

Trehalosesynthese in  
*Corynebacterium glutamicum*

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Andreas Wolf  
aus Frankfurt am Main

Köln, September 2002

---

Trehalosesynthese in  
*Corynebacterium glutamicum*

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Andreas Wolf  
aus Frankfurt am Main

Köln, September 2002

---

1. Referent: Prof. Dr. Reinhard Krämer

2. Referent: Prof. Dr. Reinhard Sterner

Tag der mündlichen Prüfung (Disputation): 13. November 2002

## KURZZUSAMMENFASSUNG

Das nicht-reduzierende Disaccharid Trehalose ist eine ubiquitär im Reich der Pro- und Eukaryoten verbreitete Schutzsubstanz gegen unterschiedliche Arten von Stress wie Hitzestress, Kältestress, oxidativen Stress, osmotischen Stress oder Stress durch Dehydratisierung. Im Genom des Gram-positiven Bodenbakteriums *Corynebacterium glutamicum* konnten fünf offene Leserahmen mit hoher Sequenzähnlichkeit zu bekannten Trehalosesynthesegenen gefunden werden, die drei mutmaßlichen Synthesewegen angehören (OtsAB, TreYZ, TreS). In dieser Arbeit wurde die Bedeutung von Trehalose für *C. glutamicum* als Kohlenstoffquelle, als Schutzsubstanz gegen hyperosmotischen Stress, als Komponente des Mycolatstoffwechsels und die physiologische Relevanz der verschiedenen Synthesewege mit Hilfe von Bakterienstämmen untersucht, in denen verschiedene Trehalosesynthesegene bzw. Synthesewege ausgeschaltet wurden. Es konnte gezeigt werden, dass Trehalose von *C. glutamicum* nicht als C-Quelle verwertet werden kann. Unter hyperosmotischen Bedingungen wurde das Disaccharid als kompatibles Solut hergestellt. Während es bei sättigender N-Versorgung jedoch nur eine untergeordnete Rolle spielte, war es unter N-limitierten Bedingungen bzw. bei Abwesenheit einer N-Quelle dagegen das bedeutendste kompatible Solut von *C. glutamicum*. Stämme, die keine Trehalose mehr synthetisieren konnten, zeigten ein stark beeinträchtigtes Wachstum und erhöhte Osmosensitivität. Verschiedene C-Quellen stimulierten die Trehalosesynthese in unterschiedlichem Maße. Besonders effektiv waren Maltose, Glucose und Maltodextrine. Neben seiner Rolle als kompatibles Solut stellt Trehalose eine essentielle Komponente bei der Mycolsäuresynthese dar. In Abwesenheit von Trehalose fand keine Mycolsäuresynthese mehr statt. Anders als in der Literatur angenommen, spielte Tre-6-P bei der Mycolatsynthese keine Rolle. Das Fehlen von Mycolsäuren bei trehalosedefizienten Stämmen hatte eine desorganisierte Zellwand, die erhöhte Exkretion von Aminosäuren und einen starken Wachstumsdefekt zur Folge. Es wurde nachgewiesen, dass alle Trehalose-Synthesewege in *C. glutamicum* aktiv sind. Die Funktion des OtsAB-Synthesewegs konnte nicht aufgeklärt werden, da er zwar stets aktiv, seine Aktivität aber gering war und nur eine schwache Stimulation durch hyperosmotische Bedingungen vorlag. Die von TreS katalysierte Reaktion war reversibel und führte *in vitro* sowohl zur Umsetzung von Maltose zu Trehalose als auch umgekehrt. *In vivo* ist das Enzym aber aufgrund des in der Zelle herrschenden Konzentrationsverhältnisses von Trehalose zu Maltose und dem Fehlen einer Trehalase wahrscheinlich für den Abbau von Trehalose verantwortlich. Der TreYZ-Syntheseweg wies unter allen angewandten Bedingungen die größte Syntheseleistung auf und war darüber hinaus osmotisch reguliert, d.h. er wurde durch erhöhte Osmolalität aktiviert.

## ABSTRACT

The non-reducing disaccharide trehalose is ubiquitously distributed in nature and commonly found among prokaryotic and eukaryotic organisms where it is employed as a general stress metabolite under various conditions including heat, chill, oxidative stress, osmotic stress and even complete desiccation. Homologs of all known trehalose synthesis genes could be found in the genome of the Gram-positive, non-sporulating immotile soil bacterium *Corynebacterium glutamicum* constituting three putative synthesis routes (OtsAB, TreYZ, TreS). The significance of trehalose as a carbon source, as an osmostress protectant, its relevance in mycolic acid synthesis and the roles of the different pathways were studied in *C. glutamicum* using strains deleted in different trehalose synthesis genes or synthesis pathways, respectively. It is documented that trehalose was not utilized by *C. glutamicum* as a carbon and energy source. However, trehalose was synthesized as a compatible solute under hyperosmotic conditions. Its importance as a compatible solute depended on the supply of nitrogen source and the type of carbon source used. While trehalose seemed dispensable when the nitrogen source was abundant, it became a crucial component of the solute pool under nitrogen-limiting conditions and was the only detected solute in the absence of a nitrogen source. Strains devoid of cytoplasmic trehalose exhibited strongly impaired bacterial growth and increased osmosensitivity. Among different C-sources, particularly maltose, glucose and maltodextrins exerted a stimulating effect on trehalose synthesis. Apart from its role as a compatible solute, trehalose proved to be an essential component of the mycolic acid synthesis pathway. This was not true for trehalose-6-phosphate, although postulated elsewhere. The absence of mycolates in trehalose-deficient strains resulted in a disordered cell wall, increased excretion of amino acids and an impairment of bacterial growth. Among the trehalose synthesis pathways, TreYZ displayed the greatest activity under all conditions tested and was osmotically regulated, i.e. responsible for osmotically-induced trehalose synthesis. The significance of the OtsAB-pathway could not be elucidated. This pathway exhibited only weak activity and slight activation in response to hyperosmotic conditions. TreS catalysed the reversible conversion of maltose to trehalose *in vitro*. However, due to the huge difference in cytoplasmic trehalose and maltose concentrations, TreS is expected to exclusively function as a trehalose degrading enzyme *in vivo*, thereby compensating the lack of a trehalase.

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ATP	Adenosyltriphosphat
BHI	<i>brain heart infusion</i>
bp	Basenpaare
BTM	Biotrockenmasse
C	Kohlenstoff
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
CTAB	N-Cetyl-N,N,N-Trimethylammoniumbromid
DMT	Dimycolyltrehalose bzw. Trehalosyldimycolat
dNTP	Desoxynucleosyltriphosphat
FI	Flammenionisation
FMOC	9-Fluorenylmethylchlorformiat
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	zweifach destilliertes Wasser
HPLC	Hochdruck-Flüssigchromatographie
K <sub>i</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumphosphat
kb	Kilobasenpaare
LB	Luria-Bertani
MMT	Monomycolyltrehalose bzw. Trehalosylmonomycolat
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MSTFA	N-Methyl-N-Trimethylsilyltrifluoracetamid
N	Stickstoff
N-Hunger	Abwesenheit einer Stickstoffquelle
N-Limitation	Limitation der Stickstoffquelle
NMR	magnetische Kernresonanz ( <i>nuclear magnetic resonance</i> )
N-Quelle	Stickstoffquelle
OPA	ortho-Phthaldialdehyd
osM	osmolal, Dimension der Osmolalität, definiert als: Anzahl osmotisch wirksamer Teilchen pro kg Lösung
ots	osmotisch regulierte Trehalosesynthese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PTV	<i>programmed temperature vaporizer</i>
PTS	Phosphotransferase-System
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SLS	Natriumlauroylsarcosinat
TCA	Trichloressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMCS	Trimethylchlorsilan
TMS	Trimethylsilylgruppe
Tre-6-P	Trehalose-6-Phosphat

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Trehalose .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Trehalosestoffwechsel bei Mikroorganismen .....</b>	<b>4</b>
1.2.1 Verwertung von Trehalose als Kohlenstoffquelle.....	4
1.2.2 Trehalose als Stress-Schutzsubstanz .....	6
<b>1.3 Trehalosestoffwechsel höherer Lebewesen .....</b>	<b>8</b>
<b>1.4 Trehalose-Biosynthesewege .....</b>	<b>9</b>
<b>1.5 Trehalosestoffwechsel und Zellwandlipide .....</b>	<b>12</b>
<b>1.6 Ziel der Arbeit .....</b>	<b>16</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Stämme, Plasmide und Oligonucleotide.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2 Wachstumsmedien und Kultivierungsbedingungen .....</b>	<b>19</b>
2.2.1 Wachstumsmedien .....	19
2.2.2 Kultivierungsbedingungen .....	20
2.2.3 Stammhaltung.....	21
<b>2.3 Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>21</b>
2.3.1 Herstellung transformationskompetenter Zellen und Transformation .....	21
2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion .....	21
2.3.3 Rekombinante DNA-Techniken.....	22
2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese .....	22
2.3.5 Plasmidpräparationen aus <i>E. coli</i> .....	22
2.3.6 Herstellung von <i>C. glutamicum</i> -Deletionsstämmen.....	22
2.3.7 RNA-Hybridisierungsexperimente.....	23
2.3.7.1 Herstellung Digoxigenin-markierter <i>antisense</i> RNA-Sonden.....	23
2.3.7.2 Isolierung von RNA aus Zellen.....	24
2.3.7.3 Hybridisierung der <i>antisense</i> RNA-Sonden.....	24
<b>2.4 Proteinchemische Methoden .....</b>	<b>25</b>
2.4.1 Proteinfällung .....	25
2.4.2 Quantitative Bestimmung von Proteinen .....	25
2.4.3 Denaturierende SDS-Gelelektrophorese .....	25
2.4.4 Antikörper-Hybridisierungsexperimente .....	25
<b>2.5 Biochemische Methoden .....</b>	<b>26</b>

2.5.1	Aufschluss von Zellen.....	26
2.5.1.1	Aufschluss von Zellen durch Permeabilisierung mit CTAB.....	26
2.5.1.2	Aufschluss von Zellen durch Methanolyse.....	26
2.5.2	Lipidextraktion aus ganzen Zellen.....	27
2.5.2.1	Lipidextraktion zum Nachweis lipidgebundener Trehalose durch Verseifung von Trehalose/Fettsäureestern.....	27
2.5.2.2	Lipidextraktion zum Nachweis von Corynomycolat.....	27
2.5.3	Herstellung von Zellwandextrakt.....	28
2.5.4	Verseifung von Fettsäureestern zur Freisetzung von Trehalose.....	28
2.5.5	Verseifung von Zellen zur Freisetzung von Zellwandmycolat.....	28
2.5.6	Extraktion der äußeren Zellhülle.....	29
2.5.7	Gaschromatographische Analysen (GC-Analysen).....	29
2.5.7.1	GC-Analyse zum Nachweis von Zuckern.....	29
2.5.7.2	GC-MS-Analyse zur Bestimmung von Trehalose-6-Phosphat und anderen cytoplasmatischen Stoffwechselprodukten.....	30
2.5.7.3	GC/GC-MS-Analyse zur Quantifizierung von Mycolsäuren.....	32
2.5.8	Dünnschichtchromatographie zum qualitativen Nachweis von MMT, DMT und Zellwandmycolat.....	32
2.5.9	HPLC-Analysen.....	32
2.5.10	Nachweis von TreS-Enzymaktivität.....	34
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>Physiologische Bedeutung von Trehalose für <i>C. glutamicum</i>.....</b>	<b>35</b>
3.1.1	Trehalose als Kohlenstoffquelle von <i>C. glutamicum</i> .....	35
3.1.2	Bedeutung von Trehalose als kompatibles Solut von <i>C. glutamicum</i> unter hyperosmotischen Bedingungen.....	36
3.1.2.1	Trehalosesynthese bei konstanter Osmolalität.....	37
3.1.2.2	Trehalosesynthese nach hyperosmotischem Schock.....	40
3.1.2.3	Trehalosesynthese nach hyperosmotischem Schock unter Bedingungen der Stickstofflimitation und des Stickstoffhungers.....	44
3.1.3	Trehalosesynthese von <i>C. glutamicum</i> in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle.....	46



---

<b>3.2</b>	<b>Konstruktion von <i>C. glutamicum</i>-Stämmen mit chromosomalen Deletionen in Genen, die für Trehalosesyntheseenzyme kodieren .....</b>	<b>48</b>
<b>3.3</b>	<b>Physiologische Bedeutung der verschiedenen Trehalosesynthesewege von <i>C. glutamicum</i> - Charakterisierung von Stämmen mit Defekten in Trehalosesynthesewegen .....</b>	<b>49</b>
3.3.1	Bedeutung der verschiedenen Trehalosesynthesewege bei konstanter Osmolalität (0,9 osM) .....	49
3.3.2	Bedeutung der verschiedenen Trehalosesynthesewege bei erhöhter Osmolalität (2,4 osM) .....	51
3.3.3	Bedeutung der verschiedenen Trehalosesynthesewege bei hyperosmotischem Schock .....	54
3.3.3.1	Regulation der verschiedenen Trehalosesynthesewege bei hyperosmotischem Schock durch Transkriptionskontrolle .....	58
3.3.4	Aktivität der verschiedenen Trehalosesynthesewege in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle .....	60
3.3.5	Eigenschaften der Stämme ATCC13032 $\Delta$ <i>otsB</i> und ATCC13032 $\Delta$ <i>treZ</i> .....	64
3.3.6	Bedeutung des TreS-Synthesewegs .....	67
<b>3.4</b>	<b>Bedeutung von Trehalose im Mycolsäurestoffwechsel von <i>C. glutamicum</i> .....</b>	<b>73</b>
3.4.1	Mechanismus der Mycolsäuresynthese .....	77
3.4.2	Auswirkungen des Fehlens von MMT, DMT und Zellwandmycolat .....	80
3.4.2.1	Auswirkungen auf die Exkretion von Aminosäuren .....	80
3.4.2.2	Auswirkungen auf die Zellwandorganisation .....	82
<b>3.5</b>	<b>Weitere Auswirkungen der Trehalosesynthese auf den Zellstoffwechsel von <i>C. glutamicum</i> .....</b>	<b>86</b>
	<b>Anhang Ergebnisteil .....</b>	<b>90</b>
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>91</b>
<b>4.1</b>	<b>Bedeutung von Trehalose im Stoffwechsel von <i>C. glutamicum</i> .....</b>	<b>91</b>
4.1.1	Bedeutung von Trehalose als C-Quelle und Speicherkohlenhydrat von <i>C. glutamicum</i> .....	91
4.1.2	Bedeutung von Trehalose als kompatibles Solut von <i>C. glutamicum</i> .....	93
4.1.3	Bedeutung von Trehalose für die Synthese von Mycolsäuren und den Aufbau der Zellwand von <i>C. glutamicum</i> .....	97

4.1.4	Effekte von Trehalose auf den Gesamtstoffwechsel von <i>C. glutamicum</i> .....	102
<b>4.2</b>	<b>Physiologische Bedeutung der verschiedenen Trehalosesynthesewege.....</b>	<b>103</b>
<b>4.3</b>	<b>Modell des Trehalosestoffwechsels von <i>C. glutamicum</i>.....</b>	<b>106</b>
<b>4.4</b>	<b>Abschlussbetrachtung.....</b>	<b>108</b>
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>110</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>111</b>

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Trehalose

Das nicht-reduzierende Disaccharid Trehalose ( $\alpha$ -D-Glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 1)- $\alpha$ -D-Glucopyranose) ist eine im Reich sowohl der Prokaryoten als auch der Eukaryoten weit verbreitete Substanz. Der Trivialname Trehalose geht auf die Entdeckung des Zuckers in den als „Trehala“ bezeichneten Kokons des Rüsselkäfers *Larinus nidificans* durch den französischen Chemiker Berthelot 1858 zurück. Der Erfolg des Disaccharids in der Natur ist auf seine vielfältige Verwendbarkeit zurückzuführen. So kann Trehalose als Energie- und Kohlenstoffquelle verwertet und als Speicherkohlenhydrat angereichert werden (Argüelles, 2000). Bedeutender für die Verbreitung von Trehalose scheint aber ihre Wirkung als Schutzsubstanzen vor verschiedenen schädlichen Umwelteinflüssen zu sein. Die Synthese von Trehalose als Reaktion auf Hitzestress, osmotischen Stress, Kältestress, oxidativen Stress und Trockenheit bis hin zu völliger Dehydratisierung ist bei verschiedenen Organismen beschrieben (Dinnbier et al., 1988; Crowe et al., 1992; Reinders et al., 1997; Hounsa et al., 1998; Fillinger et al., 2001). Trehalose wird regelmäßig auch in hohen Konzentrationen als Inhaltsstoff von Ruhe-, Ausdauer- oder Verbreitungsstadien prokaryotischer und eukaryotischer Organismen gefunden, die eine erhöhte Stressresistenz sowie die Einlagerung eines Speicherkohlenhydrats erfordern wie z.B. Sporen, Keimlinge sowie Pollen und Samen von Pflanzen (Leopold 1986).

Die Wirkung von Trehalose als generelle Stress-Schutzsubstanzen beruht auf ihren besonderen physikalischen und chemischen Eigenschaften. Aufgrund ihres nicht-reduzierenden Charakters und der Abwesenheit intramolekularer Wasserstoffbrücken, die zur Verzerrung idealer Bindungswinkel, sterischen Einschränkungen und somit zu einer höheren Energie des Moleküls, d.h. Reaktivität führen, können, ist Trehalose physikalisch und chemisch sehr stabil, d.h. äußerst reaktionsträge. So hydrolysiert Trehalose im Gegensatz zu anderen Disacchariden selbst bei niedrigen pH-Werten und hohen Temperaturen nicht. Aufgrund dieser Tatsache findet der Zucker auch bei hyperthermophilen und acidophilen Organismen wie *Sulfolobus* Verwendung (Di Lernia et al., 1998), die bei Temperaturen von bis zu 90°C und pH-Werten zwischen eins und fünf leben. Ferner zeichnet sich Trehalose durch einen

hohen Grad an Hydrophilie aus. Im Vergleich zu anderen nicht-reduzierenden Disacchariden wie Saccharose bildet Trehalose weitaus voluminösere Hydrathüllen (Sola-Penna & Meyer-Fernandes, 1998).

Ihren schützenden Einfluss auf Makromoleküle übt Trehalose auf zweierlei Weisen aus. In Analogie zu anderen als kompatible Solute bezeichneten Stress-Schutzsubstanzen stabilisiert Trehalose bei verringerter Wasseraktivität in Lösung die native Struktur von Proteinen durch präferentiellen Ausschluss von der Proteinoberfläche, d.h. durch präferentielle Hydratisierung der Proteinoberfläche (Xie & Timasheff, 1997). Kompatible Solute sind meist elektroneutrale, organische Moleküle, die von Organismen unterschiedlichster Herkunft infolge erhöhter Osmolalität in bis zu molaren cytoplasmatischen Konzentrationen angereichert werden können, ohne dabei den Zellstoffwechsel zu behindern (Yancey et al., 1982; Wood, 1999). Die Anreicherung kompatibler Solute dient dem Verhindern von Proteindenaturierung (s. folgender Absatz) und der Erhöhung der Osmolalität des Cytoplasmas zur Aufrechterhaltung oder Wiederherstellung eines positiven Turgordrucks auf die Zellwand, der als treibende mechanische Kraft für das Wachstum und die Zellteilung von Mikroorganismen angesehen wird (Koch, 1983). Beispiele häufig vorkommender kompatibler Solute sind die Aminosäure Prolin, die Aminosäurederivate Glycinbetain und Ectoin sowie Trehalose.

Das Modell der von kompatiblen Soluten vermittelten Stabilisierung der nativen Konformation von Proteinen beruht auf verschiedenen experimentellen Beobachtungen. Einerseits konnte gezeigt werden, dass stabilisierende Solute nicht mit der Proteinoberfläche interagieren („*preferential exclusion*“), während Denaturierung vorantreibende Solute wie Harnstoff präferentiell mit der Proteinoberfläche in Kontakt treten (Arakawa & Timasheff, 1985). Andererseits ergab die Bestimmung von *Gibbs*-Energien des Transfers von Proteinen und Proteinteilen aus Wasser in Lösungen verschiedener kompatibler Solute, dass der entfaltete Zustand in Solutlösung thermodynamisch ungünstiger ist als der gefaltete (Youxing et al., 1998), das Protein in Solutlösung also mit größerer Wahrscheinlichkeit in der nativen Konformation vorliegt. Verantwortlich für die ungünstige Wechselwirkung des denaturierten Proteins mit Solutlösung ist die solvophobe Wechselwirkung des Proteinrückgrats mit der Osmolytlösung. Zwar ist die Wechselwirkung der meisten Aminosäureseitenketten mit Solutlösung thermodynamisch günstig, was generell das Entfalten eines Proteins vorantreiben

würde, jedoch überwiegt quantitativ der solvophobe Effekt des Proteinerückgrats. Allerdings wird dieser Effekt mit abnehmender lösungsexponierter Oberfläche des Proteinerückgrats geringer und ist im Falle eines komplett gefalteten Proteins minimal. Das Ensemble aus nativem Protein und Osmolytlösung besitzt also klar ein geringeres chemisches Potential als das entfaltetes Protein enthaltende Ensemble. Proteindenaturierung wird folglich durch die Anwesenheit kompatibler Solute unterdrückt.

Ein stabilisierender Effekt von Trehalose auf Proteine sowie präferentieller Ausschluss von der Proteinoberfläche konnten *in vitro* gezeigt werden (Xie & Timasheff, 1997). In Übereinstimmung damit reichern unterschiedliche Organismen Trehalose als kompatibles Solut in Stresssituationen, die mit einer verringerten Wasseraktivität einhergehen, an (Dinnbier et al., 1988; Hounsa et al., 1998).

Der Wirkung von Trehalose als Schutzsubstanz unter Bedingungen völliger Dehydratisierung liegt ein grundlegend anderer Mechanismus zugrunde. Sie ist der Fähigkeit des Disaccharids zu verdanken, Wassermoleküle der Hydrathülle von Phospholipiden und Proteinen zu ersetzen („*water replacement*“), beruht also nicht auf dem Ausschluss von Trehalose von der Oberfläche dieser Makromoleküle, sondern auf direkter Interaktion durch Wasserstoffbrückenbindungen (Xie & Timasheff, 1997; Crowe et al., 1998). Dies ist notwendig, da die Menge in der Zelle befindlichen Wassers bei Austrocknung (ca. 1%-0,1% Wassergehalt) nicht mehr für die Ausbildung von Hydrathüllen ausreicht (Crowe et al., 1990). Die Anreicherung von Trehalose in solchen Situationen in Mengen von bis zu 20% des Trockengewichts ist im Falle unterschiedlicher Organismen beschrieben (Crowe et al., 1992). Sie gewährleistet die Stabilisierung des nativen, d.h. funktionalen Zustands von Proteinen, verhindert deren Aggregation und erhöht die Überlebensraten von Zellen nach Gefriertrocknung. Phospholipidmembranen durchlaufen bei (Gefrier-) Trocknung Phaseübergänge von der flüssig-kristallinen in die Gelphase. Während eines Phasenübergangs kommt es zu einer vorübergehenden Erhöhung der Membranpermeabilität, wodurch das Überleben einer Zelle bei Rehydratisierung vermutlich stark beeinträchtigt wird. Ferner neigen getrocknete Membranen stark zur Fusion. Die Anwesenheit von Trehalose während des Trocknens beugt all diesen Effekten vor. Eine wichtige Rolle insbesondere bei der Unterdrückung von Aggregations- und Fusionsereignissen spielt neben dem Ersetzen von Wasser in Hydrathüllen die Fähigkeit von Trehalose, amorphe Glasstrukturen zu bilden

(Crowe et al., 1998). Die besondere physikalische Stabilität und chemische Inertheit, die hohe Schmelztemperatur von Trehaloseglas sowie die Fähigkeit zur Bildung eines Dihydratkristalls machen Trehalose sogar gegenüber anderen nicht-reduzierenden Disacchariden wie Saccharose in Bezug auf ihre Schutzwirkung überlegen (Crowe et al., 2001).

Durch ihre schützende Wirkung bei Austrocknung unterscheidet sich Trehalose (bzw. die Stoffklasse der nicht-reduzierenden Disaccharide im allgemeinen) von anderen kompatiblen Soluten, die nur in Lösung Proteine stabilisieren und in Abwesenheit ungebundenen Wassers keinen stabilisierenden Einfluss mehr ausüben können (Crowe et al., 1990). Aufgrund dieser Tatsache wird Trehalose im industriellen Maßstabe bei der Gefriertrocknung, als Kryoprotektant sowie als Konservierungsstoff in verschiedenen Nahrungsmittel, Kosmetika und sogar zur Aufbewahrung zu Transplantationszwecken gelagerter Organe eingesetzt (Paiva & Panek, 1996; Argüelles, 2000).

### **1.2 Trehalosestoffwechsel bei Mikroorganismen**

Trotz der ubiquitären Verbreitung von Trehalose ist seine Rolle im physiologischen Gesamtkontext im Detail nur bei wenigen, genetisch gut zugänglichen und im Labor leicht kultivierbaren Organismen erforscht. Zu diesen gehört das Darmbakterium *Escherichia coli* (Boos et al., 1990; Strøm & Kaasen, 1993; Horlacher & Boos, 1997; Argüelles, 2000), das Bodenbakterium *Bacillus subtilis* (Whatmore & Reed, 1990; Whatmore et al., 1990; Helfert et al., 1995; Bürklen et al., 1998; Argüelles, 2000) sowie die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (Nwaka & Holzer, 1998; Argüelles, 2000).

#### **1.2.1 Verwertung von Trehalose als Kohlenstoffquelle**

##### **Aufnahme von Trehalose**

Die Aufnahme von Trehalose aus dem Wachstumsmedium erfolgt bei *E. coli* und *B. subtilis* durch Phosphotransferasesysteme, d.h. das Importprodukt ist Trehalose-6-Phosphat. Der Transfer wird in beiden Organismen durch eine Trehalose-spezifische Permease (Enzym II, EII<sup>Tre</sup>) in Kombination mit den anderen Komponenten der PT-Systeme vermittelt. Ist Trehalose im Wachstumsmedium vorhanden, so wird bei *E. coli* die Expression der für EII<sup>Tre</sup> und die Amylotrehalase kodierenden Gene (*treB* und *treC*), die ein Operon bilden, induziert. TreC ist für den Abbau aufgenommenen Trehalosephosphats notwendig. Analog wird bei

*B. subtilis* das *trePA*-Operon induziert, das für die Trehalosepermease und die Phosphotrehalase kodiert. In beiden Organismen stellt Tre-6-P den physiologischen Induktor dar, eine negative Regulation erfolgt durch Katabolit-Repression und den Repressor TreR.

Bei *S. cerevisiae* wird Trehalose durch einen sekundären H<sup>+</sup>/Trehalose Symportcarrier aus dem Wachstumsmedium aufgenommen. (Crowe et al., 1991). Über Mechanismen zur Aufnahme von Trehalose bei *C. glutamicum* ist bislang noch nichts bekannt.

### **Abbau von Trehalose**

Der Abbau von Trehalose erfolgt in der Regel durch Hydrolyse des Disaccharids zu zwei Glucoseeinheiten. Diese Reaktion wird durch Trehalasen katalysiert. Trotz der generellen Konserviertheit dieses Umsetzungsprinzips haben verschiedene Organismen dennoch unterschiedliche Varianten der Spaltung von Trehalose zu Glucose entwickelt. So wird bei *E. coli* das aus PTS-vermitteltem Transport resultierende Tre-6-P durch die Amylotrehalase TreC hydrolysiert und dephosphoryliert. Eines der daraus resultierenden Glucosemoleküle wird durch TreC auf ein wachsendes Glucosepolymer übertragen, während das andere als freie Glucose in das Cytoplasma entlassen wird. Außerdem besitzt der Organismus eine osmotisch induzierte, periplasmatische Trehalase zur Spaltung exkretierter Trehalose bei hoher Osmolalität (TreA) und eine weitere cytoplasmatische Trehalase (TreF) mit hoher Ähnlichkeit zu TreA (Horlacher et al., 1996). Die cytoplasmatische Trehalase unterliegt ebenfalls osmotischer Regulation, ihre physiologische Relevanz ist allerdings noch unklar.

*B. subtilis* spaltet aufgenommenes Tre-6-P durch die Phosphotrehalase TreA zu Glucose und Glucose-6-Phosphat. Die Bäckerhefe besitzt mehrere Trehalasen, die in unterschiedlichen Zellkompartimenten lokalisiert sind. *NTH* kodiert für eine cytoplasmatische Trehalase, deren Aktivitätsoptimum bei neutralem pH-Wert liegt (*neutral trehalase*) und die der Mobilisierung cytoplasmatischer Trehalose in Abhängigkeit verschiedener Stimuli dient (Kopp et al., 1993). *ATH* dagegen kodiert für die in der Vakuole lokalisierte saure Trehalase (*acid trehalase*), die für das Wachstum von *S. cerevisiae* auf Trehalose notwendig ist (Londesborough & Varimo, 1984; Nwaka et al., 1996). Darüber hinaus besitzt *S. cerevisiae* offensichtlich noch eine zweite neutrale Trehalase, deren physiologische Bedeutung allerdings noch unklar ist (Nwaka et al., 1995).

Über den Abbau von Trehalose bei *C. glutamicum* existieren bislang keine veröffentlichten Erkenntnisse. Gene mit Sequenzähnlichkeit zu bekannten Trehalasegenen konnten im Genom von *C. glutamicum* bisher nicht identifiziert werden (B. Bathe, Degussa AG, persönliche Mitteilung).

### 1.2.2 Trehalose als Stress-Schutzsubstanz

Aufgrund der unterschiedlichen Mechanismen des Schutzes zellulärer Strukturen durch Trehalose ist das Disaccharid als Schutzsubstanz in der Natur weit verbreitet und wird von verschiedenen Organismen in unterschiedlichen Stresssituationen durch *de novo*-Synthese hergestellt. *E. coli* synthetisiert das Disaccharid als kompatibles Solut durch die Enzyme OtsA und OtsB aus Glucose-6-Phosphat und UDP-Glucose. Die Gene *otsA* und *otsB* sind in einem Operon organisiert und werden durch erhöhte Osmolalität und in der stationären Phase durch einen Regulationsmechanismus induziert, an dem der alternative  $\sigma$ -Faktor  $\sigma^S$  beteiligt ist (Hengge-Aronis et al., 1991; Hengge-Aronis et al., 1993). Zu dem osmotisch induzierten System von *E. coli* gehört daneben noch eine periplasmatische Trehalase (TreA). Diese ist notwendig, weil es bei osmotisch-induzierter Trehalosesynthese zu erheblicher Exkretion des Disaccharids kommt. Da bei hoher Osmolalität Aufnahme und Abbau von Trehalose durch osmotisch regulierte Repression von *treBC* jedoch unterdrückt werden, wird Trehalose im Periplasma durch TreA abgefangen und hydrolysiert. Die entstandene Glucose kann durch PTS-vermittelten Transport wieder aufgenommen werden. Auf diese Weise beugt die Zelle dem Verlust von Stoffwechselenergie durch unkontrollierte Exkretion von Trehalose vor. Ein weiteres kompatibles Solut von *E. coli* ist Glutamat. Die Anreicherung dieser Aminosäure ist jedoch nur vorübergehend und dient unmittelbar nach einem hyperosmotischen Schock der Bereitstellung eines Gegenions zum aufgenommenen Kalium, um nach Sinken der Kaliumkonzentration durch Trehalose ersetzt zu werden. *B. subtilis* verwendet Trehalose nicht als kompatibles Solut. Das einzige *de novo*-synthetisierte kompatible Solut dieses Organismus ist Prolin.

Bei verschiedenen Pilzarten wie der Bäckerhefe *S. cerevisiae* und *Aspergillus nidulans* stellt die Synthese von Trehalose eine Reaktion auf unterschiedliche Stressarten wie Hitze, Trockenheit, oxidativen und osmotischen Stress dar (Hottiger et al., 1987a/b; De Virgilio et al., 1993; Hounsa et al., 1998; Benaroudj et al., 2001). Die stärkste Anreicherung von



Trehalose erfolgt in Sporen bzw. Conidien dieser beiden Organismen. Dies sind ruhende vegetative Stadien, die dem Auskeimen bzw. der Ausbreitung unter gegebenen Bedingungen dienen und einen Trehaloseanteil von bis zu 20% ihres Gewichts aufweisen können (Elbein, 1974; Thevelein, 1984). Da im Gegensatz zu Sporen im Falle von Conidien jedoch nicht immer eine Korrelation zwischen Trehalosegehalt und Resistenz gegen Hitze- bzw. oxidativen Stress besteht, scheint Trehalose hier hauptsächlich die Rolle eines Speicherkohlenhydrats zu erfüllen (Thevelein, 1996; Argüelles, 2000; Fillinger et al., 2001). Analog zu *E. coli* besitzen *S. cerevisiae* und *A. nidulans* eine Tre-6-P-Synthase (Tps1p bzw. TpsA) und eine Tre-6-P-Phosphatase (Tps2p/OrlA) zur Synthese von Trehalose aus Glucose. (Vuorio et al., 1993; Borgia et al., 1996; Fillinger et al., 2001). Bei der Bäckerhefe sind die Proteine in einem Multienzymkomplex organisiert, zu dem auch die regulatorischen Untereinheiten Tsl1p und Tps3p gehören (Vuorio et al., 1993).

Neben der Bedeutung in verschiedenen Stresssituationen besteht bei der Bäckerhefe eine regulatorische Funktion der Trehalosesynthese in Bezug auf die Glycolyse. Tre-6-P, das Zwischenprodukt des Trehalosesynthesewegs von *S. cerevisiae*, wirkt wahrscheinlich als Inhibitor der Hexokinase und verhindert so eine Hyperphosphorylierung von Zuckern, die den glycolytischen Fluss zum Erliegen bringt und ein Wachstum auf Glucose unmöglich macht (Thevelein & Hohmann, 1995). Eine Inhibition der Hexokinase durch Tre-6-P konnte auch bei dem filamentösen Pilz *A. nidulans* nachgewiesen werden, allerdings konnte der Pilz trotz Ausschaltens des für die Tre-6-P-Synthase kodierenden *tpsA*-Gens und der dadurch verursachten Anreicherung von Zuckerphosphaten weiterhin auf Glucose wachsen (Fillinger et al., 2001).

Unterschiedliche Prokaryoten, niedere und höhere Tiere sowie einige Pflanzen können als Ausdauerstadien bis zu jahrtausendelange Perioden völliger Austrocknung im sogenannten anhydrobiotischen Zustand überleben. Diese Fähigkeit verdanken sie der enormen Anreicherung nicht-reduzierender Disaccharide wie Trehalose oder Saccharose. Der Anteil von Trehalose am Gesamtgewicht dieser Lebewesen kann über 20% betragen. Beispiele für diese als Anhydrobioten bezeichneten Organismen finden sich bei Cyanobakterien (Potts, 1994), unter den Bärtierchen (*Tardigrada*), den Rädertierchen (*Rotatoria*), bestimmten

Nematoden und den sogenannten „Auferstehungspflanzen“ wie der Wüstenpflanze *Selaginella lepidophylla* (Crowe et al., 1998).

Trehalose wurde als von *C. glutamicum* unter hyperosmotischen Bedingungen hergestelltes kompatibles Solut mehrfach beschrieben (Frings et al., 1993; Guillouet & Engasser, 1995a/b). Allerdings wurden keine detaillierten Studien zu den der Synthese von Trehalose zugrunde liegenden Mechanismen durchgeführt und die veröffentlichten Daten erschienen mitunter auch widersprüchlich. So konnte bei Zellen aus kontinuierlicher Kultur osmotisch induzierte Trehalosesynthese nachgewiesen werden (Guillouet & Engasser, 1995a), dies war jedoch nicht mehr der Fall, wenn die Zellen aus einer *batch*-Kultur stammten (Guillouet & Engasser, 1995b). Generell schien aber Prolin stets eine wichtigere Rolle als kompatibles Solut von *C. glutamicum* zu spielen als Trehalose (Guillouet & Engasser, 1995a/b; Rönsch, 2001).

### 1.3 Trehalosestoffwechsel höherer Lebewesen

In verschiedenen Insektenarten und Nematoden stellt Trehalose den Hauptzucker der Hämolymphe dar (Becker et al., 1996; Behm, 1997). Da diese Tiere über offene Blutkreislaufsysteme verfügen, sind die Trehalosekonzentrationen in der Hämolymphe mit 1% - 2% sehr hoch. Synthese- und Speicherorgan für Trehalose bei Insekten ist der Fettkörper, die funktionale Entsprechung der Leber von Wirbeltieren. Die Synthese von Trehalose erfolgt aus Glucose und unterliegt hormonaler Kontrolle. Bei Fluginsekten kommt es während des Fluges zu schneller Mobilisierung des Disaccharids. Trehalase-vermittelter Abbau von Trehalose erfolgt bei Insekten insbesondere in den verbrauchenden Geweben, d.h. insbesondere in den Flugmuskeln, die unter allen tierischen Geweben die höchsten metabolischen Umsatzraten aufweisen (Becker et al., 1996). Ferner deuten die Anwesenheit einer Trehalase im Mitteldarm sowie die Existenz eines Geschmacksrezeptors für Trehalose bei *Drosophila* (Ishimoto et al., 2000) darauf hin, dass Trehalose Insekten auch als aufgenommener Nährstoff dienen kann.

Unter höheren Pflanzen ist Trehalose ein weit verbreitetes Stoffwechselprodukt. In *A. thaliana* konnten sowohl Trehalosesynthese- als auch Trehalasegene identifiziert werden (Vogel et al., 1998; Blazquez et al., 1998; Müller et al., 2001). Zwar ist die physiologische Bedeutung des Zuckers in *A. thaliana* noch nicht aufgeklärt, jedoch deuten Existenz und

gewebsspezifische Aktivität von Trehalasen auf die Verwertung des Disaccharids als C-Quelle bzw. Speicherkohlenhydrat hin. Die höchste Trehalaseaktivität konnte in Knospen und Blüten nachgewiesen werden (Müller et al., 2001), was andeutet, dass Trehalose in diesen Strukturen ähnlich wie bei der Bäckerhefe oder *Aspergillus* als Speicherkohlenhydrat (ruhende Knospen) bzw. Stressmetabolit zur Erhöhung der Widerstandsfähigkeit von Verbreitungsformen (Pollen) dienen könnte. Als kompatibles Solut scheinen Pflanzen dagegen eher Saccharose zu bevorzugen (Crowe et al., 1992).

Trehalaseaktivität konnte auch in Nierenzellen und Mikrovillizellen des Darmepithels des Menschen nachgewiesen werden. Dies hängt vermutlich mit dem Abbau von aus der Nahrung gewonnener Trehalose, d.h. mit der Verwertung von Trehalose als C-Quelle zusammen.

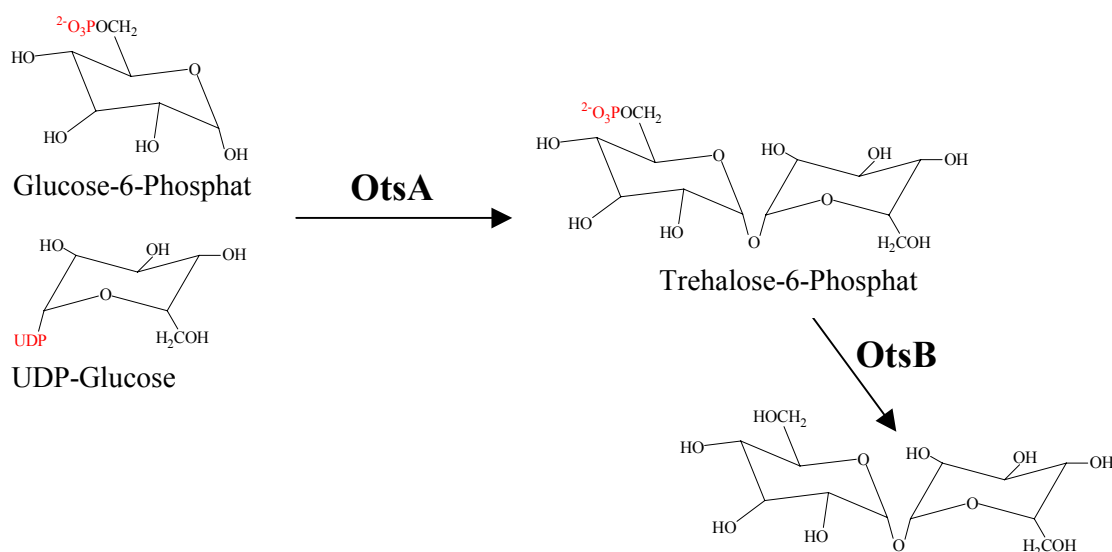
#### 1.4 Trehalose-Biosynthesewege

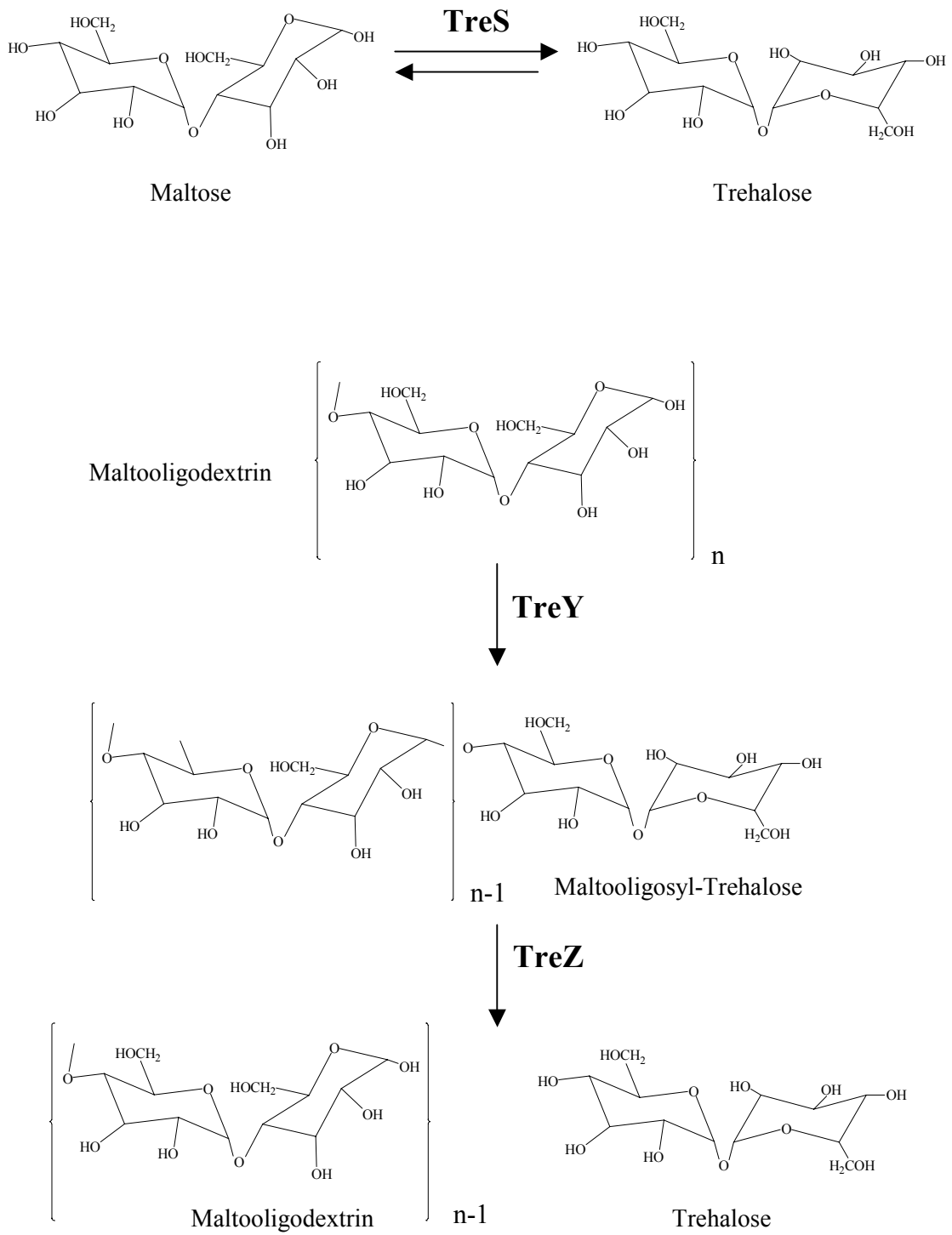
Die Biosynthese von Trehalose kann über drei unterschiedliche Syntheserouten erfolgen (Abb. 1). Die Synthese von Trehalose erfolgt bei allen höheren Lebewesen und auch den meisten Mikroorganismen (Argüelles, 2000) durch die Kondensation von Glucose-6-Phosphat und UDP-Glucose zu Tre-6-P und die Dephosphorylierung von Tre-6-P zu Trehalose. Die beiden Reaktionen werden durch die Tre-6-P-Synthase und -phosphatase katalysiert. In verschiedenen Organismen konnte gezeigt werden, dass dieser Weg durch unterschiedliche Stimuli aktiviert wird und häufig einer Stressregulation unterliegt. Eine Variante dieses Wegs wurde in der Basidiomycete *Grifola frondosa* gefunden. Der Pilz stellt Trehalose aus unmodifizierter Glucose und Glucose-1-Phosphat in einer Einschnitt-Reaktion her. Die Reaktion ist reversibel, die bevorzugte Richtung jedoch Trehalosesynthese (Saito et al., 1998). Bei diesem Mechanismus handelt es sich offensichtlich um eine umgekehrte Phosphotrehalase-Reaktion.

Eine andere Möglichkeit, Trehalose herzustellen, haben *Rhizobium* und *Arthrobacter* (Maruta et al., 1996a/b), das Archaeum *Sulfolobus* (Maruta et al., 1996c; Kobayashi et al. 1996), das mit *Corynebacterium* nah verwandte *Brevibacterium helvolum* (Kim et al., 2000) sowie verschiedenen Arten von *Mycobacterium* (De Smet et al., 2000) verwirklicht. Diese beruht auf der Umsetzung von Poly- und Oligomaltodextrinen. Mit Ausnahme kleinerer Oligomere wie Maltoheptaose oder Maltopentaose, die von manchen Organismen aufgenommen werden

können (Boos & Shumann, 1998; Hülsmann et al., 2000; Schlosser et al., 2001), repräsentieren Oligomaltodextrine typische, aus Maltoseuntereinheiten aufgebaute Speicherkohlenhydrate der Zelle und stellen eine Vorstufe von Glycogen dar. Die Umsetzung erfolgt in einer Zweischrittreaktion, bei der zunächst der terminale Maltosyl-Rest des Oligomers durch Transglycosylierung in einen Trehalosyl-Rest überführt wird, der in der zweiten Umsetzung vom Oligomer abgespalten wird. Daraus resultiert ein um eine Maltoseeinheit verkürztes Maltose-Oligomer, das wieder als Substrat dienen kann. Die Maltooligosyl-Trehalose Synthase (MOT-Synthase, TreY) zählt zu den Glycosyltransferasen, während die Maltooligosyltrehalose-Trehalohydrolase (MOT-Hydrolase, TreZ) den  $\alpha$ -Amylasen angehört, allerdings eine für  $\alpha$ -Amylasen ungewöhnliche Spezifität aufweist.

