

Lipidsynthese in *Corynebacterium glutamicum*: Genetische und biochemische Untersuchungen zu Acyl-CoA Carboxylasen

Yvonne Tilg

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3946

ISSN 0944-2952

Institut für Biotechnologie Jül-3946

D 61 (Diss., Düsseldorf, Univ., 2002)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

☎ 024 61/61-52 20 · Telefax: 024 61/61-61 03 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Lipidsynthesis in *Corynebacterium glutamicum*: Genetical and biochemical investigations of acyl-CoA carboxylases

The Gram-positive soil bacterium *C. glutamicum* is used for the industrial production of amino acids as L-glutamate and L-lysine. The cell wall of this bacterium and related *Corynebacteriaceae* is in addition to the cytoplasmic membrane built up of a second distinct lipid layer, e.g. the mycolic acid layer. It was shown that these two lipid layers are decisive for the transport of solutes and are likely to influence the efflux of the amino acids. Since the lipid synthesis of the bacterium is not entirely known, the present work describes the isolation of acyl-CoA carboxylases which catalyze the initial reaction of the lipid biosynthesis as well as the characterization of the enzyme activity.

In addition to the gene *accBC* coding for a putative α -subunit of an acyl-CoA carboxylase the four further genes *accDA*, *dtsR1*, *dtsR2* and *dtsR3* were isolated and sequenced. The deduced amino acid sequences of the genes exhibit high identities to β -subunits of acyl-CoA carboxylases. Enzymatic investigations revealed that AccBC and AccDA built up a functionally enzyme complex. The coexpression of *accBC* and *accDA* causes a threefold higher carboxylation of acetyl-CoA to malonyl-CoA, the precursor of the fatty acid biosynthesis, with a specific activity of 161 mU / mg protein. The enzyme carboxylates propionyl-CoA as well. The enzyme is also proved to be essential for *C. glutamicum* since it is not possible to inactivate *accBC* or *accDA*. The inactivation of *dtsR1*, *dtsR2* or *dtsR3* led to evident growth limitations, respectively. The growth of each mutant strain is partly restored by supplementation with different fatty acids. This points to a function of the gene products in the lipid biosynthesis. The isolation of the biotinylated AccBC protein by avidin affinity chromatography resulted in the coisolation of proteins identified as DtsR1, DtsR2 and DtsR3. Thereby it is shown that one α -subunit can interact with several β -subunits. In conclusion *C. glutamicum* could have different acyl-CoA carboxylases whose common α -subunit catalyzes the CO₂-fixation and whose β -subunits are responsible for different yet unknown substrate specificities.

The L-glutamate and L-lysine export is influenced by overexpression of the acyl-CoA carboxylase genes. After mutual overexpression of *accBC* and *dtsR1* only 30 % L-glutamate has accumulated. The mutual overexpression of *accBC* and *accDA* decreased the L-lysine accumulation by 11 %. Thus the amino acid efflux seems to be correlated with the lipid composition of the membrane.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	9
1. Bakterienstämme und Plasmide	9
2. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen	13
2.1 Nährmedien	13
2.2 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> und <i>Corynebacterium glutamicum</i>	15
3. Molekulargenetische Methoden	16
3.1 Transformation von <i>E. coli</i> und <i>C. glutamicum</i>	16
3.2 Konjugativer Plasmidtransfer von <i>E. coli</i> nach <i>C. glutamicum</i>	17
3.3 Plasmid-DNA Präparation aus <i>E. coli</i> und <i>C. glutamicum</i>	17
3.4 Restriktion, Modifikation und Ligation von DNA	18
3.5 Polymerasekettenreaktion	18
3.6 DNA-Sequenzierung und computergestützte Sequenzanalysen	19
4. Quantifizierung von Aminosäuren und Coenzym A-Derivaten	20
4.1 Quantitative Bestimmung von Aminosäuren mittels <i>reversed phase</i> HPLC	20
4.2 Quantitative Bestimmung von CoA und CoA-Derivaten mittels <i>reversed phase</i> HPLC	20
5. Messung von Enzymaktivitäten	21
5.1 Herstellung von Zellrohextrakten zur Messung von Enzymaktivitäten	21
5.2 Bestimmung der spezifischen Acetyl- und Propionyl-CoA Enzymaktivitäten der Acyl-CoA Carboxylasen von <i>C. glutamicum</i>	22
6. Proteinbiochemische Methoden	23
6.1 Herstellung von Zellrohextrakten zur Isolierung von Proteinen	23
6.2 Proteinbestimmung und SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	24
6.3 Synthese spezifischer Peptidantikörper und Western Blot Analysen zum Nachweis einzelner Untereinheiten von Acyl-CoA Carboxylasen	24
6.4 Bestimmung der Größe von Proteinen durch Gelfiltrationschromatographie mittels FPLC	25
6.5 Isolierung biotinhaltiger Enzymkomplexe durch Avidinaffinitätschromatographie mittels FPLC	26
6.6 Konstruktion der Expressionsvektoren pQE30 <i>dtsR1</i> , - <i>dtsR2</i> , - <i>dtsR3</i> und Isolierung des Histidin-DtsR1 Fusionsproteins mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie	27
6.7 Identifizierung von Proteinen mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie und Datenbankvergleich	28

III. Ergebnisse

1. Isolierung und Charakterisierung von Genen für putative Untereinheiten von Acyl-CoA Carboxylasen in <i>C. glutamicum</i>	30
1.1 Isolierung und Sequenzanalyse des Gens für eine mögliche Carboxyltransferase der Acetyl-CoA Carboxylase (<i>accDA</i>)	30
1.2 Isolierung und Sequenzanalyse der Gene für mögliche Carboxyltransferasen der Acyl-CoA Carboxylasen (<i>dtsR1</i> , <i>dtsR2</i> , <i>dtsR3</i>)	32
2. Konstruktion und Charakterisierung definierter Carboxyltransferase-negativer Mutanten von <i>C. glutamicum</i>	38
2.1 Einfluss von Fettsäuresupplementen auf das Wachstum von <i>C. glutamicum</i> R127	38
2.2 Versuche zur Inaktivierung der Gene des Biotincarboxylase-Biotincarboxyl-carrierproteins (<i>accBC</i>) und der Carboxyltransferase (<i>accDA</i>)	40
2.3 Inaktivierung der Gene für die putativen Carboxyltransferasen DtsR1, DtsR2 und DtsR3 in <i>C. glutamicum</i> ATCC13032 und R127	42
2.4 Wachstumsexperimente zur Charakterisierung der Carboxyltransferase Integrationsmutanten	47
3. Überexpression der Gene für Acyl-CoA Carboxylaseuntereinheiten und Untersuchungen zur Aminosäurebildung	50
3.1 Untersuchungen zur Glutamatbildung nach Überexpression von Acyl-CoA Carboxylasegenen im Stamm ATCC13032	50
3.2 Untersuchungen zur Lysinbildung nach Überexpression von Acyl-CoA Carboxylasegenen im Stamm MH20-22B	53
4. Enzymatische Untersuchungen zum Nachweis von Acyl-CoA Carboxylase-aktivitäten in <i>C. glutamicum</i> ATCC13032	56
4.1 Nachweis und Trennung von CoA-Derivaten und Etablierung eines diskontinuierlichen Enzymtests	56
4.2 Bestimmung der spezifischen Enzymaktivitäten bei Überexpression von Acyl-CoA Carboxylasegenen	59
5. Proteinbiochemische Untersuchungen zum Aufbau der nativen Acyl-CoA Carboxylasen	62
5.1 Bestimmung der Größe des biotinhaltigen Enzymkomplexes mittels Gel-filtrationschromatographie	63
5.2 Immunologischer Nachweis der Untereinheiten der Acyl-CoA Carboxylasen nach gefiltrationschromatographischer Trennung des Proteinrohextraktes	64

5.3 Isolierung der biotinylierten Acyl-CoA Carboxylaseuntereinheit und Identifizierung coisolierter Proteine	69
5.4 Messung der Enzymaktivitäten in Gelfiltrationsfraktionen mit Proteinkomplexen einer Größe von 700 kDa und von 400 kDa	71
5.5 Identifizierung von Acyl-CoA Carboxylaseuntereinheiten in isolierten Proteinkomplexen unterschiedlicher Größe	73
IV. Diskussion	79
V. Zusammenfassung	88
VI. Literaturverzeichnis	89
VII. Anhang	109
1. Sequenzen	109
2. Restriktionskarten der konstruierten Plasmide	118
3. PCR- und Sequenzierprimer	130
4. Peptidsequenzen zur Synthese von Peptidantikörpern	132
5. Dokumentation der Isolierung von His ₆ DtsR1 mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie	133
6. Dokumentation der Isolierung von AccBC mittels Avidinaffinitätschromatographie	134

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACC	Acetyl-CoA Carboxylase
AcylCC	Acyl-CoA Carboxylase
ACoA	Acetyl Coenzym A
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat
BCoA	n-Butyryl Coenzym A (Lithiumsalz)
bp	Basenpaare
Brij58	Polyoxyethylen-20-hexadecylether (Emulgator)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
C- / N-Terminus	Carboxy- / Aminoterminus von Proteinen
Carb	Carbenicillin
Cm	Chloramphenicol
CoA	Coenzym A
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
FPLC	<i>Fast Performance Liquid Chromatography</i>
h	Stunde(n)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
L	Liter
M	Molarität [mol/L]
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionisation - Time of Flight</i>
MCCoA	β -Methylcrotonyl Coenzym A
MCoA	Malonyl Coenzym A
MCS	Klonierungsbereich (<i>Multiple Cloning Site</i>)
MES	3-(N-Morpholino)ethansulfonsäure

min	Minute(n)
MMCoA	Methylmalonyl Coenzym A
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
Mr	relatives Molekulargewicht
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat, reduzierte Form
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
orf	Offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
ori	Replikationsursprung (<i>origin of replication</i>)
P _i	anorganisches Phosphat
PCC	Propionyl-CoA Carboxylase
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PCoA	n-Propionyl Coenzym A
PVDF	Polyvinylidendifluorid
s	Sekunde(n)
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
SCoA	Succinyl Coenzym A
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium Dodecylsulfate</i>)
sp.	Species
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TG	Trockengewicht
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
Tween 40	Polyoxyethylensorbitanmonopalmitat
Tween 60	Polyoxyethylensorbitanmonostearat
Tween 80	Polyoxyethylensorbitanmonooleat
U	Spezifische Enzymaktivität (Units) [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$]
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)

I. Einleitung

Corynebacterium glutamicum ist ein Gram positives Eubakterium, das 1957 von Kinoshita *et al.* aus einer Bodenprobe isoliert und als biotinauxotroph und glutamatproduzierend charakterisiert wurde. Heutzutage zählen *C. glutamicum* und die Subspezies *flavum* und *lactofermentum* zu den bedeutendsten Mikroorganismen bei der industriellen Aminosäureproduktion (Eggeling & Sahm, 1999; Kircher & Leuchtenberger, 1998; Liebl *et al.*, 1991; Kinoshita, 1985). Mit diesen coryneformen Stämmen werden mehr als 1.000.000 Tonnen L-Glutamat und 400.000 Tonnen L-Lysin pro Jahr hergestellt (Eggeling & Sahm, 2001; Eggeling *et al.*, 2001b; Leuchtenberger, 1996; Hodgson, 1994). Dabei findet L-Glutamat wirtschaftliche Bedeutung als Geschmacksverstärker und Würzmittel in der Lebensmittelindustrie. Die für Vertebraten essentielle und dadurch häufig limitierende Aminosäure L-Lysin dient vorwiegend als Futtermitteladditiv (Malumbres *et al.*, 1995; Kleemann *et al.*, 1985).

Da der Wildtyp dieses Bakteriums auf Komplexmedium kein L-Glutamat ausscheidet, wurde seit der Entdeckung von *C. glutamicum* nach Bedingungen zur Induktion und Steigerung der Glutamatproduktion gesucht. Der Biosyntheseweg von L-Glutamat in *C. glutamicum* (Abb. 1), beteiligte Enzyme und regulatorische Effekte sind überwiegend aufgeklärt (Kinoshita, 1985). Demnach wird Glukose nach Aufnahme durch das Phosphotransferasesystem (Parche *et al.*, 2001) über die Glykolyse und den oxidativen Pentosephosphatweg bis zum Phosphoenolpyruvat und Pyruvat umgesetzt, die über Acetyl-CoA als Citrat in den Zyklus gelangen (Wendisch *et al.*, 2000; Marx *et al.*, 1997; Kinoshita, 1985). Ausgehend vom Zwischenprodukt α -Ketoglutarat erfolgt die Synthese von L-Glutamat in einem einzigen Schritt (Abb. 1). Dieser wird in Form einer reduktiven Aminierung durch die Glutamatdehydrogenase (*gdh*) katalysiert (Börmann *et al.*, 1992; Kimura, 1962). Die Glutamatdehydrogenase steht in Konkurrenz zum α -Ketoglutaratdehydrogenasekomplex (*odhA*, *lpd*) (Usuda *et al.*, 1996; Schwinde, 1995), der das gemeinsame Substrat α -Ketoglutarat zu Succinyl-CoA umsetzt (Shiio & Ujigawa-Takeda, 1980). Reguliert wird die Glutamatsynthese aus α -Ketoglutarat durch Endproduktinhibition und -repression der Glutamatdehydrogenase (Ertan, 1992; Shiio & Ujigawa, 1978). Zusätzlich erfolgt eine Repression der Phosphoenolpyruvatcarboxylase (*ppc*) (Eikmanns *et al.*, 1989) und der Citratsynthase (*gltA*) (Eikmanns *et al.*, 1994) durch erhöhte Glutamatkonzentrationen (Shiio & Ujigawa, 1978; Shiio & Ozaki, 1970). Kürzlich wurde gezeigt, dass glutamatproduzierende Stämme mit nur zehn Prozent der Ausgangsaktivität eine stark verringerte α -Ketoglutaratdehydrogenaseaktivität aufweisen (Kawahara *et al.*, 1997). Da die Glutamatdehydrogenaseaktivität der Stämme nahezu unverändert ist, wird der Stofffluss von α -Ketoglutarat verstärkt in Richtung L-Glutamat gelenkt.

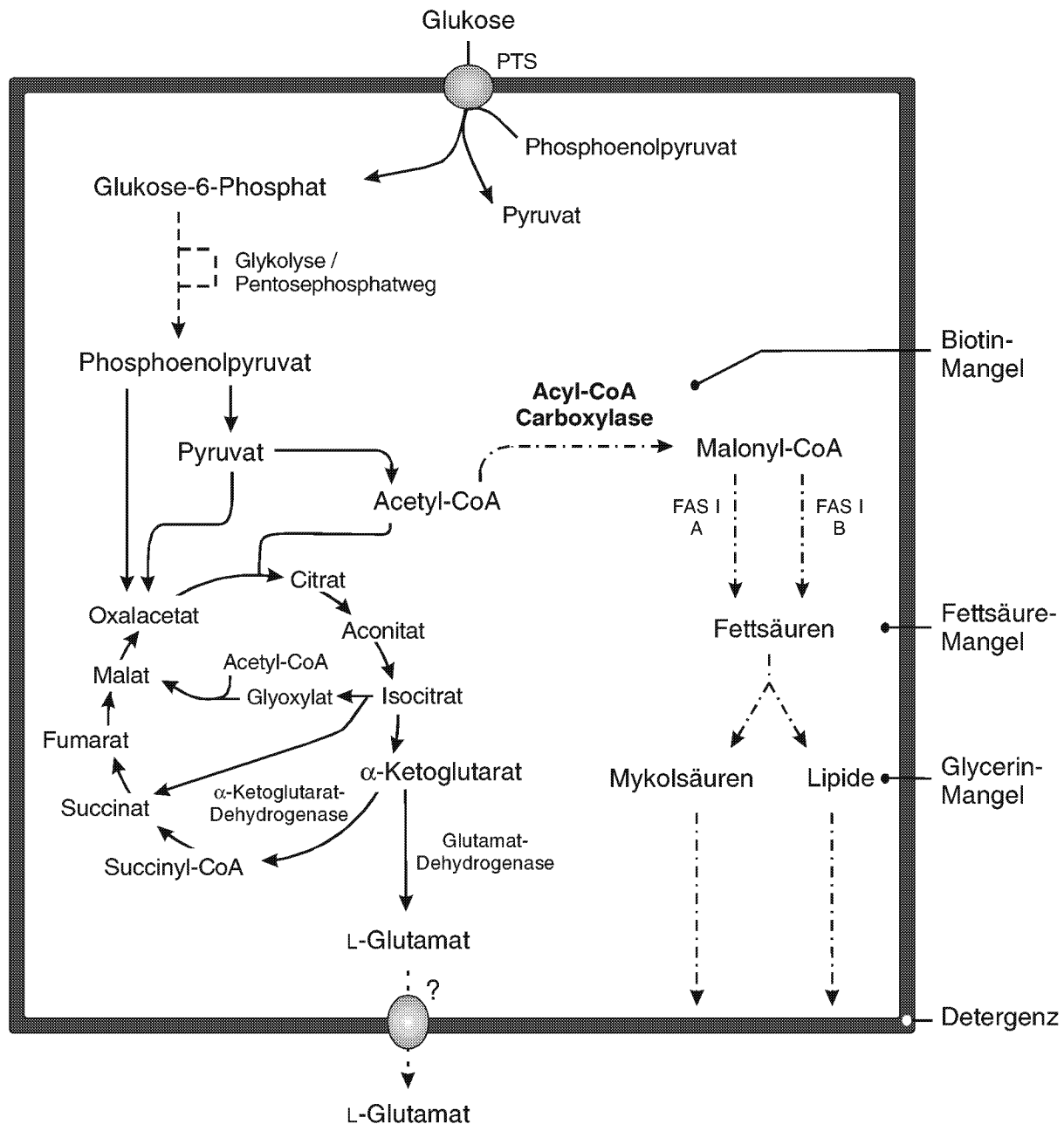


Abb. 1: Schematische Darstellung der wichtigsten Reaktionen im Biosyntheseweg von L-Glutamat in *C. glutamicum* und mögliche Wirkorte L-Glutamat produktionsinduzierender Faktoren (—●). Gestrichelte Pfeile (- - -) deuten an, dass mehrere enzymatische Schritte zwischen den beiden Verbindungen liegen. Strich-Punkt-Pfeile (- · -) deuten an, dass der Syntheseweg in *C. glutamicum* nicht bekannt ist. FAS I: Fettsäuresynthasekomplex I; PTS: Phosphotransferasesystem

Schon bei der Isolierung von *C. glutamicum* wurde beobachtet, dass die Glutamat-ausscheidung des natürlicherweise biotinauxotrophen Stammes effektiv durch Biotinmangel im Kulturmedium hervorgerufen werden kann (Gutmann *et al.*, 1992; Shiiro *et al.*, 1962) (Abb. 1). Gleichermäßen erfolgt eine Induktion der Produktion durch Ölsäure- oder Glycerinmangel im Kulturmedium ölsäure- oder glycerinauxotropher Stämme (Naji *et al.*, 2000; Kitano *et al.*, 1972; Nakao *et al.*, 1972). Zudem wurde gezeigt, dass die Glutamatproduktion durch Zugabe von Fettsäurederivaten (Hucheng *et al.*, 1984, Takinami *et al.*, 1965), subletalen Mengen Penicillin (Nunheimer *et al.*, 1970) oder Lokalanästhetika (Lambert *et al.*, 1995) in der exponentiellen Wachstumsphase zum Kulturmedium sowie durch Erhöhung der Kultivierungstemperatur (Lapujade *et al.*, 1999) induzierbar ist. Für alle Produktionsmethoden wurde angenommen, dass sie Veränderungen des Membranaufbaus bewirken. Tatsächlich zeigten Untersuchungen infolge des Biotinmangels eine Reduktion des Gesamtphospholipidgehaltes der Cytoplasmamembran um 50 % und eine Zunahme der gesättigten Fettsäuren Myristinsäure und Palmitinsäure bei gleichzeitiger Abnahme der ungesättigten Fettsäure Ölsäure (Hoischen & Krämer, 1990; Bunch & Harris, 1986; Kikuchi & Nakao, 1986).

Zum Zusammenhang zwischen den Lipidveränderungen und der Glutamatexkretion wurden zwei verschiedene Modelle postuliert, nach denen L-Glutamat entweder passiv durch eine "löchrige" Membran diffundiert (Demain & Birnbaum 1968; Shiiro *et al.*, 1963) oder durch eine Inversionsreaktion des von der protonenmotorischen Kraft entkoppelten Glutamataufnahmesystems exportiert wird (Clement & Lanéelle, 1986; Clement *et al.*, 1984). Beide Hypothesen wurden widerlegt, da der Export spezifisch, energieabhängig und auch entgegen eines Glutamatkonzentrationsgefälles stattfindet (Gutmann *et al.*, 1992). Außerdem konnte eine Beteiligung des Glutamataufnahmesystems am Export nach Deletion und Effluxmessungen, die eine unveränderte Glutamatexkretion in diesem Stamm ergab, eindeutig ausgeschlossen werden (Kronmeyer *et al.*, 1995). Durch bioenergetische Analysen biotinsupplementierter und biotinlimitierter Zellen zeigten Hoischen und Krämer (1989, 1990; Krämer, 1994) stattdessen, dass ein spezifischer Aminosäureexportcarrier den Efflux von L-Glutamat unter Biotinlimitation vermittelt. Obwohl das Gen für den Glutamatexportcarrier bisher nicht identifiziert wurde, konnte das Vorliegen solcher Exporter in *C. glutamicum* nach vorheriger Charakterisierung der L-Lysin (Bröer & Krämer, 1991a, 1991b; Bröer *et al.*, 1993), L-Isoleucin (Ebbighausen *et al.*, 1989) und L-Threonin (Palmieri *et al.*, 1996) Effluxprozesse kürzlich durch die Identifizierung der Gene für den Lysin- (LysE), den Isoleucin- (BrnFE) und den Threoninexporter (ThrE) belegt werden (Vrljić *et al.*, 1996; Kennerknecht, 1999; Simić *et al.*, 2001). Zusätzlich zur verringerten α -Ketoglutaratdehydrogenaseaktivität wird die erhöhte Glutamatausscheidung unter Biotinlimitation derzeit nach einer neuen Hypothese auf eine veränderte Aktivität des Exporters durch die Lipidumgebung und das herabgesetzte Lipid / Protein Verhältnis der Cytoplasmamembran zurückgeführt (Eggeling & Sahm, 2001;

Eggeling *et al.*, 2001b). Unter anderem ist durch Untersuchungen der Exportaktivitäten des Leucin-Transportsystems von *Lactococcus lactis* und *Pseudomonas aeruginosa* sowie der Lactose-Permease von *E. coli* bereits bekannt, dass die Lipidzusammensetzung der Membran einen Einfluss auf die Aktivität von Carriermolekülen hat (Bogdanov & Dowhan, 1998; Le Coutre *et al.*, 1997; In 't Veld *et al.*, 1991, 1993; Uratani *et al.*, 1987).

Neue Erkenntnisse zum Membranaufbau der Unterordnung *Corynebacterineae*, der auch *C. glutamicum* zugeordnet wird (Stackebrandt *et al.*, 1997), machen deutlich, dass sich eine Veränderung der Fettsäurezusammensetzung nicht nur auf die Struktur der Cytoplasmamembran auswirkt, sondern auch einen Einfluss auf andere Komponenten der Zellwand hat.

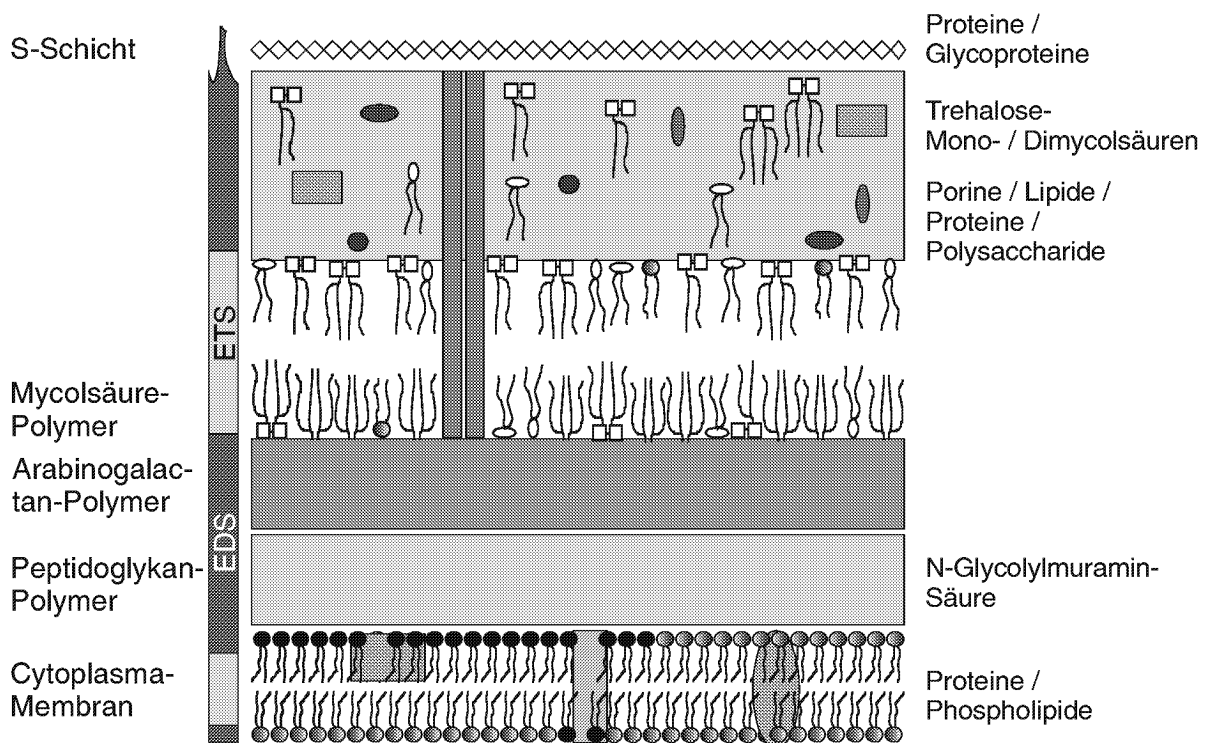


Abb. 2: Schematisches Modell des Zellwandaufbaus von *Corynebacterium* (nach Puech *et al.*, 2001). Neben der Cytoplasmamembran besteht die Zellwand aus den drei kovalent verbundenen Polymerschichten Peptidoglykan, Arabinogalactan und Mycolsäuren, gefolgt von einer im Aufbau noch undefinierten, elektronendichten Schicht mit extrahierbaren Lipiden sowie der monomolekularen, kristallinstrukturierten S-Schicht. (EDS: im Elektronenmikroskop elektronendichte Schicht; ETS: im Elektronenmikroskop elektronentransluzente Schicht)

Corynebacterineae, zu der auch die Gattungen *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Dietzia* und *Tsukamurella* gehören (Stackebrandt *et al.*, 1997), ist gemein, dass sie eine ungewöhnlich komplexe Zusammensetzung und Struktur der Zellwand (Abb. 2) im Vergleich zu anderen Gram positiven Mikroorganismen aufweisen (Puech *et al.*, 2001; Daffé & Draper, 1998; Marienfeld *et al.*, 1997).

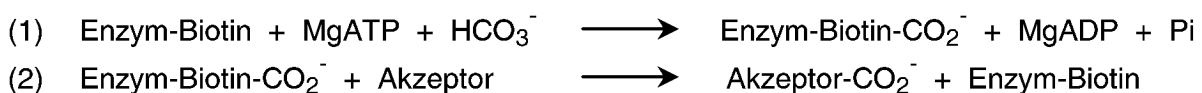
Die Zellwand dieser Bakterien zeichnet sich vor allem durch die sogenannten Mycolsäuren aus, die kovalent mit den ebenfalls über Phosphodiesterbrücken verbundenen Polymerschichten Arabinogalactan und Peptidoglykan verestert sind (Brennan & Nikaido, 1995; McNeil *et al.*, 1991). Mycolsäuren sind langkettige α -Alkyl-, β -Hydroxyfettsäuren der generellen Struktur $R_1\text{-CH(OH)-CH(R}_2\text{)-COOH}$, wobei R_1 und R_2 Fettsäurereste darstellen (Shimakata *et al.*, 1984; Walker *et al.*, 1973). *Mycobacterium* besitzt die längsten Mycolsäuren, deren Meromycolatrest (R_1) hauptsächlich aus 40-64 Kohlenstoffatomen und der kürzere α -verzweigte Fettsäurerest (R_2) aus 20-26 Kohlenstoffatomen besteht (Kremer *et al.*, 2000; Kaneda *et al.*, 1995; Minnikin, 1982). Die corynebakteriellen Mycolsäuren sind dagegen innerhalb der *Corynebacterineae* deutlich kürzer und werden auch als Corynemycolsäuren bezeichnet. Diese Mycolsäuren liegen überwiegend in der gesättigten Struktur $C_{32:0}$ und der einfach ungesättigten Struktur $C_{34:1}$ vor (Collins *et al.*, 1982). In *C. glutamicum* beträgt die Kettenlänge des Meromycolatrestes 16-18 Kohlenstoffatome und die des α -verzweigten Fettsäurerestes 14-16 Kohlenstoffatome (Jang *et al.*, 1997; Herrera-Alcaraz *et al.*, 1993; Collins *et al.*, 1982). Zusätzlich zur Polymerschicht, die die Mycolsäuren durch ihre kovalente Bindung an Arabinogalactan bilden, liegen sie als Trehalosemono- (TMM) und Trehalosedimycolsäuren (TDM) vor (Lanéelle & Asselineau, 1977) (Abb. 2). Diese sind als extrahierbare, nicht-kovalent gebundene Lipide vermutlich an der Bildung der äußeren Mycolsäureschicht der Zellwand beteiligt (Liu *et al.*, 1995; Brennan & Nikaido, 1995).

Der gesamte Aufbau der Membran und vor allem der der Mycolsäuren wird für die geringe Permeabilität sowohl hydrophiler als auch hydrophober Moleküle über die Membran dieser Mikroorganismen verantwortlich gemacht (Eggeling *et al.*, 2001a; Puech *et al.*, 2000; Jackson *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1996; Brennan & Nikaido, 1995; Jarlier & Nikaido, 1990). So ist gezeigt, dass der Mycolsäureanteil in *Mycobacterium tuberculosis* die diffusionsbedingte Aufnahme von Antibiotika beeinflusst (Jarlier & Nikaido, 1994, 1990). Ebenso steigert eine Verringerung der zellwandgebundenen Corynemycolsäuren durch erhöhte Diffusion die Aufnahme der hydrophilen Verbindungen Glycerin und Acetat (Puech *et al.*, 2000). Erst kürzlich konnten Eggeling *et al.* (2001a) zudem zeigen, dass sich ein Eingriff in die komplexe Struktur der Zellwand von *C. glutamicum* auch auf den Efflux von L-Glutamat auswirkt. Durch die Inaktivierung des *alr* Gens von *C. glutamicum*, kodierend für die D-Alaninracemase, wurde die Glutamatausbeute 25fach gesteigert. Obwohl D-Alanin nur ein Bestandteil des

Peptidoglykans ist, wirkt sich eine Schwächung dieses Polymers wahrscheinlich auch auf die Arabinogalactan- und somit auf die Mycolsäureschicht aus, da diese kovalent miteinander verbunden sind (Abb.2). Daher wird postuliert, dass der physikalisch-chemische Zustand der Mycolsäureschicht ebenfalls wesentlichen Einfluss auf den Glutamatefflux nimmt (Eggeling *et al.*, 2001a). Diese Hypothese würde zudem die Glutamatausscheidung durch Fettsäure-, Glycerinmangel, Penicillinzugabe und weitere Produktionsbedingungen erklären.

Bisher ist der Biosyntheseweg der Mycolsäuren nur teilweise aufgeklärt (Kremer *et al.*, 2000). Auch der Biosyntheseweg ihrer Bausteine, den Fettsäuren, ist in *C. glutamicum* unbekannt. Zur Zeit wird davon ausgegangen, dass die Initiationsreaktion wie in *E. coli* durch eine Acyl-CoA Carboxylase katalysiert wird (Cronan & Rock, 1996; Guchait *et al.*, 1974, Albert und Vagelos, 1972). Die Verlängerung der Startermoleküle wird dann aber wahrscheinlich durch zwei Typ I Fettsäuresynthasekomplexe vergleichbar zu *Brevibacterium ammoniagenes* katalysiert (Stuible *et al.*, 1997, 1996), da die für diese Enzyme kodierenden zwei Gene *fasA* und *fasB* im Genom von *C. glutamicum* vorliegen (Genomdatenbank der Degussa AG).

Einen molekularen Zugang zur Fettsäuresynthese und der damit verbundenen Mycol-säuresynthese in *C. glutamicum* könnte sich durch die Identifizierung der zwei Gene *accBC* (*acyl-CoA-carboxylase subunits B and C*; Jäger *et al.*, 1996) und *dtsR1* ergeben (*detergent sensitive rescuer*; Kimura *et al.*, 1996). AccBC und DtsR1 weisen Aminosäureidentitäten zu Untereinheiten von biotinabhängigen Enzymen, den Acyl-CoA Carboxylasen, auf, zu denen unter anderem die Acetyl-CoA Carboxylase, die Propionyl-CoA Carboxylase, die β -Methylcrotonyl-CoA Carboxylase und die Geranyl-CoA Carboxylase gezählt werden (Knowles, 1989; Moss & Lane, 1971). Hierbei handelt es sich um cytosolische Multienzymkomplexe, die in ihrer aktiven Form über eine Amidbindung an die ϵ -Gruppe eines einzigen, konservierten Lysinrestes kovalent mit dem Valerinsäureseitenrest des Coenzyms Biotin (Vitamin H) verbunden sind (Chapman-Smith & Cronan Jr., 1999; Samols *et al.*, 1988; Guchait *et al.*, 1974). Das Coenzym Biotin dient als CO_2 -Carrier bei der Carboxylierung von Acyl-CoA Verbindungen, die biotinvermittelt in zwei Schritten erfolgt (Knowles, 1989; Moss & Lane, 1971). Zunächst wird das enzymgebundene Biotin ATP-abhängig am N1-Stickstoffatom des Biotinringes carboxyliert, so dass Carboxybiotin entsteht (1). In einem zweiten Schritt (2) erfolgt die Übertragung der aktivierten Carboxylgruppe auf das Akzeptormolekül (Acetyl-CoA, Propionyl-CoA, β -Methylcrotonyl-CoA, Geranyl-CoA) (Knowles, 1989; Wood & Barden, 1977; Polakis *et al.*, 1974; Alberts & Vagelos, 1972).



Das ubiquitäre Enzym Acetyl-CoA Carboxylase katalysiert die Initiationsreaktion der Fettsäurebiosynthese durch die Carboxylierung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA (Wakil *et al.*, 1983; Alberts & Vagelos, 1972). Das bakterielle Enzym ist sehr gut in *E. coli* untersucht. Es besteht aus den vier Polypeptiddomänen Biotincarboxylase (AccB), Biotincarboxylcarrierprotein (AccC), α -Carboxyltransferase (AccA) und β -Carboxyltransferase (AccD), die neben der Biotinbindung (AccC) und der Substratbindung (AccA) die beiden zuvor genannten Teilreaktionen katalysieren (AccB, AccD) (Kondo *et al.*, 1991; Sutton *et al.*, 1977; Li & Cronan, 1992a; 1992b; Li *et al.*, 1992; Guchait *et al.*, 1974). Bei mehreren Acyl-CoA Carboxylasen von prokaryotischen, Gram positiven Mikroorganismen wie *Mycobacterium tuberculosis* (Rainwater & Kolattukudy, 1982), *Saccharopolyspora erythraea* (Hunaiti & Kolattukudy, 1982) und *Myxococcus xanthus* (Kimura *et al.*, 1998) finden sich jeweils zwei der vorstehend genannten Domänen auf einem Polypeptidstrang vereinigt, so dass Biotincarboxylase und Biotincarboxylcarrierprotein sowie α - und β -Carboxyltransferase zusammen vorliegen. Diese zwei Untereinheiten werden ebenfalls als α - und β -Untereinheiten bezeichnet. Auch AccBC aus *C. glutamicum* weist Aminosäureidentitäten zur Biotincarboxylase (AccB) und zum Biotincarboxylcarrierprotein (AccC) von *E. coli* auf. Daher könnte *accBC* für die biotinylierte α -Untereinheit einer Acyl-CoA Carboxylase kodieren (Jäger *et al.*, 1996).

Das Gen *dtsR1* könnte für eine weitere Untereinheit dieser Enzymfamilie kodieren. DtsR1 weist hohe Identitäten zu β -Untereinheiten von Propionyl-CoA Carboxylasen auf, die die Carboxylierung von Propionyl-CoA zu Methylmalonyl-CoA katalysieren (Kimura *et al.*, 1996). Die Reaktion findet in Prokaryonten in den verschiedensten Biosynthesewegen statt, in denen Methylmalonyl-CoA wahrscheinlich hauptsächlich der Synthese methylverzweigter, langkettiger Fettsäuren (Mycocerosesäuren, Phthiocerolsäuren) oder der Polyketidsynthese dient (Fernandes & Kolattukudy, 1998; Kimura *et al.*, 1998; Rainwater & Kolattukudy, 1982, 1983; Han *et al.*, 2000; Richardson & Khosla, 1999; Staunton & Wilkinson, 1999). Das *dtsR1* Genprodukt von *C. glutamicum* könnte ein Bindeglied zwischen der Fettsäuresynthese und dem Export von L-Glutamat darstellen. Das Gen wurde in einem Experiment zur Komplementation des detergenzsensitiven Phänotyps einer *C. glutamicum* ssp. *lactofermentum* Mutanten isoliert (Kimura *et al.*, 1996). Interessanterweise scheidet der Stamm nach Deletion des Gens auch ohne Detergenzinduktion L-Glutamat aus (Kimura *et al.*, 1997a). Zudem ist der Deletionsstamm ölsäureauxotroph, was darauf hindeutet, dass das Genprodukt mit der Fettsäurebiosynthese zusammenhängt (Kimura *et al.*, 1999).

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung der Funktion von zu Acyl-CoA Carboxylasen homologen Proteinen im Lipidstoffwechsel von *C. glutamicum* und deren Einfluss auf die Aminosäurebildung. Nach Identifizierung der entsprechenden Gene sollte die funktionelle Charakterisierung zum einen durch eine gezielte Inaktivierung der Gene und Untersuchung der Auswirkung von Fettsäuren auf das Mutantenwachstum erfolgen. Zum anderen sollte ein enzymatisches Testsystem etabliert werden, das die Messung der von diesen Enzymen katalysierten Reaktionen ermöglicht. Proteinbiochemische und massenspektrometrische Untersuchungen sollten Interaktionen zwischen den Proteinen aufdecken und zur Identifizierung noch unbekannter Proteine der Fettsäuresynthese beitragen.

II. Material und Methoden

1. Bakterienstämme und Plasmide

Die Bakterienstämme, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, sind unter Angabe ihrer Stammeigenschaften in Tabelle 1 aufgeführt. Die verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tab.1: Bakterienstämme und ihre relevanten Eigenschaften

Bakterienstamm	Genotyp / Phänotyp	Referenz
<i>E. coli</i>		
DH5 α MCR	F ⁻ <i>endA1 supE44 thi-1 λ^- recA1 gyrA96 relA1 deoR $\Delta(lacZYA-argF)$ U169 ϕ80d<i>lacZ</i>ΔM15 <i>mcrA</i> $\Delta(mrr hsdRMS mcrBC)$</i>	Grant <i>et al.</i> , 1990
S17-1	<i>thi-1 F'endA1 hsdR17 supE44 λ^- pro</i>	Simon <i>et al.</i> , 1983
M15 [pREP4]	K12 Derivat; NaI ^S Str ^S Rif ^S Thi ⁻ Lac ⁻ Ara ⁺ Gal ⁺ Mtl ⁻ F ⁻ RecA ⁺ Uvr ⁺ Lon ⁺ ; enthält das Plasmid pREP4	Qiagen, Hilden
<i>C. glutamicum</i>		
R127	Restriktionsdefekt, <i>res⁻</i>	Liebl <i>et al.</i> , 1989
ATCC13032	Wildtypisolat	Abe <i>et al.</i> , 1967
MH20-22B	Lysinproduzent, AEC ^r , <i>leuD</i>	Schrumpf <i>et al.</i> , 1992
ATCC13032 Δ <i>pyc</i>	Pyruvatcarboxylase Deletionsmutante	Peters-Wendisch <i>et al.</i> , 1998
ATCC13032 <i>ptsR1</i> ::pK18 <i>mob'</i> <i>ptsR1'</i>	<i>ptsR1</i> disruptiert durch Integration des Vektors pK18 <i>mob'</i> <i>ptsR1'</i>	diese Arbeit
ATCC13032 <i>ptsR2</i> ::pK18 <i>mob'</i> <i>ptsR2'</i>	<i>ptsR2</i> disruptiert durch Integration des Vektors pK18 <i>mob'</i> <i>ptsR2'</i>	diese Arbeit

Tab.1(ff): Bakterienstämme und ihre relevanten Eigenschaften

Bakterienstamm	Genotyp / Phänotyp	Referenz
ATCC13032 <i>ptsR3</i> ::pK18 <i>mob'ptsR3</i>	<i>ptsR3</i> disruptiert durch Integration des Vektors pK18 <i>mob'ptsR3</i>	diese Arbeit

Tab. 2: Plasmide, ihre Marker und ihre Eigenschaften

Plasmid	Marker / Eigenschaft	Referenz
pWJ71	pK18 <i>mob</i> mit 3,2 kb <i>HindIII</i> -Insert, enthält <i>accBC</i>	Jäger <i>et al.</i> , 1996
pUC18 / pUC19	Klonierungsvektor, <i>oriV_{E.c.}</i> , Amp ^R	Norlander <i>et al.</i> , 1983; Yannisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pUC18 <i>accDA</i>	pUC18 mit 2,1 kb PCR-Fragment aus chromosomaler DNA von ATCC13032, enthält <i>accDA</i>	diese Arbeit ¹⁾
pUC19 <i>accBCaccDA</i>	pUC19 mit 2,6 kb <i>SalI</i> / <i>AgeI</i> <i>accBC</i> -Insert aus pWJ71 und 2,1 kb <i>XhoI</i> / <i>EcoRI</i> <i>accDA</i> - Insert aus pUC18 <i>accDA</i>	diese Arbeit
pUC18 <i>ptsR1</i>	pUC18 mit 1,9 kb PCR-Fragment aus chromosomaler DNA von ATCC13032, enthält <i>ptsR1</i>	diese Arbeit ¹⁾
pUC18 <i>ptsR2</i>	pUC18 mit 1,9 kb PCR-Fragment aus chromosomaler DNA von ATCC13032, enthält <i>ptsR2</i>	diese Arbeit ¹⁾
pUC18 <i>ptsR3</i>	pUC18 mit 1,9 kb PCR-Fragment aus chromosomaler DNA von ATCC13032, enthält <i>ptsR3</i>	diese Arbeit ¹⁾
pK18 <i>mob</i>	Integrationsvektor, <i>oriV_{E.c.}</i> , <i>oriT</i> , <i>mob</i> , Kan ^R	Schäfer <i>et al.</i> , 1994

Tab. 2(ff): Plasmide, ihre Marker und ihre Eigenschaften

Plasmid	Marker / Eigenschaft	Referenz
pK18 <i>mob'</i> <i>accBC</i> ₅₁₀	pK18 <i>mob</i> mit internem 510 bp <i>EcoRI</i> / <i>SacI</i> -Fragment aus pUC19 <i>accBCaccDA</i>	diese Arbeit
pK18 <i>mob'</i> <i>accBC</i> ₅₉₉	pK18 <i>mob</i> mit internem 599 bp <i>EcoRI</i> -Fragment aus pUC19 <i>accBCaccDA</i>	diese Arbeit
pK18 <i>mob'</i> <i>accDA</i> ₇₆₁	pK18 <i>mob</i> mit internem 761 bp <i>HindII</i> -Fragment aus pUC18 <i>accDA</i>	diese Arbeit
pK18 <i>mob'</i> <i>accDA</i> ₅₀₉	pK18 <i>mob</i> mit internem 509 bp <i>HindIII</i> / <i>EcoRI</i> -Fragment aus pUC18 <i>accDA</i>	diese Arbeit
pK18 <i>mob'</i> <i>dtsR1'</i>	pK18 <i>mob</i> mit internem 555 bp <i>dtsR1</i> -Fragment	diese Arbeit
pK18 <i>mob'</i> <i>dtsR2'</i>	pK18 <i>mob</i> mit internem 508 bp <i>dtsR2</i> -Fragment	diese Arbeit
pK18 <i>mob'</i> <i>dtsR3'</i>	pK18 <i>mob</i> mit internem 192 bp <i>dtsR3</i> -Fragment	diese Arbeit
pEK0	<i>C. glutamicum</i> / <i>E. coli</i> shuttle Vektor, Kan ^R , <i>oriV_{E.c.}</i> , <i>oriV_{C.g.}</i>	Eikmanns <i>et al.</i> , 1991b
pEK0 <i>accBC</i>	pEK0 mit 2,6 kb <i>SalI</i> / <i>NaeI</i> <i>accBC</i> -Insert aus pUC19 <i>accBCaccDA</i>	diese Arbeit
pEK0 <i>accDA</i>	pEK0 mit 2,4 kb <i>PstI</i> / <i>EcoRI</i> <i>accDA</i> -Insert aus pUC19 <i>accBCaccDA</i>	diese Arbeit
pEK0 <i>dtsR1</i>	pEK0 mit 2,1 kb <i>NdeI</i> / <i>KpnI</i> <i>dtsR1</i> -Insert aus pUC18 <i>dtsR1</i>	diese Arbeit
pEK0 <i>dtsR2</i>	pEK0 mit 2,2 kb <i>BamHI</i> / <i>SapI</i> <i>dtsR2</i> -Insert aus pUC18 <i>dtsR2</i>	diese Arbeit
pEK0 <i>dtsR3</i>	pEK0 mit 1,9 kb <i>EcoRI</i> <i>dtsR3</i> -Insert aus pUC18 <i>dtsR3</i>	diese Arbeit
pEK0 <i>accBCaccDA</i>	pEK0 mit 2,6 kb <i>SalI</i> / <i>NaeI</i> <i>accBC</i> -Insert und 2,4 kb <i>PstI</i> / <i>EcoRI</i> <i>accDA</i> -Insert aus pUC19 <i>accBCaccDA</i>	diese Arbeit ¹⁾

Tab. 2(ff): Plasmide, ihre Marker und ihre Eigenschaften

Plasmid	Marker / Eigenschaft	Referenz
pEK0 <i>accBCdtsR1</i>	pEK0 mit 2,6 kb <i>SaI</i> / <i>NaeI</i> <i>accBC</i> -Insert aus pUC19 <i>accBCaccDA</i> und 2,1 kb <i>NdeI</i> / <i>KpnI</i> <i>dtsR1</i> -Insert aus pUC18 <i>dtsR1</i>	diese Arbeit ¹⁾
pEK0 <i>accBCdtsR2</i>	pEK0 mit 2,6 kb <i>SaI</i> / <i>NaeI</i> <i>accBC</i> -Insert aus pUC19 <i>accBCaccDA</i> und 2,2 kb <i>Bam</i> HI/ <i>SapI</i> <i>dtsR2</i> -Insert aus pUC18 <i>dtsR2</i>	diese Arbeit
pPCR-ScriptAmpSK (+)	Klonierungsvektor, <i>oriV_{E.c.}</i> , <i>oriV_{E.c.}</i> , <i>lacZα</i> , Amp ^R	Stratagene, Heidelberg
pPCR-ScriptAmpSK (+) <i>dtsR1</i>	pPCR-ScriptAmpSK(+) mit 1,7 kb PCR-Fragment des Plasmides pUC18 <i>dtsR1</i> , entspricht dem orf des <i>dtsR1</i> Gens	diese Arbeit ¹⁾
pPCR-ScriptAmpSK (+) <i>dtsR2</i>	pPCR-ScriptAmpSK(+) mit 1,7 kb PCR-Fragment des Plasmides pUC18 <i>dtsR2</i> , entspricht dem orf des <i>dtsR2</i> Gens	diese Arbeit ¹⁾
pPCR-ScriptAmpSK (+) <i>dtsR3</i>	pPCR-ScriptAmpSK(+) mit 1,6 kb PCR-Fragment des Plasmides pUC18 <i>dtsR3</i> , entspricht dem orf des <i>dtsR3</i> Gens	diese Arbeit ¹⁾
pREP4	<i>oriV_{E.c.}</i> , <i>lacI</i> , Kan ^R	Qiagen, Hilden
pQE30	Expressionsvektor, <i>oriV_{E.c.}</i> , T5-Promotor, zweifacher Lac-Operator, His ₆ -Tag kodierende Sequenz, Amp ^R	Qiagen, Hilden
pQE30 <i>dtsR1</i>	pQE30 mit 1,7 kb <i>Bam</i> HI/ <i>KpnI</i> <i>dtsR1</i> -Insert aus pPCR-ScriptAmpSK(+) <i>dtsR1</i>	diese Arbeit
pQE30 <i>dtsR2</i>	pQE30 mit 1,7 kb <i>Bam</i> HI <i>dtsR2</i> -Insert aus pPCR-ScriptAmpSK(+) <i>dtsR2</i>	diese Arbeit
pQE30 <i>dtsR3</i>	pQE30 mit 1,6 kb <i>SphI</i> <i>dtsR3</i> -Insert aus pPCR-ScriptAmpSK(+) <i>dtsR3</i>	diese Arbeit
pEC7	<i>C. glutamicum</i> / <i>E. coli</i> shuttle Vektor, Cam ^R , <i>oriV_{E.c.}</i> , <i>oriV_{C.g.}</i> , aus pEC5, singuläre <i>Bam</i> HI-Schnittstelle, <i>trp</i> -Terminator in <i>XhoI</i> integriert	Eikmanns <i>et al.</i> , 1991b

Tab. 2(ff): Plasmide, ihre Marker und ihre Eigenschaften

Plasmid	Marker / Eigenschaft	Referenz
pEC7 <i>ftsR1</i>	pEC7 mit 1,9 kb <i>Bam</i> HI/ <i>Kpn</i> I <i>ftsR1</i> -Insert aus pUC18 <i>ftsR1</i>	diese Arbeit
pEC7 <i>ftsR2</i>	pEC7 mit 1,8 kb <i>Bsg</i> I/ <i>Bam</i> HI <i>ftsR2</i> -Insert aus pUC18 <i>ftsR2</i>	diese Arbeit
pZ1	<i>C. glutamicum</i> / <i>E. coli</i> shuttle Vektor, Kan ^R , <i>oriV_{E.c.}</i> , <i>oriV_{C.g.}</i>	Menkel <i>et al.</i> , 1989
pZ1 <i>accBC</i>	pZ1 mit 2,3 kb <i>Pvu</i> II/ <i>Nae</i> I <i>accBC</i> -Insert aus pUC19 <i>accBCaccDA</i>	diese Arbeit

Die Restriktionskarten der in dieser Arbeit konstruierten Plasmide sind in Anhang 2. aufgeführt. ¹⁾ Sequenzierte Plasmide.

2. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

2.1 Nährmedien

Nährmedien für *Escherichia coli*

Zur Kultivierung der *E. coli* Stämme wurde ausschließlich das LB Vollmedium nach Sambrook *et al.*, 1989, verwendet. Auch die Stammhaltung erfolgte in LB Medium. Die Anzucht zur Erzeugung kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte in SOB Vollmedium (Hanahan, 1985).

Nährmedien für *Corynebacterium glutamicum*

Die Kultivierung von *C. glutamicum* Stämmen zur DNA-Isolierung erfolgte in LB Vollmedium. Zur Stammhaltung wurde das *C. glutamicum* spezifische CGIII Vollmedium (Menkel *et al.*, 1989) verwendet. Zur Bestimmung von Enzymaktivitäten und Isolierung von Proteinen wurden die Stämme ebenfalls in CGIII Medium angezogen. Die Anzucht zur Erzeugung kompetenter *C. glutamicum* Bakterien erfolgte in LBHIS Vollmedium (Liebl *et al.*, 1989). In allen Kultivierungen zur Quantifizierung der Aminosäureproduktion und zur Charakterisierung

fettsäureauxotropher Insertionsmutanten wurde das aminosäure- und fettsäurefreie Minimalmedium CGXII (Keilhauer *et al.*, 1993) mit 4 % Glukose (w/v) benutzt. Durch den Zusatz der Puffersubstanz 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS) zeichnet sich dieses Medium durch sehr gute Puffereigenschaften im pH-Bereich um 7,2 aus.

Medienzusätze

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

Kanamycin	50 µg/mL
Carbenicillin	50 µg/mL.

Die Selektion auf rekombinante *C. glutamicum* Stämme erfolgte durch Zusatz von:

Kanamycin / Carbenicillin	50 µg/mL	(frei replizierbarer Vektor)
	25 µg/mL	(Integration eines Vektors in das Genom)
	15 µg/mL	(nach Elektroporation und Konjugation)
Chloramphenicol	15 µg/mL	(frei replizierbarer Vektor)
	6 µg/mL	(nach Elektroporation).

Zudem wurde Nalidixinsäure in einer Endkonzentration von 50 µg/mL nach Konjugationsversuchen eingesetzt, um das Wachstum der *E. coli* Donorzellen zu verhindern.

Zur Kultivierung von fettsäureauxotrophen Stämmen enthielten die Medien Fettsäuren (Natriumoleat / Palmitinsäure; Merck, Darmstadt) oder Fettsäurederivate (Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80; Merck, Darmstadt) in den folgenden Endkonzentrationen:

Ölsäure	C18:1	20 µM	(100 %; C18:1)
Palmitinsäure	C16:0	20 µM	(100 %; C16:0)
Tween 20	C12:0	30 mg/L	(50 % Laurinsäure; C12:0)
Tween 40	C16:0	30 mg/L	(90 % Palmitinsäure; C16:0)
Tween 60	C18:0	30 mg/L	(50 % Stearinsäure; C18:0)
Tween 80	C18:1	30 mg/L	(70 % Ölsäure; C18:1)
Butterhydrolysat		300 mg/L	(undefinierte Zusammensetzung).

