

Untersuchungen zur Lipid- und Zellwandsynthese in *Corynebacterium glutamicum*

I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n

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

vorgelegt von
Roland Gande
aus Düsseldorf

Jülich, 2005

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2003 bis November 2005 am Institut für Biotechnologie 1 des Forschungszentrums Jülich unter Anleitung von Prof. Dr. H. Sahm angefertigt.

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

Referent: Prof. Dr. H. Sahm

Korreferent: Prof. Dr. K.-E. Jäger

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Dezember 2005

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

- Gande R, Gibson KJ, Brown AK, Krumbach K, Dover LG, Sahm H, Shioyama S, Oikawa T, Besra GS, 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* such as *Corynebacterium glutamicum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol. Chem.* (43): 44847-57
- Alderwick LJ, Radmacher E, Seidel M, Gande R, Hitchen P, Dell A, Sahm H, Eggeling L, Besra GS (2005) Deletion of *Cg-emb* in *Corynebacteriaceae* leads to a novel truncated cell wall arabinogalactan, whereas inactivation of *Cg-ubiA* results in an arabinan deficient mutant with a cell wall galactan core. *J. Biol. Chem.* (37): 32362-71

INHALTSVERZEICHNIS

I EINLEITUNG	1
II MATERIAL UND METHODEN	8
1 Bakterienstämme und Plasmide	8
2 Chemikalien, Nährmedien und Kultivierungsbedingungen	13
2.1 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme	13
2.2 Nährmedien	14
2.3 Medienzusätze	15
2.4 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> und <i>Corynebacterium glutamicum</i>	16
3 Molekularbiologische Methoden	16
3.1 Isolierung von genomischer DNA	16
3.2 Isolierung von Plasmid DNA	17
3.3 Transformation von <i>E. coli</i> und <i>C. glutamicum</i>	17
3.4 Restriktion, Modifikation und Rekombination von DNA	18
3.5 Polymerasekettenreaktion	19
3.6 DNA Sequenzierung und computergestützte Sequenzanalyse	20
3.7 Konstruktion und Nachweis von Integrations- und Deletionsmutanten bei <i>C. glutamicum</i>	20
4 Messung von Enzymaktivitäten	22
4.1 Herstellung zellfreier Rohextrakte	22
4.2 Bestimmung der Acetyl-CoA Carboxylaseaktivität zellfreier Rohextrakte	22
4.3 Quantitative Bestimmung von CoA und CoA-Derivaten mittels <i>reversed-phase</i> HPLC	23
5 Proteinbiochemische Methoden	24
5.1 Herstellung zellfreier Rohextrakte zur Isolierung von Proteinen	24
5.2 Proteinbestimmung und SDS Polyacrylamidgelelektrophorese	25
5.3 Isolierung biotinhaltiger Proteine durch Avidinaffinitätschromatographie	26
5.4 Isolierung von Histidin Fusionsproteinen über Ni-NTA Affinitätschromatographie	27
5.5 Bestimmung der Größe von Proteinkomplexen durch Größenausschlusschromatographie	29
5.6 Identifizierung von Proteinen mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie und Datenbankvergleich	30
6 Extraktion, Fraktionierung und Analyse ¹⁴C markierter Lipide	31
6.1 Analyse der freien Lipide	31
6.2 Analyse der kovalent gebundenen Lipide	32

III ERGEBNISSE	33
1 Sequenzanalyse der paralogen Acyl-CoA Carboxyltransferasen aus <i>C. glutamicum</i>	33
2 Konstruktion und Charakterisierung definierter Carboxyltransferase Inaktivierungs- mutanten von <i>C. glutamicum</i>	36
2.1 Inaktivierung der Acyl-CoA Carboxyltransferasen durch Vektorintegration	36
2.2 Phänotypische Charakterisierung der Acyl-CoA Carboxyltransferase Inaktivierungs- mutanten	39
2.3 Analyse des Einflusses der <i>accD</i> Inaktivierungen auf die Fettsäurezusammensetzung von <i>C. glutamicum</i>	41
3 Untersuchung zur Carboxylierung von Acetyl-CoA durch den AccD1/AccBC Komplex aus <i>C. glutamicum</i>	44
3.1 Malonyl-CoA Bildung bei Überexpression von AccD1 und AccBC in zellfreien Roh- extrakten	44
3.2 Malonyl-CoA Bildung durch zellfreie Rohextrakte einzelner <i>accD</i> Inaktivierungsstämmen	46
4 Expression, Reinigung und Charakterisierung der an der Mycol-säuresynthese betei- ligten Enzyme	48
4.1 Untersuchungen zur für die Mycol-säuresynthese spezifischen Acyl-CoA Carboxylase	48
4.2 Bestimmung des apparenten Molekulargewichts des AccD2-AccD3-AccBC Komplexes	50
4.3 Lokalisierung der Biotingruppe in der α -Untereinheit der Acyl-CoA Carboxylasen	52
5 Untersuchung zur Funktion des <i>pks</i> Lokus bei der Lipid- und Zellwandsynthese in <i>C. glutamicum</i>	55
5.1 Sequenzanalyse des <i>pks</i> Genlokus	55
5.2 Einfluss der Polyketidsynthase auf die Mycol-säuresynthese	57
5.3 Untersuchungen zur Struktur des Pks Proteins	61
5.4 Nachweis der Acyl-AMP Ligase Aktivität der annotierten Acyl-CoA Synthase (<i>fadD</i>)	63
6 Untersuchungen zur Translokation von Mycol-säuren in <i>C. glutamicum</i>	65
6.1 Deletion weiterer Gene im Bereich des <i>pks</i> Lokus	66
6.2 Charakterisierung der Deletionsstämmen aus 6.1	67
6.3 Lipidanalytik der Deletionsstämmen	71
6.4 Untersuchungen zur Funktion einer Ubiprenyltransferase (UbiA) bei der Zellwandsyn- these	74

IV DISKUSSION	78
1 Untersuchungen zur Mycolsäuresynthese	78
2 Untersuchungen zum Mycolsäuretransfer	85
3 Untersuchungen zur Bereitstellung aktivierter Arabinosereste für die Synthese des Arabino- galaktans	86
V ZUSAMMENFASSUNG	88
VI LITERATURVERZEICHNIS	89
VII ANHANG	107
1 Oligonukleotidsequenzen	107
2 Plasmidkarten	111

Abkürzungen

Acc	Acyl-CoA Carboxylase
ATCC	Stammsammlung (<i>American Type Culture Collection</i>)
ATP	Adenosin Triphosphat
bp	Basenpaare
BHI	Boviner Hirn Herz Extrakt
Bis/Tris	(Bis-2-(Hydroxyethyl)-Imino-Tris-(Hydroxymethyl)-Methan-HCl)
Bq	Bequarel
Brij58	Polyoxyethylen-20-hexadecylether
BSA	Bovines Serumalbumin
Carb	Carbenicillin
Cm	Chloramphenicol
C-/N-Terminus	Carboxy-/Amino-Terminus
CoA	Coenzym A
cpm	radioaktive Zerfälle pro Minute
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
DtsR	Detergent Sensitive Rescuer
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F	Farad
FPLC	<i>Fast Performance Liquid Chromatography</i>
g	Gramm / Erdbeschleunigung
h	Stunden
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IPTG	Isopropyl-Thio- β -D-Galactopyranosid
Kan	Kanamycin
L	Liter
LB	Luria Bertani
m	Meter
M	Molarität (mol/l)
MALDI-TOF-MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight – Mass Spectromerty</i>
MCS	Multiple Klonierungsstelle

MES	3-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
OD	Optische Dichte
ori	Replikationsursprung
Orf	Offenes Leseraster
PCR	Polymerasekettenreaktion
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pH	Potentia Hydrogenii
P _i	Anorganisches Phosphat
Pks	Polyketidsynthase
RBS	Ribosomenbindestelle
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Spec	Spectinomycin
t	Zeit
TAE	Tris/Acetat Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris/EDTA Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 40	Polyoxyethylensorbitanmonopalmitat
Tween 80	Polyoxyethylensorbitanmonooleat
U	Enzymatische Einheit (μmol/mg/min)
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenprozent
V	Volt
Wt	Wildtyp
w/v	Gewichtsprozent
Ω	Ohm
λ	Wellenlänge

I EINLEITUNG

Die Unterordnung der *Corynebacterianae* beherbergt eine sehr heterogene Gruppe von Bakterien innerhalb der *Actinomycetales* (Stackebrandt *et al.*, 1997). Zu den *Corynebacterianae* gehören unter anderem die beiden humanpathogenen Spezies *Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium leprae*, die sowohl medizinisch als auch volkswirtschaftlich von höchster Bedeutung sind (Brennan und Nikaido, 1995; Cole *et al.*, 1998). Beispielsweise verursachte *M. tuberculosis* im Jahr 2003 über 1,75 Millionen Todesfälle weltweit (WHO, 2005). Innerhalb der *Corynebacterianae* existieren aber auch apathogene und wichtige, großtechnisch genutzte Mikroorganismen. Dabei ist das Glutamat und andere Aminosäuren produzierende Bodenbakterium *Corynebacterium glutamicum* (Kinoshita *et al.*, 1958) mit Sicherheit der momentan wirtschaftlich bedeutendste Vertreter (Eggeling *et al.*, 2001a; Eggeling & Sahm, 2001). Trotz dieser gravierenden Unterschiede bezüglich Pathogenität und Anwendung besitzen nahezu alle Mitglieder der *Corynebacterianae* auch strukturelle Gemeinsamkeiten, die in keiner anderen Bakteriengruppe zu finden sind.

Eines ihrer vielleicht interessantesten Merkmale stellt in diesem Zusammenhang die Zellwandarchitektur (Abbildung 1) dar (Nikaido, 1988; Lee *et al.*, 1996; Marienfeld *et al.*, 1997; Chatterjee, 1997; Daffé und Draper, 1998; Puech *et al.*, 2001; Asselineau *et al.*, 2002). Aufgrund der Anwesenheit einer Peptidoglycanschicht, einem Netzwerk aus N-Acetylmuraminsäure und N-Acetylglucosamin und der damit einhergehenden Gram Färbbarkeit, werden die *Corynebacterianae* zu der Gruppe der Gram positiven Eubakterien gezählt (Stackebrandt *et al.*, 1997). Als zusätzliche Zellwandbestandteile besitzen sie jedoch ein verzweigtes System aus Arabinose- und Galaktoseresten, das Arabinogalaktan (McNeil *et al.*, 1990), sowie Mycolsäuren (Brennan *et al.*, 1995). Das Arabinogalaktan und auch die Mycolsäuren wurden bislang ausschließlich in den *Corynebacterianae* nachgewiesen. Das Arabinogalaktan ist kovalent mit dem Peptidoglycan verbunden und stellt an der Außenseite einen Verankerungspunkt für die Mycolsäuren dar. Es wird angenommen, dass die Mycolsäuren ähnlich wie die äußere Membran bei

Gram negativen Bakterien eine zweite Lipiddoppelschicht bilden. Die Mycolsäureschicht ist zwar funktionell mit der zweiten Zellmembran Gram negativer Bakterien vergleichbar, strukturell zeigen sich aber gravierende Unterschiede, da beispielsweise die äußere Membran bei *Escherichia coli* nicht aus Mycolsäuren, sondern überwiegend aus Lipopolysacchariden aufgebaut ist (Braun *et al.*, 1974). Die äußere Lipidschicht besitzt sowohl in Gram negativen Bakterien als auch in den *Corynebacteriaceae* zusätzlich zu der Cytoplasmamembran wichtige Eigenschaften bei der Regulierung des Stoffaustausches mit der Umgebung (Jarlier und Nikaido, 1990; Brennan und Nikaido, 1995; Liu *et al.*, 1996; Draper, 1998; Jackson *et al.*, 1999; Eggeling *et al.*, 2001b). Wegen dieser zweiten Lipiddoppelschicht werden die *Corynebacteriaceae* häufig phylogenetisch äquidistant zu Gram positiven und Gram negativen Bakterien eingeordnet.

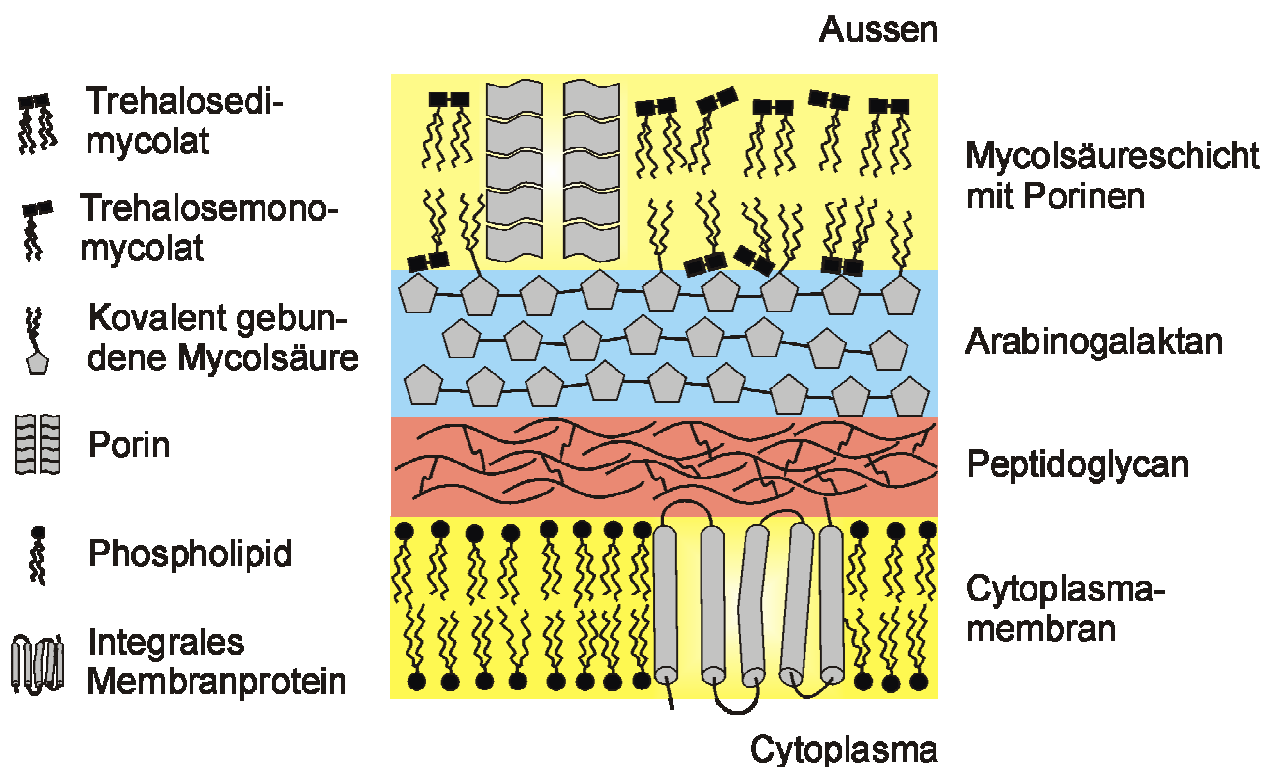


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Zellwand von *Corynebacterium glutamicum*. Der Cytoplasmamembran ist eine Peptidoglycanschicht aufgelagert. An sie schließt sich ein verzweigtes System aus Arabinose- und Galaktoseresten an, das Arabinogalaktan. Die terminalen Arabinosereste sind teilweise mit Mycolsäuren verestert. Die äußere, sowie Teile der inneren Lipidschicht der äußeren Membran werden durch Trehalosemycolate aufgebaut.

Der Aufbau der Zellwand, insbesondere die chemische Struktur der Mycolsäuren, wurde in den letzten drei Jahrzehnten intensiv erforscht. Es zeigte sich, dass eine einzelne Mycolsäure eine verzweigte, α -alkylierte, β -hydroxylierte Fettsäure der generellen Struktur $R_1\text{-CH(OH)-CH(R}_2\text{)-COOH}$ darstellt (Walker *et al.*, 1973; Minnikin, 1982; Shimakata *et al.*, 1984). Dabei wird R_1 als Meromycolat-Ast, der im Fall von *M. tuberculosis* eine Länge von bis zu 56 Kohlenstoffatomen aufweisen kann, bezeichnet. Dagegen stellt R_2 den kürzeren α -Ast mit einer Länge von nur 22 bis 26 Kohlenstoffatomen dar (Kaneda *et al.*, 1995; Barry III *et al.*, 1998; Kremer *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu *M. tuberculosis* liegen in *C. glutamicum* bei allen Mycolsäuren zwei Äste von vergleichbarer Länge mit je 14 bis 18 Kohlenstoffatomen vor (Collins *et al.*, 1982; Herrera-Alcaraz *et al.*, 1993; Jang *et al.*, 1997; Radmacher *et al.*, 2005). Diese kürzeren, sogenannten Corynemycol-säuren, sind von ihrem Aufbau und damit auch von ihrer Synthese weniger komplex als die der Mycobakterien. Zusätzlich werden bei dem längeren Mero-Zweig in *M. tuberculosis* nach oder während seiner Synthese zahlreiche Modifizierungen wie Methylierungen, Doppelbindungen, Epoxylierungen oder Cyclopropanringe eingefügt (Minnikin *et al.*, 1982). Im Gegensatz dazu wurden in *C. glutamicum* bislang nur Doppelbindungen als Modifizierungen des Mero-Astes nachgewiesen (Collins *et al.*, 1982). Die Synthese der Mycolsäuren, besonders der Mechanismus, der zu ihrer Verzweigung führt, war trotz jahrzehntelanger, intensiver Forschung lange Zeit unbekannt. Erst kürzlich wurden Teile der Mycolsäuresynthese aufgeklärt. Dabei zeigte sich, dass die beiden Seitenäste durch die bekannten Fettsäuresynthasen, wovon *C. glutamicum* zwei unterschiedliche, nämlich FasIA und FasIB besitzt (Radmacher *et al.*, 2005), synthetisiert und anschließend durch eine noch unbekannte Mycolsäuresynthase assembliert werden (Kremer *et al.*, 2000).

Die reifen Mycolsäuren werden zum Teil als Ester an das Arabinogalaktansystem gebunden (McNeil *et al.*, 1990). In *M. tuberculosis* liegen sie als Tetramycolyl-Pentaarabinose Einheiten an den nicht reduzierenden terminalen Arabinoseresten des Arabinogalaktans vor (McNeil *et al.*, 1991b). Die Hauptbestandteile der äußeren Lipidschicht stellen aber die mit organischen Lösungsmitteln extrahierbaren, zuckergebundenen, sogenannten freien Mycolsäuren dar. Dabei stellen die Trehalosedimycolate (Minnikin, 1982) den mengenmäßig größten Anteil, aber

auch Trehalosemonomycolate, Glucose- und Arabinosemonomycolate (Abbildung 2) wurden nachgewiesen (Lanéelle *et al.*, 1977; Minnikin, 1982; Tropis *et al.*, 2005). Die durch sie aufgebaute Lipiddoppelschicht ist über die kovalent gebundenen Mycolsäuren fest mit dem Arabinogalaktan verbunden (Abbildung 1).

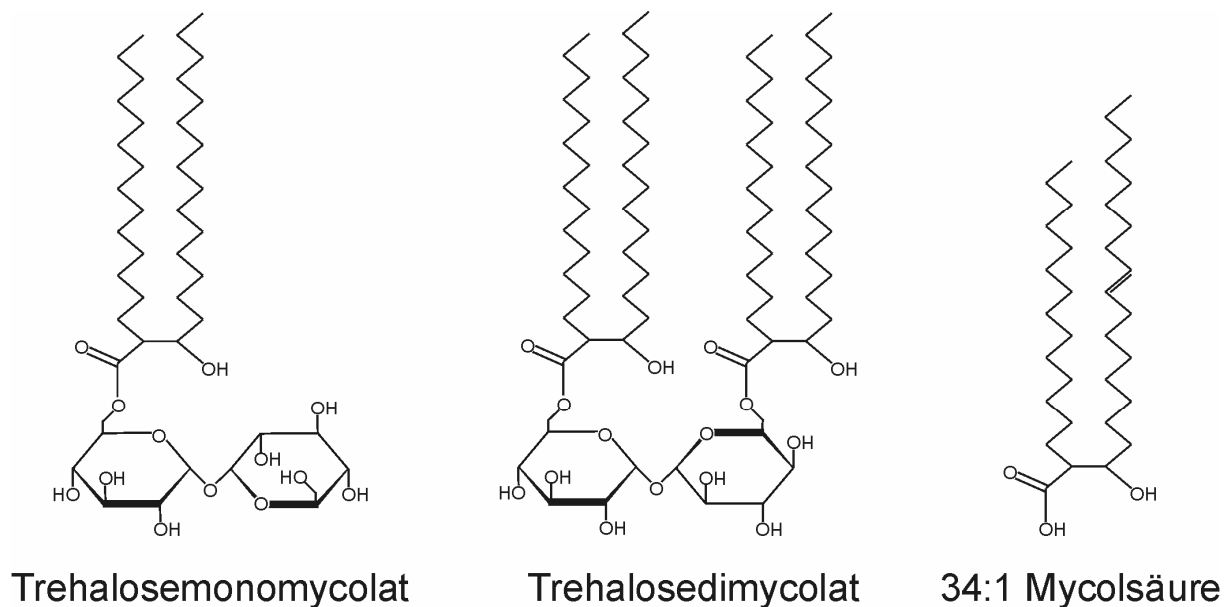


Abbildung 2: Beispiele einiger in *C. glutamicum* vorhandenen Mycolsäuren. Die einzige bekannte Modifizierung des Mero-Astes stellt hier die Doppelbindung dar, wie es beispielsweise bei der 34:1 Mycolsäure gezeigt wurde.

Aufgrund ihrer Hydrophobizität beeinflusst die Mycolsäureschicht zusätzlich zur Cytoplasmamembran bei *C. glutamicum* die Permeabilität der Zellwand. Sowohl in Hinblick auf die Exportraten biotechnologischer Produkte, wie beispielsweise Aminosäuren als auch bei der Aufnahme von Substraten könnte diese äußere Membran einen limitierenden Faktor darstellen (Jarlier und Nikaido, 1990; Brennan und Nikaido, 1995; Liu *et al.*, 1996; Draper, 1998; Jackson *et al.*, 1999; Eggeling *et al.*, 2001b). So ist für *M. smegmatis* gezeigt, dass ein Porin (MspA) in der äußeren Membran maßgeblich an der Permeation kleiner Moleküle wie Zucker oder Antibiotika beteiligt ist (Mailänder *et al.*, 2004; Stephan *et al.*, 2004). Mittlerweile wurden auch selektive Transportmechanismen für die Aminosäuren Lysin, Leucin und Threonin in der Cytoplasmamembran von *C. glutamicum* nachgewiesen, und die entsprechenden Gene identifiziert und kloniert (Eggeling *et*

al., 2001a; Simic *et al.*, 2001; Kennerknecht *et al.*, 2002). Diese Translokationssysteme erklären zwar den selektiven Transport der Metabolite durch die Cytoplasmamembran, nicht aber ihre Permeation durch die Mycolsäureschicht. Bei *C. glutamicum* Stämmen, die nachweislich weniger Mycolsäuren in ihrer äußeren Membran aufweisen, konnte eine erhöhte Aminosäureakkumulation im Medium gezeigt werden (Nakamura *et al.*, 2001; Wolf, 2002). Die Autoren schlossen daraus, dass die Mycolsäureschicht eine zusätzliche Permeabilitätsbarriere für diese Substanzen darstellt. Dieser Befund war unerwartet, denn vergleichbar zu Gram negativen Bakterien wurden auch in *C. glutamicum* Porine identifiziert, die eine erleichterte Diffusion kleiner Moleküle durch die Mycolsäureschicht ermöglichen sollen (Lichtinger *et al.*, 1998). Ein genaues Verständnis über die Struktur, die Synthese und die physikochemischen Vorgänge in der Zellwand ist folglich von großer Bedeutung, um genauere Einblicke in die Exportmechanismen zu erlangen und eventuelle Stammoptimierungen vorzunehmen.

Mit der Sequenzierung vollständiger Genome steht nun auch diese Information zur Verfügung, um Zugang zur Synthese von Zellwandkomponenten zu bekommen. Dabei zeigte sich, dass *M. tuberculosis* und *M. bovis* sowie auch andere *Mycobacterium* Spezies eine große Zahl an Genen besitzen, die mit der Lipidsynthese oder auch deren Abbau in Zusammenhang stehen. Dagegen liegen in *C. glutamicum* eine geringere Anzahl solcher Gene vor. So hat *C. glutamicum* beispielsweise nur eine Polyketidsynthase (*pks*), eine Acyl-CoA Ligase (*fadD*) und vier Acyl-CoA Carboxyltransferasen (*accD*) (Kalinowski *et al.*, 2003). Im Vergleich dazu existieren in *M. tuberculosis* 19 *pks*, 35 *fadD* und 6 *accD* Gene. (Cole *et al.*, 1998; Glickman und Jacobs, 2001). Aus diesem Grund wird *C. glutamicum* als Archetyp der *Corynebacteriaceae* mit wenigen Genduplikationen und evolutionär bedingten Veränderungen angesehen (Nakamura *et al.*, 2003). Der Organismus ist deswegen als Modell geeignet, um die Funktionen dieser und anderer zum Teil noch unbekannter Gene zu untersuchen. Zusätzlich zur strukturellen und genetischen Einfachheit ist *C. glutamicum* leicht kultivierbar, genetisch manipulierbar sowie apathogen. Erste spezifische Arbeiten zur Zellwandsynthese wurden bereits durchgeführt. So gelang es in *C. glutamicum* die Funktion von Ppm1/D1 bei der Lipomannan Synthese (Gibson *et al.*, 2003) und die Beteiligung der Mycolyltransferasen bei der Veresterung der Mycolsäuren mit dem Arabino-

galaktan oder Zuckern zu entschlüsseln (Belisle *et al.*, 1997; De Sousa-D'Auria *et al.*, 2003; Brand *et al.*, 2003; Kacem *et al.*, 2004). Trotz der vergleichsweise geringen Komplexität von *C. glutamicum* liegen aber in dessen Genom vier paraloge β -Untereinheiten der Acyl-CoA Carboxyltransferase vor (Tilg, 2002). Über die Funktion dieser vier Paraloge ist bislang wenig bekannt. Nur bei einem dieser Gene konnte experimentell eine direkte Beteiligung bei der Fettsäuresynthese nachgewiesen werden. Die Inaktivierung des Gens *accD1* (früher *dtsR1*), führte bei *C. glutamicum* zu einem fettsäureauxotrophen und Glutamat produzierenden Stamm (Kimura *et al.*, 1997). Die Autoren postulierten, dass es sich bei dem durch *accD1* codierten Enzym um die β -Untereinheit der Acetyl-CoA Carboxylase handeln könnte. Das in *E. coli* homologe Enzym ist an der Carboxylierung von Acetyl-CoA zur Bildung von Malonyl-CoA beteiligt, das als Baustein für die Fettsäuresynthese essentiell ist. Auch eine Acyl-CoA Carboxylase aus *M. tuberculosis* konnte bereits isoliert und charakterisiert werden (Rainwater und Kolattukudy, 1982). Es zeigte sich, dass sie sowohl Acetyl-CoA als auch Propionyl-CoA als Substrat umsetzt und aus zwei einzelnen Untereinheiten besteht. Davon trägt die größere, sogenannte α -Untereinheit Biotin, das als Cofaktor bei allen bekannten Carboxylasen für die reversible CO₂ Bindung und Übertragung notwendig ist (Samols *et al.*, 1988; Chapman und Cronan, 1999; Polatis *et al.*, 1979). Die kleinere β -Untereinheit besitzt hingegen eine Funktion bei der eigentlichen Carboxylierung der Substrate (Sutton *et al.*, 1977; Kondo *et al.*, 1991; Li und Cronan, 1992; Li *et al.*, 1992). Beide Untereinheiten weichen in ihrer Größe stark von den aus *E. coli* bekannten homologen Polypeptiden ab. Hier besteht die Acetyl-CoA Carboxylase aus vier verschiedenen Untereinheiten, nämlich AccA, AccB, AccC und AccD (Wood und Barden, 1977; Knowles, 1989). Die jetzt zugängliche Genomsequenz von *M. tuberculosis* und *E. coli* erlaubt einen Vergleich der einzelnen Proteine untereinander. Jeweils zwei der Untereinheiten von *E. coli* liegen in *M. tuberculosis* als Fusionspeptide vor, wobei das Fusionspeptid aus AccB und AccC die biotinylierte α -Untereinheit und das aus AccD und AccA die biotinfreie β -Untereinheit darstellt.

Eine möglicherweise durch eine Acetyl-CoA Carboxylase katalysierte Initialreaktion wird auch in Zusammenhang mit der Mycolsäuresynthese diskutiert. In zellfreien Rohextrakten von *C. matrochutii* erfolgte *in-vitro* eine Synthese von

Mycolsäuren aus ^{14}C -markierter Palmitinsäure (Shimakata *et al.*, 1984; Shimakata *et al.*, 1985). Es zeigte sich, dass sich die radioaktive Markierung ausschließlich an der C₁- und C₃-Position der neu synthetisierten Mycolsäuren befand (Walker *et al.*, 1973). Die Autoren postulierten daher einen der Fettsäuresynthese analogen Claisen-Kondensationsmechanismus (Gastambide-Odier und Lederer, 1960) zur Verknüpfung zweier vorgefertigter Fettsäuren zur Mycolsäure. Dieser Mechanismus wäre mit dem der Fettsäuresynthase vergleichbar (Waite und Wakil, 1962; Dewar und Dieter, 1988; Chirala und Wakil, 2004), an der eine schrittweise Verlängerung einer Acylkette mit Malonyl-CoA Einheiten erfolgt. Analog dazu könnte durch spezifische Acyl-CoA Carboxylasen auch eine Verknüpfung einer Acylkette mit anderen carboxylierten Substraten erfolgen. Solch eine Reaktion wurde beispielsweise bei der Verknüpfung von Methylmalonyl-CoA Einheiten zur Synthese von Methyl-verzweigten Mycocerosinsäuren von *M. tuberculosis* beschrieben (Mathur und Kolattukudy, 1992). Auch eine carboxylierte, langkettige Fettsäure wäre als Substrat nach diesem Mechanismus denkbar, da die reaktiven Gruppen in allen drei genannten carboxylierten Intermediaten identisch sind. Letztere Reaktion konnte allerdings bislang noch nicht experimentell nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit sollte die Funktion der vier paralogen Acyl-CoA Carboxyltransferasen im Lipidstoffwechsel von *C. glutamicum* sowie weiterer Gene, die möglicherweise an der Mycolsäuresynthese beteiligt sind, untersucht werden. Dazu sollten Inaktivierungen der Acyl-CoA Carboxyltransferasen durchgeführt, und die erstellten Mutanten biochemisch charakterisiert werden. Zusätzlich sollten Enzymtests gezielt die Acetyl-CoA Carboxylaseaktivität eines der Paralogen nachweisen. Die Untersuchungen in dieser Arbeit sollten zudem auf weitere Gene in der genomischen Nachbarschaft der Acyl-CoA Carboxyltransferasen mit vermuteter Beteiligung an der Lipidsynthese ausgedehnt werden. Dabei war eine Polyketidsynthase von besonderem Interesse, der computergestützte Analysen möglicherweise eine essentielle Rolle bei der Mycolsäuresynthese zusprechen.

II MATERIAL UND METHODEN

1 Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit eingesetzten und konstruierten Bakterienstämme sind unter Angabe ihrer Stammeigenschaften in Tabelle 1 aufgeführt. Plasmidkarten der neu konstruierten Vektoren sind ebenso wie die Sequenzen verwendeter PCR Primer im Anhang dargestellt. Tabelle 2 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten und erstellten Plasmide.

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme und ihre Eigenschaften.

Stamm	Phänotyp / Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
DH5αMCR	F ⁻ <i>endA1 supE44 thi-1 λ⁻ recA1 gyrA96 relA1 deoR Δ(lacZYA-araF) U169</i> Φ80 <i>dlacZΔM15 mcrA Δ(mrr hsdRMS mcrBC)</i>	Grant <i>et al.</i> , 1990
TG1	F ⁻ <i>supE hsdD5 thi Δ(lac-proAB) traD36 proAB⁺ lacIq lacZΔM15</i>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
M15	K12-Derivat: NaI ^S Str ^S Rif ^S Thi ⁻ Lac ⁻ Ara ⁺ Gal ⁺ Mtl ⁻ F ⁻ RecA ⁺ Uvr ⁺ Lon ⁺	Qiagen, Hilden
<i>Corynebacterium glutamicum</i>		
ATCC13032	Wildtyp	Abe <i>et al.</i> , 1967
13032:: <i>accD1</i>	Wildtyp mit einer Disruption von <i>accD1</i> (<i>dtsR1</i> , NCgl0678) durch <i>pk18mob</i>	Tilg, 2002

Tabelle 1ff: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme und ihre Eigenschaften.

Stamm	Phänotyp / Genotyp	Referenz
13032:: <i>accD2</i>	Wildtyp mit einer Disruption von <i>accD2</i> (<i>dtsR2</i> , NCgl0677) durch <i>pk18mob</i>	Gande <i>et al.</i> , 2004
13032:: <i>accD3</i>	Wildtyp mit einer Disruption von <i>accD3</i> (<i>dtsR3</i> , NCgl2772) durch <i>pk18mob</i>	Gande <i>et al.</i> , 2004
13032:: <i>accD4</i>	Wildtyp mit einer Disruption von <i>accD4</i> (<i>accDA</i> , NCgl0797) durch <i>pk18mob</i>	Gande <i>et al.</i> , 2004
13032:: <i>pks</i>	Wildtyp mit einer Disruption der Polyketidsynthase (<i>pks</i> , NCgl2773)	Gande <i>et al.</i> , 2004
13032:: <i>fadD</i>	Wildtyp mit einer Disruption der Acyl-AMP Ligase (<i>fadD</i> , NCgl2774)	diese Arbeit
13032:: <i>cmytA</i>	Wildtyp mit einer Disruption der Mycolyltransferase (<i>cmytA</i> , NCgl2777)	diese Arbeit
13032:: <i>ubiA</i>	Wildtyp mit einer Disruption der Ubiprenyltransferase (<i>ubiA</i> , NCgl2781)	diese Arbeit
13032Δ <i>pks</i>	<i>In-frame</i> Deletion des <i>pks</i> -Gens	Gande <i>et al.</i> , 2004
13032Δ <i>pyc</i>	<i>In-frame</i> Deletion der Pyruvat-carboxylase (<i>pyc</i> , NCgl2781)	Peters-Wendisch <i>et al.</i> , 1998
13032Δ <i>hyp</i>	<i>In-frame</i> Deletion des hypothetischen Orfs NCgl2776	diese Arbeit
13032Δ <i>cut</i>	<i>In-frame</i> Deletion der Kutinase (<i>cut</i> , NCgl2775)	diese Arbeit

Tabelle 1ff: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme und ihre Eigenschaften.

Stamm	Phänotyp / Genotyp	Referenz
13032 Δ <i>cmytAcmytB</i> (Δ B)	Doppeldeletion der Mycolyltransferasen (<i>cmyt+cmytB</i> , Cgl2777+2779)	diese Arbeit
13032 Δ <i>cuthyp</i> (Δ C)	Doppeldeletion von NCgl2775+2776	diese Arbeit
13032 Δ <i>cmytAcmytBhypcut</i> (Δ A)	Vierfachdeletion von NCgl2775+2776+2777+2779	diese Arbeit

Tabelle 2: Verwendete Plasmide, ihre Marker und Eigenschaften.

Plasmid	Marker / Eigenschaft	Referenz
pUC18 <i>accD1</i>	pUC18 mit 1,9 kb PCR Fragment aus chromosomaler DNA von ATCC13032, enthält <i>accD1</i>	Tilg, 2002
pUC18 <i>accD2</i>	pUC18 mit 1,9 kb PCR Fragment aus chromosomaler DNA von ATCC13032, enthält <i>accD2</i>	Krumbach, 2003
pUC18 <i>accD3</i>	pUC18 mit 1,9 kb PCR Fragment aus chromosomaler DNA von ATCC13032, enthält <i>accD3</i>	Krumbach, 2003
pEK0 <i>accD4</i>	pEK0 mit 2,1 kb PCR Fragment aus chromosomaler DNA von ATCC13032, enthält <i>accD4</i>	Tilg, 2002
pk18 <i>mob</i>	Integrationsvektor, <i>oriV_{E.c.}</i> , <i>oriT</i> , <i>mob</i> , Kan ^R	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pk18 <i>mob_accD1_int</i>	pk18 <i>mob</i> mit internem 555 bp <i>accD1</i> Fragment	Tilg, 2002
pk18 <i>mob_accD2_int</i>	pk18 <i>mob</i> mit internem 508 bp <i>accD2</i> Fragment	Krumbach, 2003

Tabelle 2ff: Verwendete Plasmide, ihre Marker und Eigenschaften.

Plasmid	Marker / Eigenschaft	Referenz
pk18 <i>mob_accD3_int</i>	pk18 <i>mob</i> mit internem 431 bp <i>accD3</i> Fragment	diese Arbeit
pk18 <i>mob_accD4_int</i>	pk18 <i>mob</i> mit internem 325 bp <i>accD4</i> Fragment	diese Arbeit
pk18 <i>mob_pks_int</i>	pk18 <i>mob</i> mit internem 543 bp <i>pks</i> Fragment	diese Arbeit
pk18 <i>mob_ubiA_int</i>	pk18 <i>mob</i> mit internem 320 bp <i>ubiA</i> Fragment	Heseler, 2003
pk18 <i>mob_cmytA_int</i>	pk18 <i>mob</i> mit internem 355 bp <i>cmytA</i> Fragment	diese Arbeit
pk18 <i>mob_fadD_int</i>	pk18 <i>mob</i> mit internem 383 bp <i>fadD</i> Fragment	diese Arbeit
pk19 <i>mobsacB</i>	Integrationsvektor, <i>oriV_{E.c.}</i> , <i>oriT</i> , <i>mob</i> , Kan ^R , <i>sacB</i>	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pk19 <i>mobsacB_Δpks</i>	pk19 <i>mobsacB</i> mit einem um 4,8 kb verkleinerten <i>pks</i> Gen	diese Arbeit
pk19 <i>mobsacB_Δhyp</i>	pk19 <i>mobsacB</i> mit einem um 388 bp verkleinerten <i>hyp</i> Gen	diese Arbeit
pk19 <i>mobsacB_Δcut</i>	pk19 <i>mobsacB</i> mit einem um 877 bp verkleinerten <i>cut</i> Gen	diese Arbeit
pk19 <i>mobsacB_ΔA</i>	pk19 <i>mobsacB</i> mit einem um 6,3 kb verkleinerten Bereich der Gene <i>hyp+cut+cmytA+cmytB</i>	diese Arbeit
pk19 <i>mobsacB_ΔB</i>	pk19 <i>mobsacB</i> mit einem um 4 kb verkleinerten Bereich der Gene <i>cmytA</i> und <i>cmytB</i>	diese Arbeit

Tabelle 2ff: Verwendete Plasmide, ihre Marker und Eigenschaften.

