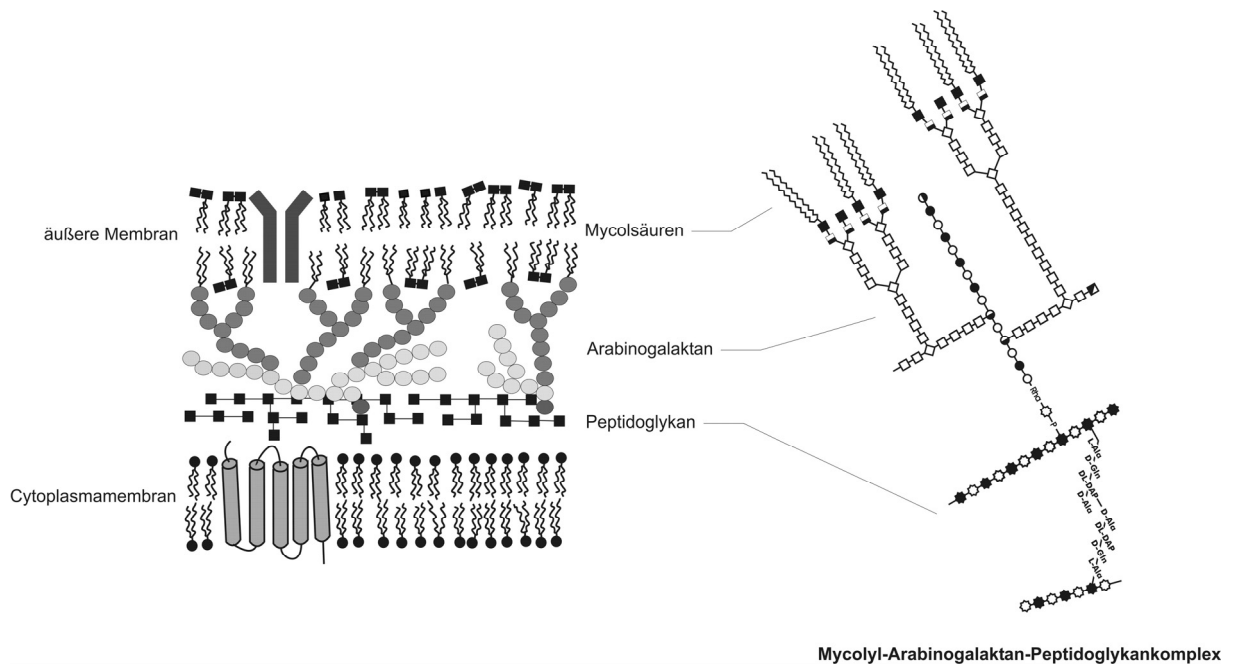
*Corynebacterium glutamicum* ist ein gram-positives und Biotin-auxotrophes Bakterium, das 1957 von Udaka und Kinoshita aus Bodenproben isoliert wurde (Kinoshita *et al.*, 1957). Sie hatten sich zum Ziel gesetzt, Mikroorganismen zu identifizieren, die zur Ausscheidung industriell interessanter Metabolite in der Lage sind (Udaka, 1960). Heutzutage zählen *C. glutamicum* und die Subspezies *flavum* und *lactofermentum* zu den bedeutendsten Mikroorganismen, die bei der industriellen Aminosäureproduktion genutzt werden (Eggeling & Sahm, 1999; Kircher & Leuchtenberger, 1998; Liebl *et al.*, 1991; Kinoshita, 1985). Derzeit werden mit *C. glutamicum* jedes Jahr mehr als  $1,2 \cdot 10^6$  Tonnen L-Glutamat produziert (Leuchtenberger, 1996), das in erster Linie als Geschmacksverstärker dient. Neben L-Glutamat werden jährlich auch  $6,5 \cdot 10^5$  Tonnen L-Lysin biotechnologisch hergestellt (Eggeling & Sahm, 1999). Diese essentielle Aminosäure spielt vor allem eine Rolle als Futtermittelzusatz (Malumbres *et al.*, 1995; Kleemann *et al.*, 1985). Außerdem werden heute zunehmend auch andere Aminosäuren wie z.B. L-Isoleucin, jedoch in wesentlich geringeren Mengen, als Feinchemikalien mit *C. glutamicum* hergestellt.

*C. glutamicum* ist zu einer Gruppe von Bakterien zu zählen, die sich von den übrigen gram-positiven Bakterien abhebt. Die *Corynebacteriaceae* bilden zusammen mit den Familien *Mycobacteriaceae*, *Nocardiaceae*, *Gordoniaceae*, *Dietziaceae* und *Tsukamurellaceae* eine spezielle Unterordnung innerhalb der *Actinomycetales*, die als *Corynebacterianae* bezeichnet wird (Stackebrandt *et al.*, 1997). Zu diesem Taxon zählt man auch einige pathogene Vertreter wie *Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium leprae*. Die Besonderheit der *Corynebacterianae* liegt in ihrem einzigartigen Zellwandaufbau. So enthält die Zellwand dieser Bakterien Komponenten, die für dieses Taxon charakteristisch sind. Das wahrscheinlich wichtigste Merkmal ist das Vorhandensein von Mycolsäuren. Diesen verzweigten Fettsäurederivaten, die die Zellwand als eine zweite Lipidschicht umgeben (Minnikin *et al.*, 1978), verdanken diese Bakterien auch die Bezeichnung Mycolata. Diese zweite Lipidschicht bzw. zusätzliche spezielle Lipide und Glykolipide der Mycobakterien werden für die Pathogenität von *M. tuberculosis* mit verantwortlich gemacht, aufgrund derer jährlich etwa 2 Millionen Menschen sterben (World Health Organisation, 2004).

Der Zellwandaufbau der *Corynebacterianae* ist schematisch in Abb. 1 dargestellt. Die Cytoplasmamembran besteht aus Phospholipiden, deren Fettsäuren in *C. glutamicum* zu etwa 90 % aus Oleat (18:1) und Palmitat (16:0) bestehen (Minnikin *et al.*, 1978). Daneben treten in geringen Mengen Myristinsäure (14:0), Pentadecansäure (15:0), Palmitoleinsäure (16:1), Stearinsäure (18:0) sowie Tuberculostearinsäure (10Me18:0) auf (Collins *et al.*,

1982). Die für ihre Synthese verantwortlichen Fettsäuresynthasen sind modular aufgebaute Enzymkomplexe. Es ist spezifisch für *Corynebacteriaceae*, dass sie wie Eukaryoten Fettsäuresynthasen vom Typ I (Fas I) besitzen, bei denen alle Domänen zu einem großen Polypeptid von etwa 3000 Aminosäureresten fusioniert sind, wogegen in Bakterien wie z.B. *E. coli* die unterschiedlichen katalytischen Domänen als einzelne Peptide vorliegen, die assoziiert den Fettsäuresynthasekomplex Typ II (Fas II) bilden. *C. glutamicum* besitzt wie *C. efficiens* (Nishio *et al.*, 2003) und *C. ammoniagenes* (Stuible *et al.* 1997) sogar zwei Fas I-Enzyme. Zusätzlich liegen im Genom von *C. glutamicum* noch einzelne Domänen des Fas II-Typs vor, die mutmaßlich aber keine wesentliche Funktion haben, da sie in *C. efficiens* (Nishio *et al.*, 2003) und *C. diphtheriae* (Cerdano-Tarraga *et al.*, 2003) abwesend sind. Hingegen besitzen die Mycobakterien zusätzlich zu einem Fas I-Enzym noch zahlreiche Fas II-Module, die an der Kettenverlängerung der Fettsäure des sogenannten Merozweigs der Mycolsäuren in Mycobakterien beteiligt sind (Barry III *et al.*, 1998). Weshalb *C. glutamicum* und die anderen Corynebakterien zwei Fas I Enzyme besitzen, ist nicht bekannt.

Der Cytoplasmamembran aufgelagert ist das Peptidoglycan, das sich aus alternierenden N-Acetyl-Glucosamin- und N-Acetyl-Muraminsäureresten zusammensetzt und die Peptidbrücken L-Alanyl-D-isoglutaminyl-meso-diaminopimyl-D-Alanin aufweist (Schleifer & Kandler, 1972). Bei den *Corynebacteriaceae* ist das Peptidoglycan kovalent über einen Rhamnose-Rest mit dem Zuckerpolymer Arabinogalaktan verbunden (Abb. 1), wo die einzelnen Galaktosereste über 1→5 und 1→6 Bindungen verknüpft sind und zusätzlich Arabinose-Seitenketten aufweisen (Brennan & Nikaido, 1995). Für *M. tuberculosis* ist bekannt, dass im Mittel 23 Arabinose-Einheiten eine Seitenkette bilden (Besra *et al.*, 1995), wogegen bei *C. glutamicum* noch keine strukturelle Information dazu vorliegt, jedoch anhand quantitativer Bestimmungen von kürzeren Arabinose-Seitenketten mit eventuell nur zwei Verzweigungen ausgegangen wird (Puech *et al.*, 2001). Zusätzlich besitzen alle *Corynebacteriaceae* einschließlich *C. glutamicum* das komplexe Glykolipid Lipomannan (Gibson *et al.*, 2003) und die Mycobakterien zusätzlich auch noch Lipoarabinomannan (Besra *et al.*, 1997).



**Abbildung 1:** Auf der linken Seite der Abbildung ist die Zellwand der *Corynebacteriaceae* mit ihren makromolekularen Strukturen und der aus Mycolsäuren bestehenden äußeren Membran dargestellt. Auf der rechten Seite der Abbildung ist die derzeitige Vorstellung zum Mycolyl-Arabinogalaktan-Peptidoglykankomplex, wie er für *M. tuberculosis* postuliert wird, gezeigt. An das terminale Hexaarabinsylmotiv des Arabinogalaktans sind kovalent die Mycolsäuren gebunden. Sterne stellen die N-Acetyl-Glucosamin- und die N-Acetyl-Muraminsäurereste des Peptidoglykans dar, Kreise Galaktosereste und Vierecke Arabinosereste. Die unterschiedlichen Schattierungen veranschaulichen die unterschiedlichen Verknüpfungstypen der Zucker.

Mit den terminalen Arabinoseresten des Arabinogalaktans sind teilweise Mycolsäuren verestert (Abb. 1), sodass ein kovalent verknüpftes Peptidoglykan-Arabinogalaktan-Mycolsäure-Gerüst (Mycolyl-Arabinogalaktan-Peptidoglykankomplex) in der Zellwand vorliegt. Zusätzlich liegt ein Teil der Mycolsäuren in Form von Trehalosemonomycolat und Trehalosedimycolat als extrahierbare Trehalose-Derivate vor. Diese Trehalose-Derivate können Lipidvesikel bilden (Puech *et al.*, 2001) und es ist davon auszugehen, dass sie zusammen mit den kovalent an die Arabinosereste gebundenen Mycolsäuren die äußere Lipidschicht der *Corynebacteriaceae* bilden. Im Unterschied zu *M. tuberculosis* ist der Anteil der kovalent verknüpften Mycolsäurereste in *C. glutamicum* aber wahrscheinlich geringer (Puech *et al.*, 2001). Ferner besteht ein wesentlicher Unterschied zwischen *C. glutamicum* und *M. tuberculosis* in der Natur der Mycolsäuren. So besitzt *C. glutamicum* relativ einfach gebaute Mycolsäuren des Typs 32:0 und 34:1, die sich aus den hauptsächlich vorhandenen Fettsäuren Oleat (18:1) und Palmitat (16:0) zusammensetzen (Collins *et al.*,

1981). Zusätzlich finden sich in erheblich geringerem Maße Mycolsäuren der Zusammensetzung 34:0, 36:0, 36:1, 36:2 (Jang *et al.*, 1997). Demgegenüber sind die Mycolsäuren in *M. tuberculosis* erheblich komplexer. Sie bestehen aus bis zu 90 Kohlenstoffatomen und der Merozweig kann zusätzlich unterschiedliche Modifizierungen wie Keto-, Epoxy-, und Methoxygruppen tragen (Barry III *et al.*, 1998). Es ist deswegen nicht verwunderlich, dass *Corynebacterium*-Spezies wie z.B. *C. matruchotii* schon seit längerem als bevorzugtes Untersuchungsobjekt der in großen Teilen noch unverstandenen Mycolsäuresynthese dienen (Datta & Takayama, 1993; Shimakata & Minatogawa, 2000). Erst kürzlich gelang es, die gesuchte Schlüsselreaktion der Verknüpfung zweier Fettsäuren zur Mycolsäure mit einem spezifischen Genort in *C. glutamicum* in Verbindung zu bringen, der für eine Polyketidsynthase und Carboxylase kodiert (Portevin *et al.*, 2003, Gande *et al.*, 2004).

Es wurde bereits darauf hingewiesen, dass Untersuchungen zur Zellwand bei den Mycobakterien auch bezüglich der Anwendung von außerordentlichem Interesse sind, da einerseits die spezielle Lipidzusammensetzung der Zellhülle eine Permeabilitätsbarriere für einige Antibiotika darstellt (Brennan & Nikaido, 1995) und andererseits in der Therapie benutzte Antibiotika unmittelbar die Zellwand als Wirkort besitzen. So besteht entsprechend den Empfehlungen der WHO die derzeitige Tuberkulose-Therapie in der Behandlung mit Rifampicin, Isonicotinsäurehydrazid, Ethambutol und Pyrizinamid. Wirkort dieser Substanzen ist abgesehen von Rifampicin die bakterielle Zellwand. Isonicotinsäurehydrazid wirkt als Inhibitor der Fas II-Komponenten, die in *M. tuberculosis* an der Verlängerung des Merozweigs der entstehenden Mycolsäuren beteiligt sind (Zhang *et al.*, 1993). Dagegen inhibiert das Antibiotikum Ethambutol ((+)-2,2'-(Ethylendiimino)-di-1-butanol) in noch nicht im Detail verstandener Weise den Arabinogalaktan-Aufbau (Takayama *et al.*, 1979; Takayama & Kilburn, 1989). Es ist ein verminderter Arabinose-Einbau beobachtet worden, der mit einer Akkumulation von  $\beta$ -D-Arabinofuranosyl-1-monophosphodecaprenol einhergeht (Wolucka *et al.*, 1994). Belanger *et al.* (1996) konnten im Genom von *M. avium* den sogenannten *embAB*-Locus identifizieren, der für zwei Arabinosyltransferasen kodiert, die offensichtlich an der Arabinogalaktansynthese beteiligt sind, da Überexpression dieser Gene zur Ethambutol-Resistenz führt. *M. tuberculosis* besitzt sogar drei homologe Arabinosyltransferasen *embABC*, die als Operon organisiert sind (Teleti *et al.*, 1997). Interessanterweise besitzt *C. glutamicum* im Unterschied zu den *Mycobacteriaceae* aber nur ein *emb*-Gen, was wieder ein Hinweis auf einen vergleichsweise einfachen Zellwandaufbau ist. Dies könnte die Analyse der genauen Funktion der *emb*-kodierten Proteine erleichtern.



Neben dem Interesse am Verständnis der Emb-Proteine und der Synthese der Mycolsäuren sind Untersuchungen zur Zellwandsynthese von *C. glutamicum* aber auch noch von weiterer Bedeutung. So ist bekannt, dass neben Exportern auch die Synthese von Zellwandkomponenten und die Struktur der Zellwand die Aminosäureakkumulation beeinflussen können. So zeigen z.B. Mutanten von *C. glutamicum* mit Defekt in der Trehalosesynthese und reduzierten Trehalosemycolaten eine signifikante Erhöhung der L-Glutamatakkumulation von  $40,2 \text{ g l}^{-1}$  auf  $45,6 \text{ g l}^{-1}$  (Nakamura *et al.*, 2002). Auch was die L-Lysinproduktion betrifft, beeinflusst die Mycolsäureschicht den Aminosäureefflux. Eine in der Mycolsäuresynthese defekte Mutante bildet überhaupt keine Mycolsäuren mehr (Tzvetkov *et al.*, 2003) und exkretiert im Vergleich zum Ausgangsstamm 37 % mehr L-Lysin (Wolf *et al.*, 2003). Insbesondere ist von starkem Interesse, welcher Zusammenhang zwischen den verschiedenen Möglichkeiten besteht, die L-Glutamatakkumulation von *C. glutamicum* zu induzieren, da diese alle in Richtung Zellwandveränderung als notwendige Maßnahme weisen (Eggeling *et al.*, 2001). Die wahrscheinlich am besten untersuchte Methode beruht auf Biotin-Limitation (Hoischen & Krämer, 1990), wobei davon auszugehen ist, dass der Biotin-Mangel die Aktivität der Biotin-abhängigen Acetyl-CoA-Carboxylase hemmt. Somit käme die L-Glutamatausscheidung durch Veränderungen der Zellmembran bzw. Zellwand als Folge einer reduzierten Fettsäuresynthese zustande. Durch Behandlung von *C. glutamicum* mit Penicillin wird in die Synthese der Zellwandkomponente Peptidoglykan eingegriffen (Nunheimer *et al.*, 1970). Neben diesen und weiteren Methoden, die alle auf die Zusammensetzung der Zellhülle abzielen, ist die Ausscheidung von L-Glutamat auch bei Mutanten zu beobachten, die in der Fettsäure- bzw. Zellwandsynthese beeinträchtigt sind (Hirasawa *et al.*, 2000).

Vor diesem Hintergrund wurden in dieser Arbeit zwei Ziele verfolgt. Zum einen sollten Erkenntnisse zur Synthese der komplexen Zellhülle des industriell relevanten Bakteriums *C. glutamicum* gewonnen werden, um dadurch den Prozess der Glutamatausscheidung und möglicherweise auch der Ausscheidung anderer Aminosäuren besser zu verstehen. Zum anderen bietet es sich an, das biochemisch einfachere und erheblich schneller wachsende Bakterium *C. glutamicum* dazu zu nutzen, mehr über grundlegende Mechanismen der Zellwandsynthese des pathogenen Bakteriums *M. tuberculosis* zu erfahren.

## II. MATERIAL UND METHODEN

### 1. Bakterienstämme und Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme sowie deren Eigenschaften sind in Tabelle 1 und die verwendeten Plasmide in Tabelle 2 aufgeführt.

**Tabelle 1:** Verwendete Bakterienstämme und ihre relevanten Charakteristika.

Bakterienstamm	Genotyp / Charakteristikum	Referenz
<b><i>E. coli</i></b>		
DH5 $\alpha$ MCR	<i>endA1 supE44 thi-1 <math>\lambda^-</math> recA1 gyrA96 relA1 deoR <math>\Delta</math>(lacZYA-argF) U169 <math>\phi</math>80dlacZ<math>\Delta</math>M15 <i>mcrA <math>\Delta</math>(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i></i>	Grant <i>et al.</i> , 1990
<b><i>C. glutamicum</i></b>		
ATCC13032	Wildtyp	Abe <i>et al.</i> , 1967
13032 :: <i>emb</i>	Wildtyp mit Disruption des <i>emb</i> -Gens durch pK18 <i>mob</i> nach 1600 bp	diese Arbeit
13032 P <sub><i>tetA</i></sub> - <i>emb</i>	Wildtyp mit Austausch des <i>emb</i> -Promotors gegen den <i>tetA</i> -Promotor	diese Arbeit
13032 $\Delta$ <i>emb</i>	Wildtyp mit Deletion eines 3363 bp internen <i>emb</i> -Fragments	diese Arbeit
13032 :: <i>fasA</i>	Wildtyp mit Disruption des <i>fasA</i> -Gens durch pK18 <i>mob</i> nach 4440 bp	diese Arbeit
13032 $\Delta$ <i>fasB</i>	Wildtyp mit Deletion eines 6132 bp internen <i>fasB</i> -Fragments	diese Arbeit
13032 $\Delta$ <i>fasB</i> :: <i>fasA</i>	Wildtyp mit einer Deletion des <i>fasB</i> -Gens und mit einer Disruption des <i>fasA</i> -Gens durch pK18 <i>mob</i>	diese Arbeit

**Tabelle 2:** Verwendete Plasmide mit ihren Charakteristika und Markern.

Plasmid	Charakteristikum / Marker	Referenz
pEC-S18 <i>mob2</i>	Spc <sup>R</sup> , oriV <sub>E.c.</sub> , oriV <sub>C.g.</sub>	Kirchner & Tauch, 2003
pEC-T18 <i>mob2</i>	Tc <sup>R</sup> , oriV <sub>E.c.</sub> , oriV <sub>C.g.</sub>	Kirchner & Tauch, 2003
pEKEx2	Kan <sup>R</sup> , P <sub>tac</sub> , lacI <sup>q</sup>	Eikmanns <i>et al.</i> , 1991
pEKEx3	Spc <sup>R</sup> , P <sub>tac</sub> , lacI <sup>q</sup>	diese Arbeit
pJC1	Kan <sup>R</sup> , oriV <sub>E.c.</sub> , oriV <sub>C.g.</sub>	Cremer <i>et al.</i> , 1990
pZ1	Kan <sup>R</sup> , oriV <sub>E.c.</sub> , oriV <sub>C.g.</sub>	Menkel <i>et al.</i> , 1989
pK18 <i>mob</i>	Integrationsvektor, Kan <sup>R</sup> , oriV <sub>E.c.</sub> , oriT, <i>mob</i>	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pK19 <i>mobsacB</i>	Integrationsvektor, Kan <sup>R</sup> , oriV <sub>E.c.</sub> , oriT, <i>mob</i> , <i>sacB</i>	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pWH853	Amp <sup>R</sup> ; pBR322-Derivat mit dem Tn10 <i>tetR</i> -Gen	Wissmann <i>et al.</i> , 1991
pWH1012	Amp <sup>R</sup> ; pCB302b-Derivat mit Tn10 P <sub>tetA</sub>	Sizemore <i>et al.</i> , 1990
pJC1:: <i>tetR</i>	pJC1-Derivat mit Tn10 <i>tetR</i> -Gen	Schaffer, unveröffentlicht
pJC1::P <sub>gap</sub> - <i>tetR</i>	pJC1:: <i>tetR</i> -Derivat mit Promotor des <i>gap</i> -Gens integriert vor dem <i>tetR</i> -Gen	Schaffer, unveröffentlicht
pK19 <i>mobsacB</i> :: <i>clpP</i>	pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat mit den flankierenden Bereichen (je ca. 0,5 kb lang) des <i>clpP1P2</i> -Promotors aus <i>C. glutamicum</i>	Schaffer, unveröffentlicht
pK19 <i>mobsacB</i> P <sub>tetA</sub> - <i>clp</i>	pK19 <i>mobsacB</i> :: <i>clpP</i> -Derivat mit Tn10 P <sub>tetA</sub> aus pWH1012 inseriert zwischen den flankierenden Bereichen des <i>clpP1P2</i> -Promotors aus <i>C. glutamicum</i>	Schaffer, unveröffentlicht
pK19 <i>mobsacB</i> P <sub>tetA</sub> - <i>emb</i>	pK19 <i>mobsacB</i> -Derivat mit Tn10 P <sub>tetA</sub> inseriert zwischen die flankierenden Bereiche (je ca. 0,5 kb lang) des <i>emb</i> -Promotors aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit

**Tabelle 2 (ff):** Verwendete Plasmide mit ihren Charakteristika und Markern.

Plasmid	Charakteristikum / Marker	Referenz
pEC-S18 <i>mob2 emb</i>	pEC-S18 <i>mob2</i> mit <i>emb</i> -Gen unter nativem Promotor	diese Arbeit
pEC-T18 <i>mob2 emb</i>	pET-S18 <i>mob2</i> mit <i>emb</i> -Gen unter nativem Promotor	diese Arbeit
pEKEx2 <i>emb</i>	pEKEx2 mit <i>emb</i> -Gen aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pEKEx2 <i>Mt_embA</i>	pEKEx2 mit <i>Mt_embA</i> -Gen	diese Arbeit
pEKEx2 <i>Mt_embB</i>	pEKEx2 mit <i>Mt_embB</i> -Gen	diese Arbeit
pEKEx2 <i>Mt_embC</i>	pEKEx2 mit <i>Mt_embC</i> -Gen	diese Arbeit
pEKEx3 <i>emb</i>	pEKEx3 mit <i>emb</i> -Gen aus <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pEKEx3 <i>Mt_embA</i>	pEKEx3 mit <i>Mt_embA</i> -Gen	diese Arbeit
pEKEx3 <i>Mt_embB</i>	pEKEx3 mit <i>Mt_embB</i> -Gen	diese Arbeit
pEKEx3 <i>Mt_embC</i>	pEKEx3 mit <i>Mt_embC</i> -Gen	diese Arbeit
pK18 <i>mob emb</i> <sub>int</sub>	pK18 <i>mob</i> mit einem 230 bp großen internen <i>emb</i> -Fragment	diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB</i> $\Delta$ <i>emb</i>	pK19 <i>mobsacB</i> mit <i>emb</i> -Sequenz, deletiert ist ein internes 3363 bp großes Fragment	diese Arbeit
pK18 <i>mob fasA</i> <sub>int</sub>	pK18 <i>mob</i> mit einem 1178 bp großem internen <i>fasA</i> -Fragment	diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB</i> $\Delta$ <i>fasB</i>	pK19 <i>mobsacB</i> mit <i>fasB</i> -Sequenz, deletiert ist ein internes 6132 bp großes Fragment	diese Arbeit

Restriktionskarten befinden sich im Anhang.

## 2. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

### 2.1 Nährmedien

#### Nährmedien für *Escherichia coli*

Zur Kultivierung von *E. coli*-Stämmen wurde im Allgemeinen LB-Vollmedium nach Sambrook *et al.* (1989) verwendet.

#### Nährmedien für *Corynebacterium glutamicum*

Zur Stammhaltung und DNA-Isolierung wurde LB-Vollmedium verwendet. Als Vollmedium für Vorkulturen wurde BHI-Komplexmedium (Difco Laboratories, Detroit, USA) oder CGIII-Medium (Menkel *et al.*, 1989) eingesetzt. Für alle Kultivierungen zur Quantifizierung der Aminosäureproduktion wurde das Minimalmedium CGXII (Keilhauer *et al.*, 1993) mit 4 % (w/v) Glucose und 30 mg/L Protokatechusäure benutzt. Dieses Medium besitzt durch den Zusatz von 3-(*N*-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS) sehr gute Puffereigenschaften im pH-Bereich um 7,0. Zur Regeneration der Zellen nach der Elektroporation wurde BHIS-Medium (BHI-Komplexmedium mit 0,5 M Sorbitol) verwendet. In diesem Medium fand auch die Kultivierung der schlecht wachsenden Zellwandmutanten statt.

#### Medienzusätze

Zur Selektion rekombinanter *E. coli*-Stämme wurden dem Medium Antibiotika in den folgenden Endkonzentrationen zugesetzt:

Kanamycin	50 µg/mL (unmittelbar nach der Transformation)
	25 µg/mL (zur Vermeidung von Plasmidverlust)
Tetracyclin	5 µg/mL
Spectinomycin	100 µg/mL

Die Selektion rekombinanter *C. glutamicum*-Stämme erfolgte mit:

Kanamycin	50 µg/mL (bei frei replizierbaren Vektoren)
	25 µg/mL (bei Integration eines Vektors ins Genom)
	15 µg/mL (unmittelbar nach der Elektroporation)
Tetracyclin	5 µg/mL
Spectinomycin	250 µg/mL

Die Selektion auf Exzision der Vektoren pK19*mobsacB*  $\Delta$ *emb* und pK19*mobsacB*  $\Delta$ *fasB* aus dem Genom von *C. glutamicum* erfolgte auf LB-Medium mit 10 % (w/v) Saccharose (Schäfer *et al.*, 1994).

Zur Herstellung von Agarplatten wurden die Medien mit 1,5 % (w/v) Agar (Difco Laboratories, Detroit, USA) versetzt.

## 2.2 Kultivierung der Bakterien

Die Kultivierung von *E. coli* und *C. glutamicum* erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in 500 mL Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen. Diese enthielten jeweils 50 mL Vollmedium bzw. CGXII-Minimalmedium. Für Plasmidisolierungen im kleineren Maßstab wurden 5 mL LB-Vollmedium im Reagenzglas verwendet. Kulturen in Reagenzgläsern wurden unter Schütteln bei einer Geschwindigkeit von 170 Upm, alle anderen Kulturen bei einer Geschwindigkeit von 120 Upm inkubiert. Die Kultivierungstemperatur betrug 37 °C für *E. coli* und 30 °C für *C. glutamicum*. Zur Bestimmung von Aminosäurekonzentrationen wurden die Zellen über Nacht auf Komplexmedium vorkultiviert und dann in Minimalmedium übertragen. Dazu wurden Aliquots der Vorkulturen steril entnommen, 10 min bei 4000 Upm und 4 °C abzentrifugiert, mit 30 mL steriler 0,9 %-iger (w/v) NaCl-Lösung gewaschen und dann in Minimalmedium überführt. Dabei wurde, wenn nicht anders angegeben, eine anfängliche Zelldichte von  $OD_{600} = 0,5$  eingestellt.

Zur Stammhaltung wurden Dauerkulturen angelegt. Dazu wurden 2 mL von einer über Nacht auf Komplexmedium angezogenen Kultur abzentrifugiert und in einem Gemisch aus 50 % LB und 50 % sterilem Glycerin resuspendiert. Aliquots dieser Zellsuspensionen wurden bei -20 °C oder -70 °C aufbewahrt und zum Beimpfen von Agarplatten verwendet. Diese Stammhaltungsplatten wurden im Fall von *E. coli* für 18 Stunden bei 37 °C bzw. im Fall von *C. glutamicum* für 48 Stunden bei 30 °C inkubiert, dann bei 4 °C gelagert und 14-tägig erneuert.

## 3. Molekulargenetische Methoden

### 3.1 Isolierung von DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde der *QIAprep Spin Miniprep Kit* der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Das Prinzip dieses Kits beruht auf der alkalischen Lyse von Bakterienzellen nach Birnboim und Doly (1979). Um Plasmid-DNA aus *C. glutamicum* zu isolieren, wurde eine modifizierte Form der alkalischen Lyse verwendet (Schwarzer & Pühler, 1991). Auch hier erfolgte die Isolierung von Plasmid-DNA nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Allerdings ist bei *C. glutamicum* aufgrund der besonders stabilen Zellwand zur

effektiven Lyse der Bakterienzellen eine vorhergehende Behandlung der Zellen mit Lysozym (15 mg/mL) erforderlich. Die Isolierung chromosomaler DNA aus *C. glutamicum* erfolgte mit dem *DNeasy Tissue Kit* (Qiagen, Hilden).

### 3.2 Restriktion, Modifikation und Rekombination von DNA

Alle Techniken zur Restriktion, Präzipitation, Phenol-Chloroform-Extraktion, Klenow- oder alkalische Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Für analytische Restriktionen wurde die DNA 1 h mit 2 U des entsprechenden Restriktionsenzym pro µg DNA inkubiert, präparative Restriktionen wurden für mindestens 4 h mit 6 U Restriktionsenzym pro µg DNA inkubiert. Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 0,8 bis 2 %-igen TAE-Agarosegelen (Sambrook *et al.*, 1989). Wurden die im Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente für weitere Klonierungsschritte benötigt, so wurden sie mit dem *QIAExII Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) aus dem Gel isoliert. Die Reinigung der DNA-Fragmente zwischen den einzelnen Klonierungsschritten erfolgte mit Hilfe des *NucleoSpin Extract 2 in 1 Kit* (Macherey & Nagel) und im Fall von PCR-Fragmenten mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen, Hilden). Zur Modifikation überhängender 5'-Enden wurden diese mittels Klenow-Polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim) unter Zugabe von Desoxynukleotiden zu glatten Enden aufgefüllt, überhängende 3'-Enden wurden mit dem gleichen Enzym zu glatten Enden abgebaut (Sambrook *et al.*, 1989). Linearisierte Vektoren wurden mit alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics, Mannheim) am 5'-Ende dephosphoryliert, um in einer Ligation die Rezirkularisierung des Vektors zu verhindern. Ligationen wurden mit dem *Rapid Ligation Kit* (Roche Diagnostics, Mannheim) für 15 min bei Raumtemperatur durchgeführt.

### 3.3 Transformation von *E. coli* und *C. glutamicum*

#### Transformation von *E. coli*

Zur Transformation von *E. coli* wurden die Zellen mit Rubidium- und Caesiumchlorid behandelt. Dazu wurden die Zellen in 50 mL SOB- oder LB-Medium angezogen und nach Erreichen einer  $OD_{600}$  von ca. 0,15 geerntet. Die weitere Durchführung erfolgte nach der Methode nach Hannahan (1983). Zur Transformation wurden 200 µL kompetente *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA bzw. einem Ligationsansatz gemischt. Durch anschließende 30 minütige Inkubation auf Eis sollte die Anlagerung der DNA an die Zellen erreicht werden.

Ein kurzer Hitzeschock (90 s, 42 °C) diente der Unterstützung der DNA-Aufnahme in die Zellen. Danach wurden die Zellen zur Regeneration für 45 min bei 37 °C in 800 µL LB-Medium inkubiert. Diese Inkubation unter leichtem Schütteln ermöglichte sowohl die Regeneration der Zellen als auch die Ausprägung der Resistenz vor dem Ausplattieren auf Antibiotika-haltigen LB-Agarplatten.

### **Transformation von *C. glutamicum***

Zur Transformation von *C. glutamicum* wurde die Methode der Elektroporation mit anschließendem Hitzeschock angewandt (Tauch *et al.*, 2002). Dazu wurden 50 mL BHIS-Medium (BHI-Komplexmedium mit 0,5 M Sorbitol) mit einer Einzelkolonie von *C. glutamicum* angeimpft und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden 5 mL der Vorkultur in 250 mL BHIS-Medium überimpft (2 L Kolben mit zwei seitlichen Schikanen) und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,75 inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten Zelldichte wurden die Zellen in zwei JA-14 Zentrifugenbecher überführt und durch Zentrifugation geerntet (20 min, 6000 Upm, 4 °C). Die Zellen wurden nachfolgend dreimal mit 20 mL eiskaltem TG-Puffer (1 mM Tris, 10 % Glycerin, pH 7,5) gewaschen und weitere zweimal mit 50 mL eiskaltem 10 %-igem (v/v) Glycerin gewaschen, anschließend in 1 mL eiskaltem 10 %-igem (v/v) Glycerin resuspendiert, in Aliquots von 150 µL in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -70 °C gelagert. Zur Elektroporation wurden 150 µL Zellen mit der zu transformierenden DNA gemischt und luftblasenfrei in eine vorgekühlte, sterile Elektroporationsküvette (Typ 16 S 2086, Biorad, München) überführt. Der Ansatz wurde mit 0,8 mL 10 %-igem (v/v) Glycerin überschichtet. Die Elektroporation wurde dann bei einer Spannung von 2,5 kV, einem Parallelwiderstand von 200 Ω und einer Kondensatorkapazität von 25 µF in einem BIORAD GENE PULSER™ (Biorad, München) durchgeführt. Sofort nach Beendigung des elektrischen Pulses wurde die Zellsuspension in 4 mL BHIS-Medium aufgenommen, in ein 15 mL Falcon-Röhrchen überführt und 6 min bei 46 °C inkubiert. Dieser Hitzeschock inaktiviert vermutlich das Restriktionssystem von *C. glutamicum*, sodass bei Verwendung heterologer DNA eine höhere Transformationseffizienz erreicht werden kann (Schäfer *et al.*, 1994). Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen für 60 min bei 30 °C unter Schütteln regeneriert, bevor die Zellsuspension auf Antibiotika-haltigem BHIS-Medium ausplattiert wurde.



### 3.4 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde sowohl zur *in vitro* Vervielfältigung von DNA-Fragmenten (Saiki *et al.*, 1988; Tindall & Kunkel, 1988) als auch analytisch zur Überprüfung von Integrations- und Deletionsmutanten eingesetzt. Dabei wurden jeweils zwei Oligonukleotide als Primer eingesetzt, die den zu amplifizierenden DNA-Bereich flankierten. Das PCR-Programm bestand aus einem einmaligen Denaturierungsschritt von 2 min bei 94 °C (hot start) und einem sich wiederholenden Zyklus aus DNA-Denaturierung bei 94 °C, Primeranlagerung (annealing) bei 55-65 °C und Verlängerung (Elongation) der Primer mittels DNA-Polymerase bei 72 °C. Dies ermöglicht eine exponentielle Amplifizierung des durch die Primer begrenzten DNA-Fragmentes. Zur Durchführung der PCR wurde ein Thermocycler der Firma Biozym Diagnostik (Oldendorf) verwendet. Als Matrizen-DNA wurde üblicherweise genomische DNA aus durch Hitzebehandlung aufgeschlossener Bakterienzellen verwendet. Dazu wurde eine Kolonie des zu untersuchenden Stammes in 100 µL sterilem Wasser resuspendiert und die Suspension für 10 min bei 95 °C inkubiert, um die Zellen aufzuschließen. Nur in Ausnahmefällen, wie zum Beispiel zur Amplifikation besonders langer Fragmente, wurde mit dem *Dneasy Kit* (Qiagen, Hilden) isolierte genomische DNA aus *C. glutamicum* verwendet. Die *annealing*-Temperatur wurde aus der Basenzusammensetzung der verwendeten Primer (siehe Anhang) mit folgender Formel berechnet: *annealing*-Temperatur = 2 °C (pro A-T-Basenpaarung mit der Matrizen-DNA) + 4 °C (pro G-C-Paarung) - 5 °C (Sambrook *et al.*, 1989). Die DNA-Polymerisation erfolgte bei 72 °C und bei Fragmenten größer als 3 kb bei 68 °C. Die Elongationszeit richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments. Die *Taq*-Polymerase synthetisiert etwa 1000 Basen pro Minute, sodass die Polymerisationszeit durch Multiplikation der Länge des erwarteten PCR-Fragments in Kilobasen mit 1,5 min errechnet wurde. Es wurden jeweils 30 Zyklen durchgeführt. Nach Beendigung der Reaktion wurde ein Aliquot jedes Ansatzes entnommen und durch Agarosegelelektrophorese analysiert. Wurden die amplifizierten DNA-Fragmente für weitere Klonierungsschritte benötigt, wurden sie mit Hilfe des *Qiaex Kit* (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten, die für weitere Klonierungsschritte benötigt wurden, wurde mit dem *Expand High Fidelity Kit* (Roche Diagnostics, Mannheim) durchgeführt. Die *emb*-Gene aus *C. glutamicum* und *M. tuberculosis* wurden für ihre Klonierung mit der *KOD Hot Start DNA Polymerase* (Merck Biosciences, Darmstadt) amplifiziert. Die Insertions- und Deletionsmutanten wurden mit *Taq*-DNA-Polymerase (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers überprüft.

### 3.5 Konstruktion von Integrations- und Deletionsmutanten von *C. glutamicum*

Die Technik der *cross over* PCR (Link *et al.*, 1997) diente dazu, in zwei PCR-Schritten Deletionskonstrukte zu erhalten. Im ersten Schritt wurden in zwei getrennten PCR-Reaktionen Fragmente, die im Chromosom stromaufwärts bzw. stromabwärts des zu deletierenden Gens liegen, generiert. Die Durchführung der PCR erfolgte wie bereits beschrieben außer, dass die Primerpaare in einem molaren Verhältnis von 10:1 (600 nM äußerer Primer und 60 nM innerer Primer) eingesetzt wurden. Im zweiten Schritt erfolgte die gegenseitige Anlagerung der zwei amplifizierten Fragmente an komplementären Regionen, die bereits an die inneren Primer angefügt worden waren, und die Amplifizierung als ein einziges Fragment durch die äußeren Primer. Dabei wurde jeweils 1 µL der Fragmente der ersten beiden PCR-Reaktionen und 600 nM der äußeren Primer in der PCR eingesetzt. Das erhaltene Fusionsprodukt wurde mit dem *QiaexII Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) gereinigt. Daraufhin wurden sowohl das PCR-Produkt als auch der Vektor pK19*mobsacB* (Schäfer *et al.*, 1994) mit dem gleichen Restriktionsenzym geschnitten und nach Dephosphorylierung des linearisierten Vektors ligiert. Anschließend wurden kompetente Zellen von *E. coli* DH5α mit dem gesamten Ligationsansatz transformiert. Unter den erhaltenen Klonen wurde durch Restriktion der präparierten Plasmide auf Klone, die Plasmide mit Insert trugen, getestet. Der fertige Deletionsvektor wurde mittels Elektroporation in *C. glutamicum* eingebracht und einige Kolonien der so erhaltenen Integrianten in 5 mL LB angezogen, eine Verdünnungsreihe angelegt und auf LB-Platten, die 10 % Saccharose enthielten, ausplattiert. Durch die von *sacB* kodierte Levan-Sucrase wird Saccharose zum toxischen Levan polymerisiert und es kommt zu einer induzierten Lethalität (Bramucci & Nagarajan, 1996). Die Saccharose-Platten wurden auf LB-Agar mit Kanamycin übergeimpft, um auf Verlust des Deletionsvektors zu selektieren. Zuletzt wurden die gesuchten Deletionsklone mittels PCR identifiziert, bei der Primer eingesetzt wurden, die im Chromosom außerhalb des deletierten Bereichs binden.

Integrationsmutanten wurden erzeugt, indem in den Vektor pK18*mob*, der in *C. glutamicum* nicht replizierbar ist, ein internes Fragment des zu unterbrechenden Gens kloniert wurde. Nach Einbringen des Plasmides durch Elektroporation wurden durch Selektion auf die durch das Plasmid vermittelte Antibiotika-Resistenz Integrationsstämme isoliert und mittels PCR überprüft.

### 3.6 Sequenzierung und computergestützte Sequenzanalysen

Die Sequenzierung klonierter DNA erfolgte nach dem Prinzip des Kettenabbruchs nach Sanger *et al.* (1977). Die nach der Aufreinigung durch *Qiaprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Hilden) hochreine DNA wurde durch die Firmen AGOWA (Berlin) oder MWG (Ebersberg) sequenziert.

Zur Analyse von Restriktionsschnittstellen und offenen Leserahmen wurde das Programm *Clone Manager* (Version 6; Scientific & Educational Software) verwendet. Zum Sequenzvergleich von Polypeptiden wurde das *Multiple Sequence Alignment* Programm ClustalW 1.8 (Jeanmougin *et al.*, 1998) und ClustalX (EMBL, Heidelberg) verwendet. Die Datenbankvergleiche zur Suche nach DNA- und Proteinsequenzen mit Ähnlichkeit zu den in dieser Arbeit bearbeiteten Sequenzen erfolgte mittels der Programme *BLASTX*, *BLASTN* und *BLASTP* (Altschul *et al.*, 1997), mit den am *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, Washington, USA; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) zur Verfügung stehenden Datenbanken, mit der Datenbank des *European Molecular Biology Laboratory* (<http://www.embl-heidelberg.de>) und mit Hilfe von ERGO (Integrated Genomics, Chicago, USA).

## 4. mRNA-Quantifizierung mittels *Real-time* quantitativer RT PCR

### 4.1 Isolierung von bakterieller Gesamt-RNA

Zur Isolierung bakterieller Gesamt-RNA wurde ein Aliquot der Bakterienkultur (~25 mL) in der exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{600} = 5$ ) mit 20 g Eis im Falcongefäß geerntet (4000 Upm, 4°C, 5 min). Das Zellpellet wurde dann entweder direkt weiterverarbeitet oder bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert (Berstein *et al.*, 2002; Khodursky *et al.*, 2003). Frisch abzentrifugierte oder gefrorene Pellets wurden mit dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden) weiterverarbeitet. Dazu wurden die Zellen in 350 µL des RNeasy-RLT-Puffers resuspendiert und mit 0,5 g Zirkonium/Silica-Kugeln ( $\varnothing$  0,1-0,13 mm) der Firma Roth (Karlsruhe) mechanisch 1 x 30 s im Silamat S5 (Vivadent, Ellwangen) aufgeschlossen. Nach Zentrifugation (2 min, 13000 Upm) wurde der Überstand (maximal 700 µL) zur Isolierung der Gesamt-RNA auf die *RNeasy*-Säulchen aufgetragen (Qiagen, Hilden). Die auf Silica-Gel basierenden Membranen der Säulchen binden in Anwesenheit von absolutem Ethanol (250 µL) und einer spezifischen Salzpufferkonzentration selektiv einzelsträngige RNA-Moleküle ab einer Größe von 200 Basenpaaren. Nach einem

ersten Waschschrift nach Herstellerangaben wurde die adsorbierte RNA mit 30 U RNase freier DNase I (*RNase-Free DNase Set*, Qiagen, Hilden) auf der Säulchenmembran für 15 min inkubiert. Danach folgten zwei weitere Waschschriffe bevor die RNA mit zweimal 50 µL RNase freiem Wasser vom Säulchen eluiert wurde.