Das Butterhydrolysat 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. Zum Lösen der Palmitinsäure und des Butterhydrolysates wurde den Medien 400 mg/L des

Emulgators Brij58 (Sigma, Deisenhofen) zugegeben. Zur Herstellung von Agarplatten wurden die Medien mit 1,5 % (w/v) Agar (Difco Laboratories, Detroit, USA) versetzt.

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

Kulturen von *E. coli* und *C. glutamicum*, die zur Aufnahme von Wachstumskurven, für Enzymtests oder Plasmidpräparationen angezogen wurden, wurden in 500 mL Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen inkubiert. Sie enthielten für Vorkulturen 100 mL Vollmedium und für Hauptkulturen 60 mL Voll- oder Minimalmedium. Kulturen, die zu proteinchemischen Untersuchungen angezogen wurden, wurden in 2.000 mL Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen inkubiert. Sie enthielten 800 mL Vollmedium. 5 mL Kulturen wurden in 20 mL Reagenzgläsern angezogen. Die Schüttlergeschwindigkeit für 2.000 mL Erlenmeyerkolben betrug 100 Upm, für 500 mL Erlenmeyerkolben 130 Upm und für Reagenzgläser 180 Upm. *E. coli* Kulturen wurden bei 37 °C, *C. glutamicum* Kulturen bei 30 °C inkubiert. Zur Aufnahme von Wachstumskurven, Quantifizierung der Aminosäureproduktion oder Bestimmung von Enzymaktivitäten wurden die Bakterienzellen auf Komplexmedium vorkultiviert und daraus eine Hauptkultur mit Voll- oder Minimalmedium beimpft. Dazu wurden berechnete Volumina der Vorkulturen steril entnommen, die Zellen durch Zentrifugation für 8 min bei 4 °C mit 4.000xg sedimentiert, mit steriler 0,9 %iger (w/v) NaCl-Lösung gewaschen und in die Hauptkultur überführt. Das berechnete Volumen aus der Vorkultur entsprach einer anfänglichen Zelldichte von $OD_{600} = 0,5$ in der Hauptkultur. Grundsätzlich wurden Kulturen, die zur Bestimmung von Enzymaktivitäten, zur Reinigung oder zur Trennung von Proteinen angesetzt wurden, bei einer optischen Zelldichte von $OD_{600} = 9,5 - 11$ geerntet.

Dauerkulturen zur Stammhaltung wurden angelegt, indem 60 % (v/v) einer unter optimalen Bedingungen angezogenen Kultur mit 40 % (v/v) Glycerin gemischt und Aliquots bei -20 °C und -70 °C gelagert wurden. Bei Bedarf wurden diese Zellen auf Agarnährböden ausgestrichen, unter den erfordernten Bedingungen für den jeweiligen Stamm inkubiert und bei 4 °C nicht länger als zwei Wochen aufbewahrt.

3. Molekulargenetische Methoden

3.1 Transformation von *Escherichia coli* und *Corynebacterium glutamicum*

Transformation von *Escherichia coli*

Die Transformation von chemisch, rubidiumchlorid-kompetenten *E. coli* Zellen (Hanahan, 1983) erfolgte mittels Hitzeschock in modifizierter Form nach Hanahan (1985). Die Präparation der Zellen sowie die Durchführung der Transformation von *E. coli* durch Elektroporation erfolgte nach Dower *et al.* (1988). Eine Alternative zu diesen Transformationsmethoden, für die die kompetenten Zellen langwierig erzeugt werden müssen, bietet eine Methode von Chung *et al.* (1989). Danach wurden die Bakterienzellen über Nacht angezogen und die Kompetenz durch eine kurze Behandlung mit Dimethylsulfoxid und Polyethylenglykol erzeugt. Die erhaltenen Zellen wurden durch Hitzeschock transformiert.

Transformation von *Corynebacterium glutamicum*

Die Transformation von *C. glutamicum* erfolgte durch Elektroporation (Dower *et al.*, 1988, Dunican und Shirvnan, 1989, Wolf *et al.*, 1989) bzw. durch Elektroporation mit anschließendem Hitzeschock nach einer neuen Methode van der Rest *et al.* (1999), durch die eine 100fach höhere Transformationsrate erreicht wird. Beide Methoden nutzen ein Medium mit Wachstumsinhibitoren nach Haynes und Britz (1989; 1990) in modifizierter Form: LB Vollmedium mit 4 mg/mL Isonicotinsäurehydrazid, 2,5 % (w/v) Glycin und 0,1 % (v/v) Tween 80. Nach Dower *et al.* wurde die Hauptkultur über Nacht bei 30°C inkubiert und bei einer Zelldichte von $OD_{600} = 0,5$ bei 4 °C durch Zentrifugation (4.000xg) geerntet. Die Zellen wurden viermal mit eiskaltem 10 %igem Glycerin (v/v) gewaschen, in 0,5 mL eiskaltem 10 %igem Glycerin (v/v) resuspendiert und in 100 µL Aliquots bei -70 °C gelagert. Zur Transformation der Zellen wurde ein 100 µL Aliquot mit der zu transformierenden DNA gemischt und in eine Elektroporationsküvette (Typ 16 S 2086, Biorad, München) überführt. Die Elektroporation wurde bei einer Spannung von 2,5 kV, einem Widerstand von 200 Ω und einer Kondensatorkapazität von 25 µF durchgeführt (BIORAD GENE PULSERTM, Biorad, München). Nach Beendigung des elektrischen Pulses wurde die Zellsuspension in 1 mL BHIS-Medium (BHI Komplexmedium mit 0,5 M Sorbitol) aufgenommen, in ein 1,5 mL Eppendorfreaktionsgefäß überführt und für 60 min bei 30 °C unter Schütteln regeneriert. Die Zellsuspension wurde dann auf antibiotikahaltigen und gegebenenfalls fettsäurehaltigen (0,0006 % der reinen Fettsäuren Natriumoleat (v/v) und Palmitinsäure (w/v) sowie 0,003 % Tween 80 (v/v) oder 0,03 % Butterhydrolysat (w/v) und 0,04 % Emulgator Brij58 (w/v)) Agarnährböden (LBHIS-Medium) ausplattiert. Nach van der Rest *et al.* wurde die Hauptkultur

für 28 h bei 18 °C inkubiert und nach Erreichen einer Zelldichte von $OD_{600} = 1,0$ entsprechend der vorstehend beschriebenen Methode geerntet, gewaschen und gelagert. Die Elektroporation wurde bei einer Spannung von 2,5 kV, einem erhöhten Widerstand von 600Ω und einer Kondensatorkapazität von 25 μF durchgeführt. Die Zellsuspension wurde direkt nach Aufnahme in 1 mL BHIS-Medium einem Hitzeschock für 6 min bei 46 °C unterzogen und die Zellen wie bereits beschrieben regeneriert und ausplattiert.

3.2 Konjugativer Plasmidtransfer von *E. coli* nach *C. glutamicum*

Der Transfer von mobilisierbaren Plasmiden vom Donorstamm *E. coli* S17-1 zum Rezipientenstamm *C. glutamicum* durch Konjugation wurde nach einer Methode von Schäfer *et al.* (1990) durchgeführt. Dazu wurde eine 20 mL LB Hauptkultur mit 1 mL einer LB Vorkultur des Donors beimpft (100 mL Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen), bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0,8 - 1,1$ inkubiert und auf Eis gestellt. Der Rezipient wurde in einer 100 mL LB Übernachtskultur bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600} = 5 - 8$ inkubiert, 3 mL der Kultur pro Konjugationsansatz in ein Reagenzglas überführt und einem Hitzeschock für 9 min bei 48,5 °C unterzogen. Für die Konjugation wurde 1 mL Donorkultur mit 3 mL Rezipientenkultur im Reagenzglas gemischt und die Zelldichte durch Zentrifugation und Abnahme des Überstandes maximiert. Dann wurde ein steriler Nitrozellulosefilter (Typ HAWP, Porengröße 0,45 μm , Millipore, Eschborn) auf eine LB Agarplatte gelegt und die Zellsuspension auf diesen übertragen. Um die Konjugation zu ermöglichen, wurde der Filter 20 h bei 30 °C inkubiert. Die Zellsuspension wurde dann mit 600 μL LB Medium vom Filter geschwemmt und je 300 μL auf BHI-Agarplatten mit 50 $\mu g/mL$ Nalidixinsäure, 15 $\mu g/mL$ Kanamycin und Fettsäuren (0,0006 % der reinen Fettsäuren Natriumoleat (v/v) und Palmitinsäure (w/v) sowie 0,003 % Tween 80 (v/v) oder 0,03 % Butterhydrolysat (w/v) und 0,04 % Emulgator Brij58 (w/v)) ausplattiert. Die Platten wurden bei 30 °C inkubiert.

3.3 Plasmid-DNA Präparation aus *E. coli* und *C. glutamicum*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde die Methode der alkalischen Lyse, modifiziert nach Birnboim und Doly (1979), angewandt. Eine hohe Ausbeute hochreiner Plasmid-DNA, die zur Sequenzierung verwendet oder zur präparativen Restriktion eingesetzt werden sollte, wurde mit dem *Midi Plasmid Purification Kit* erhalten (Qiagen, Hilden). Die Präparation erfolgte hier nach der Vorschrift des Herstellers. Plasmid-DNA aus

C. glutamicum wurde nach einem modifizierten Protokoll zur alkalischen Lyse von *E. coli* isoliert (Schwarzer und Pühler, 1991).

3.4 Restriktion, Modifikation und Ligation von DNA

Die Techniken zur Restriktion, Präzipitation, Phenol-Extraktion, Klenow- und alkalischen Phosphatasebehandlung erfolgten nach Sambrook *et al.* (1989). Für analytische Restriktionsansätze wurde die DNA 1 h mit 2 U Restriktionsenzym pro µg DNA inkubiert, präparative Restriktionen wurden für mindestens 2,5 h mit 6 U Restriktionsenzym pro µg DNA inkubiert. In Abhängigkeit von der DNA-Fragmentgröße erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung in 0,8 - 2,0 %igen Agarosegelen (Sambrook *et al.*, 1989). Für die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der *NucleoSpin Extract 2 in 1* Kit (Macharey & Nagel, Düren) genutzt. Zur Modifikation überhängender 5'-Enden wurden diese mittels Klenow-Polymerase unter Zugabe von Desoxynukleotiden zu glatten Enden aufgefüllt oder überhängende 3'-Enden mit demgleichen Enzym zu glatten Enden abgebaut (Sambrook *et al.*, 1989). Linearisierte Vektor-DNA wurde mit Phosphatase behandelt, um den Phosphatrest am 5'-Ende abzuspalten und somit eine Rezirkularisierung in einer Ligation zu verhindern. Ligationen wurden entweder mit dem *Rapid Ligation Kit* (Roche Diagnostic, Mannheim) für 5 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C mit T4-DNA-Ligase durchgeführt. Zur Aufreinigung und Ligation von PCR-Fragmenten wurde der *SureClone Ligation Kit* (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) oder der *PCR-Script™ Amp Cloning Kit* (Stratagene, Heidelberg) verwendet.

3.5 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR), eine Technik zur exponentiellen Vermehrung von DNA *in vitro* (Saiki *et al.*, 1988; Tindall und Kunkel, 1988), wurde zur Vervielfältigung definierter Abschnitte der chromosomalen DNA und zur analytischen Überprüfung von Insertionsmutanten genutzt. Dabei wurden synthetische Oligonukleotide als Primer eingesetzt, die den zu amplifizierenden chromosomalen DNA Bereich flankierten. Als Matrize zur Amplifikation von Genen, die nachfolgend charakterisiert werden sollten, wurde chromosomale DNA von *C. glutamicum* 13032 eingesetzt. Zum Nachweis einer Insertionsmutation, die die Untersuchung von mehreren Kolonien parallel erforderte, wurde die chromosomale DNA zugänglich gemacht, indem die Bakterienkolonien in je 100 µL sterilem Wasser für 10 min bei 95 °C aufgeschlossen wurden. Die Durchführung der PCR erfolgte mit Hilfe eines

Thermocyclers der Firma Biozym Diagnostik (Oldendorf). Die Denaturierung der DNA wurde bei 94 °C durchgeführt. Die Anlagerungstemperatur der verwendeten Primer (siehe Anhang 3.) wurde in Abhängigkeit ihrer Basenzusammensetzung nach Sambrook *et al.*, (1989) berechnet: Pro A- und T- Basenpaarung mit der Matrizen-DNA wurden 2 °C und pro C- und G-Basenpaarung 4 °C addiert und von der Gesamtsumme 4 °C subtrahiert. Um das Auftreten von unspezifischen Banden zu vermeiden, wurden sie vorzugsweise so ausgewählt, dass sie eine Anlagerungstemperatur > 60 °C besaßen. Die Polymerisation der DNA erfolgte in analytischen Ansätzen bei 72 °C mit der *Taq*-Polymerase (Qiagen, Hilden) oder zur Vervielfältigung von fehlerfreien Gensequenzen bei 68 °C mit dem *Pwo* / *Taq*-Polymerase Gemisch des *ExpandTM High Fidelity PCR System* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), das die *Pwo*-Polymerase mit 3'-5' Exonukleaseaktivität zur Fehlerkorrektur nutzt (Barnes, 1994). Generell wurden 30 Zyklen mit der *Taq*-Polymerase und 21 Zyklen mit dem *Pwo* / *Taq*-Polymerasegemisch durchgeführt. 5 µL von jedem Ansatz wurden nach Beendigung der Reaktion entnommen und durch Agarosegelelektrophorese analysiert.

3.6 DNA-Sequenzierung und computergestützte Sequenzanalyse

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten mit corynebakteriellen Gensequenzen, die in dieser Arbeit untersucht und charakterisiert wurden, erfolgten doppelsträngig nach der Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* (1977). Die Sequenzierung wurde mit den in Anhang 3. aufgeführten Primern von der Firma 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 Restriktionsschnittstellen und offene Leseraster identifiziert wurden. Zudem wurden mit dem Programm Plasmidkarten (siehe Anhang 2.) erstellt und offene Leseraster translatiert. Die abgeleitete Aminosäuresequenz wurde mit Hilfe des Programms *Protean* (Programmpaket Lasergene, Biocomputing Software for Windows, DNASTAR, Madison, USA) analysiert, durch das die Aminosäurezusammensetzung eines Proteins, dessen molare Masse, der pI-Wert, die antigene Wirksamkeit (James und Wolf, 1988) und Oberflächenwahrscheinlichkeit von Proteinsequenzabschnitten (Emini *et al.*, 1985) bestimmt wurde. Datenbankrecherchen, zur Ermittlung von DNA- und Proteinsequenzen mit Ähnlichkeiten zu den in dieser Arbeit untersuchten Sequenzen, wurden am *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, Washington, USA) mit den Programmen *BLASTN*, *BLASTX* und *BLASTP* (Altschul *et al.*, 1997) durchgeführt. Der Sequenzvergleich von Proteinen erfolgte mit dem *Multiple Sequence Alignment* Programm ClustalW 1.8 (Jeanmougin *et al.*, 1998). Zur Berechnung der theoretischen Massen tryptisch verdauter Proteine dieser Arbeit unter Berücksichtigung posttranslationaler Modifikationen oder Veränderungen durch die Aufarbeitung wurde der

ExPASy (Expert Protein Analysis System) Molecular Biology Server am Schweizerischen Institut für Bioinformatik (Genf, Schweiz) verwendet.

4. Quantifizierung von Aminosäuren und Coenzym A-Derivaten

4.1 Quantitative Bestimmung von Aminosäuren mittels *reversed phase* HPLC

Die quantitative Aminosäurebestimmung in Kulturüberständen erfolgte mittels *reversed phase* Chromatographie (Jones & Gilligan, 1983) in einer HPLC Serie 1100 der Firma Agilent Technologies (Böblingen). Dafür wurde einer Kultur eine Probe entnommen, die darin enthaltenen Bakterienzellen für 5 min mit 16.000xg pelletiert und der extrazelluläre Aminosäuregehalt im Überstand analysiert. Die Aminosäuren wurden mit *o*-Phthaldialdehyd in einer automatischen Vorsäulenderivatisierung zu fluoreszierenden, thiosubstituierten Isoindolen umgesetzt (Sternson *et al.*, 1984). Die Trennung erfolgte anschließend aufgrund der unterschiedlichen Hydrophobizität der Aminosäure-Derivate durch ein System bestehend aus einer Hypersil Vor- (4×40 mm, Hypersil ODS $5 \mu\text{m}$) und einer Hypersil Hauptsäule (4×120 mm, Hypersil ODS $5 \mu\text{m}$; CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe) bei 40°C , indem ein Gradient mit zunehmend unpolarer Phase (100 % Methanol) erzeugt wurde. Als polares Laufmittel diente 0,1 M Natriumacetat (pH 7,2). Die Fluoreszenz der derivatisierten Aminosäuren wurde mit einer Wellenlänge von 230 nm angeregt und bei einer Emissionswellenlänge von 450 nm detektiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit einer *HP ChemStation* (Agilent Technologies). Die Aminosäurekonzentration wurde durch Vergleich mit dem Aminosäurestandard berechnet.

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

Die quantitative Bestimmung von CoA und CoA-Derivaten wurde analog zu der in Abschnitt 4.1 beschriebenen Aminosäurequantifizierung mittels *reversed phase* HPLC (Jones & Gilligan, 1983) nach einer modifizierten Methode von Wendisch *et al.* (1997) sowie King und Reiss (1985) durchgeführt. Die CoA-Verbindungen wurden aufgrund ihrer unterschiedlichen Hydrophobizitäten auf einer polaren *reversed phase* Hypersil ODS-5 Säule (siehe Abschnitt

4.1) bei 40 °C getrennt und im UV-Bereich bei einer Wellenlänge von 254 nm durch einen Multiwellenlängendetektor (G1365A) der HP Serie 1100 detektiert. Zur Trennung von Malonyl-CoA bzw. Methylmalonyl-CoA von CoA, Acyl-CoA-Derivaten und adenosinhaltigen Metaboliten wurde folgender Gradient aus Natriumphosphatpuffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 5,0) und Acetonitril (100 %) erzeugt: 0 - 27 min linear zunehmender Gradient von 2 % - 26 % Acetonitril mit einer Flussrate von 0,3 mL/min, 27 - 28 min linear abnehmender Gradient auf 2 % Acetonitril mit einer Flussrate von 0,8 mL/min und 28 - 32 min konstantbleibend 2 % Acetonitril mit einer Flussrate von 0,8 mL/min. Als Standards wurden 0,1, 0,25, 0,5 und 1,0 mM Lösungen von CoA, Acetyl-, Malonyl-, Propionyl-, Methylmalonyl-, Succinyl-, Butyryl- und β -Methylcrotonyl-CoA in 0,2 M Natriumphosphatpuffer pH 3,0 einzeln oder in einem 0,2 mM Gemisch eingesetzt. Die Retentionszeit betrug für Malonyl-CoA 9,60 min, für Methylmalonyl-CoA 11,31 min, für Succinyl-CoA 11,48 min, für CoA 13,30 min, für Acetyl-CoA 14,43 min, für Propionyl-CoA 17,41 min, für Butyryl-CoA 21,14 min und für β -Methylcrotonyl-CoA 23,48 min. Die Abweichung von diesen Retentionszeiten betrug $\pm 0,15$ min.

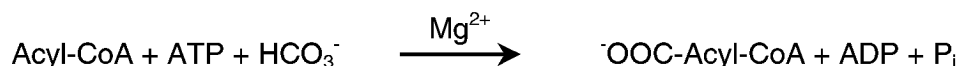
5. Messung von Enzymaktivitäten

5.1 Herstellung von Zellrohextrakten zur Messung von Enzymaktivitäten

Zur Herstellung von zellfreien Extrakten, die zur Messung von Acyl-CoA Carboxylase-aktivitäten eingesetzt wurden, wurden über Tag in CGIII Medium kultivierte *C. glutamicum* Stämme in der exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD₆₀₀ von 9,5 - 11 geerntet, zwei Mal mit einer 0,9 %igen NaCl Lösung gewaschen und in 5,0 mL pro 360 mL Kulturvolumen des im Enzymtest eingesetzten Reaktionspuffers (60 mM Tris-HCl pH7,2) resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde in ein 10 mL Glashörnchen gefüllt und mit Hilfe eines Ultraschalldesintegrators (*Branson Sonifier W-250*, Branson Sonic Power, Danbury, USA) für 6 min mit Ultraschallstufe 2,5 und 100 % Pulsmodus bei 4 °C aufgeschlossen. Durch Zentrifugation (25 min, 16.000xg, 4 °C) wurden Zelltrümmer und unaufgebrochene Zellen aus dem Aufschluss entfernt. Der Überstand wurde direkt zur Bestimmung der Enzymaktivität eingesetzt.

5.2 Bestimmung der spezifischen Acetyl- und Propionyl-CoA Enzymaktivitäten der Acyl-CoA Carboxylasen von *C. glutamicum*

Acyl-CoA Carboxylasen katalysieren die irreversible Carboxylierung von Acyl-CoA Derivaten zu α -Carboxyacetyl-CoA Derivaten in Abhängigkeit von ATP und HCO_3^- :



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

Reaktionsansatz:	100,0 μL Tris-HCl (600 mM, pH 7,2)
	100,0 μL KHCO_3 (650 mM)
	10,0 μL ATP (100 mM)
	150,0 μL MgCl_2 (10 mM)
	100,0 μL Substrat (CoA-Derivat, 20 mM)
	250,0 μL Rohextrakt* (in 60 mM Tris-HCl Puffer, pH 7,2)
	190,0 μL H_2O (bidestilliert)
	Σ 1000 μL .

(* ~ 3,5 - 4,5 mg Protein)

Die Reaktion im Testansatz wurde nach 1-minütiger Vorinkubation bei 30 °C durch Zugabe definierter Substratkonzentrationen gestartet. Nach einer Inkubationszeit von 10, 20, 30 und 40 Sekunden wurden dem Ansatz je 200 μL Volumen entnommen, die Reaktion in je 20 μL 30 %iger Perchlorsäure (v/v) abgestoppt und gefällte Proteine durch Zentrifugation sedimentiert (5 min, 16.000xg, 4°C). Je 100 μL des Überstandes wurden durch Übertragung in 25 μL einer 1 M Natriumcarbonat-Lösung auf pH 5,0 eingestellt. Die Proben wurden bis zur HPLC-Analyse zur Quantifizierung des entstandenen Produktes bei - 20 °C aufbewahrt. Enzymtests mit Proteinen aus durch Größenausschlusszentrifugation konzentrierter Gelfiltrationsfraktionen wurden in einem Volumen von 100 μL mit den vorstehend genannten Molaritäten durchgeführt. Jeder Ansatz wurde 5 min bei 30 °C inkubiert und durch den Zusatz von 2 μL 30 %iger Perchlorsäure gestoppt (Endproduktbestimmung). Die Proben wurden anschließend wie bereits beschrieben weiterbehandelt.

Enzymtests mit Proteinen, die durch Avidinaffinitätschromatographie isoliert und durch Größenausschlusszentrifugation konzentriert worden waren, wurden in einem Volumen von 500 μL mit den vorstehend angeführten Molaritäten durchgeführt. Die Reaktion wurde nach

1-minütiger Vorinkubation bei 30 °C durch Zugabe des Substrates gestartet. Nach einer Inkubationszeit von 0,5, 1, 2, 5 und 10 Minuten wurden dem Ansatz je 95 µL Volumen entnommen und die Reaktion in je 9,5 µL 30 %iger Perchlorsäure gestoppt. Die Proben wurden anschließend wie bereits beschrieben weiterbehandelt.

6. Proteinbiochemische Methoden

6.1 Herstellung von Zellrohextrakten zur Isolierung von Proteinen

Zur Aufreinigung von Proteinen und zur Bestimmung des Molekulargewichtes von Proteinkomplexen wurden zellfreie Extrakte des Stammes *C. glutamicum* 13032Δ*pyc* (Peters-Wendisch *et al.*, 1998) hergestellt, indem 1,6 L in CGIII Medium über Tag kultivierter Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD₆₀₀ von 9,5 - 11 geerntet wurden. Die Bakterienzellen wurden zwei Mal mit einer 0,9 %igen NaCl Lösung gewaschen und in 5,0 mL pro 360 mL Kulturvolumen 50 mM Natriumphosphat / 175 mM NaCl-Puffer pH 7,2 aufgenommen. Um den Abbau der Proteine während der Isolierung zu verhindern, wurden dem Puffer zwei Tabletten des Proteaseinhibitorgemisches *complete EDTA-free* (Roche Diagnostics, Mannheim) zugesetzt. Die Zellen wurden wie unter 5.1 beschrieben durch Ultraschall aufgeschlossen und die erhaltene Suspension in offene Ti50 Ultrazentrifugenröhrchen (Beckmann, München) überführt. Die Zentrifugation erfolgte in einer *Beckmann L8-70M* Ultrazentrifuge mit 190.000xg für 1,25 h bei 4 °C, um Zelltrümmer und Zellmembranen abzutrennen. Der Überstand wurde durch Ultrafiltration in *AMICON Centriprep YM-30* Konzentratoren (Millipore, Eschborn) mit einer Ausschlussgröße von 30 kDa für 3 - 3,5 h 10fach eingeengt. Analog wurde der Zellrohextrakt des Stammes *C. glutamicum* 13032Δ*pyc* pZ1*accBC* zur Isolierung des AccBC Proteins (siehe Anhang 6.) präpariert. Das Kulturvolumen betrug 1,0 L. Die Zentrifugationszeit in der Ultrazentrifuge betrug 1,0 h mit 100.000xg bei 4 °C. Der Überstand wurde direkt auf die Avidinaffinitätssäule (siehe 6.5) aufgetragen.

6.2 Proteinbestimmung und SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach einer modifizierten Methode von Bensadoun und Weinstein (1976). Es wurden verschiedene Verdünnungen eines Proteinextraktes mit einem Kupferreagenz versetzt, durch das Proteinkonzentrationen in geringen Mengen von 2,5 µg bis 12,5 µg nachgewiesen werden konnten. Der Nachweis beruhte auf einer Kupfer Farbreaktion, bei der die Reduktion des oxidierten, bläulichen Kupferkomplexes (Cu^{2+}) zum violetten Kupferkomplex (Cu^+) bei einer Wellenlänge von 750 nm photometrisch bestimmt wurde. Als Standard wurden 2,5 µg, 5 µg, 7,5 µg, 10 µg und 12,5 µg BSA eingesetzt.

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Coomassie-Färbung

Die Trennung von Proteinen in Abhängigkeit ihres Molekulargewichtes unter denaturierenden Bedingungen erfolgte elektrophoretisch in diskontinuierlichen, 10 %igen Bis-Tris Polyacrylamidgelen (Fling und Gregerson, 1986) des *NuPAGE Systems* der Firma NOVEX Elektrophoresis (Frankfurt). Die Elektrophorese wurde im MOPS-SDS Laufpuffer (50 mM MOPS, 50 mM Tris, 1 % SDS, 1 mM EDTA; pH7,7) für 1 - 2 h mit 30 - 60 mA/Gel in einer *XCell II™ Mini-Cell* (NOVEX Elektrophoresis, Frankfurt) durchgeführt. Die Proteine wurden in einer Serva Blau Färbelösung (0,05 % Coomassie Brilliant Blue R-250 (w/v), 25 % Isopropanol (v/v) und 10 % Essigsäure (v/v)) für 1,5 h oder über Nacht gefärbt und in einer Lösung aus 10 % Essigsäure und 30 % Ethanol entfärbt. Zur Größenabschätzung der Proteine wurden die Molekulargewichtstandards *Mark 12™* (16 -250 kDa) und der vorgefärbte Standard *See Blue™* (14 - 200 kDa) der Firma NOVEX Elektrophoresis genutzt. Gele, die nachfolgend zur Western Blot Analyse eingesetzt wurden, wurden nicht gefärbt.

6.3 Synthese spezifischer Peptidantikörper und Western Blot Analysen zum Nachweis einzelner Untereinheiten von Acyl- CoA Carboxylasen

Um die Acyl-CoA Carboxylasen aus *C. glutamicum* in Western Blot Analysen zu charakterisieren, wurden spezifische Peptidantikörper gegen die putativen Untereinheiten der Acyl-CoA Carboxylase AccDA, DtsR1 und DtsR3 synthetisiert. Dafür wurden die abgeleiteten Proteinsequenzen auf Strukturelemente mit antigener Wirkung untersucht (James und Wolf,

1988; Emini *et al.*, 1985) und von diesen aus 10 - 20 Aminosäuren bestehenden Sequenzabschnitten synthetische Peptide (siehe Anhang 4.) hergestellt. Jedes Peptid wurden an BSA gekoppelt und in ein Kaninchen injiziert, um Antikörper zu erhalten. Die aufgearbeiteten Blutseren der Kaninchen enthielten polyklonale Peptidantikörper und Antikörper gegen das BSA-Protein. Die Synthese wurde von NEOSYSTEM Laboratoire (Strasbourg) durchgeführt. Zum Nachweis der biotinylierten Untereinheit AccBC wurde ein *Streptavidin-AP Konjugat* (Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet. Streptavidin bindet spezifisch und mit sehr hoher Affinität ($10^{-15} \text{ mol}^{-1}$) Biotin oder Biotinverbindungen.

Zur Durchführung von Western Blots wurden in einem SDS-Gel elektrophoretisch getrennte Proteine unter Verwendung einer *SemiDry* Blotapparatur (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) auf eine *Immobilon-P* Membran (PVDF, 0,45 μm Porengröße, Millipore, Eschborn) übertragen. Dazu wurde ein Transferpuffer bestehend aus 25 mM Tris, 200 mM Glycin und 10 % Methanol (v/v) eingesetzt. Die Transferzeit betrug 1,25 h bei einer Stromstärke von 0,8 mA/cm² Membranfläche. Die Abdeckung freier Membranflächen erfolgte für 1 h durch Inkubation mit 3 % BSA (w/v) in TBST-Puffer (0,5 M NaCl, 0,05 % Tween 20 (v/v) und 20 mM Tris-HCl pH 7,5). Die spezifische Markierung der biotinhaltigen Untereinheit bzw. der Carboxyltransferaseuntereinheiten wurde 1 h mit dem *Streptavidin-AP Konjugat* bzw. mit den primären Peptidantikörpern in TBST-Puffer durchgeführt. Das *Streptavidin-AP Konjugat* wurde 1:6.000 bis 1:10.000 verdünnt eingesetzt, der AccDA Antikörper 1:150, der DtsR1 Antikörper 1:10.000 und der DtsR3 Antikörper 1:2.000 verdünnt eingesetzt. Durch die an Streptavidin gekoppelte alkalische Phosphatase (AP) (Haneji und Koide, 1989), die den Umsatz des Substrates BCIP/NBT (0,15 mg/mL 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat, 0,3 mg/mL Nitroblau-Tetrazoliumchlorid, 0,1 M Tris, 5 mM Magnesiumchlorid in 10 mL H₂O bidestilliert) zu einem unlöslichen, violettblauen Farbstoff katalysiert (Blake *et al.*, 1984), wurden biotinylierte Proteine nachgewiesen. Der Nachweis der primären Antikörper (aus Kaninchen) erfolgte nach 1stündiger Inkubation mit dem sekundären Antikörper, einem gegen Kaninchen-IgG gerichteten AP-Antikörperkonjugat (1:15.000 verdünnt), in TBST-Puffer durch den Zusatz des Substrates BCIP/NBT. Die Farbreaktion wurde durch das Waschen der Membran in Wasser gestoppt.

6.4 Bestimmung der Größe von Proteinen durch Gelfiltrationschromatographie mittels FPLC

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes der nativen Acyl-CoA Carboxylasen wurde eine Gelfiltrationschromatographie mit einer *HiLoad® 26/60 Superdex 200 prep grade* Säule (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) durchgeführt. Die Säule wurde an ein *ÄKTA*

Explorer 100 FPLC System (Amersham Pharmacia Biotech) angeschlossen und mit Hilfe des *Molecular Weight Gel Filtration Kit* (Amersham Pharmacia Biotech) mit folgenden Standardproteinen nach den Angaben des Herstellers kalibriert: Ribonuklease A (13,7 kDa), Chymotrypsin A (25 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Albumin (67 kDa), Aldolase (158 kDa), Katalase (232 kDa), Ferritin (440 kDa) und Thyroglobulin (669 kDa). Bei allen Anwendungen wurde ein 50 mM Natriumphosphat / 175 mM Natriumchlorid-Puffer (pH 7,2) zur Equilibrierung und als Laufmittel eingesetzt. Zur Proteintrennung mittels FPLC wurden jeweils 2 mL eines konzentrierten Rohextraktes von *C. glutamicum* 13032 Δ pyc (siehe Abschnitt 6.1) eingesetzt und isokratisch mit einer Flussgeschwindigkeit von 1,5 mL/min über die Superdex 200 Säule aufgetrennt. Die Proteine wurden in 3 bis 4 mL Fraktionen gesammelt. Die Bestimmung von Fraktionen mit Acyl-CoA Carboxylaseenzymen erfolgte anschließend in Western Blot Analysen zum Nachweis der biotinhaltigen Untereinheit (siehe Abschnitt 6.3) und in Enzymaktivitätsmessungen (siehe Abschnitt 5.2). Das Molekulargewicht wurde dann durch Vergleich des Elutionsvolumens der Acyl-CoA Carboxylasen mit denen der Standardproteine berechnet. Die erhaltenen Chromatogramme wurden im *UNICORN*[®] Evaluation Programm (Version 3.0) bearbeitet und ausgewertet.

6.5 Isolierung biotinhaltiger Enzymkomplexe durch Avidinaffinitätschromatographie mittels FPLC

Biotinylierte Proteine aus *C. glutamicum* 13032 Δ pyc oder *C. glutamicum* 13032 Δ pyc pZ1accBC wurden durch *ÄKTA Explorer 100* FPLC Avidinaffinitätschromatographie (Cronan Jr., 1990) mit dem *SoftLink*TM *Soft Release Avidin Resin* (Promega, Mannheim), einem Harz mit kovalent gebundenem monomerem Avidin, isoliert. Mit diesem Material wurde eine Amersham Pharmacia Biotech XK-Säule (5 mL) gepackt und mit dem FPLC-System verbunden. Vor der ersten Anwendung wurden irreversible Bindungsstellen des Avidinsäulenmaterials mit freiem Biotin (5 mM) abgesättigt, reversibel bindendes Biotin durch Denaturierung mit 10 %iger Essigsäure (v/v) entfernt und das Avidin in 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,8) renaturiert. Entsprechend dem Probenpuffer erfolgte die Equilibrierung der Säule mit einem 50 mM Natriumphosphat / 175 mM Natriumchlorid-Puffer (pH 7,2). Die Auftragung und Elution der Proteine erfolgte mit einer Flussrate von 0,5 mL/min. Die Elution wurde durch den Zusatz von Biotin in einer Endkonzentration von 5 mM zum vorstehend genannten Natriumphosphat / Natriumchlorid-Puffer in einem Einstufengradienten erzielt. Es wurden 1 mL Fraktionen gesammelt. Das Säulenmaterial wurde nach den Angaben des Herstellers regeneriert.

6.6 Konstruktion der Expressionsvektoren pQE30*dtsR1*, -*dtsR2*, -*dtsR3* und Isolierung des Histidin-DtsR1 Fusionsproteins mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie

Die Isolierung von DtsR1 erfolgte als Fusionsprotein mit spezifisch angehängter Peptidsequenz aus sechs Histidinresten (His₆) mittels *Nickel-Nitriltriessigsäure* (Ni-NTA) Agarose Säulenaffinitätschromatographie. Dazu wurde das System der Firma Qiagen (Hilden) genutzt, das auf dem Prinzip der immobilisierten Metallaffinitätschromatographie (Porath *et al.*, 1975) beruht. Das über Nitriltriessigsäure an ein *Sepharose*®CL-6B (Qiagen, Hilden) gebundene Nickelkation dient als Chelatbildner mit zwei freien Ligandenbindungsstellen. Durch Komplexierung der Histidinimidazolringe können pro Nickelkation zwei Fusionsproteine gebunden und dadurch isoliert werden (Janknecht *et al.*, 1991; Hochuli, 1989). Die Genexpression der in diesem System verwendeten pQE30 Klonierungsvektoren unterliegt der Kontrolle von zwei *lac*-Operatorsequenzen. Im verwendeten Stamm *E. coli* M15 wird die Expression des Gens dadurch verhindert, dass das den LacI-Repressor kodierende pREP4 Plasmid vorliegt. Nach Induktion der Expression mit IPTG werden sehr hohe Transkriptionsraten durch den starken T5 Promotor erzielt.

Zur Konstruktion des Vektors, kodierend für das rekombinante Protein, wurde der Expressionsvektor pQE30 verwendet, der zur N-terminalen Fusion von His₆ mit dem Protein führt. Dazu wurde das *dtsR1* Gen in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) mit dem Primerpaar CgdsR1HisF₂₂ - CgdsR1HisR₂₃ (siehe Anhang 3.) und dem Plasmid pUC18*dtsR1* als Matrize amplifiziert. Das erhaltene, glattendige 1.652 bp Sequenzfragment wurde in die glatten Enden des *SrfI* linearisierten Plasmides pPCR-ScriptAmpSK(+) (Stratagene, Heidelberg) kloniert. Mit Hilfe der in der PCR angefügten Restriktionschnittstellen *Bam*HI und *Kpn*I wurde dann genau der für DtsR1 kodierende Sequenzbereich ausgeschnitten und *in frame* zur pQE30-Vektorsequenz, kodierend für die sechs Histidinreste, ligiert (siehe Anhang 2.). Auch *dtsR2* und *dtsR3* wurden in PCR-Reaktionen mit den Primerpaaren CgdsR2HisF₃₂ - CgdsR2HisR₃₃ und CgdsR3 HisF₃₄ - CgdsR3HisR₃₅ (siehe Anhang 3.) sowie pUC18*dtsR2* und pUC18*dtsR3* als Matrizen-DNA amplifiziert. Nach beschriebener Zwischenklonierung im pPCR-ScriptAmpSK(+) Vektor wurde das *dtsR2* Gen als *Bam*HI-Fragment und das *dtsR3* Gen als *Sph*I-Fragment in die komplementären Schnittstellen des pQE30-Vektors *in frame* zur histidinkodierenden Sequenz ligiert (siehe Anhang 2.). Die Ligationsprodukte wurden in den *E. coli* Stamm M15 eingebracht. Der Nachweis der Expression von His₆DtsR1, His₆DtsR2 und His₆DtsR3 erfolgte mittels Kolonieblotanalyse nach den Angaben des QIAexpressionist 01/2000 (Qiagen, Hilden). Dazu wurde das *Ni-NTA AP Konjugat* (Qiagen, Hilden) verwendet. Um Sequenzfehler durch die PCR-Reaktion auszuschließen, wurde die Plasmid-DNA positiver Klone präpariert und einzelsträngig sequenziert.

Die native Aufreinigung von His₆DtsR1 erfolgte ebenfalls in Anlehnung an den *QIAexpressionist* 01/2000. Dazu wurde zunächst eine 50 mL LB Vollmedium Kultur über Nacht mit 75 µg/mL Carbenicillin und 25 µg/mL Kanamycin bei 37 °C inkubiert. Mit 5 mL dieser Vorkultur wurden zwei 100 mL LB Hauptkulturen mit 2 % Glukose (w/v) und Antibiotika angeimpft. Bei einer OD₆₀₀ von etwa 0,6 wurde die Genexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert. Nach 5 h wurden die Zellen durch Zentrifugation mit 4.000xg für 12 min bei 4 °C geerntet. 1 g Zellpellet wurde in 5 mL Lysispuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0) resuspendiert und für 30 min mit Lysozym (1mg/mL Endkonzentration) bei 4 °C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde in ein 10 mL Glashörnchen gefüllt und mit Hilfe eines Ultraschalldesintegrators (*Branson Sonifier W-250*, Branson Sonic Power, Danbury, USA) für 6 min mit Ultraschallstufe 2,5 und 10 % Pulsmodus bei 4 °C aufgeschlossen. Durch Zentrifugation (25 min, 16.000xg, 4 °C) wurden Zelltrümmer und unaufgebrochene Zellen aus dem Aufschluss entfernt und der Überstand auf eine 1 mL Ni-NTA Agarosesäule aufgetragen. Die Säule wurde mit 12 mL Waschpuffer gewaschen (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0) und das isolierte His₆DtsR1 Protein mit Elutionspuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0) in fünf Fraktionen zu je 0,5 mL eluiert. Die Isolation wurde durch Auftragung von Proben der einzelnen Reinigungsschritte auf ein 10 %iges *NuPAGE* Bis-Tris Polyacrylamidgel dokumentiert (siehe Anhang 5.).

6.7 Identifizierung von Proteinen mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie und Datenbankvergleich

Die Identifizierung mittels Avidinaffinitätschromatographie isolierter Proteine erfolgte mit Hilfe der MALDI-TOF Massenspektrometrie modifiziert nach Fountoulakis und Langen (1997) sowie Nouwens *et al.* (2000). Alle proteinhaltigen Elutionsfraktionen der Avidinsäulenchromatographie wurden durch Ultrafiltration in *AMICON Centricon-30* Konzentratoren (Millipore, Eschborn) mit einer Ausschlussgröße von 30 kDa ~40fach angereichert und auf einem 10 %igen *NuPAGE* Bis-Tris Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach Coomassie-Färbung wurden die Proteine aus dem Gel ausgeschnitten, mit 30 % Acetonitril (v/v) in 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat entfärbt und in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Gelstücke wurden in 3 mM Tris-HCl (pH 8,8) rehydratisiert und 11 h bei 22 °C mit Trypsin (12 ng/µL Endkonzentration) inkubiert. Die Elution der Peptide aus dem Gel erfolgte durch Zusatz von 30 % Acetonitril (v/v), 0,1 % Trifluoressigsäure (v/v). 0,5 µL jeder Probe wurde mit 0,5 µL Matrixlösung (20 mg α-Zyan-4-hydroxyzimtsäure in 1 mL 50 % Acetonitril (v/v), 0,1 % Trifluoressigsäure (v/v)) (Vorm *et al.*, 1994) auf eine Trägerplatte aufgebracht und mit einem *PerSeptive Biosystems Voyager-DETM STR* Massenspektrometer (PerSeptive

Biosystems, Langen) analysiert. Zur Massenkalisierung wurde der *SequazymeTM Peptide Mass Standard Kit* (PerSeptive Biosystems, Langen) verwendet. Basislinienkorrektur, Rauschunterdrückung und Isotopierung erhaltener Chromatogramme wurde mit dem *Data ExplorerTM* Programm (Version 3.5.0.0) durchgeführt. Monoisotopische Peptidmassen wurden mit den theoretischen Massen der durch das corynebakterielle Genomprojekt der Degussa AG zugänglichen Datenbank tryptisch geschnittener Proteine verglichen und ausgewertet. Dafür wurde das Programm *Gpmaw* (Version 4.0) verwendet.

III. Ergebnisse

1. Isolierung und Charakterisierung von Genen für putative Untereinheiten von Acyl-CoA Carboxylasen in *C. glutamicum*

Es war bekannt, dass die Gene *accBC* (Jäger *et al.*, 1996) und *dtsR1* (Kimura *et al.*, 1996), die vermutlich Untereinheiten von Acyl-CoA Carboxylasen kodieren, einen Einfluss auf die Aminosäureproduktion von *C. glutamicum* ausüben können. Um Hinweise auf den Zusammenhang dieser an der Lipidsynthese beteiligten Enzyme mit dem Aminosäureexport zu erhalten, sollte die noch unbekannte enzymatische Funktion der Genprodukte aufgeklärt werden. Dazu wurden zunächst Gene, die für Untereinheiten dieses Enzyms kodieren könnten, isoliert. Da die Gene funktionelle und strukturelle Gemeinsamkeiten aufweisen, sind die wesentlichen Eigenschaften zusammenfassend dargestellt.

1.1 Isolierung und Sequenzanalyse des Gens für eine mögliche Carboxyltransferase der Acetyl-CoA Carboxylase (*accDA*)

Die Sequenzierung flankierender chromosomaler DNA Bereiche des *gltA* Gens (Citrat-synthase) aus *C. glutamicum* ATCC13032 (Eikmanns *et al.*, 1994) ergab einen 1.800 bp stromabwärts liegenden offenen Leserahmen, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz Identitäten zur β -Carboxyltransferaseuntereinheit der Acetyl-CoA Carboxylase von *E. coli* aufwies (unveröffentlicht). Um die Funktion dieses Genproduktes untersuchen zu können, wurde zuerst die vollständige Gensequenz mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) aus dem Genom von *C. glutamicum* ATCC13032 amplifiziert. Dazu wurde das Primerpaar CgaccDAF₅ - CgaccDAR₆ (siehe Anhang 3.) aus der durch das corynebakterielle Genomprojekt der Degussa AG zugänglichen chromosomalen Nukleotidsequenz ausgewählt und in eine PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA aus *C. glutamicum* ATCC13032 als Matrize und einer Anlagerungstemperatur von 58 °C eingesetzt. Mit diesem Ansatz wurde ein spezifisches Sequenzfragment von 2.122 bp amplifiziert, das in die *Sma*I-Schnittstelle des Vektors pUC18 kloniert (siehe Anhang 2.) und anschliessend doppelsträngig sequenziert wurde. Eine Analyse der Nukleotidsequenz ergab, dass ein offener Leserahmen von 1.473 bp (Nukleotid 508 - 1.980) beginnend mit einem GTG Startcodon (siehe Anhang 1.) vorlag. Die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz (siehe Anhang 1.) von 491 Aminosäuren

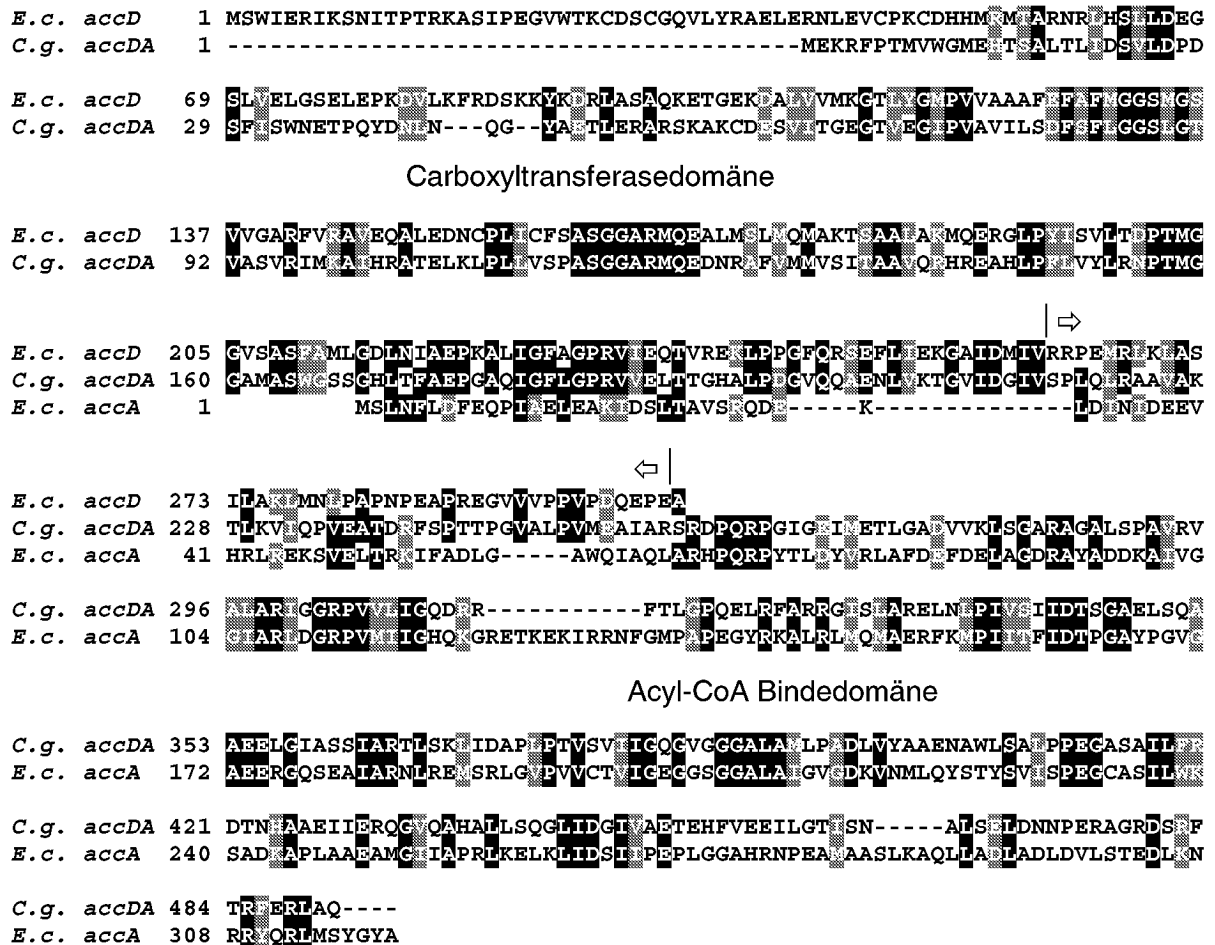


Abb. 3: Homologievergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz von *C. glutamicum* *accDA* (*C.g. accDA*) mit den α - und β -Carboxyltransferasesequenzen aus *Escherichia coli* (*E.c. accA* bzw. *E.c. accD*) unter Verwendung des Multiple Sequence Alignment Programms ClustalW 1.8 (Jeanmourgan *et al.*, 1998). Identische Aminosäuren sind schwarz, ähnliche Aminosäuren grau hinterlegt. Der Domänenübergang zwischen Carboxyltransferase- und Acetyl-CoA Bindedomäne ist durch die Markierung |⇒ eingegrenzt.

und einem kalkulierten Molekulargewicht von 52.207 wurde mit den Sequenzen der Protein-Datenbanken verglichen. Es wurden Sequenzidentitäten von 50 % (65 % ähnliche Aminosäuren) zur putativen Acetyl-CoA Carboxylase Carboxyltransferaseuntereinheit AccD3 von *Mycobacterium tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998a), von 34 % (47 % ähnliche Aminosäuren) zur putativen Acetyl Carboxylase ZuhF von *Streptomyces* sp. R1128 (Marti *et al.*, 2000) und von 30 % (41 % ähnliche Aminosäuren) zur putativen Acetyl-CoA Carboxylase Carboxyltransferaseuntereinheit PccB von *Streptomyces coelicolor* A3(2) (Redenbach *et al.*, 1996)

gefunden. Die Funktion der Genprodukte war jedoch nicht untersucht. Der Vergleich ergab aber auch, dass im carboxylterminalen Sequenzbereich des corynebakteriellen Proteins 33 % identische Aminosäuren (50 % ähnliche Aminosäuren) zur α -Untereinheit der Carboxyltransferase (AccA) von *E. coli* (Li & Cronan, 1992a) vorlagen, der aminoterminalen Sequenzabschnitt dagegen 35 % identische Aminosäuren (55 % ähnliche Aminosäuren) zur β -Untereinheit der Carboxyltransferase (AccD) von *E. coli* (Li *et al.*, 1992) aufwies (Abb. 3). Die Identitäten im aminoterminalen Sequenzbereich wurden überwiegend von Aminosäure 50 bis 216 zu AccD und im carboxylterminalen Sequenzbereich von Aminosäure 259 bis 451 zu AccA des *E. coli* Proteins gefunden. Offensichtlich handelt es sich bei dem abgeleiteten Protein von *C. glutamicum* also um ein Fusionsprotein aus Carboxyltransferase- und Acyl-CoA Bindedomäne einer Acetyl-CoA Carboxylase (Kimura *et al.*, 2000). Der dazwischen liegende Sequenzabschnitt mit geringeren Identitäten stellt den Domänenübergang dar. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das klonierte Gen aus *C. glutamicum* die Carboxyltransferaseuntereinheit einer Acyl-CoA Carboxylase kodiert. In Anlehnung an die *E. coli* Genbezeichnungen wurde dieses Gen *accDA* genannt.

1.2 Isolierung und Sequenzanalyse der Gene für mögliche Carboxyltransferasen von Acyl-CoA Carboxylasen (*dtsR1*, *dtsR2*, *dtsR3*)

Die Sequenz des möglicherweise für die Carboxyltransferase einer Acyl-CoA Carboxylase kodierenden Gens *dtsR1* (detergent sensitive rescuer) aus *C. glutamicum ssp. lactofermentum* war im Zusammenhang mit der bekannten detergenzinduzierten Glutamatausscheidung coryneformer Bakterien (Shiio *et al.*, 1962) veröffentlicht worden (Kimura *et al.*, 1996). Um die bislang unbekannte Funktion des Genproduktes untersuchen zu können, sollte das Gen nach Vervielfältigung in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) isoliert werden. Zur Amplifikation von *dtsR1* wurden aus der Genomsequenz von *C. glutamicum* zwei verschiedene *forward*- und drei verschiedene *reverse*-Primer ausgewählt. Dabei wurde festgestellt, dass 341 bp stromabwärts von *dtsR1* ein Gen mit 70 % ähnlicher Nukleotidsequenz (*dtsR2*) vorliegt (Abb. 4). Dieses Gen wurde daher ebenfalls isoliert (siehe unten). 110 bp stromaufwärts von *dtsR1* liegt zudem ein weiteres Gen mit Bezug zu Acyl-CoA Carboxylasen, *birA*, das vermutlich die Biotin-Protein-Ligase kodiert. Das homologe Enzym in *E. coli* katalysiert die kovalente Bindung von Biotin an die Apoform des Biotincarboxylcarrierproteins (Roberts *et al.*, 1999; Eisenberg *et al.*, 1982).