Plasmid	Marker / Eigenschaft	Referenz
pk19 <i>mobsacB</i> _ΔC	pk19 <i>mobsacB</i> mit einem um 1,5 kb verkleinerten Bereich der Gene <i>hyp</i> und <i>cut</i>	diese Arbeit
pEC7 <i>accD1</i>	pEC7 mit 1,9 kb <i>accD1</i> Gen aus pUC18 <i>accD1</i>	Tilg, 2002
pEC7 <i>accD2</i>	pEC7 mit 1,9 kb <i>accD2</i> Gen aus pUC18 <i>accD2</i>	Krumbach, 2003
pEC7 <i>accD3</i>	pEC7 mit 1,9 kb <i>accD3</i> Gen aus pUC18 <i>accD3</i>	Krumbach, 2003
pEC7 <i>accD4</i>	pEC7 mit 1,9 kb <i>accD4</i> Gen aus pUC18 <i>accD4</i>	Krumbach, 2003
pQU30 <i>accD2</i>	pQE30 mit 1,7 kb <i>accD2</i> Gen aus pPCR-ScriptAmpSK(+) <i>ftsR2</i>	Krumbach, 2003
pQU30 <i>accD3</i>	pQE30 mit 1,6 kb <i>accD3</i> Gen aus pPCR-ScriptAmpSK(+) <i>ftsR3</i>	Krumbach, 2003
pREP4	<i>oriV_{E.c.}</i> , <i>lacI</i> , Kan ^R	Qiagen, Hilden
pEKEx3	Spec ^R , pUC18 <i>oriV_{E.c.}</i> , pBL1 <i>oriV_{C.g.}</i> , <i>P_{tac}</i> , <i>lacIQ</i>	Radmacher, 2004
pEKEx3_H ₆ _i>accD3	pEKEx3 mit 1,7 kb RBS_H ₆ _i>accD3 Insert aus pQE30 <i>accD3</i>	diese Arbeit
pEKEx3_RBS_H ₆ _i>pks	pEKEx3 mit 4,9 kb RBS_H ₆ _i>pks PCR Frgment, His ₆ -tag N-terminal	diese Arbeit
pEKEx3_RBS_i>pks_H ₆	pEKEx3 mit 4,9 kb RBS_i>pks_H ₆ PCR Frgment, His ₆ -tag C-terminal	diese Arbeit
pEKEx3_RBS_H ₆ _i>accD2_ε	pEKEx3 mit 1,9 kb RBS_H ₆ _i>accD2_ε PCR Frgment	diese Arbeit

Tabelle 2ff: Verwendete Plasmide, ihre Marker und Eigenschaften.

Plasmid	Marker / Eigenschaft	Referenz
pEKEx4	pEKEx2 mit MCS aus pQE30, enthält artifizielle RBS und N-terminalen His ₆ -tag	diese Arbeit
pEKEx5	pEKEx3 mit MCS aus pQE30, enthält artifizielle RBS und N-terminalen His ₆ -tag	diese Arbeit
pEKEx5_ <i>fadD</i>	pEKEx5 mit 1,9 kb <i>fadD</i> PCR Fragment	diese Arbeit
pVWEx2	Kan ^R , pUC18 <i>oriV_{E.c.}</i> , pBL1 <i>oriV_{C.g.}</i> , <i>P_{tac}</i> , <i>lacI_Q</i>	Wendisch <i>et al.</i> , 1997
pVWEx2_ <i>dtsR1</i>	pVWEx2 Expressionsvektor mit 1,9 kb <i>accD1</i> Gen	Tilg, 2002

2 Chemikalien, Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

2.1 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

Soweit nicht anders aufgeführt, wurden alle Chemikalien, Reagenzien und Enzyme bei den Firmen Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe), Sigma-Aldrich Chemie (Seelze), Amersham Pharmacia Biotech Inc. (Freiburg), Merck KGaA (Darmstadt) und Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) mit den Reinheitsgrad p.a. bzw. reinst bezogen. Die Komponenten komplexer Nährmedien stammten von den Difco-Laboratories (Detroit, MI, USA).

2.2 Nährmedien

Nährmedien für *Escherichia coli*

Zur Kultivierung aller verwendeten *E. coli* Stämme wurde ausschließlich das Komplexmedium Luria-Bertani (LB) verwendet (Sambrook *et al.*, 1989). Kultivierungen zur Stammhaltung erfolgten in Reagenzgläsern mit 5 ml BHI Medium mit 0,5 M Sorbitol. Die über Nacht unter Standardbedingungen kultivierten Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (5.000 g, 1 min, RT), in 1 ml LB Medium mit 40 % Glycerin (v/v) resuspendiert und bei -70 °C gelagert. Für jeden Stamm wurden jeweils zwei parallele Kulturen angesetzt, eine diente zur dauerhaften Lagerung, die andere wurde als Ausgangskultur für die durchgeführten Kultivierungen verwendet.

Die Anzucht zur Erzeugung chemisch kompetenter Zellen erfolgte in SOB Komplexmedium (Hanahan, 1985).

Nährmedien für *Corynebacterium glutamicum*

Die Kultivierung von *C. glutamicum* Stämmen zur DNA Isolation, Stammhaltung und Proteinexpression erfolgte in LB Medium. Zur Bestimmung von Enzymaktivitäten und zur Isolierung des AccBC Proteins wurde das *C. glutamicum* spezifische Komplexmedium CgIII eingesetzt (Menke *et al.*, 1989). Die Kultivierung zur Erzeugung elektrokompenter *C. glutamicum* Zellen (Tauch *et al.*, 2002) erfolgte im BHI (*Brain Heart Infusion*, Difco) Komplexmedium. Für einige Wachstumsexperimente und zur Kultivierung der Zellen zur Fettsäureanalytik wurde das amino- und fettsäurefreie Minimalmedium CgXII (Keilhauer *et al.*, 1993) mit 4 % Glukose (w/v) verwendet. Durch den Zusatz der nicht metabolisierbaren Puffersubstanz 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS) zeichnet sich dieses Medium durch sehr gute Puffereigenschaften im pH Bereich um 7,2 aus.

2.3 Medienzusätze

Die Selektion auf rekombinante *E. coli* Stämme erfolgte durch Supplementation der Medien mit Antibiotika in folgenden Endkonzentrationen:

Kanamycin (Kan)	50 µg/µl
Carbenicillin (Carb)	50 µg/µl
Spectinomycin (Spec)	100 µg/µl

Für die Selektion rekombinanter *C. glutamicum* Stämme wurden folgende Endkonzentrationen eingesetzt:

Kanamycin (Kan)	50 µg/µl (frei replizierende Plasmide)
	25 µg/µl (Integration eines Vektors in das Genom)
Chloramphenicol (Cm)	15 µg/µl
Spectinomycin (Spec)	250 µg/µl

Zur Kultivierung fettsäureauxotropher Stämme enthielt das Medium zusätzlich Fettsäuren bzw. ihre Derivate in folgenden Endkonzentrationen:

Ölsäure	C18:1	20 µM
Tween 40	C16:0	30 mg/l
Butterhydrolysat	unspezifisch	300 mg/l
Brij58	Emulgator	400 mg/l

Das Buttersäurehydrolysat wurde nach den Angaben von Prof. Dr. E. Schweizer (Universität Erlangen-Nürnberg) hergestellt, indem 100 g Butter in einer Kaliumhydroxid / Methanol Lösung (25 g KOH in 50 ml Methanol gelöst) für 1,5 h unter Rückfluss gekocht wurden.

Zur Herstellung von Festmedien wurde den Flüssigmedien 1,5 % Agar (w/v) (Difco) hinzugefügt.

2.4 Kultivierung von *Escherichia coli* und *Corynebacterium glutamicum*

Die Kultivierung von *C. glutamicum* und *E. coli* für Wachstumsversuche, zur DNA Isolierung, für enzymatische Aktivitätsbestimmungen oder zur Proteinexpression erfolgte immer ausgehend von einer frischen LB Agarplatte, die niemals länger als eine Woche bei 4 °C aufbewahrt wurde. Zur Kultivierung der Bakterien in Flüssigmedien wurden 5 oder 50 ml Vorkulturen LB- oder BHI Medium mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 30 °C im Fall von *C. glutamicum* oder 37 °C bei *E. coli* unter Schütteln mit einer Umdrehungszahl von 170 rpm bei Reagenzgläsern oder 120 rpm bei Erlenmeyerkolben inkubiert. Für Wachstums-experimente wurde mit einer über Nacht gewachsenen Vorkultur eine 50 ml CgXII Hauptkultur beimpft, so dass ihre optische Dichte 0,5 betrug. Die Kulturen wurden dann bei 30 °C mit 120 rpm inkubiert. Zur Gewinnung von Zellmaterial zum Einsatz in Enzymtests war das Vorgehen analog. Es wurde nur statt Minimal-medium das Komplexmedium CgIII verwendet. Die Zellen wurden in der exponen-tiellen Wachstumsphase bei einer optischen Dichte zwischen 9 und 11 geerntet. Die Kultivierung von Zellmaterial zur Aufreinigung von Proteinen erfolgte in LB Medium. Um ausreichend Zellmasse zu erhalten, wurden 500 ml Medium in 2 l Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen verwendet, die bei 30 °C und 100 rpm inkubiert wurden. Die Zellernte erfolgte hier bei einer optischen Dichte von 3. Zur DNA Präparation wurden die Zellen in 50 ml LB Medium unter Standardbedingungen über Nacht kultiviert.

3 Molekularbiologische Methoden

3.1 Isolierung von genomischer DNA

Für jede Isolation genomischer DNA wurden *C. glutamicum* Zellen in 5 ml LB Medium bei 30 °C mit 170 rpm über Nacht kultiviert. Die durch Zentrifugation geernteten Zellen dienten als Ausgangsmaterial zur DNA Isolation mittels des

DNeasy Tissue Kits (Qiagen, Hilden). Das gesamte Vorgehen erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

3.2 Isolierung von Plasmid DNA

Die Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli* erfolgte nach der von Birnboim und Doly (1979) modifizierten Methode der alkalischen Lyse. Für Arbeiten, die eine höhere Reinheit oder größere Menge der DNA erforderten, wie z.B. Sequenzierungen, Elektroporationen oder präparative Restriktionen, wurde das *Mini Plasmid Purification Kit* (Qiagen, Hilden) verwendet. Das genaue Verfahren ist dem Handbuch der Firma Qiagen zu entnehmen. Plasmidisolierungen aus *C. glutamicum* erforderten aufgrund der stabilen Zellwand des Bakteriums eine Vorbehandlung mit 15 mg/ml Lysozym bei 37 °C für eine Stunde (Schwarzer und Pühler, 1991).

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

Transformation von *E. coli*

Zur Transformation von *E. coli* wurde eine modifizierte Methode nach Hanahan (1983) eingesetzt. Dabei wurden die nach Hanahan (1985) erstellten, chemisch Rubidiumchlorid kompetenten Zellen durch einen Hitzeschock transformiert.

Transformation von *C. glutamicum*

Die Transformation von *C. glutamicum* erfolgte ausschließlich durch Elektroporation mit anschließendem Hitzeschock nach Tauch *et al.* (2002). Zur Erstellung elektrokompetenter Zellen wurde 5 ml BHIS Medium mit einer Einzelkolonie von *C. glutamicum* von einer frischen Agarplatte beimpft und über Nacht bei 30 °C mit 170 rpm inkubiert. Mit 2 ml dieser Vorkultur wurden 100 ml BHIS Medium in 500 ml Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen beimpft und bei 30 °C mit

120 rpm inkubiert bis eine optische Dichte von 1,5 erreicht wurde. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (3.500 g, 15 min, 4 °C), zweimal in eiskaltem TG Puffer (1 mM Tris/HCl pH 7,5; 10 % Glycerin (v/v)) und zweimal in 10 % Glycerin (v/v) gewaschen. Die Zellen wurden dann in 1 ml 10 % Glycerin (v/v) resuspendiert und in 100 µl Aliquots bei -70 °C gelagert.

Zur Elektroporation wurden 50 µl der kompetenten Zellen mit bis zu 10 µg hochreiner und salzfreier Plasmid DNA in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette (2 mm Spaltabstand, *Gene Pulser Cuvette*, Biorad, München) vermischt und mit 0,8 ml eiskaltem 10 % Glycerin (v/v) überschichtet. Die Elektroporation wurde mit einem Puls bei einer Spannung von 2.500 V, einem Widerstand von 200 Ω und einer Kondensatorkapazität von 25 µF mit einem *Gene Pulser Xcell* (Biorad, München) durchgeführt (Tauch *et al.*, 2002). Im Anschluss erfolgte ein Hitzeschock, indem der Transformationsansatz 6 min in 5 ml BHIS Medium bei 46 °C inkubiert wurde. Vermutlich wird durch diese Hitzebehandlung die Restriktionsaktivität von *C. glutamicum* reduziert, so dass die Transformations-effizienz bei Verwendung heterologer DNA erhöht wurde (van der Rest *et al.*, 1999). Zur Regeneration und Ausprägung der plasmidcodierten Antibiotika-resistenz wurden die Zellen für weitere 60 min bei 30 °C inkubiert und anschließend auf antibiotikahaltigen BHIS Agarplatten ausplattiert.

3.4 Restriktion, Modifikation und Rekombination von DNA

Alle Methoden zur Restriktion, Präzipitation, Reinigung und Modifizierung von DNA wurden nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Für analytische Restriktionen wurde die DNA 2 h mit 2 U des entsprechenden Restriktionsenzym (Roche Diagnostics, Mannheim) pro µg DNA inkubiert, präparative Restriktionen wurden mit 6 U Restriktionsenzym pro µg DNA über Nacht bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur durchgeführt. Die anschließende gelelektrophoretische Auftrennung der DNA Fragmente erfolgte in Abhängigkeit ihrer Größe in 1 % oder 2 % TAE Agarosegelen (Sambrook *et al.*, 1989). Im Fall von präparativen Agarosegelen wurden die Banden aus dem Gel ausgeschnitten und die darin enthaltene DNA mittels des *QIAExII Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) gereinigt und aufkonzentriert. Zur Modifikation überhängender 5'-Enden wurden diese durch

die *Klenow* Polymerase (Roche, Mannheim) unter Zugabe von Desoxynukleotiden zu glatten Enden aufgefüllt, überhängende 3'-Enden durch das gleiche Enzym abgebaut (Sambrook *et al.*, 1989). Linearisierte Vektoren wurden mittels der *Shrimp Alkaline Phosphatase* (USB, Bad Honnef) dephosphoryliert, um eine intramolekulare Rezirkulisierung zu vermeiden. Ligationen wurden ausschließlich mit dem *Rapid Ligation Kit* (Roche Diagnostics, Mannheim) für 15 min bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.5 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde sowohl zur *in-vitro* Amplifikation von DNA Fragmenten (Saiki *et al.*, 1988; Tindall und Kunkel, 1988), zur analytischen Überprüfung von Integrations- und Deletionsmutanten als auch zum Nachweis von Ligationen in Plasmiden angewandt. Dabei wurden jeweils zwei synthetische DNA Oligonukleotide (MWG Biotech AG, Ebersberg) als Primer eingesetzt (Sambrook *et al.*, 1989), die den zu amplifizierenden chromosomalen Bereiche flankierten und ggf. spezielle Modifizierungen wie Ribosomenbindestellen (RBS) oder Restriktionsschnittstellen trugen. Als Matrize wurde chromosomale DNA aus *C. glutamicum* benutzt. Die Durchführung der PCR erfolgte mit Hilfe eines Thermocyclers (Biozym Diagnostik, Oldendorf oder *T3000 Thermocycler*, Biometra, Göttingen). Zur Denaturierung der DNA wurde eine Temperatur von 94 °C gewählt, die Anlagerungstemperatur der Primer war variabel und richtete sich nach der Zusammensetzung der Oligonukleotide in ihrem zur chromosomalen DNA homologen Bereich (Sambrook *et al.*, 1989). Die Dauer der Elongation richtete sich hingegen nach der Länge des zu amplifizierenden Fragments und wurde bei 72 °C, im Fall von GC reichen Amplifikaten bei 68 °C ausgeführt.

Es wurden je nach Fragestellung drei unterschiedliche DNA anhängige DNA Polymerasen verwendet. Im Fall von analytischen PCR Reaktionen wurde die *Taq DNA Polymerase* (Qiagen, Hilden) ohne Fehlerkorrektur benutzt. Bei der Amplifikation längerer Bereiche und zur Erstellung interner Fragmente zur Deletion oder Inaktivierung von Genen wurde das *Expand High Fidelity PCR System* (Roche Diagnostics, Mannheim) eingesetzt. Zur Synthese ganzer Gene zur Überexpression oder zur Komplementation von Inaktivierungsmutanten kam

ausschließlich die *KOD Hot Start DNA-Polymerase* zum Einsatz (Novagen, Darmstadt). Die beiden letztgenannten PCR Systeme zeichnen sich durch eine 3' → 5' Exonukleaseaktivität aus, die in der Lage ist, etwaige Sequenzfehler zu korrigieren (Barnes, 1994). Die Verwendung der Enzyme richtete sich nach den Angaben der einzelnen Hersteller. Nach Beendigung der PCR Reaktionen wurden die gesamten Ansätze in 1 oder 2 % TAE Agarosegelen aufgetrennt und die DNA aus dem Gel eluiert.

3.6 DNA Sequenzierung und computergestützte Sequenzanalyse

Alle DNA Sequenzierungen wurden nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* (1977) bei den Firmen *MWG Biotech AG* (Ebersberg) oder *AGOWA* (Berlin) durchgeführt. Die so erhaltenen DNA Sequenzen wurden mit dem Programm *Clone Manager 5 for Windows* (Version 5.02; Scientific & Educational Software) analysiert, wodurch auch Restriktionsschnittstellen und offene Leseraster identifiziert werden konnten. Zudem wurden mit diesem Programm Plasmidkarten der konstruierten Vektoren erstellt (siehe Anhang).

Datenbanken zur Suche nach DNA- und Proteinsequenzen mit Ähnlichkeiten zu den in dieser Arbeit untersuchten Sequenzen wurden sowohl am *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, Washington, USA) mit den Programmen *BLASTN*, *BLASTX* und *BLASTP* (Altschul *et al.*, 1997) als auch mit Hilfe von *ERGO* (Integrated Genomics, Chicago, USA) durchgeführt. Der Sequenzvergleich von Proteinen untereinander erfolgte mit dem *Multiple Sequence Alignment* Programm *ClustalW.1.8* (Jeanmougin *et al.*, 1998).

3.7 Konstruktion und Nachweis von Integrations- und Deletionsmutanten bei *Corynebacterium glutamicum*

Zur Inaktivierung von Genen durch Insertionsmutagenese wurden Derivate des in *C. glutamicum* nicht replizierbaren Vektors *pK18mob* erstellt, die ein internes Fragment von ca. 400 – 500 bp Länge des zu inaktivierenden Gens trugen (Schwarzer und Pühler, 1991). Nach Einbringen des Plasmids mittels Elektro-

poration wurden durch Selektion auf die durch das Plasmid vermittelte Antibiotikaresistenz Integrationsstämme isoliert.

Die Herstellung der Deletionsmutanten von *C. glutamicum* erfolgte nach der von Schäfer *et al.* (1994) etablierten Methode mit dem Plasmid pK19*mobsacB*. Dazu wurden mittels *cross-over* PCR (Link *et al.*, 1997) Deletionskonstrukte hergestellt (Primersequenzen siehe Anhang), die ein DNA Fragment mit der gewünschten Deletion und dessen homologen Nachbarbereiche enthielten. Diese Fragmente wurden dann in die multiple Klonierungsstelle (MCS) von pK19*mobsacB* eingefügt. Da auch pK19*mobsacB* in *C. glutamicum* nicht replizierbar ist, wurden nach Einbringen des Plasmids durch Elektroporation und anschließender Selektion auf die durch das Plasmid vermittelte Kanamycinresistenz Klone isoliert, in denen das Plasmid durch homologe Rekombination in das Chromosom integriert vorlag. Die Ausgliederung von pK19*mobsacB* aus dem Chromosom durch ein zweites Rekombinationsereignis, über die jetzt im Chromosom vorliegenden duplizierten DNA Bereiche erfolgte, indem die Zellen im BHIS Komplexmedium ohne Kanamycin kultiviert wurden. Anschließend wurde die Kultur auf BHIS Agarplatten mit 10 % Saccharose (w/v) ausplattiert. Durch die von *sacB* kodierte Levan-Sucrase wird Saccharose zu Levan polymerisiert was zu einer induzierten Lethalität führt (Bramucci *et al.*, 1996). Dadurch konnten nur solche Klone wachsen, die das Plasmid verloren hatten. Bei diesen Saccharose-resistenten und Kanamycinsensitiven Klonen war entweder die genetische Wildtypsituation wieder hergestellt oder die gewünschte Deletion entstanden. Dies wurde durch PCR-Analysen unter Verwendung von außerhalb des Konstruktes bindenden Primern (Sequenzen siehe Anhang) und durch Southernblot-Analysen ermittelt. Zur Southernblot-Analyse (Southern, 1975) wurde die genomische DNA der entsprechenden Stämme isoliert und ca. 5 µg mit der Restriktionsendonuklease BstEII gespalten. Nach Auftrennung der genomischen DNA Fragmente in einem 1 % Agarosegel wurden diese mittels Vakuumblot (2016 Vacugene, LKB, Bromma) auf eine *Nytran NY13N* Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schüll, Dassel) transferiert (Southern, 1975). Die Sonden zum Nachweis bestimmter DNA Fragmente wurden durch die Spaltung der entsprechenden Gene, vorliegend in pUC18 Vektoren, durch jeweils zwei Restriktionsendonukleasen erhalten. Dafür wurden folgende Paarungen von Restriktionsenzymen verwendet: *accD1*: SacI mit BglII, *accD2*: PvuII mit SgrAI, *accD3*: ClaI mit StuI, *accD4*: SfiI mit PvuI. Im Fall der Deletion

des Polyketidsynthase existierten keine brauchbaren Restriktions-schnittstellen, hier wurde ein durch PCR amplifiziertes 645 bp großes Fragment (Primer siehe Anhang) des *pks* Gens als Sonde verwendet. Die Markierung der so erstellten DNA Fragmente mit Digoxigenin, Hybridisierung, Waschen und Detektion erfolgte mit dem *DIG-Chem-Link Labeling and Detection Set* (Roche Diagnostics, Mannheim) nach entsprechenden Herstellerangaben.

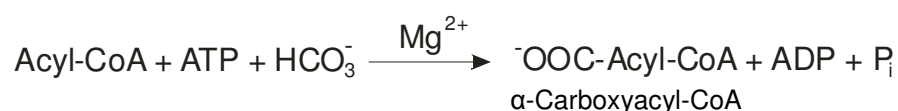
4 Messung von Enzymaktivitäten

4.1 Herstellung zellfreier Rohextrakte

Zur Herstellung zellfreier Rohextrakte, die zur Messung der Acetyl-CoA Carboxylaseaktivitäten eingesetzt wurden, erfolgte die Kultivierung der Stämme in 100 ml CgIII Medium unter Standardbedingungen. Die Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase bei einer optischen Dichte zwischen 8 und 11 geerntet, einmal mit 0,9 % NaCl gewaschen, in 0,7 ml Reaktionspuffer (60 mM Tris/HCl pH 7,2) aufgenommen und in 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen im Ultraschall-disintegrator (*Branson Sonifier W-250*, Branson Sonic Power, Danbury, USA) für 10 min auf Ultraschallstufe 20 und 20 % Pulsmodus auf Eis aufgeschlossen. Durch Zentrifugation (13.000 g, 30 min, 4 °C) wurden Zelltrümmer und intakte Zellen aus dem Rohextrakt entfernt und der zellfreie Überstand direkt zur Messung von Enzymaktivitäten eingesetzt.

4.2 Bestimmung der Acetyl-CoA Carboxylaseaktivität zellfreier Rohextrakte

Acyl-CoA Carboxylasen katalysieren die irreversible Carboxylierung von Acyl-CoA Derivaten, beispielsweise Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA in Abhängigkeit von ATP und HCO_3^- :



Die Bestimmung der spezifischen Enzymaktivitäten wurde in Anlehnung an eine Methode von Kimura *et al.* (1998) in einem diskontinuierlichen Enzymtest mit folgendem Reaktionsansatz durchgeführt:

60 mM Tris/HCl pH 7,2
65 mM KHCO₃
1 mM ATP
1,5 mM MgCl₂
3 – 4 mg Protein (Rohextrakt)
2 mM Substrat (Acetyl-CoA, Na-Salz, Roche)
ad 500 µl H₂O

Der Reaktionsansatz wurde 1 min bei 30 °C vorinkubiert und die Reaktion durch die Substratzugabe gestartet. Nach einer Inkubationszeit von 1, 2, 3, 5 und 10 min wurden dem Ansatz je 100 µl entnommen, die Reaktion sofort durch den Zusatz von 10 µl 30 % Perchlorsäure (v/v) gestoppt, und die gefällten Proteine durch Zentrifugation (14.000 g, 5 min, 4 °C) entfernt. 50 µl des Überstandes wurde durch Übetragung in 12,5 µl einer 1 M Na₂CO₃ Lösung auf pH 5,0 eingestellt und bis zur HPLC Analyse bei -20 °C gelagert.

4.3 Quantitative Bestimmung von CoA und CoA-Derivaten mittels *reversed-phase* HPLC

Die quantitative Bestimmung von CoA und CoA-Derivaten erfolgte mittels *reversed-phase* Chromatographie (Jones and Gillian, 1983) in der HPLC *Serie 110* der Firma Agilent Technologies (Böblingen) nach einer modifizierten Methode von Wendisch *et al.* (1997) sowie King und Reiss (1985). Die CoA Verbindungen wurden aufgrund ihrer unterschiedlichen Hydrophobizitäten auf einer *LiChrospher 100 RP 18-EC-5µ* Säule (125 x 4 mm, Merck, Darmstadt) bei 40 °C getrennt und im UV-Bereich bei einer Wellenlänge von 254 nm durch einen Multiwellenlängen-detektor (G1365A) der HP *Serie 1100* detektiert. Zur Trennung von Malonyl-CoA

und CoA bzw. Acetyl-CoA und adenosinhaltigen Metaboliten wurden jeweils 12 µl der Probe automatisch injiziert und folgender Gradient aus Natriumphosphatpuffer (50 mM; pH 5,0) und Acetonitril erzeugt: 0 – 27 min linear zunehmender Gradient von 2 % auf 26 % Acetonitril (v/v) mit einer Flussrate von 0,3 ml/min, 27 – 28 min linear abnehmender Gradient auf 2 % Acetonitril (v/v) mit einer Flussrate von 0,8 ml/min und 28 – 32 min konstant bleibend mit einer Flussrate von 0,8 ml/min. Als Mengenstandards wurden 0,1; 0,25; 0,5 und 1,0 mM Lösungen von CoA, Acetyl-CoA und Malonyl-CoA in 0,2 M Natriumphosphatpuffer pH 3,0 einzeln oder in einem 0,2 mM Gemisch eingesetzt. Die Retentionszeiten für Malonyl-CoA betrugen etwa 9,60 min, für CoA 13,30 min und für Acetyl-CoA 14,43 min.

5 Proteinbiochemische Methoden

5.1 Herstellung zellfreier Rohextrakte zur Isolierung von Proteinen

Zur Aufreinigung von Proteinen und Proteinkomplexen wurden zellfreie Rohextrakte der in Tabelle 3 aufgelisteten Stämme erstellt.

Außer bei der Überexpression von *accBC* in *C. glutamicum* erfolgten alle Kultivierungen der Stämme in 500 ml LB Medium. Die Kulturen wurden mit einer optischen Dichte von 0,2 beimpft und bei 30 °C mit 100 rpm inkubiert bis eine optische Dichte von 1,0 erreicht wurde. Die Expression der entsprechenden Gene wurde dann durch Zugabe von 100 µM IPTG induziert und die Zellen bis zu einer optischen Dichte von 3 unter den oben genannten Bedingungen kultiviert. Im Fall der Überexpression von *accBC* wurden 500 ml CgIII mit einer optischen Dichte von 0,5 beimpft und bei 30 °C mit 100 rpm inkubiert bis eine optische Dichte zwischen 9 und 11 erreicht wurde. Da das *accBC* Gen unter der Kontrolle des nativen Promotors stand, war eine Induktion mit IPTG nicht notwendig. Die durch Zentrifugation geernteten Zellen (6000 g, 30 min, 4 °C) wurden in 5 ml des vom Hersteller der Säulenmaterialien angegebenen Lysispuffers resuspendiert und in 5 ml Glashörnchen durch Ultraschall (*Branson Sonifier W-250*, Branson Sonic Power, Danbury, USA) aufgeschlossen (6 min, Pulslänge 100 %, Ultraschallstufe

2,5). Der so erhaltene Rohextrakt wurde zur Abtrennung von Zelltrümmern und nicht aufgeschlossenen Zellen zentrifugiert (15.000 g, 30 min, 4°C) und das Zielprotein direkt chromatographisch gereinigt.

Tabelle 3: Die zur Reinigung verschiedener Proteine und deren Komplexe verwendete Stämme. Die entsprechenden Gene wurden entweder homolog in *C. glutamicum* (*C.g.*) oder heterolog in *E. coli* (*E.c.*) überexprimiert.

Stamm	gereinigtes Protein	Referenz	Medium
<i>C. g.</i> Δpyc pJC1 <i>accBC</i>	α -Untereinheit der Acyl-CoA Carboxylase (AccBC)	Peters-Wendisch <i>et al.</i> , 1998	CgIII
<i>C. g.</i> Δpyc pJC1 <i>accBC</i> pEKEEx3_RBS_H ₆ <i>accD3</i>	Acyl-CoA Carboxylase Komplex	diese Arbeit	LB
<i>C. g.</i> Δpyc pJC1 <i>accBC</i> pEKEEx3_RBS_H ₆ <i>accD2</i>	Acyl-CoA Carboxylase Komplex	Heseler, 2005	LB
<i>C. g.</i> pEKEEx3_RBS_H ₆ <i>pks</i>	Polyketidsynthase (Pks)	diese Arbeit	LB
<i>E. c.</i> DH5 α pEKEEx5_ <i>fadD</i>	Acyl-AMP Ligase (FadD)	diese Arbeit	LB
<i>E. c.</i> pREP4 pQE30_ <i>dtsR2</i>	β -Untereinheit der Acyl-CoA Carboxylase (AccD2)	Tilg, 2002	LB

5.2 Proteinbestimmung und SDS Polyacrylamidgelelektrophorese

Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Lösung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach einer von Bensadoun und Weinstein (1976) entwickelten Methode. Dabei wurden verschiedene Verdünnungen des Proteinextraktes mit einem Kupferreagenz versetzt, durch das Proteinkonzentrationen von 2,5 bis 12,5 $\mu\text{g/ml}$ quantitativ nachgewiesen werden konnten. Diese Methode beruht auf einer Farbreaktion des Kupfers, bei der die Reduktion des oxidierten, bläulichen Kupferkomplexes (Cu^{2+}) zu einem violettem Kupferkomplex (Cu^{+}) bei

einer Wellenlänge von 680 nm spektralphotometrisch bestimmt wurde. Als Standard wurden für jede Messreihe 2,5; 5; 7,5; 10 und 12,5 µg BSA, gelöst in 1 ml Wasser, eingesetzt. Zur Quantifizierung noch geringerer Proteinmengen erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung mit anschließendem Vergleich der Bandenintensität mit Standardproteinen bekannter Konzentration (Mark 12; Invitrogen).

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Trennung von Proteinen in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht unter denaturierenden Bedingungen erfolgte diskontinuierlich in 10 bzw. 12 % Bis-Tris Polyacrylamidgelen (Fling und Gregerson, 1986) des *NuPAGE* Systems (NOVEX Elektrophoresis, Frankfurt). Die Elektrophorese wurde entweder in dem vom Hersteller angegebenen MES-SDS (50 mM MES; 50 mM Tris pH 7,7; 1 % SDS; 1 mM EDTA) oder MOPS-SDS (50 mM MOPS; 50 mM Tris pH 7,7; 1 % SDS; 1 mM EDTA) Puffer über 1,5 h bei einem Strom von maximal 60 mA in einer *XCell II Mini-Cell* (NOVEX Elektrophoresis, Frankfurt) durchgeführt. Zur Detektion wurden die Proteine in einer *Serva-Blau* Färbelösung (0,05 % Coomassie Brilliant Blau R-250 (w/v); 25 % Isopropanol (v/v); 10 % Essigsäure (v/v)) für über 1 h gefärbt und anschließend mit 10 % Essigsäure differenziert (Meyer *et al.*, 1965). Zur Färbung von schwachen Proteinbanden, unterhalb der Nachweisgrenze der *Serva-Blau* Färbemethode, wurde das *Silver Stain Plus Kit* (Biorad, München) eingesetzt. Das Vorgehen zur Silberfärbung richtete sich nach den Angaben des Herstellers. Zur Größen- und Mengenabschätzung der Proteinbanden wurden jeweils 5 µl des Molekulargewichtsstandard *Mark 12* oder des bereits vorgefärbten Größenstandards *SeeBlue* (beide NOVEX Elektrophoresis, Frankfurt) genutzt.

5.3 Isolierung biotinhaltiger Proteine durch Avidinaffinitätschromatographie

Das einzige in dem Stamm *C. glutamicum* Δpyc pJC1*accBC* exprimierte biotinylierte Protein, AccBC, wurde durch Avidinaffinitätschromatographie (Cronan Jr., 1990) mit dem *SoftLink Soft Release Avidin Resin* (Promega, Mannheim), einem

Adsorber mit kovalent gebundenem, monomeren Avidin und dem *ÄKTA Basic 100* FPLC System (GE Healthcare, Frankfurt) isoliert. Mit diesem Material wurde eine Säule mit einem Bettvolumen von 1 ml gepackt und die irreversiblen Bindestellen des Avidinmaterials mit freiem Biotin nach Herstellerangaben abgesättigt. Reversibel bindendes Biotin wurde im Anschluss durch Denaturierung (10 % Essigsäure (v/v)) und Renaturierung (0,1 M Natrium-Phosphatpuffer pH 6,8) des Avidins entfernt. Vor dem Probenauftrag wurde die Säule mit Probenpuffer (100 mM Tris/HCl pH7,6; 150 mM NaCl; 1 mM MgSO₄; 0,5 mM DTT; 20 % Glycerin (v/v)) bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,1 ml/min äquilibriert und der Rohextrakt mit gleicher Flussrate aufgetragen. Nach dem Waschen mit 3 ml Probenpuffer wurden die spezifisch an der Säule gebundenen Proteine durch 1 ml Probenpuffer mit 5 mM Biotin eluiert. Die Proteinlösungen wurden mittels *AMICON Centriprep YM-30* Ultrafiltrationseinheiten (Millipore, Eschborn) auf 500 µl aufkonzentriert und bei -20 °C gelagert.

5.4 Isolierung von Histidin Fusionsproteinen über Ni-NTA Affinitätschromatographie

Proteinreinigung mittels des ÄKTA FPLC Systems

Alle monomeren Proteine wurden über das *ÄKTA Basic 100 System* (GE Healthcare, Freiburg) unter Verwendung einer *HisTrapFF* 1 ml Säule (Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden) separiert. Zur Reinigung von Proteinkomplexen erwiesen sich in Hinblick auf die Komplexstabilität „Tropfsäulen“ (Qiagen, Hilden) als vorteilhafter. Die Isolierung erfolgte in beiden Fällen über die Interaktion einer dem Zielprotein angehängten Peptidsequenz bestehend aus sechs Histidin Resten und immobilisierter Nickel-Nitrilessigsäure (Porath *et al.*, 1975). Das über Nitrilessigsäure an Sepharose oder Agarose gebundene Nickelion diente als Chelatbildner mit zwei freien Ligandenbindestellen. Durch Komplexierung der Histidinimidazolringe konnten pro Nickelion zwei Fusionsproteine spezifisch gebunden werden (Hochuli, 1989; Janknecht *et al.*, 1991).

Bei der Isolation von Proteinen mittels des ÄKTA Systems wurde die Säule vor dem Probenauftrag mit 5 Säulenvolumen Lysispuffer (20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4; 500 mM NaCl; 10 mM Imidazol) mit einer Flussrate von 1 ml/min äquilibriert. Der Probenauftrag erfolgte anschließend mit einer auf 0,1 ml/min reduzierten Fliessgeschwindigkeit um eine möglichst lange Kontaktzeit zwischen Fusionsprotein und Säulenmatrix zu gewährleisten. Nur so konnte eine annähernd vollständige Bindung des Zielproteins erfolgen. Anschließend wurde über einen 15 Säulenvolumen andauernden Waschschrift (Waschpuffer: 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4; 500 mM NaCl; 20 mM Imidazol) bei einer Flussrate von 0,5 ml/min unspezifisch an dem Säulenmaterial haftende Proteine entfernt. Die spezifisch gebundenen Fusionsproteine wurden in einem letzten Schritt durch einen Gradienten über 10 Säulenvolumen mit einer Flussrate von 0,5 ml/min und einer Endkonzentration von 250 mM Imidazol entfernt. Durch die Gradientenelution konnten eventuell vorhandene Verunreinigungen vor der eigentlichen Elution des Zielproteins von der Säule entfernt werden. Die das Zielprotein enthaltenen Fraktionen wurden vereinigt, mit *AMICON Centriprep YM-30* Ultrafiltrationseinheiten (Millipore, Eschborn) auf 2,5 ml konzentriert, um anschließend mittels PD10 Säulen (Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden) auf den Lagerpuffer (100 mM Tris/HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 1 mM MgSO₄; 0,5 mM DTT; 20 % Glycerin (v/v)) eingestellt zu werden. Die so umgepufferten Proteinlösungen wurden erneut auf ca. 500 µl eingeeengt und als 100 µl Aliquots bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Proteinreinigung über Ni-NTA Agarose

Für die Reinigung des Acyl-CoA Carboxylasekomplexes aus *C. glutamicum* fanden selbst gepackte Ni-NTA Agarose „Tropfsäulen“ mit 1 ml Bettvolumen (Janknecht *et al.*, 1991; Qiagen, Hilden) Verwendung. Die Aufreinigungsprozedur richtete sich nach dem *QIAexpressionist* 01/2003 (Qiagen, Hilden). Dazu wurden die Säule mit 5 ml Lysispuffer (50 mM Natriumphosphatpuffer pH 8,0; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol) äquilibriert und im Anschluss der zellfreie Rohextrakt aufgetragen. Um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, wurde die Säule mit 8 ml Waschpuffer (50 mM Natriumphosphatpuffer pH 8,0; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol) gewaschen und die spezifisch an der Säule haftenden

Fusionsproteinkomplexe mit 1,5 ml Elutionspuffer (50 mM Natriumphosphatpuffer pH 8,0; 300 mM NaCl; 100 mM Imidazol) von der Säule entfernt. Die so gereinigten Proteinkomplexe wurden über PD10 Säulen (Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden) auf Lagerpuffer (100 mM Tris/HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 1 mM MgSO₄; 0,5 mM DTT; 20 % Glycerin (v/v)) eingestellt, mittels *AMICON Centriprep YM-30* Ultrafiltrationseinheiten (Millipore, Eschborn) auf ca. 500 µl eingeeengt und als 100 µl Aliquots bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

5.5 Bestimmung der Größe von Proteinkomplexen durch Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie wurde zur Bestimmung der nativen Größe des Acyl-CoA Carboxylasekomplexes und zur weiteren Aufreinigung des Pks Proteins nach Ni-NTA Affinitätschromatographie verwendet (Cruft, 1961). Alle Untersuchungen wurden mit einer *HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade* Säule (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) und einem *ÄKTA Basic 100* (GE Healthcare, Freiburg) durchgeführt. Die Kalibrierung erfolgte mit Hilfe des *Molecular Weight Gel Filtration Kit* (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) mit folgenden Proteinen: Aldolase (158 kDa), Katalase (232 kDa), Ferritin (440 kDa) und Thymoglobulin (669 kDa). Um auch den Massenbereich unter 158 kDa abzudecken wurde pro Lauf zusätzlich 0,5 mg BSA (66 kDa) zugesetzt. Bei allen Anwendungen wurde ein Tris/HCl Puffer zur Äquilibration und als Laufpuffer verwendet (100 mM Tris/HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 1 mM MgSO₄; 0,5 mM DTT). Für die Trennung wurden jeweils 200 µl der über Ni-NTA gereinigten Proteine mit einer Konzentration von 2 - 3 µg/µl injiziert und isokratisch mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min bei 4 °C über die Säule aufgetrennt. Der Säulendurchfluss wurde für die anschließende Elektrophorese in 5 ml Fraktionen gesammelt. Die Molekulargewichte der zu testenden Proteine und Proteinkomplexe wurden dann durch den Vergleich des gemessenen Elutionsvolumens mit denen der Standardproteine berechnet. Die erhaltenen Chromatogramme wurden im *UNICORN Evaluation Programm 5.0* (GE Healthcare, Freiburg) bearbeitet und ausgewertet.

