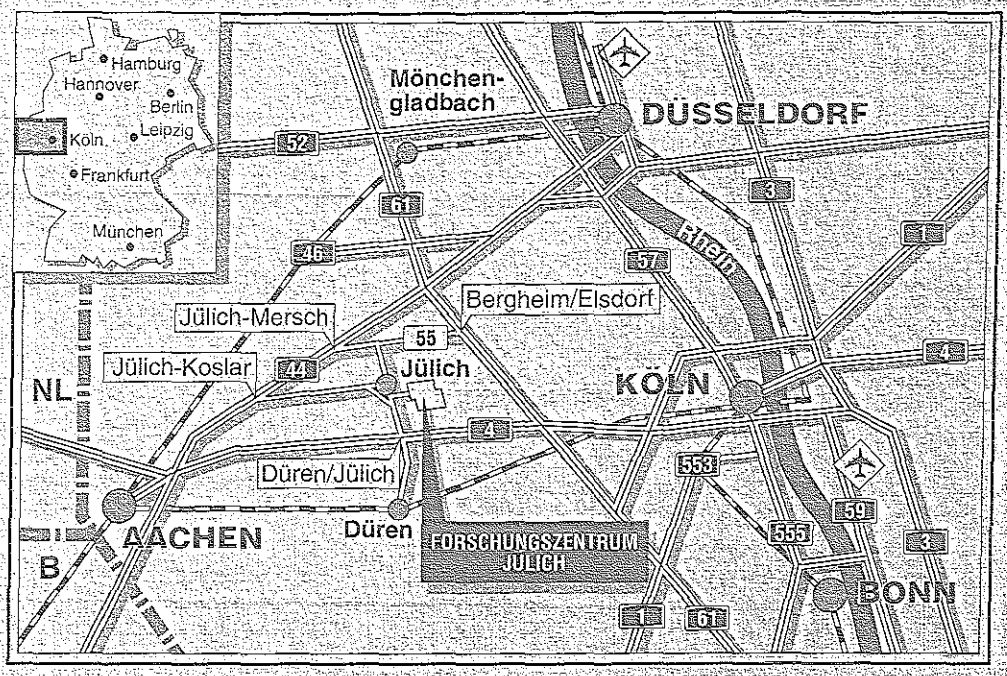
FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH

Institut für Biotechnologie

Das Diaminopimelat-Gencluster aus *Corynebacterium glutamicum*: Physiologische Untersuchungen zur verzweigten Lysinbiosynthese und zum Transport aromatischer Aminosäuren

Axel Wehrmann



Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3088
ISSN 0944-2952
Institut für Biotechnologie Jül-3088
D61 (Diss. Universität Düsseldorf)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
Telefon: 02461/61-6102 · Telefax: 02461/61-6103 · Telex: 833556-70 kfa d

Das Diaminopimelat-Gencluster aus *Corynebacterium glutamicum*: Physiologische Untersuchungen zur verzweigten Lysinbiosynthese und zum Transport aromatischer Aminosäuren

Axel Wehrmann

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
A.L.F.	Automated Laser Fluoreszenz
Ap^r	Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
BHI	Brain heart infusion
bp	Basenpaare
C	Celsius
CCCP	Carboxylcyanid-m-chlorophenylhydrazon
CoA	CoEnzym A
Da	Dalton
DMSO	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Dithiothreitol
DTNB	5,5`-Dithiobis(2-nitrobenzoat)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F	Farad
g	Gramm
GABA	γ-Aminobutyrat
h	Stunden
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropylthiogalactosid
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
Km^r	Kanamycinresistenz
kb	Kilobasen
kV	Kilovolt
l	Liter
M	Mol
min	Minuten
mM	Millimol
MOPS	3-N-Morpholino-propansulfonsäure
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsalz
nm	Nanometer
Nx^r	Nalidixinsäureresistenz

OD_{600}	optische Dichte bei 600 nm
orf	Offenes Leseraster
Phe	Phenylalanin
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunden
t	Tonnen
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N`,N`,-Tetramethyethylendiamin
TG	Trockengewicht
TPP^+	Tetraphenylphosphoniumbromid
Tris	2-Amino-hydroxymethylpropan-1,3-diol
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
U	Enzymeinheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
v_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
X-Gal	5-Bromo-4-chlor-3-indolyl-β-galactopyranosid
X-Phosphat	5-Bromo-4-chlor-2-indolylphosphat
$\Delta\Psi$	Membranpotential

1. EINLEITUNG

Meso-Diaminopimelat ist eine für Prokaryoten und höhere Pflanzen spezifische Substanz. Es bildet ein obligates Intermediat bei der L-Lysinsynthese (Patte, 1983) und ist darüberhinaus für viele Gram-positive und Gram-negative Bakterien ein essentieller Zellwandbaustein (Schleifer & Kandler, 1972). Diese bedeutende Rolle als Vorstufe dualer Funktion machte meso-Diaminopimelat (D,L-DAP) seit seiner Entdeckung (Work, 1949) zu einem Objekt intensiver Forschung, sowohl grundlegender als auch anwendungsbezogener Art. Nach der Aufklärung des Biosyntheseweges in *Escherichia coli* (Gilvarg, 1958) und später in *Bacillus* species (Sundharadas & Gilvarg, 1967; Misono *et al.*, 1976) gibt es zur Zeit eine Reihe von Versuchen, durch spezifische Inhibitoren die D,L-DAP-Synthese zu hemmen (Higgins *et al.*, 1989; Williams & Yuan, 1992), oder durch Strukturanaloga den Einbau in die Zellwand, bzw. die Decarboxylierung zum L-Lysin zu verhindern (van Asche *et al.*, 1991; Le Roux *et al.*, 1992). Da Säuger weder D,L-DAP noch L-Lysin synthetisieren können, würden sich entsprechende antimikrobielle und herbizide Agentien durch eine höchstwahrscheinlich geringe Toxizität für den Menschen auszeichnen. Bislang konnten jedoch nur wenige wirkungsvolle Inhibitoren synthetisiert werden, was aller Wahrscheinlichkeit nach in der hohen Spezifität aller an der D,L-DAP- und L-Lysinsynthese beteiligten Enzyme begründet liegt (Kelland *et al.*, 1986; Lin *et al.*, 1988; Abbott *et al.*, 1994). Dennoch bleibt zu testen, ob D,L-DAP-Analoga tatsächlich keine toxischen Effekte für den Menschen haben. Beispielsweise konnte aus dem Cytotoxin von *Bordetella pertussis*, einem Muramylpeptid, γ-D-Glutamat-D,L-DAP als kleinste toxische Komponente isoliert werden, und überraschenderweise wurden sogar im menschlichen Gehirn Rezeptoren identifiziert, die D,L-DAP erkennen (Luker *et al.*, 1993).

Die Synthese von D,L-DAP geht von L-Aspartat aus, das durch Aspartatkinase und Aspartatsemialdehyddehydrogenase zu L-Aspartatsemialdehyd umgewandelt wird. Um dieses Substrat konkurrieren die Homoserindeydrogenase, die die Vorläufer für die Bildung von L-Threonin, L-Isoleucin und L-Methionin zur Verfügung stellt, sowie die Dihydrodipicolinatsynthase, die den Kohlenstofffluß in Richtung D,L-DAP und L-Lysin ermöglicht. Durch die nachfolgende Reduktasereaktion entsteht L-Piperidin-2,6-dicarboxylat (Tetrahydrodipicolinat), dessen Katalyse zu D,L-DAP prinzipiell über drei verschiedene Varianten erfolgen kann. Bei dem am Besten untersuchten Syntheseweg, in *E. coli,* erfolgt zunächst eine Succinylierung

durch die Tetrahydrodipicolinatsuccinylase. Nach Transaminierung der Ketogruppe durch die N-Succinylaminoketopimelattransaminase wird die Succinylgruppe wieder abgespalten (N-Succinyldiaminopimelatdesuccinylase) und es erfolgt eine Epimerisierung (Diaminopimelatepimerase) des L,L-DAP zu D,L-DAP (Gilvarg, 1958). Die Acetylasevariante, bei der die Acylierung durch einen Acetylrest erfolgt, ist in *Bacillus subtilis* und *B. megaterium* verwirklicht (Weinberger & Gilvarg, 1970). In *B. sphaericus* wurde die dritte Möglichkeit zur D,L-DAP-Synthese nachgewiesen (Misono *et al.*, 1976; White, 1983), die ausschließlich bei einigen Prokaryoten vorkommt (Chaterjee *et al.*, 1994); bei dieser Dehydrogenasevariante erfolgt eine direkte reduktive Aminierung des Tetrahydrodipicolinats zu D,L-DAP. Für alle diese Bakterien konnte gezeigt werden, daß jeweils nur eine der drei möglichen Varianten etabliert ist. In *Corynebacterium glutamicum* konnte jedoch sowohl der Succinylase- als auch der Dehydrogenaseweg nachgewiesen werden (Schrumpf *et al.*, 1991), d.h. der Diaminopimelatweg ist in zwei Äste gespalten (s. Abb.1). Dieser verzweigte Weg wurde bereits früher durch Ishino *et al.* (1984) aufgrund von ^{13}C-NMR-Studien vorgeschlagen, doch liefen alle Versuche, einen genetischen Beweis für die Existenz beider Varianten in *C. glutamicum* zu finden, bislang fehl (Yeh *et al.*, 1988; Ishino *et al.*, 1988).

Corynebacterium glutamicum, ein Gram-positives, nicht sporulierendes Bodenbakterium, wurde von Kinoshita *et al.* (1957) als *Micrococcus glutamicus* isoliert. Morphologische Merkmale sind die Unbeweglichkeit der stäbchen- bis keulenförmigen Zellen sowie ein als "*snapping*" bezeichneter Zellteilungsmodus (Komagata *et al.*, 1969). Taxonomisch relevante Charakteristika sind D,L-DAP als essentieller Peptidoglykanbaustein (Yamada & Komagata, 1970) und als weitere Zellwandbestandteile die Zucker Galaktose und Arabinose sowie freie kurzkettige Mycolsäuren (Keddie & Cure, 1977). Der GC-Gehalt des Genoms von *C. glutamicum* ATCC13032 beträgt 56,8% (Abe *et al.*, 1967) und die Gesamtgenomlänge ist mit 2987 kb zwar deutlich kleiner als die von *E. coli*, aber ähnlich oder sogar größer als die anderer Gram-positiver Bakterien (Correia *et al.*, 1994). Ein wichtiges, namengebendes Kriterium von *Corynebacterium glutamicum* ist die Fähigkeit, Glutamat in großen Mengen ins Medium zu sekretieren. Auch die physiologisch und biochemisch kaum von *C. glutamicum* zu unterscheidende Gattung *Brevibacterium*, wurde *Corynebacterium glutamicum* als Subspezies zugeordnet (Liebl *et al.*, 1991). Neben L-Glutamat werden auch andere Amino-

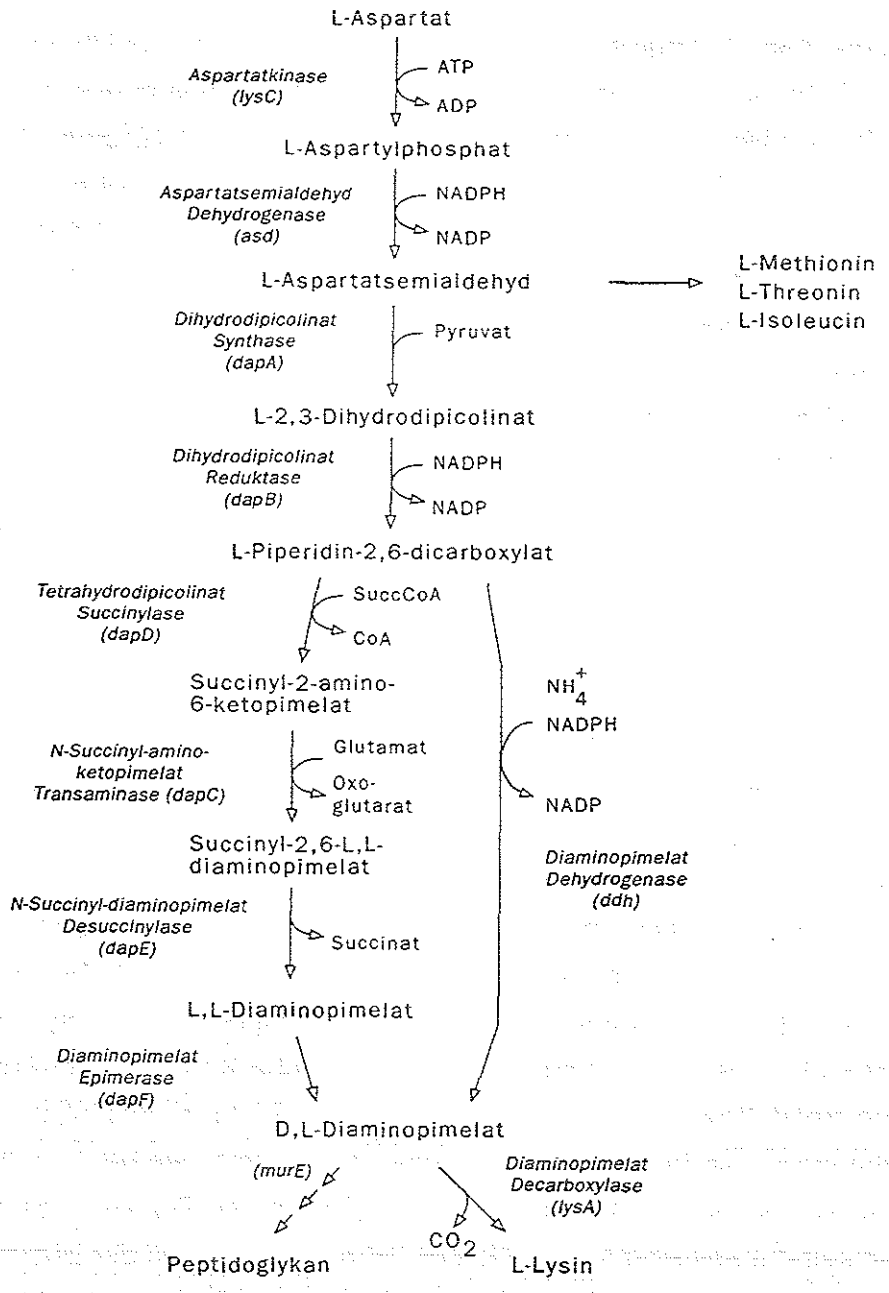


Abb.1 Der verzweigte D,L-Diaminopimelatweg in *C. glutamicum*

säuren, besonders L-Lysin, mit *C. glutamicum* mikrobiell produziert (Enei & Hirose, 1984; Eggeling, 1994).

Die Regulation der Biosynthese von D,L-DAP bzw. L-Lysin in *C. glutamicum* ist vergleichsweise einfach. Das einzige Enzym, das auf Aktivitätsebene reguliert

wird, ist die Aspartatkinase, die einer konzertierten Endprodukthemmung durch Lysin und Threonin unterliegt (Shiio & Miyajima, 1969). Alle anderen Enzyme des verzweigten L-Lysinsyntheseweges werden nicht reguliert (Cremer *et al.*, 1988; Schrumpf *et al.*, 1991). Im Gegensatz zu *E. coli* und *B. subtilis* werden in *C. glutamicum* keine Isoenzyme der Aspartatkinase (AK) gebildet. Während in *E. coli* die Aspartatkinase I durch Threonin und die Aspartatkinase III durch Lysin gehemmt wird (Cohen & Saint-Girons, 1987), werden die Isoenzyme von *B. subtilis* durch D,L-DAP (AK I), Lysin (AK II) und Lysin plus Threonin (AK III) gehemmt (Graves & Switzer, 1990; Zhang *et al.*, 1990). Darüberhinaus wird in *E. coli* die Dihydrodipicolinatsynthase am Verzweigungspunkt zur Threonin-, Isoleucin- und Methioninsynthese (Richaud *et al.*, 1986), und in *B. subtilis* die Diaminopimelatdecarboxylase am Verzweigungspunkt zur Zellwandsynthese (Grandgenett & Stahly, 1971; Rosner, 1975) jeweils durch das Endprodukt, Lysin, gehemmt.

Die Regulation der Enzymsynthese auf Transkriptionsebene spielt, auch wenn bislang keine detailierten molekulargenetischen Studien durchgeführt wurden, offenbar nur eine geringe Rolle bei der Biosynthese von D,L-DAP und L-Lysin in *C. glutamicum* (Cremer *et al.*, 1991; Schrumpf *et al.*, 1991). Wurde die Genrepression von *lysC, asd, dapB, dapD* und *lysA* in *E. coli* (Richaud *et al.*, 1980; Haziza *et al.*, 1982; Bouvier *et al.*, 1984; Richaud *et al.*, 1984; Boy *et al.*, 1979) und von *lysC* (AK II) und *lysA* in *B. subtilis* (Grandgenett & Stahly, 1971) durch Lysin gezeigt, so ist eine entsprechende genetische Kontrolle von Enzymen des Diaminopimelat- bzw. Lysinsyntheseweges von *C. glutamicum* bislang unbekannt. Dies gilt auch für die Induktion von Lysinsynthesegenen, wie bei *B. subtilis* (AK III-Gens; Graves & Switzer, 1990) und *E. coli* (*lysA* durch D,L-DAP; Stragier *et al.*, 1983). In keinem Fall sind, wie bei *E. coli*, starke Variationen der Enzymaktivitäten bei Kultivierung auf unterschiedlichen Medien beobachtet worden. Überraschend ist besonders die anscheinend fehlende Regulation von Enzymen der Lysinsynthese an den drei Stoffwechselverzweigungspunkten, erstens, zur Threonin-, Isoleucin- und Methioninsynthese, zweitens, zwischen Succinylase- und Dehydrogenaseweg und drittens, zwischen Zellwand- und Lysinsynthese. Untersuchungen zur Dihydrodipicolinatsynthase zeigten jedoch, daß bereits eine moderate *dapA*-Überexpression den *C. glutamicum* Wildtyp zu einem Lysinausscheider macht (Cremer *et al.*, 1991), so daß dieses Enzym offensichtlich an der Flußkontrolle beteiligt ist (Eggeling, 1994). Für die interne Verzweigung des Diaminopimelatweges konnten Sonntag *et al.* (1993) eine Abhängigkeit von

freiem Ammonium für die Nutzung beider Äste *in vivo* zeigen, so daß aufgrund der biochemischen Daten eine kinetische Kontrolle der Flußverteilung vorgeschlagen wurde. Das Gen für die am dritten Verzweigungspunkt aktive Diaminopimelat-decarboxylase , *lysA*, ist erstaunlicherweise mit *argS*, einem Gen für eine Arginyl-t-RNA Synthetase, in einem Operon organisiert (Marcel *et al.*, 1990; Sharp & Mitchell, 1993). Obwohl die biologische Relevanz nicht klar ist, ist ein regulatorischer Einfluß auf einer anderen Ebene, etwa der stringenten Kontrolle (Cashel & Rudd, 1987), durchaus denkbar.

L-Lysin, das Decarboxylierungsprodukt von D,L-DAP, stellt eine für Vertebraten essentielle Aminosäure dar und liegt, wie L-Threonin und L-Tryptophan, auch in vielen Kulturpflanzen in wachstumslimitierenden Konzentrationen vor. Neben Bestrebungen in jüngerer Zeit, durch transgene Pflanzen (Shaul & Galili, 1992, 1993) oder durch Expression bakterieller Lysinsynthesegene in tierischen Zellinien (Saqib *et al.*, 1994) direkt eine höhere L-Lysinverfügbarkeit zu erreichen, wird bereits seit mehreren Jahrzehnten L-Lysin mikrobiell produziert, um als Futtermittelzusatz Verwendung zu finden (Yoshinaga & Nakamori, 1983). Hier nutzt man die beschriebene geringere individuelle Regulation der an der D,L-DAP-Synthese beteiligten Enzyme in *C. glutamicum*. Gegenwärtig werden pro Jahr 180000 t L-Lysin mikrobiell synthetisiert, fast ausschließlich mit *C. glutamicum* oder dessen Unterarten *flavum* und *lactofermentum* (Sahm *et al.*, 1995). Allen Lysinproduzenten gemeinsam ist eine *feedback*-resistente Aspartat-kinase. Solche deregulierten Mutanten können durch ein *screening* auf Resistenz gegen S-(2-Aminoethyl)-L-Cystein, einem Lysinanalogon, isoliert werden (Thierbach *et al.*,1990). Diese Ausschaltung der Endprodukthemmung führt zu einem verstärkten Fluß zum Lysin, da das Gen für die Homoserindehydrogenase, *hom*, durch die verstärkte Methioninsynthese reprimiert (Miyajima & Shiio, 1971) und das Enzym durch Isoleucin und Threonin gehemmt wird (Miyajima *et al.*, 1968). Da *C. glutamicum* nicht in der Lage ist Lysin abzubauen (Nakayama, 1985), kommt es zu einem Anstau dieser Aminosäure im Cytoplasma und letztlich zur Sekretion ins Medium. Interessanterweise besitzt *C. glutamicum* einen spezifischen Sekretionscarrier für L-Lysin, der sich kinetisch eindeutig vom L-Lysinaufnahmesystem unterscheidet (Bröer & Krämer, 1990; Bröer & Krämer, 1991a). Bei der Lysinsekretion wird L-Lysin im Symport mit zwei Hydroxylionen sezerniert (Bröer & Krämer, 1991b), und es gibt Hinweise darauf, daß neben der deregulierten Aspartatkinase auch ein modifizierter Sekretionscarrier die Produktivität von Lysinproduktionsstämmen entscheidend beeinflußt (Bröer *et al.*, 1993).

Die zweite wichtige Funktion von D,L-DAP ist die Beteiligung am Zellwandaufbau, die bereits 1956 von L. E. Rhuland erkannt wurde. *C. glutamicum* besitzt wie *E. coli*, *Bacillus subilis* und *B. megaterium* eine Zellwand, die sich durch eine direkte Quervernetzung von Peptidoglykansträngen über D,L-DAP auszeichnet (Schleifer & Kandler, 1972). Die Synthese des Peptidoglycans erfolgt über eine Polymerisierung von Disaccharid-Pentapeptid-Untereinheiten, die über ein Undecaprenylphosphatlipid in der Membran verankert sind. Dieses Disaccharid besteht aus N-Acetylglucosamin, das über eine β-1,4 glykosidische Bindung mit N-Acetylmuraminsäure verknüpft ist. Das Pentapeptid wird aus alternierenden L- und D-Aminosäuren, hier L-Alanin, D-Glutamat, D,L-DAP und D-Alanin-Dipeptid, aufgebaut und ist über eine Amidbindung mit dem Muramyl-Rest verbunden. Während die Aminosäuren L-Alanin, D-Glutamat und D,L-DAP sukzessive unter ATP-Hydrolyse durch spezifische "adding enzymes" mit der aktivierten N-Acetylmuraminsäure verknüpft werden, werden beide D-Alaninreste zunächst durch eine Ligase untereinander verbunden, bevor die Amidbindung mit der α-Carboxylgruppe des D,L-DAP eingegangen wird. Ist die Synthese des Peptidoglycans bei Gram-positiven und Gram-negativen gleich, so ist die resultierende Zellwandstruktur letztlich völlig verschieden. Während erst kürzlich Labischinski *et al.* (1991) eindeutig den Aufbau der Gram-negativen Zellwand als prinzipiell einlagig und nur partiell dreilagig bestimmen konnte, ist für Gram-positive bereits länger bekannt, daß der Peptidoglycanlayer mehrschichtig und bis zu 10mal dicker ist als in Gram-negativen Bakterien. Dieser Unterschied wird sowohl durch die Notwendigkeit eines stärkeren Wanddruckes, der dem hohen Turgor von 24 atm (Mendelson & Thwaites, 1989) entgegenwirkt, als auch durch die Schaffung eines extrazellulären Kompartimentes, das funktionell dem Periplasma Gram-negativer Bakterien entspricht, erklärt (Archibald *et al.*, 1993). Während Wachstumsmodelle für die Zellwände von Kokken oder stäbchenförmigen Gram-positiven wie Gram-negativen Bakterien bestehen (Koch *et al.*, 1981; Labischinski *et al.*, 1993; Höltje, 1993), gibt es bislang keine zufriedenstellende Antwort auf die Frage, wie die typische coryneforme Gestalt beim Zellwachstum aufrechterhalten wird (Koch, 1988). Eine Schlüsselrolle nimmt in jedem Fall die ε-Aminogruppe des D,L-DAP in der Zellwand ein. Sie fungiert als Donor für die Quervernetzung mit einem anderen Peptidoglycanstrang, meist als DAP-Ala-Peptidbrücke, z.T. auch als DAP-DAP-Peptidbrücke. Diese Quervernetzung verleiht den helikal um die Bakterienlängsachse gewundenen Peptidoglycansträngen die Möglichkeit, einerseits für die notwendige Stabilität zu sorgen, andererseits eine größtmögliche Elastizität während des Zellwachstums zu gewährleisten (Archibald *et*

al.,1993; Koch & Woeste, 1992). Aus diesem Grund ist die ausreichende Verfügbarkeit von D,L-DAP von großer Bedeutung für die Aufrechterhaltung von Zellform und Zellwachstum. Nur in wenigen Fällen konnte bislang eine Substituierung des essentiellen D,L-DAP durch ähnliche Metabolite wie L,L-DAP, Cystathion oder Lanthionin nachgewiesen werden (Mengin-Lecreulx *et al.*, 1988; Mengin-Lecreulx *et al.*, 1994).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Hinweise auf die Bedeutung des verzweigten Diaminopimelatweges für *C. glutamicum* zu erlangen. Die Tatsache, daß *C. glutamicum* sich diesen luxuriösen anabolen Stoffwechselweg "leistet", deutet auf eine mögliche wichtige Funktion des Succinylaseweges hin, zumal er energieaufwendiger als die Konkurrenzreaktion, der Dehydrogenaseweg, ist. Offensichtlich sind jedoch aus evolutionärer Sicht beide Wege nicht redundant. Möglicherweise ist der verzweigte Diaminopimelatweg entweder für eine ausreichende Lysinbildung für die Proteinbiosynthese und oder für die optimale Verfügbarkeit des essentiellen Zellwandbausteins D,L-DAP notwendig. Bislang konnten alle Gene, die für die sechs Enzyme der Lysinsynthese ausgehend vom Aspartat über den Dehydrogenaseweg codieren, aus *C. glutamicum* isoliert werden (Kalinowski *et al.*, 1991; Cremer *et al.*, 1990; Ishino *et al.*, 1988; Yeh *et al.*, 1988b). Allerdings führten alle Ansätze, mit denen auch Gene für Enzyme des Succinylaseweges hätten isoliert werden können, nicht zum Erfolg (Ishino *et al.*, 1988; Yeh *et al.*, 1988a). Zu Beginn dieser Arbeit lagen nur aus *E. coli* drei der vier Gene, die für die Enzyme des Succinylaseweges codieren, *dapD*, *dapE* und *dapF* kloniert vor (Richaud *et al.*, 1984; C. Richaud, pers. Mitteilung 1989; Mengin-Lecreulx *et al.*, 1988). Bis heute ist es nicht gelungen auch *dapC*, das Gen für die N-Succinylaminoketopimelat Transaminase, zu isolieren (C. Richaud, pers. Mitteilung 1995). In ersten Versuchen konnte gezeigt werden, daß auch aus *C. glutamicum* die Gene *dapD* und *dapE*, die für die Enzyme des ersten und dritten Schrittes des Succinylaseweges codieren, zwar funktionell, aber nicht strukturell intakt kloniert werden konnten (Wehrmann, 1991). Mit Hilfe neuer Strategien sollten diese Gene zunächst strukturell intakt isoliert werden, um dann durch gezielte Mutagenese Stämme mit Defekt im Succinylaseweg zu erzeugen. Die anschließende physiologische Charakterisierung sollte Aufschluß über die Funktion des bislang nur für *C. glutamicum* nachgewiesenen verzweigten Diaminopimelatweges geben.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme der Gattungen *Escherichia coli* und *Corynebacterium glutamicum* sind in Tabelle 1, die verwendeten Plasmide in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 1: Bakterienstämme und ihre Eigenschaften

Stamm	Genotyp, Phänotyp	Referenz
E. coli		
DH5	*thi-1, endAR1, gyrA96, F⁻, relA1, supE44, recA1, hsdR17* (r^-m^+)	Hanahan, 1985
S17-1	*thi-1, endAR1, supE44, pro, hsdR17* (r^-m^+)	Simon *et al.*, 1983
NM522	*supE, thi*, Δ(*lac-proAB*), Δhsd5 (r^-m^-), {F´,*proAB,lacI*^{q}ZΔM15}	Gough & Murray, 1983
RDD32	*araD139, thi*, Δ(*lac*)U168, *strA, dapD*::MuCts	Richaud *et al.*, 1981
RDE51	*araD139, thi*, Δ(*lac*)U168, *strA, dapE*::MuCts	Richaud *et al.*, 1981
C. glutamicum		
ATCC 13032	Wildtyp, Nx^r	Abe *et al.*, 1967
MH20-22B	*lysC*^{FBR}, *leuCD*, Lysinproduzent	Schrumpf *et al.*, 1992
AS70	ATCC13032 *ddh*::pEM*ddh*$_{int}$	Schrumpf *et al.*, 1991
AS73	MH20-22B *ddh*::pEM*ddh*$_{int}$	Schrumpf *et al.*, 1991
49-3	*lysA*	Vrljic *et al.*, 1995
NA8	Defekt in der Lysinsekretion	Vrljic *et al.*, 1995

Tabelle 2: Verwendete Plasmide mit ihren Eigenschaften und Markern

Plasmid	Marker / Eigenschaft	Referenz
pUC18/pUC19	Ap^r, $oriV_{E.c.}$,2,7kb	Yanisch-Perron *et al.*, 1985
pEM1	Integrationsvector, Km^r,$oriV_{E.c}$, *oriT*, 3,3kb	Schrumpf *et al.*, 1991
pK18mobsacB	Integrationsvector, Km^r,$oriV_{E.c}$, *oriT*, *sacB*, 5,7kb	Schäfer *et al.*, 1994
pJC1	Pendelvector, Km^r,$oriV_{E.c}$, $oriV_{C.g}$, 6,0kb	Cremer *et al.*, 1990
pEKEx2	Pendel- und Expressionsvektor, Km^r,$oriV_{E.c}$, $oriV_{C.g.}$, 6,1kb	Eikmanns *et al.*, 1991
pAW111	pUC18 mit 1,5kb Sau3A-Fragment, ddh^+	Wehrmann, 1991
pAW113	pUC18 mit 1,6kb *Pvu*II-*Xho*I-Fragment, ddh^+	Wehrmann, 1991
pAW141	pUC18 mit 2,85kb *Bam*HI-Fragment, $dapD^+$, $dapE^+$	Wehrmann, 1991
pE14	pUC18 mit 1,9kb Sau3A-Fragment, $dapE^+$	Wehrmann, 1991

2.2 Nährmedien und Kulturbedingungen

Nährmedien für *E. coli*:

E. coli-Stämme wurden zur Stammhaltung auf LB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) mit 16 g/l Bacto-Agar kultiviert. Das gleiche Medium wurde zur Anzucht von Zellen für die Elektroporation genutzt. Zur DNA-Isolierung und Herstellung kompetenter Zellen wurde 2xTY-Medium verwendet (Sambrook *et al.*, 1989).

Nährmedien für *C.glutamicum*:

C. glutamicum-Stämme wurden zur DNA-Isolierung in dem Komplexmedium 2xTY angezogen. Die Anzucht für die in die Elektroporation eingesetzten Zellen erfolgte

in LB-Medium, das zusätzlich noch Isonikotinsäurehydrazid [4,0 g/l], 2,5% Glycin (vol/vol) und 0,1% Tween 80 (vol/vol) zur Zellwandmodifikation (Haynes & Britz, 1989) enthielt. Zur Regeneration der Zellen nach der Elektroporation wurde LBHIS-Medium verwendet (Liebl *et al.*, 1989), bei dessen Herstellung Sorbit und LBHI in jeweils dem halben Volumen *aqua dest.* getrennt autoklaviert wurden. Wachstumsexperimente wurden mit CgIII- (Eggeling *et al.*, 1987), bzw. BHI-Komplexmedium (Difco Laboratories, Detroit) oder in CgXII-Medium (Keilhauer *et al.*, 1993) mit BHI-Vorkultur durchgeführt. Tabelle 3 zeigt die Zusammensetzung von CgXII, des modifizierten Mediums CgXIIN sowie des Lysinproduktions-mediums 22B.

Tabelle 3: Verwendete Minimalmedien für *C. glutamicum*

Substanz	CGXII	CGXIIN	22B-Spezialmedium
$(NH_4)_2SO_4$	20 g/l	-	40 g/l
Harnstoff	5 g/l	-	-
Casamin-Hydrolysat	-	5 g/l	-
KH_2PO_4	1 g/l	1 g/l	0,5 g/l
K_2HPO_4	1 g/l	1 g/l	0,5 g/l
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,25 g/l	0,25 g/l	0,25 g/l
MOPS	42 g/l	42 g/l	-
L-Leucin	-	-	0,3 g/l
$FeSO_4 \times 7H_2O$	10 mg/l	10 mg/l	10 mg/l
$MnSO_4 \times H_2O$	10 mg/l	10 mg/l	10 mg/l
$ZnSO_4 \times 7H_2O$	1 mg/l	1 mg/l	1 mg/l
$CuSO_4$	0,2 mg/l	0,2 mg/l	0,2 mg/l
$NiCl_2 \times 6H_2O$	0,02 mg/l	0,02 mg/l	0,02 mg/l
Biotin	0,2 mg/l	0,2 mg/l	0,2 mg/l
Protokatechusäure *	30 mg/l	30 mg/l	-
$CaCO_3$**	-	-	20 g/l
Glukose **	4 %	4 %	10 %

* = sterilfiltriert

** = getrennt autoklaviert

Selektionsmarker:
Es wurden die Antibiotika Ampicillin [40 mg/l] und Kanamycin [50 mg/l] für die Selektion rekombinanter *E. coli*-Stämme eingesetzt. Selektion von *C. glutamicum* erfolgte auf Kanamycin [50 mg/l, bzw. 25 mg/l auf Regenerationsmedien nach Elektroporation und 10 mg/l nach Konjugation] sowie auf 10% Saccharose bei der Isolierung von Deletionsmutanten mittels pK18mobsacB.

Kultivierung der Bakterien:
Für Wachstumsexperimente mit *C. glutamicum*-Stämmen wurden 50 ml BHI-Medium in 500 ml Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen von einer Stammplatte angeimpft und über Nacht bei 30 °C und 140 Upm inkubiert. Diese Vorkultur wurde in der Minifuge RF (Heraeus Christ GmbH, Osterode) geerntet, einmal mit 0,9 % NaCl gewaschen und damit 60 ml Minimalmedium pro 500 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen so beimpft, daß, wenn nicht anders angegeben, eine optische Dichte von 0,5 erreicht wurde (λ = 600 nm, Zeiss Photometer PM6, Oberkochen). Die Kulturen wurden wie die Vorkulturen inkubiert und zu geeigneten Zeitpunkten Proben entnommen. 22B-Spezialmedium wurde mit einer Anfangs-OD_{600} von 2,3 beimpft.

Zur Bestimmung der spezifischen Aufnahmerate für aromatische Aminosäuren und den Untersuchungen zur Tyrosinsekretion nach Dipeptidfütterung wurden die Zellen nach Morakkabati (1994) nach dem Ernten der Vorkultur auf 20 ml CgXIIN überimpft, für 3 Stunden bei 30 °C inkubiert, einmal mit CGXII-Puffer (CGXII-Medium ohne Kohlen- und Stickstoffquelle) gewaschen und 2 Stunden auf N-Hungermedium CGXIIN$^-$ (CGXII ohne Stickstoffquelle) inkubiert. Anschließend erfolgte nach Waschen mit 0,9 % NaCl und CGXII-Puffer die radiochemische Aufnahmemessung oder die erneute Überimpfung auf CGXIIN$^-$ mit 1 mM Dipeptid.

100 ml CGIII-Medium in 500 ml Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen wurde für die Kultivierung von *C. glutamicum*-Stämmen zur Bestimmung der spezifischen Enzymaktivitäten eingesetzt. Für Plasmidisolierungen aus *E. coli* und *C. glutamicum* wurden 5 ml 2xTY-Medium im Reagenzglas bei 200 Upm oder 70 ml 2xTY-Medium im 500 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen bei 140 Upm über Nacht inkubiert. Die Inkubationstemperatur betrug bei *C. glutamicum* und *E. coli* RDD32 und RDE51 30 °C, bei anderen *E. coli*-Stämmen 37 °C.

Zur Stammhaltung wurden Dauerkulturen aus 70% (vol/vol) einer Übernachtkultur und 30% (vol/vol) sterilem Glycerin angelegt, die bei -20 °C aufbewahrt wurden. Sie dienten zum Animpfen der Stammhaltungsplatten, die bei +4 °C gelagert und monatlich erneuert wurden.

Plattentest zur Lysinausscheidung:
Die Lysinausscheidung von *C. glutamicum*-Stämmen wurde durch Kreuzfütterung durchgeführt. Dazu wurden nach Vrljic *et al.* (1995) Indikatorplatten hergestellt, die CgXII-Medium mit der lysinauxotrophen Mutante *C. glutamicum* 49/3 enthielten. Der Grad der Lysinsekretion konnte durch die Größe der Wachstumshöfe um die getesteten Klone nach zweitägiger Inkubation bei 30 °C bestimmt werden.

2.3 Analyse und Rekombination von DNA

2.3.1 Präparation von DNA

Für die schnelle Plasmidisolierung aus 1,5 ml Übernachtkultur von *E. coli* wurde eine nach Birnboim & Doly (1979) modifizierte Methode der alkalischen Lyse eingesetzt. Zur Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA mit einem höheren Reinheitsgrad wurde eine alkalische Lyse in Anlehnung an die bei Sambrook *et al.* (1989) beschriebene Methode durchgeführt. Dabei erfolgt, im Gegensatz zur schnellen Plasmidisolierung, vor der Plasmid-DNA-Aufreinigung eine zusätzliche Nukleinsäure-Fällung mit Isopropanol sowie ein RNA-Abbau.

Plasmidpräparationen aus *C. glutamicum* wurden analog durchgeführt. Die Lyse der Zellen wurde durch eine zweistündige Lysozym-Behandlung [20 mg/ml] bei 37 °C unter regelmäßigem, vorsichtigen Durchmischen ermöglicht.

Die Isolierung chromosomaler DNA aus *C. glutamicum* und *E. coli* erfolgte durch eine nach Altenbuchner & Cullum (1984) modifizierte Methode, wobei die Gesamt-DNA aus jeweils 3 ml einer 2xTY-Übernachtkultur nach Lysozym- und SDS-Behandlung (10 min, 65 °C) präpariert und aufgereinigt wurde.

2.3.2 Restriktion und Modifikation

Techniken zur DNA-Rekombination:
DNA-Techniken wie Restriktionen, DNA-Fällungen, Phenol-Extraktionen, Ligationen, Klenow-Reaktionen und Behandlungen mit alkalischer Phosphatase wurden nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Die notwendigen Enzyme wurden von Boehringer, Mannheim oder Fermentas MBI, St. Leon Rot (T4-DNA-Ligase) geliefert.

Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten:
Zum Nachweis der präparierten DNA erfolgte die elektrophoretische Auftrennung von durch Restriktionsenzymen generierten Fragmenten in TAE-Agarosegelen (0,8 %). Die Präparation von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe des QIAEX-Kits (Diagen, Hilden) durchgeführt.

Herstellung von Deletionsklonen mit Exonuklease III:
Mit Hilfe des Enzyms Exonuklease III konnten DNA-Fragmente sukzessive verkleinert werden (Henikoff, 1984; Hoheisel, 1993). Dazu wurde das "Erase-a-base" System (Promega, Madison USA) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Die so entstandenen überlappenden Deletionsklone konnten direkt in die Sequenzierung eingesetzt werden (Hoheisel & Pohl, 1986).

Erstellung von Genbänken
Zur Isolierung von *dapE* wurde eine partielle Genbank in pUC19 erstellt, die *Bam*HI-DNA-Fragmente des Genoms von *C. glutamicum* ATCC 13032 mit einer Größe von 2,5 - 4,3 kb aufweist (Wehrmann *et al.*, 1994). Dazu wurde chromosomale DNA mit *Bam*HI verdaut und in die singuläre BamHI-Schnittstelle des Vektors pUC19 ligiert. *E. coli* NM522 wurde mit diesem Ligationsansatz transformiert und auf LB-Agar mit Ampicillin (40mg/l), X-Gal (40mg/l) und IPTG (0,2 mM) ausplattiert. Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht wurden 740 weiße, d.h. inserttragende Kolonien gepickt, die die Genbank repräsentierten und für die Koloniehybridisierung eingesetzt wurden.

Bei den Versuchen zur Klonierung von *dapD* wurde analog eine partielle *Hin*dIII-Genbank errichtet, die Fragmente einer Größe von 4,3 bis 5,7 kb enthielt. 960 inserttragende Klone wurden mittels Koloniehybridisierung und Dot blot "gescreent".

2.3.3 Synthese von Oligonukleotiden

Synthese:

Synthetische Oligonukleotide wurden als Primer für die DNA-Sequenzierung verwendet. Die automatische Synthese erfolgte mit dem Gene Assembler Plus (Pharmacia/LKB, Freiburg). Bei diesem Verfahren, in dem Phosphoamidite verwendet werden, ist das 3´-Ende der Nukleotidkette an einer Festphase verankert. Die Synthese erfolgt durch Nukleotidkopplung unter wasserfreien Bedingungen im organischen Solvens Acetonitril. Die reaktiven Gruppen der Nukleotide sind während der Synthese durch Schutzgruppen maskiert, die im Anschluß an die Synthese entfernt werden müssen (Caruthers, 1985). Die synthetisierten Oligonukleotide wurden als Primer bei der nicht-radioaktiven Sequenzierung eingesetzt. Dabei wird die Detektion der Produkte der Sequenzierungsreaktion entweder durch Einsatz von Fluorescein-15-dATP (F-dATP) oder durch Fluoreszenz-markierte Primer ermöglicht. Im zweiten Fall wurde das 5´-Ende des Oligonukleotides zusätzlich mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelt.

Reinigung:

Zur Lösung der Oligonukleotide vom Säulenmaterial und der Abspaltung der Schutzgruppen wurde die Säule mit 1 ml 30%-iger Ammoniak-Lösung (-20 °C) in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel 16 h bei 50 °C inkubiert und das Eluat nach Abkühlung auf 4°C gesammelt (2 min, 2000 Upm). Diese Oligonukleotid-Lösung wurde auf eine mit H_2O equilibrierte NAP™-10-Säule (Sephadex G-25) aufgetragen und mit 1,5 ml H_2O eluiert. Fluoreszenz-markierte Oligonukleotide wurden direkt im Anschluß zur Entfernung FITC-spezifischer Verunreinigungen zusätzlich über HPLC gereinigt (Säule: Pharmacia SuperPac® Pep-S, 5 µM, 250 x 4 mm, Injektionsvolumen: 200 µl, Laufmittel A: 5% Acetonitril in 100mM Triethylaminacetat pH 7,0, Laufmittel B: 30% Acetonitril in 100mM Triethylaminacetat pH 7,0). Die Detektion der Fluoreszenz-markierten Oligonukleotide erfolgte mittels Fluoreszenzdetektor (260 nm / 491 nm), die entsprechenden Fraktionen (Retentionszeiten 15 und 17 min) wurden gesammelt, vereinigt, über Nacht in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet und in 0,5 ml H_2O resuspendiert. Die Konzentrationsbestimmung aller gereinigten Primer erfolgte photometrisch bei 260 nm, so daß die für die Sequenzierung geeigneten Verdünnungen erstellt werden konnten.

Primer zur Sequenzierung der ORF5-Fusionsstelle (vgl. Abb. 24):
I: 5´-(FITC)-GCCACCGCGAGCAAACCAGC-3´
III: 5´-(FITC)-GGTCGCGGTGATCATCGC-3´

Primer zur Sequenzierung der ORF5-*upstream*-Region (vgl. Abb. 4):
II: 5´-(FITC)-CCGGCACCAATTGCGGAGCCG-3´
IV: 5´-(FITC)-CGACTCCATCGAAGGCC-3´

Primer zur Sequenzierung einer GC-reichen Region in *dapD* (vgl. Abb. 11):
V: 5´-CGCGGTCGGCGTCACCG-3´
VI: 5´-GCCTCCTCAACAATGTCGT-3´

2.3.4 DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung wurde die Dideoxynukleotid-Terminationsmethode nach Sanger *et al.* (1977) eingesetzt. Die Detektion der Sequenzierungsprodukte erfolgte dabei entweder durch Autoradiographie nach Einsatz von radioaktiv markierten Nukleotiden oder automatisch mit dem A.L.F.-Sequencer (Automated Laser Fluorescence, Pharmacia, Freiburg) unter Verwendung von Fluoreszenz-markierten Primern bzw. Fluorescein-15-dATP (F-dATP). Die Protokolle für die Sequenzierungsreaktionen mit dem Sequenase-Kit Version 2.0 (USB, Cleveland OH, USA), radioaktiv, oder dem AutoRead™ Sequencing Kit (Pharmacia, Freiburg), nicht-radioaktiv, sind in Tabelle 4 schematisch dargestellt.

Die Sequenzierungsprodukte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurden für die A.L.F.-Sequenzierung folgende Lösungen benötigt (alle Chemikalien von Pharmacia, Freiburg):

10 x TBE:	121,14	g	Tris-Base
	51,32	g	Borsäure
	3,72	g	Na-EDTA
PAA (20%)	100	g	Acrylamid
	5,26	g	Bis-Acrylamid

APS:	50	mg	Ammoniumpersulfat
	490	µl	*aqua dest.*

Die Gelkassette wurde staubfrei gesäubert (10% SDS; Ethanol) und der obere Bereich der Glasplatten mit 0,5 ml Bind-Silan-Lösung behandelt (0,4 ml Bind-Silan (0,035% in Ethanol)+ 0,1 ml 10%-ige Essigsäure). Das 6%-ige Polyacrylamidgel (24 ml 20% PAA; 4,8 ml 10 x TBE; 33,6 g Harnstoff; 0,5 g Serdolith; ad 80 ml *aqua dest.*) wurde filtriert, 15 Minuten entlüftet und anschließend wurde durch Zugabe von 280 µl APS und 70 µl TEMED die Polymerisation gestartet. Diese PAA-Lösung wurde vorsichtig in die zusammengesetzte Gelkassette gespritzt und der Kamm eingesetzt. Nach 2 Stunden war das Gel vollständig polymerisiert und konnte für die Elektrophorese eingesetzt werden.

Als Laufpuffer wurde 0,6 x TBE eingesetzt, das Gel unter Laufbedingungen 45 Minuten vorgewärmt, und die Proben wurden unmittelbar vor dem Elektrophoresestart für 10 Minuten bei 80 °C denaturiert. Die elektrophoretischen Laufbedingungen des A.L.F-Sequencer waren wie folgt:

Stromstärke	28	mA	
Spannung	1,5	kV	
Leistung	34	W	
Temperatur	50	°C	
Laser-Leistung	3	mW	
Laufzeit	380	min	Die Signaldetektion erfolgte alle 2 Sekunden.

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung der zuvor denaturierten (4 min, 95 °C) radioaktiven Sequenzreaktionen wurde ein Polyacrylamidgel nach Sambrook *et al.* (1989) hergestellt. Nach der Elektrophorese erfolgte die Signaldetektion durch 1- bis 3-tägige Exposition eines Röntgenfilms (Kodak X-OMAT).