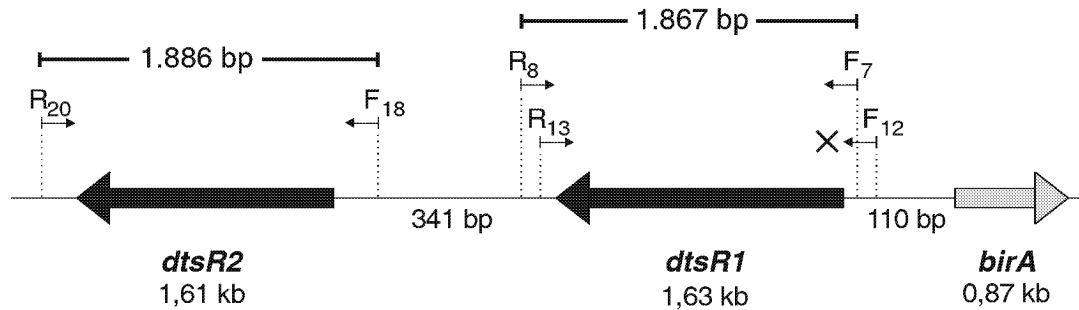


Abb. 4: Schematische Darstellung der Anordnung des *dtsR1* und *dtsR2* Gens im Genom von *C. glutamicum* und Anlagerungspositionen der Primer zur Amplifikation von *dtsR1* und *dtsR2*. *birA*: mögliche Biotin-Protein-Ligase; X: kein Fragment in der PCR; F₇, F₁₂, R₈, R₁₃, F₁₈, R₂₀: Primer (siehe Anhang 3.)

Da repetitive Nukleotidsequenzen stromauf- und stromabwärts des *dtsR1* Gens die Auswahl geeigneter Primer erschwerte, wurden mehrere Primer ausgewählt. Vier Primerkombinationen wurden in PCR-Reaktionen mit einer Anlagerungstemperatur von 60 °C eingesetzt. Mit zwei Primerkombinationen wurde kein Fragment der erwarteten Größe amplifiziert, mit den beiden anderen Primerkombinationen gelang es dagegen spezifische Sequenzfragmente zu erhalten. Das größere Sequenzfragment von 1.867 bp, das mit der Primerkombination CgdsR1F₇ - CgdsR1R₈ (siehe Anhang 3.) amplifiziert wurde, wurde für die weiteren Arbeiten ausgewählt. Das Fragment wurde in die *Sma*I-Schnittstelle des Vektors pUC18 kloniert und das Insert doppelsträngig sequenziert. Die Sequenzanalyse zeigte, dass das gesamte *dtsR1* Gen (1.632 bp) mit 49 bp stromaufwärts und 188 bp stromabwärts liegender DNA-Sequenz vorlag. Daraus wurde ein Protein mit 543 Aminosäuren und einem kalkulierten Molekulargewicht von 58.460 abgeleitet (siehe Anhang 1.). Im Vergleich zur bekannten Nukleotidsequenz von *C. glutamicum* ssp. *lactofermentum* (*CgsspI*) unterschieden sich die beiden kodierenden Bereiche in 17 Basenpaaren voneinander, die aber in lediglich drei Fällen zu einem Aminosäureaustausch im abgeleiteten *C. glutamicum* (*Cg*) Protein führten. Hierbei handelte es sich um den Austausch *CgsspI*/Thr₂₇₁-*CgAla*₂₇₁, *CgsspI*/Leu₂₇₃-*CgMet*₂₇₃ und *CgsspI*/Leu₄₀₁-*CgPro*₄₀₁. Da die veränderten Basen meist zu keinem Aminosäureaustausch führten, wurde bestätigt, dass es sich hier um ein Protein mit stark konservierter Aminosäuresequenz handelt. Dies wurde von Toh *et al.* (1993) auch für andere Acyl-CoA Carboxylasen gezeigt. Ein Aminosäuresequenzvergleich des abgeleiteten Proteins zeigte hohe Identitäten zu Propionyl-CoA Carboxylase (PCC) Carboxyltransferaseuntereinheiten. Die höchsten Übereinstimmungen wurden zu den putativen Sequenzen von *C. glutamicum* ssp. *lactofermentum* DtsR2 (70 % Identität) (EMBL-Gendatenbankeintrag),

Mycobacterium tuberculosis AccD5 (67 % Identität) (Cole *et al.*, 1998a) und *Mycobacterium leprae* AccD5 (65% Identität) (Doukhan *et al.*, 1995) sowie zu den charakterisierten Proteinen von *Saccharopolyspora erythraea* PccB (61 % Identität) (Donadio *et al.*, 1996) und *S. coelicolor* A3(2) PccB (60 % Identität) (Rodríguez & Gramajo, 1999) gefunden. Darüberhinaus wurden hohe Identitäten von DtsR1 (> 50 %) zu bakteriellen Methylmalonyl-CoA Decarboxylasen erhalten. Wie AccDA weist auch DtsR1 Sequenzidentitäten zur α - und β -Carboxyltransferaseuntereinheit von *E. coli* auf. Diese betragen in kleineren Sequenzabschnitten etwa 26 %.

Zur Isolation des *dtsR2* Gens aus *C. glutamicum*, wurde das Primerpaar CgdtsR2F₁₈ - CgdtsR2R₂₀ (siehe Anhang 3.) in eine PCR-Reaktion mit einer Anlagerungstemperatur von 55 °C und chromosomaler DNA aus *C. glutamicum* ATCC13032 als Matrize eingesetzt. Dadurch wurde ein spezifisches Fragment der erwarteten Größe von 1.886 bp amplifiziert. Dieses wurde in die *Sma*I Schnittstelle des Vektors pUC18 kloniert und doppelsträngig sequenziert. Durch einen Vergleich der erhaltenen Sequenz mit der von der Degussa AG zur Verfügung gestellten wurde belegt, dass das *dtsR2* Gen (1.614 bp) mit 180 bp stromaufwärts und 93 bp stromabwärts liegender DNA-Sequenz vorlag. Wiederum unterschieden sich 7 Basenpaare von der bekannten *C. glutamicum ssp. lactofermentum* Nukleotidsequenz, die aber lediglich zu einem einzigen Aminosäureaustausch von Valin in der *C. glutamicum ssp. lactofermentum* zu Alanin in Position 82 der abgeleiteten Proteinsequenz von *C. glutamicum* führten. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des *dtsR2* Gens mit 537 Aminosäuren und einem kalkulierten Molekulargewicht von 57.997 (siehe Anhang 1.) ergab wiederum die höchste Sequenzübereinstimmung zur putativen PCC Carboxyltransferase von *M. tuberculosis* AccD5 (74 % Identitäten), *M. leprae* AccD5 (72 % Identitäten) und *C. glutamicum ssp. lactofermentum* DtsR1 (70 % Identitäten) sowie den oben genannten, charakterisierten Proteinen von *S. erythraea* PccB (67 % Identitäten) und zu *S. coelicolor* A3(2) PccB (67 % Identitäten). Auch für DtsR2 wurden hohe Identitäten von > 50 % zu bakteriellen Methylmalonyl-CoA Decarboxylasen gefunden und auch DtsR2 weist Sequenzidentitäten zur α - und β -Carboxyltransferaseuntereinheit von *E. coli* auf. Diese betragen in ebenfalls kleineren Sequenzbereichen etwa 30 %.

Der Homologievergleich in Abbildung 5 verdeutlicht die starken Übereinstimmungen zwischen DtsR1 und DtsR2 und die Übereinstimmung beider Proteine mit der funktionell charakterisierten PCC Carboxyltransferase von *S. coelicolor*. Die Unterschiede in den Aminosäuresequenzen von DtsR1 und DtsR2 könnten allerdings auf eine unterschiedliche Substratspezifität hindeuten, die der Carboxyltransferaseuntereinheit zugeschrieben wird (Li & Cronan, 1992b; Vuorio *et al.*, 1991; Fall *et al.*, 1975). Auch die geringen Aminosäuresequenzidentitäten von DtsR1 und DtsR2 zur möglichen Carboxyltransferase AccDA von nur 15 % lassen den Umsatz eines anderen Substrates vermuten.

Bei der proteinbiochemischen Isolation von Acyl-CoA Carboxylaseproteinen aus *C. glutamicum* ATCC13032 Δ pyc (siehe Abschnitt 5.3) wurde eine weitere Enzymuntereinheit gefunden. Das für dieses Protein kodierende Gen wurde als orf313 in der Genomdatenbank von *C. glutamicum* identifiziert und *dtsR3* benannt. Auch dieses Gen wurde mittels Polymerasekettenreaktion aus dem Genom isoliert. Dafür wurde aus der Sequenz der *forward*-Primer CgdtsR3F₅₀ und der *reverse*-Primer CgdtsR3R₅₁ (siehe Anhang 3.) ausgewählt. Durch eine PCR-Reaktion mit diesem Primerpaar und chromosomaler DNA aus *C. glutamicum* ATCC13032 als Matrize wurde ein spezifisches Fragment der erwarteten Größe von 1.864 bp amplifiziert. Mit Hilfe der angefügten Restriktionsschnittstelle *EcoRI* wurde das Fragment in den mit *EcoRI* linearisierten Vektor pUC18 kloniert und doppelsträngig sequenziert. Die Analyse der erhaltenen Sequenz ergab, dass *dtsR3* (1.551 bp) mit 247 bp stromaufwärts und 66 bp stromabwärts liegender DNA-Sequenz vorlag. Das seltenere Codon TTG (Leucin) wurde als Startpunkt des offenen Leserahmens bestimmt (siehe Anhang 1.). Ausgehend von diesem Startcodon wurde eine Peptidsequenz mit 516 Aminosäuren und einem kalkulierten Molekulargewicht von 55.796 abgeleitet.

Interessanterweise ergab ein Aminosäuresequenzvergleich von DtsR3 höchste Übereinstimmungen zur putativen Propionyl-CoA Carboxylase (PCC) Carboxyltransferaseuntereinheit AccD4 von *Mycobacterium tuberculosis* (54 % identische Aminosäuren) (Cole *et al.*, 1998a) und AccD4 von *Mycobacterium leprae* (54% Identität) (Cole *et al.*, 2001) sowie den charakterisierten Proteinen PccB von *Streptomyces coelicolor* A3(2) (49 % Identität) (Gramajo *et al.*, 1998, Sequenzveröffentlichung) und PccB von *Saccharopolyspora erythraea* (48 % Identität) (Donadio *et al.*, 1996). Bei den Proteinen von *M. tuberculosis* und *M. leprae* handelte es sich also nicht um diejenigen mit den höchsten Identitäten zu DtsR1 und DtsR2, sondern um eine getrennte Gruppe homologer Proteine. Die Aminosäureidentitäten von DtsR3 zu DtsR1 betragen 43 %, die zu DtsR2 46 % und die zu AccDA 23 %. Der Aminosäuresequenzvergleich in Abbildung 5 verdeutlicht die geringeren Identitäten der vierten Carboxyltransferaseuntereinheit DtsR3 zu den homologen Proteinen DtsR1 und DtsR2 und die geringeren Identitäten von DtsR1, DtsR2 und DtsR3 zu AccDA. Daraus wurde geschlossen, dass DtsR3 zwar derselben Proteinfamilie wie DtsR1 und DtsR2 angehört, aber möglicherweise eine Reaktion mit einem anderen Substrat im Stoffwechsel von *C. glutamicum* katalysiert.

```

Cg dtsR1 1 M T I S S P L I D V A N L P D I N T T A G K L A D L A R R A E A H F P M G E A V E K V H A A G R L T A R E R I D Y L L D E G S F T E T D
Cg dtsR2 1 - - - - - M T A A Q T K P D L T T T A G K L S D L R S R A E A Q A P M G E A T V E K V H A A G R K T A R E R I E Y L L D E G S F V E I D
Sc pccB 1 - - - - - M S E P E E Q Q P D I H T T A G K L A D L R R R E E A T H A G S A R A V E K Q H A K G L T A R E R I D L L L D E G S F V E I D
Cg dtsR3 1 - - - - - L S N T T T A E K L A D L R A R E T A K D P G S E A R K K R D E E G R T T P R O R I D A L L D A G S F V E I G
Cg accDA 1 - - - - - V E K F P T V W G E H T S A L T L I D V L D P D F I S W N E T P Q Y D N L N Q G - - - - Y A E

```

```

Cg dtsR1 71 Q L A R H R T A F G L C A K R P A D G C V T G T G T I D G R E V C I F S Q D C T V F G G A L G E V Y C E K I K I M H A I D T G R P L
Cg dtsR2 65 A L A R H R S K N F G L D A K R P V I D G V V T G Y G T I D G R K V C V F S Q D G A V F G G A L G E V Y C E K I V K V M D I A I T G V P L
Sc pccB 66 E F A R H R S T N F G L D A N R P Y C D G V V T G Y G T D G R P V A V F S Q D F T V F G G A L G E V Y C Q K I V K V M D F A L K T G C P V
Cg dtsR3 58 A L G R T P D - - - - - P D A P Y S D G V V T G Y G R I D G R P V A I Y A H D K T V V G G S V G M T C R K V S E V M D A I T G C P V
Cg accDA 49 T L E R A R S - - - - - K A K C D S V T G E G T V C I T P V A V I L S D F F L G G S L G T V A S V I M K A H R A T E L K L P L

```

Carboxyltransferasedomäne

```

Cg dtsR1 141 I G L Y E G A G A R I Q E G - A V S L D F I S Q T F Y Q N I Q A S G V I P Q I S L I M G A C A G G N A Y C P A L T D F V M V D K T S K M F
Cg dtsR2 135 I G I N E G A G A R I Q E G - V V S L G H Y S Q I F Y R N T Q A S G V I P Q I S L I M G A C A G G H V Y S P A L T D F V M V D Q T S K M F
Sc pccB 136 V G I N E S G G A R I Q E G - V A S L A Y G E I F R R N T H A S G V I P Q I S L V G P C A G G A V Y S P A L T D F T V M V D Q T S H M F
Cg dtsR3 123 I G I O D S G G A R I Q D A - V T S L A N Y S E I A R R L P L S G R S P Q I S L I M G K S A G G A V Y P V T T D F V G V D G E T E M Y
Cg accDA 112 V S P A S G G A R M Q E D N R A F A M V S I T A A V R H R E A H P F V Y R N P T M G G A A S W S S G H T F A P G A Q I G

```



```

Cg dtsR1 210 V T G P D V I K T V T G E D V T Q E E L G G A T H M V T A G N S H Y T A A T E E A L D W V Q P L Y S L P S N N R S Y A P M E D F D E E
Cg dtsR2 204 V T G P D V I K T V T G E D V T Q E E L G G A T H M A T S C T S H Y S A S D S S A L D W V R E L T S L P S N N R A E T P R Q E A D I M
Sc pccB 205 V T G P D V I K T V T G E D V G F E E L G G A R T H N S T S C V A H H M A G D E K A V E Y V K Q L S L P S N N L S E P P - - - - - A F
Cg dtsR3 192 V T G P A V I K E V T G E Q I T S A D L G G - A Q Q M Q N C N I S Y L A S S E A L N M V K D L D L E L T C N D P A P - - - - - V
Cg accDA 182 F L G P R V E L T T G H A L P D G V Q Q E N L V K T G V I D G I V S P L Q L R A A A K T L K V Q P V E A T D R F S P T - - - - -

```



```

Cg dtsR1 280 E C G V E N T A D D L K L D E I P D S A T V P Y D V R D V I E C L T D D G E N L E I Q A D R A E N V I A F C R I E G Q S V G F V A N
Cg dtsR2 274 I C S I Q N N D V D L E L D T I I P D S P N Q P Y D M R V I S R I V D D A E F E I Q E D A E N H C G F A R V E G R S V G I V A N
Sc pccB 270 P E E A D L A T D E A L D T I I P D S A N Q P Y D M S V I E H V L D D A E F E T Q P L F A P N I T C F G R V E G R P V G I V A N
Cg dtsR3 255 F A A P T D E E I A Y D E A L N S F M P D D T N Q G Y D M H D D K L F D D A N L L E I Q E E Y A P N I T T F A R V D G K A V G V V A N
Cg accDA 245 - T - P G V A P V M E A I A R S R D P Q R P G I G E I M E T G A D V V K L S - - G A R A G A L S P A R V A L A R G G R P V V I I G Q

```

```

Cg dtsR1 350 Q P T Q F A G C L D I D S S E K A A R F V R T C D A F N I P I M V D V P G F L P C A G Q E Y G G I P R R G A K L L A Y A E A T V P K I
Cg dtsR2 344 Q P T Q F A G C L D I K A S E K A A R F V R T C D A F N I P I E F V D V P G F L P C T N Q E F D G I I R R G A K L L A Y A E A T V G K I
Sc pccB 340 Q P M Q F A G C L D I T A S E K A A R F V R T C D A F N P V I T F V D V P G F L P C V D Q E H D G I I R R G A K L L A Y A E A T V P L I
Cg dtsR3 325 Q P M D K A G C I D A D A A D K G A R F V R I C D A Y N I P I E F V D T P G L P C V D Q E K V G I I R G A K L A A V V E S T V P K I
Cg accDA 311 D R R F T L G P Q I R F A R R C I S L A R - - - E L N P I P S I D T S C A E L S Q A A E E L G T A S S I A T L S K L D A P I P T V

```

Acyl-CoA Bindedomäne

```

Cg dtsR1 420 T V T I R K A Y G G A Y C V M G S K L C D I N L A W P T A Q I A V M G A A G A V F I Y R K E L M A D A K G L D T V A A K S E R E
Cg dtsR2 414 T V I T R K Y G G A Y C V M G S K D G A D L V A W P T A Q I A V M G A S G A V F I Y R K E L K Q A T E G K D V A E M G E Q E
Sc pccB 410 T V I T R K A Y G G A Y D V M G S K H L G A D L N L A W P T A Q I A V M G A Q G A V N I H R R T A D A G - - - D D A E A T A R L I Q E
Cg dtsR3 395 S L I I R K A Y G G A Y A V M G S K N L T C D L N A W P T A Q I A V M G A A A V V I Q G K O L E A A P P - - E Q E Y I K L M D F
Cg accDA 378 S V I I G Q V G G A L A M L P - - - A D L V A A E N A W S A P P E G A S I I R D T N H A E I I E R Q G V Q A A L L S Q G

```

```

Cg dtsR1 490 Y E D H M N P - Y H A A E R G L D A V I L P S E T R G I L S E N L R L L E R N V T R P A R K H G N P L
Cg dtsR2 484 Y E E T H M N P - Y V A A E R G L D A V I P P S E T R G I L E C L R L L D R K V V N V P A K K H G N P L
Sc pccB 477 Y E D A H M N P - Y T A A E R G Y D A V I M P S E T R R H I V R C L R Q L T K R E S L P P K K H G N P L
Cg dtsR3 463 Y D E N T S P - Y V A A E R G Y D A N I E P A E T R L V R R A V R O L E T K A V R D L D K K H T I P V
Cg accDA 444 L I D G I A E T E H F V E E I L G T I S N A L S E L D N P E R A G R D S F T R F E R L A Q - - - - -

```

Abb. 5: Homologievergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *C. glutamicum* *dtsR1* (*Cg dtsR1*), *dtsR2* (*Cg dtsR2*), *dtsR3* (*Cg dtsR3*) und *accDA* (*Cg accDA*) mit der Propionyl-CoA Carboxylase Carboxyltransferaseuntereinheit von *Streptomyces coelicolor* A3(2) (*Sc pccB*) unter Verwendung des *Multiple Sequence Alignment* Programm ClustalW 1.8 (Jeanmourgan *et al.*, 1998). Identische

Aminosäuren sind schwarz, ähnliche Aminosäuren grau hinterlegt. Der Domänenübergang zwischen Carboxyltransferase- und Acyl-CoA Bindedomäne ist durch die Markierung | ⇨ eingegrenzt.

Im Rahmen einer Transposonmutagenese in *C. glutamicum* ATCC13032 gelang es Jäger *et al.* (1996) das Gen *accBC* kodierend für ein Protein mit dem hochkonservierten Biotinbinde-Motiv Ala-Met-Lys-Met (Shenoy *et al.*, 1992; Samols *et al.*, 1988) zu klonieren. Homologiestudien ergaben Identitäten von 46 % zur Biotincarboxylase (AccB) (Kondo *et al.*, 1991) bzw. 43 % zum Biotincarboxylcarrierprotein (AccC) von *E. coli* (Sutton *et al.*, 1977; Li & Cronan, 1992a). Bei dem Protein AccBC handelt es sich also sehr wahrscheinlich um die α -Untereinheit einer Acyl-CoA Carboxylase in *C. glutamicum*. AccBC könnte daher zusammen mit den in diesem Abschnitt als β -Untereinheiten identifizierten Proteinen AccDA, DtsR1, DtsR2 und DtsR3 funktionelle Acyl-CoA Carboxylasen in *C. glutamicum* bilden.

2. Konstruktion und Charakterisierung definierter Carboxyltransferase-negativer Mutanten von *C. glutamicum*

Durch eine gerichtete Inaktivierung der Gene *accBC*, *accDA*, *dtsR1*, *dtsR2* und *dtsR3* sollte geprüft werden, ob die Genprodukte Reaktionen im Fettsäure- bzw. Lipidstoffwechsel in *C. glutamicum* ATCC13032 katalysieren. Obwohl es zuvor nicht gelang, eine Integrationsmutante von *accBC* zu erhalten (Jäger *et al.*, 1996), konnte eine Deletionsmutante des *dtsR1* Gens bei Kultivierung in einem fettsäuresupplementierten Medium erzeugt werden (Kimura *et al.*, 1996). Folglich wurde angenommen, dass die Inaktivierung der Gene generell nur dann möglich ist, wenn fettsäurehaltige Medien bei der Durchführung der Mutagenese eingesetzt werden. Daher wurde zunächst das Wachstum von *C. glutamicum* auf Fettsäuren untersucht.

2.1 Einfluss von Fettsäuren auf das Wachstum von *C. glutamicum* R127

Es ist bekannt, dass Fettsäuren das Wachstum von *C. glutamicum* beeinträchtigen können (Haynes & Britz, 1989, 1990; Kinoshita *et al.*, 1972), so dass zunächst das Wachstum von *C. glutamicum* R127 in fettsäurehaltigen Medien untersucht wurde. Da die Literaturangaben der eingesetzten Fettsäurekonzentrationen stark voneinander abwichen (Kimura *et al.*, 1997a; Stuible *et al.*, 1996; Harder *et al.*, 1974), wurde das Wachstum von *C. glutamicum* R127 repräsentativ auf zwei der zur Supplementation ausgewählten Fettsäuren in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen untersucht. Dazu wurde eine Flüssigkultivierung des Stammes R127 in CGXII Minimalmedium mit 4 % Glukose (w/v) als C-Quelle und zusätzlich einer Fettsäurequelle durchgeführt. Zuerst wurden dem Medium verschiedene Konzentrationen Tween 80 zugesetzt, einem vorwiegend mit Oleat (cis- Δ^9 -Oktadecenat) veresterten Detergenz, und das Wachstum über einen Zeitraum von 34 h verfolgt (Abb. 6). Es zeigte sich, dass nach anfänglich gleichem Wachstum die Wachstumsrate des Stammes und auch die End-OD₆₀₀ durch den Zusatz von Tween 80 deutlich beeinträchtigt waren. Erst bei der geringen Detergenzkonzentration von 3 mg/L war das Wachstum mit dem Wachstum des Stammes im Kontrollmedium ohne Tween 80 vergleichbar.

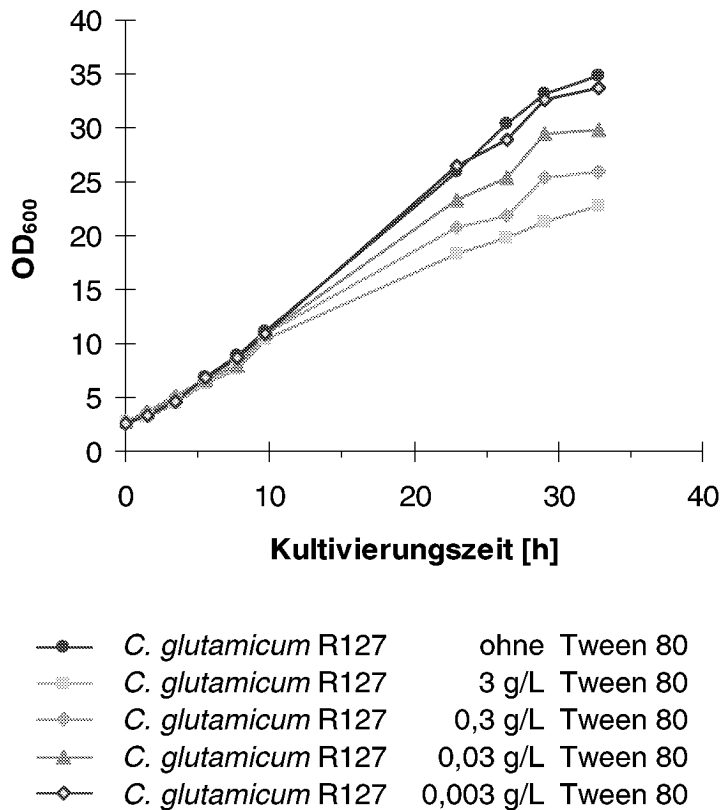


Abb. 6: Wachstum von *C. glutamicum* R127 in CGXII Minimalmedium mit verschiedenen Tween 80 Konzentrationen (Oleatverbindung). Aufgetragen wurde die optische Dichte (OD_{600}) in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit.

Analog zu diesen Experimenten wurde untersucht, wie sich der Zusatz der reinen, einfach ungesättigten Fettsäure Natriumoleat (C18:1) auf das Wachstum des Stammes *C. glutamicum* R127 auswirkt. Auch hier führten bereits geringe Mengen der Fettsäure zur Hemmung des Wachstums (Abb. 7). Eine Oleatkonzentration von 0,5 mM im Medium bewirkte sogar eine Abnahme der optischen Dichte in der Bakterienkultur. Mit einer 25fach geringeren Oleatkonzentration von 0,02 mM war das Wachstum im Vergleich zum Kontrollstamm aber auch hier nicht mehr beeinträchtigt. Ein Vergleich mit den Literaturwerten ergab, dass die corynebakterielle Subspecies *lactofermentum* in einer 30fach höheren Konzentration Tween 80 von 1 g/L kultiviert worden war (Kimura *et al.*, 1997a) und *C. glutamicum* ssp. *ammoniagenes* sogar in einer 50fach höheren Ölsäurekonzentration von 0,3 g/L mit zusätzlich 10 g/L Tween 40 kultivierbar war (Stuible *et al.*, 1996). Die Ergebnisse wurden nachfolgend in Inaktivierungsexperimenten und bei der phänotypischen Charakterisierung von Mutanten berücksichtigt.

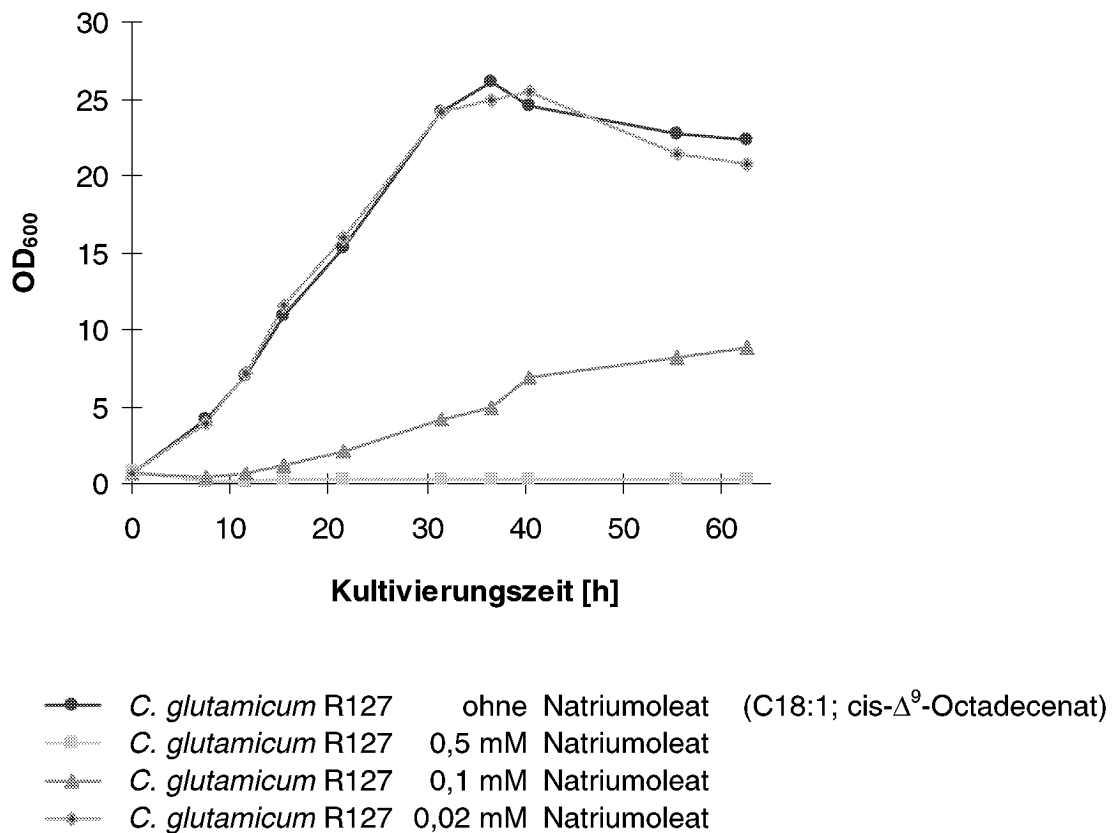


Abb. 7: Wachstum von *C. glutamicum* R127 in CGXII Minimalmedium mit verschiedenen Konzentrationen der reinen Fettsäure Natriumoleat. Aufgetragen wurde die optische Dichte (OD_{600}) in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit.

2.2 Versuche zur Inaktivierung der Gene des Biotincarboxylase-Biotincarboxylcarrierproteins (*accBC*) und der Carboxyltransferase (*accDA*)

Nach Inaktivierung der Gene für das Biotincarboxylase-Biotincarboxylcarrierprotein *accBC* und für die Carboxyltransferase *accDA* sollte in Wachstumsversuchen auf verschiedenen Fettsäuresupplementen untersucht werden, ob die Genprodukte an der Fettsäure- bzw. Lipidsynthese von *C. glutamicum* beteiligt sind. Die Mutation sollte durch die gerichtete Integration eines Vektors durch homologe Rekombination in das Gen *accBC* und in das Gen *accDA* des Chromosoms von *C. glutamicum* ATCC13032 und R127 erfolgen. Dazu wurden zunächst zwei Disruptionsvektoren mit verschiedenen internen Sequenzabschnitten des *accBC* Gens konstruiert, indem ein 510 bp *EcoRI*/*SacI*-Fragment und ein 599 bp *EcoRI*-Fragment aus dem Vektor pUC18*accBC* isoliert und in die jeweils komplementären

Restriktionsschnittstellen des mobilisierbaren, in *C. glutamicum* nicht replizierbaren Vektors pK18mob (Schäfer *et al.*, 1994) ligiert wurden (pK18mob'accBC₅₁₀ / pK18mob'accBC₅₉₉). Die Konstruktion zweier weiterer Disruptionsvektoren zur Inaktivierung des *accDA* Gens erfolgte, indem ein internes 761 bp *HindIII*-Fragment und ein internes 509 bp *HindIII*/*EcoRI*-Fragment aus dem Vektor pUC18*accDA* isoliert und ebenfalls in die jeweils komplementären Schnittstellen des Vektors pK18mob ligiert wurden (pK18mob'accDA₇₆₁ / pK18mob'accDA₅₀₉). Zum Einbringen der vier erhaltenen Plasmide in den Stamm *C. glutamicum* ATCC13032 und in den restriktionsdefizienten Stamm R127 wurden mehrere Konjugationen mit Hilfe des Donorstammes *E. coli* S17-1 (Simon *et al.*, 1983) und Elektroporationen pro Plasmid durchgeführt. Anschliessend wurden die Bakterienzellen auf BHI-Agar Nährböden mit 0,003 % Tween 80, 0,0006 % Oleat, 0,0006 % Palmitat, 400 mg/L des Emulgators Brij58, 50 µg/mL Nalidixinsäure und 15 µg/mL Kanamycin inkubiert (BHI-Agarplatten Typ I). Nachdem aus diesen Versuchen keine kanamycinresistenten Kolonien hervorgingen, wurden weitere Konjugationen und Elektroporationen durchgeführt. Diesmal wurden die Bakterien auf BHI-Agarplatten inkubiert, die statt Tween 80 0,03 % des Fettsäuregemisches Butterhydrolysat (BHI-Agarplatten Typ II) enthielten (Tab. 3). Aber auch unter diesen Bedingungen hatte kein Bakterienklon das Plasmid ins Chromosom integriert.

Aus diesen Experimenten wurde geschlossen, dass eine Inaktivierung der beiden Gene *accBC* und *accDA* nicht möglich ist und diese Gene somit für *C. glutamicum* essentiell sind. Offensichtlich kann der Verlust der Herstellung von Ausgangsverbindungen der Fettsäuresynthese durch die Acetyl-CoA Carboxylase von der Zelle nicht durch den Zusatz der Fettsäuren ins Medium kompensiert werden. Da *accBC* bisher nur in Mikroorganismen ausgeschaltet werden konnte, in denen noch eine zweite α -Untereinheit vorlag (Kimura *et al.*, 2000; Rodríguez & Gramajo, 1999; Donadio *et al.*, 1996), ist dieses Ergebnis ein Hinweis darauf, dass keine weitere α -Untereinheit in *C. glutamicum* gibt. Auch kann die Funktion des *accDA* Gens nicht durch die Genprodukte von *dtsR1*, *dtsR2* oder *dtsR3* ersetzt werden. In *Mycobacterium bovis* BCG (Norman *et al.*, 1995), *Bacillus subtilis* (Perez *et al.*, 1998) und *E. coli* (Alberts & Vagelos, 1972) war eine Inaktivierung der Acetyl-CoA Carboxylase ebenfalls nicht möglich. Harder *et al.* (1972) gelang es lediglich, temperatursensitive Mutanten von *E. coli* zu isolieren, die Punktmutationen im Biotincarboxyl-carrierprotein der Acetyl-CoA Carboxylase (Li *et al.*, 1992) und in der Carboxyl-transferaseuntereinheit AccA (Li & Cronan, 1992a) trugen. Bekannt sind zudem Integrationsmutanten der Acetyl-CoA Carboxylase von *Saccharomyces cerevisiae*, die aber ausschließlich in diploiden Stämmen erhalten wurden, in denen eines der Allele noch intakt vorlag (Haßblacher *et al.*, 1993). In diesen Stämmen betrug die Acetyl-CoA Carboxylaseaktivität nur noch 50 % der Aktivität des Ausgangsstammes.

Plasmid	Inaktivierung von	Konjugations- und Elektroporationsansätze		Plattentyp
<i>C. glutamicum</i>				
		ATCC13032	R127	
pK18 <i>mob'</i> <i>accBC</i> ₅₁₀	<i>accBC</i>	10	11	BHI-Agar- platten Typ I / II
pK18 <i>mob'</i> <i>accBC</i> ₅₉₉		13	10	
pK18 <i>mob'</i> <i>accDA</i> ₇₆₁	<i>accDA</i>	11	12	
pK18 <i>mob'</i> <i>accDA</i> ₅₀₉		8	10	

Tab. 3: Anzahl der Konjugations- und Elektroporationsansätze, die zur Integrationsmutagenese des Biotincarboxylase-Biotincarboxylcarrierproteins AccBC und der Carboxyltransferase AccDA durchgeführt wurden. Die Ansätze wurden auf zwei verschiedenen Plattentypen inkubiert. Typ I enthielt zusätzlich 0,003 % Tween 80; Typ II stattdessen 0,03 % Butterhydrolysat. Der Index der Plasmide gibt die Länge des internen Fragmentes an.

2.3 Inaktivierung der Gene für die putativen Carboxyltransferasen DtsR1, DtsR2 und DtsR3 in *C. glutamicum* ATCC13032 und R127

Da es möglich war, eine fettsäureauxotrophe *dtsR1* Deletionsmutante von *C. glutamicum* zu erhalten (Kimura *et al.*, 1997a), sollte sowohl eine Inaktivierung dieses Gens als auch eine Inaktivierung der paralogen Gene *dtsR2* und *dtsR3* durchgeführt werden. Anschliessend sollte durch eine Komplementation mit Fettsäuren überprüft werden, ob alle drei Genprodukte an der Fettsäurebiosynthese von *C. glutamicum* beteiligt sind. Die Inaktivierung sollte durch die gerichtete Integration geeigneter Plasmide in das Chromosom von *C. glutamicum* ATCC13032 und R127 erfolgen.

Zur Konstruktion der dazu benötigten Vektoren wurde zuerst ein internes 555 bp Genfragment aus *dtsR1* mit dem Oligonukleotidpaar CgdtsR1F₁ - CgdtsR1F₂ (siehe Anhang 3.) und dem Vektor pUC18*dtsR1* als Matrize in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Mit

Hilfe der angefügten Restriktionsschnittstelle *HindIII* gelang es, das spezifische Fragment in die komplementäre Schnittstelle des Plasmides pK18*mob* (Schäfer *et al.*, 1994) zu ligieren. Gleichmaßen wurde ein internes 192 bp Fragment des *dtsR3* Gens mit dem Oligonukleotidpaar CgdsR3R₅₂ - CgdsR3R₅₃ (siehe Anhang 3.) und dem Vektor pUC18*dtsR3* als Matrize amplifiziert. Die Enden dieses Fragmentes wurden mit Klenow-Polymerase geglättet und in die *SmaI*-Schnittstelle des Vektors pK18*mob* ligiert. Die Konstruktion von pK18*mob'dtsR2'* wurde durchgeführt, indem der Vektor pUC18*dtsR2* mit *EcoRI* und *SacI* geschnitten, die Enden des erhaltenen internen 508 bp *dtsR2* Fragmentes geglättet und in die *SmaI*-Restriktionsschnittstelle des Vektors pK18*mob* ligiert wurde. Daraus resultierten die drei mobilisierbaren Vektoren pK18*mob'dtsR1'*, pK18*mob'dtsR2'* und pK18*mob'dtsR3'* (siehe Anhang 2.). Das Plasmid pK18*mob'dtsR1'* wurde durch konjugativen Transfer in *C. glutamicum* ATCC13032 und R127 überführt. Die Ansätze wurden auf fettsäurehaltigen BHI-Vollmediumplatten (siehe Abschnitt II.3.1/3.2) kultiviert, denen Kanamycin und Nalidixinsäure zur Selektion auf Integrationsmutanten zugesetzt wurde. Von beiden Stämmen wurden mehrere Transkonjuganten erhalten, die das Plasmid über homologe Rekombination ins Genom integriert haben mussten. Dagegen wurden in den Konjugationsansätzen mit den Plasmiden pK18*mob'dtsR2'* und pK18*mob'dtsR3'* zunächst keine Mutanten erhalten. Erst in mehrfach durchgeführten Elektroporationen gelang es, einige Klone der beiden Mutantensämme von *C. glutamicum* ATCC13032 und R127 auf fettsäurehaltigen Medien zu isolieren. Abbildung 8 zeigt beispielhaft die Konstruktion des Plasmides pK18*mob'dtsR2'* und die resultierende Genanordnung nach Integration.

Es fiel auf, dass sich alle Integranten phänotypisch durch kleine Koloniegrößen auszeichneten und dass sich die Zellen schlecht vereinzeln ließen, da sie aneinander haften blieben. Zudem war eine matte Oberfläche der Kolonien und ein rundlicheres Aussehen der Zellen im Mikroskop zu beobachten. Daher wurde zunächst die Stammidentität dieser Klone untersucht, indem unter anderem das corynespezifische *thrE* Gen (Ziegler, 2000), das bisher nur in *C. glutamicum*, *M. tuberculosis* und *S. coelicolor* gefunden wurde, mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert wurde. In allen Klonen ließ sich aber das erwartete 1.850 bp große DNA Fragment spezifisch amplifizieren.

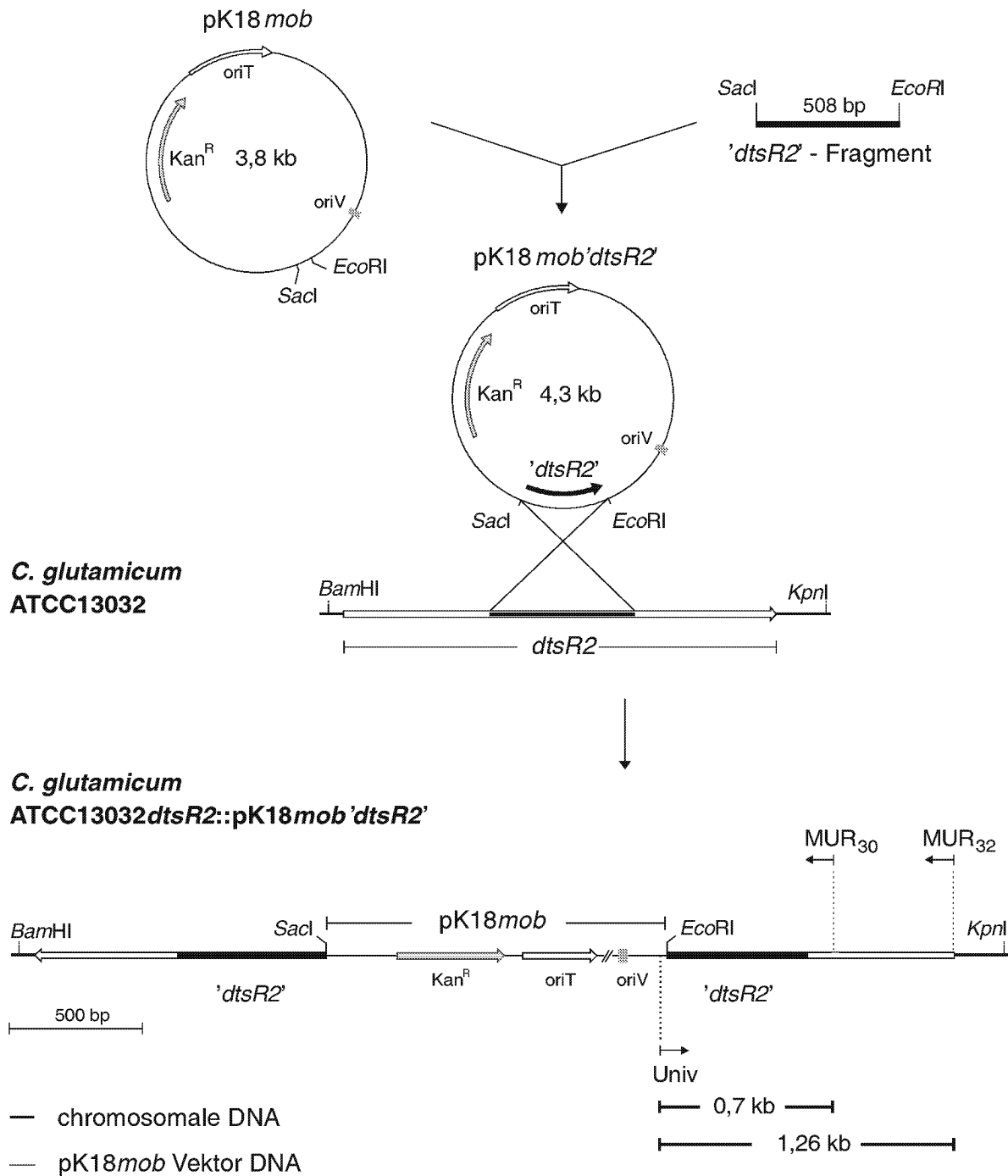


Abb. 8: Schematische Darstellung zur Konstruktion der Carboxyltransferase-Integrationsmutanten am Beispiel von *C. glutamicum* ATCC13032dtsR2::pK18mob'dtsR2. Die Integration ins Genom des Stammes ATCC13032 erfolgte über homologe Rekombination. Mit dem vektorspezifischen Universal-Primer (Univ) und zwei ausserhalb des Integrationsortes gewählten, genspezifischen Primern (MuR₃₀: CgdtsR2 MuR₃₀; MuR₃₂: CgdtsR2MuR₃₂) erfolgte der Nachweis der Integration mittels PCR. Die erwarteten PCR Fragmentgrößen sind angegeben.

Die korrekte Integration von pK18*mob'dtsR1'*, pK18*mob'dtsR2'* und pK18*mob'dtsR3'* in den jeweils kodierenden Bereich des chromosomalen Genortes von *C. glutamicum* ATCC13032, wurde dann in allen erhaltenen Klonen durch weitere PCR-Reaktionen überprüft (Abb. 9). Dazu wurden jeweils genspezifische Primer von *dtsR1*, *dtsR2* und *dtsR3* zusammen mit den vektorspezifischen Primern Universal und RSP (siehe Anhang 2.3) sowie der chromosomalen DNA der Klone zur PCR eingesetzt. Durch Integration von pK18*mob'dtsR1'* wurde die Amplifizierung eines 650 bp großen DNA-Fragmentes erwartet, während in den Ausgangsstämmen ATCC13032 und R127 kein Fragment amplifiziert werden sollte. Wie Abbildung 9 A zeigt, wurde der Vektor erfolgreich ins Chromosom der Klone integriert (Spur 2-5). Dagegen wurde in der Negativkontrolle kein Fragment vervielfältigt (Spur 1).

Aufgrund des bereits genannten ungewöhnlichen Phänotyps der erhaltenen *dtsR2* und *dtsR3* Insertionsstämme, wurde die Integration von pK18*mob'dtsR2'* und pK18*mob'dtsR3'* mit je zwei verschiedenen Primerkombinationen kontrolliert. Dadurch sollte im Falle einer Integration von pK18*mob'dtsR2'* ein 700 bp bzw. ein 1.260 bp großes DNA-Fragment vervielfältigt werden, bei Integration von pK18*mob'dtsR3'* ein 870 bp bzw. ein 370 bp Fragment. Abbildung 9 B stellt jeweils beispielhaft das Ergebnis eines Klon zur Inaktivierung des *dtsR2* Gens und eines Klon zur Inaktivierung des *dtsR3* Gens im Stamm ATCC13032 dar. Das Agarosegelfoto belegt, dass alle erwarteten Fragmente nachweisbar waren (Spur 2+4 / Spur 7+9), wohingegen in den Negativkontrollen (Spur 1+5 / Spur 6+10) keine PCR-Fragmente erhalten wurden. Insgesamt wurden zwei Integrationsstämme von ATCC13032 bzw. drei von R127 mit dem inaktivierten *dtsR2* Gen und drei Integrationsstämme von ATCC13032 bzw. sechs von R127 mit dem inaktivierten *dtsR3* Gen isoliert. Durch diese Analysen wurde gezeigt, dass die gewünschten Inaktivierungsmutanten vorlagen.

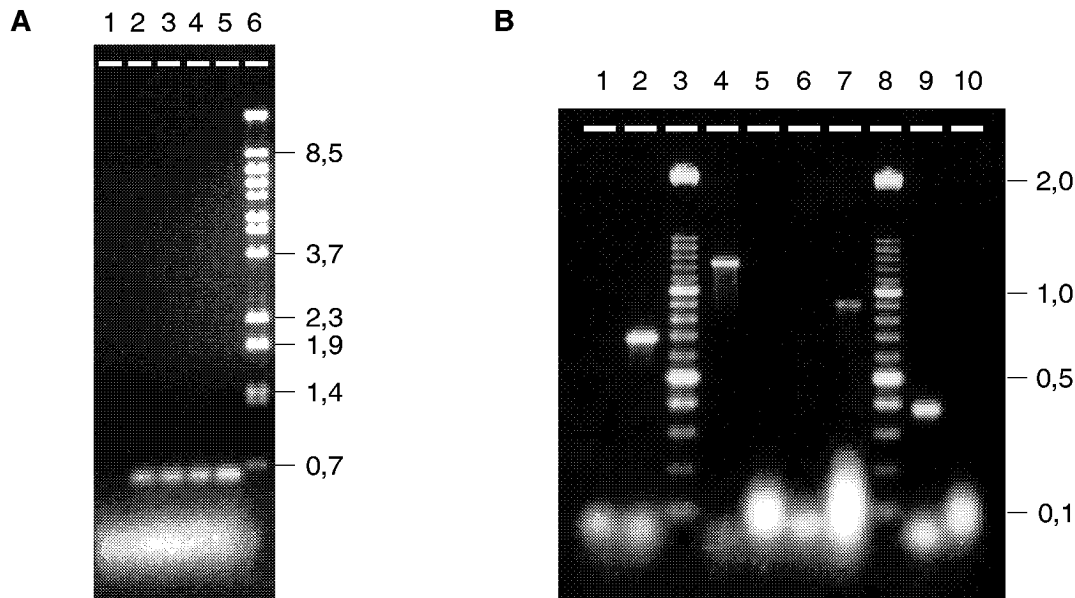


Abb. 9: Verifikation der Inaktivierungsstämme *C. glutamicum* ATCC13032*dtsR1::pK18mob'dtsR1'* (A) sowie ATCC13032*dtsR2::pK18mob'dtsR2'* und ATCC13032*dtsR3::pK18mob'dtsR3'* (B). Gezeigt sind die PCR Produkte zum Nachweis der jeweiligen Plasmidintegration ins Chromosom der Stämme.

A Spur 1: amplifizierte DNA aus ATCC13032 (Negativkontrolle; Pp1*)
 Spur 2-5: amplifizierte DNA aus ATCC13032*dtsR1::pK18mob'dtsR1'* (Pp1)
 Spur 6: Größenstandard (λ -DNA *Bst*EII geschnitten)

B Spur 1: amplifizierte DNA aus ATCC13032 (Negativkontrolle; Pp2)
 Spur 2: amplifizierte DNA aus ATCC13032*dtsR2::pK18mob'dtsR2'* (Pp2)
 Spur 3: Größenstandard (100 bp - Leiter)
 Spur 4: amplifizierte DNA aus ATCC13032*dtsR2::pK18mob'dtsR2'* (Pp3)
 Spur 5: amplifizierte DNA aus ATCC13032 (Negativkontrolle; Pp3)
 Spur 6: amplifizierte DNA aus ATCC13032 (Negativkontrolle; Pp4)
 Spur 7: amplifizierte DNA aus ATCC13032*dtsR3::pK18mob'dtsR3'* (Pp4)
 Spur 8: Größenstandard (100 bp - Leiter)
 Spur 9: amplifizierte DNA aus ATCC13032*dtsR3::pK18mob'dtsR3'* (Pp5)
 Spur 10: amplifizierte DNA aus ATCC13032 (Negativkontrolle; Pp5)

*) Pp: Primerpaar; 1: CgdsR1MuF₁₀ - RSP; 2: CgdsR2MuR₃₀ - Universal;
 3: CgdsR2MuR₃₂ - Universal; 4: CgdsR3MuF₃₅ - Universal;
 5: CgdsR3MuF₄₀ - Universal.

2.4 Wachstumsexperimente zur Charakterisierung der Carboxyltransferase Integrationsmutanten

In einer Untersuchung zur Charakterisierung der Carboxyltransferase Integrationsmutanten *C. glutamicum* ATCC13032*ftsR1::pK18mob'ftsR1'*, ATCC13032*ftsR2::pK18mob'ftsR2'* und ATCC13032*ftsR3::pK18mob'ftsR3'* sollte überprüft werden, ob die Inaktivierung der Gene eine Fettsäureauxotrophie zur Folge hat. Dazu wurde zunächst das Wachstum auf CGXII Minimalmediumplatten mit 4 % Glukose (w/v) als C-Quelle jedoch ohne einer zusätzlichen Fettsäurequelle im Vergleich zum Ausgangsstamm untersucht. Nach 50stündiger Inkubation bei 30 °C wurde das Wachstum der Stämme anhand der Größe von Einzelkolonien bewertet. Abbildung 10 A zeigt, dass alle drei Integrationsstämme auf Minimalmedium im Vergleich zum Ausgangsstamm erheblich schlechter oder nicht gar mehr wuchsen. Ein auffallend geringes Wachstum wurde bei den Integrationsmutanten *C. glutamicum* ATCC13032*ftsR1::pK18mob'ftsR1'* und ATCC13032 *ftsR2::pK18mob'ftsR2'* festgestellt, deren Koloniegrößen mit einem Durchmesser von $\leq 0,025$ mm weniger als einem zehntel des Wildtyps ($\varnothing$ 2,5 mm) entsprachen. Da die Kolonien von fettsäurehaltigen Platten abgeimpft worden waren, handelt es sich hierbei vermutlich nur noch um ein Restwachstum. Die Inaktivierung der Gene hatte demnach zu einem Defekt im Stoffwechsel von *C. glutamicum* geführt.

Um zu überprüfen, ob der ursprüngliche Phänotyp durch Supplementation mit einer bestimmten Fettsäure wiederhergestellt werden kann, wurde das Wachstum der Mutantenstämme wiederum auf CGXII Minimalmediumplatten mit 4 % Glukose (w/v) als C-Quelle sowie einer zusätzlichen Fettsäurequelle (Natriumoleat, Palmitat, Tween 80, Tween 60, Tween 40 und Tween 20 sowie Butterhydrolysat; siehe Abschnitt II.2.1) im Vergleich zum Ausgangsstamm untersucht. Abbildung 10 B stellt eine Auswahl derjenigen Fettsäureminimalmediumplatten dar, die einen Einfluss auf das Wachstum der Mutantenstämme ausübten. Es zeigte sich, dass die Wachstumsdefekte der Integrationsmutanten durch keine der Fettsäuren komplett aufgehoben werden konnten, was gleichermaßen für eine *ftsR1* Deletionsmutante bekannt war (Kimura *et al.*, 1997a). Allerdings konnte das Wachstum der Stämme partiell wiederhergestellt werden. So entsprach das Wachstum von *C. glutamicum* ATCC13032*ftsR1::pK18mob'ftsR1'* mit einem Koloniedurchmesser von 0,75 mm durch den Zusatz von Butterhydrolysat fast der Hälfte des Ausgangsstammes ($\varnothing$ 1,75 mm). Das Wachstum von *C. glutamicum* ATCC13032*ftsR2::pK18mob'ftsR2'* wurde durch Oleat, Tween 20 (C12:0) und insbesondere Tween 80 (C18:1) ($\varnothing$ 1,45 mm; Ausgangsstamm $\varnothing$ 2,5 mm) verbessert, das Wachstum von *C. glutamicum* ATCC13032 *ftsR3::pK18mob'ftsR3'* vorwiegend durch die Fettsäure Oleat ($\varnothing$ 1,15 mm; Ausgangsstamm $\varnothing$ 2,75 mm).