### **DNase-Verdau**

Die präparierte RNA wurde einem zweiten DNase-Verdau unterzogen. Dazu wurden 100 µL Probe mit 10 µL 10-fach DNase-Puffer (1 M Natriumacetat, 50 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 5,0) und 30 U RNase freier DNase (Roche Diagnostics, Mannheim) für 20 min bei 37 °C inkubiert. Es folgte die Inaktivierung des Enzyms für 10 min bei 70 °C.

### **Phenol-Chloroform-Extraktion**

Um hochreine und DNA freie RNA zu erhalten, wurde die isolierte RNA im Folgenden durch eine zusätzliche Phenol-Chloroform-Extraktion weiter aufgereinigt (Sambrook *et al.*, 1989). Dazu wurden die 60 µL RNA mit RNase freiem Wasser auf ein Volumen von 100 µL eingestellt, danach mit 100 µL Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und vermischt. Die phenolhaltige Lösung wurde daraufhin in ein entsprechend vorbereitetes PLG (*Phase Lock Gel*-Eppendorfreaktionsgefäß, *Eppendorf*, Hamburg) gegeben und für 15 min bei 12000 g zentrifugiert. Das im PLG verwendete Gel setzt sich dabei zwischen der wässrigen und der phenolhaltigen Phase ab und ermöglicht auf diese Weise eine einfache und sichere Entnahme der wässrigen RNA-Lösung (Chirgwin *et al.*, 1979; Chomczynski *et al.*, 1987). Durch die Zugabe von 100 µL Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) erfolgte ein zusätzlicher Extraktionsschritt (15 min, 12000 g). Der Überstand wurde vorsichtig in ein neues 1,5 mL Eppendorfreaktionsgefäß überführt und mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat sowie 3 Volumen absolutem Ethanol versetzt. Das Gemisch wurde über Nacht bei -20 °C inkubiert. Danach wurde abermals zentrifugiert und das Pellet durch Zugabe von 1 mL Ethanol (75 %) gewaschen (5 min, 7500 g), anschließend in der Vakuumzentrifuge getrocknet und die RNA in 60 µL RNase freiem Wasser aufgenommen.

Die RNA-Konzentration sowie die Reinheit ( $E_{260}/E_{280} \sim 1,8-2,2$ ) der isolierten RNA-Lösungen wurden photometrisch bei den Wellenlängen 230 nm, 260 nm und 280 nm gemessen. Mittels denaturierender Formamid-Gelelektrophorese (Sambrook *et al.*, 1989) wurden die RNA-Konzentration und die Reinheit der RNA zusätzlich überprüft. Die Lagerung präparierter RNA erfolgte bei -20 °C.

### **cDNA-Synthese**

Die Synthese der cDNA erfolgte ausgehend von 500 ng Gesamt-RNA, die durch reverse Transkription mit Zufalls-Hexamer-Primern (Invitrogen, Karlsruhe) und reverser Transkriptase (*Omniscript Reverse Transkriptase*, Qiagen, Hilden) in cDNA umgeschrieben wurde. Die RNA wurde vor der Synthese für 5 min bei 65 °C inkubiert und dann kurz auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde der vorbereitete Mastermix aus Reaktionspuffer, Nukleotiden und reverser Transkriptase zugegeben. Die Synthese erfolgte für 1 h bei 37 °C. Die synthetisierte cDNA wurde ohne weitere Aufreinigung als *template* in der *Real-time* PCR eingesetzt.

### **4.2 Real-time PCR**

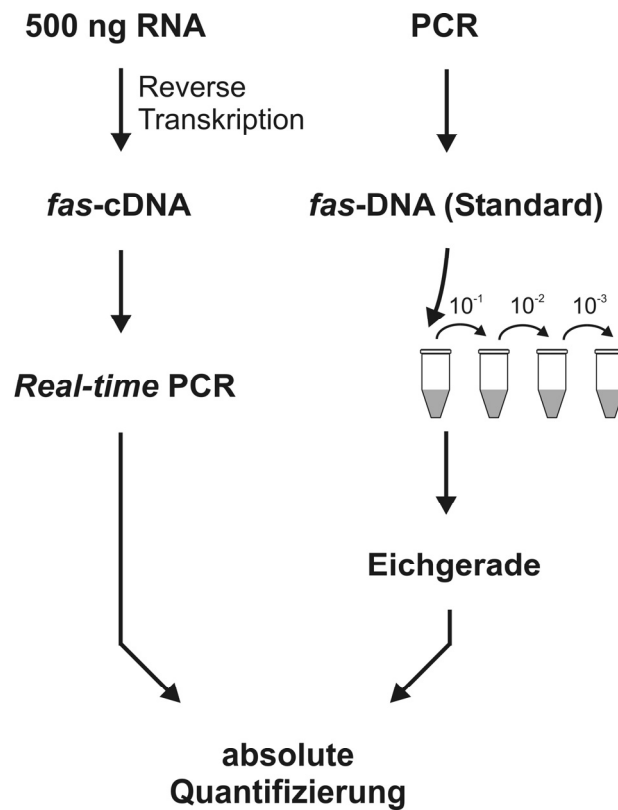
Die *Real-time* PCR wurde mit dem *LightCycler* (Roche Diagnostics, Mannheim) durchgeführt. Als Reagenzien dienten die Bestandteile des *LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I Kit* (Roche Diagnostics, Mannheim) bzw. des *Quantitect SYBR Green I Kit* (Qiagen, Hilden). Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I (Invitrogen, Karlsruhe) hat ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 521 nm. Bei der Messung erfolgte eine Anregung der in speziellen Kapillaren (*LightCycler Capillaries*, Roche Diagnostics, Mannheim) vorliegenden Proben durch eine blaue LED mit einer Anregungswellenlänge von 470 nm. Die Fluoreszenzmessung erfolgte mit dem Kanal F1 bei einer Wellenlänge von 530 nm. Tabelle 3 gibt den Ablauf der *Real-time* PCR sowie der Schmelzkurvenanalyse wieder.

**Tabelle 3:** Vorgehensweise bei der Durchführung der *Real-time* PCR. Nach Vorinkubation erfolgt die Amplifikation durch 50 PCR-Zyklen. Das Produkt wird nachfolgend anhand der Schmelzkurve analysiert.

Programm	Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen	Fluoreszenz-Detektion
Vorinkubation		95 °C	1 min	1	-
Amplifikation	Denaturierung	95 °C	10 s	50	-
	Annealing	Primer-abhängig	20 s		-
	Synthese	72 °C	Produkt [bp]/25 s		-
	Messung	72-86 °C	0 s		einfach
Schmelzkurve	Denaturierung	95 °C	0 s	1	-
	Annealing	65 °C	15 s		-
	Aufschmelzen der DNA	95 °C Temperatur- Erhöhung = 0,1 °C/s	0 s		kontinuierlich
Kühlung		40 °C	30 s	1	-

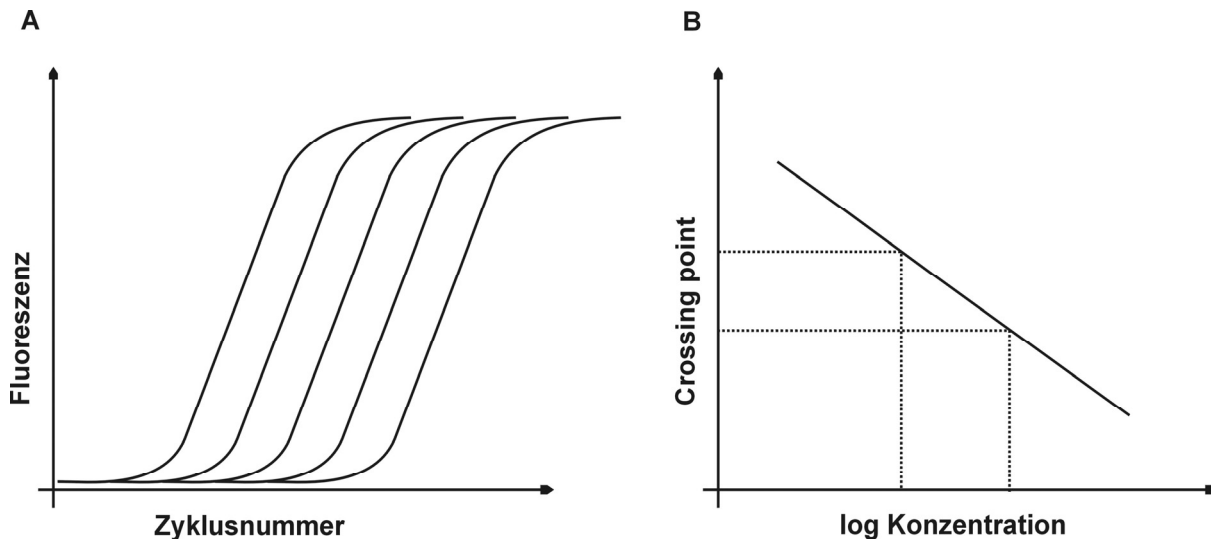
### 4.3 Auswertung der Ergebnisse durch absolute Quantifizierung

Die absolute Quantifizierung der Transkripte erfolgte anhand von externen Standards (Abbildung 2). Bei den externen Standards handelte es sich um DNA-Fragmente, die für jedes untersuchte Gen sowie die Referenzgene angefertigt wurden. Alternativ kann auch Plasmid-DNA als Standard genutzt werden.



**Abbildung 2:** Ablauf der absoluten Quantifizierung. Nach der reversen Transkription wurde die cDNA-Menge des in der *Real-time* PCR untersuchten Gens mit Hilfe von externen Standards bestimmt. Mittels der durch PCR hergestellten Standard-DNA bekannter Konzentration wurde eine Eichgerade angefertigt, an der die cDNA-Konzentration der Probe abgelesen wurde.

Mittels der Standard-DNA, deren Konzentration nach photometrischer Bestimmung bekannt war, wurde eine Eichkurve angefertigt, anhand derer die Probenkonzentration abgelesen werden konnte. Die Abbildung 3 dient der Veranschaulichung dieser Vorgehensweise.

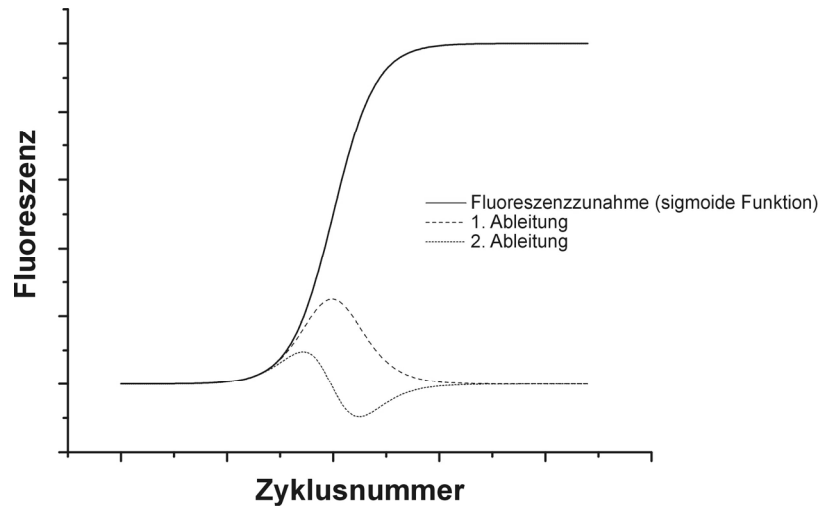


**Abbildung 3:** A) Erstellung der Eichgerade mit DNA-Standards, die als *template* in der *Real-time* PCR eingesetzt werden. Die Kurven zeigen die Fluoreszenzzunahme der einzelnen Proben während der *Real-time* PCR.

B) Durch Auftragung der Crossing points der einzelnen Proben, welche von der LightCycler-Software ermittelt werden, gegen den Logarithmus der Standardkonzentration wird eine Eichgerade erstellt.

Die Fluoreszenzzunahme kann mittels der LightCycler-Software durch zwei verschiedene Methoden berechnet werden. In dieser Arbeit wurden die Crossing points (CP) unter Zuhilfenahme der *Second derivative maximum* Methode bestimmt. Bei dieser Methode wird die während der *Real-time* PCR aufgenommene Kurve der Fluoreszenzzunahme als Funktion beschrieben. Dem bestimmten CP-Wert einer Probe entspricht nun die Zyklusnummer, welche dem Maximum der zweiten Ableitung dieser Funktion als X-Wert zugeordnet werden kann. Wie Abbildung 4 zeigt, liegt der CP-Wert am Beginn der logarithmischen Phase der PCR, in der die Fluoreszenz exponentiell ansteigt. Über die CP-Werte kann nun die Quantifizierung erfolgen, indem in der Eichgerade die dem CP-Wert entsprechende Konzentration abgelesen wird.





**Abbildung 4:** Die CP-Werte wurden nach der *Second derivative maximum* Methode ermittelt. Die Kurve der während der *Real-time* PCR gemessenen Fluoreszenzzunahme entspricht einer sigmoiden Funktion. Die Zyklusnummer, welche dem X-Wert des Maximums der zweiten Ableitung dieser Funktion entspricht, wird der zugehörigen Probe als CP-Wert zugeordnet.

Gleichzeitig mit den Proben wurden die drei verwendeten Referenzgene *ddh* (*meso*-Diaminopimelatdehydrogenase), *fbp* (Fruktose-1,6-bisphosphatase) und *gyrA* (DNA-Gyrase, Untereinheit A) amplifiziert, um so eventuelle Ungenauigkeiten durch abweichende PCR-Effizienzen zu berücksichtigen. Als Referenzgene eignen sich konstitutiv exprimierte Gene, die auch bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen gleiche Expressionsstärken aufweisen. Außerdem sollten sich die Expressionsstärken von untersuchtem Gen und Referenzgen nicht zu stark unterscheiden.

## 5. Biochemische Methoden

### 5.1 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte photometrisch nach der Methode von Bensadoun und Weinstein (1976). Der Proteingehalt wurde dabei über eine mit Rinderserumalbumin (BSA) als Standard erstellte Eichkurve ermittelt.

## 5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen mittels des *NuPAGE*-Systems (Invitrogen, Karlsruhe) analysiert. Die Auftrennung erfolgte in 10 %igen Bis-Tris Polyacrylamidgelen, wobei zur Probenvorbereitung ein vom Hersteller mitgelieferter Lithium-Dodecylsulfathaltiger Gel-Ladepuffer verwendet wurde. Als Laufpuffer wurde ein MES-haltiger (2-(*N*-Morpholino)-ethansulfonsäure) SDS-Puffer eingesetzt (50 mM MES, 50 mM Tris, 1 % SDS, 1 mM EDTA, pH 7,3). Zur Größenabschätzung wurde der vorgefärbte Standard *See Blue* (14-200 kDa) von Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. Die Proteine wurden mittels eines kolloidalen Coomassie-Farbstoffes (*GelCode Blue Stain Reagent*, Pierce, Rockford, USA) für 2-12 h direkt angefärbt und der überschüssige Farbstoff durch dreimaliges Waschen mit Wasser für jeweils 15 min entfernt.

## 5.3 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Zur Peptidmassen-Analyse, modifiziert nach Schaffer *et al.* (2001), wurden die zu untersuchenden Proteinbanden mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und die Proteine im Gel mit Trypsin verdaut (Fountoulakis & Langen, 1997). Dazu wurden die Gelstückchen zweimal 10 min mit 350  $\mu$ L 0,1 M Ammoniumbicarbonat gewaschen und anschließend in 30 % (v/v) Acetonitril für 20 min inkubiert, der Überstand verworfen und die Gelstücke in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Dann wurden die Proben mit 1  $\mu$ L 3 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,8) mit 10 ng/ $\mu$ L Trypsin (*Sequencing grade modified Trypsin*, Promega, Mannheim) rehydratisiert und nach 20 min erfolgte die Zugabe von weiteren 2  $\mu$ L 3 mM Tris/HCl (pH 8,8) ohne Trypsin. Anschließend wurden die Proben bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Peptide wurden durch Zugabe von 6  $\mu$ L Wasser, 15 min Inkubation, Zugabe von 5  $\mu$ L 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure (TFA) in 30 % (v/v) Acetonitril und nochmals 10 min Inkubation eluiert. Ein Aliquot von 0,5  $\mu$ L der erhaltenen Peptidlösung wurde auf einer Probenplatte mit 0,5  $\mu$ L einer gesättigten Lösung von  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxy-trans-Zimtsäure in 50 % (v/v) Acetonitril, 0,25 % (v/v) TFA gemischt. Eine externe Kalibrierung erfolgte für jede Probe mit Hilfe der *Calibration Mixtures 1* und *2* des *Sequazyme Peptide Mass Standard Kit* (Applied Biosystems, Weiterstadt). Die Analyse der Proben erfolgte mit 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. 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 Suche in

einer lokalen Datenbank mit 3312 *C. glutamicum*-Proteinen (Degussa) mit Hilfe der *GPMAW-Software 4.0* (Lighthouse Data) oder dem *MS-Fit-Programm* (Clauser *et al.*, 1999) genutzt.

## 6. Quantitative Bestimmung von Aminosäuren mittels *reversed phase* HPLC

Zur Bestimmung der extrazellulären Aminosäurekonzentrationen im Kulturüberstand wurden von der jeweiligen Kultur zum gewünschten Zeitpunkt Proben entnommen, die darin enthaltenen Zellen abzentrifugiert (5 min, 13000 Upm, Raumtemperatur) und der Kulturüberstand zur Analyse eingesetzt.

Die quantitative Bestimmung der Aminosäurekonzentrationen wurde mittels *reversed phase* HPLC nach Derivatisierung mit *o*-Phthaldialdehyd durchgeführt (Lindroth & Mopper, 1979). Die Derivatisierung erfolgte dabei in einer automatischen Vorsäulenderivatisierung, indem 1 µL der zu analysierenden Aminosäurelösung mit 20 µL *o*-Phthaldialdehyd/2-Mercaptoethanol-Fertigreagenz (Pierce, Rockford, USA) gemischt und eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Die so entstehenden fluoreszierenden, thiosubstituierten Isoindole (Jones & Gilligan, 1983) wurden dann über eine kombinierte Vorsäule (40 × 4 mm, LiChrospher 100RP18EC-5 µm) und Hauptsäule (125 × 4 mm, LiChrospher 100RP18EC-5 µm; beide Säulen von CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe) mit einem Gradientenprogramm mit zunehmend unpolarer Phase (Methanol) aufgetrennt. Das polare Eluent war Natriumacetat (0,1 M, pH 7,2) und die Flußrate betrug 0,3-0,8 mL/min (modifiziert nach Lindroth & Mopper, 1979). Die Fluoreszenzdetektion der derivatisierten Aminosäuren erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 230 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm. Für alle Analysen wurde ein HPLC-Gerät der Serie HP1100 (Agilent, Waldbronn) mit angeschlossenem Fluoreszenzdetektor (G1321A) verwendet; die Systemsteuerung und Auswertung der Daten erfolgte mit der HP-Chem-Station Software (Agilent, Waldbronn). Die Aminosäurekonzentration der analysierten Probe wurde über einen Vergleich mit einem externen Standard und Asparagin als zusätzlichem internem Standard berechnet.

## 7. Analyse der Mycolsäuren

Es wurde eine biochemische Analyse der Zellwand durchgeführt, um sowohl die am Arabinogalaktan gebundenen als auch die freien Mycolsäuren, welche als Trehalosemycolate vorliegen, zu untersuchen. Dazu wurde eine 5 mL BHI-Vorkultur mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 30 °C und 170 Upm inkubiert. 0,5 mL dieser Vorkultur wurden verwendet, um erneut 5 mL BHI, welches zur Markierung der Fettsäuren

10  $\mu\text{Ci}$  [ $^{14}\text{C}$ ]-Acetat enthielt, zu inokulieren. Der Ansatz wurde für 4 h bei 30 °C und 120 Upm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet. Um die freien Lipide herauszulösen, erfolgten zwei Extraktionen mit jeweils 2 mL  $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH-H}_2\text{O}$  (10/10/3, v/v/v) für 3 h bei 55 °C. Die organischen Phasen wurden vereinigt und erneut mit 1,75 mL  $\text{CHCl}_3$  und 0,75 mL  $\text{H}_2\text{O}$  extrahiert. Die wässrige Phase wurde verworfen und die organische Phase zweimal mit je 2 mL  $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH-H}_2\text{O}$  (3/47/48, v/v/v) gewaschen, sodass nur noch besonders apolare Substanzen zurückblieben. Um das Volumen zu reduzieren, wurden die gelblichen Pellets getrocknet und in 200  $\mu\text{L}$   $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH-H}_2\text{O}$  (10/10/3, v/v/v) aufgenommen. 20.000 cpm wurden jeweils dünnschichtchromatographisch aufgetrennt (5735 silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck, Darmstadt), wobei als Laufmittel  $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH-H}_2\text{O}$  (60/16/2, v/v/v) verwendet wurde. Die trockenen Chromatographieplatten wurden für 18 h auf Film (Kodak® X-Omat LS Film) exponiert.

Die partiell entfetteten Pellets, die nur noch die kovalent am Arabinogalaktan gebundenen Lipide enthielten, wurden zur Spaltung der kovalenten Bindung zwischen Mycolsäure und Arabinogalaktangerüst über Nacht bei 95 °C in 2 mL 5 % Tetrabutylammoniumhydroxidlösung<sub>(aq)</sub> inkubiert. Die erkaltete Lösung wurde zur Herstellung der apolaren Fettsäure- bzw. Mycolsäuremethylester mit 2 mL Wasser, 4 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  und 0,5 mL  $\text{CH}_3\text{I}$  für 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Phasentrennung wurde die untere, organische Phase dreimal mit je 4 mL Wasser gewaschen, getrocknet und in 4 mL Diethylether resuspendiert. Der klare Überstand wurde in ein Reagenzglas überführt, getrocknet und in 200  $\mu\text{L}$   $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  aufgenommen. 10.000 cpm wurden für die Dünnschichtchromatographie eingesetzt, die 25 min mit Diethylether-Aceton (95/5, v/v) entwickelt und 19 h auf Film (Kodak® X-Omat LS Film) exponiert wurde.

## 8. Analyse des Arabinogalaktans

Zur biochemischen Analyse des Arabinogalaktans wurden Zellen des *C. glutamicum* Wildtyps in CGXII-Minimalmedium unter Zusatz von 100 mg/L Ethambutol kultiviert. Parallel dazu wurde eine Kultur ohne Ethambutol-Zugabe angezogen, die als Kontrolle diente. Die Kultivierung wurde mit einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,1 gestartet. Nach 4 h wurde 1  $\mu\text{Ci/mL}$  [ $^{14}\text{C}$ ]-Glucose zugegeben. Nach Inkubation von weiteren 4 h wurden die Zellen durch Zentrifugation für 15 min mit 4500 g geerntet. Für den folgenden Zellaufschluss wurden 0,5 g Zellen in 1 mL 2 % (w/v) Triton X-100 in PBS (0,1 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,01 M NaCl, pH 7,4) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschall (dreimal 60 s / zwischendurch für je 90 s auf Eis). Die anschließende Präparation der Zellwände erfolgte nach dem Protokoll von Mikusova

et al. (1995). Die durch Zentrifugation (20 min bei 13000 g) pelletierten Zellwände wurden dreimal mit 2 % SDS in PBS für 1 h bei 95 °C extrahiert. Nachfolgend wurde das Pellet erst mit Wasser, dann mit 80 % Aceton in Wasser und schließlich mit Aceton gewaschen. Anschließend wurde das Pellet im Luftstrom getrocknet. Zur Hydrolyse der Zuckerbausteine des Arabinogalaktans wurde das Pellet nach Zugabe von 400 µL 2 M Trifluoressigsäure für 3 h bei 120 °C inkubiert und anschließend getrocknet. Nach der Trocknung wurde das Pellet mit 1 mL Wasser und 1 mL Chloroform extrahiert und für 5 min bei 13000 g zentrifugiert, um die Mycolsäuren von den Zuckerkomponenten des Arabinogalaktans zu trennen. Die wässrige Phase wurde abgenommen, getrocknet und anschließend in 100 µL Wasser resuspendiert. Bei der dünnschichtchromatographischen Auftrennung (5735 silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck, Darmstadt) diente ein Gemisch aus Pyridin-Ethylacetat-Eisessig-Wasser (5/5/1/3, v/v/v/v) als Laufmittel. Die Platten wurden zweimal entwickelt.

## 9. Transmissionselektronenmikroskopie

Um auch morphologische Veränderungen von *C. glutamicum* zu erfassen, wurden Zellen des *C. glutamicum* Wildtyps elektronenmikroskopisch untersucht. Dazu wurden die Zellen in CGXII-Medium angezogen. Nach Erreichen einer OD von 10 wurde 1 mL Kultur abzentrifugiert und das Pellet in 0,1 M Natriumphosphat-Puffer (pH 7,2) mit 3 % Glutardialdehyd resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in 3 % Agarose eingebettet und nachfolgend mit 1 % OsO<sub>4</sub> fixiert, entwässert und in Epoxydharz eingebettet. Ultradünnschnitte wurden auf ein Kupfer-Gitter aufgebracht, mit Uranylacetat und Bleicitrat gefärbt und mit einem Philips EM 400 Transmissionselektronenmikroskop untersucht.

### III. ERGEBNISSE

#### 1. Screening nach Glutamatausscheidung induzierenden Substanzen

*C. glutamicum* ist in erster Linie durch seine Fähigkeit zur Glutamatausscheidung bekannt geworden. Wie man weiß, tritt die Glutamatausscheidung erst als Folge einer veränderten Zusammensetzung der Zellhülle ein (Eggeling *et al.*, 2001). Der biochemische und molekulare Mechanismus der Glutamatausscheidung ist jedoch noch weitgehend unverstanden. Es ist bekannt, dass sich die Glutamatausscheidung durch unterschiedliche Faktoren induzieren lässt, wobei als Auslöser jeweils Veränderungen der Membran oder der Zellwand in Betracht kommen. Es konnte gezeigt werden, dass bei Biotinlimitation die Lipidzusammensetzung der Membran verändert ist (Hoischen & Krämer, 1990). Außerdem wurde nach gezielter Expression von Lipidsynthesegenen eine Korrelation zwischen Lipidzusammensetzung der Zelle und Glutamatausscheidung beobachtet (Nampoothiri *et al.*, 2002). Aufgrund der Tatsache, dass die Glutamatausscheidung in Zusammenhang mit der Lipid- und Zellwandsynthese gebracht werden kann, sollte nun geprüft werden, ob die Möglichkeit besteht, die Glutamatausscheidung durch weitere bekannte Inhibitoren der Lipid- oder Zellwandsynthese auszulösen. Durch die Untersuchungen zur Lipidsynthese von *E. coli* sind einige solcher Inhibitoren bekannt (Heath *et al.*, 2001). Es gibt jedoch auch spezifisch auf *Corynebacteriaceae* wirkende Substanzen, die für die Therapie der pathogenen Vertreter dieses Taxons relevant sind.

In Tabelle 4 sind die in dieser Arbeit getesteten Inhibitoren unter Angabe ihres in der Literatur beschriebenen Wirkortes aufgelistet. Die Inhibitoren wurden in Wachstumsversuchen auf ihre Wirkung getestet, wobei mit dem *C. glutamicum* Wildtyp Versuchsreihen unter Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen des Inhibitors durchgeführt wurden. Dabei wurde ausgehend von einer CGIII-Vorkultur eine Hauptkultur mit CgXII-Minimalmedium beimpft und während der Kultivierung das Wachstum kontinuierlich beobachtet, um so die Wirkung der jeweiligen Substanz in Abhängigkeit von der getesteten Konzentration zu untersuchen. Im Anschluss erfolgte noch eine Bestimmung der Aminosäurekonzentration in den Kulturüberständen mittels HPLC-Analyse.

**Tabelle 4:** Inhibitoren der Fettsäure- bzw. der Zellwandsynthese, die auf ihre Eignung zur Induktion der Glutamatausscheidung getestet wurden, und ihre in der Literatur beschriebenen Wirkorte

Inhibitor	Wirkort	Referenz
Isonikotinsäurehydrazid	Enoyl-ACP-Reduktase FabI / InhA (Lipidsynthese)	Heath <i>et al.</i> , 2001
Hexachlorophen	Enoyl-ACP-Reduktase FabI / InhA (Lipidsynthese)	Heath <i>et al.</i> , 2001
Triclosan	Enoyl-ACP-Reduktase FabI / InhA (Lipidsynthese)	Heath <i>et al.</i> , 2001
Cerulenin	FabB, FabF (Lipidsynthese)	Parrish <i>et al.</i> , 1999
Ethambutol	Arabinosyltransferase Emb (Arabinogalaktansynthese)	Takayama & Kilburn, 1989

### 1.1 Isonikotinsäurehydrazid, Hexachlorophen und Triclosan

Isonikotinsäurehydrazid ist ein Standardtherapeutikum bei der Behandlung von mycobakteriellen Erkrankungen. Es wirkt ebenso wie Hexachlorophen und Triclosan durch Interaktion mit der Enoyl-ACP-Reduktase (InhA) (Zhang *et al.*, 1993; Heath *et al.*, 2000). *C. glutamicum* besitzt zwar kein homologes Gen für *inhA*, es ist aber dennoch eine Änderung in der Mycolsäurezusammensetzung als Folge der Wirkung von Isonikotinsäurehydrazid bekannt (Jang *et al.*, 1997). Im Wachstumsexperiment wurde unter Zugabe von Isonikotinsäurehydrazid eine starke Hemmung des Wachstums festgestellt, wobei nach Überschreiten einer Konzentration von 5 mg/L eine bakteriostatische Wirkung auftrat (nicht gezeigt). Die Bestimmung der Aminosäurekonzentration im Kulturüberstand zeigte, dass Isonikotinsäurehydrazid die Glutamatausscheidung jedoch nicht auslöst.

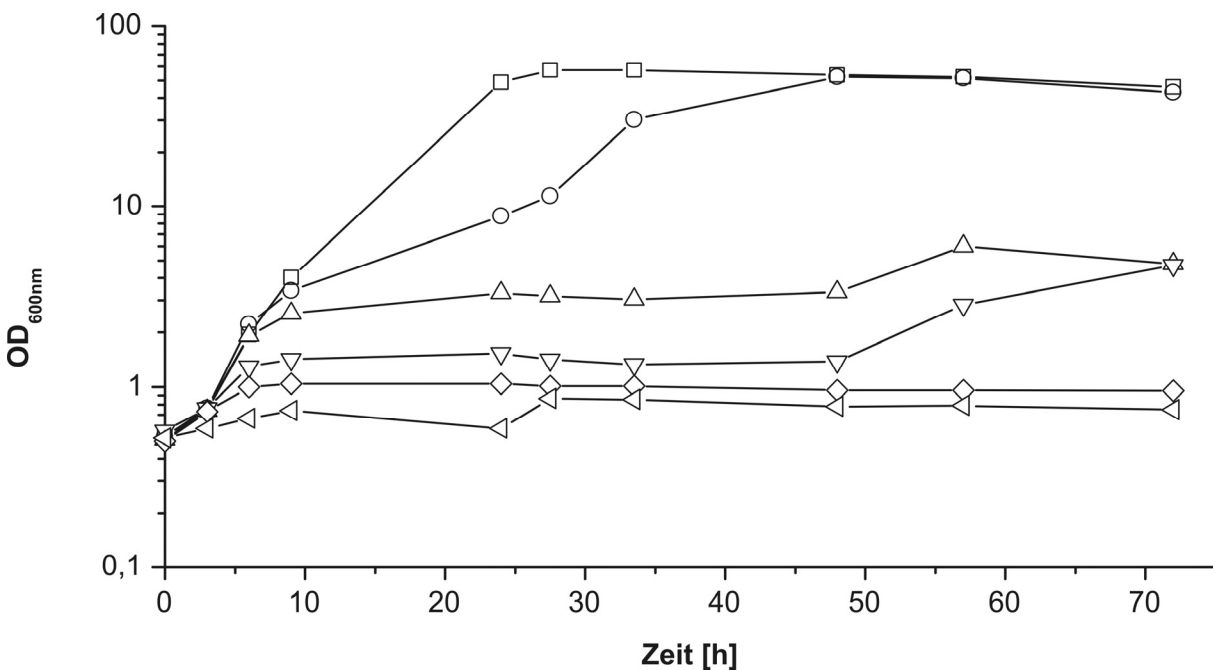
Hexachlorophen wird hauptsächlich als Desinfektionsmittel zur Bekämpfung gram-positiver Bakterien, besonders von *Staphylococcus*-Stämmen, eingesetzt (Korolkovas, 1988). Hexachlorophen bewirkte bei *C. glutamicum* eine starke Wachstumshemmung ab einer Konzentration von 2,5 mg/L. Höhere Konzentrationen führten zu einer Abnahme der OD, was auf Zellyse hindeutet. Glutamatausscheidung war nicht zu beobachten.

Die Substanz Triclosan findet als Desinfektionsmittel vielseitige Verwendung (McMurry *et al.*, 1998). Triclosan wirkt ab einer Konzentration von 6 mg/L wachstumshemmend auf

*C. glutamicum*. Eine Untersuchung von Kulturüberständen, die nach 24 h bzw. 48 h der Kultivierung in Anwesenheit dieser Triclosan-Konzentration entnommen wurden, ergab Glutamat-Konzentrationen von 5,4 mM bzw. 9,1 mM. Bei höheren Konzentrationen trat eine bakteriostatische Wirkung ein. Obwohl Triclosan, was die Wirkweise betrifft, Ähnlichkeiten zu Hexachlorophen und Isonikotinsäurehydrazid aufweist, ist diese Substanz offensichtlich in der Lage, die Glutamatausscheidung zu induzieren.

## 1.2 Cerulenin

Cerulenin wirkt auf die  $\beta$ -Ketoacyl-ACP-Synthasen durch Bindung an das aktive Zentrum (D'Agnolo *et al.*, 1973). Bei *Mycobacteriaceae* inhibiert Cerulenin sowohl FAS I- als auch FAS II-Enzyme (Parrish *et al.*, 1999), besitzt also eine relativ unspezifische Wirkung (Matsumae *et al.*, 1964). Wie das in Abbildung 5 dargestellte Experiment zeigt, hemmt die Substanz das Wachstum von *C. glutamicum* bereits ab einer Konzentration von 1 mg/L.



**Abbildung 5:** Wachstum von *C. glutamicum* in Anwesenheit unterschiedlicher Cerulenin-Konzentrationen. 0 mg/L (□), 1 mg/L (○), 1,5 mg/L (△), 2,5 mg/L (▽), 5 mg/L (◇), 10 mg/L (◁)



Die Bestimmung von Glutamat in den Kulturüberständen ergab eine Akkumulation von bis zu 11,8 mM in Anwesenheit von 2,5 mg/L Cerulenin. Die detaillierten Messdaten der Glutamat-Konzentrationen sind in Tabelle 5 aufgeführt. Ab einer Konzentration von 5 mg/L wurde das Wachstum der Zellen fast vollständig gehemmt, sodass es nur noch zu einer einzigen Verdopplung kam. Interessanterweise kam es auch unter diesen Bedingungen noch zu einer Glutamatausscheidung von 9 mM.

**Tabelle 5:** Glutamatausscheidung bei Wachstum von *C. glutamicum* in Anwesenheit unterschiedlicher Cerulenin-Konzentrationen

Cerulenin	Glutamat (mM)		
	24 h	48 h	72 h
0 mg/L	0,4	0,3	0,3
1 mg/L	4,4	6,9	6,1
1,5 mg/L	4,9	5,7	4,7
2,5 mg/L	6,2	11,8	9,7
5 mg/L	4,7	9,0	9,3
10 mg/L	4,2	7,3	7,6

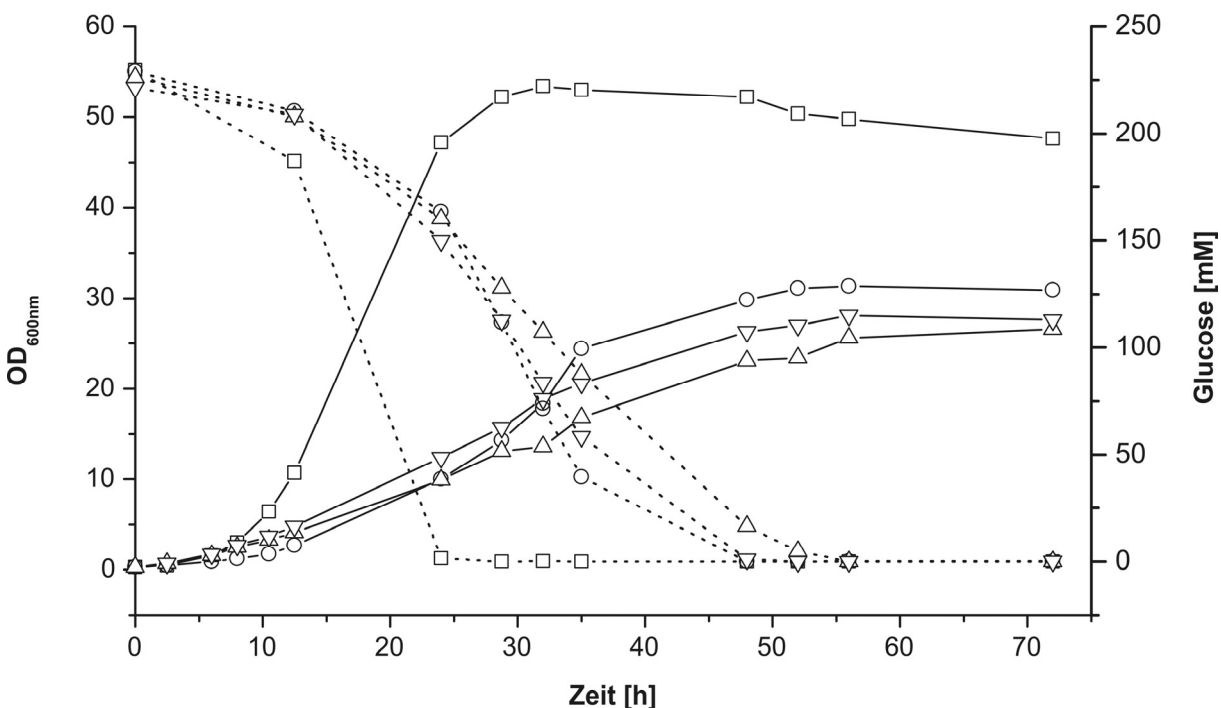
## 2. Untersuchungen zur Wirkung von Ethambutol

Ethambutol wurde im Verlauf des Screenings als ideale Substanz zur Induktion der Glutamatausscheidung identifiziert. Deshalb wurde die durch Ethambutol induzierte Glutamatausscheidung eingehend untersucht. Ethambutol besitzt große Bedeutung in der Tuberkulose-Therapie. Zuerst fanden Takayama und Kilburn (1989), dass Ethambutol in die Zellwandsynthese eingreift, heute weiß man, dass Ethambutol die Synthese der Zellwandkomponente Arabinogalaktan inhibiert (Deng *et al.*, 1995).

An *M. tuberculosis* durchgeführte Studien zeigen, dass Mutationen im *embB*-Gen, welches für die Arabinosyltransferase EmbB kodiert, Einfluss auf die Wirkung von Ethambutol besitzen und sogar zur Ethambutol-Resistenz führen können (Telenti *et al.*, 1997). Anhand der Genomsequenz konnte für *C. glutamicum* ein homologes Gen zu *embB* identifiziert werden. Während *M. tuberculosis* drei *emb*-Homologe besitzt, die als Operon organisiert sind (Escuyer *et al.*, 2001), besitzt *C. glutamicum* nur ein einziges *emb*-Gen. Die Situation ist demnach in *C. glutamicum* weniger komplex, was für einen einfacheren Aufbau der Zellwand spricht.

## 2.1 Einfluss von Ethambutol auf das Wachstum von *C. glutamicum*

Um die Wirkung von Ethambutol auf *C. glutamicum* zu untersuchen, wurde zunächst ein Wachstumsexperiment durchgeführt, bei dem der *C. glutamicum* Wildtyp unter Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von Ethambutol in Schüttelkolben kultiviert wurde. Dazu wurde ein Wachstumsexperiment in CgXII-Minimalmedium durchgeführt, wobei Ethambutol vom Fermentationsstart an in Konzentrationen von 1 mg/L bis zu 5 mg/L zugesetzt wurde, sodass das Wachstum der Zellen in Abhängigkeit von der Ethambutol-Konzentration verfolgt werden konnte. Das Ergebnis des Experiments ist in Abbildung 6 dargestellt. Die Wachstumskurven zeigen, dass sich eine Ethambutol-Konzentration von 20 mg/L bereits verzögernd auf das Wachstum von *C. glutamicum* auswirkt. Auffällig ist, dass sich die Wachstumshemmung bis zu einer getesteten Konzentration von 5 mg/L nicht weiter steigern lässt. Ethambutol unterscheidet sich demnach maßgeblich von den zuvor beschriebenen Wachstumsinhibitoren, bei denen eine Wachstumshemmung nur in einem sehr kleinen Konzentrationsbereich erzielt werden konnte, aber bei einer Erhöhung der Inhibitorkonzentration eine bakterio-statische oder sogar eine bakteriozide Wirkung auftrat.

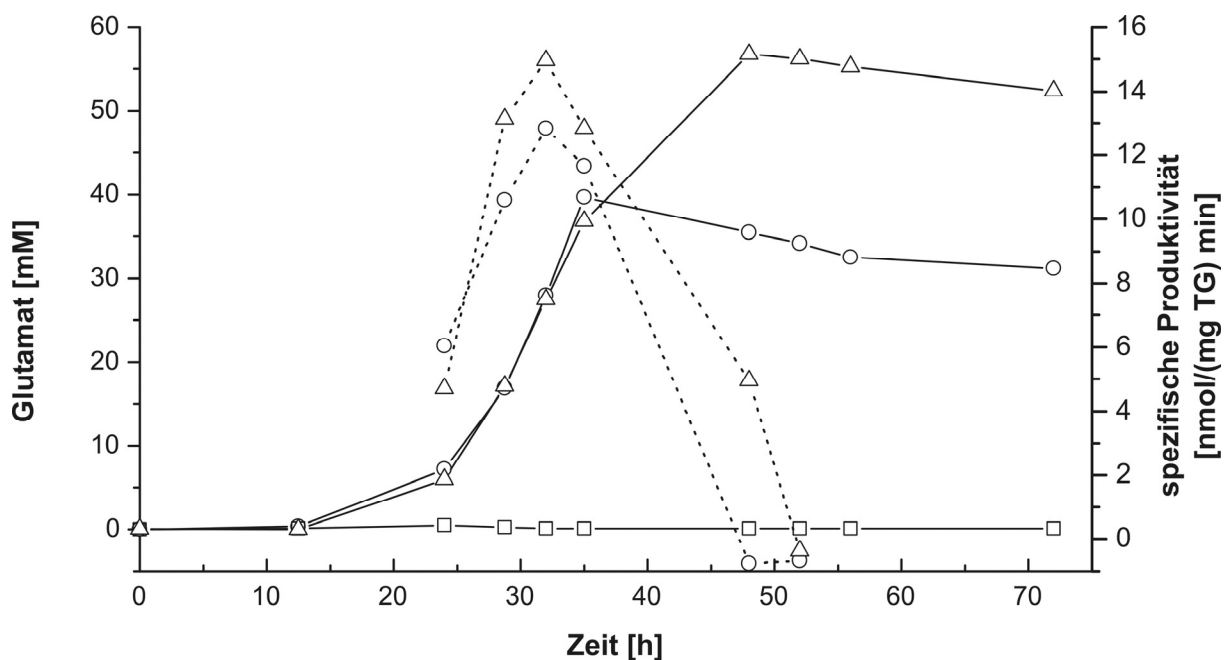


**Abbildung 6:** Wachstum von *C. glutamicum* (—) in Anwesenheit unterschiedlicher Ethambutol-Konzentrationen sowie Glucoseverbrauch (----). 0 mg/L (□), 10 mg/L (○), 30 mg/L (△), 500 mg/L (▽).

Ethambutol führte bei *C. glutamicum* nicht nur zu einer verringerten Wachstumsrate, sondern die mit Ethambutol behandelten Kulturen erreichten auch eine wesentlich geringere OD in der stationären Phase. Interessanterweise ist die Glucose jedoch bei Erreichen der stationären Phase vollständig verbraucht (Abbildung 6).