Eine dritte Variante der Trehalosesynthese beruht auf der Transglycosylierung von Maltose zu Trehalose in einer einzigen Umsetzung. Dieser Weg ist bei *Pimelobacter sp.* R48 (Tsusaki et al., 1996), *Thermus aquaticus* (Tsusaki et al., 1996) und *Mycobacterium sp.* (De Smet et al., 2000) beschrieben. Die Reaktion wird durch die Trehalose-Synthase TreS katalysiert und ist reversibel, verläuft bei TreS aus *Mycobacterium in vitro* jedoch bevorzugt in Richtung Trehalose (De Smet et al., 2000). Bei *Streptomyces coelicolor* scheint dieser Syntheseweg eng an den Glycogenstoffwechsel gekoppelt zu sein, da *treS* zusammen mit Glycogensyntheseenen ein Operon bildet (Schneider et al., 2000).





**Abb. 1:** Bekannte Trehalose-Biosynthesewege.

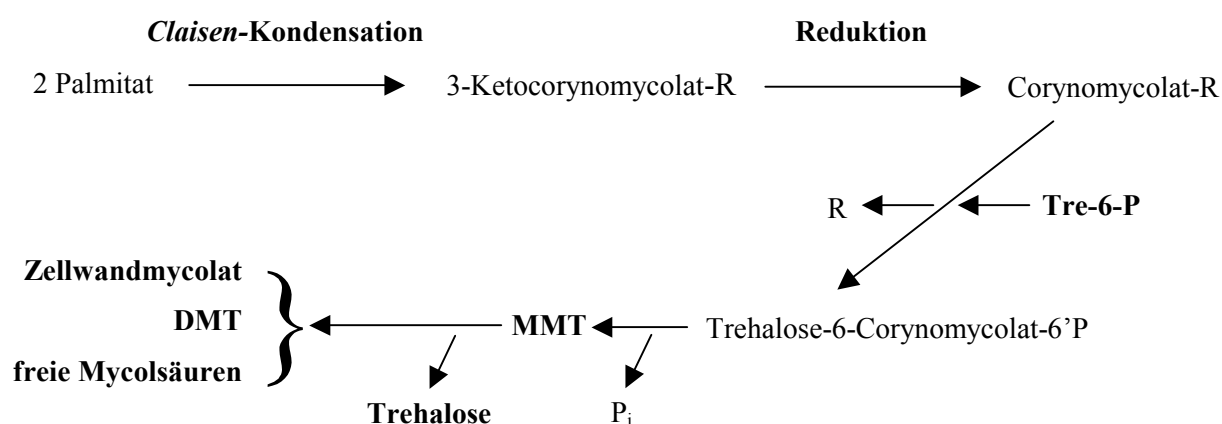
### 1.5 Trehalosestoffwechsel und Zellwandlipide

Während die meisten Organismen nur über einen Biosyntheseweg für Trehalose verfügen und die Synthese meist situationsbedingt induziert wird, besitzen verschiedene Spezies von *Mycobacterium* alle drei bekannten Synthesewege (De Smet et al., 2000) sowie einen konstitutiven Trehalosepool (Elbein & Mitchell, 1973). Trehalose scheint also im Stoffwechsel von Mycobakterien eine wichtigere Rolle zu spielen als bei anderen Organismen. Mycobakterien besitzen neben freier cytoplasmatischer Trehalose, deren Bedeutung noch unklar ist (De Smet et al., 2000), mehrere trehalosehaltige Glycolipide, darunter die Sulfolipide (acylierte Trehalose-2-Sulfat-Derivate) und verschiedene trehalosehaltige Lipooligosaccharide (Besra & Chatterjee, 1994). Die wohl bekanntesten trehalosehaltigen Lipide stellen jedoch die Mycolyltrehalosen dar. Diese entstehen aus der einfachen oder doppelten Veresterung von Trehalose und Mycolsäure (Monomycolyl-Trehalose, MMT bzw. Dimycolyl-Trehalose, DMT). Dimycolyl-Trehalose, auch als *cord factor* bezeichnet, ist das Hauptantigen bei der Immunantwort gegen mycobakterielle Infektionen (Belisle et al., 1997). Vermutlich wird durch die Inkorporation dieses Glycolipids in die Phagosomenmembran die Fusion des Phagosoms, in dem sich Mycobakterien befinden, mit dem Lysosom unterbunden (Goren et al., 1976) und somit eine Bekämpfung des intrazellulären Pathogens durch die Immunabwehr des Wirts verhindert. *In vitro*-Befunde zeigten tatsächlich, dass die Anwesenheit von DMT in Phospholipidmembranen die Calcium-induzierte Fusion von Membranvesikeln verhindert (Spargo et al., 1991). Aus diesem Grunde ist neben der Synthese von Mycolsäuren auch die Synthese von Trehalose v.a. bei *M. tuberculosis* und *M. leprae* ein Ansatzpunkt derzeitiger Antibiotikaforschung (Pan & Elbein, 1996).

Mycolsäuren sind langkettige  $\alpha$ -Alkyl- $\beta$ -Hydroxysäuren, die aus der Kondensation zweier Fettsäuren resultieren (Walker et al., 1973). Ihr Vorkommen ist auf wenige Bakteriengattungen beschränkt und gilt als taxonomisches Kriterium einer Gruppe Gram-positiver, GC-reicher Actinomyceten, zu der neben Mycobakterien, Nocardien und Rhodococcen auch Corynebakterien gehören. Während die Mycolsäuren von Mycobakterien und Nocardien bis zu neunzig C-Atome beinhalten können, sind Mycolsäuren von Corynebakterien, die sogenannten Corynomycolate, mit meist 32 C-Atomen vergleichsweise kurz (Takayama & Qureshi, 1984).

Die zur Mycolsäuresynthese nötigen Enzyme (ab *Claisen*-Kondensation, s. Abb. 2) sind bei *Corynebacterium* in der Zellwand lokalisiert (Shimakata & Minatogawa, 2000). Allerdings konnten bislang nur wenige Enzyme auf molekularer Ebene identifiziert werden. Die noch am besten untersuchten Mycolsäure-Syntheseenzyme bei Mycobakterien und Corynebakterien sind die sogenannten Mycolyltransferasen (Puech et al., 2000). Diese sind Transesterasen, die Mycolsäuren vermutlich von MMT auf ihre finalen Akzeptoren, Trehalose oder das Zellwand-Arabinogalactan, übertragen. Der Mechanismus der Mycolatsynthese ist in Grundzügen bekannt, allerdings noch nicht im Detail aufgeklärt. Das derzeitige Modell der Synthese von Mycolsäuren bei Corynebakterien beruht auf Experimenten mit *C. matruchotii* und ist in Abb. 2 skizziert. In einer *Claisen*-Kondensation reagieren zwei langkettige Fettsäuren zu einem  $\alpha$ -Alkyl- $\beta$ -Ketoester (Walker et al., 1973). Als wahrscheinlichste Substrate für die *Claisen*-Kondensation kommen bei *Corynebacterium* Palmitat und Myristat in Betracht (Shimakata et al., 1984). Bei Mycobakterien (und Nocardien) kommt es vermutlich schon vor der Kondensation einer erheblichen Verlängerung (*Elongation*) einer der beiden Fettsäuren, der Ursache der zwei- bis dreimal größeren Kettenlänge mycobakterieller Mycolsäuren (Barry et al., 1998). Der aus der Kondensation resultierende  $\alpha$ -Alkyl- $\beta$ -Ketoester wird reduziert ( $\alpha$ -Alkyl- $\beta$ -Hydroxyester) und in verschiedenen Bakteriangattungen und -spezies in unterschiedlichem Ausmaße durch Dehydrierung, Cyclopropylierung und/oder Einführung funktioneller Gruppen modifiziert. Diese Prozesse bleiben bei Corynebakterien aus (Barry et al., 1998), daher handelt es sich bei Corynomycolaten um die einfachsten bekannten Mycolsäuren (Asselineau, 1966; Takayama & Qureshi, 1984). Zur Herstellung von Mycolyltrehalosen muss das Corynomycolat auf Trehalose übertragen werden. Eine wichtige Rolle bei diesem Schritt wurde bei *C. matruchotii* Tre-6-P, dem Zwischenprodukt des OtsAB-Trehalosesynthesewegs, zugeschrieben (Shimakata & Minatogawa, 2000). In einem *in vitro*-System, das die bekannten Substrate und die Zellwandfraktion enthielt, wurde die Synthese von MMT aus  $^{14}\text{C}$ -Palmitat nur in Anwesenheit von Tre-6-P bzw. hitzebehandeltem Überstand, d.h. niedermolekularen Cytoplasmakomponenten, nicht aber durch Trehalose angeregt. Da die Quelle von Tre-6-P der OtsAB-Trehalosesyntheseweg ist, postulierten Shimakata und Minatogawa eine entscheidende Bedeutung dieses Synthesewegs für die Mycolatsynthese von *C. matruchotii*. Das entstandene MMT ist nach Auffassung der Autoren die Vorstufe aller zellulärer Mycolate, d.h. trehalosefreier Zellwandmycolate, DMTs und freier Mycolsäuren. Die

Weiterreaktion von MMT zu den verschiedenen Mycolaten wurde *in vitro* durch Trehalose effektiv gehemmt (Shimakata & Minatogawa, 2000). Dies erscheint plausibel, wenn man bedenkt, dass es sich nach dem Synthesemodell bei der Weiterreaktion um eine Gleichgewichtsreaktion handelt, bei der Trehalose freigesetzt wird (Abb. 2). Allerdings liefert das Modell keine Erklärung dafür, dass auch die Weiterreaktion von MMT zu DMT unterdrückt wurde.

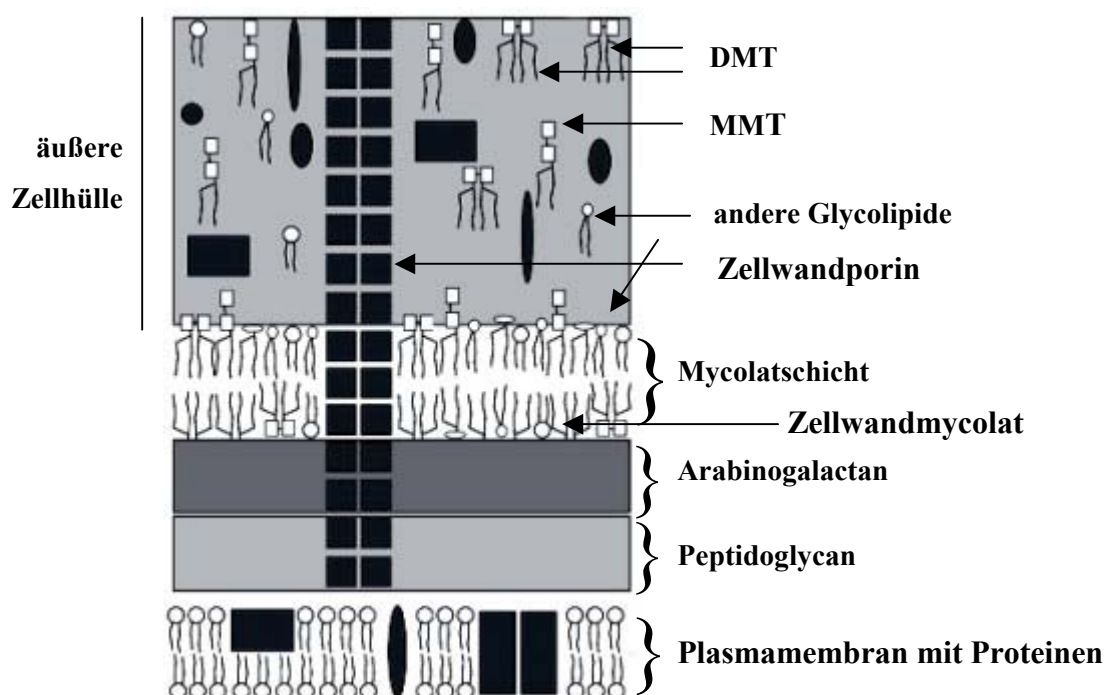


**Abb. 2:** Modell der Mycolatsynthese bei *C. matrucotii* nach Shimakata & Minatogawa (2000). *R* steht für einen noch nicht identifizierten Mycolat-Akzeptor.

Mycolsäuren stellen Hauptkomponenten der Zellwand der Organismen, in denen sie vorkommen, dar (Asselineau, 1966). Das Modell der Ultrastruktur der corynebakteriellen Zellwand, das in den Grundzügen der mycobakteriellen Zellwand entspricht, ist in Abb. 3 dargestellt. Ein Teil der Mycolsäuren liegt in der Zellwand als freies, extrahierbares Lipid in Form von Trehalose-Estern vor (MMT, DMT) (Minnikin, 1982; Puech et al., 2001). Somit ist Trehalose ein wichtiger Zellwandbestandteil dieser Organismen. Eine weitere Mycolatfraktion, die sogenannten Zellwandmycolate, beinhalten keine Trehalose, sondern sind mit Arabinoseresten der Arabinogalactanschicht verestert, also kovalent an die Zellwand gebunden (Brennan & Nikaido, 1995; Puech et al., 2001). Arabinogalactan-gebundenes Mycolat und Mycolyltrehalosen bilden zusammen mit kleineren Mengen anderer Lipide eine Lipiddoppelschicht in der Zellwand, die neben der Plasmamembran eine zweite



Permeabilitätsbarriere darstellt und für die Resistenz insbesondere von Mycobakterien gegen verschiedene Antibiotika verantwortlich gemacht wird (Brennan & Nikaido, 1995; Daffé & Draper, 1998). Diese Lipiddoppelschicht ist bei der Gefrierätz-Elektronenmikroskopie neben der Plasmamembran als zweite Bruchebene zu erkennen und fehlt bei mycolsäurefreien Corynebakterien wie *C. amycolatum* (Puech et al., 2001). Während das Auftreten von kovalent gebundenem Zellwandmycolat auf die Lipiddoppelschicht beschränkt ist, kommen Mycolyltrehalosen auch als Bestandteil der äußeren Zellhülle vor (Abb. 3).



**Abb. 3:** Modell der Zellwand von *Corynebacterium* nach Puech et al. (2001). Die Zellwand setzt sich aus einem Zellwandskelett und einer äußeren Zellhülle zusammen. Zwischen diesen befindet sich eine Lipiddoppelschicht, die hauptsächlich aus Mycolsäuren aufgebaut ist. Die Mycolate der zellwärts gerichteten Lage der Lipiddoppelschicht sind zum größten Teil kovalent an die Arabinogalactanschicht gebunden (Zellwandmycolat), während die Mycolate der gegenüberliegenden Lage (Mycolyltrehalosen) nicht-kovalent mit der äußeren Zellhülle assoziiert sind. Neben Mycolaten kommen in der Lipiddoppelschicht auch andere Glycolipide in kleineren Mengen vor. Das Peptidoglycan von *Corynebacterium* und *Mycobacterium* beinhaltet *meso*-Diaminopimelat und ist kovalent an das Arabinogalactan gekoppelt. Die Arabinogalactanschicht besteht aus einem Polysaccharid, das hauptsächlich aus Arabinose und Galactose aufgebaut ist. Die äußere Zellhülle setzt sich neben kleineren Mengen Lipid und Protein (<10%) zu über 90% aus Polysaccharid zusammen, das aus Arabinose, Mannose und Glucose aufgebaut ist. Unter den Lipiden der äußeren Zellhülle finden sich auch Mycolyltrehalosen.

### 1.6 Ziel der Arbeit

Bei der Durchmusterung des Genoms von *C. glutamicum* konnten fünf Gene identifiziert werden, die für die Enzyme aller in Abb. 1 dargestellten Trehalosesynthesewege kodierten. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung von Trehalose im Stoffwechsel von *C. glutamicum* zu untersuchen und die verschiedenen Synthesewege in diesem Organismus in Bezug auf ihre Aktivität und ihre physiologische Relevanz zu charakterisieren. Da es sich bei *C. glutamicum* um ein unbewegliches Bodenbakterium handelt, das stets schwankenden Umweltbedingungen ausgesetzt ist, stand die mögliche Rolle von Trehalose als Schutzsubstanz gegen erhöhte Osmolalität im Vordergrund. Osmoprotektive Mechanismen spielen bei diesem Organismus eine zentrale Rolle (Peter et al., 1998; Morbach & Krämer, 2002), da unterschiedliche Veränderungen im natürlichen Habitat dieses Gram-positiven Bakteriums wie Hitze, Trockenheit und Frost Auswirkungen auf die Wasseraktivität und somit auf die Osmolalität haben.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Stämme, Plasmide und Oligonucleotide

**Tabelle 1:** In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Beschreibung	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ -mcr	<i>endA1 supE44 thi-1 <math>\lambda</math> recA1 gyrA96 relA1 deoR <math>\Delta</math>(lacZYA-argF) U169 <math>\Phi</math>80<math>\Delta</math>lacZ <math>\Delta</math>M15mcrA <math>\Delta</math>(mmr hsdRMS mcrBC)</i>	Grant et al. (1990)
<i>C. glutamicum</i> -Stämme		
MH20-22B	Lysinproduktionsstamm, <i>lysC<sup>FBR</sup>, leuCD</i>	Schrumpf et al. (1992)
MH20-22B $\Delta$ otsA	MH20-22B, $\Delta$ otsA	diese Arbeit
ATCC13032	Wildtyp	Abe et al. (1967)
ATCC13032 $\Delta$ otsA	Wildtyp, $\Delta$ otsA	diese Arbeit
ATCC13032 $\Delta$ otsB	Wildtyp, $\Delta$ otsB	diese Arbeit
ATCC13032 $\Delta$ treY	Wildtyp, $\Delta$ treY	diese Arbeit
ATCC13032 $\Delta$ treZ	Wildtyp, $\Delta$ treZ	diese Arbeit
ATCC13032 $\Delta$ treS	Wildtyp, $\Delta$ treS	diese Arbeit
ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY	Wildtyp, $\Delta$ otsA $\Delta$ treY	diese Arbeit
ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treS	Wildtyp, $\Delta$ otsA $\Delta$ treS	diese Arbeit
ATCC13032 $\Delta$ treY $\Delta$ treS	Wildtyp, $\Delta$ treY $\Delta$ treS	diese Arbeit
ATCC13032 $\Delta$ otsB $\Delta$ treY	Wildtyp, $\Delta$ otsB $\Delta$ treY	diese Arbeit
ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY	Wildtyp, $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY	diese Arbeit

**Tabelle 2:** In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pUC18/pUC19	$P_{lac}$ , Ap <sup>R</sup>	Yanisch-Perron et al. (1985)
pUC18 <i>otsA</i>	pUC18 mit einem 1,8 kb großen, <i>otsA</i> -beinhaltenden Fragment	diese Arbeit
pUC18 <i>otsB</i>	pUC18 mit einem 1,1 kb großen, <i>otsB</i> -beinhaltenden Fragment	diese Arbeit
pUC18 <i>treY</i>	pUC18 mit einem 2,74 kb großen, <i>treY</i> -beinhaltenden Fragment	diese Arbeit
pUC18 <i>treZ</i>	pUC18 mit einem 2,11 kb großen, <i>treZ</i> -beinhaltenden Fragment	diese Arbeit
pUC19 <i>treS</i>	pUC18 mit einem 2,54 kb großen, <i>treS</i> -beinhaltenden Fragment	diese Arbeit
pUC18 $\Delta$ <i>otsA</i>	pUC18 <i>otsA</i> mit einer <i>HpaI/PflMI</i> Deletion im <i>otsA</i> -Gen ( $\Delta$ 0,21 kb)	diese Arbeit
pUC18 $\Delta$ <i>otsB</i>	pUC18 <i>otsB</i> mit einer <i>NcoI/DraIII</i> -Deletion im <i>otsB</i> -Gen ( $\Delta$ 0,15 kb)	diese Arbeit
pUC18 $\Delta$ <i>treY</i>	pUC18 <i>treY</i> mit einer <i>AscI/AflIII</i> -Deletion im <i>treY</i> -Gen ( $\Delta$ 0,34 kb)	diese Arbeit
pUC18 $\Delta$ <i>treZ</i>	pUC18 <i>treZ</i> mit einer <i>SfuI/BsaAI</i> -Deletion im <i>treZ</i> -Gen ( $\Delta$ 0,35 kb)	diese Arbeit
pUC19 $\Delta$ <i>treS</i>	pUC19 <i>treS</i> mit einer <i>BssHIII/Tth 111 I</i> -Deletion im <i>treS</i> -Gen ( $\Delta$ 0,71 kb)	diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB</i>	<i>ori</i> pUC, Km <sup>R</sup> , <i>mobsacB</i>	Schäfer et al. (1994)
pK19 <i>mobsacB</i> $\Delta$ <i>otsA</i>	pK19 <i>mobsacB</i> , $\Delta$ <i>otsA</i>	diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB</i> $\Delta$ <i>otsB</i>	pK19 <i>mobsacB</i> , $\Delta$ <i>otsB</i>	diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB</i> $\Delta$ <i>treY</i>	pK19 <i>mobsacB</i> , $\Delta$ <i>treY</i>	diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB</i> $\Delta$ <i>treZ</i>	pK19 <i>mobsacB</i> , $\Delta$ <i>treZ</i>	diese Arbeit
pK19 <i>mobsacB</i> $\Delta$ <i>treS</i>	pK19 <i>mobsacB</i> , $\Delta$ <i>treS</i>	diese Arbeit
pDrive		Qiagen GmbH (Hilden)
pDrive <i>otsA</i>	pDrive mit einem 0,39 kb großen Fragment aus dem <i>otsA</i> -Gen	diese Arbeit
pDrive <i>treY</i>	pDrive mit einem 0,48 kb großen Fragment aus dem <i>treY</i> -Gen	diese Arbeit
pDrive <i>treZ</i>	pDrive mit einem 0,49 kb großen Fragment aus dem <i>treZ</i> -Gen	diese Arbeit
pDrive <i>treS</i>	pDrive mit einem 0,49 kb großen Fragment aus dem <i>treS</i> -Gen	diese Arbeit

**Tabelle 3:** In dieser Arbeit verwendete Oligonucleotide. Zusammen dargestellt sind jeweils zwei Oligonucleotide, die zur Amplifikation eines Fragments verwendet wurden.

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Größe des Fragments (bp)
<i>otsAs</i> <i>otsAa</i>	5'-tct gcc agt gga tat gac tgt cc-3' 5'-cgt tga cgt cgt ggg tat aga cc-3'	1808
<i>otsBs</i> <i>otsBa</i>	5'-cga taa act tcc cga tga ttg cc-3' 5'-gga att gga aac ttc ctt cca cc-3'	1095
<i>treYs</i> <i>treYa</i>	5'-gca cgt cca att tcc gca ac-3' 5'-tca aaa ctc act atc ggg tac-3'	2739
<i>treZs</i> <i>treZa</i>	5'-ccc gcg gta ccg gaa ggt tcg-3' 5'-aat cgg caa ttg att ccc gtc-3'	2113
<i>treSs</i> <i>treSa</i>	5'-ggc ctg gag aat tcg gat acc-3' 5'-gct cca cat cgg ggt ttt gcc-3'	2541
<i>otsAgs</i> <i>otsAioa</i>	5'-atg gat gat tcc aat agc ttt-3' 5'-ccg tgt gcc gcc act tgg-3'	386
<i>treYgs</i> <i>treYsoa</i>	5'-atg gca cgt cca att tcc gca-3' 5'-cca tca agc tcc gcg aat tcc-3'	479
<i>treZgs</i> <i>treZsoa</i>	5'-atg ctc aaa gac ttg acc ggc-3' 5'-gtc acg ccg agg tcg cgc-3'	494
<i>treSgs</i> <i>treSia</i>	5'-atg act gat acc tct ccg ttg-3' 5'-gga ttc ttg gaa cca tgc gtg-3'	489

## 2.2 Wachstumsmedien und Kultivierungsbedingungen

### 2.2.1 Wachstumsmedien

Als Komplexmedium für alle *E. coli* Kulturen und *C. glutamicum*-Vorkulturen diente LB- oder BHI-Flüssigmedium. Um Nährböden zu erhalten, wurde dem Flüssigmedium 1,5% Bacto-Agar zugesetzt. Bei Verwendung von Antibiotika wurden diese stets in einer Konzentration von 25 µg/ml zugegeben.

Für Analysen bestimmte *C. glutamicum*-Kulturen wurden in CgXII-Minimalmedium (Keilhauer et al., 1993) oder MMI-Minimalmedium (Peter, 1997) angezogen. Alle C-Quellen wurden 4%ig eingesetzt. Die routinemäßig verwendete C-Quelle war Saccharose. Zur Herstellung hyperosmolaren Mediums wurde dem Basismedium NaCl zugegeben. Der Zusatz von 100 mM NaCl führte zu einer Erhöhung der Osmolalität um ca. 200 mosM. CgXII-Basismedium hatte eine Osmolalität von 0,9 osM, die Osmolalität von hyperosmotischem

CgXII-Medium lag bei 2,4 osM. Die eingestellten Osmolalitäten wurden über Gefrierpunktserniedrigung mit einem Osmomat 030 (Gonotec GmbH, Berlin) überprüft. Für Anzuchten unter konstant hyperosmotischen Bedingungen wurde dem Medium NaCl bereits bei der Herstellung zugesetzt. Um einen hyperosmotischen Schock hervorzurufen, wurde das Salz dagegen erst den wachsenden Kulturen in der exponentiellen Phase zugesetzt. In der Regel wurde beim hyperosmotischem Schock die Osmolalität von 0,9 osM auf 2,4 osM erhöht.

Wachstum unter Stickstofflimitation wurde durch Zusatz von 100 mM Glutamin zu CgXII-Minimalmedium anstelle der N-Quellen  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und Harnstoff erzielt. Die Glutaminaufnahme der Zellen wurde durch Ausschluss des für den Transportprozess nötigen  $\text{Na}^+$  (Siewe et al., 1995) aus allen Medienbestandteilen limitiert. Alle im Medium vorgesehenen  $\text{Na}^+$ -Salze wurden durch die entsprechenden  $\text{K}^+$ -Salze ersetzt. Bei stickstofflimitierten Kulturen wurde der hyperosmotische Schock folglich anstelle von NaCl mit einer äquimolaren Menge KCl ausgelöst. Um Situationen des Stickstoffhungers hervorzurufen, wurde CgXII-Minimalmedium verwendet, das keinerlei Stickstoffquelle beinhaltet. Der hyperosmotische Schock wurde durch NaCl-Zugabe ausgelöst, nachdem die Zellen vier Stunden N-Hunger ausgesetzt waren.

### 2.2.2 Kultivierungsbedingungen

*E. coli* wurde bei 37°C, *C. glutamicum* bei 30°C kultiviert. Flüssigkulturen wurden unter aeroben Bedingungen im Schüttelkolben angezogen. Um Zellen für Analysen zu erhalten, wurden *C. glutamicum*-Stämme in LB-Flüssigmedium angezogen, geerntet (3220 g, 10 min., 30°C), in einem Volumen PBS (Sambrook et al., 1989) gewaschen und auf CgXII oder MMI-Minimalmedium (4% Saccharose) überimpft. In der spätexponentiellen Phase wurden mit diesen Kulturen frische Minimalmedium-Kulturen angeimpft, aus denen während der Anzucht Zellen für die Analysen entnommen wurden. Bei Abweichungen in der Zusammensetzung des Mediums der Analysekultur und der Minimalmedium-Vorkultur (Art der Kohlenstoffquelle, Art der Stickstoffquelle, Abwesenheit einer Stickstoffquelle) wurden die Zellen vor Überimpfen abermals in einem Volumen PBS gewaschen. Bei einer stickstofflimitierten Folgekultur wurde PBS verwendet, bei der alle natriumhaltigen

Bestandteile durch die entsprechenden Kaliumsalze ersetzt waren. Hier wurden, wie auch im Falle stickstoffquellenfreier Folgekulturen, zwei Waschschriffe vor Überimpfen durchgeführt.

### **2.2.3 Stammhaltung**

Bakterienstämme wurden auf LB-Agar bei 4°C bzw. in 65% Glycerin-Dauerkulturen bei -20°C aufbewahrt.

## **2.3 Molekularbiologische Methoden**

### **2.3.1 Herstellung transformationskompetenter Zellen und Transformation**

Transformationskompetente *E. coli* Zellen wurden nach der Methode von Inoue et al. (1990) hergestellt und transformiert. Kompetente Zellen von *C. glutamicum* wurden wie von van der Rest et al. (1999) beschrieben hergestellt und durch Elektroporation (2,5 kV, 600 Ω, 2,5 μF) mit einem Bio-Rad *Gene-Pulser* (Bio-Rad, München) transformiert.

### **2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion**

Die *in vitro*-Vervielfältigung (Amplifikation) von DNA wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1988) durchgeführt. Als Quelle für Matrizen-DNA dienten entweder Plasmide oder genomische DNA aus *C. glutamicum*-Zellen. Die PCR-Ansätze enthielten außerdem 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM dNTPs sowie 0,1 U/μl Taq DNA-Polymerase der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) bzw. Sigma (Taufkirchen) und 1/10 Volumen des 10fach konzentrierten MgCl<sub>2</sub>-freien, mitgelieferten Reaktionspuffers. Die Oligonucleotid-Hybridisierungstemperatur richtete sich nach der Länge und Zusammensetzung der Oligonucleotide, die Extensionszeit nach der Länge des zu amplifizierenden Fragments, wobei eine Minute Extensionszeit für die Amplifikation von 1000 bp angenommen wurde. Alle Polymerasekettenreaktionen wurden mit 30 Wiederholungszyklen durchgeführt.

### 2.3.3 Rekombinante DNA-Techniken

Enzyme und mitgelieferte Lösungen für Arbeiten mit isolierter DNA wie Restriktion, Auffüllen von 3'-Überhängen mittels Klenow-Enzym, Entfernen von Phosphatresten durch alkalische Phosphatase und Ligation stammten von NEB (Frankfurt), Roche Diagnostics oder Qiagen (Hilden). Die Arbeiten wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Analytische und präparative Auftrennung von DNA erfolgte elektrophoretisch mit 1 - 2% (w/v) TAE-(40 mM Tris, 2 mM EDTA (pH 8,0) 20 mM Essigsäure)-Agarosegelen nach Sambrook et al. (1989). Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des *QiaQuick Gel Extraction Kits* (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers.

### 2.3.5 Plasmidpräparationen aus *E. coli*

Die Präparation von Plasmiden aus *E. coli* wurde unter Verwendung des *Mini Plasmid Prep Kits* von Pharmacia (Freiburg) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 2.3.6 Herstellung von *C. glutamicum*-Deletionsstämmen

Um Deletionsallele der für Trehalosesynthese-Enzyme kodierenden Gene fest im Genom von *C. glutamicum* zu verankern, wurden die offenen Leserahmen der Gene mit 3' und 5' flankierenden Bereichen mit den in Tabelle 3 angegebenen Oligonucleotiden aus dem Genom von *C. glutamicum* ATCC13032 amplifiziert. Die Fragmente wurden gereinigt und mit Hilfe des *Sure Clone<sup>TM</sup> Ligation Kits* (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) mit *SmaI*-linearisierten pUC-Vektoren ligiert. Die Konstrukte (Tab. 2) wurden mittels Restriktionsanalyse kontrolliert. Durch eine geeignete Kombination von Restriktionsendonucleasen wurden Fragmente aus den kodierenden Bereichen der Gene ausgeschnitten und die resultierenden, linearisierten Vektoren autoligiert (Tab. 2). Die Deletionsallele wurden aus den pUC-Vektoren unter Verwendung der *multiple cloning sites* durch Restriktionsverdau ausgeschnitten. Falls notwendig, wurden 3' oder 5' Überhänge durch Klenow- bzw. T4-DNA-Polymerasebehandlung aufgefüllt. Danach wurden die Deletionsallele mit *SmaI*-linearisiertem pK19*mobsacB*-Vektor ligiert (Tab. 2). Die erhaltenen



Konstrukte wurden durch Restriktionsanalysen kontrolliert. Um die Wildtypallele in dem Genom von *C. glutamicum* durch die Deletionsallele zu ersetzen, wurde die Methode des Allelaustauschs von Schäfer et al. (1994) angewandt. Diese basiert auf einem doppelten homologen Rekombinationsereignis zwischen dem genomischen Wildtypallel und dem plasmidkodierten Deletionsallel. Bei der ersten Rekombination wird die gesamte Plasmid-DNA inklusive des Deletionsallels in das Genom integriert, wodurch die Zellen resistent gegen Kanamycin werden. Die zweite Rekombination der beiden nun vorübergehend genomischen Allele wird durch eine Anzucht in Abwesenheit des Antibiotikums begünstigt, was zum Wiederausschneiden der Plasmid-DNA und dem Verlust der Kanamycinresistenz der betreffenden Zellen führt. Bei diesem Schritt wird eines der beiden Allele mit der Plasmid-DNA aus der Wirts-DNA ausgeschnitten und das andere stabil integriert. Für den Austausch von *otsA*, *otsB*, *treY*, *treZ* und *treS* gegen ihre jeweiligen Deletionsallele wurden die pK19*mobsacB*-Derivate durch Elektroporation in elektrokompente Zellen eingebracht. Der Allelaustausch wurde durch PCR kontrolliert. Ein im Vergleich zum Wildtypallel kleineres DNA-Fragment zeigte den Allelaustausch an. ATCC13032 $\Delta$ *otsA* $\Delta$ *treY* wurde aus ATCC13032 $\Delta$ *otsA*, ATCC13032 $\Delta$ *otsA* $\Delta$ *treS* aus ATCC13032 $\Delta$ *otsA*, ATCC13032 $\Delta$ *treY* $\Delta$ *treS* aus ATCC13032 $\Delta$ *treY*, ATCC13032 $\Delta$ *otsA* $\Delta$ *treS* $\Delta$ *treY* aus ATCC13032 $\Delta$ *otsA* $\Delta$ *treS* und ATCC13032 $\Delta$ *otsB* $\Delta$ *treY* aus ATCC13032 $\Delta$ *treY* konstruiert (Tab. 1).

## 2.3.7 RNA-Hybridisierungsexperimente

### 2.3.7.1 Herstellung Digoxigenin-markierter *antisense* RNA-Sonden

Zur Herstellung von *antisense* RNA-Sonden wurden etwa 500 bp große DNA-Fragmente der kodierenden Regionen der Gene durch PCR amplifiziert und aus Agarosegelen gereinigt. Die hierzu verwendeten Oligonucleotide sind in Tabelle 3 aufgeführt. Die Fragmente wurden mit pDrive-Vektoren ligiert (Qiagen<sup>®</sup> PCR Cloning Kit) und die resultierenden Konstrukte (Tab. 2) per Restriktionsanalyse getestet. Die so erhaltenen Plasmide wurden durch das Restriktionsenzym *Xba*I linearisiert und als Matrize für die *in vitro*-Transkription der Fragmente zur Herstellung von *antisense* RNA-Sonden verwendet. Die *in vitro*-Transkriptionsansätze (20  $\mu$ l) beinhalteten:

ca. 1 µg linearisiertes Plasmid,  
2 µl DIG-RNA-Labeling-Mix (Roche Diagnostics),  
2 µl 10x Transkriptionspuffer (Roche Diagnostics),  
2 µl RNase Inhibitor (MBI Fermentas, St. Leon-Rot),  
2 µl T7-RNA Polymerase (Roche Diagnostics),  
RNase-freies H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>.

Die *in vitro*-Transkription erfolgte während einer zweistündigen Inkubation bei 37°C. Anschließend wurde die Matrizen-DNA durch RNase-freie RQ1-DNase (Promega, Wisconsin, USA) verdaut (25 min., 37°C). Die *antisense* RNA-Sonden wurden bei -80°C gelagert.

### 2.3.7.2 Isolierung von RNA aus Zellen

Zur Isolierung von RNA aus Zellen wurden je nach Zelldichte der Kultur 1-5 ml Zellkultur durch Zentrifugation bei 20000 g und 30°C geerntet, in 700 µl Puffer RAI (Macherey-Nagel, Düren) aufgenommen und mit 300 mg Glaskügelchen (0,1-0,25 mm Durchmesser) durch zwei aufeinanderfolgenden Passagen in einem *Fast-Prep*<sup>®</sup>120 Instrument (Q-Biogene, Heidelberg) aufgebrochen. Die Reinigung der RNA aus der resultierenden Suspension erfolgte mit dem *Nucleospin*<sup>®</sup>*RNAII Kit* der Firma Macherey-Nagel nach den Anweisungen des Herstellers.

### 2.3.7.3 Hybridisierung der *antisense* RNA-Sonden

Für die Hybridisierungsexperimente wurden ca. 6 µg RNA pro Probe durch Vakuumfiltration (15 mbar) auf eine Nylon-Membran übertragen. Dazu wurde ein *Minifold Dot Blotter* der Firma Schleicher & Schuell (Dassel) verwendet. Die Kreuzvernetzung von RNA und Membran erfolgte durch zweimalige UV-Bestrahlung (125 J/cm<sup>2</sup>). Alle weiteren Schritte wurden den Angaben des *DIG-Application-Manuals* (Roche Molecular Biochemicals) entsprechend durchgeführt. Mit der entstehenden Chemilumineszenz wurden Röntgenfilme der Firma Kodak belichtet.

## 2.4 Proteinchemische Methoden

### 2.4.1 Proteinfällung

Proteine wurden aus Kulturüberständen von ATCC13032, ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY und ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY durch Trichloressigsäurefällung angereichert. Dazu wurde 1 ml Kulturüberstand mit einem Volumen 90% TCA gemischt und 15 min. bei -20°C inkubiert. Durch fünfminütige Zentrifugation bei 10000 g und 4°C wurde das Protein sedimentiert. Das Sediment wurde mit 1 ml Ethanol/Diethylether (1:1, v/v) gewaschen und in 100  $\mu$ l 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) aufgenommen.

Proteine der äußeren Zellhülle wurden aus sls-Extrakten (s. 2.5.6) durch Acetonfällung, wie von Marienfeld et al. (1997) beschrieben, angereichert. Dazu wurde 1 ml Suspension eingesetzt. Die erhaltenen Proteinsedimente wurden in 100  $\mu$ l 50 mM Tris/HCl (pH 7,5)/4xSDS-Probenpuffer (3:1, v/v) aufgenommen.

### 2.4.2 Quantitative Bestimmung von Proteinen

Die Bestimmung von Proteinen erfolgte nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976). Hierzu wurde das Fertigreagenz Roti®-Nanoquant (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe) verwendet.

### 2.4.3 Denaturierende SDS-Gelelektrophorese

Proteine wurden auf 15%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die Färbung erfolgte mit 0,2% Coomassie Brilliant Blue R250. Zum Entfärben wurde 10%ige Essigsäure verwendet.

### 2.4.4 Antikörper-Hybridisierungsexperimente

*Immunoblot*-Analysen wurden zum Nachweis des Zellwandporins PorA sowie des periplasmatischen Glutamat-Bindeproteins GluB in Kulturüberständen und Extrakten der äußeren Zellhülle der Stämme ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY und ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY durchgeführt. Bei den Antikörpern handelte es sich um polyklonale Immunglobuline aus Kaninchen. Die Übertragung der Proteine von SDS-Gelen auf PVDF-Membranen (0,45 bzw. 0,2  $\mu$ m Porendurchmesser, Millipore, Eschborn) erfolgte nach dem *semi-dry-blotting*

Verfahren von Kyhse-Anderson (1984). Die Transferdauer betrug aufgrund der geringen molekularen Masse der Proteine nur 30 Minuten. Nach Absättigung freier Bindungsstellen mit 5%iger Milchpulverlösung wurde die Membran mit dem ersten Antikörper (Kaninchen-anti-PorA/Kaninchen-anti-GluB) in 1:2500facher Verdünnung zwei Stunden lang inkubiert. Nach Waschen der Membran und abermaligem Blockieren wurde der zweite Antikörper, ein Ziege-anti-Kaninchen-alkalische-Phosphatase-Konjugat (Sigma, Taufkirchen), hinzugegeben (1:5000) und eine Stunde lang inkubiert. Der Nachweis immobilisierten PorA- und GluB-Proteins erfolgte colorimetrisch durch die von der alkalischen Phosphatase katalysierte Umsetzung der Substrate NBT und BCIP (Sigma, Taufkirchen).

## **2.5 Biochemische Methoden**

### **2.5.1 Aufschluss von Zellen**

#### **2.5.1.1 Aufschluss von Zellen durch Permeabilisierung mit CTAB**

Zum Nachweis cytoplasmatischer Aminosäuren und Kohlenhydrate wurden Kulturen zu verschiedenen Zeitpunkten 1 ml Proben entnommen und durch Vakuumsaugfiltration an Glasfaserfilter (Millipore, Eschborn) adsorbiert. Die Filter wurden zweimal mit 1 ml identischem, frischem Medium gleicher Osmolalität gewaschen und mindestens fünf Minuten bei Raumtemperatur in 1 ml 0,1% CTAB inkubiert. Die permeabilisierten Zellen wurden von den Filtern gespült und sedimentiert (20000 g, 7 min., 4°C). Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bis zur Weiterverwendung bei -20°C aufbewahrt.

#### **2.5.1.2 Aufschluss von Zellen durch Methanolyse**

Für die Messung cytoplasmatischer Metabolite durch GC-MS (s. 2.5.7.2) wurden Zellen durch Methanolyse aufgeschlossen. Dazu wurden 40 ml Kultur durch Sedimentation geerntet (3220 g, 15 min., 30°C), in einem Volumen PBS gewaschen, abermals sedimentiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. 300 mg Zellen (Nassgewicht) wurden nach Zusatz von je 50 µl 0,2 g/l Ribitol, 2 g/l Nonadecansäure (interne Standards für die GC-MS Messung) und H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> in 1,4 ml Methanol bei 70°C (20 min.) aufgeschlossen. Die Zellreste wurden bei Raumtemperatur sedimentiert (14000 g, 3 min.), der Überstand abgenommen, gesammelt und

das Zellsediment mit 750  $\mu$ l Chloroform reextrahiert (5 min., 37°C). Nach abermaligem Sedimentieren wurde der Überstand abgenommen und mit dem Methanol vereinigt. Durch Zusatz von 1,4 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>, Ausschütteln und Zentrifugation (3220 g, 15 min., 22°C) wurde eine Phasentrennung erreicht. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen und für die Herstellung von GC-Proben verwendet.

## **2.5.2 Lipidextraktion aus ganzen Zellen**

### **2.5.2.1 Lipidextraktion zum Nachweis lipidgebundener Trehalose durch Verseifung von Trehalose/Fettsäureestern**

Die Extraktion von Lipiden aus ganzen Zellen basierte auf der Methode von Puech *et al.* (2001). Dazu wurden 1-2 g Zellen (Nassgewicht) in 50 ml Chloroform/Methanol (1:1) aufgenommen und 20 std. bei Raumtemperatur unter Rühren inkubiert. Die Zellreste wurden sedimentiert (3220 g, 15 min., 20°C) und Restlipide aus den Sedimenten durch zweimaliges Waschen mit je 50 ml Chloroform/Methanol (2:1) reextrahiert. Die vereinigten Überstände wurden im Vakuum auf 5-10 % ihres Volumens eingeengt (Rotationsverdampfer, 200 mbar, 30-45°C), die konzentrierte Lipidlösung in 140 ml Chloroform/Methanol/H<sub>2</sub>O (4:2:1) aufgenommen und im Scheidetrichter erschöpfend ausgeschüttelt. Nach der Phasentrennung wurde die untere (organische) Phase abgenommen und im Vakuum bei 45°C auf 2 - 4 ml eingeengt. Die konzentrierte Lösung wurde in GC-Probengefäße überführt und im Vakuumrotationsverdampfer bei 30°C zur Trockne eingeengt. Die erhaltenen Lipidextrakte wurden über Nacht bei Raumtemperatur im Vakuum über Phosphopentoxid aufbewahrt.

### **2.5.2.2 Lipidextraktion zum Nachweis von Corynomycolat**

Der Nachweis von Mycolsäuren in Lipidextrakten verschiedener für Trehalosesynthesegene defekter Stämme wurde von M. Tropis (AG Daffé, CNRS, Toulouse, Frankreich) durchgeführt. Die Lipidextraktion basierte auf der von Puech *et al.* (2000) beschriebenen Methode. Die Extraktion erfolgte während einer 16-stündigen Inkubation der Zellen bei Raumtemperatur in einem Gemisch aus Chloroform/Methanol (1:1, v/v). Die Zellreste wurden dreimal mit CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH (1:1, v/v) und danach mit CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH (2:1,

v/v) reextrahiert. Nach Ankonzentrieren der vereinigten organischen Phasen wurden die Lipidextrakte gewaschen und zur Trockne eingengt.

### **2.5.3 Herstellung von Zellwandextrakt**

Die Präparation von Zellwand orientierte sich ebenfalls an der von Puech *et al.* (2001) beschriebenen Methode. Dazu wurden 1-2 g Zellen (Nassgewicht) in 20 ml kaltem 50 mM  $K_iPO_4$  (pH 7,5), 2 mM  $MgCl_2$  aufgenommen. Nach Zusatz von 2  $\mu g/ml$  DNaseI wurden die Zellen durch vier aufeinanderfolgende *french-press*-Passagen (18000 psig) aufgeschlossen. Nicht aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer wurden bei 3220 g (15 min., 4°C) sedimentiert. Zur Isolation von Zellwand wurde der Überstand bei 12000 g zentrifugiert (45 min., 4°C), das resultierende Sediment mit 10 ml  $H_2O_{dd}$  gewaschen und abermals sedimentiert (30 min., 15000 g, 4°C). Das Sediment wurde in 2 ml  $H_2O_{dd}$  aufgenommen und im Vakuum gefriergetrocknet.

