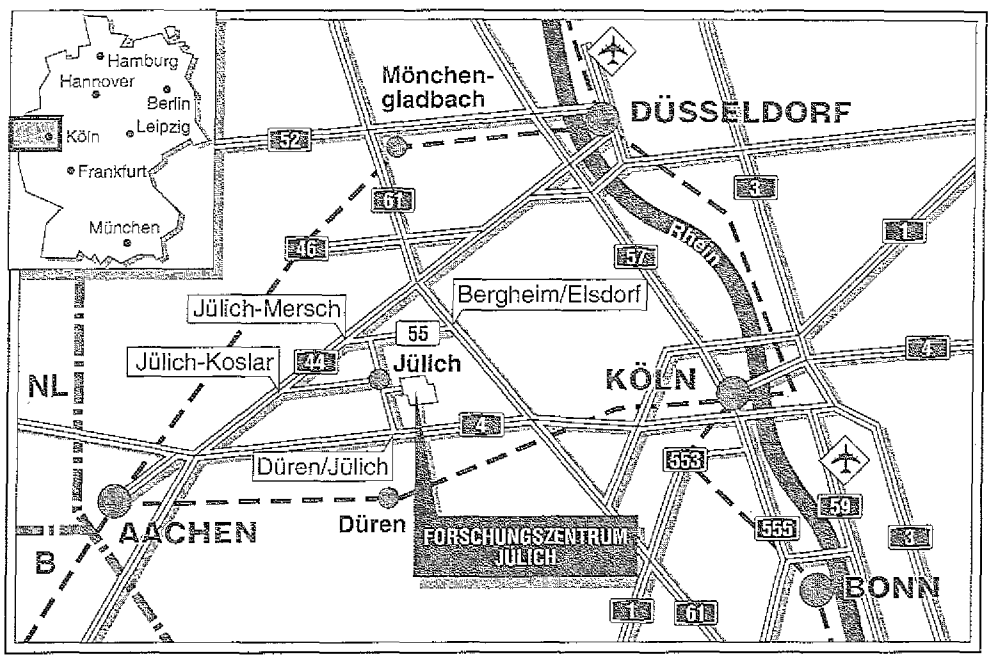
FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH KFA

Institut für Biotechnologie

Entwicklung eines Xylose verwertenden *Zymomonas mobilis* Stammes durch Expression der aus *Klebsiella pneumoniae* KAY2026 klonierten und charakterisierten Gene für Xyloseisomerase und Xylulokinase und des Transketolase-Gens aus *Escherichia coli* K12

Sigrun Feldmann



Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 2544
ISSN 0366-0885
Institut für Biotechnologie Jül-2544
D 61 (Diss. Universität Düsseldorf)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
Postfach 1913 · D-5170 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
Telefon: 02461/61-6102 · Telefax: 02461/61-6103 · Telex: 833556-70 kfa d

Entwicklung eines Xylose verwertenden *Zymomonas mobilis* Stammes durch Expression der aus *Klebsiella pneumoniae* KAY2026 klonierten und charakterisierten Gene für Xyloseisomerase und Xylulokinase und des Transketolase-Gens aus *Escherichia coli* K12

Sigrun Feldmann

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungen

I. Einleitung 1

II. Material und Methoden 8

1. Chemikalien und Enzyme 8

2. Bakterienstämme und Plasmide 9

3. Nährmedien und Kulturbedingungen 13

4. Bestimmung des Bakterienwachstums 16

5. Genetische Methoden 16

5.1. Transformation von *E.coli* 16
5.2. Filterkreuzung von *E.coli* und *Z.mobilis* 17
5.3. Plasmidstabilitätstest 17
5.4. Transposonmutagenese 18
5.5. UV-Mutagenese 18

6. Präparation und Reinigung von Nukleinsäuren 19

6.1. Isolierung chromosomaler DNA 19
6.2. Plasmidisolierung im großen Maßstab 19
6.3. Plasmidschnellisolierung aus *E.coli* und *Z.mobilis* 20
6.4. Isolierung von Gesamt-RNA aus *E.coli* und *K.pneumoniae* 21
6.5. Photometrische Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen 22

7. Techniken zur Rekombination und Analyse von DNA 22

7.1. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen .. 22
7.2. Agarose-Gelelektrophorese 23
7.3. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .. 23
7.4. Verkürzung enzymatisch gespaltener DNA mit Exonuklease III 24
7.5. Behandlung überhängender DNA-Enden mit Klenow-Polymerase 24
7.6. Ligation restringierter DNA-Moleküle 25
7.7. DNA-Sequenzierung nach Sanger 25
7.8. DNA-Markierung mit Digoxigenin-dUTP 27

7.9. DNA-DNA Hybridisierung 27
7.9.1. DNA-DNA Hybridisierung nach Southern 27
7.9.2. Koloniehybridisierung 28
7.10. In vitro Verpackung von DNA in infektiöse Partikel des Phagen λ 28

8. Techniken zur Analyse von RNA 29

8.1. RNA-Markierung mit Digoxigenin-UTP 29
8.2. RNA-Markierung mit α^{35}S-CTP 30
8.3. RNA-RNA Hybridisierung 30
8.4. Bestimmung von Transkriptionsstartpunkten 31

9. Bestimmung von Enzymaktivitäten und ATP im Rohextrakt 31

9.1. Herstellung von zellfreien Rohextrakten 31
9.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen 32
9.3. Proteinbestimmung 32
9.4. Testansätze 32
9.5. ATP-Bestimmung 37

10. Bestimmung interner Zucker- und Zuckerphosphat-konzentrationen mit Hilfe der Silikonölzentrifugation 37

10.1. Silikonölzentrifugation 37
10.2. Nachweis von Aldosen und Ketosen mittels Borat-Komplex-Chromatographie mit Anionenaustauscher . 38
10.3. Nachweis von Zuckeralkoholen 39

11. Umsatz von ^{14}C-[U]-Xylose 40

III. Ergebnisse 42

1. Klonierung und molekularbiologische Charakterisierung des Xylose- Operons aus *K. pneumoniae* KAY 2026 42

1.1. Herstellung einer Cosmid-Genbank aus *K.pneumoniae* KAY 2026 und Isolierung der Xylose-Gene 42
1.2. Restriktionskartierung der Xylose-Gene auf dem Plasmid pZY190 und Transposonmutagenese der Plasmide pZY190 und pZY240 45
1.3. Expression der verschiedenen Konstrukte in *E.coli* Stämmen 50
1.4. Sequenzanalyse des Xylose-Operons aus *K.pneumoniae* KAY 2026 52
1.5. Charakterisierung des Xylose-Operons auf Transkriptionsebene 60

1.6. Untersuchung des *in trans* vermittelten Xylose-negativen Phänotyps 62
1.6.1. Entfernung des Promotors der Xylose-Gene und Rekonstitution des Operons 65

2. Untersuchungen zur Expression der Xyloseisomerase und Xylulokinase in *Z.mobilis* 73

2.1. Konstruktion von Vektoren für die Expression der Xylose-Gene in *Z.mobilis* 73
2.2. Expression der Xylose-Gene in *Z.mobilis* und Charakterisierung der xyl^+ rekombinanten Stämme. 81
2.3. Isolierung Xylose-resistenter, rekombinanter *Z.mobilis* Stämme 89
2.4. Untersuchung der Enzyme des nicht oxidativen Pentose-Phosphat-Weges in *Z.mobilis* 92

3. Einführung des Transketolase-Gens aus *E.coli* in die $xylAB^+$- rekombinanten *Z.mobilis* Stämme 96

3.1. Klonierung der Transketolase-Gens in das Plasmid pZY225-XR4 96
3.2. Charakterisierung tkt^+ $xylAB^+$ - rekombinanter *Z.mobilis* Stämme 98

IV. Diskussion 102

V. Zusammenfassung 115

VI. Literaturhinweise 117

Abkürzungen

ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Ap	Ampicillin
Aqua bidest.	Doppelt destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
bla	β-Lactamasegen
cat	Chloramphenicol-Acetyl-Transferase-Gen
Cm	Chloramphenicol
CRP	cAMP receptor protein
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
d	Tag
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde
IAA	Isoamylalkohol
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
M	Molarität
max	maximal
min	Minute
m-RNA	Messenger-RNA
nm	Wellenlänge
OD_{600}	optische Dichte bei 600 nm
ori (V, T)	Replikationsursprung (vegetativer, Transfer)
RNA	Ribonukleinsäure
Upm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde
tet	Tetracyclinresistenz-Gen
Tn	Transposon
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
TTP	Thymidin-5'-triphosphat
U	unit, Enzymeinheit
UTP	Uridin-5'-triphosphat
UV	Ultraviolett
w/v	weight per volume = Gewichts-%
*xyl*A	Gen für die Xyloseisomerase
*xyl*B	Gen für die Xylulokinase
tkt	Gen für die Transketolase

I. Einleitung

Während traditionell für die mikrobielle Ethanolproduktion aus nachwachsenden, zuckerhaltigen Rohstoffen die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt wird, gewinnt das gram-negative, anaerobe Bakterium *Zymomonas mobilis* seit einiger Zeit zunehmendes Interesse (ROGERS ET AL., 1982; BRINGER ET AL., 1984). Das zu Beginn dieses Jahrhunderts aus gärendem Agavensaft isolierte Bakterium *Z. mobilis* (LINDNER, 1928) ist in den tropischen Teilen Amerikas, Asiens und Afrikas an der Erzeugung alkoholischer Getränke aus Pflanzensäften beteiligt (SWINGS UND DE LEY, 1977). *Z.mobilis* metabolisiert Substrate im Gegensatz zur Hefe nicht über den EMBDEN-MEYERHOFF-PARNAS-Weg sondern über den ENTNER-DOUDOROFF-Weg, (ENTNER UND DOUDOROFF, 1952; GIBBS UND DE MOSS,1951; KERSTERS UND DE LEY, 1968), der pro Mol umgesetzte Glukose nur 1 Mol ATP liefert.

Die Ethanolproduktion mit *Z.mobilis* ist im Vergleich zur Hefe aus folgenden Gründen effizienter. Zum einen ist die Ethanolausbeute von 95% wegen der geringeren Biomassebildung um 5% gesteigert, zum anderen ist die spezifische Ethanolbildungsrate aufgrund des schnelleren Stofftransports in das kleinere Bakterium und der höheren Wachstumsgeschwindigkeit, 6-7 fach erhöht (BUCHHOLZ ET AL., 1987). Die Prozessführung ist einfacher als bei Hefen, da *Z.mobilis* keinen Sauerstoff benötigt, (EVELEIGH ET AL., 1983). Auch die Toleranz des Bakteriums gegen pH- Werte von 3,5-7,5 , gegen Zukkerkonzentrationen von bis zu 40% Glukose und Alkoholkonzentrationen von bis zu 13%, sind im Hinblick auf eine industrielle Anwendung günstig.

Da das Substratspektrum von *Z.mobilis* auf Glukose, Fruktose und Saccharose begrenzt ist, sind zahlreiche, bisher ungenutzte Rohstoffe, wie z.B. Pentosen, als Ausgangsstoffe für Fermentationen ausgeschlossen, (SAHM, 1979), die eine großtechnische Anwendung von *Z.mobilis* für die Alkoholgewinnung noch interessanter machten.

Es ist daher erstrebenswert, das Substratspektrum dieses Bakteriums mit Hilfe gentechnischer Methoden, durch die Expression heterologer Gene für neue Stoffwechselwege, z.B. auf die Pentose, Xylose, zu erweitern.

Xylose gehört als Bestandteil der Hemicellulosen, die 25-40% der pflanzlichen Biomasse ausmachen, zu den weitest verbreiteten Kohlenhydraten in der Natur, (SAHM, 1979). Die Pentose bildet in den Xylanen die Hauptketten, bestehend aus etwa 200 β-1,4-glykosidisch verknüpften Einheiten, an die verschiedene Zuckerseitenketten gebunden sein können, (SAHM,1979). Xylane fallen in großen Mengen als land- und forstwirtschaftliche Rückstände, wie Stroh und Holz an, (GONG ET AL., 1981). Inzwischen gibt es verschiedene, umweltfreundliche Methoden, z.B."ORGANOCELL"- und "ASAM"-Verfahren, die eine schonende Isolierung dieser Polymere ermöglichen, (KIRK UND ERIKSSON,1990). Darüberhinaus liegt Xylose zu bis zu 4% in den Sulfitablaugen der Zellstoffindustrie vor, die zur Zeit noch als Abfallprodukt verbrannt wird, (BIELY, 1985).

Bislang wurde kein Organismus gefunden, der Xylose genauso effizient wie Glukose zu Ethanol vergären kann. Viele Bakterien verwerten Xylose zwar gut, produzieren jedoch in einer Gemischten Säuregärung neben Ethanol eine Reihe unerwünschter Nebenprodukte und verfügen nur über eine geringe Ethanoltoleranz, (ROSENBERG, 1980). Durch gentechnische Veränderung von z.B. *Escherichia coli* oder *Klebsiella planticola*, gelang es die Bildung der Nebenprodukte zu reduzieren und Ethanolausbeuten von 85-90% zu erzielen (ALTHERTUM ET AL.,1989;CONWAY ET AL.,1989; FELDMANN ET AL.,1989), jedoch zeigten die Stämme nur geringe Ethanoltoleranz.

Hefen sind ebenfalls in der Lage Xylose zu metabolisieren, jedoch erfolgt der Xylose- Abbau bei der Mehrzahl der Stämme nur aerob. Geringer anaerober Umsatz von Xylose zu Ethanol wurde bei wenigen Arten von *Pachysolen tannophilus*, *Candida tropicalis*, *Candida shehatae*, und *Pichia stipitis* (JEFFRIES, 1983) gefunden. Bei diesen Hefen scheint die Umwandlung von Xylose zu Xylulose von Sauerstoff unabhängig zu sein. Jedoch findet unter anaeroben Bedingungen zwar Alkoholproduktion, aber kein Zellwachstum statt (DU PREEZ ET AL., 1986).

Das Hauptproblem der Xylosefermentation bei Hefen, liegt vermutlich in der Umwandlung von Xylose zu Xylulose,(BRUINENBERG ET AL, 1983). Hefen isomerisieren Xylose nicht wie Bakterien direkt zu Xylulose, sondern reduzieren Xylose zunächst mit einer Xylose-Reduktase zu Xylitol und oxidieren anschließend mit einer Xylitol-Dehydrogenase zu Xylulose. Aufgrund der häufig unterschiedlichen Coenzymabhängigkeiten der beiden Enzyme (NADPH bzw.NAD^+) und dem Fehlen einer Transhydrogenase kommt es unter anaeroben Bedingungen in vielen Hefen zu einem Redoxungleichgewicht und zur Bildung von Xylitol, (BRUINENBERG ET AL.,1983).
In den letzten Jahren wurden gentechnische Methoden zur Konstruktion eines Xylose fermentierenden *Saccharomyces cerevisiae* Stammes eingesetzt. Um die mit der zweistufigen Umsetzung von Xylose zu Xylulose verbundenen Schwierigkeiten zu umgehen, war eine direkte Isomerisierung der Xylose zu Xylulose durch Einführung des bakteriellen Xyloseisomerase-Gens angestrebt, (HO ET AL., 1983; WILHELM UND HOLLENBERG, 1984; SARTHY ET AL., 1987; AMORE ET AL., 1989). Die Xyloseisomerase-Gene aus *Escherichia coli*, (SARTHY ET AL.,1987), *Bacillus subtilis*,(WILHELM UND HOLLENBERG,1984; AMORE ET AL.,1989) und *Actinoplanes missouriensis*, (AMORE ET AL., 1989) ließen sich in *S.cerevisiae* zwar unter Kontrolle von Hefepromotoren exprimieren, jedoch war das Translationsprodukt inaktiv. Weitere Ansätze beschäftigten sich mit der Etablierung der Gene für Xylose-Reduktase und Xylitol-Dehydrogenase aus *Pichia stipitis* (AMORE, Dissertation Düsseldorf,1990; KÖTTER, Dissertation Düsseldorf, 1991) in einer *S.cerevisiae* Mutante, die Xylulose anaerob fermentierte. Die Expression der beiden Gene führte zur Verwertung von Xylose und zum Zellwachstum, jedoch nur in Gegenwart von Sauerstoff. Damit ist bislang noch keine für die Alkoholproduktion geeignete, Xylose vergärende Hefe vorhanden.

In den letzten Jahren wurde von einigen Arbeitsgruppen versucht, mit molekulargenetischen Ansätzen das Substratspektrum von *Z.mobilis* zu erweitern. Durch Einführung des Transposons Tn951, welches das gesamte Laktose Operons trug, auf dem mobilisierbaren Vektor RP1::Tn951, gelang erstmals die Expression heterologer, katabolischer Gene in *Z.mobilis*, (CAREY ET AL., 1983; GOODMAN ET AL., 1984). Die Verwertung von Laktose war aber aufgrund sehr niedriger β-Galaktosidase- und Laktose-Permease Aktivitäten minimal und ermöglichte den rekombinanten Stämmen kein Wachstum auf

Laktose als Kohlenstoff- und Energiequelle. Durch Expression des Laktose-Operons unter Kontrolle eines *Zymomonas*-eigenen Promotors konnten die Enzymaktivitäten erhöht werden, (YANASE ET AL, 1988), jedoch führte erst die gleichzeitige Einbringung von *gal*-Operon (*gal* EKT) und *lac*-Operon unter Kontrolle eines *Zymomonas*-eigenen Promotors nach chemischer Mutagenese zu minimalem Wachstum der Rekombinanten mit Laktose (BUCHHOLZ ET AL., 1989). Die Verwertung der Laktose, schien durch Instabilitäten der Plasmide sowie ineffizienter Aufnahme des Disaccharids limitiert zu sein. Auch der Erfolg einen Cellobiose vergärenden *Z.mobilis* Stamm mit einer β-Glukosidase aus *Xanthomonas albilineans* zu konstruieren, war durch die schlechte Aufnahme des Disaccharids begrenzt, (SU ET AL., 1989). Es gelang bislang nicht, das Substratspektrum durch Einführung des α-Amylase Gens aus *Klebsiella oxytoca* (WALKER UND PEMBERTON, 1988), bzw. *Bacillus licheniformis* (BRESTIC GOACHET ET AL., 1990) auf Stärke zu erweitern. Um die Bildung von Ethanol aus Cellulose mit rekombinanten *Z.mobilis* Stämmen zu erreichen, wurden Versuche mit dem Cellulase-Gen aus *Cellulomonas uda* CB4 (MISAWA ET AL., 1988), aus *Erwinia chrysanthemi* (BRESTIC GOACHET ET AL.,1989), dem Endoglukanase-Gen (*eglX*) aus *Pseudomonas fluorescens* var.*cellulosa* (LEJEUNE ET AL., 1988) und dem β-Glukosidase-Gen aus *Klebsiella oxytoca* (WALKER UND PEMBERTON, 1988), bzw. *Ruminococcus albus* (MISAWA UND NAKAMURA, 1989) unternommen. Die heterologen Gene ließen sich in *Z.mobilis* exprimieren, teilweise auch unter Kontrolle des gen-eigenen Promotors,jedoch dienten die Substrate in keinem Falle als Kohlenstoff- und Energiequelle. Problematisch erwies sich häufig die Sekretion der rekombinanten Exoenzyme in *Z.mobilis*. Demzufolge waren die Enzyme teilweise intrazellulär oder im Periplasma zu finden, (BRESTIC GOACHET ET AL., 1989).

Auch erste Versuche zur Konstruktion eines Xylose-vergärenden *Z.mobilis* Stammes mit dem Xylose-Operon aus *Xanthomonas sp.* (LIU ET AL., 1988), führte nicht zum Wachstum auf Xylose. Jedoch erfüllt das Substrat Xylose eine entscheidende Voraussetzung für einen effizienten Umsatz, nämlich die Aufnahme des Substrates in die Zelle. *Z.mobilis* nimmt Xylose gut über das energieunabhängige Glukose-Transportsystem auf, (DI MARCO UND ROMANO, 1985; T.STRUCH,persönliche Mitteilung), das auf Proteinsequenzebene erhebliche Homologie zu einem *E.coli* Xylose-Transportsystem aufweist, (BARNELL ET AL., 1990).

Voraussetzung für den katabolen Stoffwechsel von Xylose in Bakterien sind die Enzyme Xyloseisomerase und Xylulokinase, kodiert durch die Gene xylA und xylB, die in allen untersuchten Xylose verwertenden Bakterien benachbart vorlagen.
In *Bacillus subtilis* lag eine negative Regulation durch einen Repressor vor, (GÄRTNER ET AL., 1988), in Enterobakterien, wie *E. coli* (DAVID UND WIESMEYER,1970), *Klebsiella oxytoca*, (WILSON UND MORTLOCK,1973) oder *Salmonella typhimurium* (SHAMANNA UND SANDERSON, 1979) wurde eine positive Regulation mit Xylose als Induktor und der Aktivität eines cAMP/CRP-Komplexes gefunden, (DAVID UND WIESMEYER, 1970; POSTMA UND LENGELER, 1985).

Das Gen für die Xyloseisomerase, die Xylose zu Xylulose isomerisiert, wurde aus zahlreichen Bakterien kloniert und sequenziert, wie *Actinoplanes missouriensis*, (AMORE ET AL.,1989), *Ampulariella sp.*, (SAARI ET AL.,1987), *Bacillus subtilis*, (WILHELM UND HOLLENBERG, 1985), verschiedenen *Clostridium*-Stämmen, (LEE ET AL., 1990; DEKKER ET AL.,1991), *Escherichia coli* K12, (BRIGGS ET AL., 1984; LAWLIS ET AL.,1984; SCHELLENBERG ET AL.,1984), *Staphylococcus xylosus*, (SIZEMORE ET AL., in press) und verschiedenen *Streptomyces* Stämmen, (DROCOURT ET AL.,1988). Mit Hilfe von Röntgenstrukturanalysen wurde der Mechanismus der Xyloseisomerasen weitgehend aufgeklärt, (CARREL ET AL.,1989; COLLYER ET AL.,1990).

Die Xylulokinase katalysiert die Phosphorylierung der Xylulose. Über Struktur und Mechanismus dieses Enzym ist zur Zeit noch nichts bekannt. Partielle oder vollständige DNA-Sequenzen wurden für *Ampulariella* sp., (SAARI ET AL.,1987); *Escherichia coli* K12, (LAWLIS ET AL.,1984), und *Staphylococcus xylosus*, (SIZEMORE ET AL.,im Druck) beschrieben.

Zur Einschleusung von Xylulose-5-Phosphat in den Zentralstoffwechsel sind die in Bakterien konstitutiv vorliegenden Enzyme des nicht oxidativen Pentose-Phosphat-Weges erforderlich, (HOREKKER,1962) die C5-Zucker-Phosphate in C3-und C6-Zucker-Phosphate umsetzen. In Abb.I.1. ist der Xyloseabbau über diese Reaktionen schematisch dargestellt.

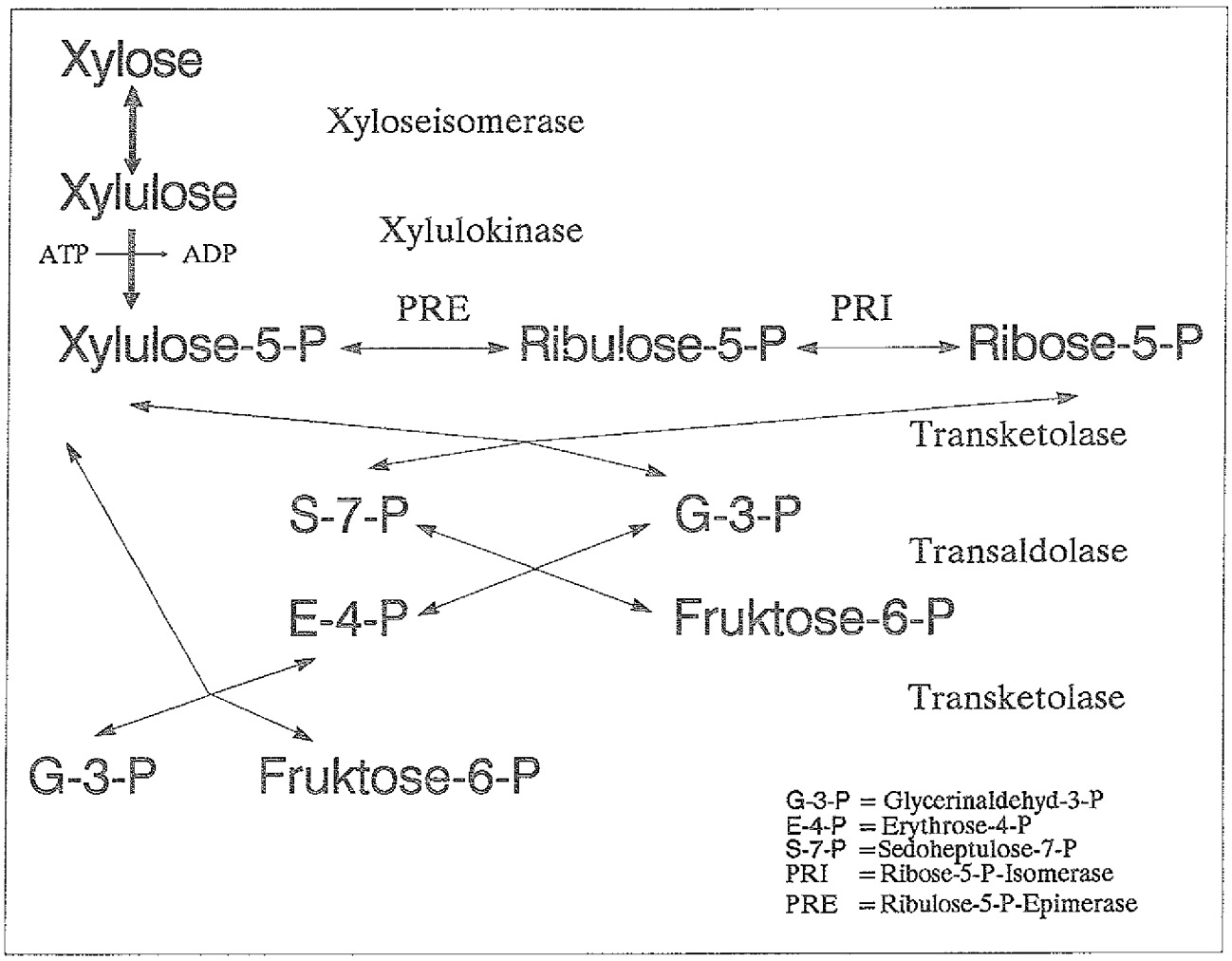


Abb.I.1: Schema der Xyloseumsetzung in Bakterien über den Pentose-Phosphat-Weg.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es,die Gene Xyloseisomerase und Xylulokinase aus einem geeigneten Organismus zu klonieren und nach molekularbiologischer Charakterisierung in *Zymomonas mobilis* zur Expression zu bringen, um damit die Grundvoraussetzung für einen katabolen Xylosestoffwechsel mit diesem Bakterium zu etablieren, (Abb.I.2.). Hierfür waren folgende Arbeiten auszuführen.

1) Zunächst war die Konstruktion eines geeigneten Expressionsvektors für *Z.mobilis* notwendig, auf dem sich das Xylose-Operon stabil exprimieren ließ.

2) Anschließend waren Einflüsse der Xylose-Gene auf den Stoffwechsel zu untersuchen und auftretende Engpässe zu beseitigen.

3) Die Enzyme des Pentose-Phosphat-Weges waren in *Z.mobilis* nachzuweisen, und im Falle zu niedriger Aktivitäten, sollten diese durch zusätzliches Einbringen des entsprechenden Gens gesteigert werden.

4) Durch sukzessives Einbringen definierter Gene für den Xylosestoffwechsel, jeweils gefolgt von Untersuchungen zur physiologischen Antwort der rekombinanten *Z.mobilis* Stämme, sollte die Etablierung des neuen Stoffwechselweges ("metabolic design") erfolgen.

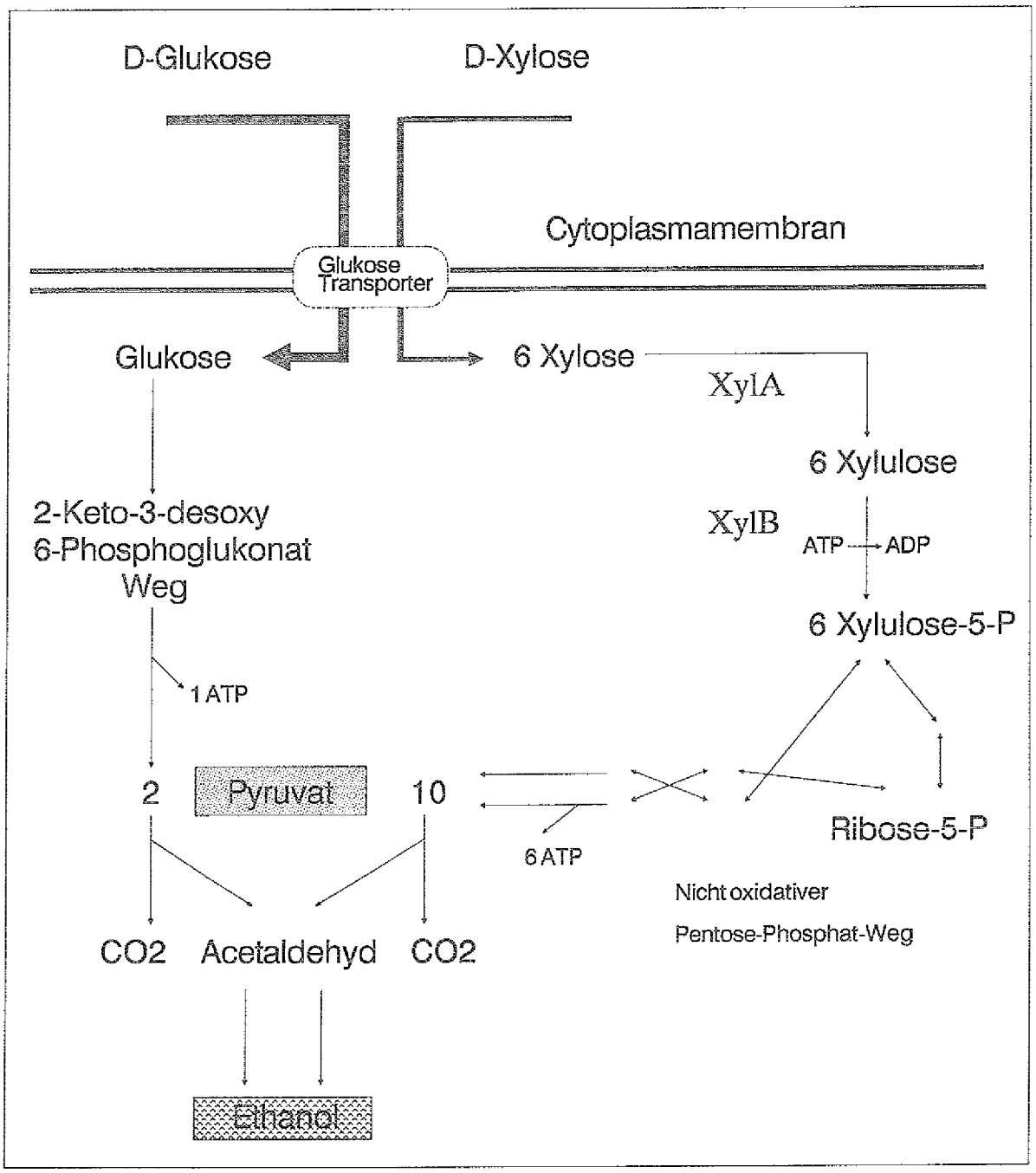


Abb.I.2: Modell eines katabolen Xylose-Stoffwechsels mit rekombinanten *Z.mobilis* Stämmen.

II. Material und Methoden

1. Chemikalien und Enzyme

In der vorliegenden Arbeit wurden analysenreine Chemikalien der Firma MERCK AG,Darmstadt verwendet. Restriktionsendonukleasen und andere Enzyme wurden von der Firma BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim bezogen. Produkte anderer Hersteller sind der nachfolgenden Liste zu entnehmen.

AMERSHAM-BUCHLER, Braunschweig:
α ^{35}S-dATP
α ^{35}S-CTP
D-[U-^{14}C] Xylose

APPLIGENE, Heidelberg:
Phenol (wassergesättigt)

BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim:
Acrylamid, reinst, 2xkrist., mind.99%
Ampicillin, Natriumsalz
ATP
Chloramphenicol, kristallisiert
Desoxy-Nukleotide
Dig DNA Labeling and Detection Kit
Dig RNA Labeling Kit (SP6/T7)
DNA-Packaging Kit
Eichproteine für die SDS-PAGE (Combithek)
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)
NAD (freie Säure)
NADH (Dinatriumsalz)
NADP (Dinatriumsalz, ca.98%)
NADPH (Tetranatriumsalz, ca.98%)
Nukleotide
1,4-Piperazindiethansulfonsäure (PIPES)
Rinderserumalbumin, Fraktion V
SP6/T7 Transcription Kit
Tetracyclin, Hydrochlorid
Thiaminpyrophosphat

DIANOVA, Hamburg:
Geneclean Kit (BIO101 INC., La Jolla, USA)

DIFCO LABORATORIES, Detroit, USA:
Bacto-Trypton
Casaminoacids
Hefe-Extrakt
MacConkey Agar Base

GIBCO BRL, Eggenstein:
Agarose (Ultra Pure)
Cäsiumchlorid (Ultra Pure)
Phenol

OXOID Deutschland, Wesel:
Gas Generating Kit

PALL BIOSUPPORT DIVISION, Dreieich:
Biodyne A Transfermembranen P/N

PHARMACIA LKB, Freiburg:
T7-Sequencing Kit™-Kit

PIERCE CHEMICAL COMPANY, Oud Beijerland, NL:
Bicinchoninat (Na-Salz)
Coomassie Protein Assay Reagent

SCHLEICHER & SCHÜLL, Dassel, CH:
NL17 Membranfilter 0,45 µm
NY 13N Nytran Transfermembranen 0,45 µm

SERVA FEINBIOCHEMICA GmbH, Heidelberg:
Bisacrylamid
Nalidixinsäure
Natriumdodecylsulfat
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)
Rifamycin

SIGMA CHEMIE, München:
Biotin
Diethylpyrocarbonat (DEPC)
Dithiothreitol
Erythrose-4-Phosphat
Ethidiumbromid
Kanamycin, Monosulfat
Laurylsarcosinat
2-N-Morpholinoethansulfonsäure (MES)
Pantothenat (Ca-Salz)
Phosphoriboseisomerase
Phosphoriboseepimerase
Ribose-5-Phosphat
Transketolase
Transaldolase
Triäthanolamin
Xylitol
Xylulose-5-Phosphat

2. Bakterienstämme und Plasmide

Eigenschaften und Herkunft der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide sind in den folgenden Tabellen zusammengefaßt. Die Bezeichnung der genetischen Marker erfolgte dabei nach BACHMANN UND LOW, (1980).