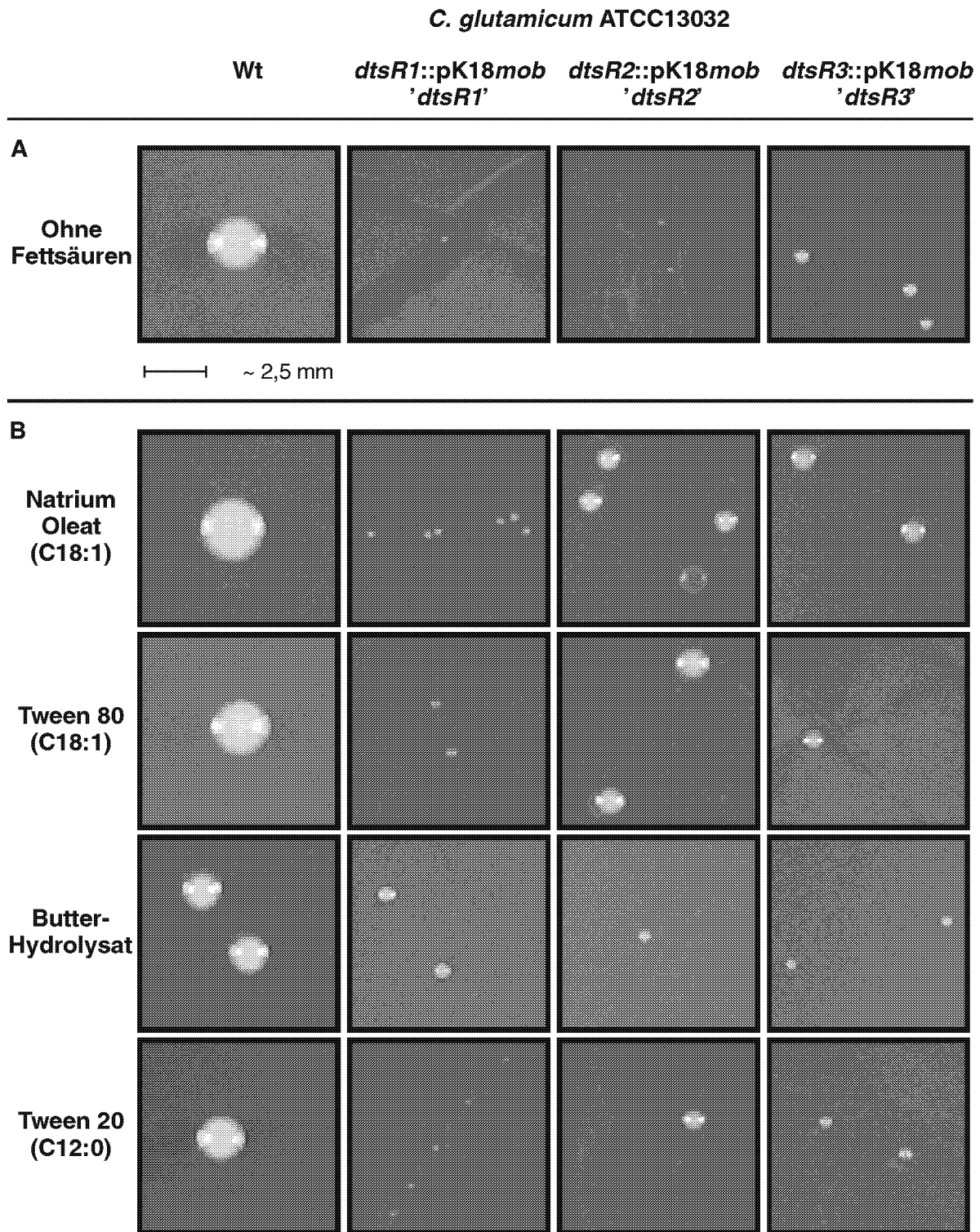


Abb. 10: Wachstum der Carboxyltransferase Integrationsmutanten *C. glutamicum* ATCC 13032*dtsR1::pK18mob*'*dtsR1*', ATCC13032*dtsR2::pK18mob*'*dtsR2*' und ATCC 13032*dtsR3::pK18mob*'*dtsR3*' im Vergleich zum Ausgangsstamm auf CGXII Minimalmediumplatten ohne bzw. mit verschiedenen Fettsäuresupplementen:

0,02 mM Oleat, 30 mg/L Tween 80, 0,3 g/L Butterhydrolysat und 30 mg/L Tween 20. Die Bakterienkolonien sind 4fach vergrößert dargestellt.

Aus dem Wachstum der Mutanten auf verschiedenen Fettsäuren wurde geschlossen, dass die *dtsR1*, *dtsR2* und *dtsR3* Genprodukte jeweils Reaktionen des Fettsäure- bzw. Lipidstoffwechsels von *C. glutamicum* katalysieren, zu denen es keine alternativen Reaktionen oder Reaktionswege gibt. Hierbei könnte es sich um die Synthese spezieller Fettsäuren oder Lipide handeln, die nicht bzw. nur in geringen Mengen in den zugesetzten Fettsäuren vorhanden sind oder die von der Zelle nicht aufgenommen werden können. Die Genprodukte können sich aber offensichtlich trotz ihrer hohen Identitäten auf Aminosäureebene nicht vollständig gegenseitig komplementieren. Das beobachtete Restwachstum der Mutantensämme könnte auch auf die in der Literatur beschriebene multiple Substratspezifität einiger Acyl-CoA Carboxylasen zurückgeführt werden (Kimura *et al.*, 1997; Hunaiti & Kolattukudy, 1982; Rainwater & Kolattukudy, 1982). Diese sind in der Lage, verschiedene Acyl-CoA Derivate, wenn auch mit geringerer Aktivität, umzusetzen.

3. Überexpression der Gene für Acyl-CoA Carboxylaseuntereinheiten und Untersuchungen zur Aminosäurebildung

Untersuchungen zur detergenzabhängigen Glutamatproduktion sowie zur Lysinproduktion nach Überexpression von *dtsR1* bzw. Transposoninsertion neben dem *accBC* Gen deuteten darauf hin, dass veränderte Acyl-CoA Carboxylaseaktivitäten die Akkumulation von Aminosäuren durch *C. glutamicum* beeinflussen können (Kimura *et al.*, 1997a, 1997b; Jäger, mündliche Mitteilung). Um zu überprüfen, ob es einen Zusammenhang zwischen den in dieser Arbeit untersuchten Genen und der Aminosäurebildung gibt, wurde die Glutamat- und Lysinproduktion in *C. glutamicum* ATCC13032 und dem Lysinproduktionsstamm MH20-22B (Schrumpf *et al.*, 1992) nach Überexpression der Acyl-CoA Carboxylasegene analysiert.

3.1 Untersuchungen zur Glutamatbildung nach Überexpression von Acyl-CoA Carboxylasegenen im Stamm ATCC13032

Die Glutamatproduktion von *C. glutamicum* kann durch Biotinmangel hervorgerufen werden (Gutmann *et al.*, 1992; Shio *et al.*, 1962). Da gezeigt wurde, dass der Biotineffekt mit der Fettsäurebiosynthese in *C. glutamicum* zusammenhängt (Hoischen & Krämer, 1990) und möglicherweise eine Folge veränderter Aktivität der biotinabhängigen Acetyl-CoA Carboxylase (Eggeling & Sahm, 1999; Eggeling *et al.*, 2001a) und des Membranaufbaus ist (Hoischen & Krämer, 1990; Kinoshita *et al.*, 1972), sollte untersucht werden, ob es einen Einfluss der *accBC*, *accDA*, *dtsR1*, *dtsR2* und *dtsR3* Genprodukte unter Biotinmangel auf die Glutamatausscheidung in *C. glutamicum* gibt. Da die funktionelle Acyl-CoA Carboxylase aus α - und β -Untereinheiten aufgebaut ist, wurden die Gene sowohl einzeln als auch in den Kombinationen *accBCaccDA*, *accBCdtsR1* und *accBCdtsR2* überexprimiert.

Zur Konstruktion der Plasmide wurden die Gene *accBC* und *accDA* als 2,6 kb *SalI*/*NaeI*-Fragment bzw. 2,4 kb *PstI*/*EcoRI*-Fragment aus dem Vektor pUC18*accBC* und dem Vektor pUC18*accDA* isoliert. Das Gen *dtsR1* wurde als 2,1 kb *NdeI*/*KpnI*-Fragment aus dem Vektor pUC18*dtsR1*, das Gen *dtsR2* als 2,2 kb *BamHI*/*SapI*-Fragment aus dem Vektor pUC18*dtsR2* und das Gen *dtsR3* als 1,9 kb *EcoRI*-Fragment aus dem Vektor pUC18*dtsR3* isoliert. Das Fragment mit dem *dtsR3* Gen wurde in die komplementäre *EcoRI*-Schnittstelle des Vektors pEK0 ligiert. Die Enden der übrigen Fragmente wurden geglättet und in die geglättete *SalI*-Schnittstelle des Vektors pEK0 ligiert. Die Konstruktion der Plasmide zur Überexpression der Genkombinationen erfolgte, indem das Plasmid pEK0*accBC* *KpnI*-linearisiert, die Enden

geglättet und mit den zuvor genannten Fragmenten des *accDA*, *dtsR1* und *dtsR2* Gens ligiert wurden. Die so konstruierten Plasmide pEK0*accBC*, pEK0*accDA*, pEK0*dtsR1*, pEK0*dtsR2* und pEK0*dtsR3* sowie pEK0*accBCaccDA*, pEK0*accBCdtsR1* und pEK0*accBCdtsR2* (siehe Anhang 2.) wurden durch Elektroporation in den Stamm *C. glutamicum* ATCC13032 eingebracht.

Die erhaltenen acht Stämme wurden über Nacht in CgIII Vollmedium vorkultiviert und mit einer OD₆₀₀ von 0,5 in CgXII Minimalmedium mit 10 µg/L Biotin überimpft. Die Zellen wurden anschliessend über Tag kultiviert und nach 6 Stunden zwei Mal mit Saline gewaschen. Zur Erzeugung des Biotinmangels wurden sie dann nochmals in CGXII Minimalmedium mit einer geringeren Biotinkonzentration von 0,1 µg / L überimpft. Ausgehend von einer anfänglichen OD₆₀₀ von 0,5 wurde das Wachstum über einen Zeitraum von 50 h verfolgt. Nach 24 h und 48 h wurde die extrazelluläre Glutamatkonzentration bestimmt. Abbildung 11 zeigt das Wachstum der Stämme und die Glutamatakkumulation im Medium. Es wurde beobachtet, dass das Wachstum der Stämme ATCC13032pEK0*accBC*, ATCC13032pEK0*accDA* und ATCC13032pEK0*dtsR2* dem des Kontrollstammes ATCC13032pEK0 entsprach. Das Wachstum der Stämme ATCC13032 pEK0*dtsR1* und ATCC13032pEK0*dtsR3* war dagegen verringert. Generell war das Wachstum bei allen Stämmen durch die geringe Biotinkonzentration auf eine End-OD₆₀₀ von etwa 17 limitiert (Abb. 11 A / B).

Bei der Glutamatakkumulation (Abb. 11 C / D) zeichneten sich bereits nach 24 h Kultivierung Unterschiede ab, die im Verhältnis denjenigen nach 48 h Kultivierung entsprachen. Besonders auffallend war eine deutlich geringere Glutamatbildung durch den Stamm ATCC13032pEK0*accBCdtsR1*, der mit 13,1 mM ca. 67 % weniger L-Glutamat ausschied, als der Vergleichsstamm ATCC13032pEK0 mit 40,2 mM (Abb. 11 D). Auch die Überexpression der Gene *accBC*, *dtsR1* und *dtsR2* verringerte die Glutamatausbeute um etwa 15 % (Abb. 11 C / D). Die Glutamatkonzentrationen nach Überexpression von *accDA*, *dtsR3* und der Genkombinationen *accBCaccDA* und *accBCdtsR2* war wenig verändert. Dabei wurden die Untersuchungen mit Stämmen, in denen die Gene *dtsR2* und *dtsR3* überexprimiert wurden, zwei Mal durchgeführt. Die übrigen Werte ergeben sich aus Vierfachbestimmungen.

Die Untersuchungen zeigen, dass es bereits einen Einfluss der einzeln überexprimierten Acyl-CoA Carboxylasegene *accBC*, *dtsR1* und *dtsR2* auf die Glutamatakkumulation von *C. glutamicum* ATCC13032 unter Biotinmangel gibt. Die gemeinsame Überexpression der möglicherweise für eine funktionelle Acyl-CoA Carboxylase kodierenden Gene *accBC* und *dtsR1* führte ebenfalls zur veränderten externen Glutamatkonzentration. Dabei wirkte sich die höhere Expression der Gene negativ auf die Glutamatakkumulation aus. Dies ist ein starker Hinweis, dass nicht das Enzym AccBCDA sondern das AccBCDtsR1 Enzym ein Target der Biotinlimitation sein könnte.

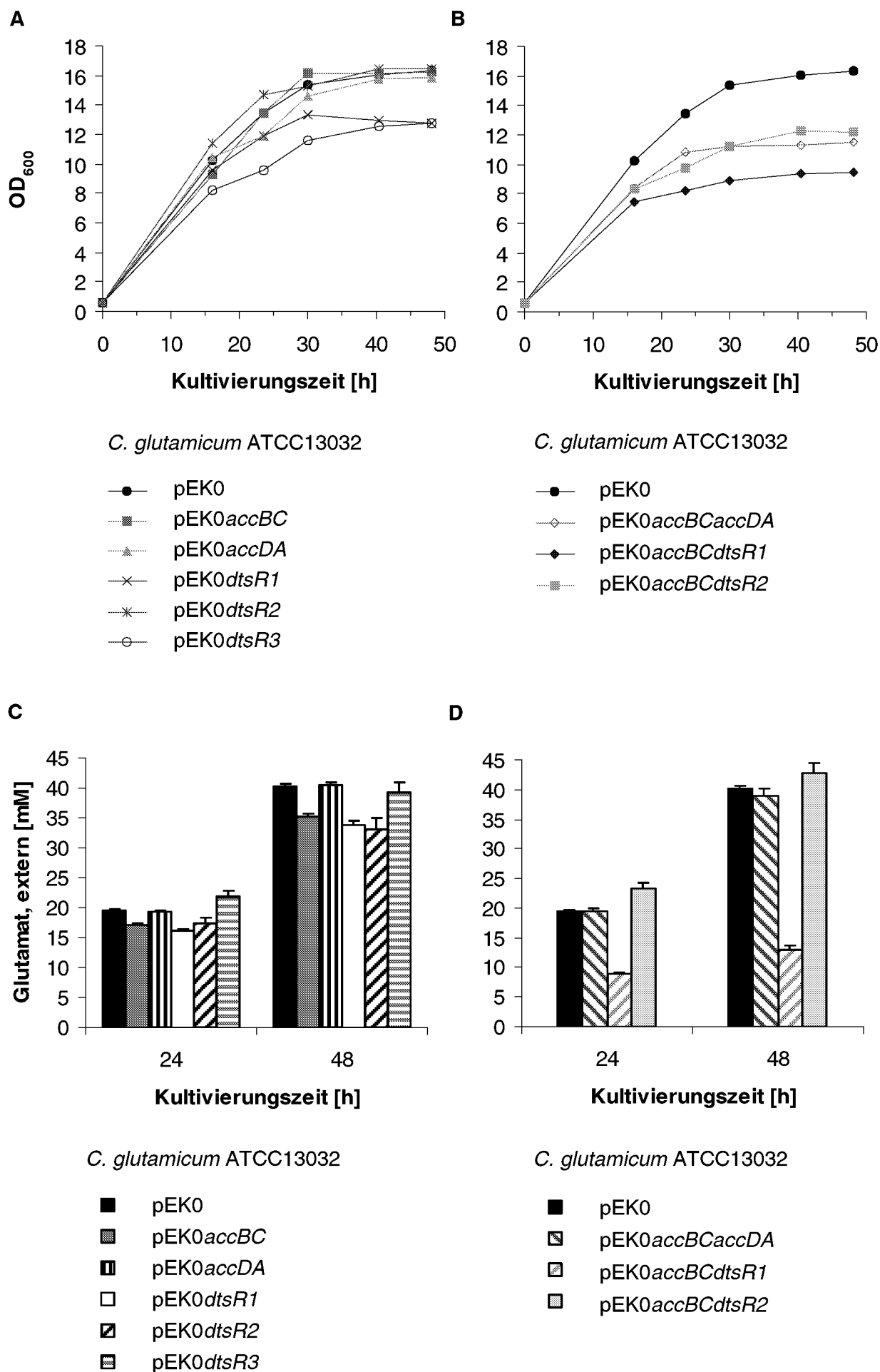


Abb. 11: Wachstum und externe Glutamatakkumulation von *C. glutamicum* ATCC13032 nach Überexpression der Gene *accBC*, *accDA*, *dtsR1*, *dtsR2* und *dtsR3* sowie *accBCaccDA*, *accBCdtsR1* und *accBCdtsR2* im Vergleich zum Kontrollstamm ATCC13032pEK0. Gezeigt ist das Wachstum über einen Zeitraum von 50 h (A / B) und die externen Glutamatkonzentrationen nach 24 h und 48 h (C / D). Die Werte ergaben sich aus Vierfachbestimmungen, für Stämme mit den Genen *dtsR2* und *dtsR3* aus Doppelbestimmungen.

3.2 Untersuchungen zur Lysinbildung nach Überexpression von Acyl-CoA Carboxylasegenen im Stamm MH20-22B

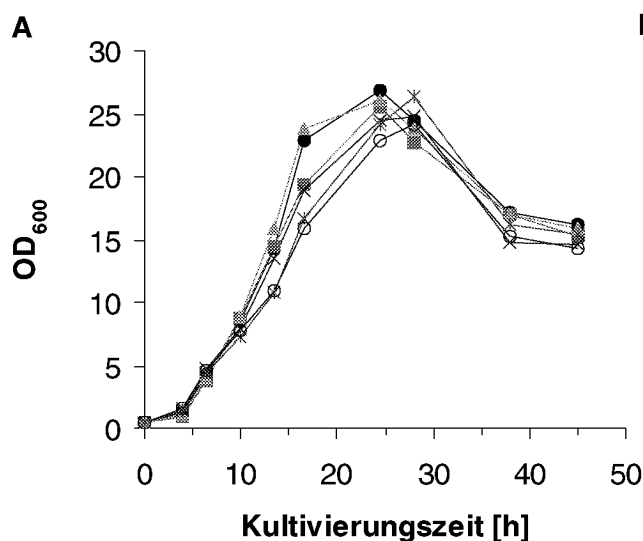
Bei den *C. glutamicum* Stämmen MH20-22B (Schrumpf *et al.*, 1992) und DG52-5 (Menkel *et al.*, 1989) handelt es sich um unterschiedlich gute Lysinproduzenten. Es wurde gezeigt, dass sich die Aktivität des LysE vermittelten Lysinexports (Vrljić *et al.*, 1996) in diesen Stämmen unterscheidet. Da aber weder das Membranpotential, der pH-Gradient oder der Lysingradient verändert war (Bröer *et al.*, 1993) noch Sequenzveränderungen im *lysE* Gen, im Regulatorgen oder deren Promotoren (Eggeling & Sahm, 2001; Vrljić, 1997) vorlagen, blieb unklar, was den Lysinefflux in diesen Stämmen verändert. Auch im Stamm 35/48 (Vrljić *et al.*, 1995), der überhaupt kein L-Lysin ausscheidet, waren die Gensequenzen unverändert. Vrljić (1997) vermutete daher, dass der Lysinexporter durch die Lipidumgebung beeinflusst wird. Eine Verbindung des Lysinexports mit der Lipidsynthese besteht durch das Gen *dtsR1*, da dessen Überexpression zur erhöhten Lysinproduktion führt (Kimura *et al.*, 1997b). Daher sollte untersucht werden, ob die Überexpression der Acyl-CoA Carboxylasegene die Lysinakkumulation verändert.

Dazu wurden zunächst die bereits konstruierten Plasmide pEK0*accBC*, pEK0*accDA*, pEK0*dtsR1*, pEK0*dtsR2*, pEK0*dtsR3*, pEK0*accBCaccDA*, pEK0*accBCdtsR1* und pEK0*accBCdtsR2* (siehe Abschnitt III.3.1 und Anhang 2.) durch Elektroporation in den Lysinproduzentenstamm MH20-22B eingebracht. Die so erhaltenen Stämme wurden über Nacht in CgIII Vollmedium vorkultiviert, mit einer anfänglichen OD₆₀₀ von 0,5 in CGXII Minimalmedium überimpft und das Wachstum über einen Zeitraum von 68 h verfolgt (Abb. 12 A / B). Im Vergleich zum Kontrollstamm MH20-22BpEK0 war das Wachstum der Stämme MH20-22BpEK0*accBC*, MH20-22BpEK0*accDA* und MH20-22BpEK0*dtsR1* nahezu identisch, während bei MH20-22BpEK0*dtsR2*, MH20-22BpEK0*dtsR3* und MH20-22BpEK0*accBCdtsR1* eine leichte Wachstumsverzögerung zu beobachten war (Abb. 12 A / B).

Eine deutliche Wachstumsverzögerung war beim Stamm MH20-22BpEK0*accBCaccDA* erkennbar. Auffällig war auch das Wachstumsverhalten des Stammes MH20-22BpEK0*accBCdtsR2*, der anfangs schneller als der Kontrollstamm wuchs, aber eine geringere End-OD₆₀₀ erreichte.

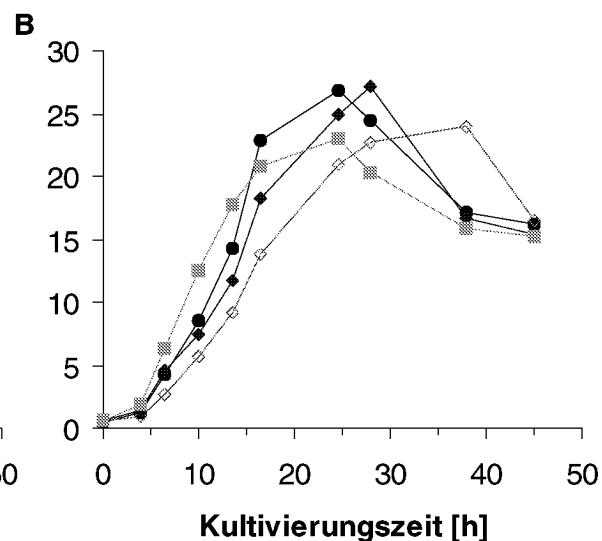
Nach 45 h und 68 h wurden die extrazellulären Lysinkonzentrationen bestimmt (Abb. 12 C / D). Danach war in den Stämmen MH20-22BpEK0*accDA* und MH20-22BpEK0*dtsR1* zwar eine leicht erhöhte Lysinakkumulation von 2,4 mM (3,3 %) und 4,0 mM (5,6 %) im Vergleich zum Kontrollstamm MH20-22BpEK0 mit 71,0 mM messbar, was aber nicht als signifikante Zunahme betrachtet werden kann. Die Akkumulation von L-Lysin durch den Stamm MH20-22BpEK0*accBCdtsR2* war mit 4,2 mM ebenfalls nur um 5,9 % erhöht. Der Stamm MH20-22BpEK0*accBCaccDA* zeichnete sich dagegen durch eine um 7,8 mM (11,0 %) verringerte Lysinkonzentration im Vergleich zum Kontrollstamm aus. Dies wurde auch in Untersuchungen mit einem Lysinproduzentenstamm der Degussa AG gezeigt, ebenso wie die leicht erhöhte Lysinakkumulation bei erhöhter *accDA* Expression (Daten nicht gezeigt). Dabei wurden die Untersuchungen mit Stämmen, in denen die Gene *dtsR2* und *dtsR3* überexprimiert wurden, zwei Mal durchgeführt. Die übrigen Werte ergeben sich aus Vierfachbestimmungen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass es geringfügige Einflüsse einiger überexprimierter Acyl-CoA Carboxylasegene auf die Lysinbildung von *C. glutamicum* MH20-22B gibt. Signifikant wirkte sich jedoch nur die gemeinsame Überexpression der für die funktionelle Acyl-CoA Carboxylase kodierenden Gene *accBC* und *accDA* aus.



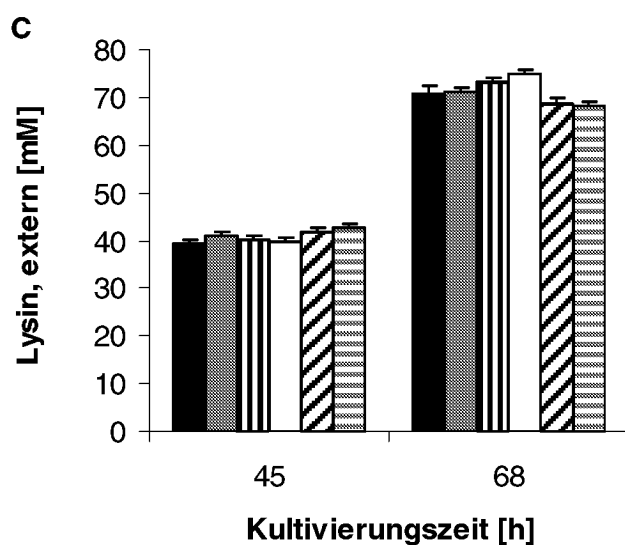
C. glutamicum MH20-22B

- pEK0
- pEK0accBC
- ▲ pEK0accDA
- × pEK0dtsR1
- * pEK0dtsR2
- pEK0dtsR3



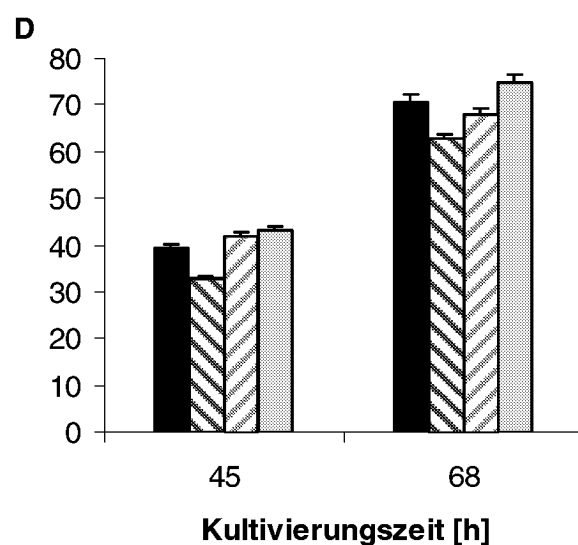
C. glutamicum MH20-22B

- pEK0
- ◇ pEK0accBCaccDA
- ◆ pEK0accBCdtsR1
- pEK0accBCdtsR2



C. glutamicum MH20-22B

- pEK0
- pEK0accBC
- ▨ pEK0accDA
- pEK0dtsR1
- ▤ pEK0dtsR2
- ▩ pEK0dtsR3



C. glutamicum MH20-22B

- pEK0
- ▨ pEK0accBCaccDA
- ▤ pEK0accBCdtsR1
- ▩ pEK0accBCdtsR2

Abb. 12: Wachstum und externe Lysinakkumulation von *C. glutamicum* MH20-22B nach Überexpression der Gene *accBC*, *accDA*, *dtsR1*, *dtsR2* und *dtsR3* sowie *accBCaccDA*, *accBCdtsR1* und *accBCdtsR2* im Vergleich zum Kontrollstamm MH20-22BpEK0. Gezeigt ist das Wachstum über einen Zeitraum von 50 h (A / B) und die externen Lysinkonzentrationen nach 45 h und 68 h (C / D). Die Werte ergaben sich aus Vierfachbestimmungen, für Stämme mit den Genen *dtsR2* und *dtsR3* aus Doppelbestimmungen.

4. Enzymatische Untersuchungen zum Nachweis von Acyl-CoA Carboxylaseaktivitäten in *C. glutamicum* ATCC13032

Die Aminosäuresequenzidentitäten der Genprodukte von *accBC* und *accDA* zu Acetyl-CoA Carboxylaseuntereinheiten von *E. coli* (Abb. 3) (Jäger *et al.*, 1996) deuteten darauf hin, dass die beiden Polypeptide eine funktionelle Acyl-CoA Carboxylase in *C. glutamicum* bilden und wahrscheinlich die Initiationsreaktion der Fettsäurebiosynthese katalysieren. Auch die Ergebnisse zum Wachstum der *dtsR1*, *dtsR2* und *dtsR3* Integrationsmutanten (Abb. 10) und die Aminosäureidentitäten der Genprodukte zu Carboxyltransferasen weisen darauf hin, dass es sich bei den Genprodukten um Untereinheiten von Acyl-CoA Carboxylasen handelt. Um zu überprüfen, ob die Genprodukte von *accBC*, *accDA*, *dtsR1* und *dtsR2* Untereinheiten dieser Enzyme darstellen, sollten die Gene in *C. glutamicum* ATCC13032 überexprimiert und Acyl-CoA Carboxylaseaktivitäten gemessen werden.

4.1 Nachweis und Trennung von CoA-Derivaten und Etablierung eines diskontinuierlichen Enzymtests

Trennung von CoA-Derivaten

Um die Produkte der Acyl-CoA Carboxylasereaktion mittels HPLC nachweisen und quantifizieren zu können, wurde zuerst die Trennung von CoA und CoA-Derivaten durch das Analyseprogramm von Spies (1996) validiert. Dazu wurde die Trennung von CoA und CoA-Verbindungen einzeln sowie eines 0,2 mM Standardgemisches aus CoA und den Derivaten

Acetyl-, Malonyl-, Propionyl-, Methylmalonyl-, Butyryl-, Succinyl- und β -Methylcrotonyl-CoA durch die HPLC untersucht. Es zeigte sich, dass sich die Signale des Methylmalonyl-CoA- und des Succinyl-CoA-Peaks unter den gewählten Bedingungen vollständig überlagerten. Da Methylmalonyl-CoA ein Produkt der Acyl-CoA Carboxylase bei der Umsetzung von Propionyl-CoA ist, war es wichtig, das Trennsystem zu verändern und zu optimieren. Dazu wurden nacheinander das anfängliche Mischungsverhältnis von polarer und apolarer Phase, das apolare Laufmittel, der Gradient und die Äquilibrationszeit der Säule zwischen zwei Trennläufen variiert. Nachdem auch die Sensitivität und Selektivität des UV-Detektors angepasst war, gelang es, das Signal von Methylmalonyl- und Succinyl-CoA konstant in zwei Signale aufzutrennen, die dann eine separate Integration zuließen (Abb. 13). Das erstellte Programm und die gewählten Trennbedingungen sind in Abschnitt II.4.2 beschrieben.

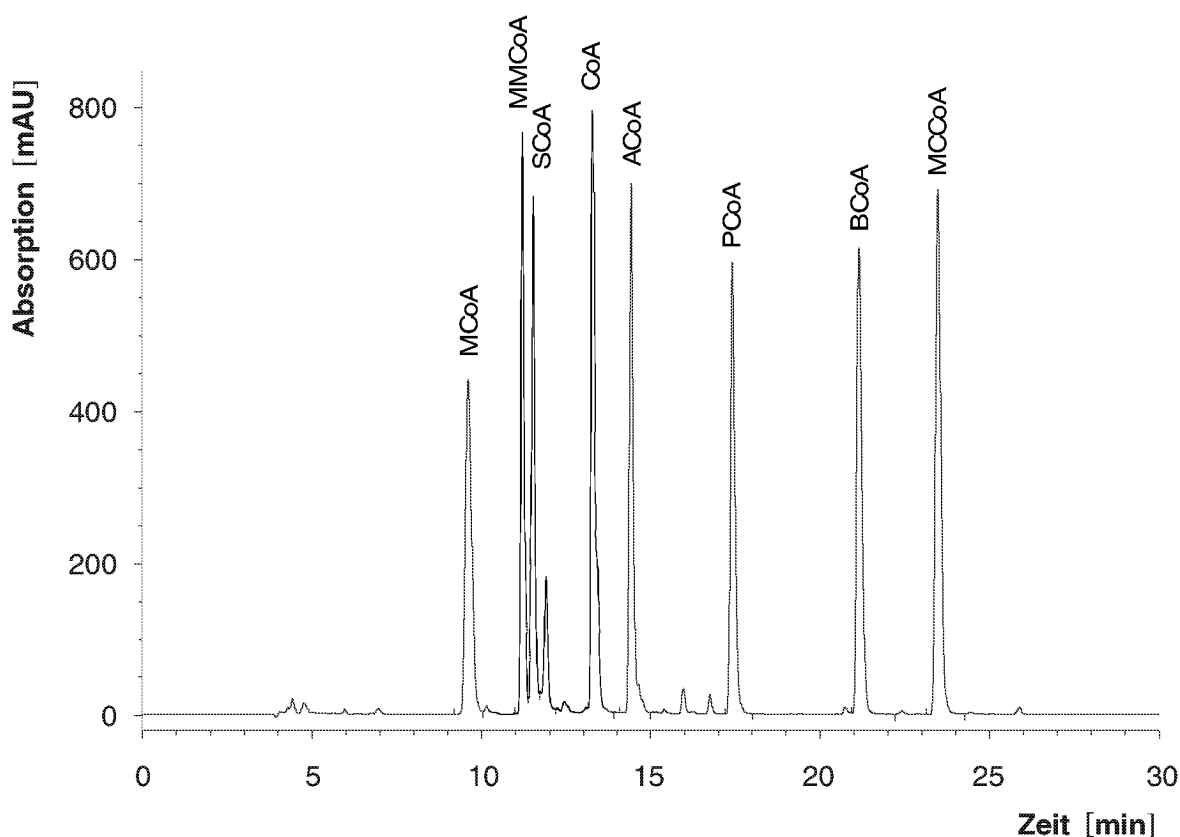


Abb. 13: HPLC-Chromatogramm der Trennung eines Standardgemisches aus CoA und den CoA-Derivaten Malonyl-CoA (MCoA), Methylmalonyl-CoA (MMCoA), Succinyl-CoA (SCoA), Acetyl-CoA (ACoA), Propionyl-CoA (PCoA), Butyryl-CoA (BCoA) und β -Methylcrotonyl-CoA (MCCoA). Jede Substanz lag in einer Konzentration von 0,2 mM vor. Die Verbindungen wurden bei einer Wellenlänge von 254 nm mittels UV-Detektor nachgewiesen.

Die Zuordnung definierter Retentionszeiten ermöglichte die Identifizierung jeder CoA-Verbindung in einem Gemisch, so dass eine wichtige Voraussetzung für die enzymatischen Untersuchungen geschaffen war.

Etablierung eines diskontinuierlichen Enzymtests

Acyl-CoA Carboxylasen (AcylCC) katalysieren die in Abbildung 14 am Beispiel von Acetyl-CoA gezeigte Carboxylierung von Acyl-CoA Derivaten zu α -Carboxyacetyl-CoA Derivaten unter Verbrauch von ATP und Bicarbonat (Polakis *et al.*, 1974; Alberts & Vagelos, 1972). Die Reaktion ist abhängig von der prosthetischen Gruppe Biotin und verläuft in zwei Teilschritten (Knowles, 1989; Samols *et al.*, 1988). Im Gegensatz zum *E. coli* Enzym, das nur Acetyl-CoA aber nicht Propionyl-CoA umsetzt (Alberts & Vagelos, 1968), katalysieren nahezu alle bisher charakterisierten bakteriellen AcylCCs sowohl den Umsatz von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA als auch den Umsatz von Propionyl-CoA zu Methylmalonyl-CoA (duale Substratspezifität) (Rodríguez & Gramajo, 1999; Kimura *et al.*, 1997; Wheeler *et al.*, 1992; Hunaiti & Kolattukudy, 1982; Henrikson & Allen, 1979; Erfle, 1973). In seltenen Fällen ist gezeigt, dass Acyl-CoA Carboxylasen auch Butyryl- und Succinyl-CoA umsetzen können (Kimura *et al.*, 1998; Hunaiti & Kolattukudy, 1982; Rainwater & Kolattukudy, 1982).

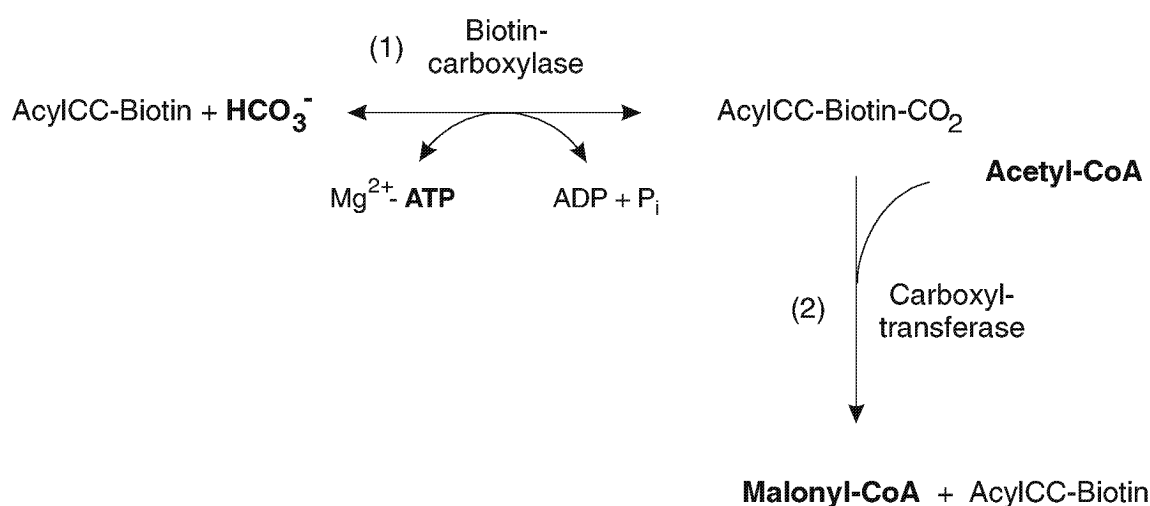


Abb. 14: Schematische Darstellung der beiden von Acyl-CoA Carboxylasen (AcylCC) katalysierten Teilreaktionen (1) und (2) durch die Untereinheiten Biotincarboxylase-Biotincarboxylcarrierprotein und Carboxyltransferase am Beispiel des Substrates Acetyl-CoA.

Zunächst wurde versucht, eine AcylCC-Aktivität im Rohextrakt des Wildtyps *C. glutamicum* ATCC13032 zu messen. Dafür wurde der Stamm in CGIII Medium mit 2 % Glukose und 2 mg / L Biotin kultiviert und die Bakterienzellen in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Es wurde ein diskontinuierlicher Enzymtest mit dem Substrat Acetyl-CoA durchgeführt. Die HPLC Analyse ergab, dass das Produkt Malonyl-CoA entstanden war, zudem aber unbekannte Substanzen des Rohextraktes zusätzliche Signale ergaben. Zur sicheren Identifizierung des Produktpeaks Malonyl-CoA im Chromatogramm wurde die Probe nach Zusatz einer definierten Menge Malonyl-CoA nochmals mittels HPLC analysiert. Durch die Erhöhung des zuvor bestimmten Signales wurde dieses dann eindeutig als Malonyl-CoA Peak ermittelt. Durch Optimierung der Parameter ATP-, Substrat- und Gesamtprotein-konzentration wurde ein Testsystem etabliert, das die Bestimmung einer AcylCC-Aktivität ermöglichte. Es stellte sich heraus, dass die in der Literatur beschriebenen Inkubationszeiten variierend zwischen 15 Minuten und 1 Stunde (Rodríguez & Gramajo, 1999; Kimura *et al.*, 1997) längst nicht mehr im linearen Messbereich lagen. Diese Beobachtung ist möglicherweise auf eine geringe Stabilität des Enzymkomplexes zurückführbar. Um eine lineare Zunahme des Produktes zu erhalten, wurden die Inkubationszeiten daher auf 40 Sekunden begrenzt und zur Aufnahme einer Kinetik Proben nach 10, 20, 30 und 40 Sekunden entnommen (vergleiche Abschnitt II 5.2). Die spezifische Enzymaktivität des Wildtyps mit Acetyl-CoA betrug 55 ± 5 mU / mg Protein. Anschliessend wurde überprüft, ob auch der Umsatz von Propionyl-CoA durch den Rohextrakt messbar ist. Die Quantifizierung des gebildeten Methylmalonyl-CoAs ergab eine spezifische AcylCC-Aktivität von 105 ± 4 mU / mg Protein.

Diese Ergebnisse zeigten, dass es in *C. glutamicum* ATCC13032 eine Acetyl-CoA Carboxylase- und eine Propionyl-CoA Carboxylaseaktivität gibt, die durch ein oder mehrere Enzyme katalysiert werden könnten. Die Bestimmung der Enzymaktivitäten nach Überexpression der möglicherweise für Acyl-CoA Carboxylasen kodierenden Gene sollte im Folgenden zeigen, ob die Genprodukte an der enzymatischen Reaktion beteiligt sind.

4.2 Bestimmung der spezifischen Enzymaktivitäten bei Überexpression von Acyl-CoA Carboxylasegenen

Alle bislang funktionell charakterisierten Acyl-CoA Carboxylasen bestehen aus biotinylierten α -Untereinheiten, AccBC, und β -Untereinheiten, vermutlich AccDA, DtsR1, DtsR2 und DtsR3

in *C. glutamicum* (Kimura *et al.*, 1998; Haase *et al.*, 1982; Hunaiti & Kolattukudy, 1982; Rainwater & Kolattukudy, 1982). Daher sollten die Gene *accBC*, *accDA*, *dtsR1* und *dtsR2* nicht nur einzeln sondern auch in Kombinationen aus Biotincarboxylase-Biotincarboxyl-carrierproteingen *accBC* und je einem der putativen Carboxyltransferasogene überexprimiert und die spezifischen Acyl-CoA Carboxylaseaktivitäten gemessen werden.

Die bereits konstruierten Stämme (siehe Abschnitt 3.1 und Anhang 2.) wurden in CGIII Medium mit 2 % Glukose und 2 mg / L Biotin kultiviert. Durch den Zusatz von Biotin sollte sichergestellt werden, dass die überexprimierte α -Untereinheit AccBC vollständig biotinyliert vorliegt (Chapman-Smith & Cronan, 1999).

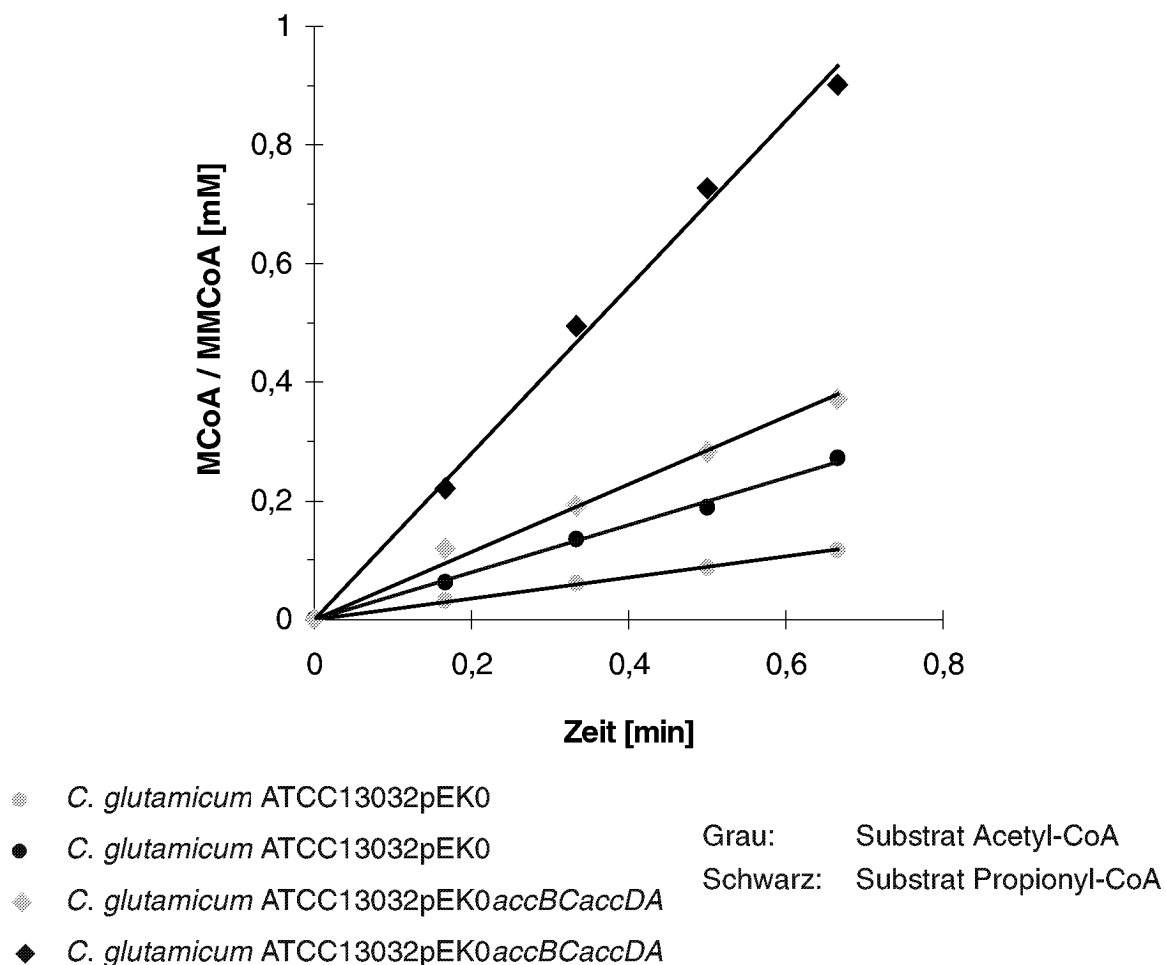


Abb. 15: Umsatz von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA und von Propionyl-CoA zu Methylmalonyl-CoA durch den Stamm *C. glutamicum* ATCC13032pEK0*accBCaccDA* im Vergleich zum Kontrollstamm *C. glutamicum* ATCC13032pEK0.

<i>C. glutamicum</i> Stamm ATCC13032	Spezifische Acyl-CoA Carboxylaseaktivität	
	Acetyl-CoA [mU / mg Protein]	Propionyl-CoA [mU / mg Protein]
pEK0	55 ± 5	105 ± 4
pEK0 <i>accBC</i>	48 ± 6	112 ± 7
pEK0 <i>accDA</i>	56 ± 4	99 ± 5
pEK0 <i>dtsR1</i>	51 ± 5	101 ± 5
pEK0 <i>dtsR2</i>	50 ± 4	106 ± 4
pEK0 <i>accBCaccDA</i>	161 ± 9	408 ± 12
pEK0 <i>accBCdtsR1</i>	54 ± 4	135 ± 5
pEK0 <i>accBCdtsR2</i>	45 ± 3	116 ± 6

Tab. 4: Spezifische Acyl-CoA Carboxylaseaktivitäten im Rohextrakt von *C. glutamicum* ATCC13032pEK0 und im Rohextrakt bei Überexpression von Acyl-CoA Carboxylasegenen in Abhängigkeit der Substrate Acetyl- und Propionyl-CoA. Erhöhte Aktivitäten sind durch Fettdruck hervorgehoben.

Die Acyl-CoA Carboxylaseaktivität wurde anhand des Umsatzes von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA und von Propionyl-CoA zu Methylmalonyl-CoA gemessen und die Produktmenge mittels HPLC quantifiziert. Es zeigte sich eine deutliche Erhöhung beider Aktivitäten durch die gemeinsame Überexpression der Gene *accBC* und *accDA* im Vektor pEK0*accBCaccDA* (Abb. 15). Die Berechnung der spezifischen Acyl-CoA Carboxylaseaktivitäten ergab, dass sowohl die Überexpression des Biotincarboxylase-Biotincarboxylcarrierproteingens (*accBC*) als auch der Carboxyltransferasegene (*accDA*, *dtsR1*, *dtsR2*) keine Veränderung der im Wildtyp gemessenen Enzymaktivitäten bewirkte (Tab. 4). Im Vergleich zum Kontrollstamm mit dem Leerplasmid pEK0 wurde aber eine ca. dreifach gesteigerte spezifische Acyl-CoA Carboxylaseaktivität nach pEK0*accBCaccDA* Überexpression von 55 ± 5 mU / mg Protein auf 161 ± 9 mU / mg Protein mit dem Substrat Acetyl-CoA und von 105 ± 4 mU / mg Protein auf 408 ± 12 mU / mg Protein mit dem Substrat Propionyl-CoA gemessen. Diese für ein in etwa 20facher Kopienzahl vorliegendes Plasmid eher geringfügige Aktivitätssteigerung war

auch nach Überexpression der Biotincarboxylase und des Biotincarboxylcarrierproteins von *E. coli* messbar (Li & Cronan, 1993). Sie wird dort auf eine Transkriptionskontrolle durch einen positiven Aktivator zurückgeführt (Magnuson *et al.*, 1993). Die gemeinsame Überexpression der Gene *accBC* und *dtsR1* sowie der Gene *accBC* und *dtsR2* hatte keinen Effekt auf die Acyl-CoA Carboxylaseaktivitäten.

Eine alternative Acyl-CoA Carboxylasereaktion, die auch bei *Mycobacteriaceae* gefunden wurde, stellt der Umsatz von β -Methylcrotonyl-CoA zu β -Methylglutaconyl-CoA dar (Lynen *et al.*, 1961). Um zu überprüfen, ob die Gene *dtsR1* oder *dtsR2* für Carboxyltransferasen mit einer solchen Substratspezifität kodieren, wurde ein Enzymtest mit Wildtypextrakt und dem Substrat β -Methylcrotonyl-CoA durchgeführt. Es stellte sich aber heraus, dass eine solche Aktivität in *C. glutamicum* nicht messbar war.

Durch diese Untersuchungen konnte erstmals belegt werden, dass AccBC zusammen mit AccDA einen Acyl-CoA Carboxylasekomplex bildet. Dieser Enzymkomplex setzt sowohl Acetyl-CoA als auch Propionyl-CoA um und weist somit eine duale Substratspezifität auf. Da die Überexpression von *accBC* und *accDA* alleine keine Aktivitätssteigerung ergab, müssen zudem beide Untereinheiten (α / β) zur Bildung eines aktiven Enzymkomplexes vorliegen. Die Funktion der Genprodukte von *dtsR1* und *dtsR2* bleibt ungeklärt.

5. Proteinbiochemische Untersuchungen zum Aufbau der nativen Acyl-CoA Carboxylasen

Die Ergebnisse der Enzymaktivitätsmessungen haben gezeigt, dass es mindestens eine Acyl-CoA Carboxylase in *C. glutamicum* gibt, die durch die biotinylierte Untereinheit AccBC und durch die Untereinheit AccDA gebildet wird. Um diesen Enzymkomplex zu charakterisieren und um zu überprüfen, ob das Biotincarboxylase-Biotincarboxylcarrierprotein auch mit einer der anderen Carboxyltransferasen interagiert, wurden proteinbiochemische Untersuchungen mittels Gelfiltrationschromatographie und Western Blot Analysen durchgeführt. Für die Versuche wurde der Stamm *C. glutamicum* ATCC13032 Δ *pyc* (Peters-Wendisch *et al.*, 1998) verwendet, in dem das zweite biotinylierte *C. glutamicum* Protein, die Pyruvatcarboxylase (Peters-Wendisch, 1996), deletiert ist. Dadurch wurde verhindert, dass dieses Protein coisoliert oder als Kreuzreaktion mit dem Streptavidinkonjugat nachgewiesen wird. Um zudem keine Effekte durch die Überexpression

einzelner Untereinheiten zu erhalten, wurde ausschließlich im Wildtyp ohne Überexpression von Acyl-CoA Carboxylasegenen gearbeitet.

5.1 Bestimmung der Größe des biotinhaltigen Enzymkomplexes mittels Gelfiltrationschromatographie

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes der Acyl-CoA Carboxylase mittels Gelfiltrationschromatographie wurde zunächst ein zellfreier Extrakt des Stammes *C. glutamicum* ATCC13032 Δ *pyc* hergestellt. Dazu wurden 1,6 L Bakterienzellen in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und in einem mit Proteaseinhibitor versetzten Natriumphosphat-Natriumchloridpuffer aufgenommen. Nach Ultraschallaufschluss der Zellen und Ultrazentrifugation erfolgte eine zehnfache Einengung des Extraktes durch Größenausschlusszentrifugation (Ausschlussgröße: 30 kDa; vergleiche Abschnitt II. 6.1). Mit dem Rohextraktkonzentrat wurde eine Gelfiltrationschromatographie mit einer Superdex 200 Säule durchgeführt und die in Abhängigkeit ihres Molekulargewichtes getrennten Proteine fraktioniert. Das Elutionsprofil des Rohextraktes (Abb. 16 A - Liniendiagramm) ergab, dass ein großer Teil der im Rohextrakt vorliegenden Proteine in Enzymkomplexen mit Molekulargewichten zwischen 270.000 und Molekulargewichten größer als 700.000 vorliegen.

Um herauszufinden, in welchen Fraktionen die Acyl-CoA Carboxylase eluiert worden war, wurde eine Gelfiltration durchgeführt, von der die Enzymaktivität jeder zweiten Fraktion gemessen wurde. Dafür wurden 26 Fraktionen zwischen 100 mL (Proteinkomplexe > 700 kDa) und 230 mL (Proteine um 20 kDa) Elutionsvolumen ausgewählt und zehnfach eingengt. Je 20 μ L der Proteinkonzentrate wurden anschliessend in Enzymtests mit den Substraten Acetyl-CoA (ACoA) und Propionyl-CoA (PCoA) eingesetzt und das entstandene Produkt mittels HPLC quantifiziert. Das Ergebnis in Abbildung 16 A (Balkendiagramm) zeigt, dass beide CoA-Substrate zu den entsprechenden Produkten Malonyl- und Methylmalonyl-CoA umgesetzt wurden. Es fiel auf, dass die gemessenen ACoA und PCoA Carboxylaseaktivitäten nicht proportional zueinander waren. Die Auswertung ergab ein Aktivitätsmaximum für den Umsatz von ACoA in Fraktionen mit Enzymkomplexen einer Größe von 625 ± 60 kDa. Das Aktivitätsmaximum für den Umsatz von PCoA wurde hingegen in Fraktionen gemessen, in denen Proteine einer Größe von 440 ± 30 kDa eluiert worden waren. Daraus wurde geschlossen, dass es sich bei den Messwerten um überlagernde und möglicherweise auch addierende Aktivitäten mehrerer Enzymkomplexe unterschiedlichen Molekulargewichtes handelt. Vorstellbar ist, dass ein Enzymkomplex aus AccBC und AccDA

die bereits in Enzymtests gemessenen Acetyl- und Propionyl-CoA Carboxylaseaktivitäten katalysiert (siehe Tab. 4). Da noch keine Untersuchungen zur Funktion des *dtsR3* Gens in Enzymtests durchgeführt wurden, könnten überlagernde Acyl-CoA Carboxylaseaktivitäten durch einen Enzymkomplex aus AccBC und DtsR3 katalysiert werden.