Tabelle 4: Schematisches Protokoll der eingesetzten Sequenzreaktionen

radioaktiv α-[^{35}S]-dATP	nicht-radioaktiv Fluoreszenzprimer	nicht-radioaktiv Fluorescein-dATP
Denaturierung:		
2 µg DNA + 40 µl Denaturierungs-puffer (0,2 M NaOH; 0,2 mM EDTA) → 5 min RT + 4 µl Neutralisierungs-puffer (2 M NH_4-Acetat pH 4,5) + 100 µl Ethanol (-20 °C) → 10 min -70°C → 10 min 13000 Upm 4 °C Pellet + 1 ml 70% Ethanol (-20 °C) → 5 min 13000 Upm 4 °C → Pellet trocknen (3 min)	6 µg DNA + 2 µl Primer (5 pmol) + 1 µl 1 N NaOH → 10 min 80 °C	6 µg DNA + 2 µl Primer (5 pmol) + 1 µl 1 N NaOH → 10 min 80 °C
***Annealing*:**		
+ 1 µl Primer + 2 µl *Annealing*-Puffer + 7 µl *aqua dest.* → 25 min 37 °C	+ 1 µl 1 N HCl + 2 µl *Annealing*-Puffer + 3 µl DMSO → 15 min 37 °C	+ 1 µl 1 N HCl + 2 µl *Annealing*-Puffer → 10 min 37 °C
Sequenzreaktion:		
+ 1 µl 0,1 M DTT, + 2 µl Markierungs-Mix (je 7,5 µM dCTP, dGTP, dTTP), + 0,5 µl [^{35}S]-dATP (5µCi) + 2 µl Sequenase (3U) → 4,5 min RT → auf Eis	+ 1 µl *Extension*-Puffer + 2 µl T7-Polymerase (3U)	+ 1 µl Nukleotidmix (je 1 µM dCTP, dGTP, dTTP; 10 µM F-dATP) + 2 µl T7-Polymerase (3U) → 10 min 37 °C + 1 µl *Extension Buffer* + 3 µl DMSO
→ je 3,5 µl zu 2,5 µl ddNTP-Mixen, in Eppendorfgefäß bei 37°C 3 min vorinkubiert → 5 min 37 °C + 4 µl Stop-Lösung → auf Eis	→ je 4,5 µl zu 2,5 µl ddNTP-Mixen, in Mikrotiterplatte bei 37°C 3 min vorinkubiert → 5 min 37 °C + 5 µl Stop-Lösung → auf Eis	→ je 4,5 µl zu 2,5 µl ddNTP-Mixen, in Mikrotiterplatte bei 37°C 3 min vorinkubiert → 5 min 37 °C + 4 µl Stop-Lösung → auf Eis

Sequenzanalyse
Die Auswertung der Daten aus der DNA-Sequenzierung wurde mit dem Programm PCGENE (IntelliGenetics) vorgenommen. Zur Datenbankrecherche, Sekundärstrukturanalyse und für Homologievergleiche wurden die Programme aus dem HUSAR-Paket 2.1 bzw. 3.0 (DKFZ, Heidelberg) eingesetzt. Dabei fanden die Programme FASTA, BLASTX und BLASTP (Datenbanksuche mit dem Algorithmus nach Lipman & Pearson, 1985), PEPTIDESTRUCTURE, PEPPLOT (Hydrophobizitätsplot nach Kyte & Doolittle, 1982) und BESTFIT (lokale Homologien nach Smith & Waterman, 1981), GAP (vollständiger Vergleich zweier Sequenzen nach Needleman & Wunsch, 1970), MULTALIGN (sequentieller Vergleich mehrerer Sequenzen nach Krueger & Osterburg, 1983) und CLUSTAL (paarweiser Vergleich zwischen verschiedenen Sequenzen nach Higgins & Sharp, 1988) Anwendung. Zur Voraussage von membranhelicalen Bereichen wurden auch die PCGENE-Programme RAOARGOS (Rao & Argos, 1986) und HELIXMEM (Eisenberg *et al.*, 1984) genutzt.

2.3.5 Hybridisierungen

Zum Nachweis von DNA-DNA-Hybridisierungen wurden linearisierte, denaturierte DNA-Fragmente mit Digoxigenin-11-dUTP ("DNA labeling and detection"- Kit, Boehringer, Mannheim) nach einer modifizierten Methode nach Feinberg & Vogelstein (1983) markiert (20 h, 37 °C) und als Sonde eingesetzt. Dabei wurden entweder ganze Zellen auf einer Trägermembran aufgeschlossen und die austretende DNA fixiert (Koloniehybridisierung), Plasmidpräparationen direkt (Dot blot) oder DNA erst nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Restriktionsfragmente (Southern blot) eingesetzt.

Koloniehybridisierung (Grunstein & Hogness, 1975)
Je 50 inserttragende *E. coli* NM522 Klone der partiellen *Bam*HI-Genbank bzw. der *Hin*dIII-Genbank in pUC19 wurden auf LB-Agar gepickt und nach 6- bis 8-stündiger Inkubation (37 °C) auf eine Nylonmembran (Biodyne A, Pall) transferriert. Zur Zelllyse wurde die Membran für 15 Minuten mit der Rückseite auf 0,5 ml 0,5 N NaOH / 1,5 N HCl gelegt, kurz getrocknet und in der gleichen Weise mit 0,5 ml 1 M Tris / 1,5 M NaCl behandelt. Die DNA-Fixierung erfolgte unter UV-Licht (4 min, 366nm).

Dot blot

Je ein Plasmidpool der partiellen *Hin*dIII-Genbank wurde in drei verschiedenen Verdünnungen auf eine Nylonmembran (Nytran N, Schleicher & Schüll, Dassel) aufgetropft und die DNA UV-fixiert.

Southern blot (Southern, 1975)

Mit Restriktionsenzymen gespaltene genomische oder plasmidale DNA wurde im Agarosegel über Nacht aufgetrennt und durch Vakuum-blotting (LKB 2016 VacuGene; Pharmacia, Freiburg) auf eine Nylonmembran (Nytran N, Schleicher & Schüll, Dassel) übertragen. Dazu wurde das Agarosegel in der Blotkammer jeweils 20 Minuten mit Depurinierungslösung (0,3 M HCl), Denaturierungslösung (0,5 M NaOH / 1,5 M NaCl) und Neutralisierungspuffer (1 M Tris / 1,5 M NaCl pH 7,5) überschichtet. Der vollständige DNA-Transfer erfolgte für 60 Minuten mit 20 x SSC-Lösung (3 M NaCl / 0,3 M Na-Citrat, pH 7,0), und die DNA wurde anschließend UV-fixiert.

Hybridisierung

Nach Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen auf den Membranen durch Prähybridisierung (5 x SSC, 1% Blocking Reagenz, 0,1% Lauroylsarcosin, 0,02% SDS; 4 h, 68 °C), erfolgte die Hybridisierung in der gleichen Lösung mit hitzedenaturierter, Digoxigenin-markierter Sonde für 16 Stunden bei 68 °C unter leichtem Schütteln. Anschließend wurde der Filter je zweimal unter Schwenken mit 2 x SSC / 0,1% SDS für 5 Minuten bei RT und mit 0,1 x SSC / 0,1% SDS für 15 Minuten bei 68 °C gewaschen.

Detektion

Zum Nachweis der DNA-DNA-Hybride wurde der Filter zunächst zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit 1% Blocking Reagenz in 0,1 M Tris / 0,15 M NaCl (pH 7,5) gebadet und anschließend mit einer spezifischen Antikörperkonjugat-Lösung (Anti-Digoxigenin / Alkalische Phosphatase; Boehringer Mannheim) behandelt. Dieser spezifische Komplex wurde entweder durch eine nachfolgende enzymkatalysierte Farbreaktion mit den Substraten 5-Bromo-4-chlor-2-indoylphosphat (X-Phosphat) und Nitroblau-Tetrazoliumsalz (NBT) oder, für eine höhere Sensitivität, durch eine Chemilumineszenzreaktion mit dem Substrat 4-Methoxy-4-(3-phosphatphenyl)spiro(1,2-dioxetan-3,2`-adamantan) (Lumigen PPD) in 0,1 M Tris / 0,1 M NaCl / 0,05 M MgCl2 (pH 9,5) nachgewiesen. Bei der Farbreaktion mit X-Phoshat / NBT wird das Hybrid als blaubrauner

Komplex sichtbar, bei der Lumigen-PDD-Methode erfolgt die Detektion über Lichtemission, die durch Röntgenfilme (Kodak X-OMAT) lokalisiert wurde.

Sollte der selbe Filter in eine weitere Hybridisierung eingesetzt werden, so wurde er zur Entfernung der zuvor benutzten Sonde zunächst für 30 Minuten mit 0,2 N NaOH / 0,1% SDS bei 50 °C gewaschen und anschließend einer dreimaligen Waschprozedur mit 2 x SSC (15 min, RT) unterzogen.

2.4 Transformationstechniken

2.4.1 Transformation von *E. coli*

Die *E. coli* Stämme DH5 und NM522 wurden mit der $CaCl_2$-Methode nach Cohen *et al.* (1972) transformiert. Eine *E. coli*-Kultur in 50 ml 2xTY-Medium wurde bei einer OD_{600} von 0,5 geerntet, das Pellet in 15 ml 70 mM $CaCl_2$ / 20 mM $MgSO_4$ resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (15 min, 4000 Upm, 4 °C) wurde das Pellet in 3,5 ml des gleichen Puffers aufgenommen, und Aliquots wurden in 20% Glycerin bei -70 °C gelagert. Zur Transformation wurden 100 µl kompetente *E. coli* Zellen mit der DNA gemischt und für 30 Minuten bei 0 °C inkubiert. Nach Hitzeschock (45 s, 42 °C) erfolgte die Zugabe von 500 µl 2xTY-Medium und 45-minütige Inkubation auf dem Rotationsschüttler (100 Upm, 37 °C), bevor die Zellen auf LB-Agar mit Antibiotikum zur Selektion ausplattiert und über Nacht inkubiert wurden.

Die Transformation der *E. coli* Stämme RDD32 und RDE51 erfolgte aufgrund der höheren Effizienz durch Elektroporation. Die Zellvorbereitung und Elektroporation wurde wie beschrieben durchgeführt (Wehrmann *et al.*, 1994).

2.4.2 Transformation von *C. glutamicum*

Auch die Transformation von *C. glutamicum* erfolgte durch Elektroporation. Zur Vorbereitung der Zellen nach einer vereinfachten Methode nach Liebl *et al.* (1989) wurden die Zellen mit den Wachstumsinhibitoren Isonicotinsäurehydrazid, Glycin und Tween 80 über Nacht in LB-Medium angezogen und bei einer OD_{600}

von 0,5 zunächst auf Eis gekühlt (10 min) und in der Zentrifuge JE21 M/E, Rotor JA10 (Beckman Instruments GmbH, München) geerntet (10 min, 6000 Upm, 4 °C). Danach wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem,10%-igen Glycerin gewaschen, in 1 ml des Puffers aufgenommen und in Aliquots zu 100 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert. Zur Elektroporation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, mit der DNA in sterilen, eiskalten Küvetten (Typ 16 S 2086, Biorad, München) gemischt und im "Biorad Gene Pulser" unter den Standardbedingungen (2,5 kV, 25 µF und 200 Ω Parallelwiderstand am "Pulse Controler") der Elektroporation unterzogen. Nach Beendigung des Pulses wurde sofort 1 ml vorgewärmtes BHIS-Medium zu den Zellen gegeben und die Regeneration erfolgte auf dem Rotationsschüttler (100 Upm) für 60 Minuten bei 30 °C. Anschließend wurden die Zellen auf LBHIS-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und für zwei Tage bei 30 °C inkubiert.

2.4.3 Konjugation

Die Methode der Transkonjugation wurde für den Transfer von Integrationsplasmiden nach *C. glutamicum* eingesetzt (Schäfer *et al.*, 1990). Dazu wurden 400 µl einer LB-Vorkultur des Donorstammes *E. coli* S17-1 (Simon *et al.*, 1983) in 20 ml LB plus 2% Glukose und Kanamycin (50 mg/l) überführt, bis zu einer OD_{600} von 1 bei 37 °C inkubiert (140 Upm) und dann auf Eis gelagert. Der Rezipient wurde in 100 ml LB-Medium plus 2% Glukose über Nacht angezogen und ein 10 ml Aliquot dieser Kultur wurde in einem Reagenzglas einem Hitzeschock (9 min, 48,5 °C) unterzogen. 1 ml Donorzellen wurden mit Rezipientenzellen (3 ml bei OD_{600}= 5) in einem Reagenzglas mit Schraubdeckel gemischt, 30 Sekunden bei 5000 Upm abzentrifugiert, der Überstand entfernt und das Zellpellet in 100 µl LB-Medium resuspendiert. Sterile Zellulosenitratfilter wurden auf LB-Platten gelegt und das Zellgemisch vorsichtig auf den Filter getropft. Nach dem Auftrocknen der Zellen wurden die Platten 20 Stunden bei 30 °C inkubiert, anschließend der Filter abgenommen und in einem Eppendorfgefäß mit 0,6 ml LB-Medium gemischt. Die so resuspendierten Zellen wurden auf LB-Agar mit Kanamycin (25 mg/l) und Nalidixinsäure (50 mg/l), zur Hemmung des Wachstums von *E. coli* S17-1, ausplattiert und zwei Tage bei 30 °C inkubiert.

2.5 Nachweis von Enzymen und Polypeptiden

2.5.1 Herstellung von Rohextrakten und Proteinbestimmung

Herstellung des Rohextraktes

Die Zellen wurden in den jeweiligen Medien bis zur spätexponentiellen Wachstumsphase angezogen und geerntet (5000 Upm, 10 min, 4 °C; Minifuge RF, Heraeus Christ GmbH, Osterode). Anschließend wurden sie zweimal in 0,9 %-iger NaCl-Lösung gewaschen und bis zum Zellaufschluß bei -20 °C gelagert. Zum Aufschluß wurden die Zellen in soviel Aufschlußpuffer (0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 oder 20 mM Tris/HCl pH 8,0) aufgenommen, daß die Zellsuspension eine optische Dichte von etwa 200 aufwies. Mit Hilfe des Ultraschall-Desintegrators Branson Sonifier W-250 wurden die Zellen mit einer Pulsfrequenz von 20% und einem Leistungs-"output" von 2,5 beschallt. Wenn nicht anders angegeben, betrug die Aufschlußdauer bei *C. glutamicum* - Zellen 10 Minuten. Als Aufschlußgefäße dienten 2,2 ml Eppendorfreaktionsgefäße, die während des Aufschlußes ständig mit Eiswasser gekühlt wurden. Zur Entfernung der Zelltrümmer erfolgte eine 30-minütige Zentrifugation (Kühlzentrifuge 202 MK, Sigma GmbH, Osterode; 13000 Upm, 4 °C). Der Überstand wurde als "Rohextrakt" in die Proteinbestimmung und Enzymtests eingesetzt.

Entsalzung

Um niedermolekulare Substanzen aus diesem Extrakt zu entfernen, wurden Gelfiltrationen mittels Sephadex G-25M durchgeführt. Dazu wurden äquilibrierte PD-10 Fertigsäulen (Pharmacia, Freiburg) benutzt. Die Elution erfolgte mit 0,75 und 3,5 ml 20 mM Tris/HCl pH 8,0, und die zweite Fraktion des Eluats wurde als "entsalzter Rohextrakt" in die Enzymtests eingesetzt.

Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration aller Rohextrakte wurde nach der Biuret-Methode (Gornall *et al.*, 1949) bestimmt.

2.5.2 Nachweis spezifischer Enzymaktivitäten

Alle photometrischen Messungen wurden bei 30 °C mit dem Spektralphotometer PM 6 (Zeiss, Oberkochen) durchgeführt. Die spezifischen Aktivitäten der Enzyme sind in U/mg Protein angegeben. Eine Enzymeinheit entspricht 1 µmol gebildetes Produkt pro Minute.

2.5.2.1 Bestimmung der Succinylase-Aktivität (DapD)

Die Acyl-CoA:Tetrahydrodipicolinat-N-Acyltransferase katalysiert den Transfer der Acylgruppe von Succinyl-CoA auf Tetrahydrodipicolinat (THDPA). Dabei ist unklar, ob THDPA (Simms *et al.*, 1984; Berges *et al.*, 1986) oder dessen hydrierte aliphatische Form, L-2-Amino-6-ketopimelat (Soda, persönl. Mitteilung 1989), Substrat dieser Reaktion ist. In jedem Fall ist N-Succinyl-2-amino-6-ketopimelat das Produkt. Die bei dieser Reaktion freiwerdende SH-Gruppe des CoA kann mit Hilfe des Ellmans Reagenz, 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoat) (DTNB), quantifiziert werden. Dabei reagiert die Thiol-Gruppe mit DTNB, was neben Disulfiden zur Bildung von 2-Nitro-5-thiobenzoat führt, dessen Dianion (TNB^{2-}) bei 412 nm absorbiert (Riddles *et al.*, 1979). Weil auch die meso-Diaminopimelat-dehydrogenase THDPA bzw. Aminoketopimelat als Substrat verwendet, wurde der Rohextrakt vor Einsatz in den Enzymtest gelfiltriert, um Ammonium, das als CoSubstrat für die direkte reduktive Aminierung erforderlich ist, aus dem Rohextrakt zu entfernen. Da die Succinylase relativ instabil ist, wurde die Gelfiltration bei 4 °C ausgeführt und der entsalzte Rohextrakt direkt in den Enzymtest nach Schrumpf *et al.* (1991) eingesetzt. Zur Bestimmung der Konzentrationen wurde ein Extinktionskoeffizient ε von 14,15 $cm^2 \mu mol^{-1}$ für TNB^{2-} (Riddles *et al.*, 1979) zugrunde gelegt.

Reaktionsansatz:	100 µl	1 M Tris/HCl pH 8,0
	100 µl	5 mM DTNB in 20 mM Tris/HCl pH 8,0
	100 µl	2 mM Succinyl-CoA
	485 µl	*aqua dest.*
	100 µl	entsalzter Rohextrakt
	115 µl	2,6 mM THDPA

Tetrahydrodipicolinat-Synthese

Um den Enzymtest durchführen zu können, mußte zunächst das Substrat der Reaktion, Tetrahydrodipicolinat (THDPA), hergestellt werden. THDPA wurde mittels angereicherter meso-Diaminopimelatdehydrogenase aus meso-Diaminopimelat synthetisiert (Schrumpf, 1991), über PD-10-Säulen entsalzt und umgepuffert. 1 ml des Präparates wurde auf eine äquilibrierte Säule gegeben und mit 5 ml 250 mM Glycin/KCl/KOH-Puffer pH 10,5 eluiert. Die ersten 2,5 ml wurden verworfen, die folgenden 3,5 ml Eluat wurden mit Puffer auf 5 ml aufgefüllt und, auf zwei äquilibrierte PD-10-Säulen verteilt, erneut gelfiltriert. Die erhaltenen 7 ml Eluat wurden auf Centricon-10 Mikrokonzentratoren (Amicon GmbH, Witten) verteilt und in der Heraeus-Minifuge eingeengt (5500 Upm, 1 h, 4 °C). Das Retentat wurde auf 1,25 ml aufgefüllt und sofort zur Synthese des THDPA nach Simms *et al.* (1984) eingesetzt. Der Syntheseansatz enthielt:

312 µl 1 M Glycin/KCl/KOH pH 10,5
500 µl 50 mM D,L-DAP
188 µl *aqua dest.*
1250 µl DAP-Dehydrogenase pH 10,5
250 µl 100 mM Na_2CO_3/250 mM NADP

Die Synthese wurde, nach 10-minütiger Vorinkubation des Ansatzes bei 30 °C, durch Zugabe von NADP gestartet. Nach 5-minütiger Inkubation wurde das Enzym mit Hilfe von Centricon-10 Mikrokonzentratoren (5500 Upm, 45 min, 4 °C) abgetrennt. Das THDPA enthaltende Filtrat wurde mit konzentrierter HCl auf pH 4 eingestellt und bei 4 °C aufbewahrt.

Die Quantifizierung des THDPA erfolgte in einem nach Misono *et al.* (1986) veränderten Reaktionsansatz, der der physiologischen Reaktionsrichtung der DAP-Dehydrogenase entspricht.

Reaktionsansatz:
200 µl 1,5 M Tris/HCl pH 7,5
200 µl 0,5 M $(NH_4)_2SO_4$
100 µl 0,002 M NADPH
470 µl Aqua dest.
20 µl DAP-Dehydrogenase (50 U/ml)
10 µl THDPA

Die Extinktion bei 340 nm wurde vor und nach Zugabe des THDPA gemessen. Aus der Extinktionsdifferenz kann die Konzentration von oxidierten Reduktionsäquivalenten bestimmt werden, die der THDPA-Konzentration äquimolar ist.

2.5.2.2 Bestimmung der Desuccinylase-Aktivität (DapE)

Die N-Acyl-Diaminopimelat-Deacylase (EC 3.5.1.18) katalysiert die Abspaltung des Acylrestes von N-Succinyl-Diaminopimelat, so daß Succinat und LL-2,6-Diaminopimelat als Reaktionsprodukte freigesetzt werden. Bei dem durchgeführten Enzymtest wurde als Meßgröße das entstehende Diaminopimelat verwendet, das mittels HPLC-Analyse quantifiziert wurde.

Damit das entstehende Diaminopimelat nicht zu Lysin decarboxyliert wird, enthielt der Enzymtest zur Hemmung der pyridoxalphosphatabhängigen meso-Diaminopimelatdecarboxylase Hydroxylammoniumchlorid (Kindler & Gilvarg, 1960). Ein weiterer Bestandteil war $CoCl_2$, da die Desuccinylase als ein Co^{2+}-abhängiges Enzym beschrieben wurde (Cohen & Saint-Girons, 1987), sowie Ornithin als internen Standard für die HPLC-Analyse. Das Substrat, N-Succinyl-Diaminopimelat (SuccDAP), wurde von B. Schrumpf zur Verfügung gestellt; der Enzymtest wurde nach Schrumpf *et al.* (1991) mit entsalztem Rohextrakt durchgeführt.

Reaktionsansatz:	50 µl	1 M Tris/HCl pH 8,0
	11 µl	0,37 M Hydroxylammoniumchlorid / 0,185 M SuccDAP
	5 µl	0,005 M $CoCl_2 \times 6H_2O$
	50 µl	0,001 M Ornithin
	84 µl	*aqua dest.*
	50 µl	entsalzter Rohetrakt

Nach 5-minütiger Vorinkubation des Reaktionsansatzes bei 30 °C erfolgte der Start durch Zugabe des Rohextraktes. Um eine zeitabhängige Reaktion beobachten zu können, wurden dem Reaktionsansatz 30 µl-Aliquots nach 0, 10, 20 und 30 Minuten entnommen und die Reaktion sofort mit 30 µl Stoppreagenz (6,7 ml 70 %-ige Perchlorsäure; 40 ml 95 %-iger Ethanol; ad 100 ml *aqua dest.*) beendet. Die Proben wurden mit 20 µl Neutralisierungspuffer (31,8 g K_2CO_3 ad 100 ml 20 mM Tris/HCl pH 8,0) versehen und abzentrifugiert (13000 Upm, 10 min,

4 °C). Der Überstand wurde direkt in die HPLC-Analyse eingesetzt oder bei -20 °C gelagert. Zur Quantifizierung von Diaminopimelat wurde eine Vorsäulenderivatisierung mit o-Phthaldialdehyd und anschließender "reversed phase" HPLC (Lindroth & Mopper, 1979) durchgeführt. Da bei dieser Auftrennung auch die Enantiomere des Diaminopimelates als getrennte Peaks auftraten, mußten die Peakflächen der beiden Stereoisomere LL-2,6-DAP und D,L-DAP, das durch Epimerase-Aktivität im Reaktionsansatz entsteht, addiert werden.

2.5.2.3 Bestimmung der Dehydrogenase-Aktivität (Ddh)

Die meso-Diaminopimelatdehydrogenase (EC 1.4.1.16) katalysiert die NADPH-abhängige reduktive Aminierung von L-2-Amino-6-ketopimelat. Während diese Reaktion physiologisch bei pH 7,5 abläuft, macht man sich für die Quantifizierung der Enzymaktivität die Rückreaktion, die bei pH 10,5 begünstigt ist (Misono *et al.*, 1979), zunutze.

Die Quantifizierung der meso-Diaminopimelatdehydrogenase wurde nach Treptow (1989) durchgeführt.

Reaktionsansatz:	500 µl	400mM Glycin/NaOH pH 10,5
	330 µl	*aqua dest.*
	100 µl	20 mM NADP-Na_2
	20 µl	Rohextrakt
	50 µl	80 mM DAP

Durch Zugabe des Substrates, DAP, wurde die Reaktion gestartet und die Extinktionsänderung bei 340 nm gemessen. Es wurde ein Extinktionskoeffizient ε von 6,3 cm^2 μmol^{-1} für NADPH zugrunde gelegt.

2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur analytischen Auftrennung von Proteinen nach Molekülgröße wurde die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach Laemmli (1970) unter denaturierenden Bedingungen verwendet. Die Herstellung des Gels und die Vorbereitung der Proben erfolgte nach Sambrook *et al.* (1989). Es wurde ein vertikales

Gelsystem (Dual Vertical Slab Model 220, Biorad, USA) mit 10%-igem Trenngel (8,4 ml 30%-iges Acrylamid / Bisacrylamid; 6,3 ml 1,5 M Tris / 0,4% SDS, pH 8,8; 10,1 ml *aqua dest.*; 25 µl TEMED und 250 µl 10% Ammoniumpersulfat) eingesetzt. Das Konzentrationsgel enthielt 3,2 ml 30%-ige Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung, 6,2 ml 0,5 M Tris / 0,4% SDS pH 6,8, 15,2 ml *aqua dest.*, 25 µl TEMED und 250 µl 10% Ammoniumpersulfat. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Stromstärke von 30 mA.

2.6 Bestimmung zellinterner und -externer Aminosäuren

Die Quantifizierung von Aminosäuren erfolgte mittels Derivatisierung mit o-Phthaldialdehyd und Auftrennung über *reversed phase* HPLC (Lindroth & Mopper, 1979). Zur Bestimmung der externen Konzentrationen wurden die Zellen kurz abzentrifugiert (5 min, 13000 Upm) und der Kulturüberstand in die Analyse eingesetzt. Wurden sowohl interne als auch externe Konzentrationen bestimmt, erfolgte die Trennung der beiden Kompartimente über Silikonölzentrifugation.

2.6.1 Silikonölzentrifugation

Durch die Silikonölzentrifugation wird eine schnelle Trennung der Zellen von dem umgebenden Medium und eine sofortige Inaktivierung des Stoffwechsels, um den Abbau bzw. die Synthese von Zellmetaboliten zu unterbinden, erreicht (Klingenberg & Pfaff, 1967). Dazu wurden vor jeder Probenentnahme 30 µl 20 %-ige Perchlorsäure in fünf 400 µl-Mikrozentrifugenröhrchen (Beckman Instruments GmbH, München) gegeben und mit je 65 µl Silikonöl der Dichte 1,04 g/cm^3 überschichtet. Jeweils 200 µl Probe wurde auf die Silikonölschicht gegeben und sofort 60 Sekunden hochtourig abzentrifugiert (Mikrofuge E, Beckman Instruments GmbH, München). Dabei wurden die Zellen durch das Silikonöl in die Perchlorsäure zentrifugiert, wodurch die Zellen inaktiviert wurden. Das Kulturmedium blieb aufgrund der geringeren Dichte über der Silikonölphase, konnte abpipettiert werden und entweder direkt in die HPLC-Analyse eingesetzt oder bei -20 °C aufbewahrt werden.

Zur Bestimmung der zellinternen Aminosäurekonzentrationen mußte das Zellpellet in der Perchlorsäurephase aufgearbeitet werden. Die Röhrchen wurden in der Silikonölphase durchtrennt, die Zellen in der Perchlorsäurephase in ein 0,75 ml Reaktionsgefäß zentrifugiert (Biofuge 13, Heraeus Christ GmbH, Osterode), resuspendiert und nach Zugabe von 45 µl *aqua dest.* und 10 µl Silikonöl der Dichte 1,07 g/cm^3 für 10 Minuten im Ultraschallbad vollständig aufgeschlossen. Zugabe von 25 µl einer 5 M KOH, 1 M Triethanolamin-Lösung führte zur Neutralisation des Homogenates. Ausgefallenes $KClO_4$, Zelltrümmer und Silikonöl wurden nach 30-minütiger Inkubation auf Eis abgetrennt (10 min, 13000 Upm, 4 °C) und die wässrige Lösung mit den löslichen Zellmetaboliten konnte in die Analyse eingesetzt werden.

2.6.2 Reversed phase HPLC

Zur Bestimmung der Aminosäurekonzentrationen wurde eine Vorsäulenderivatisierung mit o-Phthaldialdehyd mit anschließender *reversed phase* HPLC (Lindroth & Mopper, 1979) durchgeführt. Dazu wurde das HPLC-Gerät Typ HP 1090 M (Hewlett Packard, Waldbronn) mit einem Fluoreszenzdetektor HP 1046 A eingesetzt. Die Steuerung und Auswertung erfolgte über die "HP-Chem-Station".

2,5 µl Probe wurde unmittelbar vor jeder Analyse automatisch mit 17,5 µl o-Phthaldialdehyd / 2-Mercaptoethanol-Fertigreagenz gemischt. Die dabei entstehenden fluoreszierenden, thiosubstituierten Isoindole (Jones & Gilligan, 1983) wurden auf einer *reversed phase* Säule (Hypersil ODS 5µ) über ein Gradientenprogramm mit zunehmend unpolarer Phase (Methanol) aufgetrennt. Das polare Eluenz war 0,1 M Natriumacetat pH 7,2 und die Flußrate betrug 0,5 ml/min. Die Detektion erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 230 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm bei geeigneter Verstärkung.

2.7 Radiochemische Transportstudien

2.7.1 Aufnahme aromatischer Aminosäuren

Zur Bestimmung der Aufnahmeraten aromatischer Aminosäuren bei *C. glutamicum* wurden ^{14}C-markierte Substrate eingesetzt. Für die Messungen wurden die Bakterien wie unter 2.2 beschrieben angezogen, auf eine Zelldichte von etwa OD_{600} = 6 (entspricht 1,8 mg Trockengewicht / ml) eingestellt und auf Eis gelagert. Jeweils 2 ml Zellsuspension (0,35 - 1,8 mg Trockengewicht / ml) wurden bei 30 °C im Wasserbad unter Rühren mit 10 mM Glukose 3 Minuten vorinkubiert. Der Start der Messung erfolgte durch Zugabe von L-Phenylalanin-, L-Tryptophan oder L-Tyrosin-Lösungen, so daß Endkonzentrationen zwischen 0,5 und 200 µM erreicht wurden. Jeder dieser Substratlösungen wurde das entsprechende ^{14}C-Isotop (Amersham Buchler, Braunschweig) zugesetzt, so daß eine maximale radioaktive Konzentration von 18,5 KBq/ml im Testansatz vorhanden war. Jedem Testansatz wurde zu 6 Zeitpunkten (15-200 Sekunden) jeweils 200 µl entnommen und über eine Mehrfachfilteranlage (VF1, Amicon) abfiltriert. Die Zellen wurden dabei durch Glasfaserfilter (Milipore) zurückgehalten und sofort zweimal mit je 2 ml 0,1 M LiCl gewaschen. Nach Trocknen der Filter wurde die inkorporierte Aktivität mittels Flüssigkeitsscintillationszähler bestimmt.

2.7.2 Bestimmung des Membranpotentials

Zur Bestimmung des Membranpotentials wurde das radioaktiv markierte Kation Tetra-[^{14}C]-phenylphosphoniumbromid (TPP^+) eingesetzt, das aufgrund seiner lipophilen Struktur die Cytoplasmamembran durchdringen kann und durch die positive Ladung, bei intaktem elektrischen Potential, im Inneren der Zellen akkumuliert wird (Rottenberg, 1979). 500 µl Zellsuspension (OD_{600} = 1,7) wurden mit 1 µl TPP^+ (entspricht 5,5 KBq/ml im Ansatz) 60 Sekunden unter Rühren bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden 3 x 100 µl einer Silikonölzentrifugation unterzogen und je 50 µl des Überstandes (externe Aktivität) sowie 3 x 50 µl der Zellsuspension (Gesamtaktivität) wurden in die Flüssigkeitsscintillationszählung eingesetzt. Mit Hilfe des intrazellulären Volumens (1,9 µl / mg TG) kann so die intrazelluläre Volumenaktivität der Sonde und daraus, da das chemische Potential der Sonde im Gleichgewicht dem elektrischen Potential über der Membran entspricht, das Membranpotential $\Delta\Psi$ in mV errechnet werden.

3. ERGEBNISSE

3.1 Isolierung des Gens für die N-Succinyl-Diaminopimelat-desuccinylase (*dapE*)

In der Diplomarbeit (Wehrmann, 1991) konnte mittels heterologer Komplementation ein DNA-Fragment isoliert werden, das in *C. glutamicum* zu einer erhöhten Desuccinylaseaktivität führte. Molekulargenetische Untersuchungen zeigten jedoch, daß zumindest der Bereich vor dem *dapE*-Strukturgen strukturell nicht intakt vorlag. Dies sowie die Tatsache, daß in der gleichen Arbeit auch ein DNA-Fragment isoliert wurde, das sowohl zu einer erhöhten Succinylase- als auch Desuccinylaseaktivität führte (pAW141), war der Grund für einen erneuten Ansatz zur Klonierung eines intakten *dapE*-Fragmentes. Dabei wurde die Koloniehybridisierung eingesetzt, um eventuelle negative Auswirkungen eines funktionellen Selektionsdruckes, wie er bei der heterologen Komplementation besteht, auszuschließen.

3.1.1 Klonierung mittels Koloniehybridisierung

Zur Erstellung einer partiellen Genbank wurde chromosomale DNA des Wildtyps *C. glutamicum* ATCC13032 isoliert, mit *Bam*HI gespalten und nach Selektion von Fragmenten einer Länge von 2,5 - 4.3 kb in pUC19 inseriert. Nach Transformation von *E. coli* NM522 mit diesem Ligationsansatz wurden mit Hilfe von X-Gal- / IPTG-haltigen Platten 740 inserttragende Klone vereinzelt und für die Koloniehybridisierung eingesetzt. Als Sonde wurde ein 0,8kb *Xho*I-*Eco*RI internes *dapE*-Fragment aus pE14 (Wehrmann, 1991) gewählt, das strukturell intakt vorlag. Mit der Digoxigenin-markierten Sonde konnten 3 Klone, die Hybridisierungssignale aufwiesen, identifiziert werden. Restriktionsanalysen der isolierten Plasmide zeigten, daß zwar immer mehrere *Bam*HI-Fragmente im Vektor inseriert vorlagen, jedoch in jedem Fall ein 3,4 kb großes Fragment vorhanden war. Nach Isolierung und Klonierung dieses Fragmentes konnte durch Southern blot bestätigt werden (s. Abb.2), daß es sich hierbei um ein originäres *C. glutamicum Bam*HI-Fragment handelte.

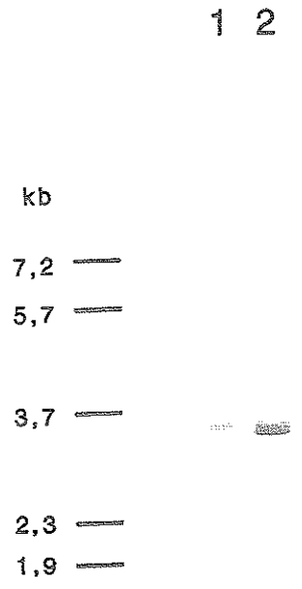


Abb. 2 Nachweis der Integrität des klonierten 3,4 kb *Bam*HI-Fragmentes durch *Southern blot*. Als Sonde diente ein internes 0,8 kb *Xho*I-*Eco*RI-Fragment. Spur 1 enthält chromosomale, *Bam*HI-verdaute DNA von *C.glutamicum* ATCC13032, Spur 2 Plasmid-DNA von pUC19*Bam*HI3,4, ebenfalls mit *Bam*HI gespalten.

Durch Komplementation der beiden DAP-auxotrophen *E. coli* Mutanten RDD32 *dapD* und RDE51 *dapE* sollte überprüft werden, ob ein funktionelles *dapE* auf dem isolierten Fragment lokalisiert ist und ob dieses Fragment auch zur *dapD*-Komplementation führt. Dabei zeigte sich, daß das 3,4 kb *Bam*HI-Fragment *dapE*, jedoch nicht *dapD* komplementiert. Zur genauen Lokalisation des *dapE*-Genes wurden auch Exonuklease III - Deletionsklone in die Komplementationsexperimente einbezogen. Hier führte das Deletionsfragment 81 zur Komplementation von *dapE*, die weitere Deletion von 205 bp (Deletionsklon 92) ergab jedoch keine Komplementation. Abbildung 3 zeigt die Ausdehnung der wichtigsten Deletionsfragmente und deren Komplementationsvermögen von *E. coli* RDE51 *dapE*.

3.1.2 Sequenzanalyse

Zur Sequenzierung des 3,4 kb großen *Bam*HI-Fragmentes wurden Subklone mittels Exonuklease III erstellt. Dabei wurde das Ausgangsplasmid pUC19*Bam*HI3,4 zunächst mit *Sph*I und *Xba*I gespalten und einer Exonuklease III - Behandlung unterzogen, religiert, und *E. coli* DH5 wurde mit diesem Ansatz transformiert. Mit Hilfe von Plasmidpräparationen konnten unterschiedlich große Insertdeletionen identifiziert werden, von denen 16 Deletionsklone für die Sequenzierung eingesetzt wurden. Zur Sequenzierung des Gegenstranges wurde das Ausgangsplasmid mit *Sac*I und *Sma*I gespalten und analog verfahren, so daß letztlich 14 Deletionsklone für die Sequenzierung ausgewählt werden konnten (Sequenzstrategie s. Abb. 3). Die Sequenzierung erfolgte mit der Dideoxy-Methode nach Sanger *et al.* (1977), der DNA-Nachweis über Autoradiographie von eingebautem ^{35}S-dATP. Die komplette Nukleotidsequenz ist in Abbildung 4 wiedergegeben.

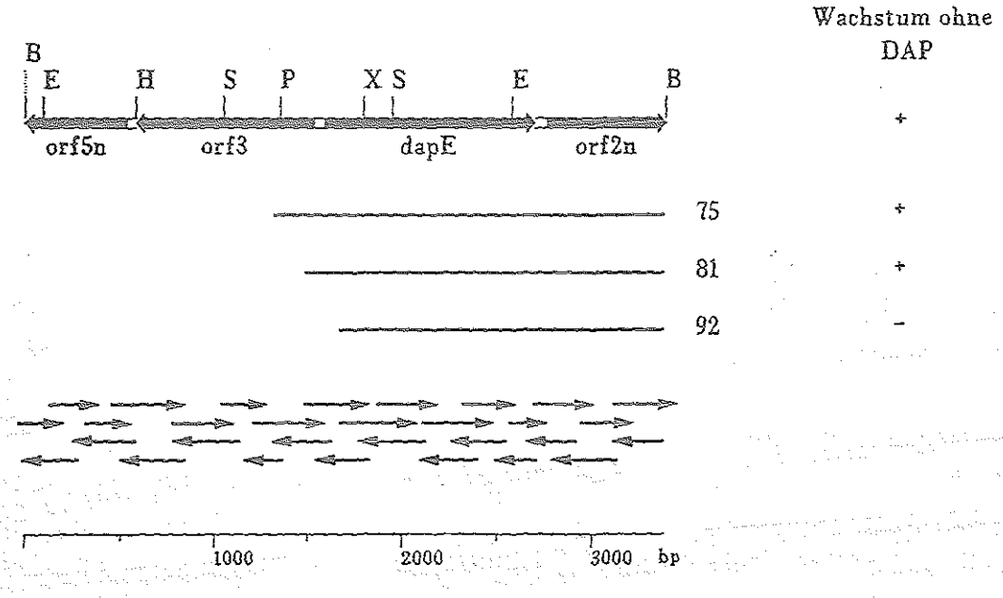


Abb. 3 Restriktionskarte des *dapE*-tragenden 3,4 kb *C. glutamicum Bam*HI-Fragmentes, Ausdehnung der für die *dapE*-Lokalisation relevanten Deletionsklone 75, 81 und 92 sowie Sequenzierungsstrategie. Die plasmidvermittelte Komplementation von *E. coli* RDE51 ist rechts dargestellt. (B=*Bam*HI, E=*Eco*RI, H=*Hin*dIII, P=*Pst*I, S=*Sal*I, X=*Xho*I)

```
3´ BamHI                                                                    75
CCTAGGCCCTTCGGTAGGCTTTTATTCTCGTTATGGTTACTACTCCTTTCGCTACTAGTGGCGCTGGAATTACTT
 S  G  P  L  W  G  F  I  L  A  I  G  I  I  L  F  A  I  I  V  A  V  K  I  F
                 EcoRI                                                     150
ACGCTTGGTCATGAGCTTAAGTGGCTTTGGCGCTTGGCGCTGCTCCAAGTGGTGTCGCTTCTTCTGGTGCGTCTG
 A  F  W  Y  E  F  E  G  F  G  R  V  A  V  L  N  V  V  A  F  F  V  V  C  V
                                                                           225
TTCGCTTCCTTAGGTGCCAAGCTGCGGCTTGGTACGTGGGTACTACCGTCGTCGCGGTCAGTAAAGCCGCGGGTA
 L  S  P  I  W  P  E  V  G  F  W  A  G  M  I  A  A  A  G  T  M  E  A  G  M
                                                                           300
GTGGTATTAGTCGTACTTGGTCATGTTGGTTGGCTCCCTCTTTGGTCGGGTCACCGGCTTTCGTAGGAGCGGCAT
 V  M  I  L  M  F  W  Y  L  W  G  L  S  F  G  A  W  H  G  F  A  D  E  G  Y
                                                                           375
TGCACTTTTGCTAGGCCTCCGCCCTGCCCGTCGTCGGTAGAGCGGCTCGTAAACGTATTGTTCGTGTTGCTACCG
 R  S  F  S  G  S  A  P  R  A  A  A  M  E  G  L  M  Q  M  V  L  V  V  I  A
                                                                           450
AGGCCGCTACTACATGCGGTCCTCGTGACGCCCCGGCCGACGCGCCTATGGTTGCGGCCACGGCTCCTTGTCAGG
 G  A  I  I  Y  A  L  L  V  A  P  G  A  A  R  I  G  V  G  T  G  L  F  L  G
                                                                           525
CCGTGGTTAACGCCTCGGCTCAGGGTAGTAACACTCCACCGCCCAGGCTTCAGGCCAAGGGTCGGGAAGTAATCT
 A  G  I  A  S  G  L  G  M  M  T  L  H  R  T  R  L  G  T  G  L  G  E  N  S
<—orf5n¬                                                  HindIII          600
AAATCGGTACATAGTTGGCATTTGGGTGTACCGTGACCAATACTTTTACCCAGTTCGAAACTCCGCCCGTTGACC
 K  A  M                                                  -  A  K  L  R  A  V  P
                                                                           675
GAGTACCTTCGGCCTAAGTGCGAACTAACTGGTTAAACGAACCGGAAGCTACCTCAGCTATCACGCATTGAGGAG
 E  H  F  G  S  E  R  K  I  S  W  N  A  Q  G  E  I  S  D  I  T  R  L  E  E
                                                                           750
TAGCCGACGCTTGGTTTACCCCCATAGAGGTAGGTTCTGTTACAATAAAGGCTACAGCGTTAACAGAGGGTCTGA
 D  A  A  F  W  I  P  T  D  G  D  L  V  I  N  N  G  I  D  C  N  D  G  L  S
                                                                           825
CTGAGGCTACTAAGGCCTCGACTGTGGTTTCAACGTCAAAACCGGCTACGAGTTGCCGTTTGCCGCCGCGACAAG
 V  G  I  I  G  S  S  V  G  F  N  C  N  Q  G  I  S  L  P  L  R  R  R  Q  E
                                                                           900
TAGAGAGCCCCTGACTTATCATCTTCTGTCAGGTTAGAGCCTTGGAAGTGGCTACTGGTGTGGCCTTGAGTCCGC
 D  R  P  S  Q  I  T  S  S  L  G  I  E  S  G  E  G  I  V  V  G  S  S  L  R
                                                                           975
CGGAAGGTGGAAACGCCGTGGGTTCCACGGCCTCAACTTTCTGTGCTTTGGAAGTGCGTCGTGTCTCCATGGGCC
 G  E  V  K  A  A  G  L  T  G  S  N  F  S  V  F  G  E  R  L  V  S  T  G  P
                                                                          1050
TCGTTCCATACGTGGATCCGCGTGCGCAAGACGAAGCCTCTACGCCTGAGGTCCCCCTTGGTGTATCAGCTGGTA
 A  L  Y  A  G  L  R  V  R  E  A  E  S  I  R  V  G  P  P  V  V  Y  D  V  M
                                                                          1125
CGCCCCTTCTGCCAGGTGTGTCATCTGCACCTACTCAGGCGCCCTGGCGTCTCGTGGTGCGTGGGTGAGTTTCAA
 R  P  L  R  D  V  C  Y  V  H  I  L  G  R  S  R  L  A  G  R  V  W  E  F  N
                                                                          1200
AAGTCCTTCCGTTCCCGGGAACAAACAGGTGTGGTGCAGCCTGTCGTCGAGGTTCCACAAAACGTACACGTAAAG
 E  P  L  C  P  G  K  N  T  W  V  V  D  S  L  L  E  L  T  N  Q  M  H  M  E
                                                                          1275
CACCCCCGCCTGGTCCGCCACCCTTTCGTCCACCTCCGCGTCCATTTGTAGCACGCGCAGATGACCTCCAACTCT
 H  P  R  V  L  R  H  S  L  L  H  L  R  L  Y  V  D  H  A  D  V  P  P  Q  S
                                                                          1350
GTCTAGCCCCTATTGCCACGCCTGACGATGGACAAGCTGCTCCGCTAGAACCAGGTCAAAATGGTTGACGTCGTA
 L  D  P  I  V  T  R  V  A  V  Q  E  V  L  R  D  Q  D  L  K  V  L  Q  L  M
                                                                          1425
GGCACCCCACTCAAGCAAACGAGGCTCCGCACACCACGGGTGAAGGTTACCCATCGCAAGTCGGGTGACTAGGCC
 R  P  T  L  E  N  A  G  L  R  T  T  G  V  E  L  P  Y  R  E  A  W  Q  D  P
                                                                          1500
CAACTTTTAAACCCCAAGACCCATGGTGCACAGGTCCTACCAGGGCAGGTACCGCTATAAACGCTAAGGTTGACG
 N  F  I  Q  P  E  P  Y  W  T  D  L  I  T  G  D  M  A  I  N  A  I  G  V  A
                <—orf3¬                                          RBS       1575
5´---CTCCGCGAATGTTTTCACTCATTTTTTAATCGACCGCTTCCATCATGTTTTAACTAAGGTTTGTAGGCTT
AACCCGAGGCGCTTACAAAAGTGAGTAAAAAATTAGCTGGCGAAGGTAGTACAAAATTGATTCCAAACA----5´
 Q  A  G  R  I  N  E  S  M
    ¬dapE—>                                                               1650
AAACCTGTGAACTCTGAACTCAAACCAGGATTAGATCTCCTCGGCGACCCAATTGTCCTTACTCAACGTTTGGTA
       V  N  S  E  L  K  P  G  L  D  L  L  G  D  P  I  V  L  T  Q  R  L  V
```

```
                                                                    1725
GATATACCGAGTCCGTCGGGTCAGGAAAAGCAGATTGCTGATGAAATTGAAGATGCCCTTCGGAACCTTAATCTA
 D  I  P  S  P  S  G  Q  E  K  Q  I  A  D  E  I  E  D  A  L  R  N  L  N  L
                                                                    .1800
CCTGGTGTAGAGGTCTTCCGCTTCAACAACAACGTTCTTGCTCGCACGAACAGGGGATTGGCCTCGAGGGTCATG
 P  G  V  E  V  F  R  F  N  N  N  V  L  A  R  T  N  R  G  L  A  S  R  V  M
                                                                    1875
CTTGCTGGTCATATCGATACAGTGCCGATCGCGGACAATCTGCCAAGCCGTGTGGAAGACGGCATCATGTATGGC
 L  A  G  H  I  D  T  V  P  I  A  D  N  L  P  S  R  V  E  D  G  I  M  Y  G
                                                                    .1950
TGTGGCACCGTCGATATGAAATCTGGGTTGGCGGTGTATTTGCATACTTTTGCCACCTTGGCCACGTCGACTGAG
 C  G  T  V  D  M  K  S  G  L  A  V  Y  L  H  T  F  A  T  L  A  T  S  T  E
                                                                    2025
CTTAAACATGATCTGACGCTGATTGCGTATGAGTGCGAGGAAGTTGCTGATCACCTCAATGGTTTGGGCCACATT
 L  K  H  D  L  T  L  I  A  Y  E  C  E  E  V  A  D  H  L  N  G  L  G  H  I
                                                                    .2100
CGCGATGAGCATCCGGAGTGGTTGGCGGCTGATTTGGCGTTGTTGGGTGAGCCTACTGGCGGCTGGATTGAGGCG
 R  D  E  H  P  E  W  L  A  A  D  L  A  L  L  G  E  P  T  G  G  W  I  E  A
                                                                    2175
GGCTGCCAGGGCAATCTGCGCATCAAGGTGACGGCGCATGGTGTGCGTGCCCATTCGGCGAGAAGCTGGTTGGGT
 G  C  Q  G  N  L  R  I  K  V  T  A  H  G  V  R  A  H  S  A  R  S  W  L  G
                                                                    .2250
GATAATGCGATGCATAAGTTGTCGCCGATCATTTCGAAGGTTGCTGCGTATAAGGCCGCAGAAGTCAACATTGAT
 D  N  A  M  H  K  L  S  P  I  I  S  K  V  A  A  Y  K  A  A  E  V  N  I  D
                                                                    2325
GGCTTGACCTACCGTGAAGGCCTCAACATCGTTTTCTGCGAATCGGGCGTGGCAAACAACGTCATTCCAGACCTC
 G  L  T  Y  R  E  G  L  N  I  V  F  C  E  S  G  V  A  N  N  V  I  P  D  L
                                                                    .2400
GCGTGGATGAACCTCAACTTCCGTTTCGCGCCGAATCGCGATCTCAACGAGGCGATCGAGCATGTCGTCGAAACG
 A  W  M  N  L  N  F  R  F  A  P  N  R  D  L  N  E  A  I  E  H  V  V  E  T
                                                                    2475
CTTGAGCTTGACGGTCAAGACGGCATCGAATGGGCCGTAGAAGACGGGGCAGGCGGTGCCCTTCCAGGCTTGGGG
 L  E  L  D  G  Q  D  G  I  E  W  A  V  E  D  G  A  G  G  A  L  P  G  L  G
                                                                    .2550
CAGCAGGTGACAAGCGGGCTTATCGACGCCGTCGGCCGCGAAAAAATCCGCGCAAAATTCGGCTGGACCGATGTC
 Q  Q  V  T  S  G  L  I  D  A  V  G  R  E  K  I  R  A  K  F  G  W  T  D  V
                    EcoRI                                           2625
TCACGTTTTTCAGCCATGGGAATTCCAGCCCTAAACTTTGGCGCTGGTGATCCAAGTTTCGCGCATAAACGCGAC
 S  R  F  S  A  M  G  I  P  A  L  N  F  G  A  G  D  P  S  F  A  H  K  R  D
                                                                    .2700
GAGCAGTGCCCAGTGGAGCAAATCACGGATGTGGCAGCAATTTTGAAGCAGTACCTGAGCGAGTAACCGCATTCG
 E  Q  C  P  V  E  Q  I  T  D  V  A  A  I  L  K  Q  Y  L  S  E  -
                                   RBS      orf2n-->                 .2775
GGGTTATCGTGGGACTTCCGAAATGTAACTAGAGACTAGAGGAGGAAACACGATGGCTCCTAAACAAACTCCCAG
                                                     M  A  P  K  Q  T  P  S
                                                                    .2850
CCCAGAGAAGAATCGAAACCTGGTGGGACCAGTTCTGCAACGTCGGCAGACAGAGGGTACTTTTGATCAACGCTT
 P  E  K  N  R  N  L  V  G  P  V  L  Q  R  R  Q  T  E  G  T  F  D  Q  R  L
                                                                    2925
GCTAGAAATGCGCGCTGATCACAATTGGAAGCACGCCGATCCATGGCGTGTACTGCGTATTCAGTCTGAGTTTGT
 L  E  M  R  A  D  H  N  W  K  H  A  D  P  W  R  V  L  R  I  Q  S  E  F  V
                                                                    .3000
GGCGGGTTTTGATGCCCTCCACGAGATGCCAAAGGCCGTAACCGTCTTTGGTTCCGCACGCATTAAAGAGGATCA
 A  G  F  D  A  L  H  E  M  P  K  A  V  T  V  F  G  S  A  R  I  K  E  D  H
                                                                    3075
CCCGTACTACAAGGCGGGTGTAGAACTTGGTGAAAAGCTCGTTGCAGCGGACTACGCAGTTGTCACCGGTGGCGG
 P  Y  Y  K  A  G  V  E  L  G  E  K  L  V  A  A  D  Y  A  V  V  T  G  G  G
                                                                    .3150
TCCAGGTCTGATGGAAGCCCCCAATAAGGGGGCAAGCGAGGCCAATGGTTTATCAGTTGGTCTGGGCATTGAGTT
 P  G  L  M  E  A  P  N  K  G  A  S  E  A  N  G  L  S  V  G  L  G  I  E  L
                                                                    3225
GCCACATGAACAGCATCTGAACCCTTATGTGGATTTGGGTCTGAACTTCCGGTACTTCTTCGCACGCAAGACCAT
 P  H  E  Q  H  L  N  P  Y  V  D  L  G  L  N  F  R  Y  F  F  A  R  K  T  M
```

```
                                                                    .3300
GTTCCTGAAATACTCCCAGGCTTTTGTGTGTCTGCCTGGTGGTTTCGGCACGCTCGATGAGCTTTTCGAGGTCCT
 F  L  K  Y  S  Q  A  F  V  C  L  P  G  G  F  G  T  L  D  E  L  F  E  V  L
                                                                    3375
CTGCATGGTACAAACCGGCAAGGTAACCAACTTTCCCATCGTGCTGATCGGCACTGAGTTCTGGGCAGGTTTGGT
 C  M  V  Q  T  G  K  V  T  N  F  P  I  V  L  I  G  T  E  F  W  A  G  L  V

     BamHI
GGATTGGATCC---3'   3386
 D  W  I
```

Abb. 4 Nukleotidsequenz des *dapE BamHI* 3,4 kb-Fragmentes aus *C. glutamicum* ATCC13032. Für orf3 und orf5n ist der zu *dapE* und orf5n antiparallele Strang gezeigt. Die Transkriptionsrichtung von *dapE* sowie der offenen Leseraster, orf2n, orf3 und orf5n, ist durch Pfeile gekennzeichnet. Ribosomenbindungsstellen (RBS) sind unterstrichen.