### **2.5.4 Verseifung von Fettsäureestern zur Freisetzung von Trehalose**

Die Verseifung von Fettsäureestern in Lipidextrakten sowie Zellwandextrakten orientierte sich an der Methode von Shimakata *et al.* (1986). Dazu wurde getrockneter Lipid- bzw. Zellwandextrakt in 500 mM KOH/50% Ethanol aufgenommen (20  $\mu l/mg$  Lipidextrakt aus ganzen Zellen bzw. 60-200  $\mu l/mg$  Zellwandextrakt) und 30 min. im Ultraschallbad bei 40°C gelöst. Für die Verseifung wurden die Proben 30 min. im Heizblock bei 70°C inkubiert. Die Proben wurden mit 1-2 ml Hexan/Diethylether erschöpfend ausgeschüttelt, die untere (wässrige) Phase abgenommen und durch Zugabe eines Volumens 1 M HCl neutralisiert. Neutralisierte wässrige Phase sowie organische Phase wurden bei -20°C aufbewahrt. Die Quantifizierung aus Fettsäureestern freigesetzter Trehalose erfolgte durch Gaschromatographie (s. 2.5.7.1).

### **2.5.5 Verseifung von Zellen zur Freisetzung von Zellwandmycolat**

Die Verseifung von Zellen zur Freisetzung und Quantifizierung von Zellwandmycolat wurde durch M. Tropis in der AG Daffé (CNRS, Toulouse, Frankreich) durchgeführt. Dazu wurden Zellen, die kein extrahierbares Lipid mehr besaßen (300 mg Trockengewicht) im Vakuum getrocknet und verseift wie von Daffé *et al.* (1983) beschrieben. Die Verseifungsprodukte

wurden durch 20%ige Schwefelsäure neutralisiert, die resultierenden Fettsäuren mit Diethylether extrahiert und mit Diazomethan in ihre Methylester überführt.

### 2.5.6 Extraktion der äußeren Zellhülle

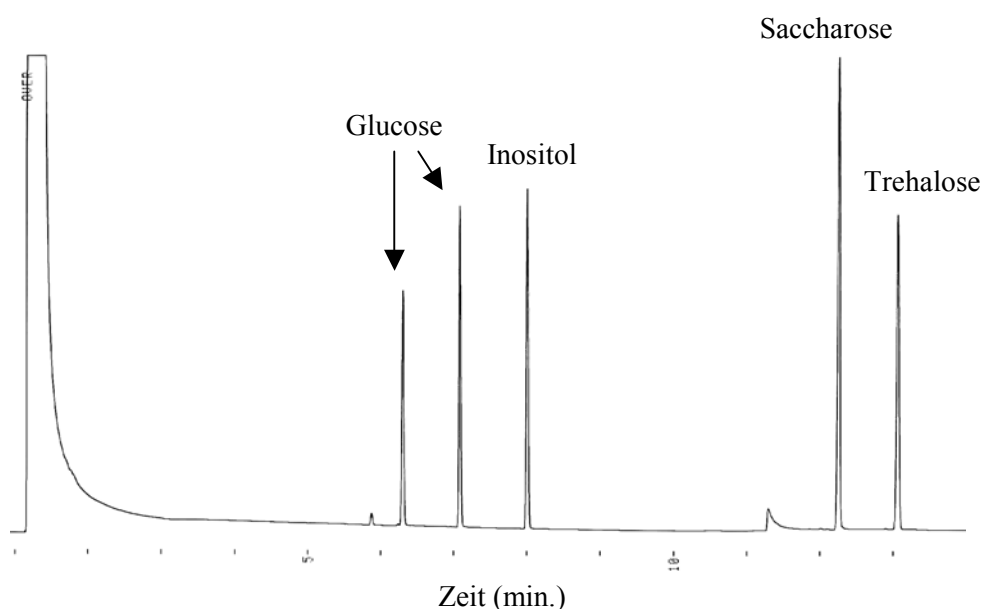
Zum Nachweis des Zellwandporins PorA und des periplasmatischen Glutamat-Bindeproteins GluB wurde die äußere Zellhülle von ATCC13032, ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY und ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY-Zellen aufgelöst und der Proteinanteil daraus extrahiert. Dazu wurde das von Marienfeld et al. (1997) beschriebene Verfahren angewandt. Die Methode basiert auf der Wirkung des Detergens Natriumlauroylsarcosinat (sls).

### 2.5.7 Gaschromatographische Analysen (GC-Analysen)

#### 2.5.7.1 GC-Analyse zum Nachweis von Zuckern

Der Nachweis von Trehalose und anderen Zuckern in CTAB-Permeabilisaten (s. 2.5.1.1.), den wässrigen Phasen nach Verseifung von Lipid- und Zellwandextrakten (s. 2.5.4) und bei TreS-Enzymtests (s. 2.5.10) erfolgte durch gaschromatographische Analyse. Dazu wurden die Proben nach Zusatz von 0,1 g/l Inosit (interner Standard bei GC-Messungen) unter Stickstoffstrom bei 60°C getrocknet und über Nacht im Vakuum über Phosphopentoxid aufbewahrt. Die Derivatisierung erfolgte durch Trimethylsilylierung (Sweeley et al., 1963). Dazu wurden die getrockneten Proben in MSTFA<sub>1%</sub>TMCS/Pyridin (4:1) aufgenommen und 15 min. im Ultraschallbad bei 40°C gelöst. Die Derivatisierung erfolgte durch einstündige Inkubation bei 100°C in einem Heizblock. Nach weiteren zwei Stunden bei Raumtemperatur konnten die Proben vermessen werden. Die Messungen erfolgten an einem GC9000 *series* Gaschromatographen der Firma Fisons Instruments, ausgestattet mit einem FI-Detektor und Elektrometer EL 980. Zur Auftrennung wurde eine 50 m lange Kapillarsäule des Typs FS-SE-54-0,25 (CS-Chromatographie Service, Langerwehe) verwendet. Als Trägergas diente Wasserstoff (Fluss 2 ml/min.). Die Proben (1 µl Probenvolumen) wurden durch *split*-Injektion (Splitverhältnis 1:10) appliziert. Die Trennung erfolgte durch einen linearen Temperaturgradienten von 160°C bis 280°C mit isothermen Plateaus bei 160°C (2 min. nach Injektion) und 280°C am Ende des Laufs (3 min.). Die Aufheizrate betrug 12°C/min., die

Abkühlrate 50°C/min. Detektor- und Injektortemperaturen wurden auf 280°C eingestellt. Die Datenauswertung erfolgte mit Hilfe des Hitachi-Merck Integrators D-2000.



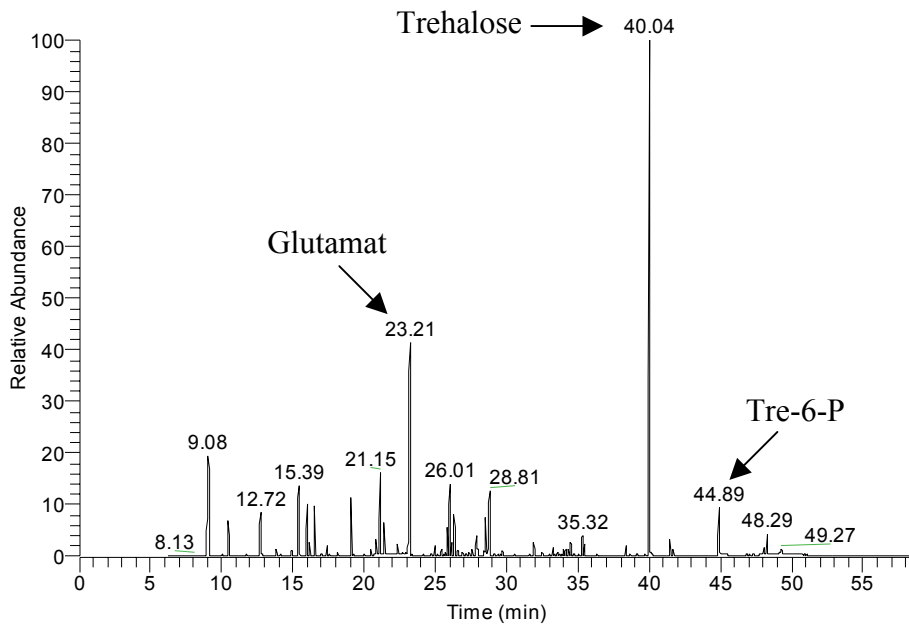
**Abb. 4:** Chromatogramm einer GC-Analyse zur Quantifizierung von Trehalose und anderen Zuckern.

### 2.5.7.2 GC-MS-Analyse zur Bestimmung von Trehalose-6-Phosphat und anderen cytoplasmatischen Stoffwechselprodukten

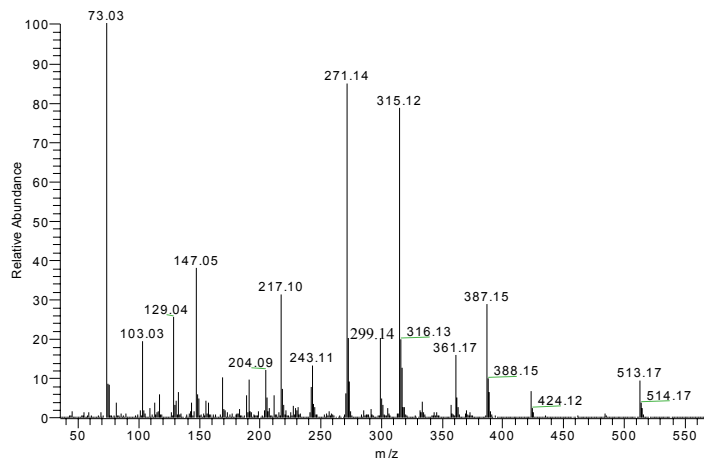
Zur Herstellung von Proben für GC-MS Messungen wurden 1 ml der nach Methanolyse von Zellen erhaltenen wässrigen Phase (s. 2.5.1.2) in GC-Probengefäßen (Macherey-Nagel, Düren) unter Stickstoff bei 40°C getrocknet und 90 min. bei 30°C mit je 50 µl 20 mg/ml Methoxamin in Pyridin inkubiert. Nach Zusatz von 80 µl MSTFA wurden die Proben 30 min. bei 37°C derivatisiert. Nach weiteren zwei Stunden bei Raumtemperatur konnten die Proben vermessen werden. Die Messung erfolgte an einem Finnigan Trace GC/Trace MS Gaschromatographen mit einer J&W Scientific *fused-silica* Kapillarsäule (30 m, 0,25 mm Innendurchmesser, 0,25 mm Filmdicke) der Firma Agilent (Palo Alto, USA). Der Gasfluss war auf 1 ml/min. geeicht, als Trägergas diente Helium. 1 µl Proben wurden durch *split*-Injektion/PTV appliziert (Splitverhältnis 25:1, Aufheizen des Injektors 0,4 min. nach Injektion von 70 auf 280°C bei 14°C/sec). Der Temperaturgradient verlief von 70°C auf 76°C



mit 1°C/min. und von 76°C auf 325°C mit 6°C/min. Darauf folgte ein zehnmütiges isothermes Plateau. Massenspektren einzelner Substanzen wurden durch Fragmentierung mittels Elektronenstoßionisation gewonnen (70 eV). Die GC-interface Temperatur betrug 250°C, die source-Temperatur 220°C.



**Abb. 5:** Chromatogramm einer GC-MS-Analyse zum Nachweis von Tre-6-P. Mit Pfeilen markiert sind neben Tre-6-P die Signale von Glutamat und Trehalose, den charakteristischen Stoffwechselprodukten von *C. glutamicum*.



**Abb. 6:** Massenspektrum von Trehalose-6-Phosphat-9TMS.  $m/z$ : Masse/Ladung.

### 2.5.7.3 GC/GC-MS-Analyse zur Quantifizierung von Mycolsäuren

Die quantitative Bestimmung von Mycolsäuren wurde in der AG Daffé (CNRS, Toulouse, Frankreich) von M. Tropis durchgeführt. Dazu wurden extrahierte Fettsäuren (s. 2.5.2.2 und 2.5.5) mit Diazomethan in ihre Methylester überführt, vakuumgetrocknet und gewogen. Die Derivatisierung erfolgte durch Trimethylsilylierung. GC-Analysen wurden mit Hilfe eines Hewlett-Packard HP4890A Gaschromatographen, ausgestattet mit einer *fused-silica*-Säule (25 m Länge, 0,22 mm Innendurchmesser) durchgeführt. Der lineare Temperaturgradient verlief von 100°C auf 300°C bei einer Aufheizrate von 5°C/min., gefolgt von einem fünfminütigen isothermen Plateau. GC-MS-Analysen wurden mit einer Hewlett-Packard 5890GC/Hewlett-Packard 5989A MS-Kombination durchgeführt. Die Analysen erfolgten mit Hilfe einer 12 m langen Säule des Typs HP12 und einem linearen Temperaturgradienten von 100°C auf 290°C (Aufheizrate 8°C/min.). Die Proben wurden durch *splitless*-Injektion appliziert.

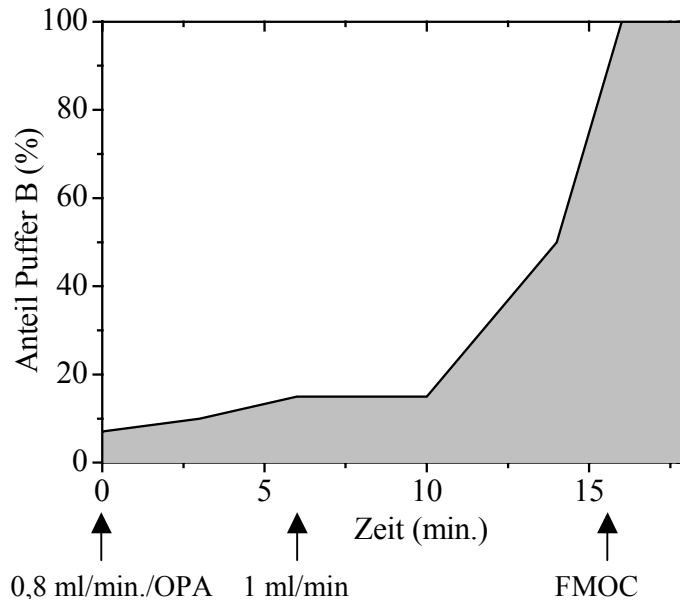
### 2.5.8 Dünnschichtchromatographie zum qualitativen Nachweis von MMT, DMT und Zellwandmycolat

Die qualitative Bestimmung von MMT, DMT und Zellwandmycolat wurde in der AG Daffé (CNRS, Toulouse, Frankreich) von M. Tropis durchgeführt. Dazu wurden Kieselgelplatten verwendet (G-60, 0,25 mm, Merck). Als Laufmittel diente  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  (9:1, v/v) oder  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  (30:8:1 bzw. 65:25:4, v/v). Zur Detektion wurden die Platten mit 0,2% Anthron (w/v) in konzentrierter Schwefelsäure besprüht und bei 110°C entwickelt.

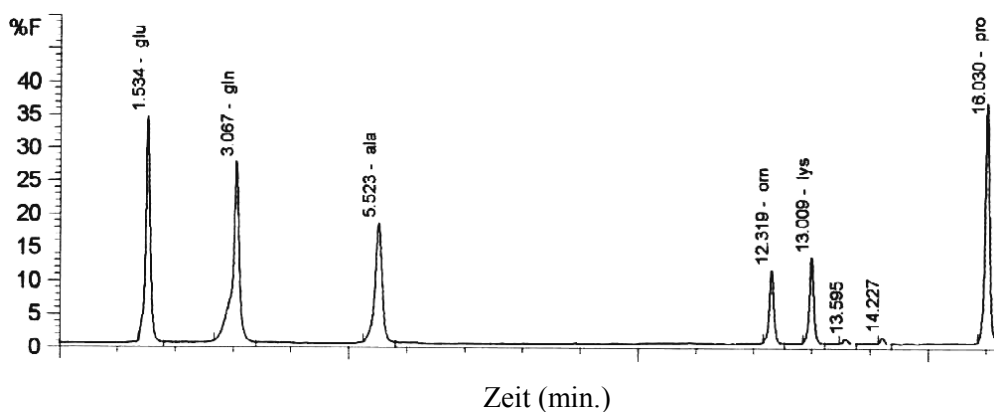
### 2.5.9 HPLC-Analysen

Die quantitative Analyse von Aminosäuren wurde mit einem Umkehrphasen-HPLC-System (HP1090 *Liquid Chromatograph*, HP1046A *Fluorescence Detector*) mit automatisierter Vorsäulen-Fluoreszenzderivatisierung basierend auf der von Schuster (1988) beschriebenen Methode durchgeführt. Puffer A bestand wie in der Originalbeschreibung aus 30 mM Natriumacetat (pH 7,2) 0,5% THF. Puffer B bestand aus einem Gemisch von Methanol/Acetonitril/100 mM Natriumacetat (pH 7,2) (2:2:1). Das zur Auftrennung verwendete Zeitprogramm ist in Abb. 7 dargestellt. Nach 15 min. wurden zur Detektion von Prolin Anregungs- und Emissionswellenlängen (Ex./Em.) von OPA (Ex.: 230 nm, Em.:

455 nm) auf FMOC (Ex.: 266 nm, Em.: 310nm) umgestellt. Als interner Standard bei HPLC-Messungen diente L-Ornitin.



**Abb. 7:** Bei HPLC-Analysen verwendetes Zeitprogramm und Lösemittelgradient. Die graue Fläche unter dem Graphen stellt den Anteil des Puffers B dar. Mit Pfeilen angezeigt ist die Veränderung des Flusses und die Detektion von OPA- bzw. FMOC-Derivaten. Ein HPLC-Lauf dauerte 22 min.



**Abb. 8:** HPLC-Chromatogramm zum Nachweis von Aminosäuren, die unter hyperosmotischen Bedingungen in hohen Konzentrationen im Cytoplasma von *C. glutamicum* zu finden sind (außer Lysin). %F: relative Fluoreszenz. Glu: Glutamat; gln: Glutamin; ala: Alanin; orn: Ornitin; lys: Lysin; pro: Prolin.

### 2.5.10 Nachweis von TreS-Enzymaktivität

Zum Nachweis von TreS-Aktivität wurden Zellextrakte der Stämme ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY sowie ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY hergestellt. Dazu wurden Zellen aus 100 ml Kulturen in der exponentiellen Phase geerntet, zweimal in PBS gewaschen und in 2,5-4 ml kaltem 50 mM Kaliumphosphat (pH 7,5), 10 mM MgCl<sub>2</sub> aufgenommen. Nach Zusatz von 50  $\mu$ g/ml DNaseI und Complete<sup>®</sup>-Protease Inhibitor (Roche Diagnostics) wurden die Zellen wie unter 2.5.3 beschrieben durch drei aufeinanderfolgende *french press* Passagen aufgebrochen. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (15000 g, 10 min., 4°C) entfernt und der Proteingehalt des Zell-Rohextrakts bestimmt.

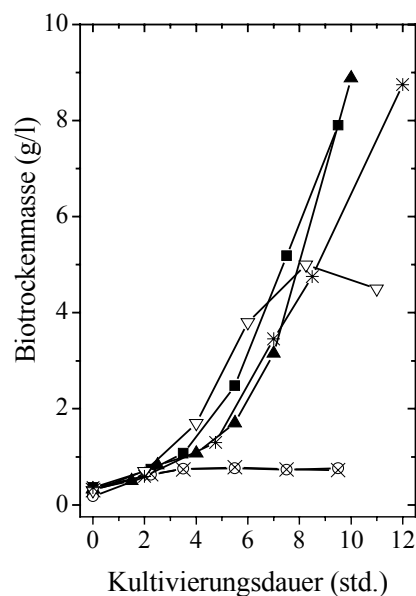
Die Durchführung des Enzymtests orientierte sich an der von De Smet et al. (2000) beschriebenen Methode. Die Enzymansätze bestanden aus 10-20 mg/ml Zellextrakt-Protein, 20 mg/ml Maltose bzw. Trehalose in 100 mM Natriumphosphat (pH 6). Die Reaktionen wurden durch den Zusatz des Zellextrakts gestartet. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 150  $\mu$ l Proben entnommen und die Reaktionen durch plötzliches Erhitzen auf 70°C (10 min.) abgestoppt. Denaturiertes Protein wurde durch fünfminütige Zentrifugation bei 20000 g und 20°C sedimentiert und die Überstände bei -20°C aufbewahrt.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 Physiologische Bedeutung von Trehalose für *C. glutamicum*

##### 3.1.1 Trehalose als Kohlenstoffquelle von *C. glutamicum*

Die Verwertung von Trehalose als Kohlenstoffquelle ist im Falle vieler unterschiedlicher Organismen beschrieben (Argüelles, 2000). *E. coli* kann Trehalose nur bei niedriger externer Osmolalität verwerten, da die Aufnahme des Zuckers bei hoher Osmolalität unterdrückt wird. Die Fähigkeit von *C. glutamicum*, Trehalose als C-Quelle zu verwerten, wurde durch Zugabe des Disaccharids zum Wachstumsmedium im Vergleich zu anderen C-Quellen getestet.



**Abb. 9:** Wachstum von *C. glutamicum* ATCC13032 in Minimalmedium mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen (alle 4%). ■ Saccharose; ○ Trehalose (CgXII-Medium, 0,9 osM); × Trehalose (MMI-Medium, 0,4 osM); ▽ Maltodextrin (15% reduzierende Anteile); ▲ Glucose; \* Mischkohlenstoffquelle aus 4% Saccharose und 3% Trehalose.

In Abb. 9 ist das Wachstum von *C. glutamicum* auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen dargestellt. Während jede dieser Kohlenstoffquellen bakterielles Wachstum zuließ, war dies

bei Trehalose als alleiniger C-Quelle nicht der Fall. Da selbst bei sehr geringer Osmolalität kein Wachstum festgestellt werden konnte, lag eine zu *E. coli* analoge Regulation der Aufnahme von Trehalose also nicht vor. Shimakata & Minatogawa (2000) konnten in einem *in vitro*-Experiment zeigen, dass freie Trehalose die Synthese von Dimycolyl-Trehalose und Zellwandmycolat hemmte. Da diese Substanzen wichtige Bestandteile der Zellwand von Corynebakterien und die Mycolat-Synthesenzyme in der Zellwand lokalisiert sind (Shimakata et al., 1984), d.h. in direktem Kontakt zum Wachstumsmedium stehen, könnte hier die Ursache für das ausbleibende Wachstum auf Trehalose liegen. Um dies zu testen, wurde eine Anzucht mit einer Mischkohlenstoffquelle aus Saccharose und Trehalose durchgeführt (Abb. 9). Unter diesen Bedingungen zeigten die Kulturen normales Wachstum. Es fand also keine Wachstumshemmung durch Trehalose statt, sondern die Verwertung von Trehalose als im Wachstumsmedium bereitgestellte Kohlenstoffquelle war nicht möglich. Zusammen mit der Beobachtung, dass einmal exkretierte Trehalose von der Zelle selbst nach tagelanger Inkubation nicht wieder aufgenommen wurde (nicht gezeigt), deuteten die gezeigten Ergebnisse auf das Fehlen eines Aufnahmemechanismus für Trehalose bei *C. glutamicum* hin.

### **3.1.2 Bedeutung von Trehalose als kompatibles Solut von *C. glutamicum* unter hyperosmotischen Bedingungen**

Da die natürlichen Habitate freilebender Bakterien mitunter starken und plötzlichen Veränderungen der Osmolalität unterworfen sind, haben solche Organismen eine Vielzahl von Mechanismen entwickelt, die eine schnelle Anpassung an Veränderungen der Osmolalität erlauben (Poolman & Glaasker, 1998; Wood, 1999; Bremer & Krämer, 2000). Diese Anpassung besteht in der Anreicherung kompatibler Solute durch Aufnahme oder Synthese. Während die Aufnahme kompatibler Solute aus dem Wachstumsmedium bei *C. glutamicum* bereits gut untersucht ist (Peter et al., 1998), liegen über die Synthese kompatibler Solute nur wenig detaillierte Erkenntnisse vor. In dieser Arbeit wurde die Synthese beschriebener kompatibler Solute von *C. glutamicum* (Frings et al., 1993) bei konstanter Osmolalität (Langzeitanpassung) sowie nach plötzlicher Erhöhung der Osmolalität mit besonderem Schwerpunkt auf der Trehalosesynthese untersucht. Die Osmolalität des Wachstumsmediums wurde durch Zusatz von NaCl erhöht. Die Basisosmolalität des in den meisten Experimenten verwendeten CgXII-Minimalmediums betrug 0,9 osM, die des hypersalinen Mediums nach

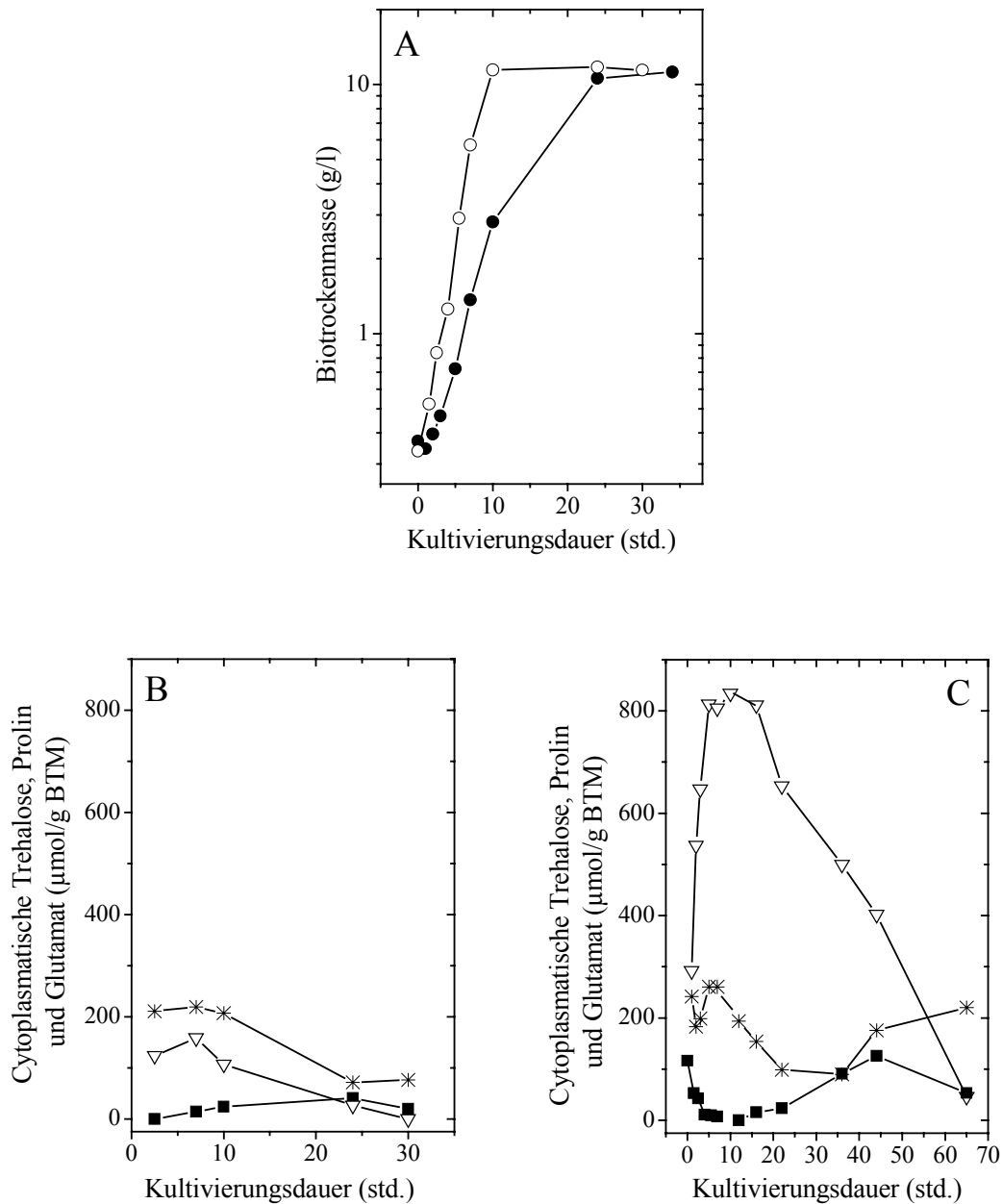
NaCl-Zugabe 2,4 osM. Um die Synthese kompatibler Solute untersuchen zu können, war es nötig, den Import kompatibler Solute auszuschließen. Deshalb wurde mit einem Wachstumsmedium gearbeitet, das keine solchen Stoffe enthielt.

### 3.1.2.1 Trehalosesynthese bei konstanter Osmolalität

Die Osmolalität des Wachstumsmediums hatte einen erheblichen Einfluss auf Wachstum und Synthese kompatibler Solute bei *C. glutamicum* (Abb. 10). Die maximale Wachstumsrate betrug bei 0,9 osM  $0,43 \text{ h}^{-1}$  (1,7 std. Verdoppelungszeit), bei 2,4 osM nur  $0,25 \text{ h}^{-1}$  (2,7 std. Verdoppelungszeit). Bei 0,9 osM wurden in der stationären Phase knapp  $50 \mu\text{mol/g}$  BTM Trehalose angereichert. In der spätstationären Phase nahm der Trehalosegehalt wieder ab, womöglich infolge einer C-Quellen-Limitation, da zu diesem Zeitpunkt keine Saccharose mehr im Wachstumsmedium gemessen werden (nicht gezeigt). Die maximale Anreicherung von Glutamat und Prolin fand in der exponentiellen Wachstumsphase statt und erreichte Werte von über  $200 \mu\text{mol/g}$  BTM (Glutamat) bzw.  $150 \mu\text{mol/g}$  BTM (Prolin). Neben den dargestellten Substanzen konnten auch Alanin und Glutamin in geringeren Mengen ( $10\text{-}20 \mu\text{mol/g}$  BTM) nachgewiesen werden.

Bei 2,4 osM stieg der Trehalosegehalt der Zellen um mehr als den doppelten Betrag im Vergleich zu 0,9 osM (Abb. 10C). Die maximale Anreicherung wurde in der *lag*-Phase unmittelbar nachdem die Zellen in das hypersaline Medium überimpft wurden sowie in der stationären Phase erreicht. In der spätstationären Phase nahm die cytoplasmatische Trehalosekonzentration wieder ab. Die Menge cytoplasmatischen Glutamats nahm bei 2,4 osM im Vergleich zu 0,9 osM nicht signifikant zu. Die größten Glutamatmengen konnten wie im Falle von Trehalose zu Beginn der Anzucht und in der stationären Phase gemessen werden, während sie in der exponentiellen Phase abnahmen. Die stärkste osmotisch bedingte Steigerung der cytoplasmatischen Konzentration war im Falle von Prolin festzustellen. Der Prolingehalt der Zellen nahm im Vergleich zu 0,9 osM um den sieben- bis achtfachen Betrag zu. Das Maximum der Anreicherung lag in der exponentiellen Phase, während die cytoplasmatische Konzentration der Aminosäure zum Ende der Anzucht immer mehr abnahm. Neben den dokumentierten kompatiblen Soluten konnte auch Glutamin nachgewiesen werden, allerdings in schwankenden Mengen (zwischen  $40$  und  $150 \mu\text{mol/g}$  BTM) und ohne einen klaren Zeitverlauf. Da aber eine deutliche Steigerung der Menge im

Vergleich zu 0,9 osM vorlag, ist in Übereinstimmung mit bereits früher veröffentlichten Daten (Frings *et al.*, 1993) davon auszugehen, dass auch Glutamin unter diesen Bedingungen als kompatibles Solut wirkte.



**Abb. 10:** Bakteriellcs Wachstum (A) und cytoplasmatische Mengen kompatibler Solute bei *C. glutamicum* ATCC13032 bei 0,9 osM (B) und 2,4 osM (C). (A): ○ 0,9 osM; ● 2,4 osM ; (B), (C): ■ Trehalose; ▽ Prolin; \* Glutamat.



Auffällig war, dass Prolin, das den Hauptanteil des *pools* kompatibler Solute darstellte, sowohl bei 0,9 osM als auch bei 2,4 osM v.a. in der exponentiellen Phase synthetisiert wurde. Eine enge Korrelation von cytoplasmatischer Prolinmenge und Zellwachstum, insbesondere bei hoher Osmolalität, wurde bereits früher beschrieben (Guillouet & Engasser, 1995a). Aufgrund der Bedeutung des Zell-Turgors für Zellwachstum und -teilung (Koch, 1983) besteht für wachsende Zellen vermutlich eine größere Notwendigkeit zur Anpassung der cytoplasmatischen Osmolalität an die im umgebenden Medium herrschende Osmolalität durch die Anreicherung kompatibler Solute als für ruhende Zellen. Im Einklang damit steht auch die Beobachtung, dass stationäre Zellen ein geringeres cytoplasmatisches Volumen aufwiesen als wachsende Zellen (Rönsch, 2001).

Da selbst bei der Basisosmolalität von 0,9 osM gemessene Mengen insbesondere der Aminosäuren Prolin und Glutamat den zellulären Bedarf für Synthese von Proteinen weit überstiegen, wurden Anzuchten in MMI-Minimalmedium durchgeführt, das eine sehr ähnliche Zusammensetzung, mit 0,4 osM aber eine weit geringere Osmolalität besitzt als CgXII-Medium. Die cytoplasmatischen Mengen von Trehalose, Prolin und Glutamat wurden zu Beginn und in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase sowie in der stationären Phase bestimmt (Tab. 4).

**Tab. 4:** Cytoplasmatischer Trehalose-, Prolin- und Glutamatgehalt von *C. glutamicum* ATCC13032-Zellen, die in CgXII Medium (0,9 osM) oder MMI-Medium (0,4 osM) angezogen wurden.

Zeit (std.)	Trehalose ( $\mu\text{mol/g BTM}$ )		Prolin ( $\mu\text{mol/g BTM}$ )		Glutamat ( $\mu\text{mol/g BTM}$ )	
	0,9 osM	0,4 osM	0,9 osM	0,4 osM	0,9 osM	0,4 osM
2,25	14	5	127	8	189	204
7,5	20	6	103	4	296	221
24	51	14	15	6	162	172

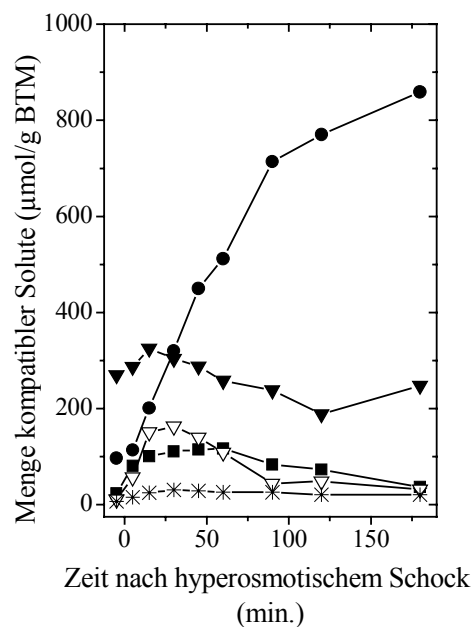
Die maximale Anreicherung von Trehalose und Prolin lag bei 0,4 osM erheblich unter der bei 0,9 osM (Tab. 4). Glutamin war mit der verwendeten Messmethode in Zellen aus MMI-Medium nicht mehr nachzuweisen. Relativ konstant hingegen blieb die Glutamatkonzentration. Diese Ergebnisse zeigen, dass der überwiegende Anteil des

Trehalose-, Glutamin- und Prolingehalts von Zellen bei 0,9 osM bereits der Osmoregulation dient. Dies trifft offensichtlich nicht auf Glutamat zu, dessen Konzentration von der Osmolalität weitgehend unbeeinflusst blieb (vgl. auch Abb. 10B und 10C) und dessen Hauptrolle im Zellstoffwechsel daher nicht die eines kompatiblen Soluts sein kann. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung wird diese Aminosäure aufgrund ihrer Nettoladung im strengen Sinne auch nicht zu den kompatiblen Soluten gezählt. Diese Beobachtungen stehen jedoch im Widerspruch zu den von Frings et al. (1993) veröffentlichten Daten, die eine starke Abhängigkeit der Menge cytoplasmatischen Glutamats von der Osmolalität zeigten. Wegen der deutlichen Konzentrationssteigerung in Abhängigkeit von der Osmolalität schien Prolin unter diesen Bedingungen das bedeutendste kompatible Solut von *C. glutamicum* zu sein. Trehalose spielte dagegen aufgrund seiner Anreicherung v.a. in der stationären Phase und der vergleichsweise geringen Mengen als kompatibles Solut wachsender Zellen offensichtlich kaum eine Rolle.

### 3.1.2.2 Trehalosesynthese nach hyperosmotischem Schock

Eine plötzliche Erhöhung der Osmolalität stellt eine wesentlich größere Herausforderung an die Zelle dar als Wachstum bei konstant hoher Osmolalität, da sie dem Wasserfluss aus der Zelle, d.h. einer drohenden Plasmolyse, unmittelbar entgegenwirken und einen Turgor aufrechterhalten bzw. wiederherstellen muss, der Zellwachstum ermöglicht. Die Situation eines hypertonen Schocks wurde im Experiment durch Zugabe von Kochsalz zu exponentiell wachsenden Kulturen hergestellt. Abb. 11 zeigt die Anreicherung kompatibler Solute bei *C. glutamicum* nach hyperosmotischem Schock. Die Reaktion der Zelle bestand aus der kurzfristigen Aufnahme von Kalium (nicht gezeigt) und der darauffolgenden vorübergehenden Anreicherung von Trehalose, Glutamat und Glutamin sowie der länger anhaltenden Synthese von Prolin. Trehalose- und Glutaminmengen nahmen nach dem Schock um den fünf- bis achtfachen Betrag zu und lagen je nach Zeitpunkt des hyperosmotischen Schocks in der exponentiellen Phase zwischen 90 und 140  $\mu\text{mol/g}$  BTM (Trehalose) bzw. zwischen 140 und 200  $\mu\text{mol/g}$  BTM (Glutamin). Im allgemeinen waren die Konzentrationen umso niedriger, je weiter fortgeschritten die exponentielle Wachstumsphase war (nicht gezeigt). Die Steigerung der Menge cytoplasmatischen Glutamats war relativ gering, was mit früheren Beobachtungen im Einklang steht (s. 3.1.2.1). Glutamatsynthese könnte, wie im Falle von *E. coli* beschrieben (Dinnbier et al., 1988), der vorübergehenden Bereitstellung

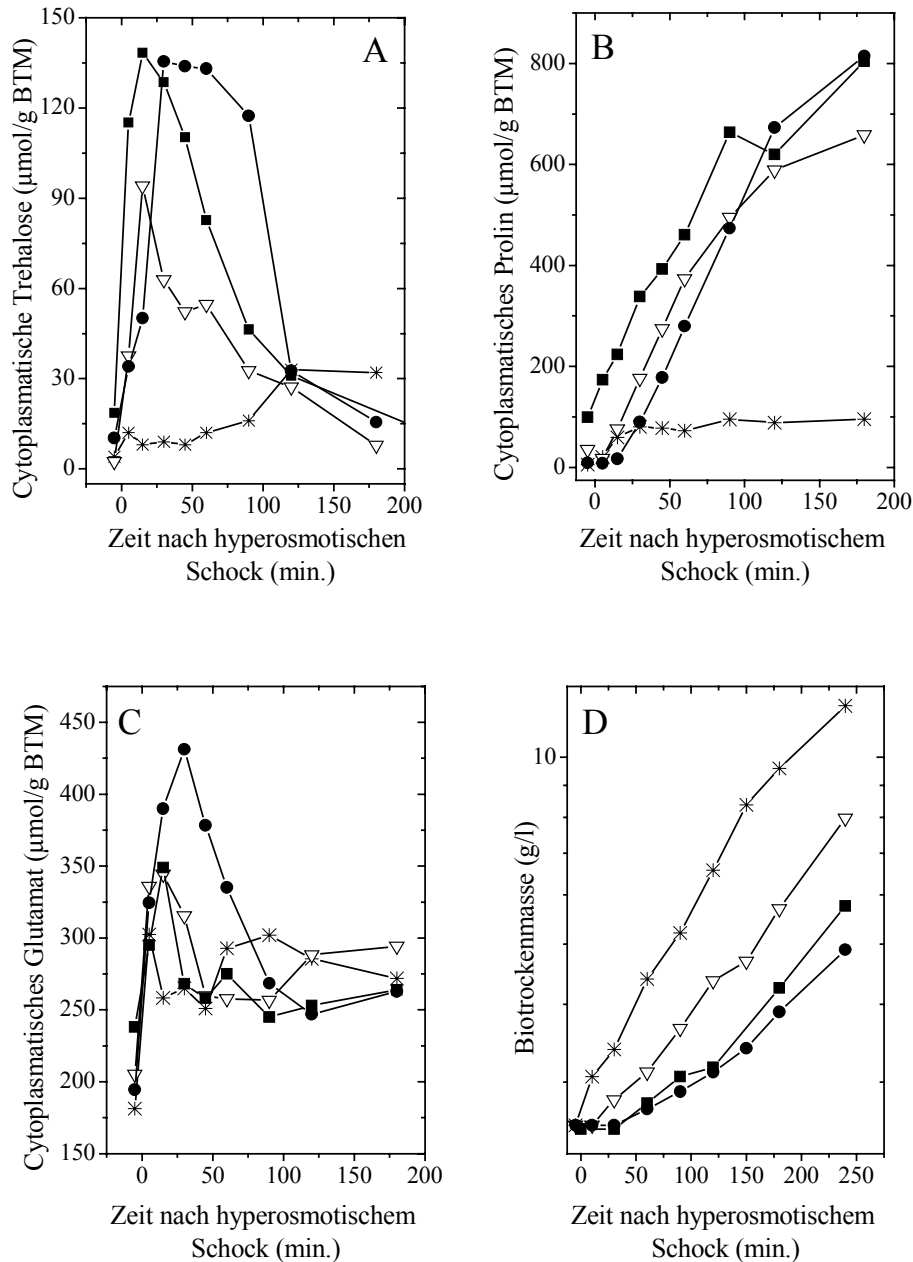
eines Gegenions zum aufgenommenen Kalium dienen. Trotz einer geringen Zunahme der cytoplasmatischen Konzentration spielte Alanin aufgrund der geringen absoluten Mengen als kompatibles Solut von *C. glutamicum* unter den Bedingungen im Experiment keine Rolle. Einhergehend mit der Wiederaufnahme des Kulturwachstums wurden Trehalose, Glutamat und Glutamin durch Prolin ersetzt, das in weit höheren Mengen hergestellt wurde (bis zu 1 mmol/g BTM). Der cytoplasmatische Prolingehalt blieb bis zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase der Kulturen konstant (vgl. Abb. 10C). Prolin schien also auch nach hyperosmotischem Schock das bedeutendste synthetisierte kompatible Solut von *C. glutamicum* zu sein.



**Abb. 11:** Cytoplasmatische Anreicherung kompatibler Solute nach hyperosmotischem Schock von 0,9 osM auf 2,4 osM bei *C. glutamicum* ATCC13032. ■ Trehalose; ● Prolin; ▼ Glutamat; ▽ Glutamin; \* Alanin.

Um festzustellen, inwieweit die Menge synthetisierter Trehalose und anderer kompatibler Solute von der Intensität des hyperosmotischen Schocks abhängt, wurden Versuche durchgeführt, bei denen der Betrag der Erhöhung der Osmolalität sowie die Ausgangs-osmolalität variiert wurden (0,4 osM→0,9 osM; 0,4 osM→1,9 osM; 0,4 osM→2,4 osM; 0,9 osM→2,4 osM). Dazu wurde MMI-Minimalmedium (0,4 osM

Basisosmolalität) bzw. CgXII-Minimalmedium (0,9 osM Basisosmolalität) verwendet. Die höhere Osmolalität von CgXII-Medium beruht auf der starken Pufferung dieses Mediums durch MOPS. Die Experimente sind in Abb. 12 zusammengefasst.



**Abb. 12:** Cytoplasmatische Anreicherung verschiedener kompatibler Solute sowie Wiederaufnahme des Bakterienwachstums nach hyperosmotischem Schock bei *C. glutamicum* ATCC13032 in Abhängigkeit von der Intensität des Schocks. \* 0,4 osM→0,9 osM; ∇ 0,4 osM→1,9 osM; ■ 0,9 osM→2,4 osM; ● 0,4 osM→2,4 osM. (A) cytoplasmatische Trehalose; (B) cytoplasmatisches Prolin; (C) cytoplasmatisches Glutamat; (D) Wiederaufnahme des Bakterienwachstums nach hyperosmotischem Schock.

Die relative Zunahme cytoplasmatischer Trehalose und cytoplasmatischen Prolins hing von der relativen Veränderung der Osmolalität (nach Schock/vor Schock), nicht aber von der Differenz der Osmolalität ab. Ein Faktor von 2-2,5 in der Erhöhung der Osmolalität (0,4 osM→0,9 osM; 0,9 osM→2,4 osM) führte z.B. stets zu einer Verzehnfachung der Prolinsynthese, eine um den Faktor 4,75 gesteigerte Osmolalität (0,4 osM→1,9 osM) zu einer 40-60fachen Zunahme und eine um den Faktor 6 gesteigerte Osmolalität (0,4 osM→2,4 osM) zu einer ca. 80fachen Erhöhung der cytoplasmatischen Prolinmenge. Ähnliches traf auf Trehalose zu, allerdings war die Proportionalität weniger direkt. Die absolute erreichte Menge dieser Solute hing dagegen allein von der absoluten Osmolalität ab. Je höher die Osmolalität war, desto höher waren die maximalen Mengen dieser Solute. Prolin wurde nach einem Schock von 0,4 osM auf 0,9 osM in cytoplasmatischen Mengen nachgewiesen, die vor einem Schock von 0,9 osM auf 2,4 osM (Abb. 11B) herrschten bzw. von Zellen bei konstanter Osmolalität (0,9 osM) während des exponentiellen Wachstums erreicht wurden (Abb. 10B). Unabhängig von der relativen Veränderung der Osmolalität wurden auch stets gleiche Trehalose- und Prolinkonzentrationen bei 2,4 osM erreicht (Abb. 12A/B). Für die Anreicherung von Glutamat war im Gegensatz zu Prolin und Trehalose die Differenz in der Osmolalität ausschlaggebend. Dies hängt mit den sehr hohen, von der Ausgangs-osmolalität nahezu unabhängigen *steady-state* Glutamatkonzentrationen zusammen. Fast identische Zunahmen wurden bei Schocks von 0,4 osM auf 1,9 osM und von 0,9 osM auf 2,4 osM beobachtet.