Stamm	Genotyp	Referenz
Escherichia coli		
CA 8000	*thi* HfrH	BRICKMAN ET AL., 1973
ED8767	*recA supE supF hsdS met thi*	MURRAY ET AL, 1977
DH5	*supE hsdR recA end gyr thi relA*	LOW, 1968
HB101	F^- *hsdS*($r_B^- m_B^-$) *recA ara proA lacY galK rpsL* (Sm^R) *xyl-5 mtl supE* lambda$^-$	BOYER UND ROULAND DUSSOIX, 1969
233	HfrC *xyl-7 glp* R^C *strA*	LENGELER, 1980
LR2-168	F^- *thi arg met his gal xyl-7 pho ton supE rpsL galP*	LENGELER, 1980
MV12/ pRts::Tn1725	*trpE recA thr leu lacY* (Km^R Cm^R)	ALTENBUCHNER ET AL, 1983
S17-1	*thi*, F^-, *endAR*, *hsdR* ($r^- m^+$), supE, lambda$^-$,*pro*, ::RP4-2	SIMON ET AL., 1983
ECG18	F^-, *hsdS* ($r_B^- m_B^-$), *recA*, *ara*, *proA*, *lacY*, *galK*, *rpsL* (Sm^R), *xyl-5*, *mtl*,supE	LUDWIG, 1987
DC1091	*pfl*	CLARK, D.P., Illinois
Klebsiella pneumoniae		
KAY2026	F^-, *arg*, *gua*, $P1^S$	SPRENGER UND LENGELER , 1984

Tab. 1: Verwendete *E.coli* K12- und *K.pneumoniae* Stämme

Stamm	Relevanter Genotyp	Referenz
Zymomonas mobilis		
ZM6 (ATCC 29191)	Wildtyp	SWINGS UND DELEY, 1977
ZM1 (ATCC 10988)	Wildtyp	SWINGS UND DELEY, 1977
CU1-Rif2	Rif^R ATCC 10988 Derivat)	AFENDRA UND DRAINAS , 1987
CP4 (ATCC 31821)	Wildtyp	SWINGS UND DELEY, 1977

Tab. 2: Verwendete *Z.mobilis* Stämme

Plasmide	Größe	Relevante Marker	Referenz
pRK2013	48,0kb	*kan tra*$^{+}$	FIGURSKI UND HELSINKI, 1979
pRTS1	130,0kb	*kan cat tra*$^{+}$ T^{S}	ALTENBUCHNER ET AL., 1983
pHC79	6,4kb	*bla tet cos*	HOHN UND COLLINS, 1980
pUC18/19	2,7kb	*bla lacZa*	VIEIRA UND MESSING, 1982
pGEM7Zf^{+}	3,0kb	*bla lacZa*	PROMEGA, 1990
pSUP104	9,5	*cat tet*	SIMON ET AL., 1983
pPTZ1	6,9kb	*bla tet*	REYNEN ET AL., 1990
pPTZ3	6,7kb	*bla tet*	REYNEN ET AL., 1990
pPTZom3	8,7kb	*bla tet*	DIESE ARBEIT
ptktase	4,5kb	*cat tkt*$^{+}$	SPRENGER,1990 unveröffentlicht
pZM134	7,3kb	*bla pdc*$^{+}$	REYNEN ET AL., 1990
pZY200	≈ 40 kb	*bla xylAB*	DIESE ARBEIT
pZY190	17,6kb	*bla xylAB*	DIESE ARBEIT
pZY220	8,6kb	*bla xylAB*	DIESE ARBEIT
pZY240	6,9kb	*bla xylAB'*	DIESE ARBEIT
pZY235	7,7kb	*tet xylA'B*	DIESE ARBEIT
pZY250	4,3kb	*bla xylA'*	DIESE ARBEIT
pZY222	6,2kb	*bla xylAB*	DIESE ARBEIT
pZY224	6,5kb	*bla xylAB*,	DIESE ARBEIT
pZY224a	5,9kb	*bla xylAB*	DIESE ARBEIT
pZY227	3,4kb	*bla* p_{xyl}	DIESE ARBEIT
pZY221	12,8kb	*tet xylAB*	DIESE ARBEIT
pZY225	12,2kb	*tet xylAB*	DIESE ARBEIT
pZY226	13,9kb	*tet xylAB*	DIESE ARBEIT
pZY228	14,8kb	*tet xylAB tkt*	DIESE ARBEIT

Tab. 3: Verwendete und neu konstruierte Plasmide

Die Konstruktion der wichtigsten Plasmide ist im folgenden aufgelistet:

pZY200: ≈ 40 kb Sau3A Fragment chromosomaler DNA aus *K.pneumoniae* KAY2026 in BamHI-Schnittstelle von pHC79 ligiert; *bla xylAB*

pZY190: 14,9kb KpnI-Fragment aus pZY200 in KpnI-Schnittstelle von pUC19 ligiert; 17,6kb, *bla xylAB*

pZY220: 5,8kb KpnI-Fragment aus pZY190::Tn1725-1 in KpnI-Schnittstelle von pUC19 kloniert; enthält 1,3kb Tn1725-Anteil und 4,5kb chromosomales Insert; 8,6kb, *bla xylAB*

pZY240: 4,1kb PstI- Fragment aus pZY220 in PstI- Schnittstelle von pUC19 gebracht; 6,9kb, *bla xylAB'*; Phänotyp in *E.coli* WT und Mutanten Xyl^{-}

pZY235: 2,9kb EcoRI-Fragment aus pZY220 in EcoRI- Schnittstelle von pACYC184 kloniert; 7,7kb, *tet xylA'B*

pZY250: 1,6kb EcoRI/PstI- Fragment aus pZY240 in EcoRI/ PstI geschnittenen Vektor pUC19 ligiert; 4,3kb; *bla xylA'*+ 5'-upstream - Bereich; Plasmid vermittelt *E.coli* WT und Mutanten Xyl$^-$Phänotyp

pZY250 g-2: 1,7kb HindIII- Fragment aus pZY240 in Hind III-Schnittstelle von pGEM7Zf$^+$; 4,7kb, *bla xylA'*+ 5'-upstream-Bereich; Plasmid vermittelt in *E.coli* WT und Mutanten Xyl$^-$ Phänotyp

pZY222: Xylose-Operon rekonstituiert durch Ligation des mit Eco RI geschnittenen Plasmides pZY250-exo 0,6 mit dem 2,9kb EcoRI-Fragment, welches aus pZY220 isoliert wurde; 6,2kb, *bla xylAB*

pZY224: 0,7kb HindIII-Fragment aus pZY222 in HindIII-Schnittstelle von pGEM7Zf$^+$ ligiert ; Klon mit xylA'in Orientierung des SP6-Promotors mit EcoRI nachgeschnitten und 2,9 kb EcoRI-Fragment aus pZY220 anligiert, so daß *xylAB* rekonstituiert wurden; 6,5kb, *bla xylAB*

pZY224a: pZY224 mit EcoRV/ XhoI gespalten, 5,9kb-Fragment isoliert, mit Klenow-Polymerase behandelt und religiert; 5,9kb, *bla xylAB'*; vermittelt in *E.coli* WT und Mutanten Xyl$^-$ Phänotyp

pZY227: 0,35kb PvuI-Fragment aus pZY250g-2 isoliert (5'-"upstream" -Bereich mit Promotor und 25bp von xylA) mit Klenow-Polymerase überhängende Enden abgedaut und in SmaI-Schnittstelle von pGEM7Zf$^+$ ligiert; xyl-Promotor in Orientierung des T7-Promotors; 3,35 kb, *bla pxyl*

pZY170: 1,7kb EcoRI/ SacI-Fragment aus pZY240, mit Klenow-Enzym behandelt und in SmaI-Schnittstelle von pUC18 ligiert; 4,4kb, *bla xylA'*, intergenische Region IGR, *xylB'*

pZY233: 2,9kb EcoRI- Fragment aus pZY235 in EcoRI-Schnittstelle von pGEM7Zf$^+$ ligiert; *bla xylA'B*

pZY237: 0,7kb EcoRV/ EcoRI-Fragment aus pZY222 in SmaI-Schnittstelle von pUC18 ligiert; 3,4kb, *bla xylB'*

pZY221: 5,8kb KpnI- Fragment aus pZY220 in KpnI- Schnittstelle von pPTZ1 kloniert; 12,8kb, *tet xylAB*

pZY225: 3,5 kb NsiI/ SphI Fragment aus pZY224 isoliert, mit Klenow-Polymerase glatte Enden hergestellt und in SmaI-Schnittstelle des Expressionsvektors pPTZom3 ligiert; 12,2kb, *tet xylAB*

pZY225-XR4, pZY225-XR7: Mutantenplasmide von pZY225

pZY226: 3,5 kb NsiI/ SphI Fragment aus pZY224 isoliert, mit Klenow-Polymerase glatte Enden hergestellt und in die Klenow-behandelte Asp718-Schnittstelle von pPTZ7 ligiert; 13,9kb, *tet xylAB*

pZY228: 2,6kb SspI/ ScaI-Fragment aus ptktase in ScaI-Schnittstelle von pZY225-XR4; 14,8kb, *bla$^-$ tet xylAB tkt*

pPTZom3: pPTZ3 mit EcoRI gespalten; 5,2 kb EcoRI- Fragment isoliert und religiert; entstandenes Konstrukt pPTZ3-02 mit PvuII geschnitten; $ori_{Z.mob.}$ als 0,8kb MspI/ ScaI-Fragment aus pDS3154 (C.DRAINAS) isoliert und in pPTZ3-02 ligiert (pPTZ ori3-1); pPTZ ori3-1 mit EcoRI restringiert und mit Klenow-Polymerase aufgefüllt; das aus pSUP104 isolierte 2,7kb AvaI-Fragment (mob) wurde in pPTZori3-1 ligiert; 8,7kb; *tet* ori_{pZMO3} $mob_{pSUP104}$

3. Nährmedien und Kulturbedingungen

Für die Anzucht der *E.coli* Stämme wurden folgende Medien verwendet:

LB-Medium (nach LENNOX, 1955):
10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl,Aqua bidest. ad 1l. Zur Herstellung eines festen Nährbodens wurde dem Medium 18g/l Agar zugesetzt.Dieses Medium diente standardmäßig zur Anzucht von *E.coli* Zellen.

McConkey Agar, (nach MacConkey, 1905):
40 g /l McConkey Agar Base der Fa.DIFCO
Die Kohlenstoffquelle D-Xylose oder andere Zucker wurden dem Medium nach dem Autoklavieren mit einer Endkonzentration von 1% steril zugesetzt. Dieses Medium diente zur Identifizierung Xylose vergärender *E.coli* Stämme und daneben zur Unterscheidung zwischen *E.coli*- und *Z.mobilis*-Zellen nach der Filterkreuzung. *Z. mobilis* wächst aufgrund der im Medium enthaltenen Gallensalze nicht auf McConkey-Platten, während *E.coli* je nach Kohlenstoffquelle rote bzw. weiße Kolonien bildet.

Minimalmedium (MM) (TANAKA ET AL., 1967):
MM wurde zur Anzucht von *E.coli* Zellen für Enzymtests verwendet. Für 1 l Medium wurden folgende Komponenten separat autoklaviert, gemischt und mit sterilem Aqua bidest. auf das Endvolumen aufgefüllt:

Lösung A	100 ml
Lösung B	10 ml
Kohlenstoffquelle (40% in Aqua bidest.)	10 ml
bei festen Nährböden Agar (18% in Aqua bidest.)	100 ml

Lösung A (10x): 340 mM NaH_2PO_4, 660 mM K_2HPO_4, 200 mM $(NH_4)_2SO_4$

Lösung B: (100x): 30 mM $MgSO_4$, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM $ZnCl_2$, 0,1 mM $FeSO_4$, 1 mM HCl

Erforderliche Aminosäuren (Endkonzentration 20 µg/ml) wurden sterilfiltriert und dem auf 48°C abgekühlten Medium zugesetzt.
Bei Anzucht von *E.coli* in Nährmedien mit Antibiotika wurden diese dem Medium in den folgenden Endkonzentrationen zugesetzt:

Ampicillin:	100µg/ml,	Chloramphenicol:	25µg/ml
Kanamycin:	25µg/ml,	Nalidixinsäure:	25ug/ml
Rifamycin:	100ug/ml,	Tetracyclin:	10µg/ml

Für die Kultivierung von *Z.mobilis* Stämmen wurden folgende Medien verwendet:

Vollmedium (VM) (BRINGER ET AL., 1984):
10g/l Hefeextrakt, 1g/l KH_2PO_4, 1g/l $(NH_4)_2SO_4$, 0,5g/l$MgSO_4$. Als Kohlenstoffquellen wurden standardmäßig 5% Fruktose oder Glukose nach dem Autoklavieren zugesetzt. Für feste Nährböden wurden 18g/l Agar ergänzt. Zur Selektion auf Antibiotiokaresistenz enthielt das Medium zusätzlich noch die entsprechenden, sterilfiltrierten Antibiotika in folgenden Konzentrationen:

Chloramphenicol	(in 50% Ethanol):	100µg/ml
Nalidixinsäure	(in 0,1 N NaOH):	40µg/ml*
Rifamycin	(in 50% Methanol):	100µg/ml
Tetracyclin	(in 50% Ethanol):	30µg/ml

*Da *Z.mobilis* resistent gegen Nalidixinsäure ist (SWINGS UND DE LEY, 1977), wurde dieses Antibiotikum zur Gegenselektion von *E.coli* verwendet.

Mineralsalzmedium (ZMM) (modifiziert nach FEIN ET AL, 1983)
1,98 g $(NH_4)_2SO_4$; 1,0 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$; 3,48 g KH_2PO_4; 0,21 g Tri-Na-Citrat; 19,52 g MES Puffer; Aqua bidest. ad 879 ml, pH 5,5 mit KOH. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen wurden folgende Substanzen aus sterilfiltrierten Stammlösungen zugesetzt:

10 ml $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (100 mg/ml); 10 ml Biotin (10 mg/ml); 1 ml Ca-Pantothenat (1 g/ml); 100 ml Kohlenstoffquelle (50 g/100 ml).
In Mineralsalzmedium erfolgte die Anzucht von *Z.mobilis* Zellen für Enzymtests und für intrazelluläre Metabolitbestimmungen.

Kultivierungsbedingungen

Die Anzucht der *E.coli* Stämme erfolgte aerob, in Flüssigkulturen unter Schütteln bei 37°C (Reagenzgläser:G24 Environmental Incubator Shaker, Firma BRUNSWICK Scientific C., USA; Erlenmeyerkolben: Pilot-Shake der Firma Kühner AG Apparatebau Basel, CH). Die Inkubationsdauer betrug 16-20 Stunden.
Die Kultivierung von *Z.mobilis* Stämmen erfolgte in Anaerobengefäßen der Firma BELLCO-GLASS-INC., New Jersey, USA oder in Zweihalskolben der Glasbläserei, KFA Jülich GmbH, bei 30°C. Die Anaerobiose stellte sich nach CO_2-Entwicklung und Entweichen des überschüssigen Gases durch einen Sterilfilter selbst in den Kulturen ein. Kulturen in Mineralsalzmedium wurden im Wasserbad leicht geschüttelt. Für die Vorkultur wurden Medien von einer Komplexmediumplatte mit einer Einzelkolonie beimpft und 20h inkubiert. Für die Hauptkultur wurden die Zellen steril abzentrifugiert und ohne Waschen zu einer OD_{600} von 0,2 in Mineralsalzmedium überführt.
Medien für intrazelluläre Metabolitbestimmungen und ^{14}C-Xylose-Verwertung wurden mit einer OD_{600} = 5-6 beimpft. Für Experimente mit ^{14}C-[U]-Xylose wurde das Inokulum einmal in Mineralsalzmedium mit 2% Fruktose gewaschen.

Die Kultivierung von *Z.mobilis* auf Agarplatten erfolgte bei 30^0C in einem Anaerobentopf (OXOID Anaerobic), der mit einem H_2/CO_2-Gasgemisch (OXOID Gas-Generating-Kit) gefüllt war und einen Edelmetallkatalysator enthielt (OXOID, Wesel).

Zur Stammhaltung von *E.coli*- bzw. *Z.mobilis*-Stämmen wurden glycerinhaltige Dauerkulturen angelegt, die bei -20°C aufbewahrt wurden. Dazu wurden 10ml einer Übernachtkultur in LB- bzw. VM-Medium abzentrifugiert und das Zellsediment in 1 ml Komplexmedium + 1 ml 87% sterilem Glycerin aufgenommen.

4. Bestimmung des Bakterienwachstums

Trübungsmessung

Das Zellwachstum in Flüssigkulturen wurde photometrisch (Shimadzu UV-160 Spektralphotometer, SHIMADZU,Düsseldorf) bei einer Wellenlänge von 600 nm verfolgt. Bei einer OD_{600} >0,5 wurde die Bakterienkultur vor einer weiteren Messung mit Medium verdünnt. Für *E. coli* entspricht 1 Absorptionseinheit bei 600 nm einer Zellzahl von ca. 10^9/ml Kultur, für *Z.mobilis* liegt sie bei $\approx 2x10^8$/ ml.

Trockengewichtsbestimmung

Die Bakterienmasse wurde über eine Trockengewichtsbestimmung ermittelt. Hierzu wurden 10 ml Bakteriensuspension in einer Kühlzentrifuge (BECKMAN Kühlzentrifuge) bei 4^0C mit 5000xg 15min. abzentrifugiert und die sedimentierten Zellen zweimal mit eiskaltem Aqua bidest. gewaschen. Das Sediment wurde in den vorbehandelten (8-15h bei 105^0C, 8-15h im Exsikkator) Reagenzgläsern getrocknet (8-15 h bei 105^oC,8-15 h im Exsikkator) und anschließend gewogen. Das Trockengewicht ergab sich aus dem Mittelwert der Parallelbestimmungen abzüglich des Leerwertes der Röhrchen. Einer OD_{600} von 1 entsprach ein Trockengewicht von 0,28 mg/ml.

5. Genetische Methoden

5.1. Transformation von E.coli

Für die Transformation von *E.coli* mit superhelikaler Plasmid-DNA wurden kompetente Zellen nach der Rubidiumchlorid-Methode hergestellt (HANAHAN, 1985). Die Zellen wurden in Aliquots zu 200 µl aufgenommen,in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C bis zu 3 Monaten gelagert. Zur Transformation wurden jeweils 100 -1000 ng Plasmid-DNA eingesetzt.

5.2. Filterkreuzung von E.coli und Z.mobilis

Rekombinante Plasmide wurden über Konjugation nach *Z.mobilis* mobilisiert. Der *E.coli* Donor-Stamm S17-1 enthält chromosomal ein Derivat des Plasmids RP4, welches die für die Mobilisation eines Vektors mit RP4-spezifischer mob-Region notwendigen Transfer-(tra) Gene trägt (SIMON ET AL., 1983). Die Durchführung der Konjugation wurde modifiziert nach einem Protokoll von AFENDRA UND DRAINAS,(1987) durchgeführt. Die *Z.mobilis*-Rezipientenstämme wurden über Nacht in Komplettmedium angezogen und anschließend zur Konjugation eingesetzt.Übernachtkulturen der rekombinanten *E. coli* S17-1 Donor-Stämme in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikazusatz wurden 1:50 verdünnt in frisches Medium überimpft und nach Erreichen einer OD_{600} von 0,6-0,8 eingesetzt. Donor- und Rezipientenstämme wurden zweimal in LB- bzw.VM-Medium gewaschen und dann 10-fach konzentriert in VM-Medium aufgenommen. Zur Konjugation wurden $4x10^8$ Donorzellen mit $2x10^8$ Rezipientenzellen gemischt und auf sterile Membranfilter (NL17,0,45µ,2,5cm SCHLEICHER & SCHÜLL, Dassel), die zuvor auf Komplettmediumplatten gelegt worden waren, in einem Volumen von etwa 100 µl aufgetropft. Die Kreuzungsansätze wurden 4 h bei 30°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 1ml VM-Medium von den Filtern in sterile 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäße abgeschwemmt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (13000 Upm, 1min.) sedimentiert, in 200µl VM- Medium resuspendiert und auf VM-Agarplatten mit Nalidixinsäure und dem entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Nach anaerober Inkubation der Konjugationsplatten bei 30°C über einen Zeitraum von 3-6 Tagen, wurden die Bakterienkolonien anschließend zur Unterscheidung zwischen *Z.mobilis*- und *E.coli* Kolonien auf VM-Platten mit Antibiotikum ausgestrichen und parallel dazu auf McConkey-Nährboden, auf denen *Z.mobilis* aufgrund der darin enthaltenen Gallensalze nicht wachsen kann.

5.3. Plasmidstabilitätstest

Zur Überprüfung der Stabilität konstruierter,rekombinanter Plasmide in den transkonjuganten *Z.mobilis* Stämmen wurde ein Stabilitätstest nach AFENDRA und DRAINAS (1987) durchgeführt. Die rekombinanten Bakterienstämme wurden hierzu zweimal täglich nach Be-

stimmung der OD_{600} und der Generationszahl,1:100 in 10ml frisches Vollmedium überimpft. Nach 50 bzw. 100 Generationen wurde eine entsprechend verdünnte Bakterienkultur auf Vollmedium- Nährboden mit bzw. ohne Antibiotikazusatz ausplattiert. Aus dem Verhältnis der Anzahl der Kolonien auf VM-Platten ohne Antibiotika zur Kolonienzahl auf antibiotikahaltigen Platten, ergab sich der Anteil der Kolonien, die die plasmidvermittelte Antibiotikaresistenz verloren hatte. Aus resistenten Kolonien der zuletzt untersuchten Generation wurde dabei zusätzlich noch die Plasmid-DNA isoliert und nach Spaltung mit Restriktionsendonukleasen das Fragmentmuster mit dem ursprünglichen verglichen.

5.4. Transposonmutagenese

Zur Transposonmutagenese verschiedener Plasmidkonstruktionen fand das Transposon Tn1725 (UBBEN UND SCHMITT, 1986) Verwendung. Die Methode eignet sich zur Kartierung der relativen Lage von Genen auf Plasmiden, und sie ermöglicht die Einführung neuer Restriktionsschnittstellen für Subklonierungen.
Das zu mutagenisierende Konstrukt wurde in den *E.coli* Stamm MV12 pR^{ts}::Tn1725 ($Km^r Cm^r$) transformiert, wobei die Selektion auf festen Nährböden mit Zusatz von Chloramphenicol und dem entsprechenden plasmidkodierten Antibiotika-Marker erfolgte. Die erhaltenen transkonjuganten Kolonien wurden dann im Sektorausstrich auf frische Selektionsplatten überstrichen, über Nacht bei 37^0C inkubiert und anschließend für weitere 4-6 d bei 30^0C belassen. In dieser Zeit fanden die Transpositionsereignisse statt. Anschliessend wurden Schnellplasmidpräparationen (II.6.3.) verschiedener Transkonjuganden durchgeführt und die Lage des Transposons durch Restriktionsanalysen sowie durch Komplementationsstudien untersucht.

5.5. UV-Mutagenese von Z.mobilis

Eine Übernachtkultur von *Z.mobilis* Zellen in Vollmedium mit 5% Glukose wurde 10-fach verdünnt in frisches Medium überimpft und 5 h bei 30^0C inkubiert (OD_{600} 1,5-2). Die Kultur wurde dann steril abzentrifugiert (BECKMAN Kühlzentrifuge, 5min. 3000 Upm, 4^0C) und

das Sediment in isotonischem Medium (Mineralsalzmedium) resuspendiert. Die Bakteriendichte wurde in 12ml Medium auf $1 \cdot 10^8$ Zellen/ml eingestellt. Diese Bakteriensuspension wurde anschließend in einer sterilen Petrischale unter ständigem Rühren mit einer UV-Lampe (254 nm, 25 cm Probenabstand, 170 sec.) bestrahlt, bis die Kultur eine Überlebensrate von etwa 1% aufwies und damit eine ausreichende Mutationsrate erreicht hatte (SAMBROOK ET AL.,1989). Zur Regenerierung der mutagenisierten Kulturen wurden 3 Vol. VM-Medium + 5% Glukose zugegeben und 1-2 d bei 30^0C inkubiert.

6. Präparation und Reinigung von Nukleinsäuren

6.1. Isolierung chromosomaler DNA aus K.pneumoniae

Zur Erstellung einer Cosmid-Genbibliothek wurde chromosomale DNA von *K.pneumoniae* KAY2026 nach einer Vorschrift von BYUN ET AL., (1986) isoliert. Dabei wurden die Zellen einer 100 ml Kultur mit einer $OD_{600} \approx 2$ schonend mit Lysozym und N- Laurylsarkosinat, in Anwesenheit von Proteinase K zur Inaktivierung von Nukleasen aufgeschlossen. Die DNA konnte nach Ethanolfällung mit einem Glasstab ausgedreht werden und wurde zur Aufreinigung je dreimal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Volumenverhältnis 25:24:1) und Chloroform/IAA (Volumenverhältnis 24:1) extrahiert.

6.2. Plasmidisolierung im großen Maßstab aus E.coli

Isopyknische Zentrifugation

Zur Isolierung großer Mengen hochreiner Plasmid-DNA aus *E.coli* für Klonierungen und Restriktionskartierungen wurden Cäsiumchlorid/ Ethidiumbromid Dichtegradientenzentrifugationen durchgeführt (MESELSON UND STAHL,1958). Die Plasmidaufarbeitung erfolgte nach SAMBROOK ET AL. (1989) aus 1l Übernachtkultur des plasmidhaltigen Stammes in LB-Medium mit selektivem Antibiotikazusatz. Der Gradientenlauf wurde in einer BECKMAN Ultrazentrifuge (Typ L8-70M) mit dem Rotor TI 70 bei 20^0C durchgeführt. Die Laufzeit betrug mindestens 36h bei 49000 Upm. Die Plasmidbande wurde unter UV-Beleuchtung mit einer Injektionsspritze aus dem Zentrifugenröhrchen ab-

gezogen und mit eiskaltem absoluten Ethanol mindestens 2h bei -20^{0}C ausgefällt, zentrifugiert und die gewonnene DNA anschliessend dreimal mit 500µl Phenol/Chloroform/IAA und Chloroform/IAA extrahiert. Die DNA wurde dann mit 1/5 Volumen einer 2 M LiCl-Lösung sowie dem 2,5-fachen Volumen absoluten Ethanols für mindestens 1 h bei -20°C gefällt, durch Zentrifugation (SIGMA-Kühlzentrifuge 202MK, 13000 Upm, 4°C, 30 min) sedimentiert, der Niederschlag getrocknet und in 100-300 µl TE-Puffer gelöst.

6.3. Plasmidschnellisolierung aus E. coli und Z. mobilis

Die Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA aus *E.coli* erfolgte durch alkalischen Aufschluß (modifiziert nach BIRNBOIM UND DOLY, 1979).1,5ml selektive Übernachtkulturen (LB-Medium) rekombinanter Einzelkolonien wurden in EPPENDORF-Reaktionsgefäße überführt und abzentrifugiert (SIGMA-Kühlzentrifuge 202MK, 13000 Upm,4°C,2min). Die Zellen wurden in 100µl Lösung I (50 mM Glukose,10 mM EDTA, 25 mM Tris/HCl pH 8) resuspendiert und durch Zugabe von 200µl Lösung II (1% SDS, 0,2 N NaOH) lysiert. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis wurden durch Zugabe von 150µl Lösung III (3M Kaliumacetat, 1,8 M Essigsäure) die chromosomale DNA und Proteine weitgehend gefällt und durch Zentrifugation (13000 Upm,4°C,15 min) vom plasmidhaltigen Überstand getrennt. Der Überstand wurde zur Entfernung verbliebener Proteine zweimal mit Phenol/Chloroform/IAA (25:24:1) und mit Chloroform/IAA (24:1) extrahiert. Die Präzipitation der Plasmid-DNA erfolgte durch Zugabe des 2,5-fachen Volumens reinen Ethanols und Zentrifugation (SIGMA-Kühlzentrifuge 202 MK, 13000 Upm, 4°C, 8 min). Das DNA-Präzipitat wurde in einer Vakuum-Zentrifuge (Speed Vac Concentrator der Firma BACHHOFER) getrocknet und in 30-100µl TE-Puffer (10mM Tris/HCl,1mM EDTA, pH 8) aufgenommen.

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus *Z.mobilis* wurde ein alkalischer Aufschluß unter Einsatz von Lysozym durchgeführt (modifiziert nach BIRNBOIM UND DOLY, 1983). 10ml Übernachtkulturen in VM mit selektivem Antibiotikazusatz wurden abzentrifugiert (BECKMAN Kühlzentrifuge 4000 Upm, 5 min.), das Zellsediment dann in 200 µl Lösung I, die zusätzlich frisch gelöstes Lysozym (10 mg/ml) enthielt, resuspendiert und 30 min. auf Eis inkubiert. Nach Zugabe

von 400 µl Lösung II erfolgte eine 5 minütige Inkubation auf Eis. Es wurden 300 µl Lösung III zugegeben und nochmals 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (SIGMA-Kühlzentrifuge 202MK, 13000 Upm, 4°C, 15 min) wurde der Überstand auf 2 Reaktionsgefäße verteilt. Es folgten je 3 Extraktionen mit Phenol/Chloroform/IAA und mit Chloroform/IAA, wobei die Zentrifugationszeit zur Phasentrennung beim ersten Extraktionsschritt auf 30 min verlängert wurde. Die Plasmid-DNA wurde mit 2 Volumen absoluten Ethanols präzipitiert (SIGMA-Kühlzentrifuge 202MK, 13000 Upm, 4°C, 10 min) in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 30-100µl TE-Puffer aufgenommen.

Aufreinigung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA aus *E.coli*, die zur Sequenzierung eingesetzt wurde und Plasmid-DNA aus *Z.mobilis* für Restriktionsanalysen wurde nach einer Methode von SAMBROOK ET AL.,(1989) weiter aufgereinigt. 100µl Plasmid-DNA wurden mit 300 µl 4M LiCL (-20^{0}C) 30 min. auf Eis gehalten, was zur Ausfällung von RNA führt. Nach 10-minütiger Zentrifugation (SIGMA-Kühlzentrifuge 202MK, 13000 Upm, 4^{0}C) wurde die Plasmid-DNA im Überstand mit 1,5 Volumen Isopropanol ausgefällt (30 min. bei Raumtemperatur, 10 min 13000 Upm 4^{0}C). Die DNA wurde in 10-30 µl TE gelöst und bei 4^{0}C aufbewahrt.

6.4. Isolierung von Gesamt-RNA aus E. coli und K. pneumoniae

Zur Isolierung von RNA wurde eine modifizierte Methode nach BÖRMANN ET AL., (1991) verwendet. Die Bakterienzellen wurden in 5ml MM-Medium mit 0,4% Xylose angezogen und in der exponentiellen Phase geerntet. Die Kulturen wurden schnell auf Eis abgekühlt (10 min. 0^{0}C), 5 min. bei 4^{0}C und 3000 Upm abzentrifugiert (BECKMAN Kühlzentrifuge) und einmal in eiskaltem Puffer (50mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 6,6) gewaschen. Der Zellaufschluß erfolgte in 0,5ml 10 mM Natriumacetat, 1% SDS pH5 bei 60^{0}C. Anschließend wurde die RNA dreimal je 10 min. bei 60^{0}C mit 1ml vorgewärmtem wassergesättigtem, saurem Phenol (APPLIGENE, Heidelberg) unter gelegentlichem Umschütteln extrahiert. Nach jeder Extraktion wurden die Proben für 5 min. auf Eis abgekühlt, zentrifugiert (SIGMA Kühlzentrifuge 202 MK, 13000 Upm, 4^{0}C, 5 min) und der wässrige Überstand weiterverwendet. Die RNA wurde anschließend über Nacht mit

1/10 Volumen 3M Natriumacetat pH 5,2 und 2,5 Volumen Ethanol bei -20^{0}C gefällt, dann für 20 Minuten bei 4^{0}C und 13000 Upm sedimentiert, mit 70% Ethanol gewaschen und die getrocknete RNA in RNAse freiem Aqua bidest., versetzt mit 1µl RNAse Inhibitor (RNAsin, PROMEGA, Heidelberg), gelöst und bei -20^{0}C aufbewahrt.

Alle verwendeten Gefäße und Lösungen wurden 30 min autoklaviert. Die Lösungen wurden in RNAse freiem Aqua bidest. (0,25% DEPC= Diethylpyrocarbonat, SIGMA GmbH, Deisenhofen) hergestellt. Während aller Arbeiten mit RNA wurden Handschuhe getragen, um Kontaminationen mit RNAsen zu vermeiden.

6.5. Photometrische Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen

Die Konzentration von DNA- und RNA-Lösungen wurde durch photometrische Messungen bei 260 und 280 nm bestimmt. Dabei wurde im Spektralphotometer UV-160 der Firma SHIMADZU,Düsseldorf in 1ml UV - Küvetten von 1cm Schichtdicke gemessen.Bei einem Verhältnis der Extinktionen von 260: 280 von 2:1 entsprach eine optische Dichte OD_{260}= 1 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml und einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml (SAMBROOK ET AL.,1989).

7. Techniken zur Rekombination und Analyse von DNA

7.1. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte gemäß den Herstellerangaben in den mitgelieferten Puffern. Das Reaktionsvolumen betrug standardmäßig 15 µl, bei Klonierungen 20-50 µl. Die Enzyme wurden in einem Verhältnis von 1-5 U/µg DNA eingesetzt. Bei Verunreinigung der DNA mit RNA wurden außerdem 0,5 U DNAse-freier RNAse zugegeben. Die Restriktionsansätze wurden 2-3 h bei 37°C inkubiert.Bei Ansätzen mit 2 Endonukleasen, die unterschiedliche Pufferbedingungen erforderten, wurde nach vollständiger Spaltung mit dem 1. Restriktionsenzym die DNA mit Phenol/ Chloroform/IAA extrahiert und mit LiCl/EtOH gefällt.Nach erneuter Aufnahme in TE- Puffer wurde mit dem zweiten Enzym geschnitten.

7.2. Agarose-Gelelektrophorese

Enzymatisch gespaltene DNA wurde zur Kontrolle der Restriktion oder zur Restriktionskartierung auf Agarose-Gelen nach Anlegen einer Spannung ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Herstellung der Gele und Durchführung der Gelelektrophorese erfolgten nach SAMBROOK ET AL.,(1989).Verwendung fanden Horizontalgelkammern der Firma GIBCO BRL (Modell H6: max. Trennstrecke 7cm, Modell H5:max. Trennstrecke 10,5 cm) und Spannungsquellen (Typ Macrodrive) der Firma PHARMACIA LKB, Freiburg. Die Agarosekonzentration der Gele betrug der Größe der zu trennenden Fragmente entsprechend 0,7-2%. Als Puffersystem diente TBE-Puffer (89mM Tris/ HCl, 89mM Borsäure, 2mM EDTA, pH8). Nach Anfärbung der Gele in Ethidiumbromid-Lösung (0,5µg/ml) wurden die DNA-Fragmente bei Betrachtung auf einem Transilluminator (WETTER GmbH, Typ Chroma 42) unter UV-Licht der Wellenlänge 366 nm rotfluoreszierend sichtbar. Zur Auswertung wurden die Gele mit einer Polaroidkamera MP4 unter Verwendung eines Rotfilters photographiert. Mittels eines Molekulargewichtsstandards wurde eine halblogarithmische Eichkurve erstellt und die Größe der einzelnen DNA-Fragmente bestimmt.

7.3. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Bei präparativen Agarosegelen wurde ein Tris/Acetat-Puffersystem (40 mM Tris/HCl, 20mM Na-Acetat, 2mM EDTA, pH8) verwendet, da die in TBE-Puffer enthaltenen Borat-Ionen die Ligation von isolierten Fragmenten behindern (SAMBROOK ET AL.,1989).
Die enzymatisch gespaltene DNA (5-10 µg) wurde bei 50 V Spannung gelelektrophoretisch aufgetrennt und die DNA-Banden mit Ethidiumbromid angefärbt. Das zu präparierende DNA-Fragment wurde entweder durch Elektroelution (SAMBROOK ET AL., 1989) isoliert und anschließend mit LiCL/Ethanol gefällt oder direkt aus der Agarose mit Glas-Milch (GENECLEAN-Kit, DIANOVA,Hamburg) isoliert. Diese Methode beruht auf der Freisetzung der DNA aus der bei 50^{0}C schmelzenden Agarose in Gegenwart von ca. 4M Natriumjodid (VOGELSTEIN UND GILLESSPIE,1979) und der anschließenden selektiven Bindung an die Silikamatrix von Glas-Milch, gefolgt von der Elution in ein geeignetes Volumen TE-Puffer. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

7.4. Verkürzung enzymatisch gespaltener DNA mit Exonuklease III

Die von HENIKOFF (1984) entwickelte Methode zur Verkürzung linearisierter DNA, wurde mit einem käuflichen Satz an Puffern und Enzymen (Erase a Base System, PROMEGA, Heidelberg) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Unidirektional zu verkürzende DNA wurde mit einem Restriktionsenzym geschnitten, das 5'-überhängende oder glatte Enden erzeugt und von diesen Enden aus mit Exonuklease III (ExoIII) verkürzt. Um das andere Ende vor dem Angriff von ExoIII zu schützen, wurde zusätzlich noch mit einem Restriktionsenzym gespalten, das 3'-überhängende Enden erzeugt, die für ExoIII-Aktivität unzugänglich sind (HENIKOFF, 1984). Da der Abbau der Nukleotide durch ExoIII mit konstanter Rate erfolgte, war es möglich in definierten Zeitabständen Aliquots aus dem Reaktionsansatz zu entnehmen, in diesen die Reaktion abzustoppen und damit eine Anzahl unterschiedlich verkürzter DNA-Moleküle zu erhalten. Nach Behandlung mit Nuklease S1 zur Erzeugung glatter Enden und Polymerasereaktion mit Klenow Enzym und Nukleotiden (dNTPs), wurde die DNA ligiert und in *E.coli* Zellen transformiert. Die Selektion erfolgte auf Nährböden mit entsprechendem Antibiotikum und die verkürzten Konstrukte wurden anschließend über Restriktionsanalyse untersucht bzw. zur Sequenzierung eingesetzt.

7.5. Behandlung überhängender DNA-Enden mit Klenow-Polymerase

Zur Erzeugung glatter Enden an restriktionsverdauten DNA-Fragmenten mit 5'- oder 3'-überhängenden Enden sowie zur radioaktiven Markierung 5'-überhängender Fragmente wurde mit Klenow-Polymerase (große Untereinheit der DNA-Polymerase I aus *E.coli*) in Anwesenheit von Desoxynukleotidtriphosphaten enzymatisch aufgefüllt. Die Reaktion wurde 30 min. bei Raumtemperatur nach SAMBROOK ET AL. (1989) in einem Gesamtvolumen von 25µl durchgeführt. Vor dem Einsatz zur Ligation wurde die DNA einmal mit Phenol extrahiert sowie mit LiCL/Ethanol gefällt und in 5-10µl TE gelöst.

7.6. Ligation restringierter DNA-Moleküle

Alkalische Phosphatasebehandlung

Die Religation eines Vektors bei Klonierungen wurde durch Entfernung der 5'-terminalen Phosphatgruppe verhindert (nach SAMBROOK ET AL., 1989). Die Dephosphorylierung erfolgte im Anschluß an die Restriktionsspaltung mit 0,5 U alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP; 37°C,30 min). Gestoppt wurde die Reaktion durch 10-minütiges Erhitzen auf 65°C. Zur vollständigen Entfernung der Phosphatase wurde eine Phenol/Chloroform/IAA-Extraktion durchgeführt. Die DNA wurde anschließend mit LiCl/EtOH gefällt und in dem gewünschten Volumen TE-Puffer aufgenommen.

Ligation

Zur Verknüpfung enzymatisch gespaltener DNA-Moleküle wurde T4-DNA - Ligase eingesetzt (SAMBROOK ET AL., 1989).Das Reaktionsvolumen betrug 10-20 µl mit einem DNA-Gehalt von 0,2-1 µg und einem molaren Verhältnis von Fragment zu Vektor von 3:1 bis 6:1. Bei der Ligation von Fragmenten mit überstehenden Enden wurden 0,5U T4-DNA- Ligase eingesetzt, bei Fragmenten mit glatten Enden 1U des Enzyms. Die Ligation erfolgte in Ligationspuffer (10x Ligationspuffer: 660 mM Tris/HCl pH7,5; 50 mM $MgCl_2$; 50 mM DTT, 10mM ATP) über Nacht bei 16°C.