Durch die Sequenzanalyse konnten vier "offene Leseraster" (orf) ermittelt werden, von denen zwei, orf2n und orf5n, jeweils an den 3´-Enden des DNA-Doppelstranges liegen, unvollständig sind und nur für den aminoterminalen Bereich eines potentiellen Polypeptides codieren. Die beiden vollständigen offenen Leseraster sind nicht auf dem gleichen Strang lokalisiert. Da durch Komplementationsexperimente das funktionelle *dapE* in dem Bereich des großen vollständigen Leserasters eingegrenzt werden konnte (s. Abb.3), muß es sich hierbei um das offene Leseraster für *dapE* handeln. Aufgrund dieser Ergebnisse ist der wahrscheinliche Translationsstart das GTG^{1583}, dem im Abstand von 9 bp eine mögliche Ribosomenbindungsstelle, 5´-GTAGG-3´ (Moran *et al.*, 1982), vorangeht (s. Abb.4). Darüberhinaus zeigten Datenbankanalysen (Programm FASTA des Husar-Pakets 2.1) eine geringe, aber signifikante Ähnlichkeit (23,2% identische Aminosäuren) der abgeleiteten Primärstruktur mit DapE aus *E. coli* (Bouvier *et al.*, 1992), wenn dieses Startcodon als Beginn des *dapE*-Strukturgenes angenommen wird. Das *C. glutamicum dapE* Genprodukt weist 369 aa auf und entspricht mit 39942 Da etwa der molaren Masse des *E. coli* Polypeptides (41129 Da).

61 bp hinter *dapE* liegt der Start von orf2n. Aufgrund der "Codon Präferenz", die für moderat exprimierte Gene von *C. glutamicum* erstellt wurde (Eikmanns, 1992), und einer perfekten Ribosomenbindungsstelle, 5´-AGGAGG-3´ (Kalinowski, unveröffentlicht) , stellt orf2 aller Wahrscheinlichkeit nach eine codierende Region dar. Eine entsprechende Datenbankanalyse mit bekannten Proteinen verlief jedoch negativ.

Direkt benachbart zu *dapE* liegt orf3, ist jedoch auf dem anderen Strang lokalisiert. Da am Beginn des offenen Leserasters keine typische Shine-Dalgarno-Sequenz erkannt werden konnte, ist es möglich, daß der Translationsstart weiter stromabwärts erfolgt. Auch hier erbrachten Datenbankanalysen (Programme FASTA und BLASTP des Husar-Pakets 3.0 beim DKFZ, Heidelberg) keine signifikante Ähnlichkeit auf Aminosäureebene. Überaschenderweise zeigte eine Datenbankanalyse mit der Nukleinsäuresequenz von orf3 jedoch eine geringe Ähnlichkeit mit einem Sequenzabschnitt von *dapD* aus *Actinobacillus pneumoniae*. Eine detailierte Untersuchung der orf3-Primärstruktur zeigte darüberhinaus ein IGXXXX-Hexapeptid Wiederholungsmotiv, das in verschiedenen Acyltransferasen, u.a. auch der Succinyltransferase aus *E. coli*, DapD, gefunden wird (Vaara, 1992). Daher handelt es sich bei orf3 möglicherweise um ein Gen für eine Acyltransferase, einer Enzymgruppe, die im Metabolismus an vielen unterschiedlichen Reaktionen beteiligt ist (Abiko, 1975).

Das potentielle Genprodukt von orf5n zeigt im Gegensatz zu dem von orf3 sogar eine sehr starke Ähnlichkeit zu einer ganzen Proteinfamilie, deren Mitglieder wahrscheinlich alle am Transport von Aminosäuren beteiligt sind (BLASTP; Husar 2.1). Obwohl auch hier kein eindeutiges Translationsstartsignal auf Nukleotidsequenzebene zu erkennen ist, kann man aufgrund der starken Homologie der Primärstruktur der AS-Transportproteine davon ausgehen, daß das Startcodon tatsächlich das ATG^{534} ist. Die vollständige Sequenzanalyse ist unter 3.6.2 dargestellt.

3.2 Isolierung des Gens für die Tetrahydrodipicolinatsuccinylase (*dapD*)

Neben dem intakten und sequenzierten 3,4 kb *Bam*HI-Fragment, auf dem orf3 benachbart zu *dapE* lokalisiert ist, war auch ein 2,85 kb *Bam*HI-Fragment isoliert worden (pAW141). Beide DNA-Fragmente sind über große Bereiche identisch (s. Abb. 6). Das kleinere Fragment besitzt jedoch zusätzlich zum *dapE*-Gen auch einen DNA-Bereich, der zur Komplementation von *dapD* führt und in *C. glutamicum* eine erhöhte Succinylaseaktivität vermittelt. Dieser Bereich wird nachfolgend als artifizielles "dapD" bezeichnet, da strukturelle Untersuchungen ergeben hatten, daß dieser Bereich nicht intakt kloniert vorliegt. Aufgrund der Anordnung der Gene auf diesen beiden Klonen, lag es nahe, das dem *dapE*

benachbarte intakte orf3 einer näheren Untersuchung zu unterziehen, zumal eine partielle Ähnlichkeit zu *dapD* aus *Actinobacillus pleuropneumoniae* nachgewiesen werden konnte und damit die Möglichkeit bestand, daß orf3 nur durch fehlende Expression keine Succinylaseaktivität zeigte.

3.2.1 Untersuchungen zu orf3

Um auszuschließen, daß benachbarte Sequenzbereiche eine mögliche *dapD*-Expression verhindern, wurde orf3 subkloniert und, um einer mangelnden Promotorerkennung im heterologen System vorzubeugen, in induzierbare Vektoren kloniert. Als Vektor wurde neben pUC19 (Vieira & Messing, 1982) auch der induzierbare *E. coli-C. glutamicum* Pendelvektor pEKEx2 (Eikmanns *et al.*, 1991) verwendet. Es wurden zwei orf3-tragende Fragmente, 1,45 kb *Eco*RI/*Mcr*I und 1,6 kb *Bam*HI/*Bgl*II, in jeweils beiden Orientierungen in die Vektoren inseriert. Mit keinem dieser Konstrukte konnte unter induzierenden Bedingungen (+ IPTG) Komplementation der *dapD*-Mutante erreicht werden. Wurde jedoch ein 1,1 kb *Bam*HI-*Bgl*II, "*dapD*"-tragender Bereich aus dem *dapE* und *dapD* komplementierenden, strukturell nicht intakten Plasmid pAW141 subkloniert, so erfolgte Komplementation von *E. coli* RDD32 *dapD*.

Diese Experimente zeigen eindeutig, daß das potentielle orf3-Genprodukt keine *dapD*-komplementierende Funktion besitzt.

3.2.2. Untersuchungen zum artifiziellen "*dapD*"

Da nur das strukturell veränderte DNA-Fragment aus pAW141 *dapD*-Komplementation zeigte, wurde das 1,1 kb große *Bam*HI-*Bgl*II artifizielle "*dapD*"-Fragment sequenziert, um Nukleotidsequenzinformationen für einen erneuten Ansatz zur Klonierung des strukturell und funktionell intakten *dapD* zu bekommen.

Für die Sequenzierung wurden Deletionsklone eingesetzt, die wie unter 3.1.2 beschrieben hergestellt wurden. In der ermittelten Sequenz konnte ein offenes Leseraster von 972 bp (orfdapD) identifiziert werden. Homologievergleiche der abgeleiteten Aminosäuresequenz mit Proteindatenbanken (BLASTP; Husar 2.1) ergaben jedoch keine signifikante Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen. Ein

gezielter Vergleich mit DapD aus *E. coli* führte zu maximal 22% identischen Aminosäuren (CLUSTAL; Husar 2.1). Interessanterweise besitzt jedoch die Sequenz, die zur Komplementation von *dapD* führt (der artifizielle "*dapD*"-Klon), eine sehr starke Ähnlichkeit zur abgeleiteten Aminosäuresequenz von orf3. Besonders auffällig ist, daß die ersten 109 AS beider Sequenzen identisch sind (s. Abb. 5).

```
                        10        20        30        40        50        60
                         .         .         .         .         .         .
orfdapD         MSENIRGAQAVGIANIAMDGTILDTWYPEPQIFNPDQWAERYPLEVGTTRLGANELTPRM
cgorf3          MSENIRGAQAVGIANIAMDGTILDTWYPEPQIFNPDQWAERYPLEVGTTRLGANELTPRM
                ************************************************************

orfdapD         LQLVKLDQDRLVEQVAVRTVIPDLSQPPVDAHDVYLRLHLLSHRLVRPHTINLDGIFGLL
cgorf3          LQLVKLDQDRLVEQVAVRTVIPDLSQPPVDAHDVYLRLHLLSHRLVRPHEMHMQNTLELL
                ********************************************** ....  . **

orfdapD         NNVVWTNFGPCAVDGFALTRARLSRRGQVTVYSVDKFPRMVDYVVPSGVRIGDADRVRLG
cgorf3          SDVVWTNKGPCLPENFEWVRGALRSRGLIHVYCVDRLPRMVDYVVPPGVRISEAERVRLG
                ..***** ***  . *   *. *  ** . ** **..*********.****..*.*****

orfdapD         AYLADGTTVMHEGFVNFNAGTLGASMVEGRISAGVTVDDGTDVGGGASIMGTLSGGGQHV
cgorf3          AYLAPGTSVLREGFVSFNSGTLGAAKVEGRLSSGVVIGEGSEIGLSSTIQSPRDEQRRRL
                **** **.*..****.**.*****. ****.*.** ...*...* ...* .      ...

orfdapD         -ISLGKRCLLGANSGC-GIPLGDDCIIEAGLYITAGTKVLF--DGSLHKASTLAGSNGLI
cgorf3          PLSIGQNCNFGVSSGIIGVSLGDNCDIGNNIVLDGDTPIWFAADEELRTIDSIEGQANWS
                 .*.*. * .* .**  *..***.* *   . . ..* . *  *  *.   .. *

orfdapD         FRRDSVSGQVVAVPNTKVVELNTALHSN
cgorf3          IKRESGF-------HEPVARLKA-----
                ..*.*         .  *  *..
```

Abb. 5 Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen des artifiziellen "dapD" (orfdapD) und orf3 (cgorf3) mittels CLUSTAL, Husar 3.0 (* = identische AS; . = ähnliche AS)

Offensichtlich besitzen orf3 und *dapD* eine große strukturelle Ähnlichkeit. Da das potentielle Genprodukt von orf3 jedoch nicht die Funktion von DapD übernehmen kann, handelt es sich entweder um ein Genprodukt mit analoger Funktion, aber anderer Substratspezifität, oder es wird kein funktionelles Protein gebildet, d.h. orf3 hat seine Genfunktion verloren. Die Tatsache, daß "*dapD*" und orf3 im 5´-Bereich eine identische Sequenz aufweisen, deutet auf ein Rekombinationsereignis während der Errichtung der Genbank oder bei der Selektion auf DAP-Prototrophie hin.

Um eine intragenomische DNA-Umlagerung, die zur Entstehung des "*dapD*" führte, nachzuweisen, wurden Southern blot - Hybridisierungen durchgeführt, die eine Aussage über die tatsächliche Lokalisation des intakten *dapD* im Genom von *Corynebacterium glutamicum* liefern sollten. Dazu wurden drei verschiedene Sonden eingesetzt, die jeweils mit *Eco*RI-gespaltener chromosomaler DNA sowie Herkunftsplasmid hybridisiert wurden. Abbildung 6 zeigt ein Schema zur Herkunft dieser Sonden. Sonde 1 (S1; *Pst*I-*Bst*XI 154 bp) und Sonde 3 (S3; *Pst*I-*Sal*I 330 bp) stammen aus dem *dapD*- und *dapE*-komplementierenden Plasmid pAW141, wobei S1 aus dem strukturell intakten, S3 jedoch aus dem strukturell veränderten Bereich dieses Plasmides stammt. Als Kontrolle wurde Sonde 2 (S2; *Ava*I-*Apa*I 313 bp) aus dem intakten orf3 des 3,4 kb *Bam*HI-Fragmentes eingesetzt. Wie erwartet, führt der Southern blot mit S2 zu Hybridisierungssignalen gleicher Größe im Vergleich von Gesamt- und Plasmid-DNA (s. Abb. 7). Auch S1 zeigt das Hybridisierungssignal, das einem chromosomalen Fragment von 2,5 kb entspricht, während bei der Hybridisierung mit Plasmid-DNA, entsprechend der verringerten Plasmidgröße, ein 2,0 kb-Signal detektiert wurde. S3, die Sonde aus dem von DNA-Umlagerungen betroffenen Bereich, zeigt zwar das gleiche Hybridisierungssignal gegenüber Plasmid-DNA, nicht aber gegenüber chromosomaler DNA. Hier erfolgt die Hybridisierung mit einem sehr viel größeren, etwa 7,4 kb *Eco*RI-Fragment.

Damit konnte gezeigt werden, daß *dapD* auf einem 7,4 kb *Eco*RI-Fragment im Genom von *C. glutamicum* lokalisiert ist. Offenbar ist es bei dem artifiziellen "*dapD*"-Fragment aus pAW141, das zur Komplemention führte, zu einer Fusion des authentischen *dapD* (auf 7,4 kb *Eco*RI-Fragment) mit orf3 (auf 2,5 kb *Eco*RI-Fragment) gekommen. Ob die gefundenen chromosomalen Umlagerungen bereits bei Errichtung der Genbank oder erst bei der Selektion auf DAP-Prototrophie aufgetreten sind, läßt sich durch diese Experimente nicht entscheiden. Mit Hilfe der Sonde 3 bestand nun die Voraussetzung für die Isolierung des intakten *dapD*.

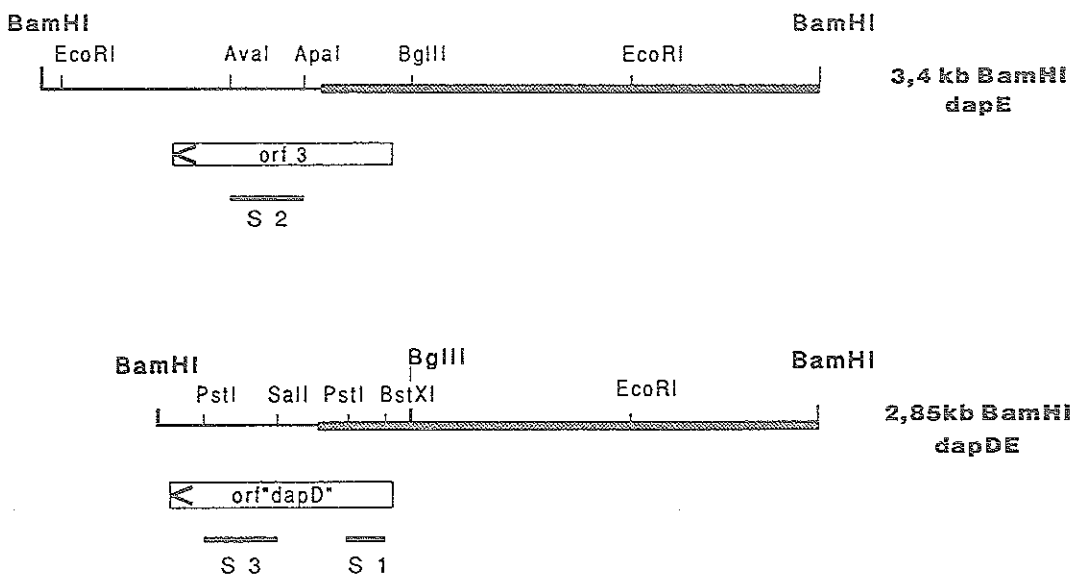


Abb. 6 Schema des *dapE* komplementierenden, intakten 3,4 kb *Bam*HI-Fragmentes und des *dapD und dapE* komplementierenden, artifiziellen 2,85 kb *Bam*HI-Fragmentes. Die Schraffierung gibt den Bereich der identischen Nukleotidsequenz beider DNA-Fragmente an. Zur Identifizierung des chromosomalen Genortes von *dapD* wurde die Sonde S3 eingesetzt, die aus dem für die *dapD*-Komplementation verantwortlichen orf"dapD" stammt. Als Kontrollen dienten die Sonden S1(ebenfalls aus orf"dapD", aber aus dem mit dem intakten Fragment identischen Bereich) und S3 (aus dem strukturell intakten orf3).

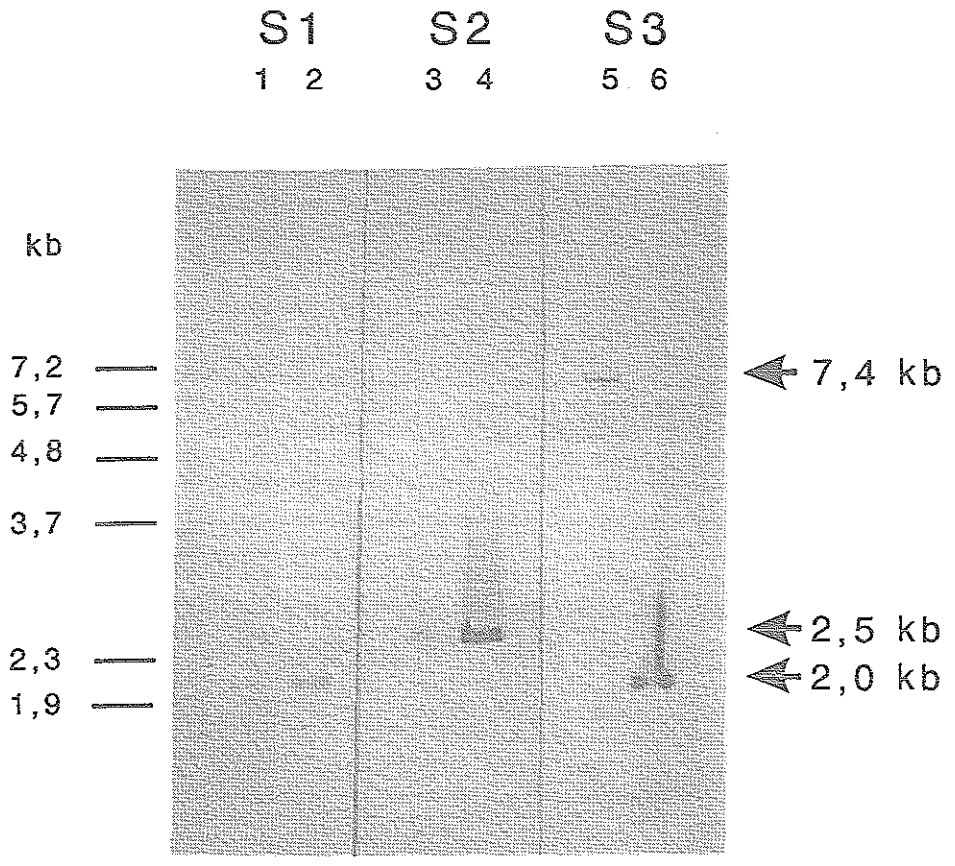


Abb. 7 Southern blot - Analyse zum Nachweis der Genorte von *dapD* und orf3. In den Spuren 1, 3 und 5 ist jeweils chromosomale DNA des Wildtyps *C. glutamicum* ATCC 13032 aufgetragen, die Spuren 2 und 6 enthalten Plasmid-DNA (pAW141), die das artifizielle "*dapD*" auf dem 2,85 kb *Bam*HI-Fragment trägt und Spur 4 enthält das Kontrollplasmid mit dem intakten 3,4 kb *Bam*HI-Fragment. Alle DNA-Proben wurden zuvor mit *Eco*RI geschnitten. S1 bis S3 gibt die jeweilige Sonde an, mit der die Proben hybridisiert wurden (vgl. Abb. 6). Obwohl die DNA-Fragmente für S1 und S3 auf dem artifiziellen "*dapD*"-Klon benachbart vorliegen, hybridisieren sie mit genomischen *Eco*RI-Fragmenten unterschiedlicher Größe.

3.2.3 Versuche zur Klonierung des intakten *dapD*

Weitere Southern blot - Analysen der genomischen DNA von *C. glutamicum* ergaben, daß *dapD* auf einem ca. 4,6 kb großen *Hin*dIII-Fragment lokalisiert ist. Zur Isolierung dieses Fragmentes wurde eine partielle *Hin*dIII-Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032 angelegt. Chromosomale DNA wurde mit *Hin*dIII vollständig gespalten, Fragmente einer Größe von 4,3 - 5,7 kb isoliert und mit pUC19 ligiert. Nach Transformation von *E. coli* NM522 mit diesem Ligationsansatz wurden 400 inserttragende Klone vereinzelt und für die Koloniehybridisierung eingesetzt. In einem Parallelansatz wurden 600 inserttragende Klone der gleichen partiellen Genbank zu Gruppen von je 50 vereinigt, einer Plasmidpräparation unterzogen und für eine dot blot-Hybridisierung verwendet. In keinem dieser Ansätze konnte mit der Digoxigenin-markierten 330 bp *dapD*-Sonde ein positives Hybridisierungssignal erhalten werden. Dieses Ergebnis zeigt, daß *dapD* nicht als 4,6 kb *Hin*dIII-Fragment im Vektor pUC19 klonierbar ist. Als möglicher Grund muß ein toxischer Effekt eines corynebakteriellen Gens, von *dapD* oder benachbarter Gene, bei Überexpression in *E. coli* in Betracht gezogen werden. In diesem Zusammenhang ist die orf3-*dapD* Genfusion bemerkenswert. Eine mögliche Erklärung könnte darin liegen, daß zusammen mit der Selektion auf DAP-Prototrophie auch auf Deletion eines bei Überexpression für *E. coli* toxischen Gens selektioniert wurde. Dies würde bedeuten, daß *dapD* zwar nicht direkt neben, aber doch in der Nachbarschaft von *dapE* lokalisiert ist. Tatsächlich konnte 1047 bp vor dem *dapE*-Strukturgen, der Start von orf5 identifiziert werden, dessen potentielles Genprodukt für ein Membranprotein codiert (s. 3.2.2) und damit möglicherweise für toxische Effekte verantwortlich sein könnte, wie bereits für andere Transportproteine nach Überexpression berichtet (Kalman *et al.*, 1991).

Zur Klärung der Frage, ob *dapD* stromabwärts von orf5 lokalisiert ist, wurde erneut eine Southern blot - Hybridisierung mit chromosomaler DNA durchgeführt. Als Sonde wurde wieder das Digoxigenin-markierte 330 bp *dapD*-Fragment verwendet. Der Hybridisierungs-Nachweis erfolgte hier mittels Chemielumineszenz-Reaktion und wurde durch Röntgenfilmschwärzung dokumentiert. Um den selben Filter mit einer zweiten Sonde hybridisieren zu können, wurde der Filter zur Entfernung der *dapD*-Sonde mit 0,2 N NaOH / 0,1% SDS gewaschen. Für die zweite Hybridisierung wurde als orf5-Sonde ein 276 bp *Bam*HI-*Bst*XI-Fragment aus dem *dapE Bam*HI 3,4 kb - Fragment eingesetzt. Auch hier erfolgte der Nachweis mittels Chemielumineszenz. Bei der Verwendung der Restriktions-

endonukleasen *Ban*II, *Bam*HI, *Pst*I und *Eco*RI ergaben sich eindeutig unterschiedliche Hybridisierungssignale, je nach Sondeneinsatz. Im Fall von *Hin*dIII- und *Cla*I-gespaltener chromosomaler DNA jedoch, ergab der Einsatz der orf5-Sonde ein deckungsgleiches Hybridisierungssignal mit dem der *dapD*-Hybridisierung bei 4,6 kb bzw. 9,4 kb (Daten nicht dargestellt).

Dieses Ergebnis zeigt, daß *dapD* und orf5 in der Tat wahrscheinlich benachbart lokalisiert sind. Da das 4,6 kb *Hin*dIII-Fragment bereits erfolglos zu klonieren versucht wurde (s.o.), bestätigte sich die Vermutung, daß Überproduktion eines potentiellen orf5-Genproduktes für die "Unklonierbarkeit" des intakten *dapD* verantwortlich ist. Aus diesem Grund kann eine *dapD*-Klonierung offenbar nur unter Vermeidung der Überproduktion eines intakten orf5-Genproduktes erfolgen, so daß eine orf5-Integrationsmutante konstruiert wurde, die erstens kein aktives orf5-Polypeptid bilden kann und zweitens für die sichere Klonierung des stromabwärts von orf5 gelegenen DNA-Bereiches genutzt werden kann.

Zu diesem Zweck wurde das Integrationsplasmid pEM1 linearisiert und mit dem gleichen internen orf5-Fragment, das auch für die Southern blot - Analyse eingesetzt wurde, blunt end ligiert. Nach Transformation von *E. coli* S17-1 mit diesem rekombinanten Plasmid pEMorf5$_{int1}$, erfolgte die Konjugation zwischen diesem *E. coli*-Stamm und *C. glutamicum* ATCC13032. Kanamycinresistente Transkonjuganten wurden nach Isolierung der chromosomalen DNA auf korrekte Integration des Plasmids pEM1 in orf5 mittels Southern blot überprüft (vgl. Abb. 9). Abbildung 8 zeigt eine Skizze zur Konstruktion von *C. glutamicum* ATCC13032 orf5:: pEMorf5$_{int1}$ durch homologe Komplementation. Die gezielte Konstruktion des Plasmids pEMorf5$_{int1}$ erlaubte es, daß nach erfolgreicher Integration in das Genom distal ein *Hin*dIII-Schnitt aus dem Integrationsplasmid zur Verfügung stand, der für die Reklonierung des pEM1-Vektors mit dem angrenzenden chromosomalen DNA-Fragment genutzt wurde. Plasmidpräparationen bestätigten die Erwartung, daß pEM1 ein etwa 4,1 kb großes Insert trägt (pEMorf5c4,1). Die Integrität der chromosomalen Insertion wurde durch Southern blot bestätigt (s. Abb. 9).

Aus dem durch plasmid rescue klonierten rekombinanten Plasmid auf Basis des pEM1-Vektors, wurde mit *Eco*RI und *Hin*dIII ein definiertes Fragment des Inserts hergestellt, isoliert und in jeweils beiden Orientierungen in die Vektoren pUC19 und pJC1 inseriert. Tatsächlich führte, wie aufgrund der Ergebnisse der chromo-

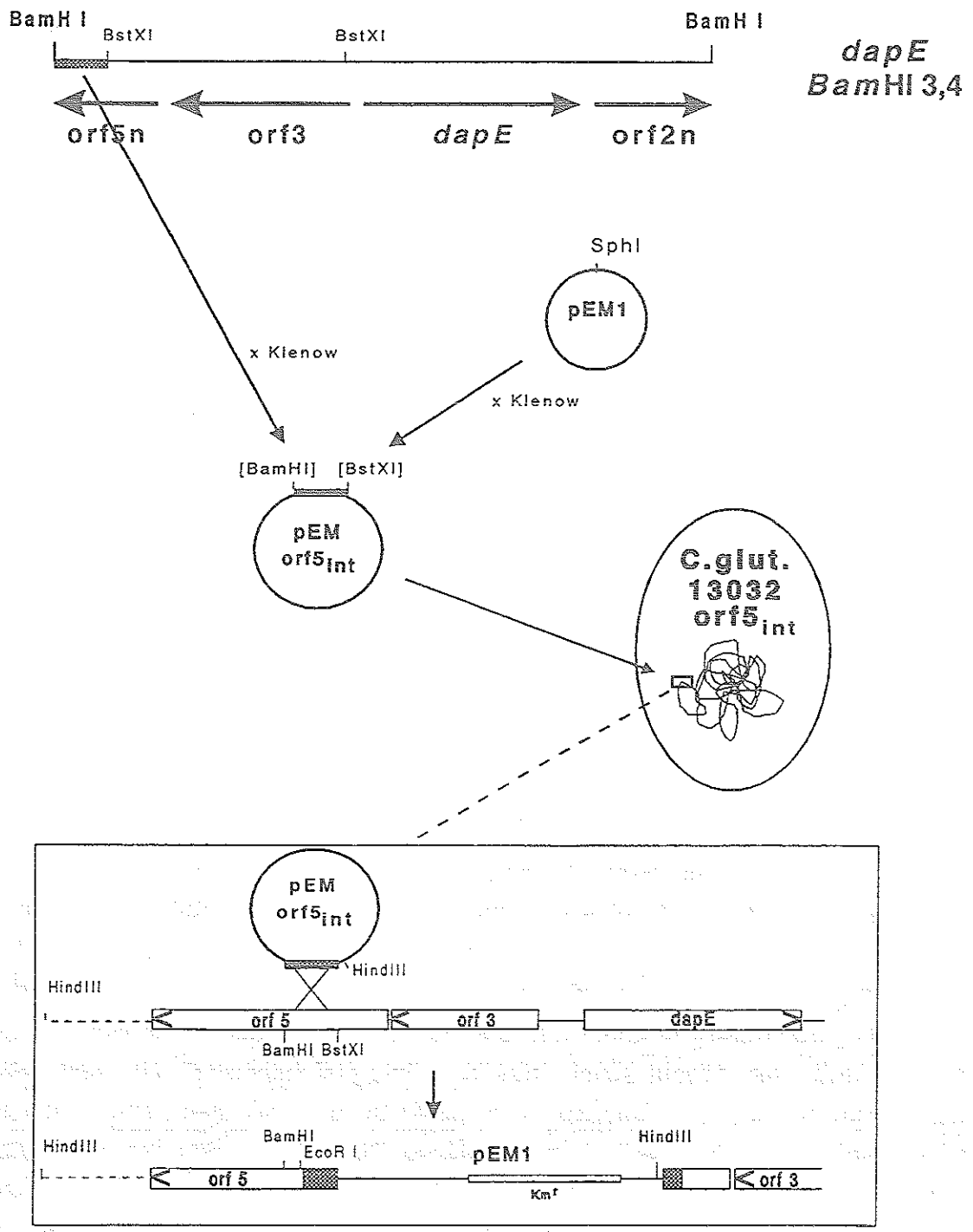


Abb. 8 Schema zur Konstruktion von *C. glutamicum* ATCC13032 orf5::pEMorf5$_{int1}$. Oben ist die chromosomale Organisation sowie die Lage des internen *Bam*HI-*Bst*XI -Fragmentes aus orf5 dargestellt. Im unteren Kasten ist die Integration des Plasmids pEMorf5$_{int1}$ durch homologe Rekombination aufgeführt. Die für die Klonierung wichtigen *Hin*dIII-Schnittstellen sind eingezeichnet.

somalen Kartierung erwartet, das in pUC19 inserierte 3,95 kb große *Hin*dIII/*Eco*RI-Fragment zur Komplementation von *E. coli* RDD32 *dapD*. Nach Erstellung einer Restriktionskarte mit Hilfe der Plasmide pUC19 *dapD Hin*dIII/ EcoRI 3,95 und pJC *dapD Hin*dIII/*Eco*RI 3,95 wurde der Bereich, der *dapD*-Komplementation vermittelt, weiter subkloniert. Auch ein 1,55 kb *Sac*I/*Sca*I-Fragment kann *dapD* komplementieren (Abb. 10). Die Tatsache, daß mit dem 3,95 kb großen *Hin*dIII-*Eco*RI-Fragment in pJC1 keine Komplementation erreicht wurde, legt den Schluß nahe, daß der coryneeigene Promotor nicht oder nur schlecht von der RNA-Polymerase in *E. coli* erkannt wurde, so daß Expression nur mit Hilfe eines externen Promotors erfolgen kann.

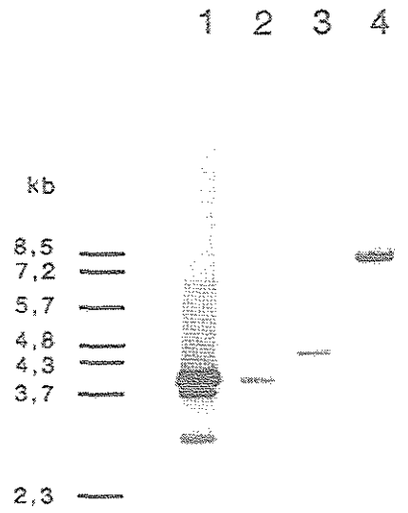


Abb. 9 Southern blot zum Nachweis der Integrität des isolierten *Hin*dIII-Fragmentes aus *C. glutamicum*. Als Sonde diente ein Digoxigenin-markiertes internes 0,75 kb *Sca*I-*Sal*I-Fragment. Spuren 1 und 2 enthalten *Hin*dIII und *Eco*RI geschnittene DNA des durch plasmid rescue isolierten pEMorf5c4,1 (1) bzw. chromosomale Wildtyp-DNA von *C. glutamicum* ATCC13032 (2). Spur 3 enthält ebenfalls Wildtyp-DNA, die wie die chromosomale DNA der Integrationsmutante *C. glutamicum* 13032 orf5::pEMorf5$_{int}$ (Spur 4), aus der pEMorf5c4,1 isoliert wurde, mit *Hin*dIII gespalten wurde. Deutlich ist die gleiche Größe der DNA-Fragmente mit spezifischen Hybridisierungssignalen in Spur 1 und 2 zu erkennen sowie das um 3,55 kb größere Fragment (Integrationsvektor pEMorf5$_{int1}$) bei Spur 4 im Vergleich mit Spur 3.

3.2.4 Sequenzanalyse

Zunächst sollten auch ausschließlich Deletionsklonen für die Sequenzierung von *dapD* eingesetzt werden. Es zeigte sich jedoch, daß von dem 1,55 kb großen *dapD*-komplementierenden *SacI-ScaI* Fragment keine Deletionen statistischer Größenverteilung mittels Exonuklease III erhalten werden konnten. Aus diesem Grund wurden auch Subklone mit Hilfe von bekannten Restriktionsschnittstellen erstellt und für die Sequenzierung nach Sanger *et al.* (1977) eingesetzt. Die Sequenz wurde mittels Fluoreszenz-markierter Primer und automatischer Laser-fluoreszenzdetektion (A.L.F.) ermittelt. Dennoch gelang es nicht, eine lückenlose Sequenz zu erstellen. Erst durch den Einsatz von Oligonukleotiden, die als interne Primer verwendet wurden, konnte die Sequenz mit Hilfe von Fluoreszin-markiertem dATP komplettiert werden. Abbildung 10 zeigt die Sequenzierungs-strategie. Die Nukleotidsequenz eines 1164 bp großen DNA-Fragmentes, das die vollständige Information zur Bildung von DapD trägt, ist in Abbildung 11 dargestellt.

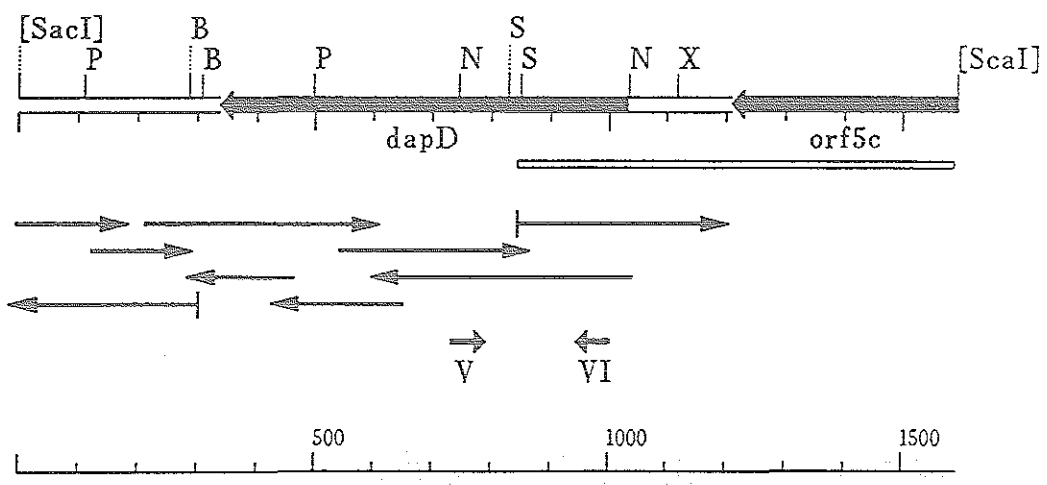


Abb. 10 Restriktionskarte der chromosomalen Organisation von *dapD* auf dem Chromosom von *C. glutamicum* sowie *dapD*-Sequenzierungsstrategie. Einfache Pfeile stellen Fragmente aus Exonuklease III - Verdau dar, definierte Fragmente sind durch einen Querstrich am Beginn des Pfeiles gekennzeichnet. Die mit römischen Ziffern gekennzeichneten Pfeile entsprechen der Lage der eingesetzten Primer. Die schmale Box zeigt den Bereich an, dessen Nukleotidsequenz durch Sequenzierung von pUC19orf5c1.4 bekannt ist (s. Abb. 24). B = *Bam*HI, N = *Nsi*I, P = *Pst*I, S = *Sal*I, X = *Xba*I

```
                                                  XbaI                                   75
AGAAATCGGGTCCACCGACCAGTCCGCGCTCACACCTCTAGAAGGCGTCGATGAAGATCGAAACGTCACCCGCAA
                                                                 ┌dapD---> .          .150
AATCGTGACGACAACTATCGACACCGACGCAGCCCCCACCGACACCTACGATGCATGCTGCGCCTTCACCTCCTC
                                                      M  L  R  L  H  L  L
                                                                                        225
TCCCACCGCGTTTTCCGCCCTCACACCATCAACCTAGACGGCATTTTCGGCCTCCTCAACAATGTCGTGTGGACC
 S  H  R  V  F  R  P  H  T  I  N  L  D  G  I  F  G  L  L  N  N  V  V  W  T
                                                                                        300
AACTTCGGACCGTGCGCAGTTGACGGTTTCGCACTCACCCGCGCGCGCCTGTCACGCCGAGGCCAAGTTACGGTT
 N  F  G  P  C  A  V  D  G  F  A  L  T  R  A  R  L  S  R  R  G  Q  V  T  V
        SalI                SalI                                                            375
TATAGCGTCGACAAGTTCCCACGCATGGTCGACTATGTGGTTCCCTCGGGCGTGCGCATCGGTGACGCCGACCGC
 Y  S  V  D  K  F  P  R  M  V  D  Y  V  V  P  S  G  V  R  I  G  D  A  D  R
                                                                                        450
GTCCGACTTGGCGCGTACCTGGCAGATGGCACCACCGTGATGCATGAGGGCTTCGTGAACTTCAACGCTGGCACG
 V  R  L  G  A  Y  L  A  D  G  T  T  V  M  H  E  G  F  V  N  F  N  A  G  T
                                                                                        525
CTCGGCGCTTCCATGGTTGAGGGCCGCATTTCCGCTGGCGTCACCGTTGATGACGGCACCGATGTCGGTGGCGGC
 L  G  A  S  M  V  E  G  R  I  S  A  G  V  T  V  D  D  G  T  D  V  G  G  G
                                                                                        600
GCATCTATCATGGGCACCCTGTCCGGCGGCGGCCAGCACGTCATCTCGCTGGGCAAGCGCTGCCTGCTCGGCGCC
 A  S  I  M  G  T  L  S  G  G  G  Q  H  V  I  S  L  G  K  R  C  L  L  G  A
                                                                                        675
AATTCCGGCTGCGGCATCCCGCTGGGCGACGACTGCATCATCGAGGCCGGCCTCTACATCACTGCAGGCACCAAA
 N  S  G  C  G  I  P  L  G  D  D  C  I  I  E  A  G  L  Y  I  T  A  G  T  K
                                                                                        750
GTGCTTTTCGACGGCTCCCTCCACAAAGCCTCCACCCTCGCGGGCTCAAACGGCCTCATTTTTAGGCGTGACTCC
 V  L  F  D  G  S  L  H  K  A  S  T  L  A  G  S  N  G  L  I  F  R  R  D  S
                                                                                        825
GTCAGCGGACAAGTTGTCGCAGTGCCCAATACCAAAGTTGTCGAACTCAACACAGCTTTGCACTCCAACTAGTCT
 V  S  G  Q  V  V  A  V  P  N  T  K  V  V  E  L  N  T  A  L  H  S  N  -
                          BamHI                   BamHI                                 900
TCTTTGTTGAGGGCGCGGACGCGGATCCGCTCAAACCTAGCCTGGATCCGATCCCTCAACACCTGACCCCAAATC
                                                                                        975
CCCCGCGGCATCGCTTTCACCAACGGACCCGTCGGCCTGGTCACCGCCGGCACATCCATCGGCCCAATCCATCTA
                                                                                       1050
ATCTCCGCCAATCCATTAGCATCAGCAGTAAAGCGACCATCGGTTTTCATATTGTGATGCCGCTGGCACAACAAC
                                                                                       1125
TGCAGGTTCCACGCCGCTGTCGGGCCGCCCTCCGCCCACGGGATAATGTGATCGACCTGGCATTTACTCGCCGGG
                                        [SacI]  1164
ACGCAACACCCTGGGAAGCGGCAATGCCCATCCCGAGCT
```

Abb. 11 Nukleotidsequenz des in Abb. 10 dargestellten *dapD*-tragenden Bereiches des 1,55 kb großen *Sac*I-*Sca*I Fragmentes aus *C. glutamicum* ATCC 13032. Die Transkriptionsrichtung von *dapD* ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Bemerkenswert ist der ungewöhnlich hohe GC-Anteil der Nukleotidsequenz. Mit 61% liegt er deutlich höher als der Durchschnitt. Dies gilt sowohl beim Vergleich mit benachbarten DNA-Bereichen (54% beim *dapE* 3,4 kb *Bam*HI-Fragment) als auch beim Vergleich mit dem Gesamt-GC-Gehalt von *C. glutamicum* (57%; Martin, 1989). Der hohe GC-Gehalt ist wahrscheinlich auch der Grund für die Probleme bei der Generierung der Deletionsklone sowie für die Sequenzierung, da bekannt ist, daß GC-reiche Regionen bevorzugt Sekundärstrukturen aus-

bilden, die zu einem veränderten elektrophoretischen Laufverhalten führen (Tabor & Richardson, 1985).