5.6 Identifizierung von Proteinen mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie und Datenbankvergleich

Die Identifizierung von Proteinen erfolgte mittels Peptidmassen-„Fingerprint“-Analyse (Fountoulakis und Langen 1997; Nouwens *et al.*, 2000; Schaffer *et al.*, 2001). Dazu wurden die Banden aus den SDS-Gelen entfernt, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, zweimal für je 15 min in 30 % Acetonitril (v/v) in 0,1 M NH_4HCO_3 gewaschen und für 20 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Zur Rehydrierung wurden die Gelstücke für 30 min in 2 μl 3 mM Tris/HCl pH 8,8 mit 10 ng/ μl Trypsin (Promega, Mannheim) inkubiert. Anschließend wurden 4 μl 3mM Tris/HCl pH 8,8 ohne Trypsin hinzugefügt und die Proben über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Elution der tryptisch gespaltenen Peptide aus der Gelmatrix erfolgte durch Inkubation mit 9 μl Wasser für 15 min, gefolgt von der Zugabe von 7,5 μl 30 % Acetonitril (v/v) in 0,1 % Trifluoressigsäure (w/v) und weiteren 10 min Inkubation bei Raumtemperatur. Die Proben wurden entweder bis zur Messung bei -20 °C gelagert oder direkt zur Massenspektrometrie eingesetzt.

Zur MALDI-TOF-MS Analyse wurden 0,5 μl Probe in 0,5 μl Matrix (α -Cyano-4-hydroxy-trans-zimtsäure in 50 % Acetonitril (v/v) und 0,25 % Trifluoressigsäure (w/v)) auf einer Probenplatte kokristallisiert (Vorm *et al.*, 1994). Die Kalibrierung erfolgte mittels des *Sequazyme Peptide Mass Standard Kits* (Applied Bioscience, Weiterstadt). Die eigentliche Messung erfolgte in einer *Voyager-DE STR Biospectrometry Workstation* (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA). Zur Steuerung des Gerätes, zur Datenaufnahme und -analyse wurde die *Voyager Control Panel Software 5.0* und die *Voyager Data Explorer Software 3.5* (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA) verwendet. Monoisotopische Peptidmassen wurden mit den theoretischen Massen der durch das corynebakterielle Genomprojekt zugänglichen Datenbank tryptisch geschnittener Peptide mittels des Programms *MSFit* (University of California, San Francisco, USA) verglichen und ausgewertet. Eine sichere Identifizierung wurde angenommen, wenn mindestens vier Peptidmassen mit den für ein bestimmtes Protein vorhergesagten Fragmentmassen übereinstimmten und die Unterschiede zwischen gemessener und theoretischer Masse maximal 100 ppm betrugen.

6 Extraktion, Fraktionierung und Analyse ^{14}C -markierter Lipide

6.1 Analyse der freien Lipide

Zur Analyse der Lipidzusammensetzung der Zellen standen nur geringe Substanzmengen zur Verfügung. Deshalb erfolgte eine radioaktive Markierung der Fettsäuren um die Nachweisgrenze bei der Detektion zu erniedrigen. Für die eigentliche Markierung wurden die einzelnen Stämme in Anwesenheit von uniform ^{14}C -markiertem Acetat kultiviert (Thorne und Kalicek, 1962). Dazu wurden 5 ml BHIS Medium mit den zu untersuchenden Stämmen beimpft und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Von dieser Vorkultur wurden 200 µl entnommen, damit eine frische CgXII oder BHIS Kultur zu je 5 ml beimpft und bis zu einer optischen Dichte von 0,4 unter Standardbedingungen inkubiert. Durch Zugabe von 5 µCi/ml [^{14}C]Acetat (2,29 GBq/mmol; Amersham Biosciences) wurde die Markierung gestartet. Nach weiteren 4 h Inkubation zur Inkorporierung des radioaktiv markierten Substrats, wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (6.000 g, 10 min, RT) und die freien Lipide extrahiert. Dazu wurde das Zellpellet zweimal mit je 2 ml $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (10:10:3, v/v/v) für 3 h bei 50 °C inkubiert. Beide Extrakte wurden vereinigt, mit 1,75 ml CHCl_3 und 0,75 ml Wasser ausgeschüttelt und zur Phasentrennung zentrifugiert (3.000 g, 10 min, RT). Die untere, organische Phase wurde entnommen und zweimal mit 2 ml $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (3:47:48, v/v/v) gewaschen, die resultierende organische Phase unter einem Luftstrom getrocknet und in 200 µl $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (10:10:3, v/v/v) resuspendiert. Um die Menge der in diesem Extrakt vorhandenen radioaktiven Substanzen zu bestimmen, wurden 10 µl der Lipidlösung mit 2 ml *Instant Scint Gel plus* (Perkin Elmer, Boston, MA, USA) vermischt und die Radioaktivität im *Liquid Scintillation Analyzer TRI-CARB 1600CA* (Packard Instrument Company, Meriden, CT, USA) quantitativ gemessen. Von den Extrakten wurden 20.000 cpm zur Trennung des Lipidgemischs auf eine *Silica Gel 60 F₂₅₄* Dünnschichtchromatographie Platte (Merck, Darmstadt) aufgetragen und mit $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (60:16:2, v/v/v) für 30 min entwickelt. Die Detektion der so getrennten Lipide erfolgte durch Autoradiographie (*X-Omat AR* Film Kodak, Stuttgart) mit einer Exposition von 2 bis 3 Tagen bei Raumtemperatur.

Die detektierten Signale wurden mit dem Laufverhalten bekannter Standards verglichen.

6.2 Analyse der kovalent gebundenen Lipide

Die kovalent gebundenen Lipide wurden mittels chemischer Verseifung der bereits partiell entfetteten Zellen aus Abschnitt 6.1 durch die Inkubation des Zellpellets in 2 ml einer 5 % Tetrabutylammoniumhydroxid (TBAH) Lösung (v/v) über Nacht bei 95 °C freigesetzt (Takayama und Armstrong, 1976). Nach Abkühlen der Lösung auf Raumtemperatur wurde zur Methylierung der freigesetzten Fettsäuren 500 µl CH₃I, 2 ml H₂O und 4 ml CH₂Cl₂ hinzugefügt und 30 min gemischt. Nach Zentrifugation zur Phasentrennung (3.000 g, 10 min, RT) wurde die organische Phase entnommen und dreimal mit je 4 ml H₂O gewaschen, unter einem Luftstrom getrocknet und in 4 ml Diethylether im Ultraschallbad resuspendiert. Nach Zentrifugation (3.000 g, 10 min, RT) wurde die klare, etherische Phase entfernt, erneut unter einem Luftstrom getrocknet und die Lipide in 200 µl CH₂Cl₂ resuspendiert (Young, 1980; Besra *et al.*, 1996). 10 µl der Lösung wurde zur Bestimmung der inkorporierten ¹⁴C-Menge im Szintillationszähler analysiert. Ein Aliquot, das einer Radioaktivität von 10.000 cpm entsprach, wurde auf *Silica Gel 60 F₂₅₄* Dünnschichtchromatographie Platten (Merck, Darmstadt) aufgetragen und in Petrolether/Aceton (95:5, v/v) für 30 min entwickelt. Die Detektion der markierten Fettsäuren und Fettsäuremethylester erfolgte durch Autoradiographie wie bereits beschrieben.

III ERGEBNISSE

1 Sequenzanalyse der paralogen Acyl-CoA Carboxyltransferasen aus *C. glutamicum*

Acetyl-CoA Carboxyltransferasen sind bei der klassischen Fettsäuresynthese für die Bildung von Malonyl-CoA, das durch die Carboxylierung von Acetyl-CoA bereitgestellt wird, notwendig (Waite *et al.*, 1962). Diese Enzyme besitzen eine biotinhaltige α -Untereinheit und eine biotinfreie β -Untereinheit, wobei letztere die eigentliche Carboxyltransferase darstellt. *C. glutamicum* besitzt vier unterschiedliche Carboxyltransferase β -Untereinheiten (Kalinowski *et al.*, 2003), seine engen Verwandten *C. efficiens* und *C. diphtheriae* besitzen fünf (Cerdeno-Tarraga *et al.*, 2003; Nishio *et al.*, 2003), *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* und *M. marinum* sogar sechs (Cole *et al.*, 1998; Garnier *et al.*, 2003). Um funktionelle und strukturelle Gemeinsamkeiten der in *C. glutamicum* vorhandenen Paralogen aufzudecken, wurden zu Beginn dieser Arbeit zunächst phylogenetische Untersuchungen durchgeführt. Die Sequenzidentitäten der einzelnen Carboxyltransferasen sind innerhalb eines Organismus nicht nur auf Aminosäure- sondern selbst auf Nukleotidebene sehr hoch. Zum Beispiel besitzen *accD1* und *accD2* in *M. tuberculosis* eine Sequenzidentität von 49 % auf Nukleotidebene und selbst das unterschiedlichste Paar, *accD1* und *accD3*, zeigt immer noch eine Identität von 22 % (nicht gezeigt).

Um den phylogenetischen Zusammenhang der β -Untereinheiten der Acyl-CoA Carboxylasen innerhalb der *Corynebacteriaceae* zu untersuchen, wurden die Aminosäuresequenzen von 35 Carboxyltransferase-Polypeptiden aus den bereits sequenzierten *Corynebacteriaceae* mit dem Computerprogramm *ClustalW* (Pearson *et al.*, 1990) untereinander verglichen. Das so erstellte Phylogramm ist in Abbildung 3 dargestellt, in dem einige bemerkenswerte Besonderheiten erkennbar sind.

Auffallend ist die Bildung phylogenetischer Gruppen, in denen orthologe Proteine mit möglicherweise ähnlicher oder sogar identischer Funktion vorliegen. Dabei

bilden I und II die Gruppen mit der engsten Verwandtschaft zueinander. In ihnen ist jeder untersuchte Organismus mit nur einer Carboxyltransferase vertreten. Hier befinden sich auch die beiden vollständig erhaltenen Carboxyltransferasen aus *M. leprae*. Seine restlichen Paraloge liegen in Form funktionsloser Pseudogene vor, bei denen die Transkription durch ein inseriertes Stopp Codon vorzeitig abbricht. Dies ergibt ein verkürztes und funktionsloses Polypeptid (Cole *et al.*, 2001). Der Verlust bestimmter enzymatischer Funktionen steht vermutlich mit der engen Pathogen/Wirt Beziehung zwischen *M. leprae* und dem Menschen in Zusammenhang, da das Bakterium durch seinen Wirt mit allen notwendigen Metaboliten, wie u.a. Fettsäuren und ihrer Derivate versorgt wird. Die Proteine in Gruppe I und II sind also wahrscheinlich an der Synthese von Metaboliten oder Intermediaten beteiligt, die nicht im Wirtsorganismus vorhanden sind. Dabei könnte es sich beispielsweise um Mycolsäuren, ihre Derivate oder Vorstufen davon handeln (Kremer *et al.*, 2000). In den phylogenetischen Clustern I und II finden sich auch die Proteine AccD2 und AccD3 aus *C. glutamicum*, die hier sicherlich von fundamentaler Bedeutung sind.

In Gruppe III ist AccD4 aus *C. glutamicum* lokalisiert. Dieses phylogenetische Cluster zeigt eine geringere Ähnlichkeit zu Gruppe I und II als diese beiden Gruppen untereinander. Zusätzlich existieren drei weitere Gruppen, in denen *M. bovis* und *M. tuberculosis* jeweils einmal vertreten sind, *M. marinum* findet sich nur in zwei dieser Gruppen wieder. Die Carboxyltransferasen dieser Cluster kommen also nur in den Mycobakterien vor und üben deswegen vermutlich eine für diese Gattung spezifische Funktion aus.

Da Carboxyltransferasen für ihre Reaktion grundsätzlich eine aktivierte C₁-Einheit benötigen, die von einer biotinhaltigen α -Untereinheit zur Verfügung gestellt wird, wurde im Genom von *C. glutamicum* nach einem Protein mit einem Biotin-Bindemotiv gesucht. Dabei konnten bei *C. glutamicum* zwei dieser Proteine nachgewiesen werden. Bei dem ersten handelt es sich um die Pyruvatcarboxylase (Jäger *et al.*, 1996), bei dem zweiten um die α -Untereinheit der Acetyl-CoA Carboxylase (AccBC). Die drei *Corynebacterium* Spezies und *M. lepreae* besitzen nur eine α -Untereinheit. Im Vergleich dazu sind es bei *M. tuberculosis*, *M. bovis* und *M. marinum* jeweils drei (Cole *et al.*, 1998; Garnier *et al.*, 2003).

Es liegen also in allen untersuchten *Corynebacteriaceae* jeweils zwei paraloge Acyl-CoA Carboxyltransferasen vor, die vermutlich eine für diese Bakteriengruppe essentielle Funktion ausführen.

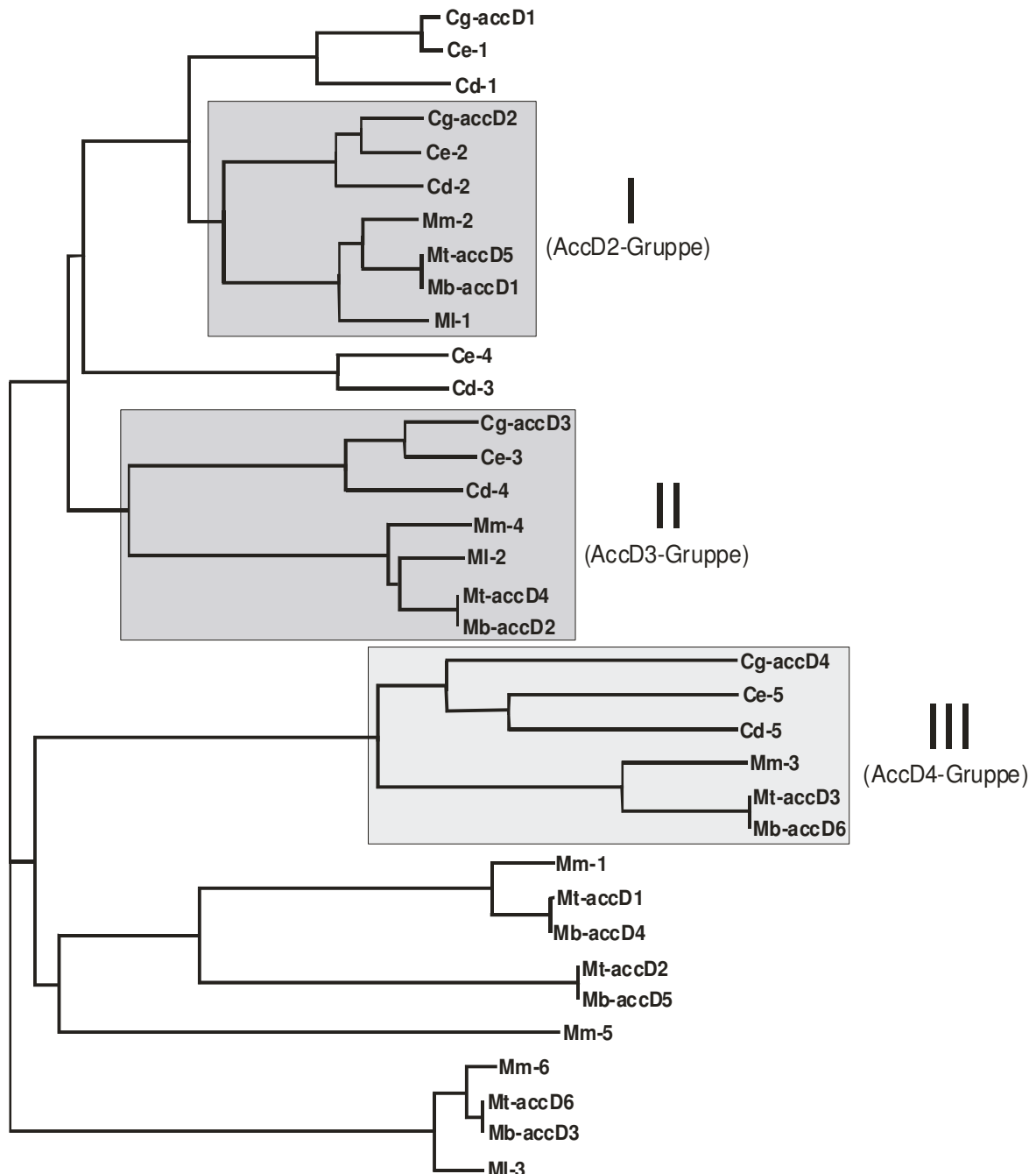


Abbildung 3: Phylogenetische Analyse der paralogen AccD Proteine aus Mycobakterien und Corynebakterien. Gruppen orthologer Carboxyltransferasen sind grau hinterlegt und mit römischen Ziffern markiert. *C. glutamicum* (Cg), *C. efficiens* (Ce), *C. diphtheriae* (Cd), *M. marinum* (Mm), *M. tuberculosis* (Mt), *M. bovis* (Mb), *M. leprae* (Ml).

2 Konstruktion und Charakterisierung definierter Carboxyltransferase Inaktivierungsmutanten von *C. glutamicum*

2.1 Inaktivierung der Acyl-CoA Carboxyltransferasen durch Vektorintegration

Um die Funktion der unterschiedlichen Carboxyltransferasen in *C. glutamicum* systematisch untersuchen zu können, wurde jedes der entsprechenden Gene mit dem pK18mob System inaktiviert (Schäfer *et al.*, 1994). Transformation von *C. glutamicum* mit einem nicht replizierbaren pK18mob Derivat, das ein 300 – 500 bp großes internes Fragment des zu inaktivierenden Gens enthielt und anschließende Selektion auf Kanamycin, erlaubte nur Klonen das Wachstum, die den Vektor über homologe Rekombination in ihr Chromosom integriert hatten. Der Integrationsort ist für die Inaktivierung von *accD1* und *accD2* in Abbildung 4A schematisch dargestellt. Es ist bekannt, dass pK18mob gelegentlich auch in Bereiche des Chromosoms mit geringerer Sequenzidentität zu dem internen Fragment als das Zielgen integriert (Mateos *et al.*, 1996). Deshalb wurde die Position des Vektors im Chromosom durch je zwei unabhängige PCR-Analysen (Primer siehe Anhang) nachgewiesen, wobei ein Primer im Bereich des integrierten Plasmids, der andere im Chromosom außerhalb des internen Fragments band. Zusätzlich erfolgte der Nachweis des Integrationsortes durch Southernblot-Analysen. Dazu wurde die genomische DNA mit der Restriktionsendonuklease BstEII gespalten, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nytran Membran transferiert. Anschließend erfolgte die Hybridisierung einer Digoxigenin markierten DNA Sonde mit dem genomischen DNA Fragment das die Vektorintegration trug (Abbildung 4A). In den Southernblot-Analysen (Abbildung 4B) zeigte eine Verschiebung der Banden um 4,0 bis 4,3 kb zu größeren Fragmenten die erfolgreiche Inaktivierung des gewünschten Gens an, wobei die Größe dieser Verschiebung der Größe des integrierten Vektors entsprach. Die unterschiedlichen Werte der Bandenverschiebung bei den einzelnen Inaktivierungsstämmen resultierten aus unterschiedlichen Vektorgrößen, hervorgerufen durch verschiedene Längen der internen Fragmente.

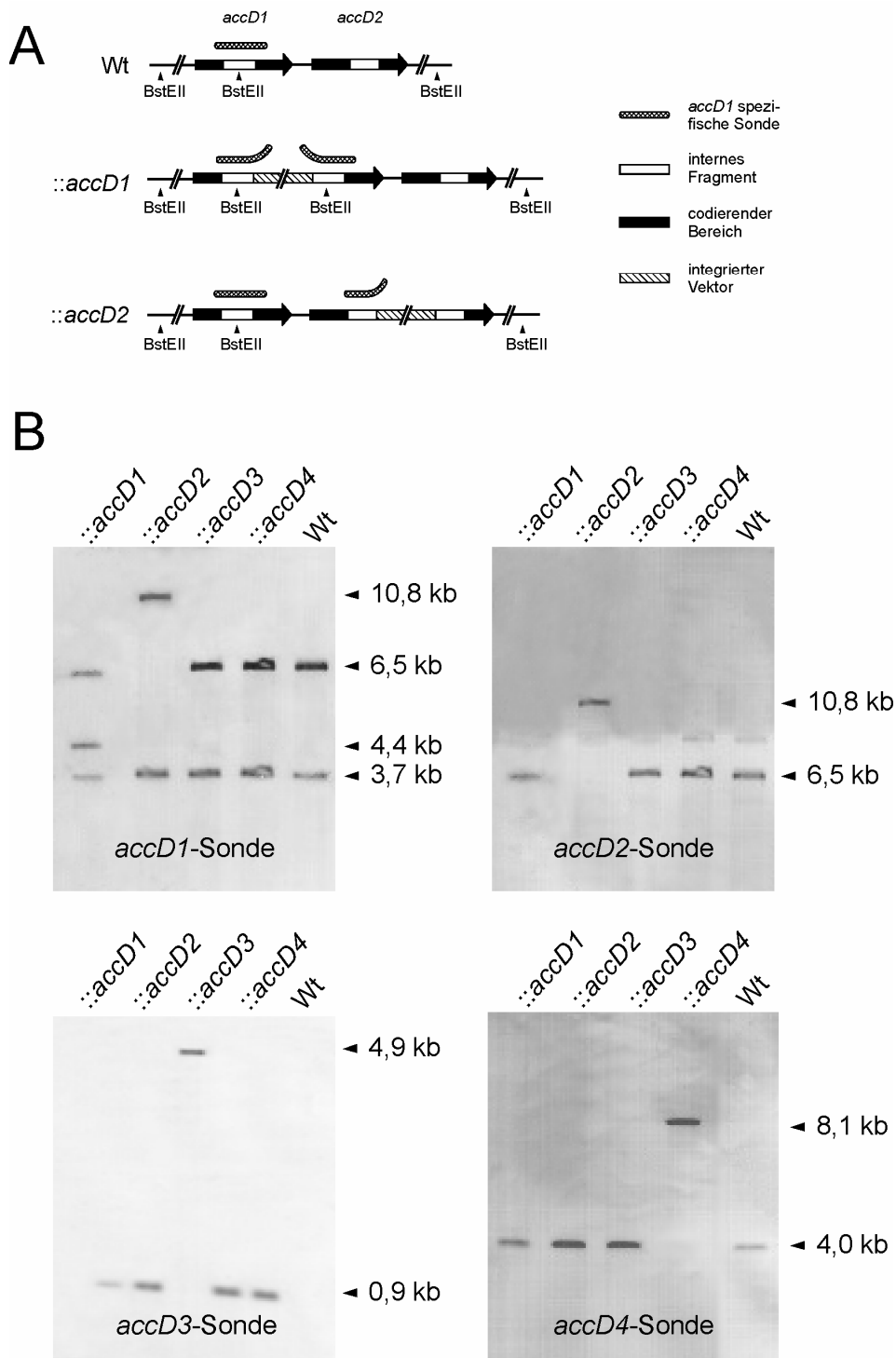


Abbildung 4: Nachweis der *accD* Inaktivierungen durch Southernblot-Analysen.

A. Schematische Darstellung der Konstruktion der Inaktivierungsmutanten am Beispiel der Gene *accD1* und *accD2*. Im oberen Teil der Abbildung ist die Wildtypsituation dargestellt. Im unteren Teil bei der Inaktivierung von *accD1* bzw. *accD2*. **B.** Darstellung der einzelnen Southernblot-Analysen. Geblottet wurde BstEII restringierte genomische DNA der einzelnen Inaktivierungsstämme (*::accD1* bis *::accD4*) und des Wildtyps (Wt). Die Zahlen neben den Einzelabbildungen geben die ermittelte Fragmentgröße in Kilobasenpaaren (kb) an. Zur Detektion wurden die im unteren Teil der einzelnen Abbildungen angegebenen Sonden verwendet.

Im Fall der *accD1* Inaktivierung (Abbildung 4B, Einzelabbildung oben links) trat eine zusätzliche Bande mit einer Größe von 4,4 kb auf. Durch die Integration von pK18*mob* in das *accD1* Gen (schwarze Rechtecke in Abbildung 4A) wurde das interne Fragment dupliziert. Dadurch entstand eine weitere BstEII Spaltstelle, wodurch der Vektor (schraffierte Rechtecke) bei der Restriktion der genomischen DNA in seiner gesamten Länge von 4,4 kb herausgeschnitten wurde. Die *accD1* spezifische Sonde (karierte Rechtecke) hybridisierte beidseitig der BstEII Schnittstelle im Bereich des duplizierten internen Fragments (weisse Rechtecke), was zu dem zusätzlichen Signal im Blot führte.

Im Fall der *accD1* spezifischen Sonde trat aber auch in der Spur *accD2* eine Bandenverschiebung auf. Dies lässt sich durch die unmittelbare Nachbarschaft und das Fehlen einer BstEII Schnittstellen zwischen den Genen *accD1* und *accD2* erklären. Die Integrationsstelle von pK18*mob_accD2_int* lag auf dem gleichen Fragment das auch unter Verwendung der *accD1* spezifischen Sonde nachgewiesen wurde (Abbildung 4A).

Um die Ergebnisse der PCR- und Southernblot-Analysen weiter abzusichern, wurden die einzelnen *accD* Inaktivierungsstämme durch die entsprechenden intakten, plasmidcodierten *accD* Gene komplementiert. Die so erhaltenen Stämme wurden mittels Plasmidpräparation auf die Anwesenheit der plasmidcodierten *accD* Gene und durch PCR-Analysen auf vorhandene Integration des pK18*mob* Vektors getestet. Die so komplementierten Inaktivierungsstämme unterschieden sich phänotypisch nicht vom Wildtyp, womit die gerichtete Inaktivierung der einzelnen *accD* Gene nachgewiesen werden konnte. Erst durch die Komplementation konnte auch ein möglicher Effekt auf die in Transkriptionsrichtung des Integrationsortes gelegenen Gene ausgeschlossen werden.

Durch Integrationsmutagenese mit dem pK18*mob* System konnte für jede in *C. glutamicum* vorhandene Acyl-CoA Carboxyltransferase eine definierte Inaktivierungsmutante erstellt werden, die durch PCR- und Southernblot-Analysen sowie homologer Komplementation verifiziert wurde.

2.2 Phänotypische Charakterisierung der Acyl-CoA Carboxyltransferase Inaktivierungsmutanten

Nach der Inaktivierung der einzelnen Acyl-CoA Carboxyltransferasen sollte die Kolonieform und das Wachstum der verschiedenen Stämme auf unterschiedlichen Festmedien untersucht werden. In Abbildung 5 ist das Wachstum der einzelnen Inaktivierungsmutanten dargestellt. Es wird deutlich, dass die Inaktivierung von *accD4* weder Einfluss auf das Wachstum, noch auf die Kolonieform und -oberfläche hat. Die Zellen zeigten selbst auf Minimalmedium keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyp. Die Carboxyltransferase AccD4 ist folglich unter den getesteten Bedingungen nicht essentiell und hat vielleicht eine Funktion in einem katabolen Stoffwechselweg wie beispielsweise für den Abbau bestimmter Fettsäuren. Im Gegensatz dazu zeigten alle übrigen Inaktivierungsmutanten ein stark verlangsamtes, auf Minimalmedium kaum nachweisbares Wachstum. Trotz ihrer hohen Sequenzhomologien komplementierten die drei Carboxyltransferasen *accD1*, *accD2* und *accD3* einander nicht. Ihre Funktionen sind folglich speziell und sie besitzen keine überschneidenden Enzymaktivitäten. Ein sehr geringes Wachstum zeigte die *accD1* Inaktivierungsmutante. Ein Wachstum auf Minimalmedium war zunächst gar nicht möglich. Im Ausstrich bildeten sich aber viele einzelne, größere Kolonien. Diese sind vermutlich auf Reversionen zurückzuführen. Die hohe Reversionsrate, trotz Selektionsdruck, weist auf eine genetische Instabilität dieser Mutante hin und damit auf die große Bedeutung des *accD1* Gens. Eine Kultivierung über einen langen Zeitraum war deswegen nicht erfolgreich. Im Vergleich zum CgXII Minimalmedium zeigten die *accD1*, *accD2* und *accD3* Inaktivierungsmutanten auf BHIS Komplexmedium ein leicht verbessertes Wachstum. Ein dem Wildtyp vergleichbares Wachstum wurde in keinem der Fälle erreicht. Demnach waren in dem verwendeten BHIS Komplexmedium die zur vollständigen Komplementation der *accD1*- *accD2*- oder *accD3* Inaktivierung benötigten Supplemente nicht oder nur in geringen Konzentrationen vorhanden. Wurde dem Komplexmedium aber zusätzlich eine Mischung unterschiedlicher Fettsäuren und ihrer Derivate, vor allem Ölsäure und Butterhydrolysat zugesetzt, konnte nur im Fall der *accD1* Inaktivierungsmutante eine deutliche Verbesserung des Wachstums erreicht werden. Diese Fettsäureauxotrophie wurde auch von Kimura *et al.* (1996) beobachtet aber nicht näher

untersucht. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass AccD1 wahrscheinlich eine direkte Rolle bei der Fettsäurebiosynthese spielt. Beispielsweise könnte es sich also bei AccD1 um die β -Untereinheit der Acetyl-CoA Carboxylase handeln, die für die Malonyl-CoA Bereitstellung bei der Fettsäuresynthese notwendig ist.

Unter Berücksichtigung, dass der diesem Medium zugesetzte Emulgator (Brij58) das Wachstum aller anderen Mutanten und auch das des Wildtyps hemmte (Abbildung 5 links unten), ist die Komplementation durch Fettsäurezusatz sogar sehr stark. Im Fall der Inaktivierung von *accD2* und *accD3* gelang keine Komplementation durch Fettsäurezugabe. Wahrscheinlich sind diese Gene an der Synthese spezieller und komplexer Lipide, wie z.B. Mycolsäuren oder Lipomannan bzw. deren Vorstufen beteiligt, die weder im BHIS Medium, noch in den Fettsäuresupplementen vorhanden waren.

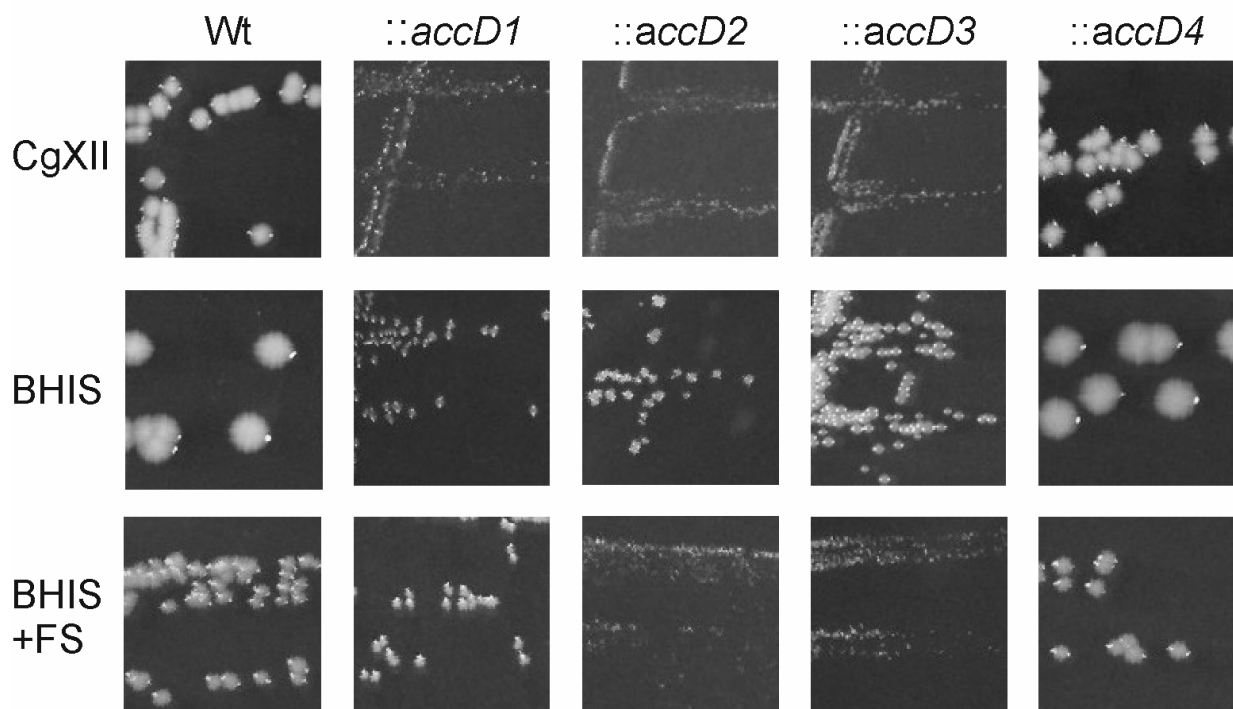


Abbildung 5: Wachstum der einzelnen *accD* Inaktivierungsmutanten von *C. glutamicum* ATCC13032 auf unterschiedlichen Festmedien. Die abgebildeten Kulturen wurden drei Tage bei 30 °C auf Minimalmedium (CgXII), dem Komplexmedium BHIS und BHIS mit Fettsäuresupplementation (BHIS+FS) inkubiert.

Weitere morphologische Veränderungen wurden bei Betrachtung der Kolonieoberflächen deutlich. Die *accD1*-, *accD2*- und *accD3* Inaktivierungsmutanten zeigten einen untereinander vergleichbaren Phänotyp, ihre Kolonien auf Komplexmedium erschienen rauher und matter als die des Wildtyps. Ferner war eine starke Klumpenbildung, ein damit einhergehendes Sedimentieren und ein Adsorbieren an der Kolbenwand bei der Kultivierung in Flüssigmedium zu beobachten.

2.3 Analyse des Einflusses der *accD* Inaktivierungen auf die Fettsäurezusammensetzung von *C. glutamicum*

Analyse der freien Lipide:

Um die Auswirkungen der Inaktivierung der einzelnen Acyl-CoA Carboxyltransferasen auf die Lipidzusammensetzung von *C. glutamicum* zu untersuchen, wurden die Stämme zur radioaktiven Markierung der Lipide in Gegenwart von ^{14}C -markiertem Acetat unter Standardbedingungen kultiviert. Anschließend wurden die freien Lipide durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln aus den Zellen entfernt, die Lipidfraktionen gewaschen und Aliquots, die einer Aktivität von 20.000 cpm entsprachen, dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Die Detektion der Lipide erfolgte autoradiographisch. Ein Vergleich des erhaltenen Bandenmusters mit dem Laufverhalten bekannter Lipide erlaubte die Zuordnung der einzelnen Signale zu den in der Zelle hauptsächlich vertretenen Lipidspezies (Abbildung 6). Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen untersuchten Inaktivierungsmutanten.

Die Inaktivierung von *accD4* führte zu keinem vom Wildtyp abweichenden Lipidprofil. Dieses Gen ist also unter den Testbedingungen nicht essentiell und besitzt bei den gewählten Kulturbedingungen keine Funktion im anabolen Lipidstoffwechsel von *C. glutamicum*.

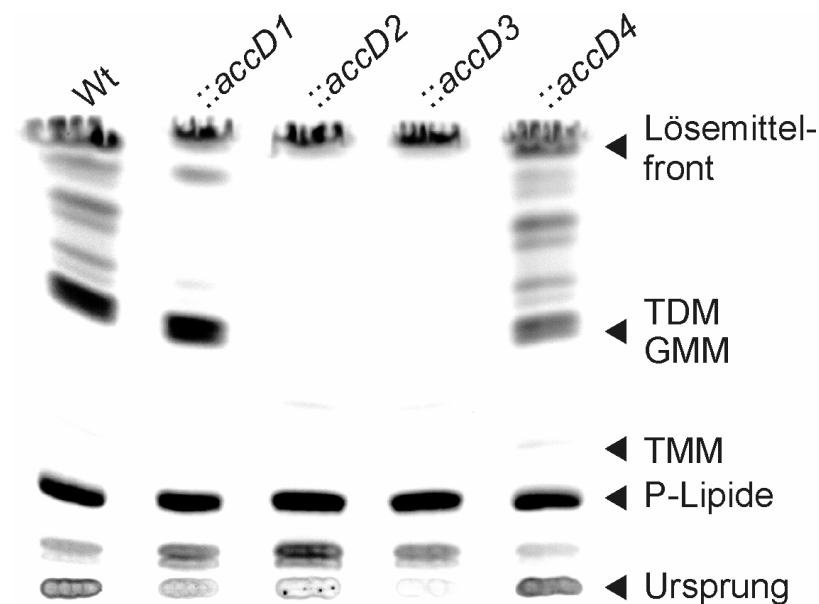


Abbildung 6: Autoradiographie der dünnschichtchromatographischen Trennung der extrahierbaren Lipide. In jeder Spur wurden 20.000 cpm des Lipidextrakts aufgetragen. Die Hauptlipide in *C. glutamicum* stellen die Phospholipide (P-Lipide), Trehalosedimycolate (TDM), Trehalosemonomycolate (TMM) und Glukosemonomycolate dar.

Auch die Inaktivierung von *accD1* führte zu keinem vom Wildtyp abweichenden Lipidprofil. Dieses Ergebnis ist auf die genetische Instabilität des Stammes während der Kultivierung zurückzuführen. Eine Kontrolle des Stammes nach durchgeführter Markierung zeigte nämlich ein dem Wildtyp vergleichbares Wachstum, obwohl die Mutante auf Festmedium nur sehr schlecht wächst (Abbildung 5). Aufgrund der schlechten Kultivierbarkeit konnten mit diesem Ansatz keine Aussagen über die tatsächliche Funktion von *accD1* getroffen werden.

Interessanterweise führte die Inaktivierung von *accD2* und *accD3* zu Mutanten, die untereinander einen identischen Phänotyp zeigten. In beiden Fällen konnten keine freien Mycolsäuren, weder Trehalosedimycolate (TDM), Trehalosemonomycolate (TMM), noch Glucosemonomycolate (GMM) nachgewiesen werden (Abbildung 6). Die Synthese der Phospholipide wurde hingegen nicht beeinflusst. Diese beiden Gene *accD2* und *accD3* sind demnach spezifisch an der Synthese von Mycolsäuren beteiligt. Trotz ihrer strukturellen und möglicherweise auch funktionellen Ähnlichkeit komplementieren sie einander aber nicht und werden auch nicht von einer der anderen paralogen Acyl-CoA Carboxyltransferase komplementiert.