## 2.2 Der Einfluss von Ethambutol auf die Glutamatexkretion

Um die Metabolite im Kulturüberstand zu analysieren, wurden während der Kultivierung Proben genommen. In Anwesenheit von Ethambutol-Konzentrationen zwischen 20 mg/L und 500 mg/L lagen nach 48 h im Überstand Glutamat-Konzentrationen von 55-65 mM vor (Abbildung 7). Hierbei war auffällig, dass die Glutamatbildung, wie bereits für die Wachstumsraten in Anwesenheit unterschiedlicher Inhibitorkonzentrationen beschrieben, nicht von der Menge des dem Medium zugesetzten Ethambutols abhing.



**Abbildung 7:** Glutamatbildung bei verschiedenen Ethambutol-Konzentrationen (—). 0 mg/L (□), 10 mg/L (○), 30 mg/L (△). Angegeben ist außerdem die spezifische Produktivität (----) bei Zugabe von 10 mg/L und 30 mg/L Ethambutol.

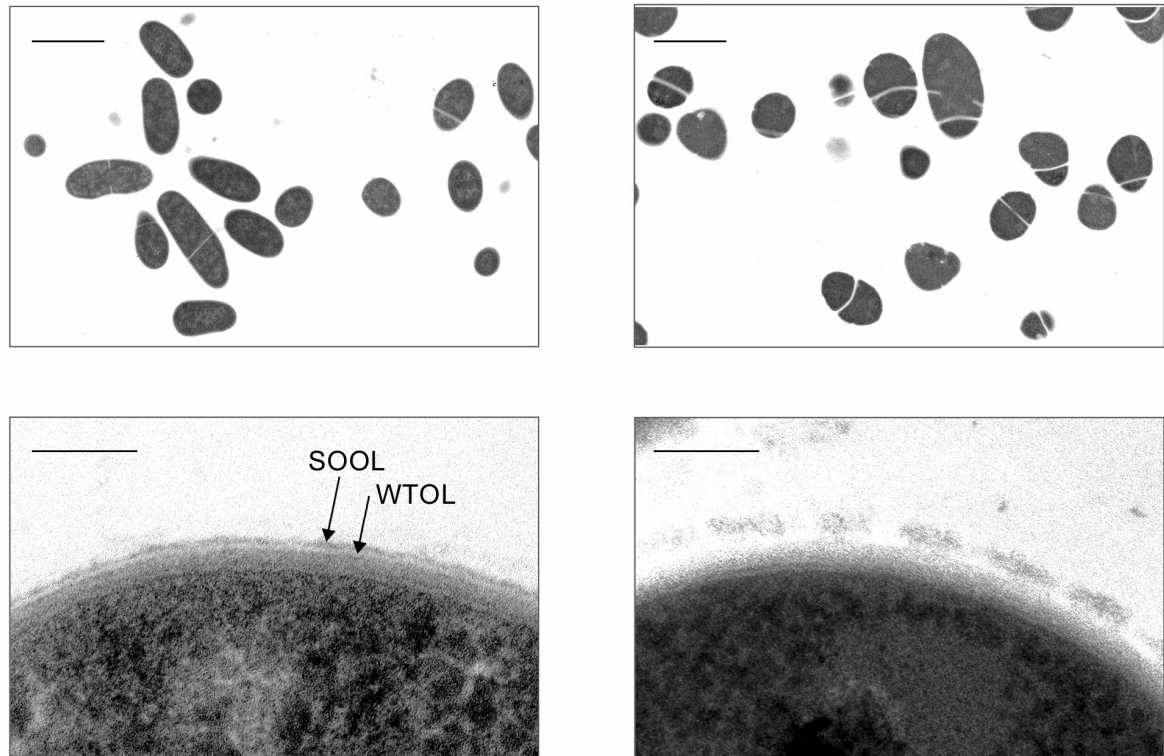
Es wurden die spezifischen Produktivitäten für die Ethambutol-Konzentrationen 10 mg/L und 30 mg/L berechnet und in Abbildung 7 dargestellt. Wie ersichtlich, betrug die maximale spezifische Produktivität etwa 15 nmol (Glutamat) mg (Trockengewicht)<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, wobei dieser Wert nach 32-35 h, also im Übergang von der exponentiellen zur stationären Phase, erreicht

wurde. Durch eine Erhöhung der Ethambutol-Konzentration war keine weitere Steigerung der Produktivität möglich. Die spezifische Produktivität für die Ethambutol-Behandlung liegt beim Vergleich mit bekannten Methoden zur Glutamatausscheidung zwischen der Biotin-Limitation, mit der eine weitaus höhere spezifische Produktivität von  $100 \text{ nmol (Glutamat) mg (Trockengewicht)}^{-1} \text{ min}^{-1}$  erreicht wird (Lapujade *et al.*, 1999), und der Behandlung mit Lokalanästhetika, bei der die spezifische Produktivität mit  $4 \text{ nmol (Glutamat) mg (Trockengewicht)}^{-1} \text{ min}^{-1}$  geringer ist (Lambert *et al.*, 1995).

### **2.3 Elektronenmikroskopische Untersuchung Ethambutol-behandelter Zellen**

Die Untersuchung von *C. glutamicum*-Zellen im Lichtmikroskop hatte Hinweise auf morphologische Veränderungen als Folge der Ethambutol-Behandlung ergeben. Um diesen Sachverhalt genauer zu untersuchen, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Hierzu wurden zwei Schüttelkolben mit CGXII-Medium parallel kultiviert, wobei eine der Kulturen  $100 \text{ mg/L}$  Ethambutol enthielt und die andere als Kontrolle ohne Zugabe von Ethambutol angezogen wurde.

Abbildung 8 zeigt die elektronenmikroskopischen Bilder von Dünnschnitten Ethambutol-behandelter Zellen. Im Übersichtsbild (oben rechts) ist zu erkennen, dass die Ethambutol-behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (oben links) größer und abgerundeter sind. Außerdem besitzen die sich in der Teilung befindenden Zellen offenbar eine verbreiterte Zellwand. Die charakteristische Schichtenstruktur der Zellwand ist nur beim unbehandelten Wildtyp (unten links) zu erkennen. Eine äußere elektronendurchlässige Schicht (WTOL) stellt mit großer Wahrscheinlichkeit die Mycolsäureschicht dar und eine Schicht von höherer Elektronendichte (SOOL) setzt sich wahrscheinlich aus Polysacchariden zusammen (Marienfeld *et al.*, 1997). Diese für die Zellwand von *C. glutamicum* typische Struktur geht nach Ethambutol-Behandlung verloren. Lediglich die innerste Schicht, die mit großer Wahrscheinlichkeit die Cytoplasmamembran darstellt, bleibt sichtbar.



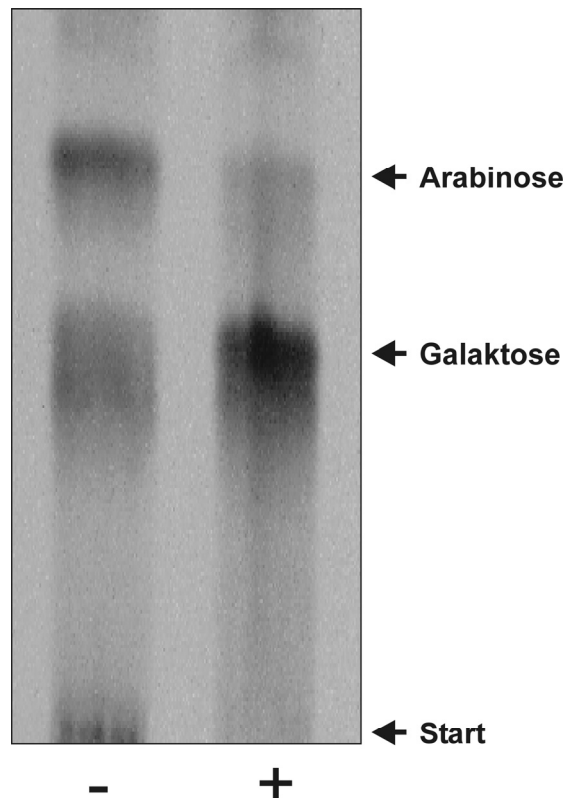
**Abbildung 8:** Die durch Ethambutol-Behandlung bedingten elektronenmikroskopisch sichtbaren morphologischen Veränderungen bei *C. glutamicum*. Linke Seite: *C. glutamicum* ohne Ethambutol-Zugabe; rechte Seite: *C. glutamicum* angezogen mit 100 mg/L Ethambutol (SOOL: dünne elektronendichte äußere Schicht (*small opaque outer layer*), WTOL: breite elektronendurchlässige äußere Schicht (*wide transparent outer layer*); Balken in oberer Abbildung = 2  $\mu\text{m}$ , Balken in unterer Abbildung = 0,1  $\mu\text{m}$ ).

## 2.4 Biochemische Untersuchungen der Wirkung von Ethambutol auf die Zellwandsynthese

Untersuchungen an *M. smegmatis* haben gezeigt, dass Ethambutol die Synthese des Arabinans im Zellwandpolymer Arabinogalaktan verhindert (Deng *et al.*, 1995). Außerdem wurde nach Ethambutol-Behandlung die Anhäufung von Trehalosemycolaten, die an der Mycolsäuresynthese beteiligt sind, beobachtet (Mikusova *et al.*, 1995). Dies wird als eine Folge dessen gedeutet, dass bei einem geringeren Arabinosegehalt des Arabinans für die Mycolsäuren die Möglichkeit der Bindung an die terminalen Zuckermoleküle des Polymers nicht mehr gegeben ist und sich deshalb die Trehalosemycolate anhäufen.

### 2.4.1 Arabinogalaktan-Analyse Ethambutol-behandelter Zellen

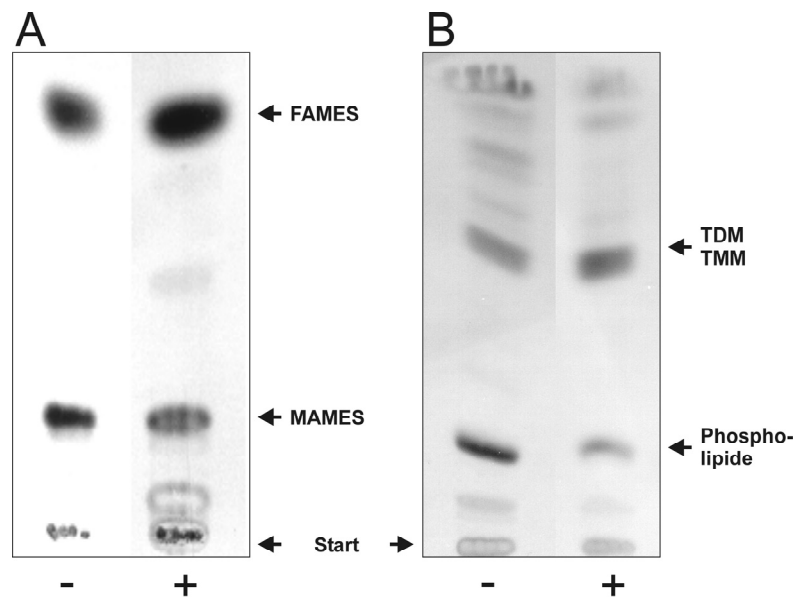
Um den Einfluss von Ethambutol auf die Arabinogalaktan-Bildung zu untersuchen, wurde in einer biochemischen Analyse der Gehalt der relativen Anteile der einzelnen Zucker im Arabinogalaktan quantifiziert. Dazu wurden die Zellen in Anwesenheit von [ $^{14}\text{C}$ ]-markierter Glucose angezogen und anschließend der Mycolyl-Arabinogalaktan-Peptidoglykankomplex isoliert. Nach Spaltung der Zuckerkomponenten des aus Arabinose- und Galaktoseresten bestehenden Polymers durch saure Hydrolyse konnten die von diesem Polymer nun abgespaltenen Mycolsäuren durch Extraktion entfernt werden. Die Zuckerbausteine des Arabinogalaktans wurden mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und anschließend autoradiographisch detektiert. Die in Abbildung 9 dargestellte Autoradiographie macht deutlich, dass Ethambutol-behandelte Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen einen drastisch reduzierten Arabinosegehalt im Arabinogalaktan aufweisen.



**Abbildung 9:** Autoradiogramm zum Nachweis der Arabinose und Galaktose im isolierten Arabinogalaktan nach Hydrolyse. Linke Spur: Arabinogalaktan-Hydrolysat aus Zellen ohne Ethambutol-Behandlung (-), rechte Spur: Arabinogalaktan-Hydrolysat aus Zellen behandelt mit 100 mg/L Ethambutol (+).

### 2.4.2 Lipid-Analyse Ethambutol-behandelter Zellen

Da eine drastische Reduktion des Arabinosegehalts im Arabinogalaktan, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, eine Folge der Ethambutol-Behandlung ist, bestand die Möglichkeit, dass auch der Gehalt der am Arabinogalaktan gebundenen Mycolsäuren reduziert ist. Um dies zu untersuchen, wurde *C. glutamicum* in CGXII-Medium unter Zugabe von 100 mg/L Ethambutol angezogen. Nach Ernten der Zellen wurden die nicht kovalent gebundenen Lipide extrahiert. Anschließend wurden die partiell entfetteten Pellets mit Tetrabutylammoniumhydroxid inkubiert, um die kovalenten Bindungen zwischen Mycolsäuren und Arabinogalaktan zu spalten. Nach erfolgter Extraktion der dabei entstandenen Mycolsäuremethylester (MAMES) wurden diese dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Das Ergebnis ist in Abbildung 10 A gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass nach Ethambutol-Behandlung der Gehalt an gebundenen Mycolsäuren im Vergleich zur Kontrolle reduziert ist. Damit bewirkt Ethambutol indirekt eine Reduktion der am Arabinogalaktan gebundenen Mycolsäuren, wie auch für *M. smegmatis* gezeigt (Mikusova *et al.*, 1995).



**Abbildung 10:** Nachweis gebundener Lipide (A) und freier Lipide (B) in *C. glutamicum* mit (+) und ohne (-) Ethambutol-Zugabe.

Es wurde ebenfalls der Gehalt an freien Lipiden analysiert. Die Dünnschichtchromatographie in Abbildung 10 B zeigt eine leicht erhöhte Menge von Trehalosedimycolaten (TDM) bzw. Trehalosemonomycolaten (TMM). Diese Anhäufung könnte eine indirekte Folge der Ethambutol-Behandlung sein, da die Trehalosedimycolate und Trehalosemonomycolate

auch Intermediate der Mycolsäuresynthese sind, die sich anhäufen, wenn es nicht zum Einbau in den Mycolyl-Arabinogalaktan-Peptidoglykankomplex kommt. Somit zeigen diese Analysen, dass Ethambutol in *C. glutamicum* drastische Änderungen im Aufbau der Zellwand bewirkt.

### **3. Untersuchungen zur Arabinosyltransferase in *C. glutamicum***

Die Arabinosyltransferase Emb wird mit Ethambutol in Zusammenhang gebracht, da in Ethambutol-Resistenten Stämmen von *M. tuberculosis* häufig Mutationen im *embB*-Gen beobachtet wurden (Telenti *et al.*, 1997). Da *C. glutamicum* nur ein *emb*-Gen besitzt, ist das Bakterium ideal geeignet, um die noch teilweise unbekannt Funktion von *emb* zu untersuchen. In erster Linie sollte die Fragestellung untersucht werden, ob Emb der Wirkort von Ethambutol ist.

#### **3.1 Überexpression von *emb* in *C. glutamicum***

Es sollte der Einfluss einer erhöhten Kopienzahl des *emb*-Gens in *C. glutamicum* getestet werden. Zur plasmidkodierte Expression von *emb* wurden zwei verschiedene Vektoren konstruiert.

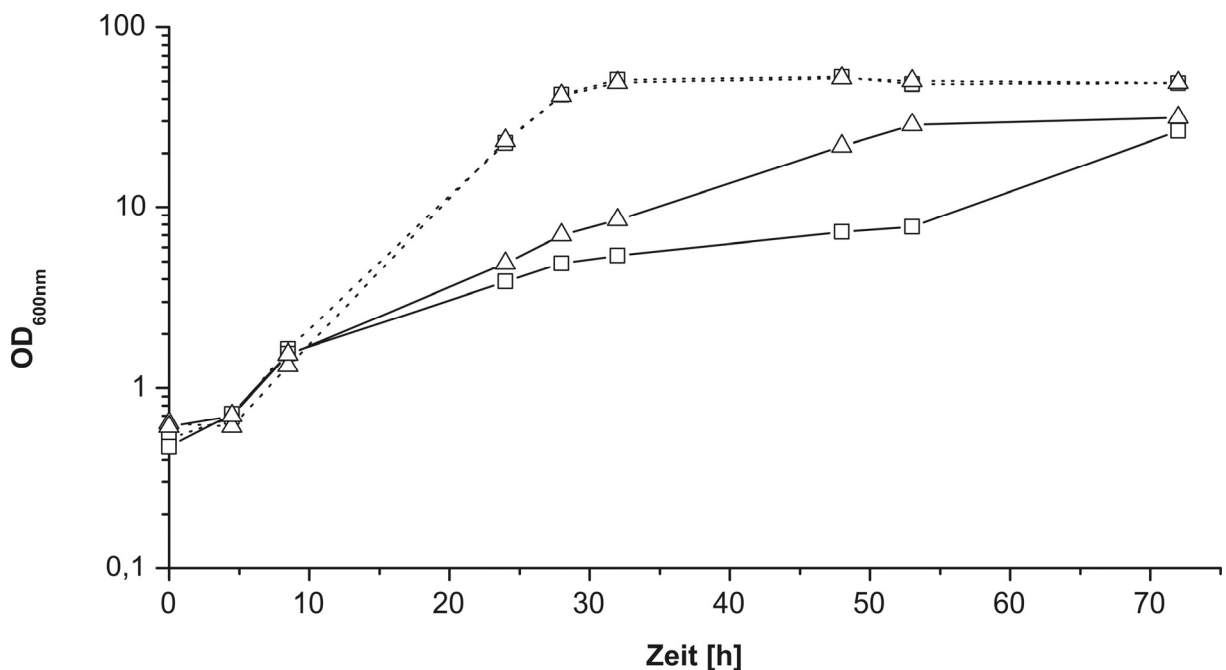
Zunächst wurde *emb* mit seinem nativen Promotor in den Vektor pEC-T18*mob2* kloniert (Tauch *et al.*, 2002). Dazu wurde das *emb*-Gen mittels der Primer *emb*\_Start+50bp und *emb*\_Ende amplifiziert. Anschließend wurde das PCR-Produkt mit Klenow-Enzym behandelt und in den mit *Bam*HI geschnittenen Vektor pEC-T18*mob2* kloniert, welcher vor der Ligation ebenfalls mit Klenow-Enzym behandelt wurde. So wurde das Plasmid pEC-T18*mob2emb* erhalten. Wie sich herausstellte, führte dieser Vektor aber allein durch seine Tetracyclin-Resistenz zu Wachstumseffekten, die dessen weitere Nutzung verhinderten. Solche Effekte sind für *E. coli* mehrfach detailliert beschrieben (Griffith *et al.*, 1994; Stavropoulos & Strathdee, 2000). Deshalb wurde eine Umklonierung von *emb* vorgenommen, um das 3,5 kb große Gen nicht erneut sequenzieren zu müssen. Dazu wurde das *emb*-Gen mit den Enzymen *Sca*I und *Xba*I aus pEC-T18*mob2emb* herausgeschnitten und nach Klenow-Behandlung in den mit *Sma*I linearisierten Vektor pEC-S18*mob2* ligiert (Tauch *et al.*, 2002).

Um zusätzlich eine Expression mittels des *tac*-Promotors zu ermöglichen, wurde das *emb*-Gen in den Vektor pEKEx2 kloniert (Eikmans *et al.*, 1991). Dies geschah durch Amplifikation



des *emb*-Gens mittels der Primer *emb\_GTG+T7RBS* und *emb\_Ende\_EcoRI*. Durch die an den zweiten Primer angefügte *EcoRI*-Schnittstelle wurde eine gerichtete Klonierung ermöglicht. Diese erfolgte, indem der Vektor pEKEx2 mit den Enzymen *EcoRI* und *EcoI*CRI geschnitten wurde. Das Enzym *EcoI*CRI ist ein Isoschizomer von *SacI*, schneidet jedoch mit glatten Enden. Das Fragment sollte so nach der Ligation mit der richtigen Orientierung im Vektor vorliegen, was durch Restriktionsanalyse bestätigt wurde.

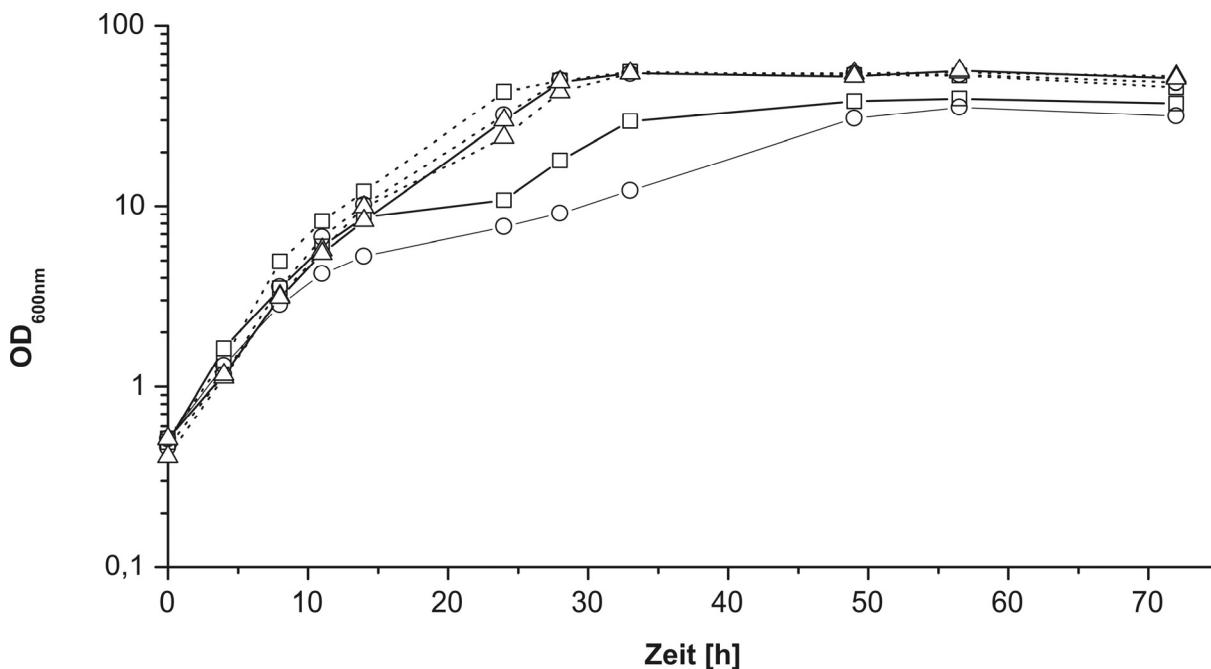
Der konstruierte Vektor pEC-S18*mob2emb* wurde in den *C. glutamicum* Wildtyp eingebracht. Ein Wachstumsexperiment (Abbildung 11) sollte zeigen, ob die *emb*-Überexpression eine erhöhte Ethambutol-Toleranz zur Folge hat. Um dies zu untersuchen, wurde der Stamm 13032 pEC-S18*mob2emb* sowie der Kontrollstamm 13032 pEC-S18*mob2* in CGXII-Medium mit und ohne Ethambutol-Zugabe kultiviert. Wie in Abbildung 11 zu sehen ist, konnte durch die verstärkte Expression des *emb*-Gens partiell die Wachstumshemmung aufgehoben werden. Allerdings gelang keine vollständige Aufhebung der Hemmung.



**Abbildung 11:** Wachstum der *C. glutamicum*-Stämme 13032 pEC-S18*mob2* (□) und 13032 pEC-S18*mob2emb* (△) in CGXII-Medium mit 15 mg/L Ethambutol (—) und ohne Ethambutol (.....).

Da die Expression unter nativem Promotor offensichtlich nicht ausreichte, um den durch Ethambutol-Behandlung hervorgerufenen Wachstumsdefekt zu komplementieren, wurde untersucht, ob die Überexpression von *emb* unter Kontrolle des *tac*-Promotors dies ermöglicht. Dazu wurde der rekombinante Stamm 13032 pEKEx2*emb* benutzt und ein

Wachstumsexperiment, wie zuvor beschrieben, durchgeführt (Abbildung 12).



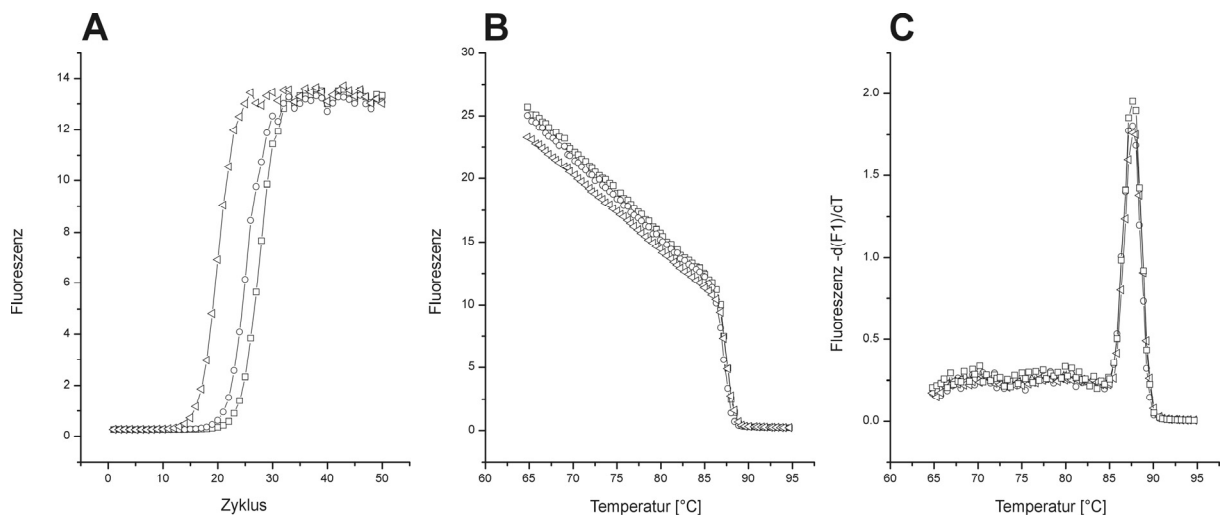
**Abbildung 12:** Wachstum des *C. glutamicum* Wildtyps (□) sowie der Stämme 13032 pEKEx2 (○) und 13032 pEKEx2emb (△) in CGXII-Medium mit 15 mg/L Ethambutol (—) und ohne Ethambutol (----).

Wie Abbildung 12 zeigt, wächst der Stamm 13032 pEKEx2emb in Anwesenheit von Ethambutol vergleichbar mit dem Wildtyp mit Leervektor ohne Ethambutol-Zugabe. Es wurde also im Gegensatz zu dem im vorherigen Abschnitt beschriebenen Experiment mit dem Vektor pEC-S18mob2 durch Überexpression von *emb* durch das Plasmid pEKEx2emb ein Stamm erhalten, welcher Resistenz gegenüber Ethambutol in der verwendeten Konzentration besitzt. Zusätzlich wurde beobachtet, dass der verwendete Vektor pEKEx2 die Empfindlichkeit gegenüber Ethambutol erhöht. Hier könnte es sich um einen kombinierten Einfluss des Vektors, der allein schon eine Verschlechterung des Wachstums bewirkt, und der Wachstumshemmung durch Ethambutol handeln.

### 3.1.1 Nachweis der *emb*-Überexpression durch *Real-time* RT PCR

Ob das *emb*-Gen im Stamm 13032 pEKEx2emb tatsächlich überexprimiert wird, sollten RT PCR-Experimente zeigen. Dazu wurden die Stämme 13032 pEKEx2 und 13032 pEKEx2emb miteinander verglichen. Die Anzucht der beiden Stämme zur Isolierung der RNA erfolgte in

CGXII-Medium, das 25 µg/mL Kanamycin und 100 µM IPTG enthielt. Die Zellen wurden bei einer OD<sub>600</sub> von 5 geerntet. Ausgehend von jeweils 500 ng wurde die RNA mittels Zufallsprimern in cDNA umgeschrieben, welche dann als *template* in der *Real-time* PCR eingesetzt werden konnte. Abbildung 13 A zeigt die erhaltenen Fluoreszenzkurven der *Real-time* PCR. Das bereits nach 15 Zyklen zu deutlicher Fluoreszenzzunahme führende Amplifikat ist durch die zur Kontrolle benutzte *emb*-DNA (◁) bedingt, das darauf erscheinende Amplifikat durch die cDNA des *emb*-Überexprimierers (○) und das letztendlich erscheinende Amplifikat durch die cDNA des Wildtyps (□). Damit wurde die Überexpression von *emb* nachgewiesen. Im Anschluss an die PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt (Abbildung 13 B), deren 1. Ableitung (Abbildung 13 C) zur Bestimmung des T<sub>m</sub>-Wertes herangezogen wurde. Dies bestätigt die Identität der einzelnen PCR-Produkte. Durch absolute Quantifizierung der Transkripte anhand einer externen Standardkurve wurde eine 5-fache Überexpression des *emb*-Gens in dem Stamm 13032 pEKEx2*emb* im Vergleich zu 13032 pEKEx2 berechnet.



**Abbildung 13:** Nachweis der Überexpression des *emb*-Gens in dem Stamm 13032 pEKEx2*emb* (○). Als Vergleichsstamm bei diesem Experiment diente der Stamm 13032 pEKEx2 (□). Als Kontrolle (◁) wurde eine *Real-time* PCR mit pEKEx2*emb*-Plasmid-DNA als *template* durchgeführt.

A) Fluoreszenzzunahme im Verlauf der *Real-time* PCR

B) Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte

C) T<sub>m</sub>-Wert-Bestimmung durch differentielle Schmelzkurve

### 3.1.2 Einfluss von Ethambutol auf die extrazelluläre Proteinakkumulation

Bei allen durchgeführten Experimenten konnte beobachtet werden, dass bei Kultivierung von *C. glutamicum* im Schüttelkolben in Anwesenheit von Ethambutol die sonst übliche Schaumbildung der Kulturen ausblieb. Es bestand daher die Vermutung, dass die Schaumbildung durch von der Zelle exkretierte Substanzen unterbunden wird.

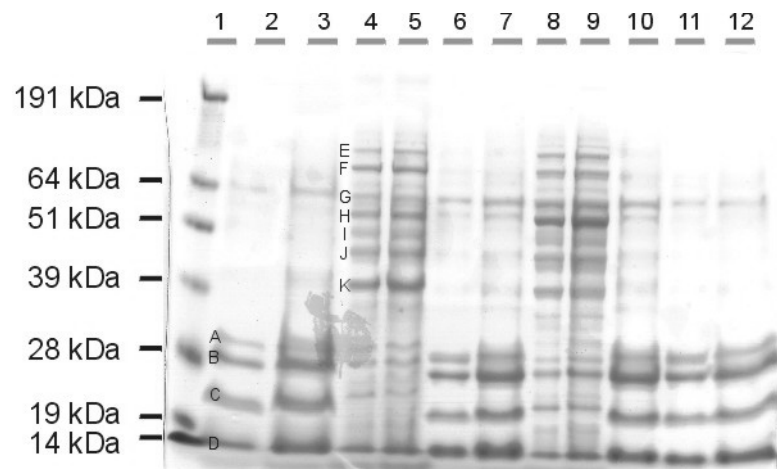
Es wurde deswegen gezielt untersucht, ob nach Ethambutol-Behandlung im Kulturüberstand eine erhöhte Proteinkonzentration vorliegt. Hierzu wurden nach der Kultivierung der *C. glutamicum*-Stämme 13032 Wildtyp, 13032 pEKEx2 und 13032 pEKEx2*emb* Proben der Kulturüberstände genommen. Die Probennahme erfolgte nach 52 h bei Abschluss der Kultivierung. Zu diesem Zeitpunkt waren alle untersuchten Kulturen bereits ausgewachsen. Die Proteinkonzentration der Kulturüberstände sowie die OD-Werte der Kulturen sind in Tabelle 6 wiedergegeben. Anhand der Messergebnisse wird deutlich, dass Ethambutol-Behandlung zu einer drastischen Erhöhung der Proteinkonzentration im Kulturüberstand führt. Beim Wildtyp erfolgte durch Ethambutol eine Erhöhung der Proteinkonzentration um den Faktor 3,2 bzw. für den Stamm 13032 pEKEx2 um den Faktor 2,4. Ebenfalls zeigen die Messungen, dass bei *emb*-Überexpression die Ethambutol-Zugabe auch in dieser Hinsicht keine Wirkung mehr zeigt. Bei der Kultivierung des Stammes 13032 pEKEx2*emb* sind im Einklang damit auch keine Unterschiede in den Proteinkonzentrationen der Überstände zu beobachten.

**Tabelle 6:** Proteinkonzentration in den Kulturüberständen. Mit allen aufgeführten Stämmen wurde jeweils eine Kultivierung in Anwesenheit von Ethambutol (15 µg/L) und eine ohne Ethambutol-Zugabe durchgeführt. Die Probennahme erfolgte jeweils nach 52 h.

	Ethambutol	Proteinkonzentration
13032 Wildtyp	-	374,30 µg/mL
13032 Wildtyp	+	1206,19 µg/mL
13032 pEKEx2	-	737,17 µg/mL
13032 pEKEx2	+	1754,87 µg/mL
13032 pEKEx2 <i>emb</i>	-	533,63 µg/mL
13032 pEKEx2 <i>emb</i>	+	560,18 µg/mL

Weiterhin wurden die Kulturüberstände mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese untersucht. Dazu wurde das 25 µg bzw. 50 µg Protein entsprechende Volumen Kulturüberstand in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 20 µL Gel-Ladepuffer aufgenommen. Die gelelektrophoretische Auftrennung der in den Überständen vorhandenen

Proteine ist in Abbildung 14 dargestellt.



**Abbildung 14:** Proteingel von Kulturüberständen der Stämme 13032 Wildtyp, 13032 pEKEx2 und 13032 pEKEx2*emb* jeweils bei Zugabe einer Ethambutol-Konzentration von 15 mg/L und ohne Ethambutol-Zugabe. Die Buchstaben A-K kennzeichnen die für die massenspektrometrische Untersuchung ausgeschnittenen Banden.

- Spur 1: Standard
- Spur 2: 13032 Wildtyp / 25 µg Protein
- Spur 3: 13032 Wildtyp / 50 µg Protein
- Spur 4: 13032 Wildtyp + 15 mg/L Ethambutol / 25 µg Protein
- Spur 5: 13032 Wildtyp + 15 mg/L Ethambutol / 50 µg Protein
- Spur 6: 13032 pEKEx2 / 25 µg Protein
- Spur 7: 13032 pEKEx2 / 50 µg Protein
- Spur 8: 13032 pEKEx2 + 15 mg/L Ethambutol / 25 µg Protein
- Spur 9: 13032 pEKEx2 + 15 mg/L Ethambutol / 50 µg Protein
- Spur 10: 13032 pEKEx2*emb* / 25 µg Protein
- Spur 11: 13032 pEKEx2*emb* / 50 µg Protein
- Spur 12: 13032 pEKEx2*emb* + 15 mg/L Ethambutol / 50 µg Protein

Wie das Gel zeigt, finden sich beim Wildtyp nur sehr wenige Proteine im Kulturüberstand. Diese liegen vorwiegend in einer Größenordnung von bis zu 30 kDa. Bei Anwesenheit von Ethambutol im Medium ist die Zahl der im Kulturüberstand auffindbaren Proteine aber dramatisch erhöht. Auffällig viele Proteine bis zu einer Größe von 90 kDa sind unter diesen Bedingungen im Kulturüberstand zu finden.

Anschließend erfolgte die Identifizierung der Proteine mittels MALDI-Massenspektrometrie. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Die Banden A-D traten unter allen Bedingungen auf. Es handelte sich hierbei hauptsächlich um Proteine

unbekannter Funktion. A und B liegen im Genom eng benachbart, sind aber nicht konserviert. Unter den nur in Anwesenheit von Ethambutol im Überstand anzutreffenden Proteinen waren zwei der sechs corynebakteriellen Mycolyltransferasen, CmytA und CmytC, zu finden. Dies ist nicht überraschend, da Mycolyltransferasen, einschließlich CmytA, bereits mehrfach in Kulturüberständen nachgewiesen wurden (Puech *et al.*, 2000; Brand *et al.*, 2003). CmytA findet sich ebenfalls im Überstand unbehandelter Zellen. Nach Ethambutol-Behandlung wurden hingegen auch Proteine im Überstand identifiziert, die eindeutig im Cytosol vorliegen (Catalase, Chorismatsynthase). Darunter waren auch Enzyme des Zentralstoffwechsels wie 3-Phosphoglyceratkinase oder 2-Methylisocitratsynthase. Das lässt darauf schließen, dass Ethambutol auch eine Lyse der Zellen bewirkt.

**Tabelle 7:** Ergebnisse der MALDI-Massenspektrometrie der Proteinbanden A-K des in Abbildung 14 gezeigten Proteingels. Die Untersuchung der Banden D und E lieferte kein Ergebnis.

Probe	RCGL-Nummer	Größe (kDa)	Annotation
A	RCGL02239	30	hypothetisches Protein
B	RCGL02234	24	hypothetisches Protein
C	RCGL00230	16	Molybdenum cofactor biosynthesis protein C
D	kein Ergebnis		
E	kein Ergebnis		
F	RCGL01571	90	Glycogenphosphorylase
G	RCGL03519	71	CmytA/PS1
H	RCGL00280	59	Catalase
H	RCGL00001	59	DnaA (chromosomal replication initiator protein)
I	RCGL03066	49	2-Methylisocitratsynthase
J	RCGL01176	45	Enolase
J	RCGL01922	43	3-Phosphoglyceratkinase
K	RCGL00420	40	CmytC
K	RCGL01961	44	Chorismatsynthase

### 3.2 Inaktivierung von *emb*

Wie bereits erwähnt, lassen mit *M. tuberculosis* durchgeführte Experimente darauf schließen, dass Emb der Wirkort von Ethambutol ist. Es konnte gezeigt werden, dass Ethambutol-resistente klinische Isolate von *M. tuberculosis* Mutationen in einem der mycobakteriellen *emb*-Gene aufweisen (Telenti *et al.*, 1997). Da allerdings auch Mutationen in weiteren Genen gefunden wurden, die ebenfalls zu erhöhter Resistenz gegenüber Ethambutol führten, ist

bisher nicht eindeutig geklärt, ob *Emb* tatsächlich den potentiellen Wirkort von Ethambutol darstellt (Ramaswamy *et al.*, 1997). Deshalb sollte die Wirkung von Ethambutol auf *C. glutamicum* nach der Inaktivierung von *emb* untersucht werden. Falls *Emb* der alleinige Wirkort ist, sollte Ethambutol bei der *emb*-Inaktivierungsmutante keinen zusätzlichen negativen Effekt ausüben.

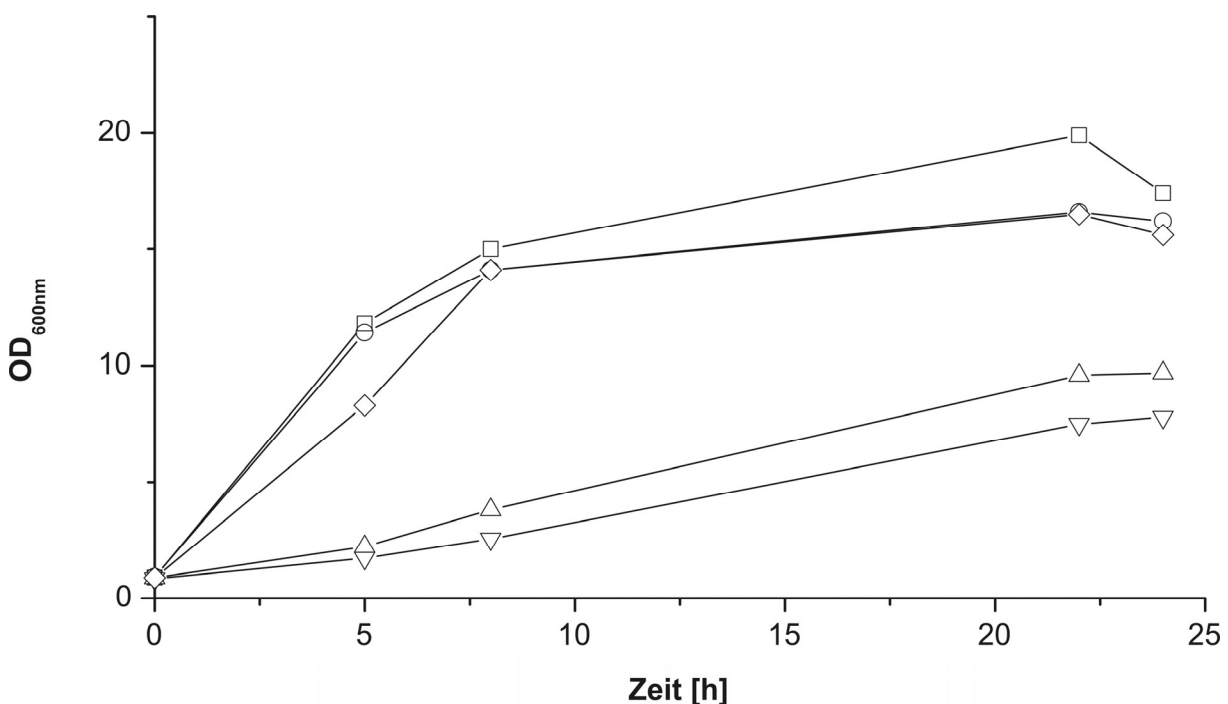
Zur Inaktivierung des *emb*-Gens von *C. glutamicum* wurde ein Plasmid konstruiert, das ein 230 bp großes Fragment dieses Gens enthält. Das mittels der Primer *pemb\_for1* und *pemb\_rev1* amplifizierte PCR-Fragment wurde über die *SmaI*-Schnittstelle der *multiple cloning site* in den Vektor *pK18mob* kloniert. Nach Einbringen des Vektors in den *C. glutamicum* Wildtyp wurde das Plasmid über die homologen Sequenzen ins Genom integriert. Dieses Ereignis konnte mittels PCR unter Verwendung der Primer *pemb\_for2*, *pemb\_rev2* sowie der im Vektor bindenden Standardprimer RSP und USP in zwei unabhängigen PCRs eindeutig nachgewiesen werden. Bei der Konstruktion der Inaktivierungsmutante 13032::*emb* erwies sich der Schritt der Integration als außerordentlich schwierig, sodass nach 14 durchgeführten Elektroporationen nur 16 Klone erhalten wurden. Bei einer einzigen Kolonie, die sich durch sehr geringes Wachstum auszeichnete und erst nach einer Inkubationszeit von einer Woche auf den BHIS-Platten, auf denen die Zellen nach der Elektroporation ausplattiert wurden, erkennbar war, konnte die Integration von *pK18mob* in den *emb*-Locus nachgewiesen werden.

Die so erzeugte Mutante 13032::*emb* wurde wegen des starken Wachstumsdefekts in BHIS-Komplexmedium kultiviert, welches zur osmotischen Stabilisierung Sorbit enthält. Die Wachstumskurven in Abbildung 15 machen den Wachstumsdefekt der Mutante im Vergleich zum Wildtyp deutlich. Wie ersichtlich erreicht die *emb*-Inaktivierungsmutante lediglich eine  $OD_{600}$  von 10.

Um auszuschließen, dass durch das integrierte Plasmid *downstream*-Effekte verursacht werden, sollte die Komplementation mit dem *emb*-Gen erfolgen. Dazu war aufgrund der Kanamycin-Resistenz der Inaktivierungsmutante die Konstruktion eines Vektors mit einer anderen Resistenz nötig. Dazu wurde in dem bereits vorhandenen Plasmid *pEKEx2emb* die Kanamycin-Resistenz gegen die Spectinomycin-Resistenz ausgetauscht. Dies geschah durch Ausschneiden der Kanamycin-Resistenz mittels der Restriktionsenzyme *StuI* und *XhoI*. Das ausgeschnittene 1 kb große Fragment beinhaltet die gesamte Kanamycin-Resistenz. Nachfolgend wurde diese durch das Gen für die Spectinomycin-Adenylyltransferase, welches Spectinomycin-Resistenz verleiht, ersetzt. Dieses Gen wurde nach Schneiden des Plasmids *pEC-S18mob2* (Kirchner & Tauch, 2003) mit dem

Restriktionsenzym *Bgl*II als 1,2 kb-Fragment isoliert. Anschließend wurde das Fragment mit dem zuvor linearisierten Vektor pEKEx2*emb* ligiert. Dieser Vektor wurde als pEKEx3*emb* bezeichnet. Auf die gleiche Weise wurde ausgehend von dem Basisplasmid pEKEx2 auch das Plasmid pEKEx3 konstruiert.