7.7. DNA-Sequenzierung nach SANGER

DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Methode von SANGER ET AL. (1977), modifiziert nach TABOR UND RICHARDSON,(1987). Diese Methode beruht auf der in vitro Synthese des komplementären Stranges einer einzelsträngigen DNA-Matrize ausgehend von einem komplementären Oligonukleotid ("Primer") mit einem 3'-OH-Ende, wobei radioaktiv markierte Nukleotide eingebaut werden. Die in vitro Synthese des komplementären Stranges erfolgte mit T7-DNA-Polymerase. Durch den Einbau von Didesoxynukleotiden statt der in der DNA vorkommenden Desoxynukleotide, kommt es zu spezifischen Kettenabbruchreaktionen und die synthetisierten radioaktiv markierten Oligonukleotide können mit Hilfe eines denaturierenden Poly-

acrylamidgels analysiert werden.
Es wurde eine Plasmidsequenzierung in den Plasmiden pUC18/ pUC19, sowie dem Plasmid pGEM7Zf$^+$ (PROMEGA, Heidelberg) mit den käuflichen Primern M13/ pUC-"sequencing" und -"reverse sequencing" (BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim) sowie den SP6- und T7-Primern der Firma PROMEGA, Heidelberg, durchgeführt. Für die Sequenzierung wurde der T7-Sequenzierungssatz der Firma PHARMACIA LKB, Freiburg verwendet. Die Durchführung erfolgte leicht modifiziert nach Angaben des Herstellers.
Für jeden Sequenzierungsansatz wurden 4µg frisch denaturierte DNA eingesetzt. Die Anlagerung des Primers an die Matrize erfolgte für 20 min. bei 37^{0}C, gefolgt von einer 10-15-minütigen Inkubation bei 20^{0}C. In der folgenden Markierungsreaktion (5min. 20^{0}C) wurden 2µl α^{35}S-dATP= 20µCi (AMERSHAM& BUCHLER, Braunschweig; 1000Ci/mmol), 3U T7-DNA-Polymerase und ein Gemisch aus dCTP, dGTP und dTTP ("Labeling-Mix") zu dem Primer/ Matrizengemisch gegeben. Der anschließende Kettenabbruch (5min.37^{0}C) erfolgte mit den entsprechenden Didesoxynukleotiden. Nach Zugabe von formamidhaltigem Farbmarker ("Stop solution",PHARMACIA,Freiburg) wurden die Proben 2 min. bei 95^{0}C denaturiert und je 1,5-2µl auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen.

Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente aus den Sequenzierungsreaktionen wurden denaturierende Gele bestehend aus 6% Acrylamid/ 7M Harnstoff hergestellt (SAMBROOK ET AL., 1989). Es wurde eine thermostatisierbare Vertikalgelapparatur der Firma PHARMACIA LKB, Freiburg, verwendet (MACROPHOR 2010, max. Trennstrecke 50cm). Als Puffersystem diente 1x TBE (II.7.2). Die Gelelektrophorese wurde mit vorgewärmten Gelen nach einem Vorlauf von 60 min. bei 2000 V bei einer Temperatur von 55^{0}C und 1700 V (≈31mA) durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 15 min. in 10% Essigsäure fixiert, mit Aqua bidest. abgespült und 60 -90 min. bei 80^{0}C getrocknet. Auf das trockene Gel wurde ein Röntgenfilm (KODAK,X-Omat XAR351) aufgelegt und bei Raumtemperatur 1-4 d exponiert.

7.8. DNA-Markierung mit Digoxigenin-dUTP

Die nicht radioaktive Markierung von DNA erfolgte unter Verwendung des Dig-DNA Labeling and Detection Systems der Firma BOEHRINGER MANNHEIM.Hierbei wurde linearisierte,denaturierte DNA nach Hybridisierung von Hexanukleotiden ("random primed"- Methode nach FEINBERG UND VOGELSTEIN, 1983) durch anschließenden Einbau von Nukleotiden (dATP, dCTP, dGTP, dTTT, Dig-dUTP) durch Klenow-Polymerase mit Digoxigenin-markierten dUTP markiert. Nach Hybridisierung an die Ziel-DNA folgte die Bindung eines Antikörperkonjugates (Anti-Digoxigenin Alkalische-Phosphatase-Konjugat) an das Steroid-Hapten. In einer nachfolgenden enzymkatalysierten Farbreaktion in Gegenwart von X-Phosphat (=5-Bromo-4-chlor-2-indolylphosphat) und NBT (=Nitroblau-Tetrazoliumsalz) wurde das Hybrid als blauer Komplex sichtbar. Der Markierungsansatz wurde über Nacht bei 37^{0}C inkubiert und bestand aus: 1µg DNA (linearisiert, 10 min. bei 100^{0}C denaturiert), 2µl Hexanukleotidgemisch (BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim), 2µl dNTP- Gemisch (je 1mM dATP, dCTP, dGTP, 0,65 mM dTTP, 0,35mM Dig-dUTP pH6,5), 1µl Klenow- Polymerase und Aqua bidest. bis zu einem Volumen von 20 µl. Die Reaktion wurde nach 24h durch Zugabe von 2µl EDTA-Lösung gestoppt (0,2M, pH 8,0), die markierte DNA gefällt, in 50 µl Aqua bidest. aufgenommen und bei -20^{0}C gelagert.

7.9. DNA-DNA Hybridisierung

7.9.1. DNA-DNA Hybridisierung nach SOUTHERN

Um spezifische DNA-Banden auf Agarosegelen nachzuweisen, wurde die auf 0,8% -igen Gelen getrennte DNA mit der von SOUTHERN, (1965) entwickelten Blot-Technik auf eine Trägermembran übertragen, denaturiert und mit einer geeigneten Dig-dUTP markierten DNA-Sonde hybridisiert. Die hybridisierten Banden wurden durch eine enzymkatalysierte Farbreaktion sichtbar gemacht (II.7.8.). DNA-Proben wurden durch Vakuum-Blotting (PHARMACIA LKB, Freiburg) auf Biodyne A Membranen (PALL, Dreieich) transferiert und 3 min. durch UV-Belichtung fixiert. Hybridisierung (68^{0}C über Nacht), Waschen der Membran und Detektion der Hybride, erfolgte wie vom Hersteller beschrieben (BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim).

7.9.2. Koloniehybridisierung

Die Methode der Koloniehybridisierung (GRUNSTEIN UND HOGNESS, 1975) diente zur schnellen Identifizierung rekombinanter Bakterienzellen auf festen Nährböden. Nach Übertragen der Kolonien auf Nylonfilter und alkalischer Denaturierung der DNA konnte gegen eine geeignete Dig-dUTP markierte DNA-Sonde hybridisiert und entsprechend der Methode detektiert werden (II.7.8.). Es wurden jeweils 100 rekombinante Bakterienklone zusammen mit einer Positiv- und einer Negativkontrolle auf einer Agarplatte mit Antibiotikum ausgestrichen. Nach Anwachsen der Klone über Nacht (*E.coli*) oder nach 2 d (*Z.mobilis*) wurden die Kolonien auf Nylonfilter (BIODYNE A, PALL, Dreieich) übertragen und durch zweimalige Inkubation (1 min.) in je 0,5 ml 0,5N NaOH aufgeschlossen und die DNA denaturiert. Nach Neutralisierung der Filter mit 1M Tris-HCL pH7,5 wurden diese zunächst luftgetrocknet und die DNA anschließend durch 3 minütige UV-Bestrahlung mit dem Filter vernetzt. Die nachfolgende Prähybridisierung, Hybridisierung (bei 68^{0}C) und Detektion der Hybride erfolgte nach Herstellerprotokoll (Dig-dUTP Labeling and Detection, BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim).

7.10. In vitro Verpackung von DNA in infektiöse Partikel des Phagen λ

Zur Herstellung einer Cosmid-Genbibliothek von *K.pneumoniae* wurde eine in vitro Verpackung von DNA in infektiöse Partikel des Phagen λ mit einem käuflichen "DNA-Verpackungs-Satz" (BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim,) durchgeführt. Das in vitro-Verpackungssystem (HOHN, 1979; HOHN UND COLLINS,1980) besteht aus den Zellextrakten zweier lysogener *E.coli*-Stämme, die verschiedene Mutationen in der Reifung der Phagenpartikel aufweisen. Einer der Stämme, mit einer amber-Mutation im Gen der Kopfkomponente D,ist nicht in der Lage DNA zu verpacken und reife Phagen zu produzieren; im Ultraschallextrakt dieses Stammes befinden sich daher unreife Phagenköpfe ("Preheads"). Der zweite Bakterienstamm kann aufgrund einer Mutation in der Hauptkopfkomponente E keine reifen Phagenpartikel bilden. Durch Mischung der beiden Zellextrakte, kompensieren sich die verschiedenen Defekte und die Inkorporation von DNA in die infektiösen Phagenpartikel ist möglich.
Für die Klonierung der Cosmide wurde der Cosmidvektor pHC79 (HOHN

UND COLLINS, 1980) mit dem Restriktionenzym BamHI gespalten und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert.Chromosomale DNA von *K.pneumoniae* KAY2026 wurde partiell mit dem Enzym Sau3A geschnitten (0,1 U/µg DNA; 30min. 37^{0}C) und Fragmente mit einer Größe von 20-50 kb wurden aus einem Agarosegel elektroeluiert. Die isolierten Sau3A-Fragmente wurden in die BamHI-Schnittstelle des Cosmidvektors ligiert (20 h 16^{0}C, dann Zugabe von 1U T4-DNA-Ligase, 6h 16^{0}C), wobei das molekulare Verhältnis von Insert zu Vektor bei etwa 6:1 lag. Die nachfolgende in vitro Verpackung der Cosmidkonstrukte in die Phagenpartikel erfolgte nach Herstellerprotokoll (BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim). Anschließend wurde der λ-sensitive *E.coli* Stamm HB101 (*xyl-5*) mit den infektiösen Phagenpartikeln infiziert ("Cosduktion") und die Selektion der Cosmidrekombinanten Klone erfolgte auf antibiotikahaltigen Nährbödenplatten.

8. Techniken zur Analyse von RNA

8.1. RNA-Markierung mit Digoxigenin-UTP

Für die Markierung von RNA wurde das Dig-RNA LABELING KIT der Firma BOEHRINGER MANNHEIM eingesetzt. Markierte RNA-Sonden werden dabei durch in vitro Transkription einer DNA-Matrize, die hinter einen SP6- oder T7 Promotor kloniert wurde (pGEM7Zf$^+$, PROMEGA, Heidelberg), durch SP6- oder T7-RNA- Polymerase- Aktivität unter Einbau von Digoxigenin-markiertem UTP hergestellt ("run off" Transkripte). Der Markierungsansatz wurde 2 h bei 37^{0}C inkubiert und enthielt in einem Volumen von 20µl: 1µg linearisierte DNA- Matrize, 2µl Nukleotidgemisch (je 1mM ATP, CTP, GTP, 0,65 mM UTP, 0,35mM Dig-UTP), 2µl Transkriptionspuffer, 1ul RNAse-Inhibitor, 40U SP6- oder T7-RNA-Polymerase. Durch Zugabe von 2µl DNAseI (RNAse frei) wurde die Matrizen-DNA anschließend entfernt (15min. 37^{0}C), die Reaktion durch 2µl 0,2M EDTA pH 8,0 abgestoppt und die markierten RNA-Transkripte mit LiCL/Ethanol gefällt. Die getrokknete RNA (≈ 10µg) wurde in 100µl RNAse freiem Aqua bidest. gelöst und bei -20^{0}C aufbewahrt.

8.2. RNA-Markierung mit α^{35}S-CTP

Die radioaktive Markierung von RNA wurde mit dem SP6/ T7- Transkriptions-System (BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim) durchgeführt. Das Prinzip beruht auf der in vitro Transkription eines DNA-Fragmentes hinter einem SP6- oder T7-Promotor mit der entsprechenden RNA-Polymerase, unter Einbau von radioaktiv markierten Nukleotiden. Der Standardansatz bestand aus: 0,5µg linearisierter DNA, 3µl Nukleotidgemisch (je 0,5mM ATP, GTP, UTP),2µl Transkriptionspuffer, 5µl [α-^{35}S]-CTP (1000Ci/mmol), 1µl RNAse-Inhibitor, 10U SP6- oder T7-RNA-Polymerase und Aqua bidest. in 20µl Gesamtvolumen. Der Ansatz wurde 30 min. bei 37^{0}C inkubiert. Danach wurden 2µl DNAseI (RNAse frei) zugegeben, weitere 15 min. bei 37^{0}C inkubiert und die Reaktion anschließend 10 min. bei 65^{0}C mit 2µl EDTA (0,2M pH8) abgestoppt. Zur Entfernung nicht eingebauter Radionuklide wurde die RNA einmal mit Phenol/Chloroform/IAA und mit Chloroform/IAA extrahiert und zweimal mit 1/6 Volumen 5M Ammoniumacetat und 2 Volumen Ethanol gefällt (SAMBROOK ET AL., 1989). Die RNA-Sonde wurde anschließend in 100µl RNAse freiem Aqua bidest. gelöst und bei -20^{0}C aufbewahrt. Für Hybridisierungsexperimente wurde 1µl dieser RNA-Probe (≈ 1-5x 10^5 dpm) eingesetzt.

8.3. RNA-RNA Hybridisierung

Northern Blot

Zur Bestimmung der Transkriptlänge der Xylose-Gene aus *K.pneumoniae* wurde eine geeignete Dig-UTP-markierte RNA-Sonde (II.8.1.) gegen Gesamt-RNA aus *K.pneumoniae* bzw. gegen plasmidkodierte xylmRNA hybridisiert. Dazu wurde die Gesamt-RNA auf einem 0,8% Formaldehyd-Agarosegel (SAMBROOK ET AL., 1989) aufgetrennt, durch Vakuumtransfer (Vakuum-Blot PHARMACIA LKB, Freiburg) auf NY13N NYTRAN Transfermembranen (SCHLEICHER& SCHÜLL, Dassel CH) übertragen und 3 min. durch UV-Belichtung fixiert. Die Hybridisierung (46^{0}C über Nacht) gegen die geeignete Dig-UTP-RNA-Sonde, das Waschen der Membran und die anschließende Detektion erfolgte mit den entsprechenden Variationen für RNA: RNA Hybridisierungen nach Herstellerprotokoll (Dig-DNA Labeling and Detection System, BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim).

8.4. Bestimmung von Transkriptionstartpunkten

Zur Festlegung der Promotorregion des Xylose-Operons von *K.pneumoniae* wurde ein RNAse-Schutz-Experiment nach SAMBROOK ET AL., (1989) durchgeführt. Dazu wurde eine geeignete universell [α-^{35}S]-CTP- markierte "antisense"- RNA-Sonde (II.8.2.; definiertes Fragment mit bekannter Sequenz, welches den Promotorbereich enthält) mit 100µg frisch denaturierter RNA aus *K.pneumoniae* für 12h bei 45^{0}C in 30 µl Hybridisierungspuffer (40mM PIPES pH 6,4; 1mM EDTA, 0,4M NaCl, 80% Formamid) inkubiert. Anschließend wurden nicht komplementäre, einzelsträngige RNA-Fragmente mit RNAse T1 und RNAse A (BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim) abgespalten, die Hybride aufgereinigt und gefällt wie bei SAMBROOK ET AL., (1989), beschrieben. Die Größenbestimmung der RNA: RNA- Hybride erfolgte nach Denaturierung mittels eines 6% Acrylamid/ 7M Harnstoff Gels, auf dem verschiedene radioaktiv markierte RNA- und DNA-Standards definierter Länge mitgeführt wurden.

9. Bestimmung von Enzymaktivitäten und ATP im Rohextrakt

9.1. Herstellung von zellfreien Rohextrakten

Die Anzucht der Zellen erfolgte, soweit nicht anders vermerkt, in 50 ml Minimalmedium mit 0,4% Glycerin und 0,1% D-Xylose über Nacht bei 37°C (*E.coli*) bzw. über 2d bei 30°C in 100-150 ml Mineralsalzmedium mit 5% Fruktose und 0,1% D-Xylose (*Z.mobilis*). Die Zellen wurden durch Zentrifugation (BECKMAN Kühlzentrifuge GPKR, 10 min.,4000 Upm,4°C) geerntet, 1x mit Aufschlußpuffer (10mM Tris -HCl, 10mM $MgCl_2$, 1mM DTT, pH7,6) gewaschen und in 0,9ml desselben Puffers aufgenommen. Der Zellaufschluß erfolgte in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß unter Eiskühlung mit einem BRANSON SONIFIER B15 (BRANSON SONIC POWER, Danburg,USA) mit konischem Mikrotip. Es wurde kontinuierlich für 2x30 sec.bei maximaler Leistung (output 4= 60 W) beschallt. Zwischen den Beschallungsvorgängen wurden die Proben für 1 min auf Eis gekühlt. Danach wurden die unlöslichen Zellfragmente durch Zentrifugation (SIGMA-Kühlzentrifuge, 20 min., 13000 Upm, 4°C) sedimentiert. Der Überstand wurde entweder direkt in die entsprechenden Enzymtests eingesetzt oder

noch zusätzlich zur Abtrennung von Membranfragmenten (Entfernung der "NADH- bzw. NADPH-Oxidase") für 2h bei 45000 Upm und 4^0C zentrifugiert (UZ-Extrakte; Ultrazentrifuge L8-70M, BECKMAN Instruments,Inc.,Calif., USA). Um auch noch niedermolekulare Metabolite zu entfernen, wurden die Rohextrakte anschließend, wenn erforderlich, über eine NAP10^{TM}-Säule (PHARMACIA LKB, Freiburg) aufgereinigt.

9.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Proteine aus UZ-Rohextrakten wurden elektrophoretisch auf 10%-igen SDS-PAGE- Gelen, nach der Methode von LÄMMLI,(1970), aufgetrennt. Als Puffersystem diente dabei Tris-Glycin (50mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS). Die Anfärbung der Gele erfolgte in 0,1% Coomassie Brillant Blue, 7,5% Eisessig,30% Methanol. Die Entfärbung (15% Methanol, 7% Eisessig) erfolgte unter leichtem Bewegen bis die Proteinbanden sichtbar wurden.

9.3. Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der Rohextrakte wurde nach der Methode von BRADFORD, (1976) bestimmt, wobei Rinderserumalbumin als Eichsubstanz diente.

9.4. Testansätze

Die Messungen erfolgten bei der jeweils angegebenen Temperatur in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1cm. Die Reaktionen wurden, wenn nicht anders vermerkt, durch Zugabe von Rohextrakt gestartet und die Zu- bzw. Abnahme der Extinktion bei 365nm gemessen. Die Bestimmung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit erfolgte über einen angeschlossenen Monitor (SHIMADZU UV160; SHIMADZU, Düsseldorf). Die spezifischen Aktivitäten wurden als U/mg Protein berechnet, wobei eine Enzymeinheit (1U) 1 µmol umgesetztes Substrat pro min entspricht. Zur Berechnung wurde für NAD(P)H ein Extinktionskoeffizient ϵ_{365} von 3,4 ($l \cdot mmol^{-1} \cdot cm^{-1}$) eingesetzt.

1. Xyloseisomerase (E.C.5.3.1.5.)
(modifiziert nach SCHELLENBERG ET AL., 1984)

Die Messung der Xyloseisomerase erfolgte diskontinuierlich. Rohextrakte wurden 10 min. bei 35^{0}C in Xylose haltigem Puffer inkubiert (Testansatz I), die Reaktion (750µl) dann mit 0,25 ml 70% Perchlorsäure auf Eis abgestoppt und nach 15 min. mit 1,5 ml 2M $KHCO_3$ neutralisiert. Nach Zentrifugation des gefällten Proteins (SIGMA Kühlzentrifuge MK202, SIGMA GmbH, Deisenhofen), wurde die gebildete Xylulose im Überstand mit Sorbit-Dehydrogenase und NADH bei 30^{0}C (Testansatz II) mit Hilfe einer Eichkurve entsprechend behandelter Xyluloselösungen bekannter Konzentrationen quantifiziert.

I. Testansatz:		Konz. im Test (mM)
0,8 ml Testpuffer pH 6,6	(333mM D-Xylose	266
	50mM Maleinsäure	40
	5mM $MnCl_2$	4
0,2 ml Rohextrakt		

II.Testansatz:	Konz. im Test (mM)
0,9 ml 50mM Tris-HCl pH 7,5	45
0,01 ml 35mM NADH (in 50mM Tris-HCl, pH 8,1)	0,35
0,01 ml 0,85 mg/ml(Enzymprotein) Sorbit-Dehydrogenase	0,34 U
0,08 ml Reaktionsmix I. oder Xyluloselösung	0,2-4

2. Xylulokinase (E.C.2.7.1.17)

Die Xylulokinase wurde in einem neu entwickelten, diskontinuierlichen Testsystem gemessen, in dem Rohextrakte für 10 min. bei 35^{0}C in Gegenwart von Xylulose und ATP inkubiert wurden (Testansatz I). Die Reaktion wurde dann durch 30 sec. Erhitzen auf 100^{0}C abgestoppt und das gebildete Xylulose-5-Phosphat anschließend im proteinfreien Überstand in einem gekoppelten Enzymtest bei 30^{0}C mit verschiedenen Hilfsenzymen bestimmt (Testansatz II). Die Xylulose-5-Phosphat-Konzentrationen ergaben sich aus einer Eichkurve mit bekannten Xylulose-5-Phosphatlösungen.

I.Reaktionsansatz	Konz. im Test (mM)
0,1 ml Testpuffer pH 7,8 (50mM Tris-HCL	25
50mM KCL	25
1mM EDTA	0,5
100mM ATP)	50
0,02 ml 500mM Xylulose	50
0,04 ml Aqua bidest.	
0,04 ml Rohextrakt	

II.Testansatz:	Konz. im Test (mM)
0,408 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$; pH7,8	40/8
0,005 ml 100 mM Erythrose-4-Phosphat	1
0,010 ml 20 U/ml Transketolase	0,4 U
0,015 ml 35 mM $NADP^+$	1,0
0,005 ml 10 mM Thiaminpyrophosphat	0,1
0,001 ml 10 mg/ml Phosphoglukose-Isomerase	3,5 U
0,001 ml 5 mg/ml Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase	1,8 U
0,015 ml Aqua bidest.	
0,040 ml Reaktionsansatz I oder Xylulose-5-Phosphat	0,1-4

3. Aldose-Reduktase (E.C.1.1.1.21)
(modifiziert nach VIIKARI UND KORHOLA, 1986)

Die Messung der Aldose-Reduktase-Aktivität von *Z.mobilis* Zellen, die in Komplexmedium mit 5% Glukose oder Fruktose gewachsen waren, erfolgte bei 25^0C und 340 nm. Als Extinktionskoeffizient für NADPH wurde 6,22 ($l \cdot mmol^{-1} \cdot cm^{-1}$) verwendet.

Testansatz:	Konz. im Test (mM)
1,325 ml 0,27 M D-Xylose bzw. andere Aldose in 50mM McIlvaine pH 8,0	242
0,1 ml 5mM NADPH	0,34
0,05 ml Rohextrakt (UZ)	

4. Transketolase (E.C.2.2.1.1.)
(modifiziert nach JOSEPHSON UND FRAENKEL, 1969)

Die Messung der Transketolase in UZ-Rohextrakten von *E.coli* und rekombinanten *Z.mobilis* Stämmen erfolgte bei 365 nm und 30^0C.

Testansatz:	Konz. im Test (mM)
0,425 ml 50 mM Tris-HCl; 10 mM $MgCl_2$	42/ 8,4
0,005 ml 50 mM Ribose-5-Phosphat	0,5
0,005 ml 50 mM Xylulose-5-Phosphat	0,5
0,005 ml 25 mM Thiaminpyrophosphat	0,25
0,005 ml 20 mM NADH	0,20
0,005 ml Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase/	0,85U
Triose-Phosphat-Isomerase (GDH/TIM)	2,50U
0,050 ml Rohextrakt (UZ)	

5. Transaldolase (E.C.2.2.1.2)
(modifiziert nach TCHOLA UND HORECKER, 1966)

Die Messung der Transaldolase in *E.coli* und *Z.mobilis* erfolgte bei 340 nm und 25^{0}C.

Testansatz:	Konz. im Test (mM)
0,418 ml 100 mM Triethanolamin , pH 7,8	84
20 mM EDTA	17
0,015 ml 140 mM Fruktose-6-Phosphat	33
0,005 ml 15 mM NADH	0,15
0,002 ml Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase/	0,34U
Triose-Phosphat-Isomerase (GDH/TIM)	1,0 U
0,050 ml Rohextrakt (UZ)	
5 min. bei 25^{0}C äquilibrieren, dann Start mit:	
0,010 ml 30 mM Erythrose-4-Phosphat	0,6

6. D-Ribose-5-Phosphat-Isomerase (E.C.5.3.1.6.)
(nach WOOD, 1969)

Der Ribose-5-Phosphat-Isomerase-Test basiert auf der durch Isomerisierung von Ribose-5-Phosphat zu Ribulose-5-Phosphat hervorgerufenen Absorptionszunahme bei 290 nm (37^{0}C) bis zur Gleichgewichtseinstellung. Der Extinktionskoeffizient beträgt nach WOOD, (1969) 0,072 $l \cdot mmol^{-1} \cdot cm^{-1}$. Die Messung des Enzyms erfolgte in *E.coli* und *Z.mobilis* Zellen, die in Komplettmedium mit Glukose gewachsen waren und nach Zellaufschluß noch zusätzlich ultra-

zentrifugiert, sowie über eine NAP10-Säule von niedermolekularen Metaboliten befreit worden waren.

Testansatz:	Konz. im Test (mM)
0,8 ml 100 mM Tris-HCl, pH 7,4	80
0,1 ml 100 mM Ribose-5-Phosphat	10
0,1 ml Rohextrakt (UZ, NAP™-10)	

7. D-Ribulose-5-Phosphat-Epimerase (E.C.5.1.3.1.)
(nach WOOD, 1969)

Die Messung der Epimerase erfolgte nach dem Prinzip des Isomerase -Tests bei 290 nm, wobei jedoch ein Überschuß von D-Ribose-5-Phosphat-Isomerase zugesetzt wurde, der zur schnellen Gleichgewichtseinstellung führte. Durch anschließende Zugabe der Epimerase bzw. des Rohextraktes folgte eine weitere Extinktionszunahme, die auf der Bildung von Xylulose-5-Phosphat beruhte.

Testansatz:	Konz. im Test (mM)
0,8 ml 100 mM Tris-HCl, pH 7,4	80
0,1 ml 100 mM Ribose-5-Phosphat	10
0,002 ml D-Ribose-5-Phosphat-Isomerase (200-400U/mg)	2U
5 min. 37°C bis zur Gleichgewichtseinstellung, dann Start:	
0,1 ml Rohextrakt (UZ, NAP™-10)	

Neben den photometrischen Aktivitätsbestimmungen der Enzyme des Pentose-Phosphat-Weges, wurden die Reaktionsprodukte zusätzlich noch mittels Zuckeranalysator (BIOTRONIK) nachgewiesen und teilweise quantifiziert. Dazu wurden die Testansätze jeweils 10-30 min. bei 37°C inkubiert, die Reaktion anschließend 30 sec. bei 100°C abgestoppt, die proteinfreien Ansätze mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert und die Zucker im Zuckeranalysator (II. 10.2.) bestimmt.

9.5. ATP-Bestimmung

(modifiziert nach Boehringer Mannheim, 1984)

ATP wurde mit Glukose durch Hexokinase quantitativ zu Glukose-6-Phosphat umgesetzt. In Gegenwart von Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase wird Glukose-6-Phosphat von $NADP^+$ oxidiert. Die während der Reaktion gebildete NADPH+ H^+-Menge ist der ATP- Konzentration äquivalent. Die Messung erfolgte bei 340 nm und 25^0C.

Testansatz:	Konz. im Test (mM)
0,522 ml Aqua. bidest.	
0,35 ml 0,75M Triethanolamin; 0,01M $MgSO_4$;pH7,6	250/3
0,004 ml 10mg/ml Hexokinase	≈6U
0,004 ml 5mg/ml Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase	≈3U
0,010 ml 0,2M $NADP^+$	2
0,010 ml 1M Glukose	10
E_1 (340 nm) messen, dann Start mit:	
0,100 ml ATP-Lösung oder Rohextrakt	0,01-0,1
E_2 (340 nm) nach Ablauf der Reaktion messen	(≈ 20 min.)

10. Bestimmung interner Zucker- und Zuckerphosphatkonzentrationen mit Hilfe der Silikonölzentrifugation

10.1. Silikonölzentrifugation

Zur Bestimmung interner Metabolite in *Z.mobilis* Kulturen (OD_{600} ≥4) wurden die Zellen mit der Methode der Silikonölzentrifugation in Perchlorsäure aufgeschlossen, (KLINGENBERG UND PFAFF, 1967). Hierzu wurden 30µl 20%-ige Perchlorsäure und 65µl Silikonöl (Dichte 1,03 g/cm, Silikonöl PN200 BAYER, Leverkusen) in 400µl BECKMAN-Reaktionsgefäße pipettiert, 30sec. zentrifugiert (EPPENDORF Mikrofuge E), so daß sich die Ölschicht über der Perchlorsäure befand. Auf 20-40 dieser Röhrchen wurden je 200 µl Kultur gegeben. Durch Zentrifugation der Zellen in die Perchlorsäure, erfolgte ein schneller Aufschluß und Trennung vom Medium. Zur Aufarbeitung des Zellsedimentes wurde die Perchlorsäurephase mit einem Skalpell abgetrennt, die Spitze des Röhrchens invers in ein 750µl EPPENDORF- Reaktionsgefäß überführt und 2 min. zentrifu-

giert. Das Sediment wurde resuspendiert und die Zellen anschließend durch 5-minütige Beschallung im Ultraschallbad homogenisiert. Zur Neutralisierung wurden die Proben mit 25µl einer 5M KOH/ 1M Triäthanolamin-Lösung versetzt, (30min.-20^{0}C). Kaliumperchlorat, Zelltrümmer und Öl wurden durch Zentrifugation (EPPENDORF-Zentrifuge 5 min.,13000 Upm) vom Überstand getrennt. Die Überstände der 20-40 aufgearbeiteten Proben wurden anschließend vereinigt, um genügend Material für die Analysen zu haben. Die internen Metabolitkonzentrationen konnten aus der ermittelten Konzentration, unter Einbeziehung des Trockengewichts und des Cytoplasmavolumens, errechnet werden.

10.2. Nachweis von Aldosen und Ketosen mittels Borat-Komplex-Chromatographie mit Anionenaustauscher

Die Auftrennung von reduzierenden Zuckern in Boratform erfolgte nach KHYM UND ZILL, (1951) mit dem BIOTRONIK-Gerät LC2000 (BIOTRONIK, Maintal). Unter alkalischen Bedingungen bilden Zuckermoleküle mit Kaliumborat anionische Boratkomplexe, die mit dem basischen Säulenmaterial in Wechselwirkung treten. Kaliumboratpuffer steigender Konzentration bewirken bei ansteigendem alkalischen pH, sukzessiv die Ablösung vom Ionenaustauscher. Durch Zusatz von Cu^{2+}/ Bicinchoninat wird der eluierte Zucker-Borat-Komplex bei hoher Temperatur (100^{0}C) oxidiert, wobei ein farbiger Cu^{1+}/ Bicinchoninat-Komplex entsteht, der bei 570 nm im Durchflußphotometer gemessen wird.

<u>Analysenbedingungen:</u>

Vorsäule: 1x 9 cm; DOWEX 1X4, 200-400 mesh (BIOTRONIK,Maintal)
Trennsäule: 0,6x 30 cm; Durrum DA-X-4-20 (DIONEX, Weiterstedt)
Temperatur: 60^{0}C
Puffer zur Äqulibrierung: A 0,1 M KBO_3, pH 8,0 (45 min.)
zur Elution : B 0,2 M KBO_3, pH 8,15 (60 min.)
: C 0,4 M KBO_3, pH 9,45 (120 min.)
zur Regenerierung: F 10% (w/v) Tetraborat (45 min.)
Nachweisreagenz: Na-Bicinchoninat 1,0 g/l
K_2CO_3 209,5 g/l
Asparaginsäure 1,85 g/l
$CuSO_4x5H_2O$ 0,5 g/l
Pumpenleistung: Pufferpumpe 60 ml/h
Reagenzpumpe 60 ml/h
Probenvolumen: 20-500µl
Probenkonzentration: 5-50 nmol

Alle eingesetzten Puffer wurden zuvor filtriert (Membrabfilter 0,2 µm; PALL, Dreieich)

Zur Quantifizierung der verschiedenen Zucker wurden für die einzelnen Zucker, Eichkurven mit bekannten Konzentrationen hergestellt. Für die zu analysierenden Zucker ergaben sich folgende Retentionszeiten:

Zucker	Retentionszeit (min)
D-Erythrose	82
D-Fruktose	101
D-Glukose	161
D-Glycerinaldehyd	82
D-Ribose	83
D-Ribulose	104
D-Sedoheptulose	105
D-Xylose	122
D-Xylulose	80

Alkalische Phospatase-Behandlung

Zur Überführung phosphorylierter Zucker bzw.- Zuckeralkohole in ihre nicht phosporylierte Form wurde eine alkalische Phosphatase-Behandlung durchgeführt. Dazu wurden 400µl Zellextrakt (II.10.1) mit 200µl PIPES-Puffer (0,2M, pH 8,4) und 12U alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) 1h bei 37^{0}C dephosphoryliert. Die Extrakte konnten im folgenden direkt analysiert werden, oder wurden bei -20^{0}C aufbewahrt.

10.3. Nachweis von Zuckeralkoholen

Photometrischer Test

Zur Quantifizierung von Xylit und Sorbit wurde ein Farb-Test nach BOEHRINGER MANNHEIM (Lebensmittelanalytik) durchgeführt. Dabei werden die Zuckeralkohole mit NAD^+ mittels Sorbit-Dehydrogenase zur Ketose und $NADH+H^+$ umgesetzt. $NADH+H^+$ wird mit dem Enzym Diaphorase oxidiert, wobei Jodnitrotetrazoliumchlorid (INT) reduziert wird. In dieser irreversiblen Reaktion entsteht ein Formazan, dessen Absorption im Maximum bei 492nm meßbar ist (Extink-

tionskoeffizient ϵ= 19,9 ($l \cdot mmol^{-1} \cdot cm^{-1}$).
Die Durchführung und Berechnung erfolgte wie von BOEHRINGER beschrieben mit einem Testansatz bestehend aus: 0,5 ml Puffer (200 mM Triäthanolamin, 50 mM K_2HPO_4; pH8,6), 0,1 ml NAD^+/ Diaphorase-Lösung (13 mM NAD^+, 3,4 U/ml Diaphorase), 0,1 ml INT (1,2mM), 0,7 ml Aqua bidest., 0,05 ml Probe (≤0,1mg/ml Zuckeralkohol) und 0,01 ml Sorbit-Dehydrogenase (30 mg Lyophilisat/ml).
Zur Unterscheidung zwischen Sorbit und Xylit wurde eine spezifische Sorbit-Bestimmung nach der Hexokinase-Methode (BOEHRINGER MANNHEIM, (Lebensmittelchemie) angeschlossen. Aus der Differenz der in den beiden Tests ermittelten "Sorbit- Konzentrationen" konnte die jeweilige Xylit-Konzentration ermittelt werden.

Qualitativer Plattentest

Für die Suche Aldose-Reduktase negativer Mutanten wurde ein Plattentest zum qualitativen Xylit- Nachweis entwickelt. Die mutagenisierten *Z.mobilis* Kolonien wurden auf Vollmediumplatten mit 5% Fruktose und 2% Xylose ausgestrichen (Xylit-Produktionsmedium; 50 Kolonien/Platte) und 2d bei 30^0C inkubiert. Anschliessend wurde ein Nylonfilter BIODYNE A (PALL,Dreieich) für 10 min. auf die Platten gelegt, damit ausgeschiedenes Xylit in den Filter diffundieren konnte. Nach vorsichtigem Abziehen der Filter wurden diese in eine Petrischale gelegt und die Kolonieumgebung mit etwa 10µl Testlösung versetzt, (Zusammensetzung wie im photometrischen Test). Nach 10-30 minütiger Reaktionszeit wurde die Färbung der Kolonieumgebung ausgewertet. Kolonien mit schwacher Färbung wurden gesammelt, (geringe Xylitolbildung) und mittels photometrischem Test und Aldose-Reduktase-Enzymtest weiter untersucht.

11. Umsatz von 14C-[U]-Xylose

Die Anzucht der *Z.mobilis* Stämme erfolgte über Nacht in Vollmedium mit 5% Glukose. Die Zellen wurden morgens steril abzentrifugiert (BECKMAN Kühlzentrifuge, 3500 Upm,5 min. 4^0C), einmal in Vollmedium mit 2% Fruktose gewaschen und das Sediment 20-fach konzentriert in frischem Medium resuspendiert. Die Hauptkultur

(3ml Vollmedium+ 2% Fruktose+ 2%Xylose) in "Warburg-Gefäßen" wurde mit 1µCi ^{14}C-[U]-Xylose versetzt, die Radioaktivität des Mediums vor Zugabe der Zellen bestimmt und anschließend mit der gewaschenen Vorkultur beimpft ($OD_{600} \approx 4$). Die Kulturen wurden bei 55 Upm und 30^0C geschüttelt und das gebildete CO_2 mit 200µl 2N NaOH (im "Warburg-Arm") aus dem Carbonat-Gleichgewicht entzogen. Über einen Zeitraum von 2 d wurde täglich eine Probe Kulturmedium sowie die NaOH entnommen. Die Radioaktivität wurde im Szintillationszähler gemessen. Die Kultur wurde täglich mit 1% Fruktose versetzt, um die Überlebensrate von *Z.mobilis* zu erhöhen. Als Positivkontrolle wurde eine *E.coli* Mutante DC1091/ pZM134 eingesetzt, die aufgrund einer defekten Pyruvat-Formiat-Lyase und der Anwesenheit der Pyruvat-Decarboxylase auf dem Plasmid pZM134, Xylose (und andere Kohlenstoffquellen), weitgehend zu Ethanol und CO_2 vergärt.

III. Ergebnisse

1. Klonierung und molekularbiologische Charakterisierung des Xylose- Operons aus *Klebsiella pneumoniae* KAY 2026

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war es erforderlich, einen geeigneten Organismus zur Isolierung der Gene für Xyloseisomerase und Xylulokinase, auszuwählen. Das gram- negative Enterobakterium *K. pneumoniae* KAY2026 (SPRENGER UND LENGELER, 1984), bot sich aus folgenden Gründen als Donorstamm des Xylose-Operons an:

- guter gram- negativer Xylose- Vergärer
- Charakterisierung der heterologen *xyl*- DNA in *rec*$^+$ *E.coli* *xyl*$^-$ Mutanten möglich

1.1. Herstellung einer Cosmid-Genbank aus *K. pneumoniae* KAY 2026 und Isolierung der Xylose- Gene

Zur Isolierung des Xylose-Operons aus *K.pneumoniae* KAY2026 wurde eine Cosmid- Genbibliothek in dem Cosmid-Vektor pHC79 (HOHN UND COLLINS, 1980) angelegt. Bei einer angenommenen Genomgröße des Bakteriums von etwa 4x 10^3 kb und einer durchschnittlichen Verpackung von 30-45kb großen Fragmenten in den Vektor pHC79, reichen 300-500 Cosmid- Klone aus, um das Genom abzudecken, (GLOVER, 1985). Chromosomale DNA aus *K.pneumoniae* KAY2026 wurde mit dem Restriktionsenzym Sau3A partiell gespalten, Fragmente mit einer Größe von 30-50kb aus einem Agarosegel isoliert und in die BamHI-Schnittstelle des Vektors pHC79 ligiert. Nach *in vitro* Verpackung der Plasmide durch die Phagenenzymextrakte wurde der λ-sensitive *E.coli* Stamm HB101, der eine Mutation im Xyloseisomerarase- Gen trägt, mit dem Phagenlysat infiziert und auf LB-Agarplatten mit Ampicillin selektioniert, (Abb.1). Aus der "Cosduktion" gingen 610 Amp-resistente Klone hervor. Diese Kolonien wurden auf LB-Nährböden mit Tetracyclin ausgestrichen, um zu überprüfen, ob die isolierten Cosmid- Klone chromosomale DNA-Inserts trugen. Die Insertion von DNA- Fragmenten in die BamHI-Schnittstelle des Vektors pHC79 sollte zur Inaktivierung des Tetracyclinresistenzgens führen. 92% der isolierten Kolonien waren sensitiv gegenüber Tet-

racyclin, d.h.trugen DNA-Inserts. In einer nachfolgenden Schnellplasmidpräparation aus 24 Cosmid-Klonen wurde die mittlere Größe der DNA-Inserts bestimmt; sie lag bei 35-40 kb.