Analyse der gebundenen Lipide:

Die Analyse der aus den Zellen durch organische Lösungsmittel nicht extrahierbaren Lipide, wie der an das Arabinogalaktanpolymer gebundenen Mycolsäuren, führte zu dem in Abbildung 7 dargestellten Ergebnis.

Die Lipidprofile der *accD2* und *accD3* Inaktivierungsstämme zeigten eine vollständige Abwesenheit aller gebundenen Mycolsäurespezies. Die Synthese anderer Fettsäuren war auch hier nicht beeinflusst. Im Fall der *accD1*- und *accD4* Inaktivierung war unter den gewählten Kulturbedingungen keine Abweichung im Lipidprofil zu dem des Ausgangsstamms erkennbar. Interessanterweise trat im Fall der *accD1* Inaktivierungsmutante ein zusätzliches Signal in der Autoradiographie auf. Die Identität dieser Lipidspezies konnte im Laufe der Arbeiten aufgrund der geringen Substanzmenge nicht aufgeklärt werden. Da die Zellen vor der Markierung in Minimalmedium in BHIS Komplexmedium kultiviert wurden, ist ein Restwachstum nicht revertierter Zellen mit der *accD1* Inaktivierung möglich. Dieses könnte den Grund für das Auftreten des neuen Signals darstellen.

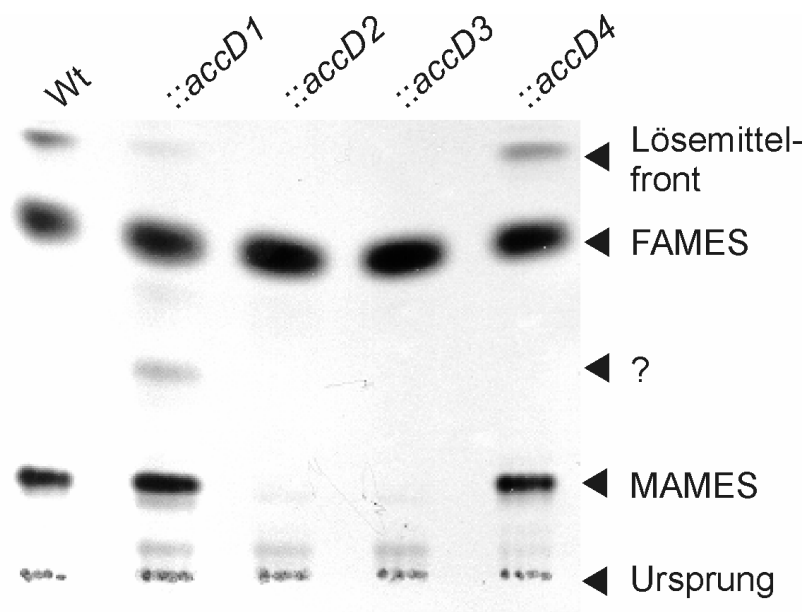


Abbildung 7: Autoradiographie der dünnschichtchromatographischen Auftrennung der kovalent gebundenen, nicht extrahierbaren Lipide der einzelnen *accD* Inaktivierungsstämme. Die Hauptfraktion der gebundenen Lipide stellen in *C. glutamicum* die Fettsäuremethylester (FAMES) und die Mycolsäuremethylester (MAMES) dar.

Die Ergebnisse der Analysen der freien und gebundenen Lipide zeigten eine Beteiligung von *accD2* und *accD3* bei der Synthese von Mycolsäuren, wobei beide Gene keine Funktion bei der Synthese anderer Lipide besitzen.

3 Untersuchung zur Carboxylierung von Acetyl-CoA durch den AccD1-AccBC Komplex aus *C. glutamicum*

3.1 Malonyl-CoA Bildung bei Überexpression von AccD1 und AccBC in zellfreien Rohextrakten

Die Komplementationsfähigkeit der *accD1* Inaktivierungsmutante durch eine Mischung verschiedener Fettsäuren ließ auf dessen Funktion als Acetyl-CoA Carboxylase schließen. Im Folgenden sollte die Carboxylierung von Acetyl-CoA durch den AccD1-AccBC Komplex in einem *in-vitro* Enzymtest nachgewiesen werden.

Die Acetyl-CoA Carboxylaseaktivität der Rohextrakte aus *C. glutamicum* ATCC13032 Δpyc zeigte über den gesamten Zeitraum der Messung eine annähernd lineare Zunahme an gebildetem Malonyl-CoA (Abbildung 8). In diesem Ausgangsstamm konnte eine spezifische Carboxylaseaktivität von 23 mU/mg ermittelt werden. Dieser Wert liegt im Bereich der Acetyl-CoA Carboxylaseaktivität zellfreier Rohextrakte von *M. tuberculosis* und *M. bovis* (Rainwater und Kolattukudy, 1982). Bei der Überexpression von *accD1* allein (*C. g.* ATCC13032 Δpyc pEC7*accD1*) stieg die spezifische Aktivität um etwa den Faktor 2 auf 41 mU/mg an. Um unspezifische Vektoreffekte, die beispielsweise durch die plasmidkodierten Resistenzfaktoren hervorgerufen werden und unter Umständen auch zu abweichenden Carboxylaseaktivitäten führen könnten auszuschließen, wurde das Experiment mit dem ebenfalls *accD1* überexprimierenden Stamm *C. glutamicum* ATCC13032 Δpyc pVWEx2*accD1* wiederholt. Auch hier stieg die spezifische Aktivität bei Überexpression von *accD1* im Vergleich zum Ausgangsstamm um etwa den Faktor 2 von 15 auf 27 mU/mg an. Folglich ist eine

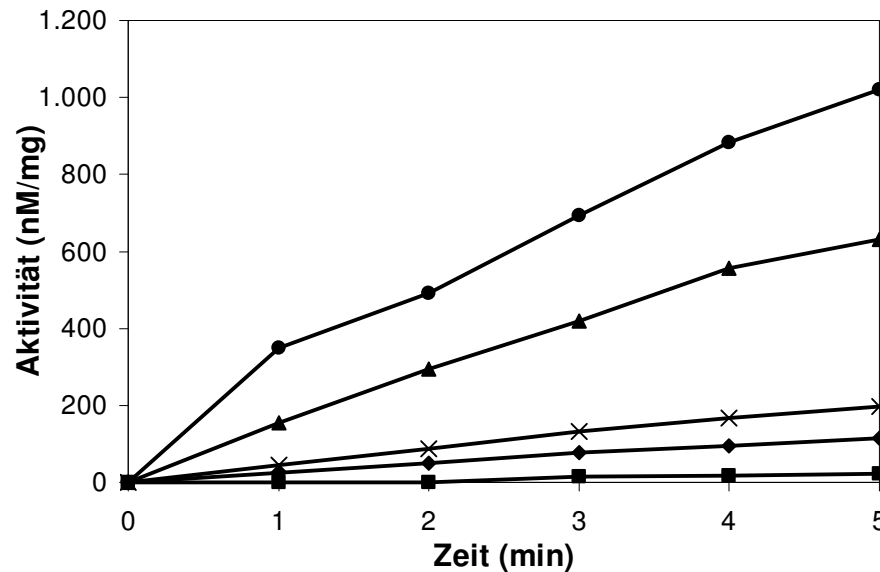


Abbildung 8: Im diskontinuierlichen Enzymtest gemessene spezifische Acetyl-CoA Carboxylaseaktivität zellfreier Rohextrakte von *C. glutamicum* bei Überexpression von AccD1-AccBC Komplexkomponenten. Für diesen Test wurden folgende Stämme eingesetzt: *C.g.* pJC1accBC (▲), *C.g.* pEC7accD1 (×) und *C.g.* pEC7accD1 pJC1accBC (●), vergleichend dazu diente der Ausgangsstamm *C.g.* ATCC13032 Δpyc (◆) als Referenz und die *accD1* Inaktivierungsmutante *C.g.* ::*accD1* (■) als weitere Kontrolle.

Steigerung der Acetyl-CoA Carboxylaseaktivität spezifisch auf die Überexpression von *accD1* zurückzuführen. Überraschenderweise führte auch die Überexpression von *accBC* (*C. g.* ATCC13032 Δpyc pJC1accBC) zu einem Anstieg in der Malonyl-CoA Bildung auf 133 mU/mg, der sogar die durch die *accD1* Überexpression bedingte Aktivitätszunahme überstieg.

Diese Ergebnisse deuten auf eine eventuelle Limitierung durch die biotinhaltige α-Untereinheit AccBC hin. Dieses wurde durch die gemeinsame Überexpression von *accBC* und *accD1* in dem Stamm *C. glutamicum* ATCC13032 Δpyc pEC7accD1 pJC1accBC überprüft. In diesem Stamm stieg die Acetyl-CoA Carboxylaseaktivität der Rohextrakte um etwa den Faktor 8 auf den höchsten Wert von 180 mU/mg an. Folglich war für eine effiziente Steigerung der Acetyl-CoA Carboxylaseaktivität eine Überexpression beider Untereinheiten notwendig. Als Kontrolle wurde auch die spezifische Aktivität der *accD1* Inaktivierungsmutante untersucht. In diesem Fall konnte nur eine Aktivität von unter 8 mU/mg gemessen werden. Dieser Wert lag deutlich unter dem des Ausgangsstamms. Diese trotz

Inaktivierung des *accD1* Gens messbare spezifische Aktivität deutet auf die Anwesenheit weiterer Carboxylaseaktivitäten mit einander leicht überschneidenden Substratspezifitäten hin, die beispielsweise durch *accD2*, *accD3* oder *accD4* kodiert und in geringem Maß in der Lage sein könnten, ebenfalls Acetyl-CoA zu carboxylieren. Diese Aktivität reicht *in-vivo* jedoch nicht aus, um ein signifikantes Wachstum der *accD1* Inaktivierungsmutante zu ermöglichen.

3.2 Malonyl-CoA Bildung durch zellfreie Rohextrakte einzelner *accD* Inaktivierungsstämme

Um die Beteiligung der Carboxyltransferasen *accD2*, *accD3* und *accD4* bei der Malonyl-CoA Synthese auszuschließen, wurde zusätzlich die spezifische Acetyl-CoA Carboxylaseaktivität in zellfreien Rohextrakten der einzelnen *accD* Inaktivierungsmutanten bestimmt.

In Tabelle 4 ist die spezifische Aktivität der Malonyl-CoA Bildung im diskontinuierlichen Enzymtest dargestellt. Wie bereits in 3.1. erwähnt, führte die Inaktivierung von *accD1* zu einer Reduktion der spezifischen Aktivität auf $\frac{1}{3}$ des Werts des Ausgangsstamms mit 23 mU/mg. Die Inaktivierung der anderen Acyl-CoA Carboxylase β -Untereinheiten, *accD2*, *accD3* und *accD4*, führte hingegen zu einer geringeren Abnahme der spezifischen Aktivität der Rohextrakte. Sie lag im Fall der Inaktivierung von *accD2* und *accD4* zwischen 18 und 19 mU/mg. Drastischer zeigte sich dieser Effekt im Fall der *accD3* Inaktivierungsmutante. Hier sank die spezifische Aktivität auf 13 mU/mg ab, was etwa der halben Aktivität des Ausgangsstamms entsprach. Der Grund hierfür kann in dem generell schlechten Wachstum der *accD2* und *accD3* Mutante begründet sein. Vermutlich war hier der Gesamtstoffwechsel der Zelle derart gestört, dass sich dies auch auf die Expression der Acetyl-CoA Carboxylase auswirkte.

Tabelle 4: Spezifische Aktivitäten zellfreier Rohextrakte von *C. glutamicum* ATCC13032 Δpyc bei der Carboxylierung von Acetyl-CoA. Untersucht wurden einzelne Untereinheiten der Acyl-CoA Carboxylasen überexprimierende Stämme (links) und deren Inaktivierungsmutanten (rechts).

Stamm	spez. Akt. [mU/mg]	Stamm	spez. Akt. [mU/mg]
Wt	23	Wt	23
pEC7 <i>accD1</i>	41	:: <i>accD1</i>	8
pJC1 <i>accBC</i>	133	:: <i>accD2</i>	18
pEC7 <i>accD1</i> pJC1 <i>accBC</i>	180	:: <i>accD3</i>	13
		:: <i>accD4</i>	19

Die Fettsäureauxotrophie, sowie die Reduktion der Acetyl-CoA Carboxylase-aktivität nach der Inaktivierung von *accD1* und deren Zunahme bei der Überexpression von *accD1* und *accBC* zeigen, dass es sich bei AccD1 tatsächlich um die β -Untereinheit der Acetyl-CoA Carboxylase handelt. Zusätzlich besitzen wahrscheinlich auch die restlichen Acyl-CoA Carboxylasen eine, wenn auch schwache Acetyl-CoA Carboxylase Nebenaktivität, die aber nicht ausreicht um die Inaktivierung des *accD1* Gens zu komplementieren.

4 Expression, Reinigung und Charakterisierung der an der Mycolsäuresynthese beteiligten Enzyme

4.1 Untersuchungen zu der für die Mycolsäuresynthese spezifischen Acyl-CoA Carboxylase

Die genetische Untersuchung zeigte, dass sowohl *accD2* als auch *accD3* spezifisch an der Mycolsäuresynthese beteiligt sind. Um einen detaillierten Einblick in die Struktur und Funktion dieser speziellen Carboxyltransferasen zu bekommen, sollten sowohl *accD2* als auch *accD3* homolog aus *C. glutamicum* gereinigt werden. Dazu wurde sowohl AccD2 also auch AccD3 mit einem N-terminalen His₆-Fusionspeptid versehen und zusammen mit AccBC, plasmidcodiert, homolog in *C. glutamicum* ATCC13032 Δpyc exprimiert. Aus den *accD2* und *accD3* überexprimierenden Stämmen wurden im Folgenden die beiden β -Untereinheiten über Ni-NTA Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die gereinigten Polypeptide wurden über eine denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach ihren apparenten Größen aufgetrennt und die Banden mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie identifiziert.

Die elektrophoretische Auftrennung der gereinigten und denaturierten Acyl-CoA Carboxylase Komplexe ist in Abbildung 9 dargestellt. Erwartungsgemäß zeigte die massenspektrometrische Analyse, dass die α -Untereinheit AccBC in großen Mengen zusammen mit den entsprechenden β -Untereinheiten His₆_AccD2 (Abbildung 9, links) und His₆_AccD3 (Abbildung 9, rechts) gereinigt werden konnte. Überraschenderweise zeigte die massenspektrometrische Analyse ferner, dass in beiden Ansätzen jeweils eine Mischung aus AccD2 und AccD3 in der unteren Bande vorhanden war, was darauf hinweist, dass sowohl AccD2 als auch AccD3 gemeinsam in einem Komplex mit AccBC vorlagen. Aufgrund ihrer Größe von 58 kDa im Fall von AccD2 und 56 kDa bei AccD3 konnten beide Proteine in den verwendeten Gelsystemen nicht voneinander getrennt werden.

Zusätzlich konnten bei der massenspektrometrischen Analyse der AccD2 Reinigung eine überwiegende Anzahl an AccD2 spezifischen Peptidfragmenten

ermittelt werden, wogegen im Fall einer AccD3 Reinigung die Anzahl der entsprechenden AccD3 Fragmente überwog (Tabelle 5). Das lässt den Schluss zu, dass trotz paralleler Überexpression von AccBC ein gewisser Anteil monomerer β -Untereinheiten in der Zelle vorlag, möglicherweise weil die zweite β -Untereinheit nicht zusätzlich überexprimiert wurde. Alternativ könnte der Komplex auch während der chromatographischen Reinigung in seine Untereinheiten zerfallen sein, so dass die Menge des spezifisch mit Hilfe des His₆-Fusionspeptids an die Säule adsorbierten Proteins bezogen auf die koisolierten Komplexpartner überwog.

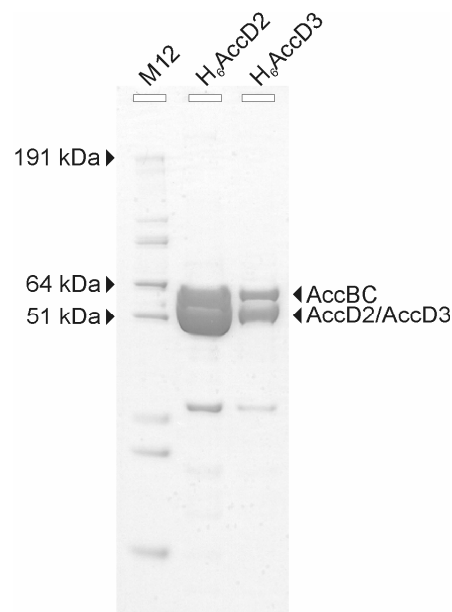


Abbildung 9: SDS-PAGE der gereinigten Acyl-CoA Carboxylase Komplexe. In der linken Spur ist ein Proteingrößenstandard, in den beiden rechten Spuren jeweils 5 μ l des Säuleneluates nach der Affinitätschromatographie aufgetragen. Bei der nicht beschrifteten Bande handelte es sich um eine Verunreinigung.

Tabelle 5: Die in der massenspektrometrischen Analyse berechnete Massenabdeckung der aus *accD2* und *accD3* überexprimierenden *C. glutamicum* Stämmen gereinigten Proteine.

detektiertes Protein	pEKEx3_RBS_H ₆ _accD2	pEKEx3_RBS_H ₆ _accD3
AccBC (Bande 1)	55 %	46 %
AccD2 (Bande 2)	28 %	20 %
AccD3 (Bande 2)	19 %	35 %

Überraschenderweise besteht die an der Mycolsäuresynthese beteiligte Acyl-CoA Carboxylase somit aus mindestens drei Untereinheiten, nämlich AccD2, AccD3 und AccBC in bislang unbekannten stöchiometrischen Verhältnissen. Heseler (2005) konnte kürzlich nachweisen, dass die Acetyl-CoA Carboxylase in *C. glutamicum* nur aus den beiden Untereinheiten AccD1 und AccBC mit einem apparenten Molekulargewicht von 714 kDa besteht. Sie schloss daraus, dass es sich bei der Acetyl-CoA Carboxylase um eine Anordnung aus sechs α - und sechs β -Untereinheiten handelt.

4.2 Bestimmung des apparenten Molekulargewichts des AccD2-AccD3-AccBC Komplexes

Durch die Reinigung von AccD2 und AccD3 konnte nachgewiesen werden, dass diese unterschiedlichen β -Untereinheiten zusammen mit der α -Untereinheit AccBC den an der Mycolsäuresynthese beteiligten Acyl-CoA Carboxylasekomplex aufbauen. Um eine Information über die Struktur dieses Proteinkomplexes zu erhalten, sollte im Folgenden das apparente Molekulargewicht des nativen Komplexes mittels Größenausschlusschromatographie bestimmt werden. Dazu wurde der Komplex aus dem Stamm *C. glutamicum* ATCC13032 Δpyc pJC1*accBC* pEKEx3_RBS_His₆*_accD3* wie beschrieben über Ni-NTA Affinitätschromatographie gereinigt, die Proteinkonzentration der Elutionsfraktion in einem SDS-Polyacrylamidgel bestimmt und die Proteinlösung so weit eingeeengt bis eine Endkonzentration von ca. 0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ erreicht wurde. Von dieser Lösung wurden anschließend 200 μl zur Größenausschlusschromatographie eingesetzt.

Das Elutionsprofil ist in Abbildung 10A dargestellt. Der höchste Peak bei einem Elutionsvolumen von 45,5 ml stellte gleichzeitig den Peak mit der größten Proteinmenge dar. Der Vergleich der so ermittelten Elutionsvolumina mit denen von Standardproteinen bekannten Molekulargewichts erlaubte die Abschätzung des unbekannten apparenten Molekulargewichts des Proteinkomplexes innerhalb dieser Fraktion mit etwa 286 kDa. Neben diesem Hauptpeak konnten zwei weitere, kleinere Peaks bei größeren Elutionsvolumina detektiert werden. Der erste entsprach 92 kDa und der zweite 39 kDa.

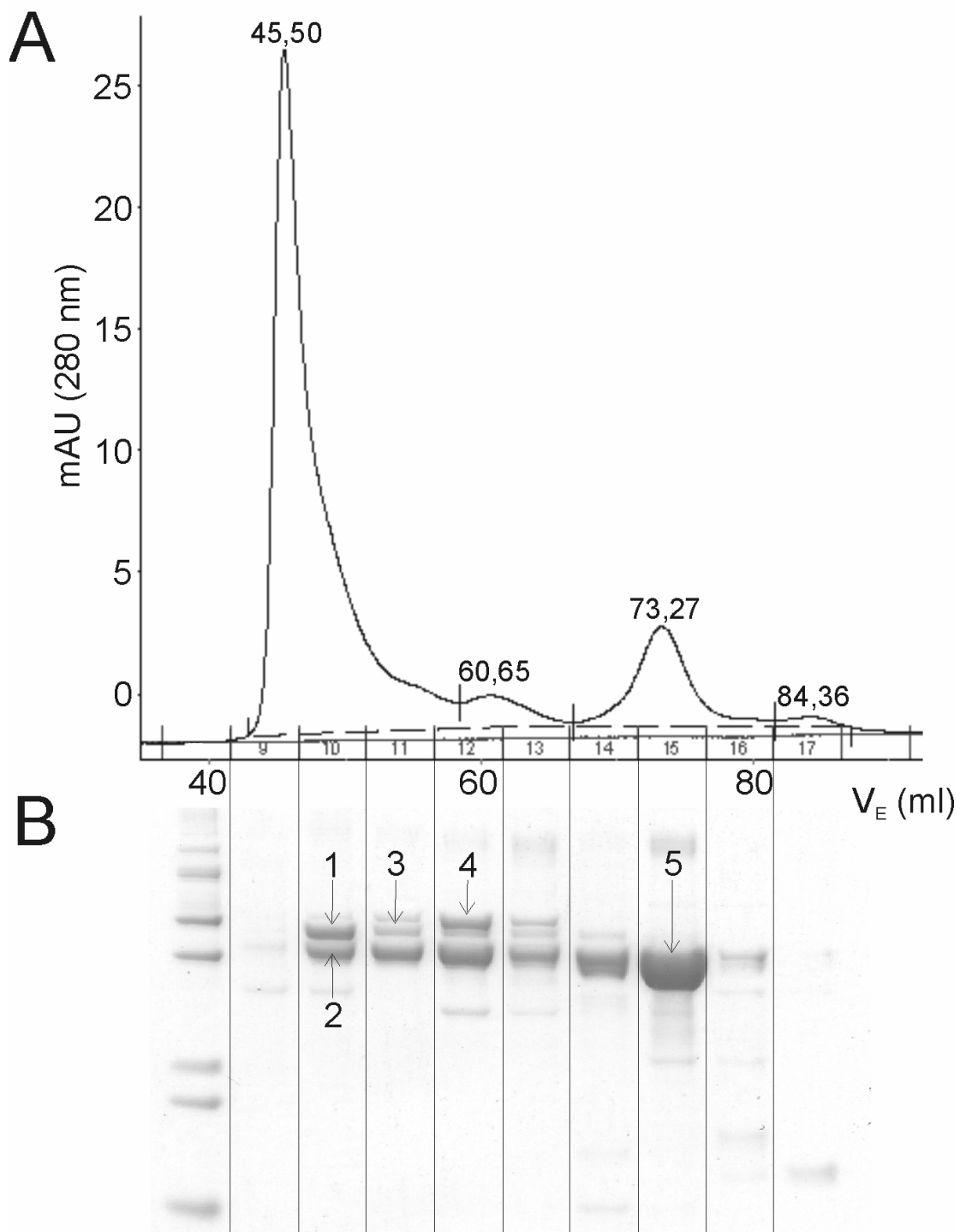


Abbildung 10: Größenausschlusschromatographie der Acyl-CoA Carboxylase zur Bestimmung des apparenten Molekulargewichtes des Gesamtkomplexes. **A.** Chromatogramm des größenausschlusschromatographischen Laufs. Auf der V_E -Achse sind zusätzlich zum Elutionsvolumen die Nummern der gesammelten Fraktionen aufgetragen. **B.** Auftragung eines Aliquots der Fraktionen 10 bis 17 auf eine 12 % Bis/Tris SDS-PAGE. AccBC (1), AccD2 und AccD3 (2), AccBC (3), Molekulares Chaperon (4) und AccD3 (5).

Um die Identität der eluierten Proteine zu untersuchen, wurde jeweils 1 ml jeder Elutionsfraktion in einem 12 % SDS-Gel aufgetrennt und die in Abbildung 10B nummerierten Banden massenspektrometrisch identifiziert. Dabei wurde deutlich, dass der Hauptpeak durch den nativen Komplex bestehend aus AccBC (1) und AccD2 mit AccD3 (2) bedingt wurde. Folglich besaß der isolierte Acyl-CoA Carboxylasekomplex eine ungefähre Masse von 286 kDa. Wird der Unterschied zwischen apparentem und tatsächlichem Molekulargewicht als vernachlässigbar angenommen, könnte sich beispielsweise bezüglich der Komplexstöchiometrie eine Zusammensetzung von 2 Molekülen AccBC (je 64 kDa), einem Molekül AccD2 (je 58 kDa) und zwei Molekülen AccD3 (56 kDa) ergeben. Rechnerisch entspricht das einem tatsächlichen Molekulargewicht von 300 kDa. Selbstverständlich sind auch alle weiteren Kombinationen, die zu dem ermittelten Molekulargewicht von ca. 290 kDa führen, denkbar.

Die Bestandteile des zweiten Hauptpeaks bei einem Elutionsvolumen von 73,3 ml konnten durch MALDI-TOF-MS als monomere AccD3 Moleküle identifiziert werden. Das ermittelte apparente Molekulargewicht von 39 kDa entspricht dem tatsächlichen Molekulargewicht des AccD3 Proteins von 56 kDa nicht. Sowohl die Kalibrierung der Säule als auch die physikochemischen Eigenschaften des Säulenmaterials wurden für Proteine mit einer Masse von über 100 kDa optimiert. In dem kleineren Massenbereich, in dem sich die Monomere befanden, konnte folglich keine quantitative Massenbestimmung erfolgen.

Bei dem kleinsten der drei untersuchten Peaks bei einem Elutionsvolumen von 60,7 ml fand sich sowohl AccD3 als auch ein 66 kDa großes molekulares Chaperon. Dieses Chaperon könnte bei der Faltung des AccD3 Proteins in seine native Sekundär- und Tertiärstruktur eine Rolle spielen.

4.3 Lokalisierung der Biotingruppe in der α -Untereinheit der Acyl-CoA Carboxylasen

Für die Funktion der untersuchten Acyl-CoA Carboxylasen ist die Bindung des Cofaktors Biotin (Vitamin H) essentiell (Wakil *et al.*, 1958). Dieser ist kovalent an

einen Lysinrest der α -Untereinheit AccBC gebunden (Rylatt *et al.*, 1977). Die Konsensussequenz für die Biotinylierung ist [GN]-[DEQTR]-x-[LIVMFY]-x(2)-[LIVM]-x-[AIV]-M-K-[LMA]-x(3)-[LIVM]-x-[SAV] (Samols *et al.*, 1988). Um die genaue Position dieses Biotinrestes experimentell zu bestimmen, wurde das *accBC* Gen homolog in *C. glutamicum* Δpyc mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Biotin im Medium exprimiert und das Protein über Biotin/Avidin Affinitätschromatographie gereinigt. Die Kultivierung unter Biotinüberschuss sollte eine möglichst vollständige Biotinylierung trotz Überexpression des *accBC* Gens sicherstellen. Eine sich anschließende tryptische Spaltung im SDS-Gel (Abbildung 11) und Analyse der entstandenen Peptidfragmente mittels MALDI-TOF-MS (Abbildung 13) zeigte eine durch die Modifizierung hervorgerufene Massenvergrößerung um 226 Da eines der Fragmente. Abbildung 12 zeigt die Peptidsequenz der möglichen tryptischen Fragmente im Bereich der mit Hilfe der Konsensussequenz bestimmten Position der Modifizierung und die entsprechend abgeleiteten Peptidmassen mit und ohne gebundenem Biotin. Interessanterweise konnte das erwartete Fragment mit einer Größe von 2.558 Da (③), also das Biotin tragende Fragment beginnend mit V₅₃₆ und endend mit K₅₅₇, nicht nachgewiesen werden. Allerdings konnte ein Fragment der Masse 3.2565,5 Da (④) detektiert werden, das dem Fragment beginnend mit V₅₃₆ und endend mit K₅₆₃ entsprach und das sich zusätzlich tatsächlich um den geforderten Wert von 226 Da von seiner theoretischen Masse von 3.030,5 Da (②) unterschied. Demnach scheint der unmittelbar an der Spaltstelle des Trypsins gebundene Biotinrest an Lys₅₅₇ eine enzymatische Fragmentierung an dieser Position zu verhindern (Abbildung 12). Im Gegensatz dazu konnte kein Fragment mit einem Fehlschnitt aber fehlender Modifizierung, entsprechend einer Masse von 3.030,5 Da (②) nachgewiesen werden. War also keine Modifizierung an Lys₅₅₇ vorhanden, erfolgte auch immer eine vollständige Fragmentierung durch Trypsin. Damit konnte die Position der Biotinylierung des AccBC Proteins zweifelsfrei dem Lysinrest 557 zugeordnet werden.

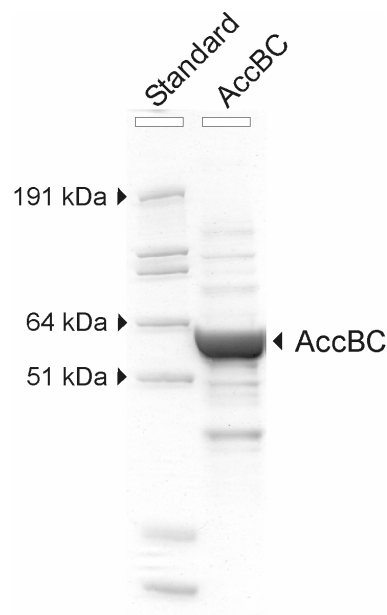


Abbildung 11: SDS-PAGE der AccBC Reinigung nach Biotin/Avidin Affinitätschromatographie. In der linken Spur wurden 5 µl des M12 Protein-Größenstandards, in der rechten Spur 10 µl des gereinigten AccBC Proteins aufgetrennt.

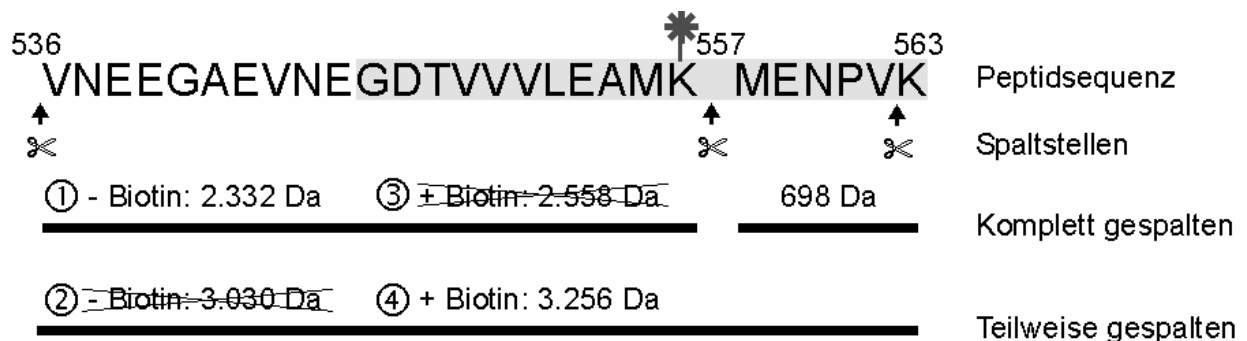


Abbildung 12: Vergleich der gemessenen mit den erwarteten Peptidmassen nach tryptischer Fragmentierung des AccBC Proteins. Im oberen Bereich der Abbildung ist die Peptidsequenz von V₅₃₆ bis K₅₆₃ dargestellt. Die Scheren symbolisieren die hypothetischen Schnittstellen des Trypsins, der Stern deutet die ermittelte Lage des Biotins an. Im unteren Bereich sind die theoretisch bestimmten Massen mit und ohne Biotinylierung angegeben. Durchgestrichene Werte symbolisieren Peptide die in keiner Messung nachgewiesen werden konnten.

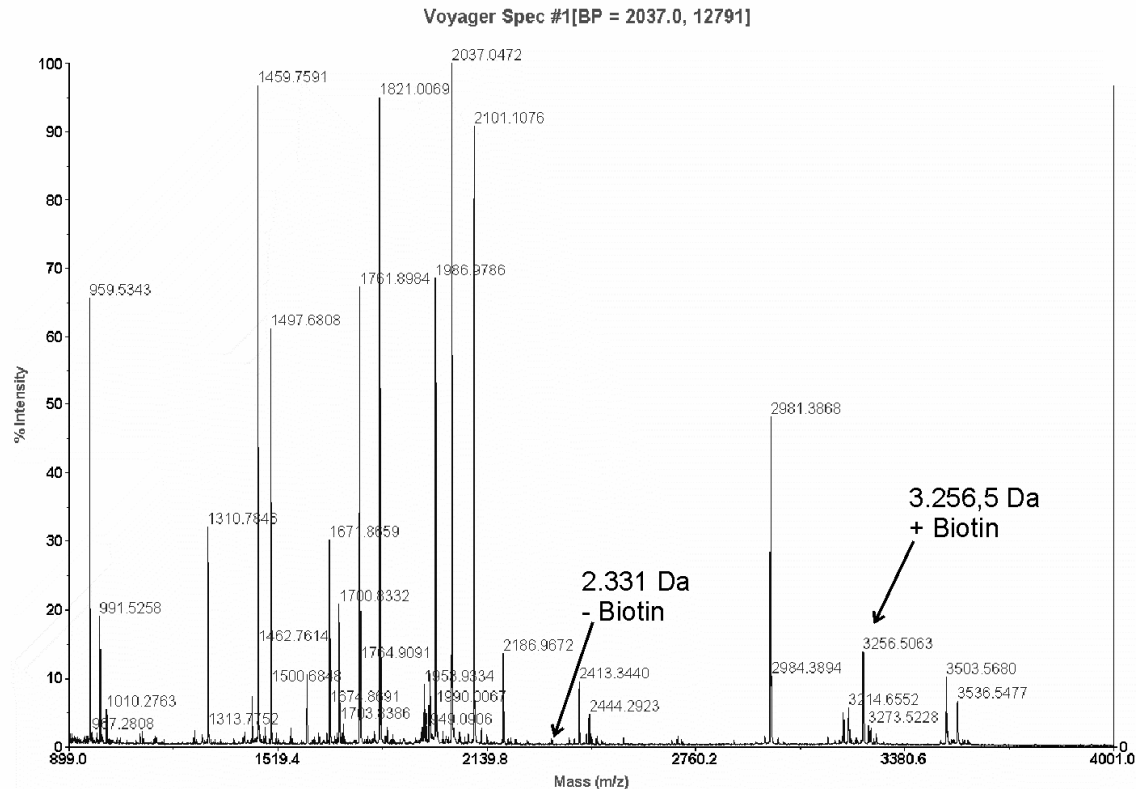


Abbildung 13: MALDI-TOF-MS Fragmentmuster des AccBC Proteins. In der Abbildung wurden die beiden für die Bestimmung der Modifizierungsposition wichtigen Signale markiert.

5 Untersuchung zur Funktion des *pks* Lokus bei der Lipid- und Zellwandsynthese in *C. glutamicum*

5.1 Sequenzanalyse des *pks* Genlokus

Um die Beteiligung weiterer Gene an der Mycolsäuresynthese nachzuweisen, wurden computergestützte Sequenzvergleiche der zu *accD3* benachbarten Gene bzw. der dadurch kodierten Proteine der sequenzierten *Corynebacteriaceae* durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Acyl-CoA Carboxyltransferase *accD3* in *C. glutamicum* unmittelbar an eine ca. 5 kb große Polyketidsynthese (*pks*) angrenzt (Abbildung 14). Das durch *pks* kodierte Protein weist große Homologien

zu dem mycobakteriellen Pks13 auf (Abbildung 14). Der an *pks* angrenzende Genombereich besitzt eine Größe von über 12 kb und besteht aus mindestens sechs Genen die alle in die gleiche Richtung transkribiert werden. In *M. tuberculosis* kodieren die ersten beiden Gene für die Mycolyltransferase FbpA und ein nicht katalytisch aktives, paraloges Protein FbpC (Belisle *et al.*, 1997). Diese Gene werden am 3'-Ende von den beiden Genen *cut* und *hyp* begrenzt. Weiter stromabwärts ist in *M. tuberculosis* die Acyl-AMP Ligase *fadD32* (Trivedi *et al.*, 2004), bzw. in *C. glutamicum* *fadD* lokalisiert (Abbildung 14). Für dieses Gen wurde experimentell eine Funktion bei der Aktivierung langkettiger Fettsäuren durch die Bildung von Acyl-Adenylaten aus Fettsäuren und ATP nachgewiesen (Trivedi *et al.*, 2004). Die gesamte Organisation dieses Genlokus ist in allen bisher untersuchten *Corynebacterianeae* nahezu identisch, obwohl geringfügige Unterschiede im Bereich der Gene der Mycolyltransferasen (Abbildung 14, graue Pfeile) existieren.

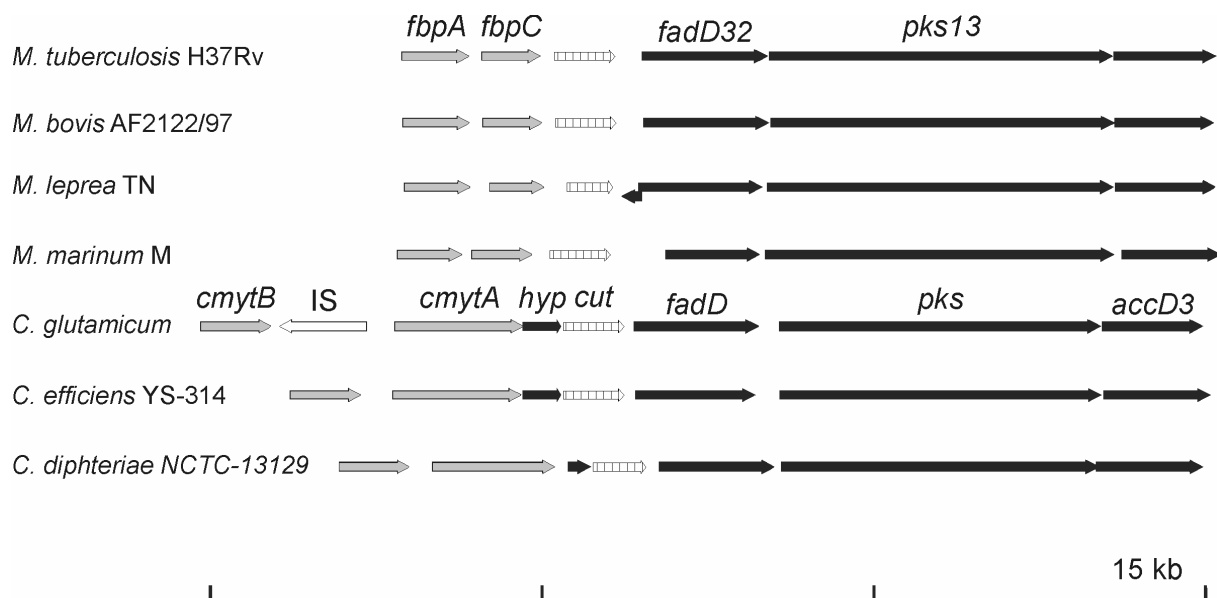


Abbildung 14: Genomische Organisation des chromosomalen Bereichs um die Polyketidsynthese (*pks*) bei *C. glutamicum* im Vergleich zu anderen Mitgliedern innerhalb der *Corynebacterianeae*. Acyl-AMP Ligase (*fadD*), Acyl-CoA Carboxyltransferase (*accD3*), Mycolyltransferasen (*cmytA* und *cmytB*), hypothetisches Protein (*hyp*), Cutinase (*cut*), Transposase (*IS*).