Die *emb*-Inaktivierungsmutante wurde sowohl mit pEKEx3 als auch mit pEKEx3*emb* transformiert. Die so erhaltenen Stämme 13032::*emb* pEKEx3 und 13032::*emb* pEKEx3*emb* wurden zusammen mit dem Wildtyp in BHIS Medium kultiviert. Die Wachstumskurven sind in Abbildung 15 gezeigt. Hier wird deutlich, dass das Plasmid pEKEx3*emb* tatsächlich in der Lage ist, den durch die Inaktivierung von *emb* verursachten Wachstumsdefekt nahezu vollständig zu komplementieren. Der Vergleich der Wachstumskurven des Wildtyps und der komplementierten Inaktivierungsmutante zeigt allerdings, dass die Mutante die OD-Werte des Wildtyps nicht ganz erreicht. Möglicherweise könnte auch die Überexpression des Membranproteins Emb einen negativen Einfluss ausüben.

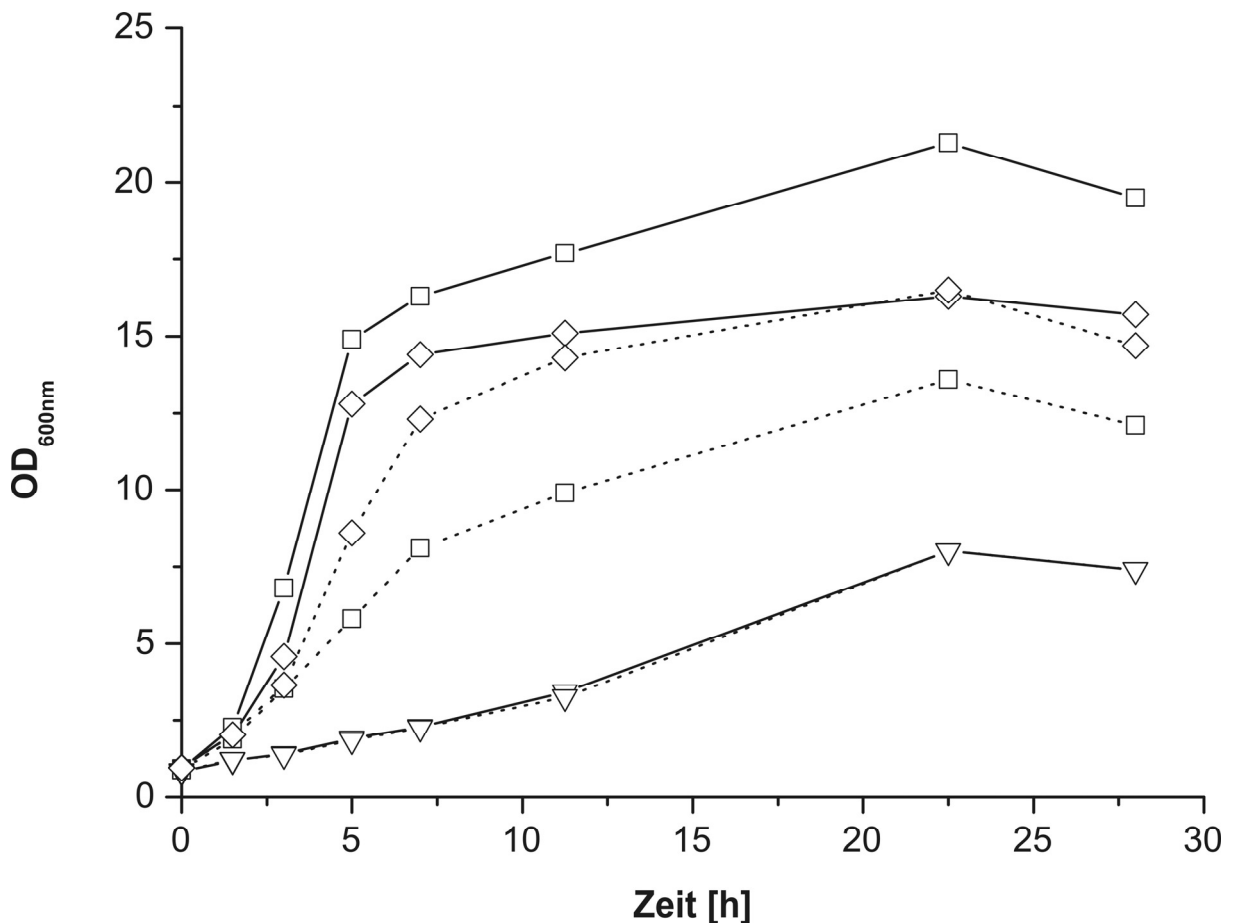


**Abbildung 15:** Wachstum der *emb*-Inaktivierungsmutante (△) sowie der komplementierten Mutante (◇) im Vergleich zum Wildtyp (□). Als Kontrollen sind ebenfalls der Wildtyp (○) sowie die Inaktivierungsmutante mit Leervektor (▽) gezeigt. Die Kultivierung erfolgte in BHIS-Komplexmedium. Die Kultur der Inaktivierungsmutante enthielt 25 µg/ml Kanamycin.



### 3.3 Ethambutol-Toleranz der *emb*-Inaktivierungsmutante

Wie bereits erwähnt ist bisher nicht eindeutig geklärt, ob Emb tatsächlich den Wirkort von Ethambutol darstellt (Ramaswamy *et al.*, 1997). Falls Emb der alleinige Wirkort ist, sollte Ethambutol bei der *emb*-Inaktivierungsmutante keinen zusätzlichen negativen Effekt ausüben. Um dies zu prüfen, wurde die *emb*-Inaktivierungsmutante sowohl mit als auch ohne Ethambutol kultiviert. Anhand der in Abbildung 16 gezeigten Wachstumskurven ist deutlich zu erkennen, dass tatsächlich bei Zugabe von 15 mg/L Ethambutol die komplementierte Mutante wie der gleiche Stamm ohne Ethambutol-Zugabe wächst. Somit führt Ethambutol bei der *emb*-Inaktivierungsmutante zu keiner zusätzlichen Wachstumshemmung. Auch die durch plasmidkodiertes *emb* komplementierte Inaktivierungsmutante zeichnet sich, wie zuvor für die Überexpression im Wildtyphintergrund gezeigt, durch eine erhöhte Ethambutol-Toleranz aus.



**Abbildung 16:** Einfluss von Ethambutol auf das Wachstum des *C. glutamicum* Wildtyps (□), der *emb*-Inaktivierungsmutante (▽) sowie der komplementierten Mutante (◇) bei Kultivierungen in BHIS-Vollmedium mit Ethambutol (----) und ohne Ethambutol (—).

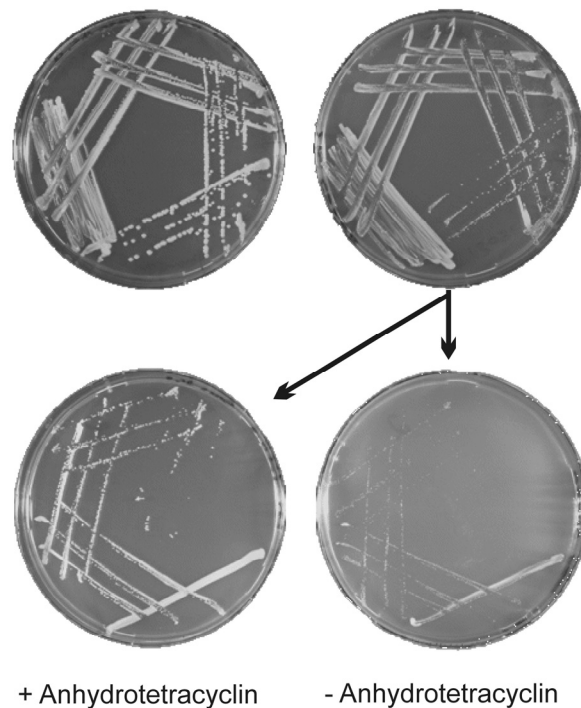
### 3.4 Expression von *emb* unter Kontrolle des *tetA*-Promotors

Da die *emb*-Inaktivierungsmutante nur ein sehr eingeschränktes Wachstum zeigte und anfangs die Transformation dieser Mutante nicht möglich war, wurde parallel ein Stamm hergestellt, bei dem angestrebt wurde, die *emb*-Expression zu regulieren. Um dies zu erreichen, sollte das *emb*-Gen unter die Kontrolle eines regulierbaren Promotors gestellt werden. Dazu bot sich der *tetA*-Promotor an (Saenger *et al.*, 2000), mit dem die Regulation des corynebakteriellen *clpP*-Gens bereits erfolgreich war (Engels *et al.*, 2004).

Um den chromosomalen Austausch des nativen *emb*-Promotors durch den *tetA*-Promotor zu erreichen, wurde das Plasmid pK19*mobsacB* P<sub>*tetA*</sub>-*clpP* verwendet. In diesem Plasmid wurden die ursprünglichen den *tetA*-Promotor flankierenden Sequenzen mit den Restriktionsenzymen *Xma*I und *Nsi*I bzw. *Xho*I und *Xba*I nacheinander herausgeschnitten und anschließend durch PCR-Produkte ersetzt, die über Primer mit den passenden Schnittstellen versehen waren (Primer: P<sub>*tetA*</sub> upstream *Nsi*I, P<sub>*tetA*</sub> upstream *Xma*I; P<sub>*tetA*</sub> downstream *Xho*I, P<sub>*tetA*</sub> downstream *Xba*I; siehe Anhang). So wurde das Plasmid pK19*mobsacB* P<sub>*tetA*</sub>-*emb* erhalten, welches den *tetA*-Promotor trägt, der flankiert wird von zwei jeweils ~400 bp großen Fragmenten, die im Chromosom stromaufwärts und stromabwärts vom *emb*-Promotor liegen. Nach Transformation des Plasmids in *C. glutamicum* kam es über diese Sequenzen zu einer homologen Rekombination, die die Integration des Plasmids ins Genom ermöglichte. Nach einem zweiten Rekombinationsschritt, der wieder zur Exzision des Vektors aus dem Genom führte, wurde so der angestrebte chromosomale Austausch des *emb*-Promotors durch den *tetA*-Promotor erreicht. Die korrekte Konstruktion wurde mittels PCR überprüft. Der erhaltene Stamm 13032 P<sub>*tetA*</sub>-*emb* wurde anschließend mit dem Plasmid pJC1 P<sub>*gap*</sub>-*tetR* transformiert, welches das Gen für den Repressor TetR trägt, dem der konstitutive Promotor des *gap*-Gens vorangestellt ist. Dieser Transformationsschritt wurde in Anwesenheit von 200 ng/mL Anhydrotetracyclin durchgeführt, um die Expression des unter Kontrolle des *tetA*-Promotors stehenden *emb*-Gens zu gewährleisten und das Wachstum der Transformanten nicht zu beeinträchtigen.

Zunächst wurde das Wachstum des Stammes 13032 P<sub>*tetA*</sub>-*emb* pJC1 P<sub>*gap*</sub>-*tetR* auf Platten untersucht. Abbildung 17 zeigt das Wachstum des Stammes sowohl in Anwesenheit von Anhydrotetracyclin (oben links) als auch in Abwesenheit von Anhydrotetracyclin (oben rechts). Interessanterweise zeigte sich erst nach einem zusätzlichen Überimpfen von der Platte ohne Anhydrotetracyclin-Zugabe auf frische Platten ein deutlicher induktorabhängiger

Wachstumsunterschied. Hier ist das Wachstum durch Abwesenheit des Induktors stark beeinträchtigt.



**Abbildung 17:** Wachstum des Stammes 13032 *Ptet-emb pJC1 Pgap-tetR* auf Minimalmedium unter Zugabe von 200 ng/mL Anhydrotetracyclin (oben links) und ohne Zugabe von Anhydrotetracyclin (oben rechts). Die beiden unteren Platten zeigen nach erneutem Ausstreichen von der Platte ohne Induktor auf jeweils eine Platte mit (unten links) und ohne Induktor (unten rechts) einen deutlichen Wachstumsunterschied.

Zusätzlich wurden Wachstumsversuche in Flüssigkultur durchgeführt. Die Vorkultivierung erfolgte in CgIII-Medium, welches 200 ng/mL Anhydrotetracyclin enthielt. Mit Zellen dieser Vorkultur wurden anschließend parallel zwei CgXII-Hauptkulturen angeimpft, wobei ein Kolben 200 ng/mL Anhydrotetracyclin enthielt. Der Stamm wies unter nicht induzierenden Bedingungen ein leicht verzögertes Wachstum auf (nicht gezeigt). Wurde wie zuvor bei dem Plattentest geschildert nochmals mit der Kultur, die kein Anhydrotetracyclin enthielt, eine zweite Hauptkultur angeimpft, war die Wachstumsverzögerung stärker ausgeprägt.

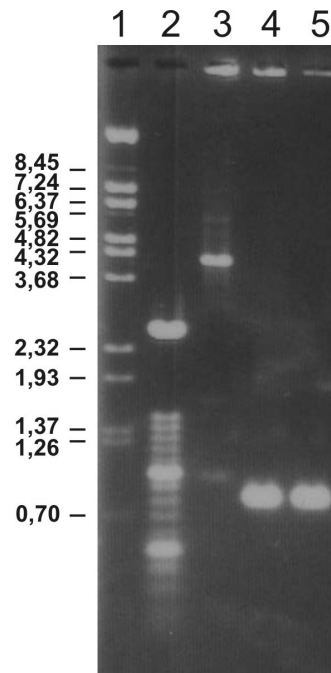
Offensichtlich ist also mittels des *tetA*-Promotors keine strikte Kontrolle der *emb*-Expression möglich, obwohl dieser Promotor eigentlich als besonders strikt reguliert gilt (Saenger *et al.*, 2000). Es könnte aber auch sein, dass extrem geringe Expression ohne Anhydrotetracyclin-Zugabe erfolgt und bereits geringe durch *emb* bedingte Arabinosyltransferase-Aktivität wieder Wachstum der Mutante erlaubt. Die durch die *emb*-Regulation bedingte Wachstums-

verzögerung ging erwartungsgemäß mit Glutamatausscheidung (bis zu 25 mM) einher. Das zeigt, dass *emb*-Expression allein mit Glutamatausscheidung korreliert und keiner der weiteren möglichen Effekte von Ethambutol dafür in Frage kommt (Deng *et al.*, 1995).

### 3.5 Deletion des *emb*-Gens

Da sich gezeigt hatte, dass *emb* inaktivierbar ist, war auch denkbar, dass dieses Gen in *C. glutamicum* ebenfalls deletiert werden kann. Dabei ist problematisch, dass es für die zweite Rekombination, die zur Deletion führt, keinen positiven Selektionsdruck gibt. Trotzdem wurde dieser Ansatz verfolgt, weil die Abwesenheit des Integrationsvektors in der Deletionsmutante erheblich mehr Freiheiten bezüglich der Nutzung von Vektoren bietet.

Um die Deletion von *emb* zu erreichen, wurde das Plasmid pK19*mobsacB*  $\Delta$ *emb* konstruiert. Dazu wurden in einer ersten PCR mittels der Primerpaare *emb\_start\_in* und *emb\_start\_out* bzw. *emb\_end\_in* und *emb\_end\_out* zwei Fragmente generiert, die nach Aufreinigung als *template* für eine zweite PCR dienten, bei der die Primer *emb\_start\_out* und *emb\_end\_out* erneut zum Einsatz kamen. Nach Behandlung mit Klenow-Polymerase wurde das erhaltene Fragment in den mit *Sma*I geschnittenen Vektor pK19*mobsacB* ligiert, um so das Deletionskonstrukt pK19*mobsacB*  $\Delta$ *emb* zu erhalten. Nach 8 Transformationsansätzen konnten 3 Integrationsmutanten erhalten werden, die zur zweiten Rekombination in LB angezogen wurden und anschließend auf LB-Platten, die 10 % Saccharose enthielten, ausplattiert wurden. Mögliche Deletionsklone wurden mittels PCR mit den Primern *emb\_start\_Deletionskontrolle* und *emb\_end\_Deletionskontrolle* identifiziert. Mehr als 100 Klone mussten getestet werden, bis schließlich zwei Mutanten, bei denen *emb* deletiert war, erhalten wurden (Abbildung 18).



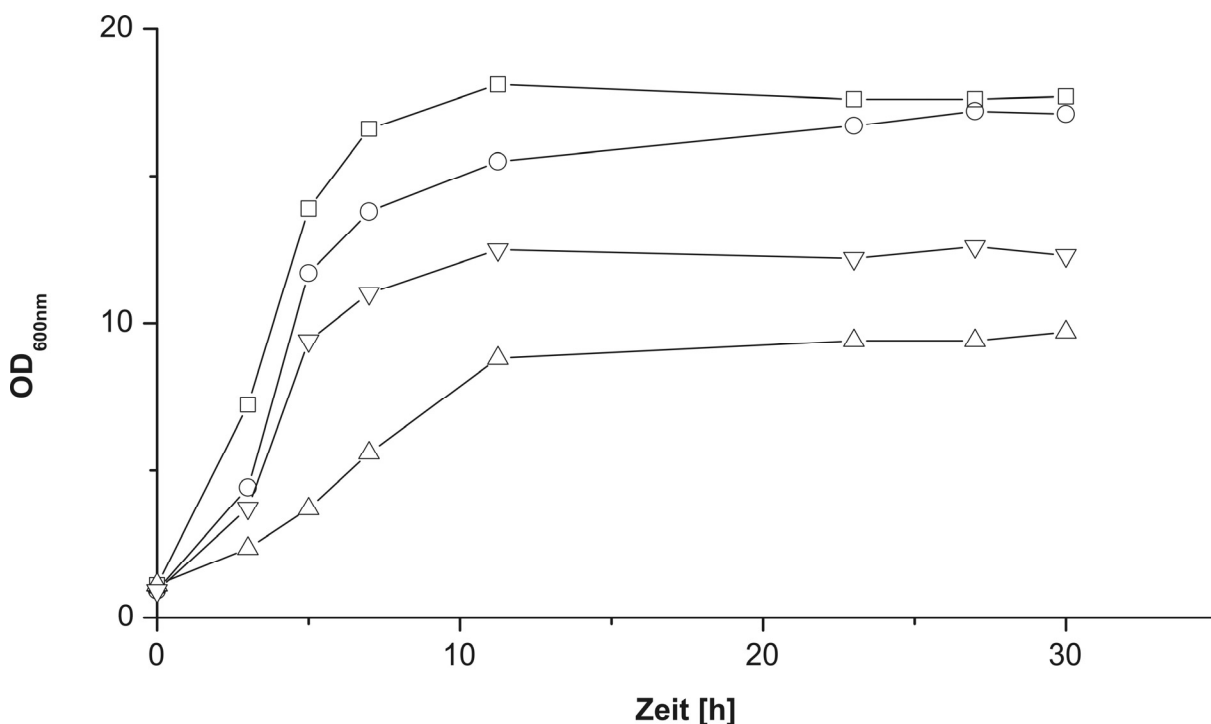
**Abbildung 18:** Nachweis der *emb*-Deletion. Spur 1: Standard 1 (Lambda-DNA geschnitten mit *Bst*EII); Spur 2: Standard 2 (100 bp-1500 bp in 100 bp-Schritten); Spur 3: Wildtyp; Spur 4: *emb*-Deletionsklon 1; Spur 5: *emb*-Deletionsklon 2.

Das Wachstum der *emb*-Deletionsmutante wurde zuerst auf Platten untersucht. Wie Abbildung 19 zeigt, wies die Mutante im Vergleich zum Wildtyp ein äußerst geringes Wachstum auf. Die Mutante wurde mit dem zuvor konstruierten Plasmid pEKEx2*emb* transformiert. Wird *emb* plasmidkodiert angeboten, so wird der Wachstumsdefekt der Mutante komplementiert.



**Abbildung 19:** Wachstum der *emb*-Deletionsmutante 13032  $\Delta emb$  (2) im Vergleich zum Wildtyp 13032 (1) auf LB-Agar.

Aufgrund des schlechten Wachstums der Mutante wurde zur Anzucht in Flüssigkultur das mit Sorbit osmotisch stabilisierte BHIS-Vollmedium verwendet. Die Abbildung 20 zeigt das Wachstum der Mutante sowie der komplementierten Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Ein Vergleich des Wildtyps mit dem Stamm, welcher den Leervektor pEKEx2 trägt, macht deutlich, dass das Plasmid pEKEx2 bereits zu einer erheblichen Verschlechterung des Wachstums führt. Solche Vektoreffekte sind bekannt (Griffith *et al.*, 1994; Stavropoulos & Strathdee, 2000). Die Mutante 13032  $\Delta emb$  mit dem Leervektor pEKEx2 wächst deutlich verzögert gegenüber den Kontrollen und erreicht auch eine erheblich niedrigere OD. Durch Komplementation der Mutante mit pEKEx2 $emb$  wird das Wachstum wesentlich verbessert, aber es erfolgte offensichtlich keine vollständige Komplementation. So erreichte die komplementierte Mutante nur eine End-OD von 13, wohingegen der Wildtyp eine OD von 17 erreichte. Der gleiche Effekt wurde bei der Komplementation der *emb*-Inaktivierungsmutante beobachtet (siehe Abschnitt 3.2). Möglicherweise spielt hier eine Rolle, dass sich die Überexpression des Membranproteins Emb negativ auf die Zelle auswirkt und so zu einem früheren Eintritt in die stationäre Phase führt.



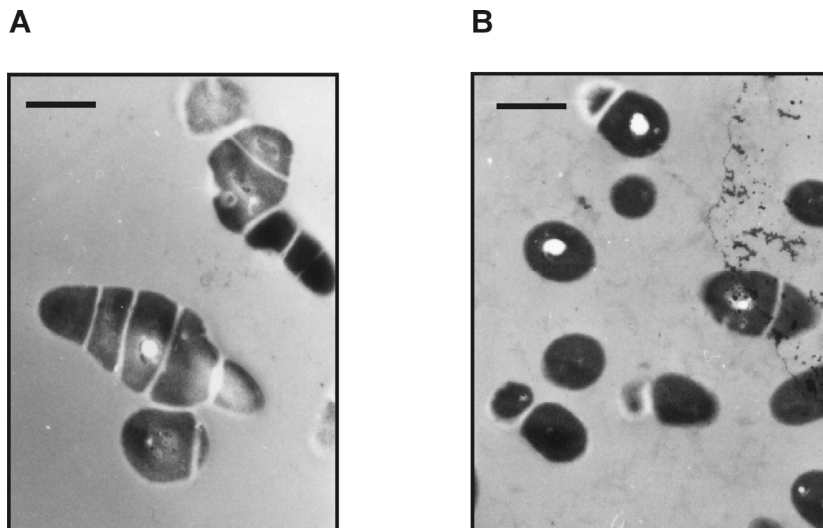
**Abbildung 20:** Wachstum der *C. glutamicum*-Stämme 13032 Wildtyp (□), 13032 pEKEx2 (○), 13032  $\Delta emb$  pEKEx2 (△) und 13032  $\Delta emb$  pEKEx2 $emb$  (▽) in BHIS-Medium.

Bei Wachstum in Minimalmedium wurde als ein weiterer Phänotyp der *emb*-Deletionsmutante eine verringerte Schaumbildung festgestellt, wie es auch beim Wildtyp bei Ethambutol-Zugabe der Fall war (siehe Abschnitt 3.1.2). Ebenfalls war die

Proteinkonzentration im Kulturüberstand stark erhöht. Auch die Kulturüberstände der *emb*-Deletionsmutante in CGXII-Medium wurden auf ihren Proteingehalt hin untersucht. Die Messung ergab, dass im Kulturüberstand der *emb*-Deletionsmutante 13032  $\Delta emb$  pEKEx2 etwa 6-fach mehr Protein vorhanden war als im Kulturüberstand des Stammes 13032 pEKEx2 und dies bei geringerer Biomassebildung der Kultur. Im Fall der komplementierten Mutante ist im Kulturüberstand keine erhöhte Proteinkonzentration zu beobachten. Damit steht dieser Phänotyp in direktem Zusammenhang mit der *emb*-Expression. Es ist demnach sehr wahrscheinlich, dass der gemeinsame Phänotyp der stark verminderten Schaumbildung, welcher beim Wildtyp unter Ethambutol-Zugabe und bei der *emb*-Deletionsmutante zu beobachten war, auf eine Steigerung der Proteinmenge in den Kulturüberständen zurückzuführen ist. Im Übrigen trat dieser Phänotyp ebenfalls bei der *emb*-Inaktivierungsmutante sowie der regulierbaren Mutante unter Bedingungen mit niedriger *emb*-Expression auf. Des Weiteren verhalten sich alle untersuchten Stämme hinsichtlich der Schaumbildung und der im Kulturüberstand vorliegenden Proteinkonzentration dem Wildtyp vergleichbar, sobald sie durch plasmidkodiertes *emb* komplementiert werden.

### 3.5.1 Elektronenmikroskopische Untersuchung der *emb*-Deletionsmutante

Zellen der *emb*-Deletionsmutante wurden einer elektronenmikroskopischen Untersuchung unterzogen. Abbildung 21 zeigt, dass die Zellteilung der *emb*-Deletionsmutante stark gestört ist, sodass die Trennung der Zellen nicht mehr erfolgt und sich Ketten von vier oder mehr Zellen bilden. Nach der Komplementation weisen die Zellen diese morphologischen Veränderungen nicht mehr auf. Demnach ist der beobachtete Phänotyp allein auf die *emb*-Deletion zurückzuführen. Diese morphologische Veränderung steht im Einklang mit dem bisherigen Kenntnisstand, der *emb* eine wesentliche Funktion in der Arabinogalaktansynthese zuschreibt (Escuyer *et al.*, 2001).



**Abbildung 21:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Zellen der *emb*-Deletionsmutante 13032  $\Delta emb$  pEKEx2 (A) und der komplementierten Mutante 13032  $\Delta emb$  pEKEx2*emb* (B) (Balken = 2  $\mu m$ ).

### 3.5.2 Biochemische Charakterisierung der *emb*-Deletionsmutante

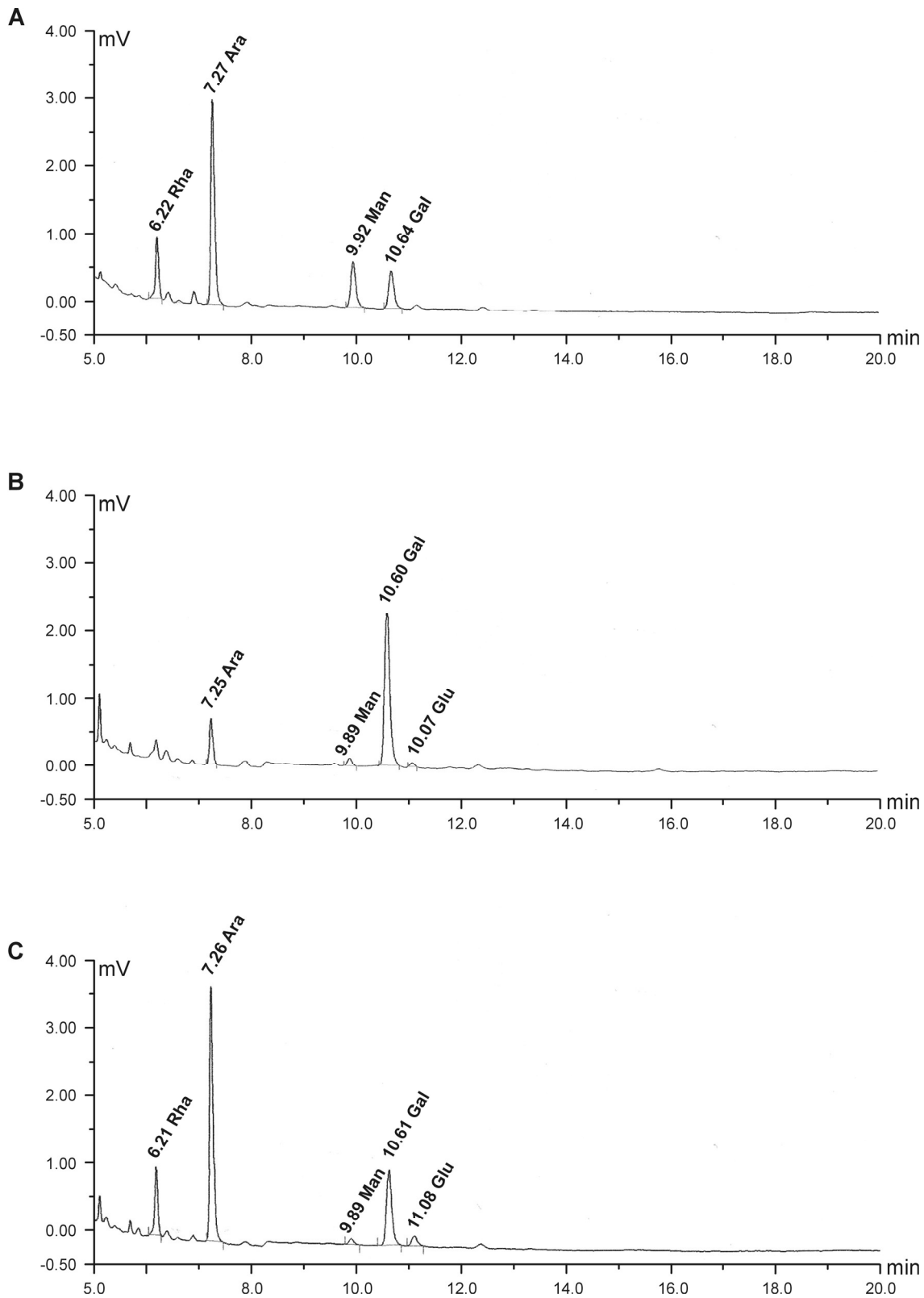
Mit der *emb*-Deletionsmutante steht nun ein Stamm zur Verfügung, um die Funktion von *emb* und den damit verknüpften Aufbau des Arabinogalaktans im Detail zu untersuchen. Es sollte deswegen zunächst eine detaillierte Analyse des Arabinogalaktans in der Mutante durchgeführt werden. Vor dem Hintergrund, dass *M. tuberculosis* drei *emb*-Gene mit noch nicht eindeutig zugewiesener Funktion besitzt, kann eine Mutante mit ausgeschalteter Emb-Aktivität später auch zur Untersuchung der spezifischen Funktion der mycobakteriellen *emb*-Gene eingesetzt werden.

#### 3.5.2.1 Arabinogalaktan-Analyse der *emb*-Deletionsmutante

Mit der Arabinogalaktan-Analyse sollte untersucht werden, welche Folgen das Ausschalten der Arabinosyltransferase Emb auf die Synthese des Arabinogalaktans hat. Dazu wurden Zellen des Wildtyps, der *emb*-Deletionsmutante und der komplementierten Mutante in BHIS-Medium angezogen. Nach Erreichen einer  $OD_{600}$  von 5 wurden die Zellen geerntet und einmal mit Saline gewaschen. Anschließend wurden die nicht gebundenen Lipide extrahiert, die Zellen aufgeschlossen und der Mycolyl-Arabinogalaktan-Peptidoglykankomplex isoliert. Die getrockneten Proben wurden zur Alditol-Acetat-Derivatisierung zuerst mit TFA behandelt



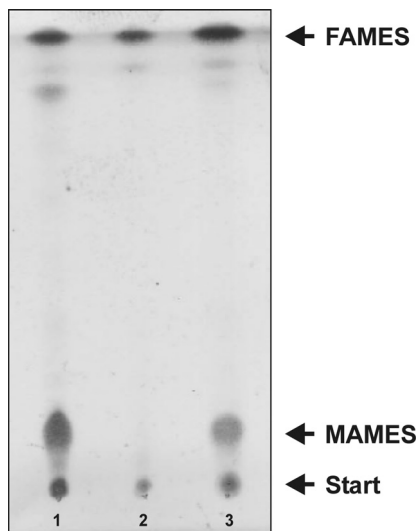
und anschließend mit Natriumbordeuterid reduziert. Nach der Zugabe von Essigsäureanhydrid wurden die Acetat-Derivate der Zucker erhalten. Die acetylierten Zucker wurden nach Resuspendieren in Chloroform gaschromatographisch analysiert. Abbildung 22 zeigt, dass das Arabinogalaktan in der *emb*-Deletionsmutante einen stark reduzierten Arabinosegehalt aufweist. Hingegen ist die Mutante nach Komplementation durch plasmidkodiertes *emb* im Arabinosegehalt des isolierten Zuckerpolymers unbeeinflusst. Das bestätigt, dass der für die Deletionsmutante beobachtete geringere Arabinoseanteil im Arabinogalaktan auf das Ausschalten der Arabinosyltransferase *Emb* zurückzuführen ist. Überraschenderweise enthält aber das isolierte Zuckerpolymer der *emb*-Deletionsmutante noch geringe Mengen Arabinose. Dies könnte bedeuten, dass *C. glutamicum* über noch nicht bekannte Wege eine weitere Möglichkeit der Arabinogalaktansynthese besitzt. Auch könnte der Einbau geringfügiger Mengen Arabinose durch unspezifische Reaktionen anderer Glykosyltransferasen wie zum Beispiel einer Mannosyltransferase erfolgen. Derzeit werden noch Analysen der Verknüpfungstypen der Arabinose durchgeführt.



**Abbildung 22:** Gaschromatographische Untersuchung der durch Hydrolyse freigesetzten Zuckerbausteine des Arabinogalaktans. Untersucht wurden Zellen des Wildtyps (A), der *emb*-Deletionsmutante (B) und der komplementierten Mutante (C).

### 3.5.2.2 Lipid-Analyse der *emb*-Deletionsmutante

Zur weiteren Charakterisierung der *emb*-Deletionsmutante wurde untersucht, wie sich die Veränderungen im Arabinan auf die an dieses Polymer kovalent gebundenen Mycolsäuren auswirken. Dazu wurden die freien Lipide von auf BHIS-Medium angezogenen Zellen extrahiert und anschließend die gebundenen Mycolsäuren als Mycolsäuremethylester (MAMES) isoliert. Das Ergebnis der dünnschichtchromatographischen Trennung ist in Abbildung 23 gezeigt.



**Abbildung 23:** Dünnschichtchromatographische Trennung der Fettsäuremethylester (FAMES) und der Mycolsäuremethylester (MAMES), die aus dem *C. glutamicum* Wildtyp (1), der *emb*-Deletionsmutante (2) und der komplementierten Mutante (3) isoliert wurden.

Die Dünnschichtchromatographie zeigt deutlich, dass in der *emb*-Deletionsmutante fast keine gebundenen Mycolsäuren mehr nachweisbar sind. Hingegen zeigt die Dünnschichtchromatographie deutlich das Vorhandensein der Mycolsäuren sowohl im Wildtyp als auch in der komplementierten Deletionsmutante. Dies bedeutet, dass durch den stark reduzierten Arabinosegehalt des Zellwandzuckerpolymers Arabinogalaktan in der *emb*-Deletionsmutante offensichtlich keine Zuckerakzeptormoleküle zur kovalenten Bindung der Mycolsäuren zur Verfügung stehen.

### 3.6 Untersuchungen zu den mycobakteriellen *emb*-Genen

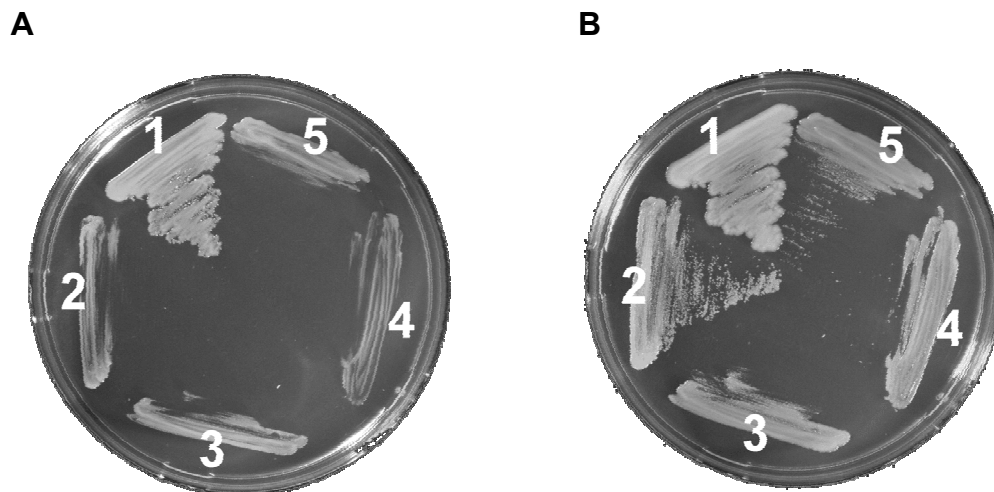
Vor dem Hintergrund, dass *M. tuberculosis* drei *emb*-Gene mit noch nicht eindeutig zugewiesener Funktion besitzt (Escuyer *et al.*, 2001), kann eine Mutante mit ausgeschalteter Emb-Aktivität auch zur Untersuchung der spezifischen Funktion der mycobakteriellen *emb*-Gene eingesetzt werden. Es gibt Hinweise darauf, dass EmbC an der Synthese des Arabinanbestandteils des Lipoarabinomannans (LAM) beteiligt ist und die beiden anderen Arabinosyltransferasen EmbA und EmbB die Bildung des am Peptidoglykan gebundenen Arabinans bewirken (Zhang *et al.*, 2003). Ob *C. glutamicum* LAM besitzt, ist nach den bisherigen Polymeranalysen nicht eindeutig geklärt (Gibson *et al.*, 2003), erscheint aber aufgrund der Enzymausstattung von *C. glutamicum* unwahrscheinlich. Weiterhin ist zur Zeit völlig unklar, welche Verknüpfungstypen der Arabinose die Arabinosyltransferasen im Einzelnen katalysieren. Unser Ziel war es deshalb, *C. glutamicum* mit seiner einfacher aufgebauten Zellwand als Modellorganismus zu nutzen, um so Hinweise auf die jeweilige Funktion der drei Arabinosyltransferasen aus *M. tuberculosis* zu erhalten. Die *emb*-Deletionsmutante sollte dazu genutzt werden, um vor dem Hintergrund einer fehlenden Arabinansynthese die drei *emb*-Gene aus *M. tuberculosis* einzeln zu exprimieren. Mit Hilfe solcher Stämme sollte Aufschluss über den Arabinose-Verknüpfungstyp erhalten werden, den die einzelnen Emb-Proteine aus *M. tuberculosis* jeweils katalysieren.

#### 3.6.1 Expression von *embA*, *embB* und *embC* in *C. glutamicum*

Um die Expression der drei *emb*-Gene aus *M. tuberculosis* zu ermöglichen, musste zuerst jedes Gen einzeln in einen geeigneten Expressionsvektor kloniert werden. Da die Gene *embA*, *embB* und *embC* als Operon organisiert sind, wurden sie unter dem artifiziellen *tac*-Promotor exprimiert. Dazu eignet sich der zuvor bereits zur Klonierung von *emb* aus *C. glutamicum* verwendete Expressionsvektor pEKEx2 (Eikmanns *et al.*, 1991). Zur Klonierung von *embA* wurde das Gen mittels der Primer *embA\_for* und *embA\_rev* amplifiziert, wobei die Primer jeweils mit einer *EcoRI*-Schnittstelle versehen waren. Zusätzlich enthielt der Primer *embA\_for* eine Ribosomenbindestelle. Nach *EcoRI*-Verdau wurde das generierte PCR-Produkt in den ebenfalls mit *EcoRI* geschnittenen Vektor pEKEx2 ligiert. Die Gene *embB* und *embC* wurden analog zu dieser Vorgehensweise mittels der Primer *embB\_for* und *embB\_rev* bzw. *embC\_for* und *embC\_rev* amplifiziert und die PCR-Produkte anschließend über eine *SacI*-Schnittstelle in pEKEx2 ligiert. Es wurde jeweils eine Vielzahl von PCR- und Ligationsansätzen durchgeführt und auch diverse Klone ansequenziert. Erst nach Ersatz der *Expand High Fidelity-Polymerase* (Roche Diagnostics,

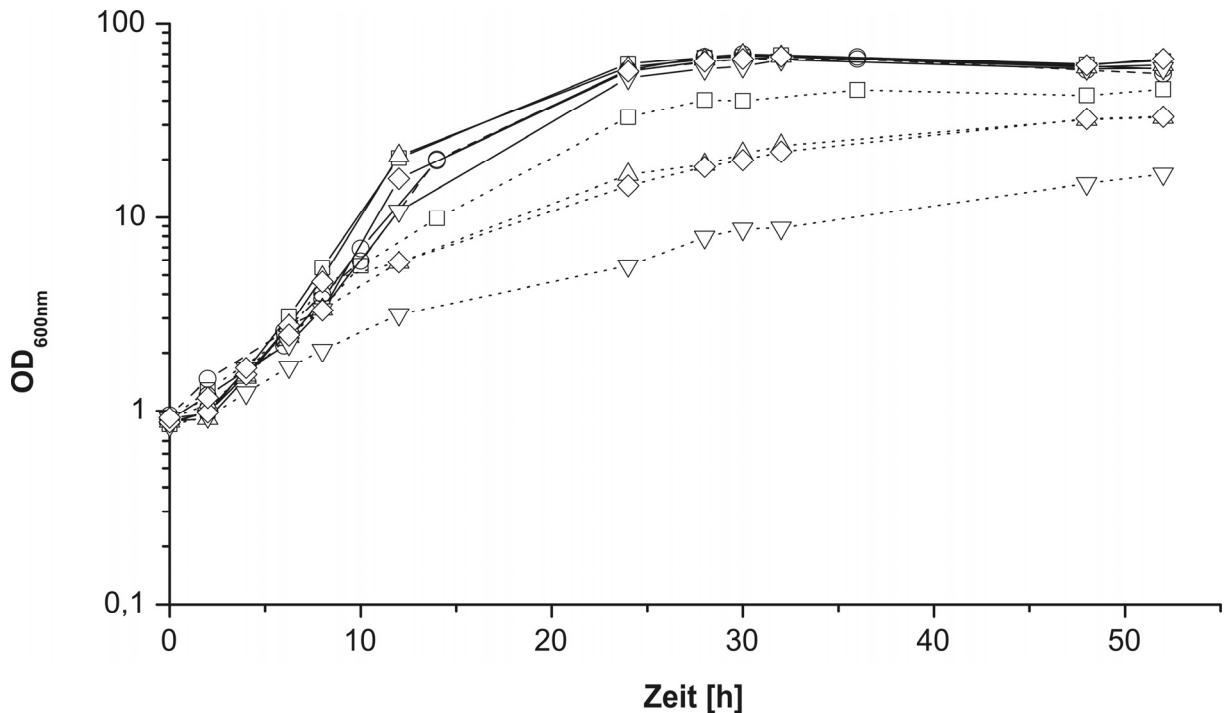
Mannheim) durch die *KOD Hot Start DNA Polymerase* (Merck Biosciences, Darmstadt) konnten die jeweils ~3,5 kb großen Gene erfolgreich kloniert werden. Die korrekte Sequenz der auf diese Weise hergestellten Plasmide pEKEx2 *Mt\_embA*, pEKEx2 *Mt\_embB* und pEKEx2 *Mt\_embC* wurde durch Sequenzierung vollständig bestätigt.