Anschließend wurden alle Kolonien der Genbank auf McConkey-Platten mit 1% Xylose und Ampicillin ausgestrichen, um solche Kolonien zu finden, bei denen die *xylA*- Mutation des Stammes *E.coli* HB101 durch das Cosmid komplementiert wurde. Unter den getesteten Kolonien zeigten zwei Klone eine starke Rotfärbung auf McConkey+ Xylose-Platten. Die Rotfärbung beruht auf der Säureproduktion beim Wachstum auf Xylose und deutet auf die Komplementation des *xylA* Defektes hin. Die beiden Cosmide trugen damit zumindest das xylA- Gen des Xylose-Operons.
Im folgenden wurde das Plasmidmuster der beiden isolierten xyl^+-Cosmide nach verschiedenen Restriktionen untersucht. Die Cosmide pZY200-1 bzw.-2 zeichneten sich durch verschiedene Restriktionsmuster aus,wobei jedoch einzelne Fragmente beiden Konstrukten gemeinsam waren, (in beiden Cosmiden vorhanden war, z.B. nach Restriktion mit EcoRI: 5kb Fragment; mit BamHI: 20kb Fragment; mit SmaI: 9kb Fragment). Hieraus war zu schließen, daß die zwei Klone unabhängig voneinander entstanden waren und beide Anteile der Xylose-Gene trugen. Das Cosmid pZY200-1 war ≈40 kb groß, das Plasmid pZY200-2 etwa 55kb.
Um zu überprüfen, ob die isolierten Cosmide auch das xylB Gen für die Xylulokinase kodierten, wurde eine λ-Cosduktion (λ_{vir}) in die *xylAB*$^-$ Mutante *E.coli* LR2-168 durchgeführt. Dazu wurden exponentiell wachsende *E.coli* HB101/ pZY200-1 bzw. -2 Stämme mit dem Phagen λ_{vir} lysiert, wobei die Cosmid-DNA in Phagenköpfe verpackt wurde. Das gewonnene, sterilfiltrierte Phagenlysat diente zur Infektion der Mutante *E.coli* LR2-168, und die Selektion der cosmidtragenden Klone erfolgte auf McConkey+Xyl+ Amp-Platten. Das Plasmid pZY200-1 komplementierte sowohl *xylA* als auch *xylB*$^-$ Mutanten auf McConkey+ Xylose-Platten. Das Cosmid pZY200-2 komplementierte *xylB*$^-$ Mutanten nicht, kodierte daher nicht für die Xylulokinase und wurde im folgenden nicht weiter untersucht.

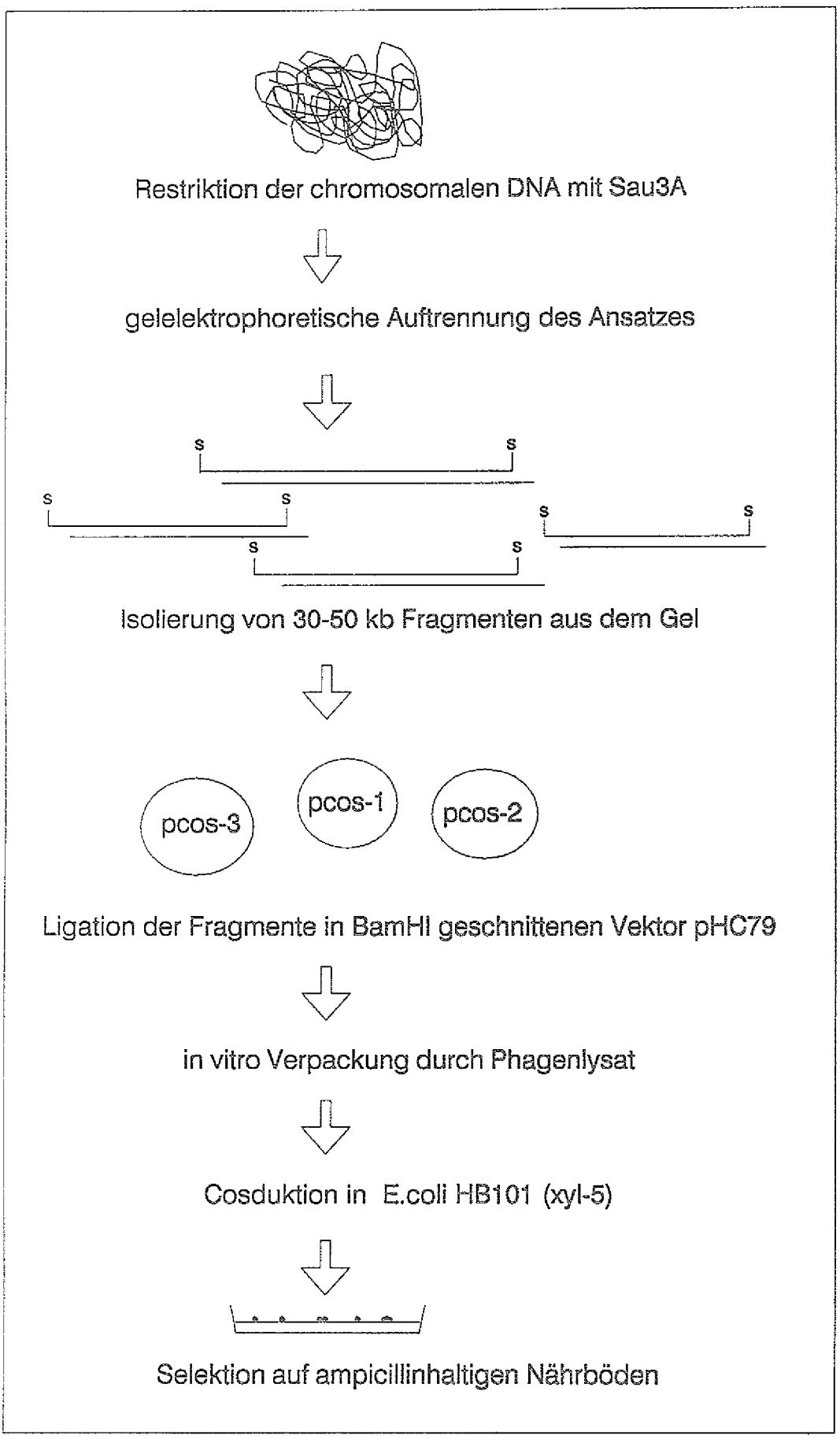


Abb.1: Schema der Cosmid-Klonierung

Vor einer weiteren Charakterisierung des isolierten Xylose-Operons war es notwendig, die Xylose-Gene zunächst subzuklonieren. Die Cosmid-DNA pZY200-1, die zuvor durch isopyknische Zentrifugation gereinigt worden war, wurde vollständig mit dem Restriktionsenzym KpnI geschnitten und das erhaltene Fragment-Gemisch in den ebenfalls mit KpnI geöffneten Vektor pUC19 ligiert. Der Ligationsansatz wurde in den Stamm *E.coli* HB101 transformiert und die Selektion erfolgte auf ampicillinhaltigen McConkey-Platten mit 1% Xylose. Unter 35 erhaltenen Transformanden komplementierte ein Klon den *xylA*-Defekt des Stammes *E.coli* HB101. Das Plasmid pZY190 wurde in die zur Verfügung stehenden *xyl*$^-$Mutanten *E.coli* LR2-168 (*xylAB*) und *E.coli* L233 (*xylB*) transformiert. Durch Komplementationsanalyse der Transformanden auf McConkey+ Xylose-Platten und durch nachfolgende Enzymtests wurde bestätigt, daß auch das xylB-Gen vollständig auf dem Konstrukt pZY190 vorlag.

1.2. Restriktionkartierung der Xylose-Gene auf dem Plasmid pZY190 und Transposonmutagenese der Plasmide pZY190 und pZY240

Das Plasmid pZY190 wurde zunächst durch Restriktionskartierung näher charakterisiert, bevor die Lage der Gene xylA und xylB auf dem 14,9 kb großen KpnI-Fragment mittels Tn1725-Mutagenese (nach UBBEN UND SCHMITT, 1986) eingegrenzt wurde.
Durch isopyknische Zentrifugation gereinigte Plasmid-DNA wurde mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen gespalten und die DNA-Fragmente anschließend zur Analyse auf Agarose-Gelen aufgetrennt. Die Größe der DNA-Fragmente wurde anhand mitgeführter Molekulargewichtsmarker bestimmt. Abb. 2A zeigt die ermittelte Restriktionskarte des Plasmids pZY190.
Zur Ermittlung der Position der Gene xylA und B auf dem 14,9 kb großen chromosomalen KpnI-Fragment, wurde eine Transposonmutagenese durchgeführt. Dazu wurde das Plasmid pZY190 in den Stamm *E. coli* MV12 pR_{ts}::Tn1725, transformiert. Die Selektion der Transformanden erfolgte auf LB-Nährböden mit Chloramphenicol (zur Selektion auf das Transposon Tn1725) und Ampicillin (zur Selektion auf pZY190). Die erhaltenen 20 Transformanden wurden im Sektorausstrich auf den gleichen Nährboden überstrichen, über Nacht bei 37^0C und anschließend für 4d bei 30^0C inkubiert. In diesem Zeitraum finden Transpositionsereignisse von Tn1725 statt, die bevor-

zugt in Plasmide erfolgen, (UBBEN UND SCHMITT, 1986). Von 20 Kolonien wurden Plasmidschnellpräparationen durchgeführt und die Plasmid-DNA in die *E.coli xylA* Mutante HB101 transformiert. Die Transformanden wurden auf LB-Platten, versetzt mit Chloramphenicol und Ampicillin, selektioniert. Die nachfolgende Differenzierung erfolgte auf McConkey+Xylose- Platten und den entsprechenden Antibiotika.Aus jedem Transformationsansatz gingen rote und weisse Kolonien hervor. Diese verschiedenen Phänotypen ließen den Schluß zu, daß bei den weißen Kolonien die Transposoninsertion in das Xylose-Operon, wahrscheinlich in das xylA-Gen erfolgt war und die roten Kolonien das Transposon im xylB-Gen oder jenseits der Xylose-Gene inseriert hatten. Diese erste phänotypische Differenzierung wurde im folgenden in Schnellplasmidpräparationen mit anschließenden Restriktionsanalysen weiter untersucht. Durch Restriktionen der isolierten Plasmide mit HindIII, EcoRI und einer Doppelrestriktion mit Hind III/ EcoRI und Auftrennung auf einem Agarose-Gel konnte die Position der jeweiligen Transposoninsertion auf dem Plasmid pZY190 festgelegt werden (Abb.2B).Durch Kombination der Transposoninsertionen mit den entsprechenden Phänotypen auf McConkey+ Xylose- Platten wurde die Lage der Xylose-Gene auf dem Plasmid pZY190 auf einen Bereich von etwa 5kb eingegrenzt.

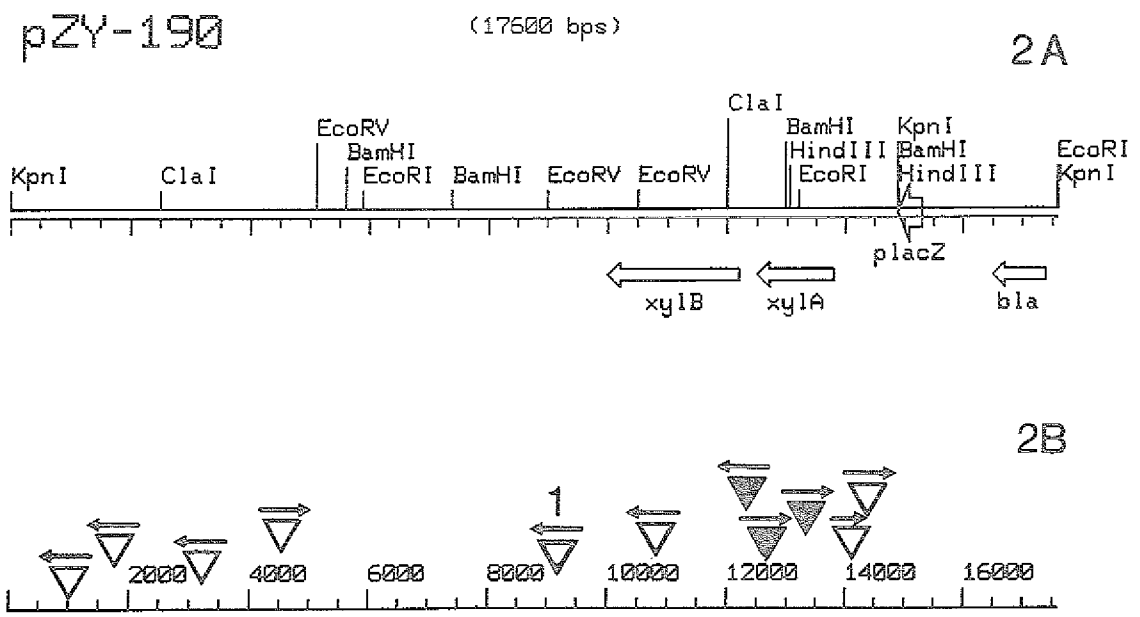


Abb.2: Physikalische Karte des Plasmids pZY190 (A) und Transposonmutagenese des Vektors mit Tn1725 (B). Abb.2B zeigt das Ergebnis der Komplementationsanalysen der pZY190::Tn1725 Konstrukte in der *xylA* Mutante *E.coli* HB101 auf McConkey+ Xylose-Platten:

▽ Xyl^+-Phänotyp durch Tn-Insertion unbeinflußt, d.h.xylA intakt
▼ Xyl^- Phänotyp durch Tn-Insertion, d.h. Tn-Insertion in xylA
Der Pfeil gibt jeweils die durch Restriktionskartierung ermittelte Orientierung des Transposons (bezogen auf die Leserichtung des *cat*-Gens) an.▽1 bezeichnet das Konstrukt pZY190::Tn1725-1, das für die weitere Subklonierung eingesetzt wurde.
Die ermittelte Position des xylA-Gens (randständig zum Vektor pUC 19) und die daraus abgeleitete Position für xylB ist in Abb. 2A angegeben.

Das Transposon Tn1725 bietet den Vorteil, neue Schnittstellen wie z.B. die Restriktionschnittstelle KpnI in Plasmide einzuführen. Hierdurch war es im folgenden möglich,das Xylose-Operon als 5,9kb großes KpnI-Fragment aus dem Konstrukt pZY190:: Tn1725-1 in die KpnI- Schnittstelle des Vektors pUC19 subzuklonieren. Das subklonierte KpnI-Fragment trug neben den Xylose-Genen einen 1,3kb- Anteil des Transposons Tn1725, der die Expression des Xylose-Operons jedoch nicht beeinflußte.Das neue Konstrukt pZY220 war 8,6kb groß und komplementierte sowohl *xylA* als auch *xylB*-Defekte vollständig. Im folgenden wurde mit dem Plasmid pZY220 eine genauere Restriktionskartierung durchgeführt (Abb.3).

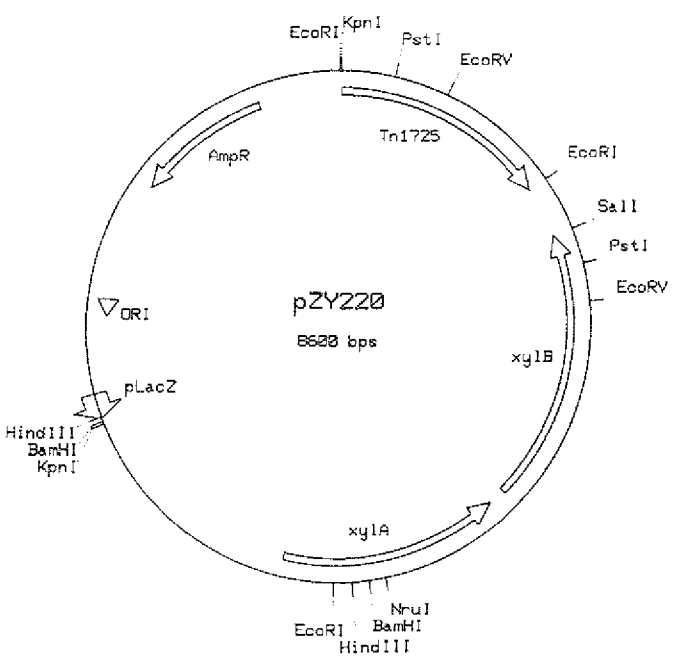


Abb.3: Restriktionskarte des Plasmids pZY220. Es sind nur die für weitere Klonierungen relevanten Schnittstellen dargestellt. Abkürzungen sind dem Abkürzungsverzeichnis zu entnehmen.
placZ= Promotor des β-Galaktosidase-Gens

Um den Transposonanteil von 1,3 kb aus dem Konstrukt pZY220 zu entfernen, wurde das 4kb PstI-Fragment aus dem Vektor pZY220 isoliert und in die PstI-Schnittstelle des Vektors pUC19 kloniert. Die Transformation dieses Konstruktes pZY240 in den Stamm *E.coli* HB101, führte bei Selektion auf McConkey+Xyl+Amp-Platten zu weissen Kolonien, obwohl das xylA Gen auf dem Plasmid vollständig vorlag und somit komplementieren sollte, (vgl. Abb.2). Die weitere Untersuchung dieses Effektes und die Eingrenzung der verantwortlichen Region sind in Abschnitt III.1.6. dargestellt.
Das Plasmid pZY240 führte in keiner der zur Verfügung stehenden *xyl*$^-$ Mutanten *E.coli* HB101, L233 und LR2-168 zur Säureproduktion aus Xylose; es trat jedoch schwaches Wachstum und damit Komplementation auf Minimalmedium+Xyl auf, so daß davon auszugehen war, daß xylA und B auf dem Konstrukt vorlagen. Es wurde eine weitere Transposonmutagenese mit Tn1725 und dem Plasmid pZY240 durchgeführt, um nun auch das xylB-Gen genau einzugrenzen. Die Durchführung der Mutagenese erfolgte wie bereits für das Plasmid pZY190 beschrieben. Die erhaltenen pZY240::Tn1725 Plasmide wurden außer in der *xylA*$^-$ Mutante *E.coli* HB101 auch jeweils parallel in den beiden anderen *xyl*$^-$ Mutanten bezüglich Komplementation auf Minimal-+Xylose+Amp-Agarplatten getestet. Das Ergebnis der Mutagenese und der Komplementationsanalysen ist in Abb. 4 dargestellt. Das xylA- Gen konnte auf einen Bereich von 1,5 kb eingegrenzt werden und liegt etwa 1kb hinter dem lacZ-Promotor von pUC19. "Downstream" von xylA liegt das xylB-Gen mit einer Größe von mindestens 1,5 kb. Das Ende des xylB- Gens konnte in dieser Mutagenese nicht festgelegt werden, und es war nicht eindeutig nachweisbar, ob das Gen vollständig auf dem Konstrukt vorlag.

Nachdem das Xylose-Operon in den Vektoren pZY220 und pZY240 relativ genau kartiert worden war und die Messung der Enzymaktivitäten zeigte, daß die Klonierung der Gene auf Vektoren mit hoher Kopienzahl, wie z.B. pUC19, nicht zur Überexpression führte (III.1.3.), erschien es notwendig, die Promotorregion des Xylose-Operons zu untersuchen und zu entfernen. Damit sollte eine konstitutive Genexpression ausgehend von Xylose-unabhängigen Promotoren erreicht werden (III.1.6.).

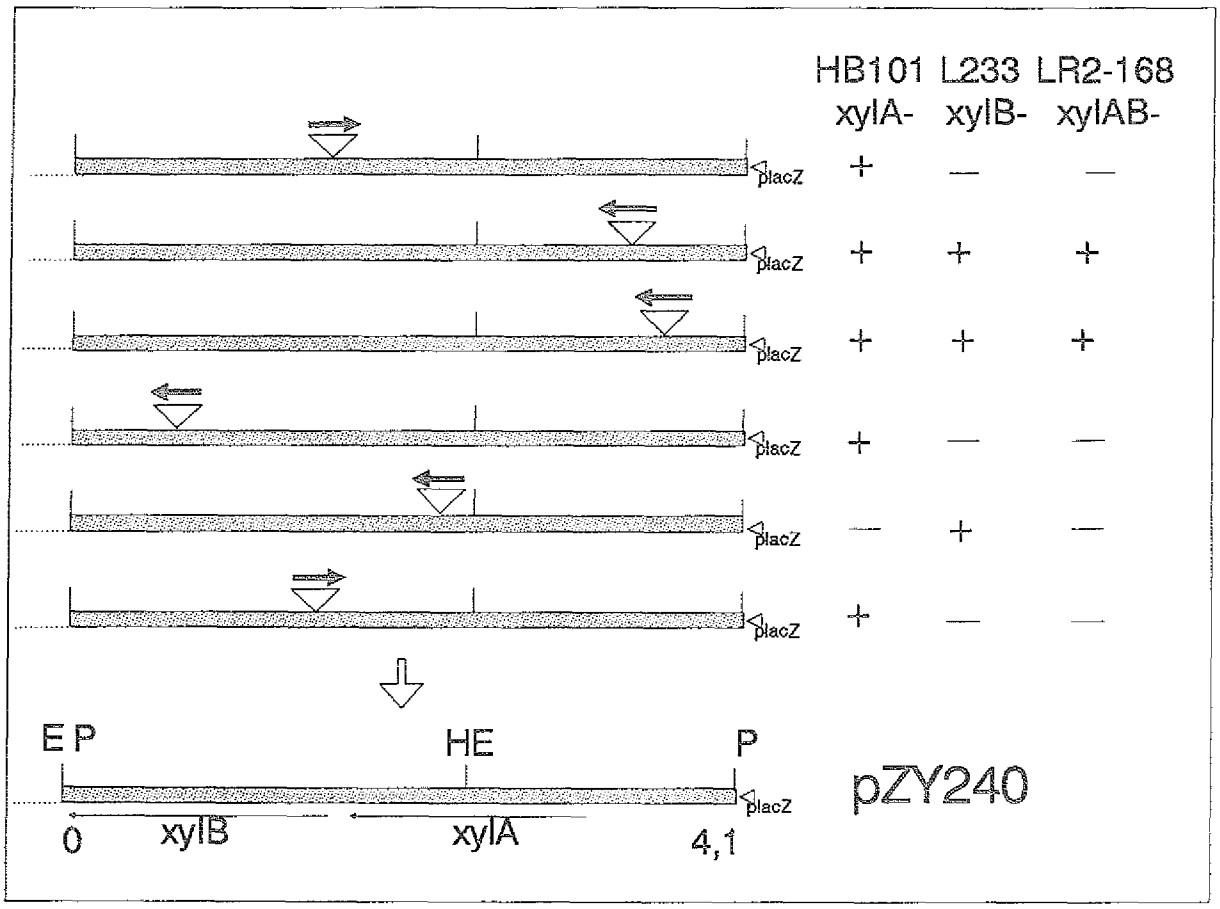


Abb. 4: Transposonmutagenese des Plasmides pZY240 und Komplementationsanalyse in *E.coli xyl⁻* Mutanten auf Minimal-+ Xylose-Platten.

▽ Insertionspunkt und Orientierung von Tn1725 (vgl. Abb.2B)

+/ - Wachstum/ bzw. kein Wachstum der pZY240::Tn1725 tragenden Klone auf Minimal- + Xylose-Platten

1.3. Expression der konstruierten xyl-Plasmide in *E. coli* Stämmen

Die Plasmidkonstruktionen des aus *K.pneumoniae* KAY2026 klonierten Xylose- Operons wurden in den verschiedenen zur Verfügung stehenden *E.coli xyl*⁻ Mutanten, sowie teilweise in *E.coli* Wildtyp im Hinblick auf die plasmidvermittelten Enzymaktivitäten von Xyloseisomerase und Xylulokinase untersucht.
In Tabelle 4 ist eine Zusammenstellung der Enzymaktivitäten der verwendeten Stämme zu sehen, sowie die Enzymaktivitäten der *E. coli* Stämme nach Transformation mit verschiedenen xyl-Plasmiden. Die Enzymaktivitäten wurden nach Xylose-Induktion gemessen. Es wird deutlich, daß die Konstrukte pZY190, pZY220 und pZY240 keine Überexpression der Xyloseisomerase und - Kinase bewirkten, obwohl das Operon in diesen Konstrukten in einem Vektor mit hoher Kopienzahl (pUC19) vorliegt.Die gefundenen Aktivitäten lagen im Bereich von chromosomalen Aktivitäten für Xyloseisomerase und -Kinase. Die xylA Mutation von *E.coli* HB101 wurde durch das Plasmid pZY240 komplementiert, es war jedoch eine starke Reduktion der Xylulokinase-Aktivität feststellbar (phänotypisch Xyl⁻). Das Konstrukt pZY240 scheint die Expression von xylB zu verhindern.

Stamm	Plasmid	Spezifische Aktivität der Xyloseisomerase U/mg	Xylulokinase U/mg
K.pneumoniae:			
KAY 2026	-	0,30	2,10
E.coli:			
ED8767	-	0,36	0,91
HB101 (*xyl*A)	-	0	1,88
L233 (*xyl*B)	-	0,86	0
LR2-168 (*xyl*AB)	-	0	0
HB101	pZY200	0,40	1,10
HB101	pZY190	0,43	0,99
HB101	pZY220	0,51	1,34
HB101	pZY240	0,52	0,01
LR2-168	pZY220	0,44	0,61
L233	pZY220	0,63	1,14

Tab. 4: Vergleich der Xyloseisomerase- und Xylulokinase-Aktivitäten verschiedener rekombinanter *E.coli* Stämme und ihrer Elterstämme nach Wachstum in MM-Medium mit 0,4% Glycerin und 0,1% Xylose. Die angegebenen Aktivitäten sind Mittelwerte aus mindestens 2 unabhängigen Messungen.

Um Hinweise auf die Regulation der Expression der Xylose-Gene zu erlangen, wurden die verschiedenen Plasmidkonstrukte hinsichtlich ihrer Induzierbarkeit durch Xylose bzw. Reprimierbarkeit durch Glukose untersucht. Dabei zeigte sich, daß die Enzymaktivitäten auf den Konstrukten pZY190 und pZY220 weiter durch Xylose induzierbar waren. Der Induktionsfaktor durch Xylose lag bei etwa 3-5 verglichen zu den Enzymaktivitäten Fruktose gewachsener Bakterien. Die Induktion durch Xylose war jedoch deutlich schwächer als diejenige bei chromosomaler Genexpression (Enzymaktivität nur nach Induktion nachweisbar),was durch die hohe Kopienzahl der Plasmidkonstrukte und einem damit verbundenen erhöhten Grundniveau an Enzymaktivität erklärbar ist.

Sehr deutlich wurde auch die starke Katabolitrepression der Xylose- Gene in den Konstrukten pZY190 und pZY220,(Tab.5). Bei in Gegenwart von Glukose gewachsenen pZY220 rekombinanten Stämmen konnte weder Xyloseisomerase noch -Kinase-Aktivität nachgewiesen werden. Erst nach Deletion des 5'-upstream-Bereiches des xylA-Gens im Konstrukt pZY222 (III.1.6.) war die Glukose-Reprimierbarkeit der Xylose-Gene aufgehoben (Tab.5). Hier war vollständige Expression der Xylose-Gene erst nach Induktion mit IPTG nachweisbar, da auch der *lacZ*-Promotor katabolitreprimiert wird.

Stamm	Plasmid	Spezifische Aktivität (U/mg)			
		Xyloseisomerase		Xylulokinase	
		Glukose	Glyc/Xyl	Glukose	Glyc/Xyl
E.coli					
HB101	pZY220	0,04	0,51	0	1,34
HB101	pZY222 -IPTG	0,53	1,41	1,08	1,90
HB101	pZY222 +IPTG	1,54	n.g.	1,75	n.g.

Tab. 5: Vergleich der Enzymaktivitäten rekombinanter *E.coli* HB101 Stämme nach Wachstum in Minimalmedium versetzt mit 0,4% Glukose (reprimierend) oder 0,4% Glycerin + 0,1% Xylose (induzierend). Der Vektor pZY220 enthält den xyl-Promotor; im Plasmid pZY222 ist der gen-eigene Promotor entfernt. Zur Induktion des placZ im Konstrukt pZY222 wurde 1mM IPTG zugesetzt. n.g.= nicht gemessen

1.4. Sequenzanalyse des Xylose-Operons aus *K. pneumoniae* KAY 2026

Die Charakterisierung des Xylose-Operons aus *K.pneumoniae* KAY2026 wurde durch Bestimmung der DNA-Sequenz vervollständigt. Die DNA-Sequenz der kodierenden Regionen xylA und xylB, sowie der Promotorregion des Operons wurde doppelsträngig mit der Didesoxymethode von SANGER ET AL., (1977), modifiziert nach TABOR UND RICHARDSON,(1987), durchgeführt. Es erfolgte eine Plasmidsequenzierung in pUC18/19 und pGEM7Zf^{+}-Vektoren mit käuflichen "Primern". Für die Sequenzierungsreaktionen wurden die in Abb.5 dargestellten Fragmente,in die Vektoren pUC oder pGEM kloniert und mit Hilfe von Exonuklease III jeweils unidirektional verkürzt, so daß Fragmente mit Größenabstufungen von etwa 200 bp entstanden. Die Plasmid- DNA wurde entweder über isopyknische Zentrifugation isoliert oder es wurden aufgereinigte Miniplasmidpräparationen in die Sequenzierungsreaktionen eingesetzt. Bei diesen Sequenzierungsansätzen konnten in einer Reaktion ausgehend von der Bindungsstelle des verwendeten "Primers" etwa 250 bis 300 Nukleotide ermittelt werden.

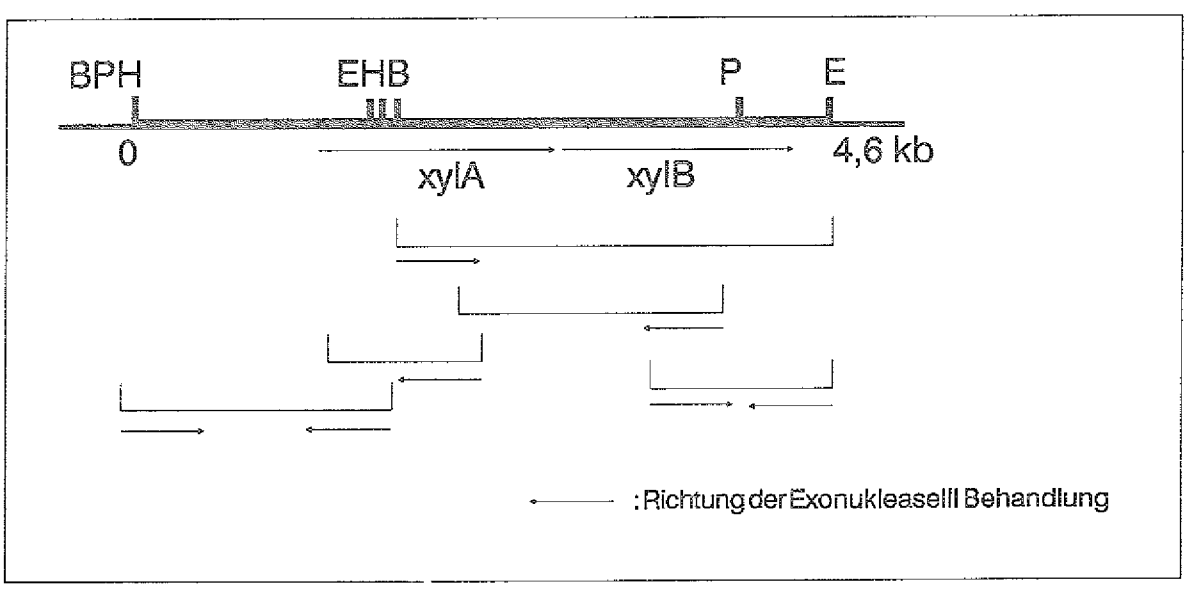


Abb. 5: Sequenzierungsstrategie für das Xylose-Operon aus *Klebsiella pneumoniae* KAY2026. Von den gezeigten Fragmenten wurden jeweils sukzessiv verkürzte Vektoren mit Exonuklease III hergestellt, die in die Sequenzierung eingesetzt wurden.