Die strenge Konservierung der Gene innerhalb des chromosomalen Bereichs um *pks* verdeutlicht eine fundamentale und essentielle Funktion der hier angeordneten Gene in allen *Corynebacterianae*. Die Abwesenheit aller Mycolsäurespezies in *C. glutamicum* nach der Inaktivierung von *accD3* weist speziell auf dessen Beteiligung bei der Mycolsäuresynthese hin (Portevin *et al.*, 2004; Gande *et al.*, 2004). Zusätzlich zeigt die nachgewiesene Mycolyltransferaseaktivität von *cmytA* und *cmytB* in *C. glutamicum* (De Sousa-D'Auria *et al.*, 2003; Brand *et al.*, 2003) und des Ag85 Komplexes in *M. tuberculosis* (Belisle *et al.*, 1997) eine essentielle Funktion der Gene in diesem Bereich nicht nur bei der eigentlichen Synthese, sondern auch bei der Translokation der Mycolsäuren beispielsweise auf das Arabinogalaktan oder auf Trehalose.

5.2 Einfluss der Polyketidsynthese auf die Mycolsäuresynthese

Um den Einfluss der Polyketidsynthese bei der Mycolsäuresynthese untersuchen zu können, wurden Inaktivierungsmutanten für das *pks* Gen mit dem *pk18mob* System (Schäfer *et al.*, 1994) erstellt. Da diese Polyketidsynthese in ihrer Domänenstruktur (Abbildung 15) den bekannten Fettsäuresynthasen (FAS) ähnelt (Hopwood und Sherman, 1990), wäre eine Kreuzkomplementation dieser Enzyme untereinander möglich.

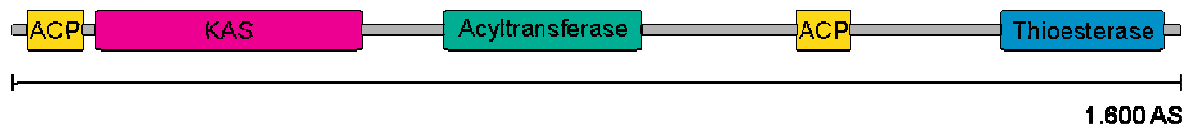


Abbildung 15: Durch Computeranalysen vorhergesagte Domänen des Pks Proteins. Die ACP Domänen beinhalten die Phosphopantethin Bindestellen und KAS stellt die Ketoacylsynthase dar. Aminosäuren (AS)

Um dieses Risiko zu minimieren, wurde für jede hypothetische Domäne ein gesondertes Inaktivierungskonstrukt erstellt. Dazu wurde ein 400 – 500 bp großes internes Fragment der zu inaktivierenden Domänen durch PCR erstellt und in den

Vektor *pK18mob* eingefügt. Transformation von *C. glutamicum* mit diesen Plasmiden und anschließende Selektion auf kanamycinhaltigen Agarplatten führte zu Klonen, bei denen die Vektoren über homologe Rekombination in das Chromosom inseriert vorlagen. Die erfolgte Vektorintegration wurde durch PCR-Analysen überprüft, wobei jeweils ein Primer im Bereich des Vektors und der andere im Chromosom außerhalb des internen Fragments hybridisierte (nicht gezeigt). Alle Stämme zeichneten sich durch schlechtes Wachstum, Klumpenbildung in Flüssigkultur, eine raue Kolonieoberfläche und die Abwesenheit von Mycolsäuren (siehe nächsten Abschnitt) aus. Dieser Phänotyp glich dem der durch die Inaktivierung von *accD2* oder *accD3* erhalten wurde. Da *accD3* unmittelbar hinter *pks* lokalisiert ist, könnte dieser Phänotyp auch durch eine fehlende Transkription des *accD3* Gens resultieren.

Um dies auszuschließen, wurden alle Inaktivierungsstämme mit einer plasmidcodierten, intakten Kopie des *accD3* Gens komplementiert. Zum Nachweis des Plasmids, das die intakte Kopie des *accD3* Gens trug, wurden diese aus den komplementierten Stämmen präpariert und durch eine Restriktionsspaltung überprüft. Zusätzlich wurde die korrekte Lokalisierung der Inaktivierungsvektoren im Bereich des *pks* Gens durch PCR-Analysen bestätigt. Wachstumsvergleiche der komplementierten Inaktivierungsstämme mit dem Wildtyp zeigten kein signifikant unterschiedliches Wachstum. Folglich komplementiert das intakte *accD3* Gen den durch die *pks* Inaktivierung hervorgerufenen Phänotyp. Demnach wird *pks* und *accD3* vermutlich cotranslatiert und liegen als eine regulatorische Einheit vor.

Um im Folgenden die Beteiligung von *pks* bei der Mycolsäuresynthese nachzuweisen, wurde eine *in-frame* Deletionsmutante erstellt, bei der das komplette *pks* Gen fehlte, das Leseraster zum *accD3* Gen aber intakt blieb. Dazu wurde in *pK19mobsacB* (Schäfer *et al.*, 1994) ein durch *cross-over* PCR erstelltes Fusionsfragment aus den 5' und 3' benachbarten Bereichen des *pks* Gens eingefügt. Nach Transformation von *C. glutamicum* ATCC13032 mit diesem Plasmid wurden kanamycinresistente Klone der zweiten Rekombination zugeführt. Alle Kolonien, die in den ersten drei Tagen nach der zweiten Rekombination erschienen, zeigten die Wiederherstellung der Wildtypsituation. Erst die Analyse

kleiner Kolonien die nach etwa 10 Tagen Inkubation erschienen zeigte den Verlust des *pks* Gens. Dies wurde durch zwei unabhängige PCR- und Southernblot-Analysen bestätigt (Abbildung 16). Bei der Southernblot-Analyse zeigte die Verschiebung der 6,2 kb großen Bande beim Wildtyp um 4,8 kb zu kleineren Größen die erfolgreiche Deletion des *pks* Gens an. Zur PCR-Analyse wurden zwei Primer gewählt, die außerhalb des durch PCR amplifizierten Bereichs in der Nachbarschaft des *pks* Gens banden. Eine Bande mit einer Größe von 1,1 kb zeigte die erfolgte Deletion an. Im Wildtyp würde ein Signal von 5,9 kb auftreten, unter den gewählten PCR Bedingungen erfolgte die Amplifizierung dieses Fragments aber nicht.

Der erhaltene Δpks Stamm zeichnete sich ebenfalls durch schlechtes Wachstum, Klumpenbildung in Flüssigkultur und eine raue Kolonieoberfläche aus. Die Analyse der Lipide zeigte erneut ein Fehlen aller im Wildtyp vorhandenen Mycolsäurespezies (Abbildung 17), dagegen waren alle anderen Hauptlipide des Wildtyps, wie Phospholipide, vorhanden. Interessanterweise hat im Fall der Δpks Mutante eine neue Lipidspezies auf. Ihre Identität konnte aufgrund der geringen Substanzmenge im Laufe dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden. Die Deletion von *pks* hat folglich die gleichen Konsequenzen wie die Inaktivierung von *accD2* oder *accD3*. Dies verdeutlicht, dass diese drei Gene vergleichbare, wichtige und spezifische Funktionen bei der Synthese der Mycolsäuren ausführen. Somit konnte auch eine Beteiligung der Polyketidsynthase bei der Mycolsäuresynthese in *C. glutamicum* gezeigt werden. Wird dieser Befund zusammen mit den computergenerierten Daten betrachtet, könnte es sich bei Pks um das Enzym handeln, das die Verknüpfung zweier vorgefertigter, linearer Fettsäuren zur reifen Mycolsäure katalysiert.

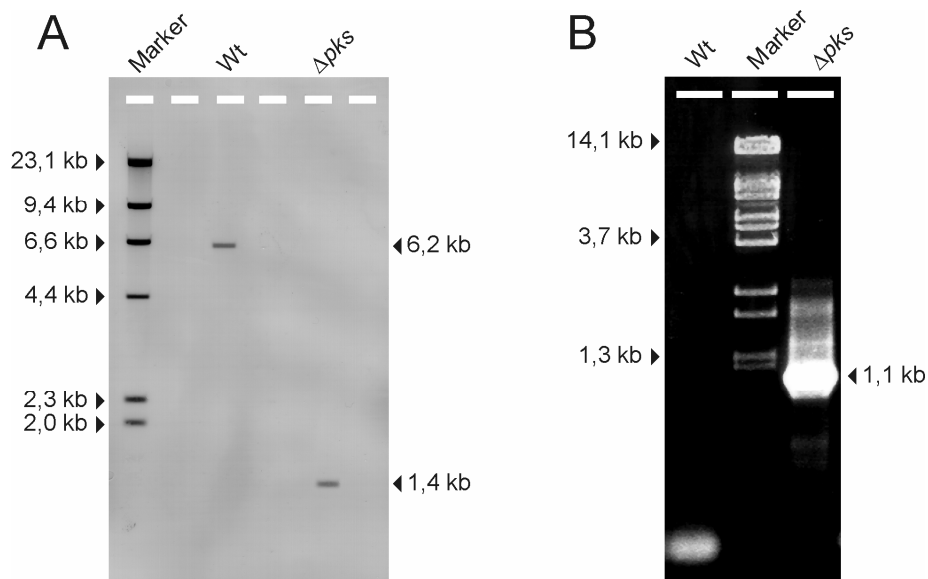


Abbildung 16: Nachweis der korrekten *pks* Deletion in *C. glutamicum*. **A.** Southernblot-Analyse. **B.** PCR-Analyse.

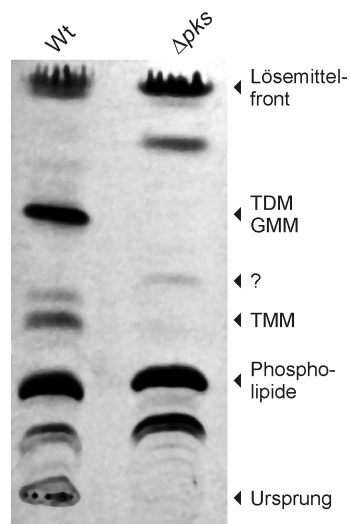


Abbildung 17: Dünnschichtchromatographische Analyse der freien Lipide der Δpks Mutante. Trehalosedimycolat (TDM), Trehalosemonomycolat (TMM), Glukosemonomycolat (GMM), unbekanntes Lipid (?).

5.3 Untersuchungen zur Struktur des Pks Proteins

Viele Polyketidsynthasen sowie Fettsäuresynthasen liegen *in-vivo* als Homodimere in einer helikalen Kopf – Schwanz Orientierung vor (Staunton *et al.*, 1996). Um zu überprüfen, ob auch das Pks Protein in *C. glutamicum* in seiner funktionellen Form auch als Homodimer vorliegt, wurde die homologe Überexpression eines His₆-Pks Fusionsproteins im Stamm *C. glutamicum* ATCC13032 pEKEx3_RBS_H₆_pks mit anschließender Proteinaufreinigung über Ni-NTA Affinitätschromatographie durchgeführt. Zur Überprüfung der Reinheit dieser Proteinpräparation wurde 1 µl des Säuleneluates in einer SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 18). Es zeigte sich, dass das Pks Protein in für die weiteren Untersuchungen ausreichender Reinheit und Konzentration vorlag. Die Proteinbande mit einer Größe von 172 kDa konnte massenspektrometrisch als Pks identifiziert werden. 500 µg des reinen Pks Proteins wurden im Anschluss mittels Größenausschlusschromatographie aufgetrennt und das apparente Molekulargewicht der einzelnen Proteine in den Elutionsfraktionen bestimmt.

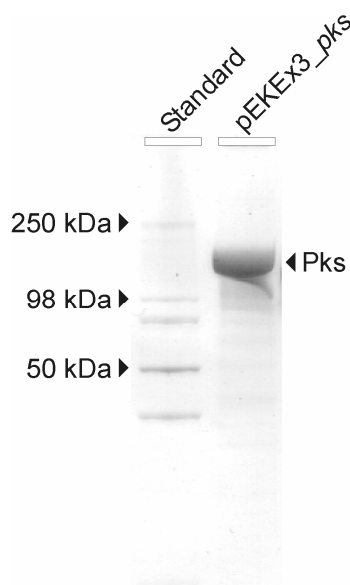


Abbildung 18: SDS-PAGE der Pks Präparation nach Aufreinigung durch Ni-NTA Affinitätschromatographie. In der rechten Spur wurde 1 µl der gereinigten Pks Präparation aus *C. glutamicum* aufgetragen.

Das Chromatogramm zeigte zwei Hauptpeaks (Abbildung 19A). Der erste Peak lag bei einem Elutionsvolumen von 45,07 ml, was einem apparenten Molekulargewicht von 295 kDa entsprach. Das zweite, größere Signal besaß sein Absorptionsmaximum bei einem Elutionsvolumen von 53,85 ml, woraus sich ein apparentes Molekulargewicht von 147 kDa bestimmen ließ. Diese Untersuchung sowie die Kalibrierung der Säule durch Eichproteine wurden jeweils zweimal durchgeführt, so dass zur Auswertung jeweils die Mittelwerte der in den beiden Läufen bestimmten Elutionsvolumina eingesetzt wurden.

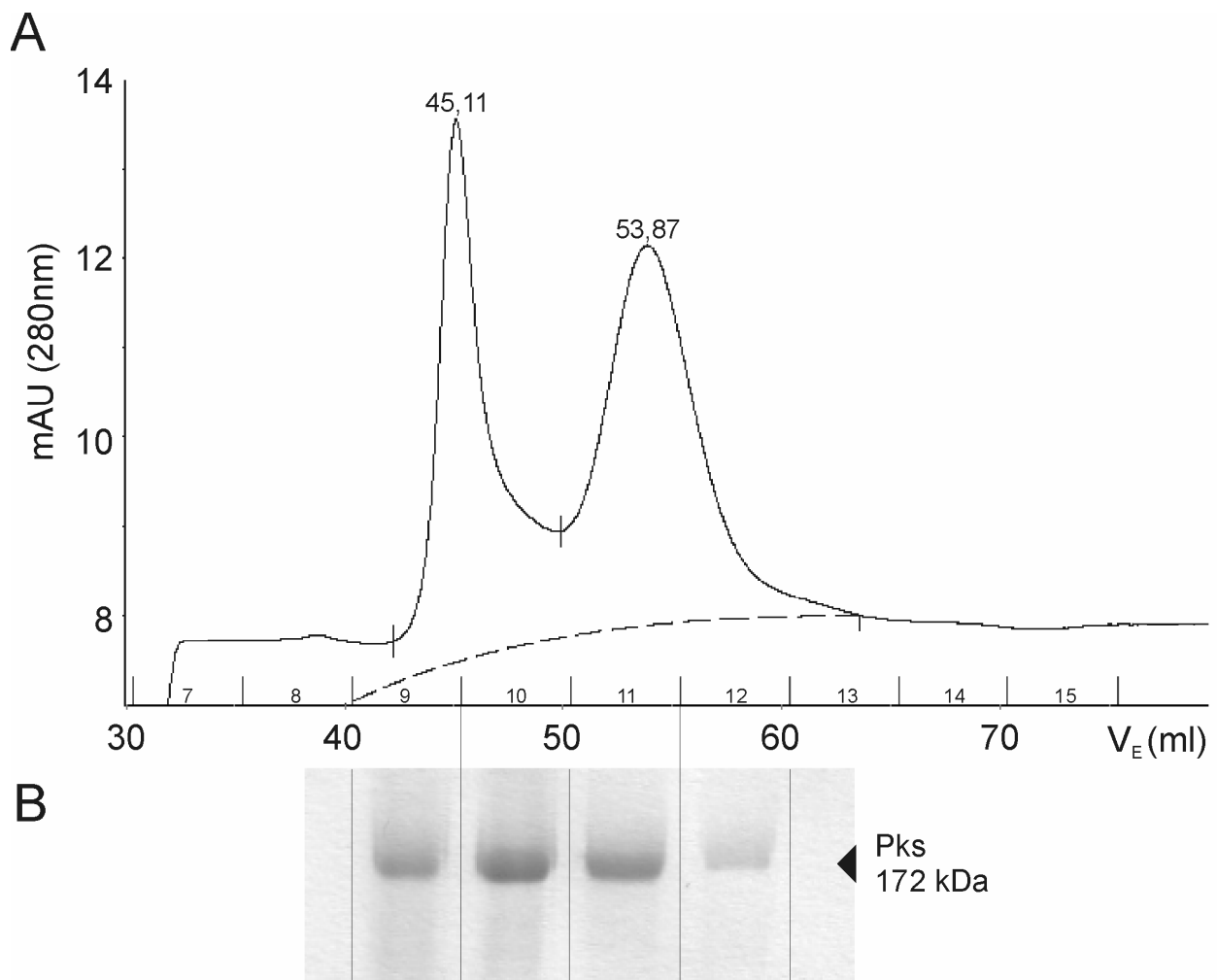


Abbildung 19: Größenausschlusschromatographie des Pks Proteins zur Bestimmung seines apparenten Molekulargewichts und seiner Dimerbildung *in-vivo*. **A.** Chromatogramm eines der Größenausschlusschromatographischen Läufe. Auf der V_E -Achse sind neben dem Elutionsvolumen die Nummern der gesammelten Fraktionen aufgetragen. **B.** Auftrennung der Fraktionen 9 bis 12 in einem SDS-Gel.

Zum Nachweis, welche Proteine bei den gemessenen Elutionsvolumina durch die Säule brachen, wurden je 100 µl der Proteinlösung aus den Fraktionen 9 bis 12 in einem SDS-Gel aufgetrennt (Abbildung 19B). Es zeigten sich in allen vier untersuchten Elutionsfraktionen Banden identischer Größe. Diese Proteinbanden konnte mittels MALDI-TOF-MS als Pks mit einem Molekulargewicht von 172 kDa identifiziert werden. Das mittels Größenausschlusschromatographie ermittelte apparente Molekulargewicht von 147 kDa wurde demnach um ca. 15 % kleiner bestimmt. Diese Abweichung ist methodisch bedingt, da die Trennung über die Größenausschlusschromatographie nicht ausschließlich durch Molekulargewichtsunterschiede erfolgt, sondern auch von der Form der untersuchten Proteine abhängig ist. Der Vergleich der apparenten Molekulargewichte beider Peaks führte zu dem Ergebnis, dass das Protein des ersten Peaks um den Faktor 1,9 größer bestimmt wurde als das des zweiten Peaks. Dies deutet auf die Dimerisierung zweier Pks Moleküle zu einem Komplex hin.

5.4 Nachweis der Acyl-AMP Ligase Aktivität der annotierten Acyl-CoA Synthase (*fadD*)

Trivedi *et al.* (2004) konnten die Adenylierung von Fettsäuren durch das FadD32 Protein aus *Mycobacterium smegmatis* in einem Enzymtest nachweisen. Im Folgenden sollte für das in *C. glutamicum* am 5'-Ende von *pks* liegende *fadD* untersucht werden, ob dessen Genprodukt ebenfalls die Adenylierung einer langkettigen Fettsäure wie Palmitat oder Oleat katalysiert. Dazu wurde FadD heterolog in *E. coli* DH5α überexprimiert, mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie gereinigt und seine Identität durch MALDI-TOF Massenspektrometrie bestätigt. Bei der Proteinreinigung über Ni-NTA Affinitätschromatographie unter Standardbedingungen wurde das Säulenmaterial nach dem Probenauftrag mit einem 20 mM Imidazol enthaltenden Puffer gewaschen. Dabei wurden unspezifisch an den Adsorber bindende Proteine entfernt. Anschließend wurde das Zielprotein mit 100 mM Imidazol von der Säule eluiert. Von der Elutionsfraktion wurden 2 µl in einem SDS-Gel analysiert (Abbildung 20). Es zeigte sich, dass neben dem FadD Protein weitere Proteine als Verunreinigung vorherrschten. Die Erhöhung der

Imidazolkonzentration im Waschpuffer auf 35 mM führte schließlich zu sauberen Proteinen.

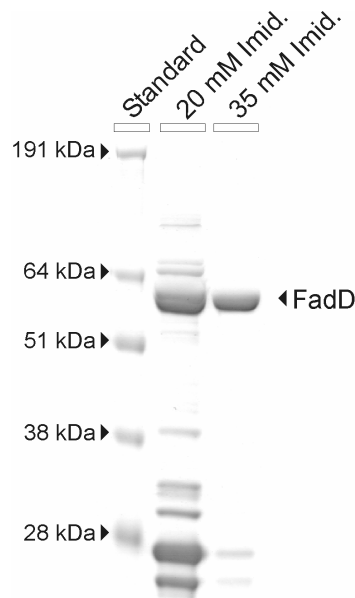


Abbildung 20: SDS-PAGE zweier FadD Reinigungen über Ni-NTA Affinitätschromatographie. Aufgetragen wurden jeweils 2 μ l der gereinigten Proteinlösungen und in der linken Spur 5 μ l des SeeBlue Größenstandards. Waschpuffer enthielt 20 mM Imidazol (20 mM Imid.), bzw. 35 mM Imidazol (35 mM Imid.)

Die Identität des gereinigten Enzyms wurde massenspektrometrisch nachgewiesen und für einen Acyl-Adenylierungstest verwendet. Dabei wurde ^{14}C -markiertes Palmitat und ATP als Substrat eingesetzt. Die Reaktionsprodukte wurden mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt, autoradiographisch visualisiert und die Signale mit den Laufeigenschaften bekannter Standards verglichen. Dieser Enzymtest wurde freundlicherweise von Dr. Lynn G. Dover Universität von Birmingham, UK durchgeführt.

Wie aus Abbildung 21 zu ersehen ist, ist eine zeitliche Zunahme der aus ATP und ^{14}C -Palmitat gebildeten Acyl-Adenylate im Vergleich zur Kontrolle (0 s) festzustellen. Aus der Bildung der Acyl-Adenylate folgt, dass wie bereits bei FadD32 in *M. smegmatis* gezeigt wurde (Trivedi *et al.*, 2004), auch FadD in *C. glutamicum* eine Acyl-AMP Ligase Funktion besitzt. Da FadD im *in-vitro* Enzymtest langkettige

C₁₆ Fettsäuren als Substrate verwenden konnte und sich sein codierendes Gen in unmittelbarer Nachbarschaft zu *pks* befindet, liegt die Vermutung nahe dass dieses Enzym maßgeblich an der Aktivierung einer langkettigen Fettsäure durch Adenylierung beteiligt ist. Diese aktivierte Vorstufe könnte dann beispielsweise direkt an die ACP Domäne der Polyketidsynthase gebunden und anschließend durch die Acyl-CoA Carboxylase für die eigentliche Verknüpfung mit der zweiten Fettsäure aktiviert werden.

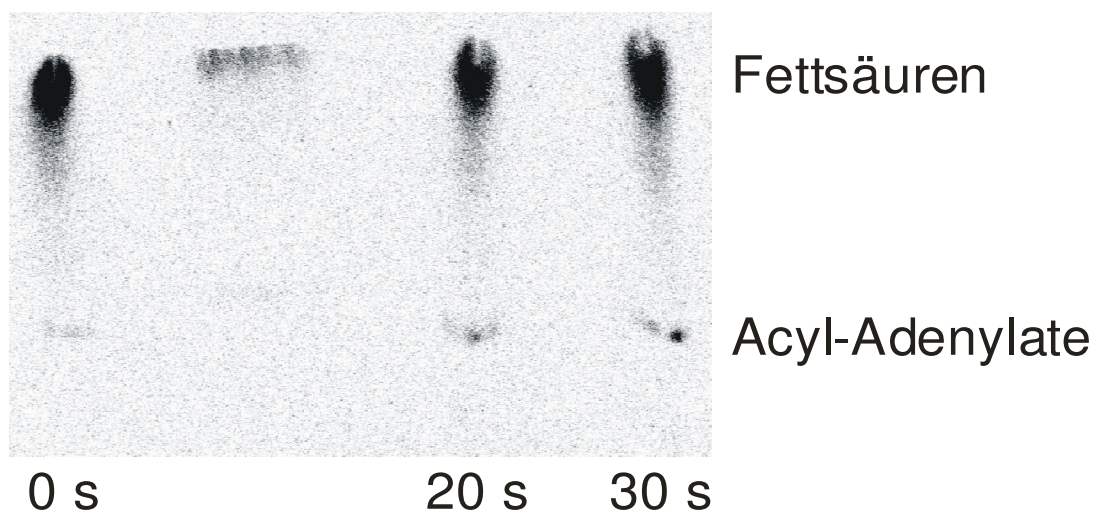


Abbildung 21: Nachweis der Acyl-Adenylierungsaktivität von FadD durch einen Enzymtest.

6 Untersuchungen zur Translokation von Mycolsäuren in *C. glutamicum*

Es ist bekannt, dass Mycolsäuren in der Zelle immer an Zucker gebunden, und zwar an Trehalose-, Arabinose- oder auch Glukoseresten vorliegen (Tropis *et al.*, 2005). Dies warf die Frage nach dem Mechanismus der Übertragung der Mycolsäuren auf die Zuckerreste und das Arabinogalaktan bzw. deren Translokation durch die Zellmembran auf. Die Frage bestand, ob weitere Gene aus dem konservierten Bereich vor *pks* bei dieser Übertragung eine Rolle spielen

(Abbildung 14). Bei den beiden Genen *cmytA* und *cmytB* handelt es sich um bekannte Mycolyltransferasen (Brand *et al.*, 2003; Puech *et al.*, 2003). Sie üben eine Funktion bei dem Transfer der Mycolsäuren von Trehalosemonomycolat zur Bildung von Trehalosedimycolat oder auf das Arabinogalaktan aus. Zwischen diesen Mycolyltransferasen und der Acyl-AMP Ligase *fadD* sind zwei weitere Gene lokalisiert, eines (*cut*) davon ist in *M. smegmatis* essentiell (Sasseti *et al.*, 2003). Das entsprechende Genprodukt besitzt in *C. glutamicum* mehrere Transmembranhelices und eine Signalsequenz für den zellulären Export. Es liegt folglich in der Cytoplasmamembran inseriert vor oder ist in ihr verankert. Bei dem kleinsten Gen im *pks* Locus handelt es sich um ein an *cut* grenzendes hypothetisches Protein (*hyp*) das auch mehrere Transmembranhelices aufweist und nur in den *Corynebacterium* Spezies vorhanden ist. Auch *hyp* besitzt laut computergestützten Analysen eine Signalsequenz für den zellulären Export.

6.1 Deletion weiterer Gene im Bereich des *pks* Locus

Die konservierten Gene, die sich im 5'-Bereich des konservierten *pks*-Genortes in *C. glutamicum* befinden, stehen vermutlich mit der Translokation von Mycolsäuren auf das Arabinogalaktan oder Trehalose in Zusammenhang. Um diese Funktion nachzuweisen, wurden Deletionsmutanten der Gene *cmytA*, *cmytB*, *hyp* und *cut* in unterschiedlichen Kombinationen mit dem pK19*mobsacB* System erstellt (Abbildung 22). Die erhaltenen Klone wurden durch PCR-Analysen auf vorhandene Deletion untersucht (Verwendete Primer siehe Anhang). In Tabelle 6 sind die Kombinationen der deletierten Gene zusammengefasst und die Koloniegröße der Deletionsstämme angegeben. Es zeigte sich, dass die Kolonien bei dem Versuch der Erstellung der ΔA und ΔC Mutanten, die bereits nach zwei Tagen Inkubation auftraten, alle eine Wiederherstellung der genetischen Wildtypsituation zeigten. Es besteht demnach ein sehr starker Selektionsdruck auf den Erhalt dieser Gene. Dennoch konnten Stämme mit erfolgter Deletion nach einer Inkubation der Agarplatten von 6 bis 8 Tagen erhalten werden. Dabei zeigten alle der getesteten, schlecht wachsenden Klone im Fall von ΔA und 20 % im Fall von ΔC die erfolgte Deletion. Alle weiteren Deletionsstämme zeigten keine reduzierte Koloniegröße

oder –morphologie. Von diesen großen Kolonien zeigten aber trotzdem nur 10 bis 15 % der getesteten Stämme die erfolgte Deletion.

Tabelle 6: Kombination von Deletionen im stromaufwärts gelegenen Bereich des *pks* Lokus. In der Spalte „Kleine Kolonien“ ist die Größe der Kolonien auf BHIS Agarplatten qualitativ angegeben. Keine Abweichung zum Wildtyp (-), unwesentlich kleinere Kolonien (+), signifikant kleinere Kolonien (++).

Mutante	Deletierte Gene	Kleine Kolonien	Vorhandene Deletion / getestete Kolonien
ΔA	<i>hyp-cut-cmytA-cmytB</i>	++	1 / 1
ΔB	<i>cmytA-cmytB</i>	-	2 / 50
ΔC	<i>hyp-cut</i>	+	1 / 5
Δcut	<i>cut</i>	-	2 / 20
Δhyp	<i>hyp</i>	-	3 / 20

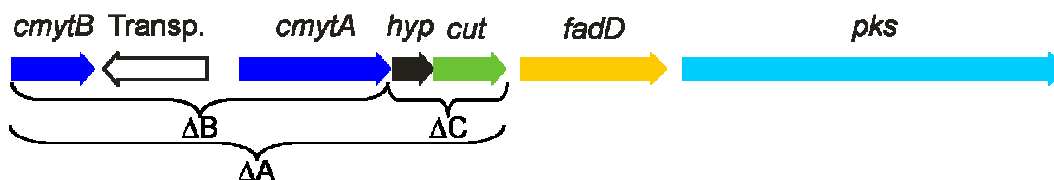


Abbildung 22: Genomischer Bereich am 5'-Ende des *fadD* Gens in *C. glutamicum*. Mycolyltransferasen (*cmytA*, *cmytB*), hypotehtisches Protein (*hyp*), Kutinase (*cut*), Acyl-AMP Ligase (*fadD*), Polyketidsynthase (*pks*), Transposase (Transp.).

6.2 Charakterisierung der Deletionsstämme aus 6.1

Nach der Deletion der Gene in Nachbarschaft der Acyl-AMP Ligase FadD in unterschiedlichen Kombinationen sollte das Wachstum der einzelnen Stämme im Minimal- und Komplexmedium untersucht werden. Die Mutanten ΔB , Δhyp und Δcut (Abbildung 22) zeigten dabei im Minimalmedium keine signifikante Abwei-

chung vom Wildtyp (Abbildung 23). Die ermittelten Wachstumsraten der exponentiellen Phase sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Die ΔC Mutante zeigte eine leicht reduzierte Wachstumsrate und eine verlängerte lag Phase. Im Gegensatz dazu war ein Wachstum der ΔA Mutante in Minimalmedium nicht möglich. Deshalb wurden zusätzlich Wachstumsversuche in BHIS Komplexmedium durchgeführt (Abbildung 24). Auch in diesem Medium zeigte die ΔC Mutante ein leicht verlangsamtes Wachstum, wogegen eine Verlängerung der lag Phase nicht beobachtet werden konnte. Die ΔA Mutante zeigte auch hier einen sehr starken Wachstumsdefekt. Es war zwar ein Wachstum bei stark verlangsamter Wachstumsrate möglich, die Endzelldichte mit einer optischen Dichte von 18, wie im Fall des Wildtyps, wurde aber nicht erreicht. Sie lag hier bei maximal 3,5 und sank bei weiterer Kultivierung stark ab, was als Hinweis auf eine verstärkte Lysisbereitschaft der Zellen, vielleicht bedingt durch eine veränderte Zellwandstruktur, gewertet werden könnte.

Tabelle 7: Wachstumsraten des *C. glutamicum* ATCC13032 Wildtyps und der fünf Deletionsstämme in Minimal- und Komplexmedium. n.d. = kein Wachstum nachweisbar; - = nicht bestimmt

Stämme	Wachstumsrate in CgXII Medium (h^{-1})	Wachstumsrate in BHIS Medium (h^{-1})
Wildtyp	0,25	0,85
ΔA	n.d.	0,13
ΔB	0,24	-
ΔC	0,21	0,68
Δhyp	0,24	-
Δcut	0,25	-

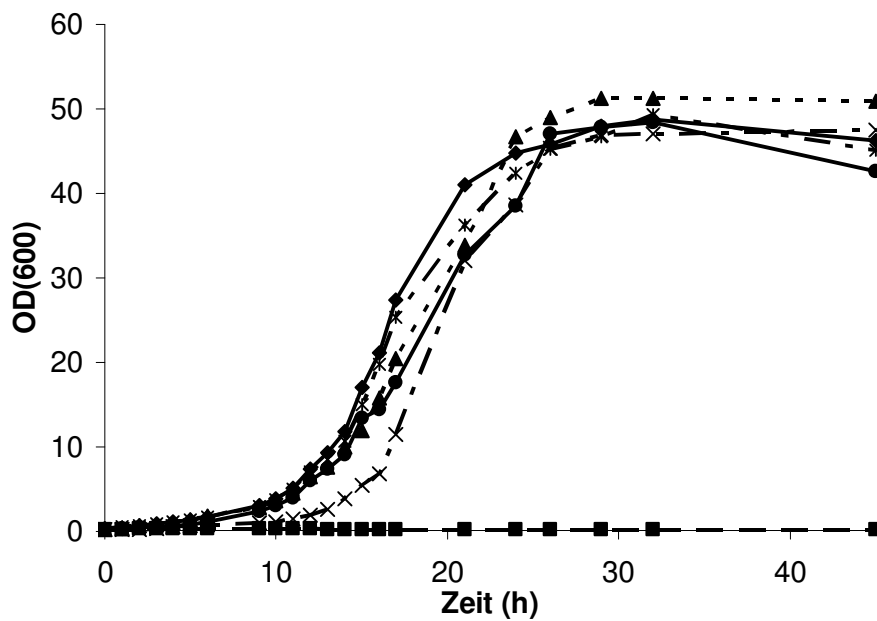


Abbildung 23: Wachstum des *C. glutamicum* ATCC13032 Ausgangsstamms und der Deletionsmutanten auf CgXII Minimalmedium. Der Wildtyp (◆) und die fünf Deletionsmutanten ΔA (■), ΔB (▲), ΔC (×), Δhyp (✱) und Δcut (●) wurden bei 30 °C im Minimalmedium inkubiert und das Wachstum verfolgt.

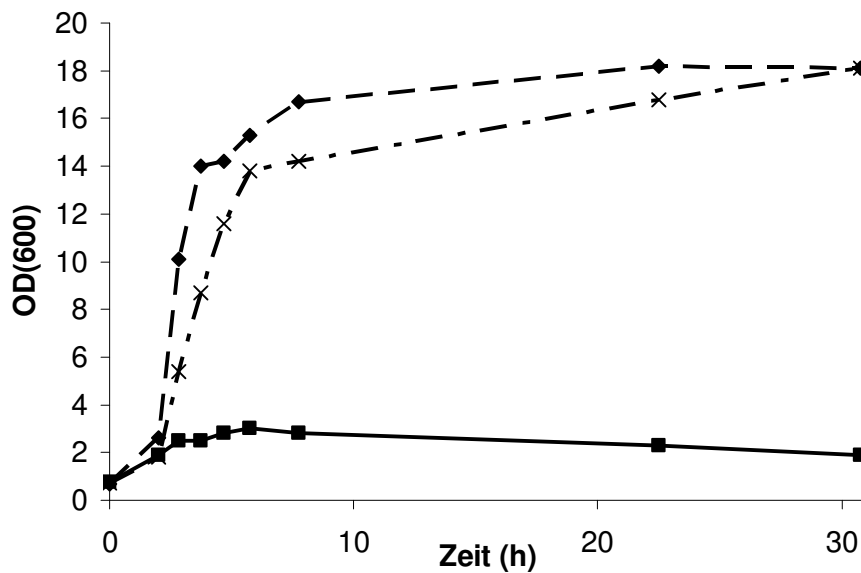


Abbildung 24: Wachstumskurve des *C. glutamicum* ATCC13032 Ausgangsstamms und der Deletionsmutanten ΔA und ΔC in BHIS Komplexmedium. Der Wildtyp (◆) und zwei Deletionsmutanten (ΔA (■) und ΔC (×)) wurden bei 30 °C inkubiert und das Wachstum verfolgt.

Um Einblicke in die Zellmorphologie der einzelnen Deletionsmutanten zu erhalten, wurden lichtmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurden die Stämme über Nacht auf BHIS Agarplatten kultiviert und davon Zellen in 10 μ l BHIS Medium auf einem Objektträger resuspendiert. Die Untersuchung von in Flüssigmedien kultivierter Zellen erwies sich als problematisch, da sich die Zellpopulation durch viele Zellbruchstücke als morphologisch sehr heterogen erwies. Korrelierend zu den Wachstumsversuchen zeigten sowohl ΔB als auch Δhyp morphologisch keinen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp. Dagegen führte die Deletion der vier Gene *cmytA*, *cmytB*, *cut* und *hyp* (ΔA) zu gravierenden morphologischen Veränderungen (Abbildung 9). Die Zellen erschienen kleiner, kugelig und bildeten zusammenhängende Ketten. Diese Kettenbildung könnte durch eine unvollständige Zellteilung bedingt sein. Die Deletionsmutanten ΔC und Δcut erwiesen sich als langgestreckt und keulenförmig. Außerdem besaßen sie an den Teilungsstellen blasenförmige Aufwölbungen.

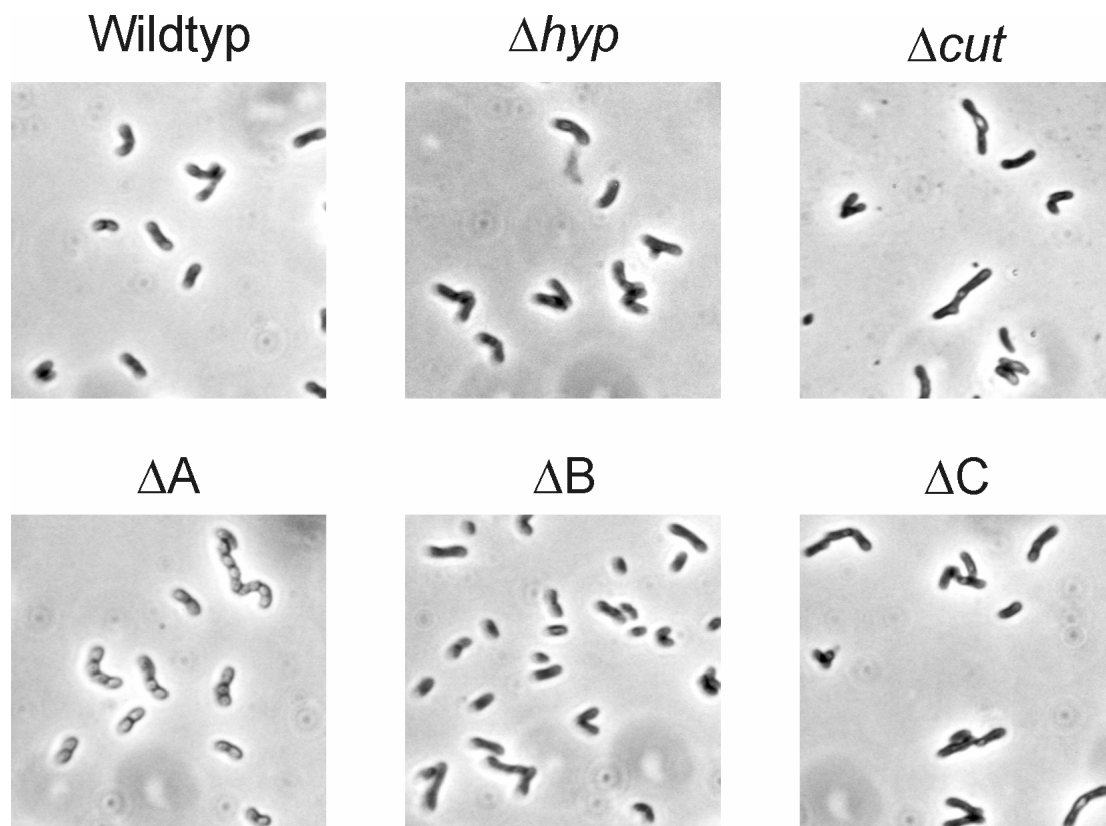


Abbildung 25: Lichtmikroskopische Untersuchung der fünf Deletionsmutanten und des Wildtyps.