Durch die Sequenzanalyse konnte ein 689 bp großes Leseraster identifiziert werden, das für die Komplementation *dapD*-Mutante verantwortlich ist. Erstaunlicherweise verlief der Vergleich der abgeleiteten AS-Sequenz mit bekannten Proteinen (BLASTP; Husar 2.1) negativ. Auch der direkte Vergleich mit DapD aus *E. coli* (Programm GAP) ergab nur 21% Identität auf Aminosäureebene. Die Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität (s. 3.4.2) zeigte jedoch, daß das klonierte *C. glutamicum*-Fragment tatsächlich für die Tetrahydrodipicolinatsynthase (DapD) codiert. Das potentielle Genprodukt ist allerdings mit 230 AS um 45 AS kürzer als die beiden anderen bekannten DapD-Polypeptide aus *E. coli* (Richaud *et al.*, 1984) und *Actinobacillus pleuropneumoniae* (embl, X63201). Im Gegensatz zu der sehr geringen Ähnlichkeit von DapD aus *C. glutamicum* zu DapD anderer Organismen, ergab der Vergleich zwischen den abgeleiteten Aminosäuresequenzen des authentischen *dapD* und orf3 einen hohen Grad an Übereinstimmung (ClustAlV; Husar 3.0). DapD ist der carboxyterminalen Sequenz eines möglichen orf3-Polypeptids sehr ähnlich (43% identische AS; s. Abb. 34). Darüberhinaus ist die DapD-Sequenz völlig identisch mit dem Carboxyterminus des unter 3.3.2 beschriebenen artifiziellen "DapD"-Polypeptides (vgl. Abb. 5), so daß wahrscheinlich homologe Rekombination zwischen orf3 und *dapD* zu dem artifiziellen "dapD" und gleichzeitig zur Deletion von orf5 führte.

3.3 Konstruktion von Mutanten mit Defekt im Succinyldiaminopimelatweg

Um Untersuchungen zur Funktion des Succinyldiaminopimelatweges (SuccDAP-Weg) in *C. glutamicum* durchführen zu können, sollten mit Hilfe der isolierten Gene *dapD* und *dapE* Mutanten konstruiert werden, die einen spezifischen Block zu Beginn (*dapD*) oder gegen Ende (*dapE*) des SuccDAP-Weges aufweisen. Zur gezielten Inaktivierung von Genen im Chromosom von *C. glutamicum* besteht die Möglichkeit Integrationsvektoren zu nutzen, die mit Hilfe eines zuvor inserierten internen Genfragmentes durch homologe Rekombination zu "*gene disruption*" und damit Inaktivierung des Gens führen (Schwarzer & Pühler, 1991). Diese etablierte Methode hat bereits bei unterschiedlichen Fragestellungen zum Erfolg geführt

(Schrumpf *et al.*, 1991; Börmann-El Kholy *et al.*, 1993; Peters-Wendisch *et al.*, 1993), hat aber den Nachteil, daß sie für eine gezielte Konstruktion von spezifischen Mehrfachmutanten weniger geeignet ist, da gleichzeitig auf unterschiedliche Marker selektioniert werden müßte. Alternativ zu diesen Integrationsvektoren steht mit pK18mobsacB neuerdings ein Vektor zur Verfügung, der die Einführung spezifischer Deletionen in die Zielgene ermöglicht, ohne daß Vektorsequenzen zurückbleiben (Schäfer *et al.*, 1994).

3.3.1 Konstruktion der orf3-Deletionsmutante

Die Möglichkeit der Erzeugung einer spezifischen Doppelmutante war speziell im Fall von *dapD* und orf3 von großem Interesse, da deren Genprodukte einen auffallend hohen Anteil identischer Aminosäuren aufweisen. Um auszuschliessen, daß orf3, trotz fehlendem *dapD*-Komplementationsvermögen, nicht doch für eine Succinylase codiert, wenn *dapD* kein intaktes Genprodukt liefert, sollte eine *dapD* oder orf3-Deletionsmutante konstruiert werden. Dieser Stamm könnte anschließend die Basis für eine gezielte Plasmidintegration in das entsprechend andere Gen darstellen, um so zu einer d*apD*-orf3-Doppelmutante weiterentwickelt zu werden.

Auf der Basis von pK18mobsacB wurden zwei Integrationsplasmide konstruiert, die Deletionen in *dapD* und orf3 aufweisen. Abbildung 12 zeigt beispielhaft die Vorgehensweise für die Konstruktion von pK18mobsacB Δorf3. Dabei wurde ein DNA-Fragment in pK18mobsacB inseriert, dessen interne Gendeletion (479 bp *Kpn*I-Fragment) von zwei annähernd gleich großen DNA-Bereichen flankiert wird. Entsprechend wurde auch pK18mobsacB Δ*dapD* konstruiert, das ein 1,05 kb Fragment mit einer internen *dapD*-Deletion von 457 bp (*Eco*47III/*Nsi*I-Fragment) trägt. Beide Plasmide wurden konjugativ in den *C. glutamicum*-Wildtyp transferriert, pK18mobsacB Δ*dapD* darüberhinaus auch in den Lysinproduzenten *C. glutamicum* MH20-22B. Abbildung 13 skizziert die Konstruktion der Deletionsmutante *C. glutamicum*13032 Δorf3 basierend auf einer doppelten Rekombination. Das erste Rekombinationsereignis erfolgt nach Transfer des Integrationsplasmides und führt zur Insertion in einen der beiden die Deletion umgebenden homologen DNA-Bereiche. Kultivierung dieser kanamycinresistenten Integrationsmutante auf Vollmedium ohne Antibiotikum führt zum Verlust des Integrationsvektors durch eine zweite Rekombination, die, wenn dieses Ereignis auf dem

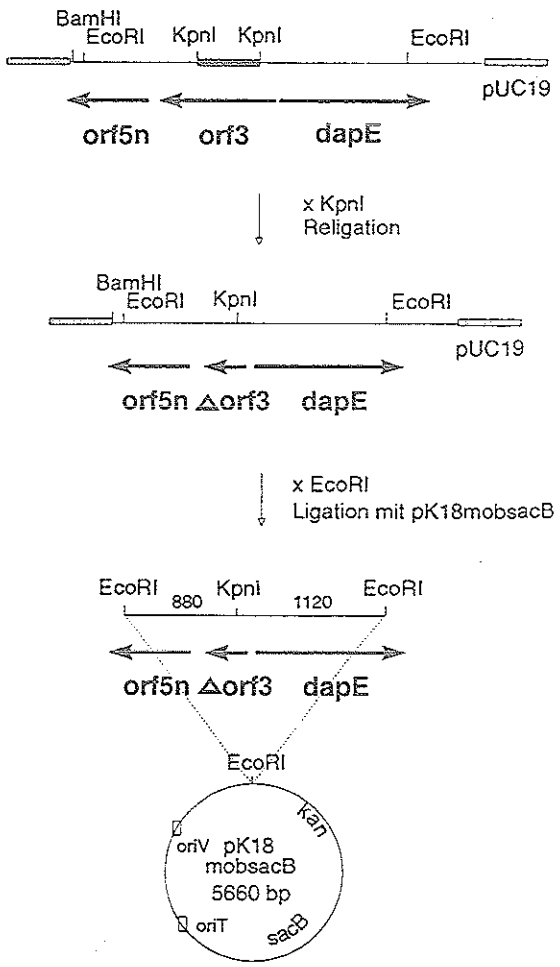


Abb. 12 Konstruktion des Plasmids pK18mobsacB Δorf3 für die chromosomale Deletion von orf3. Ein internes 479 bp *Kpn*I-Fragment wurde aus orf3 entfernt, und ein 2,0 kb großes *Eco*RI-Fragment, das sowohl dieses die Deletion tragende orf3 (Δorf3) als auch die intakten benachbarten Bereiche von orf5 und *dapE* beinhaltet, wurde mit dem Vektor pK18mobsacB ligiert.

jenseits der Deletion liegenden homologen DNA-Bereich erfolgt, zur Etablierung der zuvor plasmidcodierten Deletion im Chromosom führt. Das Positiv-Screening auf dieses 2. Rekombinationsereignis wird durch den *sacB*-Marker ermöglicht. *sacB* codiert für das Enzym Levansucrase und führt zur Synthese von Levan aus Saccharose. Da Levan einen toxischen Effekt hat, führt dies dazu, daß nur die *C. glutamicum*-Zellen, die den Integrationsvektor und damit das *sacB*-Gen verloren haben, auf Saccharose-Medien normales Wachstum zeigen (Jäger *et al.*, 1992).

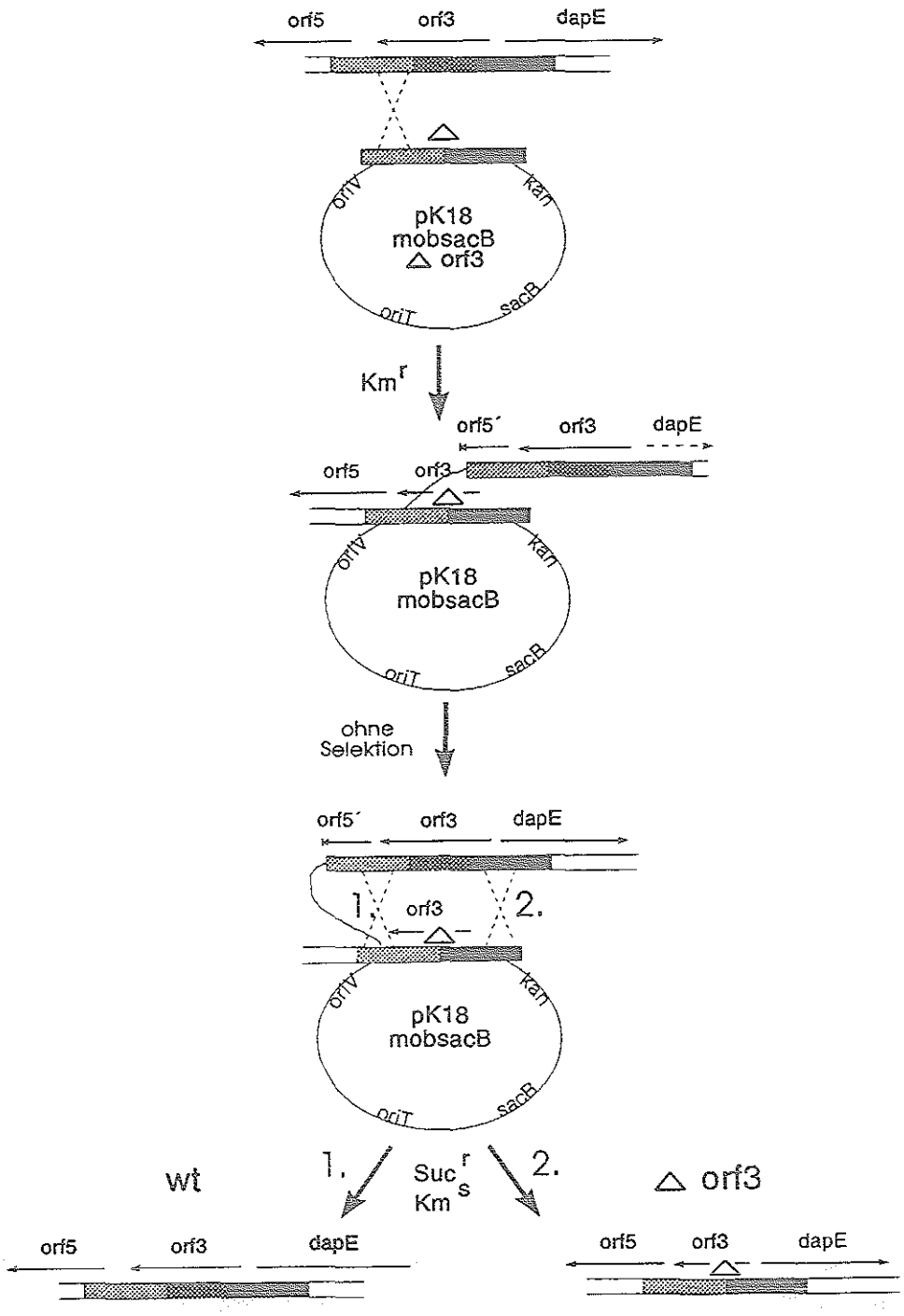


Abb. 13 Skizze zur Konstruktion der Deletionsmutante *C. glutamicum* 13032 Δ orf3. Dargestellt ist die Integration des Plasmides pK18mobsacBΔorf3 in das Genom von *C. glutamicum* ATCC 13032 durch homologe Rekombination. Durch ein zweites Rekombinationsereignis kommt es zum Verlust des Integrationsplasmides, wobei es entweder zur Rekonstitution des Wildtyps (1.) oder zum Genaustausch mit dem deletierten orf3-Fragment kommt (2.)

In allen Fällen konnte bei den kanamycinresistenten Transkonjuganten die Integration der Plasmide in das bakterielle Genom nachgewiesen werden. Die anschließende Selektion auf das zweite Rekombinationsereignis erbrachte auch jeweils den erwarteten Suc^r Km^s - Phänotyp, aber Southern blot Analysen zeigten, daß nur im Stamm *C. glutamicum* 13032::pK18mob*sacB*Δorf3 ein Genaustausch stattgefunden hatte, d.h. 3 von 9 getesteten Klonen enthielten ein um 479 bp verkürztes orf3, darunter *C. glutamicum* W3-36 (Klon 36 in Abb. 14). In allen anderen Fällen kam es zur Rekonstitution des Genotyps von ATCC 13032.

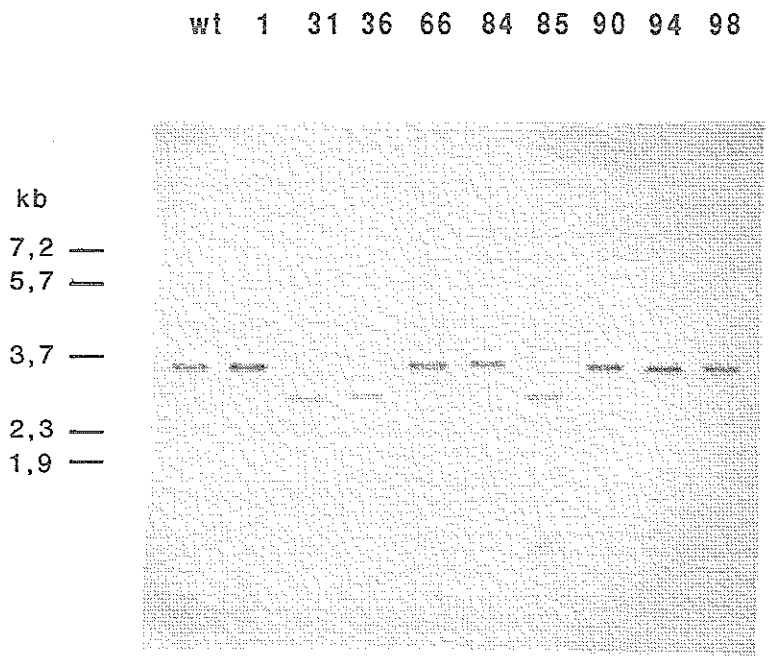


Abb. 14 Southern blot - Analyse der *Nsi*I-geschnittenen genomischen DNA von *C. glutamicum* ATCC 13032 (wt) sowie von 9 Suc^r, Km^s Klonen, die aus dem Stamm *C. glutamicum*13032::pK18mob*sacB*Δorf3 hervorgegangen sind (1-98). Als Sonde diente ein 609 bp *Sca*I-Fragment aus orf5. Die mit 31, 36 und 85 bezeichneten Spuren zeigen ein kleineres, der orf3-Deletion entsprechendes Fragment.

Die Tatsache, daß in allen 14 getesteten Suc^r, Km^s Klonen kein Genaustausch von *dapD* nach Δ*dapD* nachgewiesen werden konnte (Southern blot nicht dargestellt), deutet daraufhin, daß es einen Selektionsdruck auf Erhalt des *dapD*-Gens gibt, so daß die zweite Rekombination jeweils zur Rekonstitution des Wildtyp-*dapD* führte. Damit besteht erstmalig ein Hinweis darauf, daß dem intakten Succinyldiaminopimelatweg neben dem Dehydrogenaseweg eine wichtige, wenn auch bislang unbekannte, Funktion zukommt. Da eine entsprechende Deletion von orf3 jedoch erfolgreich war, muß man den indirekten Schluß ziehen, daß ein potentielles orf3-Genprodukt, im Gegensatz zu DapD, wahrscheinlich keinen entscheidenden Einfluß auf den Kohlenstofffluß zum DAP hat.

3.3.2 Konstruktion von *dapD*- und *dapE*-Integrationsmutanten

Zur einfachen Geninaktivierung von *dapD*, *dapE* und orf3 wurde der Vektor pEM1 (Schrumpf *et al.*, 1991) eingesetzt. Dieser Vektor zeichnet sich, wie auch pK18mobsacB, durch ein Kanamycin-Resistenzgen, einen Replikationsursprung für *E. coli* und eine mob-site aus und ist damit für den konjugativen Transfer von *E. coli* nach *C. glutamicum* geeignet.

Zur Konstruktion des *dapD*-Integrationsplasmides wurde ein 330 bp *PstI*/*SalI* internes *dapD*-Fragment in den Vektor pEM1 ligiert und *E. coli* S17-1 mit diesem Ansatz transformiert. Nach Konjugation zwischen *E. coli* S17-1 pEM$dapD_{int}$ und *C. glutamicum* 13032 konnte ein kanamycinresistenter *C. glutamicum*-Klon, *C. glutamicum* 13032 *dapD*::pEM$dapD_{int}$, isoliert werden. Zur Konstruktion der Mutante *C. glutamicum* 13032 *dapE*::pEM$dapE_{int}$ wurde analog das interne *dapE*-Fragment 298 bp *Hin*dII eingesetzt. Außerdem wurde der *dapD*-Integrationsvektor auch für die Konstruktion einer entsprechenden *dapD*-Integrationsmutante des Lysinproduktionsstammes MH20-22B und der orf3-Deletionsmutante W3-36 eingesetzt: *C.glutamicum* MH20-22B *dapD*::pEM$dapD_{int}$ und *C.glutamicum* W3-36 *dapD*::pEM$dapD_{int}$. Die korrekte Integration in das bakterielle Genom wurde in allen Fällen nach Isolierung der chromosomalen DNA durch Southern blot nachgewiesen.

Die erfolgreiche Integration in das *dapD*-Gen, Stamm *C. glutamicum* 13032 *dapD*::pEM$dapD_{int}$, war insofern überraschend, weil der Versuch der Deletion von *dapD* im Genom nicht erfolgreich war (s. 3.3.1). Dies zeigt die Grenzen der

Technik der Deletion chromosomaler Bereiche mittels pK18mobsacB auf. Sobald der Genaustausch zu einem Genotyp mit negativen physiologischen Auswirkungen führt, ist eine Rückrekombination zum Ausgangsgenotyp stark bevorzugt. Auf der anderen Seite gab die parallele Durchführung von Deletions- und Integrationsexperimenten im Fall von *dapD* einen wertvollen Hinweis auf die Rolle dieses Gens für *C. glutamicum*. Offenbar ist *dapD* zwar nicht essentiell, aber für ein optimales Wachstum der Zellen von Bedeutung. Voraussetzung für diesen Rückschluß ist jedoch der Nachweis, daß die Stämme mit *dapD*-Integration keine Succinylase-Aktivität mehr besitzen.

3.4 Bestimmung der Enzymaktivitäten

Die Bestimmung der spezifischen Enzymaktivitäten diente sowohl dem funktionellen Nachweis der klonierten Gene als auch der Überprüfung der Geninaktivierung der durch Integration und Deletion konstruierten Stämme. Die isolierten Gene wurden zunächst in den *E. coli* - *C. glutamicum* Pendelvektor pJC1 umkloniert und anschließend mittels Elektroporation in die *C. glutamicum*-Stämme transferiert.

3.4.1 Bestimmung der N-Succinyldiaminopimelatdesuccinylase-Aktivität (DapE)

Tabelle 5 zeigt die 10-fache Überexpression von *dapE* in den rekombinanten Stämmen *C. glutamicum* 13032 pJC *dapE BamHI* 3,4 A und B (A bzw. B gibt die unterschiedliche Insertorientierung an) im Vergleich zum Wildtyp mit Vektor ohne rekombinanten DNA-Anteil. Damit war der funktionelle Nachweis für die Klonierung von *dapE* erbracht. In der Integrationsmutante *C. glutamicum* 13032 *dapE*::pEM$dapE_{int}$ ist keine Desuccinylase-Aktivität nachweisbar, so daß in diesem Stamm der Kohlenstofffluß durch die Succinylase-Variante des verzweigten Diaminopimelatweges auf der Stufe des N-Succinyl-DAP blockiert ist.

Tabelle 5: N-Succinyldiaminopimelatdesuccinylase-Aktivität in verschiedenen rekombinanten Stämmen von *C. glutamicum* ATCC 13032 . Die Anzucht erfolgte über Nacht in CgIII Medium. Die spezifische Aktivität ist in µmol min^{-1}(mg Protein)$^{-1}$ angegeben.

Stamm	Desuccinylase (DapE)
C. glutamicum 13032	
pJC1	0,021
pJC *dapE BamHI* 3.4A	0,221
pJC *dapE BamHI* 3.4B	0,223
dapE::pEM*dapE*$_{int}$	< 0,001

3.4.2 Bestimmung der Tetrahydrodipicolinatsuccinylase-Aktivität (DapD) und strukturelle Analyse eines *ddh*-Genproduktes mit Hyperaktivität

Für die Bestimmung der spezifischen Succinylase-Aktivitäten muß das Substrat der Reaktion, Tetrahydrodipicolinat (THDPA), zunächst synthetisiert werden. Im Unterschied zu der chemisch recht aufwendigen Synthese (Couper *et al.*, 1992), läßt sich THDPA enzymatisch mit Hilfe der Diaminopimelatdehydrogenase *in vitro* entgegen der physiologischen Reaktionsrichtung aus Diaminopimelat (DAP) herstellen. Dazu muß jedoch die DAP-Dehydrogenase zunächst angereichert werden, da die spezifische Aktivität des Enzyms in *C. glutamicum* nicht sehr hoch ist (Schrumpf *et al.*, 1992). Durch heterologe Komplementation konnte aber ein *dapD*-komplementierendes Fragment isoliert werden (Wehrmann, 1991), das zu Beginn der Arbeiten sehr intensiv untersucht wurde, sich dann aber als rekonstituierte DAP-Dehydrogenase mit extrem hoher spezifischer Aktivität (500-fach) herausstellte. Daher war dieses Gen zwar nicht das ursprünglich gewünschte, für die Succinylase codierende Gen, konnte aber als wichtiges Hilfsmittel für die Herstellung des Succinylase-Substrates eingesetzt werden. Die Charakterisierung des *ddh*-Gens in pAW111 erbrachte die folgenden Ergebnisse.

3.4.2.1 Molekulare Analyse eines Hyperaktivität vermittelnden *ddh*-Fragmentes

Zur Überprüfung des klonierten, Dehydrogenase-Hyperaktivität vermittelnden 1,5 kb großen Fragmentes wurden beide DNA-Stränge ansequenziert (Detektion mit A.L.F.-Sequenzer). Es zeigte sich, daß jeweils alle 350 bestimmten Nukleotide mit der veröffentlichen Sequenz des *ddh*-Gens (Ishino *et al.*, 1987) übereinstimmten (nicht dargestellt), d.h. keine erkennbare DNA-Umorganisation aufgetreten ist. Interessanterweise konnte allerdings eine *in frame* - Fusion des vektoreigenen *lacZ*-Gens mit dem *ddh*-Gen festgestellt werden. Die Bildung eines entsprechenden aminoterminal verlängerten aktiven Genproduktes, dessen Synthese der Kontrolle des vektoreigenen *lacZ*-Promotors unterliegt, könnte also die gemessene 500-fache Überexpression des *ddh*-Gens erklären (Wehrmann, 1991).

Da die auf DNA-Ebene beobachtete Fusion 155 bp vor dem Start des *ddh*-Strukturgens auftritt, sollte sich ein entprechendes LacZ-Ddh Polypeptid durch ein deutlich vergrößertes Molekulargewicht auszeichnen. Aus diesem Grund wurden die in *E. coli* gebildeten Proteine mittels SDS-Page untersucht. Abbildung 15 zeigt, daß in dem Stamm mit plasmidcodiertem Fusionsprotein, *E. coli* RDD32 pAW111, ein Polypeptid synthetisiert wird, dessen Größe mit der aus der Sequenzanalyse vorhergesagten molekularen Masse von 42410 Da übereinstimmt, d.h. 35099 Da Ddh (Ishino *et al.*, 1988) zuzüglich LacZ-Anteil und translatierter *upstream* Region.

Diese Untersuchungen zeigten, daß die hohe Dehydrogenaseaktivität durch die Überproduktion eines Ddh-Polypeptides mit verlängertem Aminoterminus verursacht wurde und nicht auf einem veränderten *ddh*-Strukturgen beruht. Die Expression des *ddh*-Gens allein, durch die eigenen Transkriptions- und Translationssignale auf dem Kontrollplasmid pAW113, führte hingegen nicht zu einer auf dem Proteingel erkennbar verstärkten Synthese des Ddh-Polypeptids.

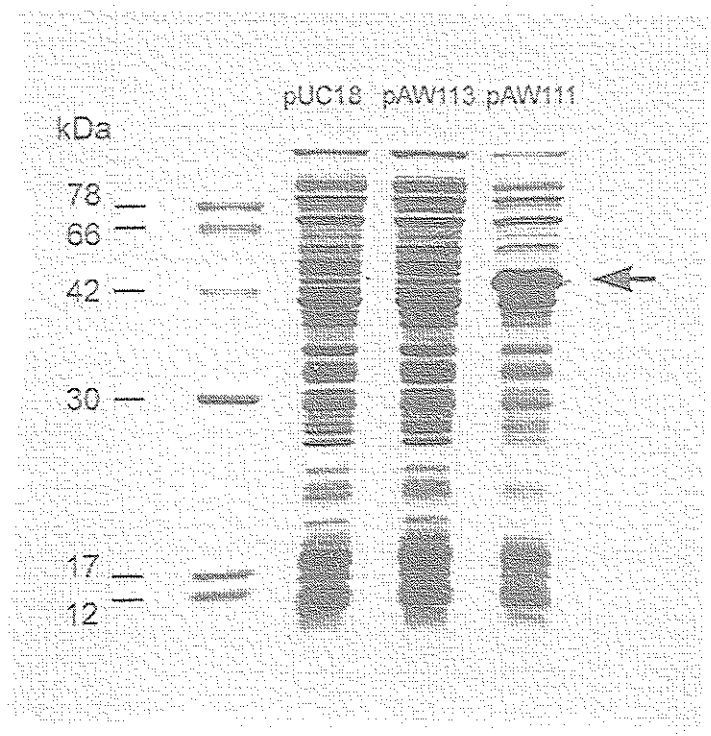


Abb. 15 Überproduktion eines funktionell aktiven LacZ-Ddh Fusionsproteins in *E. coli*. Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Page Gel mit Proteinextrakten von *E. coli* RDD32 mit pUC18, pAW113 - Kontrollplasmid mit *ddh* und 719bp upstream-Bereich, pAW111 - *ddh* mit 155bp upstream-Bereich

3.4.2.2 Bestimmung der Succinylaseaktivität (DapD)

Tabelle 6 zeigt, daß das Plasmid pJCdapD 1,55A bzw. 1,55B zu einer 7- bis 11-fachen Überexpression von *dapD* in *C. glutamicum* 13032 bzw. MH20-22B führt. Dagegen vermittelt das 3,4kb *Bam*HI-Fragment, das neben *dapE* auch orf3 trägt, keine erhöhte Succinylase-Aktivität. Auch die orf3-Deletionsmutante, *C. glutamicum* W3-36, besitzt im Vergleich mit dem Wildtyp keine geringere DapD-Aktivität, während sowohl in der Doppelmutante *C. glutamicum* W3-36 *dapD* ::pEM$dapD_{int}$ als auch in der Einfachmutante *C. glutamicum dapD* in Wildtyp und Lysinproduzent keine Succinylase-Aktivität gemessen werden konnte.

Tabelle 6: Tetrahydrodipicolinat Succinylaseaktivität von verschiedenen rekombinanten *C. glutamicum* Stämmen. Die Anzucht erfolgte in CgIII-Medium. Die spezifische Aktivität ist in µmol min^{-1} (mg Protein)$^{-1}$ angegeben.

Stamm	Succinylase (DapD)
***C. glutamicum* 13032**	
pJC1	0.008
pJC dapD 1.55A	0.093
pJC dapD 1.55B	0.060
pJC orf3/*dapE BamHI* 3.4A	0.009
pJC orf3/*dapE BamHI* 3.4B	0.007
dapD::pEM*dapD*$_{int}$	< 0.001
***C. glutamicum* W3-36** (Δorf3)	0.012
dapD::pEM*dapD*$_{int}$	< 0.001
***C.glutamicum* MH20-22B**	
pJC1	0.007
pJC *dapD* 1.55B	0.043
dapD::pEM*dapD*$_{int}$	< 0.001

Damit ist funktionell nachgewiesen, daß orf3, trotz der starken strukturellen Ähnlichkeit des potentiellen Genproduktes zu DapD, auch im homologen System nicht für die Bildung einer Tetrahydrodipicolinatsuccinylase verantwortlich ist. Durch Inaktivierung von *dapD* verliert *C. glutamicum* die Möglichkeit, den Succinyldiaminopimelatweg zu nutzen und ist auf die alleinige Aktivität der DAP-Dehydrogenase angewiesen, um D,L-DAP und somit auch L-Lysin zu synthetisieren.

3.4.3 Bestimmung der Diaminopimelat-Dehydrogenaseaktivität (Ddh)

Tabelle 7: Bestimmung der Diaminopimelatdehydrogenase-Aktivität in rekombinanten Stämmen von *C. glutamicum* bei Wachstum auf verschiedenen Medien. Die spezifische Aktivität ist in µmol min^{-1}(mg Protein)$^{-1}$ angegeben.

Stamm	Medium	DAP-Dehydrogenase (Ddh)
***C. glutamicum* 13032**	BHI + 4% Glucose	
pJC1		0.165
pJC*dapD*		0.160
dapD::pEM*dapD*$_{int}$		0.189
dapE::pEM*dapE*$_{int}$		0.279
ddh::pEM*ddh*$_{int}$(AS70)		< 0.001
***C. glutamicum* 13032**	CgXII	
pJC1		0.163
pJC*dapD*		0.179
dapD::pEM*dapD*$_{int}$		0.166
***C. glutamicum* MH20-22B**	CgIII	
pJC1		0.214
pJCdapD		0.211
pJCddh		0.951
dapD::pEM*dapD*$_{int}$		0.230
ddh::pEM*ddh*$_{int}$(AS73)		< 0.001

Die Tatsache, daß der alleinige Besitz der Dehydrogenase ausreichen kann, um einen ausreichenden Stoffluß zum m-DAP zu gewährleisten, wirft die Frage auf, ob Überexpression oder Inaktivierung von Genen des Succinyldiaminopimelatweges Auswirkungen auf die Aktivität der Dehydrogenase hat. Deswegen wurden verschiedene rekombinante *C. glutamicum*-Stämme bezüglich ihrer Dehydrogenase-Aktivität getestet. Tabelle 7 zeigt, daß weder die Überexpression noch die Inaktivierung von *dapD* einen Einfluß auf die Dehydrogenase-Aktivität hat. Dies gilt sowohl auf Komplex- (BHI + 4% Glukose) als auch auf Minimalmedium (CgXII). Das gleiche Bild ergibt sich auch für die rekombinanten Stämme des Lysinproduzenten MH20-22B. Überaschenderweise führt jedoch die Inaktivierung von *dapE* zu einer leichten, aber mehrfach überprüften Erhöhung der Dehydrogenase-Aktivität (1,7 -fach). Dieses Ergebnis könnte ein erster Hinweis auf eine mögliche genetische Regulation im verzweigten Lysinsyntheseweg von *C. glutamicum* sein.

3.5 Physiologische Untersuchungen zur Funktion des Succinyldiaminopimelatweges

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß *C. glutamicum* auch ohne den Dehydrogenaseweg normales Wachstum zeigt (Schrumpf *et al.*, 1991). Ein wichtiges Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist, daß - auch umgekehrt - die Ausschaltung des Succinyldiaminopimelatweges für die Zelle nicht letal ist. Allerdings zeigte es sich bei dem Versuch der Konstruktion einer Mutante mit Deletion in *dapD*, daß es offensichtlich einen Selektionsdruck auf Erhalt dieses Gens und damit eines funktionellen Succinyldiaminopimelatweges gibt (s. 3.3.1). Daher wurden Experimente durchgeführt, die die Bedeutung der beiden Äste des verzweigten Weges unter bestimmten Wachstumsbedingungen untersuchen sollten.

3.5.1 Untersuchungen zum Wachstum

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Medien auf das Wachstumsverhalten der spezifischen Mutanten, wurden die Stämme *C. glutamicum* 13032 *dapD*::pEM*dapD*$_{int}$ und *C. glutamicum* 13032 *dapE*::pEM*dapE*$_{int}$, die D,L-DAP und L-Lysin nur über den Dehydrogenaseweg synthetisieren können, mit *C.*

glutamicum 13032 *ddh*::pEM*ddh*$_{int}$ (= AS70; Schrumpf *et al.*, 1991) und dem Wildtyp *C. glutamicum* ATCC13032 verglichen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde der Wildtyp mit dem nichtrekombinanten Vektor pJC1 transformiert, so daß alle Kulturen auf Grund ihrer Kanamycinresistenz mit diesem Antibiotikum gezüchtet wurden.

Überaschenderweise zeigten alle Stämme sowohl auf Komplexmedium (BHI) als auch auf Mineralsalzmedium (CgXII) gleiches Wachstum (nicht dargestellt), so daß weder der alleinige Besitz des Succinylase- noch des Dehydrogenaseweges sich nachteilig auf das Wachstum der Zellen auszuwirken scheint. Dieses Bild änderte sich jedoch drastisch, sobald das Komplexmedium durch Glukose-Zugabe ein vermehrtes Kohlenstoffangebot enthielt. Abbildung 16 veranschaulicht, daß die beiden Mutanten mit Defekt im Succinylaseweg (dapD und dapE) bei OD_{600}~12-17 das Wachstum einstellen, während sowohl der Wildtyp (wt) als auch die *ddh*-Defektmutante (ddh) weitaus höhere Zelldichten erreichen.

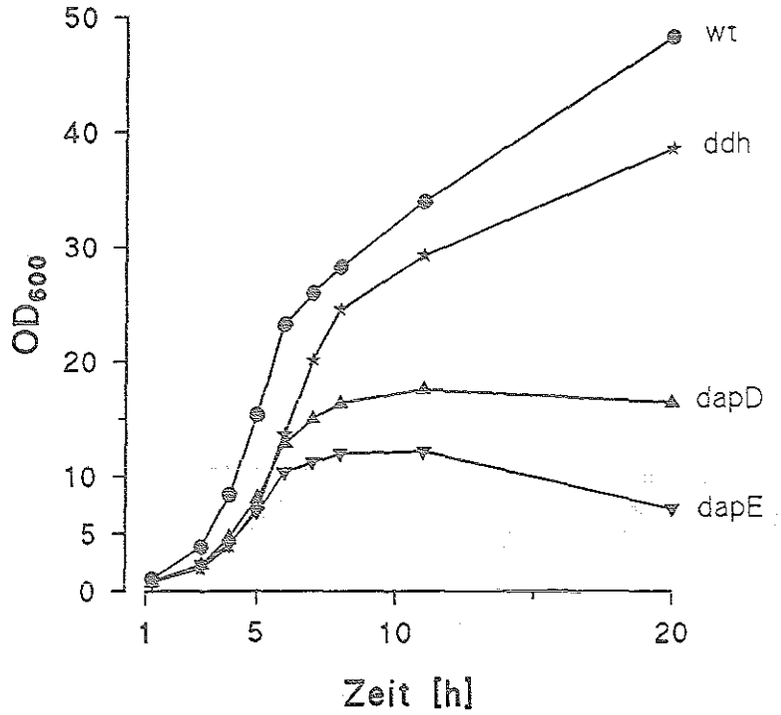


Abb. 16 Wachstum des Wildtyps von *C. glutamicum* (wt), der DAP-Dehydrogenase-Mutante (ddh), der Succinylase-Mutante (dapD) und der Desuccinylase-Mutante (dapE) auf BHI + 4% Glukose. wt = *C. glutamicum* ATCC 13032 pJC1, ddh = *C. glutamicum* ATCC 13032 *ddh*::pEM*ddh*$_{int}$, dapD = *C. glutamicum* ATCC 13032 *dapD*::pEM*dapD*$_{int}$, dapE = *C. glutamicum* ATCC 13032 *dapE*::pEM*dapE*$_{int}$

Die Tatsache, daß der intakte Dehydrogenase-Weg allein offenbar nicht ausreicht, um auf Komplexmedium mit hohem Kohlenstoffangebot ein optimales Wachstum zu gewährleisten, zeigt erstmals eine physiologische Relevanz des verzweigten DAP- und Lysinsyntheseweges in *C. glutamicum* auf.

Untersuchungen zur Nutzung der beiden Äste des verzweigten Lysinsyntheseweges *in vivo* hatten ergeben, daß der Anteil beider Wege von der Verfügbarkeit freien Ammoniums abhängig ist (Sonntag *et al.*, 1993). Dieser Befund deutete bei dem in Abbildung 16 dargestellten Experiment auf eine eventuelle Unterversorgung mit Ammonium, dem Cosubstrat der Diaminopimelatdehydrogenase, im Komplexmedium hin. Tatsächlich führte, wie Abbildung 17 zeigt, Ammoniumsupplementation zu stark verbessertem Wachstum.

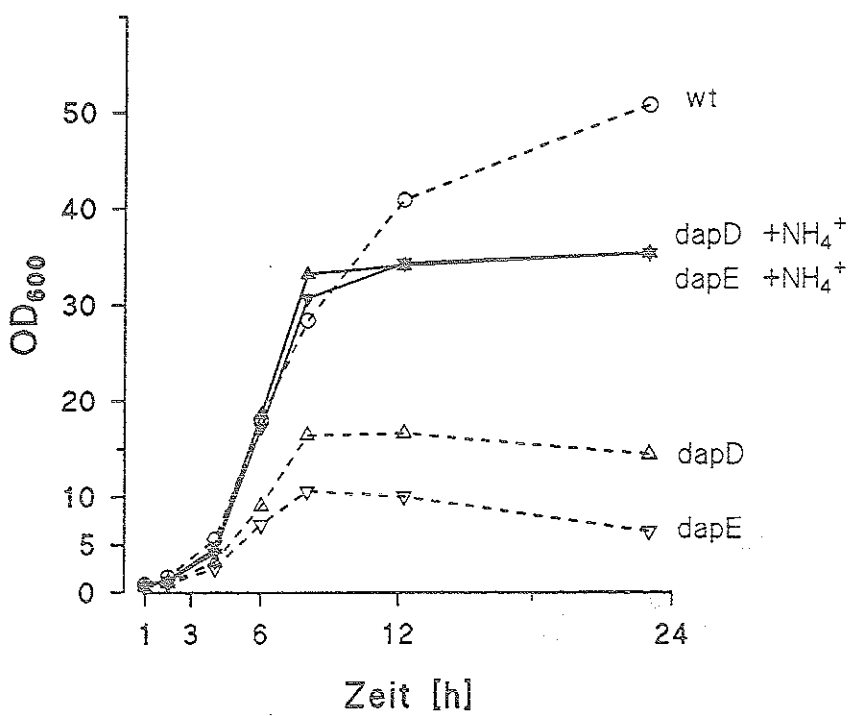


Abb. 17 Wachstum der *C. glutamicum* Succinylase- (dapD) und Desuccinylase-Mutante (dapE) auf BHI + 4% Glukose + 50mM $(NH_4)_2SO_4$.Mit unterbrochenen Linien sind Wildtyp (wt) und beide Mutanten ohne $(NH_4)_2SO_4$ Supplementation dargestellt. wt = *C. glutamicum* ATCC 13032 pJC1, dapD = *C. glutamicum* ATCC 13032 *dapD*::pEM*dapD*$_{int}$, dapE = *C. glutamicum* ATCC 13032 *dapE*::pEM*dapE*$_{int}$

Offenbar kann der Dehydrogenaseweg das Fehlen des Succinylaseweges nur dann kompensieren, wenn ausreichend freies Ammonium zur Verfügung steht. Das bedeutet, daß für die Nutzung des schlechter verfügbaren organischen Stickstoffes der Succinylaseweg erforderlich ist und erklärt, warum ein Selektionsdruck auf Erhalt der Gene des Succinyldiaminopimelatweges besteht, wenn auf Medien mit niedrigen Ammoniumkonzentrationen und hohem Kohlenstoffangebot kultiviert wird.

Wachstum auf Mineralsalzmedium stellte für die Mutanten, die nur den Dehydrogenaseweg zur Verfügung haben, kein Problem dar, da das Medium CgXII 150 mM Ammoniumsulfat enthält, so daß keine Ammoniumlimitation auftritt. Es stellte sich jedoch die Frage, ob Wachstum für Mutanten mit defektem Succinylaseweg auf Medien mit rein organischer Stickstoff-Quelle überhaupt möglich ist. Folglich wurden Experimente auf CgXIIN$^-$ (CgXII-Medium ohne Ammoniumsulfat und Harnstoff) mit Glutamat als einziger Stickstoff-Quelle durchgeführt. Tatsächlich zeigten alle Mutanten mit Defekt im Succinylaseweg auf diesem modifizierten Medium zunächst kein Wachstum. Erst nach 2 Tagen war Wachstum erkennbar und nach weiteren 2-3 Tagen erreichten auch diese Kulturen vergleichbare Zelldichten wie der Wildtyp. Abbildung 18 zeigt das Wachstum von drei verschiedenen Mutanten mit defektem Succinylaseweg (W3-36 dapD, 13032 dapD und 13032 dapE) und der Mutante ohne Dehydrogenase (13032 ddh) im Vergleich mit der orf3-Deletionsmutante W3-36, die sich wie der Wildtyp verhält (nicht dargestellt).

Um auszuschliessen, daß es sich bei dem Wachstum nach zweitägiger Latenzphase um Revertanten handelt, wurden die Experimente wiederholt. Erneut zeigte sich das gleiche Wachstumsverhalten. Die Kultur *C. glutamicum* 13032 *dapD* ::pEM*dapD*$_{int}$ wurde nach 60 Stunden geerntet und auf vier neue Medien (CgXIIN$^-$ +150 mM Kaliumglutamat) aufgeteilt. Drei dieser identischen Kulturen wurden mit je 1 mM $(NH_4)_2SO_4$, L-Lysin oder DAP supplementiert. Erstaunlicherweise reichte 1 mM $(NH_4)_2SO_4$ aus, um ein sofortiges Wachstum zu bewirken (s. Abb.19). Im Gegensatz dazu wirkte sich weder L-Lysin noch DAP-Zusatz positiv auf das Wachstum der *dapD*-Mutante aus: wiederum setzte Wachstum erst nach langer Latenz ein.

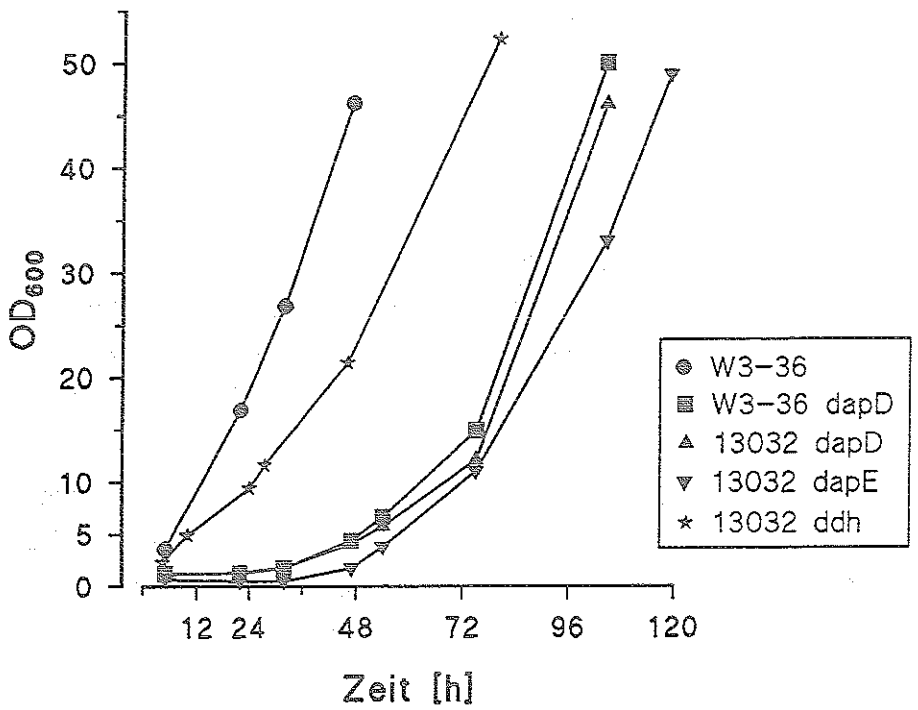


Abb.18 Wachstum der *C. glutamicum* orf3-Deletionsmutante (W3-36), der beiden Succinylase-Mutanten (W3-36 dapD und 13032 dapD), der Desuccinylase-Mutante (13032 dapE) und der DAP-Dehydrogenase-Mutante (13032 ddh) auf CgXIIN⁻ + 150 mM K-Glutamat. W3-36 = *C. glutamicum* ATCC 13032 Δorf3, W3-36 dapD = *C. glutamicum* ATCC 13032 Δorf3 *dapD*::pEM*dapD*$_{int}$, 13032 dapD = *C. glutamicum* ATCC 13032 *dapD*::pEM*dapD*$_{int}$, 13032 dapE = *C. glutamicum* ATCC 13032 *dapE*::pEM*dapE*$_{int}$, 13032 ddh = *C. glutamicum* ATCC 13032 *ddh*::pEM*ddh*$_{int}$.

Diese Experimente zeigen, daß der Succinyldiaminopimelatweg bei Wachstum auf Medien mit rein organischer N-Quelle erforderlich ist. Dennoch können auch Mutanten, die nur den Ddh-Weg besitzen, auf diesem Medium wachsen, wenn auch erst nach extrem langer Latenzphase. Offenbar ist zunächst eine physiologische "Anpassung" erforderlich, bevor Wachstum erfolgt. Die Wachstumsverzögerung konnte nicht auf einen Mangel an L-Lysin zurückgeführt werden, da eine entsprechende Supplementation kein verbessertes Wachstum bewirkt

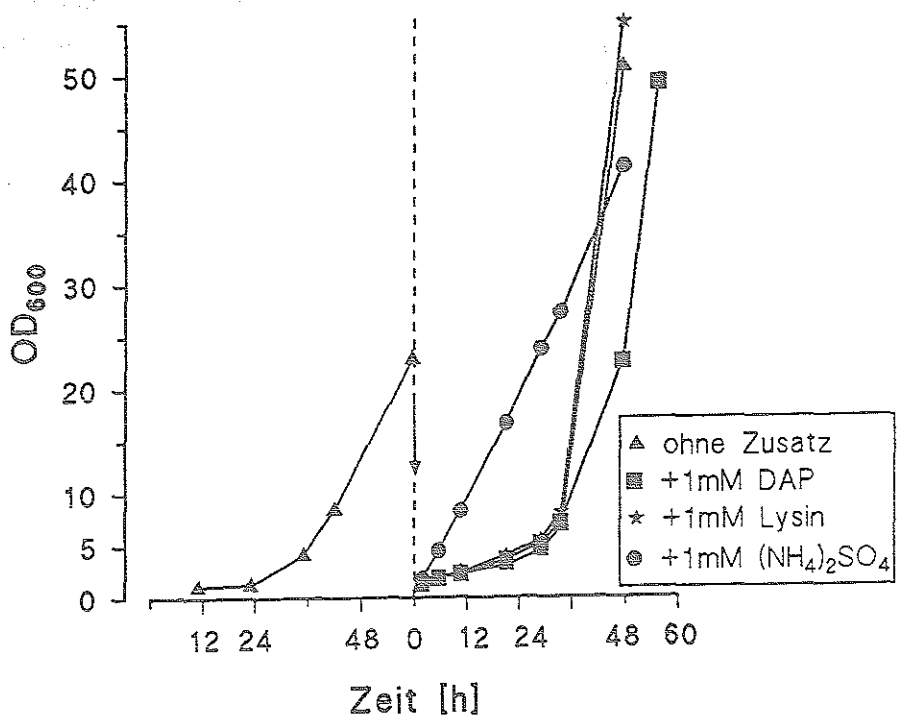


Abb. 19 Wachstum der *C. glutamicum* Succinylase-Mutante (ATCC 13032 *dapD*::pEM*dapD*$_{int}$) auf CgXIIN$^-$ +150 mM Kaliumglutamat. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Teilung der Kultur und Überimpfung auf die Folgemedien an. Supplementation wie angegeben.