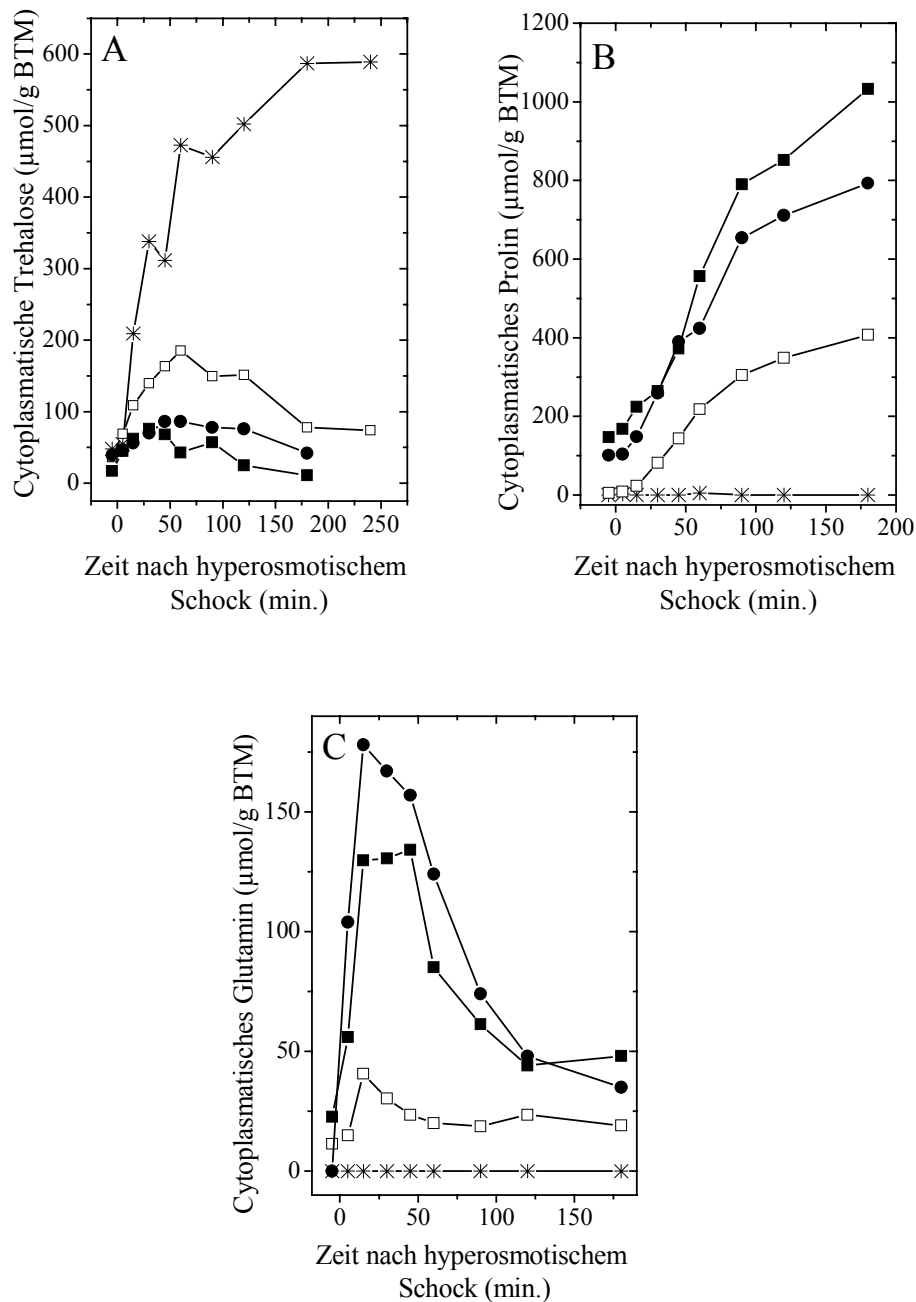
Die Wiederaufnahme des Bakterienwachstums nach hyperosmotischem Schock schien hingegen nicht vom Verhältnis der Osmolalität vor und nach dem Schock, sondern, zumindest in gewissen Grenzen, von der absoluten erreichten Osmolalität abzuhängen (Abb. 12D). So traten Zellen nach Erhöhung der Osmolalität von 0,4 osM auf 0,9 osM wesentlich früher ins Wachstum ein als nach einer Erhöhung von 0,9 osM auf 2,4 osM (gleiche relative Veränderung der Osmolalität). Selbst Bakterien, die mit einer fast fünffachen Erhöhung der Osmolalität konfrontiert waren (0,4 osM→1,9 osM), erholten sich schneller vom hyperosmotischen Schock als solche, die einer 2,5fachen Erhöhung der Osmolalität ausgesetzt wurden (0,9 osM→2,4 osM). Dagegen bestand trotz der großen Differenz in der relativen Zunahme der Osmolalität kaum ein Unterschied in der Wiederaufnahme des

Kulturwachstums bei Zellen nach einem hyperosmotischen Schock von 0,4 osM auf 2,4 osM bzw. von 0,9 osM auf 2,4 osM.

### **3.1.2.3 Trehalosesynthese nach hyperosmotischem Schock unter Bedingungen der Stickstofflimitation und des Stickstoffhungers**

Basierend auf der Überlegung, dass Trehalose nach einem hyperosmotischen Schock zwar nur einen geringen Anteil des cytoplasmatischen Gehalts kompatibler Solute ausmachte, jedoch unter den nachgewiesenen kompatiblen Soluten das einzige war, das keinen Stickstoff beinhaltete, wurde die Synthese kompatibler Solute nach einem hyperosmotischen Schock unter Limitation der N-Quelle bzw. in Abwesenheit einer N-Quelle untersucht. Da es für die Limitation der N-Quelle nötig war, ein natriumfreies Wachstumsmedium zu verwenden (s. Material und Methodenteil), wurde der hyperosmotische Schock in diesem Falle mit KCl durchgeführt. Ein entsprechendes Kontrollexperiment (nicht N-limitiert, Schock durch KCl-Zugabe) wurde ebenfalls durchgeführt. Abb. 13 zeigt die Veränderung des cytoplasmatischen Trehalose-, Prolin- und Glutamingehalts nach hyperosmotischem Schock in Abhängigkeit von der N-Versorgung.

Bei verschlechterter N-Versorgung war nach hyperosmotischem Schock ein deutlicher Anstieg der Synthese von Trehalose im Vergleich zu N-sättigenden Bedingungen zu verzeichnen. Während N-Limitation zu einer mindestens doppelt so starken Trehalosesynthese führte, konnte bei N-Hunger sogar eine rund sechsmal höhere cytoplasmatische Anreicherung des Disaccharids gemessen werden. In Abwesenheit einer N-Quelle war die Anreicherung nicht mehr vorübergehend, sondern der cytoplasmatische Trehalosegehalt blieb auf einem konstant hohen Niveau. Offensichtlich wurde Prolin durch Trehalose als cytoplasmatisches „Hauptsolut“ ersetzt. In inverser Korrelation zur Zunahme der Menge cytoplasmatischer Trehalose nahm die Anreicherung von Aminosäuren nach hyperosmotischem Schock bei Verschlechterung der N-Versorgung ab (Abb. 13B/C). N-Limitation verursachte ein Absinken cytoplasmatischen Prolins und Glutamins auf etwa 40% bzw. 25%, bei völliger Abwesenheit einer N-Quelle konnte keine der beiden Aminosäuren mehr im Cytoplasma nachgewiesen werden. Lediglich eine geringe Menge Glutamat (ca. 20  $\mu\text{mol/g}$ ) war noch vorhanden (nicht gezeigt).

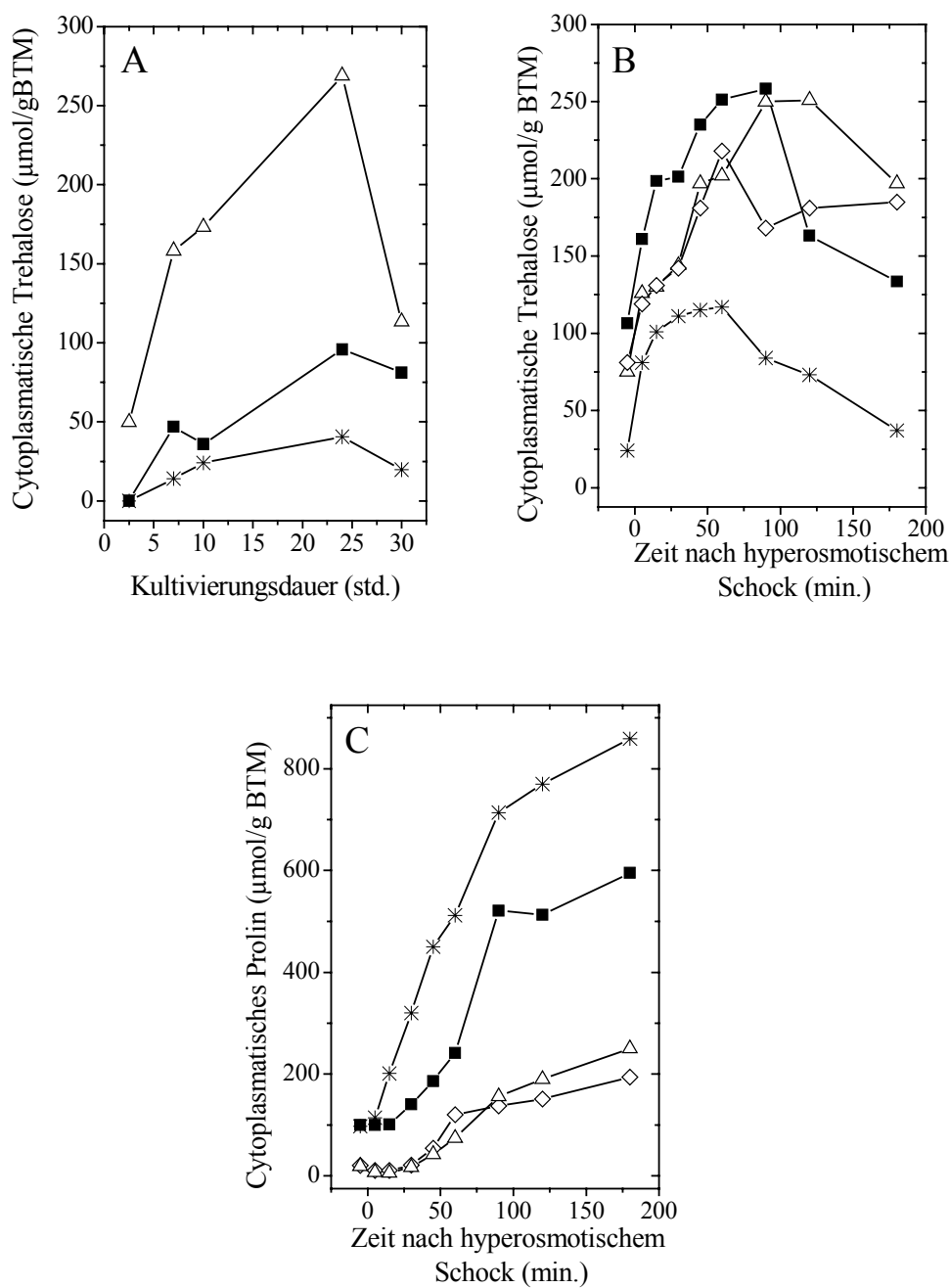


**Abb. 13:** Cytoplasmatische Anreicherung von Trehalose (A), Prolin (B) und Glutamin (C) bei *C. glutamicum* ATCC13032 nach einem hyperosmotischen Schock unter Bedingungen der N-Limitation und des N-Hungers. N-limitierende Bedingungen wurden durch Zugabe von Glutamin als einzige N-Quelle und Erschweren der Glutamin-Aufnahme durch Limitation des Transport-Kosubstrats  $\text{Na}^+$  erreicht. Die völlige Abwesenheit einer N-Quelle im Wachstumsmedium führte zu N-Hunger. ● nicht N-limitiert; ■ nicht N-limitiert; Erhöhung der Osmolalität durch KCl-Zugabe; □ N-limitiert; \* N-gehungert.

### 3.1.3 Trehalosesynthese von *C. glutamicum* in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle

Da *C. glutamicum* über drei unterschiedliche Trehalosesynthesewege mit verschiedenen Substraten verfügt, wurde der Einfluss der C-Quelle auf die Synthese von Trehalose beim Wildtyp im Verlaufe von Anzuchten bei unveränderter Osmolalität sowie nach hyperosmotischem Schock untersucht. Als C-Quellen wurden neben der regelmäßig verwendeten Kohlenstoffquelle Saccharose auch Maltose, Glucose und Maltodextrin verwendet, also die mutmaßlichen Substrate der Trehalosesynthesewege. Abb. 14 zeigt, dass Glucose, Maltose und Maltodextrin im Vergleich zu Saccharose einen stark stimulierenden Einfluss auf die Synthese von Trehalose hatten. Dies war sowohl während einer Anzucht bei konstanter Osmolalität der Fall (Abb. 14A) als auch nach einem hyperosmotischen Schock (Abb. 14B). Während Maltose unter beiden Bedingungen zu einer enormen Steigerung der Trehalosesynthese führte, war die Steigerung bei Glucose nach einem hyperosmotischen Schock stärker als über die Dauer einer gesamten Anzucht. Dass die cytoplasmatischen Trehalosemengen bei Zellen aus Glucose-, Maltose- und Maltodextrinkulturen bereits vor dem hyperosmotischen Schock wesentlich höher waren als bei Zellen aus Saccharosekulturen (Abb. 14B), zeigte den generell stimulierenden Effekt dieser C-Quellen auf die Synthese von Trehalose. Die Synthese von Prolin hingegen verhielt sich annähernd umgekehrt proportional zu der Trehalosesynthese und war bei Saccharose deutlich stärker als bei Glucose, Maltose oder Maltodextrin (Abb. 14C). Obwohl der Betrag der Zunahme cytoplasmatischer Trehalose bei Verwendung von Maltose und Maltodextrin niedriger war als die Abnahme der cytoplasmatischen Prolinmenge, d.h. die Gesamtkonzentration der gemessenen kompatiblen Solute geringer war als bei Verwendung von Saccharose, konnten keine Unterschiede in der Wiederaufnahme des Kulturwachstums nach hyperosmotischem Schock in Abhängigkeit von der C-Quelle festgestellt werden (nicht gezeigt).

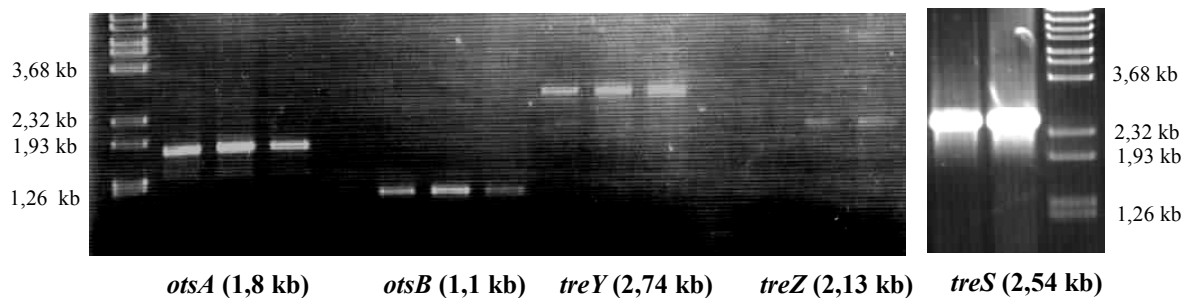




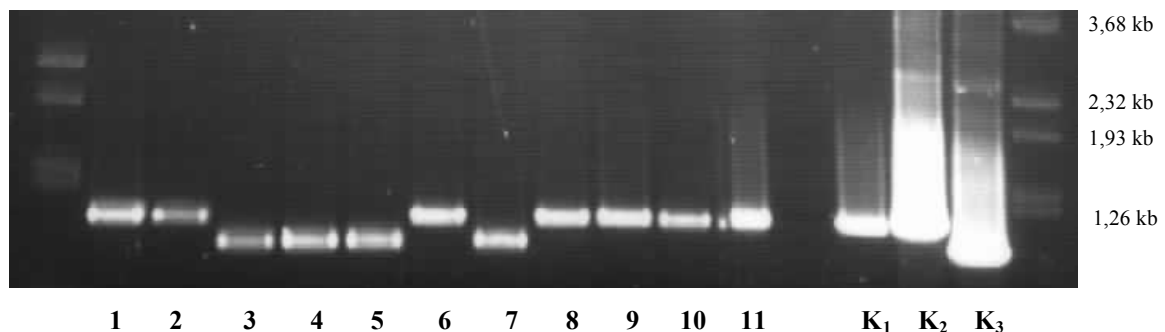
**Abb. 14:** Anreicherung cytoplasmatischer Trehalose bei *C. glutamicum* ATCC13032 während einer Anzucht bei konstanter Osmolalität (0,9 osM) **(A)** sowie nach hyperosmotischem Schock (0,9 osM→2,4 osM) **(B)** in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle. **(C)** Cytoplasmatische Prolinanreicherung nach einem hyperosmotischen Schock in Abhängigkeit von der C-Quelle. C-Quellen: \* Saccharose; ■ Glucose; △ Maltose; ◇ Maltodextrin (alle 4%).

### 3.2 Konstruktion von *C. glutamicum*-Stämmen mit chromosomalen Deletionen in Genen, die für Trehalosesyntheseenzyme kodieren

Durch Polymerase-Kettenreaktion konnten die offenen Leserahmen von *otsA*, *otsB*, *treY*, *treZ* und *treS* mit 5' und 3' flankierenden Bereichen aus dem Genom von ATCC13032 amplifiziert werden (Abb. 15A).



**Abb. 15A:** Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifikation und darauffolgenden Klonierung von *otsA*, *otsB*, *treY*, *treZ* und *treS*. Zur Amplifikation wurden die in Tab. 3 (Material und Methodenteil) angegebenen Oligonucleotide verwendet.



**Abb. 15B:** *OtsB*-Allelaustausch in *C. glutamicum* ATCC13032. **1-11:** verschiedene Bakterienkolonien, die zunächst *pK19mobsacBΔotsB* in das Genom integriert hatten (Anwesenheit beider Allele) und nach Anzucht in LB-Glucosemedium das erwartete, auf den Verlust der Plasmid-DNA hindeutende Selektionsmuster zeigten ( $Km^S$ ,  $Suc^R$ ). **K:** Kontrollen. **K<sub>1</sub>:** genomische DNA aus ATCC13032-Zellen als Matrizen-DNA. **K<sub>2</sub>:** *pUC18otsB* als Matrizen-DNA. **K<sub>3</sub>:** *pUC18ΔotsB* als Matrizen-DNA. Durch den Größenunterschied der amplifizierten Fragmente ist klar erkennbar, dass in einigen Fällen mit der Plasmid-DNA das Wildtypallel ausgeschnitten wurde und es zu der genomischen Integration des Deletionsallels kam (kleineres Fragment). Bei anderen Bakterienklonen ist der umgekehrte Fall eingetreten, d.h. das Wildtypallel wurde wieder stabil in das Genom eingebaut (größeres Fragment).

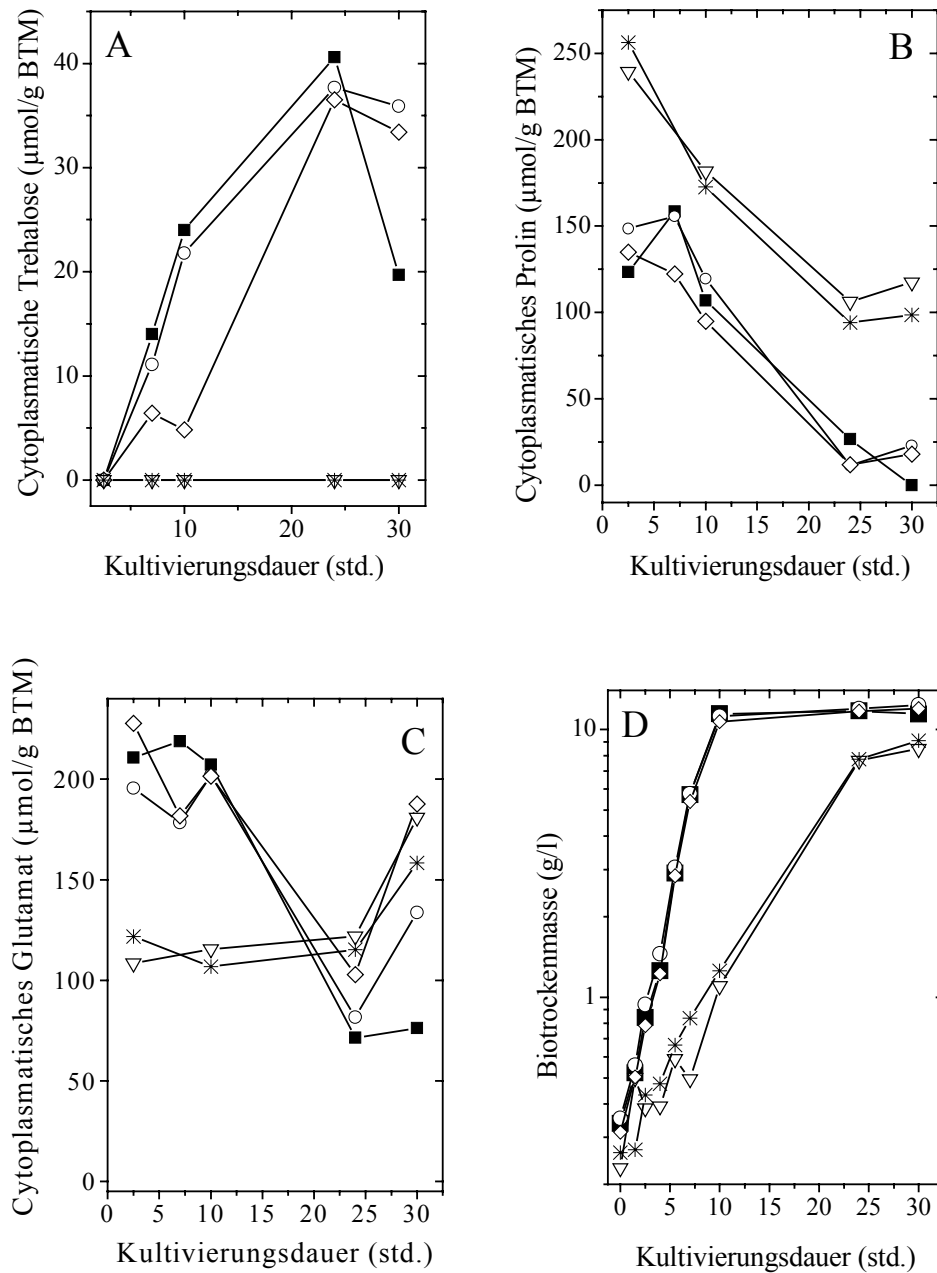
Die offenen Leserahmen mit stromaufwärts und stromabwärts flankierenden Bereichen wurden in Plasmide kloniert und durch rekombinante DNA-Techniken Allele mit internen Deletionen konstruiert. Mit Hilfe der Technik des Allelaustauschs durch zweifache homologe Rekombination (s. Material & Methodenteil, Schäfer et al., 1994) konnten diese Deletionsallele gegen die Wildtypallele ausgetauscht und fest im Genom von *C. glutamicum* verankert werden. Abb. 15B zeigt den PCR-Nachweis eines solchen Allelaustauschs.

### **3.3 Physiologische Bedeutung der verschiedenen Trehalosesynthesewege von *C. glutamicum* - Charakterisierung von Stämmen mit Defekten in Trehalosesynthesewegen**

Um die Funktionen der einzelnen Synthesewege getrennt voneinander analysieren zu können, wurden Bakterienstämme hergestellt, die nur noch über einen funktionalen Syntheseweg verfügten (Doppeldeletionsstämme). Dies wurde dadurch erreicht, dass im Falle des OtsAB- und des TreYZ-Synthesewegs die Gene ausgeschaltet wurden, die für die erste Umsetzung im jeweiligen Syntheseweg kodierten (*otsA*, *treY*). Mit derselben Strategie wurden Stämme erzeugt, denen nur ein Syntheseweg fehlte (Einfachdeletionsstämme). Ferner wurde ein Stamm konstruiert, dem alle drei Synthesewege fehlten (Dreifachdeletionsstamm).

#### **3.3.1 Bedeutung der verschiedenen Trehalosesynthesewege bei konstanter Osmolalität (0,9 osM)**

Bei 0,9 osM (Basisosmolalität) waren sowohl der OtsAB- (ATCC13032 $\Delta$ *treY* $\Delta$ *treS*) als auch der TreYZ-Syntheseweg (ATCC13032 $\Delta$ *otsA* $\Delta$ *treS*) hinreichend, um Trehalose in dem Wildtyp entsprechenden Mengen herzustellen (Abb. 16A). Da das Ausschalten der jeweils beiden anderen Synthesewege also offensichtlich keine Konsequenzen für den Trehalosegehalt der Zellen hatte, schienen auch regulatorische Phänomene vorzuliegen. Ein Hinweis darauf war auch die verzögerte Anreicherung von Trehalose bei ATCC13032 $\Delta$ *treY* $\Delta$ *treS*. Während der cytoplasmatische Trehalosegehalt beim Wildtyp in der spätstationären Phase wieder abnahm, war dies bei ATCC13032 $\Delta$ *treY* $\Delta$ *treS* und ATCC13032 $\Delta$ *otsA* $\Delta$ *treS* nicht der Fall, was auf einen möglichen Zusammenhang zwischen TreS und dem Abbau von Trehalose hindeutete (s. 3.3.5).



**Abb. 16:** Cytoplasmatische Anreicherung von Trehalose (A), Prolin (B) und Glutamat (C) während einer Anzucht bei 0,9 osM bei *C. glutamicum*-Stämmen mit nur noch einem funktionalen Trehalosesyntheseweg (Doppeldeletionsstämme) bzw. ohne einen funktionalen Trehalosesyntheseweg (Dreifachdeletionsstamm). (D): Kulturwachstum.

■ Wildtyp ATCC13032; ○ ATCC13032 $\Delta\text{otsA}\Delta\text{treS}$ ; ◇ ATCC13032 $\Delta\text{treY}\Delta\text{treS}$ ; ▽ ATCC13032 $\Delta\text{otsA}\Delta\text{treY}$ ; \* ATCC13032 $\Delta\text{otsA}\Delta\text{treS}\Delta\text{treY}$ .

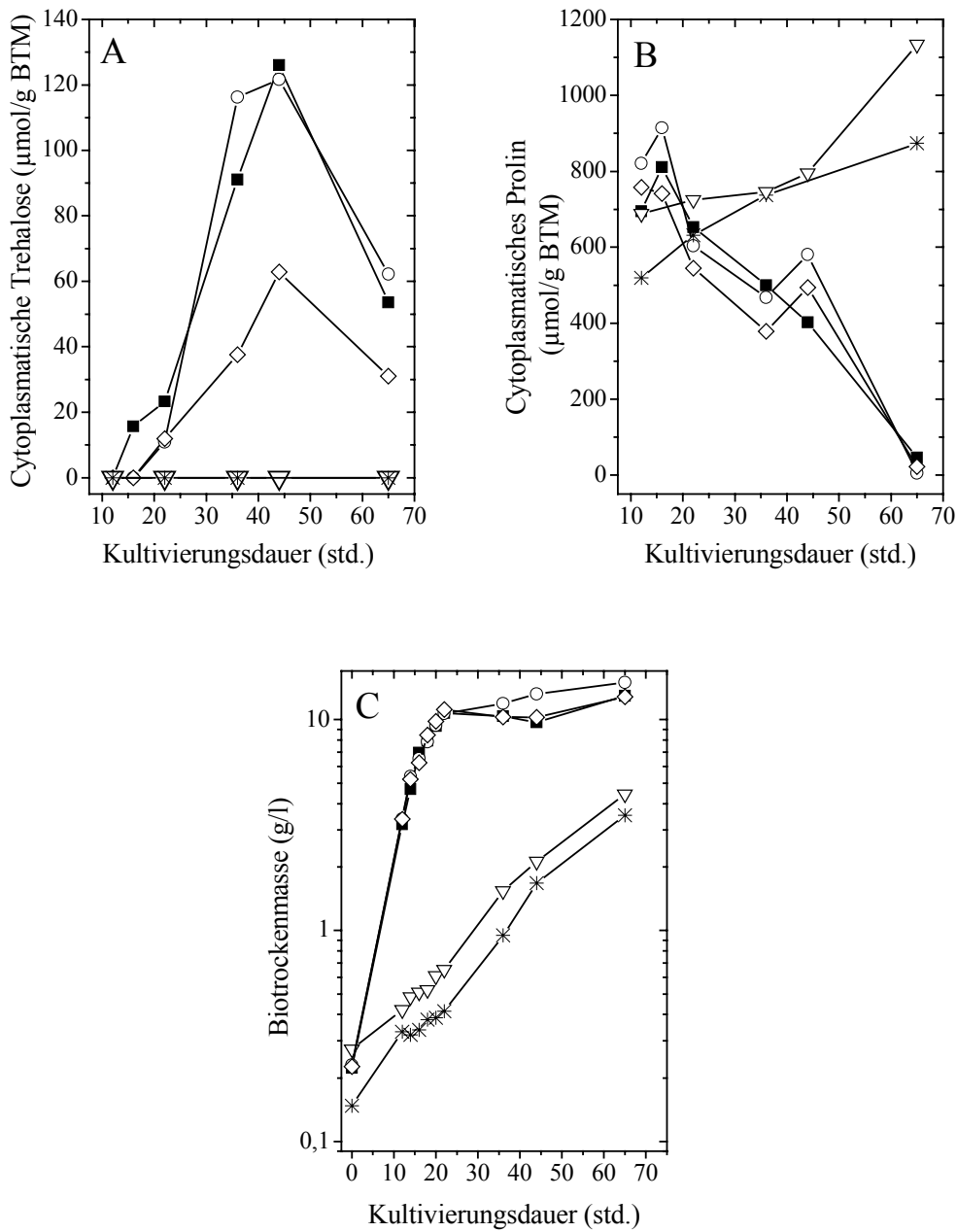
Waren sowohl der OtsAB- als auch der TreYZ-Weg ausgeschaltet (ATCC13032 $\Delta\text{otsA}\Delta\text{treY}$ ), konnte keine cytoplasmatische Trehalose mehr nachgewiesen werden. Dies war unabhängig

davon, ob der betreffende Stamm noch über ein funktionales *treS*-Gen verfügte oder nicht (vgl. ATCC13032 $\Delta$ *otsA* $\Delta$ *treY* und ATCC13032 $\Delta$ *otsA* $\Delta$ *treS* $\Delta$ *treY* in Abb. 16A). TreS spielte daher unter diesen Bedingungen keine Rolle in Bezug auf Trehalosesynthese. Die Abwesenheit von Trehalose in Zellen dieser Stämme hatte offensichtlich Auswirkungen auf die Synthese von Prolin und Glutamat. Beide Stämme synthetisierten erheblich größere Mengen Prolin und über fast die gesamte Dauer der Anzucht hinweg geringere Mengen Glutamat als der Wildtyp (Abb. 16B/C). Die anderen Stämme unterschieden sich in der Synthese dieser beiden Aminosäuren nicht vom Wildtyp. Daneben zeigten ATCC13032 $\Delta$ *otsA* $\Delta$ *treY* und ATCC13032 $\Delta$ *otsA* $\Delta$ *treS* $\Delta$ *treY* eine starke Inhibition des Kulturwachstums, während die anderen Stämme sich nicht vom Wildtyp unterschieden (Abb. 16D).

### **3.3.2 Bedeutung der verschiedenen Trehalosesynthesewege bei erhöhter Osmolalität (2,4 osM)**

Wie in Abb. 10B/C gezeigt wurde, stieg die Synthese von Trehalose bei erhöhter Osmolalität beim Wildtyp signifikant an. Um zu untersuchen, ob für diese osmotisch-induzierte Trehalosesynthese ein bestimmter Syntheseweg verantwortlich war, wurden Stämme, die nur noch einen funktionalen Syntheseweg besaßen, bei 2,4 osM angezogen und die cytoplasmatischen Konzentrationen von Trehalose und anderen kompatiblen Soluten ermittelt.

Abb. 17A zeigt, dass der TreYZ-Weg allein ausreichte, um bei erhöhter Osmolalität Trehalose in den selben Mengen wie der Wildtyp herzustellen. Nach Ausschalten der TreYZ- und TreS-Wege wurden dagegen durch OtsAB-Aktivität nur etwa 50% der im Wildtyp gemessenen Trehalosemenge hergestellt. Wie bei 0,9 osM ging von TreS keine Syntheseaktivität aus, d.h. weder ATCC13032 $\Delta$ *otsA* $\Delta$ *treY* noch ATCC13032 $\Delta$ *otsA* $\Delta$ *treS* $\Delta$ *treY* verfügten über cytoplasmatische Trehalose. Beide Stämme synthetisierten aber größere Prolinmengen als der Wildtyp und die anderen Stämme, dies womöglich, um den Verlust von Trehalose zu kompensieren (Abb. 17B).



**Abb. 17:** Cytoplasmatische Anreicherung von Trehalose (A) und Prolin (B) sowie Kulturwachstum (C) bei 2,4 osM bei *C. glutamicum*-Stämmen mit nur noch einem funktionalen Trehalosesyntheseweg (Doppeldeletionsstämme) bzw. ohne einen funktionalen Trehalosesyntheseweg (Dreifachdeletionsstamm). ■ Wildtyp ATCC13032; ○ ATCC13032ΔotsAΔtreS; ◇ ATCC13032ΔtreYΔtreS; ▽ ATCC13032ΔotsAΔtreY; \* ATCC13032ΔotsAΔtreSΔtreY.

Bei 2,4 osM war das Kulturwachstum der beiden trehalosefreien Stämme noch stärker gehemmt als bei 0,9 osM. Tab. 5 zeigt, dass die maximalen Wachstumsraten von

ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY und ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY im Vergleich zu 0,9 osM um über 60% zurückgingen, die des Wildtyps dagegen nur um etwa 35%. Die Wachstumsgeschwindigkeit dieser Stämme relativ zum Wildtyp nahm also in Abhängigkeit von der Osmolalität um fast den doppelten Betrag ab. ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY und ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY wiesen folglich einen deutlich osmosensitiven Phänotyp auf. Als Ursache hierfür kam jedoch nicht das Fehlen von Trehalose als kompatibles Solut in Betracht, da der Anteil des Disaccharids am gesamten Solutpool auch bei den anderen Stämmen nur gering war. Ferner schienen ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY und ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY-Zellen ihren cytoplasmatischen Gehalt kompatibler Solute durch erhöhte Prolinsynthese auszugleichen. Außerdem war das Wachstum dieser Stämme selbst bei 0,4 osM noch stark gehemmt (nicht gezeigt).

**Tab. 5:** Wachstumsraten und Verdopplungszeiten von ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY- und ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY-Kulturen in Abhängigkeit von der Osmolalität im Vergleich zum Wildtyp.

	Wachstumsrate $\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )		
	0,9 osM	2,4 osM	relativ (2,4 osM/0,9 osM)
ATCC13032	0,4	0,27	0,68
ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY	0,145	0,054	0,37
ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY	0,146	0,05	0,34

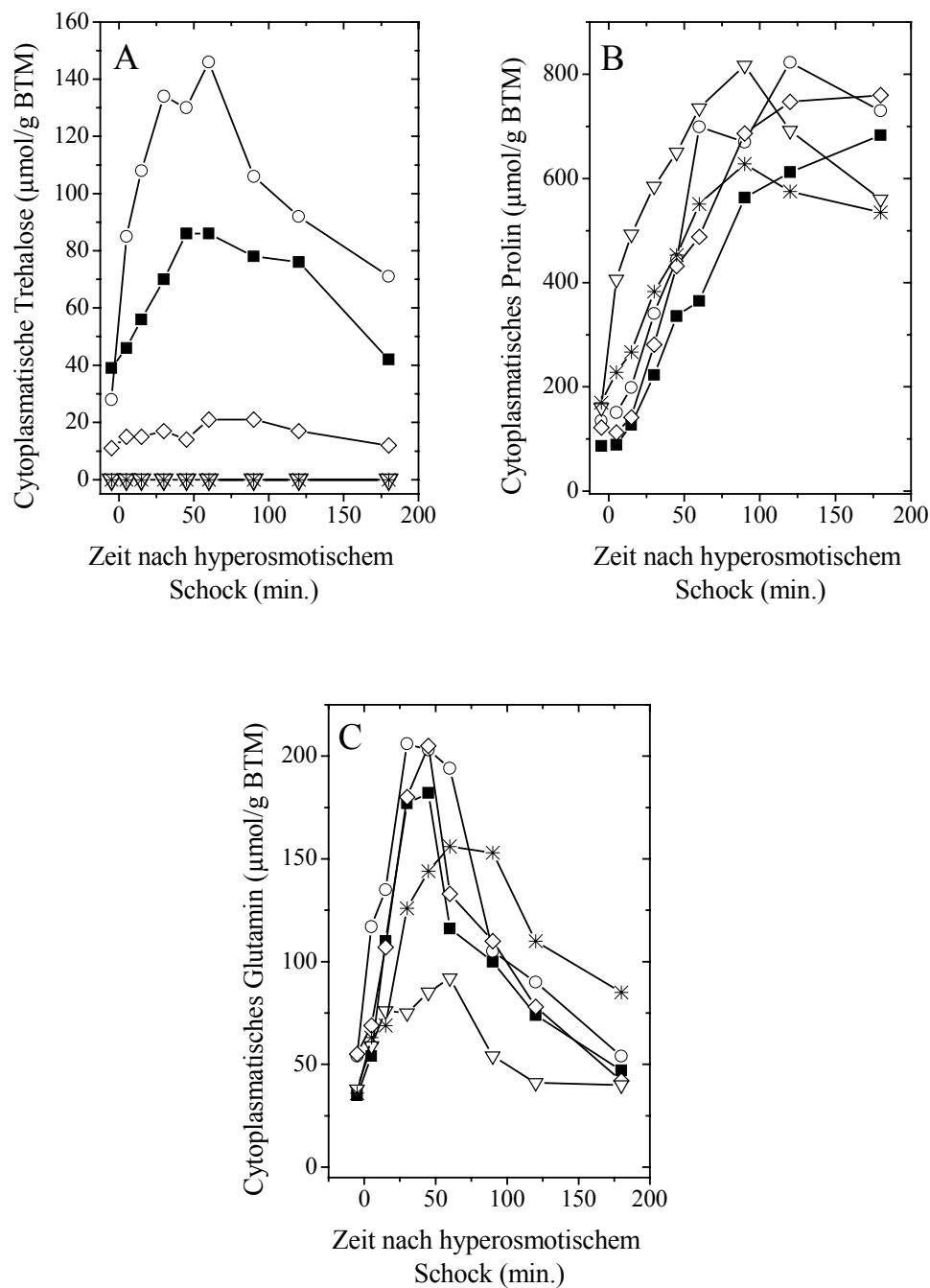
	Verdopplungszeit (h)		
	0,9 osM	2,4 osM	relativ (2,4 osM/0,9 osM)
ATCC13032	1,7	2,6	1,5
ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY	4,8	12,8	2,7
ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY	4,75	13,8	2,9

### 3.3.3 Bedeutung der verschiedenen Trehalosesynthesewege bei hyperosmotischem Schock

Wie in Abb. 11 gezeigt, konnte beim Wildtyp eine signifikante Zunahme des cytoplasmatischen Trehalosegehalts nach einem hyperosmotischen Schock festgestellt werden. Um zu untersuchen, ob dies auf der Aktivität eines bestimmten Synthesewegs beruhte, wurden Stämme, die nur noch einen Trehalosesyntheseweg besaßen, hyperosmotischem Schock unterzogen und die Synthese von Trehalose und anderen kompatiblen Soluten untersucht.

Abb. 18 zeigt, dass für die Synthese von Trehalose nach hyperosmotischem Schock wie im Falle konstant hoher Osmolalität bereits allein die Aktivität des TreYZ-Weges ausreichte. ATCC13032 $\Delta$ *otsA* $\Delta$ *treS*-Zellen synthetisierten sogar erheblich mehr Trehalose als Wildtypzellen, was andeutet, dass sich hier mehrere Effekte überlagerten (vgl. Abb. 19A, 21, 27, s. 3.3.5). Auch der OtsAB-Weg (ATCC13032 $\Delta$ *treY* $\Delta$ *treS*) reagierte auf den hyperosmotischen Schock mit einer Steigerung der Syntheseaktivität. Allerdings lagen die hergestellten Mengen in ATCC13032 $\Delta$ *treY* $\Delta$ *treS*-Zellen mit maximal 20  $\mu$ mol/g BTM um ein Fünffaches unter denen des Wildtyps und um ein Siebenfaches unter denen von ATCC13032 $\Delta$ *otsA* $\Delta$ *treS*-Zellen. Im Cytoplasma von ATCC13032 $\Delta$ *otsA* $\Delta$ *treY*- und ATCC13032 $\Delta$ *otsA* $\Delta$ *treS* $\Delta$ *treY*-Zellen konnte auch nach hyperosmotischem Schock keine Trehalose nachgewiesen werden, d.h. der TreS-Weg besaß auch unter diesen Bedingungen keine Syntheseaktivität. Bezüglich der Anreicherung von Prolin konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen einzelnen Stämmen festgestellt werden (Abb. 18B). Es fiel lediglich auf, dass die Anreicherung bei ATCC13032 $\Delta$ *otsA* $\Delta$ *treY* wesentlich schneller verlief als bei den anderen Stämmen. Möglicherweise versuchten die Zellen dadurch den Wegfall von Trehalose, d.h. von einem kompatiblen Solut der frühen Phase der Schockantwort, zu kompensieren. Allerdings konnte bei ATCC13032 $\Delta$ *otsA* $\Delta$ *treS* $\Delta$ *treY*, dem ebenfalls Trehalose fehlte, keine beschleunigte Prolinsynthese beobachtet werden. Bei ATCC13032 $\Delta$ *otsA* $\Delta$ *treY* und ATCC13032 $\Delta$ *otsA* $\Delta$ *treS* $\Delta$ *treY* sanken die Prolinkonzentrationen im Gegensatz zu allen anderen Stämmen nach etwa neunzig Minuten wieder ab. Beide Stämme zeigten auch eine schwächere Glutaminantwort als der Wildtyp und die anderen Stämme (Abb. 18C).

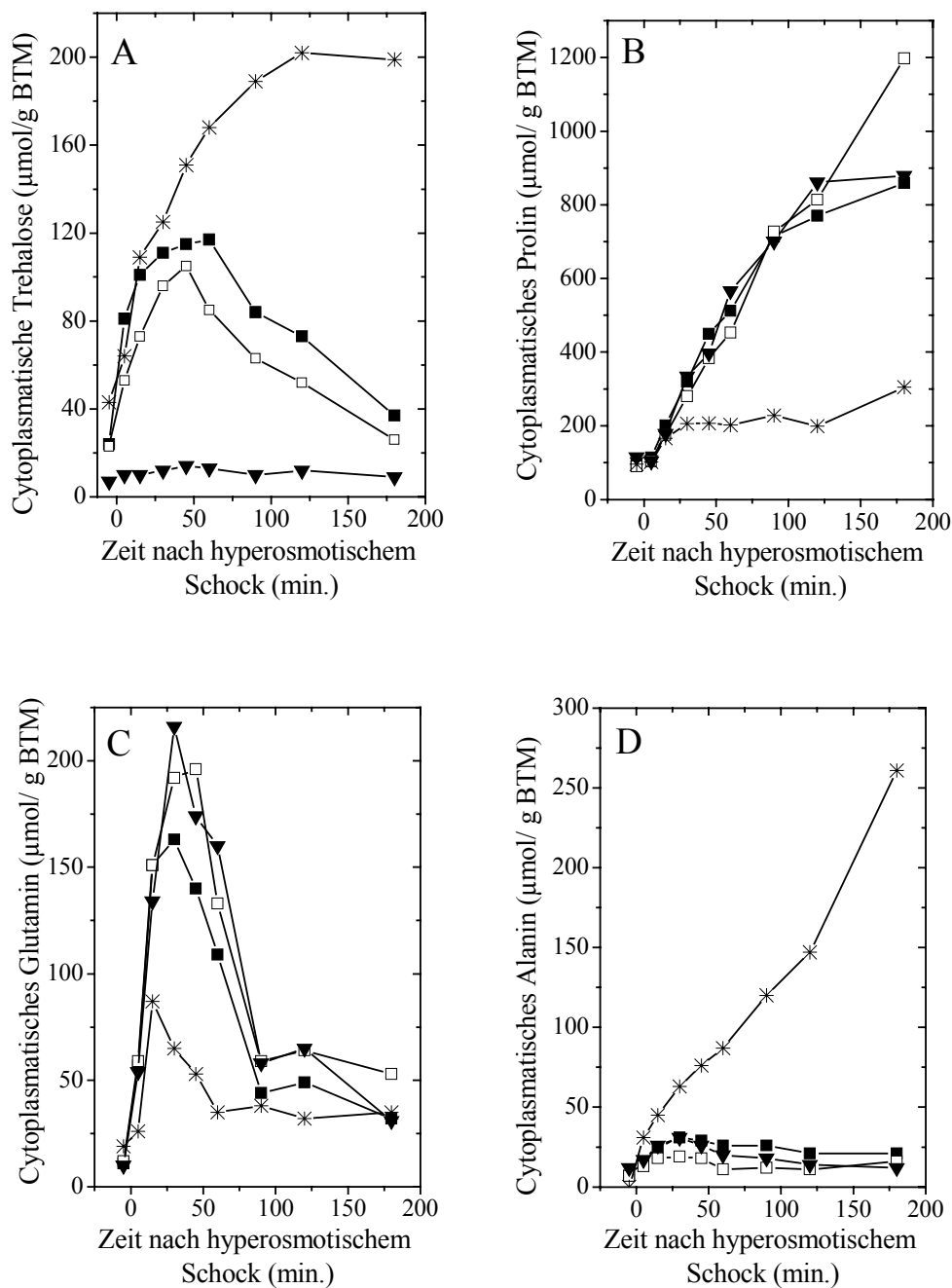




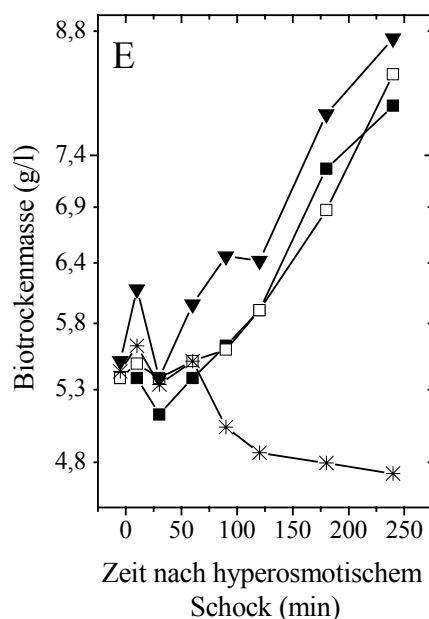
**Abb. 18:** Cytoplasmatische Anreicherung von Trehalose (**A**), Prolin (**B**) und Glutamin (**C**) nach hyperosmotischem Schock von 0,9 osM auf 2,4 osM bei *C. glutamicum*-Stämmen mit nur noch einem (Doppeldelentionsstämme) bzw. gar keinem funktionalen Trehalosesyntheseweg (Dreifachdelentionsstamm). ■ ATCC13032, ○ ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treS, ◇ ATCC13032 $\Delta$ treY $\Delta$ treS, ▽ ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY; \* ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY.