Die Nukleotidsequenz des Xylose-Operons sowie benachbarter Regionen wurde über einen Bereich von 3225bp ermittelt, (Abb.6). Die DNA-Sequenzanalyse mit dem Computerprogramm MICROGENIE der Firma BECKMAN, (QUEEN UND KORN, 1984) zeigte die Existenz von 2 großen offenen Leserastern auf, die für die Gene xylA und xylB kodieren. Das xylA- Gen ist 1320 bp, das xylB- Gen 1449 bp groß. Die beiden Gene sind durch eine 89 bp lange intergenische Region voneinander getrennt, in der sich theoretisch "stem-loop" Strukturen ausbilden könnten, die zur Termination der Transkription führen könnten (Abb.7, TINOCO ET AL.,1973). Vor dem xylA Gen findet sich die Sequenz TATGGAG, vor dem xylB-Gen die Sequenz TAAGGAG; beide stellen typische Konsensussequenzen enterobakterieller Ribosomenbindungsstellen dar (S.D.-Sequenz; SHINE UND DALGARNO, 1974).

```
ATTTATTCATGCACGCTCTTATTATTGCACTGACTGTCTCTGACAAAGCGGGTCGAGTGC -265

AACGGTTGACTGGATATTATTTTTGCGAGCTGCGCACGTTGTGATTCTCTCAATGGCGTG -205
                                        cAMP/CRP

TGTGAAATAACGTAATTGAGGAAAAATGAAAGCGAAATTCTATATTGGCTTAAACCCGTC -145
cAMP/CRP        -35                         -10        **

ATACTTCAAGTTGTAGGTGGGTTGGTGACATTCGTTCGTCCGCCCCCGGTTACCGGACTG  -85
                                        exo 0,6

CGCGCTCCTGCCGCCTTCCTGCAACTCGAATTATTTAGGGTATCTGATTGGTTATTCGCC  -25

                        +1
GCATCTCTGAATATGGAGTTCTCTATGCAGACCTATTTCGATCAACTCGATCGCGTTCGT   36
               SD       MetGlnThrTyrPheAspGlnLeuAspArgValArg
                        xylA

TACGAAGGCCCGAAATCCACTAACCCGCTGGCTTTCCGTCATTACAACCCGGATGAACTG   96
TyrGluGlyProLysSerThrAsnProLeuAlaPheArgHisTyrAsnProAspGluLeu

GTGCTGGGCAAACGGATGGAAGATCATCTGCGTTTTGCGGCCTGTTACTGGCACACCTTC  156
ValLeuGlyLysArgMetGluAspHisLeuArgPheAlaAlaCysTyrTrpHisThrPhe

TGCTGGAATGGCGCCGATATGTTTGGCGTGGGCTCCTTTGATCGTCCCTGGCAGCAGCCT  216
CysTrpAsnGlyAlaAspMetPheGlyValGlySerPheAspArgProTrpGlnGlnPro

GGCGACGCCCTGGAGATGGCCAAACGCAAAGCCGATGTGGCGTTCGAATTCTTCCATAAA  276
GlyAspAlaLeuGluMetAlaLysArgLysAlaAspValAlaPheGluPhePheHisLys

CTCAACGTGCCTTACTACTGCTTCCACGACGTTGACGTCTCGCCGGAAGGGGCGTCGCTC  336
LeuAsnValProTyrTyrCysPheHisAspValAspValSerProGluGlyAlaSerLeu

AAGGAGTACAGCAATAACTTCGCCCGGATGGTCGAGGTGCTGGCTGAGAAACAGCAGCAG  396
LysGluTyrSerAsnAsnPheAlaArgMetValGluValLeuAlaGluLysGlnGlnGln
```

```
AGCGGCGTGAAGCTTCTGTGGGGGACCGCAAACTGCTTTACCAACCCCCGCTACGGCGCC   456
SerGlyValLysLeuLeuTrpGlyThrAlaAsnCysPheThrAsnProArgTyrGlyAla

GGCGCGGCCACCAACCCGGATCCGGAAGTATTTAGCTGGGCGGCCACCCAGGTGGTCACC   516
GlyAlaAlaThrAsnProAspProGluValPheSerTrpAlaAlaThrGlnValValThr

GCCATGAATGCCACCCATCAACTGGGCGGTGAAAACTATGTGCTCTGGGGCGGTCGCGAG   576
AlaMetAsnAlaThrHisGlnLeuGlyGlyGluAsnTyrValLeuTrpGlyGlyArgGlu

GGCTATGAAACCCTGCTGAATACCGACCTGCGCCAGGAGCGTGAGCAGTTGGGCCGCTTA   636
GlyTyrGluThrLeuLeuAsnThrAspLeuArgGlnGluArgGluGlnLeuGlyArgLeu

TTGCAGCTGGTGGTGGAGCATAAGCATAAAATCGGCTTTAAAGGCACGCTGCTGATTGAG   696
LeuGlnLeuValValGluHisLysHisLysIleGlyPheLysGlyThrLeuLeuIleGlu

CCCAAACCGCAGGAGCCGACCAAGCATCAGTATGACTATGATGCCTCTACCGTTTACGGC   756
ProLysProGlnGluProThrLysHisGlnTyrAspTyrAspAlaSerThrValTyrGly

TTCCTCAAACAGTTTGGTCTGGAAAAAGAGATTAAACTGAATATTGAAGCTAACCATGCC   816
PheLeuLysGlnPheGlyLeuGluLysGluIleLysLeuAsnIleGluAlaAsnHisAla

ACGCTCGCCGGCCATTCGTTCCATCATGAAATTGCGACGGCCATTGCGCTGGGGCTGTTC   876
ThrLeuAlaGlyHisSerPheHisHisGluIleAlaThrAlaIleAlaLeuGlyLeuPhe

GGCTCCGTTGACGCCAACCGCGGCGATCCGCAGCTGGGCTGGGATACCGACCAGTTTCCG   936
GlySerValAspAlaAsnArgGlyAspProGlnLeuGlyTrpAspThrAspGlnPhePro

AACAGAGTCGAAGAAGACGCCCTGGTGATGTATGAGATCTTCAAAGCGGGCGGCTTCACC   996
AsnArgValGluGluAspAlaLeuValMetTyrGluIlePheLysAlaGlyGlyPheThr

ACCGGCGGGCTCAACTTTGATGCTAAAGTTCGCCGGCAAAGCACCGACAAATACGATCTG  1056
ThrGlyGlyLeuAsnPheAspAlaLysValArgArgGlnSerThrAspLysTyrAspLeu

TTCTATGGTCATATTGGCGCGATGGATACCATGGCCGTATCGCTGAAGGTCGCGGCGCGG  1116
PheTyrGlyHisIleGlyAlaMetAspThrMetAlaValSerLeuLysValAlaAlaArg

ATGATCGAGGACGGCGAACTGGATAAGCGCGTGGCCAGACGGTACGCCGGCTGGAACGGT  1176
MetIleGluAspGlyGluLeuAspLysArgValAlaArgArgTyrAlaGlyTrpAsnGly

GAGCTGGGGCAGCAGATCCTTAACGGGCAGATGACCCTGAGCGATATTGCCCAGTATGCC  1236
GluLeuGlyGlnGlnIleLeuAsnGlyGlnMetThrLeuSerAspIleAlaGlnTyrAla

GCTCAGCATCAGCTGGCGCCGCAGCATCGCAGCGGCCAGCAGGAACAACTGGAAAACCTG  1296
AlaGlnHisGlnLeuAlaProGlnHisArgSerGlyGlnGlnGluGlnLeuGluAsnLeu

GTCAACCATTATCTGTTTGACAAGTAATCATACGGCGGGCGCCGGGGTGACCGGCGCCAG  1356
ValAsnHisTyrLeuPheAspLys              ------------>     <------------
                                                          +1
ACCAGGATGCTCTGTTCGCGCCACGTCAGCCGTGCGGTTTAAGGAGAGGGAGTATGTATA     7
                                          SD            MetTyrI
                                                        xylB

TCGGCATCGATCTGGGGACGTCGGGCGTCAAAGCCATTCTGCTCAATGAGCAGGGTGAGG    67
leGlyIleAspLeuGlyThrSerGlyValLysAlaIleLeuLeuAsnGluGlnGlyGluV

TAGTGGCATCGCATACCGAAAAACTCACCGTCTCGCGTCCGCATCCGCTGTGGTCGGAGC   127
alValAlaSerHisThrGluLysLeuThrValSerArgProHisProLeuTrpSerGluG
```

```
AAGATCCCGAACAGTGGTGGCTGGCGACGGACACGGCGATGAAAGCCCTGGGCGCGCACG   187
lnAspProGluGlnTrpTrpLeuAlaThrAspThrAlaMetLysAlaLeuGlyAlaHisA

ATAGCCTGCGCCACGTGAAGGGCCTGGGCATTGCCGGGCAGATGCACGGCGCCACCCTAC   247
spSerLeuArgHisValLysGlyLeuGlyIleAlaGlyGlnMetHisGlyAlaThrLeuL

TGGATAAATCGTTACAGGTGTTGCGTCCGGCCATTTTATGGAATGACGGCCGCTGCGCCG   307
euAspLysSerLeuGlnValLeuArgProAlaIleLeuTrpAsnAspGlyArgCysAlaG

AAGAGTGCCAGCTGCTGGAAGACAAAGTCAGCGCTTCCCGGCAGATCACCGGCAACCTTA   367
luGluCysGlnLeuLeuGluAspLysValSerAlaSerArgGlnIleThrGlyAsnLeuM

TGATGCCGGGCTTTACGGCGCCGAAGCTCTTATGGGTACAGCGCCACGAGGCGGCAGTGT   427
etMetProGlyPheThrAlaProLysLeuLeuTrpValGlnArgHisGluAlaAlaValP

TCAGCCAGGTCGATAAAGTGCTGCTGCCCAAGGATTATCTGCGCCTGCGCATGACCGGCG   487
heSerGlnValAspLysValLeuLeuProLysAspTyrLeuArgLeuArgMetThrGlyG

AGCTTGCCAGCGATATGTCTGACGCCGCCGGCACGATGTGGCTGGACGTCGCCCGGCGCG   547
luLeuAlaSerAspMetSerAspAlaAlaGlyThrMetTrpLeuAspValAlaArgArgA

ACTGGAGCGACGAGATGCTCGCCGCCTGCGATCTCAGTCGGGATGCGATGCCGGCGCTGT   607
spTrpSerAspGluMetLeuAlaAlaCysAspLeuSerArgAspAlaMetProAlaLeuP

TCGAAGGCAGCGATGTCACCGGGCAACTGCGACCTGAGGTGGCGCAGGCGTGGAATATGC   667
heGluGlySerAspValThrGlyGlnLeuArgProGluValAlaGlnAlaTrpAsnMetP

CGCCGGCGCTGGTGGTGGGCGGCGGGGGCGACAACGCCGCCGGGGCCGTCGGGATCGGCA   727
roProAlaLeuValValGlyGlyGlyGlyAspAsnAlaAlaGlyAlaValGlyIleGlyM

TGGCCGATGCCGGTCAGGCGATGCTGTCGCTGGGTACGTCAGGCGTCTACTTCGCCGTCA   787
etAlaAspAlaGlyGlnAlaMetLeuSerLeuGlyThrSerGlyValTyrPheAlaValS

GTGAAGGGTTCCTTAGCAAACCCGAAAGCGCGGTGCACAGCTTCTGCCATGCCTGCCGCG   847
erGluGlyPheLeuSerLysProGluSerAlaValHisSerPheCysHisAlaCysArgG

GCCGCTGGCATTTGATGTCGGTGATGCTCAGCGCGGCCTCCTGTCTGGACTGGGCGGCAA   907
lyArgTrpHisLeuMetSerValMetLeuSerAlaAlaSerCysLeuAspTrpAlaAlaL

AATTAACCGGTCTCGCCAGCGTGCCGGCGCTGATCGCGGCGGCGCAGACGGCGGATGAAA   967
ysLeuThrGlyLeuAlaSerValProAlaLeuIleAlaAlaAlaGlnThrAlaAspGluS

GCGCCGGTCCGGTGTGGTTCCTGCCCTATCTGTCTGGCGAACGCACGCCGCACAACAACC  1027
erAlaGlyProValTrpPheLeuProTyrLeuSerGlyGluArgThrProHisAsnAsnP

CGCAGGCTAAGGGCGTCTTTTTTGGCCTGACGCATCAGCATGGGCCGGCAGAGCTGGCGC  1087
roGlnAlaLysGlyValPhePheGlyLeuThrHisGlnHisGlyProAlaGluLeuAlaA

GGGCGGTGCTGGAAGGGGTGGGCTATGCGCTGGCGGATGGTATGGACGTGGTGCACGCCT  1147
rgAlaValLeuGluGlyValGlyTyrAlaLeuAlaAspGlyMetAspValValHisAlaC

GCGCCATCAAGCCGGAAGCAATCACGCTTATCGGCGGCGGACGCGCACGTTACTGGCGGC  1207
ysAlaIleLysProGluAlaIleThrLeuIleGlyGlyGlyArgAlaArgTyrTrpArgG

AAATGCTGGCGGATATCAGCGGCCTGCAGCTCGATTACCGTACCGGGGGCGATGTCGGCC  1267
lnMetLeuAlaAspIleSerGlyLeuGlnLeuAspTyrArgThrGlyGlyAspValGlyP
```

```
CGGCGCTGGGGGCGGCCAGGCTGGCGCACGTGGCGGTTCACGACGAGGCAGACCGCCCCG 1327
roAlaLeuGlyAlaAlaArgLeuAlaHisValAlaValHisAspGluAlaAspArgProG

GGCTGCTGAAGCCGCTGCCGCTTGAACAAGCCCATCGCCCGGACGATCGCCGTGTGGCCC 1387
lyLeuLeuLysProLeuProLeuGluGlnAlaHisArgProAspAspArgArgValAlaH

ACTATGCGCCGCAGCGGGAAATCTTCGCCAGAATTTTCAGCAAACTGAAACCGCTGATGT 1447
isTyrAlaProGlnArgGluIlePheAlaArgIlePheSerLysLeuLysProLeuMetS

CTTAGCTCAGTCAGTCGCAGCGGCGATTCTTCTGATTGACGCTAC                1491
erEnd
```

Abb.6: DNA- und Proteinsequenz der Xyloseisomerase und Xylulokinase aus *Klebsiella pneumoniae* KAY2026. Die Sequenz ist in der EMBL- Datenbank unter der Nummer X61059 verfügbar.

S.D. = Konsensussequenz für Ribosomenbindestelle
** = Transkriptionsstartpunkt (s.III.1.5.)
-10/ -35 = Konsensussequenzen für enterobakterielle Promotoren
——> <—— : potentielle "stem loop" Region

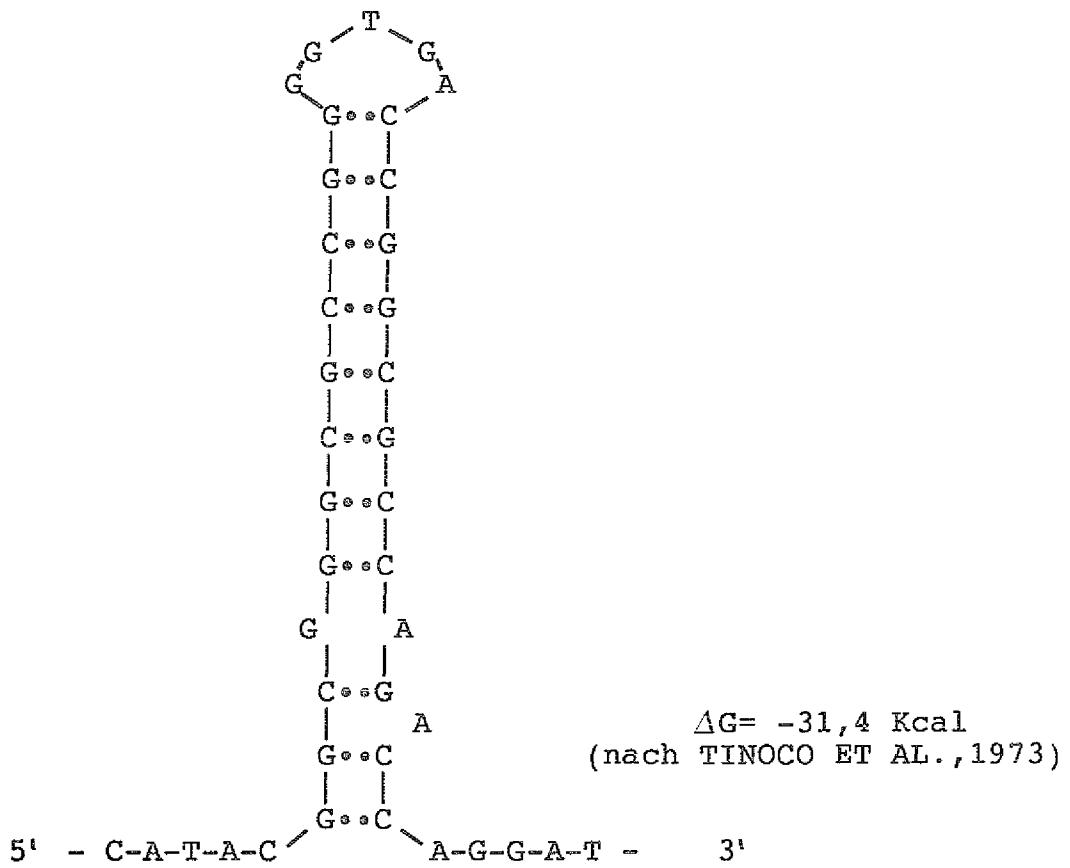


Abb. 7: Mögliche Terminationsschleife zwischen xylA und xylB. Die Punkte symbolisieren die Basenpaarungen.

Das xylA-Gen kodiert für ein Protein von 440 Aminosäuren, mit einem Molekulargewicht von 49,793 KDa, das xylB-Gen für ein Protein aus 483 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 51,783 KDa. Diese Molekulargewichte ließen sich auch in der SDS-PAGE bestätigen (siehe Abb. 14).
Die Xyloseisomerase von *K.pneumoniae* zeigte auf DNA-Sequenzebene 80% Identität zur *E.coli* Sequenz (LAWLIS ET AL.,1984; SCHELLENBERG ET AL.,1984),auf Aminosäureebene sogar 89%. Abb.8 stellt einen Vergleich der abgeleiteten Proteinsequenz der Xyloseisomerase von *K.pneumoniae* mit anderen bakteriellen Xyloseisomerasen dar.
In den verschiedenen Sequenzen finden sich häufig kurze Bereiche identischer Aminosäuren. Es ist bekannt, daß die für die Aktivität der Xyloseisomerase wichtigen Aminosäuren nicht "geclustert" vorliegen, sondern über einen weiten Bereich der Sequenz verteilt sind (CARRELL ET AL., 1989; COLLYER AND BLOW, 1990). Alle für die Aktivität entscheidenden Aminosäurereste sind in den bislang untersuchten Spezies konserviert.

Das xylB-Gen von *K.pneumoniae* zeigt auf DNA- Ebene 73% Identität zum *E.coli* xylB-Gen (LAWLIS ET AL.,1984),auf Aminosäureebene 81%. Ein Vergleich verschiedener Teil- oder Gesamtsequenzen der Xylulokinase ist in Abb.9 zu sehen. Neben einigen Bereichen homologer Aminosäuren, fallen zwei interne Sequenzwiederholungen auf (markiert in Abb. 9). Ob diese Regionen für die Funktion des Enzyms wichtig sind, oder ob sie nur ein zufälliges Ergebnis einer intramolekularen Duplikation darstellen, ist zur Zeit noch unklar.

K.pneumoniae besitzt zwei Xylulokinasen, ein Enzym für den D-Arabinitol-Stoffwechsel, das zweite für den Xylose-Stoffwechsel. Vergleicht man die aminoterminale Region der Xylulokinase des D-Arabinitol-Stoffwechsel von *K.pneumoniae* 10335P14 (Elterstamm von KAY2026) mit der in dieser Arbeit klonierten Xylulokinase aus dem D-Xylose-Stoffwechsel, so findet man deutlich geringere Homologie, verglichen zur Homologie der beiden Xylulokinasen des D-Xylose-Stoffwechsels aus *E.coli* und KAY2026. Dies ist zu verstehen, wenn die beiden Gene für die Xylulokinasen von *K.pneumoniae* sich schon früh in der Evolution in den zwei Stoffwechselwegen auseinanderentwickelt haben.

```
                 **         **  * *   *  *** *      *   ***                *
K.p.        MQTYFDQLDRVRYEGPKSTNPLAFRHYNPDELVLGKRMEDHLRFAACYWHTFCWNGADMF  60
E.c.        MQAYFDQLDRVRYEGSKSSNPLAFRHYNPDELVLGKRMEEHLRFAACYWHTFCWNGADMF  60
S.x.         MSYFD-INKVNYEGPKSNNAFSFKYYNPEEKLGNHSMSELLRFSVAYWHTFTADLSDPF  58
B.s. MAQSHSSSVNYFGSVNKVVFEGKASTNPLAFKYYNPQEVIGGKTMKEHLRFSIAYWHTFTADGTDVF  67
C.t.        MNKYFENVSKIKYEGPKSNNPYSFKFYNPEEVIDGKTMEEHLRFSIAYWHTFTADGTDQF  59
A.s.                                                        MSLQATPDDKFSF  13
S.o.                                                        MSYQPTPEDRFTF  13
S.v.                                                        MSFQPTPEDKFTF  13

      *                                      *** *  * *
K.p.  GVGSFDRP-WQQPGDALEMAKRKADVAFEFFHKLNVPYYCFHDVDVSPEGASLKEYSNNFARMVEV 125
E.c.  GVGAFNRP-WQQPGEALALAKRKADVAFEFFHKLHVPFYCFHDVDVSPEGASLKEYINNFAQMVDV 125
S.x.  GVGVAERD-WDSLDE-MEKAKARVEAIFEFMEKTRIDYFCFHDVDISPEGASLKESNENLDIIVEL 122
B.s.  GAATMQRP-WDHYKG-MDLARARVEAAFEMFEKLDAPFFAFHDRDIAPEGSTLKETNQNLDIIVGM 131
C.t.  GKATMQRP-WNHYTDPMDIAKARVEAAFEFFDKLNAPYFCFHDRDIAPEGDTLTETNKNLDTIVAM 124
A.s.  GLWTVGWQARDAFGDATRPVLD-PIEAVHKLAEIGAYGVTFHDDDLVPFGADAATR----DGIVAG  74
S.o.  GLWTVGWQGRDPFGDATRPALD-PVETVQRLAGLGAHGVTFHDDDLIPFGSSDTER----ESHIKR  74
S.v.  GLWTVGWQGRDPFGDATRPALD-PVETVQRLAELGAYGVTFHDDDLIPFGSSDTER----ESHIKR  74

                        * * *       *  *     *                  **    * ****
K.p.  LAEKQQQSGVKLLWGTANCFTNPRYGAGAATNPDPEVFSWAATQVVTAMNATHQLGGENYVLWGGR 191
E.c.  LAGKQEESGVKLLWGTANCFTNPRYGAGAATNPDPEVFSWAATQVVTAMEATHKLGGENYVLWGGR 191
S.x.  IKEKMDQTGKKLLWNTTNNFTHERFVHGAATSSNAEVFAYAAAKVKKSLEIAKKLGSENFVFWGGR 188
B.s.  IKDYMRDSNVKLLWNTANMFTNPRFVHGAATSCNADVFAYAAAQVKKGLETAKELGAENYVFWGGR 197
C.t.  IKDYLKTSKTKVLWGTANLFSNPRFVHGASTSCNADVFAYSAAQVKKALEITKELGGENYVFWGGR 190
A.s.  FSKALDETGLIVPMVTTNLFTHPVFKDGGFTSNDRSVRRYAIRKVLRQMDLGAELGAKTLVLWGGR 140
S.o.  FRQALDATGMTVPMATTNLFTHPVFKDGGFTANDRDVRRYALRKTIRNIDLAVELGAKTYVAWGGR 140
S.v.  FRQALDATGMTVPMATTNLFTHPVFKDGGFTANDRDVRRYALRKTIRNIDLAAELGAKTYVAWGGR 140

      ** *                                   **** **              *
K.p.  EGYETLLNTDLRQEREQLGRLLQLVVEHKHKIGFKGTLLIEPKPQEPTKHQYDYDASTVYGFLKQF 257
E.c.  EGYETLLNTDLRQEREQLGRFMQMVVEHKHKIGFQGTLLIEPKPQEPTKHQYDYDAATVYGFLKQF 257
S.x.  EGYESLLNTNMKLELDNLATFFKMAKSYADEIGYTGQFLIEPKPKEPTTHQYDTDVATDHAFLQKY 254
B.s.  EGYETLLNTDLKFELDNLARFMHMAVDYAKEIEYTGQFLIEPKPKEPTTHQYDTDAATTIAFLKQY 263
C.t.  EGYETLLNTDMEFELDNFARFLHMAVDYAKEIGFEGQFLDEPKPKEPTCHQYDFDVANVLAFLRKY 256
A.s.  EGAEYDSAKDVGAALDRYREALNLLAQYSEDQGYGLPFAIEPKPNEPRGDILLPTAGHAIAFVQEL 206
S.o.  EGAESGAAKDVRVALDRMKEAFDLLGEYVTSQGYDIRFAIEPKPNEPRGDILLPRVGHALAFIERL 206
S.v.  EGAESGGAKDVRDALDRMKEAFDLLGEYVTAQGYDLRFAIEPKPNEPRGDILLPTVGHALAFIERL 206
                                                 Å
              * *  *        *      *          * *          *
K.p.  GLEKEIKLNIEANHATLAGHSFHHEIATAIALGLFGSVDANRG-----DPQLGWDTDQFPNRVEED 318
E.c.  GLEKEIKLNIEANHATLAGHSFHHEIATAIALGLFGSVDANRG-----DAQLGWDTDQFPNSVEEN 318
S.x.  DLDKDFKFNIEANHATLAGHTFQHELRYARDNNMLGSVDANQG-----HPLLGWDTDES-TDVYDT 315
B.s.  GLDNHFKLNLEANHATLAGHTFEHELRMARVHGLLGSVDANQG-----HPLLGWDTDEFPTDLYST 324
C.t.  DLDKYFKVNIEANHATLAFHDFQHELRYARINGVLGSDDANTG-----DMLLGWDTDQFPTDIRMT 317
A.s.  ERPELFGINPETGHEQMSNLNFTQGIAQALWHKKLFHIDLNGQHGPKFDQDLVFGHGDLLNAFSLV 272
S.o.  ERPELYGVNPEVGHEQMAGLNFPHGIAQALWAGKLFHIDLNGQSGIKYDQDLRFGAGDLRAAFWLV 272
S.v.  ERPELYGVNPEVGHEQMAGLNFPHGIAQALWAGKLFHIDLNGQSGIKYDQDLRFGAGDLRAAFWLV 272
                Å                                Å
      *                *    * *  *                                *     *
K.p.  ALVMYEIFKAGGFTTGGLNFDAKVRRQSTDKYDLFYGHIGAMDTMAVSLKVAARMIEDGELDKRVA 384
E.c.  ALVMYEILKAGGFTTGGLNFDAKVRRQSTDKYDLFYGHIGAMDTMALALKIAARMIEDGELDKRIA 384
S.x.  TLAMYEILKNGGLAPGGLNFDAKPRRTSFKQEDLILTHIAGMDTFALGLRVAYKMIEDNFFENIMD 381
B.s.  TLAMYEILQNGGLGSGGLNFDAKVRRSSFEPDDLVYAHIAGMDAFARGLKVAHKLIEDRVFEDVIQ 390
C.t.  TLAMYEVIKMGGFDKGGLNFDAKVRRASFEPEDLFLGHIAGMDAFAKGFKVAYKLVKDRVFDKFIE 383
A.s.  DLLENGPDGGPAYD-GPRHFDYKPSRTE-DFDGVWESAKDNIRMYLLLKERAKAFRADPEVQAALA 336
S.o.  DLLESA-----GYE-GPRHLDFKPPRTE-DIDGVWASAAGCMRNYLILKERAAAFRADPEVQEALR 331
S.v.  DLLESA-----GYE-GPRHFDFKPPRTE-DFDGVWASAEGCMRNYLILKERAAAFRADPEVQEALR 331

K.p.  ----RRYAGWNGELGQQILNGQMTLSDIAQYAAQHQLAPQHRSGQQEQLENLVNHYLFDK       440
E.c.  ----QRYSGWNSELGQQILKGQMSLADLAKYAQEHHLSPVHQSGRQEQLENLVNHYLFDK       440
S.x.  ----EKYKSFNEGIGKKIVEGETSLKELEDYAFNINTIN-NTSDHLEVIKSQINQYILNINNKD  440
B.s.  ----HRYRSFTGGIGLEITEGRANFHTLEQYALNNKTIK-NESGRQERLKPILNQYILEV      445
C.t.  ----ERYASYKDGIGADIVSGKADFRSLEKYALERSQI-VNKSGRQELLESILNQYLFAE      438
A.s.  ESKVDELRTPTLNPGETYADLLADRSAFEDYDADAVGAKG--YGFVKLNQLAIDHLLGAR      394
S.o.  RSRLDELAQPT--AADGVQELLADRTAFEDFDVDAA-AARAAWPFERLDQLAMDHLLGARG     389
S.v.  AARLDQLAQPT--AADGLEALLADRTAFEDFDVEAA-AARAAWPFERLDQLAMDHLLGARG     389
```

Abb. 8: Vergleich der Proteinsequenzen verschiedener Xyloseisomerasen. K.p.= *K.pneumoniae* KAY2026; E.c.=*E.coli*; S.x.= *Staphylococcus xylosus*; B.s.=*B.subtilis*; C.t.=*Clostridium thermohydrosulfurogenes*; A.s.= *Ampulariella sp.*; S.o.= *Streptomyces olivochromogenes*; S.v.= *Streptomyces violaceoniger*; * = Konservierte Aminosäuren; Å = beteiligt an der Metallionenbindung

```
                 *                                          *  *   *
K.a.        MY-LGIDLGTSEVKA-LVIDENHEVI+                                    24
K.p.        MY-IGIDLGTSGVKA-ILLNEQGEVVASHTEKLTVSRP-HPLWSEQD-PEQWW-LATDTAM 56
E.c.        MY-IGIDLGTSGVKV-ILLNEQGEVVAAQTEKLTVSRP-HPLWSEQD-PEQWW-QATDRAM 56
S.x.       MAYVIGIDIGTSALKT-LVVNKSGDVVESYSVSYNTAHP-KSGYSEIDEPEIWY-EATLESL 59
A.s.       MALVAGI--G--QLDA-VV---QGGHSATPRPATGPAGPAAHSGRHQYDPDAWWARATGDSR 54
S.v.  MSAAEGPLVVGVDTSTQSTKALVVDAATGQVVASGQAPHTV---TSGAGRESD-PRQWW-DALGEAL 62

                          * **            ** **** *
K.p. KALGAHDSLRHVKGLGIAGQMHGATLLDKSLQVLRPAILWNDGRCAEE-CQ-LLEDKV-SASRQITG 120
E.c. KALGDQHSLQDVKALGIAGQMHGATLLDAQQRVLRPAILWNDGRCAQE-CT-LLEARV-PQSRVITG 120
S.x. KYILNHYTHNKLTGISFSGQMHGLVVIDQEGNPIRPAILWNDTRTSQEVEDIKKNLGL-NSLLQLTQ 125
A.s. EAGGLGRTLAAASVAG-QQQRHGA-LLESAVTVVRPALLWNDTRRPGAAADLIQELGGADKWAEAVG 119
S.v. RQCGDAAHEAAAVSIG--GQQHGLVTLDEHGEPVGPALLWNDVRSAPQARRLVEELGGPKAWADGTG 127

            *     *   **            ** *       *       ** **         *
K.p. NLMMPGFTAPKLLWVQRHEAAVFSQVDKVLLPKDYLRLRMTGELASDMSDAAGTMWLDVARRDWSDE 187
E.c. NLMMPGFTAPKLLWVQRHEPEIFRQIDKVLLPKDYLRLRMTGEFASDMSDAAGTMWLDVAKRDWSDV 187
S.x. NTVLEGFTLPKLMWLKNHEQDNYKRIYKFMLPKDYIVYKLTGNVYTEPSDAAGTIMFSVKDENWSTE 192
A.s. IVPVASLTLTNSGWLARHEPANAAKVAAICLPHDWLTWKLSGS+                       162
S.v. SVPGASFTATKWAWLAEHEP-DARATKAVRLPHDYLTERLTGQAVTDEGDASGTGWWASGTEQWDEE 193

      *          *         *                  *  * * **  * * *        * *
K.p. MLAACDLSRDAMPALFEGSDVTGQLRPEV-AQAWNMPPALVVGGGGDNAAGAVGIGMADAGQAML-S 252
E.c. MLQACDLSRDQMPALYEGSEITGALLPEV-AKAWGMATVPVVAGGGDNAAGAVGVGMVDANQAML-S 252
S.x. LLHRLNIDPSICPEIIASHQKSGQLTEKVKNTLGIDSNINVYQGGANNACGALGSGITD-EQKQLVS 258
S.v. TLAHIGLDPALLPRVVRPGEVAG--TVRDGHGLPFSKGTLVAAGTGDNAAAALGLG-LLPGRPVL-S 256

      ****   * *            *  *              *     *     *
K.p. LGTSGVYFAVSEGFLSKPE--SAVHSFCHACRGRWHLMSVMLSAASCLDWAAKLTGLASVPALIAAA 317
E.c. LGTSGVYFAVSEGFLSKPE--SAVHSFCHALPQRWHLMSVMLSAASCLDWAAKLTGLSNVPALIAAA 317
S.x. IGTSGV--ALSIENSTDYENDGNVHYFNHCVPNQKYIMGVTLSAGYSLEWLKQLISADENFTTFLKD 323
S.v. LGTSGTVWAVS--RGRPADPTGTVAGF-------ADARGDWLPLACTL--NCTL--AVDRVAALLGL 310

                    * * ***** *     *   **            *   *
K.p. QTADE-SAGPVWFLPYLSGERTPHNNPQAKGVFFGLTHQHGPAELARAVLEGVGY-ALADGMDVVHA 382
E.c. QQADE-SAEPVWFLPYLSGERTPHNNPQAKGVFFGLTHQHGPNELARAVLEGVGY-ALADGMDVVHA 382
S.x. INQSEVGANGLMYTPYLLGERTPHNDASVRGSFIGLDANTTQLDMKRAVIEGITYSINESIKHIMKN 390
S.v. DREAVAPGGSVTLLPFLDGERTP-NLPNASGLLHGLRHDTTPGQLLQAAYDGAVHSLLGALDLVLDE 376

                ****        *              *      * ***  *
K.p. CAIKPEAITLIGGGRA--RYWRQMLADISGLQLDYRTGGDVGPALGAARLAHVAVHDEADRPGLLKP 447
E.c. CGIKPQSVTLIGGGARSE-YWRQMLADISGQQLDYRTGGDVGPALGAARLAQIAANPEKSLIELL-P 447
S.x. NAININEIVSIGGGAKNQWLWIQ--ADIFNTTITTRT-EEQGPAYGAAMIAAMGEQWFNTFNEMSEA 455
S.v. DADRDSPLLLIGGGARGRA-WQQTVRRLSGRPVQIPTAKELV-ALGAAAQAAGLLTGEDPRAVARRW 441

                          *  *
K.p. -LPLEQAHRPDDRRVAHYAPQREIFARIFSKLKPLMS+                             483
E.c. QLPLEQSHLPDAQRYAAYQPRRETFRRLYQQLLPLMA+                             484
S.x. WIAYH-------QKVY---P-IETNTKSYQDLFNIYKTIYD+                         485
S.v. NTAAG----PVLEPV----PRDEETLARIGGVLSEAS+                             480
```

Abb. 9: Vergleich der Proteinsequenzen verschiedener Xylulokinasen. K.a.= *K.aerogenes* (D-Arabinitol-Stoffwechsel); K.p.= *K.pneumoniae* KAY2026; E.c.=E.coli; S.x.= *Staphylococcus xylosus;* A.s.= *Ampullariella sp.*, S.v.= *Streptomyces violaceoniger.*

1.6. Charakterisierung des Xylose-Operons auf Transkriptionsebene

Für Gram- negative Bakterien war bislang nicht nachgewiesen, ob die Gene xylA und xylB ein Operon, d.h. eine Transkriptionseinheit, bilden. Diese Aussage war nur für Gram-positive Bakterien bestätigt worden, (GÄRTNER ET AL.,1988; AMORE ET AL., 1990; SIZEMORE ET AL.,1991).
Um zu überprüfen, ob die Gene xylA und B als Operon transkribiert werden, wurde die Methode der "NORTHERN"- Blot Hybridisierung durchgeführt. Diese Methode eignet sich zur Bestimmung der Transkriptlänge von Genen und kann weiterhin Aufschluß über möglicherweise vorhandene Überexpression von Genen auf m-RNA-Ebene geben. Die Bestimmung der Transkriptlänge erfolgte mit Gesamt-RNA des Ausgangsstammes *K.pneumoniae* KAY2026 sowie der RNA eines rekombinanten Überproduzenten der Xylose-Gene, *E.coli* DH5/pZY224. Die Gesamt- RNA der beiden Stämme wurde in einem 0,8%- igen Formaldehydgel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und anschließend gegen eine Digoxigenin-markierte "antisense"-RNA Sonde hybridisiert (SAMBROOK ET AL., 1989; BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim). Die Markierung der RNA-Sonde erfolgte mit T7-RNA-Polymerase und dem mit BamHI linearisierten Vektor pZY224a (xylB'A) als Matrize. Die Digoxigenin-markierten RNA:RNA-Hybride konnten durch Bindung des Anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase Konjugates und einer nachfolgenden enzymkatalysierten Farbreaktion detektiert werden. Die Länge der RNA-Hybride wurde mit Hilfe von mitgeführten RNA-Molekulargewichtsstandards bestimmt. Das Ergebnis dieser NORTHERN-Blot- Analyse ist in Abb. 10 zu sehen. Es wurde deutlich,daß bei beiden Stämmen ein etwa 3000 Basen langes Transkript entsteht. Daraus läßt sich schließen, daß xylA und xylB eine Transkriptionseinheit darstellen. Daneben trat ein zweites kleineres Transkript von etwa 1600 Basen auf. Hierbei könnte es sich um ein xylA- Transkript handeln, bei dem es aufgrund von Termination zum Abbruch der Transkription vor xylB gekommen ist oder unter der Voraussetzung eines zusätzlichen Promotors vor dem xylB-Gen um ein xylB-Transkript. Möglich wäre auch ein m-RNA-Abbauprodukt. Diese Ergebnisse sind noch weiter zu untersuchen, da es sich möglicherweise dabei um einen Regulationsmechanismus für die Expression der Xylose-Gene auf Transkriptionsebene handeln könnte. Die NORTHERN-Blot Analyse bestätigte mit einem starken Hybridisierungssignal auch auf m-RNA-Ebene, die im Enzymtest und

in der SDS-PAGE gefundene starke Überexpression der Xylose-Gene im Plasmid pZY224, in dem die Xylose-Gene vom SP6-Promotor exprimiert werden, (vgl. III.1.6.).

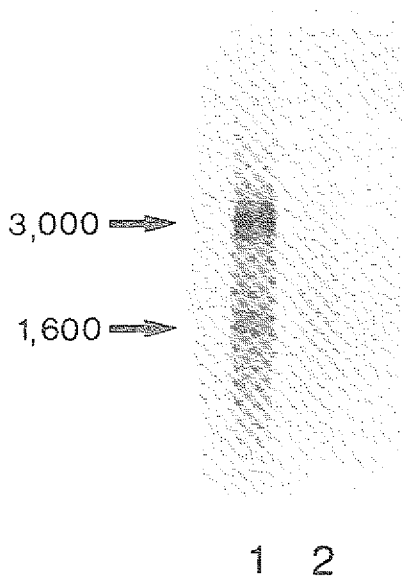


Abb.10: "Northern"-Blot Analyse der Xylose-Gene aus *K. pneumoniae* KAY2026; Gezeigt sind die Signale der Hybridisierung von Gesamt-RNA aus *K. pneumoniae* KAY2026 und *E.coli* DH5/pZY224 (jeweils etwa 5µg) gegen eine Digoxigenin-markierte xylAB RNA-Sonde.
Spur 1: *E.coli* DH5/ pZY224; Spur 2: *K.pneumoniae* KAY2026

Anschließend wurde der Transkriptionsstart des Xylose-Operons im Ausgangsstamm *K.pneumoniae* KAY2026 bestimmt. Dazu wurde ein RNAse -Schutz-Experiment nach SAMBROOK ET AL., (1989) durchgeführt. Die Gesamt-RNA wurde aus *K.pneumoniae* KAY2026 isoliert. Zur Hybridisierung wurde eine α^{35}S-CTP-markierte 350 Basen große RNA- Sonde eingesetzt, die den Promotorbereich des Xylose-Operons sowie 25bp des translatierten xylA-Gens umfaßte. Zur Herstellung dieser Matrize wurde das 0,35 kb PvuI-Fragment aus dem Vektor pZY250g-2 isoliert, mit Klenow- Polymerase die Enden abgedaut und in die SmaI- Schnittstelle des Vektors pGEM7Zf$^+$ ligiert. Die Bestimmung der Orientierung des kleinen Fragmentes in dem neuen Konstrukt pZY227, erfolgte durch Restriktion mit den beiden Enzymen EcoRI/ BstEII. Das Insert war so orientiert, daß die Transkriptionsrichtung in Richtung des T7-Promotors lag. Durch in vitro Trans-

kription ausgehend vom SP6-Promotor, konnte dann nach Linearisierung der Matrize pZY227 mit EcoRI durch Einbau von radioaktiven Nukleotiden eine markierte RNA-Sonde synthetisiert werden. Die Hybridisierung und nachfolgende RNAse-Behandlung erfolgte,wie in Material und Methoden beschrieben. Mit Hilfe verschiedener radioaktiv markierter DNA-und RNA-Größenstandards, sowie einer mitgeführten DNA-Sequenz konnte die Größe des entstandenen RNA:RNA-Hybrids nach Auftrennung über ein denaturierendes Polyacrylamid/ Harnstoff-Gel bestimmt werden. Das Ergebnis des RNAse-Schutz-Experimentes ist in Abb.11 dargestellt. Schon nach 24 stündiger Exposition des Röntgenfilms war ein starkes 175 Basen langes Signal sichtbar. Durch Abzählen der Sequenz (siehe Abb.6) ausgehend von der PvuI-Schnittstelle, die 25 bp im xylA-Gen liegt (nach Behandlung mit Klenow-Enzym) in den 5'-Bereich des Operons, ergab sich für den Transkriptionsstart die Position -150 bezogen auf den Translationsstart AUG. Im 5'-"upstream"-Bereich des bestimmten Transkriptionsstartes findet sich eine gute -10 (TATATT) und mit einem Abstand von 19bp eine -35 (TTGAGG) -Konsensussequenz, die in der DNA-Sequenz in Abb.6 vermerkt sind. Die Bereiche entsprechen klassischen enterobakteriellen Promotorstrukturen, (ROSENBERG UND COURT, 1979). In der Nähe der -35 Region befindet sich in Wiederholung die für cAMP/ CRP-Bindestellen typische Konsensussequenz (TGTGA), (VALENTIN- HANSEN, 1991; DE CROMBRUGGHE ET AL., 1984). Die für perfekte Symmetrie notwendige Sequenz (TCACA) der cAMP/CRP-Bindestelle (CAATG bzw. GTAAT) war in der vorliegenden Sequenz nicht vorhanden.