(s.Abb.19). Auch DAP-Zusatz zeigte keinen Effekt, was jedoch darauf zurückzuführen ist, daß *C. glutamicum*, im Gegensatz zu *E. coli* (Leive & Davis, 1965; Berger & Heppel, 1972), diese Aminosäure wahrscheinlich nicht aus dem Medium aufnehmen kann (Yeh *et al.*, 1988). Da kein weiteres essentielles Produkt aus der Lysinbiosynthese bekannt ist, lag es nahe, daß tatsächlich fehlendes D,L-DAP die Wachstumslimitation darstellte. Auch in diesen Experimenten unterschied sich die orf3-Deletionsmutante nicht vom Wachstumsverhalten des Wildtyps, so daß wahrscheinlich orf3 weder für *dapD* noch für ein anderes Gen des Succinyldiaminopimelatweges (d.h. *dapC* oder *dapF*) codiert.

Nachdem klar war, daß die Bedeutung des Succinylaseweges vor allem in der essentiellen m-DAP-Synthese bei geringer Verfügbarkeit von freiem Ammonium

liegt, stellte sich die Frage, warum *C. glutamicum* darüberhinaus noch den Dehydrogenaseweg besitzt, hatte sich doch in fast allen bisherigen Experimenten gezeigt, daß der Succinylaseweg allein ausreicht, ein optimales Wachstum zu gewährleisten. In einer neuen Versuchsreihe wurde das Wachstum der *ddh*-Mutante bei Kultivierung auf anderen C-Quellen untersucht. Abbildung 20 zeigt das Wachstum von *C. glutamicum ddh*::pEM*ddh*$_{int}$ (ddh) im Vergleich mit dem Wildtyp. In Parallelmessungen wurden beide Stämme auf Glukose gezogen. Während die Glukose-gezogenen Kulturen ein nahezu identisches Wachstumsverhalten zeigten, wuchs die *ddh*-Mutante auf Acetat langsamer und erreichte eine geringere maximale Zelldichte als der Wildtyp.

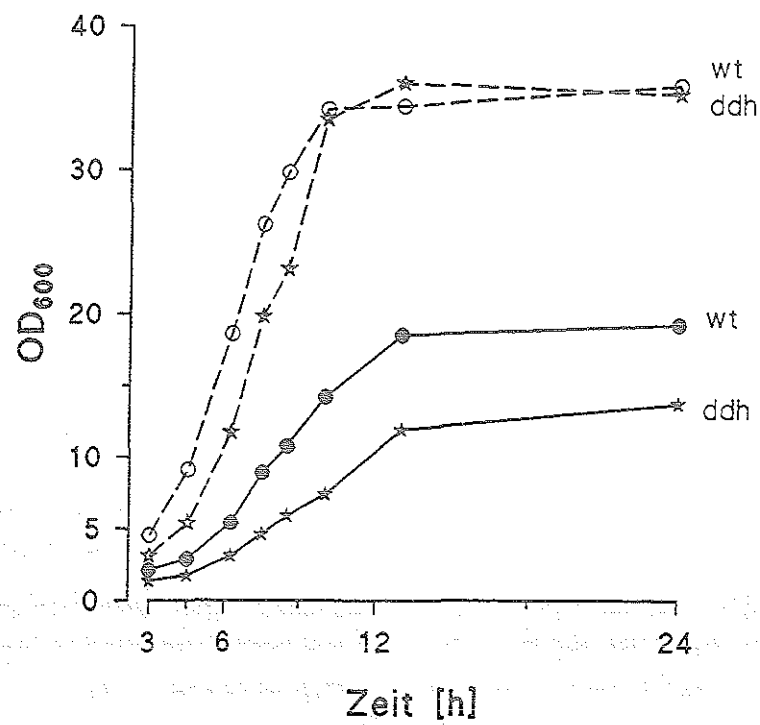


Abb. 20 Wachstum des Wildtyps von *C. glutamicum* (wt) und der DAP-Dehydrogenase-Mutante (ddh) auf CgXII mit 2% Acetat (geschlossene Symbole) oder 2% Glukose (offene Symbole) als einziger C-Quelle. wt = *C. glutamicum* ATCC 13032 pJC1, ddh = *C. glutamicum* ATCC 13032 *ddh*::pEM*ddh*$_{int}$ (ddh)

Dieser Unterschied deutet darauf hin, daß ein veränderter Fluß im Zentralstoffwechsel, d.h. Nutzung des Glyoxylatweges bei Wachstum auf Acetat, auch die Effizienz der Nutzung der Äste des verzweigten Lysinsyntheseweges beeinflußt. Möglicherweise ist auch hier, ähnlich wie bei der Funktion des Ddh-Weges, die Bereitstellung des CoSubstrates, in diesem Fall Succinyl-CoA, limitierend für den Kohlenstofffluß zum D,L-DAP.

3.5.2 Lysinproduktion

Zur Überprüfung der Auswirkung der Inaktivierung des SuccDAP-Weges auf die Lysinproduktion wurden verschiedene Abkömmlinge des Produktionsstammes MH20-22B untersucht. Es wurde die Lysinproduktion der *dapD*- und *ddh*-Defektmutanten sowie der rekombinanten Stämme mit plasmidcodiertem *dapD*- bzw. *ddh*-Gen auf Produktionsmedium untersucht und die externen Lysinkonzentrationen während der Fermentation mittels HPLC bestimmt. Die Lysinbestimmungen wurden jeweils bis zum vollständigen Verbrauch der Glukose im Medium durchgeführt. Beide Stämme mit verstärkter Succinylase- bzw. Dehydrogenase-Aktivität, *C. glutamicum* MH20-22B pJC*dapD* und *C. glutamicum* MH20-22B pJC*ddh*, verhielten sich hinsichtlich Wachstum und Lysinproduktion wie der Ausgangsstamm *C. glutamicum* MH20-22B pJC1 (nicht dargestellt). Die beiden Stämme mit Defekt im Succinylase- oder Dehydrogenase-Weg (*C. glutamicum* MH20-22B *dapD*::pEM*dapD*$_{int}$ bzw. *C. glutamicum* MH20-22B *ddh*::pEM*ddh*$_{int}$ =AS73) führten jedoch zu einer stark verringerten Lysinproduktion. Abbildung 21 zeigt, daß einhergehend mit einer reduzierten Wachstumsgeschwindigkeit auch die Lysinproduktion verringert ist. Während der Wildtyp nach 3 Tagen 192 mM Lysin ins Medium sezerniert, reicht der alleinige Besitz des Dehydrogenaseweges nach 4-tägiger Kultivierung nur für 110 mM Lysin. Unter Bedingungen, wo nur der Succinyldiaminopimelatweg zur Verfügung steht, konnten nach 5 Tagen nur 9,4 mM Lysin im Medium nachgewiesen werden. Gleichzeitig erreichte diese Kultur extrem hohe Zelldichten (OD_{600} > 60).

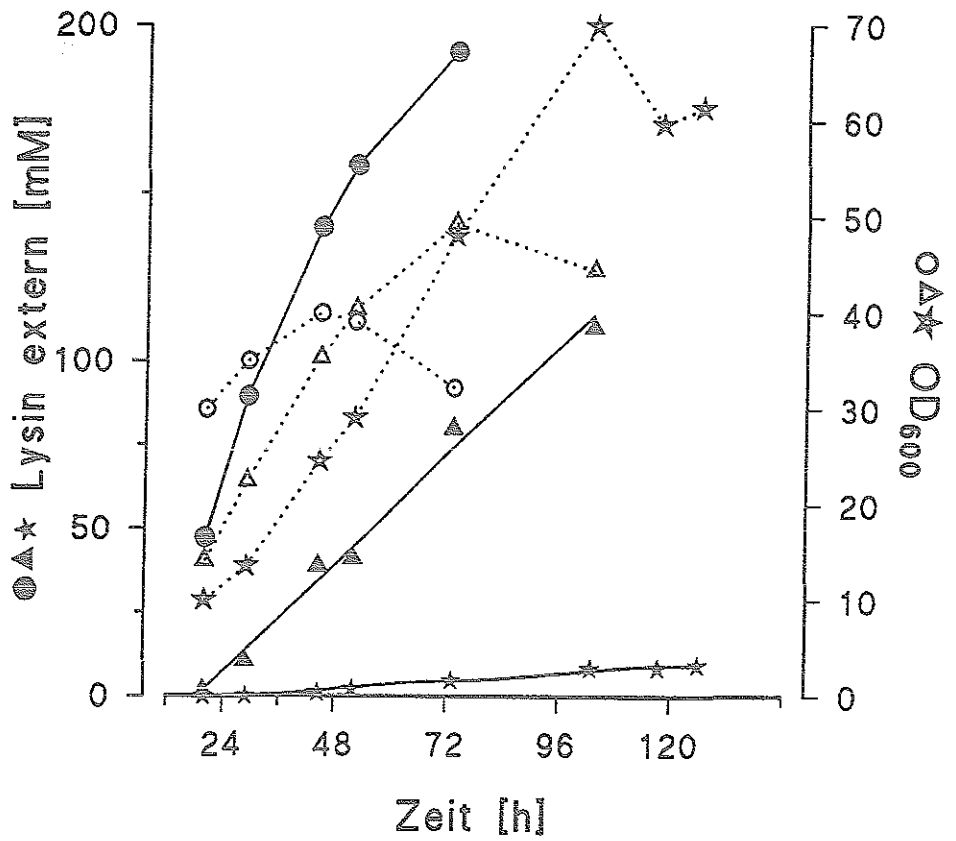


Abb. 21 Lysinbildung (geschlossene Symbole) des Lysinproduzenten *C. glutamicum* MH20-22B (Kreise) und der davon abgeleiteten Succinylase- (Dreiecke) und DAP-Dehydrogenase-Mutante (Sterne) auf Spezialmedium 22B. Die gepunkteten Linien (offene Symbole) geben den entsprechenden Wachstumsverlauf wieder.

Dieses Experiment belegt, daß sowohl der Dehydrogenaseweg als auch der Succinylaseweg für eine maximale L-Lysin-Produktion in dem deregulierten Stamm *C. glutamicum* MH20-22B zur Verfügung stehen müssen. Offenbar kommt es bei Ausfall eines der beiden Äste des verzweigten Weges zu einem verringerten Fluß zum L-Lysin, so daß mehr D,L-DAP zur Zellwandsynthese zur Verfügung steht. Interessanterweise scheint besonders ein intakter Dehydrogenaseweg unabdingbare Voraussetzung für die Überproduktion von L-Lysin zu sein. Dies stimmt auch mit dem erhöhten Ammoniumanteil des Spezialmediums überein, das bei der L-Lysinproduktion Verwendung findet (Schrumpf *et al.*, 1992) und offenbar eine optimale Ausnutzung des Dehydrogenaseweges während der Fermentation garantiert.

3.5.3 Morphologie

Sowohl die fehlende Supplementationsmöglichkeit der Wachstumsverzögerung von Mutanten mit Defekt im Succinyldiaminopimelatweg durch L-Lysin (s.3.5.1) als auch der veränderte Stofffluß am Verzweigungspunkt zwischen L-Lysinbildung und Zellwandsynthese beim Produktionsstamm MH20-22B (s.3.5.2), deutete auf eine möglicherweise zentrale Rolle des Diaminopimelatpools in der Zelle hin. Falls eine cytosolische Diaminopimelat-Verarmung bei Wachstum der *dapD*- und *dapE*-Mutanten auf Medium mit Ammoniumlimitation für den Wachstumsstopp verantwortlich war (vgl. Abb.16), so müßte dies Auswirkungen auf die Zellwandsynthese und letztlich auch auf den Zellhabitus haben.

3.5.3.1 Mikroskopische Untersuchungen

Die Kulturen der Stämme, die sich durch abweichendes Wachstumsverhalten auszeichneten, wurden hinsichtlich mikroskopisch erkennbarer Veränderungen untersucht. Es zeigte sich aber, daß die Zellmorphologie aller Mutanten aus Flüssigkultur sich nicht von der des Wildtyps unterschieden. Bei Kultivierung auf LB-Festmedium, dem zur osmotischen Stabilisierung 10% Saccharose zugefügt wurde, zeigten die Mutanten mit Defekt im Succinyldiaminopimelatweg jedoch eine schleimige Kolonieform. Mikroskopisch betrachtet wies, im Vergleich mit dem Wildtyp, die *dapD*-Mutante langgestreckte Zellformen auf, die teilweise an den Enden keulig aufgeschwollen waren und so ein spindelförmiges Erscheinungsbild hatten. Auch die *dapE*-Mutante zeigte einen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp: die Zellen waren kleiner und abgekugelt (s. Abb. 22). Da die Zellwand als morphogenetische Ursache für die Zellform angesehen wird (Schwarz & Leutgeb, 1971), kann eine Beeinflußung des Zellwandaufbaus durchaus die beschriebenen Phänotypen erklären. Parallele Kulturen auf LB-Medium ohne Saccharose zeigten jedoch keine derart auffälligen Veränderungen. Alle Mutanten entsprachen in etwa dem typischen corynebakteriellen Habitus des Wildtyps. Interessanterweise zeigte die *ddh*-Mutante medienunabhängig immer den gleichen visuellen Phänotyp wie der Wildtyp.

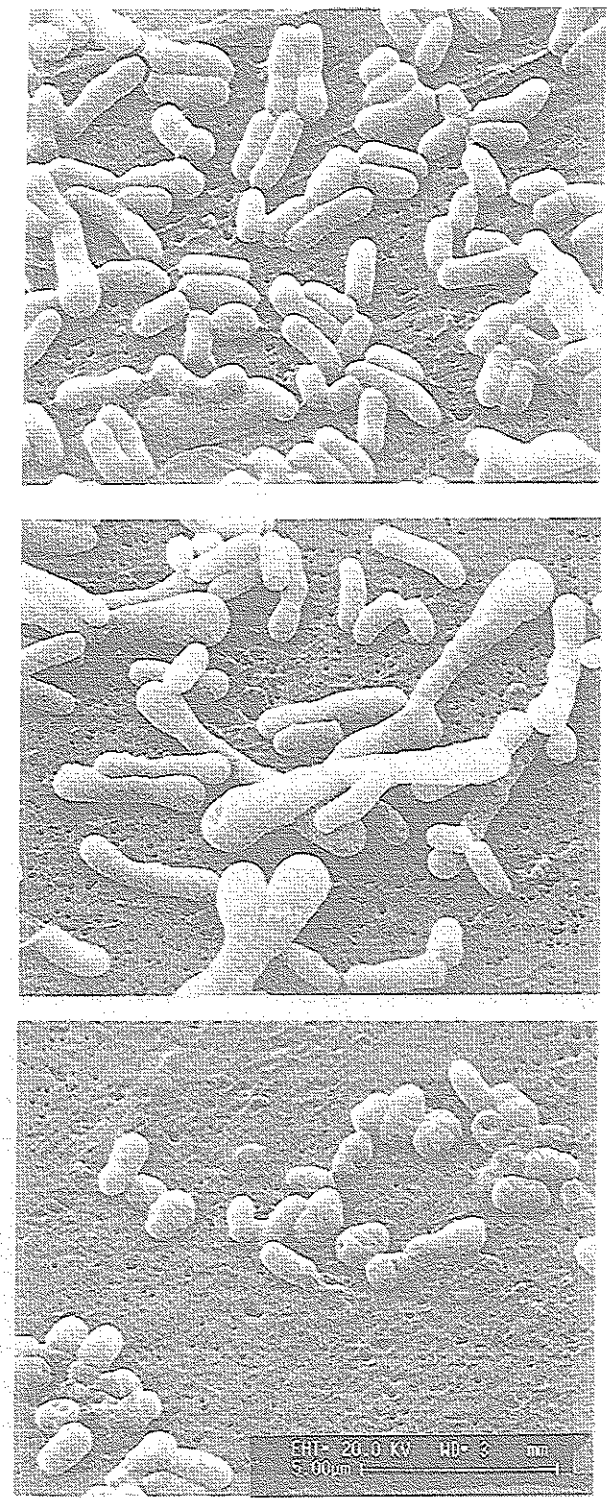


Abb. 22 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des *C. glutamicum* Wildtyps (*C. glutamicum* ATCC 13032 pJC1; oben), der Succinylase-Mutante (*C. glutamicum* ATCC 13032 *dapD*::pEM*dapD*$_{int}$; Mitte) und der Desuccinylase-Mutante (*C. glutamicum* 13032 *dapE*::pEM*dapE*$_{int}$; unten). Alle Stämme wurden auf LB-Festmedium + 10% Saccharose gezogen.

3.5.3.2 Untersuchungen zur Zellwandstabilität

Um den Zusammenhang der veränderten Zellmorphologie mit dem Aufbau der Zellwand aufzuzeigen, wurden Aufschlußexperimente durchgeführt. Da die Zellwand einem fortwährenden physikalischen Druck durch den Turgor ausgesetzt ist, besitzt ein intaktes Peptidoglykangerüst eine herausragende Rolle für die Stabilität der Bakterien (Koch, 1988). Ist der Zellwandaufbau, wie bei den Mutanten mit Defekt im SuccDAP-Weg vermutet, gestört, so sollte sich dies durch eine erhöhte Labilität der Zellen gegenüber physikalischen Kräften äußern.

Verschiedene *C. glutamicum*-Stämme wurden in BHI + 4% Glukose angezogen, nach 13 Stunden geerntet, mit 0,1M KPP pH7 gewaschen und in dem gleichen Puffer resuspendiert, so daß eine OD_{600}~200 erreicht wurde. Nach Bestimmung der genauen Zelldichte wurden die Zellen jeweils 0, 1, 2 und 5 Minuten einer Ultraschallbehandlung unterzogen. Die Proteinkonzentration im Überstand wurde anschließend mit Biuret-Reagenz (Gornall, 1949) quantifiziert. Abbildung 23 zeigt die ermittelte Proteinkonzentration bezogen auf mg Trockengewicht als Funktion der Beschalldauer. Deutlich kann man erkennen, daß alle *C. glutamicum*-Stämme, die keinen funktionsfähigen Succinyldiaminopimelatweg besitzen, wesentlich mehr Protein im Rohextrakt aufweisen (5- bis 6-fache Menge nach einer Minute Beschalldauer). Bemerkenswert ist, daß die Mutante mit inaktiver Dehydrogenase diesen Effekt nicht zeigt, sondern sich wie der Wildtyp verhält.

Dieses Ergebnis unterstützt die mikroskopischen Beobachtungen. Offenbar führt der Verlust des intakten Succinyldiaminopimelatweges zu einem Defekt im Zellwandaufbau, der sich in einer allgemein geringeren Stabilität äußert. Auf osmotisch stabilisiertem Medium führt dies zu veränderten Zellformen, da der Wanddruck dem Turgor mit hohem osmotischem Potential nur bedingt standhalten kann.

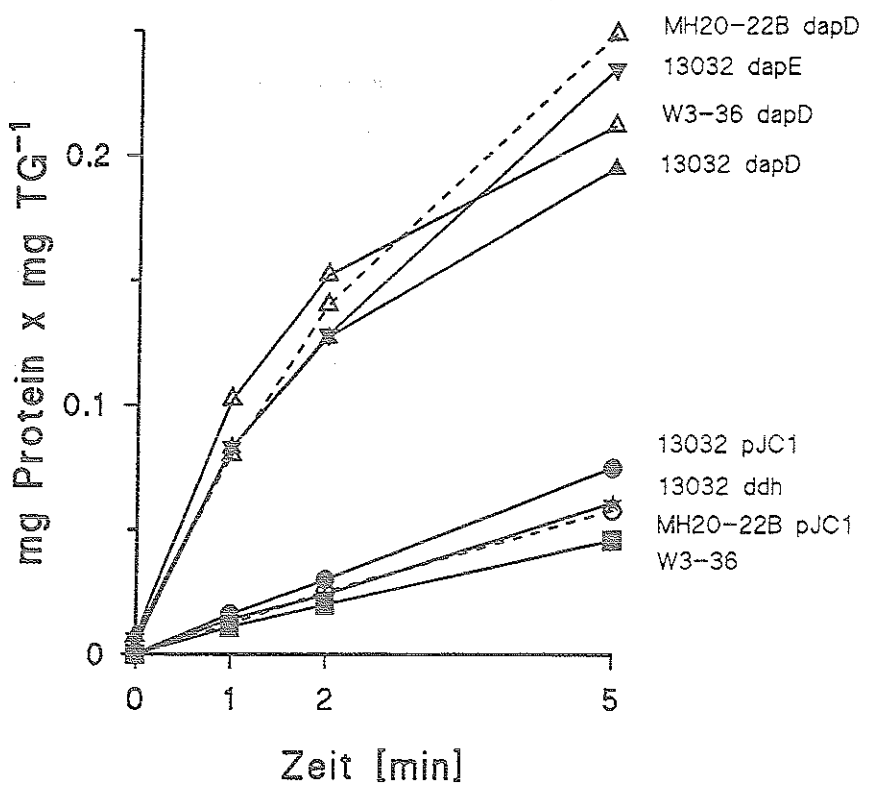


Abb. 23 Proteinmenge im Rohextrakt verschiedener *C. glutamicum*-Stämme nach zeitabhängigem Ultraschallaufschluß

3.6 Identifizierung von *aroP*

Bei der Sequenzanalyse des orf3 und *dapE* tragenden 3,4 kb *Bam*HI-Fragmentes wurde der Beginn eines offenen Leserasters, orf5n, entdeckt, dessen potentielles Genprodukt eine große Ähnlichkeit zum aminoterminalen Bereich der Primärstruktur von Aminosäuretransportproteinen aufweist (s. 3.1.2). Der stromabwärts gelegene Bereich dieses offenen Leserasters, orf5c, konnte auf einem 3,95 kb *Hin*dIII-*Eco*RI-Fragment isoliert werden (s. 3.2.3), das auch für die Succinylase codiert. Damit liegt orf5 in einem Gencluster, das auch *dapD* und *dapE*, zwei Gene zur Lysinsynthese, enthält. Diese Lage läßt eine mögliche Beteiligung von orf5 am Transport von Lysin vermuten. Auch in anderen Fällen ist eine Clusterung von Aminosäuretransportgenen mit Genen für Enzyme des Aminosäuremetabolismus beschrieben (*cadBA*, Watson *et al.*, 1992, Meng & Bennett, 1992; *arcDABC*,

Lüthi *et al.*, 1990, Verhoogt *et al.*, 1992; *gabDTP*, Metzer & Halpern, 1990, Niegemann *et al.*, 1993; *tnaAB*, Edwards & Yudkin, 1982), doch sind dies ausschließlich Gene für Aufnahmesysteme und katabole Enzyme für die entsprechenden Aminosäuren. Da es sich im vorliegenden Fall jedoch um Gene für Enzyme anaboler Funktion handelt, würde eine damit gekoppelte Expression eines Gens für das entsprechende Aufnahmesystem für die Zelle nicht von Vorteil sein. Interessanterweise kann *C. glutamicum*, im Gegensatz zu anderen Bakterien, Lysin nicht katabol verwerten. Bei Lysinüberschuß tritt deshalb ein Lysintransportsystem in Kraft, das zum Export dieser Aminosäure ins Medium führt (Erdmann *et al.*, 1993). Dieser spezifische Lysinexporter ist biochemisch vom Lysinimport klar zu unterscheiden (Bröer *et al.*, 1991a,b), das entsprechende Gen konnte aber bislang noch nicht kloniert werden (Kronemeyer, 1994). Aufgrund dieser Überlegungen sollte orf5 näher analysiert werden, um eine mögliche Beteiligung am Lysinexport zu untersuchen.

3.6.1 Subklonierung

Das 3.95 kb *dapD Hin*dIII-*Eco*RI-Fragment wurde mit *Sal*I und *Eco*RI geschnitten und ein resultierendes 1,4 kb großes Fragment wurde in die Vektoren pUC18, pUC19 und pJC1 ligiert. In beiden high-copy-number Vektoren pUC18 und pUC19 wurde jeweils nur eine Orientierung des Inserts beobachtet, während in dem mit moderater Kopienzahl replizierenden Vektor pJC1 beide Insertorientierungen nachgewiesen werden konnten. Restriktionsanalysen ergaben Überlappungen sowohl mit dem 3,4 kb *dapE Bam*HI-Fragment als auch mit dem 1,55 kb *dapD*-Fragment. Die in pUC18/19 erhaltenen Insertorientierungen entsprachen dabei jeweils einer Transkriptionsrichtung von orf5c, die entgegengesetzt zu dem vektoreigenen Transkript des *lacZ*-Promotors verläuft. Damit zeigte sich, daß selbst die Subklonierung von orf5-Genfragmenten auf high-copy-number Vektoren in *E. coli* toxisch ist und unterstreicht die Hypothese, daß *dapD* aufgrund der engen Nachbarschaft zu orf5, weder durch heterologe Komplementation (Wehrmann *et al.*, 1994) noch durch Hybridisierungsexperimente mit high-copy-number Genbänken (s. 3.2.3), intakt isoliert werden kann.

3.6.2 Sequenzanalyse

Zur Sequenzierung von orf5c wurden die beiden Plasmide pUC18orf5c1,4 und pUC19orf5c1,4 eingesetzt. Die Sequenzierung der orf5c-Insertion wurde mit der Dideoxy-Methode nach Sanger *et al.* (1977) durchgeführt. Dabei wurden überlappende Deletionsklone, die durch Exonuclease III - Verdau erhalten wurden, verwendet. Es wurde die DNA-Sequenz beider Stränge mittels Fluoreszenzmarkierter Primern und automatischer Laserfluoreszenzdetektion (A.L.F.) ermittelt.

Die Auswertung der Sequenzinformation ergab ein großes unvollständiges Leseraster, orf5c, sowie den Beginn von *dapD* (s. Abb. 24). Nach Verschmelzung der Sequenzen von orf5n und orf5c konnte ein offenes Leseraster ermittelt werden, das für ein Polypeptid von 463 Aminosäuren codieren kann. Homologievergleiche der abgeleiteten Aminosäuresequenz mit Proteindatenbanken (BLASTP; Husar 3.0) ergaben eine sehr starke Ähnlichkeit zu einer Familie von Aminosäure-Permeasen von verschiedenen Organismen (s. Abb. 25). Ein besonders hoher Anteil von identischen Aminosäuren (40,5%) ist beim Vergleich mit der γ-Aminobuttersäure (GABA)-Permease aus *E. coli* (Niegemann *et al.*, 1993) zu verzeichnen, aber auch LysP, das Lysinaufnahmesystem von *E. coli* (Steffes *et al.*, 1992), zeigt Homologie zu dem Genprodukt von orf5. In dem potentiellen orf5-Protein konnten 12 transmembrane Bereiche identifiziert werden (HELIXMEM; PCGene), so daß es sich wahrscheinlich um ein integrales Membranprotein handelt. Abbildung 26 zeigt den entsprechenden Hydrophobizitätsplot nach Kyte & Doolittle (1982).

Aufgrund der ausgeprägten Ähnlichkeit des potentiellen orf5-Genproduktes zu verschiedenen Aminosäure-Permeasen, die sich über die gesamte Länge des Polypeptids erstreckt, ist eine Beteiligung eines funktionellen Proteins am Aminosäuretransport wahrscheinlich. Ob es sich hierbei um einen Aufnahmeprozeß oder um Sekretion handelt, und welche Substrate transportiert werden, läßt sich jedoch an Hand der Sequenzdaten nicht ermitteln. Die Funktion des Transportes niedermolekularer Substanzen, wie Aminosäuren, durch den Lipidbilayer, erfordert eine ähnliche räumliche Struktur dieser Membranproteine, die unabhängig von dem spezifisch transportierten Substrat ist (Nikaido & Saier, 1992).

```
—orf5—>
EcoRI                                                                    75
GAATTCGAGTACTGGTTCGCATTCATTAAGGTCGCGGTGATCATCGCTTTCCTCATCATTGGTATTGCTCTTATT
E  F  E  Y  W  F  A  F  I  K  V  A  V  I  I  A  F  L  I  I  G  I  A  L  I
                 BamHI                                                  150
TTCGGATGGCTTCCCGGATCCACCTTTGTTGGAACCTCAAACTTCATCGGTGATCACGGATTCATGCCCAATGGT
F  G  W  L  P  G  S  T  F  V  G  T  S  N  F  I  G  D  H  G  F  M  P  N  G
                                                                         225
ATTTCTGGTGTTGCTGCTGGTTTGCTCGCGGTGGCTTTTGCCTTTGGTGGCATTGAAATTGTCACCATTGCAGCT
I  S  G  V  A  A  G  L  L  A  V  A  F  A  F  G  G  I  E  I  V  T  I  A  A
                                                                         300
GCAGAGTCCGATAAGCCACGTGAAGCTATTTCCCTGGCGGTGCGTGCCGTGATTTGGCGTATTTCAGTCTTTTAC
A  E  S  D  K  P  R  E  A  I  S  L  A  V  R  A  V  I  W  R  I  S  V  F  Y
                                                                         375
TTGGGCTCTGTTTTGGTCATCACTTTCCTCATGCCTTATGAGTCGATCAATGGTGCCGACACCGCTGCGGAATCC
L  G  S  V  L  V  I  T  F  L  M  P  Y  E  S  I  N  G  A  D  T  A  A  E  S
                                                                         450
CCCTTCACCCAAATCCTGGCGATGGCAAACATCCCTGGCACGGTTGGTTTCATGGAAGCGATCATCGTTCTAGCA
P  F  T  Q  I  L  A  M  A  N  I  P  G  T  V  G  F  M  E  A  I  I  V  L  A
                                                                         525
CTGCTTTCCGCTTTCAACGCCCAAATCTATGCCACTTCTCGTTTGGTATTTTCCATGGCGAATCGACAAGACGCT
L  L  S  A  F  N  A  Q  I  Y  A  T  S  R  L  V  F  S  M  A  N  R  Q  D  A
                                                                         600
CCGCGAGTTTTCAGTAAGCTCAGCACCAGCCACGTCCCCACCAATGCGGTGCTGTTGTCCATGTTCTTCGCCTTC
P  R  V  F  S  K  L  S  T  S  H  V  P  T  N  A  V  L  L  S  M  F  F  A  F
                                                                         675
GTTTCAGTTGGTTTGCAGTACTGGAATCCAGCCGGTCTGCTTGATTTCCTCCTCAACGCTGTTGGCGGTTGTTTG
V  S  V  G  L  Q  Y  W  N  P  A  G  L  L  D  F  L  L  N  A  V  G  G  C  L
                                                                         750
ATTGTGGTGTGGGCAATGATCACTTTGTCACAGTTGAAACTCCGCAAAGAACTGCAAGCAAACGATGAAATCTCC
I  V  V  W  A  M  I  T  L  S  Q  L  K  L  R  K  E  L  Q  A  N  D  E  I  S
                                                                         825
ACGGTTCGCATGTGGGCGCACCCATGGTTAGGCATCCTCACCTTGGTTTTGTTGGCAGGACTCGTTGCTCTCATG
T  V  R  M  W  A  H  P  W  L  G  I  L  T  L  V  L  L  A  G  L  V  A  L  M
                                                                         900
CTCGGCGACGCAGCCTCCCGCAGCCAGGTTTACTCAGTGGCAATTGTGTACGGATTCTTGGTTCTTTTGTCCTTC
L  G  D  A  A  S  R  S  Q  V  Y  S  V  A  I  V  Y  G  F  L  V  L  L  S  F
                                                                         975
GTCACAGTTAACAGCCCATTGCGCGGAGGTCGCACCCCTTCCGACTTGAACTGATAGGCCGATAGAAATTATTCT
V  T  V  N  S  P  L  R  G  G  R  T  P  S  D  L  N  -
                                                                        1050
GGACGTCATGACTACTGCTTCCGCAACCGGAATTGCAACACTGACCTCCACCGGCGACGTCCTGGACGTGTGGTA
                                XbaI                                    1125
TCCAGAAATCGGGTCCACCGACCAGTCCGCGCTCACACCTCTAGAAGGCGTCGATGAAGATCGAAACGTCACCCG
                                                      ┌dapD—>            1200
CAAAATCGTGACGACAACTATCGACACCGACGCAGCCCCCACCGACACCTACGATGCATGCTGCGCCTTCACCTC
M  L  R  L  H  L
                                                                        1275
CTCTCCCACCGCGTTTTCCGCCCTCACACCATCAACCTAGACGGCATTTTCGGCCTCCTCAACAATGTCGTGTGG
L  S  H  R  V  F  R  P  H  T  I  N  L  D  G  I  F  G  L  L  N  N  V  V  W
                                                                        1350
ACCAACTTCGGACCGTGCGCAGTTGACGGTTTCGCACTCACCCGCGCGCGCCTGTCACGCCGAGGCCAAGTTACG
T  N  F  G  P  C  A  V  D  G  F  A  L  T  R  A  R  L  S  R  R  G  Q  V  T
          SalI
GTTTATAGCGTCGAC  1365
V  Y  S  V  D  ...
```

Abb.24 Nukleotidsequenz des orf5c tragenden 1,4kb großen *Sal*I-*Eco*RI-Fragmentes aus *C. glutamicum*. Der codierende Bereich von orf5 und *dapD* ist angegeben. Die unterstrichenen Sequenzabschnitte zeigen die überlappenden Bereiche mit den Nukleotidsequenzen, die in Abb. 4 und 11 angegeben sind.

```
                        10        20        30        40        50        60
                         .         .         .         .         .         .
CgOrf5          M---------AKSNEG--LGTGLRTRHLTMMGLGSAIGAGLFLGTGVGIRAAGP-AVLLA
EcGabP          M---------GQSSQPHELGGGLKSRHVTMLSIAGVIGASLFVGSSVAIAEAGP-AVLLA
EcLysP          M------VSETKTTEAPGLRRELKARHLTMIAIGGSIGTGLFVASGATISQAGPGGALLS
EcYtfD          MVDQVKVVADDQAPAEQSLRRNLTNRHIQLIAIGGAIGTGLFMGSGKTISLAGP-SIIFV
BsRocE          M--------NTNQDNGNQLQRTMKSRHLFMISLGGVIGTGFFLGTGFTINQAGPLGAVLS
EcAroP          MME-------GQQHGEQ-LKRGLKNRHIQLIALGGSIGTGLFLGSASVIQSAGP-GIILG
                *          .     *   .  **. ...... **...*....  *  *** . ..

CgOrf5          YIIAGAIVVLVMQMLGEMAAARPASGSFSRYGEDAFGHWAGFSLGWLYWFMLIHVMGAEM
EcGabP          YLFAGLLVVMIMRMLAEMAVATPDTGSFSTYADKAIGRWAGYTIGWLYWWFWVLVIPLEA
EcLysP          YMLIGLMVYFLMTSLGELARYMPVSGSFATYGQNYVEEGFGFALGWNYWYNWAVTIAVDL
EcYtfD          YMIIGFMLFFVMRAMGELLLSNLEYKSFSDFASDLLGPWAGYFTGWTYWFCWVVTGMADV
BsRocE          YLVGGFIMFLTMLCLGELAVAFPVSGSFQTYATKFISPAFGFAFGWLYWLGWAVTCAIEF
EcAroP          YAIAGFIAFLIMRQLGEMVVEEPVAGSFSHFAYKYWGSFAGFASGWNYWVLYVLVAMAEL
                *   * .    *  ..*.         **  ..         *.  ** **    .    .

CgOrf5          TGAAAIMGAWF-GVEPWIPSLVCVVFFAVVNLVAVRGFGEFEYWFAFIKVAVIIAFLIIG
EcGabP          NIAAMILHSWVPGIPIWLFSLVITLALTGSNLLSVKNYGEFEFWLALCKVIAILAFIFLG
EcLysP          VAAQLVMSWWFPDTPGWIWSALFLGVIFLLNYISVRGFGEAEYWFSLIKVTTVIVFIIVG
EcYtfD          VAITAYAQFWFPDLSDWVASLAVIVLLLTLNLATVKMFGEMEFWFAMIKIVAIVSLIVVG
BsRocE          LSAGQLMQRWFPHIDVWIWCLVFAALMFILNAITTKAFAESEFWFSGIKILIILLFIILG
EcAroP          TAVGKYIQFWYPEIPTWVSAAVFFVVINAINLTNVKVFGEMEFWFAIIKVIAVVAMIIFG
                          *     *.            *    . ..* *.*..  *.  ..  .  *

CgOrf5          IALIFGWL--PGSTFVGTSNFIGDHGFMPNGISGVAAGLLAVAFAFGGIEIVTIAAAESD
EcGabP          AVAISGFY--PYAEVSGISRLWDSGGFMPNGFGAVLSAMLITMFSFMGAEIVTIAAAESD
EcLysP          VLMIIGI--FKGAQPAGWSNWTIGEAPFAGGFAAMIGVAMIVGFSFQGTELIGIAAGESE
EcYtfD          LVMVAMHFQSPTGVEASFAHLWNDGGWFPKGLSGFFAGFQIAVFAFVGIELVGTTAAETK
BsRocE          GAAMFGLIDLKGGEQAPFLTHFYEDGLFPNGIKAMLITMITVNFAFQGTELIGVAAGESE
EcAroP          GWLL---FSGNGGPQATVSNLWDQGGFLPHAFTGLVMMMAIIMFSFGGLELVGITAAEAD
                   .        .            .  . .. .         *.* * *..  .*.*.

CgOrf5          KPREAISLAVRAVIWRISVFYLGSVLVITFLMPYESI----NGADTAAESPFTQILAMAN
EcGabP          TPEKHIVRATNSVIWRISIFYLCSIFVVVALIPWNM-------PGLKAVGSYRSVLELLN
EcLysP          DPAKNIPRAVRQVFWRILLFYVFAILIISLIIPYTDPSLLRNDVKDISVSPFTLVFQHAG
EcYtfD          DPEKSLPRAINSIPIRIIMFYVFALIVIMSVTPWSSVVPEK--------SPFVELFVLVG
BsRocE          DPEKTIPRSIKQTVWRTLVFFVLSIIVIAGMIPWKQAGVVE--------SPFVAVFEQIG
EcAroP          NPEQSIPKATNQVIYRILIFYIGSLAVLLSLMPWTRVTADT--------SPFVLIPHELG
                 *   .  .      *  .*.. .. ..  . *                 ...  ..

CgOrf5          IPGTVGFMEAIIVLALLSAFNAQIYATSRLVFSMANRQDAPRVFSKLSTSHVPTNAVLLS
EcGabP          IPHAKLIMDCVILLSVTSCLNSALYTASRMLYSLSRRGDAPAVMGKINRSKTPYVAVLLS
EcLysP          LLSAAAVMNAVILTAVLSAGNSGMYASTRMLYTLACDGKAPRIFAKLSRGGVPRKAAVCT
EcYtfD          LPAAASVINFVVLTSAASSANSGVFSTSRMLFGLAQEGVAPKAFAKLSKRAVPAKGLTFS
BsRocE          IPYAADIMNFVILIALLSVANSGLYASTRILYAMANEGQAFKALGKTNQRGVPMYSLIVT
EcAroP          DTFVANALNIVVLTAALSVYNSCVYCNSRMLFGLAQQGNAPKALASVDKRGVPVNTILVS
                        .. ... .  *  *. ..  .*... ..    *    .        *     .

CgOrf5          MFFAFVSVGLQYWNPAGLLDF--LLNAVGGCLIVVWAMITLSQLKLRK--ELQAND-EIS
EcGabP          TGAAFLTVVVNYYAPAKVFKF--LIDSSGAIALLVYLVIAVSQLRMRK--ILRAEG-SEI
EcLysP          TVIAGLCFLTSMFGNQTV--YLWLLNTSGMTGFIAWLGIAISHYRFRRGYVLQGHDINDL
EcYtfD          CICLLGGVVMLYVNPSVIGAFTMITTVSAILFMFVWTIILCSYLVYRKQ---RPHLHEKS
BsRocE          MAVACLSLLTKFAQAETV--YMVLLSLAGMSAQVGWITISLSQIMFRRKYIREGGKIEDL
EcAroP          ALVTALCVLINYLAPE--SAFGLLMALVVSALVINWAMISLAHMKFRRA---KQEQGVVT
                                  .  .                *  .    *.

CgOrf5          TVRMWAHPWLGILTLVLLAGLVALMLGDAASRSQVYSVAIV-YGFLVLLSFVTV--NSPL
EcGabP          RLRMWLYPWLTWLVIGFITFVLVVMLFRPAQQLEVISTGLLAIGIICTVPIMARWKKLVL
EcLysP          PYRSGFFPLGPIFAFILCLIITLGQNYEAFLKDTI-DWGGVAATYIGIPLFLIIWFGYKL
EcYtfD          IYKM---PLGKL----MCWVCMAFFVF-VVVLLTL-EDDTRQALLVTPLWFIALGLGWLF
BsRocE          KFKTPLYPVLPLIGLTLNTVVLISLAFDPEQRIAL---------YCGVPFMIICYIIYHV
EcAroP          RFLL-LYPLGN-------WICLLFMAA-VLVIMLM-TRGMGIWVYLIPVWLIVLGIGYLF
                          *                                 .              .

CgOrf5          RGGR----------TPSDLN
EcGabP          WQKT----------PVHNTR
EcLysP          IKGTHFVRYSEMKFPQNDKK
EcYtfD          IGKKRAAELR---------K
BsRocE          VIKKRQQANRQLEL------
EcAroP          KEKTAKAVKA---------H
```

Abb.25 Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz von orf5 mit der GABA-Permease (EcGabP; Niegemann *et al.*, 1993) und der Lysin-Permease aus *E. coli* (EcLysP; Steffes *et al.*, 1992), zwei Transportproteinen unbestimmter Funktion aus *E. coli* (EcYtfd) und *B. subtilis* (BsRocE; Embl: X81802) sowie der Permease für aromatische Aminosäuren aus *E. coli* (EcAroP; Honoré & Cole, 1990) mit dem Programm BLASTP (Husar 3.0). Sterne geben identische, Punkte ähnliche AS an.

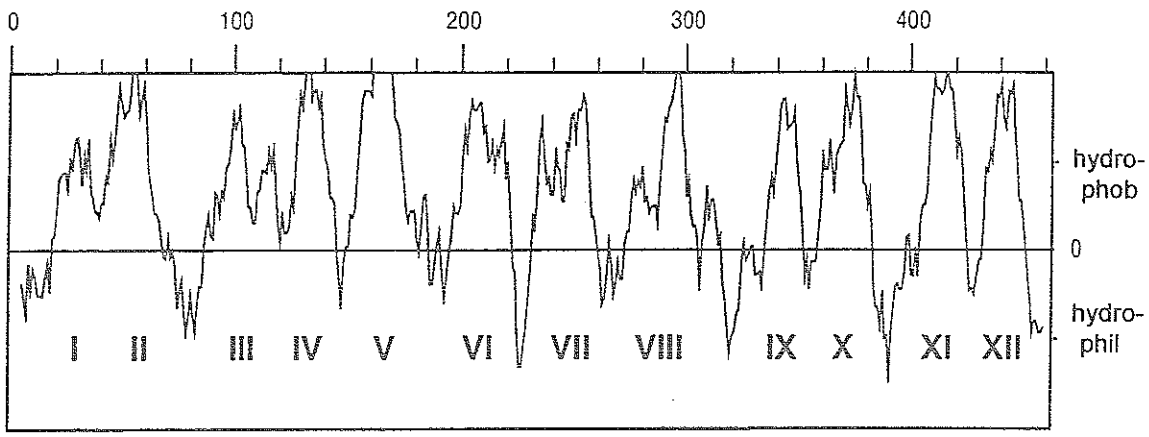


Abb. 26 Hydrophobizitätskurve des potentiellen orf5-Polypeptids nach Kyte & Doolittle (1982) mit einem Fenster von 9 AS (PEPPLOT; Husar 3.0). Transmembrane Segmente sind durch römische Ziffern gekennzeichnet (HELIXMEM; PcGene).

3.6.3 Fusion von orf5n und orf5c

Um die Funktion des potentiellen Aminosäuretransporters, der durch orf5 codiert wird, näher zu untersuchen, sollte versucht werden, eine erhöhte Aktivität des plasmidcodierten potentiellen orf5-Genproduktes nachzuweisen. Voraussetzung hierfür war die korrekte Fusion der beiden "Genfragmente" orf5n und orf5c. Um die starke Toxizität des Genproduktes für *E. coli* zu minimieren, wurde die Klonierung in pJC1, dessen Replikon für eine moderate Kopienzahl in *E. coli* sorgt (22 Kopien / Genom; Chang & Cohen, 1978), vorgenommen. Da unmittelbar vor orf5 das Leseraster orf3 lokalisiert ist, das aufgrund seiner engen Nachbarschaft (40 bp) mit orf5 eventuell ein Operon bildet, wurde auch orf3 in die Klonierung einbezogen.

Das 1,4kb orf5c *Sal*I-*Eco*RI- Fragment wurde durch eine blunt end - Ligation in die einzige *Bam*HI-Schnittstelle des Vektors pJC1 eingeführt, wodurch diese Restriktionserkennungsstelle zerstört wurde. Das rekombinante Plasmid pJC orf5c besitzt jedoch in der Insertion eine weitere *Bam*HI-Schnittstelle, die für die Ligation

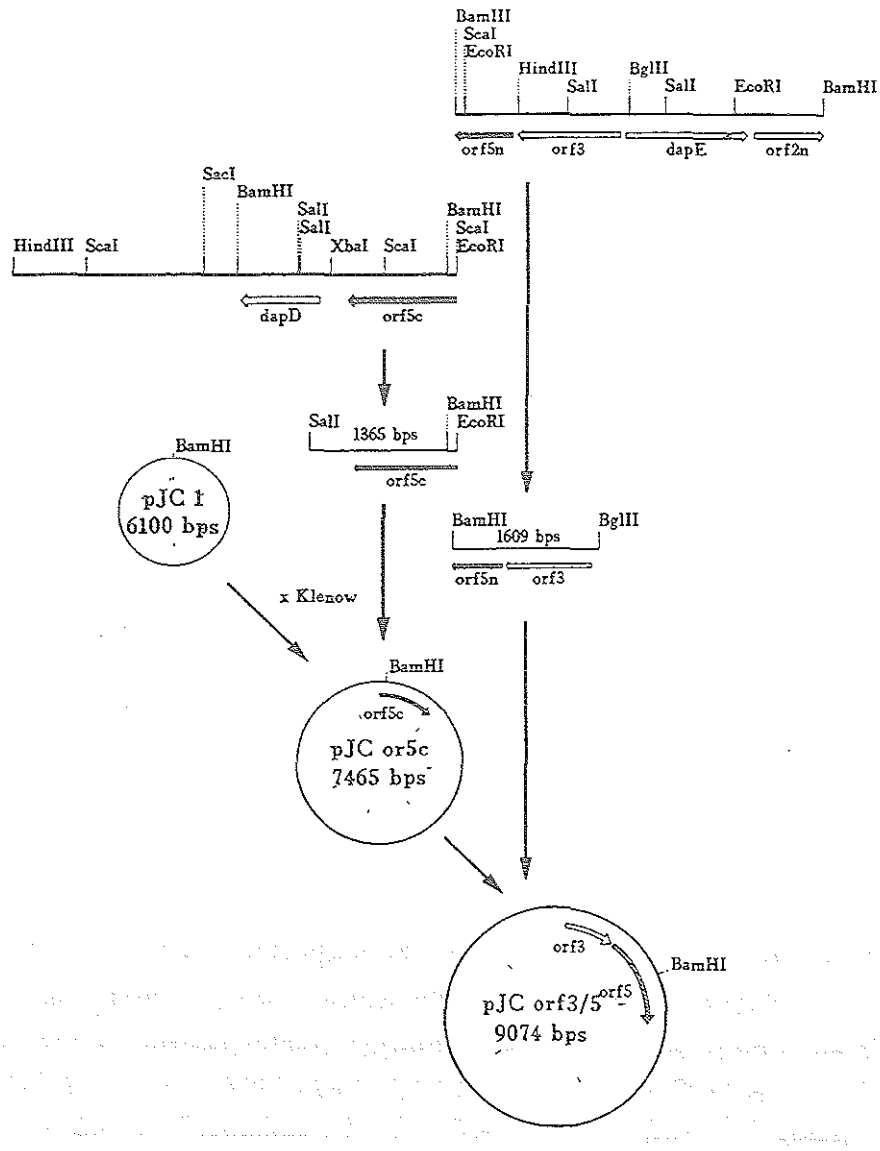


Abb. 27 Skizze zur Konstruktion des Plasmids pJC orf3/orf5. Das offene Leseraster orf5 wurde durch Ligation des 1,4 kb großen orf5c tragenden Fragmentes mit dem 1,6 kb großen orf5n tragenden Fragment im Vektor pJC1 fusioniert.

mit dem zweiten Fragment, das 1,6 kb große *Bam*HI-*Bgl*II orf5n/orf3, genutzt wurde. Nach Überprüfung der korrekten Orientierung der Insertion des 2. Fragmentes stand das rekombinante Plasmid pJC orf3/orf5, 9,1 kb, mit fusioniertem Leseraster orf5 zur Verfügung (s. Abb. 27).