Um zu überprüfen, ob der TreYZ-Weg tatsächlich hinreichend für Osmoschock-induzierte Trehalosesynthese ist, wurden Stämme, denen nur ein Trehalosesyntheseweg fehlte, einem hyperosmotischen Schock ausgesetzt. Abb. 19 dokumentiert diese Experimente. Der Wegfall des TreYZ-Weges (ATCC13032 $\Delta$ *treY*) hatte das fast völlige Ausbleiben einer Trehaloseantwort zur Folge. Das Fehlen des OtsAB-Weges (ATCC13032 $\Delta$ *otsA*) führte dagegen lediglich zu einer leichten Verringerung der cytoplasmatischen Trehalosemenge. Die Resultate bestätigten also die in Abb. 18A dargestellten Ergebnisse. Anders als die völlige Abwesenheit von Trehalose hatte die starke Reduktion cytoplasmatischer Trehalose bei ATCC13032 $\Delta$ *treY* auf die Synthese anderer kompatibler Solute und die Wiederaufnahme des Kulturwachstums keine Auswirkungen (Abb. 19B,C,D,E). Trehalose scheint demnach unter diesen Bedingungen als kompatibles Solut für die Zelle ohne große Bedeutung zu sein.

Erstaunlicherweise synthetisierte ATCC13032 $\Delta$ *treS* wesentlich größere Mengen an Trehalose als die anderen Stämme. Während die Synthese unmittelbar nach dem Schock bei allen Stämmen (außer ATCC13032 $\Delta$ *treY*) einen ähnlichen Zeitverlauf zeigte, kam es bei ATCC13032 $\Delta$ *treS* jedoch nicht zu einer Stagnation der Trehalosesynthese und darauffolgendem Abbau des Zuckers, sondern die cytoplasmatische Trehalosemenge stieg noch weiter an und verblieb dann auf einem konstant hohen Niveau. Dies hatte deutliche Auswirkungen auf die Synthese von Prolin (Abb. 19B) und Glutamin (Abb. 19C), die bei ATCC13032 $\Delta$ *treS* in weit geringeren Konzentrationen angereichert wurden als von Zellen der anderen Stämme. Im Gegensatz dazu wurde Alanin, das bei allen anderen Stämmen nur in geringen Mengen vorlag, in enormen Mengen hergestellt (Abb. 19D). Die Rolle von Alanin als kompatibles Solut ist allerdings fraglich. Während das Kulturwachstum bei allen Stämmen etwa nach einer Stunde wieder einsetzte, konnte bei ATCC13032 $\Delta$ *treS* selbst vier Stunden nach dem hyperosmotischen Schock noch kein Biomassezuwachs festgestellt werden (Abb. 19E). Offensichtlich resultierte aus den beschriebenen Veränderungen eine erhöhte Osmosensitivität.



**Abb. 19A-D:** Cytoplasmatische Anreicherung kompatibler Solute nach hyperosmotischem Schock von 0,9 osM auf 2,4 osM bei *C. glutamicum*-Stämmen mit einem defekten Trehalosesyntheseweg (Einfachdeletionsstämmen). **(A)** Trehalose; **(B)** Prolin; **(C)** Glutamin; **(D)** Alanin. ■ Wildtyp; ▼ ATCC13032 $\Delta treY$ ; □ ATCC13032 $\Delta otsA$ ; \* ATCC13032 $\Delta treS$ .



**Abb. 19E:** Wiederaufnahme des Kulturwachstums nach hyperosmotischem Schock von 0,9 osM auf 2,4 osM bei *C. glutamicum*-Stämmen mit einem defekten Trehalosesyntheseweg (Einfachdeletionsstämme). ■ Wildtyp; □ ATCC13032Δ*otsA*; ▼ ATCC13032Δ*treY*; \* ATCC13032Δ*treS*.

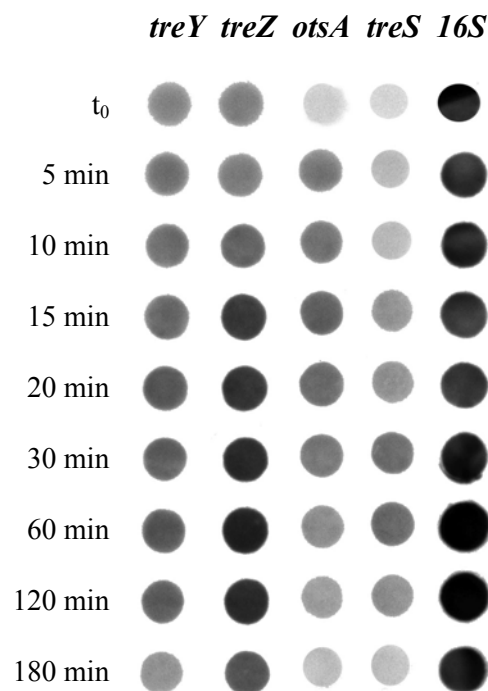
Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass die durch hyperosmotischen Schock induzierte Trehalosesynthese fast vollständig auf TreYZ-Aktivität basierte und der OtsAB-Weg, obwohl er ebenfalls aktiviert wurde, nur eine geringe Syntheseleistung erbrachte. Der TreS-Weg war zwar, wie auch bei konstanter Osmolalität, inaktiv in Bezug auf Trehalosesynthese nach hyperosmotischem Schock, der Wegfall von TreS führte jedoch zu einer starken Übersynthese von Trehalose und einem völlig veränderten Muster der Synthese anderer kompatibler Solute.

### 3.3.3.1 Regulation der verschiedenen Trehalosesynthesewege bei hyperosmotischem Schock durch Transkriptionskontrolle

Um zu untersuchen, ob der osmotisch regulierten TreYZ-vermittelten Trehalosesynthese eine Aktivierung auf Transkriptionsebene zugrunde lag, wurde die Veränderung der Transkription von *treY*, *treZ*, *otsA* und *treS* nach hyperosmotischem Schock durch RNA-

Hybridisierungsexperimente unter Verwendung Digoxigenin-markierter *antisense* RNA-Sonden untersucht.

Abb. 20 zeigt, dass es in der Folge eines hyperosmotischen Schocks zu einer leichten aber dennoch signifikanten Zunahme der Transkriptmengen von *treY* und *treZ* kam. Dies traf jedoch gleichermaßen auf *otsA* und *treS* zu, obwohl die jeweiligen Synthesewege nur wenig bzw. gar keine Trehalose zum cytoplasmatischen *pool* nach hyperosmotischem Schock beisteuerten (s. Abb. 18A/19A). Während die Transkription von *otsA* bereits fünf Minuten nach dem hyperosmotischen Schock deutlich gestiegen war, waren erhöhte Transkriptmengen der anderen Gene erst nach 15-30 min. nachzuweisen. Der Abbau des *otsA*-Transkripts erfolgte ebenfalls schneller. Das *treZ*-Transkript wies den geringsten Abbau auf und wurde offensichtlich auch in größeren Mengen als das *treY*-Transkript hergestellt.



**Abb. 20:** Veränderung der Transkription von *treY*, *treZ*, *otsA* und *treS* nach einem hyperosmotischem Schock von 0,9 osM auf 2,4 osM. Zur Kontrolle wurde 16S-rRNA nachgewiesen.

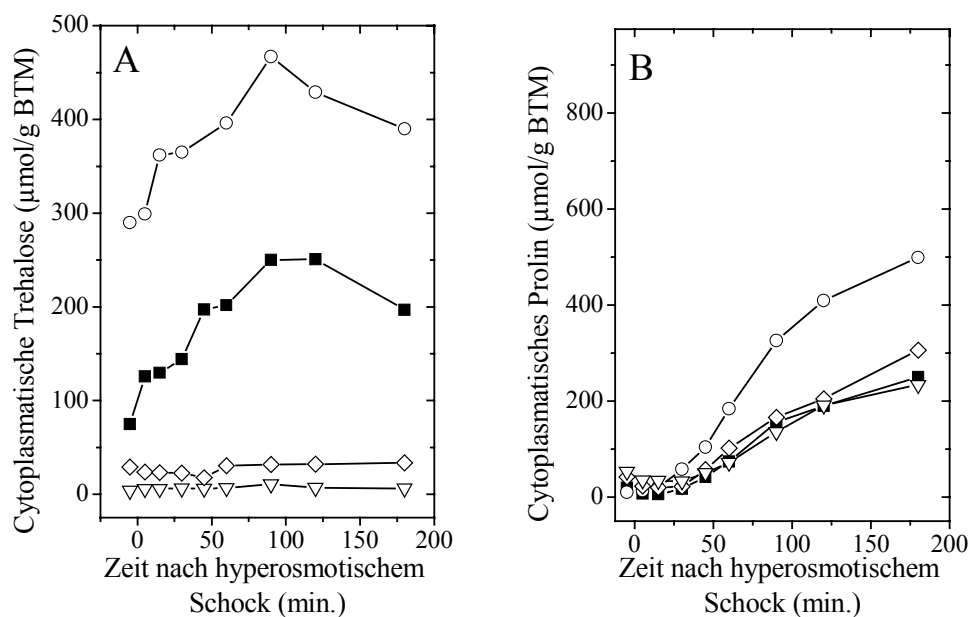
Da gezeigt werden konnte, dass die Synthese von Trehalose nach einem hyperosmotischen Schock stark zunahm, wenn die N-Quelle limitierend war bzw. völlig fehlte (Abb. 13), wurde

die Transkription von *treY*, *treZ*, *otsA* und *treS* nach einem hyperosmotischen Schock bei gleichzeitiger Limitation bzw. Abwesenheit einer N-Quelle untersucht (nicht gezeigt). Allerdings konnten weder bei N-Limitation noch in Abwesenheit einer N-Quelle signifikante quantitative Unterschiede zur Transkription dieser Gene unter N-sättigenden Bedingungen festgestellt werden. Es fiel lediglich auf, dass die Transkripte von *treY* und *treZ* bei Abwesenheit der N-Quelle nicht abgebaut wurden, was sich mit dem Verlauf der Synthese von Trehalose unter diesen Bedingungen deckte (Abb. 13A).

### **3.3.4 Aktivität der verschiedenen Trehalosesynthesewege in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle**

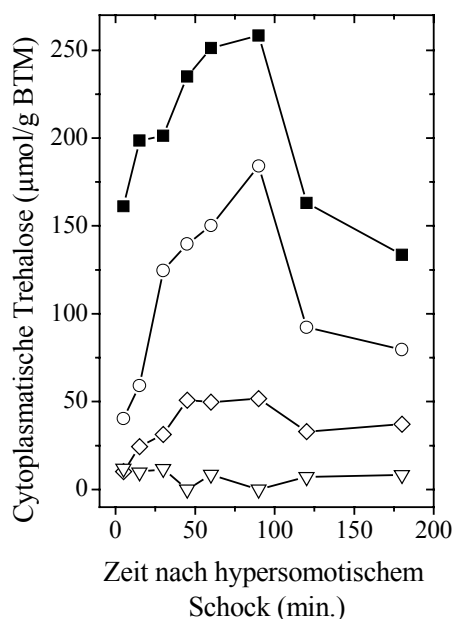
Es konnte nachgewiesen werden, dass die Synthese von Trehalose beim Wildtyp quantitativ wie auch in ihrem zeitlichen Verlauf von der Kohlenstoffquelle abhing (Abb. 14). Da diesem Phänomen die erhöhte Aktivität eines bestimmten Trehalose-Synthesewegs in Abhängigkeit einer bestimmten C-Quelle zugrunde liegen könnte, wurden Versuche durchgeführt, bei denen Stämme mit nur noch einem funktionalen Syntheseweg unter Verwendung verschiedener C-Quellen hyperosmotischem Schock ausgesetzt wurden.

Bei Verwendung von Maltose als C-Quelle (Abb. 21) reichte, wie im Falle von Saccharose (Abb. 18A), der TreYZ-Weg für eine Trehaloseanreicherung aus, die die beim Wildtyp gemessenen Mengen sogar weit übertraf. Allerdings war die Menge cytoplasmatischer Trehalose in ATCC13032 $\Delta$ *otsA* $\Delta$ *treS*-Zellen bereits vor dem Schock auf einem sehr hohen Niveau. In ATCC13032 $\Delta$ *treY* $\Delta$ *treS*-Zellen konnten abermals nur geringe Trehalosemengen nachgewiesen werden (ca. 30-40  $\mu$ mol/g BTM). Anders als bei Saccharose konnten bei Verwendung von Maltose als C-Quelle in ATCC13032 $\Delta$ *otsA* $\Delta$ *treY*-Zellen geringe Trehalosemengen festgestellt werden, die aus TreS-Aktivität resultieren mussten. Allerdings kam es zu keiner Osmoschock-abhängigen Anreicherung von Trehalose durch TreS in diesem Stamm, d.h. es lag keine osmotische Regulation vor, die sich auf die Trehalose-synthetisierende Aktivität von TreS auswirkte. Bei allen Stämmen war die Synthese von Prolin im Vergleich zu Saccharose als C-Quelle stark reduziert.



**Abb. 21:** Cytoplasmatische Anreicherung von Trehalose (A) und Prolin (B) nach einem hyperosmotischen Schock von 0,9 osM auf 2,4 osM bei Verwendung von Maltose als C-Quelle bei *C. glutamicum*-Stämmen mit nur noch einem funktionalen Trehalosesyntheseweg (Doppeldeletionsstämmen). ■ Wildtyp ATCC13032; ○ ATCC13032ΔotsAΔtreS; ◇ ATCC13032ΔtreYΔtreS; ▽ ATCC13032ΔotsAΔtreY.

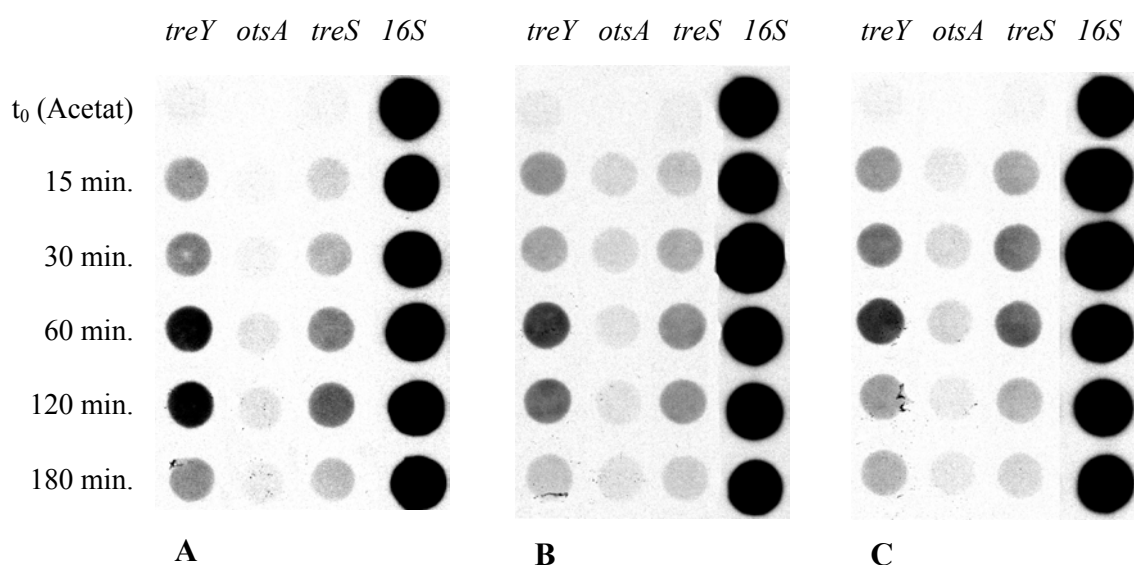
Wurde Glucose als C-Quelle eingesetzt, so konnten prinzipiell dieselben Beobachtungen gemacht werden wie bei Verwendung von Maltose (Abb. 22). Wieder resultierte der Hauptteil der cytoplasmatischen Trehalose aus dem TreYZ-Weg, obwohl die von ATCC13032ΔotsAΔtreS-Zellen erreichten Mengen unter diesen Bedingungen nicht an die des Wildtyps heranreichten. Der OtsAB-Weg wies dagegen eine höhere Aktivität auf als bei Maltose oder Saccharose, der Trehalosegehalt von ATCC13032ΔtreYΔtreS-Zellen überstieg 50 µmol/g BTM. Die Ursache hierfür könnte in einem verstärkten Fluss der C-Quelle in diesen Syntheseweg liegen, da nach PTS-vermittelter Aufnahme Glucose-6-Phosphat im Cytoplasma als direktes Substrat dieses Synthesewegs in großen Mengen bereitsteht (Dominguez & Lindley, 1996). Eine sehr geringe Menge Trehalose konnte in Abwesenheit der anderen Synthesewege auch bei Verwendung von Glucose auf TreS-Umsetzung zurückgeführt werden, jedoch stand diese Synthese in keiner Abhängigkeit von der Osmolalität.



**Abb. 22:** Cytoplasmatische Anreicherung von Trehalose nach einem hyperosmotischen Schock von 0,9 osM auf 2,4 osM bei Verwendung von Glucose als C-Quelle bei *C. glutamicum*-Stämmen mit nur noch einem funktionalen Trehalosesyntheseweg. ■ Wildtyp ATCC13032; ○ ATCC13032ΔotsAΔtreS; ◇ ATCC13032ΔtreYΔtreS; ▽ ATCC13032ΔotsAΔtreY.

Um zu untersuchen, ob die Transkription von Genen der verschiedenen Synthesewege in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle reguliert wird, wurde die Veränderung der Transkriptmengen von *otsA*, *treY* und *treS* mit Hilfe von *antisense* RNA-Sonden verfolgt, nachdem Zellen aus einer Kultur mit Acetat als C-Quelle in Kulturen mit Saccharose, Glucose oder Maltose überimpft wurden. Die Zellen aus der Acetat-Vorkultur wurden dazu sedimentiert und in Medium mit der neuen Kohlenstoffquelle aufgenommen. Die *dot blot*-Experimente sind in Abb. 23 dargestellt. In Analogie zur Reaktion auf einen hyperosmotischen Schock reagierten die Zellen auf den Wechsel unabhängig von der neuen Kohlenstoffquelle durch eine vorübergehende Verstärkung der Transkription aller untersuchten Gene. Ein spezifischer C-Quellen-abhängiger Effekt war also nicht vorhanden. In der Acetat-Vorkultur waren dagegen lediglich die Transkripte von *treY* und *treS* nachweisbar, dies allerdings nur sehr schwach (im Original besser zu erkennen).

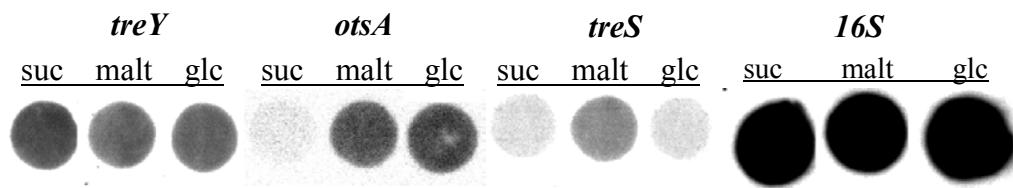




**Abb. 23:** Transkriptionsregulation der verschiedenen Trehalose-Synthesewege von *C. glutamicum* in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle. Wildtyp-Zellen wurden mit Acetat als C-Quelle angezogen und in frisches Medium mit den folgenden C-Quellen überimpft: (A) Saccharose; (B) Maltose; (C) Glucose (alle 4%). Zur Kontrolle wurde 16S-rRNA nachgewiesen.

Womöglich stellten die beobachteten Veränderungen tatsächlich eher eine kurzfristige Stressantwort als eine Anpassung an eine neue C-Quelle dar. Da es sich bei Trehalose um einen Stressmetaboliten mit breitem Wirkungsspektrum handelt, ist nicht auszuschließen, dass Trehalosesynthese eine pauschale Reaktion von *C. glutamicum* auf verschiedene Arten von Veränderungen ist.

Aufgrund der unerwarteten Ähnlichkeit des Musters der Transkription von *treY*, *otsA* und *treS* nach Wechsel der C-Quelle und nach hyperosmotischem Schock wurden in einem weiteren Experiment Zellen für Transkriptionsanalysen aus Kulturen verwendet, die bereits längere Zeit in demselben Medium gewachsen waren und die aus Vorkulturen mit identischer C-Quelle stammten. Abb. 24A/B zeigt, dass die Transkription von *treY* annähernd unbeeinflusst von der C-Quelle blieb, während *otsA* auf Saccharose offensichtlich nur schwach transkribiert wurde, jedoch deutliche Signale bei Wachstum der Zellen auf Maltose und Glucose lieferte. *TreS*-Transkription war bei Verwendung von Maltose, dem TreS-Substrat, etwas stärker als bei Glucose oder Saccharose.



**Abb. 24:** Transkriptionsregulation der verschiedenen Trehalose-Synthesewege von *C. glutamicum* in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle. Die Kulturen wurden mit den angegebenen C-Quellen angezogen und nach 3 std. Zellen zur Isolation von RNA entnommen. Bereits in den Vorkulturen wurden die selben C-Quellen eingesetzt. **suc:** Saccharose; **malt:** Maltose; **glc:** Glucose. Zur Kontrolle wurde 16S-rRNA nachgewiesen.

### 3.3.5 Eigenschaften der Stämme ATCC13032 $\Delta$ otsB und ATCC13032 $\Delta$ treZ

ATCC13032 $\Delta$ otsB und ATCC13032 $\Delta$ treZ unterschieden sich von den anderen Stämmen dadurch, dass ihnen die Aktivität für die zweite Umsetzung im jeweiligen Syntheseweg fehlte, d.h. die Anreicherung von Syntheseweg-Zwischenprodukten möglich war. Während sich ATCC13032 $\Delta$ treZ weder in seinen Wachstumseigenschaften noch in der Synthese von Trehalose oder Prolin von ATCC13032 $\Delta$ treY unterschied (nicht gezeigt), war ATCC13032 $\Delta$ otsB im Vergleich zu dem Wildtyp besonders bei hoher Osmolalität stark wachstumsinhibiert, was sich in einer sehr langen lag-Phase äußerte (Abb. 25). *OtsB* kodiert für die Trehalose-6-Phosphat-Phosphatase, die das Zwischenprodukt des Ots-Weges, Tre-6-P, weiter zu Trehalose umsetzt. Da der Wachstumsinhibition von ATCC13032 $\Delta$ otsB daher die Anhäufung von Tre-6-P zugrunde liegen könnte, ein Effekt, der bereits bei anderen Organismen beobachtet wurde (De Virgilio et al., 1993), wurde die cytoplasmatische Menge dieses Stoffwechselprodukts in unterschiedlichen Stämmen, die das  $\Delta$ otsB-Allel trugen, relativ zum Wildtyp und Stämmen, die das  $\Delta$ otsA-Allel trugen, bestimmt (Tab. 6).

Der Verlust von *otsB* führte zu einer drastischen Erhöhung der cytoplasmatischen Konzentration von Tre-6-P. Sowohl ATCC13032 $\Delta$ otsB- als auch ATCC13032 $\Delta$ otsB $\Delta$ treY-Zellen wiesen im Vergleich zum Wildtyp einen um zwei bis drei Größenordnungen höheren Tre-6-P-Gehalt auf. Dagegen konnte in Zellen, denen ein funktionales *otsA*-Gen fehlte, kein Tre-6-P mehr nachgewiesen werden. Die tatsächliche cytoplasmatische Tre-6-P-Konzentration lag beim Wildtyp vermutlich im ein- bis zweistellig mikromolaren Bereich und bei den  $\Delta$ otsB-Stämmen im ein- bis zweistellig millimolaren Bereich. Die geringen Mengen

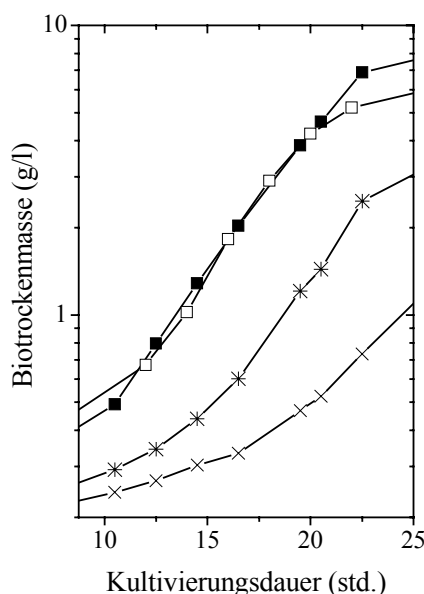
der Substanz in Wildtypzellen sind nicht verwunderlich, da Syntheseweg-Zwischenprodukte in der Regel kurzlebig sind und es daher zu keiner Anreicherung kommt. Die Anreicherung von Tre-6-P war bei den  $\Delta otsB$ -Stämmen in der stationären Phase größer als in der exponentiellen Phase, was auf einer höheren Aktivität des Ots-Synthesewegs in der stationären Phase oder dem Abfluss von Tre-6-P in die Zellwandsynthese (Shimakata & Minatogawa, 2000) während der exponentiellen Phase beruhen könnte.

**Tab. 6:** Cytoplasmatische Anhäufung von Tre-6-P durch den Verlust eines funktionalen *otsB*-Gens. Die Mengen sind relativ zum Wildtyp angegeben und basieren auf GC-MS Analysen. Die dafür verwendeten Zellen stammten aus MMI-Kulturen (0,9 osM (durch NaCl-Zusatz), 4% Saccharose). Nach dem Ernten wurden die Zellen in einem Volumen PBS gewaschen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Aufarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

	exponentielle Wachstumsphase		stationäre Wachstumsphase	
	Tre-6-P	Tre	Tre-6-P	Tre
Wildtyp	1	1	1	1
$\Delta otsB$	102	1,7	808	1,3
$\Delta otsB\Delta treY$	457	0,6	1224	0,6
$\Delta otsA$	-	0,9	-	0,6
$\Delta otsA\Delta treY$	-	-	-	-

Die Tatsache, dass ATCC13032 $\Delta otsB\Delta treY$ -Zellen größere Mengen an Tre-6-P anreicherten als ATCC13032 $\Delta otsB$ -Zellen, könnte daran liegen, dass der OtsAB-Syntheseweg aufgrund des Fehlens des TreYZ-Synthesewegs bzw. der dadurch bedingten Verringerung der cytoplasmatischen Trehalosekonzentration stärker aktiviert wurde. Die Abwesenheit von Tre-6-P in ATCC13032 $\Delta otsA$  und  $-\Delta otsA\Delta treY$  zeigt, dass OtsA offensichtlich die einzige Tre-6-P Synthase der Zelle ist. Die beträchtlichen Trehalosemengen in ATCC13032 $\Delta otsB\Delta treY$  im Vergleich zu ATCC13032 $\Delta otsA\Delta treY$  deuten dagegen darauf hin, dass es zu OtsB alternative Wege der Dephosphorylierung von Tre-6-P geben muss, die aber bislang nicht beschrieben sind.

Der Wachstumsinhibition von ATCC13032 $\Delta$ otsB könnte aufgrund der starken Tre-6-P-Anreicherung eine vorübergehende Deenergetisierung der Zellen durch Reduktion des zellulären Phosphat-, d.h. ATP-pools, zugrunde liegen. Daher wurde die Auswirkung einer erhöhten Kaliumphosphatkonzentration im Wachstumsmedium auf die Länge der lag-Phase bei ATCC13032 $\Delta$ otsB-Kulturen bei 2,4 osM untersucht. Die  $K_iPO_4$ -Konzentration des Basismediums lag bei 1 mM.



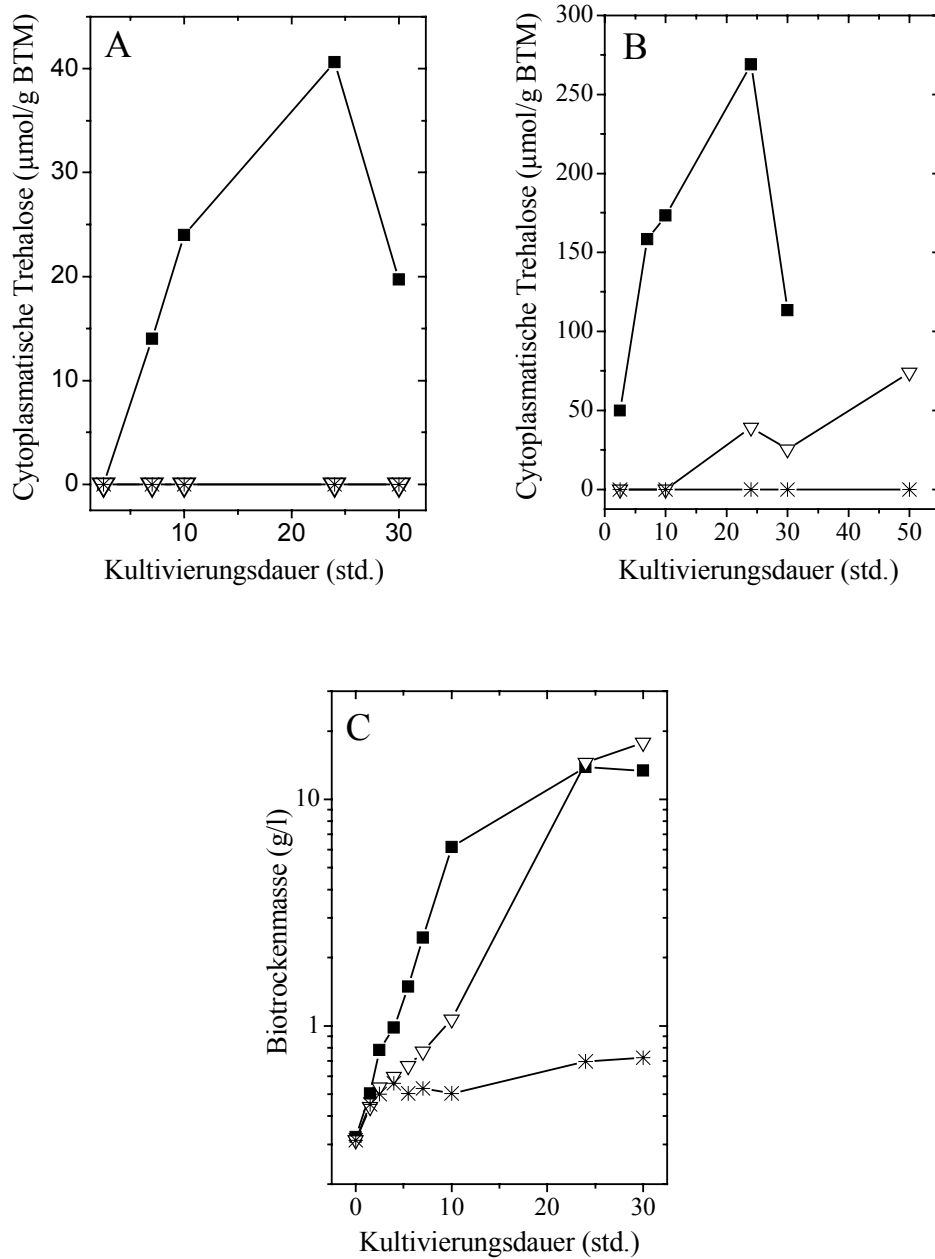
**Abb. 25:** Wachstum von ATCC13032 $\Delta$ otsB in Abhängigkeit von der Kaliumphosphatkonzentration des Wachstumsmediums (CgXII-Minimalmedium, 2,4 osM). ■ Wildtyp ATCC13032, 1 mM  $K_iPO_4$ ; □ Wildtyp, 10 mM  $K_iPO_4$ ; × ATCC13032 $\Delta$ otsB, 1 mM  $K_iPO_4$ ; \*ATCC13032 $\Delta$ otsB, 10 mM  $K_iPO_4$ .

Eine zehnfache Erhöhung der  $K_iPO_4$ -Konzentration im Vergleich zum Basismedium führte zu einer partiellen Regeneration des Wachstums von ATCC13032 $\Delta$ otsB-Zellen und zu einer deutlichen Verkürzung der lag-Phase (Abb. 25). Eine weitere Erhöhung der  $K_iPO_4$ -Konzentration auf 40 mM konnte diesen Effekt zwar abermals verstärken, jedoch führte dies auch beim Wildtyp zu einer leichten Beschleunigung des Kulturwachstums. Die Wachstumsinhibition von ATCC13032 $\Delta$ otsB bei hoher Osmolalität war folglich nur teilweise auf Phosphatlimitation zurückzuführen, da sie durch Erhöhung der Phosphatkonzentration im Medium nicht vollständig aufgehoben werden konnte.

### 3.3.6 Bedeutung des TreS-Synthesewegs

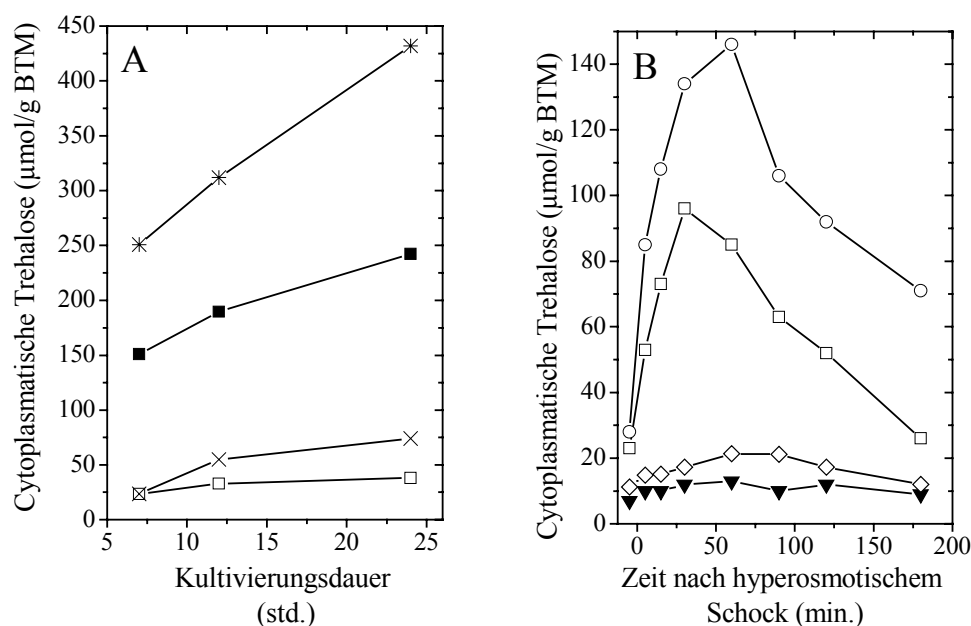
Da eine signifikante TreS-vermittelte Trehalosesynthese nur dann vorhanden war, wenn Maltose, das mutmaßliche TreS-Substrat, als C-Quelle verwendet wurde (Abb. 21A, vgl. Abb. 16A/17A/18A) und *treS* offensichtlich stärker transkribiert wurde, wenn Maltose als C-Quelle vorhanden war (Abb. 24), wurde die Abhängigkeit TreS-vermittelter Trehalosesynthese von Maltose genauer untersucht. Dazu wurden ATCC13032 $\Delta$ *otsA* $\Delta$ *treY*, ATCC13032 $\Delta$ *otsA* $\Delta$ *treS* $\Delta$ *treY* und Wildtypkulturen unter Verwendung von Maltose oder Saccharose als C-Quelle angezogen und der Verlauf der Trehalosesynthese über den Zeitraum der Anzuchten hinweg verfolgt.

Wie bereits früher gezeigt (Abb. 16A), konnte bei Verwendung von Saccharose als C-Quelle weder bei ATCC13032 $\Delta$ *otsA* $\Delta$ *treY* noch bei ATCC13032 $\Delta$ *otsA* $\Delta$ *treS* $\Delta$ *treY* cytoplasmatische Trehalose nachgewiesen werden (Abb. 26A). Wurde allerdings Maltose als C-Quelle zur Verfügung gestellt, so konnten in ATCC13032 $\Delta$ *otsA* $\Delta$ *treY*-Zellen signifikante Trehalosemengen nachgewiesen werden (ca. 20% des maximalen Trehalosegehalts des Wildtyps), nicht aber in ATCC13032 $\Delta$ *otsA* $\Delta$ *treS* $\Delta$ *treY*-Zellen (Abb. 26B). Die Synthese von Trehalose bei ATCC13032 $\Delta$ *otsA* $\Delta$ *treY* war also TreS-vermittelt. Während bei Verwendung von Saccharose als C-Quelle die Wachstumsinhibition bei beiden Stämmen gleich stark war (Abb. 16D/17C), wurde durch Verwendung von Maltose das Wachstum von ATCC13032 $\Delta$ *otsA* $\Delta$ *treY*, nicht aber von ATCC13032 $\Delta$ *otsA* $\Delta$ *treS* $\Delta$ *treY*, stimuliert (Abb. 26C). Allerdings wuchsen ATCC13032 $\Delta$ *otsA* $\Delta$ *treY*-Kulturen immer noch erheblich langsamer als der Wildtyp, was zeigt, dass entweder der Trehalosegehalt von ATCC13032 $\Delta$ *otsA* $\Delta$ *treY*-Zellen noch nicht ausreichte, um die Defekte völlig zu beheben, oder dass noch weitere Effekte in diesem Stamm vorlagen, die sich hemmend auf das Kulturwachstum auswirkten.



**Abb. 26:** TreS-vermittelte Trehalosesynthese in Abhängigkeit von der Anwesenheit von Maltose. Cytoplasmatische Trehalosemengen beim Wildtyp (■), ATCC13032ΔotsAΔtreY (▽) und ATCC13032ΔotsAΔtreSΔtreY (\*) bei Verwendung von Saccharose (A) oder Maltose (B) als C-Quelle. Wachstum der Kulturen auf Maltose (C).

Unter verschiedenen Bedingungen konnte festgestellt werden, dass die Deletion des *treS*-Gens zur einer starken Erhöhung der cytoplasmatischen Trehalosemenge führte (Abb. 18A/19A) und zwar selbst dann, wenn nur noch ein funktionaler Trehalosesyntheseweg vorhanden war. Ferner kam es bei ATCC13032 $\Delta$ *treS*-Kulturen nach hyperosmotischem Schock offensichtlich nicht zum Abbau des Disaccharids nach Durchschreiten eines Konzentrationsmaximums (Abb. 19A). Bei vergleichenden Anzuchten von ATCC13032 und ATCC13032 $\Delta$ *treS* wurden bei letzterem Stamm sowohl bei Verwendung von Saccharose als auch Maltose als C-Quelle zu allen Zeitpunkten der Anzucht etwa doppelt so hohe cytoplasmatische Trehalosemengen ermittelt wie beim Wildtyp (Abb. 27A). Doppeldeletionsstämme, denen *treS* fehlte, besaßen nach hyperosmotischem Schock stets größere cytoplasmatische Trehalosemengen als die jeweiligen Einzeldelentionsstämme, die *treS* noch besaßen (Abb. 27B).

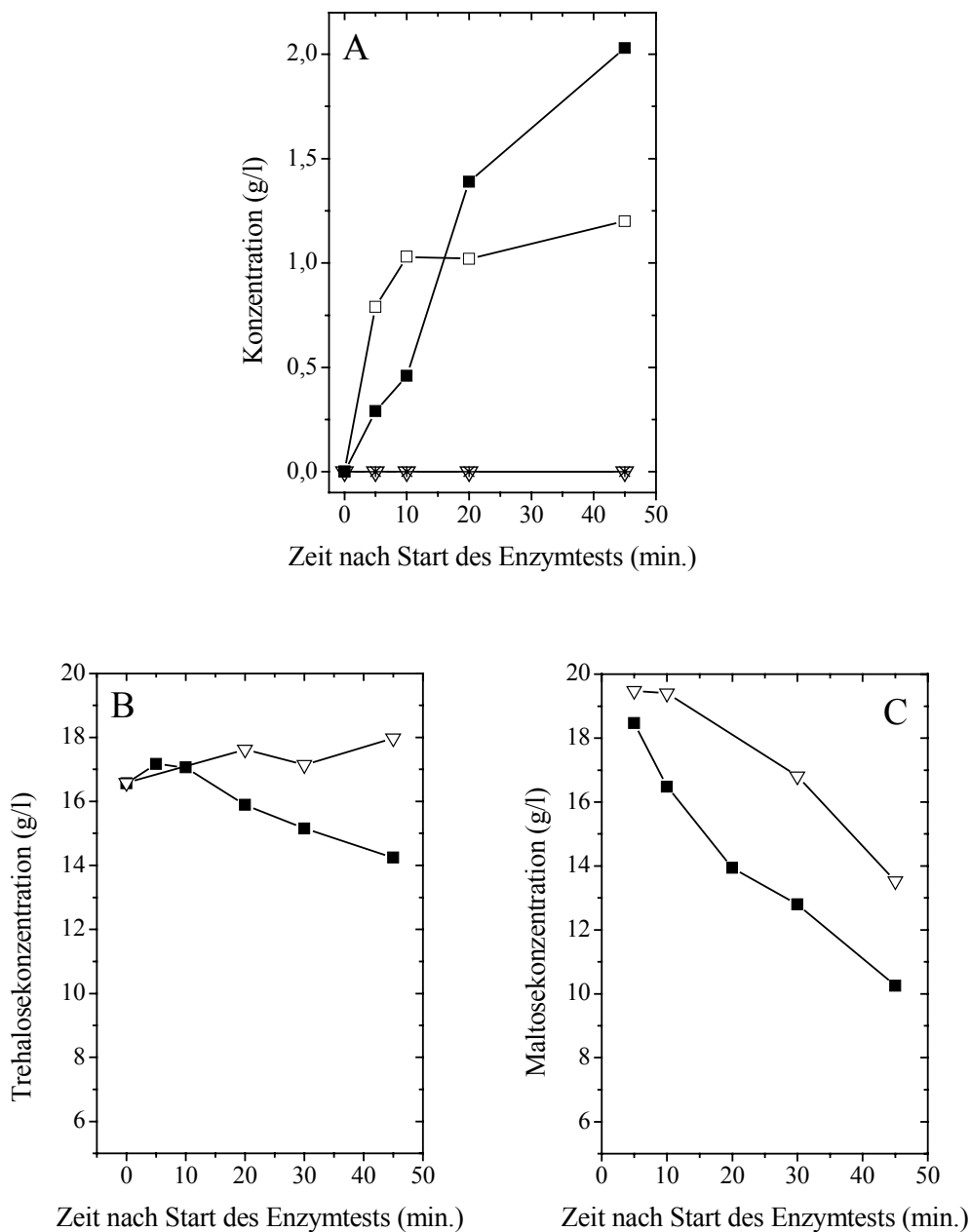


**Abb. 27:** Erhöhung cytoplasmatischer Trehalosemengen durch die Abwesenheit von TreS während Anzuchten bei unveränderter Osmolalität (0,9 osM) unter Verwendung von Maltose oder Saccharose als C-Quelle (A) und nach hyperosmotischem Schock von 0,9 osM auf 2,4 osM (B). Die in Abb. 27A dargestellten Anzuchten wurden ohne eine CgXII-Vorkultur durchgeführt. (A): □ Wildtyp, Saccharose; ■ Wildtyp, Maltose; × ATCC13032 $\Delta$ *treS*, Saccharose; \* ATCC13032 $\Delta$ *treS*, Maltose. (B): ◇ ATCC13032 $\Delta$ *treY $\Delta$ *treS*; ▼ ATCC13032 $\Delta$ *treY*; ○ ATCC13032 $\Delta$ *otsA $\Delta$ *treS*; □ ATCC13032 $\Delta$ *otsA*.**

Paradoxerweise schien also ein Zusammenhang zwischen TreS und dem Abbau von Trehalose zu bestehen. De Smet et al. (2000) konnten zeigen, dass TreS aus *Mycobacterium* *in vitro* sowohl die Umsetzung von Maltose zu Trehalose als auch von Trehalose zu Maltose katalysierte, die Umsetzung also reversibel war. Da im Genom von *C. glutamicum* bislang keine offenen Leserahmen mit Sequenzähnlichkeit zu bekannten Trehalasegenen gefunden werden konnten, lag die Vermutung nahe, dass TreS in *C. glutamicum* möglicherweise das Fehlen einer Trehalase kompensiert und *in vivo* den Abbau und nicht die Synthese von Trehalose katalysiert. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde der Umsatz von Trehalose zu Maltose von Zell-Rohextrakten der Stämme ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY und ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY ermittelt. Dazu wurden die Extrakte mit 20 g/l des Substrats versetzt und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Starten der Reaktion die Konzentrationen beider Disaccharide gemessen. Abb. 28 dokumentiert die Ergebnisse dieser Enzymtests.

ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY-Extrakte setzten sowohl Maltose zu Trehalose als auch Trehalose zu Maltose um. Bei ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY-Extrakten konnte dagegen keine der beiden Umsetzungen nachgewiesen werden (Abb. 28A). Dies bedeutet, dass die Umsetzungen in TreS-abhängiger Weise abliefen und reversibel waren. Allerdings war, wie auch bei *Mycobacterium* beschrieben, bei gleichen Konzentrationen der Substrate unter den angewandten Bedingungen der Umsatz von Maltose zu Trehalose effektiver. Die Umsetzungen waren auch an dem Verbrauch der jeweiligen Substrate durch die Zellextrakte zu erkennen (Abb. 28B/C). Während ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY-Extrakte Trehalose gar nicht umsetzten, d.h. die Konzentration konstant blieb, nahm die Trehalosekonzentration im ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY-Ansatz um annähernd den Betrag ab, mit dem Maltose entstand (Abb. 28A/B). Dies zeigt, dass es im Cytoplasma von *C. glutamicum* neben TreS offensichtlich keine weitere Trehalose-abbauende Aktivität gibt, d.h. eine Trehalase scheint tatsächlich in *C. glutamicum* nicht zu existieren. Im Einklang damit konnte auch keine Glucoseentstehung im Verlaufe der Inkubation nachgewiesen werden. Auch der Maltoseverbrauch von ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY-Extrakten war höher als der von ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY-Extrakten (Abb. 28C). Wieder entsprach die Differenz grob dem Betrag der von ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY-Extrakten hergestellten Trehalose. Allerdings setzten Extrakte beider Stämme Maltose auch anderweitig um.