1.6. Untersuchung des in trans vermittelten Xylose-negativen Phänotyps

Bei den Untersuchungen zur Expression der verschiedenen xyl-Konstrukte in *E.coli* hatte sich gezeigt,daß das Plasmid pZY240, welches das xylA-Gen,zusammen mit der 5'-"upstream" Region und 1,5kb des xylB-Gens (pZY240) trug, einen starken Effekt auf den Xylose-Phänotyp der *E.coli* Wirtszellen HB101 ausübte. Das Konstrukt wurde daraufhin in verschiedenen *E.coli* Stämmen untersucht. Durch Vorhandensein des Plasmids pZY240 bekamen sogar *E.coli* Wildtyp-Stämme, wie ED8767, die xylAB$^+$ sind, einen Xylose- negativen Phä-

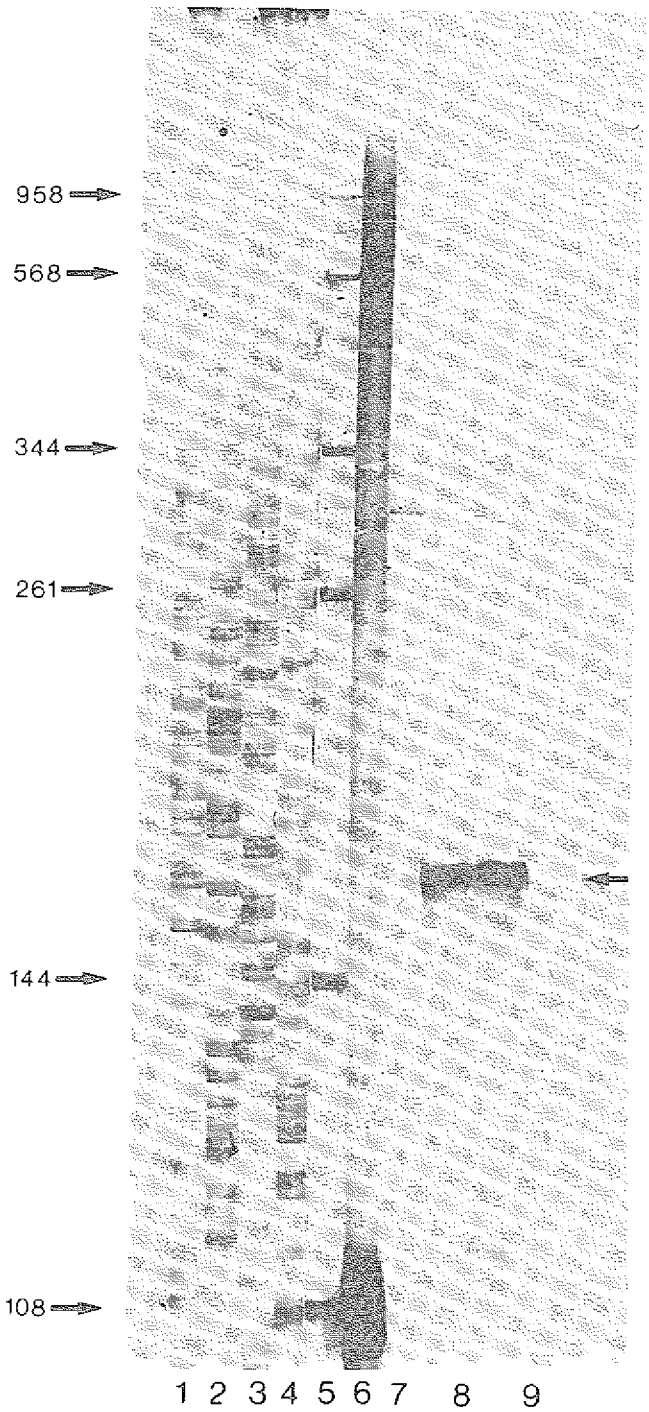


Abb.11: RNAse-Schutz-Experiment zur Bestimmung des Transkriptionsstartes des Xylose-Operons von *K. pneumoniae* KAY2026. Spur 1-4: TCGA- DNA-Sequenz M13mp18 ("universal primer"); Spur 5: pUC18 /Sau3A (Klenow)- DNA-Standard (108, 144, 261,344,588,958 Basen); Spur 6: RNA-Standard 109 Basen, Spur 7: RNA-Standard 304 Basen; Spur 8: *K. pneumoniae* KAY2026 RNA, 50µg; Spur 9: RNA-Standard 304 Basen

notyp. Die Messung der Enzymaktivitäten zeigte, daß die Xyloseisomerase in allen Stämmen normal, mit etwa 0,5 U/mg, exprimiert wurde, daß jedoch in xylB$^+$ Stämmen eine ganz starke Reduktion der Xylulokinase-Aktivität von ≥1U/mg auf ≤0,05 U/mg zu verzeichnen war, (Tab.6). Ausgehend von Befunden mit dem Plasmid pZY240 und Literaturdaten (LAWLIS ET AL.,1984; ROSENFELD ET AL.,1984;BATT ET AL., 1986), schien der beobachtete *trans*-Effekt auf die Expression von xylB in Zusammenhang mit der Xyloseisomerase xylA oder dem 5'- gelegenen "upstream" Bereich des xylA-Gens zu stehen. Um die tatsächlich verantwortliche Region genauer einzugrenzen, wurde zunächst ein 1,7 kb EcoRI/PstI-Fragment, welches für den Genstart von xylA (≈ 0,5 kb) kodiert, sowie etwa 1,2kb der 5'-"upstream" Region enthält, aus dem Plasmid pZY240 isoliert und in den Vektor pUC19 kloniert. Das erhaltene Konstrukt pZY250 (4,3kb; Abb. 13) wurde in verschiedene *E. coli* Stämme transformiert. Auch dieses xyl-Plasmid vermittelte allen *E.coli* Stämmen einen Xylose-negativen Phänotyp. Die Messung der Enzymaktivitäten ergab, daß neben der chromosomalen Xylulokinase auch die Xyloseisomerase-Aktivität des Wildtyps ganz stark reduziert war, (Tab.6). Daraus war zu schließen, daß für den beobachteten *trans*-Effekt auf die Expression der chromosomalen Xylose-Gene, keine vollständige, enzymatisch aktive Xyloseisomerase benötigt wurde. Stattdessen schien der 5'-"upstream" bzw. der Genstart von xylA beteiligt zu sein.

Stamm	Plasmid	Phänotyp auf McC+Xylose	Spezifische Aktivität (U/mg) Xyloseisomerase	Xylulokinase
ED8767	-	rot	0,36	0,91
ED8767	pZY240	weiß	0,71	0,05
ED8767	pZY250-1	weiß	0,06	0,01
HB101	-	weiß	0,008	1,88
HB101	pZY240	weiß	0,52	0,01
HB101	pZY250-1	weiß	0,04	0,03

Tab. 6: Vergleich der Enzymaktivitäten von Xyloseisomerase und Xylulokinase in *E.coli* Wildtyp und der *xylA*- Mutante HB101 vor bzw. nach Transformation mit den Plasmiden pZY240 und pZY250. Die Kulturen waren in Minimalmedium+ 0,4% Glycerin+ 0,1% Xylose+ Amp angezogen worden.
Das Plasmid pZY240 trägt den 5'-"upstream"Bereich des xylA-Gens, das gesamte Gen und 1,5kb des xylB-Gens; das Konstrukt pZY250 besteht aus der 5'-"upstream"Region von xylA und ≈ 0,5kb des Gens.

In der Literatur war bei der Klonierung des Xylose-Operons aus *E.coli* (LAWLIS ET AL., 1984; ROSENFELD ET AL., 1984; BATT ET AL., 1986) nach der Überexpression von xylA auf Plasmiden mit hoher Kopienzahl ebenfalls ein Xylose-negativer Phänotyp von *E.coli* Wildtypzellen beobachtet worden. Dieser Effekt wurde in Zusammenhang mit der verstärkten xylA Transkription (m-RNA oder XylA-Genprodukt) diskussiert, wodurch es zur Titration von Aktivatoren kommen sollte. Die molekulare Ursache dieses Phänomens sowie der genaue Wirkort blieb bislang ungeklärt.

1.6.1. Entfernung des Promotors der Xylose-Gene und Rekonstitution des Operons

Die Entfernung des durch Xylose induzierbaren xylAB- Promotors verfolgte verschiedene Ziele:

- Aufklärung der Bedeutung der Promotorregion für den *trans*-Effekt auf die chromosomalen Xylose-Gene
- Überexpression des Xylose-Operons in *E.coli*
- Deletion des Promotors notwendig für gute Expression des Xylose- Operons in *Z.mobilis* unter Kontrolle des *Z.mobilis* eigenen pdc-Promotors

Im folgenden wurde der 5'- upstream Bereich der Xyloseisomerase im Plasmid pZY250 unidirektional, sukzessive mit Exonuklease III verkürzt. Die Reaktion wurde zu definierten Zeitpunkten abgestoppt, die verkürzten Konstrukte religiert und in *E.coli* Wildtyp ED8767 transformiert. Die Selektion der Transformanden erfolgte auf McConkey+Xyl+ Amp, wobei der mit der Verkürzung der 5'-Region einhergehende Phänotyp direkt verfolgt werden konnte. Abb. 12A zeigt schematisch die Durchführung der Exonuklease III-Behandlung und die dabei erhaltenen, entscheidenden Konstrukte mit ihren jeweiligen Phänotypen. Die verkürzten Plasmide wurden isoliert und die verbliebene Insertgröße durch Restriktion und anschließende gelelektrophoretische Auftrennung bestimmt. Es wurde deutlich,daß die Deletion von etwa 0,7 kb im 5'-Bereich keine Veränderung des

Xylose-negativen Phänotyps bewirkte. Die Deletion von 0,7-0,9 kb führte zu einer graduellen Steigerung der Xylose-Vergärung (Kolonien auf McConkey+Xylose: pZY250-exo1 weiß und -exo 0,8 pink) und die Entfernung von insgesamt 1,1 kb der 5'-Region führte zu einem Xylose-positiven Phänotyp (pZY250-exo 0,6: rote Kolonien, Abb. 12B).

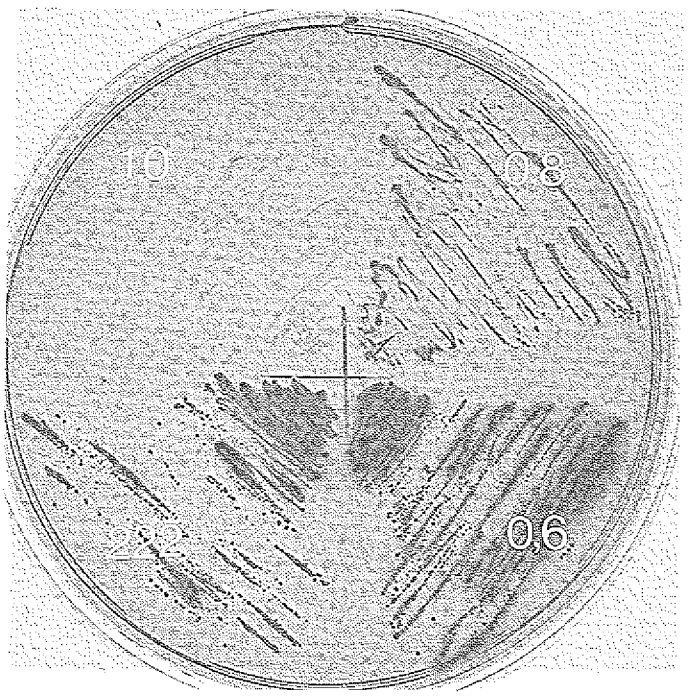


Abb. 12B: Wachstum der Stämme *E.coli* ED8767/ pZY250- exo 1,0,; -exo 0,8, - exo 0,6 und /pZY222 auf McConkey+ Xylose. weiße Kolonien: keine Xyloseverwertung; pink Kolonien: schwache Xyloseverwertung; rote Kolonien: gute Xyloseverwertung

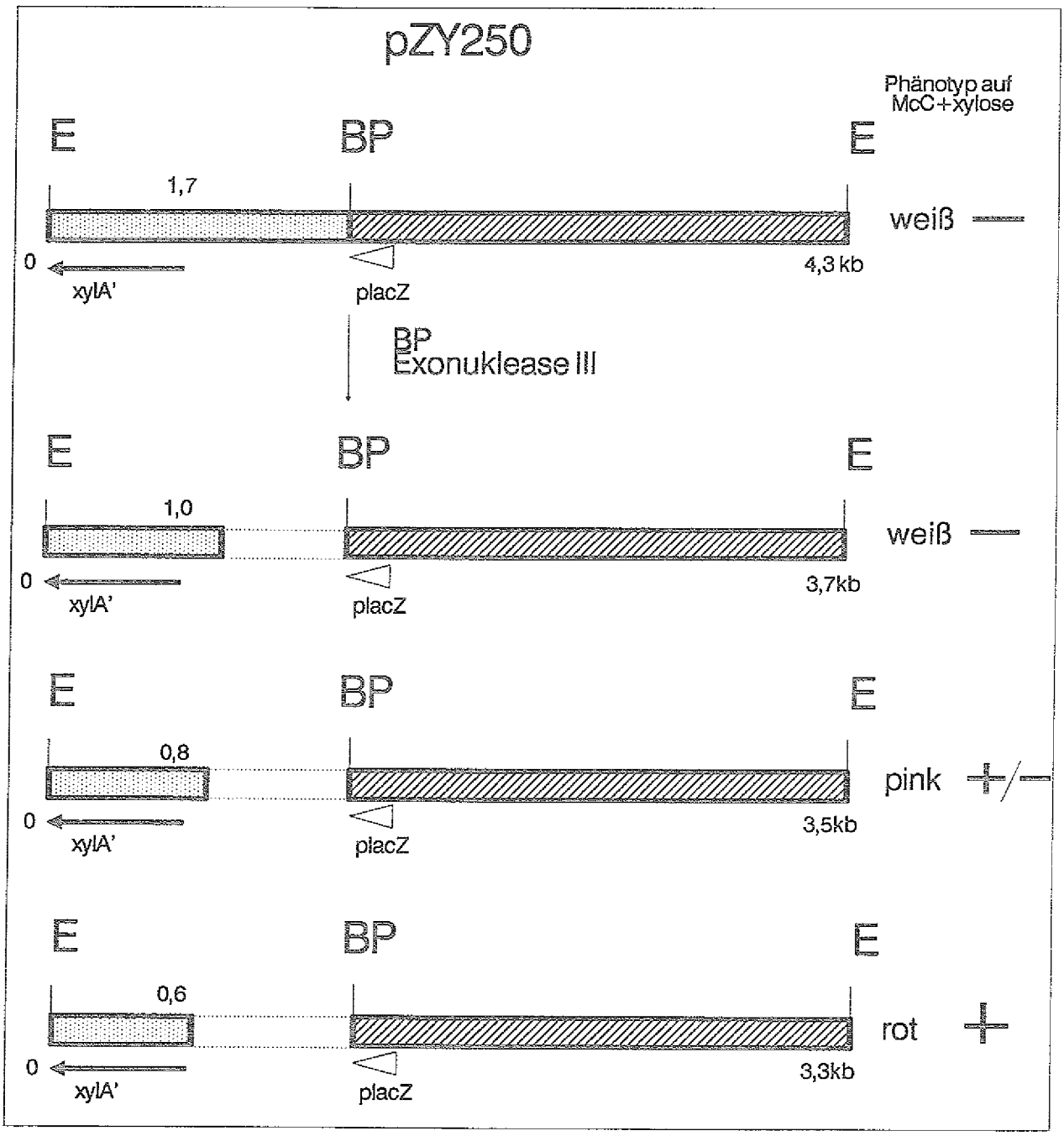


Abb. 12A: Entfernung der Promotorregion in pZY250 mit Exonuklease III und Nachweis der durch pZY250 und seine Derivate vermittelten Phänotypen in *E.coli* ED8767 auf McConkey+Xylose, (A,B).
E= EcoRI; P= PstI; ExoIII= Exonuklease III; die Korrelation von Koloniefärbung und Xyloseverwertung ist der Legende von Abb.12B zu entnehmen.

Mit dieser Untersuchung ließ sich der für den beobachteten *trans*-Effekt verantwortliche Bereich auf etwa 200bp eingrenzen. Im folgenden war noch zu überprüfen, ob die Region 5'- upstream des xylA- Gens lag, oder schon Teile des Strukturgens umfaßte. Falls der Effekt vom 5'-upstream-Bereich ausging, sollte sich das komplette Xylose-Operon aus dem Konstrukt pZY250 -exo 0,6 und einem geeigneten Fragment, das den Rest des xylA- Gens mit dem gesamten xylB- Gen trug, rekonstituieren und hinter einem geeigneten Promotor exprimieren lassen.

Wie aus Abb.13 hervorgeht,wurde das Xylose-Operon rekonstituiert, indem das 2,9 kb EcoRI- Fragment aus pZY220 (xylA'B) in das mit EcoRI gespaltene Plasmid pZY250 -exo 0,6 ligiert wurde. Durch Insertion des 2,9kb EcoRI-Fragmentes in richtiger Orientierung (xyl AB) entstand das Konstrukt pZY222 (6,2kb), welches sowohl *xylA* als auch *xylB* Mutanten auf McConkey+Xylose+Amp-Platten vollständig komplementierte. Daraus war zu folgern, daß die für den *trans* Effekt verantwortliche Region im 5'-upstream Bereich des xylA-Gens gelegen ist.

Um die Expression der Xylose-Gene auch ausgehend von einem konstitutiven, nicht regulierten Promotor untersuchen zu können, wurde das Operon zusätzlich noch in den Vektor pGEM7Zf$^+$(PROMEGA) hinter den SP6-Phagen-Promotor kloniert. Die Klonierung erfolgte, wie in Abb.13 dargestellt in zwei Schritten. Zunächst wurde ein Teil des xylA-Gens aus pZY222 als 0,7kb HindIII-Fragment in die HindIII- Schnittstelle des Vektors pGEM7Zf$^+$ ligiert, so daß xylA' in Orientierung des SP6- Promotors lag. Das Konstrukt wurde mit Eco RI nachgeschnitten und der xylA'B- Anteil des Operons als 2,9 kb EcoRI-Fragment in die EcoRI-Schnittstelle ligiert. Im entstandenen Konstrukt pZY224 (6,5kb) erfolgte die Expression der Gene ausgehend vom SP6-Promotor.
Abb. 13 zeigt zusammenfassend ein Übersichtsschema der wesentlichen Klonierungsschritte von Plasmid pZY220 bis zum Konstrukt pZY 224.

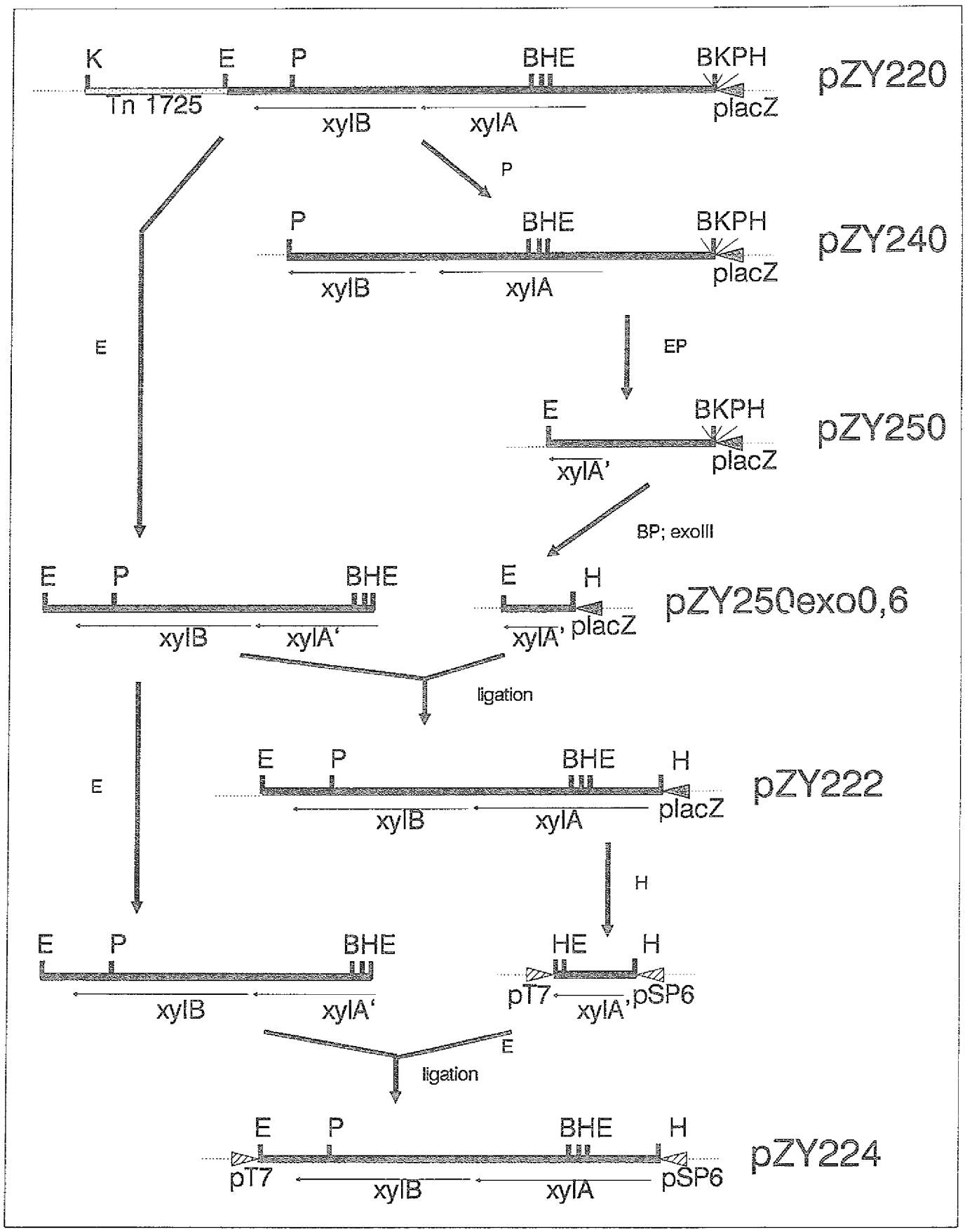


Abb.13: Übersichtsschema der Subklonierungen von pZY220 bis pZY224
Abbkürzungen: Restriktionsenzyme: E= EcoRI; B= BamHI;
P= PstI; H= HindIII. ExoIII= Exonuklease III;
Promotoren: placZ (pUC19); pSP6 und pT7 (pGEM7Zf^{+})

Die Expression der Konstrukte pZY222 und pZY224 in *E.coli* HB101 zeigte, daß durch Deletion des Operon-eigenen Promotors und Ablesung ausgehend von einem fremden Promotor (placZ, pSP6) erstmals Überexpression der beiden Enzymaktivitäten erreicht wurde. Die höchsten Aktivitäten (Xyloseisomerase:3-4 U/mg; Xylulokinase: 4-5 U/mg), mit 5-7facher Überexpression,wurden in einem unregulierten SP6- Promotorsystem (pZY224) erreicht, während bei dem cAMP/CRP-abhängigen lacZ-Promotor im Konstrukt pZY222 die Überexpression weniger deutlich wurde (2-fach).

Nachdem durch Deletion der Promotorregion im Plasmid pZY224 die Überexpression der spezifischen Aktivitäten von Xyloseisomerase und Xylulokinase erreicht worden war, wurde die Expression auch auf Proteinebene untersucht. Dazu wurden Rohextrakte der verschiedenen rekombinanten *E.coli* Stämme über eine SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinbanden angefärbt. Es zeigte sich, in Übereinstimmung zu den enzymatischen Messungen, daß bei den pZY190 und pZY220 Rekombinanten keine verstärkte XylA/B Proteinbande auftrat. Bei dem Konstrukt pZY222 war eine starke Protein-Doppelbande bei 50-52 kDa in den Rohextrakten erkennbar, beim Plasmid pZY224 machten die XylAB Proteine, den Hauptbestandteil des Zellproteins aus (Abb.14A).Die mit dem Plasmid pZY224 rekombinanten *E.coli* Stämme wurden anschließend mikroskopisch untersucht. Wie Abb.14B zeigt, führte die Akkumulation von großen Mengen Xyl A/B Protein in den Zellen zur Ausbildung langer Zellketten. In *E.coli* Zellen ist dies ein Indiz für Mangelbedingungen der Zelle, und man kann daraus folgern, daß starke Überexpression der Xylose-Gene sich nachteilig auf den *E.coli* Stoffwechsel auswirkte.

Aus den Ergebnissen dieses Kapitels, lassen sich folgende Schlüsse zur Erklärung des *trans*-Effektes ziehen. Die Inhibierung der Expression der chromosomalen Xylose- Gene durch die Plasmide pZY 240 und pZY250 benötigt keine intakte, plasmidkodierte Xyloseisomerase. Der für den *trans* -Effekt verantwortliche Bereich wurde

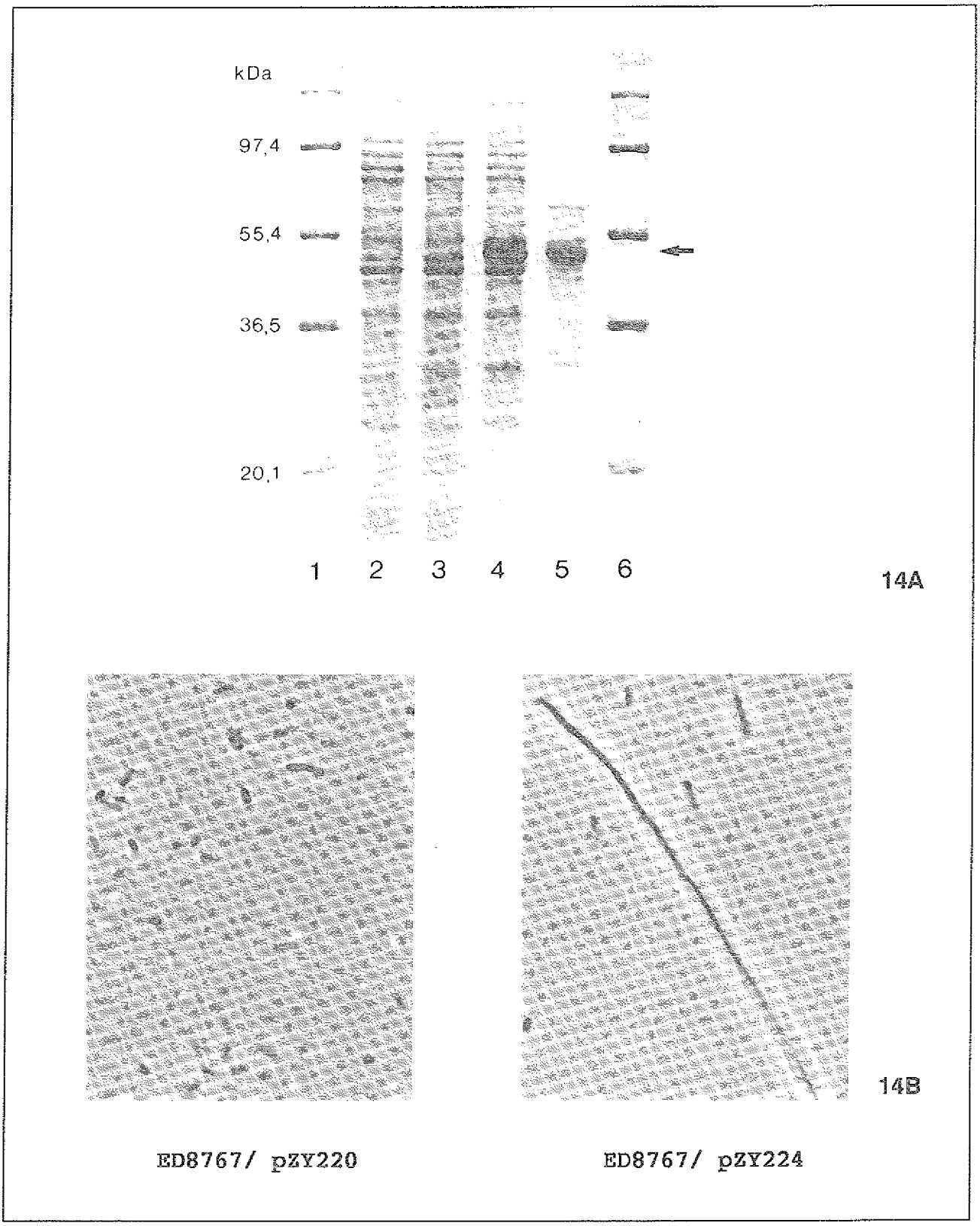


Abb.14 A: SDS-PAGE von xyl^+ rekombinanten *E.coli* ED8767 Stämmen. Es wurden jeweils 50µg Protein (UZ-Extrakt) aufgetragen. Spur 1, 6: Molekulargewichtsstandard (Combithek, BOEHRINGER MANNHEIM); Spur 2: *E.coli* ED8767/pUC19; Spur 3: *E.coli* ED8767/pZY220; Spur 4: *E.coli* ED8767/ pZY222; Spur 5: *E.coli* ED8767/ pZY224
Abb.14B: Mikroskopische Aufnahmen des $xylAB^+$ -Überproduzenten *E.coli* ED8767/ pZY224, im Vergleich zu ED8767/pZY220.(Vergr.100x)

auf etwa 200 bp eingrenzt und durch Rekonstitution des Operons, wurde bewiesen, daß er 5'-"upstream" des xylA Strukturgens liegt. Aus den vorliegenden DNA-Sequenzdaten und der Lage des Transkriptionsstartpunktes bei -150 kann gefolgert werden, daß die Promotorregion bzw. die eng benachbarte cAMP/CRP-Bindestelle in Zusammenhang mit dem Xylose-negativen Phänotyp steht. In Übereinstimmung zu dieser Aussage steht auch der Befund, daß die Überexpression der Xylose-Gene erst nach Entfernen des eigenen Promotors ausgehend von fremden Promotoren (z.B. pGEM7Zf$^+$) erfolgte und in diesen Plasmiden (pZY222, pZY224) kein Effekt auf die chromosomalen Gene auftrat. Daraus läßt sich für den *trans*-Effekt folgendes Modell entwickeln: Die xyl-Promotorregion bildet in hoher Kopienzahl eine "Falle" für ein Aktivatormolekül mit limitierter Synthese (möglicherweise XylR oder CRP). Dem chromosomalen Promotor wird so der notwendige positive Regulator wegtitriert, und die Genexpression ist abgeschaltet. Durch Deletion der Aktivatorbindestelle auf dem Plasmid wurden wieder normale Aktivitäten der chromosomalen Xylose-Gene ermöglicht.

2. Untersuchungen zur Expression der Xyloseisomerase und Xylulokinase in *Z.mobilis*

2.1. Konstruktion von Vektoren für die Expression der Xylose-Gene in *Z.mobilis*

Vor der Übertragung des Xylose-Operons in *Z.mobilis* war es erforderlich, einen geeigneten Expressions-Pendelvektor, der die Gene stabil und in hohem Maße exprimiert, zu entwickeln. Die Xylose-Gene sollten ausgehend von einem *Z.mobilis* eigenen konstitutiven, starken Promotor exprimiert werden, da es sich mehrfach gezeigt hatte, daß in *Z.mobilis* eingebrachte Gene häufig nur schwach bzw. überhaupt nicht durch den eigenen Promotor transkribiert wurden (CAREY ET AL., 1983; GOODMAN ET AL., 1984; LE JEUNE ET AL., 1988; MISAWA ET AL., 1988).

Zu Beginn dieser Arbeit stand der von REYNEN ET AL., (1990) entwickelte Expressionsvektor pPTZ1 zur Verfügung. Dieser Vektor enthält den konstitutiven Promotor des Pyruvat-Decarboxylase-Gens von *Z.mobilis* vor einer Polyklonierschnittstelle mit den singulären Schnittstellen KpnI und PstI, worauf die starken Terminationssequenzen T1T2 des rrnB Gens aus *E.coli* (BROSIUS UND HOLY, 1984) folgen. Die Selektion rekombinanter *Z.mobilis* Stämme erfolgt über eine Tetracyclinresistenz. Der Vektor pPTZ1 enthält ein 1,7 kb großes kryptisches Plasmid pZMO2 aus dem Stamm *Z.mobilis* CU1rif2, welches als Replikationsursprung für *Z.mobilis* dienen soll.

Um festzustellen, ob das Xylose-Operon aus *K.pneumoniae* KAY2026 in *Z.mobilis* exprimiert wird, wurden die beiden Xylose-Gene ausgehend von dem Plasmid pZY220 zunächst in den Vektor pPTZ1 kloniert. Das Plasmid pZY220 wurde mit dem Restriktionsenzym KpnI geschnitten, das 5,9kb große Fragment, welches das gesamte Xylose-Operon, einschließlich seiner Promotorregion und dem 1,3 kb Transposonanteil trägt, isoliert und in den mit KpnI geöffneten Vektor pPTZ1 ligiert.Der Ligationsansatz wurde in kompetente Zellen der *E.coli xylA* Mutante HB101 transformiert und rekombinante Kolonien wurden auf tetracyclinhaltigen McConkey+Xylose+Tc-Platten selektioniert. Insgesamt wurden 38 rekombinante Kolonien isoliert, von denen 25 Kolonien durch ihren roten Phänotyp eine er-

folgreiche Komplementation anzeigten. Aus 12 roten Transformanden wurde die Plasmid-DNA isoliert, und die Orientierung des inserierten Xylose-Operons durch Restriktionsanalyse bestimmt. Beide Orientierungen des Xylose-Operons konnten nachgewiesen werden (pZY221-1 bzw.-2). Da auch diejenigen Plasmide (pZY221-2), in denen das Operon entgegengesetzt zum *pdc*-Promotor liegt, Komplementation ermöglichten, erfolgt die Transkription in den Konstrukten vom gen-eigenen Promotor.
E.coli HB101/ pZY221-1 bzw. pZY221-2 wurde dann als Donorstamm bei der Konjugation der Plasmide in den *Z.mobilis* Stamm CU1rif2 eingesetzt. Da der pPTZ1-Vektor die für die Ausbildung eines Konjugationsapparates notwendigen tra-Gene nicht besitzt, wurde als zusätzlicher Elterstamm noch der *E.coli* Stamm ECG18, der das sogenannte Helferplasmid pRK2013 enthielt,eingesetzt. Während der Konjugation wurde pRK2013 zunächst nach *E.coli* HB101/pZY221-1 bzw -2 übertragen und bewirkte in einem zweiten Schritt aufgrund seiner *in trans* wirkenden tra-Funktionen die Mobilisierung von pZY221-1 bzw.-2 nach *Z.mobilis* CU1-rif2 (triparentale Kreuzung; nach SKOTNICKI ET AL., 1980). Transkonjuganden wurden auf tetracyclinhaltigen Nährböden, die zur Gegenselektion der Elterstämme zusätzlich Rifamycin enthielten, selektioniert. Da nach 6-tägiger Inkubation die Anzahl spontanresistenter Kolonien auf Kontrollplatten, die nur den Rezipienten enthielten, annähernd so hoch war, wie auf den Kreuzungsplatten, konnten Transkonjuganden nur über Koloniehybridisierung, bei der Digoxigenin-markiertes linearisiertes pZY220-Plasmid als Sonde eingesetzt wurde, nachgewiesen werden. Die Konjugationsfrequenz lag bei etwa 10^{-8}/ Rezipientenzelle. Unter ca. 700 Spontanresistenten wurden 14 Transkonjuganden festgestellt. Da sich rekombinante Plasmide in dem Stamm CU1-rif2 aufgrund des Vorhandenseins von 6 kryptischen Plasmiden (SCORDAKI UND DRAINAS,1987)nicht direkt auf ihr Plasmidmuster hin überprüfen lassen, war es erforderlich, die Plasmid-DNA aus den Transkonjuganden zu isolieren, durch Retransformation in kompetente *E.coli* HB101 Stämme zurückzuführen und nach erneuter Isolierung der Plasmide aus den *E.coli* Stämmen, das Plasmidmuster mittels Restriktionsanalyse zu untersuchen. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, daß die Plasmide in *Z.mobilis* CU1-rif2 teilweise durch Rekombination veränderte Restriktionsmuster aufwiesen. Damit erschien mit dem Vektor pPTZ1 keine dauerhafte stabile Expression der Xylose-Gene möglich zu sein. Die Instabilität

dieses Vektors ist wahrscheinlich auf seinen 1,7 kb großen pZM02-Anteil zurückzuführen, der Homologie zu anderen kryptischen Plasmiden von *Z.mobilis* CU1-rif2 besitzt, (MISAWA UND NAKAMURA,1989).

Um zu überprüfen, ob in *Z.mobilis* Expression der Xylose-Gene erfolgte, wurden Xyloseisomerase- und -Kinase Enzymtests mit den Transkonjuganden, die das richtige Plasmidmuster aufwiesen,durchgeführt. Es zeigte sich, daß beide Enzyme exprimiert wurden. Die Xyloseisomerase von *Z.mobilis* CU1-rif2/pZY221-1 betrug 0,13 U/mg, die Aktivität von pZY221-2 Rekombinanten 0,08 U/mg. Die spezifische Aktivität der Xylulokinase lag für das erste Konstrukt bei 0,21 U/mg, für die zweite Orientierung bei 0,18 U/mg. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, daß das Xylose-Operon in dem Konstrukt pZY221 wahrscheinlich unter Kontrolle des gen- eigenen Promotors steht,der in diesem Falle von *Z.mobilis* erkannt wurde. Eine Steigerung der Enzymaktivitäten in *Z.mobilis* sollte daher durch Entfernen des Xylose-Promotors und Expression der Gene ausgehend vom *pdc*-Promotor in einem stabilen Expressionsvektor möglich sein.