Um eine korrekte "in-frame"-Fusion der beiden DNA-Fragmente sicherzustellen, wurden Fluoreszenz-markierte Primer hergestellt und mittels präparativer HPLC aufgereingt. Die entsprechenden Oligonukleotide wurden mit Hilfe der ermittelten Sequenzdaten so synthetisiert, daß die Primerbindungsstellen die beidsträngige Sequenzierung sowohl der *Bam*HI-Fusionsstelle als auch des Beginns des orf5-Strukturgens erlaubten. In keinem Fall traten Abweichungen von der zuvor ermittelten orf5-Sequenz auf. Damit konnte gezeigt werden, daß orf5 intakt auf pJC orf5/orf3 vorliegt und von *E. coli* DH5 toleriert wird.

3.6.4 Funktionalitätsnachweis von orf5 als Gen für den Transport aromatischer Aminosäuren, *aroP*

Mit dem Plasmid pJCorf3/orf5 bestand nun, nach Transformation von *C. glutamicum*, die Möglichkeit, das orf5-Genprodukt auch im homologen System verstärkt zu synthetisieren. Zusammen mit einer orf5-Integrationsmutante, *C. glutamicum* 13032 orf5::pEMorf5$_{int2}$ (Morakkabati, 1994), standen nun drei verschiedene *C. glutamicum*-Stämme zur Verfügung, die sich nur in der Synthese des orf5-Genproduktes unterschieden:

1. Der Wildtyp *C. glutamicum* ATCC13032 pJC1, mit der natürlichen Menge des orf5-Genproduktes,
2. die Defektmutante, *C. glutamicum* 13032 orf5::pEMorf5$_{int2}$, die kein intaktes orf5-Genprodukt bilden kann und
3. der "Überexprimierer" *C. glutamicum* 13032 pJCorf3/orf5, der, aufgrund der plasmidcodierten orf5-Kopien, das Genprodukt verstärkt synthetisieren sollte.

Da indirekte Hinweise auf eine mögliche orf5-Funktion als Gen für ein Lysinsekretionsprotein vorlagen, wurde die lysinsekretionsdefekte Mutante NA8 mit pJCorf3/orf5 transformiert und ebenso wie die orf5-Defektmutante auf Lysinindikatorplatten hinsichtlich eines veränderten Ausscheidungsverhaltens untersucht. Es konnte aber auch unter Nutzung des Methionineffektes, der zu einem verstärkten C-Fluß zum Lysin und damit zur Lysinsekretion führt (Vrljic *et al.*, 1995), kein verändertes Lysinsekretionsverhalten gegenüber den Ausgangsstämmen beobachtet werden, d.h. der Defekt in orf5 führte nicht zum Verlust der Lysinsekretion und das intakte orf5 ist nicht in der Lage, die lysinsekretionsdefekte Mutante zu komplementieren. Dieses Ergebnis zeigt, daß orf5 nicht an der Sekretion von L-Lysin beteiligt ist.

3.6.4.1 Physiologischer Nachweis zur orf5-vermittelten Aminosäureaufnahme

Ziel dieser Experimente war es, durch einen direkten Stammvergleich von orf5-Defektmutante, Wildtyp und "Überexprimierer", bestimmte Aminosäuren (AS) als mögliche Substrate für den orf5-Transporter zu identifizieren. Orientierende Experimente ergaben, daß nicht alle der 19 untersuchten AS von *C. glutamicum* 13032 aufgenommen wurden. Um regulatorische Effekte durch die Medien-

Tabelle 8 Vergleich der Aminosäure-Aufnahme von *C. glutamicum* 13032 auf verschiedenen Nährmedien über Nacht. CgXII + 5 mM AS und CgXIIN + 1 mM AS.

AS	CgXII	CgXIIN
γ-Aminobutyrat	+++++	nicht getestet
Aspartat	+++++	nicht getestet
Glutamat	+++++	nicht getestet
Asparagin	+++++	nicht getestet
Glutamin	+++++	nicht getestet
Serin	+++++	nicht getestet
Valin	++++	++
Alanin	++++	+++
Threonin	++++	+++
Glycin	+++	+
Isoleucin	+++	+++
Lysin	++	-
Arginin	++	+
Methionin	++	++
Histidin	++	++
Phenylalanin	++	++
Leucin	++	+++
Tryptophan	-	++
Tyrosin	-	++

+++++ vollständige Aufnahme in der exponentiellen Wachstumsphase
++++ vollständige Aufnahme in der stationären Wachstumsphase
+++ Aufnahme >30%
++ Aufnahme ≤30%
+ geringe Aufnahme (≤10%) in der exponentiellen Phase
- keine Aufnahme

zusammensetzung ausschließen zu können, wurde eine Medienoptimierung hinsichtlich verstärkter AS-Aufnahme durchgeführt. Tabelle 8 zeigt eine Übersicht zur Aufnahme der AS durch den Wildtyp im Vergleich der Medien CgXII und CgXIIN (= CgXII mit 5 g/l Casamin-Hydrolysat als einzige N-Quelle).

Zur vergleichenden Stammanalyse wurde das jeweilig optimale Medium, CgXII- oder CgXIIN, herangezogen. Durch Einsatz von CgXIIN, einer Animpf-OD_{600} = 2 und AS-Zugabe von je 1 mM konnte bei Supplementation mit Tyrosin, Tryptophan, Phenylalanin oder Histidin eine verstärkte Aufnahme durch den orf5-Überexprimierer und gleichzeitig, zumindest bei Tyrosin und Tryptophan, eine verminderte Aufnahme durch die orf5-Integrationsmutante im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden (s. Abb. 28). Bezüglich aller anderen AS verhielten sich die drei Stämme indifferent.

Nach Optimierung der Kultivierungsbedingungen (Kulturvolumen 20 ml, Animpf-OD_{600} = 10, AS-Konzentration 0,1 mM) konnten Tyr, Trp und Phe als Substrate für den orf5-vermittelten Aminosäuretransport identifiziert werden. Offenbar handelt es sich bei orf5 um das Gen für ein allgemeines Aufnahmesystem für aromatische Aminosäuren in *C. glutamicum*. In Analogie zu dem entsprechenden System in *E. coli* (Honoré & Cole, 1990), das 33% identische AS aufweist (GAP, Husar 3.1), wurde orf5 *aroP* genannt.

3.6.4.2 Untersuchungen zur Spezifität des Aufnahmesystems für aromatische Aminosäuren

Um die Aufnahmeraten exakter quantifizieren zu können, wurden Kurzzeitkinetiken durchgeführt. Mit Hilfe von ^{14}C-markierten aromatischen Substraten wurde die Aminosäure-Aufnahme (AS-Aufnahme) der Zellen innerhalb von 2 Minuten verfolgt. Dazu wurden die drei Stämme *C. glutamicum* ATCC 13032 pJC1 (Wildtyp), *C. glutamicum* ATCC13032 pJC*aroP* (=pJCorf3/orf5; "Überexprimierer") und *C. glutamicum* ATCC13032 *aroP*::pEM*aroP*$_{int2}$ (= orf5-Defektmutante) wie beschrieben angezogen und auf CgXIIN$^-$ überimpft (OD~10). Nach 2,5 h (30 °C) wurden die Kulturen nach einmaligem Waschen (CgXIIN$^-$C$^-$) in CgXIIN$^-$C$^-$+10 mM NaCl resuspendiert und auf Eis gelagert. Parallele Experimente, bei denen der für den chemischen Nachweis mittels HPLC notwendige N-Hungerschritt (2,5 h auf CgXIIN$^-$) wegfiel, zeigten, daß alle ermittelten AS-Aufnahmeraten im Bereich der

Standardabweichung lagen. Ein regulatorischer Einfluß des Komplexmediums auf die Aufnahme aromatischer AS konnte daher hier nicht erkannt werden.

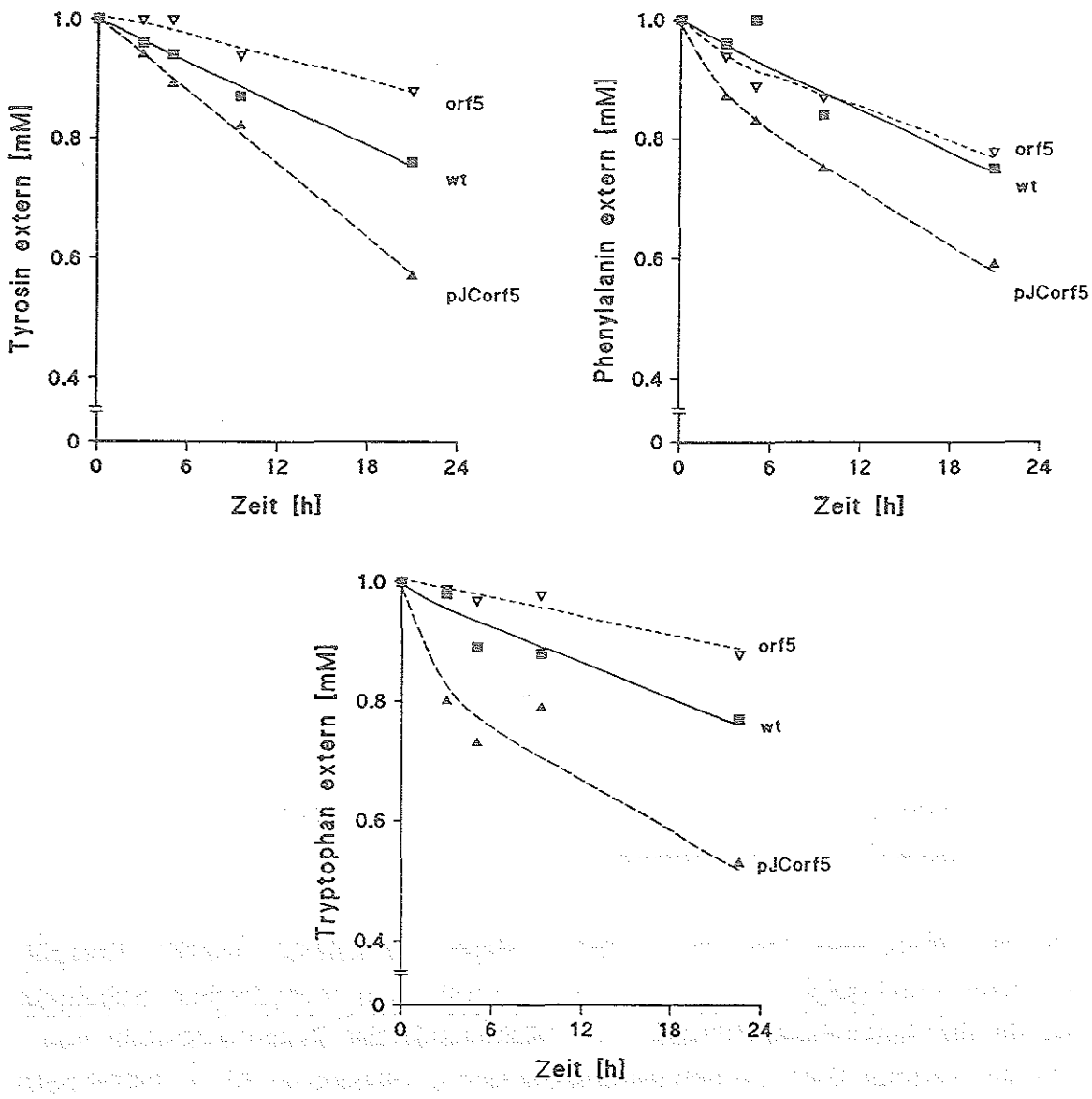


Abb. 28 Aufnahme der aromatischen Aminosäuren durch den *C. glutamicum* Wildtyp (wt), die orf5-Defektmutante (orf5) und den orf5-"Überexprimierer" (pJCorf5). Dargestellt ist die Abnahme der Aminosäurekonzentration im Medium von Tyrosin (oben links), Phenylalanin (oben rechts) und Tryptophan (unten).

Tabelle 9 zeigt, daß das plasmidcodierte *aroP* zur verstärkten Aufnahme der aromatischen AS führt. Am deutlichsten ist dieser Effekt bei der Tyrosin-Aufnahme zu erkennen: Hier wird die Aufnahme um den Faktor 4-5 erhöht. In allen Fällen bewirkt die Inaktivierung von *aroP* eine Reduzierung der AS-Aufnahmerate. Dennoch führt die Inaktivierung von *aroP* nicht zum völligen Verlust der Aufnahme aromatischer AS. Nur die Tryptophanaufnahme konnte ohne intaktes *aroP* nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 9: Messung der Aufnahme ^{14}C-markierter aromatischer Aminosäuren durch den *C. glutamicum* Wildtyp (wt), die orf5-Defektmutante (*aroP*) und den *aroP*-"Überexprimierer" (pJC*aroP*) mittels Kurzeitkinetiken. Die Raten sowie die entsprechenden Standardabweichungen sind in nmol (mg TG)$^{-1}$ min^{-1} und die Anzahl der voneinander unabhängigen Kultivierungen, die für die Messungen eingesetzt wurden, ist in Klammern angegeben.

Stamm	L-Tyr	L-Phe	L-Trp
C.glutamicum 13032			
pJC*aroP*	2.88 ±0.14 (6)	0.74 ±0.13 (3)	0.66 ±0.19 (3)
wt	0.64 (1)	0.40 ±0.01 (2)	0.21 ±0.12 (2)
aroP	0.30 ±0.07 (2)	0.24 ±0.03 (3)	< 0.1 (2)

Um zu zeigen, daß AroP tatsächlich Spezifität für alle aromatischen AS besitzt, wurden Kompetitionsexperimente durchgeführt. Untersucht wurde die Tyrosin-Aufnahme in *C. glutamicum* ATCC 13032 pJC*aroP* mit und ohne 10-fachen Überschuß der anderen aromatischer AS, Phenylalanin und Tryptophan. Abbildung 29 zeigt, daß sowohl Phenylalanin als auch Tryptophan zu einer drastischen Hem-mung (95 bzw. 87%) der Tyrosin-Aufnahme führten. Dies bedeutet, daß das klonierte *aroP*, obwohl die relative spezifische Transportgeschwindigkeit für Phe und Tyr bei *aroP*-Überexpression geringer ist (s.Tab.9), nicht nur spezifisch L-Tyrosin transportiert, sondern auch eine hohe Spezifität für die beiden anderen aromatischen AS, L-Phenylalanin und L-Tryptophan, aufweist.

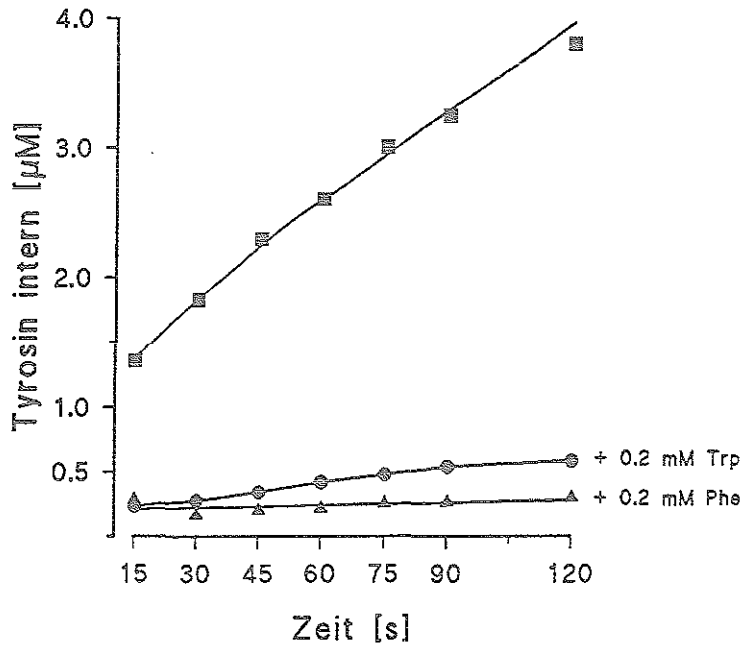


Abb. 29 Aufnahme von 0.02 mM L-Tyrosin durch *C. glutamicum* ATCC 13032 pJC*aroP* mit und ohne Zusatz von 0.2 mM L-Phenylalanin oder 0.2 mM L-Tryptophan.

3.6.4.3 Untersuchungen zur Affinität des Aufnahmesystems für aromatische Aminosäuren

Da die *aroP*-Defektmutante noch etwa 50% der Aktivität des Wildtyps zeigte, sollte die Aufnahmerate in Abhängigkeit von der Substratkonzentration bestimmt werden, um einen Hinweis auf die eventuelle Beteiligung weiterer Aufnahmesysteme zu bekommen. Am Beispiel der Tyrosin-Aufnahme wurden die konzentrationsabhängigen Aufnahmeraten von "Überexprimierer" (pJC*aroP*) und Defektmutante (*aroP*) verglichen (s. Abb. 30). Während die Tyrosin-Aufnahme des aroP-"Überexprimierers" eine typische konzentrationsabhängige Sättigungskurve (v_{max} = 2.93 nmol·(mg TG)$^{-1}$·min^{-1}; K_m = 3.0 ±0.35 µM) aufweist, scheint die Aufnahmegeschwindigkeit des Tyrosins in der Defektmutante konzentrations-

unabhängig zu sein. Dies zeigt eindeutig, daß die konzentrationsabhängige Diffusion keine Rolle bei der Tyrosin-Aufnahme spielen kann. Auch eine unspezifische Bindung des L-Tyrosins an die Zelloberfläche scheint unwahrscheinlich, da es sich zweifelsfrei um einen zeitabhängigen Prozeß handelt, was bei einer unspezifischen Absättigung nicht zu erwarten wäre.

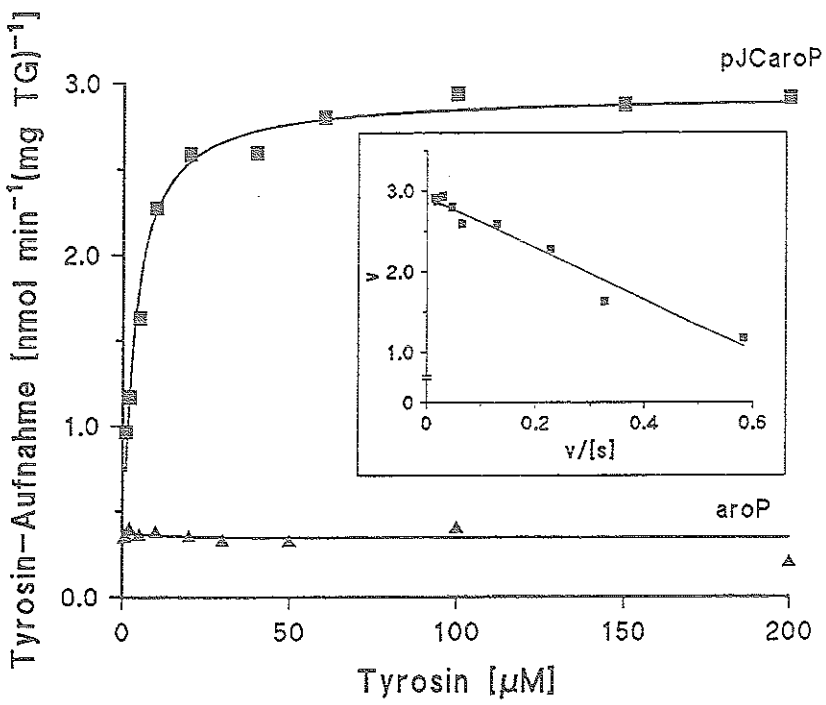


Abb.30 Konzentrationsabhängige L-Tyrosin-Aufnahme durch *C. glutamicum* *aroP*-"Überexprimierer" (pJC*aroP*) und die aroP-Defektmutante (*aroP*). Das Insert zeigt die L-Tyrosinaufnahme des *aroP*-"Überexprimierers" als Eadie-Hofstee-Auftragung, Aufnahmegeschwindigkeit v [nmol·(mg TG)^{1}·min^{-1}] als Funktion von v / interne Tyrosinkonzentration [nmol·(mg TG)$^{-1}$·min^{-1}µM^{-1}].

Um auszuschliessen, daß es sich bei der Grundaktivität um ein unspezifisches Bindungsphänomen handelt, wurden "Überexprimierer" und Defektmutante vor der Transportmessung parallel hitzeinaktiviert (Zellpellet 8 min bei 55 °C). Tabelle 10 zeigt, daß in beiden Fällen keine vollständige Inaktivierung erreicht wurde, doch deutet die gleiche prozentuale Abnahme der Transportrate darauf hin, daß es sich bei der Basisaktivität in der Defektmutante ebenfalls um eine protein-vermittelte Aufnahme von L-Tyrosin handelt.

Tabelle 10: L-Tyrosin-Aufnahme bei zwei unterschiedlichen Tyrosin-Konzentrationen durch den *C. glutamicum aroP*-"Überexprimierer" (pJC*aroP*) und die *aroP*-Defektmutante (*aroP*) mit und ohne Hitzeinaktivierung (8 min, 55°C). Die Aufnahmeraten sind in nmol·(mg TG)$^{-1}$·min^{-1} angegeben. Die relativen Aktivitäten, bezogen auf die Messungen ohne Hitzeinaktivierung, sind in Klammern angegeben.

Stamm	L-Tyr [µM]	L-Tyr-Aufnahme	
		Hitzebehandlung	
		ohne	mit
C. glutamicum			
pJC*aroP*	10	2.27 (100%)	1.21 (53%)
	100	2.94 (100%)	1.16 (40%)
aroP	10	0.37 (100%)	0.22 (60%)
	100	0.39 (100%)	0.20 (51%)

Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß *C. glutamicum* ein weiteres extrem affines Aufnahmesystem für L-Tyrosin besitzt. Die Grundaktivität in der *aroP*-Defektmutante kann durch dieses mögliche zweite Aufnahmesystem für L-Tyrosin, das bereits bei einer Konzentration von 0.5 µM seine maximale Geschwindigkeit erreicht, erklärt werden. Auch in *E. coli* ist neben einem allgemeinen Aufnahmesystem (Chye *et al.*, 1986) ein spezifisches Aufnahmesysteme für L-Tyrosin bekannt (Wookey *et al.*, 1984) , jedoch weist hier das allgemeine Aufnamesystem eine höhere Affinität zu den aromatischen AS auf (Brown, 1970).

3.6.4.4 Untersuchungen zum Mechanismus des Aufnahmesystems für aromatische Aminosäuren

Die abgeleitete Aminosäuresequenz des Gens für AroP zeigt (s. Abb. 25), daß dieses Protein zu einer Familie von Aminosäuretransportern gehört, die sich durch einen sekundären Transportmechanismus auszeichnen (Saier, 1994). Da in diesem Fall der elektrochemische Gradient über der Membran als treibende Kraft essentiell ist, ist ein intaktes Membranpotential Voraussetzung für einen funktionellen Transport (Krämer, 1994). Durch Einsatz des Entkopplers CCCP,

der zu einem sofortigen Zusammenbruch des Membranpotentials führt, sollte am Beispiel Tyrosin gezeigt werden, daß der Transport mittels AroP auf ein intaktes Membranpotential angewiesen ist.

In *C. glutamicum* pJC*aroP* erfolgte bei Einsatz von 25 µM CCCP eine drastische Reduktion des Membranpotentials von -144 mV auf -81 mV. Dies zeigt zum einen, daß die verstärkte Synthese des Membranproteins AroP nicht zu einem - im Vergleich mit dem Wildtyp (Bröer & Krämer, 1991b; Bayan *et al.*, 1993) - veränderten Membranpotential führt, was bei einem verstärkten Polypeptideinbau in die Membran nicht überrascht hätte (Eckert & Beck, 1989). Zum anderen illustriert Abbildung 31, daß unmittelbar nach CCCP-Gabe die Tyrosin-Aufnahme im *aroP*-Überexprimierer gestoppt wird. Damit ist belegt, daß die Aufnahme aromatischer Aminosäuren tatsächlich einem sekundären Transportmechanismus gehorcht.

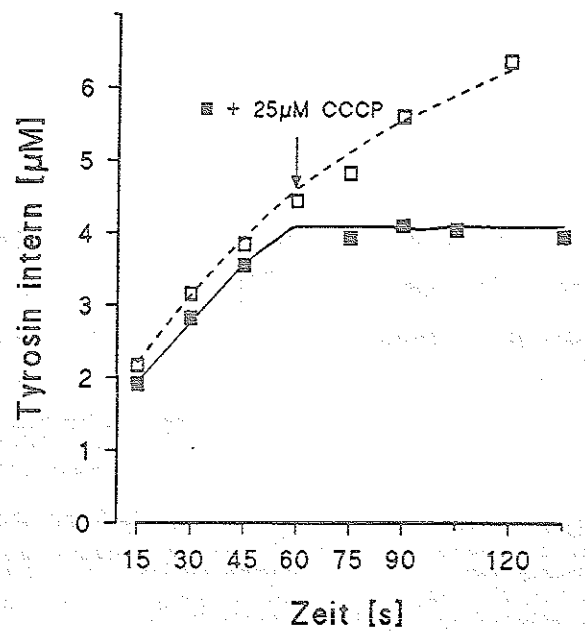


Abb. 31 L-Tyrosin-Aufnahme durch den *aroP*-"Überexprimierer" (*C. glutamicum* ATCC pJC*aroP)* vor und nach Zugabe von 25 µM CCCP. Die Kontrolle ohne Entkoppler ist mit unterbrochener Linie dargestellt.

Transport von wichtigen Substraten, wie Aminosäuren, kann auch entgegen die entsprechenden Konzentrationsgradienten erfolgen. Für sekundäre Transportprozesse ist dabei der Symport oder Antiport mit anderen Substraten Voraussetzung, wobei häufig die bestehenden Protonen- oder Natriumionen-Gradienten genutzt werden (Krämer, 1994a). Die Tyrosin-Aufnahme durch *C. glutamicum* pJC*aroP* zeigte sich in Gegenwart von 2µM des Na^+-Komplexierers Monensin stark beeinflußt und sank um etwa 50% (nicht dargestellt). Dies deutet darauf hin, daß AroP aromatische AS im Symport mit Natriumionen in die Zelle transportiert.

3.6.5 Untersuchungen zur AroP-vermittelten Sekretion aromatischer Aminosäuren

Da Membrantransportproteine prinzipiell auch als enzymatische Systeme angesehen werden können, die die Umsetzung des Substrates von einem in ein anderes Kompartiment ermöglichen (Krämer, 1994a), muß die katalysierte Reaktion reversibel sein, d.h. ein Einkomponenten-Aufnahmesystem muß theoretisch auch zur Sekretion des spezifischen Substrates befähigt sein. Um zu untersuchen, ob das Aufnahmesystem AroP auch am Export von aromatischen Aminosäuren beteiligt sein kann, wurde 1 mM des Dipeptids TyrPhe dem Medium zugegeben und zu verschiedenen Zeitpunkten die cytosolische und externe Aminosäurekonzentration beim *aroP*-Überexprimierer (pJC*aroP*) und der *aroP*-Defektmutante (*aroP*) bestimmt. TyrPhe-Gabe führte zu einer starken Akkumulation der korrespondierenden Aminosäuren im Cytosol. Interessanterweise war im Fall von Tyrosin die cytosolische Akkumulation im *aroP*-Überexprimierer nicht so hoch wie bei der *aroP*-Defektmutante, während extern eine entsprechend höhere Tyrosin-Konzentration nachgewiesen werden konnte. Abbildung 32 zeigt, daß umgekehrt, die *aroP*-Defektmutante doppelt so viel Tyrosin intern akkumuliert (140 mM) und nur langsam ins Medium sekretiert. Dies ist ein ein deutlicher Hinweis auf eine Beteiligung von AroP am Export von Tyrosin. Ein vergleichbares Bild ergab sich jedoch nicht hinsichtlich der Verteilung der Phenylalanin-Konzentrationen. Wahrscheinlich ist die Phenylalanin-Sekretion, ob durch Diffusion oder Transportsysteme vermittelt, so schnell, daß die Aufnahme und Hydrolyse des Dipeptids geschwindigkeitslimitierend ist, so daß sich dieser experimentelle Ansatz zum Nachweis der AroP-vermittelten Phenylalaninsekretion nicht eignet.

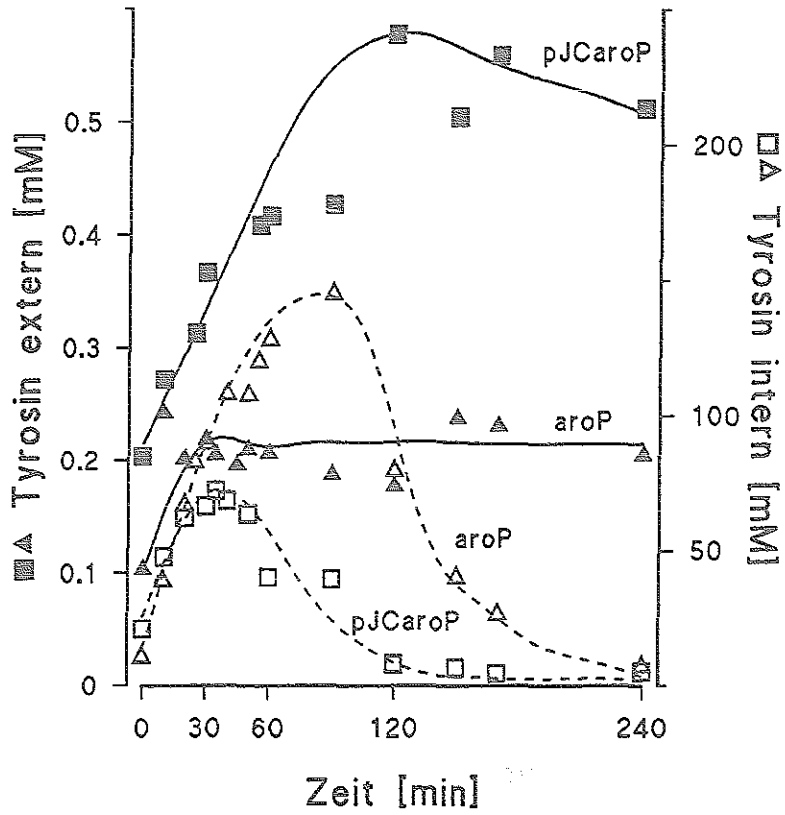


Abb. 32 Tyrosinsekretion durch den *aroP*-Überexprimierer (*C. glutamicum* ATCC 13032 pJC*aroP*) und die *aroP*-Defektmutante (*C. glutamicum* 13032 *aroP* ::pEM*aroP*$_{int}$) während einer 4-stündigen Kultivierung auf CgXIIN$^-$-Medium mit 1 mM TyrPhe-Dipeptid

3.6.6 Identifizierung eines Tryptophan-Abbauproduktes

Bei der Kultivierung des *aroP*-Überexprimierers auf Medium mit D,L-Tryptophan zeigte sich wiederholt eine braungelbe Verfärbung der Übernacht-Kultur. Da bei Parallelkultivierungen mit der *aroP*-Defektmutante dieses Phänomen nicht auftrat, lag es auf der Hand, die Verfärbung als Indiz für Tryptophanabbau in *C. glutamicum* zu werten. Bedingt durch die verstärkte Aufnahme des Tryptophans durch *C. glutamicum* 13032 pJC*aroP* wird offenbar vermehrt ein Stoffwechselprodukt gebildet, das ins Medium ausgeschieden wird. Da in Mikroorganismen der Tryptophanabbau vor allem über zwei Wege beschritten wird, die entweder

Kynurein oder Indol als Zwischenprodukt bilden (Kieslich, 1976), wurde ein Indol-Test durchgeführt. Im Gegensatz zu *E. coli*, zeigte weder der *C. glutamicum*-Wildtyp noch *C. glutamicum* 13032 pJC*aroP* eine positive Reaktion auf Kovac´s-Reagenz (Cappuccino & Sherman, 1987). Damit ist gezeigt, daß bei einem Tryptophanabbau in *C. glutamicum* kein freies Indol entsteht.

Zur genauen Untersuchung der Produktbildung bei Wachstum auf Tryptophan wurden die Kulturüberstände des *aroP*-Überexprimierers und der *aroP*-Defektmutante jeweils durch *reversed phase* HPLC getrennt und mittels UV-Detektion ein Absorptionsspektrum aufgenommen. Durch die Differenz der beiden Absorptionsspektren konnten die Fraktionen ermittelt werden, in denen ein für den *aroP*-Überexprimierer spezifisches Produkt absorbiert (s. Abb. 33). Die Fraktion, die den dominanten Peak (Retentionszeit 8,1 Minuten) mit einer Konzentration von 0,27 mM zeigte, wurde isoliert, lyophilisiert und für die Vermessung mittels ^{1}H-NMR-Spektroskopie in D_2O (pH 3) gelöst.

Mit Hilfe der Kernspinresonanz-Spektroskopie lassen sich die verschiedenen Protonen eines Moleküls aufgrund der unterschiedlichen sie umgebenden Elektronendichten durch ihre charakteristischen Absorptionssignale bei verschiedenen Frequenzen identifizieren. Das isolierte Tryptophan-Abbauprodukt wurde mit ^{1}H-NMR-Spektroskopie (9,4 tesla, 400MHz, AMX-400WB NMR-Gerät; Bruker, Karlruhe) vermessen, und durch das erhaltene Protonenresonanzspektrum konnte die Substanz überraschenderweise als substituiertes Indol klassifiziert werden. Da im Vergleich zum Tryptophan ein charakteristischer Protonenshift zu hohen Frequenzen nachweisbar war, kam eine Aldehydgruppe als potentieller Substituent in Betracht. Tatsächlich zeigte die Referenzsubstanz Indol-3-aldehyd den gleichen charakteristischen Protonenshift. Offensichtlich akkumuliert *C. glutamicum* 13032, wenn das Aufnahmesystem für aromatische Aminosäuren, AroP, verstärkt synthetisiert wird, bei Wachstum mit D,L-Tryptophan in großen Mengen Indol-3-aldehyd, obwohl freies Indol unter den gleichen Bedingungen nicht nachweisbar ist.

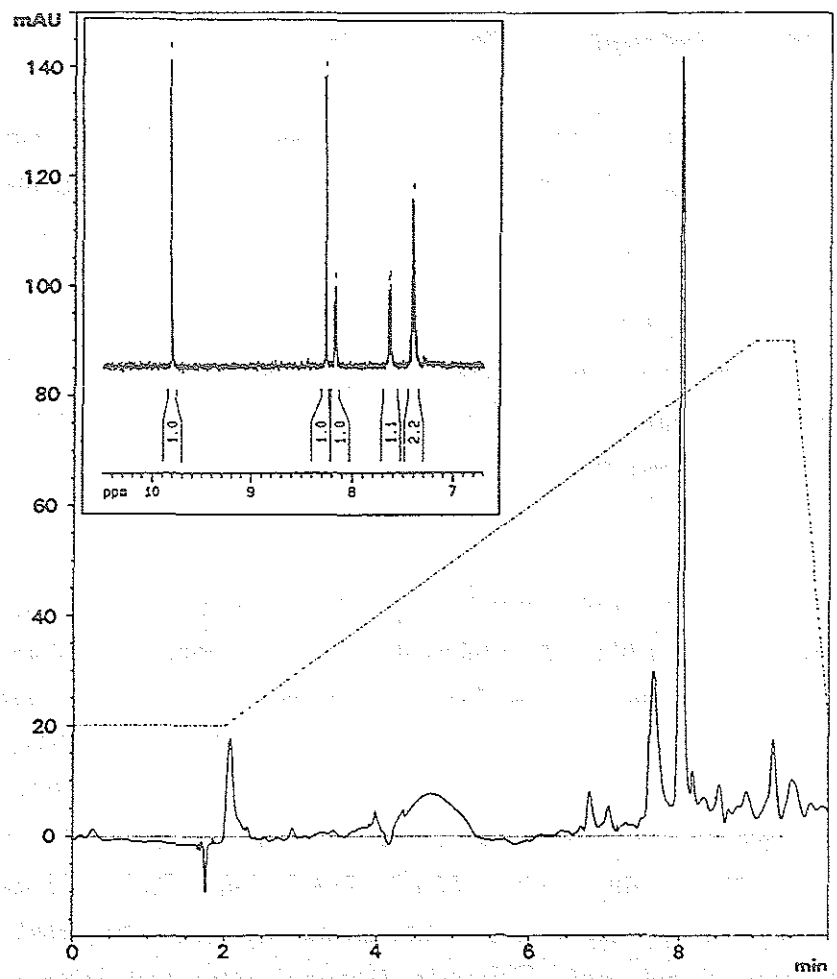


Abb. 33 UV-Differenzchromatogramm von Kulturüberständen des *aroP*-Überexprimierers (*C. glutamicum* 13032 pJC*aroP*) und der *aroP*-Defektmutante (*C. glutamicum* 13032 *aroP*::pEM*aroP*$_{int}$) nach Trennung über *reversed phase* HPLC. Das Spektrum zeigt die Substanzen, die im Kulturüberstand von *C. glutamicum* 13032 pJC*aroP* vermehrt auftraten. Die Kulturen wurden parallel auf CgXIIN mit 1 mM D,L-Tryptophan angezogen. Das Insert zeigt einen Ausschnitt des Protonenresonanzspektrums des als D,L-Tryptophan-Abbauprodukt isolierten Indol-3-aldehydes. Das für die Aldehydgruppe charakteristische Signal ist bei 9,79 ppm zu erkennen.

4. DISKUSSION

4.1 Isolierung des Diaminopimelat-Genclusters

Das in dieser Arbeit isolierte Gencluster warf überraschenderweise Probleme bei der intakten Klonierung auf. Um den Grund für die wiederholt beobachteten DNA-Umlagerungen in dem chromosomalen *dapD* und *dapE* tragenden Bereich herauszufinden, waren auch molekulargenetische Untersuchungen solcher "artifiziellen", d.h. strukturell nicht der genomischen Organisation des Wildtyps entsprechenden Klone notwendig. Letztlich zeigte es sich, daß alle Probleme ihre Ursache in zwei voneinander unabhängigen rekombinanten Ereignissen hatten, nämlich der Rekonstitution des *ddh*-Gens und der Deletion von *aroP* sowie angrenzender Sequenzbereiche.

Komplementation von DAP-auxotrophen *E. coli*-Mutanten führte zu einem Stamm mit hoher Dehydrogenase-Aktivität. Dabei war nicht so sehr die Tatsache überraschend, daß überhaupt eine in der Succinylase (*dapD*) defekte *E. coli*-Mutante durch ein Gen eines in diesem Organismus nicht existierenden Enzyms (*ddh*) komplementiert werden konnte, sondern vielmehr, daß diese Komplementation mit DNA des Dehydrogenase-negativen Ausgangsstammes *C. glutamicum* AS70 (Schrumpf *et al.*, 1991), möglich war. Höchstwahrscheinlich ist homologe Rekombination im *E. coli* Wirt für die Deletion des Integrationsvektors pEM1 aus dem *ddh*-Gen und eine damit einhergehende Restaurierung der Dehydrogenase-Aktivität verantwortlich. Dies deutet auf einen starken Selektionsdruck durch die DAP-auxotrophen Mutanten hin (Wehrmann *et al.*, 1994) und erklärt, warum Yeh *et al.* (1988) und Ishino *et al.* (1988) nicht in der Lage waren, die Gene des Succinyldiaminopimelatweges zu klonieren.

Mit Hilfe von Koloniehybridisierungen konnte das Gen für die N-Succinyldiaminopimelatdesuccinylase, *dapE*, auf einem strukturell und funktionell intakten *Bam*HI-Fragment aus *C. glutamicum* ATCC13032 isoliert werden. Die abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte 23% identische Aminosäuren mit dem einzigen anderen bekannten DapE-Polypeptid, der Desuccinylase aus *E. coli* (Bouvier *et al.*, 1992). Ein ähnlich niedriger Anteil identischer Aminosäuren wurde auch für andere Polypeptide der Aminosäurebiosyntheseenzyme von *C. glutamicum* berichtet, wie LysC (Kalinowski *et al.*, 1990), IlvA (Möckel *et al.*, 1992) und LeuA (Pátek *et al.*, 1994), während beim Vergleich von Polypeptiden von Enzymen des Zentralstoff-

wechsels beider Organismen in der Regel ein höherer Grad an Identität beobachtet wurde (Eikmanns, 1992). Dies zeigt, daß trotz des nur in Gram-positiven Bakterien vorhandenen Dehydrogenaseweges, eine ähnliche strukturell divergente Entwicklung von DapE aus *C. glutamicum* und *E. coli*, wie sie auch bei anderen Aminosäurebiosyntheseenzymen anzutreffen ist, stattgefunden hat. Interessanterweise wird eine evolutionäre Verwandtschaft der Desuccinylase aus *E. coli* mit der Acetylornithin Deacetylase aus *E. coli* (Boyen *et al.*, 1992), der Carboxypeptidase G2 aus *Pseudomonas sp.* (Minton *et al.*, 1984), der Aminoacylase I aus Mensch und Schwein (Mitta *et al.*, 1992) und der Aminoacylase aus *Bacillus stearothermophilus* diskutiert (Sakanyan *et al.*, 1993). Obwohl alle Polypeptide der Mitglieder dieser Gruppe untereinander nur etwa 20% identische Aminosäuren aufweisen, zeigen sie doch konservierte Bereiche, wie zwei aufeinanderfolgende Glutamatreste und ein hochkonserviertes GXXXH-Motiv (Sakanyan *et al.*, 1993). Diese Motive sind, wie Abbildung 34 zeigt, auch in der N-Succinyldiaminopimelat Desuccinylase aus *C. glutamicum* konserviert (EE, Position 137/138 ; GVRAH, Position 188-192) und weisen DapE als neues Mitglied dieser Gruppe von Aminoacylasen aus. Die beiden Glutamatreste könnten

```
                          .         .         .         .         .
CgDapE      125 KHDLTLIAYECEEVADHLNGLGHIRDEHPEWLAADLALLGEPT-----GG
EcDapE      123 -GRLAFLITSDEEASAHNGTUKVVEALMARNERLDYCLVGEPSSIEVVGD
EcArgE      134 -KPLYILATADEETSMAGARYFAETTAL----RPDCAIIGEPTSLQPV--
BstAma      127 RGEIRFLFQHAEELFPGGAEEMVQAGVMDGVDVVIGTHLWSPLERGKIGI
PspCpG2     163 YGTITVLFNTDEEKGSFGSADLIQEEAK----LADYVLSFEPTSAGDE--
PigACY1     134 PRTIHMTFVPDEEVGGHQGMELFVKRPEFQALRAGFALDEGLASPTDA--
                            **

CgDapE          WIEAGCQGNLRIK----VTAEGVRAE-SARSWLGDNAMHKLSPIISKVAA   215
EcDapE          VVKNGRRGSLTCN----LTIEGVQGE-VAYPHLADNPVHRAAPFLNELVA   217
EcArgE          ---RAHKGHISNA----IRIQGQSGE-SSDPARGVNAIELMHDAIGHILQ   220
BstAma          VYGPMMAAPDRFF----IRIIGKGGE-GAMPHQTIDAIAIGAQVVTNLQH   222
PspCpG2         ---KLSLGTSGIA-YVQVNITGKASEAGAAPELGVNALVEASDLVLRTMN   253
PigACY1         ---FTVFYSERSPWWLRVTSTGKPGEGSRFIEDTAAEKLHKVINSILAFR   229
                                          *   *
```

Abb. 34 Vergleich von Aminoacylase Polypeptidteilsequenzen. CgDapE = *C. glutamicum* N-Succinyldiaminopimelatdesuccinylase; EcDapE = *E. coli* N-Succinyldiaminopimelatdesuccinylase; BstAma = *B. stearothermophilus* Aminoacylase; PspCpG2 = *Pseudomonas sp.* Carboxypeptidase G2; PigAci = Aminoacylase I vom Schwein. Sterne zeigen identische AS an. Sequenzbereiche mit starker Ähnlichkeit sind hervorgehoben dargestellt.

an der Bindung von Co^{2+} beteiligt sein, da DapE aus *E. coli* als cobaltabhängig beschrieben wird (Lin *et al.*, 1988), und für die Carboxypeptidase A die Beteiligung von zwei aufeinanderfolgenden Glutamatresten an der Bindung von Metallionen nachgewiesen wurde (Lipscomb, 1973).

Die Klonierung von *dapD* war nur unter Vermeidung einer starken Überexpression des funktionellen Nachbargens, *aroP* (=orf5), möglich. Solch ein Problem kann entweder durch den Einsatz von *low-copy* Vektoren gelöst werden (Reinscheid *et al.*, 1994a; Kronemeyer *et al.*, 1995) oder aber, wie hier erstmalig für *C. glutamicum* beschrieben, durch chromosomale Inaktivierung des toxischen Gens und anschließender Isolierung der benachbarten Sequenzen mittels *plasmid rescue*. Die Lokalisation der beiden Gene *dapD* und *dapE* auf einem Cluster auf dem Chromosom von *C. glutamicum* ATCC13032 (s. Abb. 35) ist überraschend, da für *E. coli* eine verstreute Anordnung der Gene des Succinyldiaminopimelatweges im Genom berichtet wird (Patte, 1983). Zwar ist auch für andere Gene konsekutiver Enzyme der Aminosäurebiosynthese in *C. glutamicum* eine Clusterung bekannt (*lysC-asd*, Kalinowski *et al.*, 1990; *dapA-dapB*, Cremer *et al.*, 1990), doch werden *dapD* und *dapE* in unterschiedliche Richtungen transkribiert. Im Unterschied zum *aceA-aceB*-Locus, der sich auch durch eine divergente Transkription der geclusterten Gene auszeichnet (Reinscheid *et al.*, 1994c), sind *dapD* und *dapE* durch *aroP* und orf3 getrennt, so daß eine koordinierte Expression sehr unwahrscheinlich ist. Das Genprodukt DapD weist erstaunlicherweise nur eine geringe Ähnlichkeit mit anderen bekannten DapD-Polypeptiden auf, doch konnte durch Ermittlung der spezifischen Enzymaktivität eindeutig dessen Funktion als Tetrahydrodipicolinat Succinylase belegt werden.