Diese Ergebnisse führten zu dem Schluss, dass es mehrere Acyl-CoA Carboxylasekomplexe in *C. glutamicum* gibt. Der 625 ± 60 kDa Proteinkomplex könnte sich aus der α -Untereinheit und einer der vier bzw. verschiedener β -Untereinheiten im molaren Verhältnis von 6:6 zusammensetzen. Der 440 ± 30 kDa Proteinkomplex könnte sich aus einer $\alpha_4\beta_4$ Anordnung ergeben. Um welche der vier β -Untereinheiten es sich jeweils handelt, konnte aufgrund deren ähnlicher Molekulargewichte nicht bestimmt werden.

5.2 Immunologischer Nachweis der Untereinheiten der Acyl-CoA Carboxylasen nach gelfiltrationschromatographischer Trennung des Proteinrohextraktes

Im Folgenden wurde untersucht, welche Acyl-CoA Carboxylaseuntereinheiten in den Fraktionen, in denen Enzymaktivitäten messbar waren, vorliegen. Dadurch sollte gezeigt werden, welche Untereinheiten den 625 kDa und den 440 kDa Enzymkomplex aufbauen könnten. Da der Nachweis der Enzymuntereinheiten in Western Blot Analysen erfolgen sollte, wurden Peptidantikörper gegen die Carboxyltransferasen AccDA, DtsR1 und DtsR3 hergestellt und getestet (siehe Abschnitt III 6.3, Anhang 1. / 4.). Die Überprüfung der Peptidantikörper ergab, dass der gegen AccDA gerichtete Antikörper in hoher Konzentration (1:150) eingesetzt werden musste, um das Protein nachweisen zu können, und dass zudem mehrere Proteine von dem Antikörper erkannt wurden. Da das Signal nach Überexpression von *accDA* verstärkt werden konnte, wurde gefolgert, dass AccDA nur in geringen Mengen im Rohextrakt von *C. glutamicum* vorliegt. Der Antikörper gegen DtsR1 ergab einen deutlichen Nachweis des Proteins in einer 1:10.000 Verdünnung, detektierte zudem aber vier weitere Proteine. Der Antikörper gegen das DtsR3 Protein ergab in einer Verdünnung von 1:2.000 ein deutliches Signal, detektierte aber insgesamt zehn Proteine.

Zum Nachweis von AccBC, AccDA, DtsR1 und DtsR3 wurde zunächst eine weitere Gelfiltrationschromatographie unter Einhaltung der zuvor beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Die Proteine aus Aliquots der 45 Fraktionen wurden auf 10 %igen SDS Gelen aufgetrennt und das Vorliegen der Acyl-CoA Carboxylaseuntereinheiten in Western Blot

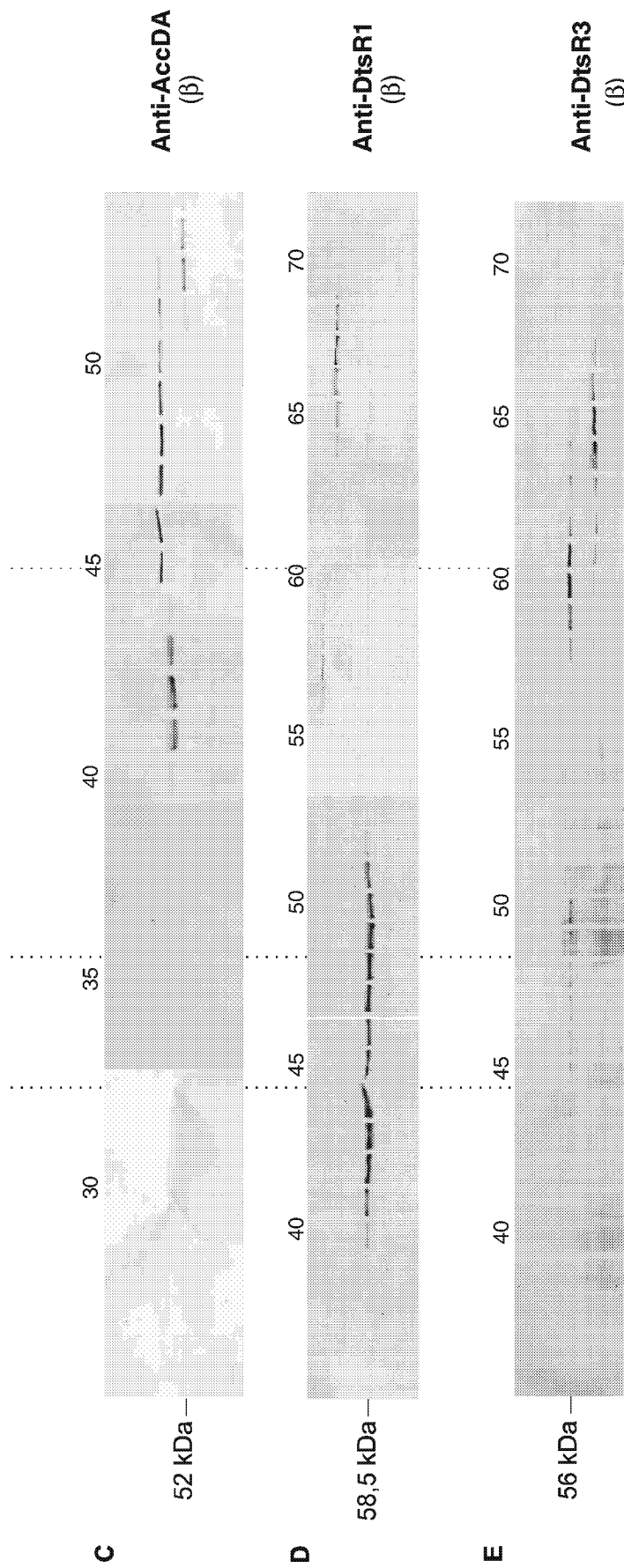


Abb. 16: Größentrennung nativer Proteine des zellfreien Rohextraktes von *C. glutamicum* ATCC13032 Δ pyc mittels Gelfiltration (A-Liniendiagramm) und gemessene Acyl-CoA Carboxylaseaktivitäten in jeder zweiten Fraktion (A-Balkendiagramm). Entstandenes Malonyl-CoA (MCoA) aus Acetyl-CoA und Methylmalonyl-CoA (MMCoA) aus Propionyl-CoA wurde gegen die molaren Massen der Enzymkomplexe in der jeweiligen Fraktion aufgetragen. Molare Massen einzelner Untereinheiten des Acyl-CoA ausserhalb der Eichgeraden und sind daher nicht angegeben. Der Nachweis einzelner Untereinheiten des Acyl-CoA Carboxylasekomplexes erfolgte in Western-Blot Analysen mit dem Streptavidin-AP Konjugat gegen die α -Untereinheit AccBC (B) und mit den Peptidantikörpern gegen die β -Untereinheiten AccDA (C), DtsR1 (D) und DtsR3 (E). Die Zahlen über den Blots geben die Fraktionsnummer an. Die molaren Massen der detektierten Untereinheit sind links neben den Blots angegeben. α : α -Untereinheit der Acyl-CoA Carboxylasen; β : β -Untereinheit der Acyl-CoA Carboxylasen.

Die Hauptmenge der Carboxyltransferaseuntereinheit DtsR1 wurde mit dem gegen diese Untereinheit gerichteten Antikörper spezifisch in Fraktionen mit hochmolekularen Proteinkomplexen eines Molekulargewichtes von 500.000 ± 40.000 nachgewiesen (Abb. 16 D). In diesen Fraktionen war auch das AccBC Protein detektiert und Enzymaktivitäten gemessen worden. Zusätzlich wurde DtsR1 in geringerer Menge in den Fraktionen 58-66 bestimmt, in denen Proteinkomplexe mit einem Molekulargewicht von 113.000 ± 9.000 eluiert wurden. Das Vorliegen eines Dimers dieser Untereinheit (M_r : 117.000) oder eine Verbindung des DtsR1 Monomers mit AccBC (M_r : 121.900) würden dieses Molekulargewicht ergeben. Da die Messung der Enzymaktivitäten nach gemeinsamer Expression von *accBC* mit *dtsR1* (siehe Tab. 4) zu keinen erhöhten Acyl-CoA Carboxylaseaktivitäten führten, ist es unwahrscheinlich, dass AccBC mit DtsR1 den 625 kDa oder den 440 kDa Komplex bildet. Die Untersuchung wurden aber als Hinweis gewertet, dass AccBC möglicherweise mit DtsR1 einen Enzymkomplex bildet, der ein bisher unbekanntes Substrat umsetzen könnte.

Zuletzt wurde untersucht, in welchen Fraktionen die β -Untereinheit DtsR3 vorliegt. Abbildung 16 E zeigt, dass auch DtsR3 in Fraktionen mit nativen Proteinkomplexen eines hohen Molekulargewichtes von 400.000 ± 32.000 und in Fraktionen mit Proteinkomplexen eines geringeren Molekulargewichtes von 125.000 ± 10.000 detektierbar war. Das Molekulargewicht von 125.000 ± 10.000 deutet auf eine Dimerbildung von DtsR3 (M_r : 112.000) oder einem Komplex aus DtsR3 und AccBC (M_r : 119.400) hin. Zudem stimmen die Fraktionen, in denen DtsR3 detektiert wurde, mit denjenigen überein, in denen AccBC nachgewiesen und in denen Enzymaktivitäten gemessen wurden. Daher könnte DtsR3 zusammen mit AccBC den 440 kDa Komplex bilden.

Zusammenfassend wurde durch diese Versuche gezeigt, dass die biotinylierte α -Untereinheit AccBC und die β -Untereinheiten DtsR1 und DtsR3 nativ in hochmolekularen, multimeren Enzymkomplexen im Rohextrakt von *C. glutamicum* ATCC13032 Δ *pyc* vorliegen und daher miteinander interagieren könnten. Dabei könnte DtsR3 mit AccBC den 440 kDa Enzymkomplex bilden. Der Aufbau des 625 kDa Komplexes ist dagegen noch unklar. Da nach gemeinsamer Überexpression der Gene *accBC* und *dtsR1* bzw. *accBC* und *dtsR2* weder mehr ACoA noch mehr PCoA umgesetzt wurde (siehe Tab. 4), ist es unwahrscheinlich, dass DtsR1 oder DtsR2 diesen Komplex mit AccBC bilden. AccDA wurde aber nur als Monomer detektiert, so dass auch für diese Untereinheit eine Beteiligung am Aufbau dieses Komplexes unwahrscheinlich ist. Eventuell gelingt die Detektion mit dem Antikörper gegen das AccDA Protein in den hochmolekularen Fraktionen aufgrund dessen Konzentration nicht. Grundsätzlich deutet das Vorliegen von Dimeren der Proteine AccBC, DtsR1 und DtsR3 auf einen teilweisen Zerfall der Acyl-CoA Carboxylasekomplexe hin, da in diesen Fraktionen keine Enzymaktivitäten gemessen wurden.

5.3 Isolierung der biotinylierten Acyl-CoA Carboxylaseuntereinheit und Identifizierung coisolierter Proteine

Da AccBC das einzige Biotincarboxylase-Carboxyltransferaseprotein in *C. glutamicum* ist (Peters-Wendisch, 1996), aber vier Carboxyltransferasen identifiziert wurden, wurde von Anfang an postuliert, dass AccBC mit mehreren Carboxyltransferasen interagiert. Darauf deutete auch das durch den immunologischen Nachweis gezeigte Vorliegen der Acyl-CoA Carboxylaseuntereinheiten AccBC, DtsR1 und DtsR3 in hochmolekularen Enzymkomplexen hin. Um zu überprüfen, welche der vier β -Untereinheiten mit AccBC wechselwirken, wurde die Möglichkeit genutzt, dass das biotinylierte AccBC Protein und mit ihm verbundene Proteine spezifisch über Avidin isoliert werden könnten. Die Coisolation des zweiten biotinylierten Proteins aus *C. glutamicum*, der Pyruvatcarboxylase (*pyc*) (Peters-Wendisch, 1996), wurde vermieden, indem der Stamm *C. glutamicum* ATCC13032 Δ *pyc* (Peters-Wendisch *et al.*, 1998) als Ausgangsstamm zur Reinigung gewählt wurde. Mit AccBC verbundene Proteine sollten dann mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie identifiziert werden.

Zu diesem Zweck wurden zunächst die Proteine des Rohextraktes von *C. glutamicum* ATCC13032 Δ *pyc* mittels Gelfiltrationschromatographie getrennt und diejenigen Fraktionen, in denen in vorhergehenden Experimenten der Hauptteil der biotinhaltigen Untereinheit AccBC immunologisch detektierbar war (Fraktion 30-36; Abb. 16 B), zu einer Probe vereinigt. Diese Probe wurde auf eine Avidinaffinitätssäule aufgetragen. Die Elution der Proteine erfolgte unter nativen Bedingungen, um so an AccBC gebundene Untereinheiten zu isolieren. Alle proteinhaltigen Fraktionen der Affinitätssäule wurden vereinigt und durch Größenausschlusszentrifugation vierzigfach eingeeengt. Anschliessend erfolgte die Trennung der isolierten Enzymkomplexe in einzelne Untereinheiten mittels SDS Gelelektrophorese. Die Coomassiefärbung des Geles zeigte, dass im wesentlichen vier Proteine mit molaren Massen von 64 kDa, 58 kDa, 56 kDa und 52 kDa vorlagen (Abb. 17 A). Diese Proteine, deren Molekulargewichte mit denen der Acyl-CoA Carboxylaseuntereinheiten übereinstimmen, wurden isoliert, mit Trypsin gespalten und mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert. Die erhaltenen Massen wurden mit denen der Degussa AG Datenbank (Abb. 17 B) verglichen. Der Vergleich ergab, dass es sich bei dem 64 kDa Protein um AccBC handelte, dessen Aminosäuresequenz zu 44 % durch die erhaltenen Massen erfasst wurde. Das 58 kDa Protein wurde als DtsR2 identifiziert (18 %ige Proteinsequenzerrfassung). Überraschend war, dass das 56 kDa Protein als Propionyl-CoA Carboxylase β -Untereinheit identifiziert wurde, die weder dem bis dahin bekannten Protein AccDA noch DtsR1 oder DtsR2 entsprach. Stattdessen wurde dieses unbekannte 56 kDa Protein (20 %ige Proteinsequenzerrfassung) als vierte Carboxyltransferaseuntereinheit ermittelt.

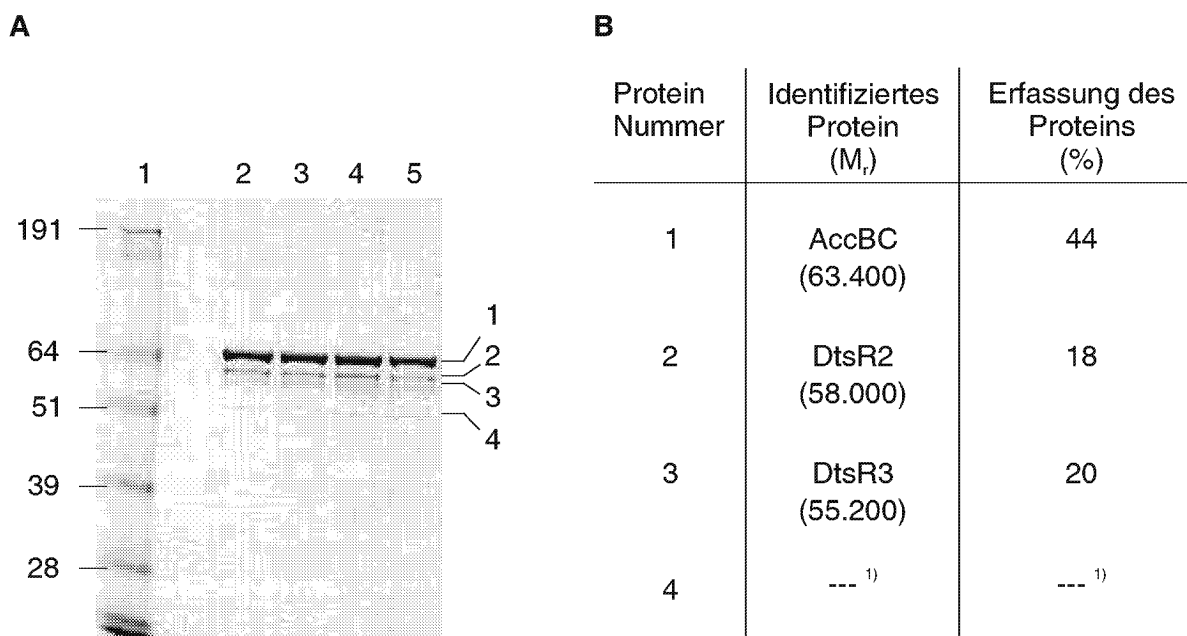


Abb. 17: Nachweis und Identifizierung der mit der biotinylierten α -Untereinheit AccBC nach Avidinaffinitätschromatographie coisolierten Proteine. Gezeigt ist die Trennung isolierter Enzymkomplexe in einzelne Untereinheiten (1-4) auf einem SDS Gel (A) und die durch MALDI-TOF Massenspektrometrie und Datenbankvergleich identifizierten Proteine (B). ¹⁾ Die erhaltenen Massen konnten keinem Protein zugeordnet werden. Auftragung des Geles:

- A** Spur 1: Molekulargewichtsstandard (Größenangabe in kDa)
 Spur 2-5: Probe des konzentrierten Proteinextraktes

Aufgrund der hohen Identitäten zwischen den Aminosäuresequenzen dieser Carboxyltransferase und DtsR1 von 44 % wurde das Protein DtsR3 genannt. Eine eindeutige Zuordnung des 52 kDa Proteins war anhand der detektierten Massen nicht möglich. Obwohl zuvor mehrere Banden paralleler Spuren des Geles vereinigt worden waren, war die Proteinkonzentration wahrscheinlich immer noch zu gering.

Diese Experimente belegen, dass AccBC Enzymkomplexe mit DtsR2 und DtsR3 bildet, wodurch erstmals gezeigt werden konnte, dass eine einzelne Biotincarboxylase-Biotincarboxylcarrierproteinuntereinheit mit mehreren Carboxyltransferaseuntereinheiten wechselwirken kann. Dabei ist die Intensität der Banden im coomassiegefärbten SDS Gel (Abb. 17 A), in dem AccBC in wesentlich höherer Konzentration als DtsR2 oder DtsR3 vorliegt, möglicherweise ein Hinweis darauf, dass AccBC getrennte Acyl-CoA Carboxylasekomplexe mit DtsR2 und DtsR3 bildet. Noch nicht bekannt sind die von diesen Acyl-CoA

Carboxylasekomplexen katalysierten Reaktionen bzw. umgesetzten Substrate. Überraschend war, dass in diesen Untersuchungen kein DtsR1 Protein gefunden wurde. Eine mögliche Erklärung ist, dass DtsR1 keinen Enzymkomplex mit AccBC bildet und deshalb nicht durch die Avidinaffinitätssäule isoliert wurde oder dass die Verbindung zwischen den Untereinheiten so labil ist, dass DtsR1 während der Aufreinigung verloren ging.

5.4 Messung der Enzymaktivitäten von isolierten Proteinkomplexen einer Größe von 700 kDa und 400 kDa

Durch Messung der Enzymaktivitäten in den Gelfiltrationsfraktionen (Abb. 16 A-Balkendiagramm) war gezeigt worden, dass es sehr wahrscheinlich zwei Acyl-CoA Carboxylasekomplexe einer Größe von 625 kDa und 440 kDa im Rohextrakt von *C. glutamicum* gibt, die den Umsatz von Acetyl-CoA (ACoA) und Propionyl-CoA (PCoA) katalysieren. Um diese Annahme zu verifizieren, sollten im folgenden Experiment biotinhaltige Enzymkomplexe einer Größe von 700 kDa und 400 kDa durch Avidinaffinitätschromatographie isoliert werden und die Enzymaktivitäten dieser Komplexe gemessen werden.

Um genügend Acyl-CoA Carboxylaseprotein zu erhalten, wurde zunächst soviel (6 mL) einer hochkonzentrierten Rohextraktsuspension von *C. glutamicum* ATCC13032 Δ pyc (Peters-Wendisch *et al.*, 1998) unter den beschriebenen Bedingungen präpariert (siehe Abschnitt II 6.1), dass direkt nacheinander zwei Gelfiltrationschromatographieläufe durchgeführt werden konnten. Anschliessend wurden Fraktionen mit Proteinen der molaren Masse von 700 kDa und größer vereinigt (F₇₀₀) und Fraktionen mit Proteinen molarer Massen von 350-450 kDa (F₄₀₀) (siehe Abb. 16 A).

Biotinhaltige Proteine aus denen mit F₇₀₀ und F₄₀₀ bezeichneten Fraktionen wurden dann jeweils mittels Avidinaffinitätschromatographie isoliert. Die aus den beiden Affinitätschromatographien erhaltenen Fraktionen wurden jeweils durch Größenausschlusszentrifugation achtzigfach konzentriert, auf ein Volumen von 120 μ L eingestellt und in diskontinuierliche Enzymtests eingesetzt. Die gemessenen Aktivitäten sind in Abbildung 18 dargestellt. Es war zu beobachten, dass die Enzymaktivitäten mit gereinigtem Enzym gegenüber den Messungen im Rohextrakt über einen Zeitraum von zwei Minuten linear waren. Zudem zeigte sich, dass sich die Acyl-CoA Carboxylaseaktivitäten mit den beiden Substraten in F₇₀₀ (Abb. 18 A) und F₄₀₀ (Abb. 18 B) auffallend voneinander unterschieden.

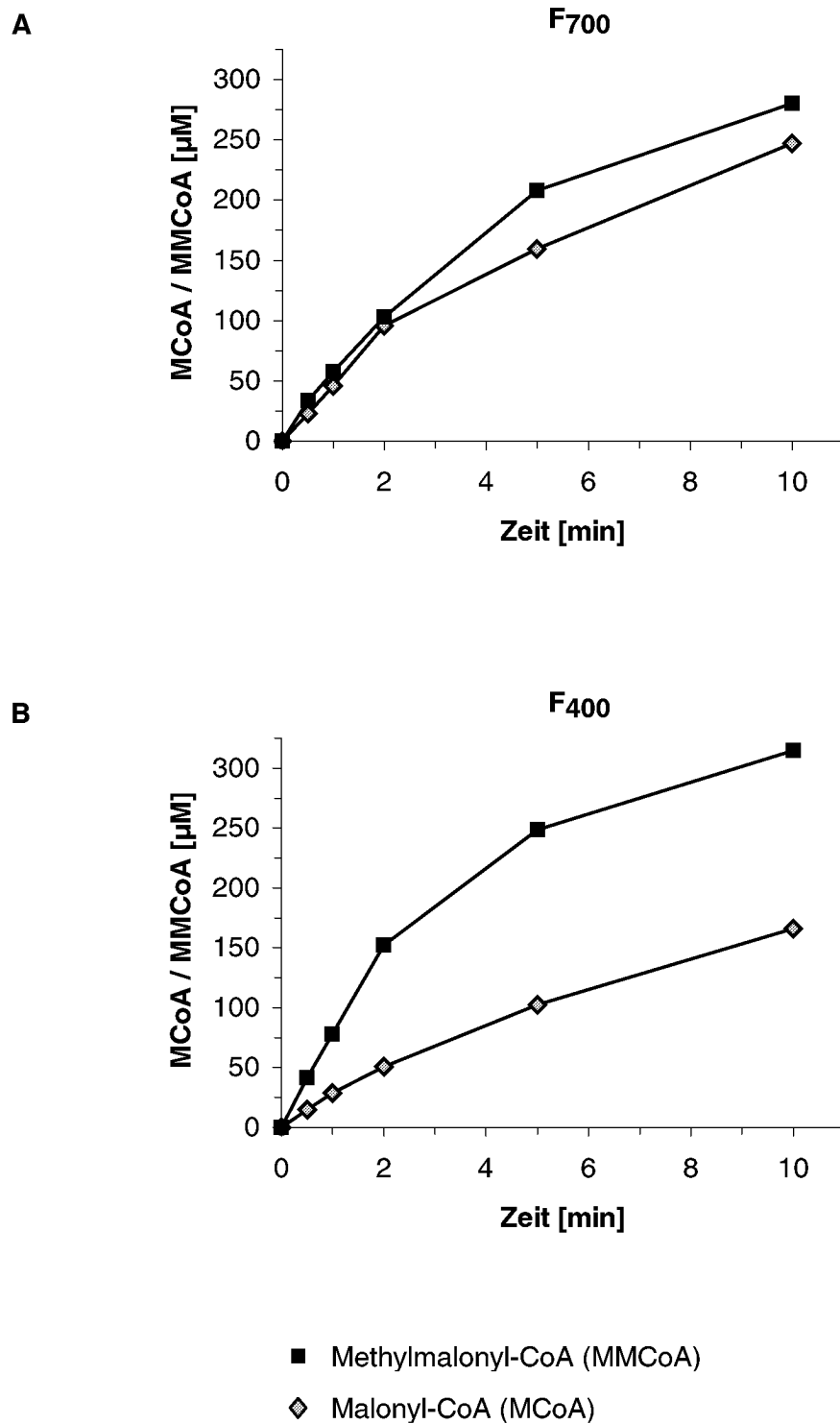


Abb. 18: Umsatz von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA und von Propionyl-CoA zu Methylmalonyl-CoA mit isolierten Enzymkomplexen unterschiedlichen Molekulargewichtes. (A) Enzymkomplexe mit einem M_r von 700.000 und größer (F_{700}). (B) Enzymkomplexe mit einem M_r von 350.000 - 450.000 (F_{400}). Dargestellt ist die Zunahme der Produkte über einen Zeitraum von zehn Minuten.

Die spezifische Acetyl-CoA Carboxylaseaktivität, die mit den höhermolekularen Proteinkomplexen aus F₇₀₀ gemessen wurde, betrug 6,2 U / mg Protein (Tab. 5) und war annähernd doppelt so hoch wie die spezifische Aktivität, die mit isolierten Proteinkomplexen aus F₄₀₀ gemessen wurde (3,7 U / mg Protein). Das bedeutet, dass in diesen Fraktionen ein Enzym vorliegt, das ein höheres V_{max} mit Acetyl-CoA als mit Propionyl-CoA besitzt, oder dass ein zusätzliches Protein vorliegt, das Acetyl-CoA umsetzt und dadurch die Aktivität erhöht. Die Propionyl-CoA Carboxylaseaktivität war dagegen mit Enzymkomplexen aus F₄₀₀ mit 10,7 U / mg Protein etwa doppelt so hoch wie die Aktivität mit Proteinkomplexen aus F₇₀₀ (6,4 U / mg Protein). Der deutliche Unterschied des Quotienten aus den in Fraktion F₇₀₀ und F₄₀₀ gemessenen Aktivitäten zeigt, dass unterschiedliche Acyl-CoA Carboxylasekomplexe in diesen hochmolekularen Proteinextrakten vorliegen.

Spezifische Acyl-CoA Carboxylaseaktivität	Proteine aus		Quotient spezifischer Enzymaktivitäten $\frac{F_{700}}{F_{400}}$
	F ₇₀₀	F ₄₀₀	
Acetyl-CoA [U / mg Protein]	6,2	3,7	2,3
Propionyl-CoA [U / mg Protein]	6,4	10,7	0,6

Tab. 5: Spezifische Acetyl- und Propionyl-CoA Carboxylaseaktivitäten von Enzymkomplexen unterschiedlicher Größe und Quotient der Aktivitäten (F₇₀₀:F₄₀₀). F₇₀₀: Enzymkomplexe mit einem M_r von 700.000 und größer; F₄₀₀: Enzymkomplexe mit einem M_r von 350.000 - 450.000.

5.5 Identifizierung von Acyl-CoA Carboxylaseuntereinheiten in isolierten Proteinkomplexen unterschiedlicher Größe

Im Folgenden wurde überprüft, ob verschiedene Acyl-CoA Carboxylaseuntereinheiten am Aufbau der in F₇₀₀ und F₄₀₀ vorliegenden Enzymkomplexe (siehe Abschnitt 5.4) beteiligt

sind, indem mit AccBC coisolierte Proteine aus F₇₀₀ und F₄₀₀ mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie identifiziert wurden. Um zusätzliche Hinweise auf den Aufbau der nativen Komplexe zu erhalten, wurde zudem untersucht, ob die Acyl-CoA Carboxylaseabbauprodukte in den niedermolekularen Gelfiltrationsfraktionen mit Proteinen einer Größe um 125 kDa (siehe Abschnitt 5.2 Abb. 16) nur aus AccBC Dimeren oder auch aus Dimeren von AccBC verbunden mit DtsR1, DtsR2 oder DtsR3 bestehen. Dazu waren parallel zur Präparation von F₇₀₀ und F₄₀₀ (siehe Abschnitt 5.4) biotinhaltige Proteine einer molaren Masse von 95 kDa - 155 kDa (Abb. 16 B) durch Avidinaffinitätschromatographie isoliert worden (F₁₂₅). Um die in F₇₀₀, F₄₀₀ und F₁₂₅ vorliegenden Acyl-CoA Carboxylaseuntereinheiten identifizieren zu können, erfolgte zunächst eine Trennung der isolierten Proteine in einzelne Untereinheiten mittels SDS Gelelektrophorese. Die Coomassiefärbung der Gele ergab, dass in jedem der drei Proteinextrakte eine unerwartet hohe Anzahl coisolierter Proteine vorlag (Abb. 19-21). Da es sich bei diesen um Proteine von mit Acyl-CoA Carboxylasen interagierenden Enzymen mit Hinweisen auf die Funktion handeln könnte, wurden nicht nur Banden in der Größe möglicher Acyl-CoA Carboxylaseuntereinheiten, sondern mehrere in ausreichender Konzentration vorliegende Banden aus jedem Gel ausgewählt (Abb. 19 A - 21 A Nr. 1-32), die anschliessend mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie untersucht wurden. Die Auswertung der Massenspektren ist in den drei Tabellen in Abbildung 19 B - 21 B zusammengefasst.

Es zeigte sich, dass als Hauptbande im Proteinextrakt F₇₀₀ (Abb. 19 A Nr. 4), entsprechend der Präparation über Avidin, die biotinhaltige α -Untereinheit AccBC vorlag. Die Aminosäuresequenz von AccBC war zu 34 % durch die analysierten Massen erfasst. Zusätzlich lag AccBC in mehreren Banden als Abbauprodukt vor. In zwei weiteren intensiv gefärbten Banden lagen zudem die β -Untereinheiten DtsR2 (23 %ige Proteinsequenzerrfassung) und die zuvor in MALDI-TOF Analysen (siehe Abschnitt 5.3) nicht nachgewiesene β -Untereinheit DtsR1 (22 %ige Proteinsequenzerrfassung) vor. Es war zu beobachten, dass das relative Molekulargewicht von DtsR1 um ca. 2.500 des kalkulierten Molekulargewichtes abwich, was auf einen proteolytischen Abbau des Proteins hindeutet. Bei den übrigen Proteinen, die in geringeren Mengen coisoliert wurden, könnte es sich aufgrund von Aminosäureidentitäten um die GTP Pyrophosphokinase (Wehmeier *et al.*, 1998), die Translationelongationsfaktoren FusA und Tuf (Ovchinnikov *et al.*, 1982; Bosch *et al.*, 1983), einer cytosolisch lokalisierten Untereinheit der H⁺-abhängigen ATP-Synthase (Ludwig *et al.*, 1993-94) und um eine Untereinheit der Magnesium-Protoporphyrin-Chelatase (Gibson *et al.*, 1995) handeln. Diese Proteine wurden höchstwahrscheinlich unspezifisch isoliert, da bisher kein Zusammenhang zum Fettsäurestoffwechsel bekannt ist. Von Schaffer *et al.* (2001, unveröffentlicht) wurde mittels 2D-Gelelektrophorese gezeigt, dass Translationelongationsfaktoren in großen Mengen im Rohextrakt von *C. glutamicum* vorliegen, so dass es zu einer unspezifischen Bindung des Proteins kommen kann.

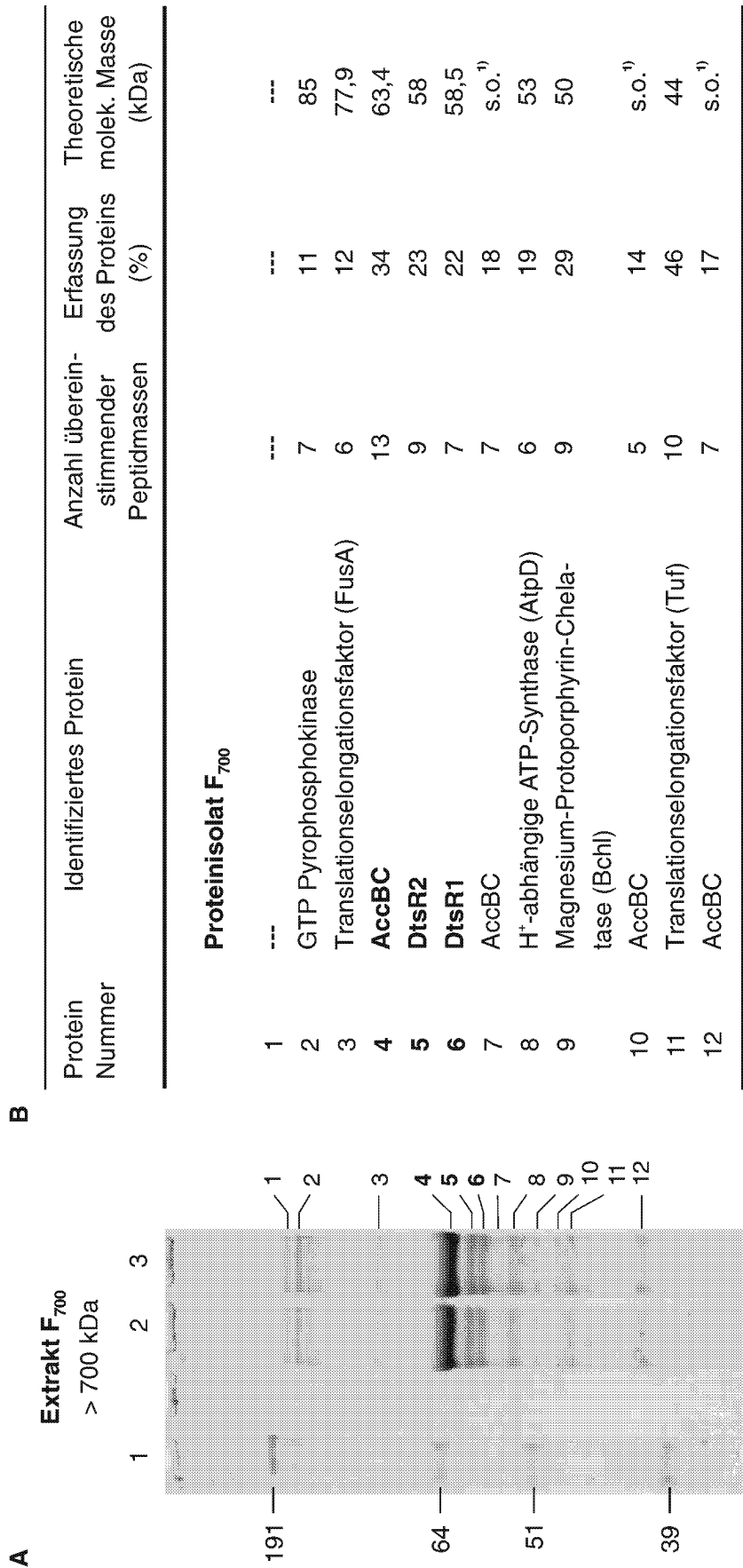


Abb. 19: Analyse mittels Avidinaffinitätschromatographie isolierter Proteine aus Gefiltrationsfraktionen mit Proteinen größer als 700 kDa. Gezeigt ist die Trennung der Proteine in einzelne Untereinheiten auf einem SDS Gel (A) und die tabellarische Darstellung der mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie sowie Datenbankvergleich identifizierten Proteine (B). Acyl-CoA Carboxylaseuntereinheiten sind durch Fettdruck gekennzeichnet. ¹⁾ Proteine, deren kalkuliertes Molekulargewicht nicht mit dem im Gel beobachteten übereinstimmt. **A** Spur 1: Molekulargewichtsstandard (Größenangabe in kDa) Spur 2-3: Probe des konzentrierten Proteinextraktes F₇₀₀

Im Proteinextrakt F₄₀₀ (Abb. 20) wurde in der Hauptbande wiederum das AccBC Protein (31 %ige Proteinsequenz erfassung) nachgewiesen und eine große Anzahl Abbauprodukte dieser Untereinheit in mehreren Nebenbanden detektiert. Auch in diesem Isolat wurde DtsR2 (24 %ige Proteinsequenz erfassung) gefunden. Zudem war diesmal die β -Untereinheit DtsR3 (25 %ige Proteinsequenz erfassung) nachweisbar. Im Verhältnis lag wesentlich mehr DtsR2 als DtsR3 Protein in F₄₀₀ vor. Die prozentuale Abdeckung der Proteine entspricht nahezu derjenigen in F₇₀₀. In diesem Isolat waren keine anderen Proteine coisoliert worden.

Neben AccBC und dessen Abbauprodukten lagen DtsR2 und DtsR3 auch im Proteinextrakt F₁₂₅ vor (Abb. 21 Nr. 24-26). In diesem war aufgrund der niedrigeren Konzentration der Proteine zwar eine geringere, aber ausreichende prozentuale Proteinsequenz erfassung zu beobachten. Wie bereits in F₇₀₀ war die unspezifische Isolierung von vier weiteren Proteinen erfolgt, die in nahezu gleichen Mengen die Hauptbanden des Geles ausmachten (Abb. 21 A Nr. 23, 29, 31, 32). Die Proteine zeigten hohe Identitäten zur Transketolase von *C. glutamicum* (Ikeda *et al.*, 1999), zur Succinyl-CoA:CoA-Transferase von *Clostridium kluyveri* (Söhling & Gottschalk, 1996), zur Ketolsäurereduktoisomerase IlvC von *C. glutamicum* (Keilhauer *et al.*, 1993; Cordes *et al.*, 1992) und zur L-2,3-Butandioldehydrogenase von *Brevibacterium saccharolyticum* (Ui *et al.*, 1998). Bis auf die Ketolsäurereduktoisomerase wurden diese Proteine wiederum von Schaffer *et al.* (2001, unveröffentlicht) in großen Mengen im Rohextrakt von *C. glutamicum* nachgewiesen und könnten daher ebenfalls unspezifisch coisoliert worden sein.

Durch diese Untersuchungen wurde gezeigt, dass im Proteinextrakt F₇₀₀ die Acyl-CoA Carboxylaseuntereinheiten AccBC, DtsR1 und DtsR2 vorliegen, in F₄₀₀ die Untereinheiten AccBC, DtsR2 und DtsR3. Der 625 kDa Acyl-CoA Carboxylasekomplex könnte also von der α -Untereinheit AccBC und den β -Untereinheiten DtsR1 oder DtsR2 gebildet werden. Der 440 kDa Komplex könnte von AccBC und den β -Untereinheiten DtsR2 oder DtsR3 gebildet werden. Durch die Isolation der Proteine aus F₁₂₅ wurde gezeigt, dass Dimere aus AccBC und DtsR2 oder DtsR3 vorliegen, da DtsR2 bzw. DtsR3 sonst nicht mit AccBC coisoliert worden wären. Da es sich bei den Dimeren also offensichtlich um Abbauprodukte der nativen Komplexe handelt, muss davon ausgegangen werden, dass diese Komplexe instabil sind. Alle anderen coisolierten Proteine konnten in keinen Zusammenhang zu den Acyl-CoA Carboxylasen oder zur Fettsäuresynthese gebracht werden.

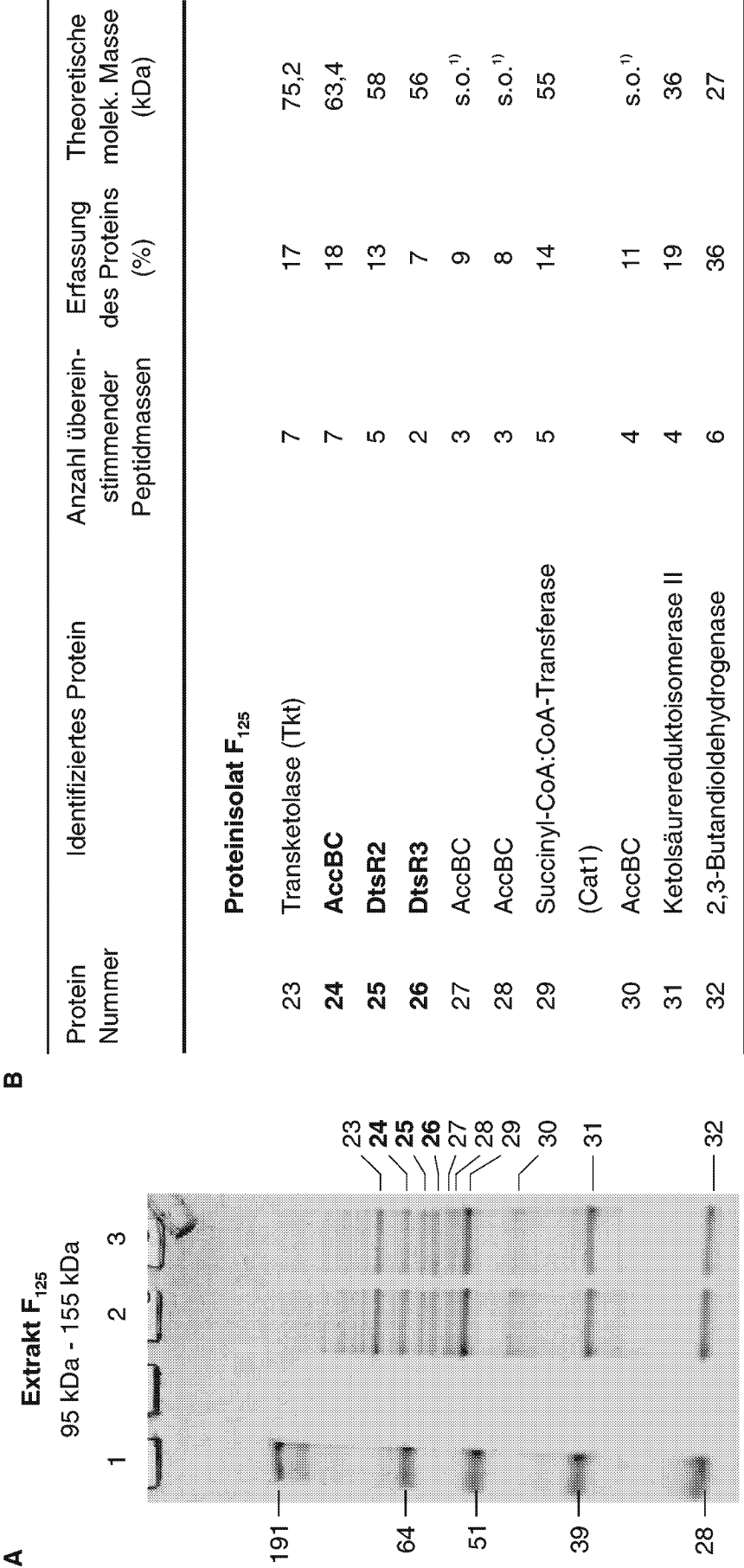


Abb. 21: Analyse mittels Avidinaffinitätschromatographie isolierter Proteine aus Gelfiltrationsfraktionen mit Proteinen um 125 kDa. Gezeigt ist die Trennung der Proteine in einzelne Untereinheiten auf einem SDS Gel (A) und die tabellarische Darstellung der mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie sowie Datenbankvergleich identifizierten Proteine (B). Acyl-CoA Carboxylaseuntereinheiten sind durch Fettdruck gekennzeichnet. ¹⁾Proteine, deren kalkuliertes Molekulargewicht nicht mit dem im Gel beobachteten übereinstimmt.

A Spur 1: Molekulargewichtsstandard (Größenangabe in kDa)
Spur 2-3: Probe des konzentrierten Proteinextraktes F₁₂₅

IV. Diskussion

Biotinabhängige Enzyme katalysieren in Eu- und Prokaryoten essentielle Reaktionen im Aminosäuremetabolismus und in Stoffwechselwegen wie der Glukoneogenese, der Polyketid- und der Fettsäuresynthese (Knowles, 1989; Wood & Barden, 1977; Moss & Lane, 1971). Meist liegen mehrere Biotinenzyme in einem Organismus vor, die überwiegend der Gruppe der Carboxylasen angehören (Fall *et al.*, 1975). So wurden auch im Rohextrakt von *C. glutamicum* zwei biotinhaltige Proteine nachgewiesen, bei denen es sich um die Pyruvat-Carboxylase und um die Untereinheit AccBC einer Acyl-CoA Carboxylase handelt (Peters-Wendisch *et al.*, 1998; Peters-Wendisch, 1996; Jäger *et al.*, 1996). Da die Sekretion von L-Glutamat durch das biotinauxotrophe Bakterium *C. glutamicum* durch Biotinlimitation induziert werden kann, was mit einem reduzierten Lipidgehalt und einer veränderten Lipidzusammensetzung einhergeht, wurde vermutet, dass die biotinhaltige Untereinheit AccBC und damit eine Acyl-CoA Carboxylase das Targetprotein dieser Limitation sein könnte (Eggeling *et al.*, 2001a; Jäger *et al.*, 1996; Hoischen & Krämer, 1990; Hoischen, 1990). Durch Identifizierung und Isolierung der vier Gene *accDA*, *dtsR1*, *dtsR2* und *dtsR3* und Analyse der Genprodukte in Homologievergleichen wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass zusammen mit *accBC* (Jäger *et al.*, 1996) insgesamt fünf Gene in *C. glutamicum* vorliegen, die für α - und β -Untereinheiten von Acyl-CoA Carboxylasen kodieren. Damit kommt sehr wahrscheinlich nicht nur ein Enzym, sondern mehrere, bisher unbekannte Enzyme als Target der biotinlimitierten Glutamatausscheidung in Frage.

Die abgeleiteten Proteinsequenzen der Gene weisen Sequenzähnlichkeiten zu charakterisierten Acyl-CoA Carboxylasen wie der Acetyl-CoA Carboxylase von *E. coli*, der Acyl-CoA Carboxylase von *Myxococcus xanthus* und den Propionyl-CoA Carboxylasen von *Saccharopolyspora erythraea*, *Streptomyces coelicolor* A3(2) und *M. xanthus* auf (Kimura *et al.*, 2000; Rodríguez & Gramajo, 1999; Kimura *et al.*, 1998; Li & Cronan, 1992a, 1992b; Rainwater & Kolattukudy, 1982). Bei diesen Carboxylaseenzymen handelt es sich um homologe Proteine, die sowohl in Pro- als auch in Eukaryoten einen Aufbau aus vier funktionellen Domänen aufweisen (Toh *et al.*, 1993). So wurde für AccBC gezeigt, dass es aus den zwei Domänen Biotincarboxylase und Biotinbindeprotein besteht und dass AccBC die einzige biotinhaltige α -Untereinheit der Acyl-CoA Carboxylasen in *C. glutamicum* darstellt (Jäger *et al.*, 1996) (Abb. 22). Die vier Polypeptide AccDA, DtsR1, DtsR2 und DtsR3 bestehen hingegen aus den amino- bzw. carboxylterminalen Domänen Carboxyltransferase und Acylbindeprotein und stellen somit β -Untereinheiten von Acyl-CoA Carboxylasen dar (Abb. 22). Diese vier Domänen sind im Modellorganismus *E. coli* und anderen Mikroorganismen wie *Pseudomonas citronellolis* und *Bacillus subtilis* auf einzelnen Polypeptiden

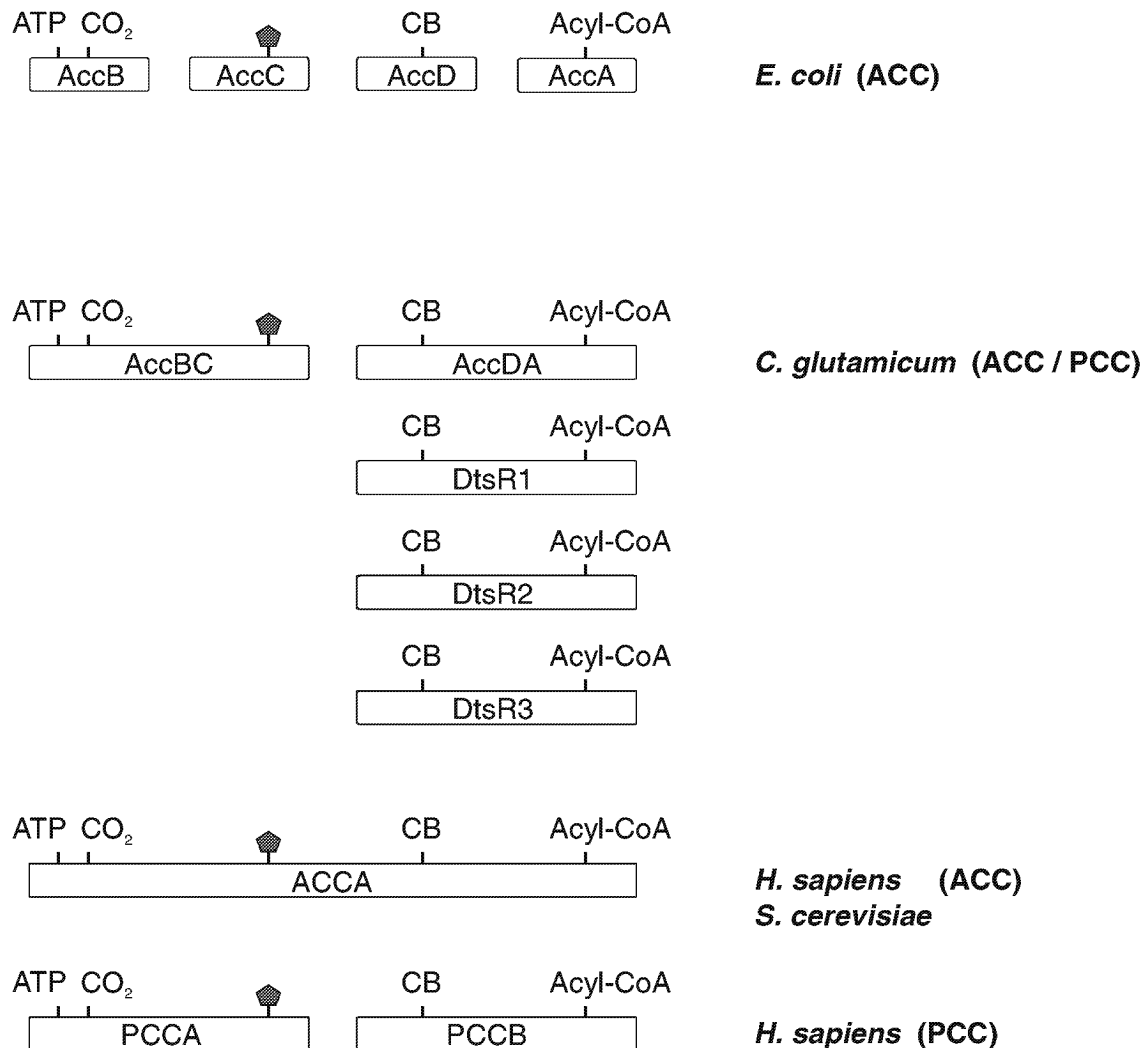


Abb. 22: Schematische Darstellung der Untereinheitenstruktur und Lokalisation der Domänen von Acyl-CoA Carboxylasen in verschiedenen Organismen. Die für die Untereinheiten kodierenden Gene sind angegeben. Die Biotinbindereigenschaft mit dem konservierten Lysinrest ist durch ein Pentagon markiert. BC: Biotincarboxylase; BCCP: Biotincarboxylcarrierprotein; CB: Carboxybiotin; CT-β: Carboxyltransferase, CT-α: Acylbindeprotein.

lokalisiert, die durch vier getrennte Gene kodiert werden. Dies sind die in einem Operon organisierten Gene *accB* und *accC* sowie die einzeln im Genom vorliegenden Gene *accA* und *accD* (Li & Cronan, 1992a, 1992b; Guchait, 1974; Kondo *et al.*, 1991; Best & Knauf, 1993; Hector & Fall, 1976; Marini *et al.*, 1995).

Für *C. glutamicum* wurde dagegen in dieser Arbeit gezeigt, dass die vier Domänen auf zwei Polypeptiden kodiert durch zwei Gene vorliegen, indem *accBC* eine Kombination mit *accDA*, *dtoR1*, *dtoR2* oder *dtoR3* eingeht (Abb. 22). Damit nimmt die Acyl-CoA Carboxylase von *C. glutamicum*, die den ersten Schritt der langkettigen Fettsäuresynthese katalysiert, eine Stellung zwischen der Acyl-CoA Carboxylase von *E. coli* und den in eukaryotischen wie *Saccharomyces cerevisiae*, *Rattus norvegicus* und *Homo sapiens* vorkommenden ein, die nur durch ein einziges Gen kodiert werden und somit alle Domänen auf einem Polypeptid vereint haben (Al-Feel *et al.*, 1992; Lopez-Casillas *et al.*, 1988; Abu-Elheiga *et al.*, 1995). Eine Anordnung der Domänen auf zwei Polypeptiden kodiert durch zwei Gene ist ferner von Propionyl-CoA Carboxylasen bekannt, die in allen bisher untersuchten Organismen durch zwei Gene kodiert werden und aus zwei Untereinheiten bestehen (Rodríguez & Gramajo, 1999; Browner *et al.*, 1989; Samols *et al.*, 1988; Kraus *et al.*, 1986; Lamhonwah *et al.*, 1986).

