
INHALTSVERZEICHNIS

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

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

| | |
|-----------------------------------|------------|
| VI. LITERATURVERZEICHNIS | 87 |
| VII. ANHANG | 101 |
| 1. Oligonukleotidsequenzen | 101 |
| 2. Plasmidkarten | 104 |
| 3. Daten der LightCycler-Analysen | 112 |