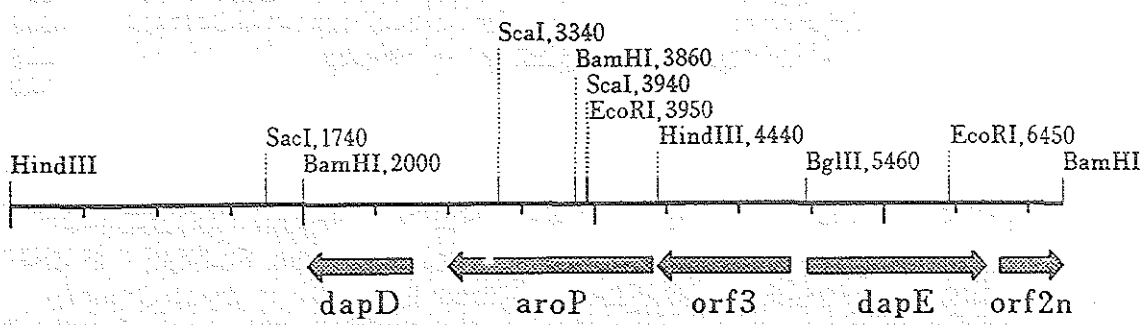


Abb. 35 Anordnung der Gene *dapD*, *dapE* und *aroP* sowie der offenen Leseraster orf3 und orf2n im Genom von *C. glutamicum* ATCC13032

Das artifizielle "dapD", das als 2,85kb *Bam*HI-Fragment isoliert wurde (Wehrmann *et al.*, 1994), ist durch eine Fusion der authentischen Gene *dapD* und orf3 entstanden. Ermöglicht wurde dies durch die starke Ähnlichkeit der Nukleotidsequenzen, die über einen großen Bereich identisch sind. Eine gezielte Suche nach der DNA-Region mit der stärksten Ähnlichkeit zwischen orf3 und *dapD* (Programm BESTFIT, Husar 3.0) ergab einen homologen Bereich, der kurz vor dem Translationsstart von *dapD* beginnt. Abbildung 36 veranschaulicht, daß der Einzelstrangbruch, der für die Rekombination, die zu dem artifiziellen "dapD" geführt hat, verantwortlich ist, sehr genau lokalisiert werden konnte. Obwohl die Rekombination im *dapD*-Strukturgen stattgefunden hat, führte der Austausch der Nukleotidsequenzen von orf3 und *dapD* nur zu konservativen Basenaustauschen. Lediglich im Bereich von Codon 11 und 12 der DapD-Sequenz fand ein Aminosäureaustausch statt (V11L, F12V), so daß, von dieser Ausnahme abgesehen, der carboxyterminale Bereich des artifiziellen "*dapD*" (ab AS 96 von "orfdapD" in Abb. 5) mit dem authentischen *dapD* identisch ist.

```
        90    D  A  H  D  V  Y  L  R  L  H  L  L  S  H  R  L  V
orf3          GACGCGCACGATGTTTACCTGCGCCTCCACCTGCTTTCCCACCGCCTGGT
              ||  |  ||||||  |  ||||||||  |||||  ||  |||||||||  |  |
dapD          GACACCTACGATGCAT-GCTGCGCCTTCACCTCCTCTCCCACCGCGTTTT
                                M  L  R  L  H  L  L  S  H  R  V  F

       108     R  P  H  E  M  H  M  Q  N  T  L  E  L  L  S  D
orf3          CCGCCCCCACGAAATGCACATGCAAAACACCTTGGAGCTGCTGTCCGACG
              ||||||  |||   ||  ||  |  |   ||  ||  |  ||  ||   |  |  |
dapD          CCGCCCTCACACCATCAACCTAGACGGCATTTTCGGCCTCCTCAACAATG
        13     R  P  H  T  I  N  L  D  G  I  F  G  L  L  N  N

       124    V  V  W  T  N  K  G  P
orf3          TGGTGTGGACAAACAAGGGCCCTT
              |  ||||||||  |||   ||  ||  |
dapD          TCGTGTGGACCAACTTCGGACCGT
        29    V  V  W  T  N  F  G  P
```

Abb. 36 Vergleich der Nukleotidsequenzen von *dapD* und orf3 einschließlich der ersten ca. 100 Basen vor dem Translationsstart durch das Programm BESTFIT (Husar 3.0). Sequenzhomologie tritt erst kurz vor dem ATG-Startcodon (unterstrichen) der *dapD*-Sequenz auf. Die abgeleitete Aminosäuresequenz von dapD und orf3 ist zusätzlich angegeben. Die durch homologe Rekombination entstandene artifizielle "orfdapD"-Sequenz ist hervorgehoben dargestellt.

Der hohe Grad an Identität (43%) der abgeleiteten AS-Sequenzen von orf3 und *dapD* könnte auf eine ähnliche Funktion der Genprodukte von orf3 und *dapD* hinweisen. Gezielte Untersuchungen zu orf3 zeigten jedoch weder eine Überexpression der Tetrahydrodipicolinat Succinylase in rekombinanten *C. glutamicum*-Stämmen mit plasmidcodiertem orf3, noch konnten physiologische Auswirkungen durch eine orf3-Deletion, *C. glutamicum* W3-36, festgestellt werden. Aus diesem Grund kann eine Funktion eines potentiellen orf3-Genproduktes als DapD-Isoenzym ausgeschlossen werden. Durch Experimente zur Bestimmung des Transkriptionsstartes ist bekannt, daß ein orf3-Transkript gebildet wird (M. Pátek, persönl. Mitteilung). Ob aber tatsächlich auch ein orf3-Protein gebildet werden kann und, wenn ja, welche Funktion es besitzt, müssen zukünftige Studien zeigen. Interessanterweise wurde erst kürzlich im menschlichen Genom das Pseudogen einer anderen Succinyltransferase entdeckt, das zwar prozessiert, aber aufgrund von Mutationen nicht in ein funktionelles Protein translatiert wird (Dihydroliponamid Succinyltransferase des 2-Oxoglutarat Dehydrogenase Komplexes; Nakano et al., 1994). Allerdings deutet die Tatsache, daß das artifizielle "dapD"-Fragment ein funktionelles Protein bilden kann (Wehrmann *et al.*, 1994), eindeutig auf eine Translation des orf3-Transkriptes *in vivo* hin. Da die Rekombination, die zur orf3-*dapD*-Fusion führte, am Codon 15 für DapD stattgefunden haben muß (s. Abb. 36), steht das artifizielle "DapD" unter der Kontrolle der Transkriptions- und Translationssignale von orf3. Wenn von orf3 also tatsächlich ein Genprodukt gebildet wird, so erscheint es äußerst unwahrscheinlich, daß *C. glutamicum* sich die Synthese eines funktionslosen Proteines "leistet". Eine Anhäufung von Mutationen, die zu einem Abbruch einer solchen energieaufwendigen Synthese in einem frühen Stadium führt, wäre zu erwarten (Hall *et al.*, 1984), und ein Verlust dieser genetischen Information wäre die logische Konsequenz (Stouthamer & Kooijman, 1993). Auf der anderen Seite gibt es jedoch auch Beispiele für den Erhalt von nicht exprimierten kryptischen Genen, wie *argM* (Riley & Glansdorf, 1984) oder das *cel*-Operon (Parker & Hall, 1990) . Solche stummen Gene, deren Mutationen unter Selektionsdruck revertieren bzw. durch Zweitmutationen suprimiert werden können, stellen unter Umständen einen Überlebensvorteil für eine Bakterienpopulation dar (Li, 1984).

In *C. glutamicum* ist bislang keine Regulation der Diaminopimelatsynthese durch DAP bekannt (Cremer *et al.*, 1988; Schrumpf *et al.*, 1991). Bemerkenswerterweise wurde bei der Überprüfung der spezifischen Enzymaktivitäten in der DapE-Defektmutante wiederholt eine leicht erhöhte Dehydrogenaseaktivität festgestellt.

Eventuell reflektiert diese Beobachtung einen geringeren freien D,L-DAP-Pool in der DapE-Mutante, der zu einer Derepression des *ddh*-Gens und damit zu einer erhöhten Synthese des Enzyms führt. Entsprechende Untersuchungen zur DAP-Regulation auf Transkriptionsebene können nicht direkt durchgeführt werden, da externes DAP von den Zellen nicht aufgenommen werden kann (Yeh *et al.*, 1988). Sowohl in *B. subtilis* (Hemmung der Apartatkinase I; Zhang & Paulus, 1990) als auch aus *E. coli* (Induktion von *lysA*; Boy *et al.*, 1979; Patte, 1983) stellt D,L-DAP einen Effektor für die Regulation dar. Eine entsprechende Rolle des essentiellen Intermediats D,L-DAP wäre auch für *C. glutamicum* nicht überraschend. Eine mögliche Regulationsstelle ist dabei der Verzweigungspunkt am Tetrahydrodipicolinat, so daß die erhöhte Dehydrogenaseaktivität in *C. glutamicum dapE* erstmals einen Anhaltspunkt für eine mögliche Regulation des verzweigten Syntheseweges zum D,L-DAP bietet. Ob es sich hierbei tatsächlich um den Effektor D,L-DAP handelt, ließe sich eventuell durch Einsatz von DAP-haltigen Di- oder Tripeptiden verifizieren.

4.2 Funktion des verzweigten Syntheseweges zum D,L-Diaminopimelat

Die Untersuchungen zur Funktion des verzweigten Syntheseweges zum D,L-DAP zeigten eindeutig die physiologische Relevanz beider Äste. Obwohl das Ausschalten des Succinylase- (diese Arbeit) oder des Dehydrogenaseweges (Schrumpf *et al.*, 1991) jeweils einen prototrophen Phänotyp ergab, zeigten detailliertere Wachstumsstudien eine deutlich medienabhängige Präferenz für die Nutzung des einen oder anderen Weges. Durch frühere Untersuchungen war bereits bekannt, daß im Wildtyp die Nutzung der beiden Wege zum D,L-DAP ammoniumabhängig ist (Sonntag *et al.*, 1993). In der vorliegenden Arbeit konnte durch die gezielte Inaktivierung von *dapD* und *dapE* nun auch der genetische Nachweis dafür erbracht werden, daß der Dehydrogenaseweg nur bei guter Ammoniumverfügbarkeit ausreicht, um Wachstum von *C. glutamicum* zu gewährleisten. In Komplexmedium mit hohem Kohlenstoffangebot stellen Mutanten mit Block im Succinyldiaminopimelatweg in dem Moment das Wachstum ein, in dem die Ammoniumkonzentration unter einen kritischen Wert von 0,5 mM absinkt (B. Philipp, persönl. Mitteilung). Während der Wildtyp flexibel auf diese Limitation durch Nutzung organischer Stickstoff (N)-Quellen reagieren kann, reicht der alleinige Besitz der Dehydrogenase für weiteres Wachstum nicht aus,

da freies Ammonium als CoSubstrat benötigt wird. Wahrscheinlich ist ein rein kinetischer Effekt, aufgrund der geringen Affinität (K_m = 36 mM) der Dehydrogenase für Ammonium (Misono *et al.*, 1986), für die starke Ammoniumabhängigkeit verantwortlich. Experimente auf Mineralsalzmedium mit organischer N-Quelle verdeutlichten diesen Effekt. Hier zeigten die Mutanten ohne Succinyldiaminopimelatweg zunächst kein Wachstum. Auch für *Bacillus sphaericus*, der nur den Dehydrogenaseweg für die DAP-Synthese besitzt, wird Wachstum auf Glutamin, nicht aber auf Glutamat als einziger N-Quelle berichtet (White, 1983). Nach zweitägiger Latenzphase konnten jedoch auch die *C. glutamicum*-Mutanten wachsen. Dieses Phänomen des Wachstums von Mutanten, die nur die ammoniumabhängige Dehydrogenase für die Bildung der essentiellen Metabolite D,L-DAP und L-Lysin besitzen, in einem ammoniumfreien Medium, kann unterschiedliche Erklärungen haben. Zum Einen könnte das hoch affine Ammoniumaufnahmesystem in *C. glutamicum* (Siewe, 1995) bereits geringe Ammoniumkonzentrationen, die durch Bakterienlyse freiwerden, nutzen und intern akkumulieren. Damit übereinstimmend konnte vor dem Wachstumsbeginn nach zwei Tagen regelmäßig eine sinkende OD beobachtet werden, während die vorherige Zugabe von nur 1mM $(NH_4)_2SO_4$ sofort zu einer Wachstumsrestauration führt (vgl. Abb.19). Denkbar ist jedoch auch eine langsame Erhöhung der internen Ammoniumkonzentration durch Desaminierung des Glutamats durch die Glutamatdehydrogenase (GDH). Interessanterweise wird die GDH in *C. glutamicum* im Gegensatz zu *E. coli* (Varricchio, 1969) nicht durch Glutamat reprimiert (Börmann *et al.*, 1992) und kann bei hohen Glutamatkonzentrationen *in vitro* auch die Bildung von 2-Oxoglutarat katalysieren (E. Börmann-El-Kholy, persönl. Mitteilung). Das Phänomen einer extrem langen Latenzphase ist auch für das Wachstum von *gltB*-Mutanten (GOGAT$^-$) von *E. coli* auf Serin beschrieben. Auch hier wird katabol gebildetes Ammonium als CoSubstrat, in diesem Fall für die anabole Glutamatdehydrogenasereaktion, diskutiert (Pahel *et al.*, 1978).

Daß auch der alleinige Besitz des kompletten Succinyldiaminopimelatweges unter Umständen nicht ausreicht, um ein optimales Wachstum zu garantieren, zeigt das schlechte Wachstum der *C. glutamicum* DAP-Dehydrogenase-Mutante auf Acetat. Da die Nutzung dieser Kohlenstoff-Quelle zu einem Kohlenstofffluß über die anaplerotischen Enzyme des Glyoxylatweges, die einer strengen regulatorischen Kontrolle unterliegen (Reinscheid *et al.*, 1994 b/c), führt, scheint dies auch Auswirkungen auf die Nutzung der Äste des verzweigten Stoffwechselweges zum D,L-DAP bzw. L-Lysin zu haben. Es liegt nahe, eine mangelhafte CoSubstrat-

Versorgung zu vermuten, da aus der Umlenkung des Kohlenstoffflusses im Zentralstoffwechsel ein stark verringerter SuccinylCoA-Pool resultieren müßte, der nur auf Kosten von ATP-Hydrolyse aus Succinat aufgefüllt werden kann. Eine weitere Möglichkeit der Beeinflussung des Succinyldiaminopimelatweges bei Wachstum auf Acetat könnte aber auch durch einen erhöhten Succinat-Pool gegeben sein, so daß eine Produkthemmung der N-Succinyldiaminopimelat-desuccinylase (DapE) durch Succinat in Betracht kommt. Dies würde eine weitere Deacylierung von N-Succinyldiaminopimelat, das in *C. glutamicum* Dehydrogenase-Mutanten cytosolisch akkumuliert (Schrumpf *et al.*, 1991), zusätzlich behindern und so zu einem wachstumslimitierenden Kohlenstofffluß führen.

Abbildung 37 zeigt schematisch den verzweigten Diaminopimelatweg. Während die optimale Nutzung des Succinylaseweges mittelbar vom Kohlenstoffangebot abhängt, ist der Dehydrogenaseweg sehr stark auf die freie Ammoniumverfügbarkeit angewiesen, d.h. die Funktion des Succinylaseweges kann nur dann vollständig übernommen werden, wenn viel Ammonium verfügbar ist, da die Affinität dieses Enzyms zu NH_4^+ recht gering ist (K_m= 36 mM; Misono *et al.*, 1986). Nur bei einem hohen Angebot an freiem Ammonium ist *C. glutamicum* nicht mehr auf den energieaufwendigeren Succinylaseweg angewiesen, sondern kann D,L-DAP mit Hilfe der Dehydrogenase bilden. Das gleichzeitige Beschreiten beider Wege *in vivo* (Sonntag *et al.*, 1993) ermöglicht, flexibel auf eine plötzliche Ammoniumlimitierung zu reagieren, wie sie z.B. durch eine schnelle Auswaschung bei Regenfällen für das unbewegliche Bodenbakterium gegeben sein könnte. Von großer Bedeutung scheint für alle Bakterien, die D,L-DAP als Peptidoglycanbaustein nutzen, ein geringer, aber konstanter Pool von D,L-DAP zu sein. In *E. coli* ist auch unter verschiedenen Wachstumsbedingungen die cytosolische D,L-DAP-Konzentration hoch genug, um eine ausreichende Substrat-Verfügbarkeit für die UDP-N-acetylmuramyl-L-Ala-γ-D-Glu-D,L-DAP-Synthase (*murE*), das in *E. coli* eine weitaus höhere Affinität zum D,L-DAP aufweist (K_m = 0,036 mM; Michaud *et al.*, 1990) als das Konkurrenzenzym, die Diaminopimelatdecarboxylase, LysA (K_m = 1,7 mM; White & Kelly, 1965), zu gewährleisten (Mengin-Lecreulx *et al.*, 1982). Während aus kinetischen Gründen der Kohlenstofffluß vorzugsweise in Richtung der Zellwandsynthese abläuft, wird durch Regulation von *lysA* auf Expressionsebene die Lysinversorgung sichergestellt (Stragier *et al.*,1983). Beide Enzyme, die UDP-N-acetylmuramyl-L-Ala-γ-D-Glu-D,L-DAP-Synthase und die Diaminopimelatdecarboxylase, konnten auch in *C. glutamicum* nachgewiesen werden (Marcel *et al.*, 1990), doch stehen, im Gegensatz zu detailierten molekular-

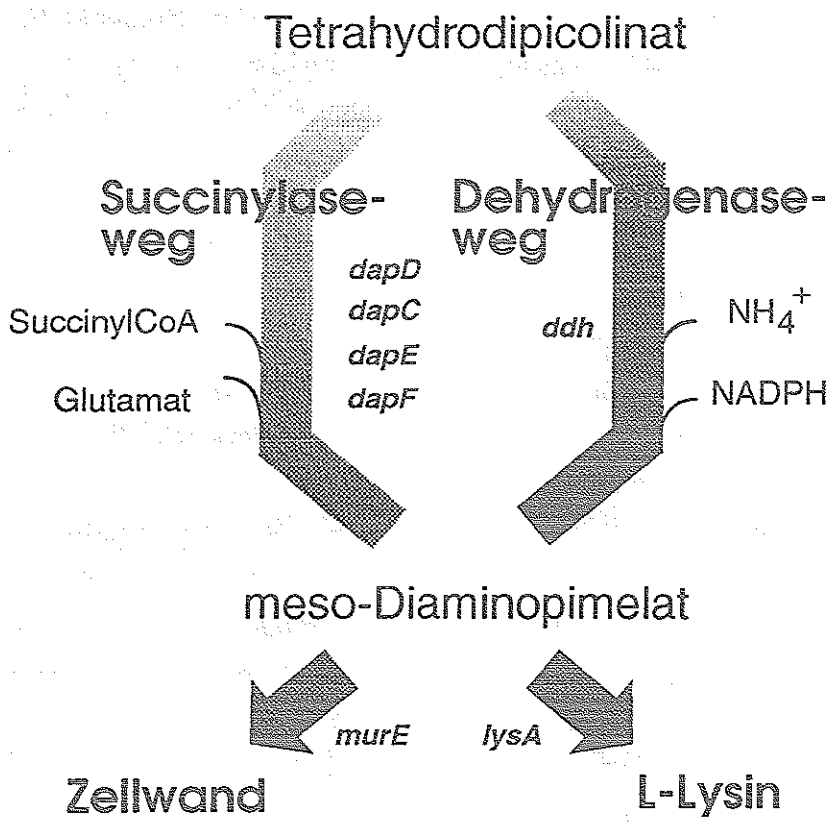


Abb. 37 Schema zum Kohlenstofffluß durch den verzweigten D,L-DAP-Weg in *C. glutamicum.* Nur bei hoher Ammoniumverfügbarkeit kann der Dehydrogenaseweg den Succinylaseweg, der für einen konstanten meso-Diaminopimelat-Pool verantwortlich ist, voll ersetzen.

biologischen Expressionstudien (Oguiza *et al.*, 1993), keine kinetische Messungen, die Rückschlüsse über die relative Affinität der Enzyme zu D,L-DAP zulassen, zur Verfügung. Eine ähnlich geringe Affinität der Decarboxlase zu D,L-DAP wie bei *E. coli*, wurde jedoch auch für andere Gram-positive Bakterien, die D,L-DAP als Zellwandbaustein nutzen, beschrieben (Rosner, 1975). Daß in *C. glutamicum* ähnliche Verhältnisse vorliegen, zeigt die Tatsache, daß es nur unter Lysinproduktionsbedingungen zu einem verstärkten Fluß über beide Wege zum L-Lysin kommen kann (vgl. Abb. 21).

Nachdem die wichtige Rolle beider Äste des verzweigten Weges bei der Anpassung an unterschiedliche Wachstumsbedingungen für *C. glutamicum* nachgewiesen werden konnte,stellte sich die Frage, welches der beiden essentiellen

Produkte dieser Biosynthese, D,L-DAP oder L-Lysin, bei suboptimalen Wachstumsbedingungen limitierend ist. Die Tatsache, daß L-Lysin nicht zur Wachstumsrestauration von *C. glutamicum* Succinylase-Mutante auf ammoniumfreien Medium führt, kann als indirekter Hinweis auf einen Mangel an dem essentiellen Zellbaustein D,L-DAP angesehen werden. Der direkte Nachweis, Wachstumsrestauration durch D,L-DAP, könnte nur mit Hilfe von DAP-haltigen Peptiden geführt werden. Diese müssen, im Gegensatz zur freien Aminosäure, aufgenommen werden, da das recycling von Peptidoglycanbausteinen eine wesentliche Rolle beim turnover der Zellwand spielt (Goodell, 1985). Experimente, die einen erleichterten Zellaufschluß bei Mutanten mit Defekt im Succinyldiaminopimelatweg zeigten, unterstützen die Hypothese, daß fehlendes D,L-DAP und nicht L-Lysinmangel zum Wachstumsstopp führen. Eine D,L-DAP-Verarmung, die höchstwahrscheinlich bei Wachstum von *C. glutamicum*-Zellen, die nur den Dehydrogenaseweg besitzen, auf Medium ohne ausreichende Ammoniumversorgung auftritt, beeinflußt also offensichtlich die Zellwandsynthese. Weil D,L-DAP, aufgrund der ε-Aminogruppe, essentiell für die Quervernetzung der Peptidoglycanstränge ist, hat dessen Mangel Auswirkung auf die Stabilität der Zellwand, so daß starke physikalische Belastungen, wie bei einer Ultraschallbehandlung, zu einem erleichterten Aufbrechen der Zellen führen. Bezeichnenderweise ist aus *E. coli* bekannt, daß bei langsamem Wachstum sowohl in der stationären Phase als auch unter osmotisch bedingtem Streß vermehrt DAP-DAP-Brücken ausgebildet werden, die dem Mureinsacculus eine zusätzliche Stabilität verleihen (Driehuis & Wouters, 1987; Pisabarro *et al.*, 1985;Glauner *et al.*, 1988). Für die den Corynebakterien nah verwandten Mycobakterien ist sogar ein ungewöhnlich hoher Anteil dieser DAP-DAP-Brücken beschrieben (Wietzerbin *et al.*, 1974). Dieser Sicherheitsmechanismus schützt die Zelle vor Deformation durch den immensen Turgor, der in Gram-positiven Bakterien über 20 bar betragen kann (Mendelson & Thwaites, 1989). Interessanterweise bildet die Succinylase-Mutante (*dapD*) auf osmotisch stabilisiertem Festmedium ungewöhnlich lange Zellformen, die teilweise an den Enden keulig aufgeschwollen sind. Dies deutet auf eine starke Beeinflußung der Regulation von Zellelongation und Zellteilung hin. Einen ähnlichen Phänotyp findet man auch bei Einsatz von niedrigen Konzentrationen von Penicillin (Schwarz & Asmus, 1969), Kultivierung mit DAP-Analoga (Chaloupka *et al.*, 1974) oder durch Überexpression von *murF*, dem Gen für das "D-Ala-D-Ala-adding enzyme" (Mengin-Lecreulx *et al.*, 1989), in *E. coli*. In allen Fällen kommt es zur Störung des Verhältnisses von UDP-N-Acetylmuramin-Pentapeptid zu UDP-N-Acetylmuramin-Tripeptid in der Zelle, was bei der

Umstellung von Längenwachstum zur Zellteilung von entscheidender Bedeutung ist (Botta & Park, 1981; Begg *et al.*, 1990). Im Gegensatz zur *C. glutamicum* Succinylase-Mutante weist die Desuccinylase-Mutante (*dapE*) unter den gleichen Bedingungen kleinere, abgerundete Zellformen auf. Es ist denkbar, daß aufgrund des starken cytosolischen Succinyl-Diaminopimelatanstaus von über 150 mM (B. Philipp, pers. Mitteilung) hier SuccDAP anstelle von D,L-DAP in die Zellwand eingebaut wird. Da die Succinylgruppe die ε-Aminogruppe des Diaminopimelat blockiert, kann es nicht zur Quervernetzung der einzelnen Peptidoglycanstränge kommen und die Zelle verliert ihre typische Zellform. Auch bei *B. subtilis* Sphäroblasten konnte ein Defekt in einem Diaminopimelatsynthesegen (*asd*) als Grund für die mangelnde Peptidoglycansynthese belegt werden. Hier wurde der Anstau des UDP-Dipeptids nachgewiesen (Ward, 1975). Demnach repräsentieren die sphäroblastenähnlichen *dapE*-Mutanten eine Extremform des Zellwanddefektes der Succinylase-Mutante (*dapD*). Unterstützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, daß bei Wachstum der Desuccinylase-Mutante auf Komplexmedium mit hohem Kohlenstoffangebot wiederholt eine im Vergleich mit der Succinylase-Mutante geringere End-OD gemessen wurde. Gleichzeitig konnte bei weiterer Inkubation eine verstärkte Zelllyse festgestellt werden, was ein deutliches Anzeichen für ein mangelndes Adaptationsvermögen der Zellwand an die stationäre Phase ist (Glauner *et al.*, 1988), und sowohl auf eine mangelnde Quervernetzung durch die zu geringe Verfügbarkeit von Peptidoglycan-Donorsträngen (Höltje, 1993) als auch auf eine Entkopplung von Peptidoglycan-Neusynthese und dem autolytischen System (Tomasz *et al.*, 1970) zurückzuführen ist.

4.3 Charakterisierung des Aufnahmesystems für aromatische Aminosäuren, AroP

Im Verlauf der Klonierung von *dapE* und *dapD* kam es wiederholt zu DNA-Umlagerungen, die letztlich auf die Nachbarschaft zu *aroP*, dem Gen für einen Carrier aromatischer Aminosäuren, zurückgeführt werden konnten (vgl. Abb. 35). AroP stellt aufgrund seiner starken Hydrophobizität, zumindest bei einer verstärkten Synthese in *E. coli*, eine potentiell toxische Komponente dar. Dies könnte, bei unkontrolliertem Einbau des Proteins in die Membran, das Membranpotential beeinflussen und damit zu einer allgemeinen Störung essentieller Transportprozesse führen (Eckert & Beck, 1989). Dieser letale Defekt tritt nicht

nur bei Überexpression des kompletten Gens, sondern auch bei plasmidcodierten großen *aroP*-Fragmenten auf. Untersuchungen mit gentechnisch veränderten *lacY*-Allelen in *E. coli* zeigten, daß auch die Deletion mehrerer transmembranhelikaler Bereiche die Insertion des Proteins in die Membran nicht beeinträchtigt (Stochaj *et al.*, 1988), was durch eine Spontaninsertion von Membranproteinen erklärbar ist ("helical hairpin hypothesis", Engelmann & Steitz, 1981). Durch Einsatz des *E. coli / C. glutamicum* - Pendelvektors pJC1, der in *E. coli* nur mit moderater Kopienzahl repliziert, konnte diese klonierungsbedingte Übersynthese von AroP umgangen werden. Abbildung 38 zeigt ein schematisches Modell der Sekundärstruktur von AroP unter Berücksichtigung der nach Eisenberg *et al.* (1984) identifizierten potentiell membranüberspannenden 12 helikalen Bereiche. Deutlich ist eine Verteilung der geladenen AS-Reste beiderseits der Membran zu erkennen, wobei gemäß der "positive-inside rule" (von Heijne, 1992) die positiv geladenen Reste bevorzugt auf der cytosolischen Seite des Transmembranproteins lokalisiert sind. Nur insgesamt 5 geladene AS-Reste befinden sich in den

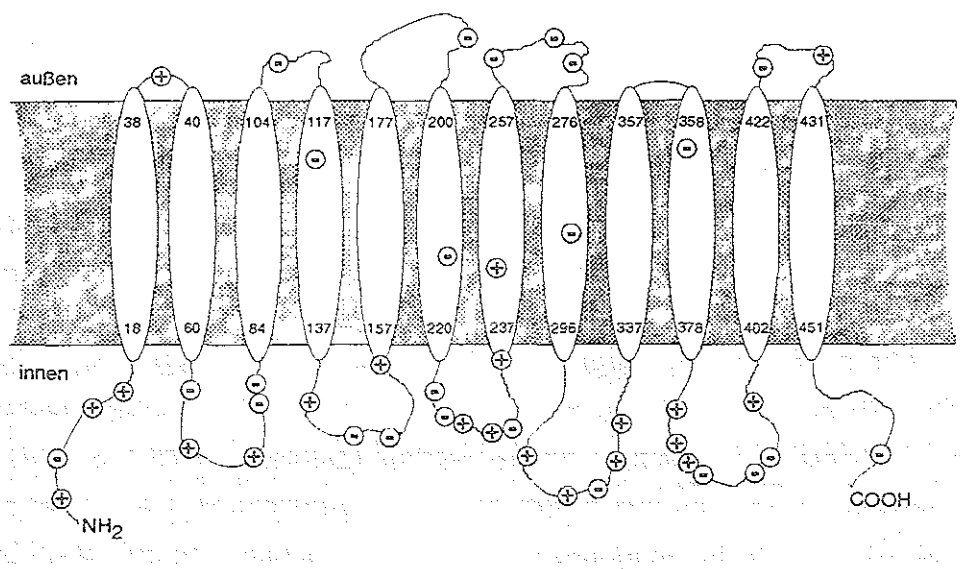


Abb. 38 Schema eines Topologiemodells für die Membraninsertion von AroP auf Basis der Lokalisation möglicher membranüberspannender Helices nach Eisenberg *et al.* (1984). Die Lage der positiv und negativ geladenen AS-Reste ist angegeben. Zahlen identifizieren die jeweils erste und letzte AS der Primärstruktur, die den einzelnen potentiellen Transmembranhelices zugeordnet werden.

transmembranhelicalen Bereichen, wobei sich die geladenen AS-Reste in Helix 6 und 7 möglicherweise neutralisieren (Traxler *et al.*, 1993) und damit eine funktionelle Kanalgeometrie garantieren könnten (Nelson & Douglas, 1993). Ein Vergleich von AroP mit den durch Datenbankrecherche ermittelten homologen Proteinen ergab (BlastP, ClustalV; Husar 3.0), daß der Anteil der geladenen AS bei den hochkonservierten Bereichen besonders hoch ist. Obwohl nur 9,5% aller AS-Reste in dem hydrophoben AroP-Polypeptid geladen sind, beträgt deren Anteil an den konservierten Aminosäuren 39%. Dies unterstreicht die wichtige Rolle der Ladungsverteilung in integralen Membranproteinen.

Überraschenderweise erwies sich weder der funktionelle Aspekt, d.h. Beteiligung am Lysintransport aufgrund der Lokalisation von *aroP* in einem Cluster mit Lysinsynthesegenen, noch der strukturelle Aspekt, d.h. große Identität der Primärstrukturen von *C. glutamicum* AroP und der GABA-Permease aus *E. coli* (40,5% identische AS), hilfreich für den Nachweis der Funktion von AroP. Nur durch einen systematischen Vergleich des Aufnahmeverhaltens verschiedener Aminosäuren durch Wildtyp, Defektmutante und Stamm mit plasmidcodiertem Gen konnte der offene Leserahmen 5 (orf5) als *aroP*-Gen identifiziert werden. Diese Vorgehensweise, d.h. experimentelle Ermittlung der Funktion eines Gens, das für ein potentielles Membranprotein codiert, ohne Einsatz von zur Komplementation geeigneter Mutanten, ist meines Wissens nach bisher beispiellos. Die Tatsache, daß die Membraninsertion von Transportproteinen strukturelle Erfordernisse verlangt, beinhaltet zwar die relativ sichere Identifizierung entsprechender codierender Regionen (Engelmann *et al.*, 1986) und die Zuordnung zu Proteinfamilien (Saier, 1994), läßt aber keine Aussage über die spezifische Funktion zu. Diese Problematik ist umso bedeutender hält man sich vor Augen, daß etwa 13% aller *E. coli* Gene an Transportprozessen beteiligt sind (Riley, 1993). Daher überrascht es nicht, daß auch für viele zu AroP aus *C. glutamicum* homologe Genprodukte bisher keine Funktion nachgewiesen werden konnte (u.a.YtfD aus *E. coli* mit 57,8% ähnlichen AS; Yifk aus *E. coli* mit 57,2% Ähnlichkeit, Daniels *et al.*, 1992; YifK aus *Salmonella typhimurium* mit 57,7% Ähnlichkeit, pironly:S27728; RocE aus *B. subtilis* mit 55,9% Ähnlichkeit; YCC5 aus *Saccharomyces cerevisiae* mit 53,6% Ähnlichkeit, embl:X59720), obwohl die Zugehörigkeit zum Cluster I der APC-Familie (Aminosäure-Polyamin-Cholin-Transporter) aufgrund der strukturellen Daten unzweifelhaft ist (Reizer *et al.*, 1993). Damit stellt AroP das erste Gram-positive Mitglied definierter Funktion dieser Transportfamilie dar.

Erste Hinweise auf eine Beteiligung des Genproduktes von orf5, AroP, am Transport von aromatischen Aminosäuren ergaben sich aus der Beobachtung, daß mit Tryptophan supplementierte Übernacht-Kulturen des *aroP*-Überexprimierers *C. glutamicum* 13032 pJC*aroP* eine starke Braunfärbung aufwiesen, die bei der *aroP*-Defektmutante *C. glutamicum* 13032 *aroP* ::pEMaroPint nicht zu erkennen war. Durch den Nachweis von Indol-3-aldehyd im Kulturüberstand war auch die funktionelle Korrelation von vermehrter Tryptophanaufnahme durch *aroP*-Überexpression und verstärkter Braunfärbung durch Akkumulation eines Tryptophan-Abbauproduktes, Indol-3-aldehyd, gegeben. Überraschenderweise ist *C. glutamicum* im Gegensatz zu *E. coli* (Tatum & Bonner, 1944; Deeley & Yanofsky, 1981) jedoch kein Indolbildner, so daß Indol-3-aldehyd offenbar nicht weiter oxidiert wird. Die Bildung von Indol-3-aldehyd ist bislang nur in der Hefe sowie in höheren Organismen nachgewiesen worden und gilt als Abbauprodukt von Indolessigsäure. Da die Indol-3-aldehyd Bildung auch als enantiomerspezifischer Abbau von D-Tryptophan beschrieben wurde (Chen *et al.*, 1974 und Referenzen darin), ist es nicht ausgeschlossen, daß der Einsatz des D-,L-Tryptophan-Gemisches zu der beobachteten Indol-3-aldehyd Akkumulation im Kultur-überstand von *C. glutamicum* 13032 pJC*aroP* führte.

Bei dem Funktionalitätsnachweis von *aroP* konnte neben den aromatischen Aminosäuren auch Histidin als mögliches Substrat identifiziert werden. Dies scheint jedoch eher die geringe Spezifität von AroP widerzuspiegeln und kann als Nebenaktivität bei hohen Substratkonzentrationen angesehen werden. Auch in *E. coli* und *S. typhimurium* wurde eine entsprechende Aktivität nachgewiesen, wobei die Affinität dieser AroP-Carrier zu Histidin 500-fach geringer ist als zu den drei aromatischen Aminosäuren (Brown, 1970; Ames & Roth, 1968). Auch wenn das plasmidcodierte *aroP* nicht für alle 3 Substrate die gleiche relative Steigerung der Transportrate bewirkte, so konnte durch Kompetitionsexperimente zweifelsfrei gezeigt werden, daß eine hohe Affinität von AroP zu allen aromatischen Aminosäuren besteht. Exemplarisch wurde der K_m für L-Tyrosin bestimmt. Mit 3,0 µM liegt er etwas höher als der entsprechende Wert in *E. coli* (0,5 µM; Brown, 1970). Die Frage, ob in *C. glutamicum*, wie in *E. coli*, weitere Aufnahmesysteme für aromatische Aminosäuren existieren, kann nicht endgültig beantwortet werden. Diese zusätzlichen Aufnahmesysteme für aromatische Aminosäuren in *E. coli* sind spezifisch für Tyrosin , TyrP (K_m = 2,2 µM), Phenylalanin, PheP (K_m = 2,0 µM) und Tryptophan, Mtr (K_m = 3,0 µM) (Brown, 1970). Darüberhinaus erfolgt der Tryptophantransport auch über das niedrig affine System TnaB (K_m = 70 µM),

das zusammen mit der Tryptophanase, TnaA, als Operon codiert vorliegt und für das Wachstum von *E. coli* auf Tryptophan als einziger C-Quelle essentiell ist (Edwards & Yudkin, 1982; Yanofsky *et al.*, 1991). Die Tatsache, daß die Identifikation der Funktion des *C. glutamicum* AroP auf einem Medium mit Casamino acids gelang (CgXIIN), deutet jedoch darauf hin, daß zumindest die Regulation der Aufnahme aromatischer Aminosäuren in beiden Organismen völlig verschieden ist, da in *E. coli* unter diesen Bedingungen *aroP* durch TyrR reprimiert wird (Whipp & Pittard, 1977; Chye & Pittard, 1987). Auf der anderen Seite kann auch eine mögliche Negativregulation von spezifischen Aufnahmesystemen für aromatische Aminosäuren in *C. glutamicum* nicht ausgeschlossen werden, da in *E. coli* sowohl die tyrosinspezifische Permease TyrP als auch die tryptophanspezifischen Permeasen Mtr und TnaB komplex reguliert werden. Während *tyrP* TyrR-vermittelt durch Tyrosin reprimiert und durch Phenylalanin induziert wird, erfolgt zusätzlich eine Expressionsstimmulation ohne TyrR-Beteiligung durch Casamino acids (Kasian *et al.*, 1984 / 1986). Das Gen für die hochaffine Tryptophan-Permease, *mtr*, wird in Anwesenheit von Tryptophan durch den Tryptophanrepressor reprimiert und durch die aromatischen Aminosäuren über TyrR induziert (Heatwole & Somerville, 1991; Sarsero *et al.*, 1991). Das Gen für das niederaffine Tryptophanaufnahmesystem, *tnaB,* dagegen ist Gegenstand der Katabolitrepression und wird durch Tryptophan induziert (Burrous & DeMoss, 1963). Einziger Hinweis auf ein eventuell weiteres, L-Tyrosin spezifisches, Transportsystem in *C. glutamicum* ist die Basisaktivität der L-Tyrosinaufnahme in der *aroP*-Defektmutante (vgl. Abb. 30). Ein entsprechendes Aufnahmesystem müßte bei sehr niedrigen Konzentrationen (0,5 µM) bereits seine maximale Transportgeschwindigkeit von 0,4 nmol mg TG^{-1} min^{-1} erreicht haben, was auf ein bindeproteinabhängiges Transportsystem hindeutet (Ames & Joshi, 1990). Bislang sind für aromatische Aminosäuren jedoch nur sekundär energetisierte Transporter beschrieben (Krämer, 1994b). Auch AroP aus *C. glutamicum* wird elektrochemisch, wahrscheinlich durch den Natriumionengradienten, energetisiert. Der Ausfall des Membranpotentials führt folgerichtig zu einem sofortigen Tyrosinaufnahmestopp. Dieser Befund widerspricht wiederum einem möglichen zweiten, primär aktiven Aufnahmesystem für L-Tyrosin in *C. glutamicum*. Die Möglichkeit, daß in *C. glutamicum*, neben AroP, keine spezifischen Permeasen an der Aufnahme aromatischer Aminosäuren beteiligt sein könnten, wäre jedoch nicht außergewöhnlich, da auch für die verzweigtkettigen Aminosäuren in *C. glutamicum* , im Gegensatz zu *E. coli* (Landick *et al.*, 1984), nur ein Transportsystem wahrscheinlich ist (Ebbighausen *et al.*, 1989).

Interessanterweise ist AroP nicht nur für die Aufnahme von aromatischen Aminosäuren verantwortlich, sondern ist auch an der Sekretion des selben Substrates beteiligt. Damit konnte erstmalig experimentell gezeigt werden, daß neben Diffusion und spezifischen Sekretionscarriern auch die spezifischen Aufnahmesysteme an der Sekretion der korrespondierenden Aminosäure beteiligt sein können. Die Verifizierung dieser "inversion hypothesis" (Krämer, 1994a), die ursprünglich für die Glutamatsekretion in *C. glutamicum* vorgeschlagen wurde (Clement *et al.*, 1984), anschließend aber funktionell und genetisch widerlegt werden konnte (Gutmann *et al.*, 1992; Kronemeyer *et al.*, 1995), ist nicht nur von mechanistischer Bedeutung, sondern könnte auch bei der mikrobiellen Produktion von L-Aminosäuren im industriellen Maßstab eine große Rolle spielen. Ikeda & Katsumata (1994) berichten ebenfalls von einem generellen Aufnahmesystem für aromatische Aminosäuren, das in *C. glutamicum* ATCC13032 die Hauptrolle bei der Aufnahme dieser Aminosäuren spielt. Dabei scheint es sich tatsächlich um AroP zu handeln, doch gelang es Ihnen nur, ein entsprechendes DNA-Fragment aus einem verwandten Stamm, *C. glutamicum* ATCC31833, zu klonieren. Die Autoren berichten über Tryptophanproduktion in einem Stamm mit defektem Aufnahmesystem und ziehen daraus den Schluß, daß die Aufnahme aromatischer Aminosäuren unabhängig von der Sekretion ist. Die vorliegenden Untersuchungen konnten jedoch, umgekehrt, klar die Beteiligung des Aufnahmesystems an der Sekretion aromatischer Aminosäuren in *C. glutamicum* zeigen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Wie in den letzten Jahren gezeigt werden konnte, wird in *Corynebacterium glutamicum* die Aminosäure L-Lysin über einen verzweigten Syntheseweg gebildet. Das Zwischenprodukt meso-Diaminopimelat wird dabei entweder über die vier enzymatischen Schritte des Succinylaseweges oder über den Dehydrogenaseweg, der allein durch das Enzym Diaminopimelatdehydrogenase repräsentiert wird, synthetisiert. Ziel dieser Arbeit war zunächst die Klonierung von Genen, die für Enzyme des Succinylaseweges codieren, um dann, mit Hilfe von definierten Mutanten mit Defekt im Succinylaseweg, die Funktion des verzweigten Syntheseweges analysieren zu können.

1. Das Gen *dapD*, das für das Enzym am Verzweigungspunkt der Diaminopimelatsynthese, die Tetrahydrodipicolinatsuccinylase codiert, und das Gen *dapE* für die N-Succinyldiaminopimelatdesuccinylase, die den dritten Schritt im Succinylaseweg katalysiert, wurden kloniert und sequenziert. Beide Gene sind zusammen mit orf3, einem offenen Leseraster unbekannter Funktion, das eine starke Ähnlichkeit zu *dapD* aufweist, chromosomal in einem 5512 bp Cluster organisiert. Ein weiteres Gen dieses Clusters codiert für ein Membranprotein.

2. Die Defektmutanten *C. glutamicum dapD* und *C. glutamicum dapE* zeigten ein limitiertes Wachstum und eine veränderte Zellmorphologie. Beide Effekte traten nur bei einem hohem Kohlenstoff-Ammonium-Verhältnis im Medium auf, und gleichzeitig zeigten diese Mutanten eine geringere Zellwandstabilität. Dies zeigt, daß der Succinylaseweg bei Ammoniumkonzentrationen < 0,5 mM benötigt wird, um genügend meso-Diaminopimelat für die Zellwandsynthese zu bilden, wogegen bei einer hohen Ammoniumverfügbarkeit der Dehydrogenaseweg dafür ausreicht.