Zur funktionellen Analyse der Acyl-CoA Carboxylasegene wurde ein Enzymtest etabliert. Durch die Erhöhung der Acyl-CoA Carboxylaseaktivitäten im Rohextrakt von *C. glutamicum* nach *accBCaccDA*-Überexpression wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass diese beiden Gene gemeinsam für eine Acyl-CoA Carboxylase kodieren. Die Acyl-CoA Carboxylase AccBCDA setzt sowohl Acetyl-CoA als auch Propionyl-CoA um. Die spezifischen Aktivitäten betrugen 161 mU / mg Protein mit dem Substrat Acetyl-CoA und 408 mU / mg Protein mit dem Substrat Propionyl-CoA. Die homologe Überexpression einer Acyl-CoA Carboxylase ist bisher für kein Bakterium gezeigt. Meist wurde die Funktion von Acyl-CoA Carboxylasen durch die Isolierung der Enzyme oder die Inaktivierung der entsprechenden Gene charakterisiert. Die im Rohextrakt von *C. glutamicum* gemessenen Aktivitäten ohne Überexpression der Gene betrugen 55 mU / mg Protein mit Acetyl-CoA und 105 mU / mg Protein mit Propionyl-CoA. Diese sind geringer als die Aktivitäten, die im Rohextrakt des phylogenetisch eng verwandten Organismus *M. smegmatis* gemessen wurden. Die spezifischen Aktivitäten betrugen mit dem Substrat Acetyl-CoA 370 mU / mg Protein und mit dem Substrat Propionyl-CoA 710 mU / mg Protein (Erfle, 1973). Geringer im Vergleich zu *C. glutamicum* sind die spezifischen Aktivitäten bei *M. xanthus* und *S. erythraea*, die mit Acetyl-CoA 0,63 mU / mg Protein bzw. 1,12 mU / mg Protein betrugen, mit Propionyl-CoA 4,3 mU / mg Protein bzw. 2,62 mU / mg Protein ergaben (Rodríguez & Gramajo, 1999; Kimura *et al.*, 1997). Generell unterscheiden sich die in mehreren Organismen gemessenen Aktivitäten auffällig voneinander. Dies könnte zum einen an den unterschiedlichen Messmethoden liegen, die teils radioaktiv, teils chromatographisch oder photometrisch durchgeführt wurden und so zu verschiedenen Ergebnissen führen könnten (Bramwell *et al.*, 1996; Haßlacher *et al.*, 1993; Wheeler, 1992). Zum anderen könnten cytosolische Enzyme, die die Abspaltung von CoA am Produkt katalysieren könnten, wie die Malonyl-CoA Decarboxylase von *S. erythraea*, oder Enzyme, die die weitere Umsetzung des Produktes katalysieren, wie die in *C. glutamicum* vorkommende Methylmalonyl-CoA Mutase, die die

Umsetzung des Isomers L-Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA katalysiert, die Produktbildung beeinflussen (Hsieh & Kolattukudy, 1994; Rainwater & Kolattukudy, 1982; Birch *et al.*, 1993). Neben der erhöhten Aktivität nach Überexpression der Gene für die Acyl-CoA Carboxylase AccBCDA sprechen die beiden folgenden Befunde dafür, dass AccDA die β -Untereinheit ist, die zusammen mit AccBC die Eingangsreaktion der langkettigen Fettsäuresynthese in *C. glutamicum* katalysiert: (1) AccDA ist diejenige β -Untereinheit, die mit 35 % im amino- und mit 33 % im carboxylterminalen Sequenzbereich die höchsten Aminosäureidentitäten zur α - und β -Carboxyltransferaseuntereinheit der Acetyl-CoA Carboxylase von *E. coli* aufweist. (2) Obwohl weitere Gene (*dtsR1*, *dtsR2*, *dtsR3*), deren Genprodukte Sequenzidentitäten zu Acyl-CoA Carboxylase β -Untereinheiten aufweisen, isoliert wurden, handelt es sich bei *accDA* um das einzige Gen, das nicht inaktiviert werden konnte. Auch aus Untersuchungen anderer Bakterien wie *E. coli*, *S. coelicolor* A3(2), *S. erythraea* und *Mycobacterium bovis* sowie dem Pilz *S. cerevisiae* ist bekannt, dass die Gene für die Acetyl-CoA Carboxylase, für ein normales Wachstum dieser Organismen essentiell ist und dass die Gene nicht inaktivierbar sind (Rodríguez *et al.*, 2001; Perez *et al.*, 1998; Donadio *et al.*, 1996; Guan & Wurtele, 1996; Norman *et al.*, 1995; Haßlacher *et al.*, 1993; Li & Cronan, 1992, 1993).

Es ist nicht klar, warum AccBCDA in *C. glutamicum* Acetyl-CoA und Propionyl-CoA umsetzt. Von Albert und Vagelos (1968) wurde gezeigt, dass das entsprechende *E. coli* Enzym nur Acetyl-CoA jedoch kein Propionyl-CoA carboxyliert. Die duale Substratspezifität ist aber auch für die Acyl-CoA Carboxylasen aus *M. xanthus*, *S. erythraea*, und mehreren mycobakteriellen Enzymen, unter anderem von *M. tuberculosis* und *M. smegmatis*, gezeigt (Kimura *et al.*, 1997; Hunaiti & Kolattukudy, 1982; Rainwater & Kolattukudy, 1982; Erfle, 1973). Auch für den Nematoden *Turbatrix aceti* ist eine Acyl-CoA Carboxylase beschrieben (Meyer & Meyer, 1978). In *M. tuberculosis* und *M. bovis* ist gezeigt, dass das aus Propionyl-CoA gebildete Methylmalonyl-CoA als Ausgangsverbindung zur Synthese multimethylverzweigtkettiger Fettsäuren wie Mycocerosesäuren oder Phthienosäuren dient (Rainwater & Kolattukudy, 1982, 1983, 1985). Bis auf die Tuberculostearinsäure, die eine einfach methylierte Octadecanfettsäure darstellt, sind diese speziellen Fettsäuren für *C. glutamicum* aber bisher nicht bekannt (Collins *et al.*, 1982). Stattdessen könnte Methylmalonyl-CoA in *C. glutamicum* nach Isomerisierung durch die Methylmalonyl-CoA Mutase zu Succinyl-CoA umgesetzt werden, das dann im Tricarbonsäurezyklus verstoffwechselt wird. Die Gene *mutA* und *mutB*, die eine Methylmalonyl-CoA Mutase kodieren könnten, wurden auch in der Genomsequenz von *C. glutamicum* gefunden (Genomdatenbank der Degussa AG). Erfle (1973) vermutete ebenfalls, dass das gebildete Methylmalonyl-CoA im Bakterium *M. smegmatis*, das keine verzweigtkettigen Fettsäuren bildet (Minnikin *et al.*, 1985), vorwiegend durch die von Stjernholm *et al.* (1962) in diesem Organismus entdeckte Methylmalonyl-CoA Mutase zu Succinyl-CoA metabolisiert wird. Unterstützt wurde die Annahme

dadurch, dass radioaktiv markiertes Methylmalonyl-CoA durch die isolierte Fettsäuresynthase von *M. smegmatis* nicht in langkettige Fettsäuren eingebaut wurde. Wahrscheinlich ist die Aktivität aber auf eine unspezifische Bindung mehrerer Substrate zurückzuführen. So wurde für *M. xanthus* und *S. erythraea* gezeigt, dass das gereinigte Enzym die Substrate Propionyl-CoA, Acetyl-CoA, Butyryl-CoA und Succinyl-CoA mit abnehmender Aktivität von Propionyl-CoA zu Succinyl-CoA umsetzt (Kimura *et al.*, 1997; Hunaiti & Kolattukudy, 1982).

Die Funktion der Genprodukte von *dtsR1*, *dtsR2* und *dtsR3* bleibt ungeklärt. In den durchgeführten Enzymtests wurde weder ein Umsatz von Acetyl- oder Propionyl-CoA noch von β -Methylcrotonyl-CoA durch AccBCDtsR1 oder AccBCDtsR2 gemessen; AccBCDtsR3 wurde nicht untersucht. Offensichtlich entspricht das von diesen Enzymen umgesetzte Substrat nicht dem angebotenen. Das deutet darauf hin, dass es sich bei den beiden Enzymen nicht um Propionyl-CoA Carboxylasen handelt. Die verschiedenen Phänotypen der Integrationsmutanten zeigen wahrscheinlich stattdessen, dass die drei β -Untereinheiten verschiedene Funktionen im Lipidstoffwechsel von *C. glutamicum* ausüben und jede β -Untereinheit eine eigene Substratspezifität aufweist. Ein Vergleich mit den Genomsequenzen der *Corynebacterineae* *M. tuberculosis* und *M. leprae* zeigt, dass in diesen Bakterien eine größere Anzahl von Genen, die für putative Acyl-CoA Carboxylasen kodieren, vorhanden sind. So wurden in beiden Mikroorganismen die drei Gene *accA1*, *accA2* und *accA3* (α -Untereinheiten), sowie die sechs Gene *accD1*, *accD2*, *accD3*, *accD4*, *accD5* und *accD6* (β -Untereinheiten) identifiziert (Cole *et al.*, 1998; Cole *et al.*, 2001). Die Sequenzidentitäten zwischen den corynebakteriellen Genprodukten und den mycobakteriellen ergaben eine Zuordnung von *accBC* zu *accA3*, *accDA* zu *accD3*, *dtsR1/dtsR2* zu *accD5* sowie *dtsR3* zu *accD4* (Abb. 23). Zu jedem Gen liegt folglich ein homologes Gen in *Mycobacterium* vor. Selbst in *M. leprae*, dessen Genomsequenz im Vergleich zu *M. tuberculosis* zu mehr als 50 % degeneriert ist und aus vielen Pseudogenen besteht, sind die homologen Gene als funktionelle Gene vorhanden (Cole *et al.*, 2001). Das macht nochmals deutlich, dass es sich um essentielle Gene des Lipidstoffwechsels handelt. Die Funktion der Genprodukte im Fettsäurestoffwechsel von *Mycobacterium* ist bisher unbekannt. Die Anordnung der Gene im Genom von *C. glutamicum* und *Mycobacterium* ist aber sehr ähnlich. Von den fünf Genen ist das Gen *dtsR3* in einem putativen Operon zusammen mit *pks13*, möglicherweise kodierend für eine Polyketidsynthase bzw. Mycocerosesäure-Synthase (Hutchinson, 1999; Fernandes & Kolattukudy, 1997) und *fadD32*, möglicherweise kodierend für eine Acyl-CoA Synthase (DiRusso & Black, 1999), organisiert. Mycocerosesäure-Synthasen sind multifunktionale Enzyme, die die Verlängerung von unverzweigten Fettsäuren unter Verwendung von Methylmalonyl-CoA katalysieren (Fernandes & Kolattukudy, 1997). Für das homologe Gen *pks2* aus *M. tuberculosis* wurde kürzlich gezeigt, dass es für ein Enzym kodiert, das die Synthese von diesen Fettsäurederivaten der Zellwand katalysiert (Sirakova *et al.*, 2001).

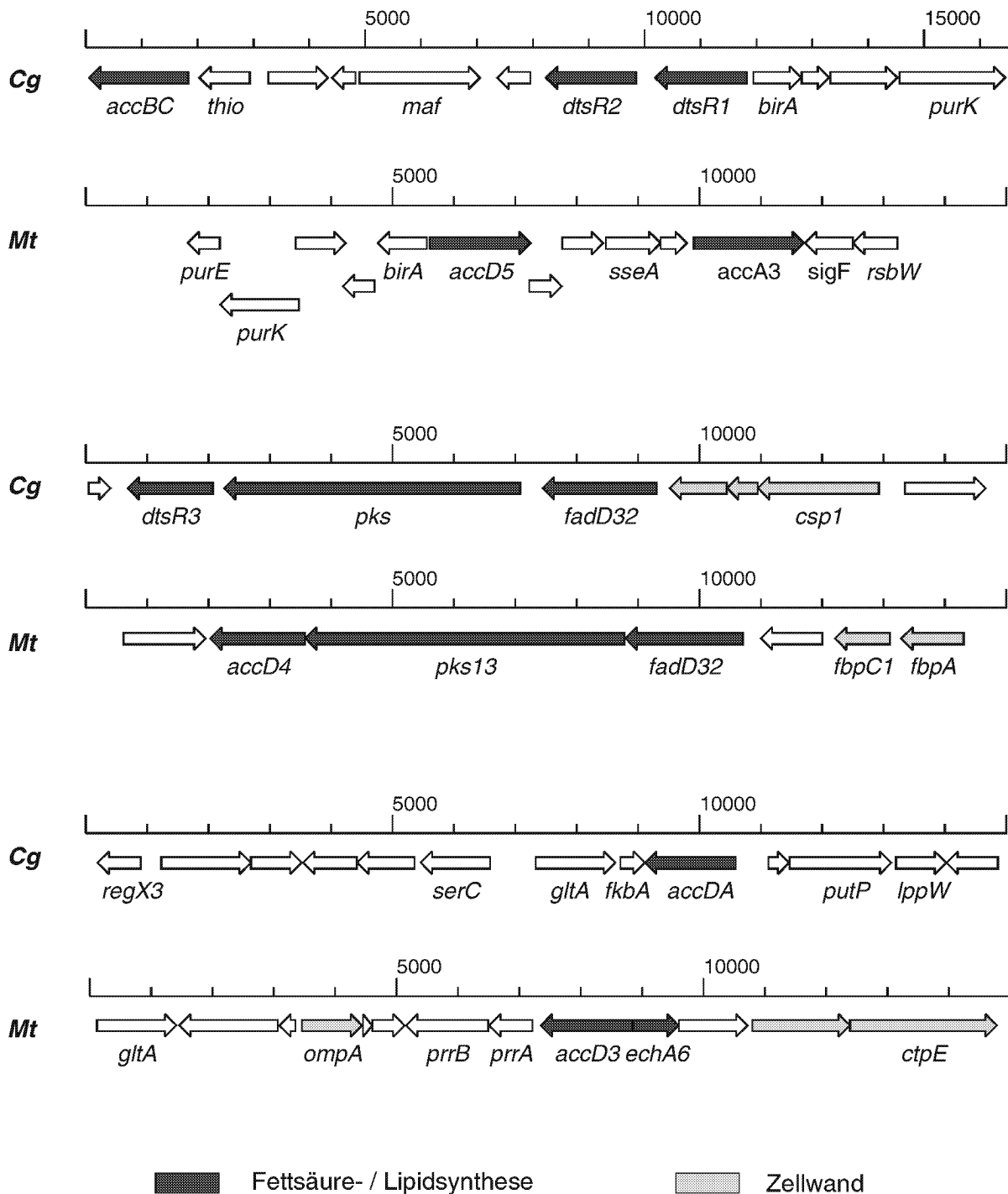


Abb. 23: Schematische Darstellung der Genumgebung von *accBC*, *accDA*, *dtsR1*, *dtsR2* und *dtsR3* im Genom von *C. glutamicum* (Cg) sowie deren homologer Gene *accA3*, *accD3*, *accD4* und *accD5* im Genom von *M. tuberculosis* (Mt). Gene ohne Annotation sind hypothetisch. Gene, die für Proteine der Fettsäuresynthese, der Lipidsynthese und der Zellwand kodieren, sind farblich hervorgehoben.

Somit könnte das *dtsR3* Genprodukt die Funktion der Bereitstellung von Ausgangsverbindungen für die Polyketidsynthase Pks13 ausüben. Eine Veränderung in der Zellwandstruktur bei den *dtsR3* Integrationsmutanten würde die beobachtete Flockenbildung des Stammes in Flüssigkultur bzw. das Zusammenhaften der Zellen beim Ausstreichen erklären. Eine Funktion von *dtsR1* oder *dtsR2*, zu denen in *M. tuberculosis* nur ein homologes Gen vorliegt (Abb. 23), könnte eine von Walker *et al.* (1973) postulierte Carboxylierungsreaktion im Biosyntheseweg der Mykolsäuren sein. In diesen Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Verknüpfung der zwei zur Mykolsäuresynthese notwendigen Acyl-CoA Reste durch Avidin gehemmt werden kann. Das bedeutet, dass in diesem Reaktionsweg sehr wahrscheinlich ein biotinabhängiges Enzym involviert ist. Um welchen Reaktionsschritt es sich genau handelt, ist aber momentan noch umstritten, da das carboxylierte Zwischenprodukt nach neueren Untersuchungen nicht nachgewiesen werden konnte (Lee *et al.*, 1997). Cole *et al.* (1998) vermuteten, dass AccD3 (*accDA*), AccD4 (*dtsR3*) und AccD5 (*dtsR1/dtsR2*) aufgrund ihrer konservierten Sequenzen an der Carboxylierung einer einzigen wichtigen Ausgangsverbindung beteiligt sind. Durch die Untersuchungen in dieser Arbeit scheint es jedoch eher unwahrscheinlich, dass die Genprodukte die Carboxylierung einer einzigen Verbindung katalysieren. Stattdessen ist anzunehmen, dass alle Acyl-CoA Carboxylasen individuelle Enzyme mit verschiedenen Funktionen sind. Generell gibt es noch keinen Organismus aus der Unterordnung *Corynebacterineae*, von dem ein Überblick über die *in vivo* Funktion einzelner Enzyme oder Gene, die die Ausgangsverbindungen der Lipidsynthese bereitstellen, gegeben ist. Durch die vorliegende Arbeit besteht somit erstmals ein Überblick über die Gene der Acyl-CoA Carboxylasen in *C. glutamicum*. Überraschend sind die hohen Aminosäuresequenzidentitäten der Carboxyltransferaseuntereinheiten. Wie bereits erwähnt, können sich die Genprodukte aber trotz dieser hohen Identitäten nicht gegenseitig komplementieren. Dieser unerwartete Befund eröffnet möglicherweise einen völlig neuartigen Zugang zum Verständnis der Lipidsynthese in den *Corynebacterineae*.

Da außer AccBC keine weitere α -Untereinheit in der Genomsequenz von *C. glutamicum* gefunden wurde, ist davon auszugehen, dass AccBC auch mit den drei β -Untereinheiten DtsR1, DtsR2 und DtsR3 interagiert. Tatsächlich konnte durch Avidinaffinitätschromatographie AccBC und mit ihr verbundene Proteine coisoliert werden, die nach MALDI-TOF Analysen als DtsR1, DtsR2 und DtsR3 identifiziert wurden. Damit ist durch diese Arbeit zum ersten Mal gezeigt, dass eine biotinhaltige Acyl-CoA Carboxylaseuntereinheit mit mehreren Carboxyltransferaseuntereinheiten interagieren kann. Dies bedeutet auch, dass die Substratspezifität allein von der Carboxyltransferaseuntereinheit vermittelt wird. Schon lange wurde vermutet, dass eine biotinhaltige Untereinheit aufgrund des übereinstimmenden Reaktionsmechanismus mit verschiedenen Carboxyltransferasen wechselwirken kann (Samols *et al.*, 1988; Hector & Fall, 1976; Moss & Lane, 1971; Alberts & Vagelos, 1969). Mehrere homologe

Acyl-CoA Carboxylasen sind auch in *Pseudomonas citronellolis* in Abhängigkeit verschiedener Wachstumsbedingungen sowie in Pflanzen nachgewiesen (Hector & Fall, 1976; Wurtele & Nikolau, 1990). So konnten Hector & Fall (1976) zeigen, dass es in *P. citronellolis* neben einer Acetyl-CoA Carboxylase eine induzierbare Geranyl-CoA Carboxylase gibt, die einen Schritt im Abbau acyclischer Terpene katalysiert, eine 3-Methylcrotonyl-CoA Carboxylase, die eine Funktion im Leucin Abbauweg übernimmt, und eine Propionyl-CoA Carboxylase, die beim Wachstum auf Valin als C-Quelle exprimiert wird. In Bakterien ist überwiegend das Vorkommen von ein oder zwei Acyl-CoA Carboxylasen nachgewiesen (Rodríguez *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2000; Kimura *et al.*, 2000, 1998, 1997; Perez *et al.*, 1998; Donadio *et al.*, 1996; Hunaiti & Kolattukudy, 1982; Fall *et al.*, 1975).

Es wurde gezeigt, dass die Sekretion der Aminosäuren L-Glutamat und L-Lysin durch *C. glutamicum* carriervermittelt ist (Gutmann *et al.*, 1992; Hoischen & Krämer, 1989; Vrljić *et al.*, 1996). In noch unbekannter Weise wird diese Ausscheidung durch Veränderungen in der Lipidsynthese bzw. dem Zellwandaufbau des Bakteriums beeinflusst (Eggeling *et al.*, 2001a; Kimura *et al.*, 1997a, 1997b; Hoischen & Krämer, 1990; Jäger, mündliche Mitteilung). Ein Gen, das damit in Zusammenhang steht, ist *dtsR1*, das sehr wahrscheinlich die β -Untereinheit einer Acyl-CoA Carboxylase darstellt (Kimura *et al.*, 1996). Nach Deletion von *dtsR1* im Wildtyp wurde beobachtet, dass auch ohne Zugabe des Detergenz eine Ausscheidung von 230 mM L-Glutamat erfolgte (Kimura *et al.*, 1997b). Dagegen führte die Überexpression von *dtsR1*, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, zur Reduktion der biotinabhängigen Glutamatbildung. Dies bedeutet, dass die *dtsR1* Expression mit der Glutamatbildung korreliert. Auch die einzeln überexprimierten Gene *accBC* und *dtsR2* verringerten die Glutamatakkumulation um etwa 15 %. Eine besonders deutliche Abnahme der durch Biotinlimitation induzierten Glutamatakkumulation bewirkte die Überexpression von *accBC* in Kombination mit *dtsR1*. Dies führte zu einer 67 %igen Verringerung der Glutamatausbeute. Damit handelt es sich bei AccBCDtsR1 sehr wahrscheinlich um eine funktionell aktive Acyl-CoA Carboxylase, die in Hinblick auf die *dtsR1* Inaktivierungsmutante die Lipidsynthese verändert und infolge die Glutamatausscheidung beeinflusst. In der vorliegenden Arbeit wurde ferner gezeigt, dass nicht nur die Inaktivierung von *dtsR1* sondern auch die von *dtsR2* und *dtsR3* möglich ist. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse, die nun zu *dtsR1* bekannt sind, könnte auch in diesen Inaktivierungsmutanten die Glutamatbildung erhöht sein. Da AccBCDA keinen Effekt auf die Glutamatbildung hatte, kann dieses Enzym, das bisher als Target der Biotinlimitation galt, sehr wahrscheinlich als solches ausgeschlossen werden.

Neben der Akkumulation von L-Glutamat wird auch die Sekretion von L-Lysin durch die Acyl-CoA Carboxylasegenexpression beeinflusst. Obwohl in der Patentliteratur eine signifikante Erhöhung der Lysinausbeute von 15 g/L auf 25 g/L bei Überexpression von *dtsR1* im Lysinproduktionsstamm *C. glutamicum* ssp. *lactofermentum* AJ12435 berichtet wurde (Kimura

et al., 1997b) erscheinen die Effekte nicht so ausgeprägt, wie bei der Ausscheidung von L-Glutamat. Geringfügig erhöht war die Lysinakkumulation nach Überexpression von *dtsR1* oder *accDA* im Lysinproduktionsstamm MH20-22B (Schrumpf *et al.*, 1992). Die gemeinsam überexprimierten Gene *accBC* und *accDA* führten zu einer 11 %igen Verringerung der Lysinbildung. Der entsprechende rekombinante Stamm zeigte auch ein verzögertes Wachstum, so dass möglicherweise auch Wachstumseffekte die veränderte Lysinbildung erklären könnten (An *et al.*, 1999). Hinweise zur Lysinbildung und Expression von mutmaßlich an der Lipidsynthese beteiligten Genen ergaben sich kürzlich auch aus einem *microarray*-Ansatz. So wurde unter Lysinproduktionsbedingungen eine 2,8fache Zunahme der Expression von *dtsR1* in *C. glutamicum* ATCC21253 beobachtet (Loos *et al.*, 2001). Von den derzeit durchgeführten Mykolsäureanalysen der *dtsR1*, *dtsR2* und *dtsR3* Inaktivierungsmutanten werden Hinweise erwartet, ob der Lysin- oder Glutamatefflux durch die von diesen Fettsäurederivaten gebildete Polymerschicht beeinflusst wird und wie die Mykolsäuresynthese in *C. glutamicum* ablaufen könnte.

V. Zusammenfassung

Die Zellwand des Gram-positiven, aminosäureproduzierenden Bakteriums *C. glutamicum* und verwandter *Corynebacteriaceae* ist neben der Cytoplasmamembran aus einer zweiten, distinkten Lipidschicht aufgebaut. Diese Lipidschichten sind maßgeblich am Stofftransport beteiligt und beeinflussen sehr wahrscheinlich auch den carriervermittelten Efflux von Aminosäuren. Wie die Lipidsynthese erfolgt, ist aber weitgehend unbekannt. Daher war es das Ziel dieser Arbeit, die Gene für Acyl-CoA Carboxylasen, die Initiationsreaktionen der Lipidsynthese katalysieren, zu isolieren und die entsprechenden Enzymaktivitäten zu charakterisieren.

1. Die Acyl-CoA Carboxylasegene *accBC*, *accDA*, *dtsR1*, *dtsR2* und *dtsR3* wurden aus *C. glutamicum* isoliert. Aufgrund von Aminosäureidentitäten lässt sich ableiten, dass es sich bei AccBC (591 AS) um die α -Untereinheit, bei AccDA (491 AS), DtsR1 (543 AS), DtsR2 (537 AS) und DtsR3 (516 AS) um vier β -Untereinheiten von Acyl-CoA Carboxylasen handelt.
2. Die Etablierung eines Enzymtests ermöglichte zu zeigen, dass AccBC zusammen mit AccDA eine funktionelle Acyl-CoA Carboxylase bildet. Durch die gemeinsame Überexpression von *accBC* mit *accDA* erfolgte eine etwa dreifach erhöhte Carboxylierung von Acetyl-CoA zur Vorstufe der Fettsäuresynthese Malonyl-CoA. Die spezifische Aktivität betrug 161 mU / mg Protein. Das Enzym carboxyliert auch Propionyl-CoA. Die Acyl-CoA Carboxylase ist vermutlich essentiell für *C. glutamicum*, da die Inaktivierung der Gene *accBC* und *accDA* nicht möglich war.
3. Die Inaktivierung von *dtsR1*, *dtsR2* oder *dtsR3* führte zur starken Beeinträchtigung des Wachstums. Dadurch ist gezeigt, dass die Genprodukte sich trotz ihrer hohen Identitäten von bis zu 70 % nicht gegenseitig komplementieren können. Die Wachstumslimitierung konnte durch Supplementation mit Fettsäuren teilweise aufgehoben werden, was darauf hindeutet, dass die Genprodukte Funktionen in der Lipidsynthese ausüben.
4. Die Isolierung des biotinhaltigen AccBC Proteins über Avidinaffinitätschromatographie ergab die Coisolierung von Proteinen, die als DtsR1, DtsR2 und DtsR3 identifiziert wurden. Das zeigt erstmals, dass eine α -Untereinheit mit verschiedenen β -Untereinheiten interagieren kann. Zudem weist dieses Ergebnis darauf hin, dass verschiedene Acyl-CoA Carboxylasen in *C. glutamicum* vorliegen, deren gemeinsame α -Untereinheit AccBC die CO₂-Fixierung katalysiert, deren β -Untereinheiten hingegen unterschiedliche und noch unbekannte Substratspezifitäten vermitteln.
5. Die L-Glutamat- und L-Lysinausscheidung wird durch Überexpression der Acyl-CoA Carboxylasegene beeinflusst. Nach gemeinsamer Überexpression der Gene *accBC* und *dtsR1* wurden nur noch 30 % L-Glutamat akkumuliert. Die gemeinsame Überexpression der Gene *accBC* und *accDA* verringerte die Lysinakkumulation um 11 %. Das deutet darauf hin, dass die Aminosäureakkumulation von der Lipidzusammensetzung abhängt.

VI. Literaturverzeichnis

- Abe, S., Takayama, K. & Kinoshita, S. (1967).** Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **13**: 279-301.
- Abu-Elheiga, L., Jayakumar, A., Baldini, A., Chirala, S.S. & Wakil, S.J. (1995).** Human acetyl-CoA carboxylase: characterization, molecular cloning, and evidence for two isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 4011-4015.
- Alberts, A. & Vagelos, P.R. (1968).** Acetyl-CoA carboxylase, I. Requirement for two protein fractions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **59**: 561-568.
- Alberts, A. & Vagelos, P.R. (1972).** Acyl-CoA carboxylases. In: *The enzymes*. Vol. 6, S. 37-82. Boyer, P.D. (Ed.) Academic Press, New York, USA.
- Al-Feel, W., Chirala, S.S. & Wakil, S.J. (1992).** Cloning of the yeast FAS3 gene and primary structure of yeast acetyl-CoA carboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 4534-4538.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zahng, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman D.J. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- An, G.H., Song, K.B. & Sinskey, A.J. (1999).** Redirection of carbon flux to lysine in a recombinant of *Corynebacterium lactofermentum* ATCC 21799 by limited supply of pantothenate. *J. Bioscie. Bioeng.* **88**: 168-172.
- Barnes, W.M. (1994).** PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 2216-2220.
- Belisle, J.T., Vissa, V.D., Sievert, T., Takayama, K., Brennan, P.J. & Besra, G.S. (1997).** Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in the cell wall biogenesis. *Science* **276**: 1420-1422.
- Bensadoun, A. & Weinstein, D. (1976).** Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal. Biochem.* **70**: 241-250.
- Best, E.A. & Knauf, V.C. (1993).** Organization and nucleotide sequences of the genes encoding the biotin carboxyl carrier protein and biotin carboxylase protein of *Pseudomonas aeruginosa* acetyl coenzyme A carboxylase. *J. Bacteriol.* **175**: 6881-6889.
- Birch, A., Leiser, A. & Robinson, J.A. (1993).** Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding methylmalonyl-coenzyme A mutase from *Streptomyces cinnamonensis*. *J. Bacteriol.* **175**: 3511-3519.

- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* **7**: 1513-1523.
- Blake, M.S., Johnston, K.H., Russel-Jones, G.J. & Gotschlich, E.C. (1984).** A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on western blots. *Anal. Biochem.* **136**: 175-179.
- Börmann, E.R., Eikmanns, B.J. & Sahm, H. (1992).** Molecular analysis of the *Corynebacterium glutamicum* *gdh* gene encoding glutamate dehydrogenase. *Mol. Microbiol.* **6**: 317-326.
- Bogdanov, M. & Dowhan, W. (1998).** Phospholipid-assisted protein folding: phosphatidylethanolamin is required at a late step of the conformational maturation of the polytopic membrane protein lactose permease. *EMBO J.* **17**: 5255-5264.
- Bosch, L., Kraal, B., Van der Meide, P.H., Duisterwinkel, F.J. & Van Noort, J.M. (1983).** The elongation factor EF-Tu and its two encoding genes. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **30**: 91-126.
- Bramwell, H., Hunter, I.S., Coggins, H.R. & Nimmo, H.G. (1996).** Propionyl-CoA carboxylase from *Streptomyces coelicolor* A3(2): cloning of the gene encoding the biotin-containing subunit. *Microbiol.* **142**: 649-655.
- Brennan, P.J. & Nikaido, H. (1995).** The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **64**: 29-63.
- Bröer, S. & Krämer, R. (1991a).** Lysine excretion by *Corynebacterium glutamicum*. 1. Identification of a specific secretion carrier system. *Eur. J. Biochem.* **202**: 131-135.
- Bröer, S. & Krämer, R. (1991b).** Lysine excretion by *Corynebacterium glutamicum*. 2. Energetics and mechanism of the transport system. *Eur. J. Biochem.* **202**: 137-143.
- Bröer, S., Eggeling, L. & Krämer, R. (1993).** Strains of *Corynebacterium glutamicum* with different lysine productivities may have different lysine excretion systems. *Appl. Environm. Microbiol.* **59**: 316-321.
- Browner, M.F., Taroni, F., Sztul, E. & Rosenberg, L.E. (1989).** Sequence analysis, biogenesis, and mitochondrial import of the α -subunit of rat liver propionyl-CoA carboxylase. *J. Biol. Chem.* **264**: 12680-12685.
- Bunch, A.W. & Harris, R.E. (1986).** The manipulation of microorganisms for the production of secondary metabolites. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **4**: 117-144.
- Chapman-Smith, A. & Cronan Jr., J.E. (1999).** The enzymatic biotinylation of proteins: a post-translational modification of exceptional specificity. *TIBS* **24**: 359-363.

- Chung, C.T., Niemela, S.L. & Miller, R.H. (1989).** One step preparation of competent *Escherichia coli* : transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 2172-2175.
- Clement, Y., Escoffier, B., Trombe, M.C. & Lanéelle, G. (1984).** Is glutamate excreted by its uptake system in *Corynebacterium glutamicum*? A working hypothesis. *J. Gen. Microbiol.* **130**: 2589-2594.
- Clement, Y. & Lanéelle, G. (1986).** Glutamate excretion mechanism in *Corynebacterium glutamicum*: triggering by biotin starvation or by surfactant addition. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 925-929.
- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D. et al. (1998a).** Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**: 537-544.
- Cole, S.T. (1998b).** Comparative mycobacterial genomics. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**: 567-571.
- Cole, S.T., Eiglmeier, K., Parkhill, J., James, K.D., Thomson, N.R., Wheeler, P.R., Honore, N. et al. (2001).** Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* **409**: 1007-1011.
- Collins, M.D., Goodfellow, M. & Minnikin, D.E. (1982).** A survey of the structures of mycolic acids in *Corynebacterium* and related taxa. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 129-149.
- Cordes, C., Möckel, B., Eggeling, L. & Sahm, H. (1992).** Cloning, organization and functional analysis of *ilvA*, *ilvB* and *ilvC* genes from *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **112**: 113-116.
- Cronan Jr., J.E. (1990).** Biotination of proteins *in vivo*. A post-translational modification to label, purify, and study proteins. *J. Biol. Chem.* **265**: 10327-10333.
- Cronan Jr., J.E. & Rock, C.O. (1996).** Biosynthesis of membrane lipids. In: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*. 2nd Ed., Vol. 1, pp. 612-636, Neidhardt, F.C. et al. (Eds.), American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Crueger, W. & Crueger, A. (1990).** Biotechnology: A textbook of industrial microbiology, 2nd Ed., T.D. Brock (Ed.). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Daffé, M. & Draper, P. (1998).** The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv. Microb. Physiol.* **39**: 131-203.
- Demain, A.L. & Birnbaum, J. (1968).** Alteration of permeability for the release of metabolites from the microbial cell. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **46**: 1-25.

- DiRusso, C.C. & Black, P.N. (1999).** Long-chain fatty acid transport in bacteria and yeast. Paradigms for defining mechanism underlying this protein-mediated process. *Mol. Cell. Biochem.* **192**: 41-52.
- Donadio, S., Staver, M.J. & Kratz, L. (1996).** Erythromycin production in *Saccharopolyspora erythraea* does not require a functional propionyl-CoA carboxylase. *Mol. Microbiol.* **19**: 977-984.
- Doukhan, L., Predich, M., Nair, G., Dussurget, O., Mandic-Mulec, I., Cole, S.T., Smith, D.R. & Smith, I. (1995).** Genomic organization of the mycobacterial sigma gene cluster. *Gene* **165**: 67-70.
- Dower, W.J., Miller, J.F. & Ragsdale, C.W. (1988).** High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acid Res.* **16**: 6127-6145.
- Duncan, L.K. & Shirvnan, E. (1989).** High frequency transformation of whole cells of amino acid producing coryneform bacteria using high voltage electroporation. *Bio/Technology* **7**: 1067-1070.
- Ebbighausen, H., Weil, B. & Krämer, R. (1989).** Isoleucine excretion in *Corynebacterium glutamicum*: evidence for a specific efflux carrier system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 184-190.
- Eggeling, L. & Sahm, H. (1999).** L-Glutamate and L-lysine: traditional products with impetuous developments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 146-153.
- Eggeling, L. & Sahm, H. (2001).** The cell wall barrier of *Corynebacterium glutamicum* and amino acid efflux. *J. Biosci. Bioeng.* **92**: 201-213.
- Eggeling, L., Krumbach, K. & Sahm, H. (2001a).** L-Glutamate efflux with *C. glutamicum*: why is penicillin treatment or tween addition doing the same? *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 67-68.
- Eggeling, L., Pfefferle, W. & Sahm, H. (2001b).** Amino acids. In: *Basic Biotechnology*. 2nd Ed., pp. 281-303, Ratledge, C. und Kristiansen, B. (Eds.). Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Eikmanns, B.J., Follettie, M.T., Griot, M.U. & Sinskey, A.J. (1989).** The phosphoenolpyruvate carboxylase gene of *Corynebacterium glutamicum*. Molecular cloning, nucleotide sequence and expression. *Mol. Gen. Genet.* **218**: 330-339.
- Eikmanns, B.J., Metzger, M., Reinscheid, D., Kircher, M. & Sahm, H. (1991a).** Amplification of three threonine biosynthesis genes in *Corynebacterium glutamicum* and its influence on carbon flux in different strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 617-622.

- Eikmanns, B.J., Kleinertz, E., Liebl, W. & Sahm, H. (1991b).** A family of *Corynebacterium glutamicum* / *Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing. *Gene* **102**: 93-98.
- Eikmanns, B.J., Thum-Schmitz, N., Eggeling, L., Lüttke, K. & Sahm, H. (1994).** Nucleotide sequence, expression and transcriptional analysis of *gltA* gene encoding citrate synthase. *Microbiol.* **140**: 1817-1828.
- Eisenberg, M.A., Prakash, O. & Hsiung, S.C. (1982).** Purification and properties of the biotin repressor. A bifunctional protein. *J. Biol. Chem.* **257**: 15167-15173.
- Emini, E.A., Hughes, J.V., Perlow, D.S. & Boger, J. (1985).** Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *J. Virol.* **55**: 836-839.
- Erfle, J.D. (1973).** Acetyl-CoA and propionyl-CoA carboxylation by *Mycobacterium phlei*. Partial purification and some properties of the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* **316**: 143-155.
- Ertan, H. (1992).** Some properties of glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase and glutamate synthase from *Corynebacterium callunae*. *Arch. Microbiol.* **158**: 35-41.
- Fall, R.R., Nervi, A.M., Alberts, A.W. & Vagelos, P.R. (1971).** Acetyl CoA carboxylase: isolation and characterization of native biotin carboxyl carrier protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**: 1512-1515.
- Fall, R.R., Alberts, A.W. & Vagelos, P.R. (1975).** Analysis of bacterial biotin-proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **379**: 496-503.
- Fernandes, N.D. & Kolattukudy, P.E. (1997).** Methylmalonyl coenzyme A selectivity of cloned and expressed acyltransferase and β -ketoacyl synthase domains of mycocerosic acid synthase from *Mycobacterium bovis* BCG. *J. Bacteriol.* **179**: 7538-7543.
- Fernandes, N.D. & Kolattukudy, P.E. (1998).** A newly identified methyl-branched chain fatty acid synthesizing enzyme from *Mycobacterium tuberculosis var. bovis* BCG. *J. Biol. Chem.* **273**: 2823-2828.
- Fling, S.P. & Gregerson, D.S. (1986).** Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal. Biochem.* **155**: 83-88.
- Fountoulakis, M. & Langen, H. (1997).** Identification of proteins by matrix-assisted laser desorption ionization-mass spectrometry following in-gel digestion in low-salt, nonvolatile buffer and simplified peptide recovery. *Anal. Biochem.* **250**: 153-156.

- Gibson, L.C., Willows, R.D., Kannangara, C.G., von Wettstein, D. & Hunter, C.N. (1995).** Magnesium-protoporphyrin chelatase of *Rhodobacter sphaeroides*: reconstitution of activity by combining the products of the *bchH*, *-I*, and *-D* genes expressed in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 1941-1944.
- Grant, S.G.N., Jessee, J., Bloom, F.R. & Hanahan, D. (1990).** Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4645-4649.
- Guchhait, R.B., Polakis, S.E., Dimroth, P., Stoll, E., Moss, J. & Lane, M.D. (1974).** Acetyl coenzyme A carboxylase system of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **249**: 6633-6645.
- Gutmann, M., Hoischen, C. & Krämer, R. (1992).** Carrier-mediated glutamate secretion by *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation. *Biochim. Biophys. Acta* **1112**: 115-123.
- Guan, X. & Wurtele, E.S. (1996).** Reduction of growth and acetyl-CoA carboxylase activity by expression of a chimeric streptavidin gene in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**: 753-758.
- Haase, F.C., Henrikson, K.P., Treble, D.H. & Allen, S.H.G. (1982).** The subunit structure and function of the propionyl coenzyme A carboxylase of *Mycobacterium smegmatis*. *J. Biol. Chem.* **257**: 11994-11999.
- Han, L., Yang, K., Kulowski, K., Wendt-Pienkowski, E., Hutchinson, C.R. & Vining, L.C. (2000).** An acyl-coenzyme A carboxylase encoding gene associated with jadomycin biosynthesis in *Streptomyces venezuelae* ISP5230. *Microbiol.* **146**: 903-910.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- Hanahan, D. (1985).** Techniques for transformation of *E. coli*. S. 109-135. In: *DNA cloning. A practical approach*. Vol.I, Glover D.M. (Ed.). IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA.
- Haneji, T. & Koide, S.S. (1989).** Transblot identification of biotin-containing proteins in rat liver. *Anal. Biochem.* **177**: 57-61.
- Harder, M.E., Beacham, I.R., Cronan Jr., J.E., Beacham, K., Honegger, J.L. & Silbert, D.F. (1972).** Temperature-sensitive mutants of *Escherichia coli* requiring saturated and unsaturated fatty acids for growth: isolation and properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**: 3105-3109.
- Harder, M.E., Ladenson, R.C., Schimmel, S.D. & Silbert, D.F. (1974).** Mutants of *Escherichia coli* with temperature-sensitive malonyl coenzyme A-acyl carrier protein transacylase. *J. Biol. Chem.* **249**: 7468-7475.

- HaBlacher, M., Ivessa, A.S., Paltauf, F. & Kohlwein, S.D. (1993).** Acetyl-CoA carboxylase from yeast is an essential enzyme and is regulated by factors that control phospholipid metabolism. *J. Biol. Chem.* **268**: 10946-10952.
- Haynes, J.A. & Britz, M.L. (1989).** Electrotransformation of *Brevibacterium lactofermentum* and *Corynebacterium glutamicum*: growth in tween 80 increases transformation frequencies. *FEMS Microbiol. Lett.* **61**: 329-334.
- Haynes, J.A. & Britz, M.L. (1990).** The effect of growth conditions of *Corynebacterium glutamicum* on the transformation frequency obtained by electroporation. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 255-263.
- Hector, M.L. & Fall, R.R. (1976).** Multiple acyl-coenzyme A carboxylases in *Pseudomonas citronellolis*. *Biochem.* **15**: 3465-3472.
- Henrikson, K.P. & Allen, S.H.G. (1979).** Purification and subunit structure of propionyl coenzyme A carboxylase of *Mycobacterium smegmatis*. *J. Biol. Chem.* **254**: 5888-5891.
- Herrera-Alcaraz, 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.
- Hodgson, J. (1994).** Bulk amino acid fermentation: technology and commodity trading. *Bio/Technology* **12**: 152-155.
- Hoischen, C. (1990).** Untersuchungen zum Mechanismus der Glutamatsekretion in *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Hoischen, C. & Krämer, R. (1989).** Evidence for an efflux carrier system involved in the secretion of glutamate by *Corynebacterium glutamicum*. *Arch. Microbiol.* **151**: 342-347.
- Hoischen, C. & Krämer, R. (1990).** Membrane alteration is necessary but not sufficient for effective glutamate secretion in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **172**: 3409-3416.
- Hsieh, Y.J. & Kolattukudy, P.E. (1994).** Inhibition of erythromycin synthesis by disruption of malonyl-coenzyme A decarboxylase gene *eryM* in *Saccharopolyspora erythraea*. *J. Bacteriol.* **176**: 714-724.
- Hucheng, A., Marquet, M., Welby, M., Montrozier, H., Goma, G. & Laneélle, G. (1984).** Glutamate excretion triggering mechanism: a reinvestigation of the surfactant-induced modification of cell lipids. *Ann. Microbiol.(Paris)* **135B**: 53-67.
- Hunaiti, A.R. & Kolattukudy, P.E. (1982).** Isolation and characterization of an acyl-coenzyme A carboxylase from an erythromycin-producing *Streptomyces erythraea*. *Arch. Biochem. Biophys.* **216**: 362-371.

- Hutchinson, C.R. (1999).** Microbial polyketide synthases: More and more prolific. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 3336-3338.
- Ikedo, M., Kamada, N., Takano, Y. & Nakano, T. (1999).** Molecular analysis of the *Corynebacterium glutamicum* transketolase gene. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**: 1806-1810.
- In 't Veld, G., Driessen, A.J.M., Op den Kamp, J.A.F. & Konings, W.N. (1991).** Hydrophobic membrane thickness and lipid-protein interactions of the leucine transport system of *Lactococcus lactis*. *Biochim. Biophys. Acta* **1065**: 203-212.
- In 't Veld, G., Driessen, A.J.M. & Konings, W.N. (1993).** Bacterial solute transport proteins in their lipid environment. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**: 293-314.
- Jäger, W., Peters-Wendisch, P.G., 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.
- Jackson, M., Raynaud, C., Lanéelle, M.-A., Guilhot, C., Laurent-Winter, C., Ensergueix, D., Gicquel, B. & Daffé, 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.* **31**: 1573-1587.
- James, B.A. & Wolf, H. (1988).** The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *CABIOS* **4**: 181-186.
- Jang, K.-H., Pierotti, D., Kemp, G.W., Best, G.R. & Britz, M.L. (1997).** Mycolic acid composition of *Corynebacterium glutamicum* and its cell surface mutants: effects of growth with glycine and isonicotinic acid hydrazide. *Microbiol.* **143**: 3209-3221.
- Jarlier, V. & Nikaido, H. (1990).** Permeability barrier to hydrophilic solutes in *Mycobacterium chelonae*. *J. Bacteriol.* **172**: 1418-1423.
- Jarlier, V. & Nikaido, H. (1994).** Mycobacterial cell wall: Structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Microbiol. Lett.* **123**: 11-18.
- Joliff, G., Mathieu, L., Hahn, V., Bayan, N., Duchiron, F., Renaud, M., Schechter, E. & Leblon, G. (1992).** Cloning and nucleotide sequence of the *csp1* gene encoding PS1, one of the two major secreted proteins of *Corynebacterium glutamicum*: the deduced N-terminal region of PS1 is similar to the *Mycobacterium* antigen 85 complex. *Mol. Microbiol.* **6**: 2349-2362.
- Jones, B.M. & Gilligan, J.P. (1983).** *o*-Phthaldialdehyde precolumn derivatization and reversed-phase-high-performance liquid chromatography of polypeptide hydrolysates and physiological fluids. *J. Chromatogr.* **266**: 471-482.

- Kaneda, K., Imaizumi, S. & Yano, I. (1995).** Distribution of C₂₂-, C₂₄-, and C₂₆-alpha-unit-containing mycolic acid homologues in mycobacteria. *Microbiol. Immunol.* **39**: 563-570.
- Kawahara, Y., Takahashi-Fuke, K., Shimizu, E., Nakamatsu, T. & Nakamori, S. (1997).** Relationship between the glutamate production and the activity of 2-oxoglutarate dehydrogenase in *Brevibacterium lactofermentum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**: 1109-1112.
- Keilhauer, C., Eggeling, L. & Sahm, H. (1993).** Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon. *J. Bacteriol.* **175**: 5595-5603.
- Kennerknecht, N. (1999).** Transposonmutagenese bei *Corynebacterium glutamicum*: Charakterisierung peptidsensitiver Mutanten. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Kikuchi, M. & Nakao, Y. (1986).** Glutamic acid. In: *Progress in industrial microbiology*. Vol. 24, pp. 101-116, Aida, K., Chibata, I., Nakayama, K., Takinami, K. & Yamada, H. (Eds.), Kodansha LTD, Tokyo, Elsevier, Amsterdam.
- Kimura, K. (1962).** The significance of glutamic dehydrogenase in glutamic acid fermentation. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **4**: 253-260.
- Kimura, E., Abe, C., Kawahara, Y., Nakamatsu, T. & Tokuda, H. (1996).** Molecular cloning of a novel gene, *dtsR*, which rescues the detergent sensitivity of a mutant derived from *Brevibacterium lactofermentum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**: 1565-70.
- Kimura, E., Abe, C., Kawahara, Y., Nakamatsu, T. & Tokuda, H. (1997a).** 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**: 157-161.
- Kimura, E., Abe, C., Kawahara, Y., Yoshihara, Y. & Nakamatsu, T. (1997b).** Novel gene originating in corynebacterium and use thereof. Europäische Patentanmeldung EP 0 752 472 A1.
- Kimura, Y., Kojyo, T., Kimura, I. & Sato, M. (1997).** Propionyl-CoA carboxylase is required for development of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **179**: 7098-7102.
- Kimura, Y., Kojyo, T., Kimura, I. & Sato, M. (1998).** Propionyl-CoA carboxylase of *Myxococcus xanthus*: catalytic properties and function in developing cells. *Arch. Microbiol.* **170**: 179-184.
- Kimura, Y., Miyake, R., Tokumasu, Y. & Sato, M. (2000).** Molecular cloning and characterization of two genes for the biotin carboxylase and carboxyltransferase subunits of acetyl coenzyme A carboxylase in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **182**: 5462-5469.

- King, M.T. & Reiss, P.D. (1985).** Separation and measurement of short-chain Coenzyme-A compounds in rat liver by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **146**: 173-179.
- Kinoshita, S., Udaka, S. & Shimino, M. (1957).** Studies on the amino acid fermentation, I. Production of L-glutamic acid by various microorganism. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **3**: 193-205.
- Kinoshita, S. & Tanaka, K. (1972).** Glutamic acid. In: *The microbial production of amino acids*. Pp. 263-324, Yamada, K., Kinoshita, S., Tsunoda, T. & Aida, K. (Eds.). Kodansha, Tokyo; John Wiley & Sons, New York.
- Kinoshita, S. (1985).** Glutamic acid bacteria. In: *Biology of industrial microorganisms*. Pp. 115-142, Demain, A. & Solomon, N. (Eds.), The Benjamin/Cummings Publishing Company.
- Kircher, M. & Leuchtenberger, W. (1998).** Aminosäuren - ein Beitrag zur Welternährung. *Biologie in unserer Zeit.* **28**: 281-293.
- Kitano, K., Sugiyama, Y. & Kanzaki, T. (1972).** L-Glutamate fermentation with acetic acid by an oleic acid requiring mutant. II Inhibitory factors against the extracellular accumulation of L-glutamate. *J. Ferment. Technol.* **50**: 182-191.
- Kleemann, A., Leuchtenberger, W., Hoppe, B. & Tanner, H. (1985).** Amino acids. In: *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*. Vol. A2, pp. 57-97, Bartholomé, E., Biekert, E. & Hellmann, H. (Eds.), VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim, New York, Basel, Cambridge.
- Knowles, J.R. (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**: 9730-9733.
- Krämer, R. (1994).** Secretion of amino acids by bacteria: physiology and mechanism. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**: 75-79.
- Kraus, J.P., Firgaira, F., Novotny, J., Kalousek, F., Williams, K.R., Williamson, C., Ohura, T. & Rosenberg, L.E. (1986).** Coding sequence of the precursor of the β -subunit of rat propionyl-CoA carboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 8049-8053.
- Kremer, L., Baulard, A.R. & Besra, G.S. (2000).** Genetics of mycolic acid biosynthesis. In: *Molecular genetics of Mycobacteria*. 1st Ed., pp. 173-190, Hatfull, G.F. & Jacobs Jr., W.R. (Eds.), American Society for Microbiology, Washington D.C.

- Kronmeyer, W., Peekhaus, N., Krämer, R., Sahm, H. & Eggeling, L. (1995). Structure of the *gluABCD* cluster encoding the glutamate uptake system of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **177**: 1152-1158.
- Lanéelle, M.-A. & Asselineau, J. (1977). Glycolipids of *Brevibacterium vitarumen*. *Biochim. Biophys. Acta* **486**: 205-208.
- Lambert, C., Erdmann, A., Eikmanns, M. & Krämer, R. (1995). Triggering glutamate excretion in *Corynebacterium glutamicum* by modulating the membrane state with local anesthetics and osmotic gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 4334-4342.
- Lamhonwah, A.M., Barankiewicz, T.J., Willard, H.F., Mahuran, D.J., Quan, F. & Gravel, R.A. (1986). Isolation of cDNA clones coding for the alpha and beta chains of human propionyl-CoA carboxylase: chromosomal assignments and DNA polymorphisms associated with PCCA and PCCB genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 4864-4868.
- Lapujade, P., Goergen, J.L. & Engasser, J.M. (1999). Glutamate excretion as a major kinetic bottleneck for the thermally triggered production of glutamic acid by *Corynebacterium glutamicum*. *Metab. Eng.* **1**: 255-261.
- Le Coutre, J., Narasimhan, L.R., Patel, C.K.N. & Kaback, H.R. (1997). The lipid bilayer determines helical tilt angle and function in lactose permease of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 10167-10171.
- Lee, R.E., Armour, J.W., Takayama, K., Brennan, P.J. & Besra, G.S. (1997). Mycolic acid biosynthesis: definition and targeting of the Claisen condensation step. *Biochim. Biophys. Acta* **1346**: 275-284.
- Leuchtenberger, W. (1996). Amino acids - technical production and use. In: *Biotechnology*, Vol. 6, pp. 466-502, Rehm, H.-J., Reed, G., Pühler, A. & Stadler, P. (Eds.) VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Levert, K.L., Lloyd, R.B. & Waldrop, G.L. (2000). Do cysteine 230 and lysine 238 of biotin carboxylase play a role in the activation of biotin? *Biochem.* **39**: 4122-4128.
- Li, S.J. & Cronan Jr., J.E. (1992a). The gene encoding the biotin carboxylase subunit of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase. *J. Biol. Chem.* **267**: 855-863.
- Li, S.J. & Cronan Jr., J.E. (1992b). The genes encoding the two carboxyltransferase subunits of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase. *J. Biol. Chem.* **267**: 16841-16847.
- Li, S.J. & Cronan Jr., J.E. (1993). Growth rate regulation of *Escherichia coli* acetyl coenzyme A carboxylase, which catalyzes the first committed step of lipid biosynthesis. *J. Bacteriol.* **175**: 332-340.