Die drei Plasmide pEKEx2 *Mt\_embA*, pEKEx2 *Mt\_embB* und pEKEx2 *Mt\_embC* wurden durch Elektroporation in die *C. glutamicum emb*-Deletionsmutante eingebracht. Die Transformation mit den mycobakteriellen *emb*-Genen erwies sich gegenüber der Transformation mit dem corynebakteriellen *emb* als außerordentlich schwierig. Die BHIS-Platten mit den ausplattierten Transformationsansätzen mussten mindestens für einen Zeitraum von 5 Tagen inkubiert werden, wonach nur wenige Kolonien von sehr geringer Größe sichtbar wurden. Abbildung 24 zeigt das Wachstum der resultierenden Stämme 13032  $\Delta emb$  pEKEx2 *Mt\_embA*, 13032  $\Delta emb$  pEKEx2 *Mt\_embB* und 13032  $\Delta emb$  pEKEx2 *Mt\_embC* im Vergleich zur *emb*-Deletionsmutante 13032  $\Delta emb$  pEKEx2 sowie der komplementierten Mutante 13032  $\Delta emb$  pEKEx2*emb* auf BHIS-Agarplatten. Alle konstruierten Stämme wiesen überraschenderweise sehr schlechtes Wachstum auf. Das bedeutet, dass keines der mycobakteriellen Gene in der Lage ist, die *emb*-Deletion in *C. glutamicum* zu komplementieren. Bei Inkubation der einzelnen Stämme über 48 h zeichnete sich sogar ein Wachstumsnachteil der die *embA,B,C*-Plasmide tragenden Stämme ab. Dies wurde auch in Schüttelkolben-Experimenten bestätigt (nicht gezeigt). Es muss also davon ausgegangen werden, dass die heterologe Expression der mycobakteriellen *emb*-Gene die Ursache für das langsamere Wachstum der drei Stämme mit den *embA,B,C*-Plasmiden ist. Offensichtlich kann keines der mycobakteriellen *emb*-Gene die Funktion des corynebakteriellen *emb*-Gens übernehmen.



**Abbildung 24:** Versuch der Komplementation der *emb*-Deletionsmutante durch eines der mycobakteriellen *emb*-Gene. Gezeigt ist das Wachstum der *emb*-Deletionsmutante 13032  $\Delta emb$  pEKEx2 (2), der komplementierten Mutante 13032  $\Delta emb$  pEKEx2*emb* (1) sowie der Stämme 13032  $\Delta emb$  pEKEx2 *Mt\_embA* (3), 13032  $\Delta emb$  pEKEx2 *Mt\_embB* (4) und 13032  $\Delta emb$  pEKEx2 *Mt\_embC* (5) auf BHIS-Agarplatten mit 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Kanamycin nach 24-stündiger (A) bzw. 48-stündiger (B) Inkubation.

Um zu untersuchen, ob durch Expression der Gene *embA*, *embB* und *embC* in *C. glutamicum* generell ein Wachstumsnachteil entsteht, wurden diese ebenfalls im Wildtyp von *C. glutamicum* exprimiert. Das Wachstum der Stämme 13032 pEKEx2 *Mt\_embA*, 13032 pEKEx2 *Mt\_embB* und 13032 pEKEx2 *Mt\_embC* auf LB-Agarplatten mit 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Kanamycin war jedoch im Vergleich zum Stamm 13032 pEKEx2 unverändert (nicht gezeigt). Auch in Flüssigkultur bestätigte sich, dass im Wildtyp-Hintergrund kein Wachstumsnachteil durch die Expression der mycobakteriellen *emb*-Gene entstand (Abbildung 25). In diesem Experiment wurde zusätzlich die Wirkung von Ethambutol auf die Stämme mit den *embA,B,C*-Plasmiden getestet. Wie bereits beschrieben (siehe Abschnitt 3.1) wurde durch Überexpression des corynebakteriellen *emb*-Gens ein Ethambutol-resistenter Stamm erzeugt. Überraschenderweise reagieren jedoch der *embA*-, der *embB*- und der *embC*-Überexprimierer nicht nur mit unveränderter, sondern sogar mit einer erhöhten Sensitivität auf die Ethambutol-Behandlung. Ein ähnliches Verhalten wurde zuvor schon für die Stämme 13032 pEC-T18*mob2emb* und 13032 pEC-S18*mob2emb* beschrieben (siehe Abschnitt 3.1). Das bedeutet, dass die *emb*-Expression bzw. die Aktivität des *emb*-kodierten Enzyms sehr kritisch für die Zelle ist.



**Abbildung 25:** Wachstum der Stämme 13032 pEKEx2 (□), 13032 pEKEx2emb (○), 13032 pEKEx2 *Mt\_embA* (△), 13032 pEKEx2 *Mt\_embB* (▽) und 13032 pEKEx2 *Mt\_embC* (◇) in CGXII-Medium. Das Medium enthielt 25 µg/mL Kanamycin und 100 µM IPTG. Für alle Stämme erfolgte eine Kultivierung unter Zugabe von 15 mg/L Ethambutol (----) und eine Kultivierung ohne Ethambutol-Zugabe (—).

### 3.6.2 Nachweis der Expression der mycobakteriellen *emb*-Gene

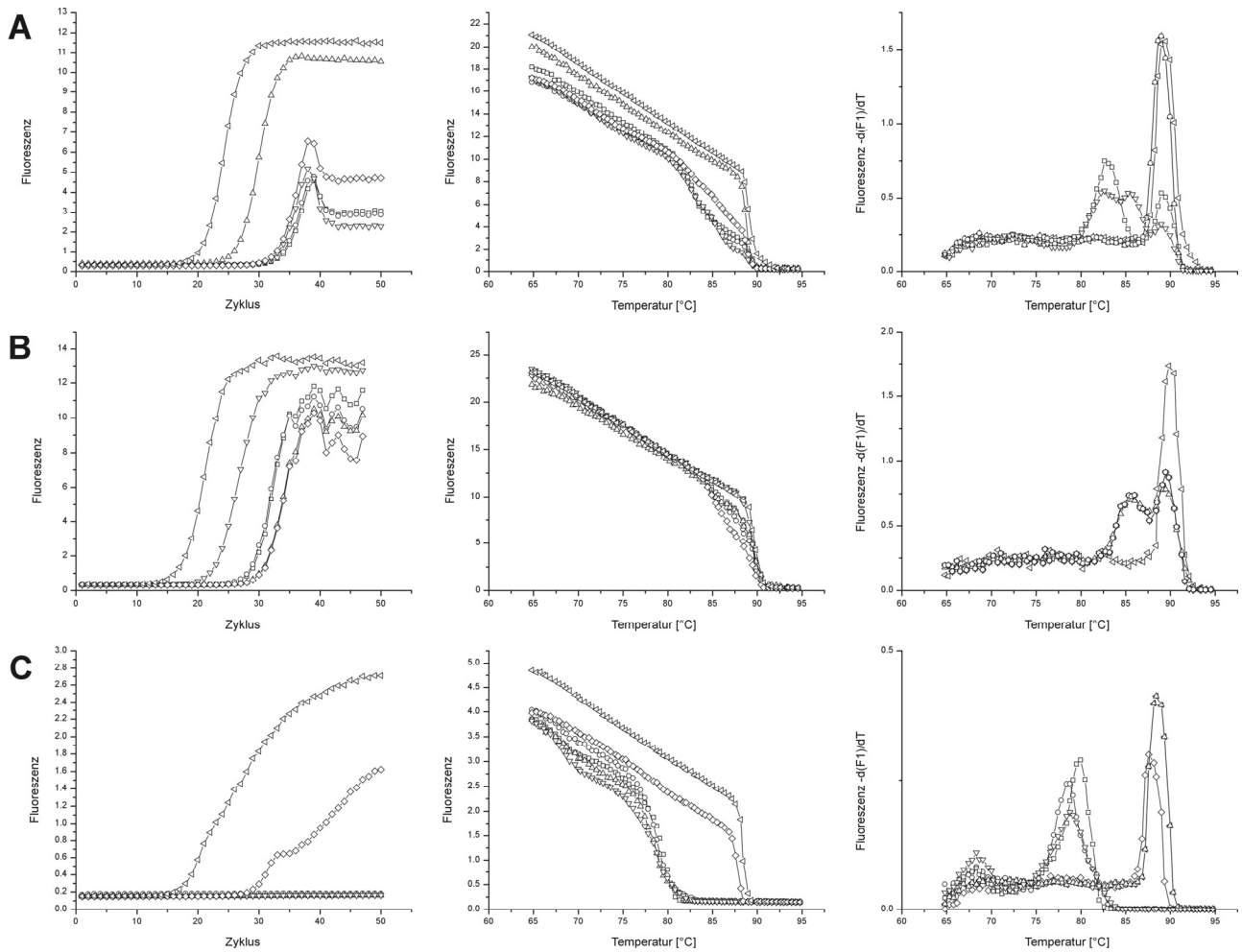
Um sicher zu gehen, dass die drei *emb*-Gene aus *M. tuberculosis* in den untersuchten Stämmen tatsächlich exprimiert werden, wurde ein Nachweis der Expression mittels *Real-time* RT PCR erbracht. Diese Methode ermöglicht einen direkten Nachweis der RNA-Transkripte. Dazu wurden die untersuchten Stämme in CGXII-Medium, welches 25 µg/mL Kanamycin und 100 µM IPTG enthielt, angezogen, bei einer OD von 5 geerntet und die RNA isoliert. Ausgehend von jeweils 500 ng wurde die RNA mittels Zufallsprimern in cDNA umgeschrieben, welche dann als *template* in der *Real-time* PCR eingesetzt werden konnte. In den folgenden Experimenten wurde die Expression der Gene *embA*, *embB* und *embC* aus *M. tuberculosis* untersucht. Dabei wurde zum Nachweis jedes Gens ein spezifisches Primerpaar eingesetzt (siehe Anhang). Bei der Primer-Auswahl musste beachtet werden, dass ein Primerpaar jeweils nur Sequenz-Homologien zu einem der *emb*-Homologen aufwies, um so das Auftreten von Nebenprodukten in der *Real-time* PCR nach Möglichkeit

zu verhindern. Um Nebenprodukte durch unspezifische Bindung der Primer auszuschließen, wurde die Expression des untersuchten *emb*-Homologen zur Kontrolle nicht nur in dem jeweiligen Überexprimierer getestet, sondern es wurden in jedem Experiment alle Stämme parallel untersucht.

Abbildung 26 zeigt die Experimente zum Nachweis der Expression der Gene *embA*, *embB* bzw. *embC*. Dabei stellt der Kurvenverlauf in den linken Diagrammen die Fluoreszenzzunahme im Verlauf der PCR dar, die durch Bindung des Farbstoffs SYBR Green I an die synthetisierte DNA zustande kommt. Die Diagramme in der Mitte der Abbildung zeigen die im Anschluss an die PCR durchgeführte Schmelzkurvenanalyse. Ganz rechts ist die 1. Ableitung der Schmelzkurven, anhand derer der  $T_m$ -Wert abgelesen werden kann, dargestellt. In Experiment A wurde *embA*-cDNA amplifiziert und parallel dazu *embA*-DNA. In beiden Fällen ist *embA* eindeutig nachzuweisen, was sich anhand des PCR-Signals und der Schmelzkurve zeigt. In Experiment B führte auch die *embB*-cDNA zu nachweisbarem Amplifikat bei niedriger Zykluszahl. In Experiment C wurde die cDNA mit *embC*-spezifischen Primern amplifiziert. Da hier mit Reagenzien eines anderen Herstellers gearbeitet wurde, ergibt sich ein von den Experimenten A und B abweichender Kurvenverlauf. Es sind aber eindeutig die eingesetzte *embC*-cDNA sowie die *embC*-DNA nachweisbar. Durch RT PCR konnte also die Expression der mycobakteriellen *emb*-Homologen in den jeweiligen Stämmen nachgewiesen werden. Ebenfalls wurde die Expression der Gene *embA*, *embB* bzw. *embC* vor dem Hintergrund der *emb*-Deletion untersucht (nicht gezeigt). Auch hier konnte die Expression des jeweiligen Gens erfolgreich nachgewiesen werden.

Dies bedeutet, dass keines der drei mycobakteriellen *emb*-Genprodukte in der Lage ist, den als Folge der *emb*-Deletion in *C. glutamicum* auftretenden Wachstumsdefekt zu komplementieren. Die Anwesenheit der Plasmide pEKEx2 *Mt\_embA*, pEKEx2 *Mt\_embB* bzw. pEKEx2 *Mt\_embC* wirkt sich sogar nachteilig auf das Wachstum der *emb*-Deletionsmutante aus. Ob dies ursächlich auf die Expression des jeweiligen *emb*-Gens oder auf Vektoreffekte zurückzuführen ist, bleibt dabei offen und muss im Zuge weiterer Untersuchungen geklärt werden. Durch die Konstruktion der Stämme 13032  $\Delta emb$  pEKEx2 *Mt\_embA*, 13032  $\Delta emb$  pEKEx2 *Mt\_embB* und 13032  $\Delta emb$  pEKEx2 *Mt\_embC* wurde die Grundlage dafür geschaffen, die mycobakteriellen *emb*-Gene in *C. glutamicum* zu untersuchen.





**Abbildung 26:** Nachweis der Expression der mycobakteriellen *emb*-Gene mittels *Real-time* RT PCR. Untersucht wurde die Expression in den Stämmen 13032 pEKEx2 (□), 13032 pEKEx2*emb* (○), 13032 pEKEx2 *Mt\_embA* (△), 13032 pEKEx2 *Mt\_embB* (▽) und 13032 pEKEx2 *Mt\_embC* (◇). (A) Nachweis von *embA*, (B) Nachweis von *embB*, (C) Nachweis von *embC*. In einer Kontroll-PCR (◁) wurde das nachzuweisende Gen als *template* in Form von Plasmid-DNA eingesetzt. Unterschiede im Kurvenverlauf der einzelnen Experimente rühren daher, dass bei der Durchführung der Experimente Reagenzien unterschiedlicher Hersteller verwendet wurden (Experimente A und B: *LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I Kit*, Roche Diagnostics; Experiment C: *Quantitect SYBR Green I Kit*, Qiagen).

#### 4. Untersuchungen zur Fettsäuresynthese

Wie die Genomanalyse zeigte, besitzt *C. glutamicum* zwei Fettsäuresynthasen (Kalinowski *et al.*, 2003). Dies ist ungewöhnlich, weil z.B. *E. coli* und *B. subtilis* nur eine Fettsäuresynthase aufweisen (Blattner *et al.*, 1997), wurde aber auch schon für das mit *C. glutamicum* nahe verwandte Bakterium *C. ammoniagenes* beobachtet (Stuible *et al.*, 1996). Beide Fettsäuresynthasen von *C. glutamicum* sind FAS I-Enzyme, die sich dadurch auszeichnen, dass die einzelnen katalytisch aktiven Domänen ein einziges Polypeptid darstellen. Hingegen sind bei Fas II-Enzymen die einzelnen Domänen durch unterschiedliche Gene kodiert. Solche Fas II-Enzyme sind die eigentlich für Bakterien typischen Fettsäuresynthasen (Vagelos *et al.*, 1969).

##### 4.1 Konstruktion einer *fasA*- und einer *fasB*-Mutante sowie einer *fasAB*-Doppelmutante

Das Ziel der Untersuchung der FAS I-Enzyme von *C. glutamicum* war die Aufklärung der *in vivo*-Funktion dieser Enzyme. Dazu sollten zunächst die für die beiden Fettsäuresynthasen kodierenden Gene *fasA* und *fasB* ausgeschaltet werden.

Um das 9 kb große *fasB*-Gen zu deletieren, wurde durch *cross over* PCR (Link *et al.*, 1997) ein Deletionskonstrukt erstellt. Mit Hilfe der Primer *pfasB5'out* und *pfasB5'in* bzw. *pfasB3'out* und *pfasB3'in* wurden zuerst Bereiche des *fasB*-Gens, die die zu deletierende Sequenz flankierten, amplifiziert. Dann wurde die *cross over* PCR mit dem Primerpaar *pfasB5'out* und *pfasB3'out* durchgeführt. Das resultierende Fragment wurde über *EcoRI*-Schnittstellen in den ebenfalls mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* geschnittenen Vektor pK19*mobsacB* (Schäfer *et al.*, 1994) ligiert. Das nach Ligation erhaltene Deletionskonstrukt pK19*mobsacB*  $\Delta$ *fasB* enthielt eine jeweils ca. 500 bp große Sequenz, die einem Sequenzbereich aus dem vorderen bzw. aus dem hinteren Bereich des *fasB*-Gens entsprach. Im Genom verblieben vom Translationsstart gesehen ca. 1,3 kb des *fasB*-Gens und ca. 1,6 kb vor dem Stopcodon. Es wurden also ca. 6,1 kb des insgesamt 9 kb großen *fasB*-Gens deletiert.

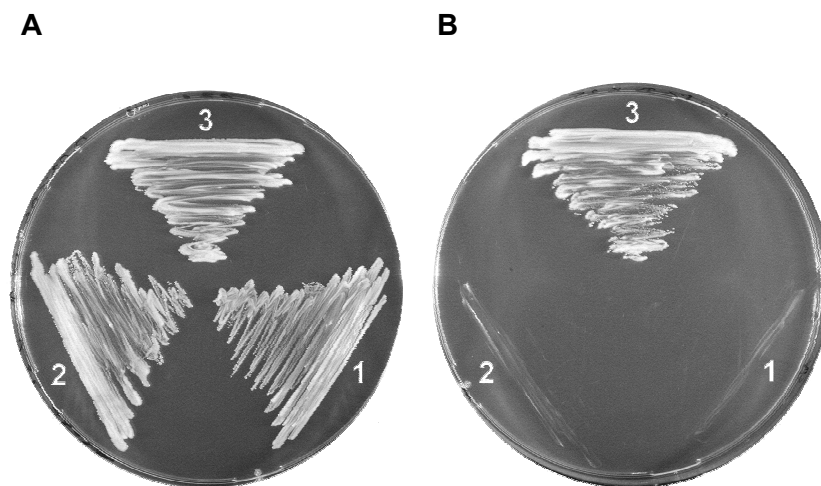
Um *fasA* zu inaktivieren, wurde zuerst das Inaktivierungskonstrukt pK18*mob fasA\_int* hergestellt. Dazu wurde mittels der Primer *pfasA5'* und *pfasA3'* ein 1 kb-Fragment des *fasA*-Gens amplifiziert und nach Klenow-Behandlung in den mit dem Restriktionsenzym *SmaI* linearisierten Vektor pK18*mob* (Schäfer *et al.*, 1994) ligiert. Nach Einbringen des resultierenden Inaktivierungskonstrukts pK18*mob fasA\_int* in den Wildtyp von *C. glutamicum*

durch Elektroporation kam es zur Integration des nicht-replizierenden Plasmids ins Bakteriengenom. Untersuchungen, die mit *B. ammoniagenes* durchgeführt wurden, haben gezeigt, dass durch die Inaktivierung des *fasA*-Gens eine Ölsäure-auxotrophe Mutante generiert wurde (Stuible *et al.*, 1996). Deshalb wurden die Zellen nach der Elektroporation auf Platten mit Fettsäurezusatz ausplattiert. Die verwendeten Platten enthielten 0,012  $\mu$ M Ölsäure, 400 mg/L Buttersäurehydrolysat und 400 mg/L des Detergenz Brij 35, das als Emulgator der in Wasser unlöslichen Fettsäuren fungiert. Von den nach sechs Elektroporationsansätzen erhaltenen Kolonien zeigten drei Klone gutes Wachstum auf BHIS-Platten. Bei allen drei Klonen konnte die Integration des Plasmids in das Gen *fasA* mittels PCR bestätigt werden. Die Insertion des Inaktivierungskonstrukts erfolgte ca. 4,5 kb stromabwärts vom Translationsstart des *fasA*-Gens. Die Inaktivierung des *fasA*-Gens erfolgte ebenfalls im  $\Delta$ *fasB*-Hintergrund, um die *fasAB*-Doppelmutante zu erzeugen.

Das Ausschalten der Gene *fasA* und *fasB* wurde zusätzlich mittels RT PCR bestätigt. In keiner der beiden Mutanten war das jeweilige Transkript nachweisbar. Unabhängig davon wurde im Wildtyp die *fas*-Transkriptmenge quantifiziert. Dies ergab, dass bei Wachstum auf Glucose die *fasA*-mRNA mit etwa 70 % den Hauptanteil und die *fasB*-mRNA die verbleibenden 30 % ausmacht.

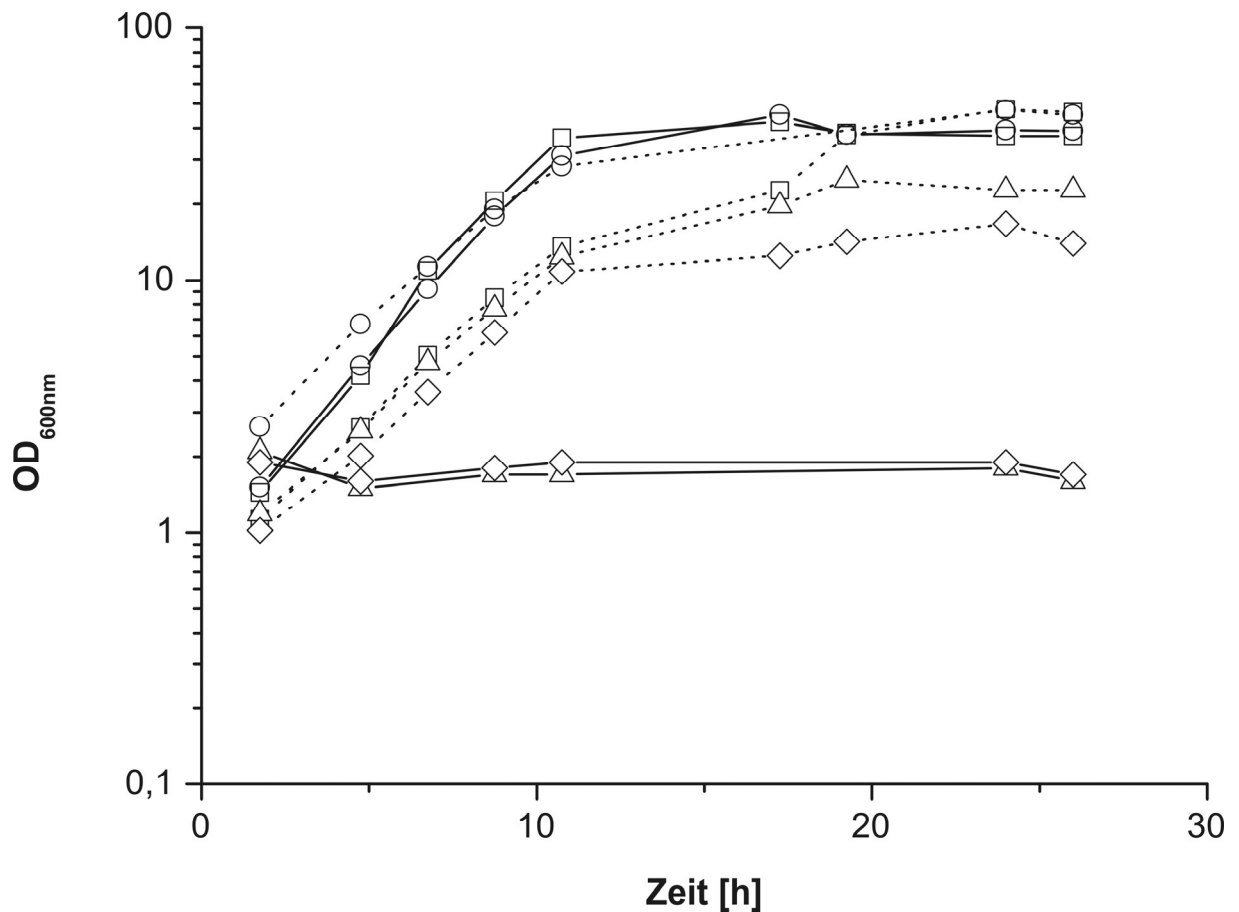
## 4.2 Untersuchungen zum Wachstum der *fas*-Mutanten

Um zu untersuchen, ob durch Ausschalten des *fasA*-Gens eine Fettsäure-Abhängigkeit verursacht wird, wurden sowohl die *fasA*- als auch die *fasAB*-Mutante auf Medium mit Fettsäurezusatz ausplattiert. Die Mutanten wuchsen auf Agarplatten nur bei Zugabe von Buttersäurehydrolysat oder Tween 80, was deren Fettsäure-Bedürftigkeit zeigt. Auch die Zugabe von 0,03 % (w/v) Natriumoleat ermöglichte das Wachstum der Mutanten (Abbildung 27).



**Abbildung 27:** Wachstum der *fasA*-Mutante (1), der *fasAB*-Mutante (2) sowie des Wildtyps 13032 pZ1 (3) auf LB-Medium mit 25 µg/mL Kanamycin A) mit Ölsäure-Supplementation und B) ohne Supplementation

Außerdem wurde das Wachstum der *fas*-Mutanten in Flüssigkultur untersucht. Dazu wurde über Nacht eine Vorkultur in 50 mL CGIII-Medium angezogen, die dazu diente eine CGXII-Hauptkultur mit OD 2 anzuimpfen. Sowohl das Medium der Vorkultur als auch das der Hauptkultur enthielten 0,03 % (w/v) Natriumoleat und 1 % (w/v) des Emulgators Brij 35. Für jeden Stamm wurde außerdem eine Kultivierung ohne Oleat durchgeführt, um so auch den Einfluss des Supplements auf die nicht auxotrophe *fasB*-Mutante sowie den Wildtyp zu testen. Die Wachstumskurven sind in Abbildung 28 gezeigt.



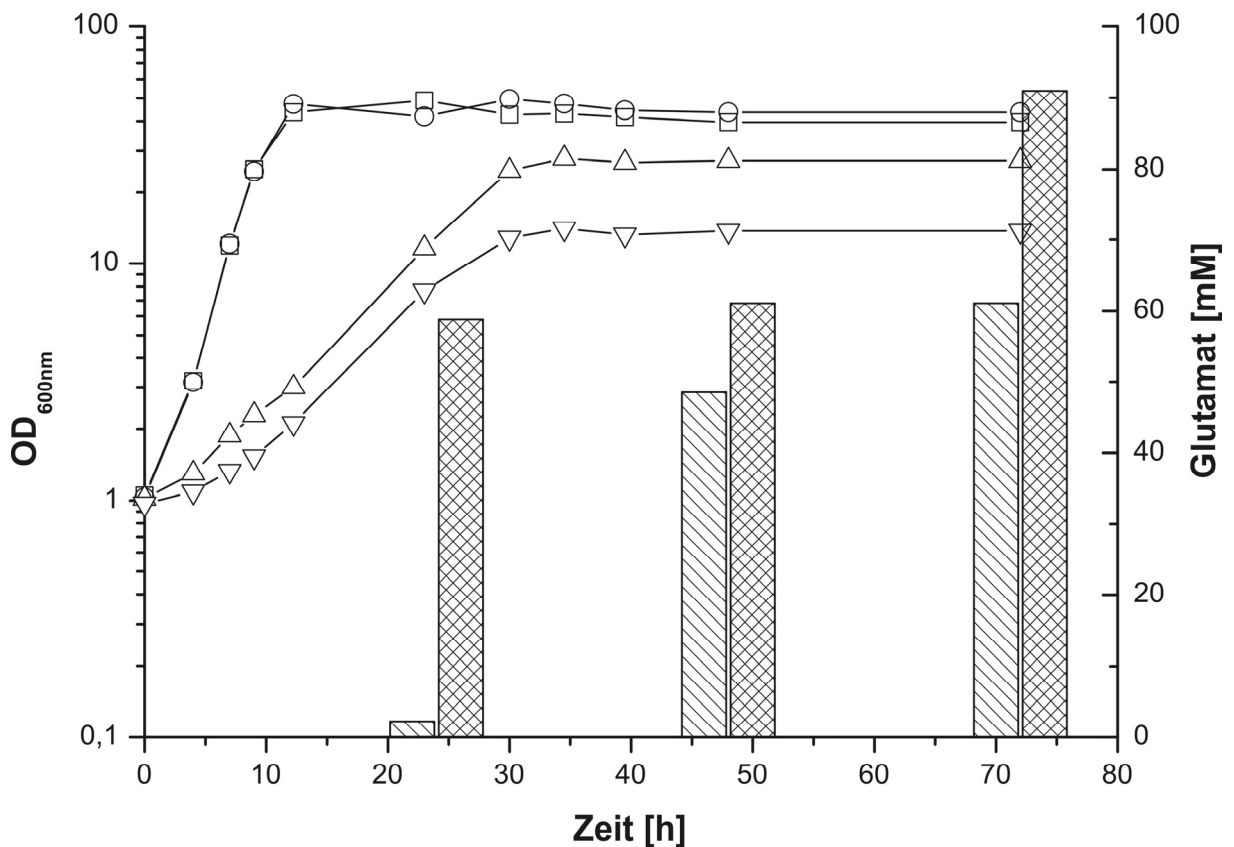
**Abbildung 28:** Wachstum des Wildtyps (□), der *fasA*-Mutante (△), der *fasB*-Mutante (○) und der *fasAB*-Mutante (◇) in CGXII-Medium mit 0,03 % Oleat (---) und ohne Supplementation (—).

Die *fasB*-Deletion hatte offenbar keinen Einfluss auf das Wachstum. Die beiden Ölsäure-auxotrophen Mutanten *fasA* und *fasAB* wuchsen jedoch ausschließlich in Anwesenheit von Oleat. Sie wiesen im Vergleich zum Wildtyp ein drastisch verringertes Wachstum auf und erreichten ferner bei niedrigeren OD-Werten die stationäre Phase. Das deutet darauf hin, dass ähnlich wie in *C. ammoniagenes* *FasB* nicht essentiell, *FasA* hingegen aber essentiell ist (Stuible *et al.*, 1997). *FasA* besitzt außerdem die höchsten Identitäten zu dem einzigen *Fas I*-Enzym von *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998), was ein weiterer Hinweis auf die offensichtlich wichtige Funktion des *FasA*-Enzyms ist. Interessanterweise zeigte sich, dass das zusätzliche Ausschalten von *fasB* neben *fasA* zu einem weiteren Wachstumsnachteil führte. Dies ist ein Hinweis dafür, dass in der *fasB*-Deletionsmutante die Funktion des ausgeschalteten Gens wenigstens teilweise durch *fasA* übernommen werden kann. Wie die Kultivierung des Wildtyps zeigte, wirkt Oleat allein schon stark wachstumshemmend. Interessanterweise war diese Wachstumshemmung aber nicht für den *fasB*-Deletionsstamm zu beobachten. Möglicherweise führt die *fasB*-Deletion zu einer erhöhten Toleranz

gegenüber Oleat.

### 4.3 Untersuchungen zur Glutamatexkretion der *fas*-Mutanten

Ölsäure-auxotrophe Stämme von *C. glutamicum* sind als Glutamatproduzenten beschrieben (Takinami *et al.*, 1965, 1968). Jedoch ist dies bislang nur für Mutanten, die aus ungerichteter Mutagenese hervorgegangen sind, bekannt. Es war deswegen interessant, wie sich die zwei *fas*-Mutanten bezüglich der Glutamatbildung verhalten. Um dies zu untersuchen, wurde CGXII-Minimalmedium mit OD 1 angeimpft und die Ölsäure-auxotrophen Mutanten wurden jeweils mit 0,03 % (w/v) Oleat und 1 % (w/v) Brij 35 supplementiert (Abbildung 29). Der Wildtyp und die *fasB*-Deletionsmutante schieden unter den gewählten Bedingungen kein Glutamat aus. Die *fasA*-Mutante bildete 60 mM Glutamat nach 72 h. Mit der *fasAB*-Mutante ließ sich die Glutamatausscheidung sogar auf 90 mM steigern. Die *fasB*-Deletion beeinflusst somit zusätzlich förderlich die Glutamatausscheidung. Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Glutamatausscheidung durch Inaktivierung von *fasA*, welche zur Fettsäure-Auxotrophie führt, induziert werden kann. Außerdem wurde gezeigt, dass durch Inaktivierung beider *fas*-Gene die Glutamatbildung gesteigert werden kann. Dies war bislang unbekannt und es bestand auch nicht die Möglichkeit, dies durch eine Mutante, die durch ungerichtete Mutagenese hervorgegangen ist, zu untersuchen, da die *fasB*-Mutante keinen Phänotyp zeigt.



**Abbildung 29:** Wachstum und Glutamatbildung der *fas*-Mutanten. Die einfach schraffierten Balken geben die Glutamatausscheidung der *fasA*-Mutante an und die doppelt schraffierten Balken die Glutamatausscheidung der *fasAB*-Doppelmutante. Die Messung der Glutamat-Konzentration im Kulturüberstand wurde jeweils zu den Zeitpunkten 24, 48 und 72 h durchgeführt. Außerdem gezeigt ist das Wachstum des Wildtyps (□) sowie der *fasA*-Mutante (△), der *fasB*-Mutante (○) und der *fasAB*-Doppelmutante (▽). Die *fasA*- und die *fasAB*-Mutante wurden mit 0,03 % Oleat und 1 % Brij 35 supplementiert.

#### 4.4 Analyse der Lipidzusammensetzung der *fas*-Mutanten

Um Aufschluss darüber zu erhalten, wie sich die Mutationen auf die Fettsäurezusammensetzung auswirken, wurde eine Analyse der Fettsäuren und der Mycolsäuren durchgeführt. Dabei erfolgte eine detaillierte Analyse der Lipidspezies des Wildtyps sowie der *fas*-Mutanten.

Der Wildtyp und die Mutanten wurden in CGXII-Medium angezogen. In diesem Experiment erfolgte die Supplementation der Mutanten mit 0,03 % (v/v) Ölsäure und 1 % (w/v) Brij 35.

Dabei wurde die sterilfiltrierte Ölsäure dem Medium erst nach dem Autoklavieren zugegeben, um so zu verhindern, dass durch den Autoklaviervorgang unter Umständen Zerfallsprodukte auftreten, die das Analysenergebnis verfälschen könnten. Um die Fettsäurezusammensetzung zu untersuchen, wurden die Zellen bei OD 5 geerntet und die Lipide extrahiert. Anschließend erfolgte die Analyse der Fettsäuren mittels Gaschromatographie bzw. die der Mycolsäuren mittels HPLC. Die Analyse der Fettsäuren (Tabelle 8) zeigt, dass der Wildtyp hauptsächlich Ölsäure (18:1) und Palmitinsäure (16:0) synthetisiert. Außerdem konnte Tuberculostearinsäure (10Me18:0) nachgewiesen werden, die charakteristisch für das Taxon *Corynebacterianae* ist (Collins *et al.*, 1982). Weitere Fettsäuren sind in Spuren vorhanden.

Da die *fasA*- und die *fasAB*-Mutante mit Ölsäure supplementiert werden mussten, wurde zur Kontrolle ebenfalls der Wildtyp unter Zugabe von Ölsäure angezogen und auf seinen Fettsäuregehalt hin analysiert. Das Fettsäuremuster der *fasA*-Mutante wies keine wesentlichen Unterschiede zum Wildtyp auf. Das in geringen Mengen auftretende Stearat war allerdings nicht mehr nachweisbar. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass FasA neben Oleat in geringen Mengen auch Stearat synthetisiert. Dies haben auch *in vitro*-Studien, die mit dem FasA-Enzym von *C. ammoniagenes* durchgeführt wurden, gezeigt (Stuible *et al.*, 1996). Das Fettsäuremuster der *fasB*-Mutante wies einen stark verringerten Anteil an Palmitat auf. Auch ein Vergleich der *fasA*- und der *fasAB*-Mutante macht den Einfluss der *fasB*-Deletion auf die Fettsäurezusammensetzung deutlich. In der *fasAB*-Doppelmutante war neben geringen Mengen anderer Fettsäuren hauptsächlich Oleat zu finden. Sehr wahrscheinlich ist die *fasAB*-Mutante nicht mehr in der Lage zur Fettsäuresynthese. Die neben Oleat in geringen Mengen auftretenden Fettsäuren könnten auf Verunreinigungen zurückzuführen sein.

Die Fettsäurezusammensetzung der Stämme spiegelt sich in ihrem Mycolsäuremuster wider. Der Wildtyp besitzt hauptsächlich die Mycolsäuren 32:0 und 34:1, die aus Palmitat und Oleat gebildet werden. Wurde der Wildtyp in Anwesenheit von Ölsäure angezogen, so war der Gehalt an Oleat stark erhöht und darüber hinaus fanden sich ausschließlich Mycolsäuren, die aus Ölsäure hervorgehen. Das Mycolsäuremuster der *fasB*-Mutante zeichnete sich durch einen reduzierten Gehalt der Mycolsäuren 34:1 und 34:0 aus, was im Einklang mit dem stark verringerten Anteil an Palmitat der Mutante steht. In der *fasAB*-Doppelmutante trat ausschließlich die Mycolsäure 36:2 auf. Diese Mutante synthetisiert mit großer Wahrscheinlichkeit keine eigenen Fettsäuren mehr, sodass die Mycolsäuren allein aus der supplementierten Ölsäure hervorgehen.



**Tabelle 8:** Analyse der Fettsäuren und Mycolsäuren des Wildtyps 13032, der *fasA*-Mutante, der *fasB*-Mutante und der *fasAB*-Mutante. Der Fettsäure- bzw. der Mycolsäuregehalt ist jeweils in Prozent angegeben.

	Fettsäuremuster						
	12:0	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	10Me18:0
Wildtyp	-	-	42,33	0,30	0,76	55,08	1,31
$\Delta fasB$	-	-	18,86	1,36	9,12	67,31	1,05
Wildtyp (0,03 % Ölsäure)	-	1,08	24,33	-	0,68	71,56	1,63
:: <i>fasA</i> (0,03 % Ölsäure)	-	1,93	26,69	-	-	70,74	0,64
:: <i>fasA</i> $\Delta fasB$ (0,03 % Ölsäure)	1,33	3,15	2,38	-	0,42	91,74	0,75

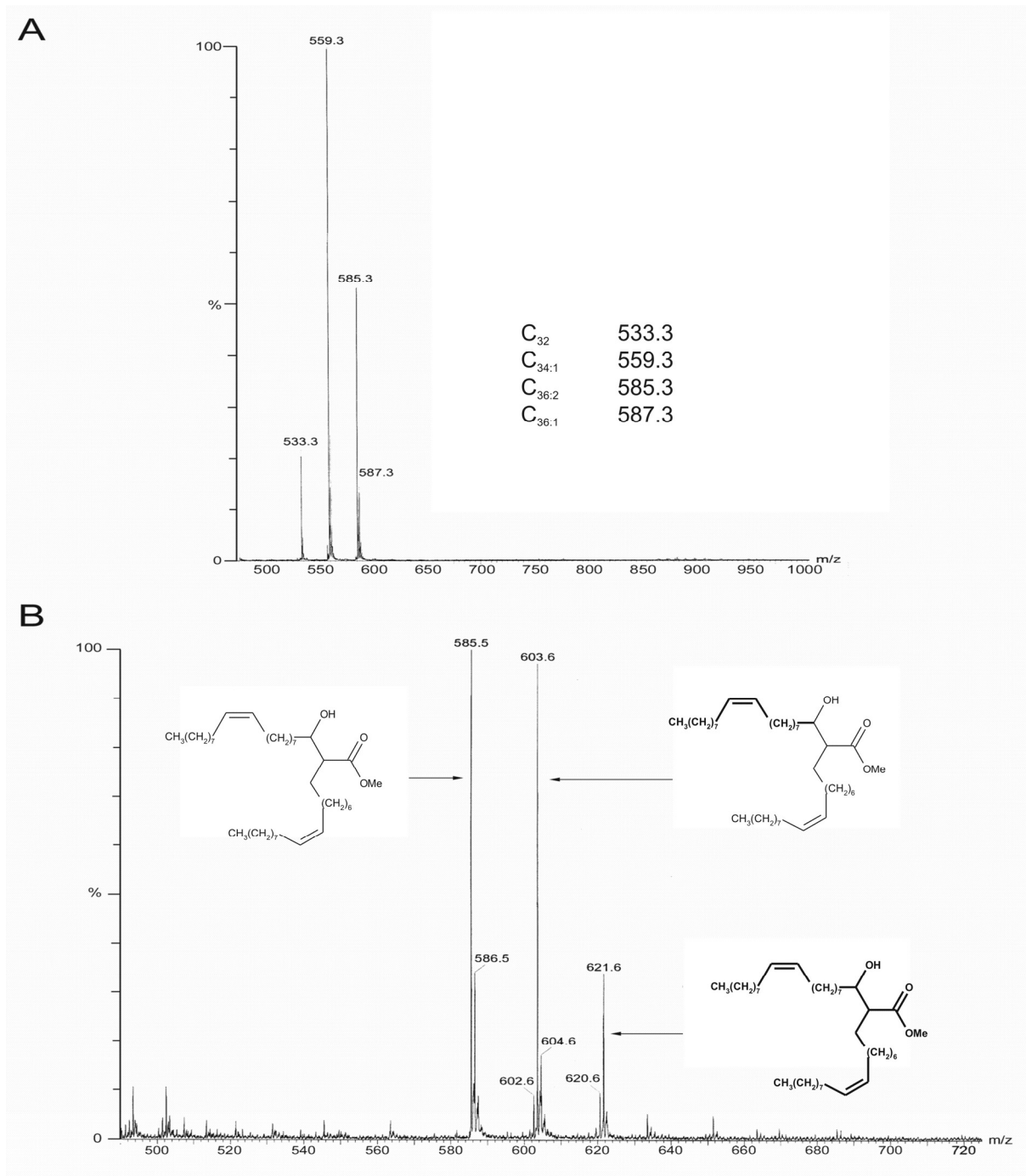
	Mycolsäuremuster								
	32:1	32:0	34:2	34:1	34:0	36:2	36:1	36:0	38:1
Wildtyp	2	31	-	35	12	13	6	1	-
$\Delta fasB$	-	-	1	5	1	79	12	1	2
Wildtyp (0,03 % Ölsäure)	-	-	-	9	-	91	-	-	-
:: <i>fasA</i> (0,03 % Ölsäure)	-	2	-	2	-	96	-	-	-
:: <i>fasA</i> $\Delta fasB$ (0,03 % Ölsäure)	-	-	-	-	-	100	-	-	-

#### 4.5 Untersuchungen zur Mycolsäuresynthese in *C. glutamicum*

Die Mycolsäuresynthese in *C. glutamicum* ist teilweise noch ungeklärt. Es ist bis heute nicht schlüssig gezeigt, aus welchen Bausteinen die Mycolsäuren gebildet werden. Es wird angenommen, dass die Fettsäuren die Bausteine für die Synthese der Mycolsäuren sind (Asselineau *et al.*, 2002). Auch die Analysenergebnisse in Tabelle 8 bestätigen diese Annahme. Um unmittelbar zu zeigen, dass die Mycolsäuren ausschließlich Kohlenstoffatome aus Fettsäuren enthalten, wurde die *fasAB*-Mutante genutzt und mit [<sup>13</sup>C]-markierter Ölsäure angezogen.

Dazu wurde die [<sup>13</sup>C]-Ölsäure sterilfiltriert und nach dem Autoklavieren jedem Kolben einzeln zugegeben. Nach einigen Vorexperimenten wurde ausgehend von einer CgIII-Vorkultur, supplementiert mit 1 % Brij 35 (w/v) und 0,03 % (w/v) Natriumoleat, eine CgXII-Hauptkultur mit 1 % (w/v) Brij 35 und 0,03 % (v/v) Ölsäure mit OD 2 angeimpft. Supplementiert wurde mit einem Gemisch aus 50 % uniform markierter [<sup>13</sup>C]-Ölsäure und 50 % unmarkierter Ölsäure. Nach Erreichen einer OD von 10 wurden die Zellen geerntet. Es folgte die Analyse der

## Mycolsäuremethylester (MAMES) mittels Massenspektrometrie.



**Abbildung 30:** Identifizierung der MAMES mittels Massenspektrometrie

A) MAMES isoliert aus dem *C. glutamicum* Wildtyp.

B) MAMES isoliert aus der *C. glutamicum* *fasAB*-Doppelmutante nach Markierung mit  $^{13}C$ -Ölsäure. Die jeweils fett gedruckten Mycolsäureäste symbolisieren das Auftreten der  $^{13}C$ -Markierung im Mero- oder im  $\alpha$ -Zweig der MAMES ( $m/z$  603,6 kann ebenso Markierung im  $\alpha$ -Zweig bedeuten).