3. Das für ein Membranprotein codierende Gen wurde kloniert und sequenziert. Durch funktionelle Charakterisierung des Genproduktes konnte das Gen *aroP* identifiziert werden, das für ein hochaffines Transportprotein (K_m für L-Tyrosin = 3,0 µM) zur Aufnahme der aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan codiert. Darüberhinaus konnte auch die durch dieses sekundäre Transportsystem vermittelte Sekretion von Tyrosin ins Medium gezeigt werden. Damit ist erstmalig *in vivo* die Beteiligung eines Aminosäure-Aufnahmesystemes am Export des spezifischen Substrates belegt.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Abbott S.D., P. Lane-Bell, K.P.S. Sidhu, and J.C. Vederas, 1994.
Synthesis and testing of heterocyclic analogues of Diaminopimelic Acid (DAP) as inhibitors of DAP dehydrogenase and DAP epimerse. J. Am. Chem. Soc., 116:6513-6520

Abe S., K.-I.Takayama, S. Kinoshita, 1967.
Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. J. Gen. Appl. Microbiol. 13, 279-301

Abiko Y., 1975.
Metabolism of Coenzyme A, in: Metabolic pathways Vol.7, Greenburg D.M. (ed.), Academic Press, Inc. New York 556

Altenbuchner J. & J. Cullum, 1984
DNA amplification and an unstable arginine gene in *Streptomyces lividans* 66. Mol. Gen. Genet. 195, 134-138

Ames G.F-L. & A. Joshi, 1990.
Energy coupling in bacterial periplasmic permeases. J. Bacteriol. 172:4133-4137

Ames G.F-L. & J.R. Roth, 1968.
Histidine and aromatic permeases of *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. 96:1742-1749

Archibald A.R., I.C. Hancock, and C.R. Harwood, 1993.
Cell wall structure, synthesis, and turnover, in: *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria", A.L. Sonenshein (ed.), American Society For Microbiology, Washington DC 576

Bayan N., S. Schrempp, G. Joliff, G. Leblon, and E. Shechter, 1993.
Role of the protonmotive force and of the state of the lipids in the in vivo Biochim. Biophys. Acta 1146:97-105

Begg K.J., A. Takasuga, D.H. Edwards, S.J. Dewar, B.G. Spratt, H. Adachi, T. Ohta, H. Matsuzawa, and W.D. Donachie, 1990
The balance between different peptidoglycan precursors determines whether *Escherichia coli* cells will elongate or divide. J Bacteriol. 172: 6697-6703

Berger E. A. & L. A. Heppel, 1972.
A binding protein involved in the transport of cystine and diaminopimelic acid in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 247:7684-7694

Berges D.A., W.E. DeWolf,Jr., G.L. Dunn, D.J. Newman, S.J. Schmidt, J.J. Taggart, and C. Gilvarg, 1986.
Studies on the Active Site of Succinyl-CoA: Tetrahydrodipicolinate N-Succinyltransferase. J. Biol. Chem. 26:6160-6167

Birnboim H.C & J. Doly J., 1979.
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. 7:1513-1523

Börmann E.R., B.J. Eikmanns, and H. Sahm, 1992.
Molecular analysis of the *Corynebacterium glutamicum gdh* gene encoding glutamate dehydrogenase. Mol Microbiol. 6:317-326

Börmann-El Kohly E.R., B.J. Eikmanns, M. Gutmann, and H. Sahm, 1993.
Glutamate dehydrogenase in not essential for glutamate formation by *Corynebacterium glutamicum*. Appl. Env. Microbiol. 59:2329-2331

Botta G.A. & J.T. Park, 1981.
Evidence for involvement of penicillin-binding protein 3 in murein synthesis during septation but not during cell elongation. J. Bacteriol. 145:333-340

Bouvier J., C. Richaud, F. Richaud, J-C. Patte, and P, Stragier, 1984.
Nucleotide sequence and expression of the *Escherichia coli dapB* gene. J. Biol. Chem. 259:14829-14834

Bouvier J., C. Richaud, W. Higgins, O. Bögler, and P. Stragier, 1992.
Cloning, characterization, and expression of the *dapE* gene of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 174:5265-5271

Boy E., C. Richaud and J-C. Patte, 1979.
Multiple regulation of DAP-decarboxylase synthesis in *Escherichia coli* K-12. FEMS Microbiol. Let. 5:287-290

Boyen A., D. Charlier, J. Charlier, V. Sakanyan, I. Mett, and N. Glansdorff, 1992
Acetylornithine deacetylase, succinyldiaminopimelate desuccinylase and carboxypeptidase G2 are evolutionarily related. Gene 116:1-6

Bröer S. & R. Krämer, 1990.
Lysine uptake and exchange in *Corynebacterium glutamicum*. J. Bacteriol. 172:7241-7248

Bröer S. & R. Krämer, 1991a.
Lysine excretion by *Corynebacterium glutamicum*, 1. Identification of a specific secretion carrier system. Eur. J. Biochem. 202:131-135

Bröer S. & R. Krämer, 1991b.
Lysine excretion by *Corynebacterium glutamicum*, 2. Energetics and mechanism of the transport system. Eur. J. Biochem. 202: 137-143

Bröer S., L. Eggeling, and R. Krämer, 1993.
Strains of *Corynebacterium glutamicum* with different lysine productivities may have different lysine excretion sytems. Appl. Env. Microbiol. 59:316-321

Brown, K.D., 1970.
Formation of aromatic amino acid pools in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 104:177-188

Burrous S.E. & R.D. DeMoss, 1963.
Studies on tryptophan permease in *Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta 73:623-637

Cappuccino J.G. & N. Sherman, 1987.
Microbiology: A laboratory manual. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Menlo Park, Cal., USA

Caruthers M.H., A.D. Barone, S.L. Beaucage, D.R. Dodds, E.F. Fisher, L.J. McBride, M. Matteucci, Z. Staninsky, and J.Y. Tang, 1985.
Chemical synthesis of deoxyoligonucleotides by the phosphoramidite method. Science 230:281

Cashel M. & K.E. Rudd, 1987.
The stringent response, in: Neidhardt (ed.); *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. American Society for Microbiology, Washington D.C., Vol 2 , 1410-1438

Chaloupka J., M. Strnadová, J. Cáslavská, and K. Veres, 1974.
Growth and cell division of *Escherichia coli* 173-25 in the presence of some analogues of diaminopimelic acid. Zeitschrift f. Allg. Mikrobio. 14:283-296

Chang A.C.Y. & S.N. Cohen, 1978.
Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. J. Bacteriol. 134:1141-1156

Chaterjee S.P., B.K. Singh, and C. Gilvarg, 1994
Biosynthesis of lysine in plants: the putative role of meso-diaminopimelate dehydrogenase. Plant Mol. Biol. 26:285-290

Chen N.-Y., S.-Q. Jiang, D.A. Klein, H. Paulus, 1993.
Organization and nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis* diaminopimelate operon, a cluster of genes encoding the first three enzymes of diaminopimelate synthesis and dipicolinate synthase. J. Biol. Chem. 268:9448-9465

Chen N.C., R.K. Gholson, and N. Raica, 1974.
Isolation and identification of indole-3-carboxaldehyde: A major new urinary metabolite of D-tryptophan. Biochim. Biophys. Acta 343:167-172

Chibata I., T. Tosa, T. Sato, and T. Mori, 1976.
Production of L-amino acids by aminoacylase adsorbed on DEAE-Sephadex. Methods Enzymol. 44:746-759

Chye M.-L. & A.J. Pittard, 1987.
Transcription control of the *aroP* gene in *Escherichia coli* K-12: analysis of operator mutants. J. Bacteriol. 169:386-393

Chye M.-L., J.R. Guest, and J. Pittard, 1986.
Cloning of the *aroP* gene and identification of its product in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 167:749-753

Clément Y., B. Escoffier, M.C. Trombe, and G. Lanéelle, 1984.
Is glutamate excreted by its uptake system in *Corynebacterium glutamicum*? A working hypothesis. J. Gen. Microbiol. 130:2589-2594

Cohen G.N., Saint-Girons I., 1987.
Biosynthesis of Threonin, Lysine, and Methionine. in: Neidhardt (ed); *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, American Society for Microbiology, Washington D.C., Vol 1 , 429-444

Cohen S.N., A.C.Y. Chang, and L. Hsu L., 1972.
Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria: Genetic Transformation of *Escherichia coli* by R-Factor DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69:2110-2114

Correia A., J.F. Martin and J.M. Castro, 1994.
Pulsed-field gel electrophoresis analysis of the genome of amino acid producing corynebacteria: chromosome sizes and diversity of restriction patterns. Microbiology 140:2841-2847

Couper L., D.J. Robins, and E.J.T. Chrystal, 1992
Synthesis of the potassium salt of 2,3,4,5-terahydrodipicolinic acid, a key intermediate in the diaminopimelate pathway to L-lysine. Tetrahydron. Lett. 33:2717-2720

Cremer J., C. Treptow, L. Eggeling, and H. Sahm, 1988,
Regulation of enzymes of lysine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. J. Gen Microbiol 134:3221-3229

Cremer J., Eggeling L., Sahm H., 1991.
Control of the lysine biosynthesis sequence in *Corynebacterium glutamicum* as analyzed by overexpression of the individual corresponding genes. Appl. Env. Microbiol. 57:1746-1752

Cremer J., L. Eggeling, and H. Sahm, 1990.
Cloning the *dapA dapB* cluster of the lysine-secreting bacterium *Corynebacterium glutamicum*. Mol Gen Genet 220:478-480

Daniels D.L., G. Plunkett III, V. Burland, and F.R. Blattner, 1992.
Analysis of the *Escherichia coli* genome: DNA sequence of the region from84.5 to 86.5 minutes. Science 257:771-778

Deeley M.C. & C. Yanofsky, 1981.
Nucleotide sequence of the structural gene for tryptophanase of *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 147:787-796

Driehuis F. & J.T.M. Wouters, 1987.
Effect of growth rate and cell shape on the peptidoglycan composition in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 169:97-101

Ebbighausen H., B. Weil, and R. Krämer, 1989.
Transport of branched-chain amino acids in *Corynebacterium glutamicum*. Arch Microbiol 151:238-244

Eckert B. & C.F. Beck, 1989.
Overproduction of transposon Tn*10*-encoded tetracycline resistence protein results in cell death and loss of membrane potential. J. Bacteriol. 171:3557-3559

Edwards R.M. & M.D. Yudkin, 1982.
Location of the gene for the low-affinity tryptophan-specific permease of *Escherichia coli*. Biochem. J. 204:617-619

Eggeling I., C. Cordes, L. Eggeling, and H. Sahm, 1987.
Regulation of acetohydroxy acid synthase in *Corynebacterium glutamicum*

during fermentation of α-ketobutyrate to L-isoleucine. Appl. Microbiol. Biotechnol. 25:346-351

Eggeling L., 1994.
Biology of L-lysine overproduction by *Corynebacterium glutamicum*. Amino Acids 6:261-272

Eikmanns B., 1992.
Identification, sequence analysis, and expression of a *Corynebacterium glutamicum* gene cluster encoding the three glycolytic enzymes glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 3-phosphoglycerate kinase, and triosephosphate isomerase. J. Bacteriol. 174:6076-6086

Eikmanns B.J., E. Kleinertz, W. Liebl, and H. Sahm, 1991.
A family of *Corynebacterium glutamicum / Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promotor probing. Gene 102:93-98

Eikmanns B.J., L. Eggeling, and H. Sahm, 1993.
Molecular aspects of lysine, threonine, and isoleucine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. Antonie van Leeuwenhoek 64:145-163

Eisenberg D., E. Schwarz, M. Komaromy, and R. Wall, 1984.
Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. J. Mol. Biol. 179:125-142

Enei H. & Y. Hirose, 1984.
Recent research on the development of microbial strains for amino-acid production. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, Vol. 2

Engelmann D.M. & T.A. Steitz, 1981.
The spontaneous insertion of proteins into and across membranes: The helical hairpin hypothesis. Cell 23:411-422

Engelmann D.M., T.A. Steitz, and A. Goldman, 1986.
Identifying nonpolar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins. Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 15:321-353

Erdmann A., B. Weil, and R. Krämer, 1993.
Lysine secretion by wild-type *Corynebacterium glutamicum* triggered by dipeptide uptake. J. Gen. Microbiol. 139:3115-3122

Feinberg A.P. & B. Vogelstein, 1983.
A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Analytical Biochemistry 132, 6-13

Gilvarg C., 1958.
The Enzymatic Synthesis of Diaminopimelic Acid. J. Biol. Chem. 233:1501-1504

Glauner B., J.-V. Höltje, and U. Schwarz, 1988.
The Composition of the Murein of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 263:10088-10095

Goodell, E.W., 1985.
Recycling of murein by *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 163:305-310

Gornall A.G., C.J. Bardawill, M.M. David, 1949.
Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J. Biol. Chem. 177:751-766

Gough J.A. & N.E. Murray, 1983.
Sequence diversity among related genes for recognition of specific targets in DNA molecules. J. Mol. Biol. 166:1-19

Grandgenett D.P. & D.P. Stahly, 1971.
Repression of diaminopimelate decarboxylase by L-lysine in different *Bacillus* species. J. Bacteriol. 105: 1211-1212

Graves L.M. & R.L. Switzer, 1990.
Aspartokinase III, a new isoenzyme in *Bacillus subtilis* 168. J. Bacteriol. 172:218-223

Grunstein & Hogness, 1975.
Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:3961-3965

Gutmann M., C. Hoischen, and R. Krämer, 1992.
Carrier-mediated glutamate secretion by *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation. Biochim. Biophys. Acta 1112:115-123

Hall B. G., S. Yokoyama, and D.H. Calhoun, 1984;
Role of cryptic genes in microbial evolution. Molec. Biol. Evol. 1:109-124

Hanahan D., 1985.
Techniques for transformation of *E. coli*. In: Glover D.M. (ed), DNA-cloning. IRL-Press, Oxford/Washington DC Vol.1, 109-135

Haynes J.A. & M.L. Britz, 1989.
Electrotransformation of *Brevibacterium lactofermentum* and *Corynebacterium glutamicum*: growth in tween 80 increases transformation frequencies.FEMS Microbiol. Let. 61:329-334

Haynes J.A. & M.L. Britz, 1990.
The effect of growth conditions of *Corynebacterium glutamicum* on the transformation frequency obtained by electroporation. J. Gen. Microbiol. 136:255-263

Haziza C., M. Cassan, and J.-C. Patte, 1982.
Identification of the promotor of the *asd* gene of *Escherichia coli* using in vivo fusion with the *lac* operon. Biochimie 64:227-230

Heatwole V.M. & R.L. Somerville. 1991.
The tryptophan-specific permease gene, *mtr*, is differentially regulated by the tryptophan and tyrosine repressors in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 173:3601-3604

Henikoff S., 1984.
Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. Gene 28: 351-359

Higgins D.G. & P.M. Sharp, 1988.
CLUSTAL: a package for performing multiple sequence allignment on a microcomputer. Gene 73:237-244

Higgins W., C. Tardif, C. Richaud, M.A. Krivanek, and A. Cardin, 1989.
Expression of recombinant diaminopimelate epimerase in *Escherichia coli*. Eur. J. Biochem. 186:137-143

Hoheisel J. & F.M. Pohl, 1986.
Simplified preparation of unidirectional deletion clones. Nucl. Acids Res. 14

Hoheisel J.D., 1993.
On the activities of *Escherichia coli* exonuclease III. Analyt. Biochem. 209:38-246

Hohn B., J. Collins, 1980.
A small cosmid for efficient cloning of large DNA fragments. Gene 11, 291-298

Höltje J.-V., 1993
"Three for one" - A simple growth mechanism that guarantees a precise copy of the thin, rod-shaped murein sacculus of *Escherichia coli*. In: de Pedro *et al.* (eds.), Bacterial growth and lysis. Plenum Press, New York, 419-426

Ikeda M. & R. Katsumata, 1994.
Transport of aromatic amino acids and its influence on overproduction of the amino acids in *Corynebacterium glutamicum*. Journal of Fermentation and Bioengineering 78:420-425

Ishino S., K. Yamaguchi, K. Shirahata, and K. Araki, 1984.
Involvement of meso-diaminopimelate D-dehydrogenase in lysine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. Agr. Biol. Chem. 48:2557-2560

Ishino S., T. Mizukami, K. Yamaguchi, R. Katsumata, and K. Araki K, 1988.
Cloning and sequencing of the meso-diaminopimelate-D-dehydrogenase (*ddh*) Gene of *Corynebacterium glutamicum*. Agr. Biol. Chem. 52:2903-2909

Jäger W., A. Schäfer, A. Pühler, G. Labes, and W. Wohlleben, 1992.
Expression of the *Bacillus subtilis sacB* gene leads to sucrose sensitivity in the Gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* but not in *Streptomyces lividans*. J. Bacteriol. 174:5462-5465

Jones B.N. & J.P. Gilligan, 1983.
o-phthaldialdehyde precolumn derivatization and reversed-phase high performance liquid chromatography of polypeptide hydrolysates and physiological fluids. J. Chromatography 266:471-482

Kalinowski J., B. Bachmann, G. Thierbach, A. Pühler,1990.
Aspartokinase genes lysCα and lysCß overlap and are adjacent to the aspartate ß-semialdehyde dehydrogenase gene *asd* in *Corynebacterium glutamicum*. Mol. Gen. Genet. 224:317-324

Kaiman M., D.G. Gentry, and M. Cashel, 1991
Characterization of the *Escherichia coli* K12 *gltS* glutamate permease gene. Mol. Gen. Genet. 225:379-386

Kasian P.A. & J. Pittard, 1984.
Construction of a *tyrP-lac* operon fusion strain and its use in the isolation and analysis of mutants derepressed for *tyrP* expression. J. Bacteriol. 160:175-183

Kasian P.A., B.E. Davidson, and J. Pittard, 1986.
Molecular analysis of the promotor operator region of the *Escherichia coli* K-12 *tyrP* gene. J. Bacteriol. 167:556-561

Keddie R.M. & G.L. Cure, 1977.
The cell wall composition and distribution of free mycolic acids in named strains of coryneform bacteria and in isolates from various natural sources. J. Appl. Bacteriol. 42:229-252

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

Kelland J.G., L.D. Arnold, M.M. Palic, M.A. Pickard, and J.C. Vederas, 1986.
Analogs of diaminopimelate decarboxylase from *Bacillus sphaericus* and wheat germ. J. Biol. Chem. 261:13216-13223

Kieslich, K. 1976.
Microbial Transformation of non-steroid cyclic compounds. Georg Thieme Publishers, Stuttgart

Kindler S.H. & C. Gilvarg, 1960.
N-succinyl-L-α,ε-diaminopimelic acid deacylase. J. Biol. Chem. 235:3532-3535

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

Klingenberg M. & E. Pfaff, 1967.
Means of terminating reactions. Methods in Enzymology, Vol X:680-684

Koch A. L. & S. Woeste, 1992.
Elasticity of the Sacculus of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 174:4811-4819

Koch A.L., 1988,
Biophysics of Bacterial Walls Viewed as Stress-Bearing Fabric. Microbiol. Rev. 52:337-353

Koch A.L., M.L. Higgins, and R.J. Doyle, 1981,
Surface tension-like forces determine bacterial shape: *Streptococcus faecium*. J. Gen. Microbiol. 123:151-161

Komagata K., K. Yamada, and H. Ogawa, 1969.
Taxonomic studies on coryneform bacteria. I. Division of bacterial cells. J. Gen. Appl. Microbiol. 15:243-259

Krämer R., 1994a.
Systems and mechanisms of amino acid uptake and excretion in prokaryotes. Arch. Microbiol. 162:1-13

Krämer, R., 1994b.
Secretion of amino acids by bacteria: Physiology and mechanism. FEMS Microbiol. Rev. 13: 75-94

Kronemeyer W., 1994.
Corynebacterium glutamicum: Untersuchungen zum Lysinexport und Isolierung der Gene des Glutamatimports - einem Bindeprotein-abhängigen Transportsystem. Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Kronemeyer W., N. Peekhaus, R. Krämer, H. Sahm, and L. Eggeling, 1995.
Structure of the *gluABCD* cluster encoding the glutamate uptake system of *Corynebacterium glutamicum*. J. Bacteriol. 177:1152-1158

Krueger & Osterburg, 1983.
Comp. Prog. in Biomed. 16:68-69

Kyte J. & R.F. Doolittle, 1982.
A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J. Mol. Biol. 157:105-132

Labischinski H., E.W. Goodell, A. Goodell, and M.L. Hochberg, 1991.
Direct proof of a "more-than-single-layered" peptidoglycan architecture of *Escherichia coli* W7: a neutron small-angle scattering study. J. Bacteriol. 173:751-756

Labischinski H., M. Hochberg, T. Sidow, H. Maidhof, U. Henze, B. Berger-Bächi, and J. Wecke, 1993.
Biophysical and biochemical studies on the fine structure of the sacculi from *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. In: de Pedro *et al.* (eds.), Bacterial growth and lysis. Plenum Press, New York, 9-21595

Laemmli U.K., 1970.
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685

Landick R., D.L. Oxender, and G.F.-L. Ames, 1984.
Bacterial amino acid transport systems. In: Martonosi A. (ed.), The enzymes of biological membranes. Plenum Publ. Comp., New York, 577-615

Leive L. & B.D. Davis
The transport of diaminopimelate and cystine in Escherichia coli. J. Biol. Chem. 240:4362-4369

Le Roux P., G. Auger, J. van Heijenoort, and D. Blanot, 1992.
Synthesis of new peptide inhibitors of the meso-diaminopimelate-adding enzyme. Eur. J. Med. Chem. 27:899-907

Li W.H., 1984.
Retention of cryptic genes in microbial populations. Mol. Biol. Evol. 1:213-219

Liebl W., A. Bayerl, B. Schein, U. Stillner, K.H. Schleifer, 1989.
High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells. FEMS Microbiol. Letters 65:299-304

Liebl W., M. Ehrmann, W. Ludwig, K.H. Schleifer, 1991.
Transfer of *Brevibacterium divaricatum* DSM 20297^T, "*Brevibacterium flavum*"

DSM 20411, "*Brevibacterium lactofermentum*" DSM 20412 and DSM 1412, and *Corynebacterium lilium* DSM 20137T to *Corynebacterium glutamicum* and their distinction by rRNA gene restriction patterns. Internat. J. Syst. Bacteriol. 41:255-260

Lin Y., R. Myhrmann, M.L. Schrag, and M. H. Gelb, 1988.
Bacterial N-succinyl-L-diaminopimelic acid desuccinylase. J. Biol. Chem. 263:1622-1627

Lindroth P. & K. Mopper, 1979.
High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthaldialdehyde. Analytical Chemistry 51:1667-1674

Lipman D.J. & W.R. Pearson, 1985.
Rapid and sensitive protein similarity searches. Science 227:1435-1441

Lipscomb, W. N., 1973.
Enzymatic activities of carboxypeptidase A´s in solution and in crystals. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70:3797-3801

Lüthi E., H. Baur, M. Gamper, F. Brunner, D. Villeval, A. Mercenier, and D. Haas, 1990.
The *arc* operon for anaerobic arginine catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* contains an additional gene, *arcD*, encoding a membrane protein. Gene 87: 37-43

Luker K.E., J.L. Collier, E.W. Kolodziej, G.R. Marshall, and W.E. Goldman, 1993.
Bordetella pertussis tracheal cytotoxin and other muramyl peptides: Distinct structure-activity relationships for respiratory epithelial cytopathology. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2365-2369

Marcel T., Archer J.A.C., D. Mengin-Lecreulx, and Sinskey A.J., 1990,
Nucleotide squence and organization of the upstream region of the *Corynebacterium glutamicum lysA* gene. Mol Microbiol 4:1819-1830

Mendelson N.H. & J.J. Thwaites, 1989.
Cell wall mechanical properties as measured with bacterial thread made from *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 171:1055-1062

Meng S.-H., & G.N. Bennett, 1992.
Nucleotide sequence of the *Escherichia coli cad* operon: a system for neutralization of low extracellular pH. J. Bacteriol. 174: 2659-2669

Mengin-Lecreulx D., B. Flouret, and J. van Heijenoort, 1982,
Cytoplasmic steps of peptidoglycan synthesis in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 151:1109-1117

Mengin-Lecreulx D., C. Michaud, C. Richaud, D. Blanot, and J. van Heijenoort, 1988.
Incorporation of LL-diaminopimelic acid into peptidoglycan of *Escherichia coli* mutants lacking diaminopimelate epimerase encoded by *dapF*. J. Bacteriol. 170:2031-2039

Mengin-Lecreulx, C. Parquet, L.R. Desviat, J. Plá, B. Flouret, J.A. Ayala, and J. van Heijenoort, 1989,
Organization of the *murE-murG* region of *Escherichia coli*: Identification of the *murD* gene encoding the D-glutamic acid-adding enzyme. J. Bacteriol. 171:6126-6134

Mengin-Lecreulx D., D. Blanot, and J. van Heijenoort, 1994.
Replacement of diaminopimelic acid by cystathionine or lanthionine in the peptidoglycan of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 176:4321-4327

Menkel E., G. Thierbach, L. Eggeling, H. Sahm, 1989.
Influence of increased aspartate availability on lysine formation by a recombinant strain of *Corynebacterium glutamicum* and utilization of fumarate. Appl. Env. Microbiol. 55:684-688

Metzer E. & Y.S. Halpern, 1990.
In vivo cloning and characterization of the *gabCTDP* gene cluster of *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 172:3250-3256

Michaud C., D. Blanot, B. Flouret , and J. van Heijenoort, 1990.
Overproduction, purification and properties of the uridine-diphosphate-N-acetylmuramyl-L-alananyl-D-glutamate : meso-diaminopimelate ligase from *Escherichia coli*. Eur. J. Biochem. 194:853-861

Minton, N., T. Atkinson, C. Bruton, and R. Sherwood, 1984.
The complete nucleotide sequence of the *Pseudomonas* gene coding for carboxypeptidase G2. Gene 31:31-38

Misono H., H. Togawa, T. Yamamoto, and K. Soda, 1976.
Occurence of meso-α,ε-diaminopimelate dehydrogenase in *Bacillus spaericus*. Biochem. Biophys. Res. Com. 72: 89-93

Misono H., T. Hitoshi, Y. Tatsuo, K. Soda, 1979.
Meso-α,ε-diaminopimelate D-dehydrogenase: Distribution and the reaction product. J. Bacteriol. 137: 22-27

Misono H., M. Ogasawara, S. Nagasaki, 1986.
Characterization of meso-diaminopimelate dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum* and its distribution in bacteria. Agr. Biol. Chem. 50:2729-2734

Mitta M., H. Onogi, A. Yamamoto, I. Kato, F. Sakiyama, S. Tsunasawa, 1992.
J. Biochem. 112:737-742

Miyajima R. & I. Shiio, 1971.
Regulation of aspartate family amino acid biosynthesis in *Brevibacterium flavum*; Part IV. Repression of the enzymes in threonine biosynthesis. Agr. Biol. Chem. 35:424-430

Miyajima R., S.-I. Otsuka, and I. Shiio, 1968.
Regulation of aspartate family amino acids of the enzymes in threonine biosynthesis. J. Biochem. 63:139-148

Möckel B., L. Eggeling, and H. Sahm, 1992.
Functional and structural analyses of threonine dehydratase from *Corynebacterium glutamicum*. J. Bacteriol. 174:8065-8072

Morakkabati, S., 1994.
Identifizierung des aromatischen Aminosäuretransportsystems aus *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit Fachhochschule Aachen/Jülich.

Moran C.P., N. Lang, S.F.J. LeGrice, G. Lee, M. Stephens, A.L. Sonenshein, J. Pero, and R. Losick, 1982.
Nucleotide sequences that signal the initiation of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. Mol. Gen. Genet. 186:339-346

Nakano K., C.Takase, T. Sakamoto, S. Nakagawa, S. Inazawa, S. Ohta, and S. Matuda, 1994,
Isolation, characterization and structural organization of the gene and pseudogene for the dihydrolipoamide succinyltransferase component of the human 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. Eur. J. Biochem. 224:179-189

Nakayama, K., 1985.
Lysine. In Comprehensive Biotechnology, vol.3, Moo-Young (ed). Oxford : Pergamon Press

Needleman & Wunsch, 1970.
A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. J. Mol. Biol. 48:895-903

Nelson D.R. & M.G. Douglas, 1993.
Function-based mapping of the yeast mitochondrial ADP/ATP translocator by selection for second site revertants. J. Mol. Biol. 230:1171-1182

Niegemann E., A. Schulz, and K. Bartsch, 1993.
Molecular organization of the *Escherichia coli gab* cluster: nucleotide sequence of the structural genes *gabD* and *gabP* and expression of the GABA permease gene. Arch. Microbiol. 160:454-460

Nikaido H. & M.H. Saier, Jr., 1992.
Transport proteins in bacteria: commom themes in their design. Science 258:936-942

Oguiza J.A., M. Malumbres, G. Eriani, A. Pisabarro, L.M. Mateos, F. Martin, and J.F. Martin, 1993.
A gene encoding arginyl-tRNA synthetase is located in the upstream region of the *lysA* gene in *Brevibacterium lactofermentum*: regulation of *argS-lysA* cluster expression by arginine. J. Bacteriol. 175:7356-7362

Pahel G., A.D. Zelenetz, and B.M. Tyler, 1978.
gltB gene and regulation of nitrogen metabolism by glutamine synthetase in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 133:139-148

Parker, L.L. & B.G. Hall, 1990,
Characterization and nucleotide sequence of the cryptic *cel* operon of *Escherichia coli* K12. Genetics 124:455-471

Pátek M., K. Krumbach, L. Eggeling, and H. Sahm, 1994.
Leucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: enzyme activities, structure of *leuA*, and effect of *leuA* inactivation on lysine synthesis. Appl. Environ Microbiol. 60:133-140

Patte J-C.,1983.
Diaminopimelate and lysine.In: Herrmann K.M. & R.L. Somerville (eds); Amino Acids: Biosynthesis and genetic regulation. Addison-Wesley Publishing Co., Inc., Reading, Mass., 213-228

Peters-Wendisch P.G., B.J. Eikmanns, G. Thierbach, B. Bachmann, and H. Sahm, 1993.
Phosphoenolpyruvate carboxylase in *Corynebacterium glutamicum* is dispensable for growth and lysine production. FEMS Microbiol. Let. 112:269-274

Pi J., P.J. Wookey, and J. Pittard, 1991
Cloning and sequencing of the *pheP* gene, which encodes the phenylalanine-specific transport system of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 173:3622-3629

Pisabarro A.G., M.A. de Pedro, and D. Vázquez, 1985.
Structural modifications in the peptidoglyan of *Escherichia coli* associated with changes in the state of growth of the culture. J. Bacteriol. 161:238-242

Rao J.K.M. & P. Argos, 1986.
A conformational preference parameter to predict helices in integral membrane proteins. Biochim. Biophys. Acta 869:197-214

Reinscheid D.J., W. Kronemeyer, L. Eggeling, B.J. Eikmanns, and H. Sahm, 1994a.
Stable expression of *hom-1-thrB* in *Corynebacterium glutamicum* and its effect on the carbon flux to threonine and related amino acids. Appl. Environ. Microbiol. 60:126-132

Reinscheid D.J., B.J. Eikmanns, and H. Sahm, 1994b.
Characterization of the isocitrate lyase gene from *Corynebacterium glutamicum* and biochemical analysis of the enzyme. J. Bacteriol. 176:3474-3483

Reinscheid D.J., B.J. Eikmanns, and H. Sahm, 1994c.
Malate synthase from *Corynebacterium glutamicum*: sequence analysis of the gene and biochemical characterization of the enzyme. Microbiology 140:3099-3108

Reizer J., K. Finley, D. Kakuda, C.L. MacLeod, A. Reizer, and M.H. Saier, Jr., 1993.
Mammalian integral membrane receptors are homologous to facilitators and antiporters of yeast, fungi, and eubacteria. Prot. Sci. 2:20-30

Rhuland L.E., 1957.
Role of α,ε-diaminopimelic acid in the cellular integrity of *Escherichia coli*. Biochem. J. 67:416-421

Richaud C., F. Richaud, C. Martin, C. Haziza, and J.-C. Patte, 1984.
Regulation of expression and nucleotide sequence of the *Escherichia coli dapD* gene. J. Biol. Chem. 259:14824-14828

Richaud F., N.H. Phuc, M. Cassan, and J.-C- Patte, 1980.
Regulation of aspartokinase III in *Escherichia coli*: isolation of mutants containing *lysC-lac* fusions. J. Bacteriol. 143:513-515

Richaud F., C. Richaud, C. Haziza, and J.-C. Patte, 1981.
Isolement et purification de gènes d'*Escherichia coli* K 12 impliqués dans la boisynthèse de la lysine. Comptes Rendus De L'Academie de Sciences Serie III 293 (9), 507-512

Richaud F., C. Richaud, P. Ratet, and J.-C. Patte, 1986.
Chromosoml location and nucleotide sequence of the *Escherichia coli dapA* gene. J. Bacteriol. 166:297-300

Riddles P.W., R.L. Blakeley, and B. Zerner, 1979.
Ellman's reagent: 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic Acid) - a reexamination. Analytical Biochemistry 94, 75-81

Riley M., 1993.
Functions of the gene products of *Escherichia coli*. Microbiol. Rev. 57:862-952

Riley, M. & N. Glansdorf, 1984,
Cloning the *Escherichia coli argD* gene specifying acetylornithine δ-transaminase. Gene 24:341-345

Rosner A., 1975.
Control of lysine biosynthesis in *Bacillus subtilis*: inhibition of diaminopimelate decarboxylase by lysine. J. Bacteriol. 121:20-28

Rottenberg, H., 1979.
The measurement of membrane potential and pH in cells, organelles, and vesicles. Methods in Enzymology 55:547-569

Sahm H., L. Eggeling, B. Eikmanns, and R. Krämer, 1995
Metabolic design in amino acid producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. FEMS Microbiol. Rev. 16:243-252

Saier, Jr. M.H., 1994.
Computer-aided analyses of transport protein sequences: gleaning evidence concerning function, structure, biogenesis, and evolution. Microbiol. Rev. 58:71-93

Sakanyan V., L. Desmarez, C. Legrain, D. Charlier, I. Mett, A. Kochikyan, A. Savchenko, A. Boyen, P. Falmagne, A. Pierard, and N. Glanddorff, 1993.
Gene cloning, sequence analysis, purification, and characterization of a thermostable aminoacylase from *Bacillus stearothermophilus*. Appl. Environ. Microbiol. 59:3878-3888

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

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

Saqib K.M., S.M. Hay, and W.D. Rees, 1994.
The expression of *Escherichia coli* diaminopimelate decarboxylase in mouse 3T3 cells. Biocim. Biophys. Acta 1219:398-404

Sarsero, J.P., P.J. Wookey, P. Gollnick, C. Yanofsky, and A.J. Pittard, 1991.
A new family of integral membrane proteins involved in transport of aromatic amino acids in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 173:3231-3234

Sarsero, J.P., P.J. Wookey, and A.J. Pittard, 1991.
Regulation of expression of the *Escherichia coli mtr* gene by TyrR protein and Trp repressor. J. Bacteriol. 173:4133-4143

Schäfer A., J. Kalinowski, R. Simon, A.-H. Seep-Feldhaus, A. Pühler, 1990.
High-frequency conjugal plasmid transfer from Gram-negative *Escherichia coli* to various Gram-positive coryneform bacteria. J. Bacteriol. 172:1663-1666

Schäfer A., A. Tauch, W. Jäger, J. Kalinowski, G. Thierbach, and A. Pühler, 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

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

Schrumpf B., A. Schwarzer., J. Kalinowski, A. Pühler, L. Eggeling, and H. Sahm, 1991.
A functionally split pathway for lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. J. Bacteriol. 173:4510-4516

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

Schwarz U. & A. Asmus, 1969.
Autolytic enzymes and cell division of *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 41:419-429

Schwarz U. & W. Leutgeb, 1971.
Morphogenetic aspects of murein structure and biosynthesis. J. Bacteriol. 106:588-595

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

Sharp P.M. & K.J Mitchell, 1993.
Corynebacterium glutamicum arginyl-tRNA synthetase. Mol. Microbiol. 8:200

Shaul O. & G. Galili, 1992.
Increased lysine synthesis in tobacco plants that express high levels of

bacterial dihydrodipicolinate synthase in their chloroplasts. Plant J. 2 :203-209

Shaul O. & G. Galili, 1993.
Concerted regulation of lysine and threonine synthesis in tobacco plants expressing bacterial feedback-insensitive aspartate kinase and dihydrodipicolinate synthase. Plant Mol. Biol. 23:759-768

Shiio I. & R. Miyajima, 1969.
Concerted inhibition and its reversal by end products of aspartate kinase in *Brevibacterium flavum*. J. Biochem. 65:849-859

Siewe R., 1995.
Funktion und Regulation von Aufnahmesystemen für stickstoffhaltige Substrate bei *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Simms S.A., W.H. Voige, C. Gilvarg, 1984.
Purification and characterization of succinyl-CoA: tetrahydrodipicolinate N-succinyltransferase from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem.259:2734-2741

Simon R., U. Priefer, and A. Pühler, 1983.
A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. Bio/Technologie 11:784-791

Smith & Waterman, 1981.
Advances in Applied Mathematics 2:482-489

Sonntag K., L. Eggeling, A.A. de Graaf, and H. Sahm, 1993.
Flux partitioning in the split pathway of lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. Eur. J. Biochem. 213:1325-1331

Southern E.M., 1975.
Detection of specific sequences among DNA fragments separarted by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98:503-517

Steffes C., J. Ellis, J. Wu, and B. Rosen, 1992.
The *lysP* gene encodes the lysine-specific permease. J. Bacteriol. 174:3242-3249

Stochaj U., H.-J. Fritz, C. Heibach, M. Markgraf, A. von Schaewen, U. Sonnewald, and R. Ehring, 1988.
Truncated forms of *Escherichia coli* lactose permease: models for study of biosynthesis and membrane insertion. J. Bacteriol. 170:2639-2645

Stouthammer A.H. & S.A.L.M. Kooijman, 1993.
Why it pays for bacteria to delete disused DNA and to maintain megaplasmids. Antonie van Leeuwenhoek 63:39-43

Stragier P., F. Richaud, F. Borne, and J.C. Patte, 1983.
Regulation of diaminopimelate dcarboxylase synthesis in *E. coli*: I. Identification of a *lysR* gene encoding an activator of the *lysA* gene. J. Mol. Biol. 168: 307-320

Sundharadas G. & C. Gilvarg, 1967.
Biosynthesis of α,ε-diaminopimelic acid in *Bacillus megaterium*. J. Biol. Chem. 212:3983-3984

Tabor S. & C.C. Richardson, 1985.
A bacteriophage T7 RNA polymerase / promotor system for controlled exclusive expression of specific genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:1074-1078

Tatum E.L. & D. Bonner, 1944.
Indole and serine in the biosynthesis and breakdown of tryptophane. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 30:30-37

Thierbach G., J. Kalinowski, B. Bachmann, and A. Pühler, 1990.
Cloning of a DNA fragment from *Corynebacterium glutamicum* confering aminoethyl cysteine resistence and feedback resistence to aspartokinase. Appl. Microbiol. Biotechnol. 32:443-448

Tomasz A., A. Albino, and E. Zanati, 1970.
Multiple antibiotic resistance in a bacterium with supressed autolytic system. Nature 227:138-140

Traxler B., D. Boyd, and J. Beckwith, 1993.
The topological analysis of integral cytoplasmic membrane proteins. J. Membrane Biol. 132:1-11

Treptow C., 1989.
Untersuchungen zur Regulation der meso-Diaminopimelat-Decarboxylase und der meso-Diaminopimelat-Dehydrogenase des Aminosäure-produzierenden Bakteriums *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Vaara M., 1992.
Eight bacterial proteins, including UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase (LpxA) and three other transferases of *Escherichia coli*, consist of a six-residue periodicity theme. FEMS Microbiol. Lett. 97:249-254

van Asche I., M. Soroka, A. Haemers, M. Hopper, D. Blanot, and J. van Heijenoort, 1991.
Synthesis and antibacterial evaluation of phosphonic acid analogues of diaminopimelic acid. Eur. J. Med. Chem. 26:505-515

Verhoogt H.C.J., H. Smit, T. Abee, M. Gamper, A.J.M. Driessen, D. Haas, and W.N. Konings, 1992.
arcD, the first gene of the *arc* operon for anaerobic arginine catabolism in *Pseudomonas aeruginosa*, encodes an arginine-ornithine exchanger. J. Bacteriol. 174:1568-1573

von Heijne G., 1992.
Membrane protein structure prediction. J. Mol. Biol. 225:487-494

Vrljic M., W. Kronemeyer, L. Eggeling, and H. Sahm, 1995.
Disbalance of L-lysine flux in *Corynebacterium glutamicum* and its use for the isolation of excretion-defective mutants. J. Bacteriol. zur Veröffentlichung eingereicht.

Ward J.B., 1975.
Peptidoglycan synthesis in L-phase variants of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 124:668-678

Watson N., D.S. Dunyak, E.L. Rosey, J.L. Slonczewski, and E.R. Olson, 1992.
Identification of elements involved in transcriptional regulation of the *Escherichia coli cad* operon by external pH. J. Bacteriol. 174:530-540

Wehrmann A., 1991.
Klonierung von Genen des Succinyldiaminopimelatweges aus *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit Justus-Liebig-Universität Gießen

Wehrmann A., L.Eggeling, and H. Sahm, 1994.
Analysis of different DNA fragments of *Corynebacterium glutamicum* complementing *dapE* of *Escherichia coli*. Microbiology, 140:3349-3356

Weinberger S. & C. Gilvarg, 1970.
Bacterial distribution of the use of succinyl and acetyl blocking groups in diaminopimelic acid biosynthesis. J. Bacteriol. 101:323-324

White P.J., and B. Kelly, 1965.
Purification and properties of diaminopimelate decarboxylase from *Escherichia coli*. Biochem. J. 265:75-84

White P.J., 1983.
The essential role of diaminopimelate dehydrogenase in the biosynthesis of lysine by *Bacillus sphaericus*. J. Gen. Microbiol. 129:739-749

Wietzerbin J., B.C. Das, J.-F. Petit, E. Lederer, M. Leyh-Bouille, and J.-M. Ghuysen, 1973.
Occurence of D-alanyl-(D)-meso-diaminopimelic acid and meso-diaminopimelyl-meso-diaminopimelic acid interpeptide linkages in the peptidoglycan of mycobacteria. Biochemistry 13:3471-3476

Williams R.M. & C. Yuan, 1992.
Asymmetric synthesis of 2,6-diaminopimelic acids. J. Org. Chem. 57:6519-6527

Whipp M.J. & A.J. Pittard, 1977.
Regulation of aromatic amino acid transport systems in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 132:453-461

Wookey P.J., J. Pittard, S.M. Forrest, and B.E. Davidson, 1984.
Cloning of the *tyrP* gene and further characterization of the tyrosine-specific transport system in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 160:169-174

Work E., 1949.
Biochim. Biophys. Acta 3:400

Yamada K. & K. Komagata, 1970.
Taxonomic studies on coryneform bacteria. II. Principal amino acids in the cell wall and their taxonomic significance. J. Gen. Appl. Microbiol. 16:103-113

Yanisch-Perron C., J. Vieira, and J. Messing,1985.
Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene 33:103-119

Yanofsky C., V. Horn, and P. Gollnick, 1991.
Physiological studies of tryptophan transport and tryptophanase operon induction in *Escherichia coli.* J. Bacteriol. 173:6009-6017

Yeh P., A.M. Sicard, and A.J. Sinskey, 1988a.
General organization of the genes specifically involved in the diaminopimelate-lysine biosynthetic pathway of *Corynebacterium glutamicum.* Mol. Gen. Genet. 212:105-111

Yeh P., A.M. Sicard, and A.J. Sinskey, 1988b.
Nucleotide sequence of the *lysA* gene of *Corynebacterium glutamicum* and possible mechanisms for modulation of its expression. Mol. Gen. Genet. 212:112-119

Yoshinaga F. & S. Nakamori, 1983.
Production of amino acids. In: Herrmann K.M. & R.L. Somerville (eds); Amino Acids: Biosynthesis and genetic regulation. Addison-Wesley Publishing Co., Inc., Reading, Mass., 405-429

Zhang J.-J. & H. Paulus, 1990.
Desensitization of *Bacillus subtilis* aspartokinase I to allosteric inhibition by meso-diaminopimelate allows aspartokinase I to function in amino acid biosynthesis during exponentiell growth. J. Bacteriol. 172:4690-4693

Zhang J.-J., F.-M. Hu, N.-Y. Chen, and H. Paulus, 1990.
Comparison of the three aspartokinase isoenzymes in *Bacillus subtilis* Marburg and 168. J. Bacteriol. 172:701-708

7. ANHANG

Nachfolgend sind die Restriktionskarten von ausgewählten, in dieser Arbeit konstruierten Plasmiden aufgeführt.

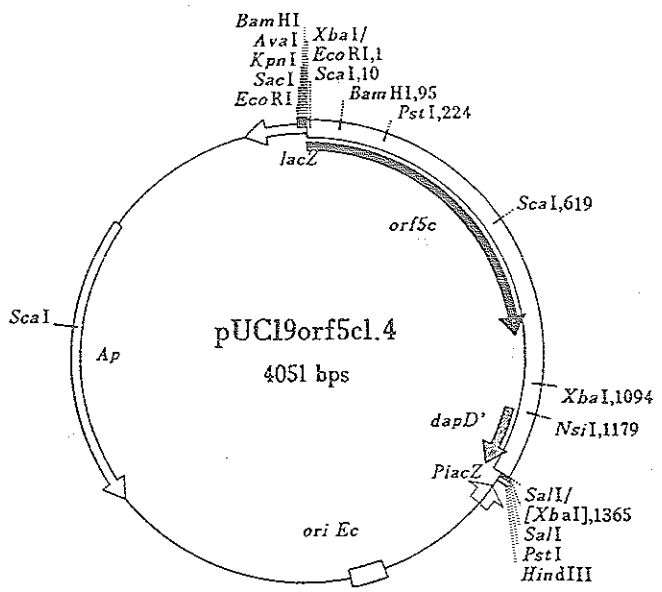


Abb. 39 Plasmid pUC19orf5c1,4 (1365 bp *Sal*I-*Eco*RI-Fragment im Vektor pUC19). Dargestellt ist die Orientierung B. Die Insertion liegt in dieser Orientierung auch im Vektor pUC18 sowie im Pendelvektor pJC1 vor.

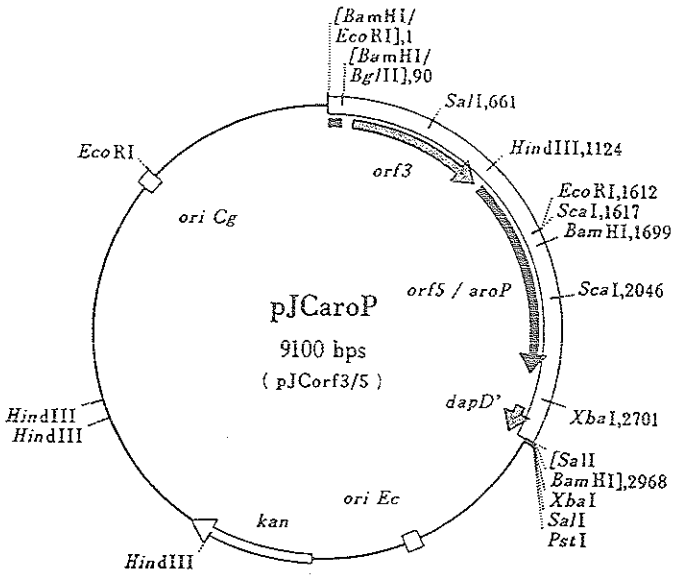


Abb.40 Plasmid pJC*aroP* (2968 bp Insertion mit fusioniertem orf5 im Vektor pJC1)

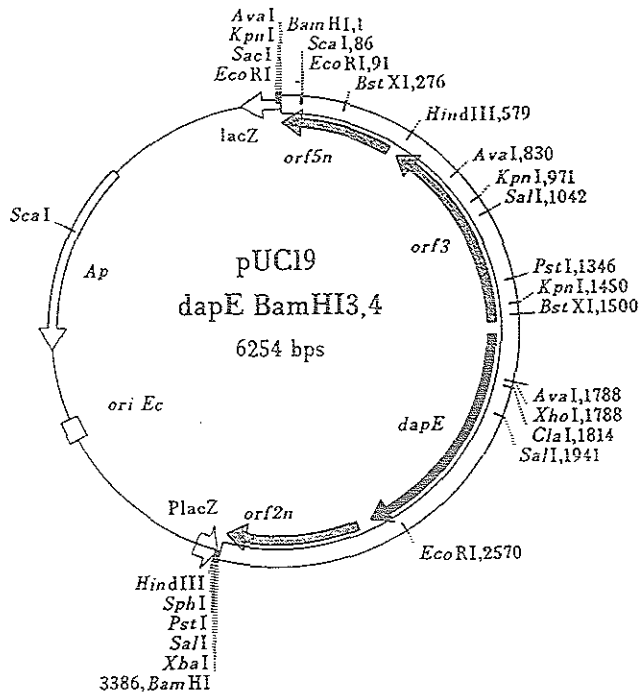


Abb. 41 Plasmid pUC19 *dapE BamHI*3.4 (3386 bp *BamHI*-Fragment im Vektor pUC19). Dargestellt ist die Orientierung A. Die Insertion liegt sowohl in diesem Vektor als auch im Pendelvektor pJC1 in beiden Orientierungen vor.

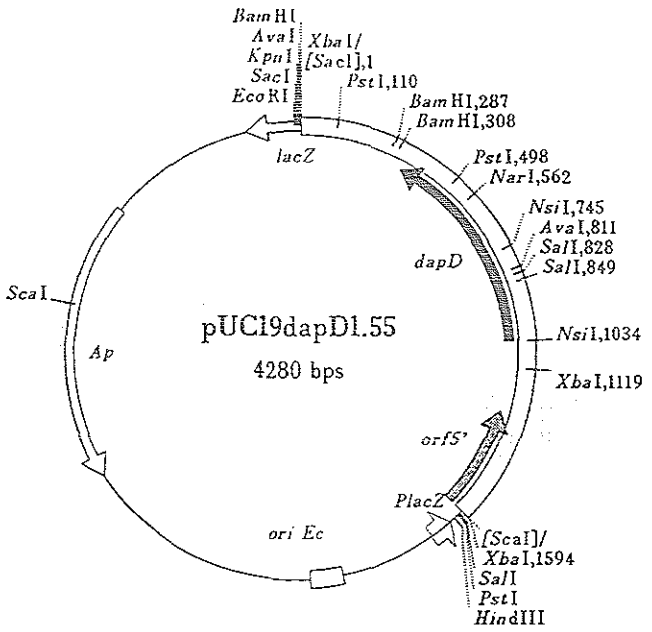


Abb. 40 Plasmid pUC19*dapD*1,55 (1594 bp *SacI*-*ScaI*-Fragment im Vektor pUC19). Dargestellt ist die Orientierung A. Die Insertion liegt sowohl in diesem Vektor als auch im Pendelvektor pJC1 in beiden Orientierungen vor.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie 1 des Forschungszentrums Jülich durchgeführt. Die Finanzierung erfolgte mit Mitteln des Bundesministeriums für Forschung und Technologie und der Degussa AG, Hanau.

Herrn Prof. Dr. H. Sahm danke ich für die Überlassung des Themas, seine großzügige Unterstützung und sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit. Für die freundliche Übernahme des Korreferates danke ich Herrn Prof. Dr. M. von Ciriacy-Wantrup.

Mein besonderer Dank für Rat und Tat gilt Lothar und den anderen Eggelings: Bettina, Bodo, Carmen, Fr. Cichorius, Jupp, Kai, Karin, Marina, Schirin, Steffi, Susanne, Uwe und Wolfgang.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Krämer, Achim, Andreas, Bernd, Dieter, Elke, Georg, Herrn de Graaf, Jörch, Klaus, Marc, Marcella, Markus, Michi, Mike, Mirek, Nobbi, Peter, Petra, Ruth und Volker für die Gespräche außerhalb des Labors bedanken.

Zum Schluß mein herzlicher Dank an Ina, Tim und meine Eltern, die mich während des gesamten Studiums unterstützt haben.

FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH

KFA

Jül-3088
Juli 1995
ISSN 0944-2952