- Li, S.J., Rock, C.O. & Cronan Jr., J.E. (1992).** The *dedB* (*usg*) open reading frame of *Escherichia coli* encodes a subunit of acetyl-coenzyme A carboxylase. *J. Bacteriol.* **174**: 5755-5757.
- Liebl, W., Bayerl, A., Stillner, U. & Schleifer, K.H. (1989).** High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **53**: 299-303.
- Liebl, W., Ehrmann, M., Ludwig, W. & Schleifer, K.H. (1991).** Transfer of *Brevibacterium divaricatum* DSM 20297^T, "*Brevibacterium flavum*" DSM 20411, "*Brevibacterium lactofermentum*" DSM 20412 and DSM 1412, and *Corynebacterium lilium* DSM 20137^T to *Corynebacterium glutamicum* and their distinction by rRNA gene restriction patterns. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**: 255-260.
- Lindroth, P. & Mopper, K. (1979).** High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with *o*-phthaldialdehyde. *Anal. Chem.* **51**: 1167-1174.
- Liu, J., Rosenberg, E.Y. & Nikaido, H. (1995).** Fluidity of the lipid domain of cell wall from *Mycobacterium chelonae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 11254-11258.
- Liu, J., Barry III, C.E., Besra, G.S. & Nikaido, H. (1996).** Mycolic acid structure determines the fluidity of the mycobacterial cell wall. *J. Biol. Chem.* **271**: 29545-29551.
- Loos, A., Glanemann, C., Willis, L.B., O'Brien, X.M., Lessard, P.A., Gerstmeir, R., Guillouet, S. & Sinskey, A.J. (2001).** Development and validation of *Corynebacterium* dna microarrays. *Appl. Environm. Microbiol.* **67**: 2310-2318.
- Lopez-Casillas, F., Bai, D.H., Luo, X.C., Kong, I.S., Hermodson, M.A. & Kim, K.H. (1988).** Structure of the coding sequence and primary amino acid sequence of acetyl-coenzyme A carboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 5784-5788.
- Ludwig, W., Neumaier, J., Klugbauer, N., Brockmann, E., Roller, C., Jilg, S., Reetz, K., Schachtner, I., Ludvigsen, A., Bachleitner, M., *et al.* (1993-94).** Phylogenetic relationships of bacteria based on comparative sequence analysis of elongation factor Tu and ATP-synthase beta-subunit genes. *Antonie van Leeuwenhoek* **64**: 285-305.
- Lynen, F., Knappe, J., Lorch, E., Jütting, G., Ringelmann, E. & La Chance, J.-P. (1961).** Zur biochemischen Funktion des Biotins. II Reinigung und Wirkungsweise der β -Methylcrotonyl-Carboxylase. *Biochem. Zeit.* **335**: 123-167.
- Magnuson, K., Jackowski, S., Rock, C.O. & Cronan Jr., J.E. (1993).** Regulation of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **57**: 522-542.
- Malumbres, M., Mateos, L., Martin, J.F. (1995).** Microorganisms for amino acid production: *Escherichia coli* and corynebacteria. In: *Food Biotechnology*, pp. 423-469, Hui, Y.H. & Khachatourians, G.G. (Eds.) Verlag Chemie, Weinheim - New York.

- Marienfeld, S., Uhlemann, E.-M., Schmid, R., Krämer, R. & Burkovski, A. (1997).** Ultrastructure of the *Corynebacterium glutamicum* cell wall. *Antonie van Leeuwenhoek* **72**: 291-297.
- Marini, P., Li, S.J., Gardiol, D., Cronan Jr., J.E. & de Mendoza, D. (1995).** The genes encoding the biotin carboxyl carrier protein and biotin carboxylase subunits of *Bacillus subtilis* acetyl coenzyme A carboxylase, the first enzyme of fatty acid synthesis. *J. Bacteriol.* **177**: 7003-7006.
- Marti, T., Hu, Z., Pohl, N.L., Shah, A.N. & Khosla, C. (2000).** Cloning, nucleotide sequence, and heterologous expression of the biosynthetic gene cluster for R1128, a non-steroidal estrogen receptor antagonist. *J. Biol. Chem.* **275**: 33443-33448.
- Marx, A., Striegel, K., de Graaf, A.A., Sahm, H. & Eggeling, L. (1997).** Response of the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* to different flux burdens. *Biotechnol. Bioengin.* **56**: 168-180.
- McNeil, M., Daffé, M. & Brennan, P.J. (1991).** Location of the mycolyl ester substituents in the cell walls of mycobacteria. *J. Biol. Chem.* **266**: 13217-13223.
- Menkel, E., Thierbach, G., Eggeling, L. & Sahm, H. (1989).** Influence of increased aspartate availability on lysine formation by a recombinant strain of *Corynebacterium glutamicum* and utilization of fumarate. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 684-688.
- Meyer, H. & Meyer, F. (1978).** Acyl-coenzyme A carboxylase of the free-living nematode *Turbatrix aceti*. 2. Its catalytic properties and activation by monovalent cations. *Biochem.* **17**: 1828-1833.
- Minnikin, D.E. (1982).** Lipids: complex lipids, their chemistry, biosynthesis and roles. In: *The biology of the Mycobacteria: Physiology, Identification and classification*, Vol. 1, pp. 95-184, Ratledge, C. & Stanford, J. (Eds.) Academic Press, London, UK.
- Minnikin, D.E., Minnikin, S.M., Parlett, J.H. & Goodfellow, M. (1985).** Mycolic acid patterns of some rapidly-growing species of Mycobacterium. *Zentralbl. Bakteriол. Mikrobiol. Hyg. [A]* **259**: 446-460.
- Moss, J. & Lane, M.D. (1971).** The biotin-dependent enzymes. In: *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*. Vol. 35, pp. 322-363, Meister, A. (Ed.) Interscience Publishers, New York, USA.
- Nakao, Y., Kikuchi, M., Suzuki, M. & Doi, M. (1972).** Microbial production of L-glutamic acid by glycerol auxotrophs. Part I. Induction of glycerol auxotrophs and production of L-glutamic acid from n-paraffins. *Agric. Biol. Chem.* **36**: 490-496.
- Naji, B., Gehin, G. Bonaly, R. (2000).** Structure of surfactants and glutamate efflux by *Corynebacterium glutamicum*. *Process Biochem.* **35**: 759-764.

- Norman, E., De Smet, K.A., Stoker, N.G., Ratledge, C., Wheeler, P.R. & Dale, J.W. (1994).** Lipid synthesis in mycobacteria: characterization of the biotin carboxyl carrier protein genes from *Mycobacterium leprae* and *M. tuberculosis*. *J. Bacteriol.* **176**: 2525-2531.
- Norman, E., Dellagostin, O.A., McFadden, J. & Dale, J.W. (1995).** Gene replacement by homologous recombination in *Mycobacterium bovis* BCG. *Mol. Microbiol.* **16**: 755-760.
- Norrande, J.M., Kempe, T. & Messing, J. (1983).** Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene* **26**: 101-106.
- Nouwens, A.S., Cordwell, S.J., Larsen, M.R., Molloy, M.P., Gillings, M., Willcox, M.D.P. & Walsh, B.J. (2000).** Complementing genomics with proteomics: The membrane subproteome of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Electrophoresis* **21**: 3797-3809.
- Nunheimer, T.D., Birnbaum, J., Ihnen, E.D. & Demain, A.L. (1970).** Product inhibition of the fermentative formation of glutamic acid. *Appl. Microbiol.* **20**: 215-217.
- Ovchinnikov, YuA, Alakhov, YuB, Bundulis, YuP, Bundule, M.A., Dovgas, N.V., Kozlov, V.P., Motuz, L.P. & Vinokurov, L.M. (1982).** The primary structure of elongation factor G from *Escherichia coli*. A complete amino acid sequence. *FEBS Lett.* **139**: 130-135.
- Palmieri, L., Berns, D., Krämer, R. & Eikmanns, M. (1996).** Threonine diffusion and threonine transport in *Corynebacterium glutamicum* and their role in threonine production. *Arch. Microbiol.* **165**: 48-54.
- Parche, S., Burkovski, A., Sprenger, G.A., Weil, B., Krämer, R. & Titgemeyer, F. (2001).** *Corynebacterium glutamicum*: a dissection of the PTS. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 423-428.
- Perez, C.A., Marini, P. & de Mendoza, D. (1998).** Effects on *Bacillus subtilis* of conditional expression of the *accBC* operon encoding subunits of acetyl coenzyme A carboxylase, the first enzyme of fatty acid synthesis. *Microbiol.* **144**: 895-903.
- Peters-Wendisch, P.G. (1996).** Anaplerotische Reaktionen in *Corynebacterium glutamicum*: Untersuchungen zur Bedeutung der PEP-Carboxylase und der Pyruvat-Carboxylase im Zentralstoffwechsel und bei der Aminosäure-Produktion. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Peters-Wendisch, P.G., Kreutzer, C., Kalinowski, J., Pátek, M., Sahm, H. & Eikmanns, B.J. (1998).** Pyruvate carboxylase from *Corynebacterium glutamicum*: characterization, expression and inactivation of the *pyc* gene. *Microbiol.* **144**: 915-927.
- Polakis, S.E., Guchhait, R.B., Zwergel, E.E., Lane, M.D. & Cooper, T.G. (1974).** Acetyl coenzyme A carboxylase system of *Escherichia coli*. *Microbiol.* **144**: 895-903.

- Post, L.E., Post, D.J. & Raushel, F.M. (1990).** Dissection of the functional domains of *Escherichia coli* carbamoyl phosphate synthetase by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **265**: 7742-7747.
- 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**: 1026-1041.
- Puech, V., Chami, M., Lemassu, A., Lanéelle, M.-A., 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. *Microbiol.* **147**: 1365-1382.
- Rainwater, D.L. & Kolattukudy P.E. (1982).** Isolation and charakterisation of acyl coenzyme A carboxylases from *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*, which produce multiple methyl-branched mycocerosic acids. *J. Bacteriol.* **151**: 905-911.
- Rainwater, D.L. & Kolattukudy P.E. (1983).** Synthesis of mycocerosic acids from methylmalonyl coenzyme A by cell-free extracts of *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis* BCG. *J. Biol. Chem.* **258**: 2979-2985.
- Redenbach, M., Kieser, H.M., Denapaité, D., Eichner, A., Cullum, J., Kinashi, H. & Hopwood, D.A. (1996).** A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Mol. Microbiol.* **21**: 77-96.
- Richardson, M. & Khosla, C. (1999).** Structure, function, and engineering of bacterial aromatic polyketide synthases. In: *Comprehensive natural products chemistry. Polyketides and other secondary metabolites including fatty acids and their derivatives*. Vol. 1, pp. 473-494, Sankawa, U. (Ed.), Elsevier, Amsterdam, NL.
- Roberts, E.L., Shu, N., Howard, M.J., Broadhurst, R.W., Chapman-Smith, A., Wallace, J.C. Morris, T., Cronan Jr., J.E. & Perham R.N. (1999).** Solution structures of apo and holo domains from acetyl coenzyme A carboxylase of *Escherichia coli* determined by triple-resonance nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochem.* **38**: 5045-5053.
- Rodríguez, E. & Gramajo, H. (1999).** Genetic and biochemical characterization of the α and β components of a propionyl-CoA carboxylase complex of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiol.* **145**: 3109-3119.
- Rodríguez, E., Banchio, C., Diacovich, L., Bibb, M.J. & Gramajo, H. (2001).** Role of an essential acyl coenzyme A carboxylase in the primary and secondary metabolism of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4166-4176.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A. (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989).** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samols, D., Thornton, C.G., Murtif, V.L., Kumar, G.K., Haase, F.C. & Wood, H.G. (1988).** Evolutionary conservation among biotin enzymes. *J. Biol. Chem.* **263**: 6461-6464.
- Sanger, F., Nicklen, C. & Coulson, A.R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Schäfer, A., Kalinowski, J., Simon, R., Seep-Feldhaus, A.-H. & Pühler, A. (1990).** High-frequency conjugal plasmid transfer from Gram-negative *Escherichia coli* to various Gram-positive coryneform bacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 1663-1666.
- 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.
- Sirakova, T.D., Thirumala, A.K., Dubey, V.S., Sprecher, H. & Kolattukudy, P.E. (2001).** The *Mycobacterium tuberculosis* *pkas2* gene encodes the synthase for the hepta- and octamethyl-branched fatty acids required for sulfolipid synthesis. *J. Biol. Chem.* **276**: 16833-16839.
- Schrumpf, B., Eggeling, L. & Sahm, H. (1992).** Isolation and prominent characteristics of an L-lysine hyperproducing strain of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 566-571.
- Schwarzer, A. & Pühler, A. (1991).** Manipulation of *Corynebacterium glutamicum* by gene disruption and replacement. *Bio/Technology* **9**: 84-87.
- Schwinde, J. (1995).** Untersuchungen zur Aktivität der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase von *Corynebacterium glutamicum* und Charakterisierung des Gens für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Untereinheit. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Shenoy, B.C., Xie, Y., Park, V.L., Kumar, G.K., Beegen, H., Wood, H.G. & Samols, D. (1992).** The importance of methionine residues for the catalysis of the biotin enzyme, transcarboxylase. *J. Biol. Chem.* **267**: 18407-18412.
- Shiio, I., Otsuka, S.I. & Takahashi, M. (1962).** Effect of biotin on the bacterial formation of glutamic acid. I. Glutamate formation and cellular permeability of amino acids. *J. Biochem.* **51**: 56-62.
- Shiio, I., Otsuka, S.I. & Katsuya, M. (1963).** Cellular permeability and extracellular formation of glutamic acid in *Brevibacterium flavum*. *J. Biochem.* **53**: 333-340.

- Shiio, I. & Ozaki, H. (1970).** Regulation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-specific glutamate dehydrogenase from *Brevibacterium flavum*, a glutamate-producing bacterium. *J. Biochem.* **68**: 633-647.
- Shiio, I. & Ujigawa, K. (1978).** Enzymes of the glutamate and aspartate synthetic pathways in a glutamate-producing bacterium, *Brevibacterium flavum*. *J. Biochem.* **84**: 647-657.
- Shiio, I. & Ujigawa-Takeda, K. (1980).** Presence and regulation of 2-ketoglutarate dehydrogenase complex in a glutamate-producing bacterium, *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.* **44**: 1897-1904.
- Shimakata, T., Iwaki, M. & Kusaka, T. (1984).** *In vitro* synthesis of mycolic acids by the fluffy layer fraction of *Bacterionema mattruchotii*. *Arch. Biochem. Biophys.* **229**: 329-339.
- Simić, P., Sahm, H. & Eggeling, L. (2001).** L-threonine export: use of peptides to identify a new translocator from *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **183**: 5317-5324.
- Simon, R., Priefer, U. & Pühler, A. (1983).** A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Bio/Technology* **11**: 784-791.
- Söhling, B. & Gottschalk, G. (1996).** Molecular analysis of the anaerobic succinate degradation pathway in *Clostridium kluyveri*. *J. Bacteriol.* **178**: 871-880.
- Spies, M. (1996).** Nachweis und Quantifizierung von CoA und CoA-Derivaten und Untersuchung zur Rolle von Acetyl-CoA bei der Regulation des Acetatstoffwechsels in *C. glutamicum*. Diplomarbeit, Fachhochschule, Aachen.
- Stackebrandt, E., Rainey, F.A. & Ward-Rainey, N.L. (1997).** Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int. J. System. Bacteriol.* **47**: 479-491.
- Staunton, J. & Wilkinson, B. (1999).** Biosynthesis of erythromycin and related macrolides. In: *Comprehensive natural products chemistry. Polyketides and other secondary metabolites including fatty acids and their derivatives*. Vol. 1, pp. 495-533, Sankawa, U. (Ed.), Elsevier, Amsterdam, NL.
- Sternson L.A., Stobaugh, J.F. & Repta A.J. (1984).** Rational design and evaluation of improved o-phthalaldehyd-like fluorogenic reagents. *Anal. Biochem.* **144**: 233-246.
- Stuible, H.P., Wagner, C., Andreou, I., Huter, G., Haselmann, J. & Schweizer, E. (1996).** Identification and functional differentiation of two type I fatty acid synthases in *Brevibacterium ammoniagenes*. *J. Bacteriol.* **178**: 4787-4793.
- Stuible, H.P., Meurer, G. & Schweizer, E. (1997).** Heterologous expression and biochemical characterization of two functionally different type I fatty acid synthases from *Brevibacterium ammoniagenes*. *Eur. J. Biochem.* **247**: 268-273.

- Sutton, M.R., Fall, R.R., Nervi, A.M., Alberts, A.W., Vagelos, P.R. & Bradshaw, R.A. (1977).** Amino acid sequence of *Escherichia coli* biotin carboxyl carrier protein (9100). *J. Biol. Chem.* **252**: 3934-3940.
- Takinami, K., Yoshii, H., Tsuru, H. & Okada, H. (1965).** Biochemical effects of fatty acid and its derivatives on L-glutamic acid fermentation. Part III. Biotin-tween 60 relationship in the accumulation of L-glutamic acid and the growth of *Brevibacterium lactofermentum*. *Agric. Biol. Chem.* **29**: 351-359.
- Tindall, K.R. & Kunkel, T.A. (1988).** Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* **27**: 6008-6013.
- Thoden, J.B., Blanchard, C.Z., Holden, H.M. & Waldrop, G.L. (2000).** Movement of the biotin carboxylase B-domain as a result of ATP binding. *J. Biol. Chem.* **275**: 16183-16190.
- Toh, H., Kondo, H. & Tanabe, T. (1993).** Molecular evolution of biotin-dependent carboxylases. *Eur. J. Biochem.* **215**: 687-696.
- Ui, S., Otagiri, M., Mimura, A., Dohmae, N., Takio, K., Ohkuma, M. & Kudo, T. (1998).** Cloning, expression and nucleotide sequence of the L-2,3-butandiol dehydrogenase gene from *Brevibacterium saccharolyticum* C-1012. *J. Ferment. Bioeng.* **86**: 290-295.
- Uratani, Y., Wakayama, N. & Hoshino, T. (1987).** Effect of lipid acyl chain length on activity of sodium-dependent leucine transport system in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biolog. Chem.* **262**: 16914-16919.
- Usuda, Y., Tujimoto, N., Abe, C., Asakura, Y., Kimura, E., Kawahara, Y., Kurahashi, O., Matsui, H. (1996).** Molecular cloning of the *Corynebacterium glutamicum* ('*Brevibacterium lactofermentum*' AJ12036) *odhA* gene encoding a novel type of 2-oxoglutarate dehydrogenase. *Microbiol.* **142**: 3347-3354.
- van der Rest, M.E., Lange, C. & Molenaar, D. (1999).** A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 541-545.
- Vorm, O. & 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**: 955-958.
- Vrljić, M., Kronmeyer, W., Sahm, H. & Eggeling, L. (1995).** Unbalance of L-lysine flux in *Corynebacterium glutamicum* and its use for the isolation of excretion-defective mutants. *J. Bacteriol.* **177**: 4021-4027.
- Vrljić, M., Sahm, H. & Eggeling, L. (1996).** A new type of transporter with a new type of cellular function: L-lysine export from *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Microbiol.* **22**: 815-826.

- Vrljić, M. (1997).** L-Lysinexport bei *Corynebacterium glutamicum*: Physiologische und molekularbiologische Charakterisierung des Carrier-vermittelten Exportes eines Primärmetaboliten. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Vuorio, R., Hirvas, L. & Vaara, M. (1991).** The Ssc protein of enteric bacteria has significant homology to the acyltransferase Lpxa of lipid A biosynthesis, and to three acetyltransferases. *FEBS Lett.* **292**: 90-94.
- Wakil, S.J., Stoops, J.K. & Joshi, V.C. (1983).** Fatty acid synthesis and its regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **52**: 537-79.
- Walker, R.W., Prome, J.-C. & Lacave, C.S. (1973).** Biosynthesis of mycolic acids. Formation of a C₃₂ β -keto ester from palmitic acid in a cell-free system of *Corynebacterium diphtheriae*. *Biochim. Biophys. Acta* **326**: 52-62.
- Wehmeier, L., Schäfer, A., Burkovski, A., Krämer, R., Mechold, U., Malke, H., Pühler, A. & Kalinowski, J. (1998).** The role of the *Corynebacterium glutamicum* *rel* gene in (p)ppGpp metabolism. *Microbiol.* **144**: 1853-1862.
- Wendisch, V.F., Spies, M., Reinscheid, D.J., Schnicke, S., Sahm, H. & Eickmanns, B.J. (1997).** Regulation of acetate metabolism in *Corynebacterium glutamicum*: transcriptional control of the isocitrate lyase and malate synthase genes. *Arch. Microbiol.* **168**: 262-269.
- Wendisch, V.F., De Graaf, A.A., Sahm, H. & Eikmanns, B.J. (2000).** Quantitative determination of metabolic fluxes during cointilization of two carbon sources: comparative analyses with *Corynebacterium glutamicum* during growth on acetate and/or glucose. *J. Bacteriol.* **182**: 3088-3096.
- Wheeler, P.R., Bulmer, K., Ratledge, C., Dale, J.W. & Norman, E. (1992).** Control of acyl-CoA carboxylase activity in mycobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **90**: 169-172.
- Wijayarathna, C.D., Wachi, M. & Nagai, K. (2001).** Isolation of *ftsI* and *murE* genes involved in peptidoglycan synthesis from *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**: 466-470.
- Wood, H.G. & Barden, R.E. (1977).** Biotin enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **46**: 385-413.
- Wurtele, E.S. & Nikolau, B.J. (1990).** Plants contain multiple biotin enzymes: discovery of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase, propionyl-CoA carboxylase and pyruvate carboxylase in the plant kingdom. *Arch. Biochem. Biophys.* **278**: 179-186.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985).** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.

Yao, X., Wei, D., Soden, C. Jr., Summers, M.F. & Beckett, D. (1997). Structure of the carboxy-terminal fragment of the apo-biotin carboxyl carrier subunit of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase. *Biochemistry* **36**: 15089-15100.

Ziegler, P. (2000). Untersuchungen zur Sekretion und zum Abbau von L-Threonin in *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.

VII. Anhang

1. Sequenzen

Die Nukleotidsequenzen in dieser Arbeit isolierter Gene sind in 5' → 3' Richtung dargestellt. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen kodierender Bereiche sind im Einbuchstabencode gezeigt. Putative Start- und Stopcodons sind in der Nukleotidsequenz durch Fettdruck hervorgehoben. Ebenso sind die zur Synthese von Peptidantikörpern ausgewählten Bereiche der Aminosäuresequenz durch Fettdruck gekennzeichnet.

accDA

PCR amplifizierte Sequenz (2.122 bp) mit dem *accDA* Gen (508 - 1980) und der abgeleiteten Aminosäuresequenz (491 AS).

```

1  CTCGAGCGGGAGTCGGTGATCGGCCACTCTCTAAGCAATGCCGGCTTTAAAATAAAGCAA
61  CTTATATGTTTCTCACCACATCTGGCCGACGACCACGAAGTATGTTGTCGATCACAGCTA
121 AACGTGTGAATGTGAAGTTACCTAACTCACATTGCAATGCGATAGCGATTTGGAAAACCTC
181 ACTCCCCCAATATCTTAACTTAACTTAAAAGTAGTGTTTTACCTGCATTTATAAAAAGT
241 TCCCGATCTACCCCTCTTTACCCCGAAATACCCCTTTTGCAAAGATTGCAAACACAACA
301 GTGCAATAGTTAACGGGCTTCACACGTCACCATTCTGTCCGGTTTTAGGCTATGTTCCGG
361 ACGTCTAGGCAAAAAGTAGTTTTGTGAGATGAAACGCATAATCCGTCATTTTTTACGCAA
421 TCGATAGCCTAAATTGGGCTTAGATCTTCCGCCCTCTAAATAGGTATGCAGAGACATTCGA
481 ATTAATTAACAAAGCCATTTTTCGGGCCGTGGAGAAGCGTTTTCCGACTATGGTGTGGGGC
      V E K R F P T M V W G
541 ATGGAACACACTTCAGCATTGACGCTCATAGACTCGGTTTTGGACCCTGACAGCTTCATT
      M E H T S A L T L I D S V L D P D S F I
601 TCTTGAATGAAACTCCCCAATATGACAACCTCAATCAAGGCTATGCAGAGACCTTGGAG
      S W N E T P Q Y D N L N Q G Y A E T L E
661 CGGGCTCGAAGCAAGGCCAAATGCGATGAATCGGTAATTACTGGAGAAGGCACCGTGGAG
      R A R S K A K C D E S V I T G E G T V E
721 GGCATTCCGGTAGCCGTTATTTTGTCCGATTTTTCTTCCCTCGGCGGTTCTTTGGGCACG
      G I P V A V I L S D F S F L G G S L G T
781 GTCGCGTCGGTGCGCATCATGAAGGCGATTACCGCGCCACAGAGCTGAAACTCCCACTG
      V A S V R I M K A I H R A T E L K L P L

```

841 CTGGTCTCCCTGCTTCCGGTGGTGCGCGCATGCAGGAAGACAATCGAGCTTTTGTCTATG
 L V S P A S G G A R M Q E D N R A F V M
 901 ATGGTGTCCATAACCGCGGCTGTGCAGCGTCACCGCGAGGCGCATTTGCCGTTCTGGTG
 M V S I T A A V Q R H R E A H L P F L V
 961 TATTTGCGCAATCCACGATGGGTGGCGCCATGGCCTCGTGGGGTTCATCTGGGCATCTC
 Y L R N P T M G G A M A S W G S S G H L
 1021 ACTTTTGCGBAACCGGCGCGCAGATAGGTTTCTGGGTCTCGCGTGGTGGAGTTAACCC
 T F A E P G A Q I G F L G P R V V E L T
 1081 ACTGGGCATGCGCTTCCAGACGGTGTGCAGCAGGCGGAGAATTTGGTGAAAACCTGGTGTG
 T G H A L P D G V Q Q A E N L V K T G V
 1141 ATTGATGGAATTGTGTGCGCCACTCCAATTGCGTGCAGCGGTGGCAAAAACCTCAAGGTT
 I D G I V S P L Q L R A A V A K T L K V
 1201 ATTCAGCCGGTAGAGGCAACGGATCGTTTTTCTCCAACAACCTCCTGGCGTGGCACTTCCG
 I Q P V E A T D R F S P T T P G V A L P
 1261 GTGATGGAGGCGATTGCGCGTTCTCGTGACCCGCGAGAGGCTGGAATCGGGGAGATTATG
 V M E A I A R S R D P Q R P G I G E I M
 1321 GAAACGTTGGGGCAGACGTCGTCAAGCTTTCTGGTGCGCGTGCTGGCGCATTGAGCCCCG
 E T L G A D V V K L S G A R A G A L S P
 1381 GCTGTGCGCGTTGCCCTGGCGCGCATCGGGGGCCGGCCCGTGGTGCTGATTGGGCAGGAT
 A V R V A L A R I G G R P V V L I G Q D
 1441 CGCCGCTTCACGCTTGGGCCGCGAGGAGCTGCGTTTTGCGCGTCGTGGCATTTCGCTGGCG
 R R F T L G P Q E L R F A R R G I S L A
 1501 CGCGAGCTAAACCTGCCGATCGTGTCCATCATCGACACCTCCGGCGCCGAATTGTCGCAG
 R E L N L P I V S I I D T S G A E L S Q
 1561 GCGGCTGAGGAGCTCGGCATCGCAAGCTCGATTGCGCGCACCTTGTCCAAGCTTATCGAC
 A A E E L G I A S S I A R T L S K L I D
 1621 GCTCCCCTCCCACCGTTTTCGGTCATTATTGGTCAGGGCGTTGGCGGTGGCGCGCTGGCC
 A P L P T V S V I I G Q G V G G G A L A
 1681 ATGCTGCCCCGCCGATCTGGTCTACGCGGCCGAAAACGCGTGGCTGTCCGATTGCCACCA
 M L P A D L V Y A A E N A W L S A L P P
 1741 GAGGGCGCCTCGGCCATCCTCTTCCGCGACACCAACCACGCCGCGGAAATCATAGAGCGA
 E G A S A I L F R D T N H A A E I I E R
 1801 CAAGGCGTGCAGGCGCACGCACTTTTAAGCCAAGGGCTTATCGACGGGATCGTCGCCGAA
 Q G V Q A H A L L S Q G L I D G I V A E
 1861 ACCGAGCACTTTGTTGAAGAAATTCTCGGCACAATCAGCAACGCCCTCTCCGAATTGGAT
 T E H F V E E I L G T I S N A L S E L D
 1921 AACAAATCCGGAGAGGGCGGGACGCGACAGTCGCTTCACACGATTTGAGCGTTTAGCGCAG
 N N P E R A G R D S R F T R F E R L A Q
 1981 **TAA**AGAAAATTATGCGCTGATCAAATCGATGATGAACACCAGGGTACGGCCAGACAGTGG
 -

dtsR1

PCR amplifizierte Sequenz (1.867 bp) mit dem *ftsR1* Gen (50 - 1681) und der abgeleiteten Aminosäuresequenz (543 AS).

1 GCGGAAATATTTGTGGACGTTACCCCCGCCTACCGCTACGATTTTCAAAC**ATG**ACCATTTC
M T I S

61 CTCACCTTTTGATTGACGTCGCCAACCTTCCAGACATCAACACCAC TGCCGGCAAGATCGC
S P L I D V A N L P D I N T T A G K I A

121 CGACCTTAAGGCTCGCCGCGCGGAAGCCCATTTCCCCATGGGTGAAAAGGCAGTAGAGAA
D L K A R R A E A H F P M G E K A V E K

181 GGTCCACGCTGCTGGACGCCCTCACTGCCCGTGAGCGTTTGGATTACTTACTCGATGAGGG
V H A A G R L T A R E R L D Y L L D E G

241 CTCCTTCATCGAGACCGATCAGCTGGCTCGCCACCGCACCACCGCTTTCGGCCTGGGCGC
S F I E T D Q L A R H R T T A F G L G A

301 TAAGCGTCCTGCAACCGACGGCATCGTGACCGGCTGGGGCACCATTGATGGACGCGAAGT
K R P A T D G I V T G W G T I D G R E V

361 CTGCATCTTCTCGCAGGACGGCACCGTATTCGGTGGCGCGCTTGGTGAGGTGTACGGCGA
C I F S Q D G T V F G G A L G E V Y G E

421 AAAGATGATCAAGATCATGGAGCTGGCAATCGACACCGGCCGCCCATTGATCGGTCTTTA
K M I K I M E L A I D T G R P L I G L Y

481 CGAAGGCGCTGGCGCTCGTATTTCAGGACGGCGCTGTCTCCCTGGACTTCATTTCCCAGAC
E G A G A R I Q D G A V S L D F I S Q T

541 CTTCTACCAAAACATTTCAGGCTTCTGGCGTTATCCCACAGATCTCCGTCATCATGGGCGC
F Y Q N I Q A S G V I P Q I S V I M G A

601 ATGTGCAGGTGGCAACGCTTACGGCCCAGCTCTGACCGACTTCGTGGTCATGGTGGACAA
C A G G N A Y G P A L T D F V V M V D K

661 GACCTCCAAGATGTTTCGTTACCGGCCCAGACGTGATCAAGACCGTCACCGGCGAGGAAAT
T S K M F V T G P D V I K T V T G E E I

721 CACCCAGGAAGAGCTTGGCGGAGCAACCACCCACATGGTGACCGCTGGTAACTCCCCTA
T Q E E L G G A T T H M V T A G N S H Y

781 CACCGCTGCGACCGATGAGGAAGCACTGGATTGGGTACAGGACCTGGTGTCTTCCTCCC
T A A T D E E A L D W V Q D L V S F L P

841 ATCCAACAATCGCTCCTACGCACCGATGGAAGACTTCGACGAGGAAGAAGGCGGCGTTGA
S N N R S Y A P M E D F D E E E G G V E

901 AGAAAACATCACC[.]CGCTGAC[.]GATCTGAAGCTCGACGAGATCATCCAGATTCCGCGACCGT[.]
 E N I T A D D L K L D E I I P D S A T V

961 TCCTTACGACGTCCGCGATGTCATCGAATGCCTCACC[.]GACGATGGCGAATACCTGGAAAT[.]
 P Y D V R D V I E C L T D D G E Y L E I

1021 CCAGGCAGACCGCGCAGAAAACGTTGTTATTGCATTCCG[.]CCGCATCGAAGGCCAGTCCGT[.]
 Q A D R A E N V V I A F G R I E G Q S V

1081 TGGCTTTGTTGCCAACCAGCCAACCCAGTTCGCTGGCTGCCTGGACATCGACTCCTCTGA[.]
 G F V A N Q P T Q F A G C L D I D S S E

1141 GAAGGCAGCTCGCTTCGTCCGCACCTGCGACGCGTTCAACATCCCAATCGTCATGCTTGT[.]
 K A A R F V R T C D A F N I P I V M L V

1201 CGACGTCCCCGGCTTCCTCCCAGGCGCAGGCCAGGAGTACGGTGGCATTCCGCGTCGTGG[.]
 D V P G F L P G A G Q E Y G G I P R R G

1261 CGCAAAGCTGCTCTACGCATACGGCGAAGCAACCGTTCCAAAGATCACCGTCACCATGCG[.]
 A K L L Y A Y G E A T V P K I T V T M R

1321 TAAGGCTTACGGCGGAGCGTACTGCGTGATGGGTTCCAAGGGCTTGGGCTCTGACATCAA[.]
 K A Y G G A Y C V M G S K G L G S D I N

1381 CCTTGCATGGCCAACCGCACAGATCGCCGTATGGGCGCTGCTGGCGCAGTTGGATTCA[.]
 L A W P T A Q I A V M G A A G A V G F I

1441 CTACCGCAAGGAGCTCATGGCAGCTGATGCCAAGGGCCTCGATACCGTAGCTCTGGCTAA[.]
 Y R K E L M A A D A K G L D T V A L A K

1501 GTCCTTCGAGCGCGAGTATGAAGACCACATGCTCAACCCGTACCACGCTGCAGAACGTGG[.]
 S F E R E Y E D H M L N P Y H A A E R G

1561 CCTGATCGACGCCGTGATCCTGCCAAGCGAAACCCGCGGACAGATTTCCCGCAACCTTCG[.]
 L I D A V I L P S E T R G Q I S R N L R

1621 CCTGCTCAAGCACAAGAACGTCACTCGCCCTGCTCGCAAGCACGGCAACATGCCACTGTA[.]
 L L K H K N V T R P A R K H G N M P L -

1681 AATCGGCGAATCCATAAAGGTTCAAAAGAATTCAATAAGAATTCAATAAGAATTCAATAA[.]

1741 GGGTTCAATAAGGGCCGTCTTAAATGATTGGGTGTAAAGAAATACCAATGAAAATTGGCA[.]

1801 ACTCTTTACACCCAATCTTTAAGACATGGGGGGTGGCGCTGGGCTAATATAACCGGTTAG[.]

1861 CGAAACG

dtsR2

PCR amplifizierte Sequenz (1.886 bp) mit dem *dtsR2* Gen (181 - 1794) und der abgeleiteten Aminosäuresequenz (537 AS).

```

1  GGCTAATATAACCGGTTAGCGAAACGATTAGTCCCCTTGTTAGGGGGATTAAACCCTCGAAG
61  TGGGTCGTATTTTGGCGTTTGTATGTTACACAAGAACCCTGCACAACGCCTTCAAAGTA
121  CGTCGACCACGACCAAGCGCATTATTCACTCTCACCCCTTCAGGATTTAGACTAAGAAACC
181  ATGACTGCAGCACAGACCAAACCTGACCTCACCACCACGGCTGGAAAGCTGTCCGATCTT
    M T A A Q T K P D L T T T A G K L S D L
241  CGCTCCCGTCTTGCAGAAGCTCAAGCTCCAATGGGCGAAGCAACTGTAGAAAAAGTGCAC
    R S R L A E A Q A P M G E A T V E K V H
301  GCTGCTGGCAGGAAGACTGCCCGGAACGTATCGAGTATTTGCTCGATGAGGGCTCTTTC
    A A G R K T A R E R I E Y L L D E G S F
361  GTAGAGATCGATGCTCTTGCTCGTCACCGTTCCAAGAACTTCGGCCTGGATGCCAAGCGT
    V E I D A L A R H R S K N F G L D A K R
421  CCAGTTACTGACGGTGTGTGACTGGTTACGGCACCATCGATGGCCGTAAGGTCTGTGTG
    P V T D G V V T G Y G T I D G R K V C V
481  TTCTCCCAGGACGGCGCTGTATTCGGTGGCGCTTTGGGTGAAGTTTATGGTGAAAAGATC
    F S Q D G A V F G G A L G E V Y G E K I
541  GTTAAGGTTATGGATCTTGCATCAAGACCGGTGTGCCTTTTGATCGGAATCAATGAGGGT
    V K V M D L A I K T G V P L I G I N E G
601  GCTGGTGCAGCTATCCAGGAAGGTGTTGTGTCTCTGGGTCTGTACTCACAGATCTTCTAC
    A G A R I Q E G V V S L G L Y S Q I F Y
661  CGCAACACCCAGGCGTCTGGCGTTATCCCACAGATCTCTTTGATCATGGGTGCCTGCGCT
    R N T Q A S G V I P Q I S L I M G A C A
721  GGTGGTCACGTGTACTCCCCTGCTCTGACTGACTTCATCGTCATGGTGGATCAGACTTCC
    G G H V Y S P A L T D F I V M V D Q T S
781  AAGATGTTTATCACCGGCCCTGATGTCATCAAGACTGTCACCGGTGAAGATGTCACCCAG
    K M F I T G P D V I K T V T G E D V T Q
841  GAGGAGCTCGGTGGCGCTCACACCCACATGGCTACCTCCGGTACCTCCCATTACTCTGCT
    E E L G G A H T H M A T S G T S H Y S A
901  TCTGATGATTACAGATGCTTTGGATTGGGTTTCGCGAGCTGACCTCTTATCTTCCATCCAAC
    S D D S D A L D W V R E L T S Y L P S N
961  AACCGTGCAGAACTCCTCGCCAGGAGGCCGACATCATGATCGGTTCCATCCAGGAAAC
    N R A E T P R Q E A D I M I G S I Q E N
1021  ATCAACGATGTGGATCTGGAATTGGACACCATCATCCCGGATTCCCCGAACCAGCCTTAT
    I N D V D L E L D T I I P D S P N Q P Y
1081  GACATGAAGGAAGTTATTTCCCGCATCGTCGACGACGCCGAGTTCTTCGAGATCCAGGAA
    D M K E V I S R I V D D A E F F E I Q E

```

```

1141  GACTACGCAGAGAACATCCTGTGTGGCTTCGCTCGCGTTGAGGGCCGTTCTGTTGGCATC
      D Y A E N I L C G F A R V E G R S V G I

1201  GTGGCTAACCAGCCAACCCAGTTTCGCTGGCTGCTTGGATATTAAGGCATCTGAGAAGGCT
      V A N Q P T Q F A G C L D I K A S E K A

1261  GCCCCGTTTCATCCGCACCTGCGATGCCTTCAACATCCCAATCCTTGAGTTCGTGGACGTT
      A R F I R T C D A F N I P I L E F V D V

1321  CCAGGCTTCCTGCCTGGCACCAACCAGGAATTCGACGGCÂTCATCCGCCGCGGCGCAAAG
      P G F L P G T N Q E F D G I I R R G A K

1381  CTGCTTTACGCTTACGCTGAAGCAACCGTCGGCAAGATCÂCCGTCATCÂCCCGCAAGTCC
      L L Y A Y A E A T V G K I T V I T R K S

1441  TACGGCGGAGCGTACTGCGTGATGGGTTCCAAGGATATGGGCGCTGACCTCGTATTCGCT
      Y G G A Y C V M G S K D M G A D L V F A

1501  TGGCCTACCGCACAGATCGCCGTCATGGGCGCTTCAGGTGCTGTTGGATTTATCTACCGT
      W P T A Q I A V M G A S G A V G F I Y R

1561  AAGGAACTCAAGCAGGCTGCCACCGAAGGCAAGGACGTTGCTGAGGTCATGAAGGGCTAC
      K E L K Q A A T E G K D V A E V M K G Y

1621  GAGCAGGAGTACGAAGAACTCTGGTCAACCCTTATGTCGCAGCTGAGCGTGGCCTGGTT
      E Q E Y E E T L V N P Y V A A E R G L V

1681  GATGCCGTTATCCACCTTCTGAGACCCGCGGCCAGATCÂTTGAGGGTCTGCGTCTGCTG
      D A V I P P S E T R G Q I I E G L R L L

1741  GATCGCAAGGTGGTCAATGTTCTGCTAAAAAGCACGGTAACATTCCACTATAGAAACTG
      D R K V V N V P A K K H G N I P L -

1801  TTTTTTAAAGGAGAACCATGTCTGAAGAAÂCCACTCAGGÂCACCAAGGCTGCAGAGAAGC

1861  CTTTTCTGCAGATCGTATCTGGCAAC

```

dtsR3

PCR amplifizierte Sequenz (1.864 bp) mit dem *dtsR3* Gen (248 - 1798) und der abgeleiteten Aminosäuresequenz (516 AS).

```

1  AAGCCCCTGTCATCCTGTTCCGCGCGGAACGCATGCATGATGGAGCTATCGAACTTGAAC

61  CAAACTATGCCAAGATTGATCAAGATGGAGGATGGTCCGGAATTGTCAACGATTTGGAAA

121  TTGTTTCAGCTGAATGGTGACCACCTGGCAGTTGTTCGATGAACCAGAAATCGGCACAGTCG

181  GAGCTCATTTGAGTCGCCGCATTGATGAGÂTTTCTCGGAAGAATTAGTAACGGAGAGCTG

241  ACGGAAGTTGAGTAACACCÂCTACTGCAGAGAAGCTAGCGGATCTGCGCGCACGCCTGGA
      M S N T T T A E K L A D L R A R L E

```

301 GATTGCCAAAGACCCAGGTAGTGAACGCGCACGTAAAAAGCGCGACGAGGAAGGCCGAAC
 I A K D P G S E R A R K K R D E E G R T

361 CACCCCTCGTCAGCGTATTGATGCTCTGCTTGATGCCGGATCCTTTGTGGAGATCGGCGC
 T P R Q R I D A L L D A G S F V E I G A

421 ACTAGGCCGTACCCCGGATGAACCCGATGCGCCTTACTCTGACGGTGTGGTGAAGTGTGTA
 L G R T P D E P D A P Y S D G V V T G Y

481 TGGTCGCATCGATGGTCGCCCAGTGGCCATCTACGCCCATGACAAGACCGTTTACGGTGG
 G R I D G R P V A I Y A H D K T V Y G G

541 TTCCGTGGGCATGACTTTCGGACGTAAAGTCAGCGAAGTCATGGACATGGCTATCCGCAT
 S V G M T F G R K V S E V M D M A I R I

601 TGGTTGCCAGTTATCGGTATTTCAGGATTCGGGCGGAGCCCGCATTCAGGATGCGGTGAC
 G C P V I G I Q D S G G A R I Q D A V T

661 CTCCTTGGCGATGTACTCAGAGATCGCGCGTCGTCAGCTTCCGCTGTCTGGCCGAGCCC
 S L A M Y S E I A R R Q L P L S G R S P

721 TCAGATTTCCATCATGCTGGGTAAATCGGCAGGTGGCGCAGTGTATGCACCTGTGACCAC
 Q I S I M L G K S A G G A V Y A P V T T

781 TGACTTTGTTATCGGCGTTGATGGTGAAACAGAAATGTATGTCACCGGCCAGCCGTGAT
 D F V I G V D G E T E M Y V T G P A V I

841 CAAGGAAGTCACCGGCGAGCAGATCACTTCCGCGAGACCTCGGTGGCGGTGCGCAGCAGAT
 K E V T G E Q I T S A D L G G G A Q Q M

901 GCAAAACGGCAACATTTCTATTTGGCGTCCTCTGAAGAAGAGGCCCTGAATATGGTCAA
 Q N G N I S Y L A S S E E E A L N M V K

961 GGATTTGCTCGACTTCCTGCCTTTGACCTGCAATGATCCAGCCCCCTGTGT'TTGCAGCACC
 D L L D F L P L T C N D P A P V **F A A P**

1021 AACGGATGAAGAGATCGCCTACGACGAAGCTCTGAACCTCGTTCATGCCTGACGACACTAA
T D E E I A Y D E A L N S F M P D D T N

1081 CCAGGGCTACGACATGCATGACCTGCTGGACAAGCTTTTCGACGACGCCAACCTGCTGGA
 Q G Y D M H D L L D K L F D D A N L L E

1141 AATCCAAGAGGAGTACGCCCCAACCTGATCACTACCTTCGCCCCGCTTGATGGCAAGGC
 I Q E E Y A P N L I T T F A R V D G K A

1201 AGTCGGTGTGGTGGCCAACCAACCAATGGATAAGGCAGGCTGCATCGACGCTGACGCCGC
 V G V V A N Q P M D K A G C I D A D A A

1261 CGACAAGGGCGCCCGCTTCATCCGTATCTGCGACGCCCTACAACATCCCGATCATCTTCGT
 D K G A R F I R I C D A Y N I P I I F V

1321 CGTGGACACCCCTGGCTACCTGCCTGGCGTGGACCAAGAGAAGGTCGGTTTGATTACCG
 V D T P G Y L P G V D Q E K V G L I H R

1381 TGGCGCAAAGCTAGCCTTCGCAGTGGTGGAAATCGACCGTCCCTAAGATTTCTTGATCGT
 G A K L A F A V V E S T V P K I S L I V

1441 GCGCAAGGCCCTACGGCGGAGCATATGCCGTGATGGGTTCGAAGAACCTCACCGGTGACCT
 R K A Y G G A Y A V M G S K N L T G D L

1501 CAACTTCGCATGGCCAACCGCACAGATCGCCGTGATGGGCGCAGCCGCAGCTGTCGTGAT
N F A W P T A Q I A V M G A A A A V V M

1561 GATCCAGGGCAAGCAGCTCGAAGCCGCCCCACCTGAGCAGCGTGAATACATGAAGAACT
I Q G K Q L E A A P P E Q R E Y M K K L

1621 GTTCATGGACTTCTACGATGAGAACATGACCAGCCCATATGTGGCCGCCGAGCGTGGTTA
F M D F Y D E N M T S P Y V A A E R G Y

1681 CATCGACGCCATGATCGAACCTGCAGAGACCCGTTTGGTGCTTCGCCGAGCAGTCCGCCA
I D A M I E P A E T R L V L R R A V R Q

1741 GCTGGAAACCAAGGCTGTGCGAGACCTCGACAAGAAGCACACGATCATGCCGATG**TAACG**
L E T K A V R D L D K K H T I M P M -

1801 TCCAAAGAATTATCCAGATAGAAATCCTGTAACTAATTCACCAGAGGAGACCGCAATGGC

1861 AACC

2. Restriktionskarten der konstruierten Plasmide

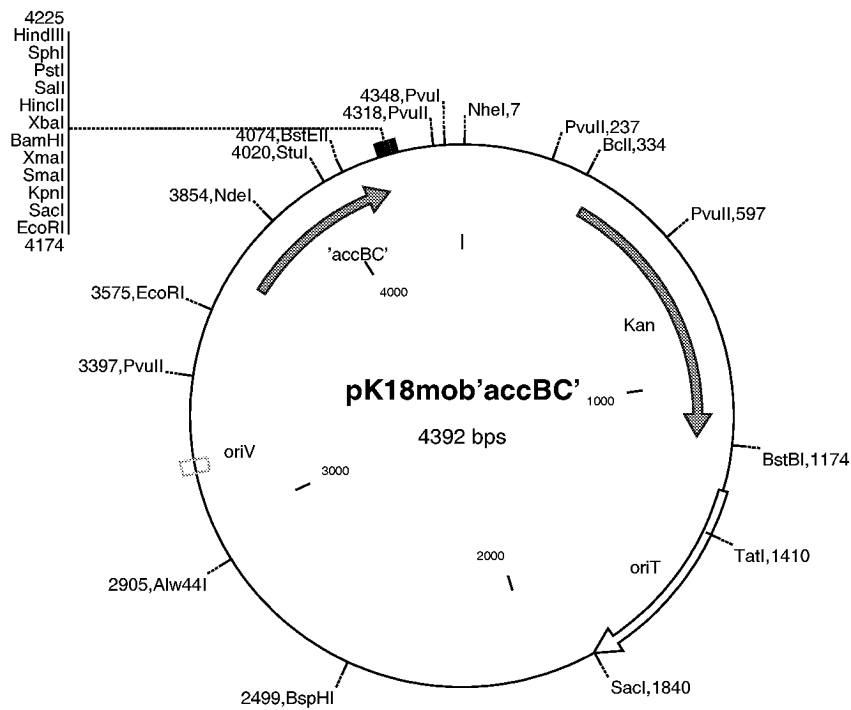


Abb. 24: Plasmid pK18mob'accBC' (pK18mob mit internem 599 bp accBC-Fragment)

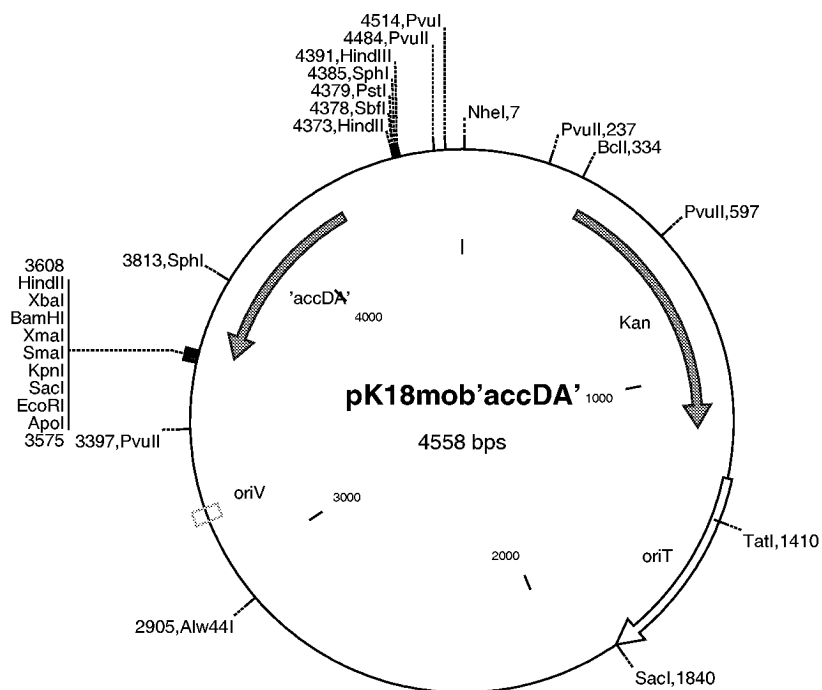


Abb. 25: Plasmid pK18mob'accDA' (pK18mob mit internem 761 bp accDA-Fragment)

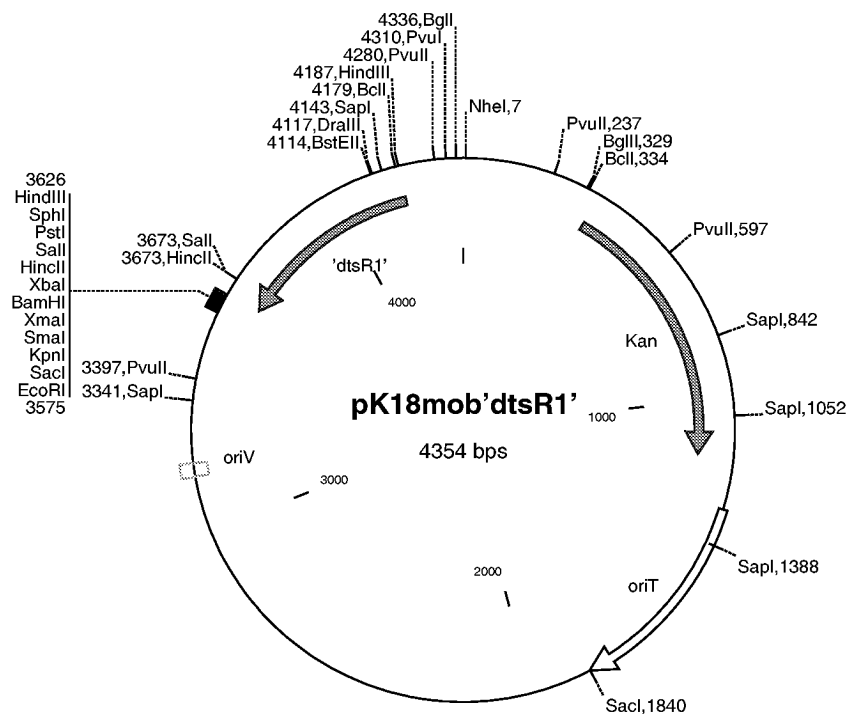


Abb. 26: Plasmid pK18mob'dtsR1' (pK18mob mit internem 555 bp *dtsR1*-Fragment)

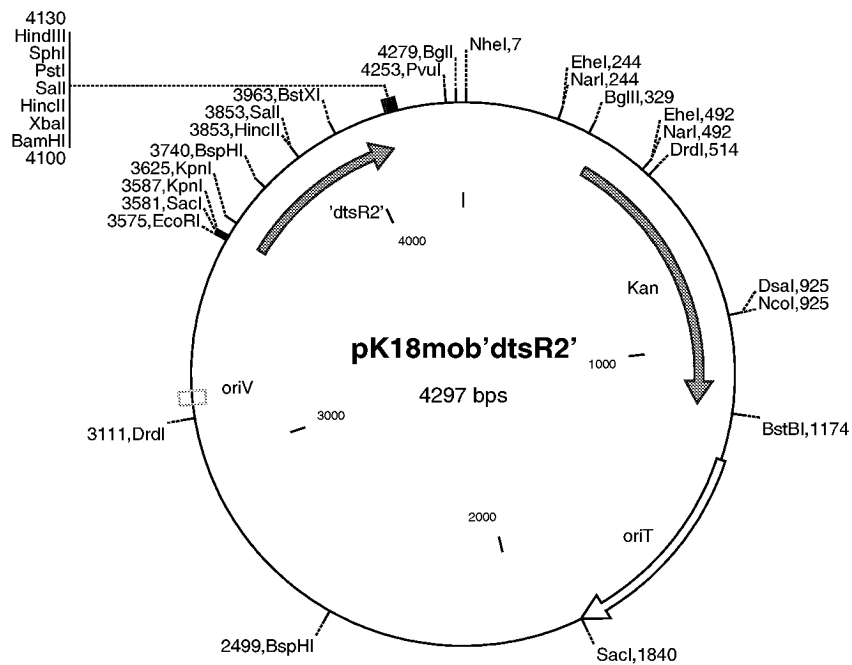


Abb. 27: Plasmid pK18mob'dtsR2' (pK18mob mit internem 508 bp *dtsR2*-Fragment)