Um die oben beschriebenen Anforderungen zu erfüllen, war es notwendig einen veränderten Expressionsvektor zu konstruieren, der verbunden mit den positiven Eigenschaften des Vektors pPTZ (p_{PDC} T_1T_1, Tet^R, singuläre Klonierschnittstellen) zusätzlich folgende Eigenschaften aufweisen sollte:

- möglichst geringe *Z.mobilis* homologe DNA-Regionen, um Rekombinationsereignisse zu reduzieren und die Stabilität zu erhöhen
- verbesserte Mobilisierbarkeit und erweitertes Wirtsspektrum verbunden mit reduzierter Spontanresistenz

Im folgenden wurde ausgehend von dem Vektor pPTZ3 (REYNEN ET AL., 1990) der Expressionspendelvektor pPTZom3 (8,7kb) konstruiert,der die genannten Anforderungen erfüllte. Die Klonierung des Vektors erfolgte in zwei Schritten:

1) Stabilisierung des Vektors pPTZ3 durch Eliminierung des pZMO2-Anteils und Einführung eines 0,8 KB "ori"-Fragmentes aus dem kryptischen Plasmid pZM03 von *Z.mobilis* CU1-rif2, das keine Homologien zu anderen kryptischen Plasmiden besitzt.

2) Mobilisierung des Vektors pPTZ ori3-1 durch Einführung einer 2,7kb "mob-site" aus dem Vektor pSUP104 (SIMON ET AL., 1983).

Untersuchungen der Gruppen MISAWA ET AL, (1989) und SCORDAKI UND DRAINAS, (1990) hatten gezeigt, daß das kryptische Plasmid pZMO3 von *Z.mobilis* CU1rif2 keine Homologien zur DNA anderer *Z.mobilis* Stämme besitzt und daß der Replikationsursprung dieses Plasmids zur Konstruktion stabiler Expressionsvektoren geeignet ist. Das Konstruktionsschema des Vektors pPTZori3-1 zeigt Abb.15. Der Vektor pPTZ3 wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRI geschnitten, das 5,2kb Fragment aus einem Agarosegel isoliert und religiert (pPTZ3 -02). Anschließend wurde das 0,8kb MspI/ScaI Fragment aus dem Vektor pDS3154 (SCORDAKI UND DRAINAS, 1990), nach Auffüllen mit Klenow-Enzym in den mit PvuII geöffneten 5,2 kb Vektors pPTZ3 -02 ligiert. Das erhaltene Konstrukt pPTZ ori3-1 (6,0kb) enthält nun einen für die stabile Replikation in *Zymomonas* geeigneten "origin".
Ausgehend von diesem Konstrukt wurde die Mobilisierung des Vektors, die zu erhöhten Konjugationsfrequenzen führen soll, angestrebt. Der Vektor pPTZ war mit seinem großen pBR322-Anteil nicht mobilisierbar, sondern wurde bei der Konjugation wahrscheinlich über Cointegratbildung (seltenes Ereignis) übertragen (CHO ET AL. 1989; REYNEN ET AL.,1990). Zur Erhöhung der Konjugationsfrequenzen wurde daher eine "mob-site" aus dem Vektor pSUP104 (SIMON ET AL.,1983) eingeführt, da von diesem Vektor bekannt war, daß er gut nach *Z.mobilis* mobilisierbar ist (UHLENBUSCH ET AL., 1991).
Der Vektor pSUP 104 wurde mit dem Restriktionsenzym AvaI geschnitten, das 2,7 kb Fragment (kodiert für oriV oriT mob) wurde isoliert und in die mit Klenow-Enzym aufgefüllte EcoRI Schnittstelle von pPTZ ori3-1 ligiert (pPTZom3).

Zur Überprüfung der Mobilisierbarkeit des erhaltenen Vektors pPTZom3 (Abb.15) wurde eine Kontrollkonjugation mit dem Donorstamm *E.coli* S17-1/pPTZom3 und den *Z.mobilis* Stämmen CU1rif2 und CP4 durchgeführt. Der neu konstruierte Vektor war nicht nur in *Z. mobilis* CU1rif2 mobilisierbar, sondern es gelang hiermit erstmals, einen pPTZ-Expressionsvektor auch in den für die biotechnologische Anwendung geeigneten *Z.mobilis* Stamm CP4 zu bringen. Die

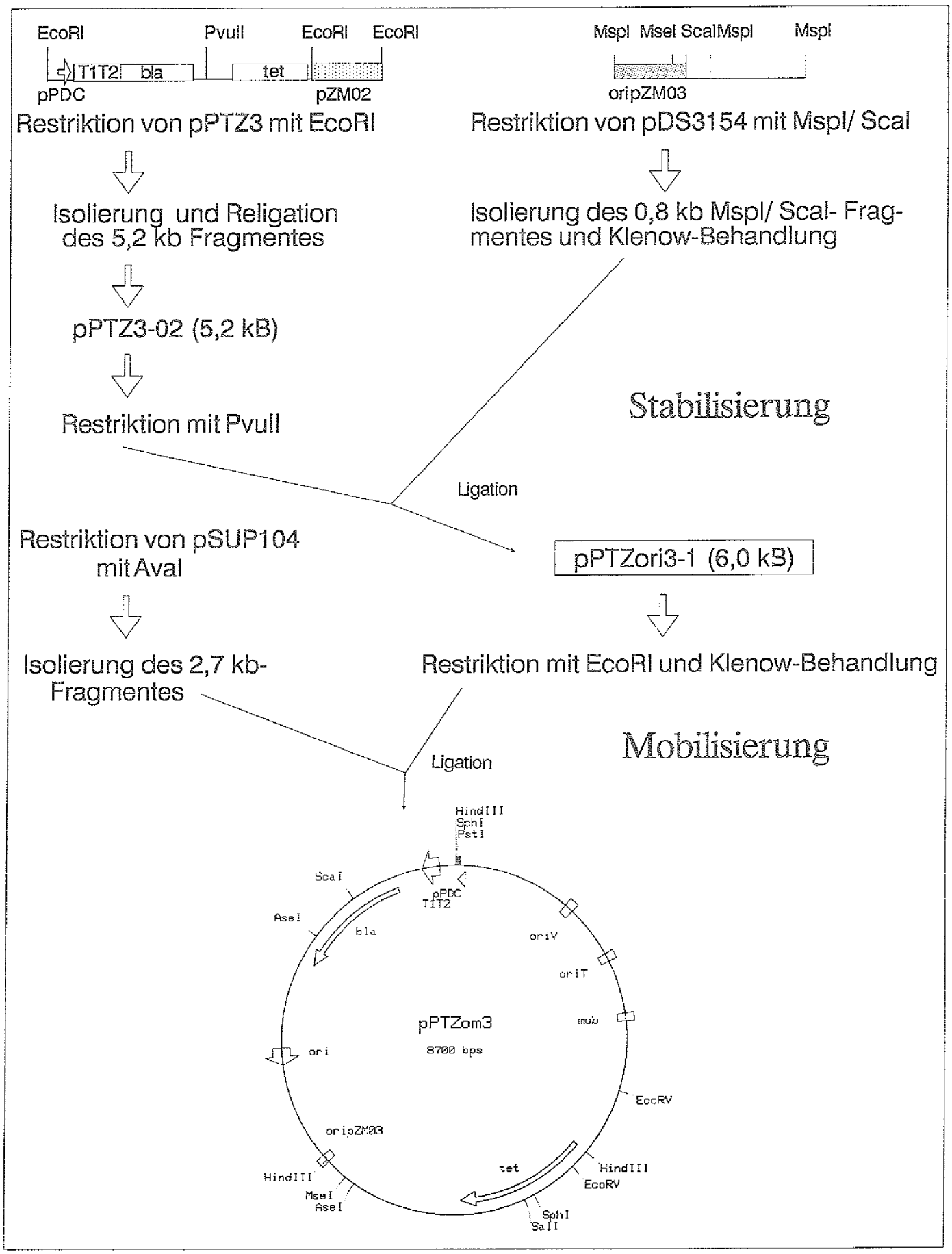


Abb.15: Konstruktion des Expressionsvektors pPTZom3.

Konjugationsfrequenz lag bei $2x10^{-6}$ bis $5x10^{-5}$/Rezipientenzelle und war damit etwa 100-fach erhöht gegenüber den ursprünglichen pPTZ-Vektoren. Die transkonjuganten CP4 Kolonien waren bereits nach 3 Tagen sichtbar, es trat keine Spontanresistenz auf,und alle Transkonjuganden zeigten das richtige Plasmidmuster. Mit dem neuen Expressionsvektor pPTZom3 ist eine effiziente Einführung von heterologer DNA möglich, und rekombinante Stämme müssen nicht mehr durch aufwendige Koloniehybridisierung gesucht werden.

Nachdem nun ein geeigneter Expressionspendelvektor vorlag, wurde das Xylose-Operon in den neuen Vektor pPTZom3 kloniert. Das Xylolose- Operon, bei dem die 5'-Promotorregion durch ExonukleaseIII Behandlung entfernt worden war, wurde aus dem Plasmid pZY224 isoliert. Der Vektor pZY224 wurde dazu mit den Restriktionsenzymen NsiI und SphI gespalten, das entstehende 3,5kb NsiI/SphI-Fragment auf dem das gesamte Xylose-Operon vorliegt isoliert und die überstehenden Enden des Fragmentes mit Klenow-Polymerase zu glatten Enden aufgefüllt bzw abgedaut.Das Fragment wurde dann in die SmaI Schnittstelle des Vektors pPTZom3 direkt hinter den *pdc*-Promotor kloniert und der Ligationsansatz in den *E.coli* Stamm HB101 transformiert.Inserttragende (pZY225;12,2kb) Transformanden wurden auf tetracyclinhaltigen McConkey+ Xylose+ Tc-Nährböden als rote Kolonien identifiziert. Bei allen komplementierenden Plasmidkonstrukten war die Orientierung des Xylose-Operons gleichgerichtet zum *pdc*-Promotor, so daß davon auszugehen ist, daß die Expression der Xylose-Gene auf dem Konstrukt pZY225 auch in *E.coli* vom *pdc*-Promotor erfolgte. Diese Aussage wurde auch durch entsprechende Enzymmessungen bestätigt, aus denen hervorging, daß die Gene ausgehend vom *Z.mobilis* Promotor niedriger exprimiert wurden (Xyloseisomerase: 0,4 U/mg; Xylulokinase: 0,8 U/mg), als ausgehend von Promotoren mit *E.coli* Konsensussequenzen (pZY222; pZY224).

Das Konstrukt pZY225 wurde mittels Filterkreuzung aus dem *E.coli* Donorstamm S17-1/pZY225 in *Z.mobilis* CP4 überführt. Der Stamm S17 -1 ist aufgrund seiner tra-Gene, die auf dem chromosomal integrierten Plasmid RP4 liegen, ein geeigneter Donorstamm bei Konjugationen zur Überführung mobilisierbarer Plasmide. Die Selektion der Exkonjuganden erfolgte auf Vollmediumplatten mit Tetracyclin und Nalidixinsäure, wodurch eine Gegenselektion des *E.coli* Donors

möglich war. Die erhaltenen *Z.mobilis* CP4/ pZY225 Exkonjuganden zeigten alle das richtige Plasmidmuster.

Das im Vektor pZY225 (3,5kb xyl^+-Fragment in pPTZom3) enthaltene xyl^+-Fragment, wurde auch in einen weiteren Expressionsvektor für *Z.mobilis* kloniert, pPTZ7. Der Vektor pPTZ7 (UHLENBUSCH ET AL., 1991) gehört nicht zu den ursprünglichen pPTZ-Vektoren auf pBR322 Basis,sondern er wurde von dem gut mobilisierbaren Vektor pSUP104 (SIMON ET AL.,1983) abgeleitet. Der Expressionsvektor pPTZ7 hat folgende Eigenschaften:

- pSUP104 (Replikon RSF1010; Vektor mit breitem Wirtsspektrum, Kopienzahl höher als pPTZ-Vektoren)
- PDC-Promotor und Terminator T1T2 aus pPTZ4
- 1 singuläre Schnittstelle (KpnI/ Asp718) hinter dem pPDC

Das Xylose-Operon (NsiI/SphI-Fragment aus pZY224, aufgefüllt mit Klenow-Polymerase) wurde in die mit Klenow-Enzym behandelte Asp 718 Schnittstelle des Vektors pPTZ7 direkt hinter den pPDC kloniert. Das entstandene Plasmid pZY226 (13,9kB) konnte nach der schon für den Vektor pZY225 beschriebenen Methode der Filterkreuzung erfolgreich nach *Z.mobilis* CP4 und erstmals auch nach ZM6 konjugiert werden. Die Konjugationsfrequenz war mit 2-5 $x10^{-5}$/ Rezipientenzelle etwa um den Faktor 10 höher als die des Vektors pZY225. Alle Transkonjuganden zeigten das richtige Plasmidmuster. Das Konstrukt pZY226 war in CP4 und ZM6 Plasmid-Minipräparationen nach Restriktion mit DraI zu sehen; pZY225 konnte aufgrund der Überlappung mit Fragmenten kryptischer Plasmide in verschiedenen Restriktionen nicht direkt nachgewiesen werden.

Tabelle 7 zeigt zusammenfassend einen Vergleich der in diesem Kapitel beschriebenen, konstruierten Xylose-Expressionsvektoren und in Abb.16 sind die physikalischen Karten der Plasmide dargestellt.

EIGENSCHAFTEN	pZY221	pZY225	pZY226
Vektor	pPTZ1	pPTZom3	pPTZ7
Mobilisierbarkeit	$\approx 10^{-8}$	$\approx 10^{-6}$	$\approx 10^{-5}$
Stabilität/Muster	instabil	stabil	stabil
/Segregation	instabil	17%	83
(nach 100 Generationen ohne Selektionsdruck)			
Kopienzahl	niedrig	niedrig	höher

Tab 7: Vergleich der verschiedenen Xylose-Expressionsvektoren.

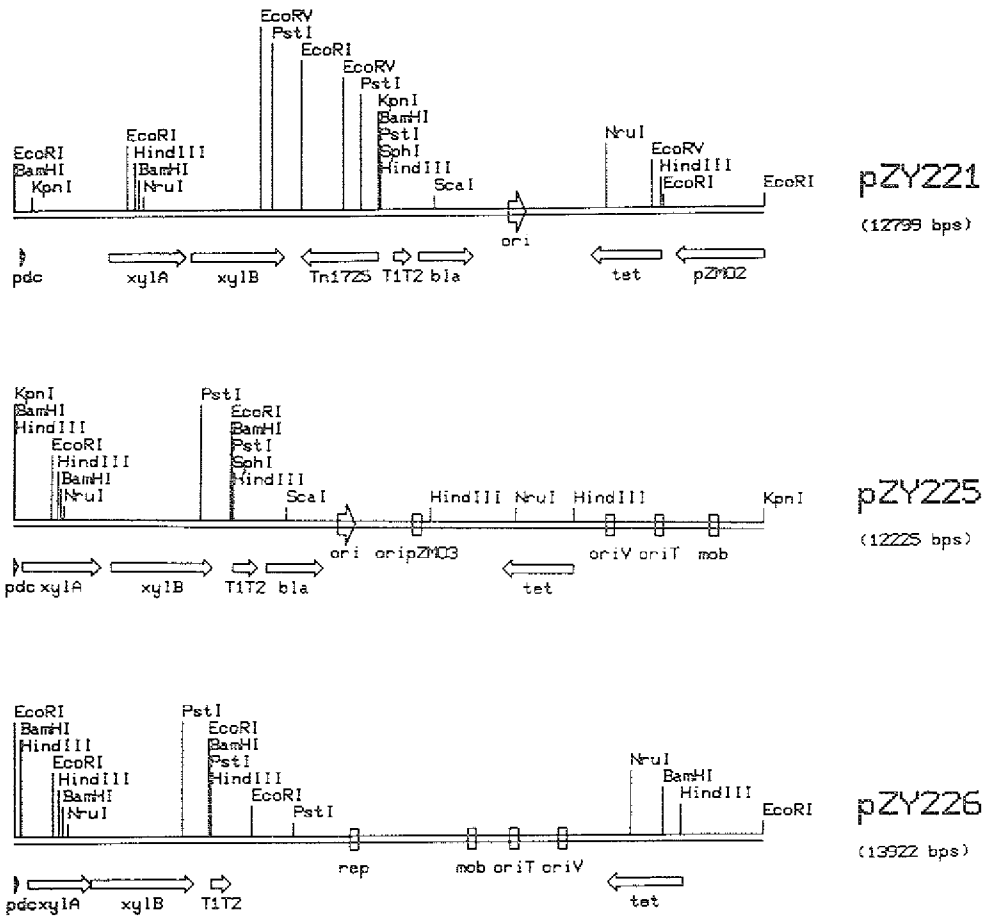


Abb.16: Restriktionskarten der Xylose-Expressionsvektoren pZY221 pZY225 und pZY226.
P_{PDC}=Promotor des Pyruvat-Decarboxylase-Gens; T_1T_1= Terminator des rrnB-Gens aus *E.coli*; oriV=vegetativer Replikationsursprung; oriT=Transfer Replikationsursprung; rep=Replikationsursprung; mob=Mobilisationsfunktionen; tet= Tetracyclinresistenz-Gen

2.2. Expression der Xylose-Gene in *Z. mobilis* und Charakterisierung rekombinanter Stämme

Nachdem die Xylose-Expressionsvektoren pZY221, pZY225 und pZY226 in *Z.mobilis* CU1rif2, CP4 bzw. ZM6 eingeführt worden waren, wurden zunächst, als Maß für die Genexpression,die plasmidvermittelten Enzymaktivitäten der Xyloseisomerase und Xylulokinase bestimmt (Tab.8).
Es zeigte sich, daß durch Entfernung des Operon eigenen Promotors die Expression der Xylose-Gene in *Z.mobilis* gesteigert werden konnte. Die Konstrukte pZY225 und pZY226 führten zu einer 7-8 fachen Erhöhung der Xylulokinase-Aktivität (1,3-1,6 U/mg), verglichen mit dem Ausgangskonstrukt pZY221. Die Xyloseisomerase-Aktivität war in den verschiedenen Konstrukten maximal verdoppelt. Die mit den Plasmiden pZY225 und pZY226 in CP4 und ZM6 erreichten Enzymaktivitäten liegen im Bereich derjenigen Aktivitäten, die auch in *E.coli* und *K.pneumoniae* gefunden werden (III.1.3.,Tab.4), und man kann somit davon ausgehen, daß Xyloseisomerase und Xylulokinase für die Umsetzung der Xylose in *Z.mobilis* nicht mehr limitierend sind.

Stamm		SPEZIFISCHE AKTIVITÄT der		Insert-größe	Vektor
		Xyloseisomerase U/mg	Xylulokinase U/mg	KB	
Z.mobilis:					
CP4	/pPTZom3	0	0	-	pPTZom3
CU1rif2	/pZY221	0,13	0,2	5,8	pPTZ1
CP4	/pZY225	0,13	1,6	3,5	pPTZom3
CP4	/pZY226	0,17	1,3	3,5	pPTZ7
ZM6	/pZY226	0,25	1,4	3,5	pPTZ7

Tab.8: Vergleich der Enzymaktivitäten verschiedener Xylose-Expressionsvektoren in *Z.mobilis* Transkonjuganden. Die Zellen waren in Mineralsalzmedium mit 5% Fruktose und 0,1% Xylose sowie Tetracyclin angezogen und nach 48 h geerntet worden. Die Werte sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Messungen.

Da neben guter Expression der Xylose-Gene auch die Stabilität der Konstrukte gewährleistet sein mußte, wurde im folgenden die Stabilität der verschiedenen Plasmide bezüglich der Segregation und des Plasmidmusters untersucht. Da von dem Vektor pZY221 bekannt war, daß häufig Rekombinationsereignisse auftraten, die zu einem veränderten Plasmidmuster führten, wurde dieser Vektor nicht weiter bezüglich seines Segregationsverhaltens untersucht. Die Stabilität der Vektoren pZY225 und pZY226 wurde über einen Zeitraum von 100 Generationen ohne Selektionsdruck verfolgt. Dabei hielt sich der Vektor pZY226 im Stamm CP4 deutlich stabiler als das Konstrukt pZY225. Im Falle von pZY225 besaßen nach 50 Generationen noch 36% der Kolonien das Plasmid, verglichen mit 92% bei pZY 226, und nach 100 Generationen enthielten lediglich 17% das Plasmid pZY225, verglichen mit 83%, die pZY226 noch enthielten. Diese hohe Stabilität der auf Basis von pSUP104 konstruierten Plasmide in *Z.mobilis* ist in Übereinstimmung zu den Untersuchungen zur Expression der Alanindehydrogenase in *Z.mobilis* (UHLENBUSCH ET AL., 1991). Die angeschlossenen Analysen des Plasmidmusters der Konstrukte pZY225 und pZY226 zeigte, daß die Restriktionsprofile der Plasmide unverändert waren. Aus diesen Ergebnissen läßt sich schließen, daß die Plasmidmuster beider Plasmide nicht mehr durch Rekombination verändert werden, daß es jedoch zum Erhalt des Vektors pZY225 notwendig ist, selektive Bedingungen aufrechtzuerhalten. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich auch, daß die rekombinanten *Z.mobilis* Stämme im Verlauf der Subkultivierungen wahrscheinlich die Kopienzahl der Plasmide reduzierten. Dies machte sich in verringerten Enzymaktivitäten in Rohextrakten von Stämmen bemerkbar, die die Plasmide über längere Zeit enthielten (Xyloseisomerase 0,06 U/mg; Xylulokinase 0,36 U/mg).

Nachdem bestätigt war, daß die Vektoren pZY225 und pZY226 eine stabile Genexpression gewährleisteten, wurden die xyl^+- rekombinanten *Z.mobilis* Stämme charakterisiert. Zunächst wurde das Wachstum der Rekombinanten in Gegenwart von Xylose untersucht. Mit Xylose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle war mit keinem der plasmidtragenden Stämme Wachstum festzustellen. Daher wurden Wachstumsversuche in Komplettmedium mit niedriger Fruktosekonzentration (0,8%) und steigenden Xylosekonzentrationen (0-5 %) angeschlossen, um zu überprüfen, ob Xylose einen Einfluß auf das

Wachstumsverhalten der rekombinanten Stämme hatte. Die Kulturen wurden mit einer frischen Vorkultur angeimpft und bei 30^{0}C anaerob inkubiert. Als Kohlenstoff- und Energiequelle wurde in diesen und folgenden Untersuchungen in der Regel Fruktose eingesetzt. Glukose würde die Xyloseaufnahme kompetetiv beschränken, da Xylose von *Z.mobilis* über das Glukose-Transport-System aufgenommen wird (DIMARCO UND ROMANO, 1985; BARNELL ET AL., 1990).
Es zeigte sich,daß *Z.mobilis* CP4/pZY225 rekombinante Stämme durch steigende Xylosekonzentrationen deutlich im Wachstum gehemmt wurden (Tab.9); dieser Effekt war bei den *Z.mobilis* CP4/pZY226 Stämmen noch deutlicher. Warum die Hemmung durch Xylose bei *Z.mobilis* CP4/pZY226 und CP4/pZY225 unterschiedlich stark war, ist noch unverstanden. Bei dem Kontrollstamm *Z.mobilis* CP4/ pPTZom3 ohne Xylose- Gene war keine vergleichbare Wachstumshemmung in Gegenwart von Xylose zu beobachten. Auch nach Verlängerung der Inkubationszeit bis auf 5 Tage war keine Aufhebung des Effektes nachweisbar.

Komplettmedium	Stamm *Z.mobilis*		
0,8% Fruktose + Xylose	CP4/pZY225 End-OD_{600}	CP4/pZY226 End-OD_{600}	CP4/pPTZom3 End-OD_{600}
0 % Xylose	0,60	0,67	0,71
0,1% Xylose	0,63	0,41	0,83
0,5% Xylose	0,52	0,32	0,81
1,0% Xylose	0,39	0,30	0,67
2,0% Xylose	0,41	0,23	0,77
5,0% Xylose	0,34	0,17	0,62
0 % Fruktose + 1,0% Xylose	0,055	0,053	0,06

Tab.9: Vergleich des Wachstums von *Z.mobilis* CP4/pZY225, CP4/ pZY 226 und CP4/pPTZom3 in Komplettmedium mit 0,8% Fruktose und steigenden Xylosekonzentrationen. Die Anfangs-OD_{600} der Kulturen entsprach der End-OD_{600}, der in Gegenwart von 1% Xylose ohne Fruktose inkubierten Stämme;die End-OD_{600} wurde nach 2d bestimmt. Die Meßwerte wurden aus zwei unabhängigen Versuchen gemittelt.

Um die Ursache der Hemmung der rekombinanten Stämme beim Wachstum in Gegenwart von Xylose aufzuklären, wurde das Spektrum der intrazellulären Zucker- bzw. Zuckerphosphate analysiert. Diese physiologischen Untersuchungen wurden mit den Stämmen *Z.mobilis* CP4/ pZY225 und CP4/ pZY226 durchgeführt und zur Kontrolle mit dem

nicht gehemmten Stamm CP4/pPTZom3. Die Zellen wurden zunächst zur Produktion von Zellmasse über Nacht in Mineralsalzmedium mit 5% Fruktose unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend nach einmaligem Waschen in Mineralsalzmedium mit 1% Fruktose zu einer OD_{600} von 6-8 in Medium mit 1% Fruktose und 1% Xylose überimpft. Die Kulturen wurden 4 h bei 30^0C und 100 Upm inkubiert und anschließend die Zellextrakte mittels Silikonölzentrifugation hergestellt.Die Zellextrakte wurden geteilt, eine Hälfte mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert und dann der phosphorylierte bzw. der unbehandelte Extrakt, sowie die Kulturüberstände mit dem Zuckeranalysator untersucht.In Tabelle 10 sind die gemessenen Metabolite zusammengestellt. In den Zellextrakten war Xylose nachweisbar, wobei die intrazelluläre Konzentration nahezu der extrazellulären entsprach. Hieraus kann man schließen, daß Xylose sowohl vom Wildtyp als auch von den Rekombinanten gut aufgenommen wurde. Darüberhinaus traten Ribose und Ribose-5- Phosphat auf. In den Extrakten von *Z.mobilis* CP4/ pZY225 konnte keine deutliche Akkumulation von Xylulose oder Xylulose-5-Phosphat nachgewiesen werden, was bei voller Aktivität von Xyloseisomerase und Xylulokinase verbunden mit einem nur schwach aktiven Pentose-Phosphat-Weg, zu erwarten gewesen wäre. Die Hemmung konnte daher nicht auf eine Akkumulation von Xylulose-5-Phosphat zurückgeführt werden.

Stamm	Zeit h	Xylose mM_{ext}	Xylose mM_{int}	Ribose mM_{int}	Ribose-5-P mM_{int}
Z.mobilis:					
CP4/pZY225	0	52	0	-	-
	4	46	49	4	13
CP4/pZY226	0	53	0	-	-
	4	47	36	3	6
CP4/pPTZom3	0	56	0	-	-
	4	52	35	3	5

Tab.10: Nachweis intrazellulärer Zucker und Zucker-Phosphate in rekombinanten *Z.mobilis* Stämmen. Die Metabolite wurden mittels BIOTRONIK- Zuckeranalysator in *Z.mobilis* Zellextrakten bestimmt. Die Kulturen waren in Mineralsalzmedium + 1% Fruktose + 1% Xylose (4h) inkubiert worden. Die Berechnung der internen Metabolitkonzentrationen erfolgte unter Einbeziehung des jeweils ermittelten Trockengewichtes sowie des Cytoplasmavolumens (= Taurinraum), für das jeweils 2,2 µl/mg (UHLENBUSCH ET AL.,1991) eingesetzt wurde.

Die angegebenen Konzentrationen sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchsreihen. - : nicht gemessen zum Zeitpunkt t_0

Bei den Metabolituntersuchungen fiel auf, daß die extrazelluläre Xylosekonzentration im Verlauf der Kurzfermentation abnahm, woraus zu schließen war, daß eine Umsetzung von Xylose stattfand. Um diese Aussage zu verstehen, wurden die Kulturüberstände von in Gegenwart von Fruktose und Xylose gewachsenen *Z.mobilis* CP4 Wildtyp- sowie Transkonjuganden- Stämmen auf mögliche Metabolite untersucht.Dabei zeigte sich, daß sowohl *Z.mobilis* Wildtyp als auch die xylAB rekombinanten Stämme 1-15 mM Xylitol ins Medium ausschieden, d.h. Xylose wurde zum Zuckeralkohol Xylitol reduziert. Die Xylitolbildung erfolgte in Medien mit Fruktose und Xylose, Glukose und Xylose,sowie Xylose als Kohlenstoffquelle. Da ein Zusammenhang zwischen der beobachteten Hemmung und der Xylitolproduktion möglich erschien, wurde untersucht, ob der externe Zusatz von Xylitol (0-10mM) einen Einfluß auf das Wachstum von *Z.mobilis* CP4/ pZY225 hatte. Dabei zeigte sich, daß der Zusatz von 1-4 mM Xylitol keinen Einfluß hatte, daß die End-OD_{600} bei *Z.mobilis* CP4 /pZY225 im Gegensatz zu CP4/ pPTZom3 jedoch in Gegenwart von 4-10 mM Xylitol um etwa 20% reduziert war. Daraus wurde gefolgert, daß ein Zusammenhang zwischen Xylose-Hemmeffekt und Xylitol-Produktion bestand. Da alle *Z. mobilis* Stämme in Gegenwart von Xylose Xylitol produzierten,aber nur die xylAB rekombinanten Stämme gehemmt wurden,konnte das Xylitol selbst nicht für die Hemmung verantwortlich sein, sondern eher ein Metabolisierungsprodukt des Xylitols, z.B. Xylitol-5-Phosphat.

Zunächst wurde untersucht, ob in rekombinanten *Z.mobilis* CP4/ pZY 225 Stämmen auch intern Xylitol bzw. Xylitol-5-Phosphat nachweisbar war. Dazu wurden *Z.mobilis* CP4/pZY225 und CP4/pPTZom3 in Komplexmedium (150ml) mit 1% Glukose überimpft und zum Anwachsen der Kulturen 6h inkubiert. Dann wurden 5% Fruktose und 2% Xylose zugesetzt (Wachstumshemmung und Xylitolproduktion) und die Kulturen 16 h bei 30^0C stehend inkubiert. Zur Erhöhung der Zellmasse wurden die Kulturen anschließend abzentrifugiert (5min. 3000 Upm)und das Sediment zu einer OD_{600} von 4-6 in dem Kulturüberstand resuspendiert und direkt der Silikonölzentrifugation unterworfen. In den aufgearbeiteten Zellextrakten wurde die Xylitolkonzentration bestimmt bzw. nach Dephosphorylierung die Konzentration von

Xylitol-5-Phosphat ermittelt. Dabei zeigte sich, daß in *Z.mobilis* CP4/ pZY225 Stämmen intern eine hohe Konzentration an Xylitol-5-Phosphat (16mM) vorlag. Die interne Xylitolkonzentration war mit 3mM erheblich niedriger. Bei der Kontrolle *Z.mobilis* CP4/ pPTZom3 lag die interne Konzentration unter der Nachweisgrenze von 2mM. Extern lag bei beiden Stämmen ≥10 mM Xylitol vor (Tab.11).

	STAMM *Z.mobilis*	
METABOLIT	CP4/pZY225	CP4/pPTZom3
$Xylitol_{extern}$	16 mM	13 mM
$Xylitol_{intern}$	3 mM	≤2 mM
$Xylitol\text{-}5\text{-}P_{intern}$	16 mM	≤2 mM

Tab.11: Nachweis von intra- und extrazellulärem Xylitol bzw. Xylitol-5-Phosphat. Die Konzentrationen sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen.

Diese Experimente machten deutlich, daß die beobachtete Hemmung der $xylAB^+$-rekombinanten *Z.mobilis* Stämme in Gegenwart von Xylose wahrscheinlich auf der internen Akkumulation von Xylitol-5-Phosphat beruhte. Von *E.coli* C Mutanten ist bekannt, daß die Akkumulation von Zuckeralkoholphosphaten das Wachstum der Zellen stark inhibiert, (SCANGOS UND REINER, 1979), wobei jedoch die Ursache dieser Hemmung nicht aufgeklärt wurde und möglicherweise vielfältig ist.
Im Anschluß an diese Erkenntnis galt es im Hinblick auf eine Beseitigung des Hemmeffektes in rekombinanten *Z.mobilis* Stämmen folgende Fragen zu klären.

- Wie bildet *Z.mobilis* Xylitol?
- Wie entsteht Xylitol-5-Phosphat in *Z.mobilis*?
- Wirkt Xylitol oder Xylitol-5-Phosphat inhibierend auf die Aktivitäten von Xyloseisomerase oder Xylulokinase?

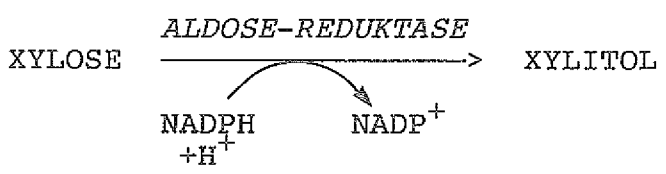
Zunächst wurde das Enzym, welches Xylose zu Xylitol reduziert in Rohextrakten (UZ) von *Z.mobilis* nachgewiesen und näher charakterisiert. Das Enzym war sowohl in *Z.mobilis* CP4 als auch in ZM6 nachweisbar. Das Enzym wurde konstitutiv exprimiert; die Aktivität war in Fruktose gewachsenen *Z.mobilis* Stämmen etwas höher als

nach Glukose-Wachstum. Es handelte sich um eine Aldose-Reduktase mit breitem Substratspektrum und strenger Spezifität für NADPH + H^+, (Abb.17; Tab.12). Das Enzym hatte für Xylose einen apparenten K_M-Wert von 0,14 M und einen apparenten V_{max}-Wert von 0,51 U/ml. Die Reaktion verlief in der thermodynamisch bevorzugten Richtung, der Reduktion der Ketose zum Zuckeralkohol.

SUBSTRAT	SPEZIFISCHE AKTIVITÄT der **Aldose-Reduktase** U/mg
D-Ribose	0,08
D-Xylose	0,05
D-Mannose	0,02
D-Galaktose	0,02
D-Glukose	≤0,004
D-Fruktose	≤0,004

Tab. 12: Substratspektrum einer NADPH-abhängigen Aldose-Reduktase in *Z.mobilis* CP4. Die Enzymaktivitäten wurden in Rohextrakten (UZ) von Zellen gemessen, die in Vollmedium mit 5% Glukose angezogen worden waren.Die Werte sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Messungen.

Die Aldose-Reduktase scheint nicht mit der von VIIKARI ET AL., (1986) beschriebenen Mannit-Dehydrogenase identisch zu sein, da Glukose und Fruktose nicht als Substrat umgesetzt wurden. Es handelt sich um ein bislang noch nicht beschriebenes Enzym in *Z. mobilis*. Funktion und natürliches Substrat der Aldose-Reduktase sind zur Zeit noch unklar.



- streng spezifisch für NADPH
- spezifisch für Aldosen: D-Ribose, D-Xylose, D-Galaktose, D-Mannose
- D-Glukose ist kein Substrat
- apparenter K_M für D-Xylose 0,14M

Abb.17: Charakterisierung einer Aldose-Reduktase von *Z.mobilis*.

Im folgenden wurde untersucht, wie *Z.mobilis* Xylitol zu Xylitol-5-Phosphat umsetzte. Aus der Literatur war bekannt, daß die Xylulokinase von *Aerobacter aerogenes* Xylitol mit geringer Affinität phosphorylieren kann (SIMPSON,1966). Um zu überprüfen, ob die Xylulokinase von *K.pneumoniae* KAY2026, Xylitol als Substrat akzeptiert, wurden Rohextrakte von *K.pneumoniae* KAY2026 und *E.coli* ED 8767 mit Xylulokinase-Inkubationspuffer (ohne Xylulose), dem Xylitol als Substrat zugesetzt wurde, für 16 h bei 37^{0}C inkubiert. Zur Kontrolle der ATPase-Aktivität wurde jeweils ein Ansatz ohne Substrat mitgeführt. Nach Abstoppen der Reaktionsansätze mit Perchlorsäure, wurde das gebildete Xylitol-5-Phosphat indirekt über den ATP-Verbrauch bestimmt. Nach Korrektur des ATP -Verbrauchs um die ATPase Aktivität zeigte sich, daß sowohl die Xylulokinase von *Klebsiella* als auch das *E.coli* Enzym, Xylitol langsam phosphorylierte. In Xylose- induzierten *K.pneumoniae* Kulturen zeigte die Xylulokinase, Aktivitäten von 1-3 mU/mg Protein mit dem Substrat Xylitol, in *E.coli* ED8767 8-13 mU/mg. Aus diesen Untersuchungen war zu schließen, daß xyl(A)B- rekombinante *Z.mobilis* Stämme Xylose über Xylitol bis zum Xylitol-5-Phosphat umsetzen können.

Anschließend wurde der Einfluß von Xylitol auf die Xyloseisomerase untersucht. In der Literatur gilt Xylitol als kompetetiver Inhibitor für die Xyloseisomerasen von *Lactobacillus* mit einem K_i von 1,5mM (YAMANAKA,1975) und *Arthrobacter* (HENRICK ET AL.,1989). Um die Hemmung der Xyloseisomerase von *K.pneumoniae* durch Xylitol zu untersuchen, wurden Rohextrakte in Xyloseisomerase-Inkubationspuffer mit 10 mM Xylose und 0-15 mM Xylitol inkubiert. Die Reaktion wurde nach 10 min. für 30 sec. bei 100^{0}C abgestoppt und die gebildete Xylulose mit Sorbit-Dehydrogenase (0,4U) quantifiziert. Dabei zeigte sich eine *kompetetive Hemmung* der Xyloseisomerase von *K.pneumoniae* KAY2026 durch Xylitol;in Gegenwart von 10 mM Xylose und 10mM Xylitol betrug die Aktivität des Enzyms noch 75% der ungehemmten Xyloseisomerase; durch weitere Erhöhung der Xylitolkonzentration bei konstanter Xylosekonzentration wurde die Enzymaktivität kontinuierlich reduziert (12mM Xylitol: 70%; 15mM Xylitol 65% der ungehemmten Aktivität). War die Xylosekonzentration aber deutlich höher als die Xylitolkonzentration, so konnte keine Hemmung nachgewiesen werden, was für eine kompetitive Inhibierung spricht.