6.3 Lipidanalytik der Deletionsstämme aus 6.1

Um bei den hier beschriebenen Stämmen die phänotypischen Veränderungen mit der Lipidzusammensetzung der Zellwand korrelieren zu können, wurden die einzelnen Stämme in BHIS Vollmedium kultiviert und die Lipide mit ^{14}C -Acetat wie beschrieben markiert. Nach der Lipidextraktion wurde die organische Phase dünnenschichtchromatographisch aufgetrennt und die radioaktiven Signale autoradiographisch visualisiert. Dabei zeigte sich erstaunlicherweise, dass sich die Lipidprofile aller Mutanten im Hinblick auf das Vorhandensein von freien Mycolsäuren nicht signifikant vom Wildtyp unterschieden (Abbildung 26). Die vier untersuchten Gene üben also keine Funktion bei der Mycolsäuresynthese oder deren Reifung aus, sondern spielen vermutlich bei ihrer Translokation durch die Zellwand oder bei der Übertragung auf das Arabinogalaktan eine Rolle. Nur im Fall der ΔA Mutante zeigte sich eine Veränderung in ihrem Lipidprofil, obwohl Mycolsäuren nachgewiesen werden konnten (Abbildung 26). Auffällig war das Auftreten eines neuen, intensiven Signals, das bisher in keiner weiteren Mutante beobachtet wurde und dessen Laufverhalten nicht mit dem bekannter Standardlipide übereinstimmte. Um zu klären, ob es sich bei diesem Signal um ein bei der Mycolsäuretranslokation essentielles Intermediat handelt, wurden aus 10 g Zelltrockenmasse die Lipide extrahiert und die neu aufgetretene Lipidspezies durch Gaschromatographie, NMR und HPLC Analysen untersucht. Diese Versuche wurden freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G. S. Besra (School of Biosciences, University of Birmingham, UK) durchgeführt. Dabei stellte sich diese Lipidspezies als ein Phosphatidylglycerol Derivat mit unterschiedlichen Lipidbestandteilen, überwiegend C18:1 and C16:1 heraus. Dieses Lipidderivat kann nach heutigem Kenntnisstand nicht mit der Mycolsäuresynthese in Zusammenhang gebracht werden. Vermutlich war seine Akkumulation auf das generell schlechte Wachstum und die dadurch einhergehende starke Schädigung des allgemeinen Stoffwechsels des ΔA Stamms zurückzuführen. Dieses Lipidderivat konnte bei einer Kultivierung der ΔA Mutante unter optimalen Wachstumsbedingungen im Fermenter, wobei sich auch eine höhere Wachstumsrate aber keine höhere Endzellkonzentration einstellte, nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigte die ΔB Mutante, bei der beide Mycolyl-

transferasen *cmytA* und *cmytB* deletiert wurden, in den bisherigen Analysen keinen signifikanten Phänotyp.

Ergänzend wurde die Menge des inkorporierten ^{14}C -Acetats durch Radio-szintillationsmessungen der gereinigten Lipidextrakte bestimmt. Die Menge der in den freien Lipiden vorhandenen Radioaktivität war in allen Stämmen mit der im Ausgangsstamm vergleichbar (Tabelle 8). Die Deletionsmutante ΔA zeigte einen leicht reduzierten Wert, der durch die geringere Zelldichte dieses schlecht wachsenden Stammes bedingt war. Interessanterweise war die in der Fraktion der kovalent gebundenen Lipide vorhandene Radioaktivität bei den Stämmen ΔA und ΔB , also den Stämmen in denen zwei der sechs Mycolyltransferasen fehlten, stark reduziert. Das daraus resultierende Verhältnis aus inkorporierter Radioaktivität in die freien- zu der in gebundenen Lipiden betrug im Fall der ΔA Mutante 30. Bezogen auf den Wildtyp entspricht das einem um den Faktor 7 erhöhten Wert. In diesem Stamm war folglich die Menge an kovalent gebundenen Mycolsäuren dramatisch reduziert, wogegen freie Mycolsäuren weiterhin nachweisbar waren.

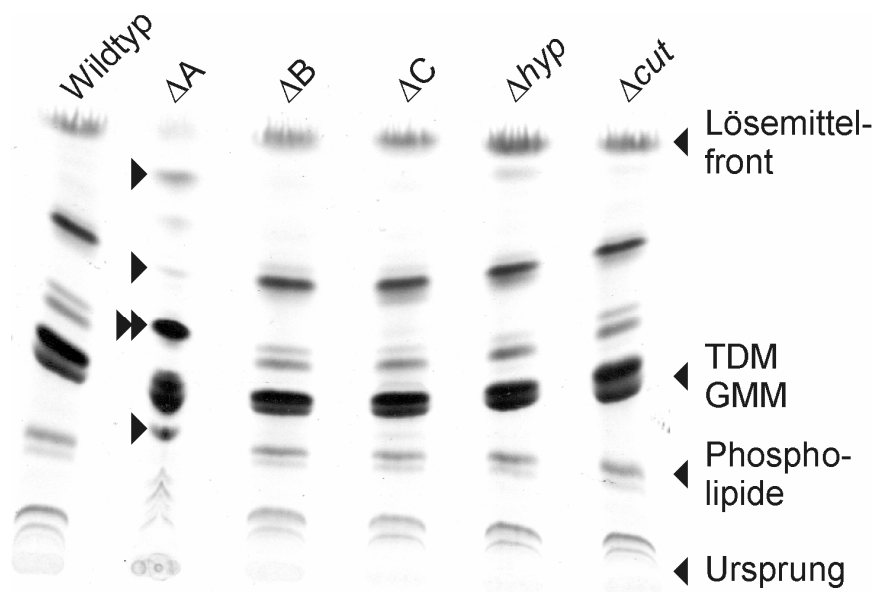


Abbildung 26: Dünnschichtchromatographische Analyse der freien Lipide der fünf *C. glutamicum* Deletionsstämmen und des Ausgangsstammes. Die mit einem Doppelpfeil markierte Lipidspezies wurde genauer charakterisiert.

Tabelle 8: Durch Radioszintillationsmessungen bestimmte Menge des inkorporierten ^{14}C -Acetats in *C. glutamicum* Zellen.

Stamm	Freie Lipide (cpm/ μl)	Gebundene Lipide (cpm/ μl)	Verhältnis Frei/Gebunden
Wildtyp	4.060	1.140	3,5
ΔA ($\Delta hyp \Delta cut \Delta cmytA \Delta cmytB$)	1.780	60	30
ΔB ($\Delta cmytA \Delta cmytB$)	3.730	770	5
ΔC ($\Delta hyp \Delta cut$)	3.420	1.410	2,5
Δhyp	3.830	1.320	3
Δcut	3.650	1.440	2,5

Das leicht erhöhte Verhältnis im Fall der ΔB Mutante um etwa den Faktor 1,5 war überraschend, denn diese Mutante zeigte in keinen bisherigen Untersuchungen einen erkennbaren Phänotyp. Dies weist auf eine gewisse Toleranz bezüglich der Menge an gebundenen Mycolsäurederivaten hin.

Diese Ergebnisse zeigen, dass alle vier in der ΔA Mutante fehlenden Gene zusammen bei dem Transfer von Mycolsäuren auf das Arabinogalaktan und / oder deren Translokation durch die Zellmembran involviert sind. Zwei der erstellten Mutanten zeigten eine reduzierte Menge an kovalent gebundenen Lipiden, was auf die Beteiligung der Gene *cmytA* und *cmytB* bei dem Mycolsäuretransfer auf das Arabinogalaktan schließen lässt. Dennoch zeigte erst die Deletion aller vier Gene einen ausgeprägten Effekt.

6.4 Untersuchungen zur Funktion einer Ubiprenyltransferase (UbiA) bei der Zellwandsynthese

Die gebundenen Mycolsäuren liegen in Form eines Esters mit den Arabinoseresten des Arabinogalaktans vor. In der Nachbarschaft der Mycolyltransferasen ist in allen *Corynebacterianae* eine annotierte, konservierte Ubiprenyltransferase (*ubiA*) lokalisiert (Abbildung 28). Das zu *ubiA* orthologe Gen aus *M. tuberculosis* (Rv3806c) wurde kürzlich als essentiell bei der Synthese von Polyprenylphosphat-5-Phosphoarabinose (Pppa) beschrieben (Huang *et al.*, 2005). Diese polyprenylierte Arabinose ist vermutlich die ubiquitäre Arabinosequelle zur Synthese des Arabinogalaktans. Ein hypothetischer Mechanismus für die Synthese dieses Intermediates ist in Abbildung 27 dargestellt.

Um auch die Funktion von *ubiA* in *C. glutamicum* zu untersuchen, wurde auch dieses Gen mit dem pK18*mob* System inaktiviert. Erfahrungsgemäß zeigten bisher alle Zellwandmutanten ein extrem schlechtes Wachstum. Deshalb wurden für den Nachweis der Inaktivierungsmutante ausschließlich kleine Kolonien verwendet, die ca. 8 bis 10 Tage nach erfolgter Elektroporation und Selektion auf kanamycinhaltigen Agarplatten erschienen. In allen getesteten dieser kleinen Kolonien konnte durch PCR-Analysen die erfolgreiche Inaktivierung von *ubiA* nachgewiesen werden. Das Wachstum und der makroskopische Phänotyp bezüglich der Kolonief orm und –oberfläche sowie die Zellform bei lichtmikroskopischer Analyse war der Ethambutol behandelten Zellen (Radmacher *et al.*, 2005) und der *emb* Deletionsmutante (Alderwick *et al.*, 2005) vergleichbar. In allen drei Fällen zeigte sich ein extrem schlechtes Wachstum, eine rauhe Kolonieoberfläche, Klumpenbildung in Flüssigkultur und ein charakteristisches Ablösen ganzer Kolonien beim Überimpfen von Agarplatten. Zusätzlich konnten keine zellwandgebundenen Mycolsäuren nachgewiesen werden, wogegen freie Mycolsäuren weiterhin vorhanden waren (Alderwick *et al.*, 2005). Folglich greift auch *ubiA* nicht direkt in die Bildung von Mycolsäuren, sondern vermutlich in die Synthese des Arabinogalaktans ein, indem es aktivierte Arabinosereste bereitstellt, die dann durch die Arabinosyltransferase *emb* auf das Arabinogalaktan übertragen werden (Radmacher *et al.*, 2005; Alderwick *et al.*, 2005).

Pentose-Metabolismus

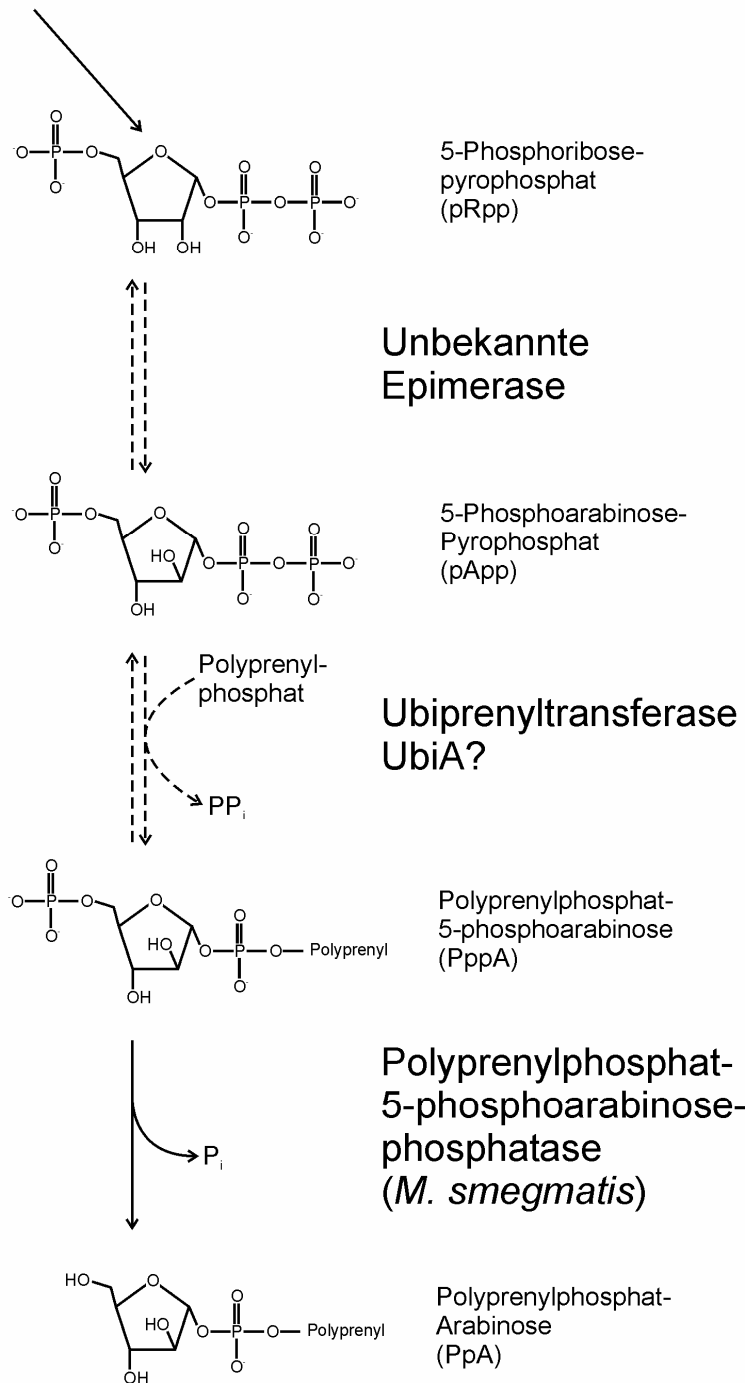


Abbildung 27: Hypothetischer Mechanismus der Polyphrenylphosphat-Arabinose Bereitstellung. Ausgehend von 5-Phosphoarabinose-Pyrophosphat könnte die Konvertierung zur 5-Phosphoarabinose-Pyrophosphat über eine unbekannte Epimerase erfolgen. Die darauf folgende Umsetzung zur Polyphrenylphosphat-5-Phosphoarabinose könnte durch das Genprodukt des untersuchten *ubiA* Gens erfolgen. Die Abspaltung der Phosphatgruppe an der 5' Position des Zuckers ist aus *M. smegmatis* bekannt und wird durch eine Polyphrenylphosphat-5-phosphoarabinose-phosphatase katalysiert (Huang *et al.*, 2005).

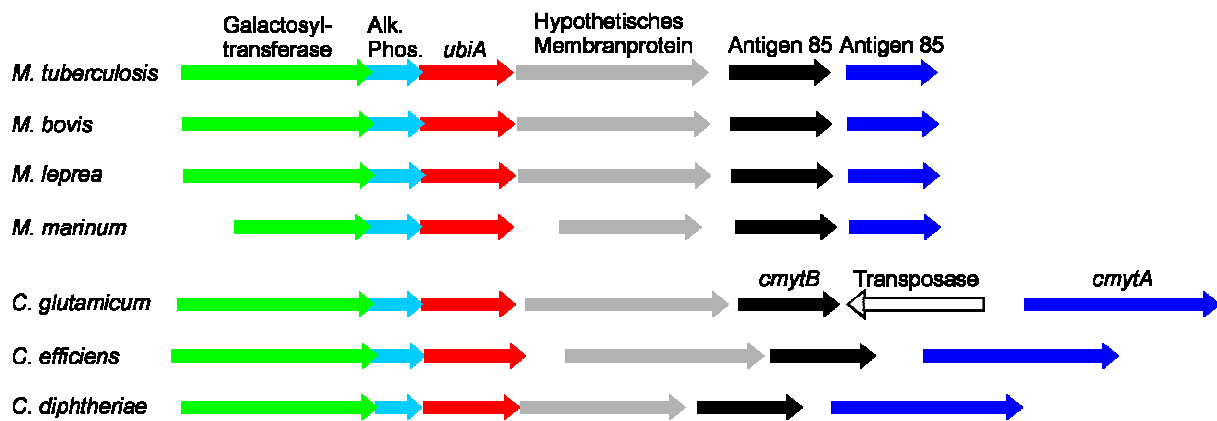


Abbildung 28: Chromosomale Lokalisierung des *ubiA* Gens in den sequenzierten *Corynebacteriaceae*.

Eine detaillierte Analyse des Zuckerpolymers der Zellwand wurde an der School of Biosciences (University of Birmingham, UK) und am Imperial College (London, UK) durchgeführt. Dazu wurden unter anderem GC-MS und FAB-MS-MS (*Fast Atom Bombardement Mass Spectrometry*) als Analysetechniken eingesetzt. Die gaschromatographische Analyse der *ubiA* Inaktivierungsmutante zeigte eine vollständige Abwesenheit jeglicher Arabinose in der Zellwand (Abbildung 29). Erwartungsgemäß lagen im Arabinogalaktan des Wildtyps unterschiedlich verknüpfte Arabinosereste vor. Das zeigte, dass *ubiA* tatsächlich für die Synthese eines aktivierten Arabinosederivates, vermutlich der Polyprenylphosphat-Arabinose (PpA) essentiell ist und dass PpA in *C. glutamicum* den einzigen Arabinosedonor darstellt.

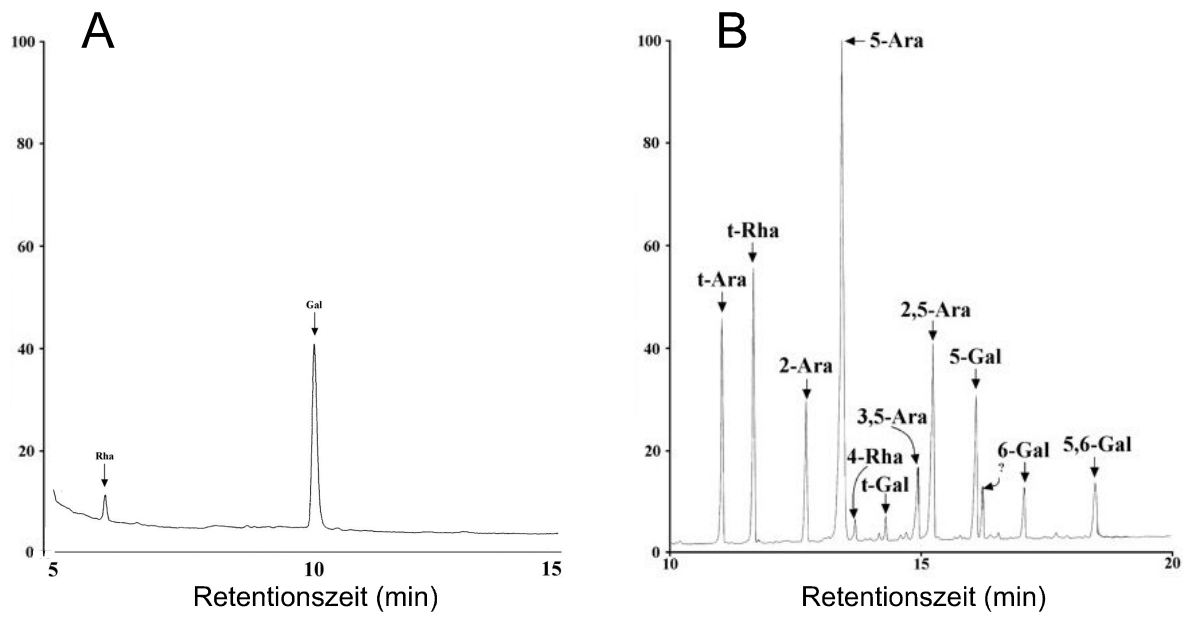


Abbildung 29: Gaschromatographische Analyse der Zuckerzusammensetzung der Zellwand der *ubiA* Inaktivierungsmutante (A) und des *C. glutamicum* Wildtyps (B).

IV DISKUSSION

1 Untersuchungen zur Mycolsäuresynthese

Die kürzlich publizierte Genomsequenz ergab, dass *C. glutamicum* vier paraloge Gene im Chromosom enthält, die Ähnlichkeiten zu der β -Untereinheit der Acetyl-CoA Carboxylase aus *E. coli* aufweisen. Dieser überraschende Befund und die Tatsache, dass eines der Paralogen mit der Glutamatbildung in Zusammenhang steht (Kimura *et al.*, 1997), war Anlass, die Funktion dieser vier putativen β -Untereinheiten in *C. glutamicum* eingehend zu untersuchen. Dazu wurden genetische und biochemische Untersuchungen zum *accD1* Gen in *C. glutamicum* durchgeführt. Es zeigte sich, dass dessen Genprodukt ein essentieller Bestandteil der bei der Fettsäuresynthese beteiligten Acetyl-CoA Carboxylase ist. Dieses Enzym spielt eine zentrale Rolle bei der irreversiblen Carboxylierung von Acetyl-CoA zur Synthese des für die Fettsäuresynthese benötigten Bausteins Malonyl-CoA (Alberts *et al.*, 1972; Gurchhait *et al.*, 1974; Cronan und Rock, 1996). Die Synthese von Malonyl-CoA konnte durch *in-vitro* Enzymtests mit Rohextrakten verschiedener *C. glutamicum* Stämme nachgewiesen werden. Bei der Überexpression des *accD1* Gens zeigte sich eine Verdoppelung der spezifischen Acetyl-CoA Carboxylaseaktivität in Bezug auf den Ausgangsstamm. Jedoch führte die gemeinsame Überexpression von *accD1* und *accBC* zu einer weiteren Steigerung der Malonyl-CoA Synthese um den Faktor 8. Dies zeigt, dass AccBC zusammen mit AccD1 den Acetyl-CoA Carboxylasekomplex bildet. Vergleichbar hohe spezifische Aktivitäten konnten bei der Untersuchung der Acetyl-CoA Carboxylase aus *M. bovis* (Rainwater und Kolattukudy, 1982), sowie der Propionyl-CoA Carboxylase aus *M. smegmatis* (Haase *et al.*, 1982), ermittelt werden. Diese Enzymkomplexe sind aus zwei separaten Untereinheiten aufgebaut, wovon die α -Untereinheit den Cofaktor Biotin trägt und als CO₂ Akzeptor bzw. Überträger dient (Alberts *et al.*, 1969). Die eigentliche Carboxylasereaktion sowie die Substratbindung erfolgt an der biotinfreien β -Untereinheit (Gurchhait *et al.*, 1974).

Das apparente Molekulargewicht der Acetyl-CoA Carboxylase beträgt bei *C. glutamicum* 714 kDa. Das lässt vermuten, dass das Enzym aus sechs α -Untereinheiten mit einem jeweiligen Molekulargewicht von 63,4 kDa und aus sechs β -Untereinheiten zu je 58,5 kDa aufgebaut ist (Heseler, 2005). Diese $\alpha_6\beta_6$ -Stöchiometrie ist auch von anderen Acetyl-CoA Carboxylasen, beispielsweise aus *Rhizobium etli* (Dunn *et al.*, 2004), oder der Propionyl-CoA Carboxylase aus *M. smegmatis* (Haase *et al.*, 1982) bekannt. Die Kristallstruktur des β_6 -Komplexes der Propionyl-CoA Carboxylase aus *Streptomyces coelicolor* (Diacovich *et al.*, 2004) zeigt eine ringförmige Anordnung der sechs Untereinheiten. Eine vergleichbare Struktur konnte auch für die Acetyl-CoA Carboxylase aus *C. glutamicum* mittels Cryo-Elektronenmikroskopie wahrscheinlich gemacht werden (Heseler, 2005). Der AccD1-AccBC Komplex aus *C. glutamicum* ist folglich sowohl strukturell als auch funktionell mit anderen bekannten Acyl-CoA Carboxylasen vergleichbar (Gurchait *et al.*, 1974). Da die dreidimensionale Struktur dieses Enzyms bisher aus keinem einzigen Organismus bekannt ist, und das Enzym aus *C. glutamicum* als stabiler Komplex isoliert werden kann, ist diese Acetyl-CoA Carboxylase ideal, um die Struktur eines solchen Enzyms aufzuklären.

Inaktivierungsstudien der beiden paralogen Acyl-CoA Carboxyltransferasen *accD2* und *accD3* zeigten, dass diese Gene bzw. ihre Genprodukte in *C. glutamicum* spezifisch an der Mycolsäuresynthese beteiligt sind. Sie haben im Gegensatz zu *accD1* keinen direkten Einfluss auf die Fettsäuresynthese. Portevin *et al.* (2005) führten Untersuchungen zur Lipidzusammensetzung des Wildtyps von *C. glutamicum* und einer *accD3* Inaktivierungsmutante durch. Dabei ergab ein Vergleich beider Lipidprofile, dass bei der *accD3* Mutante neben der Abwesenheit von Mycolsäuren auch kein Tetradecylmalonat synthetisiert wurde, was somit eine mögliche aktivierte Vorstufe für die Mycolsäuresynthese darstellt.

Bei der an der Mycolsäuresynthese beteiligten Acyl-CoA Carboxylase handelt es sich ebenfalls um einen Multienzymkomplex mit einem in dieser Arbeit bestimmten apparenten Molekulargewicht von 286 kDa bestehend aus AccD2, AccD3 und AccBC. Ob dies tatsächlich der Molekülmasse des gesamten Komplexes entspricht ist fraglich. Wie bereits erwähnt, besitzen die bekannten Acetyl-CoA Carboxylasekomplexe Molekulargewichte von über 700 kDa (Haase *et al.*, 1984;

Diacovich *et al.*, 2004; Dunn *et al.*, 2004). Da der Komplex der Acyl-CoA Carboxylase aber eine sehr geringe Stabilität aufweist, könnte es sich bei dem 286 kDa großen Komplex nur um einen Teil der nativen Acyl-CoA Carboxylase handeln (Portevin *et al.*, 2005). Dennoch ist die Anwesenheit von zwei verschiedenen β -Untereinheiten überraschend und wurde bislang bei keiner anderen Acyl-CoA Carboxylase beschrieben. Vielleicht liegt die funktionelle Bedeutung dieser strukturellen Besonderheit in der Verbindung zweier Carboxylasefunktionen, wie dies von der Transcarboxylase aus *Propionibacterium shermanii* beschrieben wurde (Hall *et al.*, 2003). Hierbei handelt es sich um einen Multienzymkomplex mit einer Größe von 1,2 MDa, der eine Übertragung der Carboxylgruppe von Methylmalonyl-CoA auf Pyruvat katalysiert, wodurch Propionyl-CoA und Oxalacetat gebildet werden. Dabei dient das gebildete Oxalacetat bei den Propionibakterien als Oxidationsmittel für NADH. Diese Reaktion ist für die Propionsäurebildung der Propionibakterien essentiell (Allen *et al.*, 1964). Die Acyl-CoA Carboxyltransferase AccD3 aus *C. glutamicum* zeigt zur 12 S Untereinheit dieses Komplexes aus *P. shermanii* eine Sequenzidentität von 41 % (Kimura *et al.*, 1996). Der Transfer von reaktiven Intermediaten zwischen verschiedenen Untereinheiten eines Multienzymkomplexes erlaubt ein komplexes Zusammenspiel aus Regulation und Modulation der Spezifitäten solcher Reaktionswege (Hall *et al.*, 2003).

Bei der Analyse der Zusammensetzung des AccD2-AccD3-AccBC Komplexes stellt sich zusätzlich die Frage nach der Funktion des kleinen offenen Leserasters, das sich direkt an *accD2* anschließt. Diacovich *et al.* (2002) konnten in ihrer Arbeit mit der Propionyl-CoA Carboxylase aus *Streptomyces coelicolor* nachweisen, dass der stromabwärts des Gens der β -Untereinheit liegende offene Leserahmen für ein Peptid kodiert, das essentiell bei der Stabilisierung dieser Propionyl-CoA Carboxylase ist. Erst bei der *in-vitro* Rekonstituierung des Komplexes in Anwesenheit dieser so genannten ϵ -Untereinheit konnte eine signifikante Carboxylaseaktivität detektiert werden. Die Autoren postulierten, dass diese ϵ -Untereinheit zwar keine katalytische Funktion, aber eine essentielle Rolle bei der Assemblierung oder Stabilisierung des Komplexes spielt. Ob das in *C. glutamicum* und anderen *Corynebacterium* Spezies an das *accD2* angrenzende Gen eine ähnliche Funktion besitzt, ist unklar. In keiner Proteinreinigung des AccD2-AccD3-

AccBC Komplexes konnte bisher diese putative ϵ -Untereinheit nachgewiesen werden.

Neben der Aktivierung einer Acylkette durch Carboxylierung konnten Trivedi *et al.* (2004) kürzlich einen neuen Mechanismus zur Fettsäureaktivierung in Form der Adenylierung einer freien Laurinsäure in einem *in-vitro* Testsystem mit gereinigtem FadD32 Protein aus *M. smegmatis* nachweisen. In der vorliegenden Arbeit konnte eine vergleichbare Aktivität von FadD aus *C. glutamicum* nachgewiesen werden, wobei die Adenylierung von freier Palmitinsäure in einem *in-vitro* Testsystem gezeigt wurde (① in Abbildung 30). Aus diesem Befund, der Identifizierung von Tetradecylmalonat (Portevin *et al.*, 2004), sowie den weiteren Ergebnissen dieser Arbeit kann das im Folgenden beschriebene Modell zur Mycolsäuresynthese erstellt werden. Der Fettsäurerest wird nach Aktivierung zunächst mit der Acyl-Carrier Domäne (ACP) der Polyketidsynthase Pks verknüpft (② in Abbildung 30). Dieser Rest bildet später den α -Zweig der Mycolsäure. Das Gen für die Polyketidsynthase befindet sich unmittelbar am 3'-Ende von *fadD* in allen untersuchten *Corynebacterianae*. Ihr kommt die eigentliche Rolle bei der Verknüpfung der linearen Fettsäuren zur verzweigten Mycolsäure zu (Gande *et al.*, 2004; Portevin *et al.*, 2004). Polyketidsynthasen besitzen ebenso wie Fettsäuresynthasen einen modularen Aufbau aus mehreren hintereinander angeordneten Domänen unterschiedlicher Funktionen wie beispielsweise Thioesterasen, Acyltransferasen oder Enoylreduktasen (Staunton und Weissman, 2001; Weissman, 2005). Bei der eigentlichen Kohlenstoff-Kohlenstoff Verknüpfung kommt die Hauptfunktion der β -Ketoacylsynthase Domäne (KAS) zu, durch die Acylketten miteinander verknüpft werden (Staunton und Weissman, 2001). Die aktivierte Acylkette liegt während des gesamten Reaktionszyklus kovalent am Phosphopantetheinrest der ACP Domäne gebunden vor, die am aminoterminalen Ende von Pks liegt. Der Panthothentrest stellt einen flexiblen Bereich dar, der einen Transfer des daran gebundenen Substrates an die einzelnen Module der Polyketidsynthase ermöglicht (Chirala und Wakil, 2004). Die zweite Fettsäure wird innerhalb der β -Ketoacylsynthase Domäne (KAS) ebenfalls in Form eines Thioesters gebunden, vergleichbar zur Bindung der Acylkette an der Fettsäuresynthase (Dewar *et al.*, 1988). Ob bei diesem Schritt ebenfalls ein adenyliertes

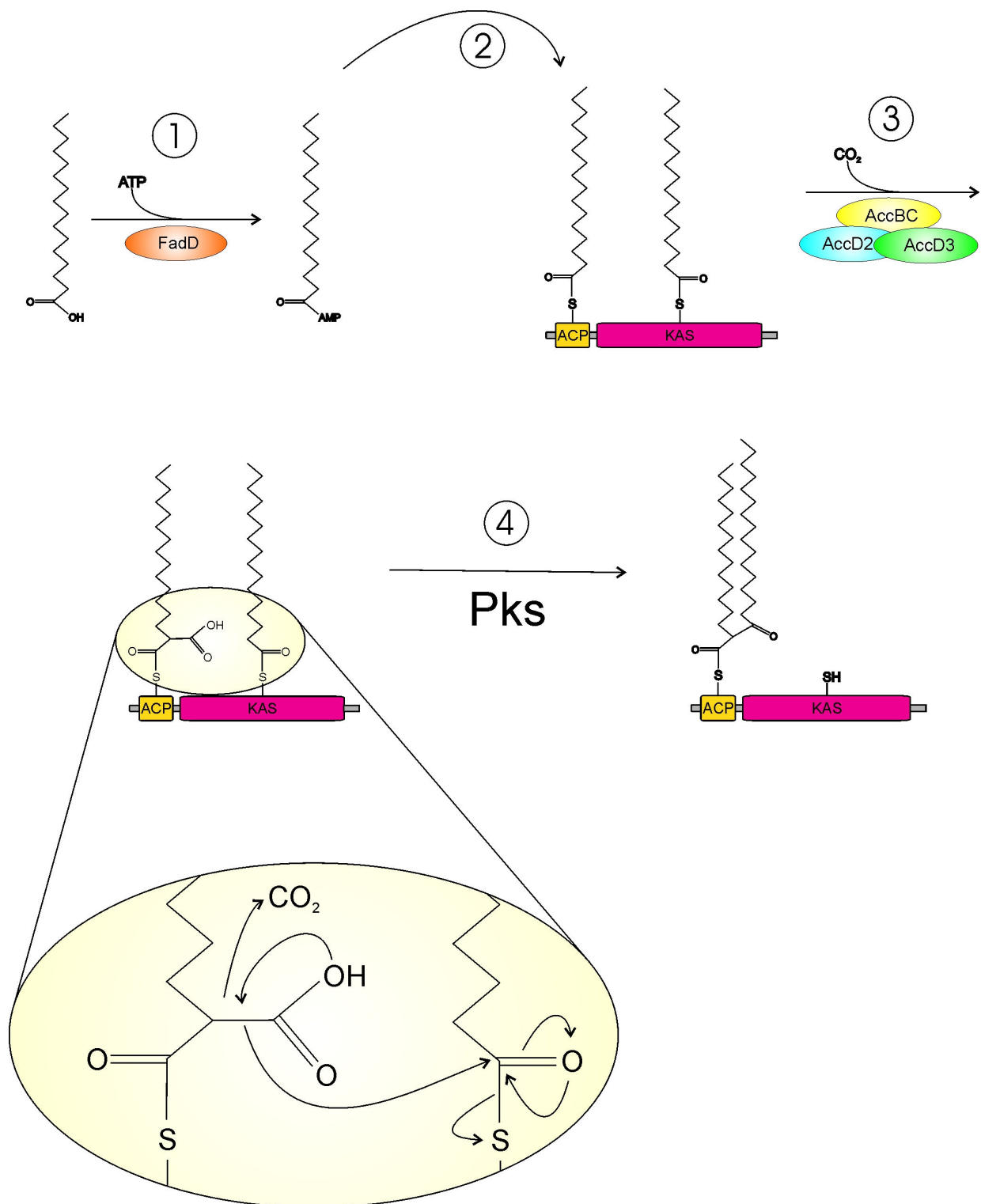


Abbildung 30: Hypothetischer Mechanismus der Mycolsäuresynthese durch die Polyketidsynthese in *C. glutamicum*. Im ersten Schritt erfolgt eine Aktivierung zweier Fettsäuren durch Adenylierung (1). Diese werden dann auf die ACP- und KAS Domäne von Pks übertragen (2). Anschließend erfolgt die Carboxylierung der ACP gebundenen Fettsäure (3), was die Grundlage für die folgende C-C Verknüpfung zur Mycolsäure durch die KAS Domäne in Form eines Claisen-Mechanismus legt (4).

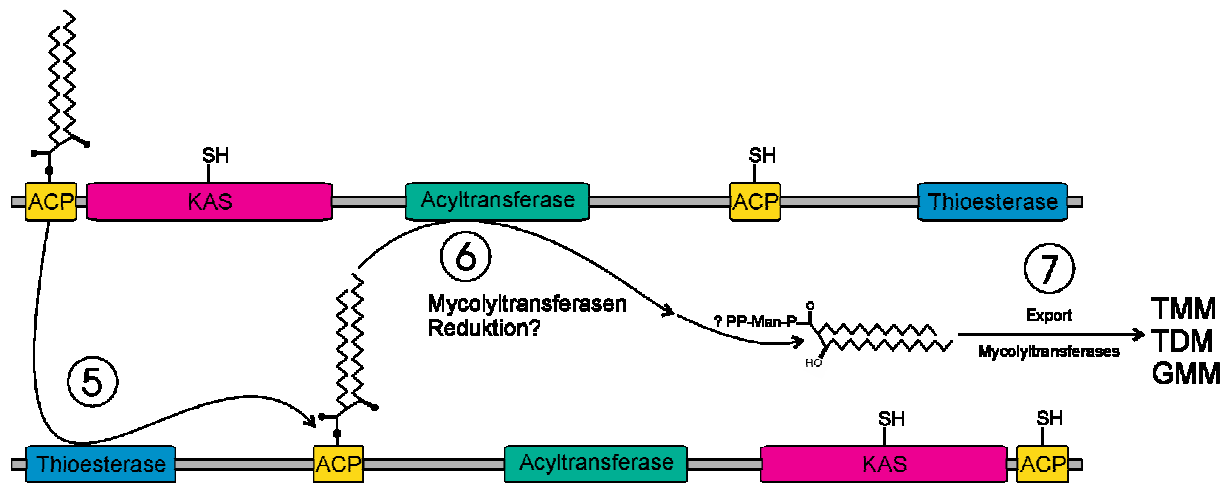


Abbildung 31: Hypothetischer Mechanismus zum Transfer von Mycolsäuren. Die homodimere Anordnung zweier Polyketidsynthasen ist angedeutet. Acylcarrierpeptid (ACP), Ketoacylsynthase (KAS), Trehalosemonomycolat (TMM), Trehalosedimycolat (TDM), Glukosemonomycolat (GMM), Polyprenol (PP).

Intermediat oder eine mit Coenzym A verknüpfte Fettsäure wie im Fall der Fettsäuresynthase (Kannangara und Stumpf, 1971) eine Rolle spielt, ist unklar.