**Abb. 28:** (A): Umsetzung von Maltose zu Trehalose und umgekehrt durch Zell-Rohextrakte der Stämme ATCC13032ΔotsAΔtreY (■ Maltose zu Trehalose, □ Trehalose zu Maltose) und ATCC13032ΔotsAΔtreSΔtreY (▽ Maltose zu Trehalose, \* Trehalose zu Maltose). (B): Trehaloseverbrauch bei der Umsetzung von Trehalose zu Maltose von Zell-Rohextrakten der Stämme ATCC13032ΔotsAΔtreY (■) und ATCC13032ΔotsAΔtreSΔtreY (▽) während des Enzymtests. (C): Maltoseverbrauch bei der Umsetzung von Maltose zu Trehalose von Zell-Rohextrakten der Stämme ATCC13032ΔotsAΔtreY (■) und ATCC13032ΔotsAΔtreSΔtreY (▽) während der Enzymtests.

Die dokumentierten Experimente wurden auch mit Extrakten von Wildtyp- und ATCC13032 $\Delta$ *treS*-Zellen durchgeführt (nicht gezeigt). Diese Stämme unterschieden sich ebenfalls nur in der An- bzw. Abwesenheit eines funktionalen *treS*-Gens. Auch hier konnte beobachtet werden, dass die Umsetzungen in einer TreS-abhängigen Weise abliefen, d.h. sie waren beim Wildtyp nachzuweisen, nicht aber bei ATCC13032 $\Delta$ *treS*. Da beide Stämme jedoch über einen Trehalosepool verfügten, war bereits zum Zeitpunkt Null in beiden Extrakten Trehalose vorhanden. Bei Inkubation mit Maltose nahm diese Konzentration im Verlaufe des Enzymtests beim Wildtyp weiter zu. Bei ATCC13032 $\Delta$ *treS* blieb sie hingegen konstant, d.h. es fand keine weitere Synthese statt. Alle Experimente wurden auch bei zehnfach geringerer Konzentration der Substrate durchgeführt. Die dokumentierten Ergebnisse konnten dadurch qualitativ bestätigt werden.

Bei der TreS-Umsetzung handelte es sich also offensichtlich um eine sich nahe am Gleichgewichtszustand befindende Reaktion. Da die Richtung solcher Umsetzungen von dem Konzentrationsverhältnis von Edukt und Produkt abhängt, wurde das Verhältnis der cytoplasmatischen Maltose und Trehalosemengen in Wildtypzellen in der exponentiellen sowie in der stationären Phase von Kulturen durch GC-MS-Messungen bestimmt. Als Kohlenstoffquelle bei den Bakterienanzuchten diente Saccharose.

**Tab. 7:** Verhältnis cytoplasmatischer Trehalose- zu Maltosemengen bei *C. glutamicum* ATCC13032 in der exponentiellen und stationären Wachstumsphase. Die für die Analysen verwendeten Zellen stammten aus MMI-Kulturen (4% Saccharose).

Verhältnis Trehalose/Maltose ( $\times 10^3$ )	
exponentiell	$1,35 \pm 0,31$
stationär	$4 \pm 0,48$

Die ermittelten Konzentrationsverhältnisse (Tab. 7) zeigten, dass Maltose unabhängig von der Wachstumsphase in mindestens 1000fach geringerer Konzentration in der Zelle vorlag als Trehalose. Die tatsächlichen cytoplasmatischen Maltosekonzentrationen lagen folglich im ein- bis zweistellig mikromolaren Bereich. In der stationären Phase war aufgrund der höheren

Trehalosekonzentrationen das Verhältnis von Trehalose zu Maltose höher als in der exponentiellen Wachstumsphase. Wegen des großen Konzentrationsunterschiedes zwischen Trehalose und Maltose ist davon auszugehen, dass *in vivo* TreS tatsächlich den Umbau von Trehalose zu Maltose katalysiert und nicht umgekehrt.

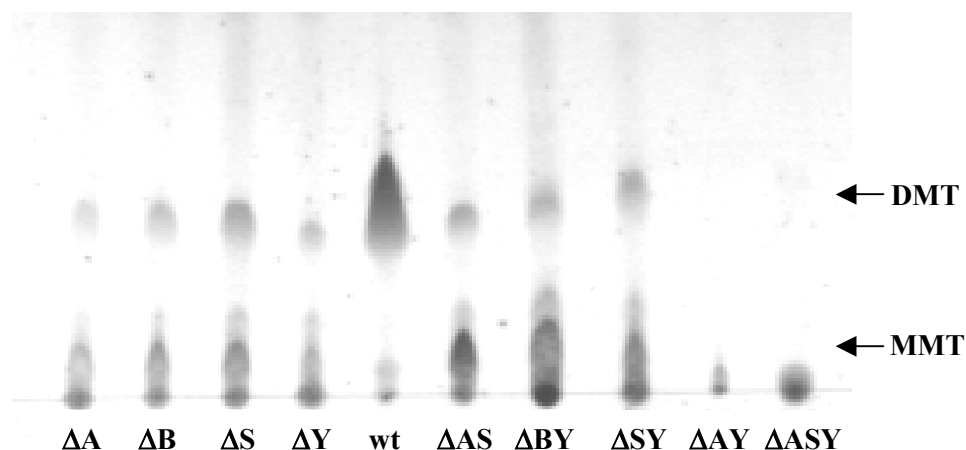
### 3.4 Bedeutung von Trehalose im Mycolsäurestoffwechsel von *C. glutamicum*

Während der Experimente mit ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY und ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY-Kulturen war aufgefallen, dass die Zellen offenbar stark veränderte physikalische Oberflächeneigenschaften besaßen. Die Oberflächen schienen hydrophober zu sein, was sich in einer starken Neigung zur Kohäsion äußerte. In Flüssigkultur kam es zur Bildung von Flocken, d.h. Zellaggregaten, die absanken und Klumpen bildeten, sobald die Kolben vom Rotationsschüttler entfernt wurden (s. Anhang Ergebnisteil, Abb. 38). Die Bildung von Zellaggregaten konnte auch unter dem Lichtmikroskop beobachtet werden. Die Zellen neigten außerdem dazu, an der Glasoberfläche der Kolben oberhalb des Flüssigkeitsspiegels haften zu bleiben, d.h. sie zeigten eine hohe Affinität zu Glas, auch ein Hinweis auf Hydrophobizität der Zelloberflächen. Durch die starke Zell-Zell-Adhäsion wurde auch das Aufnehmen von Zellsedimenten in Lösung erschwert. Zellsedimente dieser beiden Stämme bildeten zwei diskrete Phasen, eine gallertartige obere Phase, und darunter das eigentliche Zellsediment (s. Anhang Ergebnisteil, Abb. 39).

Ein Zusammenhang zwischen Trehalosesynthese und der Zelloberfläche von Corynebakterien besteht in der Anwesenheit von Trehalose in bestimmten Zellwandlipiden, den Mycolyltrehalosen und in der mutmaßlichen Rolle von Trehalose als Synthesewegkomponente von Mycolsäuren (Shimakata & Minatogawa, 2000). Die Autoren demonstrierten *in vitro* die Notwendigkeit von Tre-6-P für die Umsetzung von Corynomycolat zu Monomycolyl- und Dimycolyltrehalose sowie Zellwandmycolat. Da Tre-6-P das Zwischenprodukt des OtsAB-Weges ist und neben OtsA keine weiteren Tre-6-P-synthetisierenden Aktivitäten in *Corynebacterium* beschrieben sind, müsste daher die Anwesenheit von Mycolyltrehalosen und Zellwandmycolat allein von OtsA abhängen. Anders als ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY und ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY unterschied sich ATCC13032 $\Delta$ otsA jedoch kaum in seinen Oberflächeneigenschaften von den anderen

Stämmen. Lediglich in BHI-Komplexmedium konnte ebenfalls Flockenbildung beobachtet werden.

Um den Einfluss von Trehalose und Tre-6-P auf die Synthese von Mycolsäuren zu untersuchen, wurden MMT und DMT sowie Zellwandmycolat aus verschiedenen *C. glutamicum*-Stämmen isoliert und quantifiziert. MMT und DMT wurden, da sie nicht kovalent an die Zellwand gebunden sind, durch Lipidextraktion erhalten. Zur Freisetzung von Zellwandmycolat wurden Zellen, nachdem der extrahierbare Lipidanteil entfernt wurde, verseift, um die Esterbindungen zwischen Mycolsäuren und Arabinoseresten der Arabinogalactanschicht zu lösen. Die qualitative Analyse der Lipide erfolgte durch Dünnschichtchromatographie, die quantitative Analyse mittels GC-MS. Zusätzlich wurde in denselben Stämmen Tre-6-P durch GC-MS nachgewiesen, um den Einfluss der Substanz auf die Mycolsäuresynthese zu untersuchen.

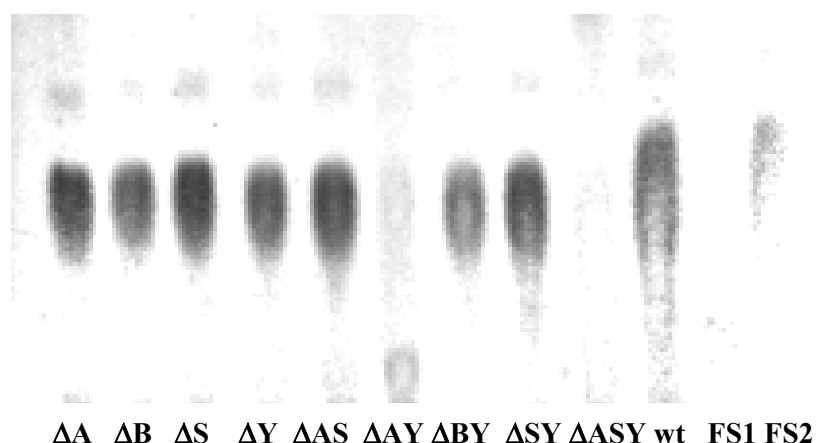


**Abb. 29:** Qualitativer Nachweis von MMT und DMT in Lipidextrakten verschiedener *C. glutamicum*-Stämme durch Dünnschichtchromatographie. Die Analysen wurden durch M. Tropis in der AG Daffé (CNRS, Université Paul Sabatier, Toulouse, Frankreich) durchgeführt.  $\Delta A$ : ATCC13032 $\Delta$ otsA;  $\Delta B$ :  $-\Delta$ otsB;  $\Delta S$ :  $-\Delta$ treS;  $\Delta Y$ :  $-\Delta$ treY;  $\Delta AS$ :  $-\Delta$ otsA $\Delta$ treS;  $\Delta BY$ :  $-\Delta$ otsB $\Delta$ treY;  $\Delta SY$ :  $-\Delta$ treS $\Delta$ treY;  $\Delta AY$ :  $-\Delta$ otsA $\Delta$ treY;  $\Delta ASY$ :  $-\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY; wt: Wildtyp ATCC13032.

In Abb. 29 ist die Auftrennung von Mycolyltrehalosen in einem Dünnschichtchromatogramm gezeigt. Es ist deutlich erkennbar, dass abgesehen von ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY und

ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY alle Stämme sowohl über Monomycolyltrehalose als auch über Dimycolyltrehalose verfügten. Demnach konnte die Synthese dieser Substanzen nicht allein von der Aktivität von OtsA abhängen. Aufgrund der geringen Laufstrecke von MMT war zwar nicht auszuschließen, dass auch in diesen beiden Stämmen noch geringe Mengen MMT vorhanden waren. Die Quantifizierung der verschiedenen Mycolate per GC-MS (Tab. 8) und unabhängige Bestimmungen (von Elstermann, 2002) zeigten jedoch, dass dies nicht der Fall war.

Der qualitative Nachweis von Zellwandmycolat in den verschiedenen Stämmen ist in Abb. 30 dargestellt. Auch Zellwandmycolat konnte in allen Stämmen außer ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY und ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY nachgewiesen werden.



**Abb. 30:** Qualitativer Nachweis von Zellwandmycolat in verschiedenen *C. glutamicum*-Stämmen durch Dünnschichtchromatographie. Die Mycolsäuren wurden durch Verseifung von Zellen gewonnen, die kein extrahierbares Lipid mehr besaßen und in ihre Methylester überführt. Die Analysen wurden durch M. Tropis in der AG Daffé (CNRS Université Paul Sabatier, Toulouse, Frankreich) durchgeführt.  $\Delta$ A: ATCC13032 $\Delta$ otsA;  $\Delta$ B:  $-\Delta$ otsB;  $\Delta$ S:  $-\Delta$ treS;  $\Delta$ Y:  $-\Delta$ treY;  $\Delta$ AS:  $-\Delta$ otsA $\Delta$ treS;  $\Delta$ BY:  $-\Delta$ otsB $\Delta$ treY;  $\Delta$ SY:  $-\Delta$ treS $\Delta$ treY;  $\Delta$ AY:  $-\Delta$ otsA $\Delta$ treY;  $\Delta$ ASY:  $-\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY; **wt**: Wildtyp ATCC13032; **FS1**: Fettsäurestandard; **FS2**: Fettsäurestandard mit Corynomycolat.

Tab. 8 zeigt das Ergebnis der quantitativen Analyse von extrahierbarem Mycolat (Mycolyltrehalosen) und Zellwandmycolat. ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY und ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY beinhalten weder trehaloseveresterte, freie Mycolate

(MMT/DMT) noch zellwandgebundene Mycolate, waren also mycolsäurefrei. Interessanterweise konnten aus ATCC13032 $\Delta$ *otsA $\Delta$ *treY*-Zellen jedoch, wenn diese auf Maltose als C-Quelle gewachsen waren, Mycolate in Mengen isoliert werden, die dem Wildtyp entsprachen. Allerdings handelte es sich bei dem Mycolat aus extrahierbarem Lipid nicht um Mycolyltrehalose, sondern vermutlich um Mycolylmaltose (M. Tropis, persönliche Mitteilung), ein bislang noch nicht beschriebenes Mycolat. Die genaue Struktur dieses Glycolipids wird zur Zeit in der AG Daffé durch NMR aufgeklärt.*

**Tab. 8:** Anteil (w/w) extrahierbaren Mycolats am Gesamtlipidextrakt bzw. zellwandgebundenen Mycolats an Zellen, die kein extrahierbares Lipid mehr besaßen bei verschiedenen *C. glutamicum*-Stämmen. Die Analysen wurden durch M. Tropis in der AG Daffé (CNRS Universität Paul Sabatier, Toulouse, Frankreich) durchgeführt.

Stamm (ATCC13032-)	Anteil extrahierbarer Corynomycolate am Lipidextrakt (% w/w)	Anteil zellwandgebundener Corynomycolate an lipidextrahierten Zellen (% w/w)
Wildtyp	21	1,7
<i>ΔotsA</i>	9	2,5
<i>ΔotsB</i>	9	2,3
<i>ΔtreY</i>	10	1,4
<i>ΔtreS</i>	30	2,2
<i>ΔotsAΔtreS</i>	39	1,5
<i>ΔtreYΔtreS</i>	19	2,3
<i>ΔotsBΔtreY</i>	21	2,3
<i>ΔotsAΔtreY</i>	0	0,0
<i>ΔotsAΔtreY</i> Maltose	20	1,9
<i>ΔotsAΔtreSΔtreY</i>	1	0,0

Signifikant weniger MMT und DMT war in Zellen der Stämme ATCC13032 $\Delta$ *otsA*, - $\Delta$ *otsB* und - $\Delta$ *treY* nachzuweisen. ATCC13032 $\Delta$ *otsA $\Delta$ *treS* und ATCC13032 $\Delta$ *treS* beinhalteten dagegen höhere Mengen der freien Mycolate als der Wildtyp. Dies schien mit der Erhöhung des cytoplasmatischen Trehalosegehalts durch das Fehlen von TreS zusammenzuhängen, da*

auch Doppeldeletionsstämmen, die zusätzlich das  $\Delta treS$ -Allel trugen, stets mehr Mycolyltrehalosen besaßen als die entsprechenden Einzeldelusionsstämmen, die noch über ein funktionales *treS*-Gen verfügten (vgl. ATCC13032 $\Delta otsA\Delta treS$  und ATCC13032 $\Delta otsA$ ; ATCC13032 $\Delta treY\Delta treS$  und ATCC13032 $\Delta treY$ , Tab. 8). Mit Ausnahme der Stämme ATCC13032 $\Delta otsA\Delta treY$  und ATCC13032 $\Delta otsA\Delta treS\Delta treY$  konnten keine signifikanten Unterschiede in den Mengen bei den verschiedenen Stämmen isolierten Zellwandmycolats festgestellt werden.

### 3.4.1 Mechanismus der Mycolsäuresynthese

Die Tatsache, dass ATCC13032 $\Delta otsA$ -Zellen sowohl Mycolyltrehalosen als auch Zellwandmycolat besaßen und dass ATCC13032 $\Delta otsB$  über die gleichen Mengen dieser Substanzen verfügte wie ATCC13032 $\Delta otsA$ , warf die Frage nach der Bedeutung von Tre-6-P im Mycolatsyntheseweg auf. Die starke Anreicherung von Tre-6-P bei Verlust von OtsB wurde bereits in Tab. 6 dokumentiert. Wenn, wie von Shimakata & Minatogawa (2000) behauptet, das Zuckerphosphat also für die Synthese von MMT, DMT und Zellwandmycolat notwendig und OtsA die einzige Tre-6-P-Syntheseaktivität von *C. glutamicum* wäre, so dürfte ATCC13032 $\Delta otsA$  keine Mycolate mehr besitzen. Dies war allerdings nicht der Fall (s. Tab. 8). Der Mycolatgehalt von ATCC13032 $\Delta otsB$  sollte sich von dem des Wildtyp dagegen nicht unterscheiden oder müsste bei einer quantitativen Abhängigkeit der Mycolatbildung von Tre-6-P darüber liegen. Auch dies war nicht der Fall (s. Tab. 8). Um die Frage der Bedeutung von Tre-6-P für die Mycolatsynthese zu klären, wurde der Tre-6-P-Gehalt von Zellen verschiedener  $\Delta otsA$ - Stämme untersucht, die sich in ihrem Mycolatgehalt stark unterschieden. Tab. 9 gibt eine Übersicht über den cytoplasmatischen Tre-6-P Gehalt sowie die Anwesenheit von Mycolat und cytoplasmatischer Trehalose in verschiedenen *C. glutamicum*-Stämmen relativ zum Wildtyp.

**Tab. 9:** Korrelation von Tre-6-P-, Trehalose- und Mycolatgehalt. Dargestellt sind die cytoplasmatischen Tre-6-P-Mengen verschiedener *C. glutamicum*-Stämme in der exponentiellen (exp.) und der stationären (stat.) Phase relativ zum Wildtyp sowie die Anwesenheit von Trehalose und Mycolat. **T6P:** Tre-6-P. **Tre:** Trehalose. **N.d.:** Nicht detektierbar, Signale waren nicht mehr gegen das Basislinienrauschen abzugrenzen.

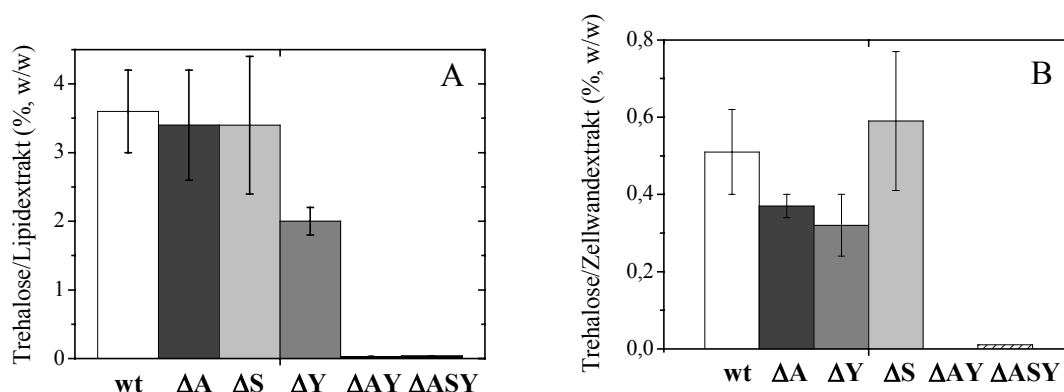
	Wildtyp	$\DeltaotsA$	$\DeltaotsA\Delta treY$	$\DeltaotsA\Delta treS$	$\Delta treY$	$\DeltaotsA\Delta treS$	$\Delta treY$	$\Delta treS$
T6P exp.	1	- (n.d.)	- (n.d.)	- (n.d.)	- (n.d.)	- (n.d.)	2,1	1,3
T6P stat.	1	- (n.d.)	- (n.d.)	- (n.d.)	- (n.d.)	- (n.d.)	1,3	0,9
Tre	ja	ja	nein	nein	ja	ja	ja	ja
Mycolat	ja	ja	nein	nein	ja	ja	ja	ja

An den Verlust eines funktionalen *otsA*-Gens war offensichtlich das Fehlen von cytoplasmatischem Tre-6-P gekoppelt. OtsA ist folglich die einzige Tre-6-P synthetisierende Aktivität von *C. glutamicum*. In keinem der dargestellten Stämme, die das  $\DeltaotsA$  Allel trugen, konnte Tre-6-P nachgewiesen werden. Signale bei der für diese Substanz charakteristischen Retentionszeit hoben sich bei diesen Stämmen vom Basislinienrauschen nicht mehr ab und zeigten auch kein diskretes Massenspektrum. Weil jedoch die Tre-6-P-Signale schon beim Wildtyp sehr gering waren, ist nicht auszuschließen, dass das Zuckerphosphat noch in sehr kleinen, 5% des Wildtyps unterschreitenden Mengen in den  $\DeltaotsA$ -Stämmen vorhanden war. Da jedoch trotz des Fehlens von cytoplasmatischem Tre-6-P sowohl ATCC13032 $\DeltaotsA$  als auch ATCC13032 $\DeltaotsA\Delta treS$ -Zellen über MMT, DMT und Zellwandmycolat verfügten und kein quantitativer Unterschied in dem Mycolatgehalt von ATCC13032 $\DeltaotsA$  und ATCC13032 $\DeltaotsB$ -Zellen bestand (s. Tab. 8), ist eine Rolle von Tre-6-P als essentielles Intermediat der Mycolatsynthese sehr unwahrscheinlich. Vielmehr scheint ein Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von Trehalose und der generellen Fähigkeit von Zellen, Mycolate herzustellen, vorzuliegen, denn einzig die trehalosefreien Stämmen ATCC13032 $\DeltaotsA\Delta treY$  und ATCC13032 $\DeltaotsA\Delta treS\Delta treY$  besaßen keinerlei Mycolsäuren. Ein *quantitativer* Zusammenhang schien darüber hinaus zwischen dem cytoplasmatischen Trehalosegehalt und der Synthese von Mycolyltrehalosen zu bestehen. So besaßen ATCC13032 $\Delta treY$ -Zellen, die einen reduzierten Trehalosepool aufwiesen (Abb. 22A), auch



geringere Mengen Mycolyltrehalosen (Tab. 8). Dagegen stellten Stämme, die aufgrund des Fehlens von TreS einen relativ zu ihrem nicht *treS*-defizienten Parentalstamm erhöhten Trehalosepool besaßen, auch größere Mengen Mycolyltrehalose her als der jeweilige Parentalstamm (ATCC13032 $\Delta$ *treS* relativ zum Wildtyp, ATCC13032 $\Delta$ *otsA $\Delta$ *treS* relativ zu ATCC13032 $\Delta$ *otsA*, ATCC13032 $\Delta$ *treY $\Delta$ *treS* relativ zu ATCC13032 $\Delta$ *treY*; vgl. auch Abb.18A, 19A und Tab. 8).**

In unabhängigen Experimenten konnten die Ergebnisse bezüglich des MMT-/DMT-Gehalts einiger Stämme qualitativ bestätigt werden (Abb. 31). Dazu wurden Lipide aus ganzen Zellen extrahiert bzw. Zellwände isoliert. Aus den Lipid- und Zellwandextrakten wurde durch Verseifung Trehalose freigesetzt. Diese Trehalose wurde als Maß für in den Zellwänden vorhandene, trehalosehaltige Mycolsäuren, d.h. nicht kovalent gebundenes MMT und DMT, gewertet, da in *Corynebacterium* keine weiteren trehalosehaltigen Lipide beschrieben sind.



**Abb. 31:** Indirekter Nachweis von MMT und DMT durch Freisetzung von Trehalose aus Lipidextrakten ganzer Zellen (A) und unbehandelten Zellwandextrakten (B) durch Verseifung. wt: Wildtyp;  $\Delta$ A: ATCC13032 $\Delta$ *otsA*;  $\Delta$ S: ATCC13032 $\Delta$ *treS*;  $\Delta$ Y: ATCC13032 $\Delta$ *treY*;  $\Delta$ AY: ATCC13032 $\Delta$ *otsA $\Delta$ *treY*;  $\Delta$ ASY: ATCC13032 $\Delta$ *otsA $\Delta$ *treS $\Delta$ *treY*.***

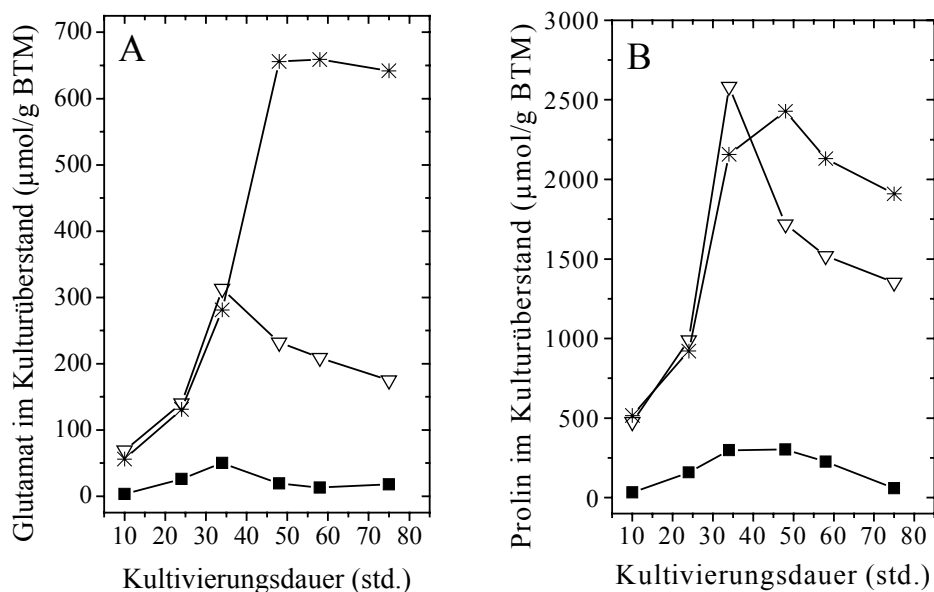
Abgesehen von ATCC13032 $\Delta$ *otsA $\Delta$ *treY* und ATCC13032 $\Delta$ *otsA $\Delta$ *treS $\Delta$ *treY* konnte aus Lipidextrakten bzw. Zellwandextrakten aller Stämme durch Verseifung Trehalose in signifikanten Mengen freigesetzt werden. Neben dem Rückschluss auf die Abwesenheit von Mycolyltrehalosen zeigten diese Ergebnisse ferner, dass diese beiden Stämme tatsächlich***

vollständig frei von Trehalose waren, d.h. neben freier, cytoplasmatischer Trehalose auch keine Lipid- bzw. zellwandgebundene Trehalose besaßen. Quantitativ konnten diese Ergebnisse allerdings nicht mit den Ergebnissen der AG Daffé verglichen werden, da ermittelte Größe und/oder Bezugsgröße der Bestimmungen verschieden waren. Bei Berücksichtigung des Gewichtanteils von Trehalose an MMT und DMT entsprachen jedoch die Mengen aus Lipidextrakten ganzer Zellen freigesetzter Trehalose in der Größenordnung dem berechneten Anteil von Mycolat im Lipidextrakt.

### **3.4.2 Auswirkungen des Fehlens von MMT, DMT und Zellwandmycolat**

#### **3.4.2.1 Auswirkungen auf die Exkretion von Aminosäuren**

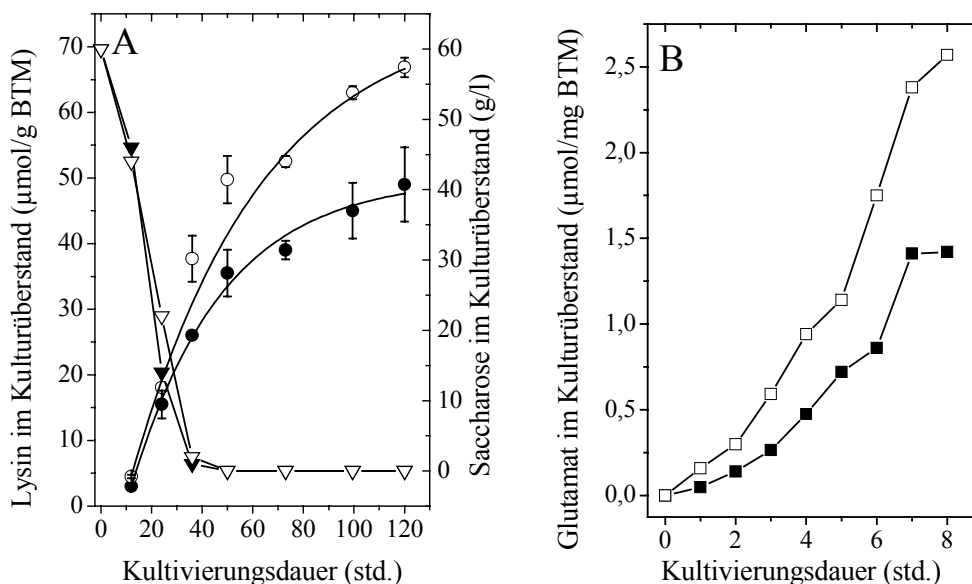
Neben den bereits beschriebenen Veränderungen der physikalischen Eigenschaften der Zelloberflächen und den Unterschieden bei der Anreicherung kompatibler Solute unter hyperosmotischen Bedingungen zeichneten sich die Stämme ATCC13032 $\Delta$ *otsA* $\Delta$ *treY* und ATCC13032 $\Delta$ *otsA* $\Delta$ *treS* $\Delta$ *treY* v.a. bei hoher Osmolalität durch eine im Vergleich zum Wildtyp stark erhöhte Exkretion von Glutamat und Prolin aus (Abb. 32). Diese Effekte waren bei ATCC13032 $\Delta$ *otsA* $\Delta$ *treS* $\Delta$ *treY* noch stärker ausgeprägt als bei ATCC13032 $\Delta$ *otsA* $\Delta$ *treY*. Während zum Ende einer Anzucht beim Wildtyp die ausgeschiedenen Aminosäuren aus dem Kulturüberstand wieder verschwanden, d.h. vermutlich von den Zellen aufgenommen und verstoffwechselt wurden, nahm die Glutamat- und Prolinkonzentration in den Kulturüberständen der beiden trehalosedefizienten Stämme nur wenig ab.



**Abb. 32:** Glutamat (**A**) und Prolin (**B**) in den Kulturüberständen von ATCC13032ΔotsAΔtreY, ATCC13032ΔotsAΔtreSΔtreY und dem Wildtyp während einer Anzucht unter hyperosmotischen Bedingungen. ■ Wildtyp; ▽ ATCC13032ΔotsAΔtreY; \* ATCC13032ΔotsAΔtreSΔtreY.

Der Verlust des *otsA*-Gens, der nicht mit einer Trehalosedefizienz einherging (Abb. 22/Tab. 9), hatte offensichtlich keinen Effekt auf die Bildung von Zellwandmycolat und führte lediglich zu einer Halbierung des Gehalts von Mycolyltrehalosen in ATCC13032ΔotsA (Tab. 8). Offensichtlich hatte aber schon diese Veränderung erhebliche Auswirkungen auf die Exkretion von Aminosäuren. Dies konnte anhand des *C. glutamicum*-Lysinproduktionsstammes MH20-22B gezeigt werden, der aufgrund einer Deregulation des Lysin synthesewegs enorme Mengen dieser Aminosäure ausscheidet. Abb. 33A zeigt, dass das Ausschalten von *otsA* in MH20-22B zu einer um etwa 25% gesteigerten Exkretion von Lysin im Verlaufe einer Anzucht führte. Einher ging dies mit einer Reduktion der Menge cytoplasmatischen Lysins um ca. 50% (nicht gezeigt). Da der neu konstruierte Stamm weder eine Beeinträchtigung des Bakterienwachstums noch einen höheren Verbrauch an C-Quelle aufwies (Abb. 33A), konnte durch das Ausschalten von *otsA* der bestehende Lysinproduktionsstamm verbessert werden. Glutamatexkretionstests zeigten, dass auch diese Aminosäure von MH20-22BΔotsA stärker exkretiert wurde als von MH20-22B (Abb. 33B). Folglich handelte es sich nicht um ein auf Lysin beschränktes Phänomen. Auch im Vergleich

zwischen ATCC13032 und ATCC13032 $\Delta$ otsA war stets ein höheres Maß an Glutamausscheidung bei ATCC13032 $\Delta$ otsA zu verzeichnen als beim Wildtyp (nicht gezeigt). Der Effekt war demnach auch nicht auf den Produktionsstamm MH20-22B beschränkt, sondern schien tatsächlich mit der Reduktion des Anteils von MMT und DMT in der Zellwand zusammenzuhängen. Puech et al. (2001) konnten zeigen, dass die nicht-kovalent an die Zellwand gebundenen Mycolyltrehalosen erhebliche zu der Bildung der Permeabilitätsbarriere in der Zellwand von *Corynebacterium* beitragen.



**Abb. 33:** Lysin (A) und Glutamat (B) in den Kulturüberständen von MH20-22B und MH20-22B $\Delta$ otsA. (A) ● Lysinproduktion MH20-22B; ○ Lysinproduktion MH20-22B $\Delta$ otsA; ▼ Saccharoseverbrauch MH20-22B; ▽ Saccharoseverbrauch MH20-22B $\Delta$ otsA. (B): ■ Glutamatproduktion MH20-22B; □ Glutamatproduktion MH20-22B $\Delta$ otsA.

### 3.4.2.2 Auswirkungen auf die Zellwandorganisation

Beim Sedimentieren von ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY- und ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY-Zellen fiel neben der bereits beschriebenen Ausbildung eines zweiphasigen Zellsediments auf, dass die erhaltenen Kulturüberstände noch trüb waren, d.h. noch erhebliche Mengen Materials einer geringeren Schwebedichte als Zellen enthielten (Anhang Ergebnisteil, Abb. 39). Da die Abwesenheit von MMT, DMT und Zellwandmycolat vermutlich die Ausbildung einer

Lipiddoppelschicht stark beeinträchtigt, wenn nicht sogar verhindert (wie offensichtlich bei dem mycolatfreien *C. amycolatum* der Fall, s. Puech et al., 2001), sollte es zu einem starken Verlust des Zusammenhalts der äußeren Zellhülle mit der restlichen Zellwand kommen. Daher lag die Vermutung nahe, dass ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY- und ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY-Zellen ihre äußere Zellhülle im Laufe einer Anzucht verlieren und es sich bei dem Material in den Kulturüberständen dieser Stämme um Komponenten dieses Teils der Zellwand handelte. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die chemische Natur dieses Materials im Vergleich zu Wildtyp-Kulturüberständen untersucht. Dazu wurde der Proteingehalt (Tab. 10, Abb. 34) und der Gehalt bestimmter Zucker, die das Polysaccharid der äußeren Zellhülle bilden (Puech et al., 2001), ermittelt (nicht gezeigt).

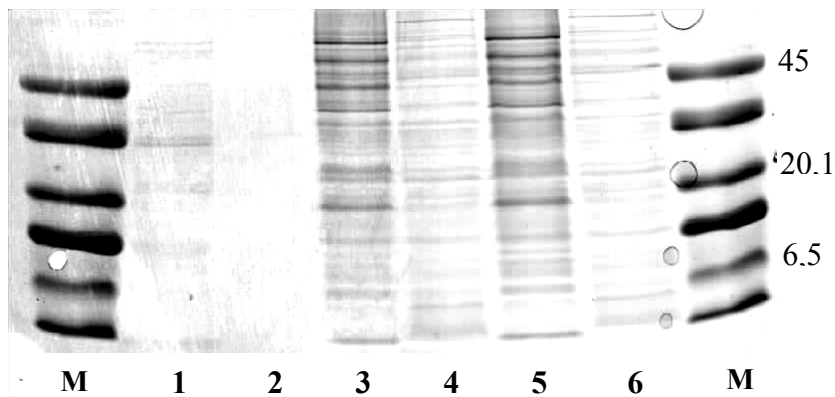
In Tab. 10 ist dokumentiert, dass die Kulturüberstände von ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY und ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY eine 4,5 bis 7,5fach höhere Proteinkonzentration aufwiesen als die des Wildtyps. Diese Tatsache war auch bei der Auftrennung aus den Überständen gefällter Proteine durch SDS-Gelelektrophorese deutlich erkennbar (Abb. 34).

**Tab. 10:** Proteingehalt der Kulturüberstände der Stämme ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY und ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY im Vergleich zum Wildtyp. Zellen wurden in der stationären Phase geerntet und die Kulturüberstände nach zweimaliger Zentrifugation für die Proteinbestimmung verwendet.

	ATCC13032 Wildtyp	ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY	ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY
Proteingehalt ( $\mu$ g/ml)	41,5 (+/-1,7)	182,4 (+/-10,8)	307,3 (+/-9,5)

Nach Behandlung der Kulturüberstände mit TCA bei 110°C zur Hydrolyse von Polysacchariden konnten keine höheren Glucose-, Arabinose- oder Mannosemengen, die auf die Existenz des Polysaccharids der äußeren Zellhülle hindeuten würden (Puech et al., 2001), in den Überständen von ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY und ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY nachgewiesen werden. Jedoch deutete die gallertartige Konsistenz der oberen Phase von Zellsedimenten dieser Stämme darauf hin, dass das Polysaccharid der äußeren Zellhülle sich hier befand. Die Untersuchung dieses Materials zeigte, dass es Arabinose, Mannose und

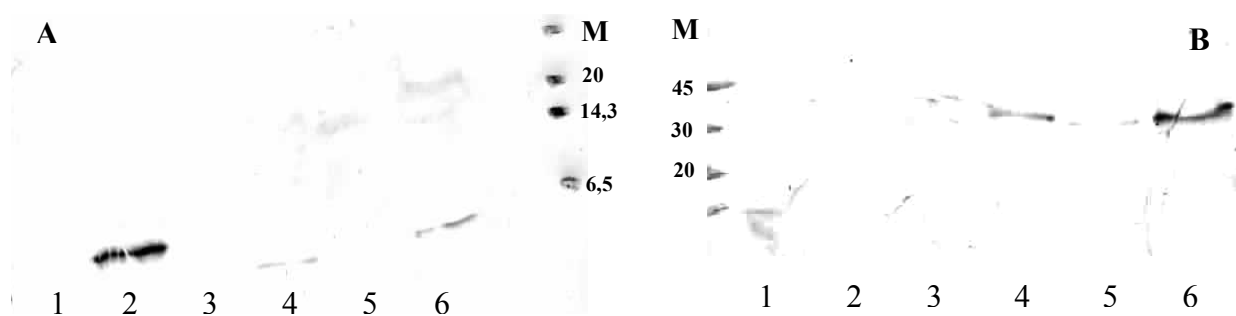
Glucose, also spezifische Komponenten des Polysaccharides der äußeren Zellhülle, aber nur geringe Mengen Protein beinhaltete (nicht gezeigt).



**Abb. 34:** Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen aus Kulturüberständen des Wildtyps, ATCC13032ΔotsAΔtreY und ATCC13032ΔotsAΔtreSΔtreY (1, 3, 5) bzw. aus der äußeren Zellhülle dieser Stämme (sls-Extrakte: 2, 4, 6). **1:** Protein aus Wildtyp-Überstand; **2:** Protein aus Wildtyp sls-Extrakt; **3:** Protein aus ATCC13032ΔotsAΔtreY- Überstand; **4:** Protein aus ATCC13032ΔotsAΔtreY sls-Extrakt; **5:** Protein aus ATCC13032ΔotsAΔtreSΔtreY-Überstand; **6:** Protein aus ATCC13032ΔotsAΔtreSΔtreY sls-Extrakt; **M:** Molekulargewichtstandard, Angaben in kDa (Kilodalton).

Um zu untersuchen, ob sich unter den Proteinen in den Kulturüberständen von ATCC13032ΔotsAΔtreY und ATCC13032ΔotsAΔtreSΔtreY spezifische Zellwandproteine befanden, wurde die Anwesenheit des Zellwandporins PorA (Lichtinger et al., 2001) und des periplasmatischen Glutamat-Bindeproteins GluB (Kronemeyer et al., 1995) durch immunchemische Analysen untersucht (Abb. 35). Dabei konnte ein Protein einer apparenten molekularen Masse von ca. 5 kDa in den Überständen aller untersuchten Stämme, nicht aber in den jeweiligen Extrakten der äußeren Zellhülle durch das anti-PorA Immunglobulin nachgewiesen werden. Aufgrund der Übereinstimmung der apparenten mit der tatsächlichen molekularen Masse (Lichtinger et al., 2001) und der hohen Spezifität des Antikörpers ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich hierbei tatsächlich um PorA handelte. Das mit Abstand stärkste Signal lieferte der Kulturüberstand des Wildtyps. Dieses Ergebnis entsprach zwar nicht der Erwartung, stand jedoch in gewisser Übereinstimmung mit den von Puech et al.

(2001) veröffentlichten Daten. Die Autoren konnten das Zellwandporin in den Kulturüberständen und der äußeren Zellhülle von *C. glutamicum* und *C. diphtheriae*, nicht aber von *C. amycolatum* nachweisen. Offensichtlich scheint PorA in der Zellwand mycolatfreier Corynebakterien nur in sehr geringen Mengen vorhanden zu sein. Die Ursache hierfür ist zwar unklar, könnte jedoch mit einer veränderten Zellwandorganisation und/oder daraus resultierendem geringeren Einbau des Porins in die Zellwand mycolsäurefreier Corynebakterien zusammenhängen. Allerdings könnte auch eine geringere endogene Synthese oder ein erhöhter Abbau des Porins in den Kulturüberständen von ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY und ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY die Ursache für die geringeren Mengen an PorA-Protein in den Überständen dieser Stämme sein.



**Abb. 35:** Immunchemischer Nachweis des Zellwandporins PorA und des periplasmatischen Glutamat-Bindeproteins GluB in Kulturüberständen des Wildtyps, ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY und ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY sowie in sls-Extrakten der äußeren Zellhülle dieser Stämme. **(A):** PorA-Immunoblot. **(B):** GluB-Immunoblot. **1:** Protein aus Wildtyp sls-Extrakt; **2:** Protein aus Wildtyp-Kulturüberstand; **3:** Protein aus ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY sls-Extrakt; **4:** Protein aus ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY-Kulturüberstand; **5:** Protein aus ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY sls-Extrakt; **6:** Protein aus ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY-Kulturüberstand; **M:** Molekulargewichtstandard, Angaben in kDa (Kilodalton).

Aus den Kulturüberständen von ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY und ATCC13032  $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY konnte ein Protein einer apparenten molekularen Masse zwischen 30 und 45 kDa gefüllt werden, das spezifisch durch das anti-GluB Immunglobulin erkannt wurde (Abb. 35B). Aufgrund des beschriebenen Molekulargewichts von GluB von ca. 32 kDa und der hohen Spezifität des Antikörpers handelte es sich bei dem erkannten Protein offensichtlich um GluB. Ebenfalls vorhanden war dieses Protein in Extrakten der äußeren Zellhülle der beiden

Stämme, allerdings waren die Signale wesentlich schwächer. Nicht nachzuweisen war das Protein in dem Kulturüberstand und dem sls-Extrakt des Wildtyps.

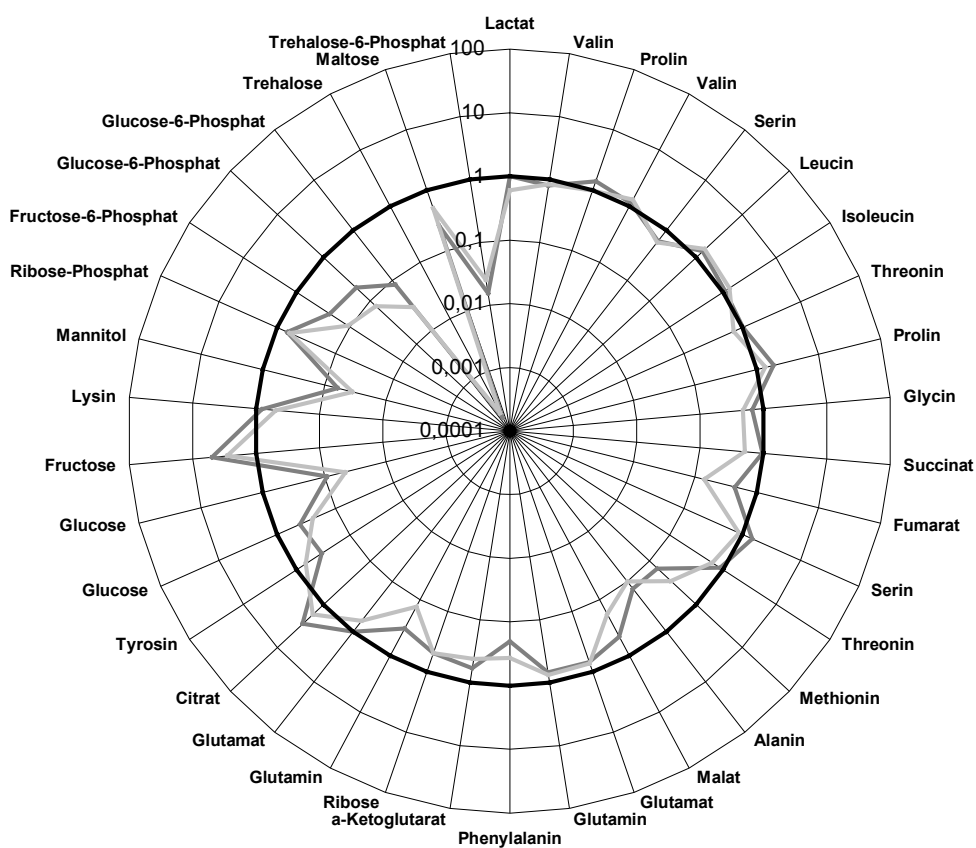
Die erhöhten Proteinmengen in Kulturüberständen, das Polysaccharid der äußeren Zellhülle in der gallertartigen oberen Phase von Zellsedimenten und die Anwesenheit von GluB in den Kulturüberständen der Stämme ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY und ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY deuten darauf hin, dass Material, aus dem die äußere Zellhülle aufgebaut ist, im Wachstumsmedium dieser Stämme vorhanden war. Dies steht in Übereinstimmung mit der Vorstellung, dass die äußere Zellhülle aufgrund der vermutlich fehlenden Lipiddoppelschicht nicht mehr fest mit der restlichen Zellwand in Verbindung steht und somit im Verlaufe einer Anzucht ins Medium verlorenght.