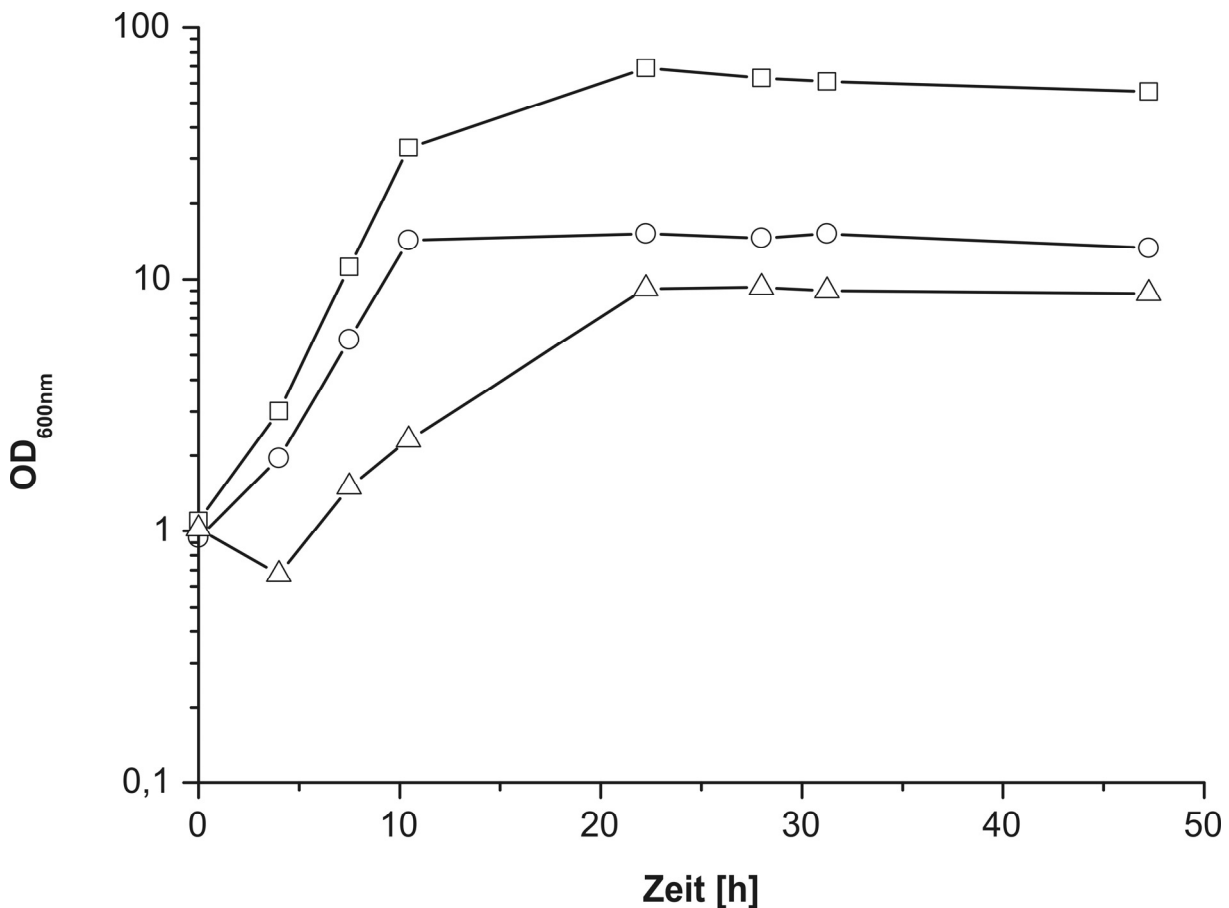
Das Massenspektrum in Abbildung 30 b zeigt, dass sich offenbar drei unterschiedliche Mycolsäurespezies in der Mutante nachweisen lassen, welche alle dem Typ 36:2 entsprechen. Die Massenunterschiede kommen durch den unterschiedlichen Einbau der [<sup>13</sup>C]-markierten Ölsäure zustande. Die Mycolsäurespezies mit einer Masse von 621,4 ist der uniform markierten Mycolsäure 36:2 zuzuordnen. Ebenfalls tritt eine Mycolsäurespezies mit der Masse 585,3 auf, die der unmarkierten Mycolsäure 36:2 entspricht und sehr wahrscheinlich aus unmarkierter Ölsäure bzw. Mycolsäuren resultiert. Zwischen den Signalen der unmarkierten und der vollständig markierten Mycolsäure tritt ein weiteres Signal mit der Masse 603,6 auf. Diese Masse entspricht einer Mycolsäurespezies, bei der entweder der Mero- oder der  $\alpha$ -Zweig markiert ist. Dieses Ergebnis unterstützt somit die Hypothese, die besagt, dass die Mycolsäuren durch Claisen-Kondensation aus zwei Fettsäuren entstehen (Lee *et al.*, 1997). Auch gibt dieses Experiment eine weitere Erklärung für das schlechte Wachstum der *fasAB*-Mutante, da durch die Ölsäure-Supplementation nicht nur die Fettsäurezusammensetzung verändert wird, sondern sich diese ferner auch auf die Mycolsäuren auswirkt, welche sich beim Wildtyp maßgeblich aus den Spezies 34:1, gefolgt von 36:2 und 36:1 und zu einem geringeren Anteil 32:0 zusammensetzen (Abbildung 30 a). Bei diesem beschriebenen Experiment war die Ölsäure teilweise unmarkiert. Das Experiment wurde wiederholt, wobei ausschließlich markierte Ölsäure eingesetzt wurde. In diesem Fall wurde erwartungsgemäß fast ausschließlich das Signal 621,4 detektiert (nicht gezeigt). Dies zeigt schlüssig, dass bei diesem Experiment beide Mycolsäureäste aus extern zugesetztem Oleat hervorgehen.

#### **4.6 Untersuchung der Funktion der zwei Fas-Enzyme bei Wachstum auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen**

DNA-Chipanalysen haben gezeigt, dass die *fasA*-Expression bei Wachstum von *C. glutamicum* auf Acetat als Kohlenstoffquelle im Vergleich zum Wachstum auf Glucose um den Faktor 3 vermindert ist (Gerstmeir *et al.*, 2003). Von Hüser *et al.* (2003) wurde die differentielle Genexpression in *C. glutamicum* bei Wachstum auf Glucose-Propionat-Mischsubstrat im Vergleich zum Wachstum auf Glucose als alleiniger Kohlenstoffquelle untersucht. Die Daten der DNA-Chipexperimente belegen, dass *fasA* eine um den Faktor 9 erhöhte Expression aufweist. Auf Propionat erfolgt nach Claes *et al.* (2002) Wachstum erst nach einer außerordentlich langen Lag-Phase von 168 h, sodass Expressionsdaten zu Propionat noch nicht erhalten werden konnten. Es gibt demnach deutliche Hinweise darauf, dass die Fettsäuresynthasen von *C. glutamicum* einer Kohlenstoffquellen-abhängigen Regulation unterliegen. Es sollte deshalb diese Regulation und die Konsequenzen der

veränderten Expression auf die Lipidzusammensetzung genauer untersucht werden.

Wie eine Reihe von Vorexperimenten zeigte, erfordert schnelles und reproduzierbares Wachstum von *C. glutamicum* auf Propionat und auch auf Acetat eine Vorkultivierung auf diesen Substraten. Bei Vorkultivierung in Vollmedium mit Glucose benötigt *C. glutamicum* allerdings 24-48 h zur Adaptation an die neue Kohlenstoffquelle. Deshalb ging den Kultivierungen jeweils nach der CgIII-Vorkultur eine weitere Vorkultur in CGXII-Minimalmedium voraus, wobei das Medium 2 % Acetat bzw. 4 % Propionat enthielt. Mit den so adaptierten Zellen wurde die Hauptkultur angeimpft, wobei die Kultivierung wiederum in CgXII mit 2 % Acetat bzw. 4 % Propionat erfolgte. Wie in Abbildung 31 gezeigt, ist *C. glutamicum* in der Lage, auf Acetat bzw. Propionat als alleiniger Kohlenstoffquelle zu wachsen.



**Abbildung 31:** Wachstum von *C. glutamicum* auf CgXII mit 4 % Glucose (□), 2 % Acetat (○) bzw. 1 % Propionat (△).

Die maximalen Wachstumsraten betragen auf Acetat  $0,38 \text{ h}^{-1}$  bzw. auf Propionat  $0,15 \text{ h}^{-1}$ . Im Vergleich dazu erreichte der Wildtyp auf Glucose eine Wachstumsrate von  $0,40 \text{ h}^{-1}$ . Zusätzlich wurde geprüft, wie sich die *fas*-Mutanten bei Wachstum auf den unterschiedlichen Kohlenstoffquellen verhalten. Es zeigte sich, dass die Deletion von *fasB* praktisch keinen Effekt auf das Wachstum auf den einzelnen Kohlenstoffquellen hatte, wogegen die *fasA*-Mutante nicht auf Propionat und nur extrem verzögert auf Acetat wuchs (nicht gezeigt).

#### 4.6.1 Untersuchung der Regulation der zwei *fas*-Gene in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle

Zur Untersuchung der Regulation der Gene *fasA* und *fasB* aus *C. glutamicum* sollte eine Quantifizierung der *fasAB*-Transkripte mittels *Real-time* RT PCR erfolgen. Es wurde die Gesamt-RNA isoliert und ausgehend von 500 ng RNA cDNA synthetisiert, die in der *Real-time* PCR als *template* eingesetzt wurde. Der prinzipielle Ablauf ist schematisch in Abbildung 2 im Kapitel Material und Methoden gezeigt.

Tabelle 9 zeigt das Ergebnis der absoluten Quantifizierung der *fasA*-cDNA der auf den unterschiedlichen Kohlenstoffquellen gewachsenen Zellen. In einem ersten Experiment wurde auf Glucose eine cDNA-Konzentration von  $3,84 \cdot 10^{-5} \text{ } \mu\text{g/mL}$  bestimmt. Hingegen beträgt die cDNA-Konzentration auf Acetat nur  $6,06 \cdot 10^{-6} \text{ } \mu\text{g/mL}$ , was eine stark reduzierte Expression von *fasA* auf Acetat bedeutet. Auf Propionat ist die cDNA-Konzentration mit  $7,07 \cdot 10^{-5} \text{ } \mu\text{g/mL}$  im Vergleich zu dem auf Glucose bestimmten Wert leicht erhöht. Vergleichbare Daten wurden in einer zweiten Versuchsreihe bestimmt (Tabelle 9, unterer Teil), wo zur Kontrolle ein anderes Primerpaar benutzt wurde. Insgesamt wurden mit Primerpaar 1 und Primerpaar 2 jeweils drei Experimente durchgeführt. Aus diesen Experimenten lassen sich die in Tabelle 10 gezeigten relativen Mengen *fasA*-Transkript angeben.

**Tabelle 9:** Absolute Quantifizierung der *fasA*-cDNA sowie der Referenzgene *ddh* (Exp. 1), *fbp* (Exp. 2) und *gyrA* (Exp. 3). Angegeben sind absolute Konzentrationen in  $\mu\text{g/mL}$ . In Versuchsreihe 1 wurde das Primerpaar *fasA\_for\_230bp/fasA\_rev\_230bp* eingesetzt und in Versuchsreihe 2 das Primerpaar *fasA\_for\_250bp/fasA\_rev\_250bp*.

**Versuchsreihe1:**

Substrat	template-Konz.	<i>fasA</i>			Referenzgene		
		Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	<i>ddh</i>	<i>fbp</i>	<i>gyrA</i>
Glucose	$1 \cdot 10^{-1} \mu\text{g/mL}$	3.84E-05	7.36E-05	5.34E-05	1.80E-05	9.57E-05	6.01E-06
Glucose	$1 \cdot 10^{-2} \mu\text{g/mL}$	6.28E-06	8.59E-06	1.07E-05	2.44E-06	1.50E-05	1.00E-06
Acetat	$1 \cdot 10^{-1} \mu\text{g/mL}$	6.60E-06	1.00E-05	9.69E-06	1.72E-05	1.58E-04	1.34E-05
Acetat	$1 \cdot 10^{-2} \mu\text{g/mL}$	2.16E-06	1.69E-06	1.89E-06	2.43E-06	2.80E-05	1.79E-06
Propionat	$1 \cdot 10^{-1} \mu\text{g/mL}$	7.07E-05	1.29E-04	7.46E-05	1.26E-05	8.54E-05	5.26E-06
Propionat	$1 \cdot 10^{-2} \mu\text{g/mL}$	1.18E-05	1.20E-05	1.09E-05	1.63E-06	1.28E-05	7.02E-07

**Versuchsreihe2:**

Substrat	template-Konz.	<i>fasA</i>			Referenzgene		
		Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	<i>ddh</i>	<i>fbp</i>	<i>gyrA</i>
Glucose	$1 \cdot 10^{-1} \mu\text{g/mL}$	4.99E-05	5.06E-05	5.92E-05	5.03E-05	2.30E-05	1.33E-05
Glucose	$1 \cdot 10^{-2} \mu\text{g/mL}$	5.44E-06	5.25E-06	6.48E-06	5.27E-06	2.36E-06	1.28E-06
Acetat	$1 \cdot 10^{-1} \mu\text{g/mL}$	1.13E-05	1.14E-05	1.43E-05	4.81E-05	3.87E-05	2.36E-05
Acetat	$1 \cdot 10^{-2} \mu\text{g/mL}$	1.20E-06	1.17E-06	1.59E-06	5.05E-06	3.80E-06	2.38E-06
Propionat	$1 \cdot 10^{-1} \mu\text{g/mL}$	8.12E-05	8.06E-05	9.80E-05	3.08E-05	1.42E-05	9.50E-06
Propionat	$1 \cdot 10^{-2} \mu\text{g/mL}$	9.28E-06	5.00E-06	7.25E-06	3.76E-06	1.11E-06	7.18E-07

Für den Vergleich der *fasA*-Expression bei Wachstum auf Acetat im Vergleich zu Glucose ergibt sich als Mittelwert aus drei durchgeführten Experimenten der Wert 0,18, was bedeutet, dass die Expression auf Acetat um den Faktor 5,56 reduziert ist. Hingegen ist die *fasA*-Expression auf Propionat im Vergleich zu Glucose um den Faktor 1,62 erhöht. Übereinstimmend damit zeigte der Vergleich Propionat gegenüber Acetat mit dem Faktor 9,03 einen noch größeren Unterschied in der *fasA*-Expression. Damit werden die drastischen Expressionsveränderungen bei Wachstum auf den unterschiedlichen Kohlenstoffquellen deutlich. Da auf Propionat die Wachstumsrate stark reduziert ist und dies generell den mRNA-Transkriptlevel beeinträchtigen könnte, wurden zusätzlich Referenzgene quantifiziert. Als Referenzgene eignen sich konstitutiv exprimierte Gene, die auch bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen gleiche Expressionslevel aufweisen. Unter den 9 getesteten Kandidaten für Referenzgene (*amtR*, *ddh*, *EF-Tu*, *fbp*, *gapA*, *gapB*, *gyrA*, *pitA*,

*thrB*) erwiesen sich die Gene *ddh*, *fbp* und *gyrA* als geeignet, da sie auf den unterschiedlichen Substraten vergleichbare Expression zeigten. Parallel zu den beschriebenen Experimenten wurden deshalb ebenfalls die Referenzgene quantifiziert (Tabelle 9).

**Tabelle 10:** Relative Verhältnisse der *fasA*-Expression auf den Kohlenstoffquellen Glucose, Acetat und Propionat. Angegeben sind Mittelwerte, die sich aus drei Experimenten ergeben (Tab. 9). Es wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt, wobei in der PCR unterschiedliche Primerpaare eingesetzt wurden.

Vergleich	template-Konzentration	Versuchsreihe 1	Versuchsreihe 2
Acetat/Glucose	1·10 <sup>-1</sup> µg/mL	0,18 ± 0,01	0,23 ± 0,01
Acetat/Glucose	1·10 <sup>-2</sup> µg/mL	0,26 ± 0,08	0,23 ± 0,01
Propionat/Glucose	1·10 <sup>-1</sup> µg/mL	1,62 ± 0,22	1,63 ± 0,03
Propionat/Glucose	1·10 <sup>-2</sup> µg/mL	1,41 ± 0,43	1,26 ± 0,40
Propionat/Acetat	1·10 <sup>-1</sup> µg/mL	9,03 ± 1,54	7,05 ± 0,18
Propionat/Acetat	1·10 <sup>-2</sup> µg/mL	5,49 ± 0,25	5,52 ± 1,93

Die *fasB*-Expression wurde auf die gleiche Weise wie zuvor beschrieben quantifiziert. Die Daten der absoluten Quantifizierung in Tabelle 11 zeigen, dass im ersten Experiment bei Wachstum auf Glucose eine cDNA-Konzentration von 1,88·10<sup>-5</sup> µg/mL bestimmt wurde. Auf Acetat betrug die cDNA-Konzentration hingegen nur 7,83·10<sup>-6</sup> µg/mL. Im Vergleich zum Wachstum auf Glucose ist also auch hier die *fasB*-Expression verringert. Beim Wachstum auf Propionat blieb die *fasB*-Expression hingegen unverändert.

**Tabelle 11:** Absolute Quantifizierung der *fasB*-cDNA sowie der Referenzgene *ddh* (Exp. 1), *fbp* (Exp. 2) und *gyrA* (Exp. 3). Angegeben sind absolute Konzentrationen in  $\mu\text{g/mL}$ . In Versuchsreihe 1 wurde Primerpaar *fasB\_for\_6820/fasB\_rev\_7090* eingesetzt und in Versuchsreihe 2 das Primerpaar *fasB\_for\_250bp/fasB\_rev\_250bp*.

**Versuchsreihe1:**

Substrat	template-Konz.	<i>fasB</i>			Referenzgene		
		Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	<i>ddh</i>	<i>fbp</i>	<i>gyrA</i>
Glucose	$1 \cdot 10^{-1} \mu\text{g/mL}$	1.88E-05	7.07E-05	2.32E-05	2.34E-05	2.32E-05	1.02E-05
Glucose	$1 \cdot 10^{-2} \mu\text{g/mL}$	3.92E-06	8.46E-06	3.51E-06	4.36E-06	5.06E-06	1.05E-06
Acetat	$1 \cdot 10^{-1} \mu\text{g/mL}$	7.83E-06	2.81E-05	9.93E-06	2.94E-05	2.80E-04	1.93E-05
Acetat	$1 \cdot 10^{-2} \mu\text{g/mL}$	1.21E-06	3.21E-06	1.51E-06	4.22E-06	3.71E-05	2.03E-06
Propionat	$1 \cdot 10^{-1} \mu\text{g/mL}$	1.34E-05	5.00E-05	1.90E-05	2.00E-05	1.07E-04	7.64E-06
Propionat	$1 \cdot 10^{-2} \mu\text{g/mL}$	1.86E-06	4.53E-06	3.93E-06	2.79E-06	1.90E-05	1.04E-06

**Versuchsreihe2:**

Substrat	template-Konz.	<i>fasB</i>			Referenzgene		
		Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	<i>ddh</i>	<i>fbp</i>	<i>gyrA</i>
Glucose	$1 \cdot 10^{-1} \mu\text{g/mL}$	1.93E-05	1.90E-05	1.91E-05	4.85E-05	2.73E-05	2.10E-05
Glucose	$1 \cdot 10^{-2} \mu\text{g/mL}$	2.68E-06	2.58E-06	2.76E-06	5.26E-06	2.73E-06	2.24E-06
Acetat	$1 \cdot 10^{-1} \mu\text{g/mL}$	1.14E-05	1.17E-05	1.15E-05	4.94E-05	4.84E-05	3.84E-05
Acetat	$1 \cdot 10^{-2} \mu\text{g/mL}$	1.79E-06	1.70E-06	1.68E-06	5.09E-06	4.79E-06	4.10E-06
Propionat	$1 \cdot 10^{-1} \mu\text{g/mL}$	1.31E-05	1.50E-05	1.42E-05	3.25E-05	1.92E-05	1.64E-05
Propionat	$1 \cdot 10^{-2} \mu\text{g/mL}$	1.98E-06	2.03E-06	2.29E-06	3.65E-06	2.01E-06	2.04E-06

Es wurden wiederum drei Experimente durchgeführt, aus deren Ergebnissen relative *fasB*-Transkriptmengen berechnet wurden (Tab. 12). Für den Vergleich des Wachstums auf Acetat zum Wachstum auf Glucose ergibt sich der Wert 0,45. Das bedeutet, dass die *fasB*-Expression auf Acetat ebenfalls reduziert ist. Der Vergleich Propionat zu Glucose ergab für *fasB* im Unterschied zu *fasA* allerdings keine auffällige Expressionsänderung. Bei Wachstum auf Propionat im Vergleich zu Acetat zeigte sich eine 1,7-fach erhöhte *fasB*-Expression. Auch die Ergebnisse zur *fasB*-Expression konnten durch eine zweite Versuchsreihe, bei der ein weiteres Primerpaar verwendet wurde, reproduziert werden.



**Tabelle 12:** Relative Verhältnisse der *fasB*-Expression auf den Kohlenstoffquellen Glucose, Acetat und Propionat. Angegeben sind Mittelwerte, die sich aus drei Experimenten ergeben (Tab. 11). Es wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt, wobei in der PCR unterschiedliche Primerpaare eingesetzt wurden.

Vergleich	template-Konzentration	Versuchsreihe 1	Versuchsreihe 2
Acetat/Glucose	1·10 <sup>-1</sup> µg/mL	0,45 ± 0,02	0,60 ± 0,01
Acetat/Glucose	1·10 <sup>-2</sup> µg/mL	0,55 ± 0,14	0,65 ± 0,03
Propionat/Glucose	1·10 <sup>-1</sup> µg/mL	0,77 ± 0,02	0,74 ± 0,05
Propionat/Glucose	1·10 <sup>-2</sup> µg/mL	0,75 ± 0,18	0,78 ± 0,04
Propionat/Acetat	1·10 <sup>-1</sup> µg/mL	1,70 ± 0,12	1,22 ± 0,07
Propionat/Acetat	1·10 <sup>-2</sup> µg/mL	1,38 ± 0,08	1,22 ± 0,13

Besonders *fasA* ist also in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle stark reguliert. Um dies zu veranschaulichen, wurde zusätzlich ein Experiment durchgeführt, in dem die *fasA*- und die *fasB*-Transkripte gleichzeitig quantifiziert wurden (Tab. 13). Es zeigte sich, dass das *fasA*-Transkript auf Glucose 68,0 % der beiden *fas*-Transkripte ausmacht, auf Acetat nur 46,9 % und auf Propionat 80,3 %. Eine Folge der Regulation der Gene *fasA* und *fasB* ist also in jedem Fall eine drastische Verschiebung der Verhältnisse der *fasA*- und der *fasB*-mRNA in der Zelle sowie eine sehr stark verringerte Expression von *fasA* auf Acetat.

**Tabelle 13:** Prozentuale Anteile der *fasA*- bzw. der *fasB*-mRNA im *C. glutamicum* Wildtyp 13032 angezogen auf CGXII-Medium mit 4 % Glucose, 2 % Acetat bzw. 1 % Propionat.

Substrat	<i>fasA</i>	<i>fasB</i>
Glucose	68,0 %	32,0 %
Acetat	46,9 %	53,1 %
Propionat	80,3 %	19,7 %

#### 4.6.2 Analyse der Lipidzusammensetzung bei Anzucht auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen

Mit der Analyse der Lipidzusammensetzung der auf Glucose, Acetat und Propionat angezogenen Zellen sollte nun untersucht werden, ob sich die veränderte Expression von *fasA* und *fasB* auf die Fettsäurezusammensetzung auswirkt. Die Ergebnisse der Analyse sind in Tabelle 14 zusammengefasst. Wie schon zuvor gezeigt, enthält der Wildtyp hauptsächlich Palmitat und Oleat. Bei Wachstum auf Acetat ist im Vergleich zum Wachstum

auf Glucose die Lipidzusammensetzung von *C. glutamicum* nicht wesentlich verändert. Auch die auf Propionat angezogenen Zellen weisen einen hohen Anteil an Palmitat und Oleat auf. Überraschenderweise treten ferner sonst nicht nachweisbare ungeradzahlige Fettsäuren auf. Offensichtlich wird das C<sub>3</sub>-Gerüst von Propionat direkt in die Fettsäuren eingebaut. Es ist bekannt, dass Propionat ähnlich wie Acetat zu Propionyl-CoA aktiviert wird, um verstoffwechselt zu werden, sodass sehr wahrscheinlich dieses aktivierte Intermediat in die Fettsäuresynthese einfließt (Arai *et al.*, 1982). Mit Rohextrakten ist gezeigt worden, dass als Primer der Fettsäuresynthese nicht nur Acetyl-CoA, sondern auch Propionyl-CoA genutzt werden kann, dass dann zur Heptadecansäure (17:0) führt. Offensichtlich läuft diese Reaktion auch in *C. glutamicum* bei Wachstum auf Propionat ab.

**Tabelle 14:** Analyse der Fettsäuren und der Mycolsäuren in *C. glutamicum* angezogen auf CGXII-Medium mit 4 % Glucose, 2 % Acetat bzw. 1 % Propionat. Der Fettsäure- bzw. Mycolsäuregehalt ist jeweils in Prozent angegeben.

	Fettsäuremuster							
	14:0	15:0	16:0	16:1	17:0	18:0	18:1	10Me18:0
<b>Glucose</b>	0,29	0	44,93	0	0	0,98	53,80	0
<b>Acetat</b>	0,35	0	42,82	0,19	0	0,69	55,71	0,24
<b>Propionat</b>	0,57	6,82	32,71	0,69	4,73	1,63	51,40	0,81

	Mycolsäuremuster												
	30:0	31:0	32:1	32:0	33:1	33:0	34:1	34:0	35:1	35:0	36:2	36:1	36:0
<b>Glucose</b>	0	0	0	33	0	0	34	15	0	0	10	7	1
<b>Acetat</b>	1	0	0	47	0	0	29	13	0	0	6	4	1
<b>Propionat</b>	3	11	4	30	5	16	20	1	2	2	3	3	0

Erwartungsgemäß spiegelt die Mycolsäurezusammensetzung das Muster der Fettsäuren wider. So liegen bei Wachstum auf Propionat auch ungeradzahlige Mycolsäuren vor wie z. B. 31:0 und 33:0. Diese entstehen vermutlich nach der Kondensation von 15:0 und 16:0 bzw. 16:0 und 17:0. Dies zeigt, dass die für die Mycolsäuresynthese verantwortliche Polyketidsynthase auch ungeradzahlige Fettsäuren akzeptiert, was in diesem Fall zu den ungewöhnlichen Mycolsäuren 33:0 und 33:1 führt (Gande *et al.*, 2004). Das bestätigt, wie bereits in Abschnitt 4.5 beschriebenen, dass fertig synthetisierte Fettsäuren unmittelbar in Mycolsäuren eingebaut werden und keine sukzessive Kettenverlängerung erfolgt, wie es bei *M. tuberculosis* für den Merozweig der Fall ist (Barry III *et al.*, 1998).

## IV. DISKUSSION

### 1. Ethambutol-induzierte Glutamatexkretion

Obwohl mehr als 1,2 Millionen Tonnen L-Glutamat jährlich mit *C. glutamicum* produziert werden (Leuchtenberger, 1996), gehört die Glutamatproduktion und -ausscheidung noch zu den am wenigsten verstandenen Aminosäure-Produktionsprozessen. Die Glutamatproduktion zeichnet sich gegenüber allen anderen Aminosäure-Produktionsprozessen dadurch aus, dass immer erst eine „Induktion“ erfolgen muss. In dieser Arbeit wurde durch Ethambutol-Behandlung eine völlig neue Methode entdeckt, die Glutamatausscheidung zu induzieren. Die bisherigen bereits bekannten Möglichkeiten zur Induktion der Ausscheidung benutzen i) Biotin-Limitation (Shiio *et al.*, 1962), ii) Penicillin-Behandlung (Nunheimer *et al.*, 1970), iii) Lysozym-sensitive Mutanten (Hirasawa *et al.*, 2000), iv) Behandlung mit Detergentien wie z.B. Tween 60 oder Dodecylammoniumacetat (Takinami *et al.*, 1965, 1996; Duperray *et al.*, 1969), v) Temperaturerhöhung (Lapujade *et al.*, 1999), vi) Ölsäure- oder Glycerin-auxotrophe Mutanten (Takinami *et al.*, 1965, 1968; Nakao *et al.*, 1972), vii) die Behandlung mit Lokalanästhetika (Lamber *et al.*, 1995) oder auch kombinierte Methoden wie Expression von Lipidsynthesegenen bei gleichzeitiger Temperaturerhöhung (Nampoothiri *et al.*, 2002). Bislang wird davon ausgegangen, dass primär eine veränderte Lipidzusammensetzung (Hoischen & Krämer, 1990) in Verbindung mit aktivem Export (Gutmann *et al.*, 1992) zur Glutamatausscheidung führt. Dass die Fettsäuresynthese Einfluss auf die Glutamatbildung hat, ist schon lange bekannt (Kimura *et al.*, 1996). Es ist deswegen nicht überraschend, dass in dieser Arbeit gefunden wurde, dass Cerulenin, ein spezifischer Inhibitor der Fettsäuresynthese, zur Glutamatausscheidung führt (Parrish *et al.*, 1999). Es können aber nicht alle Techniken der „Induktion“ mit der Fettsäuresynthese in Zusammenhang gebracht werden, da z.B. Penicillin die Synthese der Zellwandkomponente Peptidoglykan inhibiert. Es gibt bisher kein insgesamt schlüssiges Modell, welches den Glutamatefflux auf molekularer Ebene erklärt und mit der Vielzahl der unterschiedlichen Methoden zur Induktion in Einklang bringt. Interessanterweise ist die einzige Gemeinsamkeit, dass alle „Induktoren“ auf die Zellhülle einwirken.

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen der Ethambutol-Behandlung auf die Zelle eingehend untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Ethambutol die Zusammensetzung der Zellwandkomponente Arabinogalaktan stark beeinflusst. So ist in Ethambutol-behandelten Zellen der Arabinosegehalt im Arabinan drastisch reduziert. Gleichzeitig sind die am Arabinogalaktan gebundenen Mycolsäuren reduziert. Der Schluss liegt demnach nahe, dass Ethambutol in die Synthese der Arabinankomponente des Arabinogalaktans

eingreift; dies wurde auch für *M. smegmatis* gezeigt (Deng *et al.*, 1995; Mikusova *et al.*, 1995). In der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich nachgewiesen, dass Ethambutol bei *C. glutamicum* zu Trehalosemonomycolat- und Trehalosedimycolat-Akkumulation führt. Diese Trehalosemycolate spielen in der Mycolsäuresynthese bzw. beim Transport synthetisierter Mycolsäuren bis zum Arabinogalaktan eine Rolle (Wolf *et al.*, 2003). Eine Anhäufung dieser Mycolate ist somit wahrscheinlich die Folge des reduzierten Arabinogehalts der Ethambutol-behandelten Zellen. Offensichtlich besteht die Möglichkeit, durch Veränderungen des Arabinogalaktan-Polymers die Glutamatausscheidung zu induzieren. Da das Arabinogalaktan kovalent mit einem Teil der Mycolsäuren und ebenfalls mit dem Peptidoglykan verknüpft ist, ist grundsätzlich auch vorstellbar, dass eine Veränderung des Peptidoglykans oder eine Schwächung der Mycolsäureschicht zum Efflux führt. Es gibt Hinweise, dass reduzierter Mycolsäuregehalt bei *C. glutamicum* die Glutamatakkumulation von  $40,2 \text{ g l}^{-1}$  auf  $45,6 \text{ g l}^{-1}$  steigern soll (Nakamura *et al.*, 2002).

Aufgrund des beschriebenen Zusammenhangs zwischen Ethambutol und der Zellwand sowie den bekannten „Induktoren“, die zur Glutamatausscheidung führen, ist davon auszugehen, dass der Efflux jeweils indirekt über eine veränderte Zellhülle zustande kommt. Denkbar ist, dass durch die veränderte Zellhülle ein molekularer Prozess in Gang gesetzt wird, z.B. durch die Beteiligung der extracytoplasmatischen Sigmafaktoren von *C. glutamicum* (Kalinowski *et al.*, 2003), der schließlich zur Induktion eines Exporters führt. Möglicherweise könnte es sich bei diesem Exporter auch um ein Protein handeln, das eigentlich Metabolite der Zellwandsynthese ausschleust aber auch unspezifisch Glutamat. Auch könnten osmotische Effekte bei veränderter Zellhülle wirksam werden. Es ist bekannt, dass bei Biotin-Limitation das Zellvolumen vergrößert ist (Hoischen, Dissertation), sodass durch den dadurch bedingten Stress auf die Membran ein Transporter oder eine Pore aktiv wird.

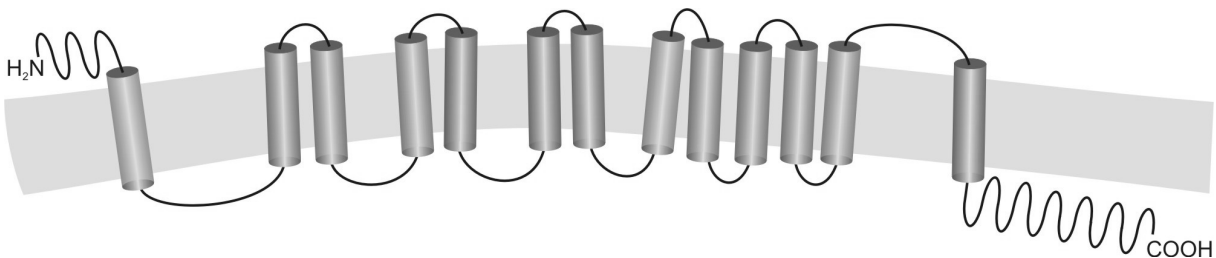
Dieser Glutamat-Transporter wird in einem von Krämer etablierten Modell gefordert (Gutmann *et al.*, 1992). Solange dieser Transporter aber nicht eindeutig identifiziert ist, müssen auch davon abweichende Modelle mit in Betracht gezogen werden. Grundsätzlich ist auch möglich, dass die Zellhülle aufgrund einer veränderten Fettsäurezusammensetzung durchlässig wird, was zur Diffusion des Glutamats aus der Zelle führt (Shiio *et al.*, 1962). Hierfür sprechen die im Kulturüberstand gefundenen cytoplasmatischen Proteine. So wurde z.B. Succinat lange als Substanz angesehen, die nicht durch Diffusion transloziert werden kann, wogegen Kaim und Dimroth (1999) zeigen konnten, dass Succinat in zyklischer Form vorliegen kann und damit membranpermeabel ist.

## 2. Arabinosyltransferase und Arabinogalaktan

Alle *Corynebacteriaceae* besitzen mindestens ein *emb*-Gen. Obwohl die Funktion des Genprodukts Emb noch nicht vollständig verstanden ist, ist Emb als Arabinosyltransferase letztlich am Einbau von Arabinose in das im Periplasma lokalisierte Arabinogalaktan und das Lipoarabinomannan beteiligt (Dover *et al.*, 2004). Neben der Resistenz gegenüber Ethambutol ist ein weiterer Hinweis darauf, dass Emb der Wirkort von Ethambutol ist, dass klinische Isolate von *M. tuberculosis*, die resistent gegenüber Ethambutol sind, sehr oft Mutationen im *embB*-Gen tragen (Telenti *et al.*, 1997; Lety *et al.*, 1997). In der vorliegenden Arbeit konnte für *C. glutamicum* gezeigt werden, dass alle für Mycobakterien bekannten phänotypischen Befunde auch auf *C. glutamicum* zutreffen. Dieses sind: i) Überexpression von *emb* führt zur Ethambutol-Resistenz, ii) der Arabinosegehalt des Arabinogalaktans der *emb*-Inaktivierungsmutante bzw. der *emb*-Deletionsmutante ist reduziert, iii) die Zellmorphologie der Mutanten ist stark verändert, iv) die an das Arabinan gebundenen Mycolsäuren sind in den Mutanten reduziert. Überraschenderweise führt Ethambutol zur Akkumulation cytoplasmatischer Proteine im Kulturüberstand; bei *M. tuberculosis* wurde dies bisher nicht beobachtet, wohl aber Zellyse (Reisner *et al.*, 1997). Demzufolge könnte die Toxizität von Ethambutol unter anderem auch auf Ethambutol-bedingte Lyse zurückzuführen sein. Es wird diskutiert, dass neben den *emb*-Genen noch weitere Wirkorte für Ethambutol in *M. tuberculosis* denkbar sind (Ramaswamy *et al.*, 2000). Da jedoch die *emb*-Deletionsmutante von *C. glutamicum* ein Ethambutol-unabhängiges Wachstum aufweist, ist dies eher unwahrscheinlich.

Das Emb-Protein besitzt in *M. tuberculosis* und anderen Mycobakterien drei Homologe, wogegen *C. glutamicum* nur ein entsprechendes Protein besitzt. Diese sehr großen Proteine (~1000 Aminosäurereste) besitzen einen transmembranen Bereich und einen globulären Bereich, der Topologievorhersagen zufolge im periplasmatischen Raum lokalisiert sein könnte (Abbildung 32). Nach derzeitiger Vorstellung könnten die Proteine in *M. tuberculosis* unterschiedliche Spezifitäten bezüglich des Verknüpfungstyps der Arabinose oder des Akzeptors - Arabinogalaktan oder Lipoarabinomannan - besitzen (Escuyer *et al.*, 2001). So ist nach Inaktivierung von *embA* bzw. *embB* in *M. tuberculosis* der Arabinosegehalt des Arabinogalaktans verringert (Escuyer *et al.*, 2001) und bei Inaktivierung von *embC* das Lipoarabinomannan strukturell verändert. Allerdings muss bei diesen Experimenten berücksichtigt werden, dass zumindest bei der *embC*-Mutante sehr wahrscheinlich ein polarer Effekt auftrat und somit ebenfalls die Expression der stromabwärts von *embC* liegenden Gene *embA* und *embB* durch die Inaktivierung beeinträchtigt wurde. Wegen dieser komplexen Situation ist es attraktiv, *C. glutamicum*, das nur ein einziges *emb*-Gen besitzt, zu untersuchen. Zudem ist davon auszugehen, dass *C. glutamicum* wie *M. tuberculosis*

Lipomannan besitzt, wahrscheinlich aber kein Lipoarabinomannan (Gibson *et al.*, 2003; Puech *et al.*, 2001). Überraschenderweise konnte aber keine Komplementation der *emb*-Deletionsmutante von *C. glutamicum* mit einem der drei Homologen aus *M. tuberculosis* erreicht werden. Anscheinend sind die Ähnlichkeiten zwischen den orthologen *emb*-Genen nicht hoch genug, da auch *embC*, welches mit 37 % die höchsten Identitäten zu dem corynebakteriellen *emb*-Gen aufweist, keine Komplementation ermöglicht. Es wäre aber auch denkbar, dass gerade *embC* ungeeignet ist, die Funktion des corynebakteriellen *emb*-Gens zu übernehmen, da EmbC in *M. tuberculosis* an der Lipoarabinomannan-Synthese beteiligt sein soll (Zhang *et al.*, 2003). Wie die Experimente zur mRNA-Quantifizierung zeigten, werden die *M. tuberculosis* Gene in *C. glutamicum* exprimiert. Unter Umständen erfolgt aber kein korrekter Einbau der entsprechenden Proteine in die Membran. Dies könnte z.B. durch PhoA-Fusionen oder Nachweis des Proteins in Membranfraktionen untersucht werden. Des Weiteren soll die *emb*-Deletionsmutante von *C. glutamicum* genutzt werden, die vielfältigen Funktionalitäten der Emb-Proteine, d.h. der möglicherweise gekoppelte Transport aktivierter Arabinose mit Substraterkennung (Arabinogalaktan oder Lipoarabinomannan) und die Arabinose-Verknüpfung (1→2 oder 1→5 Bindung) zu untersuchen, um ein tieferes Verständnis der Emb-Proteine aus *M. tuberculosis* zu erhalten.



**Abbildung 32:** Topologiemodell des Emb-Proteins. Der periplasmatische C-Terminus des Proteins könnte für die Arabinansynthese außerhalb der Zelle verantwortlich sein. Dem N-Terminus könnte die Rolle der Akzeptor-Erkennung zukommen.

Ein überraschender Befund, der mit der *emb*-Deletionsmutante von *C. glutamicum* erhalten wurde, ist, dass es trotz Deletion von *emb* offensichtlich noch zu einem Einbau von Arabinose ins Arabinogalaktan kommt, wenn auch in erheblich geringerem Maße. Dieser neuartige Befund wird derzeit noch weiter untersucht, um zusätzliche strukturelle Informationen zur Verknüpfung der Arabinosreste im Zuckerpolymer von *C. glutamicum* zu erhalten. Aus den Ergebnissen muss geschlossen werden, dass es in *C. glutamicum* noch mindestens eine weitere Arabinosyltransferase gibt. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass im Genom von *C. glutamicum* vor *emb* ein nicht charakterisierter ORF liegt, der für ein Membranprotein kodiert, und diese Region in allen *Corynebacteriaceae*

syntänisch angeordnet ist. Die unmittelbare Nachbarschaft dieses ORFs zu *emb* und die Möglichkeit, dass beide Gene ein Operon bilden könnten, ist ein guter Hinweis dafür, dass auch das Genprodukt dieses ORFs an der Arabinogalaktan- bzw. der Zellwandsynthese beteiligt ist. Falls es sich dabei um ein am Arabinose-Einbau beteiligtes Protein handelt, wäre dieses wahrscheinlich von Ethambutol unabhängig, da die *emb*-Deletionsmutante von *C. glutamicum* nicht mehr Ethambutol-sensitiv ist. Ein zusätzliches Indiz für einen noch erfolgenden *emb*-unabhängigen Arabinose-Einbau könnte die noch teilweise erfolgende Arabinansynthese bei *M. smegmatis* nach Ethambutol-Behandlung sein (Lee *et al.*, 2004).

### 3. Fettsäuresynthese

Im Zusammenhang mit der Synthese der Zellhülle wurden in dieser Arbeit auch Untersuchungen zur Lipidsynthese durchgeführt. Interessant ist, dass *Corynebacteriaceae* Fettsäuresynthasen haben, die wie bei Eukaryonten aus einem großen Polypeptid (~3000 Aminosäurereste) bestehen, wogegen in anderen Bakterien die Fettsäuresynthese aus einzelnen getrennten Polypeptiden besteht (Fernandes & Kolattukudy, 1996; Kawaguchi & Okuda, 1977). Eine zusätzliche Besonderheit von *C. glutamicum*, *C. efficiens* und *C. ammoniagenes* (Kolattukudy *et al.*, 1997; Besra & Chatterjee, 1994) ist, dass sie jeweils zwei verschiedene dieser außerordentlich großen Proteinkomplexe besitzen, während *Mycobacterium*-Spezies nur eine Fettsäuresynthese besitzen. In dieser Arbeit gelang es in *C. glutamicum* *fasB* zu deletieren, und *fasA* zu inaktivieren, sodass eine Fettsäureauxotrophe Mutante zur Verfügung stand. Die Analyse dieser Mutanten zeigt, dass beide Genprodukte *in vivo* aktiv sind, und das Hauptprodukt der *fasA*-kodierte Fettsäuresynthese Ölsäure (18:1) ist sowie der *fasB*-kodierte Palmitat (16:0). Wie ferner die *fasB* Mutante zeigt, scheint das FasA Protein *in vivo* auch noch zusätzlich Stearat (18:0) zu synthetisieren. Diese Daten sind in voller Übereinstimmung mit *in vitro*-Studien der zwei isolierten Enzyme aus *C. ammoniagenes*, die zeigen, dass FasA hauptsächlich Oleat (18:1) und zu etwa 10 % Stearat (18:0) sowie Spuren von Palmitat (16:0) synthetisiert (Stuible *et al.*, 1997). Die molekulare Grundlage für die Tatsache, dass FasA sowohl 18:1 als auch 18:0 synthetisiert, ist ebenso unbekannt, wie die Ursache dafür, dass FasB nur die gesättigten Fettsäuren 16:0 und zu einem kleineren Teil auch 18:0 bildet. Der Sequenzvergleich der beiden corynebakteriellen Proteine mit denen aus *M. tuberculosis* zeigt keine spezifische Region, die auf eine „Desaturase“ hinweist. Demgegenüber besitzt *E. coli* ein spezielles Enzym, Des, das eine solche Funktion wahrnimmt (Mansilla *et al.*, 2004). Fettsäuresynthasen scheinen generell ein breites Produktspektrum zu besitzen, da z.B. die Fettsäuresynthasen von *M. smegmatis* und *M. tuberculosis* zwei Klassen von Fettsäuren mit je einer Kettenlänge von

16 bis 18 bzw. 24 bis 26 Kohlenstoffatomen bilden (Bloch und Vance, 1977; Fernandes und Kolattukudy, 1996; Kikuchi *et al.*, 1992).