In allen drei untersuchten *Corynebacterium* Spezies ist die Polyketidsynthase und das sich daran anschließende *accD3* Gen durch weniger als 20 Nukleotide getrennt. Experimentelle Befunde dieser Arbeit belegen, dass sie auch gemeinsam transkribiert werden. Solch eine enge strukturelle Organisation wurde auch für andere Gene mit funktioneller Kopplung wie beispielsweise die Polyprenol-Monophosphomannose Synthase *ppm1* gezeigt (Gurcha *et al.*, 2002; Gibson *et al.*, 2003; Baulard *et al.*, 2003). Wie bereits erwähnt, ist die Acyl-CoA Carboxylase, in der *AccD3* als Komplexpartner vorliegt, an der Carboxylierung eines Palmitinsäurederivats beteiligt (Portevin *et al.*, 2005). Dies könnte der an der ACP Domäne gebundene Palmitatrest sein, der durch die Acyl-CoA Carboxylase in α -Position carboxyliert wird (③ in Abbildung 30). Diese Reaktion ist analog zu der Carboxylierung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA, die in *E. coli* durch die Acetyl-CoA Carboxylase *AccDABC* katalysiert wird (Alberts *et al.*, 1969) und in *C. glutamicum* durch die homologe Acetyl-CoA Carboxylase *AccD1-AccBC*. Dieser Schritt könnte die eigentliche Kondensation zu einem verzweigten 3-Oxo-Intermediat vorbereiten, die durch die KAS Domäne von Pks katalysiert wird (④ in Abbildung 30). Mechanistisch erfolgt diese Reaktion nach einem Claisen-Kondensationsmechanismus einer α -Carboxysäure mit einer zweiten Acylkette,

wie dies auch bei Fettsäuresynthasen (Dewar und Dieter, 1988) und anderen Polyketidsynthasen (Fujii *et al.*, 2001) der Fall ist. Durch die Freisetzung von CO₂ bei der Bildung der neuen C-C Verknüpfung besitzen beide Fettsäureseitenketten die gleiche Länge wie ihre einzelnen, linearen Ausgangssubstrate (Radmacher *et al.*, 2005).

Zur eigentlichen Mycolsäuresynthese wird prinzipiell nur die ACP- und Ketoacylsynthase Domäne der Polyketidsynthase benötigt (Khosla *et al.*, 1992; Portevin *et al.*, 2004). Alle weiteren in Pks vorhandenen Module (Abbildung 31) spielen vermutlich eine Rolle bei der weiteren Mycolsäurereifung. Die meisten Polyketidsynthasen sowie die bekannten Fettsäuresynthasen liegen funktionell als Homodimere in Kopf-Schwanz Anordnung mit leicht helikal verdrehter Struktur vor (Staunton *et al.*, 1996). Wie in dieser Arbeit nachgewiesen, zeigt auch Pks aus *C. glutamicum* eine Dimerbildung, sodass von einer ähnlichen Anordnung auszugehen ist, und dadurch der Acyltransferase- und Thioesterasedomäne spezielle Funktionen in nachfolgenden Schritten zukommen. Da durch die Dimerisierung die C-terminale Thioesterasedomäne des ersten Polypeptids neben der N-terminalen ACP Gruppe des zweiten Polypeptids lokalisiert ist, kann so die bis auf die Reduktion der 3-Oxogruppe reife Mycolsäure durch die Thioesterasedomäne auf die zweite ACP Domäne übertragen werden (⑤ in Abbildung 31). Anschließend könnte durch die Acyltransferasedomäne eine Übertragung auf ein Polyprenylderivat erfolgen (⑥ in Abbildung 31). In *M. smegmatis* ist Decaprenyl-Mannosyl-Mycolat nachgewiesen worden (Besra *et al.*, 1994), was vermutlich eine Funktion bei der Translokation der Mycolsäure durch die Cytoplasmamembran zu ihrem Zielort in der Zellwand besitzt. Zu welchem Zeitpunkt die Reduktion der 3-Oxogruppe durch ein noch unbekanntes Enzym stattfindet, ist unbekannt, ebenso ab wann Trehalosederivate ins Spiel kommen und wie der Export erfolgt (⑦ in Abbildung 31).

Die experimentellen Ergebnisse dieser Arbeit, zusammen mit den strukturellen Charakteristika des *fadD-pks-accD3* Locus und den neuen Erkenntnissen zu *fadD32* (Trivedi *et al.*, 2004) und *pks13* in *M. smegmatis* (Portevin *et al.*, 2004) führen zu drei speziellen Schritten, welche die Basis für die Mycolsäuresynthese darstellen. Dabei handelt es sich um 1. die Aktivierung einer Fettsäure durch

Adenylierung und anschließende Bindung an die Polyketidsynthase (Trivedi *et al.*, 2004), *II.* Aktivierung der gebundenen Fettsäure durch Carboxylierung (Gande *et al.*, 2004; Portevin *et al.*, 2005) und *III.* die Erstellung einer neuen C-C Verknüpfung mit einer zweiten Fettsäure (Portevin *et al.*, 2004). Der detaillierte enzymatische Reaktionsmechanismus ist zum großen Teil weiterhin noch spekulativ.

2 Untersuchungen zum Mycolsäuretransfer

Während die der Polyketidsynthase benachbart liegenden Gene unmittelbar mit der Mycolsäuresynthese verknüpft sind, sind die weiter entfernt zum *pks* Lokus liegenden Gene vermutlich am Transfer der Mycolsäure auf Zuckerderivate oder das Arabinogalaktan beteiligt. Im 5'-Bereich von *fadD* befinden sich vier weitere konservierte Gene (Abbildung 22), wovon das Antigen 85 (*ag85*) in *M. tuberculosis* Mycolyltransferaseaktivität besitzt (Puech *et al.*, 2000). Das Antigen 85, sowohl von *M. tuberculosis* (Belisle *et al.*, 1997) als auch sein Paraloges (*cmytA*) in *C. glutamicum* (De Sousa-D'Auria *et al.*, 2003; Brand *et al.*, 2003), sind in der Zellwand lokalisiert und werden zumindest teilweise ins Medium sekretiert (Peyret *et al.*, 1993). Diese beiden Mycolyltransferasen sind an der Translokation reifer Mycolsäuren von einem Überträger, wie von Trehalosemycolaten, auf das Arabinogalaktangerüst beteiligt sind. (McNeil *et al.*, 1991b; Belisle *et al.*, 1997; De Sousa-D'Auria *et al.*, 2003; Brand *et al.*, 2003). Zusätzlich konnten im Genom von *C. glutamicum* vier weitere paraloge Mycolyltransferasen nachgewiesen werden (Brand *et al.*, 2003; De Sousa-D'Auria *et al.*, 2003). In dieser Arbeit wurde mit dem Stamm *C. glutamicum* ATCC13032 gearbeitet, in dem alle sechs Mycolyltransferasen funktionell aktiv sind (Kacem *et al.*, 2004). Dagegen weist *C. glutamicum* ATCC2005 eine durch eine Punktmutation inaktivierte Mycolyltransferase auf (Brand *et al.*, 2003). Beide Stämme unterscheiden sich aber weder morphologisch noch physiologisch voneinander. Mycolyltransferasen besitzen also überschneidende Aktivitäten und keine strikte Substratspezifität wie beispielsweise die untersuchten Acyl-CoA Carboxylasen. Dies erklärt, warum die Deletion von *cmytA*

und *cmytB* in *C. glutamicum* ATCC13032 nur eine geringfügige Reduktion der gebundenen Mycolsäuren zur Folge hat. Die Mycolyltransferasen sind Esterasen ebenso wie eine zusätzliche in dieser Arbeit untersuchte Esterase (*cut*), die sich in direkter Nachbarschaft der bekannten Mycolyltransferasen befindet. Diese Esterase ist sowohl für *M. tuberculosis* als auch *M. smegmatis* (Sasseti *et al.*, 2003), nicht aber für *C. glutamicum*, essentiell. Ihre Esterasedomäne weist hohe Identitäten, besonders im Bereich eines vorhergesagten katalytisch aktiven Serinrestes, zu einer aus *Penicillium purpurogenum* bekannten Acetylxylyl Esterase auf (Egana *et al.*, 1996). Überraschenderweise führte erst die kombinierte Deletion von *cut* mit den zwei benachbarten Mycolyltransferasen zu dramatischen Veränderungen. Die Mutante ist zwar noch zur Mycolsäuresynthese befähigt, die kovalente Verknüpfung der reifen Mycolsäuren mit dem Arabinogalaktan erfolgte allerdings nicht mehr. Da diese mutmaßliche Esterase in der Membran verankert ist, könnte ihr eine sehr spezielle Aufgabe beim Mykolsäuretransport oder der Transesterifizierung zukommen.

3 Untersuchungen zur Bereitstellung aktivierter Arabinosereste für die Synthese des Arabinogalaktans

Das Arabinogalaktan stellt innerhalb der Zellwand ein Gerüst für die Mycolsäuren und damit für die gesamte äußere Lipiddoppelschicht dar (Besra *et al.*, 1995). Dieses nur bei den *Corynebacteriaceae* vorhandene Zuckerpolymer setzt sich aus einem verzweigten Verbund aus Arabinose- und Galaktosemolekülen zusammen (McNeil *et al.*, 1995). An die terminalen Arabinosereste sind die Mycolsäuren kovalent über eine Esterbrücke gebunden (Wolucka *et al.*, 1994; Eggeling und Sahm, 2001). Erst kürzlich wurde gezeigt, wie die Arabinosesynthese in Mycobakterien erfolgt. Dabei spielt die Epimerisierung einer polyprenylierten Ribose zu einer polyprenylierten Arabinose eine wesentliche Rolle (Huang *et al.*, 2005). Im 5'-Bereich des Mycolyltransferaselokus ist in *C. glutamicum* ein Gen vorhanden, das als 4-Hydroxybenzoat-Polyprenyltransferase annotiert ist (Kalinowski *et al.*, 2003). Aufgrund dieser Annotation und seiner direkten Nachbar-

schaft zum Zellwandlokus ist ihm eine mögliche Funktion bei der Polyprenylierung und damit Aktivierung von einem Arabinosederivat zugesprochen. Diese Vorstufe dient dann als Monomer für die Synthese des Arabinananteils im Arabinogalaktan. Die Inaktivierung dieser putativen Ubiprenyltransferase ergab eine Mutante, die neben einem extrem schlechten Wachstum keine kovalent gebundenen Mycolsäuren aufweist, wobei die eigentliche Mycolsäuresynthese nicht beeinflusst ist. Die Analyse der Zuckerzusammensetzung der Zellwand dieser Mutante zeigte ferner, dass keine Arabinose in der Zellwand vorhanden ist. Zusätzliche Enzymtests belegten die Abwesenheit der Ubiprenyltransferaseaktivität in der Inaktivierungsmutante (Alderwick *et al.*, 2005). Aus diesen Ergebnissen ist zu schließen, dass die Ubiprenyltransferase UbiA an der Bildung einer polyprenylierten Arabinosespezies beteiligt ist, die den einzigen Arabinosedonor in *C. glutamicum* für die Arabinogalaktansynthese darstellt. Polyprenylierte Intermediate spielen häufig bei der Translokation von Zuckerresten über die Zellmembran eine wichtige Rolle. Beispielsweise erfolgt auch der Transport von Galaktose zur Synthese von extrazellulären Teichonsäuren bei *Bacillus coagulans* in Form eines Galactosyl-Phosphoryl-Polyprenols (Yokoyama *et al.*, 1988).

Im Bereich von *pks* sind in *C. glutamicum* also nicht nur die Gene für die eigentliche Mycolsäuresynthese und deren Transfer auf das Arabinogalaktan vorhanden, sondern auch essentielle Gene, die Arabinosevorstufen bereitstellen. Folglich stellt der gesamte Bereich um das *pks* Gen einen hochkonservierten Zellwandlokus in allen untersuchten *Corynebacteriaceae* dar.

V ZUSAMMENFASSUNG

Die Zellwand der *Corynebacterianae*, zu denen unter anderem das biotechnologisch genutzte *Corynebacterium glutamicum* gehört, besitzt neben der Cytoplasmamembran eine zweite Lipiddoppelschicht die funktionell mit der äußeren Membran Gram negativer Bakterien vergleichbar ist. Beide Membranen sind maßgeblich am Stofftransport beteiligt. Diese Lipidmembranen bestehen aus Fettsäuren und Mycolsäuren. Es war das Ziel dieser Arbeit die Synthese der Mycolsäuren sowie die weiterer Zellwandbestandteile zu untersuchen.

1. In *C. glutamicum* wurden 4 paraloge Acyl-CoA Carboxyltransferasen entdeckt. Während *accD4* keine Funktion zugesprochen werden konnte, ergab die Analyse von Inaktivierungsmutanten, sowie ein zusätzlicher Enzymtest, dass *accD1* essentiell ist und zusammen mit *accBC* für die Acetyl-CoA Carboxylase kodiert. Auch *accD2* und *accD3* sind essentiell und spezifisch an der Mycolsäuresynthese beteiligt.
2. Die Isolierung von AccD3 über Affinitätschromatographie ergab eine Coisolation von AccD2 und AccBC. Zusammen mit den Mutationsstudien zeigt dies, dass der AccD2-AccD3-AccBC Carboxylasekomplex an der Mykolsäuresynthese beteiligt ist. Auch die Biotinylierung von AccBC konnte nachgewiesen werden, was sie als α -Untereinheit der Carboxylasen ausweist.
3. In allen *Corynebacterianae* liegt im Genom benachbart zu dem für AccD3 kodierenden Gen das Gen einer Polyketidsynthase, Pks, sowie das Gen einer Acyl-AMP Ligase, FadD. Beide Proteine wurden isoliert. Die Deletion von *pks* führt ebenfalls zur Abwesenheit von Mykolsäuren. FadD transferiert einen Adenylrest auf eine Fettsäure. Aufgrund dieser Befunde konnte ein Mechanismus vorgeschlagen werden, der den Transfer einer Fettsäure auf Pks, sowie dessen Aktivierung durch Carboxylierung und schließlich die Kondensation mit einer weiteren Fettsäure zur Mykolsäure beinhaltet.
4. Deletionen von Genen stromaufwärts der Polyketidsynthase, die für zum Teil sehr ähnliche Esterasen kodieren, führten zur Reduktion von an das Arabinogalaktan gebundenen Mykolsäuren, was auf deren Beteiligung am Mycolsäuretransfer hinweist. Für ein weiteres Gen konnte wahrscheinlich gemacht werden, dass es als Polyrenyltransferase an einem neuartigen Syntheseweg zur Generierung polyprenylierter Arabinose beteiligt ist, da dessen Inaktivierung zur Abwesenheit von Arabinose im Arabinogalaktan führt.

VI LITERATURVERZEICHNIS

- Abe S, Takayama K-I, Kinoshita S (1967)** Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* (13): 279-301
- Alberts AW, Bell RM, Vagelos PR (1972)** Acyl carrier protein. XV. Studies of -ketoacyl-acyl carrier protein synthetase. *J. Biol. Chem.* (10): 3190-8
- Alberts AW, Nervi AM, Vagelos PR (1969)** Acetyl CoA carboxylase, II. demonstration of biotin-protein and biotin carboxylase subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* (4): 1319-26
- Alderwick LJ, Radmacher E, Seidel M, Gande R, Hitchen P, Dell A, Sahm H, Eggeling L, Besra GS (2005)** Deletion of *Cg-emb* in *Corynebacterianeae* leads to a novel truncated cell wall arabinogalactan, whereas inactivation of *Cg-ubiA* results in an arabinan deficient mutant with a cell wall galactan core. *J. Biol. Chem.* (37): 32362-71
- Allen SH, Kellermeyer RW, Stjernholm RL, Wood HG (1964)** Purification and properties of enzymes involved in the propionic acid fermentation. *J. Bacteriol.* (87): 171-87
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997)** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* (25): 3389-402
- Asselineau C, Asselineau J, Lanéelle G, Lanéelle MA (2002).** The biosynthesis of mycolic acids by *mycobacteria*: current and alternative hypotheses. *Progress in Lipid Research* (41): 501-23
- Belisle JT, Vissa VD, Sievert T, Takayama K, Brennan PJ, Besra GS (1997)** Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science* (276): 1420-2
- Barnes WM (1994)** PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proc. Natl. Acad Sci. USA* (91): 2216-20

- Barry CE 3rd, Lee RE, Mdluli K, Sampson AE, Schroeder BG, Slayden RA, Yuan Y (1998)** Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. *Prog Lipid Res.* (37): 143-79
- Baulard AR, Gurcha SS, Engohang-Ndong J, Gouffi K, Locht C, Besra GS (2003)** *In-vivo* interaction between the polyprenol phosphate mannose synthase Ppm1 and the integral membrane protein Ppm2 from *Mycobacterium smegmatis* revealed by a bacterial two-hybrid system. *J. Biol. Chem.* (278): 2242-8
- Bensadou and A, Weinstein D (1976)** Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal. Biochem.* (79): 241-50
- Bentley R and Bennett JW (1999)** Constructing polyketides: from collie to combinatorial biosynthesis. *Annu. Rev. Microbiol.* (53): 411-46
- Besra GS, Sievert T, Lee RE, Slayden RA Brennan PJ, Takayama K (1994)** Identification of the apparent carrier in mycolic acid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (91): 12735-9
- Besra GS, Khoo K, McNeil M, Dell A, Morris HR, Brennan PJ (1995)** A new interpretation of the structure of the mycolyl-arabinogalactan complex of *Mycobacterium tuberculosis* as revealed through characterisation of oligoglycosylalditol fragments by fast-atom bombardement mass spectrometry and ¹H nuclear magnetic resonance spectrometry. *Biochemistry* (34): 4257-66
- Birnboim HC and Doly J (1979)** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* (7): 1513-23
- Bramucci MG and Nagarajan V (1996)** Direct detection of cloned DNA in *Bacillus subtilis* based on Saccharose-induced lethality. *Appl. Environmental. Microbiol.* (11): 3948-53
- Brand S, Niehaus K, Puhler 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): 33-44

- Braun V, Bosch V, Hantke K, Schaller K (1974)** Structure and biosynthesis of functionally defined areas of the *Escherichia coli* outer membrane. *Ann. NY Acad. Sci.* (235): 66-82
- Brennan PJ and Goren MB (1979)** Structural studies on the type-specific antigens and lipids of the *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium scrofulaceum* serocomplex, *Mycobacterium intracellulare* serotype 9. *J. Biol. Chem.* (254): 4205-11
- Brennan PJ and Nikaido H (1995)** The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem.* (64): 29-63
- Carreras CW and Khosla C (1998)** Purification and in vitro reconstitution of the essential protein components of an aromatic polyketide synthase. *Biochemistry* (8): 2084-8
- Cerdeno-Tarraga AM, Efstratiou A, Dover LG, Holden MT, Pallen M, Bentley SD, Besra GS, Churcher C, James KD, De Zoysa A, Chillingworth T, Cronin A, Dowd L, Feltwell T, Hamlin N, Holroyd S, Jagels K, Moule S, Quail MA, Rabinowitsch E, Rutherford KM, Thomson NR, Unwin L, Whitehead S, Barrell BG, Parkhill J (2003)** The complete genome sequence and analysis of *Corynebacterium diphtheriae* NCTC13129. *Nucleic Acids Res.* (22): 6516-23
- Chapman-Smith A, Cronan JE Jr. (1999)** Molecular biology of biotin attachment to proteins. *J. Nutr.* (129): 477-84
- Chatterjee D (1997)** The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. *Current Opinion in Chemical Biology* (1): 579-88
- Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, Honore N, Garnier T, Churcher C, Harris D, Mungall K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies RM, Devlin K, Duthoy S, Feltwell T, Fraser A, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Lacroix C, Maclean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, Rutter S, Seeger K, Simon S, Simmonds M, Skelton J, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Whitehead S, Woodward JR, Barrell BG (2001)** Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature.* (6823): 1007-11

Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE 3rd, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. (6685): 537-44

Collins MD, Goodfellow M, Minnikin DE (1982) A survey of the structures of mycolic acids in *Corynebacterium* and related taxa. *J. Gen. Microbiol.* (128): 129-49

Chirala SS and Wakil SJ (2004) Structure and function of animal fatty acid synthase. *Lipids*. (11): 1045-53

Cronan Jr JE (1990) Biotiation of proteins *in-vivo*. A post-translational modification to label, purify and study proteins. *J. Biol. Chem.* (265): 10327-33

Cronan Jr JE and Waldrop GL (2002) Multi-subunit acetyl-CoA carboxylases. *Prog. Lipid. Res.* (41): 407-35

Cruft HJ (1961) The fractionation of histones on Sephadex G-75. *Biochim Biophys Acta*. (54): 611-3

Collins MD, Goodfellow M, Minnikin DE (1982) A survey of the structures of mycolic acids in *Corynebacterium* and related taxa. *J. Gen. Microbiol.* (128): 129-49

Daffé M and Draper P (1998) The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv. Microb. Physiol.*(39): 131-203

De Sousa-D'Auria C, Kacem R, Puech V, Tropis M, Leblon G, Houssin C, Daffé M (2003) New insights into the biogenesis of the cell envelope of corynebacteria: identification and functional characterization of five new mycolyltransferase genes in *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* (224): 35-44

Dewar MJ and Dieter KM (1988) Mechanism of the chain extension step in the biosynthesis of fatty acids. *Biochemistry*. (9): 3302-8

- Diacovich L, Peiru S, Kurth D, Rodriguez E, Podesta F, Khosla C, Gramajo H. (2002)** Kinetic and structural analysis of a new group of Acyl-CoA carboxylases found in *Streptomyces coelicolor*. *J. Biol. Chem.* (34): 31228-36
- Draper P (1998)** The outer parts of the mycobacterial envelope as permeability barriers. *Frontiers in Bioscience* (3): 1253-61
- Dubey VS, Sirakova TD, Kolattukudy PE (2002)** Disruption of *msl3* abolishes the synthesis of mycolipanoic and mycolipenic acids required for polyacyltrehalose synthesis in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and causes cell aggregation. *Mol. Microbiol.* (5): 1451-9
- Dunn MF, Araiza G, Mora J (2004)** Biochemical characterization of a *Rhizobium etli* monovalent cation-stimulated acyl-coenzyme A carboxylase with a high substrate specificity constant for propionyl-coenzyme A. *Microbiology.* (150): 399-406
- Egana L, Gutierrez R, Caputo V, Peirano A, Steiner J, Eyzaguirre J (1996)** Purification and characterization of two acetyl xylan esterases from *Penicillium purpurogenum*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* (24): 33-9
- Eggeling L, Pfefferle W, Sahm H (2001a)** in *Basic Biotechnology* (Ratledge C and Kristiansen B, eds) pp. 281-302, Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom
- Eggeling L, Krumbach K, Sahm H (2001b)** L-Glutamate efflux with *C. glutamicum*: why is penicillin treatment or tween addition doing the same? *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* (3): 67-8
- Eggeling L and Sahm H (2001)** The cell wall barrier of *Corynebacterium glutamicum* and amino acid efflux. *J. Biosci. Bioeng.* (92): 201-13
- Fling SP and Gregerson DS (1986)** Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using high- molarity tris buffer system without urea. *Anal. Biochem.* (155): 83-8

- Fountoulakis M and Langen H (1997)** Identification of proteins by matrix-assisted laser desorption ionization-mass spectrometry following in-gel digestion in low-salt, non-volatile buffer and simplified peptide recovery. *Anal. Biochem.* (250): 153-6
- Fujii I, Watanabe A, Sankawa U, Ebizuka Y (2001)** Identification of Claisen cyclase domain in fungal polyketide synthase WA, a naphthopyrone synthase of *Aspergillus nidulans*. *Chem. Biol.* (2): 189-97
- Gande R, Gibson KJ, Brown AK, Krumbach K, Dover LG, Sahm H, Shioyama S, Oikawa T, Besra GS, 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* such as *Corynebacterium glutamicum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem.* (43): 44847-57
- Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, Medina N, Mansoor H, Pryor M, Duthoy S, Grondin S, Lacroix C, Monsempe C, Simon S, Harris B, Atkin R, Doggett J, Mayes R, Keating L, Wheeler PR, Parkhill J, Barrell BG, Cole ST, Gordon SV, Hewinson RG (2003)** The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (13): 7877-82
- Gastambide-Odier M and Lederer E. (1960)** Biosynthesis of corynomycolic acid from two molecules of palmitic acid. *Biochem. Z.* (333): 285-95
- Gibson KJ, Eggeling L, Maughan WN, Krumbach K, Gurcha SS, Nigou J, Puzo G, Sahm H, Besra GS (2003)** Disruption of *Cg-ppm1*, a polyprenyl monophosphomannose synthase, and the generation of lipoglycan-less mutants in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Chem.* (278): 40842-50
- Glickman MS and Jacobs Jr WR (2001)** Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline. *Cell* (4): 477-85
- Grant SGN, Jessee J, Bloom FR, Hanahan G (1990)** Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (87): 4645-49

- Guchhait RB, Polakis SE, Dimroth P, Stoll E, Moss J, Lane MD (1974)** Acetyl coenzyme A carboxylase system of *Escherichia coli*. Purification and properties of the biotin carboxylase, carboxyltransferase, and carboxyl carrier protein components. *J. Biol. Chem.* (249): 6633-45
- Gurcha SS, Baulard AR, Kremer L, Locht C, Moody DB, Muhlecker W, Costello CE, Crick DE, Brennan PJ, Besra GS (2002)** Ppm1, a novel polyprenol monophosphomannose synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem. J.* (365): 441-50
- Hall PR, Wang YF, Rivera-Hainaj RE, Zheng X, Pustai-Carey M, Carey PR, Yee VC (2003)** Transcarboxylase 12S crystal structure: hexamer assembly and substrate binding to a multienzyme core. *EMBO J.* (22): 2334-7
- Hanahan D (1983)** Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* (166): 557-80
- Hanahan D (1985)** Techniques for transformation of *Escherichia coli*. pp. 109-135. In: *DNA cloning. A practical approach*. Vol. I, Glover DM (Ed.). IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA.
- Haase FC, Henrikson KP, Treble DH, Allen SH (1982)** The subunit structure and function of the propionyl coenzyme A carboxylase of *Mycobacterium smegmatis*. *J. Biol. Chem.* (257): 11994-9
- Herrera-Icaraz E, Valero-Guillén P, Martín-Luengo F, Canteras-Jordana M (1993)** Numerical analysis of fatty and mycolic acid profiles of *Corynebacterium urealyticum* and other related corynebacteria. *Microbiologia* (9): 53-62
- Heseler K (2005)** Untersuchungen zu Acyl-CoA Carboxylasen in *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit, *Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*
- Hochuli E (1988)** Large-scale chromatography of recombinant proteins. *J. Chromagr.* (444): 293-302
- Hopwood DA and Sherman DH (1990)** Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annu. Rev. Genet.* (24): 37-66

- Huang H, Scherman MS, D'Haese W, Vereecke D, Holsters M, Crick DC, McNeil MR (2005)** Identification and active expression of the *Mycobacterium tuberculosis* gene encoding 5-phospho- α -D-ribose-1-diphosphate: decaprenyl-phosphate 5-phosphoribosyltransferase, the first enzyme committed to decaprenylphosphoryl-D-arabinose synthesis. *J. Biol. Chem.* (280): 24539-43
- Hunaiti AR and Kolattukudy PE (1982)** Isolation and characterization of an acyl-coenzyme A carboxylase from an erythromycin-producing *Streptomyces erythreus*. *Arch. Biochem. Biophys.* (1): 362-71
- Jackson M, Raynaud C, Lan  lle MA, Guilhot C, Laurent-Winter C, Ensergueix D, Gicquel B, Daff   M (1999)** Inactivation of the antigen 85C gene profoundly affects the mycolate content and alters the permeability of the *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope. *Mol. Microbiol.* (5): 1573-87
- Jäger W, Peters-Wendisch PG, Kalinowski J, Pühler A (1996)** A *Corynebacterium glutamicum* gene encoding a two-domain protein similar to biotin carboxylases and biotin-carboxyl- carrier proteins. *Arch. Microbiol.* (166): 76-82
- Jang K-H, Pierotti D, Kemp GW, Best GR Britz ML (1997)** Mycolic acid composition of *Corynebacterium glutamicum* and its cell surface mutants: effects of growth with glycine and isonicotinic acid hydrazide. *Microbiol.* (143): 3209-21
- Janknecht R, de Martynoff G, Lou J, Hipskind RA, Nordheim A, Stunnenberg HG (1991)** Rapid and efficient purification of a native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (88): 8972-6
- Jarlier V and Nikaido H (1990)** Permeability barrier to hydrophilic solutes in *Mycobacterium chelonae*. *J. Bacteriol.* (3): 1418-23
- Jeanmourgin F, Thompson JD, Gouy M, Higgins DG, Gibson TJ (1998)** Multiple sequence alignment with ClustalX. *Trends Biochem. Sci.* (23): 403-5
- Jones BM and Gillian JP (1983)** o-Phthalaldehyde precolumn derivatization and reversed-phase-high-performance liquid chromatography of polypeptide hydrolysates and physiological fluids. *J Chromatogr.* (266): 471-82

- Kacem R, De Sousa-D'Auria C, Tropis M, Chami M, Gounon P, Leblon G, Houssin C, Daffé M (2004)** Importance of mycoloyltransferases on the physiology of *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology* (150) : 73-84
- Kalinowski J, Bathe B, Bartels D, Bischoff N, Bott M, Burkovski A, Dusch N, Eggeling L, Eikmanns BJ, Gaigalat L, Goesmann A, Hartmann M, Huthmacher K, Kramer R, Linke B, McHardy AC, Meyer F, Möckel B, Pfefferle W, Pühler A, Rey DA, Ruckert C, Rupp O, Sahm H, Wendisch VF, 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): 5-25
- Kaneda K, Imaizumi S, Yano I (1995)** Distribution of C22-, C24- and C26-alpha-unit-containing mycolic acid homologues in mycobacteria. *Microbiol. Immunol.* (8): 563-70
- Kannangara CG and Stumpf PK (1971)** The formation of fatty acyl thioesters during ¹⁴C-1-acetate incorporation into long chain fatty acids by isolated spinach chloroplasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (6): 1544-51
- Keilhauer C, Eggeling L, Sahm H (1993)** Isoleucine analysis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon. *J. Bacteriol.* (175): 5595-603
- Kennerknecht N, Sahm H, Yen MR, Patek M, Saier Jr MH Jr, Eggeling L (2002)** Export of L-isoleucine from *Corynebacterium glutamicum*: a two-gene-encoded member of a new translocator family. *J Bacteriol.* (14): 3947-56
- Khosla C, Ebert-Khosla S, Hopwood DA (1992)** Targeted gene replacements in a *Streptomyces* polyketide synthase gene cluster: role for the acyl carrier protein. *Mol. Microbiol.* (21): 3237-49
- Kimura E, Abe C, Kawahara Y, Nakamatsu T (1996)** Molecular cloning of a novel gene, *dtsR*, which rescues the detergent sensitivity of a mutant derived from *Brevibacterium lactofermentum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (10): 1565-70

- Kimura E, Abe C, Kawahara Y, Nakamatsu T, Tokuda H (1997)** A *dtsR* gene-disrupted mutant of *Brevibacterium lactofermentum* requires fatty acids for growth and efficiently produces L-glutamate in the presence of an excess of biotin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (234): 157-61
- Kimura Y, Kojyo T, Kimura I, Sato M (1998)** Propionyl-CoA carboxylases of *Myxococcus xanthus*: catalytic properties and function in developing cells. *Arch. Microbiol.* (170): 179-184
- King MT and Reiss PD (1985)** Separation and measurement of short-chain Coenzyme-A compounds in rat liver by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* (146): 173-9
- Kinoshita S, Udaka S, Shimono M. (1957).** Amino acid fermentation. I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J Gen Appl Microbiol* (3): 193-205
- Knowles JR (1989)** The mechanism of biotin-dependent enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* (58): 195-221
- Kondo H, Shiratsuchi K, Yoshimoto T, Masuda T, Kitazono A, Tsuru D, Anai M, Sekiguchi M, Tanabe T (1991)** Acetyl-CoA carboxylase from *Escherichia coli*: gene organization and nucleotide sequence of the biotin carboxylase subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (88): 9730-3
- Kremer L, Baulard AR, Besra GS (2000)** in *Molecular Genetics of Mycobacteria* (Hatfull GF and Jacobs WR, Jr, Ed.) 173-90, ASM Press, Washington D.C.
- Lanéelle M-A and Asselineae J (1977)** Glycolipids of *Brevibacterium vitarumen*. *Biochim. Biophys. Acta* (486): 205-8
- Lee RE, Brennan PJ, Besra GS (1996)** *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* (215): 1-27
- Li SJ and Cronan Jr JE (1992)** The gene encoding the two carboxyltransferase subunits of *Escherichia coli* acetyl-CoA Carboxylase. *J. Biol. Chem.* (267): 16841-7

- Li SJ, Rock CO, Cronan Jr JE (1992)** The *dedB* (*usg*) open reading frame of *Escherichia coli* encodes a subunit of acetyl-coenzyme A Carboxylase. *J. Bacteriol.* (174): 5755-7
- Lichtinger T, Burkovski A, Niederweis M, Krämer R, Benz R (1998)** Biochemical and biophysical characterization of the cell wall porin of *Corynebacterium glutamicum*: the channel is formed by a low molecular mass polypeptide. *Biochemistry.* (43): 15024-32
- Link AJ, Phillips D, Church GM (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): 6228-37
- Liu J, Barry CE 3rd, Besra GS, Nikaido H (1996)** Mycolic acid structure determines the fluidity of the mycobacterial cell wall. *J. Biol. Chem.* (47): 29545-51
- Mailänder C, Reiling N, Engelhardt H, Bossmann S, Ehlers S, Niederweis M (2004)** The MspA porin promotes growth and increases antibiotic susceptibility of both *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology.* (150): 853-64
- Marienfeld S, Uhlemann EM, Schmid R, Kramer R, Burkovski A (1997)** Ultrastructure of the *Corynebacterium glutamicum* cell wall. *Antonie Van Leeuwenhoek.* (4): 291-7
- Mateos LM, Schäfer A, Kalinowski J, Martin JF, Pühler A (1996)** Integration of narrow-host-range vectors from *Escherichia coli* into the genomes of amino acid-producing corynebacteria after intergeneric conjugation. *J. Bacteriol.* (19): 5768-75
- Mathur M and Kolattukudy PE (1992)** Molecular cloning and sequencing of the gene for mycocerosic acid synthase, a novel fatty acid elongating multifunctional enzyme, from *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis*. *J. Biol. Chem.* (27): 19388-95
- McNeil M, Daffé M, Brennan PJ (1990)** Evidence for the nature of the link between the arabinogalactan and peptidoglycan of mycobacterial cell walls. *J Biol Chem.* (30): 18200-6

- McNeil MR and Brennan PJ (1991a)** Structure, function and biogenesis of the cell envelope of mycobacteria in relation to bacterial physiology, pathogenesis and drug resistance; some thoughts and possibilities arising from recent structural information. *Res. Microbiol.* (4): 451-63
- McNeil MR, Daffé M, Brennan PJ (1991b)** Location of the mycolyl ester substituents in the cell walls of mycobacteria. *J. Biol. Chem.* (266): 13217-23
- Meyer TS and Lamberts BL (1965)** Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochim Biophys Acta.* (1): 144-5
- Minnikin DE (1982)** in *The Biology of Mycobacteria* (Ratledge C, Stanford J, eds) pp. 95-184, Academic Press Ltd., London
- Minnikin DE, Kremer L, Dover LG, Besra GS (2002)** The methyl-branched fortifications of *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem. Biol.* (5): 545-53
- 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
- Nakamura Y, Nishio Y, Ikeo K, Gojobori T (2003)** The genome stability in *Corynebacterium* species due to lack of the recombinational repair system. *Gene* (317): 149-55
- Nikaido H (1988)** Structure and functions of the cell envelope of gram-negative bacteria. *Rev. Infect. Dis.* (10): 279-81
- 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.* (7): 1572-9
- Nouwens AS, Cordwell SJ, Larsen MR, Molloy MP, Gillings M, Willcox MDP, Walsh BJ (2000)** Complementing genomics with proteomics: The membrane subproteome of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Electrophoresis* (21): 3797-809

- Pearson WR. (1990)** Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods Enzymol.* (183): 63-98
- Peters-Wendisch PG, Kreutzer C, Kalinowski J, Patek M, Sahm H, Eickmanns BJ (1998)** Pyruvate carboxylase from *Corynebacterium glutamicum*: characterisation, expression and inactivation of the *pyc* gene. *Microbiology* (144): 915-27
- Peyret JL, Bayan N, Joliff G, Gulik-Krzywicki T, Mathieu L, Schechter E, Leblon G (1993)** Characterization of the *cspB* gene encoding PS2, an ordered surface-layer protein in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Microbiol.* (1): 97-109
- Polakis SE, Guchhait RB, Zwergel EE, Lane MD, Cooper TG (1974)** Acetyl coenzyme A carboxylase system of *Escherichia coli*. *Microbiol.* (144): 895-903
- Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage G (1975)** Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* (258): 598-9
- Portevin D, De Sousa-D'Auria C, Houssin C, Grimaldi C, Chami, M, Daffé M, Guilhot C (2004)** A polyketide synthase catalyzes the last condensation step of mycolic acid biosynthesis in *mycobacteria* and related organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (101) 314-9
- Portevin D, de Sousa-D'Auria C, Montrozier H, Houssin C, Stella A, Lanéelle MA, Bardou F, Guilhot C, Daffé M. (2005)** The acyl-AMP ligase FadD32 and AccD4-containing acyl-CoA carboxylase are required for the synthesis of mycolic acids and essential for mycobacterial growth: identification of the carboxylation product and determination of the acyl-CoA carboxylase components. *J Biol Chem.* (280): 8862-74
- Puech V, Bayan N, Salim K, Leblon G, Daffé M (2000)** Characterization of the *in-vivo* acceptors of the mycoloyl residues transferred by the corynebacterial PS1 and the related mycobacterial antigens 85. *Mol Microbiol.* (35): 1026-41
- Puech V, Chami M, Lemassu A, Lanéelle MA, Schiffler B, Gounon P, Bayan N, Benz R, Daffé 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): 1365-82

- Radmacher E, Stansen KC, Besra GS, Alderwick LJ, Maughan WN, Hollweg G, Sahm H, Wendisch VF, Eggeling L (2005)** Ethambutol, a cell wall inhibitor of *Mycobacterium tuberculosis*, elicits L-glutamate efflux of *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology* (151): 1359-68
- Rainwater DL and Kolattukudy PE (1982)** Isolation and characterization of acyl coenzyme A carboxylases from *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*, which produce multiple methyl-branched mycocerosic acids. *J. Bacteriol.* (151): 905-11
- Rylatt DB, Keech DB, Walla JC (1977)** Pyruvate carboxylase: the amino acid sequence at the biotin attachment site of the enzymes isolated from chicken, turkey and sheep liver. *Biochem. Soc. Trans.* (5): 1544-6
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989)** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samols D, Thornton CG, Murtif VL, Kumar GK, Haase FC, Wood HG (1988)** Evolutionary conservation among biotin enzymes. *J. Biol. Chem.* (263): 6461-4
- Sanger F, Nicklen C, Coulson AR (1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (74): 5463-7
- Sassetti CM, Boyd DH, Rubin EJ (2003)** Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol. Microbiol.* (48): 77-84
- Saxena P, Yadav G, Mohanty D, Gokhale RS (2003)** A new family of type III polyketide synthases in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* (45): 44780-90
- Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A (1994)** Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* (145): 69-73
- Schaffer S, Weil B, Nguyen VD, Dongmann G, Günther K, Nickolaus M, Hermann T, Bott M (2001)** A high-resolution reference map for cytoplasmic and membrane-associated proteins of *Corynebacterium glutamicum*. *Electrophoresis* (22): 4404-22