### **3.5 Weitere Auswirkungen der Trehalosesynthese auf den Zellstoffwechsel von *C. glutamicum***

Aufgrund des starken Einflusses des Fehlens von Trehalose in den Stämmen ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY und ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY auf die Mycolatsynthese, die Synthese kompatibler Solute, die Exkretion cytoplasmatischer Metabolite und das Bakterienwachstum wurde der cytoplasmatische *pool* verschiedener weiterer Stoffwechselprodukte dieser Stämme untersucht. Hierzu wurde in einem Metabolom-Ansatz der Gehalt einiger Produkte des zentralen und des peripheren Stoffwechsels durch GC-MS untersucht und ins Verhältnis zum Wildtyp gesetzt (Abb. 36). Auffallend war, dass beide Stämme ein fast identisches Muster cytoplasmatischer Stoffwechselprodukte aufwiesen. Dies deutete darauf hin, dass die Abwesenheit von Trehalose grundlegende Veränderungen im Zellstoffwechsel verursacht. Neben der bereits dokumentierten Abwesenheit von Trehalose und Tre-6-P fiel besonders auf, dass Komponenten der Glycolyse (Glucose-6-Phosphat, Fructose-6-Phosphat) in etwa fünffach geringeren Mengen vorlagen als beim Wildtyp. Andere Zucker wie Glucose, Ribose, Ribosephosphat und Mannitol waren nur in etwa den halben Mengen vorhanden wie beim Wildtyp. Dasselbe traf, mit Ausnahme von Citrat, auch auf Intermediate des Citratzyklus zu (Succinat, Fumarat, Malat). Fructose, die vorübergehend nach der Aufnahme von Saccharose entsteht (Dominguez & Lindley, 1996), lag dagegen in fast zehnfach höheren Mengen vor als in Wildtypzellen. Dies deutet auf Probleme bei der



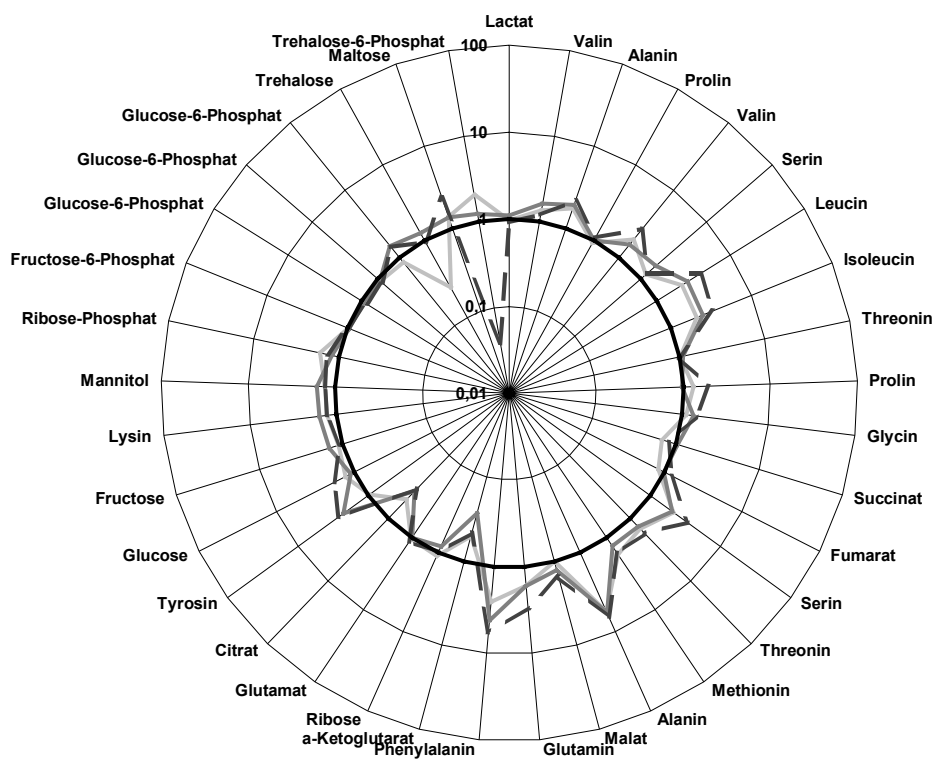
Verwertung und Verstoffwechslung der C-Quelle hin, was eine Erklärung für die bei diesen Stämmen beobachtete Wachstumsinhibition sein kann. Nur geringe Unterschiede zeigten sich dagegen in der Abundanz cytoplasmatischer Aminosäuren. Aminosäurestoffwechsel und Proteinsynthese schienen also nicht gestört. Insgesamt deuten die Ergebnisse auf eine Beeinträchtigung des Energiestoffwechsels hin, da fast alle nachgewiesenen Komponenten von Glycolyse und Citratzyklus in geringeren Konzentrationen als beim Wildtyp vorlagen. Allerdings fehlten bei der Bestimmung wichtige Stoffwechselprodukte wie Pyruvat, Phosphoenolpyruvat, Fructose 1,6-Bisphosphat und Ribulose-5-phosphat.



**Abb. 36:** Bestimmung der Mengen cytoplasmatischer Stoffwechselprodukte durch GC-MS bei *C. glutamicum* ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY (hellgrau) und ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY (dunkelgrau) relativ zum Wildtyp ATCC13032 (schwarz). Substanzen, die mehrfach vorkommen, bildeten bei der Derivatisierung verschiedene diskrete Produkte in ähnlicher Abundanz. Alle beim Wildtyp bestimmten Mengen wurden mit 1 definiert. Die für die Analysen verwendeten Zellen stammten aus exponentiell wachsenden MMI-Kulturen (0,9 osM (durch NaCl-Zusatz), 4% Saccharose). Nach dem Ernten wurden die Zellen in einem Volumen PBS gewaschen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Aufarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

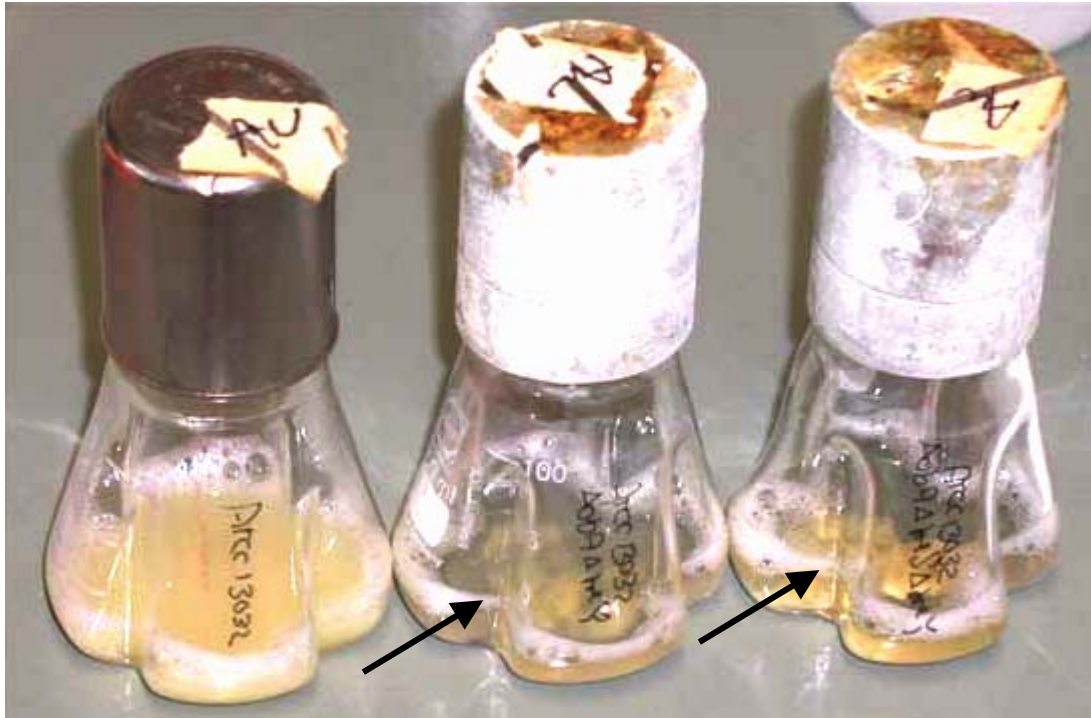
Neben den dargestellten Effekten schienen in *ATCC13032ΔotsAΔtreY* und *ATCC13032ΔotsAΔtreSΔtreY* auch grundlegende Veränderungen im Lipidstoffwechsel vorzuliegen. Bei der Analyse hydrophober Metabolite zeigten die beiden Stämme drastische Abweichungen vom Wildtyp, die nur teilweise auf den gestörten Mycolatstoffwechsel zurückzuführen waren (von Elstermann, 2002).

Metabolom-Analysen wurden auch mit Stämmen durchgeführt, denen jeweils ein Trehalose-Syntheseweg fehlte (Abb. 37). Auch bei diesen Stämmen konnten im Gehalt verschiedener cytoplasmatischer Stoffwechselprodukte große Ähnlichkeiten untereinander und Abweichungen vom Wildtyp festgestellt werden. Die Konzentrationen fast aller Aminosäuren waren im Vergleich zum Wildtyp erhöht. In besonderem Maße galt dies für Alanin und Phenylalanin. Dagegen lag  $\alpha$ -Ketoglutarat stets in geringeren Mengen vor als beim Wildtyp. Insgesamt deutet dies auf eine verstärkte N-Fixierung dieser Stämme hin. Citrat lag ebenfalls in geringeren Mengen vor, allerdings traf das nicht auf andere Citratzyklus-Intermediate wie Succinat, Malat oder Fumarat zu. Im Gegensatz zu *ATCC13032ΔotsAΔtreY* und *ATCC13032ΔotsAΔtreSΔtreY* lagen die Glycolysesubstrate Fructose-6-Phosphat und Glucose-6-Phosphat im Vergleich zum Wildtyp in unveränderten Mengen vor. Unverändert waren auch die cytoplasmatischen Fructosemengen, was andeutet, dass die Verwertung der C-Quelle Saccharose bei diesen Stämmen nicht gestört war. Wie bereits früher gezeigt, besaß *ATCC13032ΔotsA* kein Tre-6-P und *ATCC13032ΔtreY* eine geringere Menge cytoplasmatischer Trehalose als der Wildtyp.



**Abb. 37:** Bestimmung der Mengen cytoplasmatischer Stoffwechselprodukte durch GC-MS bei *C. glutamicum* ATCC13032 $\Delta$ *otsA* (schwarz gestrichelt), ATCC13032 $\Delta$ *treS* (dunkelgrau) und ATCC13032 $\Delta$ *treY* (hellgrau) relativ zum Wildtyp ATCC13032 (schwarz). Substanzen, die im Diagramm mehrfach vorkommen, bildeten bei der Derivatisierung verschiedene, diskrete Produkte in ähnlicher Abundanz. Alle beim Wildtyp bestimmten Mengen wurden mit 1 definiert. Die für die Analysen verwendeten Zellen stammten aus exponentiell wachsenden MMI-Kulturen (0,9 osM (durch NaCl-Zusatz), 4% Saccharose). Nach dem Ernten wurden die Zellen in einem Volumen PBS gewaschen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Aufarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

## ANHANG ERGEBNISTEIL



**Abb. 38:** Aggregation und Absinken von Zellen der Stämme *ATCC13032ΔotsAΔtreY* und *ATCC13032ΔotsAΔtreSΔtreY* nach Entfernen der Kolben vom Rotationsschüttler. Von links nach rechts: Wildtyp *ATCC13032*, *ATCC13032ΔotsAΔtreY*, *ATCC13032ΔotsAΔtreSΔtreY*. Die Pfeile deuten die aggregierten Zellen an.



**Abb. 39:** Zweiphasiges Zellsediment und trüber Kulturüberstand bei *ATCC13032ΔotsAΔtreY* nach Sedimentieren bei 3220 g. Links: *ATCC13032*; rechts: *ATCC13032ΔotsAΔtreY*.

## 4. DISKUSSION

### 4.1 Bedeutung von Trehalose im Stoffwechsel von *C. glutamicum*

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Trehalose eine Substanz von grundlegender Bedeutung im Stoffwechsel von *C. glutamicum* ist. Einerseits dient Trehalose diesem Organismus als stressprotektive Substanz bei hoher Osmolalität, andererseits stellt sie eine Komponente von Zellwandlipiden dar und ist notwendig für die Synthese dieser Zellwandlipide, die maßgeblich für die Ultrastruktur der Zellwand von *Corynebacterium* sind. Da jedoch zwei Stämme konstruiert werden konnten, die konditional bzw. konstitutiv trehalosedefizient waren, kann Trehalose kein essentielles Stoffwechselprodukt von *C. glutamicum* sein. Die Abwesenheit des Disaccharids in diesen Stämmen führte allerdings zu dramatischen Wachstumsdefekten und einer verringerten Resistenz gegen hyperosmotischen Stress.

#### 4.1.1 Bedeutung von Trehalose als C-Quelle und Speicherkohlenhydrat von *C. glutamicum*

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *C. glutamicum* ATCC13032 im Gegensatz zu vielen anderen Bakterien (Argüelles, 2000) Trehalose nicht als Kohlenstoffquelle verwerten konnte. Dies war weder auf eine osmolalitätsbedingte Unterdrückung der Trehaloseaufnahme wie bei *E. coli*, noch auf eine Hemmung der Mycolatsynthese durch Trehalose, wie von Shimakata & Minatogawa (2000) im Falle von *C. matruchotii* beschrieben, zurückzuführen. Als Ursache für das ausbleibende Wachstum von *C. glutamicum* auf Trehalose kommt vielmehr das Fehlen eines Aufnahmemechanismus in Betracht, da auch während des Wachstums exkretierte Trehalose nach Erschöpfung der C-Quelle nicht wieder von der Zelle aufgenommen wurde (nicht dokumentierte Daten). Dem Fehlen eines Aufnahmemechanismus (und einer Trehalase, s. 4.2) könnte die Unverträglichkeit von vollständigem Abbau von Trehalose und Mycolatsynthese zugrunde liegen, da eine gewisse cytoplasmatische Trehalose-Basiskonzentration für die Mycolatsynthese notwendig ist und der erschöpfende Abbau von Trehalose diese nicht gewährleisten würde.

Ob und in welchen Situationen Trehalose *C. glutamicum* als Speicherkohlenhydrat dient, ist unklar. Da die Funktion von Trehalose als stressprotektive Substanz von der eines Speicherkohlenhydrats oft nur schwer getrennt werden kann (Argüelles, 2000), könnte der Zweck der Anreicherung von Trehalose beispielsweise nach einem hyperosmotischen Schock auch die Anhäufung von Speicherkohlenhydrat zur Vorbereitung der Wiederaufnahme bakteriellen Wachstums und nicht die Anhäufung eines kompatiblen Solut sein. Dafür spricht, dass die Wiederaufnahme des Wachstums und der Abbau von Trehalose zeitlich miteinander einhergehen. Da es aber bereits in der akuten Phase der Schockantwort zur Synthese von Trehalose kam, ist es unwahrscheinlich, dass diese *ausschließlich* der Anreicherung von Speicherkohlenhydrat diene. Jedoch ist eine kombinierte Rolle von Trehalose als stressprotektive Substanz und Speicherkohlenhydrat möglich. Auch die Anreicherung von Trehalose in der stationären Phase von Kulturen, die bei konstanter Osmolalität angezogen wurden, steht nicht *prinzipiell* im Einklang mit der Rolle eines Speicherkohlenhydrats. Zur Bildung von Speicherkohlenhydrat kommt es, solange die C-Quelle im Überschuss vorhanden ist (Argüelles, 2000) und nicht zu einem Zeitpunkt, wenn die C-Quelle im Medium bereits erschöpft ist. Allerdings ist zu erwägen, dass Trehalose ein Abbau-Zwischenprodukt anderer Speicherkohlenhydrate, also ein Übergangsspeicherkohlenhydrat darstellen könnte. Zumindest ein Teil der in der stationären Phase hergestellten Trehalose resultierte aus TreYZ-Aktivität, d.h. aus dem mutmaßlichen Abbau von Speicherkohlenhydrat (s. Einleitung und 4.2). Eine enge Verbindung von Trehalose und Glycogenstoffwechsel scheint auch in anderen Organismen vorzuliegen (Schneider et al., 2000).

Typische Eigenschaften eines Speicherkohlenhydrats zeigte Trehalose jedoch, wenn die Zellen auf Maltose angezogen wurden. Hier wurden in der exponentiellen Wachstumsphase, d.h. bei sättigender Versorgung mit C-Quelle, enorme Trehalosemengen angereichert, die in der stationären Phase wieder abnahmen. Da diese Anzuchten nicht bei hoher Osmolalität durchgeführt wurden, ist eine Rolle von Trehalose als kompatibles Solut unter diesen Bedingungen unwahrscheinlich. Trehalose könnte *C. glutamicum* folglich in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle als Speicherkohlenhydrat dienen und möglicherweise andere Speicherstoffe wie Glycogen ersetzen.

#### 4.1.2 Bedeutung von Trehalose als kompatibles Solut von *C. glutamicum*

Da unterschiedliche Veränderungen in den Umweltbedingungen der natürlichen Habitate von Bodenbakterien wie Temperatur und Trockenheit Schwankungen der Wasseraktivität, d.h. der Osmolalität, verursachen, wurde die Bedeutung von Trehalose als stressprotektive Substanz von *C. glutamicum* in Situationen hyperosmotischen Stresses untersucht. Die Tatsache, dass dieser Organismus fünf verschiedene *Carrier*proteine zur Aufnahme kompatibler Solute unter hyperosmotischen Bedingungen (Peter et al., 1998; Steger, unveröffentlichte Daten) und mindestens zwei mechanosensitive Kanäle zur schnellen Ausschleusung osmotisch wirksamer Substanzen unter hypoosmotischen Bedingungen (Morbach & Krämer, 2002) besitzt, zeigt die zentrale Bedeutung osmoprotektiver Mechanismen bei *C. glutamicum*. Weil jedoch das Habitat auch großen Schwankungen in der Verfügbarkeit von Nahrungsquellen und kompatiblen Soluten unterworfen ist (Bremer & Krämer, 2000), besitzt *C. glutamicum* daneben, wie auch in dieser Arbeit dokumentiert, effektive Mechanismen zur *de novo*-Synthese osmoprotektiver Substanzen.

Es konnte gezeigt werden, dass *C. glutamicum* im Gegensatz zu Organismen wie *E. coli* (Dinnbier et al., 1988, Giæver et al., 1988) oder *B. subtilis* (Whatmore & Reed, 1990; Whatmore et al., 1990), die nur wenige kompatible Solute durch *de novo*-Synthese herstellen können, nach hyperosmotischem Schock eine Vielzahl verschiedener kompatibler Solute herstellte, d.h. offensichtlich auf eine starke Redundanz bezüglich der Synthese osmoprotektiver Substanzen setzt. Anders als *E. coli*, ein begeißeltes Enterobakterium, oder der sporenbildende *B. subtilis*, ist *C. glutamicum* nicht zum Ortswechsel bzw. zur Ausbildung stressresistenter Ruhestadien befähigt, was offensichtlich eine höhere Anpassungsfähigkeit an stets wechselnde Bedingungen erfordert. So konnte nach einem hyperosmotischen Schock die Synthese von Trehalose, Glutamat, Glutamin und Prolin, in bestimmten Fällen sogar von Alanin, nachgewiesen werden. Trehalose, Glutamat und Glutamin wurden jedoch nur vorübergehend von den Zellen angereichert, was mit unterschiedlichen Funktionen dieser Substanzen bei der Schockantwort zusammenhängen kann. Generell ist davon auszugehen, dass unmittelbar nach einem hyperosmotischen Schock angereicherte kompatible Solute dem Abwenden der unmittelbaren Folgen eines solchen Ereignisses dienen. Zu diesen gehört der Ausfluss cytoplasmatischen Wassers, was zu einem Abfallen des Turgors und damit einhergehendem Schrumpfen der Zelle bis hin zur Plasmolyse führen kann (Galinski &

Trüper, 1994; Poolmann & Glaasker, 1998). Für den vorübergehenden Charakter der Anreicherung von Trehalose, Glutamat und Glutamin kommen allerdings noch weitere Erklärungen in Betracht. Trehalose könnte, wie bereits erwähnt, neben der Rolle als kompatibles Solut auch als Speicherkohlenhydrat dienen und darin die Ursache für die Abnahme der cytoplasmatischen Konzentration bei Wiederaufnahme des Zellwachstums liegen. Glutamat, das unter physiologischen Bedingungen eine Nettoladung besitzt und daher eine über den *steady state pool* hinausgehende Anreicherung dieser Aminosäure langfristig wahrscheinlich nicht mit dem Zellstoffwechsel kompatibel ist, könnte analog zu *E. coli* als Gegenion zu aufgenommenem Kalium fungieren. Dafür spricht, dass auch Kalium nur vorübergehend angereichert wurde und die Zunahmen beider Substanzen in derselben Größenordnung lagen (O. Ley, unveröffentlichte Daten). Die Anreicherung von Glutamin könnte eine Konsequenz aus hohen cytoplasmatischen Glutamatkonzentrationen und der in den Experimenten herrschenden sättigenden Ammoniumversorgung sein. Dem nur vorübergehenden Charakter der Anreicherung beider Aminosäuren könnte die Tatsache zugrunde liegen, dass Glutamat eine Vorstufe im Prolinsyntheseweg darstellt. Im Gegensatz zu Trehalose, Glutamat und Glutamin stieg der Prolingehalt von Zellen nach einem hyperosmotischen Schock über drei Stunden hinweg stetig an, erreichte wesentlich höhere Beträge und blieb bis zum Ende der Wachstumsphase der Kulturen konstant. Dies deutet darauf hin, dass Prolin das bevorzugte kompatible Solut *wachsender* Zellen ist. In Übereinstimmung mit dieser Vorstellung wurde auch unter konstant hyperosmotischen Bedingungen nur Prolin während des bakteriellen Wachstums in großen Mengen hergestellt. Trehalose tauchte erst mit Beginn der stationären Phase in signifikanten cytoplasmatischen Mengen auf, und der Glutamatgehalt der Zellen sank sogar während des exponentiellen Wachstums. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den von Guillouet & Engasser veröffentlichten Daten, die eine Korrelation von Wachstumsrate und cytoplasmatischer Prolinmenge bei hoher Osmolalität zeigen konnten (Guillouet & Engasser 1995a). Allerdings sind weder Glutamat noch Glutamin oder Trehalose in hohen Konzentrationen *prinzipiell* inkompatibel mit Zellwachstum, da Glutamat stets in hohen cytoplasmatischen Mengen in *C. glutamicum* vorliegt, Glutamin als kompatibles Solut von *C. glutamicum* bereits früher beschrieben wurde (Frings et al., 1993) und Trehalose bei Verwendung von Maltose als C-Quelle auch von exponentiell wachsenden Zellen in großen Mengen angereichert wurde.



Durch Veränderungen in der Verfügbarkeit der N-Quelle und der Art der C-Quelle konnte gezeigt werden, dass die Zusammensetzung des *pools* kompatibler Solute nach hyperosmotischem Schock bei *C. glutamicum* in starker Abhängigkeit von den äußeren Bedingungen steht und enormen Variationen unterliegt. Auch dies zeigt die besondere Fähigkeit und Notwendigkeit dieses Organismus, sich an stets wechselnde Bedingungen anzupassen. So wurde Trehalose bei sättigender N-Versorgung nach einem hyperosmotischen Schock zwar in beträchtlichen Mengen hergestellt. Die Osmoschockantwort unter diesen Bedingungen basierte jedoch eindeutig auf der Synthese von Aminosäuren, die über 90% der von der Zelle hergestellten kompatiblen Solute ausmachten. Wenig erstaunlich war, dass die Reduktion der nach einem hyperosmotischen Schock hergestellten Trehalosemenge in bestimmten *C. glutamicum* Stämmen auf bis zu 10% der Menge des Wildtyps unter diesen Bedingungen keinerlei Auswirkungen auf die Osmoresistenz dieser Stämme hatte. Offensichtlich spielt Trehalose bei sättigender N-Versorgung als kompatibles Solut von *C. glutamicum* keine entscheidende Rolle. Es ist nicht auszuschließen, dass ein gewisses Maß an Trehalosesynthese eine von der Art der Veränderung weitgehend unabhängige Pauschalantwort auf plötzliche Veränderungen der Bedingungen darstellt. So konnte auch bei plötzlichem Wechsel der C-Quelle eine erhöhte Transkription von Trehalosesynthesegenen festgestellt werden, die in ihrem zeitlichen Verlauf eine starke Ähnlichkeit zur Transkription der Gene nach hyperosmotischem Schock aufwies (vgl. 3.3.3, Abb. 23).

Sobald jedoch die N-Versorgung verschlechtert war, kam es zu einer starken Stimulation der Trehalosesynthese (zwei- bis dreifache Menge) und damit einhergehender Verringerung der Synthese aller Aminosäuren. Die völlige Abwesenheit einer N-Quelle verursachte eine weitere Verdoppelung bis Verdreifachung der cytoplasmatischen Trehalosemenge bei gleichzeitiger Abwesenheit jeglicher Aminosäuresynthese. Aufgrund der enormen cytoplasmatischen Mengen und der offensichtlichen Kompensation des Fehlens von Aminosäuresoluten war der Zweck der Trehalosesynthese unter diesen Bedingungen eindeutig die Bereitstellung eines kompatiblen Soluts und nicht die Anhäufung von Speicherkohlenhydrat oder eine Pauschalreaktion auf eine Veränderung der Bedingungen. Durch nicht mehr vorübergehende, sondern anhaltende Anreicherung von Trehalose in Abwesenheit einer N-Quelle versuchte die Zelle offensichtlich sogar, Prolin als langfristig hergestelltes kompatibles Solut durch Trehalose zu ersetzen.

Einen signifikanten Einfluss auf die Synthese von Trehalose und die Zusammensetzung des *pools* osmoprotektiver Substanzen nach hyperosmotischem Schock hatte auch die C-Quelle. Die Synthese von Trehalose wurde in besonderem Maße durch Maltose, Glucose und Maltodextrin stimuliert, während sie geringer war, wenn Saccharose verwendet wurde. In inverser Korrelation dazu verhielt sich die Synthese von Prolin, die umso geringer war, je höher die Trehaloseanreicherung war. Unabhängig von den hergestellten Mengen war jedoch die Anreicherung von Trehalose vorübergehend und die von Prolin anhaltend. Als kompatibles Solut wachsender und sich teilender Zellen fungierte also wieder nur Prolin. Auffällig war, dass die Beträge der Trehalosezunahme und der Prolinabnahme nicht gleich waren, sich durch die Umwälzungen im Solutpool der absolute cytoplasmatische Gehalt kompatibler Solute folglich änderte. 100  $\mu\text{mol/g}$  BTM Trehalosezunahme verursachten stets eine Abnahme der cytoplasmatischen Prolinmenge um etwa 300  $\mu\text{mol/g}$  BTM. Eine 1:3 Zunahme/Abnahme Stöchiometrie von Trehalose-/Prolinmengen wurde auch unter N-limitierenden Bedingungen sowie bei ATCC13032 $\Delta\text{treS}$  beobachtet, der mehr als doppelt soviel Trehalose herstellte wie der Wildtyp. Die aus erhöhter Trehalosesynthese und verringerter Prolinsynthese resultierende Abnahme der absoluten cytoplasmatischen Konzentration kompatibler Solute hatte jedoch keine generelle Verringerung der Osmostress-Resistenz zur Folge. Auch bei anderen Organismen konnte gezeigt werden, dass das Ersetzen kompatibler Solute durch Trehalose geringere Mengen Trehalose als der anderen Solute erforderte (Dinnbier et al., 1988). Eine mögliche Erklärung ist, dass Trehalose eine höhere osmotische Wirksamkeit in Bezug auf das Binden cytoplasmatischen Wassers besitzt als andere kompatible Solute. In diesem Zusammenhang konnten Sola-Penna & Meyer-Fernandes (1998) zeigen, dass Trehalose etwa 2,5mal soviel Wasser in seiner Hydrathülle bindet wie Saccharose und andere Disaccharide.

Die in dieser Arbeit dokumentierten Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Synthese von Trehalose nach einem hyperosmotischen Schock in starker quantitativer Abhängigkeit von den äußeren Bedingungen steht und Trehalose eine zentrale Bedeutung als kompatibles Solut von *C. glutamicum* erlangt, sobald die Synthese von Aminosäuren z.B. durch verschlechterte N-Versorgung gehemmt ist oder eine starke Stimulation der Trehalosesynthese durch eine bestimmte C-Quelle vorliegt. Die Redundanz bei der *de novo*-Synthese kompatibler Solute bei *C. glutamicum* zahlt sich also offensichtlich aus, sobald es zu fundamentalen

Veränderungen im Habitat kommt. Von grundlegender Bedeutung ist hierbei die chemische Verschiedenheit unterschiedlicher osmoprotektiver Substanzen (z.B. An- oder Abwesenheit von N).

#### **4.1.3 Bedeutung von Trehalose für die Synthese von Mycolsäuren und den Aufbau der Zellwand von *C. glutamicum***

*Corynebacterium* zählt mit *Mycobacterium*, *Nocardia* und *Rhodococcus* zum Taxon der Gram-positiven GC-reichen Actinomyceten. Ein Merkmal dieses Taxons ist die Anwesenheit sogenannter Mycolsäuren, langkettiger Lipidmoleküle, die eine wichtige Komponente der charakteristischen massiven Zellwand dieser Organismen darstellen (Shimakata *et al.*, 1984). Diese Moleküle sind entweder kovalent an die Arabinogalactanschicht gebunden (Zellwandmycolat) oder kommen als Veresterungsprodukte von Mycolsäure und Trehalose (Mycolyltrehalosen, MMT, DMT) als freie Zellwandlipide vor. Zellwandmycolat und Mycolyltrehalosen bilden eine Lipiddoppelschicht zwischen Arabinogalactan und der äußeren Zellhülle (Puech *et al.*, 2001), die eine zweite Permeabilitätsbarriere bildet und aufgrund ihrer Bedeutung für die Resistenz von Mycobakterien gegen verschiedene Antibiotika (Brennan & Nikaido, 1995; Daffé & Draper, 1998) hohe medizinische Relevanz besitzt. Da Trehalose also einen Bestandteil einiger Mycolate bildet und ein genereller Zusammenhang von Trehalose- und Mycolatsynthese in der Literatur gesehen wird (Pan & Elbein, 1996; Shimakata & Minatogawa, 2000), wurde in dieser Arbeit der Anteil von Zellwandmycolat und Mycolyltrehalosen verschiedener Stämme in Abhängigkeit von der Fähigkeit dieser Stämme, Trehalose herzustellen, untersucht. Ferner wurde die Rolle von Tre-6-P, das nach dem von Shimakata & Minatogawa aufgestellten Modell (Einleitung, Abb. 2) die aktive, trehalosehaltige Komponente im Mycolatsyntheseweg darstellt, *in vivo* mit Hilfe von Stämmen untersucht, die kein Tre-6-P mehr herstellen konnten.

Es konnte gezeigt werden, dass Trehalose essentiell für die Mycolatsynthese von *C. glutamicum* ist. Stämme, die keine Trehalose mehr herstellen konnten, besaßen auch keine Mycolsäuren mehr. Dies traf auf beide Formen des zellulären Mycolats, d.h. sowohl auf Zellwandmycolat als auch auf die extrahierbaren Mycolyltrehalosen MMT und DMT zu. Mit Hilfe des Stammes ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY, der nur konditionell trehalosedefizient ist, konnte gezeigt werden, dass die Synthese von Mycolsäuren tatsächlich nur von der An- oder

Abwesenheit von Trehalose abhing. Während dieser Stamm in Abwesenheit cytoplasmatischer Trehalose (Wachstum auf Saccharose) keine Mycolate enthielt, konnten in Anwesenheit von Trehalose (Wachstum auf Maltose) sowohl Zellwandmycolat als auch Mycolat im extrahierbaren Lipidanteil nachgewiesen werden. Allerdings handelte es sich bei den unter den extrahierbaren Lipiden gefundenen Mycolaten nicht um Mycolyltrehalosen, sondern um ein neues, mycolathaltiges Glycolipid, dessen Struktur derzeit aufgeklärt wird. Dies zeigt, dass für die Synthese von Mycolyltrehalose die Anwesenheit cytoplasmatischer Trehalose zwar notwendig, allein aber noch nicht hinreichend ist, sondern noch andere Faktoren eine Rolle spielen. Allerdings kann eine Bedeutung von Tre-6-P in diesem Zusammenhang ausgeschlossen werden, da andere, Tre-6-P freie, aber cytoplasmatische Trehalose beinhaltende Stämme Mycolyltrehalosen besaßen.

Durch die Bestimmung von Tre-6-P in unterschiedlichen Stämmen konnte gezeigt werden, dass diese Substanz *in vivo* keinen Einfluss auf die Mycolatsynthese hatte, d.h. keine essentielle Komponente im Syntheseweg von Mycolsäuren sein kann, wie von Shimakata & Minatogawa (2000) behauptet. Unterschiedliche Stämme, die aufgrund der *otsA*-Deletion kein Tre-6-P mehr besaßen, wiesen immer noch erhebliche Mengen aller Typen von Mycolat auf, solange sie über Trehalose verfügten. Ferner wurden gleiche Mengen Zellwandmycolat und Mycolyltrehalosen aus ATCC13032 $\Delta$ *otsA*, der kein Tre-6-P mehr besaß, und ATCC13032 $\Delta$ *otsB*, dessen Tre-6-P Gehalt um zwei bis drei Größenordnungen über dem des Wildtyps lag, isoliert. Auch besaßen beide Stämme sowohl MMT als auch DMT, was zeigt, dass Tre-6-P auch bei der Umsetzung von MMT zu DMT keine Rolle spielen kann. Eine quantitative Abhängigkeit bestand dagegen offensichtlich zwischen der Synthese von Mycolyltrehalosen und der Menge cytoplasmatischer Trehalose. Während ATCC13032 $\Delta$ *treY*-Zellen, die einen geringeren Trehalosepool aufwiesen als Wildtypzellen, auch nur etwa halb soviel Mycolyltrehalose besaßen, traf das Umgekehrte auf ATCC13032 $\Delta$ *treS*-Zellen zu, die sich durch einen stark erhöhten Trehalosepool auszeichneten. Ferner besaßen Doppeldeletionsstämme, die zusätzlich das  $\Delta$ *treS*-Allel trugen, was stets mit einer Erhöhung der cytoplasmatischen Trehalosemenge relativ zum Stamm mit der jeweiligen Einzeldelation einherging, auch höhere Mengen Mycolyltrehalosen als die Einzeldelationsstämme. Keine quantitative Abhängigkeit bestand zwischen der Menge cytoplasmatischer Trehalose und dem Gehalt an (dem trehalosefreien) Zellwandmycolat. Trehalose ist folglich zwar essentiell

für die Synthese aller Mycolate, ein quantitativer Einfluss besteht jedoch nur auf die Synthese von Mycolyltrehalosen.

Die in dieser Arbeit dokumentierten Daten deuten darauf hin, dass *in vivo* bei der Mycolatsynthese Trehalose entweder anders als durch Phosphorylierung aktiviert wird und die Zelle dazu auf freie Trehalose zurückgreift oder aber Trehalose im Verlaufe der Mycolatsynthese nicht aktiviert wird (vgl. Einleitung, Abb. 2). Ferner scheint Trehalose an zwei verschiedenen Stellen im Mycolatsyntheseweg eine Rolle zu spielen: zuerst eine grundlegende, vor und evtl. bei der Übertragung von Corynomycolat auf die Zellwand, die folglich notwendig für die Bildung aller Mycolate ist, und später im Verlaufe der Synthese bei der Herstellung von Mycolyltrehalosen aus Corynomycolat, der grundlegenden Reaktion für die Synthese der nicht kovalent gebundenen Mycolate der Zellwand. Eine frühe Rolle *bei* der Übertragung auf die Zellwand wäre nur dann denkbar, wenn hergestellte Mycolsäuren, die nicht auf Trehalose bzw. durch Trehalose auf die Zellwand übertragen werden, einem schnellen Abbau unterlägen, da sie ansonsten im extrahierbaren Lipidanteil der Zelle nachzuweisen wären. Dies war jedoch nicht der Fall, da weder Mycolsäuren noch Meroaldehyde, die prominentesten Abbauprodukte von Mycolsäuren (Barry *et al.*, 1998), in ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY- und ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY-Lipidextrakten vorhanden waren (diese Arbeit und von Elstermann, 2002). Wahrscheinlicher ist daher, dass die frühe Funktion von Trehalose im Mycolsäuresyntheseweg schon die Kondensation der Fettsäuren zu Corynomycolat oder einen noch nicht näher charakterisierten Schritt zu Beginn der Synthesesequenz zu betrifft. Die Herstellung von Mycolyltrehalosen aus Corynomycolat schien in einem quantitativen Zusammenhang mit dem cytoplasmatischen Trehalosegehalt der Zellen zu stehen. Offenbar handelt es sich bei diesem Schritt also um eine Gleichgewichtsreaktion, bei der die Verfügbarkeit von Mycolat nicht reaktionslimitierend ist. Dabei könnte Trehalose (allerdings anders als durch Phosphorylierung aktiviert) oder Mycolat die aktivierte Komponente darstellen (vgl. Abb. 2). Die Diskrepanzen zwischen den vorgestellten Ergebnissen und den von Shimakata & Minatogawa veröffentlichten Daten könnten darin gründen, dass diese Autoren Mycolatsynthese mit Hilfe eines *in vitro*-Systems untersuchten, das sich von den *in vivo* herrschenden Bedingungen stark unterscheiden kann. Ferner könnten aber auch Unterschiede im Mechanismus der Mycolatsynthese zwischen *C. matruchotii* und *C. glutamicum* bestehen.

Die Folgen des Fehlens von Mycolat bei ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY- und ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY-Zellen bestanden in einer stark erhöhten Exkretion von Aminosäuren, einer erheblichen Beeinträchtigung des Kulturwachstums und einer offenbar veränderten Zellwandorganisation. Letztere hatte eine höhere Hydrophobizität der Zelloberflächen zur Folge, was zu starker Kohäsion von Zellen und Bildung großer Zellaggregate führte (Anhang Ergebnisteil, Abb. 38). Ferner blieben die Kulturüberstände dieser Stämme nach Sedimentieren der Zellen stets trüb, d.h. sie besaßen noch erhebliche Mengen Materials einer geringeren Schwebedichte als Zellen (Anhang Ergebnisteil, Abb. 39).

Die Ursache der verstärkten Exkretion ist unklar. Zwar fehlt mycolatfreien Zellen vermutlich die Lipiddoppelschicht der Zellwand (Puech et al., 2001), d.h. die zweite Permeabilitätsbarriere, jedoch kann erhöhte Zellwandpermeabilität nicht als Hauptursache für die drastischen Effekte auf der Ebene der Exkretion von Aminosäuren in Betracht kommen. Prolin und in besonderem Maße Glutamat können aufgrund ihres ionischen Charakters nicht frei durch Lipiddoppelschichten permeieren, d.h. schon die Plasmamembran stellt eine effektive Barriere für den passiven Durchtritt dieser Substanzen dar. Außerdem wiesen bereits Stämme, die lediglich über einen geringeren Anteil von Mycolyltrehalosen verfügten, aber keine signifikanten Veränderungen der Zelloberfläche zeigten, erhöhte Aminosäureexkretion auf. Die Exkretion von Fructose schien im Gegensatz zu Prolin und Glutamat bei den mycolatfreien Stämmen stark behindert (s. Abb. 36), was zeigt, dass cytoplasmatische Stoffwechselprodukte nicht prinzipiell von diesen Stämmen in erhöhtem Maße exkretiert wurden. Zwar haben Veränderungen der Zellwand von *C. glutamicum* häufig einen Einfluss auf die Exkretion von Aminosäuren, die genaue Ursache hierfür ist jedoch bislang nicht bekannt. Es bestehen allerdings Hinweise auf eine ursächliche Beteiligung regulatorischer Wechselwirkungen (R. Krämer, persönliche Mitteilung).

Die in Abb. 38 und 39 (Anhang Ergebnisteil) dargestellten Phänomene deuten auf eine Veränderung der Zellwandorganisation bei ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY und ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY hin, da ein klarer Zusammenhang dieser Effekte mit dem Fehlen von Mycolat bei diesen Stämmen bestand. Bei ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY traten diese Effekte nur auf, wenn der Stamm auf Saccharose angezogen wurde. Dagegen fehlten sie, wenn die Zellen auf Maltose angezogen wurden und wieder über Mycolsäuren verfügten. Die

äußere Zellhülle wird mit dem restlichen Teil der Zelle nur über die nicht-kovalenten Wechselwirkungen der Mycolatschicht zusammengehalten. Da das Fehlen von Mycolsäuren bei ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY und ATCC13032  $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY vermutlich zu einer enormen Schwächung dieses nicht-kovalenten Zusammenhalts führt, erschien es wahrscheinlich, dass es sich bei dem Material, das die Trübung der Kulturüberstände dieser Stämme verursachte, um Komponenten der äußeren Zellhülle handelte. Der Proteinanteil dieser Kulturüberstände lag weit über dem des Wildtyps und war für die Trübung verantwortlich, da keine Komponenten des Polysaccharids der äußeren Zellhülle in erhöhten Mengen darin nachgewiesen werden konnten. Tatsächlich beinhalteten die Überstände von ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY und ATCC13032  $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY das periplasmatische Glutamat-Bindeprotein GluB, was als Hinweis auf den Verlust der äußeren Zellhülle und möglicherweise noch fundamentalere Veränderungen in der Zellwand gewertet werden kann. Im Gegensatz dazu waren jedoch die Mengen des Zellwandporins PorA geringer als im Kulturüberstand des Wildtyps. Zwar erscheint dies zunächst im Widerspruch mit der oben angestellten Hypothese. Da das völlige Fehlen von PorA in Kulturüberständen und der Zellwand anderer mycolatfreier Corynebakterien jedoch beschrieben wurde (Puech et al., 2001), könnte auch der Einbau des Porins in die wahrscheinlich strukturell stark veränderte Zellwand erschwert sein und hierin die Ursache für die geringen Mengen des Proteins in den Kulturüberständen der Stämme ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY und ATCC13032  $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY liegen. Das Polysaccharid der äußeren Zellhülle dieser Stämme bildete vermutlich die Oberphase der Zellsedimente nach Zentrifugation bei 3200 g. Dafür spricht zum einen die gallertartige Konsistenz dieser Phase, die charakteristisch für Polysaccharid im hydratisierten Zustand ist. Zum anderen konnten nach Hydrolyse dieses Materials durch 2 M TCA bei 110°C Glucose, Arabinose, und Mannose, also die Komponenten des Polysaccharids der äußeren Zellhülle (Puech et al., 2001), nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Kulturüberständen war der Proteinanteil der Oberphase der Zellsedimente nur gering, was mit der beschriebenen Zusammensetzung der äußeren Zellhülle von *C. glutamicum* übereinstimmt (Puech et al., 2001).

Den Verlust der äußeren Zellhülle in bewegter Lösung vorausgesetzt, könnte die beobachtete Hydrophobizität der Zelloberfläche und die Tendenz zur Zell-Zell-Adhäsion bei ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY und ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY auf Zelloberflächen-exponierten

Lipiden beruhen. Die Lipiddoppelschicht der Zellwand beinhaltet zu einem geringen Anteil auch andere Lipide als Mycolate (Puech et al., 2001), die sich nach Verlust der äußeren Zellhülle an der Oberfläche der Zelle befinden könnten. Ein geeignetes Mittel, das Modell des Verlusts der äußeren Zellhülle genauer zu überprüfen, bietet die Methode der Gefrierätz-Elektronenmikroskopie. Eine Lipiddoppelschicht stellt eine Sollbruchstelle dar, die nach Gefrierätz-Behandlung als Bruchebene erkennbar ist. *Corynebacterium* verfügt über zwei solcher Bruchebenen, die mit der Plasmamembran und der Lipiddoppelschicht in der Zellwand korrelieren (Puech et al., 2001). Das mycolsäurefreie *C. amycolatum* weist nur noch eine Bruchebene in der Plasmamembran auf, was als Hinweis auf das Fehlen der Lipiddoppelschicht in der Zellwand und die Abwesenheit einer äußeren Zellhülle zu werten ist.

#### 4.1.4 Effekte von Trehalose auf den Gesamtstoffwechsel von *C. glutamicum*

Der Einfluss des Fehlens von Trehalose auf den Gesamtzellstoffwechsel ist nicht eindeutig zu erklären. Es konnte gezeigt werden, dass Zellen der trehalosefreien Stämme ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY und ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY signifikant geringere Mengen verschiedener Intermediate von Glycolyse und Citratzyklus, aber erheblich höhere Fructosemengen beinhalteten als der Wildtyp. Zwar deuteten diese Beobachtungen auf eine gestörte Verwertung der Kohlenstoffquelle Saccharose und einen daraus resultierenden niedrigeren Umsatz der Wege des zentralen Energiestoffwechsels wie der Glycolyse und des Citratzyklus hin, fraglich ist jedoch, ob diese Effekte direkt oder indirekt mit der Abwesenheit von Trehalose zusammenhängen. Saccharose wird von *C. glutamicum* nach PTS-vermitteltem Import und darauf folgender Hydrolyse zu Glucose-6-Phosphat und freier Fructose abgebaut. Aufgrund des Fehlens einer Fructokinase wird diese von der Zelle wieder exkretiert und durch ein Fructose-spezifisches Phosphotransferasesystem als Fructose-6-Phosphat aufgenommen (Dominguez & Lindley, 1996). Der Anreicherung freier Fructose und der Reduktion cytoplasmatischen Fructose-6-Phosphats in ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY- und ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY-Zellen könnte folglich ein Defekt in der Exkretion dieses Zuckers zugrunde liegen. Lediglich ein Resultat dieses Exkretionsdefekts könnten die schlechtere Energieausbeute aus der C-Quelle und die geringeren Mengen von Glycolyse- und Citratzyklus-Intermediaten darstellen. Der Exkretionsdefekt wiederum könnte auf den veränderten Zellwandeigenschaften dieser Stämme, verursacht durch die Abwesenheit von



Mycolsäuren, also auf einer indirekten Auswirkung der Trehalosedefizienz, beruhen. Eine verschlechterte Verwertung der C-Quelle würde auch das stark verlangsamte Wachstum und die im Vergleich zum Wildtyp um etwa 25% geringeren Zelldichten der beiden Stämme bei Verwendung von Saccharose als C-Quelle erklären. Bei Wachstum auf Maltose erreichte ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY dagegen normale Zelldichten.