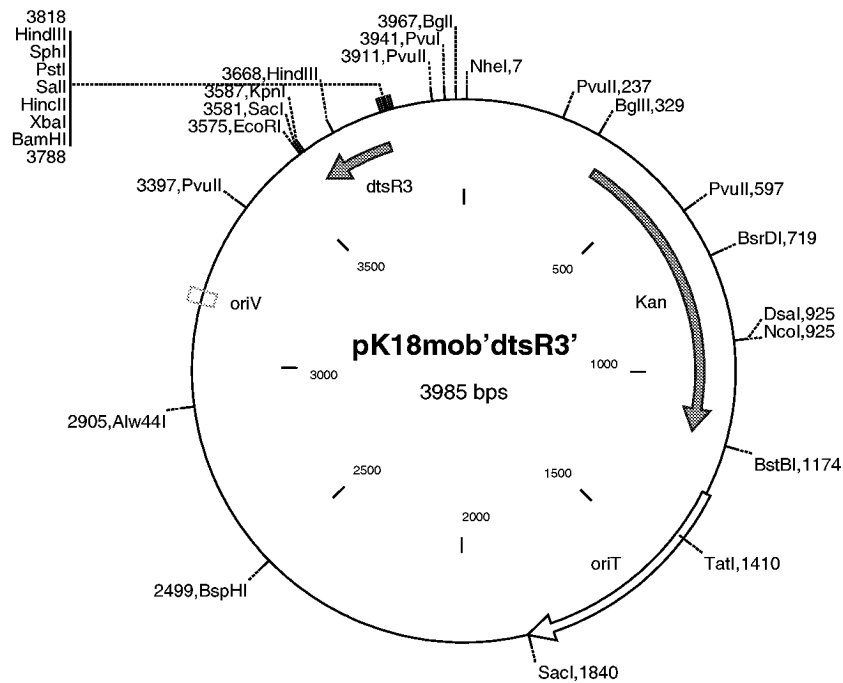


Abb. 28: Plasmid pK18mob'dtsR3' (pK18mob mit internem 192 bp dtsR3-Fragment)

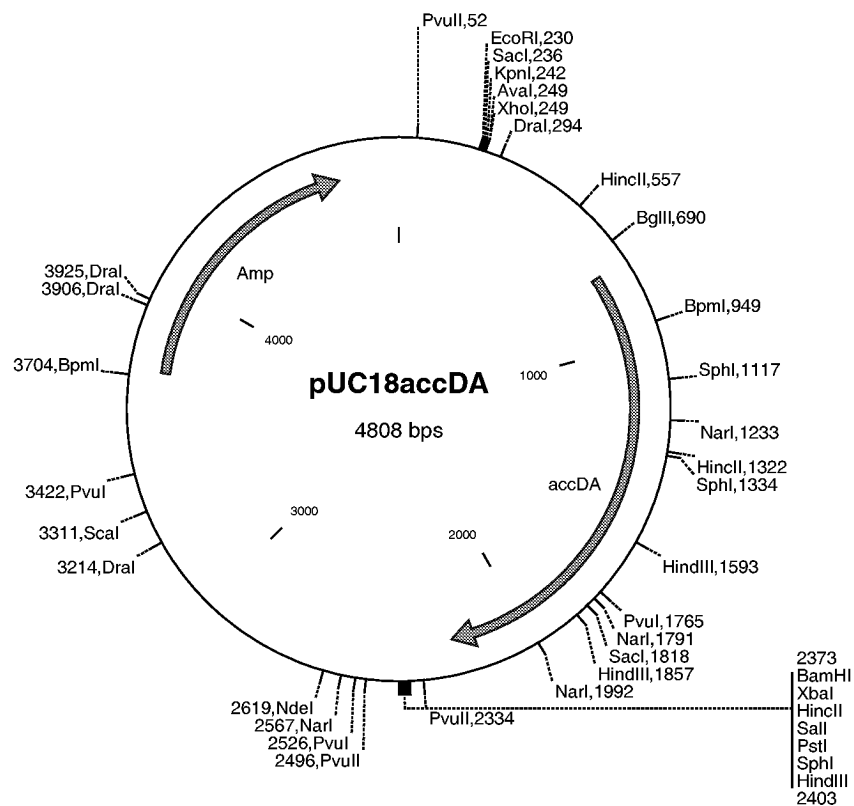


Abb. 29: Plasmid pUC18accDA (pUC18 mit 2,1 kb PCR-Fragment aus chromosomaler DNA von *C. glutamicum* ATCC13032, enthält accDA)

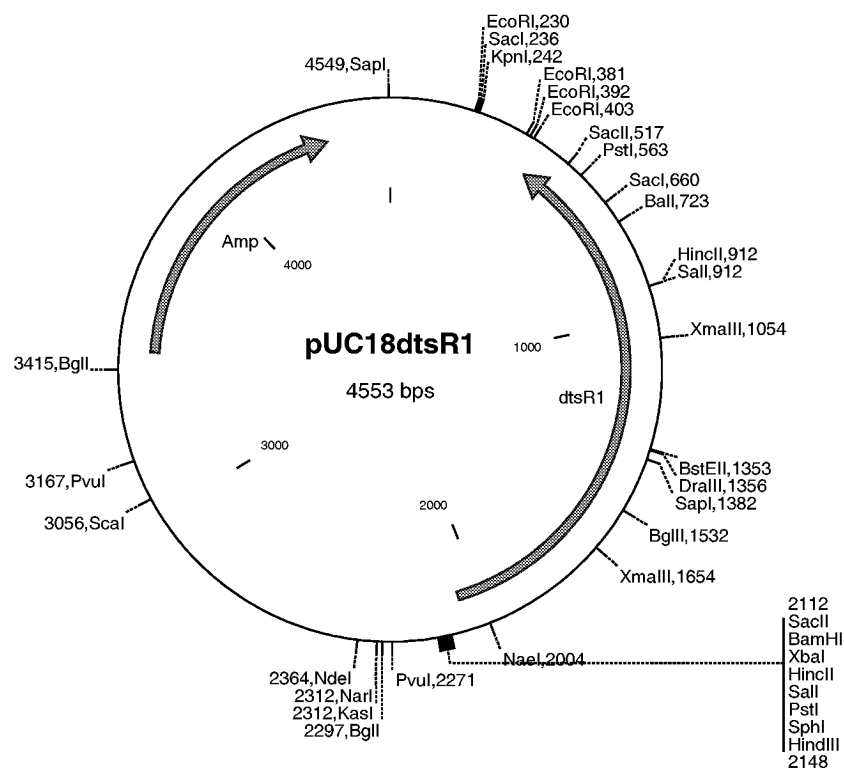


Abb. 30: Plasmid pUC18*dtsR1* (pUC18 mit 1,9 kb PCR-Fragment aus chromosomaler DNA von *C. glutamicum* ATCC13032, enthält *dtsR1*)

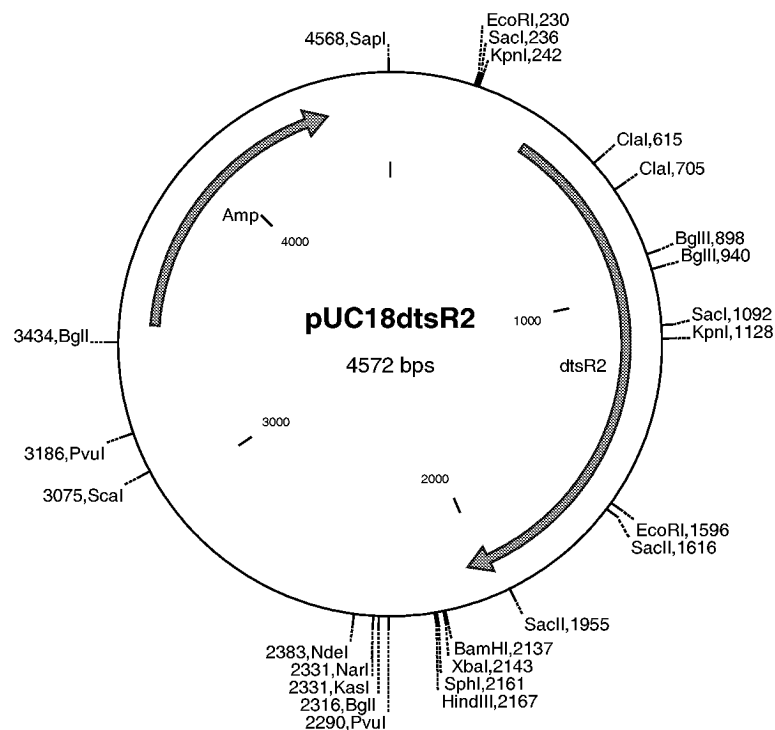


Abb. 31: Plasmid pUC18*dtsR2* (pUC18 mit 1,9 kb PCR-Fragment aus chromosomaler DNA von *C. glutamicum* ATCC13032, enthält *dtsR2*)

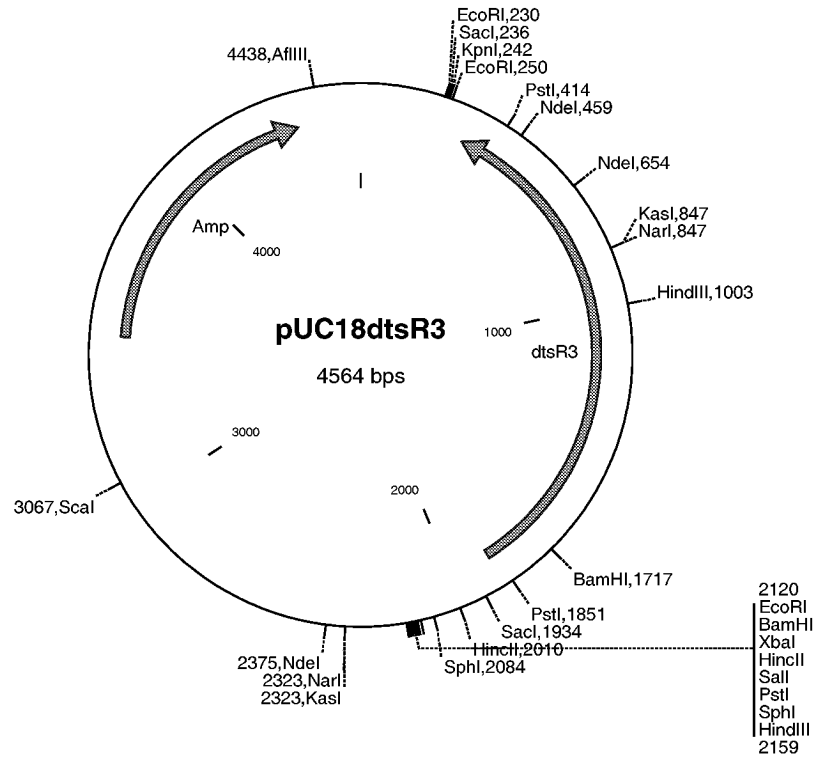


Abb. 32: Plasmid *pUC18dtsR3* (*pUC18* mit 1,9 kb PCR-Fragment aus chromosomaler DNA von *C. glutamicum* ATCC13032, enthält *dtsR3*)

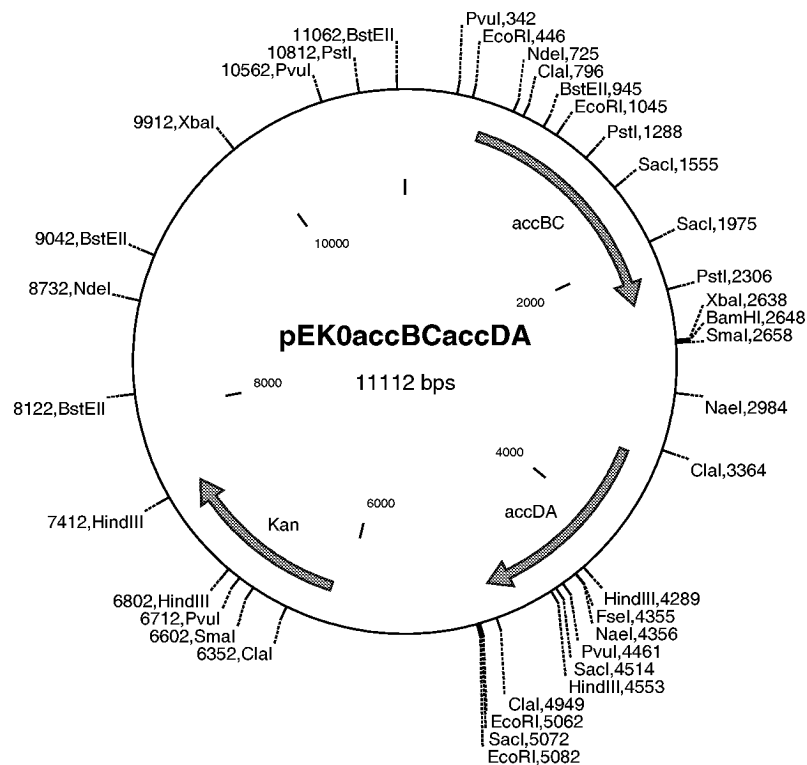


Abb. 33: Plasmid *pEK0accBCaccDA* (*pEK0* mit 2,6 kb *SalI/NaeI* *accBC*-Insert aus *pUC18accBC* und 2,4 kb *PstI/EcoRI* *accDA*-Insert aus *pUC18accDA*)

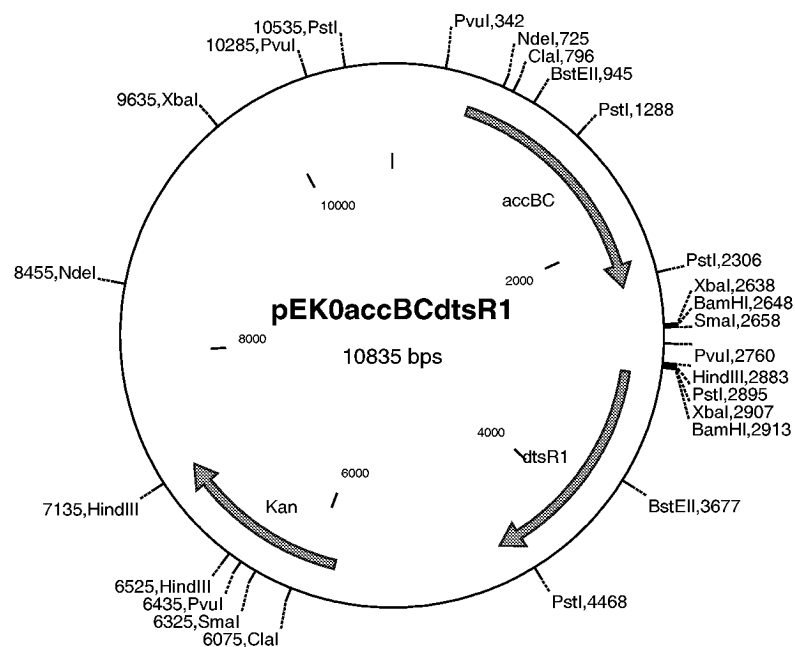


Abb. 34: Plasmid *pEK0accBCdtsR1* (*pEK0* mit 2,6 kb *SalI/NaeI* *accBC*-Insert aus *pUC18accBC* und 2,1 kb *NdeI/KpnI* *dtsR1*-Insert aus *pUC18dtsR1*)

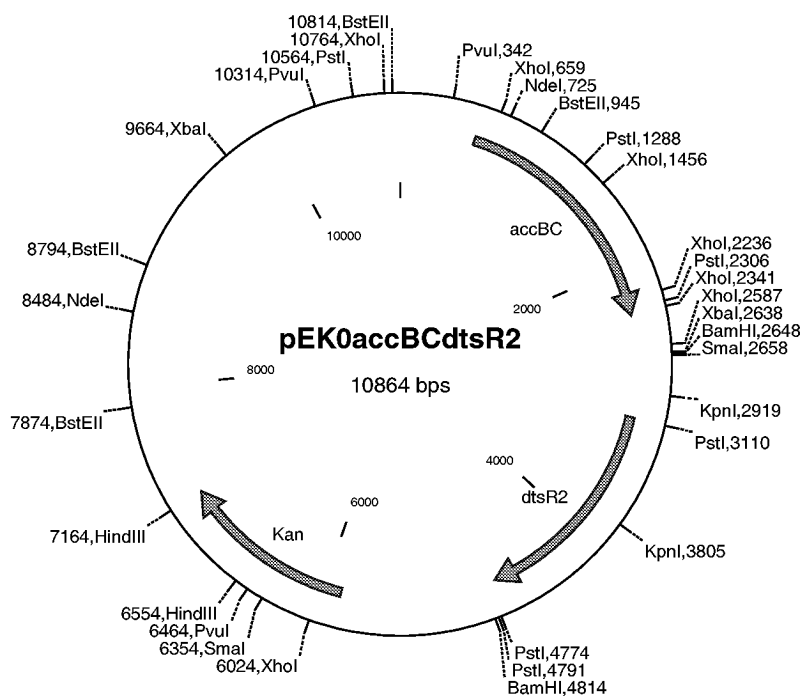


Abb. 35: Plasmid *pEK0accBCdtsR2* (*pEK0* mit 2,6 kb *SalI/NaeI* *accBC*-Insert aus *pUC18accBC* und 2,1 kb *BamHI/SapI* *dtsR2*-Insert aus *pUC18dtsR2*)

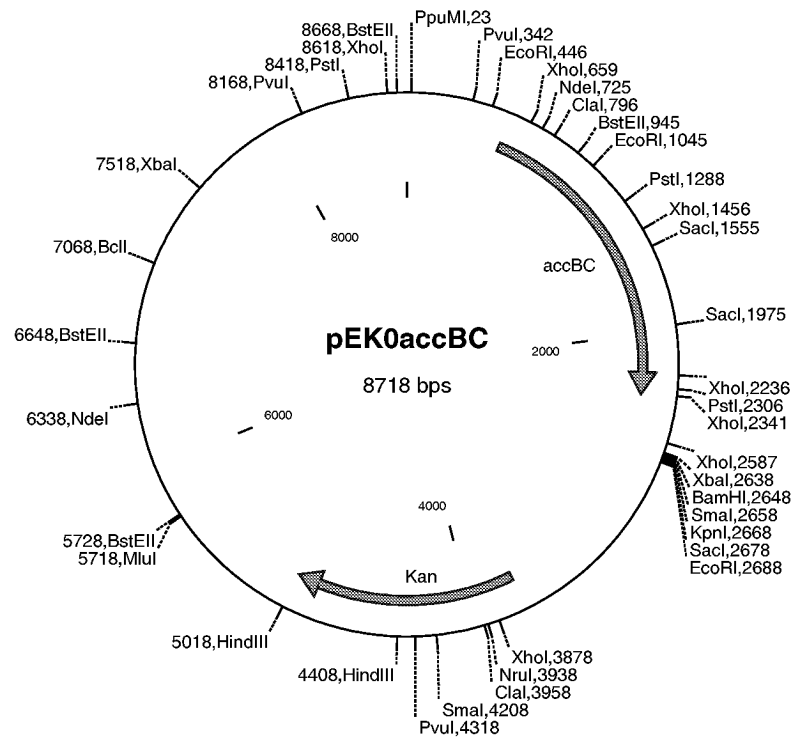


Abb. 36: Plasmid pEK0accBC (pEK0 mit 2,6 kb *SaI*/*NaeI* *accBC*-Insert aus pUC18*accBC*)

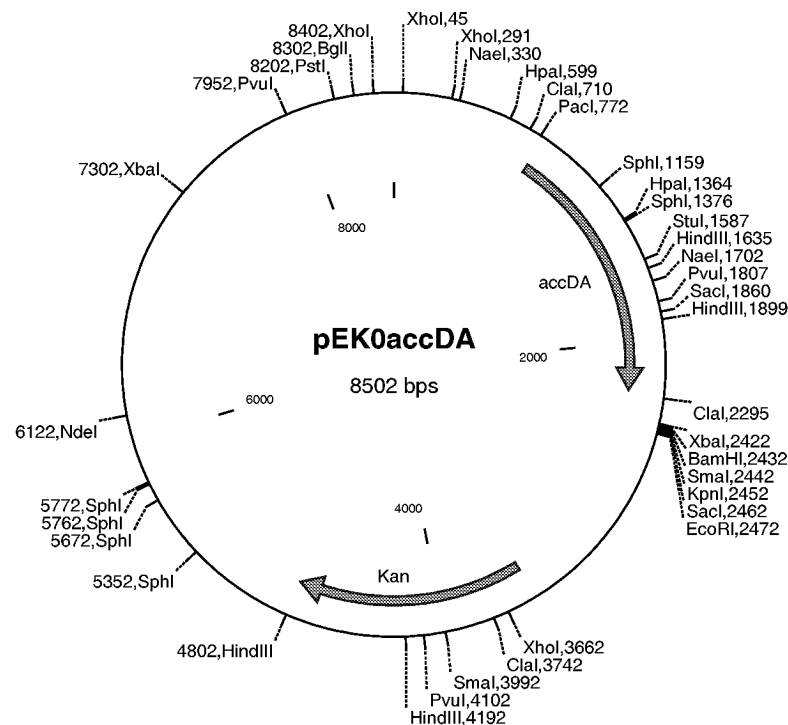


Abb. 37: Plasmid pEK0accDA (pEK0 mit 2,4 kb *PstI*/*EcoRI* *accDA*-Insert aus pUC18*accDA*)

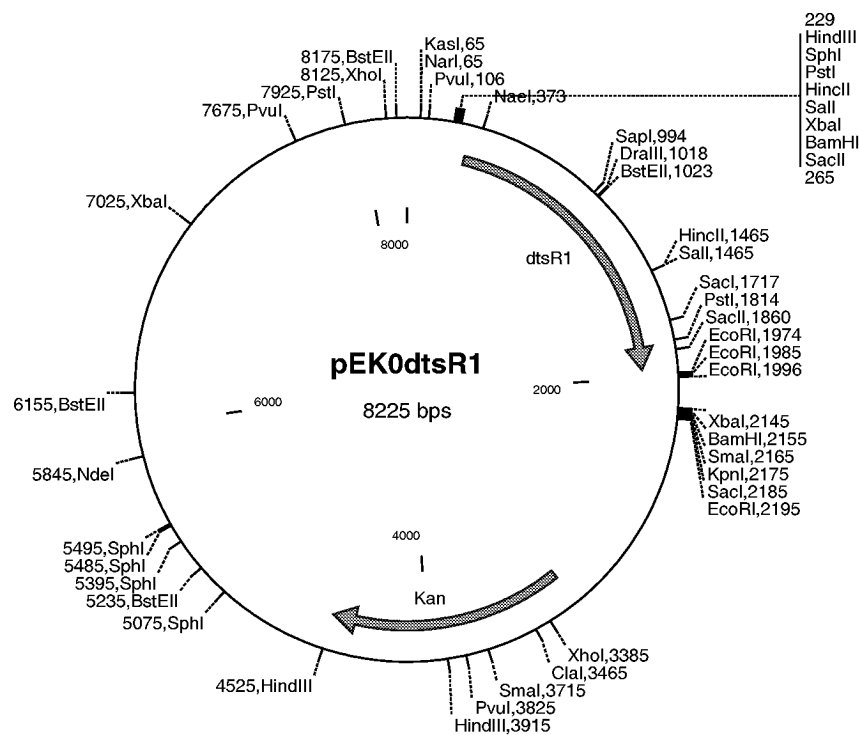


Abb. 38: Plasmid pEK0dtsR1 (pEK0 mit 2,1 kb *NdeI/KpnI* dtsR1-Insert aus pUC18dtsR1)

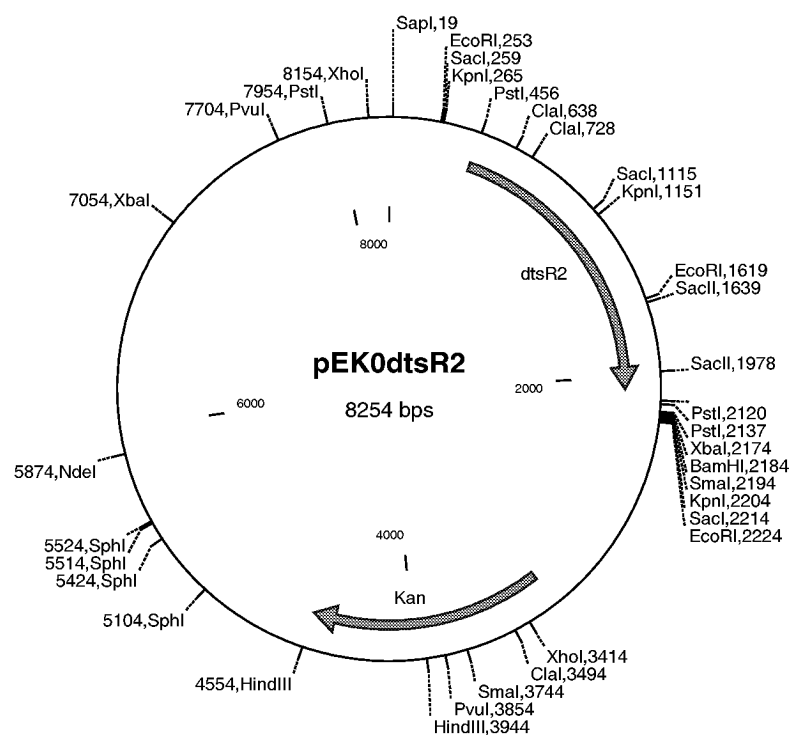


Abb. 39: Plasmid pEK0dtsR2 (pEK0 mit 2,2 kb *BamHI/SapI* dtsR2-Insert aus pUC18dtsR2)

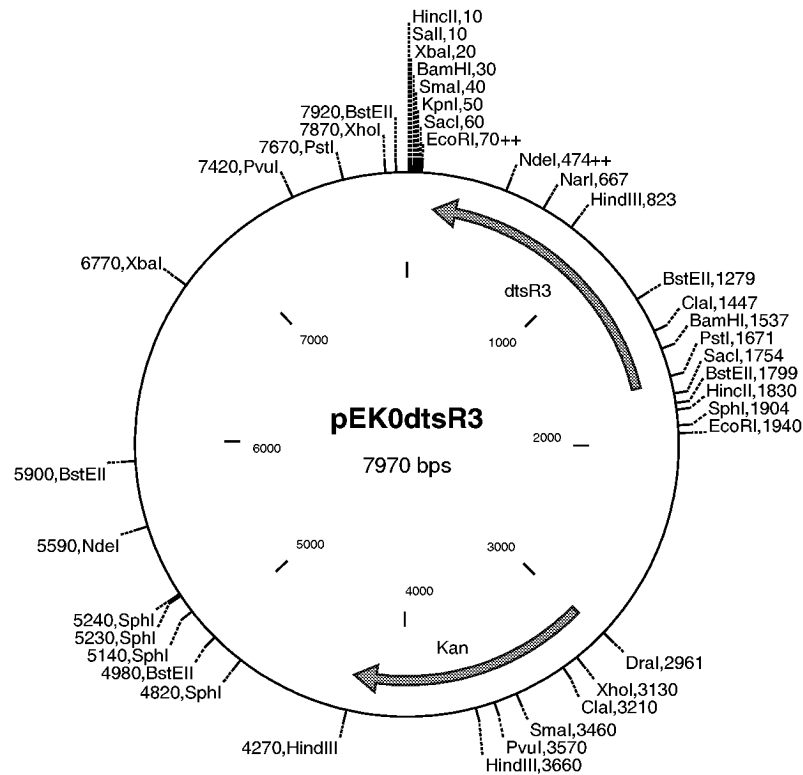


Abb. 40: Plasmid pEK0*dtsR3* (pEK0 mit 1,9 kb *EcoRI dtsR3*-Insert aus pUC18*dtsR3*)

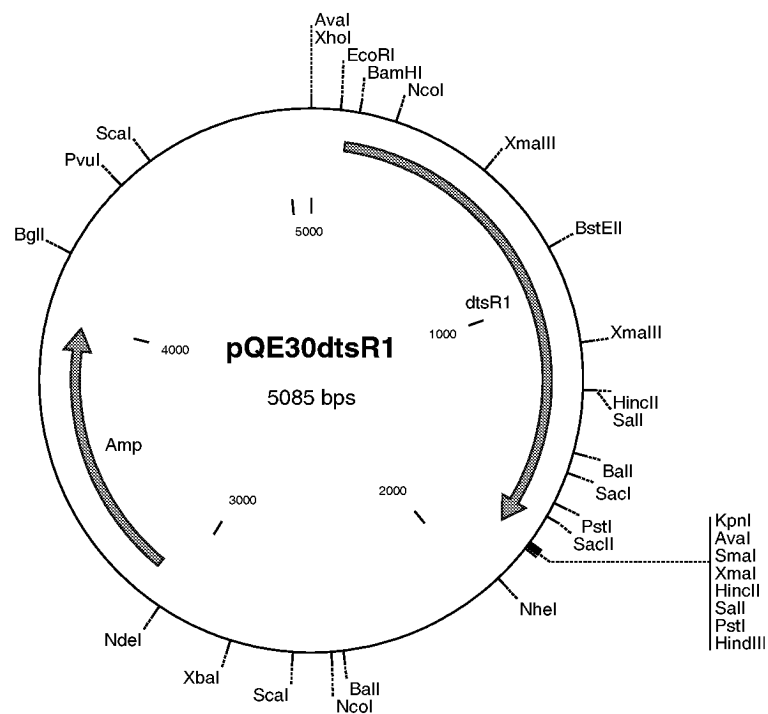


Abb. 41: Plasmid pQE30*dtsR1* (pQE30 mit 1,7 kb *BamHI/KpnI dtsR1*-Insert aus pPCR-ScriptAmpSK(+)*dtsR1*)

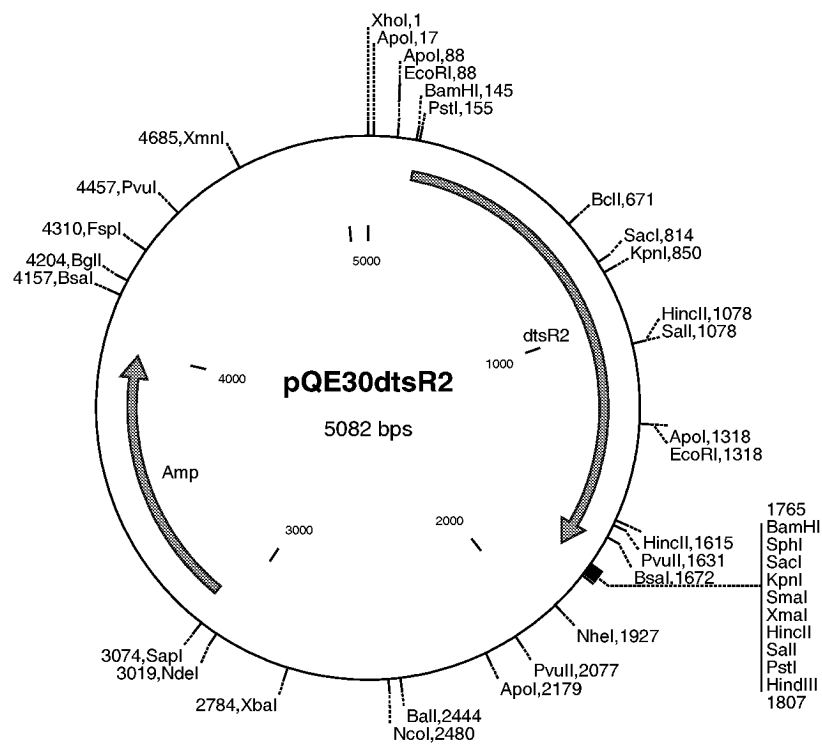


Abb. 42: Plasmid pQE30*dtsR2* (pQE30 mit 1,7 kb *Bam*HI *dtsR2*-Insert aus pPCR-Script AmpSK(+)*dtsR2*)

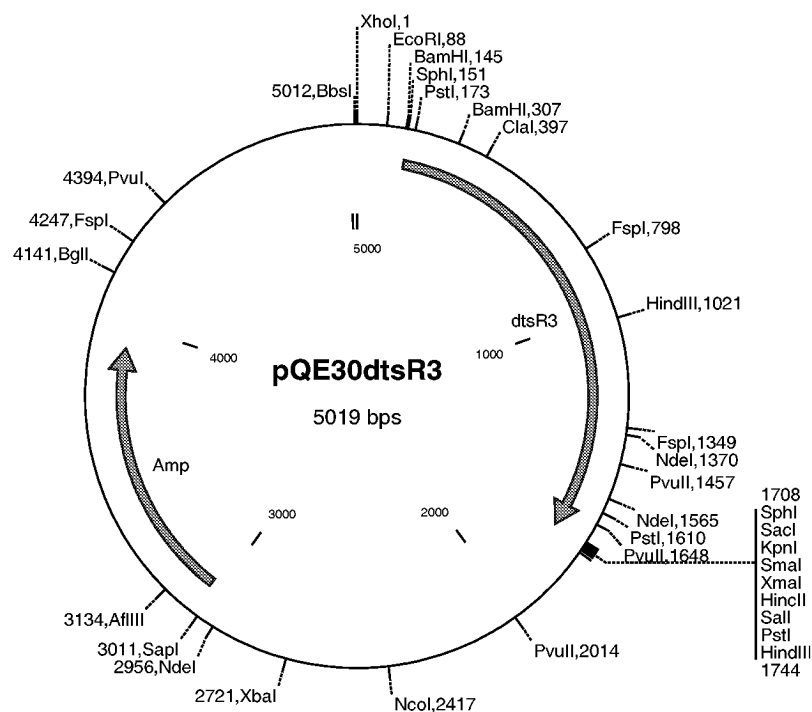


Abb. 43: Plasmid pQE30*dtsR3* (pQE30 mit 1,6 kb *Sph*I *dtsR3*-Insert aus pPCR-Script AmpSK(+)*dtsR3*)

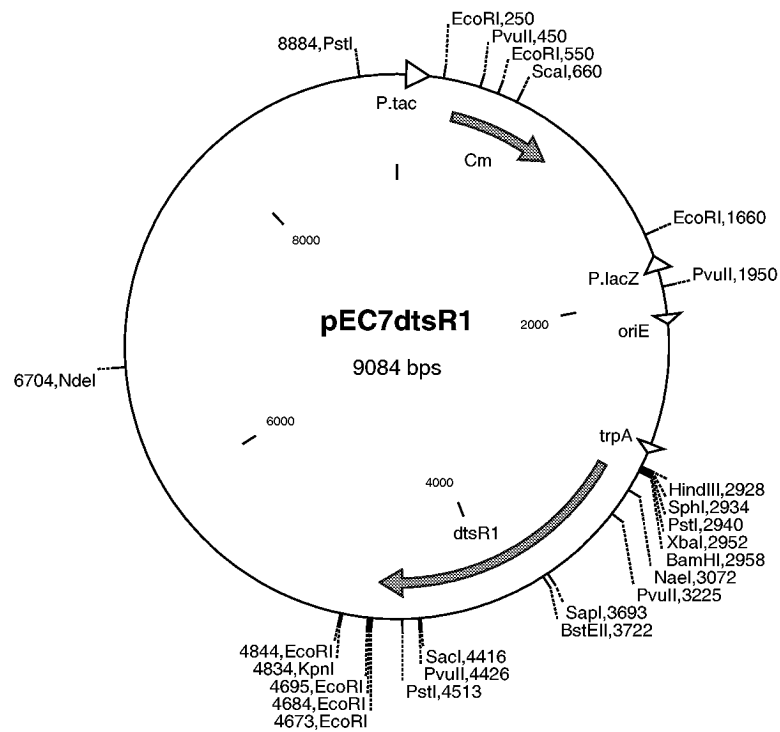


Abb. 44: Plasmid *pEC7dtsR1* (*pEC7* mit 1,9 kb *BamHI/KpnI* *dtsR1*-Insert aus *pUC18dtsR1*)

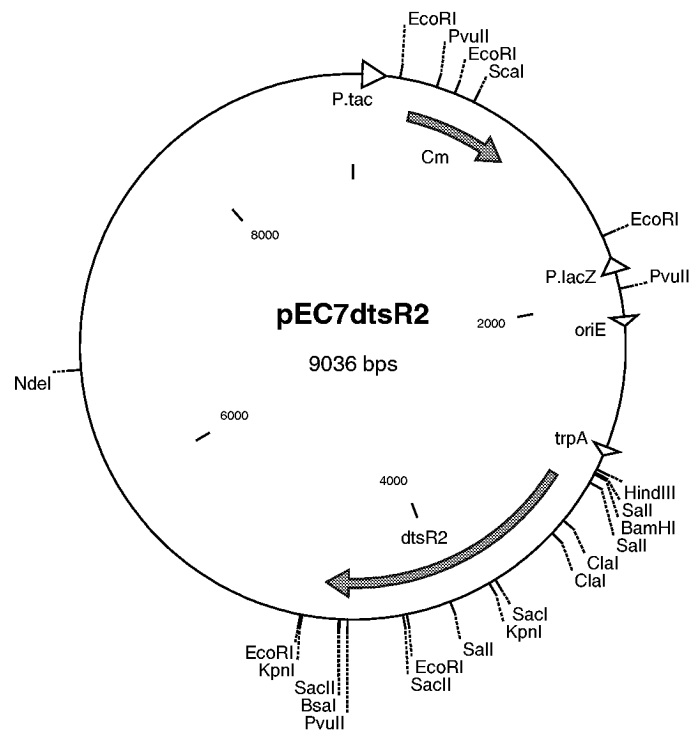


Abb. 45: Plasmid *pEC7dtsR2* (*pEC7* mit 1,8 kb *BsgI/BamHI* *dtsR2*-Insert aus *pUC18dtsR2*)

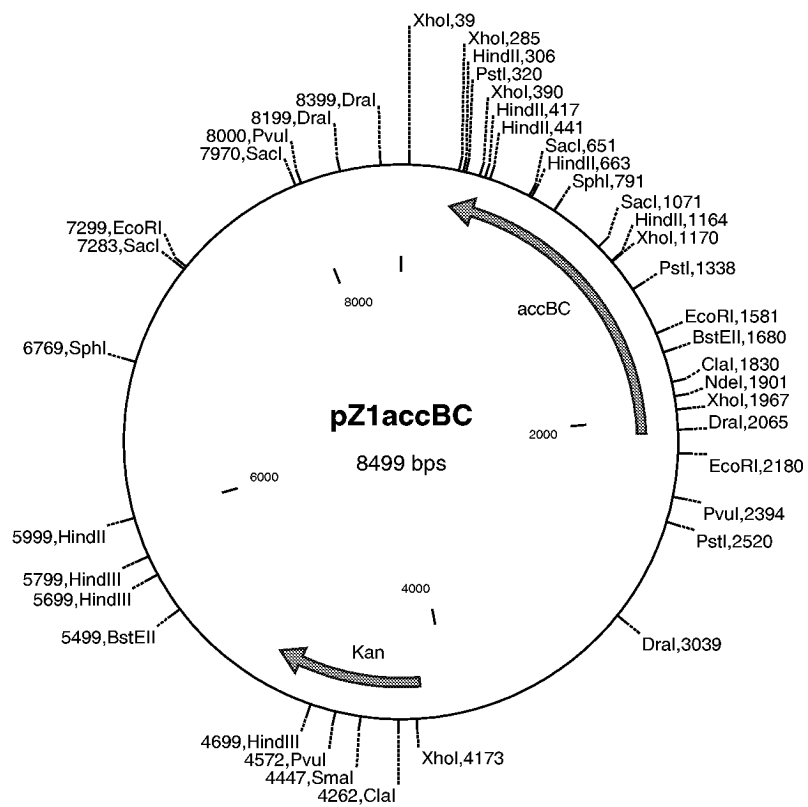


Abb. 46: Plasmid pZ1*accBC* (pZ1 mit 2,3 kb *PvuI*/*NaeI* *accBC*-Insert aus pUC19*accBC accDA*)

3. PCR- und Sequenzierprimer

Standardprimer zur Sequenzierung

Universal 5' -CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC- 3'
 RSP 5' -GGA AAC AGC TAT GAC CAT G- 3'

Primer zum Erhalt des *accDA*-Gens

CgaccDAF₅ 5' -CTC GAG CGG GAG TC- 3'
 CgaccDAR₆ 5' -CTT CAT GCC TGG AAT T- 3'

Primer zum Erhalt des *dtsR1*-Gens

CgdtsR1F₇ 5' -GCG GAA ATA TTG TGG ACG TTA CCC- 3'
 CgdtsR1R₈ 5' -CGT TTC GCT AAC CGG TTA TAT TAG CC- 3'
 CgdtsR1F₁₂ 5' -CCT GTT CAG TGA TGT AAA TCA CCG C- 3'
 CgdtsR1R₁₃ 5' -CCG GTT ATA TTA GCC CAG CG- 3'

Primer zum Erhalt eines internen *dtsR1* -Fragmentes

HindIII

CgdtsR1F₁ 5' -ACT GTG **AAG CTT** CGT GAT CAA GAC CGT CAC CGG- 3'
 CgdtsR1R₂ 5' -GTC ATC **AAG CTT** CCA CCA TAC TCC TGG CCT GC- 3'

Primer zum Nachweis der *dtsR1*-Insertionsmutanten

CgdtsR1MuF₁₀ 5' -GCA TGT GCA GGT GGC AAC GC- 3'
 CgdtsR1MuR₁₁ 5' -GGT AAT CTT TGG AAC GGT TGC- 3'

Primer zum Erhalt von *dtsR1* zur Klonierung und Expression von His₆DtsR1

BamHI

CgdtsR1HisF₂₂ 5' -CGG **GAT CCA** TGA CCA TTT CCT CAC CTT TG- 3'

KpnI

CgdtsR1HisR₂₃ 5' -CGG **GGT ACC** GAT TTA CAG TGG CAT GTT GCC- 3'

Primer zum Erhalt des *dtsR2*-Genes

CgdsR2F₁₈ 5' -GGC TAA TAT AAC CGG TTA GCG- 3'

CgdsR2R₂₀ 5' -GTT GCC AGA TAC GAT CTG C- 3'

Primer zum Nachweis der *dtsR2*-Insertionsmutanten

CgdsR2MuF₃₁ 5' -CAA GCG AAT ACG AGG TC- 3'

CgdsR2MuR₃₀ 5' -GTC ACG TGT ACT CCC CT- 3'

CgdsR2MuF₃₂ 5' -CGG GAT CCA TGA CTG CAG CAC AGA CCA AAC CTG AC- 3'

CgdsR2MuR₃₃ 5' -CGG GAT CCC TAT AGT GGA ATG TTA CCG TGC TTT TTA GC- 3'

Primer zum Erhalt von *dtsR2* zur Klonierung und Expression von His₆DtsR2

BamHI

CgdsR2HisF₃₂ 5' -CGG **GAT CCA** TGA CTG CAG CAC AGA CCA AAC CTG AC- 3'

CgdsR2HisR₃₃ 5' -CGG **GAT CCC** TAT AGT GGA ATG TTA CCG TGC TTT TTA GC- 3'

Primer zum Erhalt des *dtsR3*-Gens

EcoRI

CgdsR3F₅₀ 5' -**GGA ATT** CGG TTG CCA TTG CGG TCT CC- 3'

CgdsR3R₅₁ 5' -**GGA ATT** CAA GCC CCT GTC ATC CTG TTC C- 3'

Primer zum Erhalt eines internen *dtsR3*-Fragmentes

CgdsR3F₅₂ 5' -TCA ACG CGG GCG AAG GTA GTG ATC- 3'

CgdsR3R₅₃ 5' -AGC CCC TGT GTT TGC AGC ACC AAC- 3'

Primer zum Nachweis der *dtsR3*-Insertionsmutanten

CgdsR3MuF₃₄ 5' -CAT GCA TGC TTG AGT AAC ACC ACT ACT GCA G- 3'

CgdsR3MuR₃₅ 5' -CAT GCA TGC TTA CAT CGG CAT GAT CGT GTG C- 3'

CgdsR3MuF₄₀ 5' -GTT GTA GGC GTC GCA GAT AC- 3'

CgdsR3MuR₄₁ 5' -GCG TCC TCT GAA GAA GAG- 3'

Primer zum Erhalt von *dtsR3* zur Klonierung und Expression von His₆DtsR3

SphI

CgdtsR3HisF₃₄ 5' -CAT **GCA TGC** TTG AGT AAC ACC ACT ACT GCA G- 3'

CgdtsR3HisR₃₅ 5' -CAT **GCA TGC** TTA CAT CGG CAT GAT CGT GTG C- 3'

4. Peptidsequenzen zur Synthese der Peptidantikörper

Peptidsequenz aus AccDA: R-A-G-R-D-S-R-F-T-R-F-G-R-K-A-Q

Peptidsequenz aus DtsR1: M-T-I-S-S-P-L-I-D-V-A-N-L-P-D-Y

Peptidsequenz aus DtsR3: C-F-A-A-P-T-D-E-E-I-A-Y-D-E-A

5. Dokumentation der Isolierung von His₆DtsR1 mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie

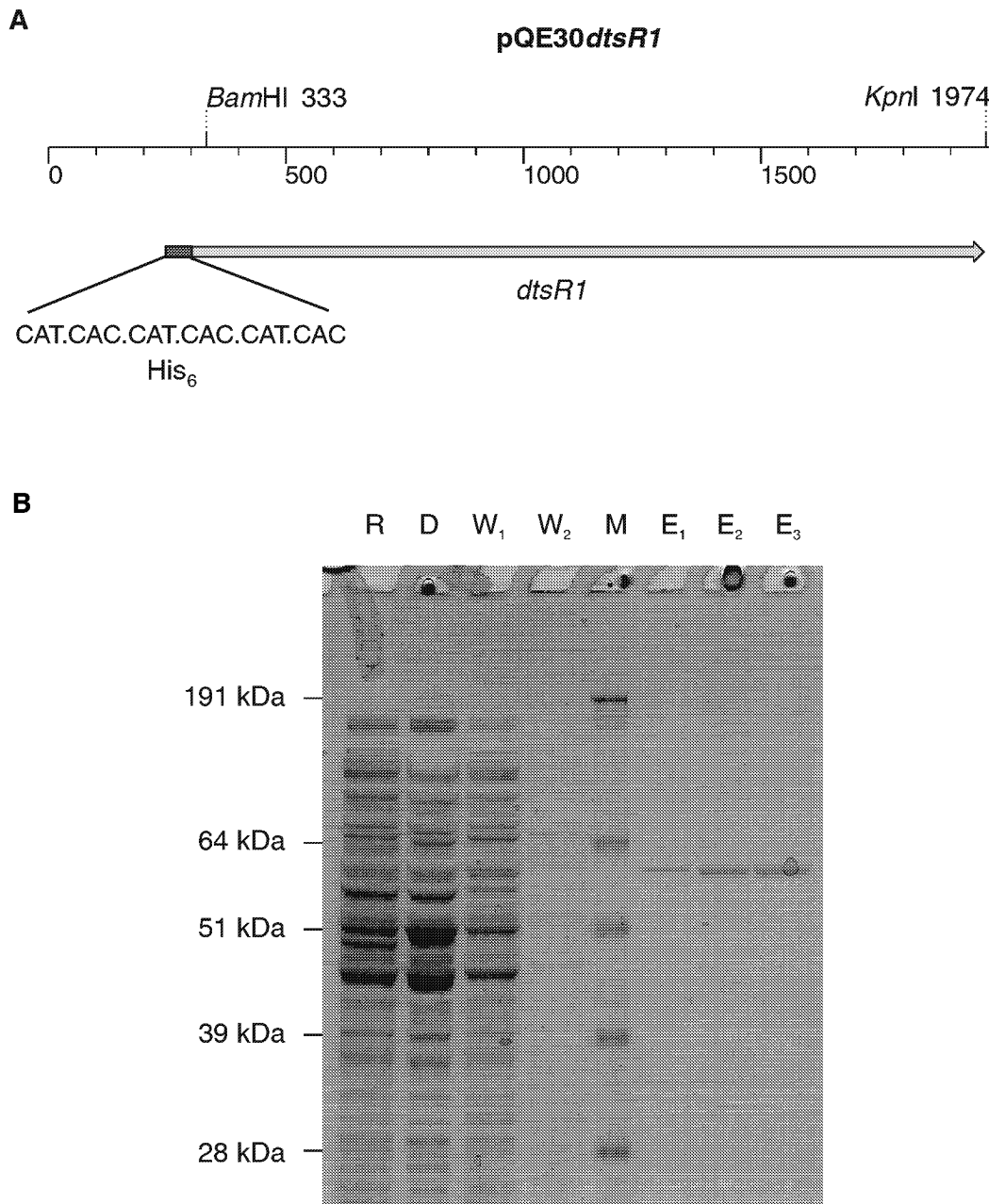


Abb. 47: Schematische Darstellung zur Klonierung des *dtsR1* Gens *in frame* zur Sequenz kodierend für sechs Histidine im Expressionsvektor pQE30 (A).

Isolierung von His₆DtsR1 unter nativen Bedingungen mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie (B). R: Rohextrakt; D: Durchfluss; W_{1/2}: Waschfraktionen; M: Molekulargewichtsstandard der angegebenen molaren Massen; E₁₋₃: Elutionsfraktionen.

6. Dokumentation der Isolierung von AccBC mittels Avidin-affinitätschromatographie

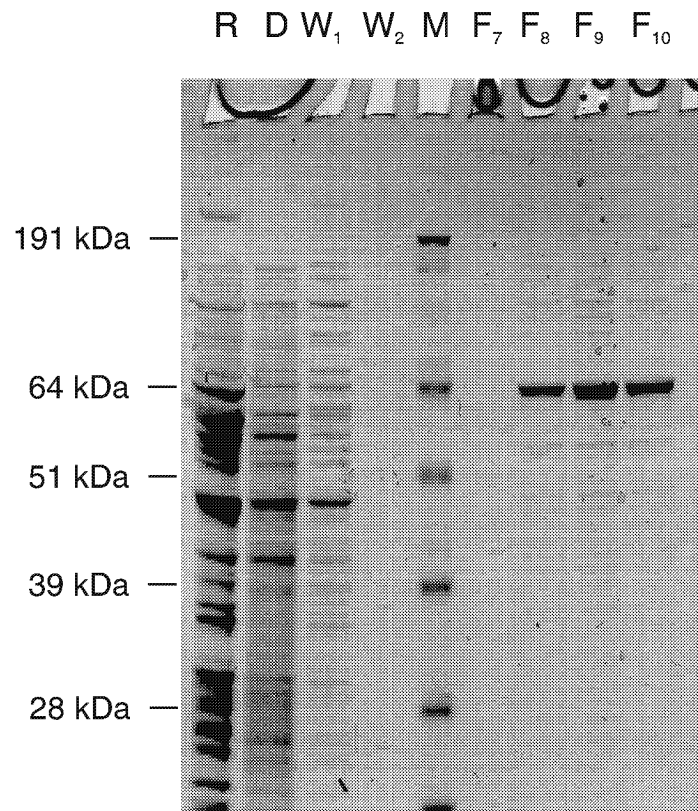


Abb. 48: Dokumentation der Isolierung von AccBC unter nativen Bedingungen. R: Rohextrakt; D: Durchfluss; W_{1/2}: Waschfraktionen; M: Molekulargewichtsstandard der angegebenen molaren Massen; F₇₋₁₀: Elutionsfraktionen.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie 1 der Forschungszentrum Jülich GmbH angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Hermann Sahm danke ich für die Überlassung des Themas, für seine Anregungen und für das Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H. Weiss danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Der Degussa AG danke ich für die finanzielle Unterstützung und für das Interesse an dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Lothar Eggeling für seine ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, seine engagierte, fürsorgliche Betreuung und seinem Optimismus, dass aus vielen Teilchen einmal ein Ganzes wird.

Dr. Steffen Schaffer möchte ich für alle Erläuterungen und Hilfen rund ums MALDI-TOF Massenspektrometer danken. Dr. Petra Peters-Wendisch danke ich für die Überlassung des *C. glutamicum* ATCC13032 Δ *pyc* Stammes. Prof. Dr. Bernd Eikmanns danke ich für die Überlassung des *accDA* Gens.

Bei Anja B., Anja S., Doris, Eva K., Eva R., Frank, Juliane, Georg, Karin, Lothar, Marina, Nicole, Petra P.-W., Petra S., Roman, Thomas, Uwe und Volker möchte ich mich für die angenehme und lebendige Atmosphäre im Labor und die stete Diskussionsbereitschaft bedanken. Die unumstößliche Kaffeepause und unsere diversen Ausflüge werden mir bestimmt in Erinnerung bleiben. Petra Z. und Eva K. danke ich für die freundschaftliche und fröhliche Büroatmosphäre. Roman, Axel, Thomas, Eva, Mirja, Georg und insbesondere Nicole danke ich für die Abendgestaltung in Jülich, Petra S. für die schönen Abende in Aachen. Nicole und Eva möchte ich zudem für die erste Hilfe bei der Rettung eines Fingers und eines letzten Experimentes danken.

Arne, Astrid, Carlo, Ditmar, Gabi, Grit, Maren, Michael, Oliver, Rainer, Stephanie und Christina möchte ich für die gute Labornachbarschaft danken.

Bei allen übrigen Institutsangehörigen möchte ich mich für die freundliche Aufnahme, die stete Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Besonders danken möchte ich meinen Eltern, Ursula und Gerhard Tilg, meinem Bruder Christian und meiner Schwester Nicolette für ihre Unterstützung und Ermutigungen.

Monika und Jürgen Textor danke ich ganz besonders für die vielen schönen Stunden, die den Ausgleich und die Kraft für viele Arbeitsstunden geschaffen haben.

Mein Dank gilt vor allem Jörg Textor für die liebevolle Unterstützung, die Ermutigungen, das Vertrauen und das Verständnis für alle Höhen und Tiefen dieser Zeit.