- Scherman MS, Kalbe-Bournonville L, Bush D, Xin Y, Deng L, McNeil M (1996)** Polyprenylphosphate-pentoses in Mycobacteria are synthesized from 5-Phosphoribose Pyrophosphate. *J. Biol. Chem.* (271): 29652-8
- Schwarzer A, and Pühler A (1991)** Manipulation of *Corynebacterium glutamicum* by gene disruption and replacement. *Bio/Technology* (9): 84-7
- Shimakata T, Iwaki M, Kusaka T (1984)** In vitro synthesis of mycolic acids by the fluffy layer fraction of *Bacterionema matruchotii*. *Arch Biochem Biophys.* (229): 329-39
- Shimakata T, Tsubokura K, Kusaka T, Shizukuishi K (1985)** Mass-spectrometric identification of trehalose 6-monomycolate synthesized by the cell-free system of *Bacterionema matruchotii*. *Arch Biochem Biophys.* (238): 497-508
- Simic P, Sahm H, Eggeling L (2001)** L-threonine export: use of peptides to identify a new translocator from *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* (18): 5317-24
- Southern EM (1975)** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* (98): 503-17
- Stackebrandt E, Rainey FA, Ward-Rainey NL (1997)** Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* (47): 479-91
- Staunton J, Caffrey P, Aparicio JF, Roberts GA, Bethell SS, Leadlay PF (1996)** Evidence for a double-helical structure for modular polyketide synthases. *Nat. Struct. Biol.* (2): 188-92
- Staunton J and Weissman KJ (2001)** Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat. Prod. Rep.* (4): 380-416
- Stephan J, Mailänder C, Etienne G, Daffé M, Niederweis (2004)** Multidrug resistance of a porin deletion mutant of *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* (11): 4163-70
- Sutton MR, Fall RR, Nervi AM, Alberts AW, Vagelos PR, Bradshaw RA (1977)** Amino acid sequence of *Escherichia coli* biotin carboxyl carrier protein (9100). *J. Biol. Chem.* (252): 3934-40

- Takayama K and Armstrong EL (1976)** Isolation, characterization, and function of 6-myceryl-6'-acetylthreosyl-6-phosphate in the H37Ra strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry*. (2): 441-7
- Takayama K, Armstrong EL, Kunugi KA, Kilburn JO (1979)** Inhibition by ethambutol of mycolic acid transfer into the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* (2): 240-2
- 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. *Current Microbiology* (45): 362–367
- Thorne KJ and Kodicek E (1962)** The metabolism of acetate and mevalonic acid by lactobacilli. II. The incorporation of [14C]acetate and [14C]mevalonic acid into the bacterial lipids. *Biochim Biophys Acta* (59): 280-94
- Tilg Y (2002)** Lipidsynthese in *Corynebacterium glutamicum*: Genetische und biochemische Untersuchungen zu Acyl-CoA Carboxylasen. *Dissertation Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf*
- Trivedi O, Arora P, Sridharan V, Tickoo R, Mohanty D, Gokhale RS (2004)** Enzymic activation and transfer of fatty acids as acyl-adenylates in mycobacteria. *Nature* (428): 441-5
- Trivedi OA, Arora P, Vats A, Ansari MZ, Tickoo R, Sridharan V, Mohanty D, Gokhale RS (2005)** Dissecting the mechanism and assembly of a complex virulence mycobacterial lipid. *Mol. Cell.* (5): 631-43
- Tropis M, Meniche X, Wolf A, Gebhardt H, Strelkov S, Chami M, Schomburg D, Krämer R, Morbach S, Daffé M (2005)** The crucial role of trehalose and structurally related oligosaccharides in the biosynthesis and transfer of mycolic acids in *Corynebacterineae*. *J. Biol. Chem.* (28): 26573-85
- van der Rest ME, Lange C, Molenaar D (1999)** A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogenetic plasmid-DNA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (52): 541-5

- Vorm O and Mann M (1994)** Improved mass accuracy in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of peptides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* (5): 955-8
- Waddell SJ, Chung GA, Gibson KJ, Everett MJ, Minnikin DE, Besra GS, Butcher PD (2005)** Inactivation of polyketide synthase and related genes results in the loss of complex lipids in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Lett. Appl. Microbiol.* (3): 201-6
- Waite M and Wakil SJ (1962)** Studies on the mechanism of fatty acid synthesis. XII. Acetyl coenzyme A carboxylases. *J Biol. Chem.* (237): 2750-7
- Wakil SJ, Titchener EB, Gibson DM (1958)** Evidence for the participation of biotin in the enzymic synthesis of fatty acids. *Biochim Biophys Acta.* (29): 225-6
- Walker RW, Prome JC, Lacave CS (1973)** Biosynthesis of mycolic acids. Formation of a C32 beta-keto ester from palmitic acid in a cell-free system of *Corynebacterium diphtheriae*. *Biochim Biophys Acta.* (326): 52-62
- Weissman KJ (2005)** Polyketide synthases: mechanisms and models. *Ernst Schering Res. Found Workshop.* (51): 43-78
- Wendisch VF, Spies M, Reinscheid DJ, Schnicke S, Sahm H, Eickmanns BJ (1997)** Regulation of acetate metabolism in *Corynebacterium glutamicum*: transcriptional control of the isocitrate lyase and malate synthase genes. *Arch Microbiol.* (168) 262-9
- Wolf A (2002):** Trehalosesynthese in *Corynebacterium glutamicum*. *Dissertation Universität zu Köln*
- Wood HG and Barden RE (1977)** Biotin enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* (46): 385-413
- Wolucka BA, McNeil MR, de Hoffmann E, Chojnacki T, Brennan PJ (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.* (37): 23328-35
- Yokoyama K, Araki Y, Ito E (1988)** The function of galactosyl phosphorylpolyprenol in biosynthesis of lipoteichoic acid in *Bacillus coagulans*. *Eur. J. Biochem* (173): 453-8

Young DB (1980) Identification of *Mycobacterium leprae*: use of wall-bound mycolic acids. *J. Gen. Microbiol.* (**1**): 249-53

VII ANHANG

1 Oligonukleotidsequenzen

Tabelle 9: Oligonukleotidsequenzen, die zur Amplifizierung von DNA Fragmenten, zur Sequenzierung oder zum Nachweis chromosomaler Manipulationen verwendet wurden. Eingeführte Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen und der entsprechende Enzymname hinter der Sequenz in Klammern angeführt. Überlappende Sequenzen für die *cross-over* PCR sind durch Fettdruck hervorgehoben. Für einen fusionierten His₆-Tag (H₆) codierende Sequenzen sind kursiv, die der artifiziellen Ribosomenbindestelle (RBS) unterbrochen unterstrichen und die Start bzw. Stopp Codons doppelt unterstrichen markiert.

Primer	Basensequenz in 5' → 3' Richtung	Verwendung
Standardprimer		
rsp1	CAC AGG AAA CAG CTA TGA CCA TG	universal-M13-Primer (rev)
universal	CAC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC	universal-M13-Primer (for)
Inaktivierungen		
<i>paccDA-int-for</i>	TGG GGT TCA TCT GGG CAT CTC AC	Amplifikation des <i>accD4</i> -internen Fragments (for) zur Inaktivierung
<i>paccDA-int-rev</i>	TGC CCC CAA CGT TTC CAT AAT CTC	Amplifikation des <i>accD4</i> -internen Fragments (rev) zur Inaktivierung
<i>pag85-int-for</i>	GAG CGC TGG CAG GAA AAC G	Amplifikation des <i>cmytA</i> -internen Fragments (for) zur Inaktivierung
<i>pag85-int-rev</i>	CGA TTG CGC CGA CAG GTG	Amplifikation des <i>cmytA</i> -internen Fragments (rev) zur Inaktivierung
<i>pfadD-int-for</i>	CAT TAT CCT CGC GGC GTT TGT C	Amplifikation des <i>fadD</i> -internen Fragments (for) zur Inaktivierung
<i>pfadD-int-rev</i>	GTG GGC GGT TTT CGG TCT GTG	Amplifikation des <i>fadD</i> -internen Fragments (rev) zur Inaktivierung
<i>CgdsR3F52</i>	TCA ACG CGG GCG AAG GTA GTG ATC	Amplifikation des <i>accD3</i> -internen Fragments (for) zur Inaktivierung
<i>CgdsR3R53</i>	AGC CCC TGT GTT TGC AGC ACC AAC	Amplifikation des <i>accD3</i> -internen Fragments (rev) zur Inaktivierung

Primer	Basensequenz in 5' → 3' Richtung	Verwendung
Cgdt <i>sR3</i> MuF40	GTT GTA GGC GTC GCA GAT AC	Nachweis der <i>accD3</i> Integrität (for), Nachweis der <i>accD3</i> Inaktivierung (for)
Cgdt <i>sR3</i> MuR41	GCG TCC TCT GAA GAA GAG	Nachweis der <i>accD3</i> Integrität (rev), Nachweis der <i>accD3</i> Inaktivierung (rev)
p <i>accDAF36</i>	CGG GAT CCG TGG AGA AGC GTT TTC CGA C (BamHI)	Nachweis der <i>accD4</i> Inaktivierung (for)
p <i>accDA</i> -rev-2	CGC GGA TCC ACC CAC TGT CTG GCC GTA CCC TG (BamHI)	Nachweis der <i>accD4</i> Inaktivierung (rev)
p <i>pks13</i> -int-for2	GCT TAC GCT GCC GGT GGA CTC A	Nachweis der <i>pks</i> Inaktivierung (for)
p <i>pks13</i> -int-rev2	GTG TGG CGG ATC GAT GGT TTC A	Nachweis der <i>pks</i> Inaktivierung (rev); Nachweis der <i>cmytA</i> Inaktivierung (rev)
p <i>ag85</i> -chrom-for	CGC AAC CCA CCA CCC AGA C	Nachweis der <i>cmytA</i> Inaktivierung (for)

Deletion *pks*

p <i>Cipks13</i>	TGT TTA AGT TTA GTG GAT GGG AGT CGC CGC ATT GAT GAG ATT TC	Amplifikation des rechten internen Fragments (for)
p <i>Copks13</i>	GGA ATT CGA CAG CGG AAG CTG ACG ACG	Amplifikation des rechten internen Fragments (rev)
p <i>Nopks13</i>	GGA ATT CCG TTG GCA CTG CAC ACG GTG	Amplifikation des linken internen Fragments (for)
p <i>Nipks13-2</i>	CCC ATC CAC TAA ACT TAA ACA CTT CTG ATC CGA CGA TTG GCT CTG	Amplifikation des linken internen Fragments (rev)
p <i>chrompks13</i> -for	CTG CTG AAG AAG CAA TCC GC	Nachweis der Deletion (for)
p <i>hrompks13</i> -rev	CAG CAT GAT GGA AAT CTG AGG	Nachweis der Deletion (rev)

Deletion *fadD*

p <i>CifadD32</i>	TGT TTA TGT TTA GTG GAT GGG CAG CGC AAC TAC ATTC AGG AAC	Amplifikation des rechten internen Fragments (for)
p <i>CofadD32</i>	GGA ATT CCG CCT TGT CAT CCG TAA CTT CC	Amplifikation des rechten internen Fragments (rev)
p <i>NofadD32</i>	GGA ATT CCT TTG AAC TTG CTG GTG CAG	Amplifikation des linken internen Fragments (for)
p <i>NifadD32</i>	CCC ATC CAC TAA TCT TAA ACA CGC TTT ATC TAA ATC CAT GTG AAC	Amplifikation des linken internen Fragments (rev)

Primer	Basensequenz in 5' → 3' Richtung	Verwendung
Deletion <i>hyp</i>		
pCihp	TGT TTA AGT TTA GTG GAT GGG GGC CAG CTC ATC GTG CAG G	Amplifikation des rechten internen Fragments (for)
pCohp	CGG <u>GAT CCC</u> GCAT TCA TCT TCG CGG TGC CTT C (BamHI)	Amplifikation des rechten internen Fragments (rev)
pNohp	CGG <u>GAT CCC</u> GCC ACT GGT CCT TGG GAA ATC C (BamHI)	Amplifikation des linken internen Fragments (for)
pNihp	CCC ATC CAC TAA ACT TAA ACA GTA GAT GCG CTT CAC TAT TAG	Amplifikation des linken internen Fragments (rev)
pdhp_nw_for	TCA CCT TCG AGC ACG GCT CC	Nachweis der Deletion (for)
pdhp_nw_rev	GCA GGG CAC TCA TTG TGA GTG	Nachweis der Deletion (rev)
Deletion <i>cut</i>		
pCihypex	TGT TTA AGT TTA GTG GAT GGG GTG GAT TGG GCG ACC AAC C	Amplifikation des rechten internen Fragments (for)
pCohypex	GGA ATT CCA CGA TCA CCC AGG GTG GC	Amplifikation des rechten internen Fragments (rev)
pNohypex	GGA ATT CCT ACG CAA CTC TCG CTT CCG	Amplifikation des linken internen Fragments (for)
pNihypex	CCC ATC CAC TAA ACT TAA ACA GGT GAT GGT TTT CCT CAT CGG	Amplifikation des linken internen Fragments (rev)
pdhypex_nw_for	CAG GTC AAT GGC CGA ATT GAG G	Nachweis der Deletion (for)
pdhypex_nw_rev	GTA GAT CGC GCC GAG GAA GC	Nachweis der Deletion (rev)
Deletion A, B, C		
pdMY_12N_for	GGT TCA CCT TTT CCA GAC TTA C	Deletion A und B – Amplifikation des internen Fragments (for)
pdMY_12N_rev	CCC ATC CAC TAA ACT TAA ACA TCG TGT AAA TAC GGA CAT AAT TC	Deletion A und B – Amplifikation des internen Fragments (rev)
pdMY_2C_for	TGT TTA AGT TTA GTG GAT GGG GTT CGA GAT GAC TCA GGC GTT	Deletion B – Amplifikation des internen Fragments (for)
pdMY_2C_rev	CCC ATG CGG CGA GCA TAT CG	Deletion B - Amplifikation des internen Fragments (rev)
pdMY_3N_for	GGC CTG CGC CAG CAG TTC G	Deletion C – Amplifikation des internen Fragments (for)
pdMY_3N_rev	CCC ATC CAC TAA ACT TAA ACA GTA GAT GCG CTT CAC TAT TAG C	Deletion C - Amplifikation des internen Fragments (rev)
pdMY_13C_for	TGT TTA AGT TTA GTG GAT GGG GTG	Deletion A und C – Amplifikation

Primer	Basensequenz in 5' → 3' Richtung	Verwendung
	GAT TGG GCG ACC AAC CTC	des internen Fragments (for)
pdMY_13C_rev	AGA AGT CCC AGA AAT GCA TGC G	Deletion A und C - Amplifikation des internen Fragments (rev)
pdMY_12nw_for	CAG GCG CTA CGC CAC CCA G	Nachweis ΔA und ΔB (for)
pdMY_3nw_for	CCA ACC GGC GCT GCA GTT G	Nachweis ΔC (for)
pdMY_13nw_rev	AAT CAG CTT GCC ATC GCG GTC	Nachweis ΔA und ΔC (rev)
pdMY_2nw_rev	GCT GCC CTT CTC ATA GTC CTG	Nachweis ΔB (rev)

Amplifikation von

Genen

pRBSH ₆ <i>pks</i> _for2	ACT <u>CCT GCA GGA AGG AGA TAT AGA</u> <u>TAT GCA TCA CCA TCA CCA TCA CGA</u> ACA GAG CCA ATC GTC GGA TC (SbfI)	Amplifikation des <i>pks</i> -Gens mit N- terminalem Histag (for)
<i>ppks</i> _rev3	GTC <u>CCT GCA GGC TAA</u> TTC TTC CGA GAA ATC TCA TC (SbfI)	Amplifikation des <i>pks</i> -Gens (rev)
<i>pfadD</i> _ex_for	CGG <u>GAT CCG</u> ATT TAG ATA AAG CGA TTG GTT C (BamHI)	Amplifikation des <i>fadD</i> -Gens zur Clonierung in pEKEx5 (for)
<i>pfadD</i> _ex_rev	CGG <u>GAT CCC TAG</u> TTA GCT TGT TCC TGA ATG (BamHI)	Amplifikation des <i>fadD</i> -Gens zur Clonierung in pEKEx5 (rev)
<i>pdtsR2</i> _Ex_H ₆ _up	CGC <u>GGA TCC AAG GAG ATA TAG ATA</u> <u>TGC ATC ACC ATC ACC ATC ACA</u> CTG CAG CAC AGA CCA AAC CTG (BamHI)	Amplifikation des <i>accD2</i> -Gens mit N-terminalem Histag (for)
<i>pdtsR2/846</i> _Ex_H 6_low	CTG <u>CCC GGG TTA</u> GAA GAA ATT CAC ATT CTG AAA CG (SmaI)	Amplifikation des <i>accD2</i> -Gens (rev)
<i>pdtsR2/845</i> _Ex_H 6_low	CTG <u>CCC GGG TTA</u> CAT GTT CCA GAA GTC GCT GG (SmaI)	Amplifikation des <i>accD2</i> -Gens mit angrenzendem Orf (rev)

2 Plasmidkarten

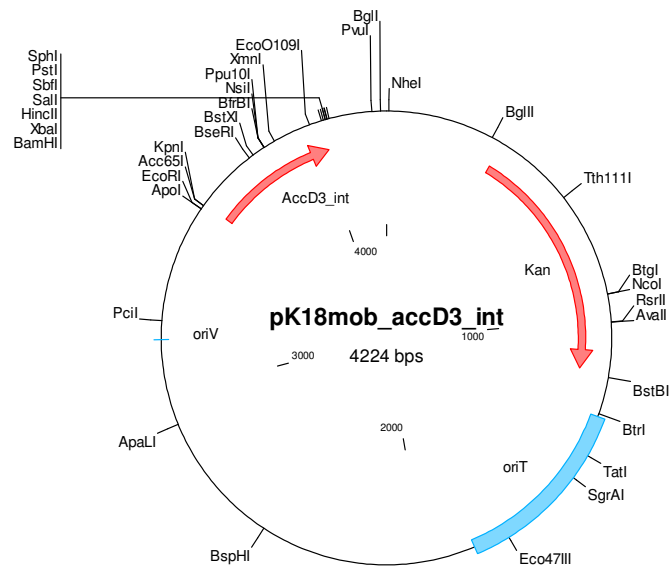


Abbildung 32: Plasmid pK18mob_*accD3_int* zur Inaktivierung des *accD3* Gens.

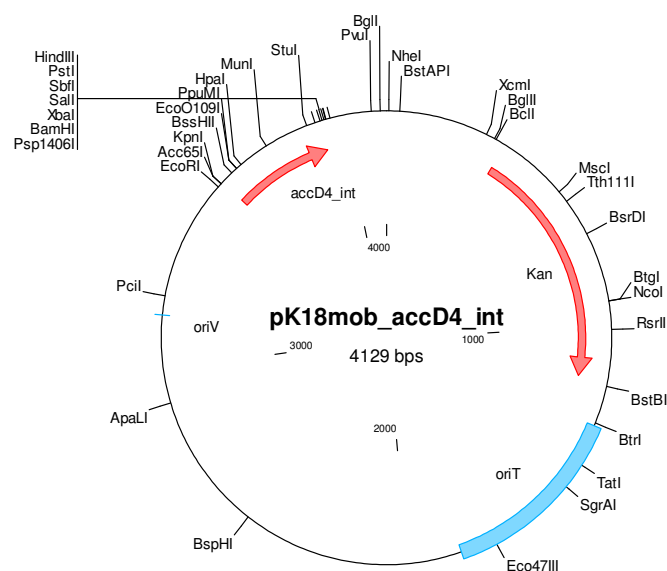


Abbildung 33: Plasmid pK18mob_*accD4_int* zur Inaktivierung des *accD4* Gens.

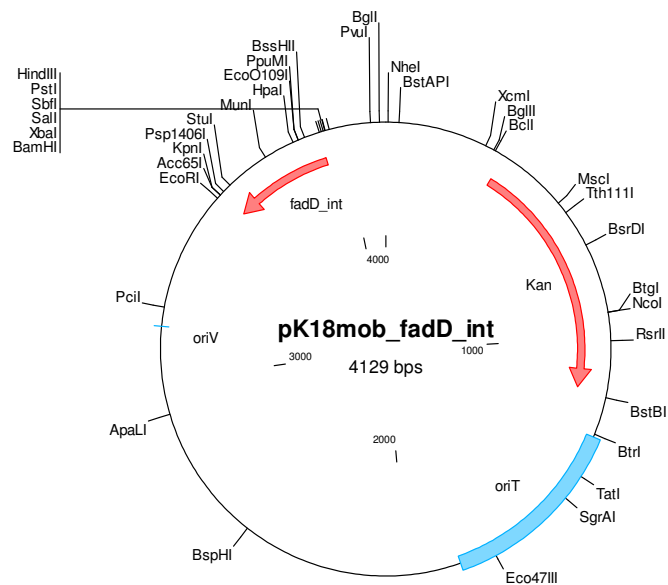


Abbildung 34: Plasmid pK18mob_*fadD_int* zur Inaktivierung des *fadD* Gens.

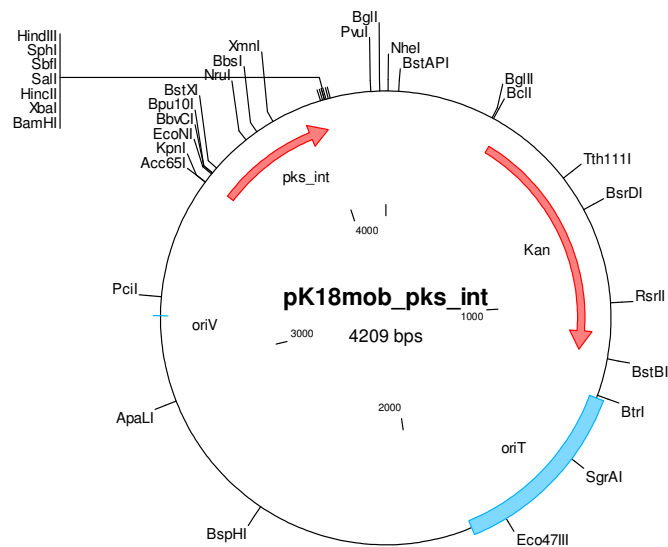


Abbildung 35: Plasmid pK18mob_*pks_int* zur Inaktivierung des *pks* Gens.

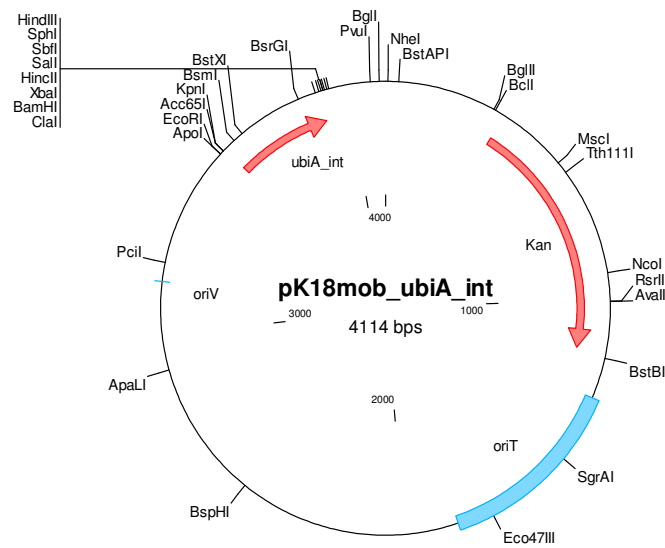


Abbildung 36: Plasmid pK18mob_ubiA_int zur Inaktivierung des *ubiA* Gens.

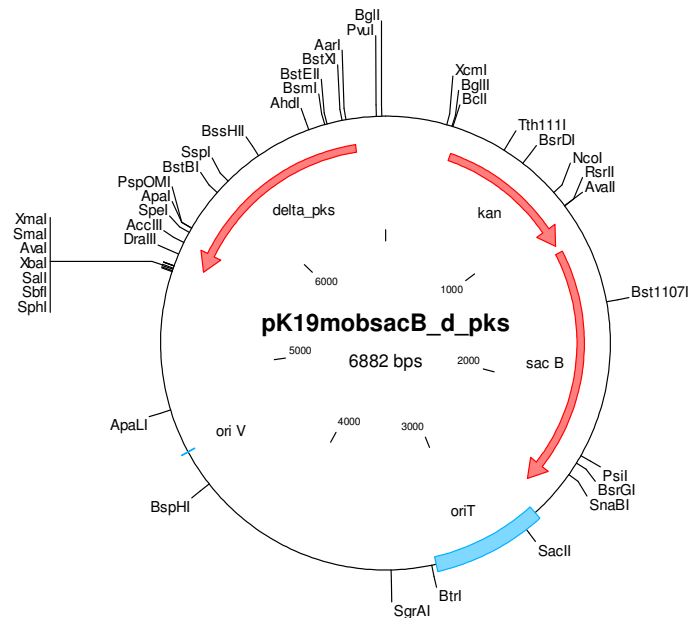


Abbildung 37: Plasmid pK19mobsacB_d_pks zur *in-frame* Deletion des gesamten *pks* Gens.

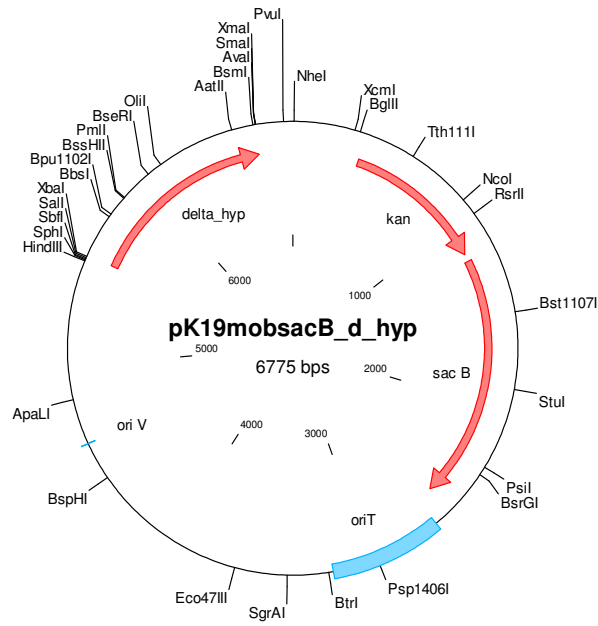


Abbildung 38: Plasmid pK19mobsacB_d_hyp zur *in-frame* Deletion des gesamten *hyp* Gens.

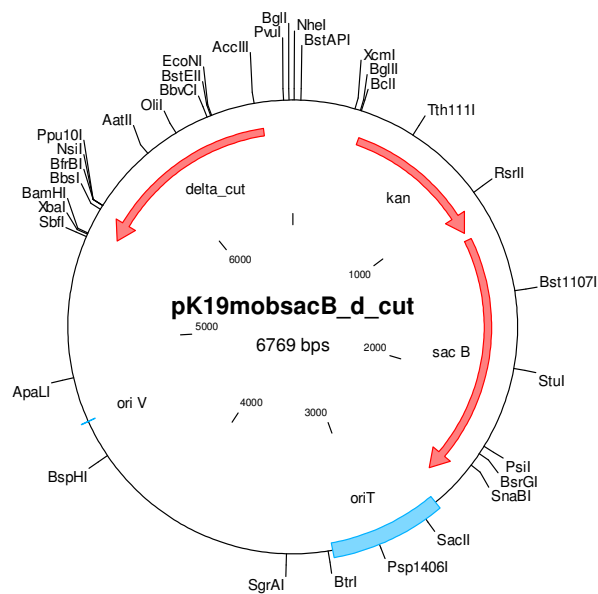


Abbildung 39: Plasmid pK19mobsacB_d_cut zur *in-frame* Deletion des gesamten *cut* Gens.

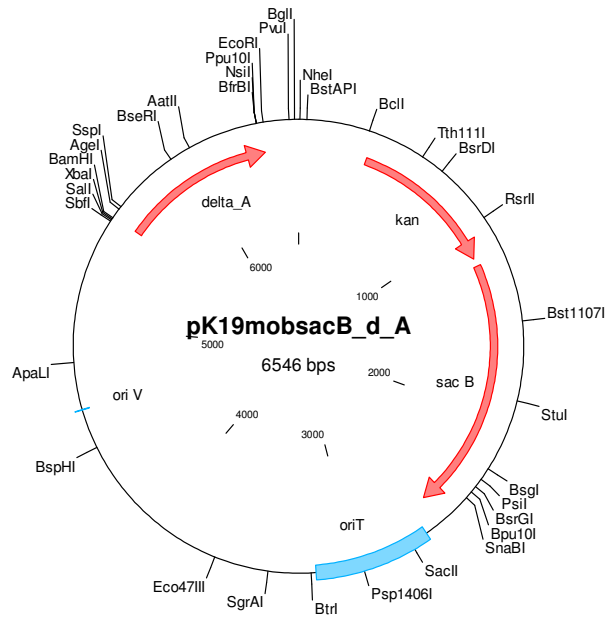


Abbildung 40: Plasmid pK19mobsacB_d_A zur *in-frame* Deletion des gesamten Bereichs von *cmytA*, *cmytB*, *cut* und *hyp*.

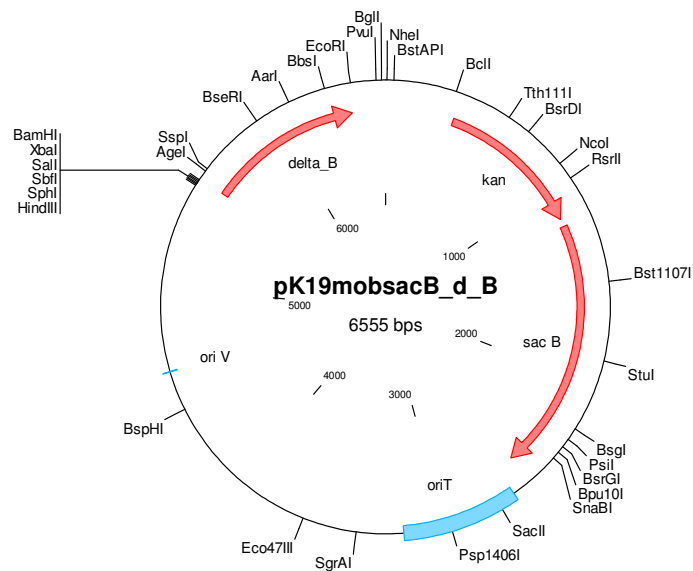


Abbildung 41: Plasmid pK19mobsacB_d_B zur *in-frame* Deletion des gesamten Bereichs von *cmytA* und *cmytB*.

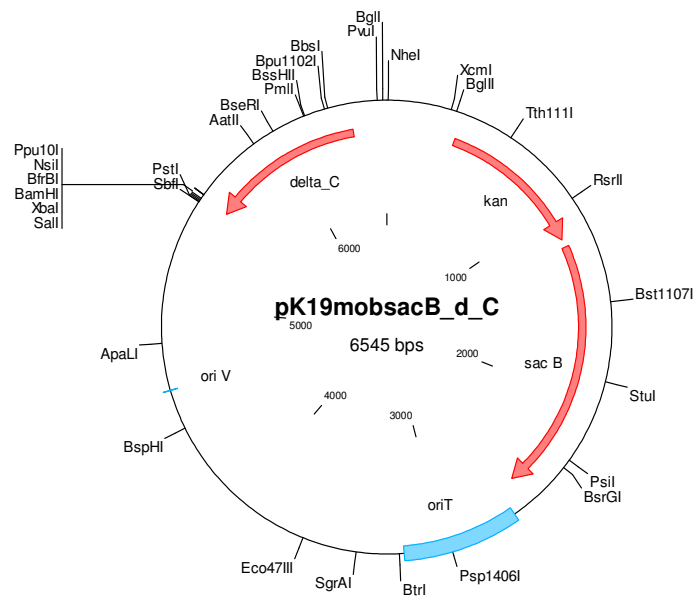


Abbildung 42: Plasmid pK19mobsacB_d_C zur *in-frame* Deletion des gesamten Bereichs von *cut* und *hyp*.

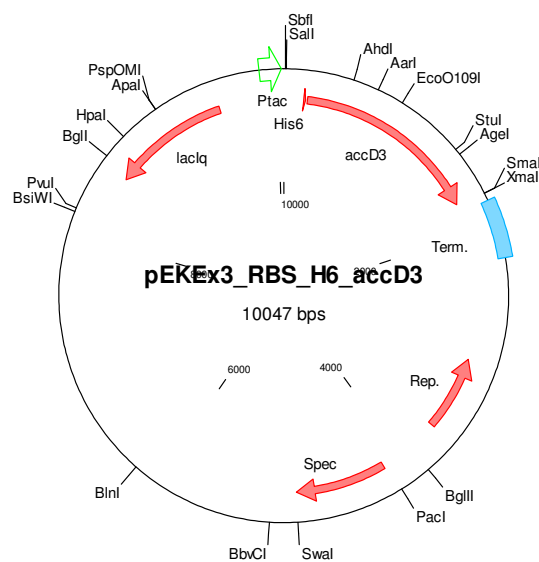


Abbildung 43: Plasmid pEKEx3_RBS_H6_accD3 zur Überexpression des Fusionsproteins von AccD3 und einem N-terminalen His₆-Tag.

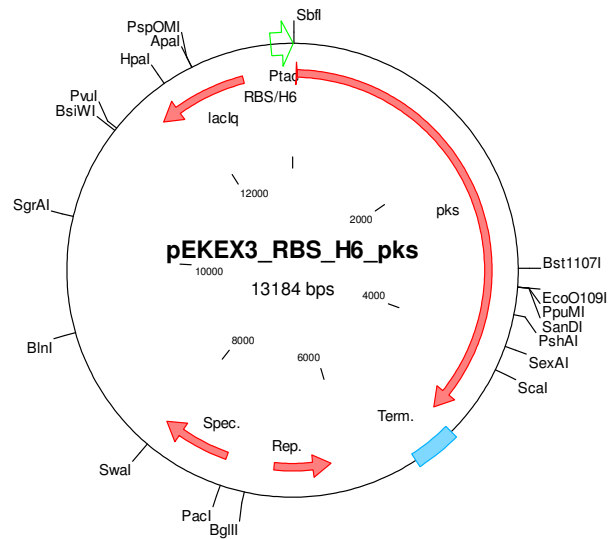


Abbildung 44: Plasmid pEKEx3_RBS_H6_pks zur Überexpression des Fusionsproteins von Pks und einem N-terminalen His₆-Tag.

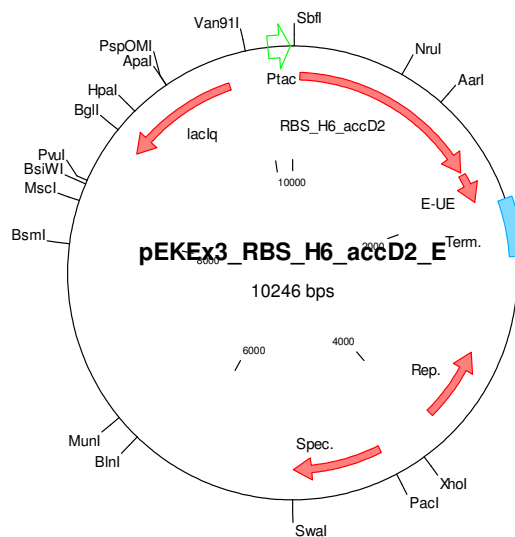


Abbildung 45: Plasmid pEKEx3_RBS_H6_accD2_E zur Überexpression des Fusionsproteins von AccD3 und einem N-terminalen His₆-Tag zusammen mit der putativen ϵ -Untereinheit.

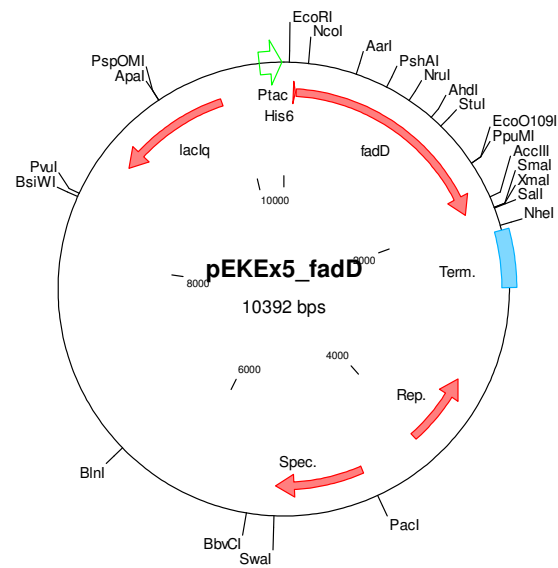


Abbildung 46: Plasmid pEKEx5_fadD zur Überexpression des Fusionsproteins von FadD und einem N-terminalen His₆-Tag.

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Hermann Sahm danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, seine Anregungen und sein Interesse an dem Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jäger danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Lothar Eggeling, der durch seine engagierte Betreuung, seine konstruktive Kritik und seinen dauerhaften Optimismus einen großen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Frau Karin Krumbach danke ich ganz besonders für die geduldige Einarbeitung, die Hilfe bei der Lösung vieler Probleme und die netten Gespräche.

Der gesamten Arbeitsgruppe, Herrn Prof. Dr. Bang, Corinna, Eva K, Eva R, Helga, Jan, dem Gartenzwerg, Karin, Kathrin, Michael, Nadine, Natalie, Nicole, Petra, Ramon und Roman (in alphabetischer Reihenfolge) bedanke ich mich für die nette Arbeitsatmosphäre. In diesem Zusammenhang möchte ich meinen Laborpartnern, Karin, Eva und Herrn Prof. Dr. Bang für ihre Geduld mit mir danken... Ebenso möchte ich mich auch bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe auf der anderen Seite des Flures, speziell natürlich bei Michael und Daniel (ich denke immer noch an die Bahnfahrt...) für die nette Nachbarschaft bedanken.

Speziell bei Eva möchte ich mich noch für die Duldung über viele Monate im Raum 234 bedanken. Ich werde die Durchführung der vielen skurrilen, wenn auch manchmal nicht ganz sinnvollen Experimente vermissen. Nur schade, dass nicht alle verbotenen Experimente funktioniert haben, manchmal scheitert es eben an so etwas banalem wie dem Verfallsdatum.

Mein Dank gilt auch der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Besra aus Birmingham, insbesondere Ali, Kevin, Luke, Lynn, Neil, Raju und Sid, ohne deren freundliche Unterstützung viele Experimente nicht möglich gewesen wären.

Bei den ehemals „Jülichern“, Andrea, Corinna (nochmals vielen Dank für die provisions-freie Wohnungsvermittlung), Eva, Michael und Nadine, möchte ich mich nochmals dafür bedanken, dass ich im Kreis Düren nicht ganz vereinsamen musste

Allen ungenannten Mitarbeitern des IBT-1 danke ich für die ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre, ihre Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Speziell danke ich in diesem Zusammenhang auch Dr. Axel Niebisch für seine Einweisung in die MALDI-TOF Analytik, sowie Frau Martha Chmielus und Sandra Johnen für die Betreuung bei der Flüssigkeits-chromatographie.

Ein besonders lieber Dank gilt natürlich auch meiner Familie, die mich mit Fürsorge, Verständnis, Aufmunterungen und uneingeschränkter Unterstützung durch Studium und Doktorarbeit begleitet hat. Mein Dank gilt an dieser Stelle vor allem auch Stefanie Müller für die liebevolle Unterstützung, die Ermutigungen, das Vertrauen und das Verständnis für alle Höhen und Tiefen in dieser Zeit.

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Jülich, den 01. November 2005

(Roland Gande)