Wie aus dem unveränderten Wachstum der *fasB*-Mutante zu schließen ist, scheint das FasB-Enzym für die Zelle weniger wichtig zu sein als FasA. Es ist auch nicht in *C. diphtheriae* vorhanden. Dagegen ist FasA offensichtlich sehr wichtig und nach der *fasA*-Inaktivierung ist Wachstum nur bei Fettsäure-Supplementation möglich. Wie die erfolgreiche Ölsäure-Supplementation aber zeigt, ist grundsätzlich Wachstum mit Phospholipiden und Mycolsäuren, die fast nur Ölsäure als Bestandteil haben, möglich. Dass FasA das bedeutendere der zwei Fas-Enzyme ist, zeigt auch das relative Verhältnis der *fas*-mRNAs, wobei die *fasA*-mRNA etwa 68 % und die *fasB*-mRNA 32 % in *C. glutamicum* ausmacht. Für die Fas-Proteine aus *C. ammoniagenes* wurde mittels Antikörpern der FasA-Anteil auf 90 % des gesamten Fas-Proteins abgeschätzt (Stuible *et al.*, 1996).

Die Expression der Gene *fasA* und *fasB* unterliegt einer von den Kohlenstoffquellen abhängigen Regulation. Es ist denkbar, dass sich *C. glutamicum* auf diese Weise an veränderte Umweltbedingungen anpasst, um so z.B. durch verändertes Fettsäureprofil auf Stress durch Temperatur oder Säure zu reagieren. Ein verändertes Fettsäureprofil der Cytoplasmamembran als Folge von Säurestress ist z.B. für *Streptococcus mutans* bekannt (Fozo *et al.*, 2004). In dieser Arbeit konnte für *C. glutamicum* keine veränderte Lipidzusammensetzung bei Wachstum auf der Kohlenstoffquelle Acetat im Vergleich zu Glucose nachgewiesen werden. Überraschenderweise war aber der relative Anteil der *fasA*- zur *fasB*-mRNA verändert, denn die absolute Expression von *fasA* auf Acetat im Vergleich zu Glucose war stark reduziert. Es könnte also durchaus sein, dass auf Acetat die Gesamtmenge der Lipide reduziert ist. Alternativ ist aber auch denkbar, dass wegen der vermutlich erhöhten Konzentration von Acetyl-CoA auf diesem Substrat eine erhöhte Konzentration dieser Vorstufe zu einer vergleichbaren Gesamtmenge der Lipide führt (Gerstmeir *et al.*, 2003).

Überraschend ist der Befund, dass bei Wachstum von *C. glutamicum* auf Propionat als Kohlenstoffquelle auch ungeradzahlige Fettsäuren der Länge 15 bzw. 17 gebildet werden. Da beim Propionat-Abbau dies zunächst zu Propionyl-CoA in der Zelle aktiviert wird (Claes *et al.*, 2002), ist davon auszugehen, dass der C<sub>3</sub>-Körper von Propionat über Propionyl-CoA in die Fettsäure gelangt. Sehr wahrscheinlich dient Propionyl-CoA über die Ketoacylsäuresynthase-Aktivität der Fettsäuresynthase als Starter-Einheit der anschließenden Kettenverlängerung. Für *C. ammoniagenes* ist gezeigt, dass bei Zugabe von Propionyl-CoA als Starter-Einheit die Fettsäure 17:0 gebildet wird (Arai *et al.*, 1982) und



dass sogar längerkettige Acyl-CoAs bis zu einer Länge von 10 Kohlenstoffatomen zur Fettsäuresynthese akzeptiert werden (Kawaguchi *et al.*, 1981).

Die zusammen mit der Fettsäure-Analyse durchgeführte Mycolsäure-Analyse zeigt, unabhängig von dem Markierungsexperiment mit der [<sup>13</sup>C]-markierten Ölsaure, dass die Polyketidsynthase aus *C. glutamicum in vivo* synthetisierte Fettsäuren als Substrat verwendet. So spiegelt sich z.B. der verringerte Anteil an 16:0 in der *fasB*-Mutante in der Abwesenheit der Mycolsäure des Typs 34:0 wider. Ferner wird bei Anzucht auf Propionat die Fettsäure 17:0 wahrscheinlich in eine Mycolsäure des Typs 34:0 eingebaut. Eine der Fettsäuren wird nach neuesten Erkenntnissen der Mycolsäuresynthese als Adenylyl-Derivat aktiviert (Trivedi *et al.*, 2004) und dann mit einer zweiten Fettsäure verknüpft, sodass nicht nur die Polyketidsynthase, sondern auch dieses Adenylierungsenzym, FadD, eine gewisse Toleranz bezüglich der Substratspezifität besitzt.

## V. ZUSAMMENFASSUNG

Mit *Corynebacterium glutamicum* werden jährlich 1,2 Millionen Tonnen L-Glutamat hergestellt. Vieles spricht dafür, dass eine Veränderung der Zellwandstruktur am Glutamatefflux beteiligt ist. Die Zellwand von *C. glutamicum* ist ähnlich aufgebaut wie die von *Mycobacterium tuberculosis*. Sie ist durch das Zuckerpolymer Arabinogalaktan gekennzeichnet sowie durch den Besitz von Mycolsäuren, die eine zweite äußere Lipidschicht bilden.

Es konnte eine neuartige Technik zur Induktion der Glutamatausscheidung gefunden werden. Ethambutol-Behandlung führt zur Glutamatakkumulation von 55 mM bei einer maximalen spezifischen Effluxrate von  $15 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg (Trockengewicht)}^{-1}$ .

Die Wirksamkeit von Ethambutol ist bei Überexpression von *emb*, das für eine Arabinosyltransferase kodiert, reduziert. Eine *emb*-Deletionsmutante wächst nur stark verzögert, scheidet Glutamat aus und zeichnet sich ferner durch verminderten Arabinosegehalt des Arabinogalaktans sowie Abwesenheit von Mycolsäuren aus. Diese Analysen und die von Ethambutol-behandelten Zellen zeigen, dass ein verändertes Arabinogalaktan und eine reduzierte äußere Lipidschicht Glutamatausscheidung ermöglichen.

Die drei *emb*-Gene aus *M. tuberculosis* wurden in *C. glutamicum* plasmidkodiert eingebracht. Trotz nachgewiesener Expression können sie die Funktion des einzigen *emb*-Gens in *C. glutamicum* nicht ersetzen, was auf starke Spezialisierung der einzelnen Arabinosyltransferasen hinweist.

Ungewöhnlicherweise besitzt *C. glutamicum* zwei Fettsäuresynthasen, FasA und FasB, und es gelang, beide zu inaktivieren. Während die *fasB*-Mutante prototroph ist, ist die *fasA*-Mutante Ölsäure-auxotroph. Die Lipidanalysen der Mutanten ergaben, dass das Hauptprodukt des FasA-Enzyms Ölsäure ist, das des FasB-Enzyms hingegen Palmitat. Damit ist eine spezifische *in vivo*-Funktion der Fettsäuresynthasen gezeigt, und dass *C. glutamicum* offensichtlich tolerant gegenüber der Fettsäurezusammensetzung ist, da die *fasB*-Mutante im Wachstum nicht beeinträchtigt ist.

Durch Ethambutol-Behandlung ist eine neue Möglichkeit gegeben, Glutamatefflux zu erreichen. Erstmals ist gezeigt, dass Glutamatefflux auch durch Veränderung der Arabinogalaktanstruktur möglich ist. Dies ist ein starker Hinweis, dass der Glutamatefflux mit massiver Veränderung der Zellwandstruktur einhergeht. Die Tatsache, dass auch ein reduzierter Fettsäure- und Mycolsäuregehalt den Efflux auslösen, deutet auf einen eher unspezifischen Effekt hin, der zur Glutamatausscheidung führt.

## VI. LITERATURVERZEICHNIS

- Abe, S., Takayama, K., and Kinoshita, S.** (1967) Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **13**:279-301.
- D'Agnolo, G., Rosenfeld, I. S., Awaya, J., Omura, S., Vagelos, P. R.** (1973) Inhibition of fatty acid synthesis by the antibiotic cerulenin. Specific inactivation of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthetase. *Biochim. Biophys. Acta* **326(2)**: 155-156.
- Alcaide, F., Pfyffer, G.E., Telenti, A.** (1997) Role of *embB* in natural and acquired resistance to ethambutol in mycobacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41(10)**: 2270-2273.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J, Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Arai, K., Kawaguchi, A., Saito, Y., Koike, N., Seyame, Y., Yamakawa, T., Okuda, S.** (1982) Propionyl-CoA induced synthesis of even-chain-length fatty acids by fatty acid synthetase from *Brevibacterium ammoniagenes*. *J. Biochem.* **91**: 11-18.
- Ariga, N., Maruyama, K., Kawaguchi, A.** (1984) Comparative studies of fatty acid synthases of corynebacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **30**: 87-95.
- Asselineau, C., Asselineau, J., Lanéelle, G., Lanéelle, M.-A.** (2002) The biosynthesis of mycolic acids by mycobacteria: current and alternative hypotheses. *Prog. Lipid Res.* **41**: 501-523.
- Barry III, C. E., Lee, R. E., Mdluli, K., Sampson, A. E., Schroeder, B. G., Slayden, R. A., Yuan, Y.** (1998) Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. *Prog. Lipid Res.* **37(2)**: 143-179.
- Belanger, A. E., Besra, G. S., Ford, M. E., Mikusova, K., Belisle, J. T., Brennan, P. J., Inamine, J. M.** (1996) The *embAB* genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93(21)**: 11919-11924.

- Bensadoun, A., Weinstein, D.** (1976) Assay of proteins in the presence of interfering material. *Anal. Biochem.* **70**: 241-250.
- Bernstein, J. A., Khodursky, A. B., Lin, P. H., Lin-Chao, S., Cohen, S. N.** (2002) Global analysis of mRNA decay and abundance in *Escherichia coli* at single-gene resolution using two-color fluorescent DNA microarrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**: 9697-9702.
- Besra, G. S., Chatterjee, D.** (1994) Lipid and carbohydrates of *Mycobacterium tuberculosis*, p. 285-306. In: B. R. Bloom (ed.), Tuberculosis, pathogenesis, protection and control. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Besra, G. S., Khoo, K., McNeil, M., Dell, A., Morris, H. R., Brennan, P. J.** (1995) A new interpretation of the structure of the mycolyl-arabinogalactan complex of *Mycobacterium tuberculosis* as revealed through characterization of oligoglycosylalditol fragments by fast-atom bombardment mass spectrometry and <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* **34**: 4257–4266.
- Besra, G. S., Morehouse, C. B., Rittner, C. M., Waechter, C. J., Brennan, P. J.** (1997) Biosynthesis of mycobacterial lipoarabinomannan. *J. Biol. Chem.* **272(29)**: 18460-18466.
- Birnboim, H. C., Doly, J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.
- Blattner, F. R. et al.** (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277(5331)**: 1453-1474.
- Bloch, K. und Vance, D.** (1977) Control mechanisms in the synthesis of saturated fatty acids. *Annu. Rev. Biochem.* **46**: 263-298.
- Bramucci, M. G., Nagarajan, V.** (1996) Direct selection of cloned DNA in *Bacillus subtilis* based on sucrose-induced lethality. *Appl. Environ. Microbiol.* **62(11)**: 3948-3953.
- Brand, S., Niehaus, K., Pühler, A., Kalinowski, J.** (2003) Identification and functional analysis of six mycolyltransferase genes of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032: the genes cop1, cmt1, and cmt2 can replace each other in the synthesis of trehalose dicorynomycolate, a component of the mycolic acid layer of the cell envelope. *Arch. Microbiol.* **180(1)**: 33-44.

**Brennan, P. J., Nikaido, H.** (1995) The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **64**: 29-63.

**Cerdeno-Tarraga, A. M., Efstratiou, A., Dover, L. G., Holden, M. T., Pallen, M., Bentley, S. D., Besra, G. S., Churcher, C., James, K. D., De Zoysa, A., Chillingworth, T., Cronin, A., Dowd, L., Feltwell, T., Hamlin, N., Holroyd, S., Jagels, K., Moule, S., Quail, M. A., Rabinowitsch, E., Rutherford, K. M., Thomson, N. R., Unwin, L., Whitehead, S., Barrell, B. G., Parkhill, J.** (2003) The complete genome sequence and analysis of *Corynebacterium diphtheriae* NCTC13129. *Nucleic Acids Res.* **31(22)**: 6516-6523.

**Chatterjee, D.** (1997) The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1**: 579-588.

**Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J., Rutter, W. J.** (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochem.* **18**: 5294-5299.

**Chomczynski, P., Sacchi, N.** (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159.

**Chopra, I. und Roberts, M.** (2001) Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**: 232-260.

**Clauser, K. R., Baker, P., Burlingame, A. L.** (1999) Role of accurate mass measurement ( $\pm 10$  ppm) in protein identification strategies employing Ms or MS/MS and database searching. *Anal. Chem.* **71**: 2871-2882.

**Claes, W. A., Pühler, A., Kalinowski, J.** (2002) Identification of two *prpDBC* gene clusters in *Corynebacterium glutamicum* and their involvement in propionate degradation via the 2-methylcitrate cycle. *J. Bacteriol.* **184(19)**: 2728-2739.

**Cole, S. T. et al.** (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from complete genome sequence. *Nature* **393 (6685)**: 537-544.

**Collins, M. D., Goodfellow, M., and Minnikin, D. E.** (1981) A survey of the structures of mycolic acids in *Corynebacterium* and related taxa. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 129-149.

- Collins, M. D., Goodfellow, M., Minnikin, D. E.** (1982) Fatty acid composition of some mycolic acid-containing coryneform bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 2503–2509.
- Cremer, J., Eggeling, L., Sahm, H.** (1990) Cloning the *dapA dapB* cluster of the lysine-secreting bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Gen. Genet.* **220**: 478-480.
- Datta, A. K., Takayama, K.** (1993) Isolation and purification of trehalose 6-mono- and 6,6'-di-corynomycolates from *Corynebacterium matruchotii*. Structural characterization by <sup>1</sup>H NMR. *Carbohydr Res.* **245(1)**: 151-158.
- Deng, L., Mikusova, K., Robuck, K. G., Scherman, M., Brennan, P. J., McNeil, M. R.** (1995) Recognition of Multiple Effects of Ethambutol on Metabolism of Mycobacterial Cell Envelope. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39(3)**: 694-701.
- Dover, L. G., Cerdeno-Tarraga, A. M., Pallen, M. J., Parkhill, J., Besra, G. S.** (2004) Comparative cell wall core biosynthesis in the mycolated pathogens, *Mycobacterium tuberculosis* and *Corynebacterium diphtheriae*. *FEMS Microbiol Rev.* **28(2)**: 225-250.
- Duperray, F., Jezequel, D., Ghazi, A. Letellier, L., Shechter, E.** (1992) Excretion of glutamate from *Corynebacterium glutamicum* triggered by amine surfactants. *Biochim. Biophys. Acta* **1103**: 250-258.
- Eggeling, L. und Sahm, H.** (1999) L-glutamate and L-lysine: traditional products with impetuous developments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 146-153.
- Eggeling, L., Krumbach, K., Sahm, H.** (2001) L-Glutamate Efflux with *Corynebacterium glutamicum*: Why Is Penicillin Treatment or Tween Addition Doing the Same? *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3(1)**: 67-68.
- Eikmanns, B. J., Kleinertz, E., Liebl, W. and Sahm, H.** (1991) A family of *Corynebacterium glutamicum*/*Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing. *Gene* **102**: 93-98.
- Engels, S., Schweitzer, J. E., Ludwig, C., Bott, M., Schaffer, S.** (2004) *clpC* and *clpP1P2* gene expression in *Corynebacterium glutamicum* is controlled by a regulatory network involving the transcriptional regulators ClgR and HspR as well as the ECF sigma factor sigma H. *Mol. Microbiol.* **52(1)**: 285-302.

- Escuyer, V. E., Lety, M. A., Torrelles, J. B., Khoo, K. H., Tang, J. B., Rithner, C. D., Frehel, C., McNeil, M. R., Brennan, P. J., Chatterjee, D.** (2001) The role of the *embA* and *embB* gene products in the biosynthesis of the terminal hexaarabinofuranosyl motif of *Mycobacterium smegmatis* arabinogalactan. *J. Biol. Chem.* **276(52)**: 48854-48862.
- Fernandes, N. D. und Kolattukudy, P. E.** (1996) Cloning, sequencing and characterization of a fatty acid synthase-encoding gene from *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis* BCG. *Gene* **170**: 95-99.
- Fozo, E. M., Quivey, R. G. Jr.** (2004) Shifts in the membrane fatty acid profile of *Streptococcus mutans* enhance survival in acidic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **70(2)**: 929-936.
- Gande, R., Gibson, K. J., Brown, A. K., Krumbach, K., Dover, L. G., Sahm, H., Shioyama, S., Oikawa, T., Besra, G. S., Eggeling, L.** (2004) Acyl-CoA carboxylases (*accD2* and *accD3*) together with a unique polyketide synthase (*Cg-pks*) are key to mycolic acid biosynthesis in *Corynebacteriaceae* like *Corynebacterium glutamicum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **279(43)**: 44847-44857.
- Gerstmeir, R., Wendisch, V. F., Schnicke, S., Ruan, H., Farwick, M., Reinscheid, D., Eikmanns, B. J.** (2003) Acetate metabolism and its regulation in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* **104**: 199-122.
- Gibson, K. J., Eggeling, L., Maughan, W. N., Krumbach, K., Gurcha, S. S., Nigou, J., Puzo, G., Sahm, H., Besra, G. S.** (2003) Disruption of *Cg-Ppm1*, a polyprenyl monophosphomannose synthase, and the generation of lipoglycan-less mutants in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Chem.* **278(42)**: 40842-40850.
- Gutmann, M., Hoischen, C. and Krämer, R.** (1992) Carrier-mediated glutamate secretion by *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation. *Biochimica et Biophysica Acta* **1112**: 115-123.
- Grant, S. G. N., Jessee, J, Bloom, F. R. and Hanahan, D.** (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4645-4649.

**Griffith, J. K., Cuellar, D. H., Fordyce, C. A., Hutchings, K. G., Mondragon, A.** (1994) Structure and function of the class C tetracycline/H<sup>+</sup> antiporter: three independent groups of phenotypes are conferred by TetA (C). *Mol. Memb. Biol.* **11(4)**: 271-277.

**Hannahan, D.** (1983) Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.

**Heath, R. J., Li, J., Roland, G. E., Rock, C. O.** (2000) Inhibition of the *Staphylococcus aureus* NADPH-dependent Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase by Triclosan and Hexachlorophene. *J. Biol. Chem.* **275**: 4654-4659.

**Heath, R. J., White, S. W., Rock, C. O.** (2001) Lipid biosynthesis as a target for antibacterial agents. *Prog. Lipid Res.* **40**: 467-497.

**Hirasawa, T., Wachi, M., Nagai, K.** (2000) A mutation in the *Corynebacterium glutamicum* *ltsA* gene causes susceptibility to lysozyme, temperature-sensitive growth, and L-glutamate production. *J. Bacteriol.* **182(10)**: 2696-2701.

**Hoischen, C.** (1990) Untersuchungen zum Mechanismus der Glutamatsekretion in *Corynebacterium glutamicum*, Dissertation Universität Düsseldorf.

**Hoischen, C., Krämer, R.** (1990) Membrane alteration is necessary but not sufficient for effective glutamate secretion in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **172(6)**: 3409-3416.

**Hüser, A. T., Becker, A., Brune, I., Dondrup, M., Kalinowski, J., Plassmeier, J., Pühler, A., Wiegrabe, I., Tauch, A.** (2003) Development of a *Corynebacterium glutamicum* DNA microarray and validation by genome-wide expression profiling during growth with propionate as carbon source. *J Biotechnol.* **106(2-3)**: 269-286.

**Jang, K. H., Pierotti, D., Kemp, G. W., Best, G. R., Britz, M. L.** (1997) Mycolic acid composition of *Corynebacterium glutamicum* and its cell surface mutants: effects of growth with glycine and isonicotinic acid hydrazide. *Microbiology* **143**: 3209-3221.

**Jeanmourgin, F., Thompson, J. D., Gouy, M., Higgins, D. G., Gibson, T. J.** (1998) Multiple sequence alignment with ClustalX. *Trends Biochem. Sci.* **23**: 403-405.



**Kaim, G., Dimroth, P.** (1999) ATP synthesis by F-type ATP synthase is obligatorily dependent on the transmembrane voltage. *The EMBO Journal* **18(15)**: 4118-4127.

**Kalinowski, J., Bathe, B., Bartels, D., Bischoff, N., Bott, M., Burkovski, A., Dusch, N., Eggeling, L., Eikmanns, B. J., Gaigalat, L., Goesmann, A., Hartmann, M., Huthmacher, K., Krämer, R., Linke, B., McHardy, A. C., Meyer, F., Möckel, B., Pfefferle, W., Pühler, A., Rey, D. A., Rückert, C., Rupp, O., Sahm, H., Wendisch, V. F., Wiegrabe, I., Tauch, A.** (2003) The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J Biotechnol.* **104(1-3)**: 5-25.

**Kawaguchi, A., Seyama, Y., Yamakawa, T., Okuda, S.** (1981) Fatty acid synthase from *Brevibacterium ammoniagenes*. *Methods Enzymol.* **71**: 120-127.

**Kawaguchi, K., Okuda, S.** (1977) Fatty acid synthetase from *Brevibacterium ammoniagenes*: formation of monounsaturated fatty acids by a multienzyme complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 3180-3183.

**Keilhauer, C., Eggeling, L. and Sahm, H.** (1993) Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon. *J. Bacteriol.* **175**: 5595-5603.

**Khodursky, A. B., Bernstein, J. A.** (2003) Life after transcription – revisiting the fate of messenger RNA. *Trends Genet.* **19**: 113-115.

**Kikuchi, S., Rainwater, D. L., Kollatukudy, P. E.** (1992) Purification and characterization of an unusually large fatty acid synthase from *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis* BCG. *Arch. Biochem. Biophys.* **295**: 318-326.

**Kimura, E., Abe, C., Kawahara, Y., Nakamatsu, T., Tokuda, H.** (1996) Molecular cloning of a novel gene, *dtsR*, which rescues the detergent sensitivity of a mutant derived from *Brevibacterium lactofermentum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**: 1565-1570.

**Kinoshita, S., Udaka, S., Shimono, M.** (1957) Studies on the amino acid fermentation. Production of L-glutamate by various microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **3**: 193-205.

**Kinoshita, S.** (1985) Glutamic acid bacteria. In: *Biology of industrial microorganisms*, pp. 115-142, Demain, A., Solomon, N. (Eds.), The Benjamin/Cummings Publishing Company.

- Kircher, M., Leuchtenberger, W.** (1998) Aminosäuren – ein Beitrag zur Welternährung. *Biologie in unserer Zeit* **28**: 281-293.
- Kirchner, O., Tauch, A.** (2003) Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* **104**: 287-299.
- Kleemann, A, Leuchtenberger, W., Hoppe, B, Tanner, H.** (1985) Amino acids. In: Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry. Vol. A2, pp. 57-97, Bartholome, E., Biekert, E., Hellmann, H. (Eds.), VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim, New York, Basel, Cambridge.
- Kolattukudy, P. E., Fernandes, N. D., Azad, A. K., Fitzmaurice, A. M., Sirakova, T. D.** (1997) Biochemistry and molecular genetics of cell-wall lipid biosynthesis in *Mycobacteria*. *Mol. Microbiol.* **24**: 263-270.
- Korolkovas, A.** (1988) In: Essentials of Medicinal Chemistry, John Wiley & Sons, Inc.; New York.
- Lambert, C., Erdmann, A., Eikmanns, M. and Krämer, R.** (1995) Triggering glutamate excretion in *Corynebacterium glutamicum* by modulation the membrane state with local anesthetics and osmotic gradients. *Appl. Env. Microbiol.* Vol. **61**, No. 12: 4334-4342.
- Lapujade, P., Goergen, J. L., Engasser, J. M.** (1999) Glutamate excretion as a major kinetic bottleneck for the triggered production of glutamic acid by *Corynebacterium glutamicum*. *Metab. Eng.* **1(3)**: 255-261.
- Lee, R. E., Armour, J. W., Takayama, K., Brennan, P. J., Besra, G. S.** (1997) Mycolic acid biosynthesis: definition and targeting of the Claisen condensation step. *Biochim. Biophys. Acta* **1346**: 275-284.
- Lee, R. E., Li, W., Chatterjee, D., Lee, R. E.** (2005) Rapid structural characterization of the arabinogalactan and lipoarabinomannan in live mycobacterial cells using 2D and 3D MAS NMR. *Glycobiology* **15(2)**: 139-151. Epub 2004 Sep15.
- Lety, M. A., Nair, S., Berche, P., Escuyer, V.** (1997) A single point mutation in the *embB* gene is responsible for resistance to ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41(12)**: 2629-2633.

- Leuchtenberger, W.** (1996) Amino acids-technical production and use, p.455-502. In: Rehm, H. J. und Reed, G. (ed.), Products of primary metabolism, vol. 6. Verlag Chemie Weinheim, Germany.
- Liebl, W., Ehrmann, M., Ludwig, W., Schleifer, K. H.** (1991) Transfer of *Brevibacterium divaricatum* DSM 20297T, "*Brevibacterium flavum*" DSM 20411, "*Brevibacterium lactofermentum*" DSM 20412 and DSM 1412, and *Corynebacterium glutamicum* and their distinction by rRNA gene restriction patterns. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41(2)**: 255-260.
- Link, A. J., Phillips, D., 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.
- Lindroth, P., Mopper, K.** (1979) High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with *o*-phthaldialdehyde. *Anal. Chem.* **51**: 1167-1174.
- Malumbres, M., Mateos, L., Martin, J. F.** (1995) Microorganisms for amino acid production: *Escherichia coli* and corynebacteria. In: Food Biotechnology, pp. 423-469, Hui, Y. H., Khachtourians, G. G. (Eds.), Verlag Chemie, Weinheim, New York.
- Mansilla, M. C., Cybulski, L. E., Albanesi, D., de Mendoza, D.** (2004) Control of Membrane Lipid Fluidity by Molecular Thermosensors. *J. Bacteriol.* **186**: 6681-6688.
- Marienfeld, S., Uhlemann, E.-M., Schmid, R., Krämer, R., Burkovski, A.** (1997) Ultrastructure of the *Corynebacterium glutamicum* cell wall. *Antonie van Leeuwenhoek* **72**: 291-297.
- Matsumae, A., Nomura, S., Hata, T. J.** (1964) Studies on cerulenin. IV. Biological characteristics of cerulenin. *J. Antibiot.* (Tokyo) **17**: 1-7.
- McMurry, L. M., Oethinger, M., Levy, S. B.** (1998) Triclosan targets lipid synthesis. *Nature* **394**: 531-532.
- Menkel, E., Thierbach, G., Eggeling, L., Sahm, H.** (1989) Influence of increased aspartate availability on lysine formation by a recombinant strain of *Corynebacterium glutamicum* and utilization of fumarate. *Appl. Env. Microbiol.* **55**: 684-688.

- Mikusova, K., Slayden, R. A., Besra, G. S., Brennan, P. J.** (1995) Biogenesis of the mycobacterial cell wall and the site of action of ethambutol. *Antimicrob Agents Chemother.* **39(11)**: 2484-2489.
- Minnikin, D. E., Goodfellow, M., Collins, M. D.** (1978) Lipid composition in the classification and identification of coryneform and related taxa. In: Bousfield, I. J., Calley, A. G., Editors, *Coryneform bacteria*, Academic Press, London, pp. 85–159.
- Nakamura, J., Izui, H., Nakamatsu, T.** (2002) Bacterium producing L-glutamic acid and method for producing L-glutamic acid. European Patent Application EP 1 174 508 A2.
- Nakao, Y., Kikuchi, M., Suzuki, M., Doi, M.** (1972) Microbial Production of L-Glutamic Acid by Glycerol Auxotrophs. Part I: Induction of Glycerol Auxotrophs and Production of L-Glutamic Acid from *n*-Paraffins. *Agr. Biol. Chem.* **36(3)**: 490-496.
- Nampoothiri, K. M., Hoischen, C., Bathe, B., Mockel, B., Pfefferle, W., Krumbach, K., Sahm, H., Eggeling, L.** (2002) Expression of genes of lipid synthesis and altered lipid composition modulates L-glutamate efflux of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58(1)**: 89-96.
- Nishio, Y., Nakamura, Y., Kawarabayasi, Y., Usuda, Y., Kimura, E., Sugimoto, S., Matsui, K., Yamagishi, A., Kikuchi, H., Ikeo, K., Gojobori, T.** (2003) Comparative complete genome sequence analysis of the amino acid replacements responsible for the thermostability of *Corynebacterium efficiens*. *Genome Res.* **13(7)**: 1572-1579.
- Nunheimer, T. D., Birnbaum, J., Ihnen, E. D., Demain, A. L.** (1970) Product inhibition of the fermentative formation of glutamic acid. *Appl. Microbiol.* **20**: 215-217.
- Parrish, N. M., Kuhajda, F., Heine, H., Bishai, W., Dick, J. D.** (1999) Antimycobacterial activity of cerulenin and its effects on lipid biosynthesis. *J. Antimicrob. Chemother.* **43(2)**: 219-226.
- Portevin, D., De Sousa-D'Auria, C., Houssin, C., Grimaldi, C., Chami, M., Daffe, M., Guilhot, C.** (2003) A polyketide synthase catalyzes the last condensation step of mycolic acid biosynthesis in mycobacteria and related organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101(1)**: 314-319.

**Puech, V., Bayan, N., Salim, K., Leblon, G., Daffe, M.** (2000) Characterization of the *in vivo* acceptors of the mycolyl residues transferred by the corynebacterial PS1 and the related mycobacterial antigens 85. *Mol. Microbiol.* **35(5)**: 1026-1041.

**Puech, V., Chami, M., Lemassu, A., Laneelle, M. A., Schiffler, B., Gounon, P., Bayan, N., Benz, R., Daffe, M.** (2001) Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non-covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane. *Microbiology* **147**: 1365-1382.

**Ramaswamy, S. V., Amin, A. G., Goksel, S., Stager, C. E., Dou, S. J., El Sahly, H., Moghazeh, S. L., Kreiswirth, B. N., Musser, J. M.** (2000) Molecular genetic analysis of nucleotide polymorphisms associated with ethambutol resistance in human isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44(2)**: 326-336.

**Reisner, B. S., Woods, G. L., Popov, V. L.** (1997) Electron microscopic analysis of *Mycobacterium avium* complex isolates exposed to ciprofloxacin, rifabutin, ethambutol and clarithromycin. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **1(3)**:270-275.

**van der Rest, M. E., Lange, C. and Molenaar, D.** (1999) A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 541-545.

**Saenger W., Orth, P., Kisker, C., Hillen, W., Hinrichs, W.** (2000) The Tetracycline Repressor - A Paradigm for a Biological Switch. *Angewandte Chemie International Edition* **39(12)**: 2042-2052.

**Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A.** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.

**Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.** (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Sanger, F., Nicklen, C., Coulson, A. R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.

**Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., Pühler, A.** (1994) Small mobilizable multipurpose cloning vectors derived from *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73.

**Schaffer, S., Weil, B., Nguyen, V. D., Dongmann, G., Gunther, K., Nickolaus, M., Hermann, T., Bott, M.** (2001) A high-resolution reference map for cytoplasmic and membrane-associated proteins of *Corynebacterium glutamicum*. *Electrophoresis* **22(20)**: 4404-4422.

**Schleifer, K., Kandler, O.** (1972) Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* **36**: 407-477.

**Schwarzer, A., Pühler, A.** (1991) Manipulation of *Corynebacterium glutamicum* by gene disruption and replacement. *Bio/Technology* **9**: 84-87.

**Shiio, I., Otsuka, S. I., Takahashi, M.** (1962) Effect of biotin on the bacterial formation of glutamic acid. I. Glutamate formation and cellular permeability of amino acids. *J. Biochem.* **51**: 56-62.

**Shimakata, T., Minatogawa, Y.** (2000) Essential Role of Trehalose in the Synthesis and Subsequent Metabolism of Corynomycolic Acid in *Corynebacterium matruchotii* *Arch Biochem Biophys.* **380(2)**: 331-338.

**Sizemore, C., Wissmann, A., Gulland, U., Hillen, W.** (1990) Quantitative analysis of Tn10 Tet repressor binding to a complete set of *tet* operator mutants. *Nucleic Acids Res* **18**: 2875-80.

**Stackebrandt, E., Rainey, F. A., Ward-Rainey, N. L.** (1997) Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47 (2)**: 479-491.

**Stavropoulos, T. A. und Strathdee, C. A.** (2000) Expression of the *tetA(C)* tetracycline efflux pump in *Escherichia coli* confers osmotic sensitivity. *FEMS Microbiol. Lett.* **190**: 147-150.

- Stuible, H.-P., Wagner, C., Andreou, I., Huter, G., Haselmann, J., Schweizer, E.** (1996) Identification and functional differentiation of two type I fatty acid synthases in *Brevibacterium ammoniagenes*. *J. Bacteriol.* **178(16)**: 4787-4793.
- Stuible, H.-P., Meurer, G., Schweizer, E.** (1997) Heterologous expression and biochemical characterization of two functionally different type I fatty acid synthases from *Brevibacterium ammoniagenes*. *Eur J Biochem.* **247(1)**: 268-273.
- Takayama, K., Armstrong, E. L., Kunugi, K. A., Kilburn, J. O.** (1979) Inhibition by ethambutol of mycolic acid transfer into the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **16**: 240-242.
- Takayama, K., Kilburn, J. O.** (1989) Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**: 1493-1499.
- Takinami, K., Yoshii, H., Tsurii, H., Okada, H.** (1965) Biochemical effects of fatty acid and its derivatives on L-glutamic acid formation. Part III. Biotin-Tween 60 relationship in the accumulation of L-glutamic acid and the growth of *Brevibacterium lactofermentum*. *Agric. Biol. Chem.* **29**: 351-359.
- Takinami, K., Yoshii, H., Yamada, Y., Okada, H., Kinoshita, K.** (1968) Control of L-glutamic acid fermentation by biotin and fatty acid. *Amino Acid and Nucleic Acid* **18**: 120-160.
- Tauch, A., Kirchner, O., Löffler, B., Götter, S., Pühler, A., Kalinowski, J.** (2002) Efficient electrotransformation of *Corynebacterium diphtheriae* with a mini-replicon derived from the *Corynebacterium glutamicum* plasmid pGA1. *Curr. Microbiol.* **45**: 362-367.
- Telenti, A., Philipp, W. J., Sreevatsan, S., Bernasconi, C., Stockbauer, K. E., Wieles, B., Musser, J. M., Jacobs, W. R., Jr.** (1997) The *emb* operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nat. Med.* **3 (5)**: 567-570.
- Tindall, K. R., Kunkel, T. A.** (1988) Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* **27**: 6008-6013.
- Trivedi, O. A., Arora, P., Sridharan, V., Tickoo, R., Mohanty, D., Gokhale, R. S.** (2004) Enzymic activation and transfer of fatty acids as acyl-adenylates in mycobacteria. *Nature* **428**: 441-445.

**Tzvetkov, M., Klopprogge, C., Zelder, O., Liebl, W.** (2003) Genetic dissection of trehalose biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*: inactivation of trehalose production leads to impaired growth and an altered cell wall lipid composition. *Microbiology* **149**:1659-1673.

**Udaka, S.** (1960) Screening method for microorganisms accumulating metabolites and its use in the isolation of *Micrococcus glutamicus*. *J. Bacteriol.* **79**: 745-755.

**Vagelos, P. R., Alberts, A. W., Majerus, P. W.** (1969) Mechanism of saturated fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **14**: 39-42.

**Wissmann, A., Wray, L. V., Jr., Somaggio, U., Baumeister, R., Geissendorfer, M., Hillen, W.** (1991) Selection for Tn10 tet repressor binding to tet operator in *Escherichia coli*: isolation of temperature-sensitive mutants and combinatorial mutagenesis in the DNA binding motif. *Genetics* **128**: 225-232.

**Wolf, A., Krämer, R., Morbach, S.** (2003) Three pathways for trehalose metabolism in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 and their significance in response to osmotic stress. *Mol. Microbiol.* **49**:1119-1134.

**Wolucka, B. A., McNeil, M. R., de Hoffmann, E., Chojnacki, T., Brennan, P. J.** (1994) Recognition of the lipid intermediate for arabinogalactan/arabinomannan biosynthesis and its relation to the mode of action of ethambutol on mycobacteria. *J. Biol. Chem.* **269**: 23328-23335.

**World Health Organisation** (2004) Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. WHO Report 2004. ISBN 92 4 156264 1.

**Zhang, Y., Young, D. B.** (1993) Molecular mechanisms of isoniazid: a drug at the front line of tuberculosis control. *Trends in Microbiology* **1(3)**: 109-113.

**Zhang, N., Torrelles, J. B., McNeil, M. R., Escuyer, V. E., Khoo, K. H., Brennan, P. J., Chatterjee, D.** (2003) The Emb proteins of mycobacteria direct arabinosylation of lipoarabinomannan and arabinogalactan via an N-terminal recognition region and a C-terminal synthetic region. *Mol. Microbiol.* **50(1)**: 69-76.



## VII. ANHANG

### 1. Oligonukleotidsequenzen

**Tabelle 15:** Oligonukleotidsequenzen, die zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten verwendet wurden

Oligonukleotid		Verwendung	
RSP	5'-CACAGGAAACAGCTATGACC ATG-3'	reverser Universal-M13-Primer	
USP	5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCA CGAC-3'	forward Universal-M13-Primer	
<i>pemb</i> -for1	5'-GGGGGCGTCGAAAAGCAAAG TC-3'	Primer, die zur Konstruktion des <i>emb</i> -Inaktivierungsvektors verwendet wurden.	
<i>pemb</i> -rev1	5'-AGCAAACGGCGGGTGAAGGA-3'		
<i>emb</i> Ende	5'-TTCCAGTACTGAAGGTCTTATT CAT-3'	Primer zur Klonierung von <i>emb</i> mit nativem Promotor	
<i>emb</i> Start+50 bp	5'-CTATGCGCCAAGTCGGTGGTA AT-3'		
<b><u>EcoRI</u></b>			
<i>emb</i> Ende <i>EcoRI</i>	5'- <b>CCGGAATTCGG</b> TTCCAGTAC TGAAGGTCTTATTCAT-3'	Primer zur Klonierung von <i>emb</i> in den Vektor pEKEx2	
<b><u>T7 RBS</u></b>			
<i>emb</i> GTG+T7RBS	5'- <b>AAGGAGATATAGAT</b> GTGTCAG ATGTAGTTGAGTCGAAGAAA-3'		
<b><u>XmaI</u></b>			
<i>PtetA</i> upstream <i>XmaI</i>	5'- <b>TCCCCCGGGGGGA</b> ACTGTCTG TGCTGACAGACGAAC-3'	Primer, die zur Amplifizierung der in pk19mobsacB <i>PtetA-emb</i> klonierten <i>emb</i> -Fragmente dienen.	
<b><u>NsiI</u></b>			
<i>PtetA</i> upstream <i>NsiI</i>	5'- <b>AACTGCAGAACCAATGCATTGG</b> GTTTGGTGAGGAATTACTION GT-3'		
<b><u>XhoI</u></b>			
<i>PtetA</i> downstream <i>XhoI</i>	5'- <b>CCGCTCGAGCGG</b> ATCAACTAG ACTCGATCAACGTGT-3'		
<b><u>XbaI</u></b>			
<i>PtetA</i> downstream <i>XbaI</i>	5'- <b>GCTCTAGAGCG</b> CGAACAATCA CGTCAAGGTTAC-3'		

Oligonukleotid		Verwendung
<b><u>linker</u></b>		
<i>emb</i> start in	5'- <b>CCCATCCACTAAACTTAAACA</b> CTCAACTACATCTGACACGTTGA TC-3'	Primer, die zur Konstruktion des <i>emb</i> -Deletionsvektors verwendet wurden.
<i>emb</i> start out	5'-GCTTGGTGAGTTCGGAAACAG GA-3'	
<b><u>linker</u></b>		
<i>emb</i> end in	5'- <b>TGTTTAAGTTTAGTGGATGGGC</b> TCTGGAATCCAGGGCATATGAAG-3'	Primer zum Nachweis der <i>emb</i> -Deletion
<i>emb</i> end out	5'-TTCCATGAGCAGCTGGCGATAA C-3'	
<i>emb_start</i> _Deletions- kontrolle	5'-CCCTTATCGCGGATACCAAGC-3'	
<i>emb_end</i> _Deletions- kontrolle	5'-CAAATCGGAATGCTGCAAATG C-3'	
<b><u>EcoRI, linker</u></b>		
<i>embA_for</i> EcoRI	5'- <b>ACTGGAATCAAGGAGATATAG</b> <b>ATATGCCCCACGACGTAATGAG</b> -3'	Konstruktion des Plasmids pEKEx2 <i>Mt_embA</i>
<i>embA_rev</i>	5'-ATCGGAATTCTTATGGCAGCGCC CTGATCGGTCTCTGG-3'	
<b><u>SacI, linker</u></b>		
<i>embB_for</i> SacI	5'- <b>CAGTGATCGAGCTCAAGGAGAT</b> <b>ATAGATATGACACAGTGC GCGAGC</b> AGACGC-3'	Konstruktion des Plasmids pEKEx2 <i>Mt_embB</i>
<i>embB_rev</i>	5'-CTAGCTAGGAGCTCTTATGGACC AATTCGGATCTTGCCCGG-3'	
<b><u>SacI, linker</u></b>		
<i>embC_for</i> SacI	5'- <b>GATCGATCGAGCTCAAGGAGAT</b> <b>ATAGATATGGCTACCGAAGCCGCC</b> CCACCC-3'	Konstruktion des Plasmids pEKEx2 <i>Mt_embC</i>
<i>embC_rev</i>	5'-GATCGATCGAGCTCTTAGCCGC GGCGCAACGGCGCCGG-3'	
<i>Cg_emb_for</i> (LC)	5'-GTCAACCGTCATGGAATCCATC A-3'	Nachweis der <i>emb</i> -Expression durch <i>Real-time</i> RT PCR
<i>Cg_emb_rev</i> (LC)	5'-AGGATCGCGATGACCACAATA G-3'	
<i>Mt_embA_for</i> (LC)	5'-CACGGTGGCCGAATCGGCAC-3'	Nachweis der <i>embA</i> -Expression durch <i>Real-time</i> RT PCR
<i>Mt_embA_rev</i> (LC)	5'-AGCACGAACAGCACCCCGAAC-3'	

Oligonukleotid		Verwendung
<i>Mt_embB_for</i> (LC)	5'-AACGGTGTGGGAAGCCACCAG-3'	Nachweis der <i>embB</i> -Expression durch <i>Real-time</i> RT PCR
<i>Mt_embB_rev</i> (LC)	5'-ACATGATGAACACCGCGGTGA A-3'	
<i>Mt_embC_for</i> (LC)	5'-GCGAGATCCAGGCCAACCTC-3'	Nachweis der <i>embC</i> -Expression durch <i>Real-time</i> RT PCR
<i>Mt_embC_rev</i> (LC)	5'-GTAACGACATTGCCACCGATA C-3'	
<i>pfasA5'</i>	5'-GTGCTTACGTGAACATTCCAG G-3'	Primer zur Konstruktion des <i>fasA</i> -Inaktivierungsplasmids
<i>pfasA3'</i>	5'-ACCGCCGGAGGACATGGAGA-3'	
	<b><u>EcoRI</u></b>	
<i>pfasB5'</i> out	5'- <b>CGGAATTCCG</b> CGCGTTCAGCCC CCGTATTA-3'	
	<b><u>linker</u></b>	
<i>pfasB5'</i> in	5'- <b>CCCATCCACTAACTTAAACGC</b> GAGCTCAGCCCAGTGTCC-3'	Primer zur Konstruktion des <i>fasB</i> -Deletionsplasmids
	<b><u>EcoRI</u></b>	
<i>pfasB3'</i> out	5'- <b>CGGAATTCCG</b> GTAGCCACCGAC GTAGGACTG-3'	
	<b><u>linker</u></b>	
<i>pfasB3'</i> in	5'- <b>TGTTTAAGTTTAGTGGATGGGG</b> TACGGCATGATCGACAACCTTT-3'	
<i>fasA_for_230bp</i>	5'-GCATCCCCTCGAGGAGCTG-3'	Primer zur Quantifizierung der <i>fasA</i> -Expression mittels <i>Real-time</i> PCR
<i>fasA_rev_230 bp</i>	5'-ACAACCTTCGTCGCGTGCGC-3'	
<i>fasA_for_6820</i>	5'-ACCGGCTGGCCACAGTTTGTC-3'	
<i>fasA_rev_250bp_7090</i>	5'-TGCGATGGATACGCCACCG-3'	
<i>fasB_for_250bp</i>	5'-AAGGGCAACGCTGTCCGACG-3'	Primer zur Quantifizierung der <i>fasA</i> -Expression mittels <i>Real-time</i> PCR
<i>fasB_rev_250bp</i>	5'-GCACCGGCGATCAGTTCACC-3'	
<i>fasB_for 6820</i>	5'-CAAGCTGCATGGGGAGCAC-3'	
<i>fasB_rev 7090</i>	5'-CATTCCGCCAGGTTTCAGATC-3'	