Die Bestimmungen cytoplasmatischer Produkte des Zentralstoffwechsels zeigten deutlich, dass Tre-6-P in *C. glutamicum* nicht, wie bei *S. cerevisiae* beschrieben, als Regulator der Glycolyse fungiert. Der Wegfall der Tre-6-P-vermittelten Inhibition der Hexokinase bei Verlust der Tre-6-P-Synthase hatte bei der Bäckerhefe eine Hyperakkumulation von Zuckerphosphaten zur Folge, die kein weiteres Wachstum mehr zuließ (Thevelein & Hohmann, 1995). Die cytoplasmatischen Mengen verschiedener Zuckerphosphate, v.a. Glucose-6-Phosphat und Fructose-6-Phosphat, waren in ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treY- und ATCC13032 $\Delta$ otsA $\Delta$ treS $\Delta$ treY-Zellen, die kein Tre-6-P beinhalten, dagegen geringer als im Wildtyp und lagen auch in Zellen anderer Tre-6-P-freier Stämme nicht über denen des Wildtyps. Auch war das Wachstum von *C. glutamicum* auf keiner der verwendeten C-Quellen durch das Fehlen von Tre-6-P beeinträchtigt.

#### 4.2 Physiologische Bedeutung der verschiedenen Trehalosesynthesewege

Von den drei verschiedenen Trehalose-Synthesewegen von *C. glutamicum* zeigte unter allen in dieser Arbeit angewandten Bedingungen der TreYZ-Weg die stärkste Aktivität. Zwar variierte die Trehalosesynthese von *C. glutamicum* in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Wachstumsmediums mitunter stark (z.B. bei bestimmten C-Quellen), jedoch war der Hauptanteil des cytoplasmatischen Trehalosegehalts stets auf TreYZ-Aktivität zurückzuführen. TreYZ stellt also offensichtlich den Haupt-Trehalosesyntheseweg von *C. glutamicum* dar. Darüber hinaus unterliegt dieser Weg osmotischer Regulation. Über 80% der nach einem hyperosmotischen Schock hergestellten Trehalose resultierten aus TreYZ-Aktivität. In Abwesenheit des Synthesewegs blieb die Trehaloseantwort der Zelle fast vollständig aus. Die osmotische Regulation des TreYZ-Wegs basiert zumindest teilweise auf Transkriptionskontrolle. Allerdings wurden Mechanismen auf Aktivitätsebene nicht untersucht, die aber deshalb eine Rolle spielen könnten, weil eine Erhöhung der

Transkriptmengen auch der Gene der anderen Synthesewege vorlag, die nur einen geringen oder gar keinen Beitrag zum cytoplasmatischen Trehalosepool unter diesen Bedingungen lieferten. Für die Synthese von Trehalose scheint *C. glutamicum* bevorzugt auf endogene Reserven zurückzugreifen, da Maltooligodextrine, die Substrate des TreYZ-Wegs, typische zelluläre Speicherkohlenhydrate darstellen. Dies erscheint im Zusammenhang mit dem für *C. glutamicum* beschriebenen hohen Glycogengehalt (R. Krämer, persönliche Mitteilung) auch sinnvoll. Ferner stellen endogene Speicherstoffe in Situationen wie einem hyperosmotischen Schock möglicherweise die am schnellsten verfügbaren Substrate für *de novo*-Synthesen dar, da nicht osmoregulierte *carrier*-vermittelte Transportprozesse zur Aufnahme von Substraten unter solchen Bedingungen zumindest vorübergehend behindert sein könnten.

Die wohl prominentesten Beispiele für stressinduzierte und -regulierte Trehalosesynthese bei Mikroorganismen sind *E. coli* (Giæver et al., 1988) und *S. cerevisiae* (De Virgilio et al., 1993; Hounsa et al., 1998). Beide Organismen stellen Trehalose durch die OtsA/OtsB-Umsetzungen her. Auch im Falle der Organismen, bei denen die anderen Synthesewege identifiziert werden konnten, wurde bislang keine stressbedingte Aktivierung des TreYZ-Synthesewegs beschrieben. Über osmotisch regulierte Trehalosesynthese bei *Mycobacterium*, dem einzigen Organismus neben *C. glutamicum*, für den mehrere Trehalose-Synthesewege beschrieben sind, ist nichts bekannt. Bei der in dieser Arbeit dokumentierten osmotischen Regulation des TreYZ-Wegs von *C. glutamicum* handelt es sich daher um den ersten Fall eines stressregulierten Trehalosesynthesewegs, der nicht dem OtsAB-Weg entspricht.

Durch Enzymtests konnte gezeigt werden, dass TreS in konzentrationsabhängiger Weise sowohl die Umsetzung von Maltose zu Trehalose als auch von Trehalose zu Maltose katalysierte. Da Trehalose in einer mindestens um drei Größenordnungen höheren Konzentration im Cytoplasma von *C. glutamicum* vorlag als Maltose, ist davon auszugehen, dass TreS *in vivo* den Abbau von Trehalose katalysiert. Dies erscheint sinnvoll, da im Genom von *C. glutamicum* bislang keine Gene mit Sequenzähnlichkeit zu bekannten Trehalasegenen identifiziert werden konnten. In Übereinstimmung damit konnte in Rohextrakten verschiedener Stämme im Rahmen dieser Arbeit auch keine Trehalaseaktivität nachgewiesen werden. Im Einklang mit einer Rolle von TreS als Trehalose-abbauendes Enzym von

*C. glutamicum* steht auch die Beobachtung, dass es bei hohen cytoplasmatischen Trehalosekonzentrationen, wie nach hyperosmotischem Schock oder bei Verwendung von Maltose als C-Quelle der Fall, zu erhöhter Transkription von *treS* kam. Es ist denkbar, dass Trehalose in konzentrationsabhängiger Weise als physiologischer Induktor von *treS* fungiert. TreS-vermittelte Umsetzung von Maltose zu Trehalose scheint *in vivo* offensichtlich nur dann stattzufinden, wenn die cytoplasmatische Trehalosekonzentration gering und die Maltosekonzentration hoch ist, wie in ATCC13032 $\Delta$ *otsA* $\Delta$ *treY*-Zellen bei Wachstum auf Maltose. In Wildtypzellen, die bei der Anzucht auf Maltose einen hohen Trehalosepool besaßen, katalysierte TreS dagegen offensichtlich wieder die Umsetzung von Trehalose zu Maltose, da die Deletion von TreS zu einer Erhöhung der cytoplasmatischen Trehalosekonzentration relativ zum Wildtyp führte. Eine sich unter physiologischen Bedingungen nahe am Gleichgewicht befindende Reaktion zum Abbau von Trehalose wie die TreS-Umsetzung, d.h. ein weniger leistungsvoller Trehalose-Abbaumechanismus als eine Trehalase, erscheint im physiologischen Gesamtkontext von *C. glutamicum* sogar sehr sinnvoll. Dieser Mechanismus gewährleistet, dass es niemals zu erschöpfendem Trehaloseabbau kommt. Eine cytoplasmatische Basismenge Trehalose, die bei *C. glutamicum* stets nachzuweisen war (10-20  $\mu$ mol/g BTM in der exponentiellen Phase), ist für wachsende Zellen vermutlich sehr wichtig, da sie für die Mycolatsynthese benötigt wird. Das Phänomen eines permanenten Trehalosepools wurde auch bei *Mycobacterium* beschrieben (Elbein & Mitchell, 1973), für das dieselben Überlegungen in Betracht kommen.

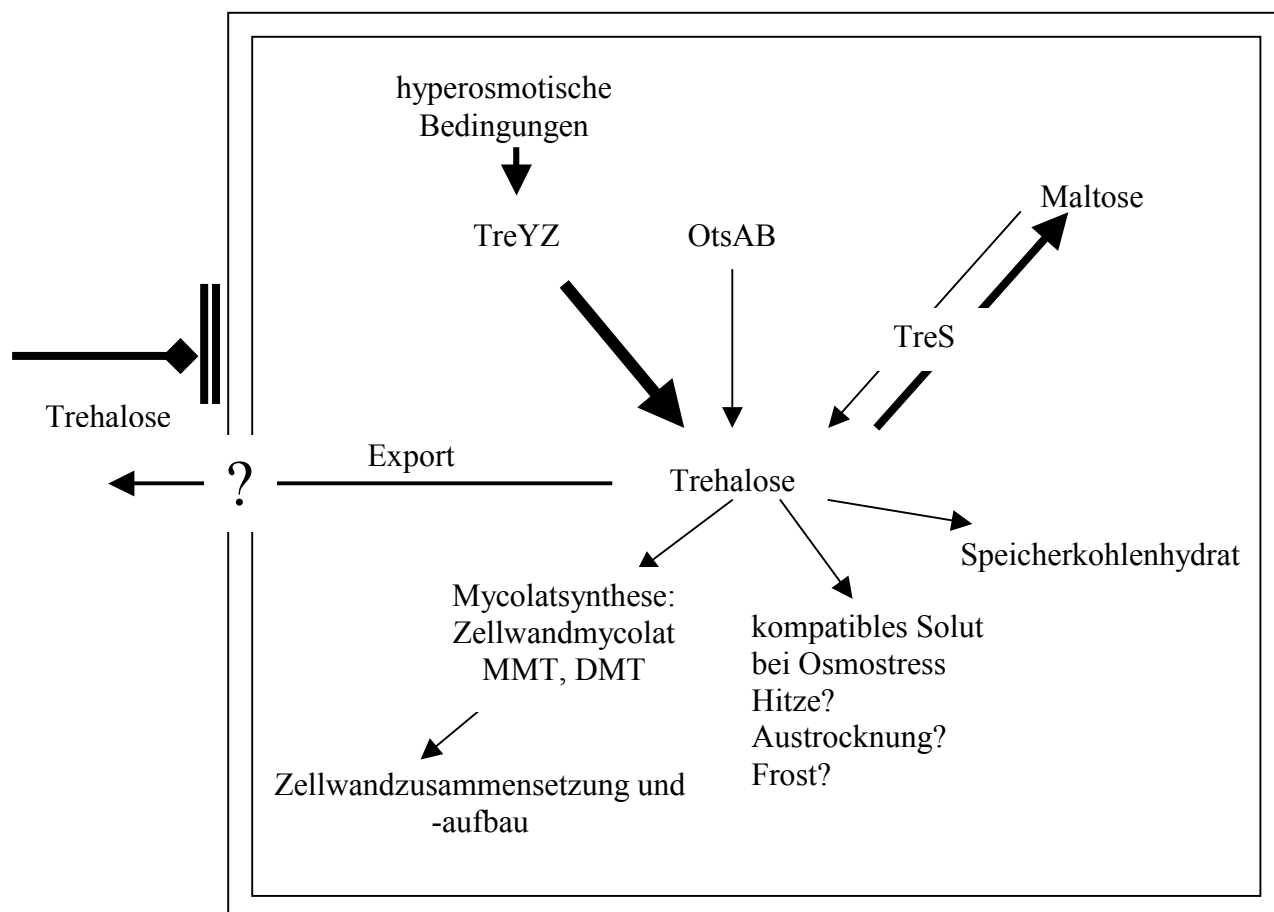
Die physiologische Relevanz des OtsAB-Synthesewegs, der klassischen Trehalose-Syntheseroute fast aller Organismen (Argüelles, 2000), ist im Falle von *C. glutamicum* nicht klar. Anders als bisher angenommen (Shimakata & Minatogawa, 2000) besitzt dieser Syntheseweg *per se* keine Bedeutung für die Synthese von Mycolsäuren. Es konnte gezeigt werden, dass *in vivo* nicht Tre-6-P, das Produkt der OtsA-Umsetzung, sondern Trehalose die essentielle Komponente im Mycolsäure-Syntheseweg von *C. glutamicum* darstellt. Auch der Beitrag des OtsAB-Wegs zum Gehalt cytoplasmatischer Trehalose war relativ zu dem TreYZ-Weg gering. Lediglich bei Verwendung von Glucose als C-Quelle, dem Substrat dieses Synthesewegs, schien seine Aktivität leicht erhöht. Das Ausschalten dieses Synthesewegs hatte weder negative Auswirkungen auf das Zellwachstum noch wurden dadurch signifikante Veränderungen im Trehalosepool hervorgerufen. Möglicherweise wurde die Situation, in der

dieser Syntheseweg von Bedeutung für *C. glutamicum* ist, nicht gefunden. Denkbar ist, dass der Weg bei Limitation der C-Quelle die zelluläre Garantie für eine Basis-Trehalosesynthese darstellt. Folgende Überlegungen stützen diese Mutmaßung: Maltodextrine, die Substrate des TreYZ-Wegs, sind typische Speicherkohlenhydrate, die unter C-limitierenden Bedingungen von der Zelle nicht angereichert werden können. Von TreS-vermittelter Trehalosesynthese ist bei Knappheit der C-Quelle ebenfalls nicht auszugehen, da die Umsetzung gewisse Maltosekonzentrationen erfordert, die aus denselben Gründen ausgeschlossen werden können. Auch osmotisch regulierte Trehalosesynthese könnte unter solchen Bedingungen vom OtsAB-Weg abhängen. Dafür spricht, dass eine prinzipielle Reaktion des OtsAB-Synthesewegs auf hyperosmotischen Schock auf Transkriptionsebene und in geringem Maße auch in der Syntheseleistung nachgewiesen werden konnte. Ferner zieht die Zelle selbst unter Nährstofflimitation die Anreicherung stressprotektiver Substanzen offensichtlich dem Zellwachstum vor (diese Arbeit, Abb. 13; O. Ley, unveröffentlichte Daten), was allerdings wenig erstaunlich ist, da die Anreicherung kompatibler Solute unter hyperosmotischen Bedingungen die Voraussetzung für Zellwachstum und -teilung ist.

### **4.3 Modell des Trehalosestoffwechsels von *C. glutamicum***

Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten sind in Abb. 40 in einem Schaubild zusammengefasst. Trehalose kann von *C. glutamicum* als Kohlenstoffquelle nicht genutzt werden, was vermutlich auf dem Fehlen eines Import-Transportproteins beruht. Endogen hergestellte Trehalose hat zwei Hauptfunktionen. Zum einen dient sie als kompatibles Solut unter hyperosmotischen Bedingungen und möglicherweise auch in anderen, für diesen Organismus relevanten Stresssituationen. Zum anderen stellt sie eine Komponente im Mycolat-Syntheseweg und einen Bestandteil bestimmter Mycolsäure-Derivate dar. Mycolate sind für den regulären Aufbau der Zellwand und die Bildung einer Zellwand-Permeabilitätsbarriere notwendig. Eine Rolle von Trehalose als Speicherkohlenhydrat unter bestimmten Bedingungen ist möglich. Die Synthese von Trehalose kann über drei verschiedene Synthesewege erfolgen (OtsAB, TreYZ, TreS). Von diesen besitzt TreYZ-Weg die stärkste Aktivität und ist auch für die Trehaloseantwort der Zelle unter hyperosmotischen Bedingungen verantwortlich, ist also osmoreguliert. TreS stellt den Trehalose-Abbauweg von *C. glutamicum* dar. Die physiologische Relevanz des OtsAB-Wegs ist unklar, da seine Syntheseleistung gering war und keine signifikante situationsabhängige Aktivierung dieses

Wegs gefunden werden konnte. Da Trehalose in erheblichen Mengen aus der Zelle ausgeschleust wird (ca. 5 mM Konzentration im Kulturüberstand stationärer Zellen, nicht in dieser Arbeit dokumentiert), scheint ferner auch ein Exportmechanismus für Trehalose zu existieren. Ein solcher Mechanismus könnte eine notwendige Voraussetzung für die Synthese von Mycolsäuren sein, da Trehalose als Synthesewegkomponente benötigt wird und sich die Mycolatsynthese-Enzyme in der Zellwand befinden. Die Anreicherung im Wachstumsmedium könnte folglich mit dem Freiwerden von Trehalose im Rahmen der Mycolatsynthese zusammenhängen (s. Einleitung, Abb. 2).



**Abb. 40:** Auf den in dieser Arbeit dokumentierten Daten basierendes Modell des Trehalosestoffwechsels von *C. glutamicum*.

#### 4.4 Abschlussbetrachtung

Die erhebliche Redundanz bezüglich der Synthese von Trehalose bei *C. glutamicum*, die sich in der Anwesenheit dreier verschiedener Synthesewege manifestiert, hängt vermutlich mit der Lebensweise dieses Organismus und den daraus resultierenden hohen Anforderungen an die Stressresistenz und Anpassungsfähigkeit an wechselnde Bedingungen zusammen.

Schon unter Laborbedingungen führte das Fehlen von Trehalose in Stämmen, die das Disaccharid nicht mehr herstellen konnten, zu einer drastischen Beeinträchtigung des Bakterienwachstums und einer starken Osmosensitivität. Als ausschlaggebend für diese Effekte ist jedoch, zumindest unter den angewandten Bedingungen, nicht die Rolle von Trehalose als osmoprotektive Substanz anzusehen, sondern die durch das Fehlen von Mycolsäuren hervorgerufenen Veränderungen der Zellwand. Da die stabile Zellwand von Corynebakterien und Mycobakterien als eine wichtige Ursache für die Durchsetzungsfähigkeit dieser Organismen in ihren Habitaten und die Resistenz gegen Umwelteinflüsse angesehen wird und die Anwesenheit von Trehalose eine notwendige Voraussetzung für die chemische Zusammensetzung und Ultrastruktur dieser Zellwand ist, könnte hier ein Grund für die dreifache Absicherung der Trehalosesynthese liegen. Dafür spricht auch, dass bislang nur bei *Mycobacterium*, das mit *Corynebacterium* die Anwesenheit von Mycolsäuren und die charakteristische Zellwand als grundlegende Eigenschaften teilt, ebenfalls drei verschiedene Trehalosesynthesewege identifiziert werden konnten.

Mit großer Wahrscheinlichkeit ist Trehalose aber auch als stickstofffreies *de novo*-synthetisiertes kompatibles Solut in Situationen von Nährstoffknappheit von hoher physiologischer Relevanz für *C. glutamicum*. Dafür spricht die dominante Rolle von Trehalose bei der Osmoschockantwort von *C. glutamicum* bei verschlechterter N-Versorgung. Als unbewegliches Bodenbakterium ist dieser Organismus aber vermutlich regelmäßig mit noch härteren Stressbedingungen als hohe Osmolalität konfrontiert, wie z.B. Hitze oder Austrocknung. In solchen Situationen könnte die Fähigkeit von Trehalose zum Tragen kommen, durch direkte Interaktion Proteine in ihrem nativen Zustand zu stabilisieren und fast in der Art eines Chaperons die Aggregation von Proteinen zu verhindern. Da unter diesen Bedingungen andere kompatible Solute keine Schutzwirkung mehr besitzen, könnte daher Trehalose fundamental für das Überleben von *C. glutamicum* bei Hitze oder Austrocknung

sein und auch hierin ein Grund für die Redundanz trehalosesynthetisierender Mechanismen liegen. Die Hitze- und Austrocknungsresistenz von *C. glutamicum* in Anhängigkeit von der Fähigkeit, Trehalose herzustellen, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, stellt aber ohne Zweifel einen attraktiven Aspekt zukünftiger Studien dar.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Trehalose ist eine ubiquitär im Reich der Pro- und Eukaryoten verbreitete Schutzsubstanz gegen unterschiedliche Arten von Stress wie Hitzestress, Kältestress, oxidativen Stress, osmotischen Stress und Austrocknung. *C. glutamicum* ist als nicht sporulierendes, unbewegliches Bodenbakterium stets solchen Bedingungen ausgesetzt. Die Suche nach Homologen bekannter Trehalosesynthesegene im Genom von *C. glutamicum* brachte fünf mutmaßliche Gene hervor, die drei diskreten Synthesewegen angehörten (OtsAB, TreYZ, TreS). Da viele Veränderungen in der Umwelt einen Einfluss auf die Osmolalität des Habitats haben und Osmoregulation einen zentralen Aspekt im Stoffwechsel von *C. glutamicum* darstellt, wurde die Synthese von Trehalose insbesondere in Bezug auf die Anpassung an hohe Osmolalität, aber auch seine Rolle bei der Mycolsäuresynthese, seine Verwertbarkeit als C-Quelle sowie die physiologische Relevanz der verschiedenen Synthesewege untersucht. Dazu wurden *C. glutamicum*-Stämme mit stabilen Deletionen in Trehalosesynthesegenen konstruiert. Es konnte gezeigt werden, dass Trehalose von *C. glutamicum* nicht als C-Quelle verwertet werden kann. Unter hyperosmotischen Bedingungen wurde Trehalose als kompatibles Solut synthetisiert. Die Menge dabei hergestellter Trehalose hing stark von der Versorgung mit N-Quelle und der verwendeten C-Quelle ab. Während Trehalose als kompatibles Solut bei sättigender N-Versorgung nur eine untergeordnete Rolle spielte, war das Disaccharid unter N-limitierenden Bedingungen bzw. in Abwesenheit einer N-Quelle das bedeutendste kompatible Solut von *C. glutamicum*. Stämme, die keine Trehalose mehr herstellen konnten, zeigten erhebliche Wachstumsdefekte und erhöhte Osmosensitivität. Durch die Verwendung von Maltose, Glucose und Maltodextrinen als C-Quelle wurde die Synthese von Trehalose stark stimuliert. Es wurde nachgewiesen, dass Trehalose, nicht aber Tre-6-P, eine notwendige Komponente der Mycolsäuresynthese ist und daher Trehalosesynthese und Zellwandsynthese eng miteinander verknüpft sind. Stämme, die keine Trehalose herstellen konnten, besaßen auch keine Mycolsäuren. Das Fehlen von Mycolsäuren in diesen Stämmen hatte eine veränderte Zellwandorganisation, erhöhte Exkretion von Aminosäuren sowie eine starke Beeinträchtigung des Wachstums zur Folge. Alle Trehalosesynthesewege waren in *C. glutamicum* aktiv. Die Funktion des OtsAB-Synthesewegs konnte nicht aufgeklärt werden. Dieser war zwar stets aktiv, seine Aktivität war aber nur gering und es lag nur eine schwache Stimulation durch hyperosmotische Bedingungen vor. TreS katalysierte *in vitro* die reversible Umsetzung von Maltose zu Trehalose. *In vivo* ist das Enzym aber aufgrund des in der Zelle herrschenden Konzentrationsverhältnisses von Trehalose zu Maltose vermutlich für den Abbau von Trehalose verantwortlich, da dem Organismus eine Trehalase fehlt. TreYZ besaß unter allen Bedingungen die größte Aktivität und wurde durch hohe Osmolalität stimuliert, war also osmoreguliert.



## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- Abe, S., Takayama, K. und Kinoshita, S. (1967)** Taxonomical studies on glutamic acid producing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **13**: 279-301.
- Ankri, S., Serebrijski, I., Reyes, O. und Leblon, G. (1996)** Mutations in the *Corynebacterium glutamicum* proline biosynthetic pathway: a natural bypass of the ProA step. *J. Bacteriol.* **178**: 4412-4419.
- Arakawa, T. und Timasheff, S. N. (1985)** The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophys. J.* **47**: 411-414.
- Argüelles, J. C. (2000)** Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. *Arch. Microbiol.* **174**: 217-224.
- Asselineau, J. (1966)** *The bacterial lipids*. Hermann-Editeurs des Sciences et des Arts, Paris.
- Barry, C. E., Lee, R. E., Mdluli, K., Sampson, A. E., Schroeder, B. G., Slayden, R. A. und Yuan, Y. (1998)** Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. *Prog. Lipid Res.* **37**: 143-179.
- Becker, A., Schloder, P., Steele, J. E. und Wegener, G. (1996)** The regulation of trehalose metabolism in insects. *Experientia* **52**: 433-439.
- Behm, C. A. (1997)** The role of trehalose in the physiology of nematodes. *Int. J. Parasitol.* **27**: 215-229
- Belisle, J. T., Varalakshmi, D. V., Sievert, T., Takayama, K., Brennan, P. und Besra, G. S. (1997)** Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science* **276**: 1420-1422.
- Benaroudj, N., Lee, D. H. und Goldberg, A. L. (2001)** Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *J. Biol. Chem.* **276**: 24261-24267.
- Besra, G. S. und Chatterjee, D. (1994)** Lipids and carbohydrates of *Mycobacterium tuberculosis*. In Bloom, B. R. (ed.) *Tuberculosis: Pathogenesis, protection and control*: 285-306. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
- Blazquez, M. A., Santos, E., Flores, C. L., Martinez-Zapater, J. M., Salinas, J. und Gancedo, J. (1998)** Isolation and molecular characterization of the *Arabidopsis* TPS1 gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. *Plant J.* **13**: 685-689.

- Boos, W., Ehmann, U., Forkl, H., Klein, W., Rimmele, M. und Postma, P. (1990)** Trehalose transport and metabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**: 3450-3461.
- Boos, W. und Shuman, H. (1998)** Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism and regulation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 204-229.
- Borgia, P. T., Miao, Y. und Dodge, C. L. (1996)** The *orlA* gene from *Aspergillus nidulans* encodes a trehalose-6-phosphate phosphatase necessary for normal growth and chitin synthesis at elevated temperatures. *Mol. Microbiol.* **20**: 1287-1296.
- Bradford, M. M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Bremer, E. und Krämer, R. (2000)** Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. In: Storz, G. und Hengge-Aronis, R. (eds.) *Bacterial Stress Responses*: 79-97. ASM Press, Washington D.C.
- Brennan, P. J. und Nikaido, H. (1995)** The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **64**: 29-63.
- Bürklen, L., Schock, F. und Dahl, M. K. (1998)** Molecular analysis of the interaction between the *Bacillus subtilis* trehalose repressor TreR and the *tre* operator. *Mol. Gen. Genet.* **260**: 48-55.
- Crowe, J. H., Carpenter, J. F., Crowe, L. M. und Anchordoguy, J. (1990)** Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Cryobiology* **27**: 219-231.
- Crowe, J. H., Panek, A. D., Crowe, L. M., Panek, A. C. und De Araujo, P. S. (1991)** Trehalose transport in yeast cells. *Biochem. Int.* **24**: 721-730.
- Crowe, J. H., Hoekstra, F. A. und Crowe, L. M. (1992)** Anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* **54**: 579-599.
- Crowe, J. H., Carpenter, J. F. und Crowe, L. M. (1998)** The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* **60**: 73-103.
- Crowe, J. H., Crowe, L., Oliver, A. E., Tsvetkova, N., Wolkers, W. und Tablin, F. (2001)** The trehalose myth revisited: Introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. *Cryobiology*. **43**: 89-105
- Daffé, M., Lanéelle, M.-A., Asselineau, C., Lévy-Frédault, V. und David, H. L. (1983)** Intérêt taxonomique des acides gras des Mycobactéries: proposition d'une méthode d'analyse. *Ann. Microbiol.* **134B**: 241-256.

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

**De Smet, K. A. L., Weston, A., Brown, I. N., Young, D. B. und Robertson, B. D. (2000)** Three pathways for trehalose biosynthesis in mycobacteria. *Microbiol.* **146**: 199-208.

**De Virgilio, C., Bürckert, N., Bell, W., Jenö, W., Boller, T. und Wiemken, A. (1993)** Disruption of *TPS2*, the gene encoding the 100-kDa subunit of the trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex in *Saccharomyces cerevisiae*, causes accumulation of trehalose-6-phosphate and loss of trehalose-6-phosphate phosphatase activity. *Eur. J. Biochem.* **212**: 315-323.

**Di Lernia, I., Morana, A., Ottobrino, A., Fusco, S., Rossi, M. und De Rosa, M. (1998)** Enzymes from *Sulfolobus shibatae* for the production of trehalose and glucose from starch. *Extremophiles* **2**: 409-416.

**Dinnbier, U., Limpinsel, E., Schmid, R. und Bakker, E. P. (1988)** Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations. *Arch. Microbiol.* **150**: 348-357.

**Dominguez, H. und Lindley, N. D. (1996)** Complete sucrose metabolism requires fructose phosphotransferase activity to ensure phosphorylation of liberated fructose. *Appl. Env. Microbiol.* **62**: 3878-3880.

**Elbein, A. D. und Mitchell, M. (1973)** Levels of glycogen and trehalose in *Mycobacterium smegmatis* and the purification and properties of the glycogen synthetase. *J. Bacteriol.* **113**: 863-873.

**Elbein, A. D. (1974)** The metabolism of alpha, alpha-trehalose. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **30**: 227-256.

**Elstermann, von, M. (2002)** Chemisch-massenspektrometrische Identifikation hydrophober Metabolite von *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit an der Universität zu Köln.

**Fillinger, S., Chaveroche, M. K., van Dijck, P., de Vries, R., Ruijter, G., Thevelein, J. und d'Enfert, C. (2001)** Trehalose is required for the acquisition of tolerance to a variety of stresses in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Microbiol.* **147**: 1851-1862.

**Frings, E., Kunte, J. und Galinski, E. A. (1993)** Compatible solutes in representatives of the genera *Brevibacterium* and *Corynebacterium*: Occurrence of tetrahydropyrimidines and glutamine. *FEMS Microbiol. Lett.* **109**: 25-32

- Galinski, E. A. und Trüper, H. G. (1994)** Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**: 95-108.
- Giæver, H. M., Styrvold, O. B., Kaasen, I. und Strøm, A. R. (1988)** Biochemical and genetic studies of osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**: 2841-2849.
- Goren, M. B., D'Arcy Hart, P., Young, M. R. und Armstrong, J. A. (1976)** Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**: 2510-2514.
- Grant, S. G. N., Jessee, J., Bloom, F. R. und Hanahan, D. (1990)** Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **166**: 253-259.
- Guillouet, S. und Engasser, J. M. (1995a)** Growth of *Corynebacterium glutamicum* in glucose-limited continuous cultures under high osmotic pressure. Influence of growth rate on the intracellular accumulation of proline, glutamate and trehalose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**: 315-320.
- Guillouet, S. und Engasser, J. M. (1995b)** Sodium and proline accumulation in *Corynebacterium glutamicum* as a response to an osmotic saline upshock. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**: 496-500.
- Helfert, C., Gotsche, S. und Dahl, M. K. (1995)** Cleavage of trehalose-phosphate in *Bacillus subtilis* is catalyzed by a phospho-alpha-(1-1)-glucosidase encoded by the *treA* gene. *Mol. Microbiol.* **16**: 111-120.
- Hengge-Aronis, R., Klein, W., Lange, R., Rimmel, M. und Boos, W. (1991)** Trehalose synthesis genes are controlled by *rpoS* and are involved in stationary-phase thermotolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**: 7918-7924.
- Hengge-Aronis, R., Lange, R., Henneberg, N. und Fischer, D. (1993)** Osmotic regulation of *rpoS*-dependent genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**: 259-265.
- Horlacher, R., Uhland, K., Klein, W., Ehrmann, M. und Boos, W. (1996)** Characterization of a cytoplasmic trehalase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**: 6250-6257.
- Horlacher, R. und Boos, W. (1997)** Characterization of TreR, the major regulator of the *Escherichia coli* trehalose system. *J. Biol. Chem.* **272**: 13026-13032.
- Hottiger, T., Boller, T. und Wiemken, A. (1987a)** Rapid changes of heat and desiccation tolerance correlated with changes of trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae* cells subjected to temperature shifts. *FEBS Lett.* **220**: 113-115.
- Hottiger, T., Schmutz, P. und Wiemken, A. (1987b)** Heat-induced accumulation and futile cycling of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **169**: 5518-5522.

- Hounsa, C.-G., Brandt, E. V., Thevelein, J., Hohmann, S. und Prior, B. A. (1998)** Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiol.* **144**: 671-680.
- Hülsmann, A., Lurz, R., Scheffel, F. und Schneider, E. (2000)** Maltose and maltodextrin transport in the thermoacidophilic Gram-positive bacterium *Alicyclobacillus acidocaldarius* is mediated by a high affinity transport system that includes a maltose binding protein tolerant to low pH. *J. Bacteriol.* **182**: 6292-6301.
- Inoue, H., Nojima, H. und Okayama, H. (1990)** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.
- Ishimoto, H., Matsumoto, A. und Tanimura, T. (2000)** Molecular identification of a taste receptor gene for trehalose in *Drosophila*. *Science* **289**: 116-119.
- Keilhauer, C., Eggeling, L. und Sahm, H. (1993)** Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon. *J. Bacteriol.* **175**: 5595-5603.
- Kim, Y. H., Kwon, T. K., Park, S., Seo, H. S., Cheong, J.-J., Kim, C. H., Kim, J.-K., Lee, J. S. und Choi, Y. D. (2000)** Trehalose synthesis by sequential reactions of recombinant maltooligosyltrehalose synthase and maltooligosyltrehalose trehalohydrolase from *Brevibacterium helvolum*. *Appl. Env. Microbiol.* **66**: 4620-4624.
- Kobayashi, K., Kato, M., Miura, Y., Kettoku, M., Komeda, T. und Iwamatsu, A. (1996)** Gene cloning and expression of new trehalose-producing enzymes from the hyperthermophilic archaeum *Sulfolobus solfataricus* KM1. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**: 1882-1885.
- Koch, A. L. (1983)** The surface stress theory of microbial morphogenesis. *Adv. Microbiol. Physiol.* **24**: 301-336.
- Kopp, M., Müller, H. und Holzer, H. (1993)** Molecular analysis of the neutral trehalase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **268**: 4766-4774.
- Kronmeyer, W., Peekhaus, N., Krämer, R., Sahm, H. und Eggeling, L. (1995)** Structure of the *gluABCD* cluster encoding the glutamate uptake system of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **177**: 1152-1158.
- Kyhse-Andersen, J. (1984)** Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**: 203-209.
- Laemmli, U. K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

- Leopold, A. C. (ed.) (1986)** *Membranes, metabolism and dry organisms*. Ithaca: Cornell Univ. Press.
- Lichtinger, T., Rieß, F., Burkovski, A., Engelbrecht, F., Hesse, D., Kratzin, H. D., Krämer, R. und Benz, R. (2001)** The low-molecular-mass subunit of the cell wall channel of the Gram-positive *Corynebacterium glutamicum*. *Eur. J. Biochem.* **268**: 462-469.
- Londesborough, J. und Varimo, K. (1984)** Characterization of two trehalases in baker's yeast. *Biochem. J.* **219**: 511-518.
- Marienfeld, S., Uhlemann, E. M., Schmid, R., Krämer, R. und Burkovski, A. (1997)** Ultrastructure of the *Corynebacterium glutamicum* cell wall. *Antonie Van Leeuwenhoek* **72**: 291-297.
- Maruta, K., Hattori, K., Nakada, T., Kubota, M., Sugimoto, T. und Kurimoto, M. (1996a)** Cloning and sequencing of trehalose biosynthesis genes from *Rhizobium sp.* M-11. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**: 717-720.
- Maruta, K., Hattori, K., Nakada, T., Kubota, M., Sugimoto, T. und Kurimoto, M. (1996b)** Cloning and sequencing of trehalose biosynthesis genes from *Arthrobacter sp.* Q36. *Biochim. Biophys. Acta* **1289**: 10-13.
- Maruta, K., Mitsuzumi, H., Nakada, T., Kubota, M., Chaen, H., Fukuda, S., Sugimoto, T. und Kurimoto, M. (1996c)** Cloning and sequencing of a cluster of genes encoding novel enzymes of trehalose biosynthesis from thermophilic archaebacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biochim. Biophys. Acta* **1291**: 177-181.
- Minnikin, D. E. (1982)** Lipids: complex lipids, their chemistry, biosynthesis and roles. In: Ratledge, C. und Stanford, J. L. (eds.). *The biology of the mycobacteria* **1**: 95-184. Academic Press, London.
- Morbach, S. und Krämer, R. (2002)** Body Shaping under Water Stress: Osmosensing and Osmoregulation of Solute Transport in Bacteria. *Chembiochem.* **3**: 384-397.
- Müller, J., Aeschbacher, R. A., Wingler, A., Boller, T. und Wiemken, A. (2001)** Trehalose and trehalase in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **125**: 1086-1093.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1986)** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51**: 263-273.
- Nwaka, S., Mechler, B., Destruelle, M. und Holzer, H. (1995)** Phenotypic features of trehalase mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **360**: 286-290.
- Nwaka, S., Mechler, B. und Holzer, H. (1996)** Deletion of the *ATH1* gene in *Saccharomyces cerevisiae* prevents growth on trehalose. *FEBS Lett.* **386**: 235-238.

- Nwaka, S. und Holzer, H. (1998)** Molecular biology of trehalose and trehalases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **58**: 197-237.
- Paiva, C. L. und Panek, A. D. (1996)** Biotechnological applications of the disaccharide trehalose. *Biotechnol. Annu. Rev.* **2**: 293-314.
- Pan, Y. T. und Elbein, A. D. (1996)** Inhibition of the trehalose-P synthase of mycobacteria by various antibiotics. *Arch. Biochem. Biophys.* **335**: 258-266.
- Peter, H. (1997)** Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zur Aufnahme von osmoprotektiven Substanzen bei *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation an der Universität Düsseldorf.
- Peter, H., Weil, B., Burkovski, A., Krämer, R. und Morbach, S. (1998)** *Corynebacterium glutamicum* is equipped with four secondary carriers for compatible solutes: identification, sequencing, and characterization of the proline/ectoine uptake system, ProP, and the ectoine/proline/glycine betaine carrier, EctP. *J. Bacteriol.* **180**: 6005-6012.
- Poolman, B. und Glaasker, E. (1998)** Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol. Microbiol.* **29**: 397-407.
- Potts, M. (1994)** Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol. Rev.* **58**: 755-805.
- Puech, V., Bayan, N., Salim, K., Leblon, G. und Daffé, M. (2000)** Characterization of the *in vivo* acceptors of the mycolyl residues transferred by the corynebacterial PS1 and the related mycobacterial antigens 85. *Mol. Microbiol.* **35**: 1026-1041.
- Puech, V., Chami, M., Lemassu, A., Laneelle, M. A., Schiffler, B., Gounon, P., Bayan, N., Benz, R. und Daffé, M. (2001)** Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non-covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane. *Microbiology* **147**: 1365-1382.
- Reinders, A., Bürckert, N., Hohmann, S., Thevelein, J. M., Boller, T., Wiemken, A. und De Virgilio, C. (1997)** Structural analysis of the subunits of the trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex in *Saccharomyces cerevisiae* and their function during heat shock. *Mol. Microbiol.* **24**: 687-695.
- Rest, van der, M. E., Lange, C. und 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.
- Rönsch, H. (2001)** Untersuchungen zum Einfluss der Osmoregulation auf die Aminosäureproduktion mit *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation an der Universität zu Köln.

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

**Saito, K., Kase, T., Takahashi, E., Takahashi, E. und Horinouchi, S. (1998)** Purification and characterisation of a trehalose synthase from the basidiomycete *Grifola frondosa*. *Appl. Env. Microbiol.* **64**: 4340-4345.

**Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T (1989)** Molecular Cloning: A Laboratory Manual, *Cold Spring Harbor Laboratory*, Cold Spring Harbor, N.Y.

**Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. und 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.

**Schneider, D., Bruton, C. J. und Chater, K. F. (2000)** Duplicated gene clusters suggest an interplay of glycogen and trehalose metabolism during sequential stages of aerial mycelium development in *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Gen. Genet.* **263**: 543-553.

**Schlosser, A., Weber, A. und Schrempf, H. (2001)** Synthesis of the *Streptomyces lividans* maltodextrin ABC transporter depends on the presence of the regulator MalR. *FEMS Microbiol. Lett.* **196**: 77-83.

**Schrumpf, B., Eggeling, L. und Sahm, H. (1992)** Isolation and prominent characteristics of an l-lysine hyperproducing strain of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 566-571.

**Schuster, R. (1988)** Determination of amino acids in biological, pharmaceutical, plant and food samples by automated pre-column derivatization and high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **431**: 271-284.

**Shimakata, T., Iwaki, M. und Kusaka, T. (1984)** In vitro synthesis of mycolic acids by the fluffy layer fraction of *Bacterionema matruchotii*. *Arch. Biochem. Biophys.* **229**: 329-339.

**Shimakata, T., Tsubokura, K. und Kusaka, T. (1986)** Requirement of glucose for mycolic acid biosynthetic activity localized in the cell wall of *Bacterionema matruchotii*. *Arch. Biochem. Biophys.* **247**: 302-311.

**Shimakata, T. und Minatogawa, Y. (2000)** Essential role of trehalose in the synthesis and subsequent metabolism of corynomycolic acid in *Corynebacterium matruchotii*. *Arch. Biochem. Biophys.* **380**: 331-338.



- Siewe, R. M., Weil, B. und Krämer, R. (1995)** Glutamine uptake by a sodium-dependent secondary transport system in *Corynebacterium glutamicum*. *Arch. Microbiol.* **164**: 98-103.
- Sola-Penna, M. und Meyer-Fernandes, J. R. (1998)** Stabilization against thermal inactivation promoted by sugars on enzyme structure and function: why is trehalose more effective than other sugars? *Arch. Biochem. Biophys.* **360**: 10-14.
- Spargo, B. J., Crowe, L. M., Ionedo, T., Beaman, B. L. und Crowe, J. H. (1991)** Cord factor (alpha, alpha-trehalose 6,6'-dimycolate) inhibits fusion between phospholipid vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 737-740.
- Strøm, A. R. und Kaasen, I. (1993)** Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress protection and stress regulation of gene expression. *Mol. Microbiol.* **8**: 205-210.
- Sweeley, C. C., Bentley, R., Makita, M. und Wells, W. W. (1963)** Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. *J. Am. Chem. Soc.* **85**: 2497-2507.
- Takayama, K. und Qureshi, N. (1984)** In: Kubica, G. P. und Wayne, L. G. (eds.). *The mycobacteria*, a sourcebook, part A, Microbiology Series **15**: 315-344. *Marcel Dekker Inc.*, N.Y.
- Thevelein, J. M. (1984)** Regulation of trehalose mobilization in fungi. *Microbiol. Rev.* **48**: 42-59.
- Thevelein, J. M. und Hohmann, S. (1995)** Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast? *Trends Biochem. Sci.* **20**: 3-10.
- Thevelein, J. M. (1996)** Regulation of trehalose metabolism and its relevance to cell growth and function. In: Brambl, R., Marzluf, G. A. (eds.). *The mycota*. **3**: 395-414. Springer, Berlin Heidelberg New York.
- Tsusaki, K., Nishimoto, T., Nakada, T., Kubota, M., Chaen, H., Sugimoto, T. und Kurimoto, M. (1996)** Cloning and sequencing of trehalose synthase gene from *Pimelobacter sp.* R48. *Biochim. Biophys. Acta* **21**: 1-3.
- Vieira, J. und Messing, J. (1982)** The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**: 259-268.
- Vogel, G., Aeschbacher, R. A., Müller, J., Boller, T. und Wiemken, A. (1998)** Trehalose-6-phosphate phosphatases from *Arabidopsis thaliana*: identification by functional complementation of the yeast tps2 mutant. *Plant J.* **13**: 673-683.
- Vuorio, O. E., Kalkkinen, N. und Londesborough, J. (1993)** Cloning of two related genes encoding the 56-kDa and 123-kDa subunits of trehalose synthase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **216**: 849-861.

- Walker, R. W., Prome, J. C. und Lacave, C. S. (1973)** Biosynthesis of mycolic acids. Formation of a C32 beta-keto ester from palmitic acid in a cell-free system of *Corynebacterium diphtheriae*. *Biochim. Biophys. Acta* **326**: 52-62.
- Whatmore, A. M. und Reed, R. H. (1990)** Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis*: a possible role for K<sup>+</sup> in turgor regulation. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 2521-2526
- Whatmore, A. M., Chudek, J. A. und Reed, R. H. (1990)** The effects of osmotic upshock on the intracellular solute pools of *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 2527-2535.
- Wood, J. M. (1999)** Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 230-262.
- Xie, G. und Timasheff, S. N. (1997)** The thermodynamic mechanism of protein stabilization by trehalose. *Biophys. Chem.* **64**: 25-43.
- Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D. und Somero, G. N. (1982)** Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**: 1214-1222.
- Yanisch-Perron, C., Vieira J. und Messing, J. (1985)** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
- Youxing, Q., Bolen, C. L. und Bolen, W. (1998)** Osmolyte-driven contraction of a random coil protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 9268-9273.

---

## **DANKSAGUNG**

Bei Herrn Prof. Krämer bedanke ich mich für die Überlassung des Themas, die engagierte Betreuung dieser Arbeit und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Bei Herrn Prof. Sterner möchte ich mich für die Erstellung des Zweitgutachtens bedanken.

Dr. Susanne Morbach danke ich für die Betreuung dieser Arbeit.

Meiner Arbeitsgruppe (Udo Burger, Johannes Botzenhardt, Eva Glees, Oliver Ley, Ute Meyer, Nina Möker, Dirk Schiller, Ralf Steger und Martin Weinand) danke ich für die stets gute und lustige Arbeitsatmosphäre, die einen großen Beitrag zur Freude an der Arbeit geleistet hat.

Bei Rolf Hecker und Klaus Bollig möchte ich mich für den Austausch von GC-Know-How und Zubehör bedanken. Ohne diese Dinge wäre das Leben sehr viel schwieriger gewesen...

Ein herzlicher Dank gilt auch meinen Kooperationspartnern am CNRS (Université Paul Sabatier, Toulouse, Frankreich) Marielle Tropis und Dr. Mamadou Daffé für das Interesse an meiner Arbeit und wichtigen Ergebnisse, die sie zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Sergej Strelkov aus der AG Schomburg für die Hilfestellung bei der Bestimmung von Tre-6-P und die vielen anderen Aspekte, die diese Analysen eröffnet haben.

---

## **ERKLÄRUNG**

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. R. Krämer betreut worden.

keine Teilpublikationen

**Andreas Wolf**