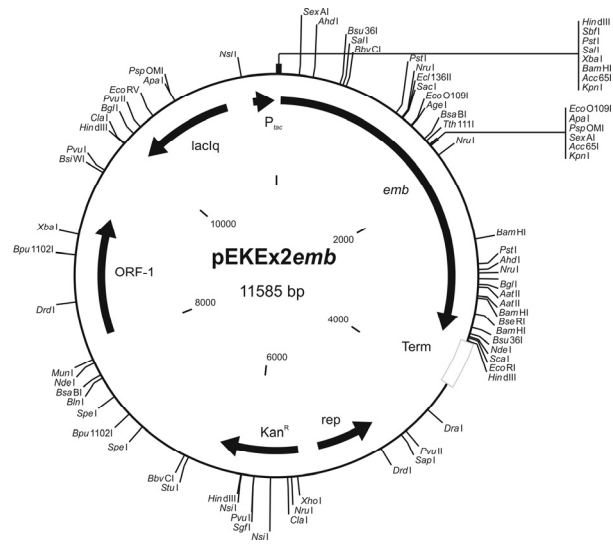


Abbildung 35: pEKEx2 mit 3,4 kb-Fragment mit *emb* aus *C. glutamicum*

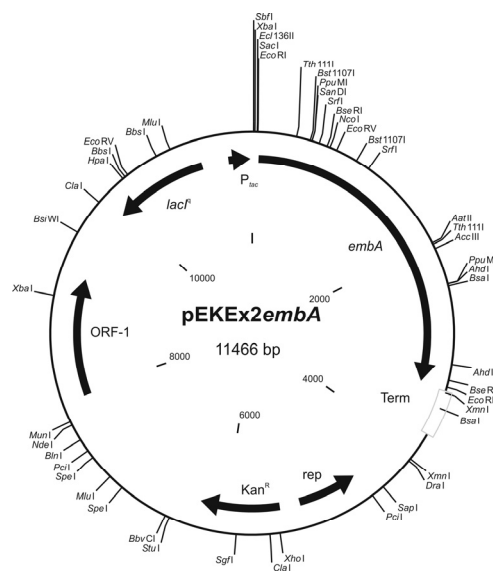


Abbildung 36: pEKEx2 mit 3,3 kb-Fragment mit *embA* aus *M. tuberculosis*





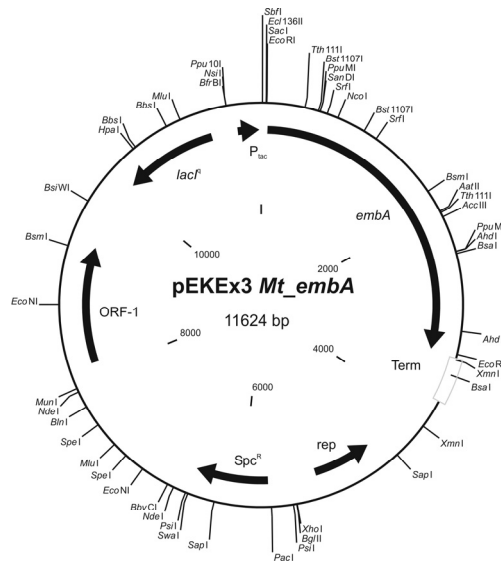


Abbildung 41: pEKEx3 mit 3,3 kb-Fragment mit *embA* aus *M. tuberculosis*

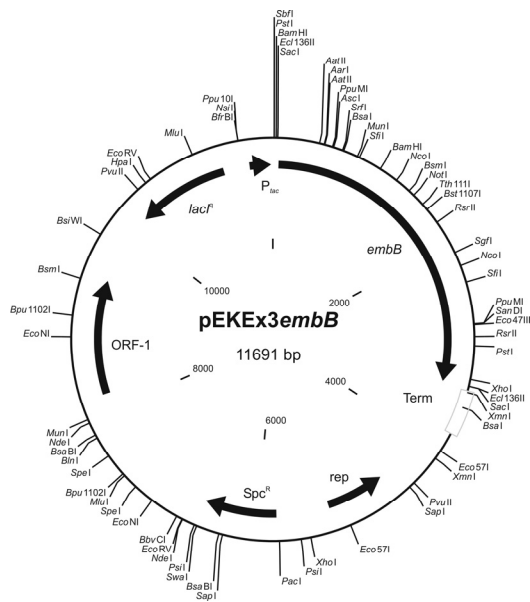


Abbildung 42: pEKEx3 mit 3,3 kb-Fragment mit *embB* aus *M. tuberculosis*



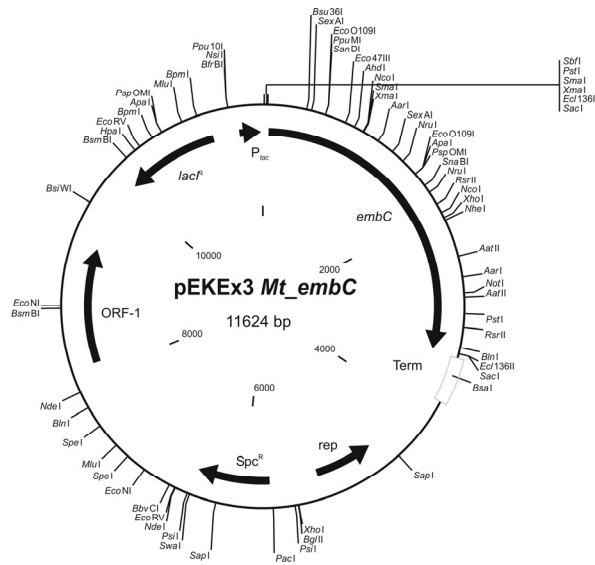


Abbildung 43: pEKEx3 mit 3,3 kb Fragment mit *embC* aus *M. tuberculosis*

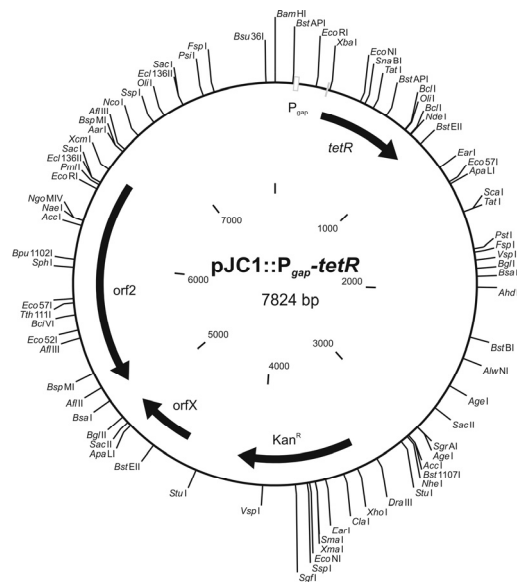
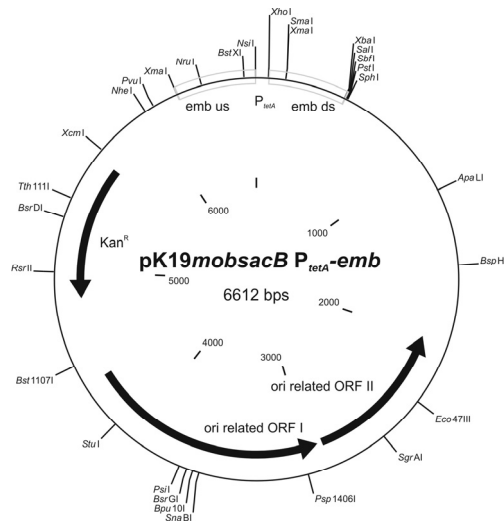
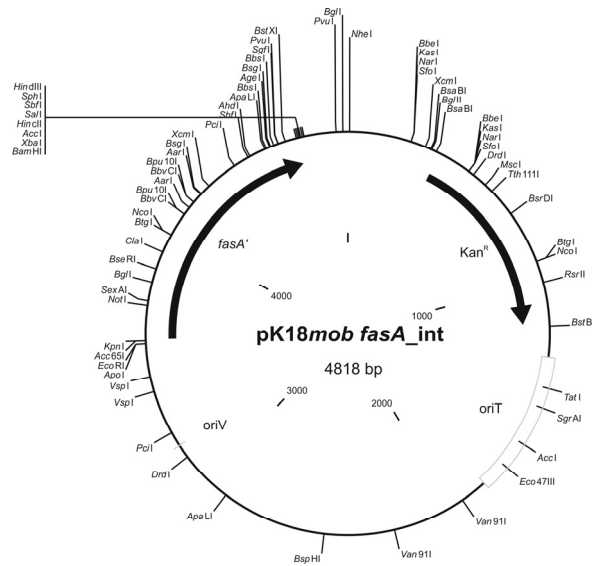


Abbildung 44: pJC1::tetR-Derivat mit Promotor des *gap*-Gens integriert vor dem *tetR*-Gen



**Abbildung 45:** pK19mob sacB-Derivat mit Tn10 P<sub>tetA</sub> inseriert zwischen den flankierenden Bereichen (je ca. 0,5 kb) des emb-Promotors aus *C. glutamicum*



**Abbildung 46:** pK18mob mit einem 1178 bp internen fasA-Fragment

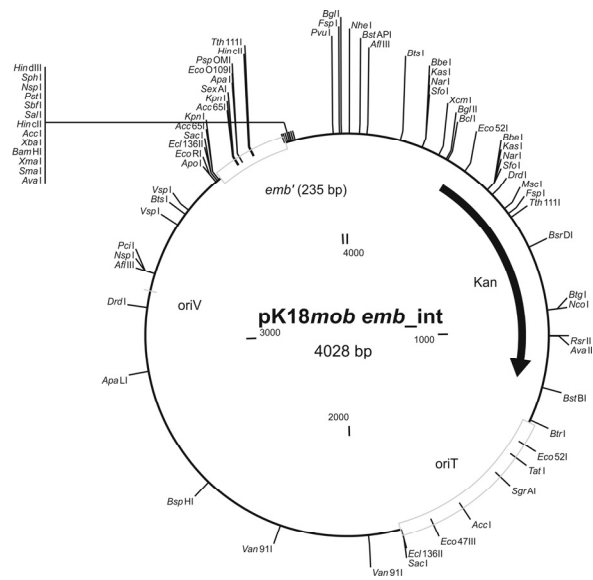


Abbildung 47: pK18mob mit einem 230 bp emb-Fragment

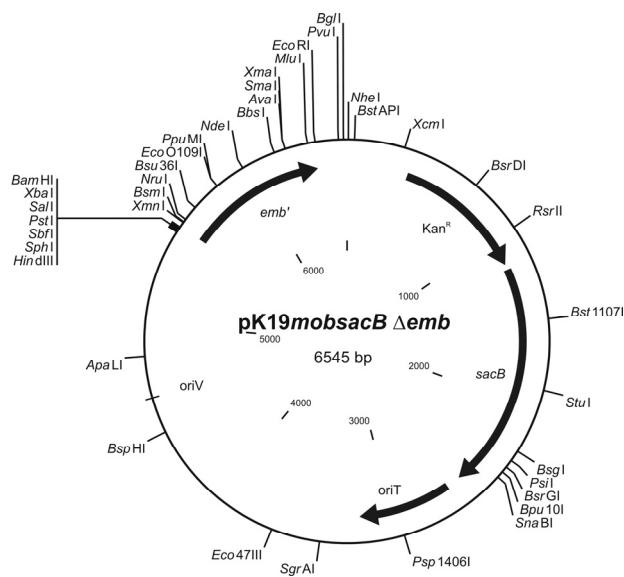


Abbildung 48: pK18mobsacB mit emb-Sequenz, deletiert ist ein internes 3363 bp großes Fragment

### 3. Daten der LightCycler-Analysen

Probe		Konzentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	CP
fbp ( $10^{-1}$ )	Standard 1	1.00E-01	11.12
fbp ( $10^{-2}$ )	Standard 1	1.00E-02	14.69
fbp ( $10^{-3}$ )	Standard 1	1.00E-03	19.73
fbp ( $10^{-4}$ )	Standard 1	1.00E-04	24.02
fbp ( $10^{-5}$ )	Standard 1	1.00E-05	27.58
fbp ( $10^{-6}$ )	Standard 1	1.00E-06	33.26
fbp ( $10^{-7}$ )	Standard 1	1.00E-07	35.64
fasA ( $10^{-1}$ )	Standard 2	1.00E-01	13.56
fasA ( $10^{-2}$ )	Standard 2	1.00E-02	17.71
fasA ( $10^{-3}$ )	Standard 2	1.00E-03	21.75
fasA ( $10^{-4}$ )	Standard 2	1.00E-04	25.73
fasA ( $10^{-5}$ )	Standard 2	1.00E-05	29.48
fasA ( $10^{-6}$ )	Standard 2	1.00E-06	31.16
fasA ( $10^{-7}$ )	Standard 2	1.00E-07	33.52
Glucose-fbp ( $10^{-1}$ )	Referenzgen	9.57E-05	23.80
Glucose-fbp ( $10^{-2}$ )	Referenzgen	1.50E-05	27.21
Glucose-fbp ( $10^{-3}$ )	Referenzgen	1.79E-06	31.12
Acetat-fbp ( $10^{-1}$ )	Referenzgen	1.58E-04	22.88
Acetat-fbp ( $10^{-2}$ )	Referenzgen	2.80E-05	26.06
Acetat-fbp ( $10^{-3}$ )	Referenzgen	2.57E-06	30.45
Propionat-fbp ( $10^{-1}$ )	Referenzgen	8.54E-05	24.01
Propionat-fbp ( $10^{-2}$ )	Referenzgen	1.28E-05	27.50
Propionat-fbp ( $10^{-3}$ )	Referenzgen	1.11E-06	31.99
Glucose-fasA230nt ( $10^{-1}$ )	Zielgen	7.36E-05	25.15
Glucose-fasA230nt ( $10^{-2}$ )	Zielgen	8.59E-06	28.30
Glucose-fasA230nt ( $10^{-3}$ )	Zielgen	1.38E-06	30.98
Acetat-fasA230nt ( $10^{-1}$ )	Zielgen	1.00E-05	28.07
Acetat-fasA230nt ( $10^{-2}$ )	Zielgen	1.69E-06	30.68
Acetat-fasA230nt ( $10^{-3}$ )	Zielgen	1.25E-06	31.13
Propionat-fasA230nt ( $10^{-1}$ )	Zielgen	1.29E-04	24.33
Propionat-fasA230nt ( $10^{-2}$ )	Zielgen	1.20E-05	27.81
Propionat-fasA230nt ( $10^{-3}$ )	Zielgen	1.47E-06	30.89

Probe		Konzentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	CP
gyrA ( $10^{-1}$ )	Standard 1	1.00E-01	11.31
gyrA ( $10^{-2}$ )	Standard 1	1.00E-02	14.89
gyrA ( $10^{-3}$ )	Standard 1	1.00E-03	18.49
gyrA ( $10^{-4}$ )	Standard 1	1.00E-04	21.86
gyrA ( $10^{-5}$ )	Standard 1	1.00E-05	25.29
gyrA ( $10^{-6}$ )	Standard 1	1.00E-06	28.82
gyrA ( $10^{-7}$ )	Standard 1	1.00E-07	32.19
fasA ( $10^{-1}$ )	Standard 2	1.00E-01	12.61
fasA ( $10^{-2}$ )	Standard 2	1.00E-02	16.62
fasA ( $10^{-3}$ )	Standard 2	1.00E-03	20.29
fasA ( $10^{-4}$ )	Standard 2	1.00E-04	24.51
fasA ( $10^{-5}$ )	Standard 2	1.00E-05	28.5
fasA ( $10^{-6}$ )	Standard 2	1.00E-06	31.09
fasA ( $10^{-7}$ )	Standard 2	1.00E-07	31.3
Glucose-gyrA ( $10^{-1}$ )	Referenzgen	6.01E-06	26.08
Glucose-gyrA ( $10^{-2}$ )	Referenzgen	1.00E-06	28.78
Glucose-gyrA ( $10^{-3}$ )	Referenzgen	8.88E-08	32.44
Acetat-gyrA ( $10^{-1}$ )	Referenzgen	1.34E-05	24.87
Acetat-gyrA ( $10^{-2}$ )	Referenzgen	1.79E-06	27.91
Acetat-gyrA ( $10^{-3}$ )	Referenzgen	2.12E-07	31.13
Propionat-gyrA ( $10^{-1}$ )	Referenzgen	5.26E-06	26.28
Propionat-gyrA ( $10^{-2}$ )	Referenzgen	7.02E-07	29.32
Propionat-gyrA ( $10^{-3}$ )	Referenzgen	8.15E-08	32.57
Glucose-fasA230nt ( $10^{-1}$ )	Zielgen	5.34E-05	25.19
Glucose-fasA230nt ( $10^{-2}$ )	Zielgen	1.07E-05	27.83
Glucose-fasA230nt ( $10^{-3}$ )	Zielgen	1.65E-06	30.9
Acetat-fasA230nt ( $10^{-1}$ )	Zielgen	9.69E-06	27.99
Acetat-fasA230nt ( $10^{-2}$ )	Zielgen	1.89E-06	30.67
Acetat-fasA230nt ( $10^{-3}$ )	Zielgen	1.02E-06	31.69
Propionat-fasA230nt ( $10^{-1}$ )	Zielgen	7.46E-05	24.64
Propionat-fasA230nt ( $10^{-2}$ )	Zielgen	1.09E-05	27.8
Propionat-fasA230nt ( $10^{-3}$ )	Zielgen	2.07E-06	30.52

Probe		Konzentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	CP
ddh ( $10^{-1}$ )	Standard 1	1.00E-01	12.35
ddh ( $10^{-2}$ )	Standard 1	1.00E-02	15.52
ddh ( $10^{-3}$ )	Standard 1	1.00E-03	19.79
ddh ( $10^{-4}$ )	Standard 1	1.00E-04	22.89
ddh ( $10^{-5}$ )	Standard 1	1.00E-05	26.87
ddh ( $10^{-6}$ )	Standard 1	1.00E-06	30.65
ddh ( $10^{-7}$ )	Standard 1	1.00E-07	34.12
fasA ( $10^{-1}$ )	Standard 2	1.00E-01	14.2
fasA ( $10^{-2}$ )	Standard 2	1.00E-02	18.31
fasA ( $10^{-3}$ )	Standard 2	1.00E-03	22.15
fasA ( $10^{-4}$ )	Standard 2	1.00E-04	25.91
fasA ( $10^{-5}$ )	Standard 2	1.00E-05	29.54
fasA ( $10^{-6}$ )	Standard 2	1.00E-06	32.06
fasA ( $10^{-7}$ )	Standard 2	1.00E-07	32.21
Glucose-ddh ( $10^{-1}$ )	Referenzgen	1.80E-05	25.9
Glucose-ddh ( $10^{-2}$ )	Referenzgen	2.44E-06	29.08
Glucose-ddh ( $10^{-3}$ )	Referenzgen	2.14E-07	32.96
Acetat-ddh ( $10^{-1}$ )	Referenzgen	1.72E-05	25.97
Acetat-ddh ( $10^{-2}$ )	Referenzgen	2.43E-06	29.09
Acetat-ddh ( $10^{-3}$ )	Referenzgen	2.69E-07	32.59
Propionat-ddh ( $10^{-1}$ )	Referenzgen	1.26E-05	26.47
Propionat-ddh ( $10^{-2}$ )	Referenzgen	1.63E-06	29.72
Propionat-ddh ( $10^{-3}$ )	Referenzgen	2.23E-07	32.89
Glucose-fasA230nt ( $10^{-1}$ )	Zielgen	3.84E-05	27.01
Glucose-fasA230nt ( $10^{-2}$ )	Zielgen	6.28E-06	29.86
Glucose-fasA230nt ( $10^{-3}$ )	Zielgen	1.53E-06	32.08
Acetat-fasA230nt ( $10^{-1}$ )	Zielgen	6.60E-06	29.78
Acetat-fasA230nt ( $10^{-2}$ )	Zielgen	2.16E-06	31.54
Acetat-fasA230nt ( $10^{-3}$ )	Zielgen	1.67E-06	31.94
Propionat-fasA230nt ( $10^{-1}$ )	Zielgen	7.07E-05	26.05
Propionat-fasA230nt ( $10^{-2}$ )	Zielgen	1.18E-05	28.87
Propionat-fasA230nt ( $10^{-3}$ )	Zielgen	1.68E-06	31.93

Probe		Konzentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	CP
ddh ( $10^{-1}$ )	Standard 1	1.00E-01	9.44
ddh ( $10^{-2}$ )	Standard 1	1.00E-02	13.45
ddh ( $10^{-3}$ )	Standard 1	1.00E-03	17.45
ddh ( $10^{-4}$ )	Standard 1	1.00E-04	21.14
ddh ( $10^{-5}$ )	Standard 1	1.00E-05	24.29
ddh ( $10^{-6}$ )	Standard 1	1.00E-06	27.96
ddh ( $10^{-7}$ )	Standard 1	1.00E-07	31.70
fasA ( $10^{-1}$ )	Standard 2	1.00E-01	10.30
fasA ( $10^{-2}$ )	Standard 2	1.00E-02	14.23
fasA ( $10^{-3}$ )	Standard 2	1.00E-03	18.06
fasA ( $10^{-4}$ )	Standard 2	1.00E-04	22.65
fasA ( $10^{-5}$ )	Standard 2	1.00E-05	26.89
fasA ( $10^{-6}$ )	Standard 2	1.00E-06	30.66
fasA ( $10^{-7}$ )	Standard 2	1.00E-07	33.06
Glucose-ddh ( $10^{-1}$ )	Referenzgen	5.03E-05	21.87
Glucose-ddh ( $10^{-2}$ )	Referenzgen	5.27E-06	25.46
Acetat-ddh ( $10^{-1}$ )	Referenzgen	4.81E-05	21.94
Acetat-ddh ( $10^{-2}$ )	Referenzgen	5.05E-06	25.53
Propionat-ddh ( $10^{-1}$ )	Referenzgen	3.08E-05	22.65
Propionat-ddh ( $10^{-2}$ )	Referenzgen	3.76E-06	26.00
Glucose-fasA250nt ( $10^{-1}$ )	Zielgen	4.99E-05	23.45
Glucose-fasA250nt ( $10^{-2}$ )	Zielgen	5.44E-06	27.23
Acetat-fasA250nt ( $10^{-1}$ )	Zielgen	1.13E-05	25.99
Acetat-fasA250nt ( $10^{-2}$ )	Zielgen	1.20E-06	29.81
Propionat-fasA250nt ( $10^{-1}$ )	Zielgen	8.12E-05	22.62
Propionat-fasA250nt ( $10^{-2}$ )	Zielgen	9.28E-06	26.32

Probe		Konzentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	CP
fbp ( $10^{-1}$ )	Standard 1	1.00E-01	5.41
fbp ( $10^{-2}$ )	Standard 1	1.00E-02	9.36
fbp ( $10^{-3}$ )	Standard 1	1.00E-03	12.62
fbp ( $10^{-4}$ )	Standard 1	1.00E-04	16.68
fbp ( $10^{-5}$ )	Standard 1	1.00E-05	20.24
fbp ( $10^{-6}$ )	Standard 1	1.00E-06	23.81
fbp ( $10^{-7}$ )	Standard 1	1.00E-07	27.95
fasA ( $10^{-1}$ )	Standard 2	1.00E-01	10.28
fasA ( $10^{-2}$ )	Standard 2	1.00E-02	14.61
fasA ( $10^{-3}$ )	Standard 2	1.00E-03	18.03
fasA ( $10^{-4}$ )	Standard 2	1.00E-04	22.75
fasA ( $10^{-5}$ )	Standard 2	1.00E-05	26.98
fasA ( $10^{-6}$ )	Standard 2	1.00E-06	30.54
fasA ( $10^{-7}$ )	Standard 2	1.00E-07	32.86
Glucose-fbp ( $10^{-1}$ )	Referenzgen	2.30E-05	18.89
Glucose-fbp ( $10^{-2}$ )	Referenzgen	2.36E-06	22.63
Acetat-fbp ( $10^{-1}$ )	Referenzgen	3.87E-05	18.04
Acetat-fbp ( $10^{-2}$ )	Referenzgen	3.80E-06	21.85
Propionat-fbp ( $10^{-1}$ )	Referenzgen	1.42E-05	19.69
Propionat-fbp ( $10^{-2}$ )	Referenzgen	1.11E-06	23.87
Glucose-fasA250nt ( $10^{-1}$ )	Zielgen	5.06E-05	23.52
Glucose-fasA250nt ( $10^{-2}$ )	Zielgen	5.25E-06	27.26
Acetat-fasA250nt ( $10^{-1}$ )	Zielgen	1.14E-05	25.98
Acetat-fasA250nt ( $10^{-2}$ )	Zielgen	1.17E-06	29.73
Propionat-fasA250nt ( $10^{-1}$ )	Zielgen	8.06E-05	22.75
Propionat-fasA250nt ( $10^{-2}$ )	Zielgen	5.00E-06	27.34



Probe		Konzentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	CP
gyrA ( $10^{-1}$ )	Standard 1	1.00E-01	8.77
gyrA ( $10^{-2}$ )	Standard 1	1.00E-02	11.81
gyrA ( $10^{-3}$ )	Standard 1	1.00E-03	15.71
gyrA ( $10^{-4}$ )	Standard 1	1.00E-04	18.95
gyrA ( $10^{-5}$ )	Standard 1	1.00E-05	22.46
gyrA ( $10^{-6}$ )	Standard 1	1.00E-06	25.83
gyrA ( $10^{-7}$ )	Standard 1	1.00E-07	29.81
fasA ( $10^{-1}$ )	Standard 2	1.00E-01	10.27
fasA ( $10^{-2}$ )	Standard 2	1.00E-02	14.58
fasA ( $10^{-3}$ )	Standard 2	1.00E-03	18.06
fasA ( $10^{-4}$ )	Standard 2	1.00E-04	22.76
fasA ( $10^{-5}$ )	Standard 2	1.00E-05	27.10
fasA ( $10^{-6}$ )	Standard 2	1.00E-06	30.62
fasA ( $10^{-7}$ )	Standard 2	1.00E-07	32.65
Glucose-gyrA ( $10^{-1}$ )	Referenzgen	1.33E-05	22.09
Glucose-gyrA ( $10^{-2}$ )	Referenzgen	1.28E-06	25.69
Acetat-gyrA ( $10^{-1}$ )	Referenzgen	2.36E-05	21.21
Acetat-gyrA ( $10^{-2}$ )	Referenzgen	2.38E-06	24.74
Propionat-gyrA ( $10^{-1}$ )	Referenzgen	9.50E-06	22.61
Propionat-gyrA ( $10^{-2}$ )	Referenzgen	7.18E-07	26.58
Glucose-fasA250nt ( $10^{-1}$ )	Zielgen	5.92E-05	23.56
Glucose-fasA250nt ( $10^{-2}$ )	Zielgen	6.48E-06	27.51
Acetat-fasA250nt ( $10^{-1}$ )	Zielgen	1.43E-05	26.10
Acetat-fasA250nt ( $10^{-2}$ )	Zielgen	1.59E-06	30.02
Propionat-fasA250nt ( $10^{-1}$ )	Zielgen	9.80E-05	22.66
Propionat-fasA250nt ( $10^{-2}$ )	Zielgen	7.25E-06	27.31

Probe		Konzentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	CP
ddh ( $10^{-1}$ )	Standard 1	1.00E-01	13.9
ddh ( $10^{-2}$ )	Standard 1	1.00E-02	17.83
ddh ( $10^{-3}$ )	Standard 1	1.00E-03	21.44
ddh ( $10^{-4}$ )	Standard 1	1.00E-04	25.09
ddh ( $10^{-5}$ )	Standard 1	1.00E-05	28.72
ddh ( $10^{-6}$ )	Standard 1	1.00E-06	32.41
ddh ( $10^{-7}$ )	Standard 1	1.00E-07	36.42
fasB ( $10^{-1}$ )	Standard 2	1.00E-01	14.06
fasB ( $10^{-2}$ )	Standard 2	1.00E-02	18.28
fasB ( $10^{-3}$ )	Standard 2	1.00E-03	21.94
fasB ( $10^{-4}$ )	Standard 2	1.00E-04	25.78
fasB ( $10^{-5}$ )	Standard 2	1.00E-05	29.5
fasB ( $10^{-6}$ )	Standard 2	1.00E-06	32.78
fasB ( $10^{-7}$ )	Standard 2	1.00E-07	36.3
Glucose-ddh ( $10^{-1}$ )	Referenzgen	2.34E-05	27.46
Glucose-ddh ( $10^{-2}$ )	Referenzgen	4.36E-06	30.17
Glucose-ddh ( $10^{-3}$ )	Referenzgen	5.07E-07	33.64
Acetat-ddh ( $10^{-1}$ )	Referenzgen	2.94E-05	27.09
Acetat-ddh ( $10^{-2}$ )	Referenzgen	4.22E-06	30.22
Acetat-ddh ( $10^{-3}$ )	Referenzgen	5.60E-07	33.48
Propionat-ddh ( $10^{-1}$ )	Referenzgen	2.00E-05	27.71
Propionat-ddh ( $10^{-2}$ )	Referenzgen	2.79E-06	30.89
Propionat-ddh ( $10^{-3}$ )	Referenzgen	2.50E-07	34.78
Glucose-fasB250nt ( $10^{-1}$ )	Zielgen	1.88E-05	28.2
Glucose-fasB250nt ( $10^{-2}$ )	Zielgen	3.92E-06	30.71
Glucose-fasB250nt ( $10^{-3}$ )	Zielgen	4.46E-07	34.19
Acetat-fasB250nt ( $10^{-1}$ )	Zielgen	7.83E-06	29.6
Acetat-fasB250nt ( $10^{-2}$ )	Zielgen	1.21E-06	32.59
Acetat-fasB250nt ( $10^{-3}$ )	Zielgen	1.59E-07	35.84
Propionat-fasB250nt ( $10^{-1}$ )	Zielgen	1.34E-05	28.74
Propionat-fasB250nt ( $10^{-2}$ )	Zielgen	1.86E-06	31.9
Propionat-fasB250nt ( $10^{-3}$ )	Zielgen	2.45E-07	35.15

Probe		Konzentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	CP
fbp ( $10^{-1}$ )	Standard 1	1.00E-01	12.48
fbp ( $10^{-2}$ )	Standard 1	1.00E-02	14.35
fbp ( $10^{-3}$ )	Standard 1	1.00E-03	17.97
fbp ( $10^{-4}$ )	Standard 1	1.00E-04	22.12
fbp ( $10^{-5}$ )	Standard 1	1.00E-05	27.14
fbp ( $10^{-6}$ )	Standard 1	1.00E-06	33.91
fbp ( $10^{-7}$ )	Standard 1	1.00E-07	35.31
fbp ( $10^{-1}$ )	Standard 2	1.00E-01	16.65
fbp ( $10^{-2}$ )	Standard 2	1.00E-02	20.41
fbp ( $10^{-3}$ )	Standard 2	1.00E-03	23.91
fbp ( $10^{-4}$ )	Standard 2	1.00E-04	26.92
fbp ( $10^{-5}$ )	Standard 2	1.00E-05	29.61
fbp ( $10^{-6}$ )	Standard 2	1.00E-06	33.94
fbp ( $10^{-7}$ )	Standard 2	1.00E-07	37.41
Glucose-fbp ( $10^{-1}$ )	Referenzgen	2.32E-05	25.97
Glucose-fbp ( $10^{-2}$ )	Referenzgen	5.06E-06	28.73
Glucose-fbp ( $10^{-3}$ )	Referenzgen	1.95E-06	30.46
Acetat-fbp ( $10^{-1}$ )	Referenzgen	2.80E-04	21.46
Acetat-fbp ( $10^{-2}$ )	Referenzgen	3.71E-05	25.12
Acetat-fbp ( $10^{-3}$ )	Referenzgen	5.91E-06	28.45
Propionat-fbp ( $10^{-1}$ )	Referenzgen	1.07E-04	23.2
Propionat-fbp ( $10^{-2}$ )	Referenzgen	1.90E-05	26.33
Propionat-fbp ( $10^{-3}$ )	Referenzgen	1.34E-06	31.14
Glucose-fasA250nt ( $10^{-1}$ )	Zielgen	7.07E-05	27.49
Glucose-fasA250nt ( $10^{-2}$ )	Zielgen	8.46E-06	30.62
Glucose-fasA250nt ( $10^{-3}$ )	Zielgen	7.92E-07	34.11
Acetat-fasA250nt ( $10^{-1}$ )	Zielgen	2.81E-05	28.85
Acetat-fasA250nt ( $10^{-2}$ )	Zielgen	3.21E-06	32.05
Acetat-fasA250nt ( $10^{-3}$ )	Zielgen	1.34E-07	36.73
Propionat-fasA250nt ( $10^{-1}$ )	Zielgen	5.00E-05	28
Propionat-fasA250nt ( $10^{-2}$ )	Zielgen	4.53E-06	31.54
Propionat-fasA250nt ( $10^{-3}$ )	Zielgen	2.45E-07	35.84

Probe		Konzentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	CP
gyrA ( $10^{-1}$ )	Standard 1	1.00E-01	10.97
gyrA ( $10^{-2}$ )	Standard 1	1.00E-02	14.23
gyrA ( $10^{-3}$ )	Standard 1	1.00E-03	17.94
gyrA ( $10^{-4}$ )	Standard 1	1.00E-04	21.16
gyrA ( $10^{-5}$ )	Standard 1	1.00E-05	24.75
gyrA ( $10^{-6}$ )	Standard 1	1.00E-06	28.00
gyrA ( $10^{-7}$ )	Standard 1	1.00E-07	31.77
fasB ( $10^{-1}$ )	Standard 2	1.00E-01	13.99
fasB ( $10^{-2}$ )	Standard 2	1.00E-02	17.43
fasB ( $10^{-3}$ )	Standard 2	1.00E-03	21.06
fasB ( $10^{-4}$ )	Standard 2	1.00E-04	24.88
fasB ( $10^{-5}$ )	Standard 2	1.00E-05	28.72
fasB ( $10^{-6}$ )	Standard 2	1.00E-06	32.08
fasB ( $10^{-7}$ )	Standard 2	1.00E-07	35.76
Glucose-gyrA ( $10^{-1}$ )	Referenzgen	1.02E-05	24.69
Glucose-gyrA ( $10^{-2}$ )	Referenzgen	1.05E-06	28.10
Acetat-gyrA ( $10^{-1}$ )	Referenzgen	1.93E-05	23.73
Acetat-gyrA ( $10^{-2}$ )	Referenzgen	2.03E-06	27.11
Propionat-gyrA ( $10^{-1}$ )	Referenzgen	7.64E-06	25.12
Propionat-gyrA ( $10^{-2}$ )	Referenzgen	1.04E-06	28.11
Glucose-fasB250nt ( $10^{-1}$ )	Zielgen	2.32E-05	27.16
Glucose-fasB250nt ( $10^{-2}$ )	Zielgen	3.51E-06	30.16
Acetat-fasB250nt ( $10^{-1}$ )	Zielgen	9.93E-06	28.51
Acetat-fasB250nt ( $10^{-2}$ )	Zielgen	1.51E-06	31.50
Propionat-fasB250nt ( $10^{-1}$ )	Zielgen	1.90E-05	27.48
Propionat-fasB250nt ( $10^{-2}$ )	Zielgen	3.93E-06	29.98

Probe		Konzentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	CP
ddh ( $10^{-1}$ )	Standard 1	1.00E-01	9.47
ddh ( $10^{-2}$ )	Standard 1	1.00E-02	13.47
ddh ( $10^{-3}$ )	Standard 1	1.00E-03	17.56
ddh ( $10^{-4}$ )	Standard 1	1.00E-04	21.27
ddh ( $10^{-5}$ )	Standard 1	1.00E-05	24.50
ddh ( $10^{-6}$ )	Standard 1	1.00E-06	28.15
ddh ( $10^{-7}$ )	Standard 1	1.00E-07	31.58
fasB ( $10^{-1}$ )	Standard 2	1.00E-01	10.04
fasB ( $10^{-2}$ )	Standard 2	1.00E-02	14.00
fasB ( $10^{-3}$ )	Standard 2	1.00E-03	17.44
fasB ( $10^{-4}$ )	Standard 2	1.00E-04	21.29
fasB ( $10^{-5}$ )	Standard 2	1.00E-05	26.03
fasB ( $10^{-6}$ )	Standard 2	1.00E-06	27.68
fasB ( $10^{-7}$ )	Standard 2	1.00E-07	28.87
Glucose-ddh ( $10^{-1}$ )	Referenzgen	4.85E-05	22.09
Glucose-ddh ( $10^{-2}$ )	Referenzgen	5.26E-06	25.55
Acetat-ddh ( $10^{-1}$ )	Referenzgen	4.94E-05	22.06
Acetat-ddh ( $10^{-2}$ )	Referenzgen	5.09E-06	25.60
Propionat-ddh ( $10^{-1}$ )	Referenzgen	3.25E-05	22.71
Propionat-ddh ( $10^{-2}$ )	Referenzgen	3.65E-06	26.12
Glucose-fasB-2 ( $10^{-1}$ )	Zielgen	1.93E-05	23.86
Glucose-fasB-2 ( $10^{-2}$ )	Zielgen	2.68E-06	27.00
Acetat-fasB-2 ( $10^{-1}$ )	Zielgen	1.14E-05	24.69
Acetat-fasB-2 ( $10^{-2}$ )	Zielgen	1.79E-06	27.64
Propionat-fasB-2 ( $10^{-1}$ )	Zielgen	1.31E-05	24.47
Propionat-fasB-2 ( $10^{-2}$ )	Zielgen	1.98E-06	27.48

<b>Probe</b>		<b>Konzentration (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>CP</b>
fbp ( $10^{-1}$ )	Standard 1	1.00E-01	5.54
fbp ( $10^{-2}$ )	Standard 1	1.00E-02	9.53
fbp ( $10^{-3}$ )	Standard 1	1.00E-03	12.84
fbp ( $10^{-4}$ )	Standard 1	1.00E-04	17.32
fbp ( $10^{-5}$ )	Standard 1	1.00E-05	20.86
fbp ( $10^{-6}$ )	Standard 1	1.00E-06	24.21
fbp ( $10^{-7}$ )	Standard 1	1.00E-07	28.15
fasB ( $10^{-1}$ )	Standard 2	1.00E-01	10.18
fasB ( $10^{-2}$ )	Standard 2	1.00E-02	14.05
fasB ( $10^{-3}$ )	Standard 2	1.00E-03	17.63
fasB ( $10^{-4}$ )	Standard 2	1.00E-04	21.47
fasB ( $10^{-5}$ )	Standard 2	1.00E-05	26.14
fasB ( $10^{-6}$ )	Standard 2	1.00E-06	27.66
fasB ( $10^{-7}$ )	Standard 2	1.00E-07	28.98
Glucose-fbp ( $10^{-1}$ )	Referenzgen	2.73E-05	19.06
Glucose-fbp ( $10^{-2}$ )	Referenzgen	2.73E-06	22.79
Acetat-fbp ( $10^{-1}$ )	Referenzgen	4.84E-05	18.13
Acetat-fbp ( $10^{-2}$ )	Referenzgen	4.79E-06	21.88
Propionat-fbp ( $10^{-1}$ )	Referenzgen	1.92E-05	19.63
Propionat-fbp ( $10^{-2}$ )	Referenzgen	2.01E-06	23.29
Glucose-fasB-2 ( $10^{-1}$ )	Zielgen	1.90E-05	23.97
Glucose-fasB-2 ( $10^{-2}$ )	Zielgen	2.58E-06	27.13
Acetat-fasB-2 ( $10^{-1}$ )	Zielgen	1.17E-05	24.74
Acetat-fasB-2 ( $10^{-2}$ )	Zielgen	1.70E-06	27.79
Propionat-fasB-2 ( $10^{-1}$ )	Zielgen	1.50E-05	24.35
Propionat-fasB-2 ( $10^{-2}$ )	Zielgen	2.03E-06	27.51

Probe		Konzentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	CP
gyrA ( $10^{-1}$ )	Standard 1	1.00E-01	8.94
gyrA ( $10^{-2}$ )	Standard 1	1.00E-02	11.99
gyrA ( $10^{-3}$ )	Standard 1	1.00E-03	16.20
gyrA ( $10^{-4}$ )	Standard 1	1.00E-04	19.54
gyrA ( $10^{-5}$ )	Standard 1	1.00E-05	23.56
gyrA ( $10^{-6}$ )	Standard 1	1.00E-06	26.29
gyrA ( $10^{-7}$ )	Standard 1	1.00E-07	30.84
fasB ( $10^{-1}$ )	Standard 2	1.00E-01	9.71
fasB ( $10^{-2}$ )	Standard 2	1.00E-02	13.95
fasB ( $10^{-3}$ )	Standard 2	1.00E-03	17.60
fasB ( $10^{-4}$ )	Standard 2	1.00E-04	21.25
fasB ( $10^{-5}$ )	Standard 2	1.00E-05	26.00
fasB ( $10^{-6}$ )	Standard 2	1.00E-06	27.52
fasB ( $10^{-7}$ )	Standard 2	1.00E-07	29.14
Glucose-gyrA ( $10^{-1}$ )	Referenzgen	2.10E-05	22.08
Glucose-gyrA ( $10^{-2}$ )	Referenzgen	2.24E-06	25.61
Acetat-gyrA ( $10^{-1}$ )	Referenzgen	3.84E-05	21.13
Acetat-gyrA ( $10^{-2}$ )	Referenzgen	4.10E-06	24.66
Propionat-gyrA ( $10^{-1}$ )	Referenzgen	1.64E-05	22.47
Propionat-gyrA ( $10^{-2}$ )	Referenzgen	2.04E-06	25.76
Glucose-fasB-2 ( $10^{-1}$ )	Zielgen	1.91E-05	23.83
Glucose-fasB-2 ( $10^{-2}$ )	Zielgen	2.76E-06	26.92
Acetat-fasB-2 ( $10^{-1}$ )	Zielgen	1.15E-05	24.63
Acetat-fasB-2 ( $10^{-2}$ )	Zielgen	1.68E-06	27.71
Propionat-fasB-2 ( $10^{-1}$ )	Zielgen	1.42E-05	24.30
Propionat-fasB-2 ( $10^{-2}$ )	Zielgen	2.29E-06	27.22

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Biotechnologie 1 des Forschungszentrum Jülich angefertigt.

---

Bei Herrn Prof. Dr. Sahm möchte ich mich für die Überlassung des Themas, sein Interesse und die konstruktiven Anregungen bedanken.

Herrn Prof. Dr. Jäger danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Bei Herrn Dr. Eggeling bedanke ich mich besonders für seine engagierte Betreuung und die große Unterstützung.

Bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Besra von der University of Birmingham bedanke ich mich für die großzügen Kooperationsbereitschaft.

Frau Karin Krumbach danke ich besonders für die vielen hilfreichen und praktischen Tipps.

Für eine besonders angenehme Laboratmosphäre möchte ich mich besonders bei Nicole Kennerknecht und Rolande Gande bedanken. Die Experimentierfreudigkeit war schier grenzenlos... Roland Gande gilt außerdem mein Dank für die aufopferungsvolle Durchführung einiger (strahlender) Experimente.

Für eine angenehme Zeit im Büro danke ich besonders Eva Krings und Nadine Tietze, mit denen man auch mal über nicht-arbeitstechnische Themen quatschen konnte.

Der gesamten Arbeitsgruppe Eggeling mit ihren alten und neuen Mitgliedern danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Viele lustige Geschichten werden mir stets in Erinnerung bleiben.

Auch den netten Kollegen von der anderen Seite des Flurs gilt mein Dank, mit denen ich schon eine besondere Bahnfahrt erlebt habe...

Schließlich bedanke ich mich beim gesamten Institut für Biotechnologie 1 für die freundliche Aufnahme und die ständige Hilfsbereitschaft, die mir alle ausnahmslos entgegenbrachten.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner lieben Familie, die mir immer alles ermöglichte, und Björn Richter, der mir immer hilfsbereit zur Seite stand.