Aus diesen Untersuchungen stellte sich der Xylosestoffwechsel in xylAB rekombinanten *Z.mobilis* Stämmen CP4/pZY225 bzw./pZY226 folgendermaßen dar: In Gegenwart von Xylose im Wachstumsmedium bilden sowohl der Wildtyp als auch die *xyl*AB rekombinanten *Z.mobilis* Stämme Xylitol mit einer Aldose-Reduktase. Der Wildtyp wird durch Xylitol nicht im Wachstum beeinträchtigt. Der rekombinante Stamm *Z.mobilis* CP4/pZY225 setzt Xylitol aber mit der Xylulokinase zu Xylitol-5-Phosphat um. Xylitol-5-Phosphat kann nicht weiter verstoffwechselt werden, akkumuliert daher in den Zellen und führt zur Wachstumshemmung. Abhängig von der intrazellulären Xylose- und Xylitol-Konzentration kann außerdem noch eine kompetetive Hemmung der Xyloseisomerase dazu führen, daß wenig Xylulose bzw./ Xylulose-5-Phosphat gebildet wird.

Es wurde deshalb im folgenden versucht, Mutanten zu isolieren, die weniger oder kein Xylitol-5-Phosphat mehr produzierten, so daß die Umsetzung der Xylose bis zum Xylulose-5-Phosphat und damit die Einschleusung in den Pentose-Phosphat-Weg ungehemmt ablaufen konnte.

2.3. Isolierung Xylose-resistenter *Z. mobilis* CP4/ pZY225 Stämme

Zur Isolierung Xylose-resistenter rekombinanter *Z.mobilis* Stämme standen zwei Selektionsmöglichkeiten zur Verfügung. Einmal bestand die Möglichkeit unter den *Z.mobilis* CP4/pZY225 Rekombinanten im Anschluß an eine Mutagenese,direkt in Gegenwart von Xylose nach besser wachsenden Mutanten zu suchen und diese dann zu charakterisieren. Dabei waren drei verschiedene Mutantentypen zu erwarten: Die Xylose-Resistenz kann auf Ausschaltung der Aldose-Reduktase beruhen, sie kann aber auch durch Deletion des Xylose-Operons, insbesondere des xylB-Gens, hervorgerufen werden, oder aber die Resistenz beruht auf einer veränderten Substratbindestelle der Xylulokinase.
Die zweite Selektionsmöglichkeit bestand nach Entwicklung eines geeigneten Plattenfiltertests in der Suche nach Aldose-Reduktase negativen *Z.mobilis* CP4 Wildtypzellen und der anschließenden Einführung des Xylose-Operons in die isolierten Mutanten. Dieses Verfahren hatte den Vorteil, daß nur ein Typ von Mutanten zu er-

warten war. Beide Selektionsverfahren wurden durchgeführt.
Mit Hilfe eines neu entwickelten Plattenfiltertests wurde zunächst nach solchen Mutanten von *Z.mobilis* CP4 (mutagenisiert mit NTG) gesucht, die kein Xylitol mehr ausschieden und die damit in der Aldose-Reduktase defekt sein sollten. Insgesamt wurden 1600 Mutanten im Plattentest untersucht. Dabei fielen Mutanten an, die durch schwache Xylitolbildung auf dem Filter charakterisiert waren. Genauere Überprüfung dieser Kolonien, d.h. quantitative Xylitolbestimmung und Aldose-Reduktase Enzymtest ergab jedoch, daß alle Kolonien noch Aldose-Reduktase Aktivität zeigten (maximal um etwa 50% reduziert). Da die Wahrscheinlichkeit der Inaktivierung eines Enzyms durch eine Punktmutation sehr gering ist, müßte eine erheblich größere Kolonienzahl untersucht werden.

Im folgenden wurde die Mutantenselektion direkt in den rekombinanten Stämmen *Z.mobilis* CP4/ pZY225 durchgeführt. Die Idee war, Mutanten von *Z.mobilis* CP4/pZY225 zu isolieren, die entweder kein Xylitol oder kein Xylitol-5-Phosphat mehr bildeten, und bei denen die Hemmung durch Xylose aufgehoben sein sollte. Beim Plattieren von *Z.mobilis* CP4/pZY225 auf Vollmediumplatten mit 2% Fruktose und 5% Xylose (inhibierende Bedingungen) tritt nur schwaches Wachstum auf; es entstehen jedoch schnell "Papillen" besser wachsender Mutanten. Diese Kolonien sollten einem der oben beschriebenen Mutantentypen entsprechen. Die Suche nach Mutanten umfaßte die Reinigung besser wachsender Kolonien, die Überprüfung in Flüssigmedium mit 0,8% Fruktose und 5% Xylose, gefolgt von Miniplasmidpräparationen und Retransfer der Plasmide in die *E.coli xylA*-Mutante HB101.
Nach UV-Mutagenese des Xylose-sensitiven Stammes *Z.mobilis* CP4/ pZY225 und anschließender Selektion besser wachsender Mutanten, wurden insgesamt 240 Flüssigkulturen untersucht. Davon zeigten 140 Kolonien besseres Wachstum in Gegenwart von Xylose. Von 100 Kolonien wurden Miniplasmidpräparationen mit anschließender Retransformation nach *E.coli* HB101 durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß die Plasmide von 97 Mutanten den Stamm *E.coli* HB101 nicht mehr komplementierten, d.h. die xyl-Gene zumindest partiell deletiert oder mutiert waren. Eine Xylose-resistente Mutante wurde isoliert, die zwar noch *xylA*-Mutanten komplementierte, nicht aber *xylB*-Mutanten. Dies ist ein weiterer Hinweis, daß die Hemmung auf der unspezifischen Bildung von Xylitol-5-Phosphat durch die

Xylulokinase beruhte. Die Ergebnisse werden weiterhin durch Beobachtungen unterstützt, die in der Literatur für D-Arabitol bzw. Ribitol-Dehydrogenase negative Mutanten von *E.coli* C beschrieben wurden (SCANGOS UND REINER, 1979). Diese Mutanten wurden sensitiv gegenüber Zuckeralkoholen, weil statt der Oxidation der Zuckeralkohole mit anschließender Phosphorylierung der Ketosen durch die Kinase eine direkte unspezifische Phosphorylierung des Zuckeralkohols stattfand. Bei der Selektion resistenter Kolonien zeigten die Mutanten immer Defekte in der Xylulokinase, was in Übereinstimmung zu den Befunden dieser Arbeit steht.

Bei der Mutantenselektion von *Z.mobilis* CP4/pZY225 wurden 2 Xyloseresistente Klone isoliert, die sowohl Xyloseisomerase als auch Xylulokinase Mutanten komplementierten und ein unverändertes Plasmidmuster aufwiesen (pZY225-XR4 bzw. -XR7). Bei der Untersuchung dieser Mutanten zeigte sich, daß die Aldose-Reduktase nicht reduziert war, und daß auch die Aktivitäten der Xylose-Gene denen des Xylose sensitiven Stammes *Z.mobilis* CP4/pZY225 entsprachen. Dabei war jedoch die Aktivität der Xylulokinase sowohl im Ausgangsstamm *Z.mobilis* CP4/pZY225, der die Xylose-Gene seit der Konjugation besaß (mehrere Monate), als auch in den isolierten Xylose-resistenteren Mutanten auf etwa 0,2- 0,3 U/mg reduziert. Diese Ergebnisse ließen die Hypothese zu, daß die Xylose-Resistenz der Mutanten nicht nur auf eine reduzierte Xylulokinase-Aktivität zurückzuführen war, sondern vermutlich auf einer Veränderung der Substratbindestelle der Xylulokinase beruhte, d.h. daß Xylitol möglicherweise kein/ oder schlechteres Substrat für die Xylulokinase war, während Xylulose weiterhin umgesetzt wurde. Um dies zu beweisen, wurde die intrazelluläre Konzentration von Xylitol und Xylitol- 5-Phosphat in den Mutanten und im Stamm *Z. mobilis* CP4/pZY225 gemessen (Tab.13). Die Kultivierung der Stämme sowie die Silikonölzentrifugation zur Herstellung der Zellextrakte erfolgte, wie bereits beschrieben.

Die Messung zeigte eindeutig, daß die intrazelluläre Konzentration von Xylitol-5-Phosphat in den Xylose-resistenten Stämmen *Z.mobilis* CP4/pZY225 -XR4 und -XR7 deutlich reduziert war, verglichen mit *Z.mobilis* CP4/ pZY225. Damit schien die Xylose-Resistenz der Mutanten auf einer veränderten Affinität der Xylulokinase zum Xylitol zu beruhen.

Die isolierten Mutantenplasmide pZY225-XR4 bzw. -XR7 sollten daher für weitere Manipulationen des Pentosestoffwechsels, z.B. Klonierung der Transketolase in die xylAB-Plasmide, in *Z. mobilis* geeignet sein.

Stamm	TG (mg/ml)	$Xylitol_{ext}$ [mM]	$Xylitol_{int}$ [mM]	$Xylitol\text{-}5\text{-}P_{int}$ [mM]
Z.mobilis:				
CP4/pZY225	1,24	23,4	13,3	12,9
CP4/pZY225-XR4	2,06	20,3	13,7	0,6
CP4/pZY225-XR7	1,72	21,9	7,4	3,5

Tab.13: Intrazelluläre Konzentration von Xylitol und Xylitol-5-Phosphat in den *Z.mobilis* Stämmen CP4/pZY225; CP4/pZY225-XR4; CP4 /pZY225-XR7. Die Kulturen waren in Gegenwart von 5% Fruktose+ 2% Xylose 16 Stunden gewachsen. Die Messung erfolgte in Extrakten, die durch Silikonölzentrifugation hergestellt wurden.
TG= Trockengewicht; int= intrazellulär; ext= extrazellulär

2.4. Untersuchung der Enzyme des Pentose-Phosphat-Weges

Für den katabolen Xylose-Stoffwechsel sind neben den Enzymen Xyloseisomerase und Xylulokinase, die Enzyme des Pentose-Phosphat-Weges erforderlich. Diese Enzyme,Transketolase,Transaldolase, Ribose-5-Phophat-Isomerase und Ribulose-5-Phophat-Epimerase, waren in *Z. mobilis* bislang nicht nachgewiesen worden (McGILL UND DAWES 1971; SWINGS UND DE LEY, 1977). Um Aussagen über mögliche Engpässe des Xylose-Stoffwechsels der $xylAB^+$- rekombinanten *Z.mobilis* CP4-Stämme machen zu können, war es zunächst erforderlich, die Enzyme des Pentose-Phosphat-Weges in *Z. mobilis* CP4 zu bestimmen.

Die Transketolase von *Z.mobilis* war in photometrischen Testsystemen nicht meßbar, daher wurde zur Analytik der BIOTRONIK-Zuckeranalysator eingesetzt. Rohextrakte von *Z.mobilis* CP4,die frei von niedermolekularen Metaboliten waren, wurden 10 min. mit verschiedenen Transketolase-Substraten inkubiert, und die gebildeten Metabolite nach Abstoppen der Reaktion und Dephosphorylierung der

Zucker mit dem BIOTRONIK Zuckeranalysator untersucht. Tabelle 14 zeigt die getesteten Transketolase-Substrate und die nachgewiesenen Produkte.

Zucker (Produkt)	Transketolase-Substrate (mM)			
	1) Rib5P+Xu5P 0,5 0,5	2) E4P+Xu5P 0,03 0,5	Xu5P 0,5	3) Rib5P+ Hpyr 0,5 0,3
Xul5P	+	+	+	+
Rib5P	+	+	+	+
Ery/GAl-P	-	+	-	-
Frk6P	-	-	-	-
Shp7P	-	-	-	-
Rub5P	+	+	+	+
Glc6P	-	-	-	-

Tab. 14: Umsetzung verschiedener Transketolase-Substrate durch Rohextrakte von *Z.mobilis* CP4. Nach 10 min. Inkubation der Rohextrakte (UZ/ NAP-10) mit den Substraten wurden die Umsetzungen abgestoppt (30sec. 100^{0}C), dephosphoryliert und mit dem BIOTRONIK Zuckeranalysator untersucht. Folgende Umsetzungen durch die Transketolase waren zu erwarten:

			Transketolase			
1)	Rib5P + Xul5P	<——————>	Shp7P	+	GAl3P
2)	Ery4P + Xul5P	<——————>	Frk6P	+	GAl3P
3)	Rib5P + Hpyr	<——————>	Shp7P	+	CO_2

+= Zucker gefunden; -= Zucker nicht aufgetreten;
Ery= Erythrose; Frk= Fruktose; GAL= Glycerinaldehyd; Glc= Glukose; HPyr= Hydroxypyruvat; Shp= Sedoheptulose; Rib= Ribose; Rub= Ribulose; Xul= Xylulose; -P= Phosphat

Es zeigte sich, daß beim Einsatz verschiedener Substrate jeweils die Umsetzung von Ribose-5-Phosphat zu Ribulose-5-Phosphat und Xylulose-5-Phosphat auftrat. Das Transketolase-Produkt Sedoheptulose-7-Phosphat konnte nicht nachgewiesen werden (möglicherweise aufgrund einer Überlappung mit dem Ribulose-Peak), so daß hieraus keine Transketolase-Aktivität in *Z.mobilis* abgeleitet werden konnte.Anschließend wurde die Umsetzungen phosphorylierter Transketolase- Substrate durch Rohextrakte von *Z.mobilis* CP4 und *E.coli* CA8000 über einen Zeitraum von 60 Minuten verfolgt und näherungsweise quantifiziert (Tab.15).
Die schnelle Umwandlung der drei Pentose-Phosphate war sowohl in *E.coli* als auch in *Z.mobilis* zu beobachten.In *E.coli* CA8000 konn-

te die Umsetzung der Transketolase-Substrate über Sedoheptulose-7-Phosphat bis zum Glukose-6-Phosphat nachgewiesen werden. In *Z. mobilis* CP4 war dies nicht möglich.

Zucker (nmol/ml)	*Z.mobilis* CP4				*E.coli* CA8000			
	5'	15'	30'	60'	5'	15'	30'	60'
Xul5P	187	187	225	206	113	34	19	19
Rib5P	64	45	176	131	94	45	45	53
Rub5P	170	170	200	225	83	100	128	135
Shp7P	-	-	-	-	200	300	75	25
Glc6P	-	-	-	-	-	-	450	430

Tab. 15: Umsetzung der Transketolase-Substrate Ribose-5-Phosphat (0,5mM) und Hydroxypyruvat (0,3mM) durch *Z.mobilis* CP4 und *E.coli* CA 8000 über einen Zeitraum von 60 min.('). Die Abkürzungen der Zuckerphosphate sind Tab. 14 zu entnehmen. Die Reaktionsansätze enthielten 0,44 mg Protein *Z.mobilis* Rohextrakt und 0,12 mg *E.coli* Extrakt (UZ/ NAP-10).

Im folgenden wurden Untersuchungen zur Transaldolase durchgeführt, wobei 0,5mM Sedoheptulose-7-Phosphat und 0,5mM Glycerinaldehyd-3-Phosphat als Substrate angeboten wurden. Die durch die Transaldolase zu erwartende Umsetzung dieser Substrate zu Erythrose-4-Phosphat und Fruktose-6-Phosphat konnte im Zuckeranalysator nicht nachgewiesen werden. Es wurde jedoch in *Z.mobilis* Xylulose-5-Phosphat als Produkt gefunden. Diese Umsetzung kann auf die Aktivität einer Transketolase zurückgeführt werden, so daß mit Hilfe dieses Testsystems in *Z.mobilis* CP4 eine geringe Transketolase-Aktivität von 1-2 mU/mg Protein gezeigt wurde (Tab. 16). Die Transaldolase ließ sich auch unter Einsatz anderer Substrate in *Z.mobilis* CP4 bisher nicht messen.

Stamm	SPEZIFISCHE AKTIVITÄT (mU/mg)			
	Transketolase		Transaldolase	
	E_{365}	BIOTRONIK	E_{365}	BIOTRONIK
E.c. CA8000	65	59	32	n.g.
Z.mob. CP4	n.n.	1-2	n.n.	n.n.

Tab. 16: Nachweis von Transketolase- und Transaldolase-Aktivitä-

ten in *E.coli* CA8000 und *Z.mobilis* CP4.
Für die Analysen mit dem BIOTRONIK-Zuckeranalysator wurden die Rohextrakte (UZ/NAP10) 30 min. mit den Substraten inkubiert, dephosphoryliert und untersucht. n.g.= nicht quantifiziert; n.n.= nicht nachweisbar.
Der Testansatz (0,5ml) für den Nachweis der Transketolase in *Z. mobilis* CP4 mit dem Zuckeranalysator, enthielt folgende Komponenten (konzipiert für den Transaldolase-Test): 0,5mM Sedoheptulose-7-Phosphat, 0,5mM Glycerinaldehyd-3-Phosphat,0,2mM $NADP^+$,8U Phosphoglukose-Isomerase, 4U Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 38 mM Tris-HCl/7,5mM $MgCl_2$; pH 7,6. Die Bildung von Xylulose-5-Phosphat wurde bestimmt.

Anschließend wurden zwei weitere Enzyme des Pentose-Phosphat-Weges, die Ribose-5- Phosphat-Isomerase und die Ribulose-5-Phosphat -Epimerase, in *Z.mobilis* CP4 bestimmt. Es handelt sich hierbei um Enzyme, die die reversiblen Umwandlungen der Pentosen Ribose-5-Phosphat, Ribulose-5-Phosphat und Xylulose-5-Phosphat katalysieren. Ribose-5-Phosphat-Isomerase und Ribulose-5-Phosphat-Epimerase waren eindeutig in *Z.mobilis* CP4 nachweisbar, sowohl im photometrischen Enzymtest, als auch in der Analytik mittels Zukkeranalysator. Im photometrischen Test (E_{290}) lag die spezifische Aktivität der Isomerase von *Z.mobilis* CP4 bei 0,43U/mg; die Quantifizierung mittels BIOTRONIK ergab eine deutlich höhere Aktivität von 1,6 U/mg Protein, (Tab.17).
Die Ribulose-5-Phosphat-Epimerase von *Z.mobilis* CP4 zeigte im photometrischen Test (E_{290}) eine spezifische Aktivität von 0,32 U/mg, im Zuckeranalysator wurde eine Aktivität von 0,64 U/mg ermittelt, (Tab.17).

STAMM	SPEZIFISCHE AKTIVITÄT (U/mg)			
	Ribose-5-Phosphat-Isomerase		Ribulose-5-Phosphat-Epimerase	
	E_{290}	BIOTRONIK	E_{290}	BIOTRONIK
*E.c.*CA8000	1,25	>1,4	0,70	1,0
Z.mob. CP4	0,43	1,6	0,32	0,64

Tab.17: Nachweis von Ribose-5-Phosphat-Isomerase und Ribulose-5-Phosphat-Epimerase Aktivitäten in Rohextrakten (UZ, NAP-10) von *Z.mobilis* CP4 und *E.coli* CA8000.

Aus diesen Untersuchungen ließ sich schließen, daß *Z.mobilis* CP4 die Enzyme Ribose-5-Phosphat-Isomerase, Ribulose-5-Phosphat-Epimerase und Transketolase des Pentose-Phosphat-Wegs besitzt. Die Isomerase- und Epimerase- Aktivitäten waren denen der entsprechenden *E.coli* Enzyme vergleichbar, die Transketolase-Aktivität zeigte nur sehr geringe Aktivität. Der Nachweis einer Transaldolase-Aktivität konnte mit der verwendeten Analytik bislang nicht erbracht werden.

3. Einführung des Transketolase-Gens aus *E.coli* in die *xyl*AB$^+$-rekombinanten *Z.mobilis* Stämme

3.1. Klonierung des Transketolase-Gens in das Plasmid pZY225-XR4

Bei der Untersuchung des Pentose-Phosphat-Weges von *Z. mobilis* CP4 hatte sich gezeigt, daß die Transketolase mit einer spezifischen Aktivität von 1-2 mU/mg Protein etwa 60-fach schwächer exprimiert wurde als das *E.coli* Enzym. Um einen signifikanten Durchfluß von Xylulose-5-Phosphat zum Glycerinaldehyd-3-Phosphat und damit den Anschluß an die Glykolyse zu ermöglichen, war es notwendig die Transketolase-Aktivität in *xyl*$^+$-rekombinanten *Z. mobilis* CP4 Stämmen zu erhöhen.
Es bestand die Möglichkeit, das klonierte *tkt*-Gen aus *E.coli* (SPRENGER,unveröffentlicht) in den xylAB$^+$-Vektor pZY225-XR4 einzubringen. Dazu wurde das *tkt*$^+$-Fragment aus dem Vektor ptktase als 2,6 kb ScaI/SspI Fragment mit glatten Enden isoliert und in den mit dem Restriktionsenzym ScaI linearisierten Vektor pZY225-XR4, der nicht Phosphatase behandelt war, ligiert. Die Selektion der *E.coli* DH5-Transformanden erfolgte auf tetracyclinhaltigen LB -Nährböden. Die erhaltenen 26 Transformanden wurden auf LB-Agarplatten mit Tetracyclin sowie auf Nährböden mit Ampicillin ausgestrichen. Die Insertion des Fragmentes in die ScaI-Schnittstelle des Vektors pZY225- XR4 führt zur Inaktivierung der Ampicillin-Resistenz. Es wurde ein Klon isoliert, der Tetracyclin resistent und Ampicillin sensitiv war. Dieser Klon enthielt das *tkt*-Fragment in Orientierung des *bla* -Promotors, so daß die Transkription des *tkt*-Gens theoretisch sowohl vom *tkt*-eigenen Promotor als auch

vom *bla*-Promotor erfolgen konnte. Das Konstrukt pZY228 (14,8kb, Abb.19) vermittelte verschiedenen *E.coli* Stämmen spezifische Transketolase-Aktivitäten von 2,1- 2,5 U/mg, d.h. in *E.coli* lag eine fast 40-fache Überexpression des Gens vor.

Das Plasmid pZY228 wurde anschließend über eine Filterkreuzung aus dem Stamm S17-1/ pZY228 in *Z.mobilis* CP4 mobilisiert. Die Transkonjuganden wurden auf VM + 5% Glukose-Platten mit Tetracyclin und Nalidixinsäure, selektioniert. Alle 35 erhaltenen rekombinanten *Z.mobilis* CP4 Kolonien wiesen das richtige Plasmidmuster auf, welches im Agarosegel nach Restriktion der Gesamt-Plasmid-DNA mit dem Enzym KpnI sichtbar war. Nachdem das Plasmid erfolgreich in *Z.mobilis* CP4 eingebracht worden war, wurde die Charakterisierung der nun *xylAB*$^+$/*tkt*$^+$ rekombinanten *Z.mobilis* CP4-Stämme durchgeführt.

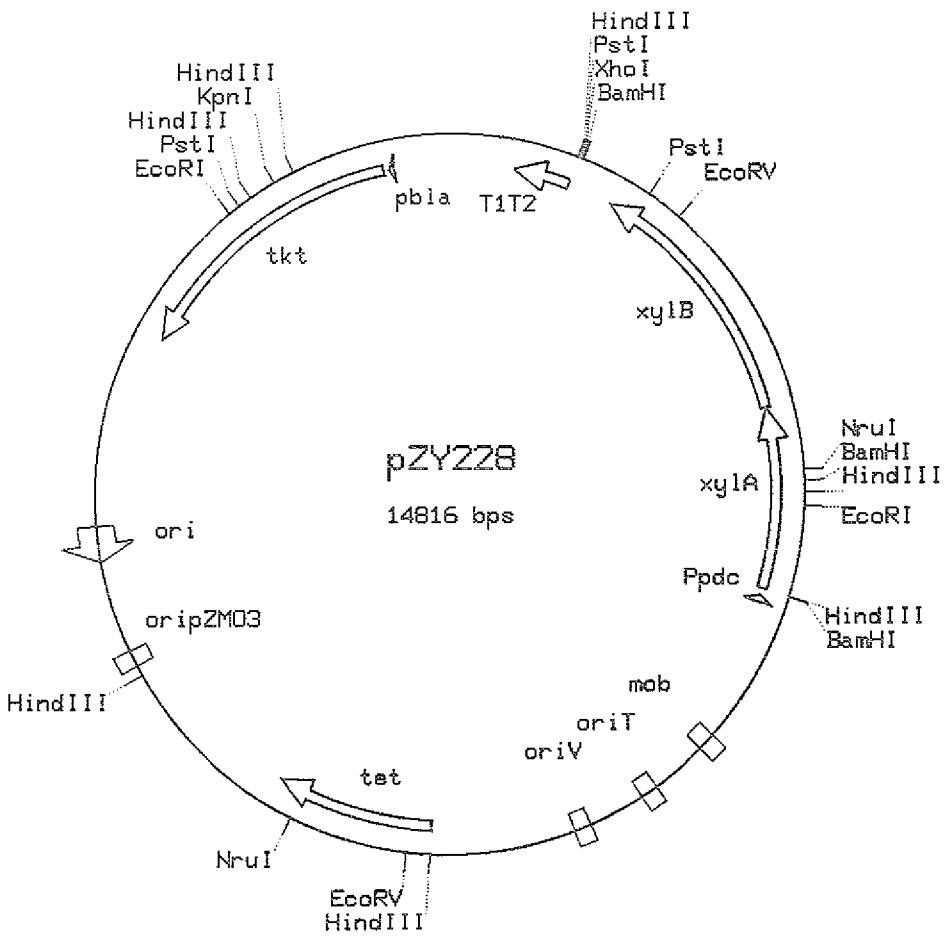


Abb. 18: Restriktionskarte des xylAB$^+$/tkt$^+$ Plasmides pZY228. Die Expression des Xylose-Operons erfolgt vom p_{pdc}, das Transketolase-Gen kann vom gen-eigenen und vom p_{bla} abgelesen werden. Die verwendeten Abkürzungen sind Abb. 16 und dem Abkürzungsverzeichnis zu entnehmen.

3.2. Charakterisierung der *xylAB*$^+$ / *tkt*$^+$ rekombinanten *Z.mobilis* CP4- Stämme

Zunächst wurde die Expression der drei Gene auf dem Plasmid pZY 228 mit Hilfe der Enzymaktivitäten bestimmt. Dabei zeigte sich, daß neben den Xylose-Genen auch die Transketolase aus *E. coli* in *Z. mobilis* CP4 gebildet wurde, (Tab.18). Die spezifische Aktivität der Transketolase war 2-3-fach höher (150 mU/mg), als das Enzym in *E.coli* Wildtyp-Stämmen (65 mU/mg) und sollte damit für den katabolen Xyloseumsatz nicht mehr limitierend sein. Die Aktivitäten von Xyloseisomerase und Xylulokinase waren im Vektor pZY 228 vergleichbar mit den Aktivitäten, die das Konstrukt pZY225-XR4 vermittelte. Es fiel auf, daß die spezifische Aktivität der Xylulokinase deutlich niedriger war als in den ursprünglichen Plasmiden pZY225 und pZY226 (direkt nach Einbringen der Plasmide) Daraus ist zu schließen, daß die Xylulokinase der Xylose-Resistenz vermittelnden Mutantenplasmide pZY225-XR4 und -XR7 nicht nur reduzierte Affinität zum Xylitol sondern auch zur Xylulose besitzt. Die gemessenen Aktivitäten sollten jedoch für den Xylose-Metabolismus mit *Z.mobilis* nicht limitierend sein.

STAMM	SPEZIFISCHE AKTIVITÄT (U/mg)		
	Xyloseisomerase	Xylulokinase	Transketolase
Z.mobilis:			
CP4/pZY225XR4	0,16	0,14	n.n.
CP4/pZY228	0,15	0,17	0,15

Tab.18: Nachweis der Xyloseisomerase, Xylulokinase und Transketolase in pZY228 rekombinanten *Z.mobilis* CP4-Stämmen. Die für *Z. mobilis* CP4/ pZY228 angegebenen Enzymaktivitäten sind Mittelwerte verschiedener Transkonjuganden.
n.n.= photometrisch nicht nachweisbar

Im Anschluß an die Enzymmessungen wurde das Wachstum der *Z. mobilis* CP4/ pZY228 Stämme mit Xylose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle untersucht. Die xylAB$^+$tkt$^+$ rekombinanten Stämme wuchsen nicht auf Xylose als alleinigem Substrat. Daraufhin wur-

den niedrige Fruktose- bzw. Glukose-Konzentrationen (0,8%) mit steigenden Xylose-Konzentrationen (0,5%-5%) als Substrate eingesetzt. Als Kontrollen wurden *Z.mobilis* CP4/pPTZom3 und der Ausgangsstamm *Z.mobilis* CP4/pZY225-XR4 mitgeführt. Dabei zeigte sich bei keinem der Stämme beim Wachstum mit Glukose ein inhibierender Effekt der Xylose. Mit Fruktose als Kohlenstoffquelle war allein beim Zusatz von 5% Xylose eine Reduktion des Wachstums bei *Z. mobilis* CP4/ pZY228 und CP4/ pZY225-XR4 feststellbar (≈50%). Niedrigere Xylosekonzentrationen wirkten nicht inhibierend.
Wachstumsversuche mit 5%-iger Fruktosekonzentration zeigten, daß *Z.mobilis* CP4/pZY228 Stämme im Gegensatz zu allen bisher untersuchten Rekombinanten durch Fruktose im Wachstum gehemmt wurden. In Gegenwart von Fruktose hatten die Zellen zunächst eine fast 1-tägige Anwachsphase und wuchsen dann mit stark reduzierter Wachstumsrate innerhalb von 3 d hoch (1d:OD_{600} 0,1; 2d:OD_{600} 0,4; 3d: OD_{600} 1,5), während rekombinante Kontrollstämme das Substrat nach 1d verbraucht hatten. Diese Inhibierung durch Fruktose ist wahrscheinlich im Zusammenhang mit der Transketolase zu verstehen, da Fruktose nach der Phosphorylierung direkt ein Substrat für die Transketolase ist und somit zur Akkumulation von phosphorylierten Metaboliten, z.B. Sedoheptulose-7-Phosphat oder Xylulose-5-Phosphat, führen könnte.

Um zu überprüfen, ob durch Einführung des Transketolase-Gens die Umsetzung von Xylose über Xylulose, Xylulose-5-Phosphat, (Ribose-5-Phosphat) bis zum Glycerinaldehyd-3-Phosphat und damit auch bis zum CO_2 ermöglicht wurde, wurden Experimente mit ^{14}C-[U]-Xylose durchgeführt. Diese radioaktive Methode ist aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit geeignet,auch geringsten Durchsatz von Xylose zum CO_2 nachzuweisen. Die *Z.mobilis* Stämme CP4/ pZY228, CP4/ pZY225-XR4, sowie CP4/ pPTZom3 wurden in Vollmedium mit 2% Fruktose und 2% Xylose, versetzt mit 1µCi ^{14}C-[U]-Xylose unter leichtem Schütteln inkubiert. Als Positivkontrolle wurde die *E.coli* Mutante DC 1091/ pZM134 eingesetzt, die aufgrund einer defekten Pyruvat-Formiat-Lyase, unter anaeroben Bedingungen mit der plasmidkodierten Pyruvat-Decarboxylase aus *Z.mobilis* die Substrate hauptsächlich zu Ethanol und CO_2 umsetzt. Aus Tabelle 19 geht hervor, daß der $xylAB^+/tkt^+$ rekombinante Stamm *Z.mobilis* CP4/pZY228, ^{14}C-[U]- Xylose zu einem geringen Anteil zum $^{14}CO_2$ verstoffwechseln konnte. 0,3% der eingesetzten ^{14}C-[U]- Xylose wurden als $^{14}CO_2$ gebunden,

was 15-30 fach mehr war als bei den Kontrollen *Z.mobilis* CP4/ pZY 225 und CP4/pPTZom3. In der *E.coli* Positivkontrolle wurden 7,4% gebundenes $^{14}CO_2$ nachgewiesen.
Damit war bewiesen, daß *Z. mobilis* CP4 durch die Einführung der Gene Xyloseisomerase, Xylulokinase und Transketolase, Xylose in geringem Maße zu (Ethanol) und CO_2 umsetzte.

STAMM	Zeit (d)	^{14}C-Xylose (dpm) Medium	gebundene Radioaktivität 2N NaOH	$^{14}CO_2$ (Σ%)
Z.mobilis:				
CP4/ pZY228	0	$2,49 \cdot 10^6$	-	
	1	$2,50 \cdot 10^6$	$6,44 \cdot 10^3$	
	2	$2,52 \cdot 10^6$	$0,81 \cdot 10^3$	0,30%
CP4/ pZY225-XR4	0	$3,17 \cdot 10^6$	-	
	1	$3,20 \cdot 10^6$	$0,59 \cdot 10^3$	
	2	$3,19 \cdot 10^6$	$0,18 \cdot 10^3$	0,02%
CP4/ pPTZom3	0	$2,93 \cdot 10^6$	-	
	1	$2,85 \cdot 10^6$	$0,23 \cdot 10^3$	
	2	$3,01 \cdot 10^6$	$0,28 \cdot 10^3$	0,01%
E.coli:				
DC1091/ pZM134	0	$3,14 \cdot 10^6$	-	
	1	$1,95 \cdot 10^6$	$2,03 \cdot 10^5$	
	2	$1,70 \cdot 10^6$	$0,23 \cdot 10^5$	7,20%

Tab. 19: Umsetzung von ^{14}C-Xylose zu $^{14}CO_2$ durch *Z.mobilis* CP4/ pZY228 und verschiedene Kontrollstämme. Die Messungen berücksichtigen nur die Radioaktivität des gebundenen $^{14}CO_2$, nicht die Radioaktivität der Gasphase.

Nachdem gezeigt war, daß *Z.mobilis* CP4/pZY228 Xylose bis zum CO_2 metabolisieren kann, war es naheliegend nach intrazellulären Metaboliten zu suchen, die diesen Stoffluß noch limitierten. Hierzu wurden erneut intrazelluläre Metabolituntersuchungen in Silikonölzentrifugationsextrakten von *Z.mobilis* CP4/ pZY228 im Vergleich zu *Z.mobilis* CP4/ pZY225-XR4 mit dem BIOTRONIK Zuckeranalysator durchgeführt. Die Zellextrakte wurden von Kulturen hergestellt (OD_{600} >4), die 4h in Gegenwart von 1% Fruktose und 1% Xylose inkubiert worden waren.

Die Untersuchungen zeigten eine Akkumulation von 9mM Sedoheptulose-7-Phosphat in den *Z.mobilis* CP4/ pZY228 Extrakten. In Zellextrakten der Stämme *Z.mobilis* CP4/ pZY225 , CP4/ pZY225-XR4 bzw. CP4/pZY226 war dieser Metabolit nicht gefunden worden, so daß davon auszugehen ist, daß Sedoheptulose-7-Phosphat aufgrund der erhöhten Transketolase-Aktivität in den Zellen akkumuliert. Die Bildung und Akkumulation von Sedoheptulose-7-Phosphat erklärt sich aus der Umsetzung von Xylulose-5-Phosphat mit Ribose-5-Phosphat. Dabei entsteht Glyceraldehyd-3-Phosphat, das weiter verstoffwechselt werden kann und Sedoheptulose-7-Phosphat, welches aufgrund der niedrigen /oder nicht vorhandenen Transaldolase-Aktivität nicht weiter umgesetzt werden kann. Es ist zu vermuten, daß die Akkumulation von Sedoheptulose-7-Phosphat oder die Anhäufung eines anderen phosphorylierten Transketolase-Metabolites in den pZY228-Rekombinanten auch für die Wachstumshemmung in Gegenwart von Fruktose verantwortlich ist.

Aus den vorliegenden Untersuchungen mit dem Stamm CP4/ pZY228 lassen sich folgende Schlüsse ziehen: *Z.mobilis* CP4/ pZY228 ist mit den Genen für die Xyloseisomerase, die Xylulokinase und die Transketolase in der Lage, Xylose zu CO_2 umzusetzen. Dabei kommt es aufgrund fehlender Transaldolase-Aktivität zur Akkumulation von Sedoheptulose-7-Phosphat.

IV. Diskussion

Grundvoraussetzung für die Etablierung eines katabolen Xylose-Stoffwechsels in *Z.mobilis* war die Klonierung und molekularbiologische Charakterisierung der Gene für Xyloseisomerase (xylA) und Xylulokinase (xylB) aus einem Xylose umsetzenden Gram-negativen Bakterium. Mit dem in dieser Arbeit klonierten Xylose-Operon aus *K.pneumoniae* KAY2026 steht neben den *E.coli* xylAB-Genen (ROSENFELD ET AL., 1984; LAWLIS ET AL., 1984) die zweite vollständige DNA-Sequenz Gram-negativer Bakterien zur Verfügung. Aus Gram-positiven Bakterien liegen bereits über 10 Sequenzen des xylA Gens vor. Die Bestimmung der relativen Lage der Gene durch Transposon-Mutagenese und Sequenzanalysen ergaben, daß die an der Xylose- Verwertung beteiligten Gene benachbart vorliegen und das xylA Gen vor der kodierenden Region von xylB liegt, was in Übereinstimmung zu den bisher untersuchten Prokaryonten steht (*E.coli*: ROSENBERG ET AL., 1984; LAWLIS ET AL.,1984, *B.subtilis*: WILHELM UND HOLLENBERG,1984; GÄRTNER ET AL., 1988).
Die Bestimmung und Analyse der Primärstruktur eines 3225bp Fragmentes,welches xylA und xylB enthielt, ergab zwei große Leseraster von 1320bp für das xylA- und 1489bp für das xylB-Gen. Zwischen den beiden Genen befindet sich eine intergenische Region von 89bp, in der die Ausbildung einer GC-reichen Terminationsstruktur mit einer freien Enthalpie von -31 kcal (nach TINOCO ET AL., 1973), möglich ist. Jedem Strukturgen geht die Konsensussequenz einer Ribosomen-Bindungsstelle (SHINE UND DALGARNO,1974) voraus, proximal zum xylA Gen ist außerdem der AT- Gehalt deutlich erhöht. Die Translation kann somit bei beiden Genen, jeweils beginnend am Initiationscodon AUG (+1), unabhängig voneinander erfolgen. Durch eine "NORTHERN-Blot"-Hybridisierung wurde gezeigt, daß xylAB eine Transkriptionseinheit mit einer etwa 3 kb langen m-RNA bilden. Daraus ist zu schließen, daß sich die Terminatorstruktur zwischen xylA und B nicht immer ausbildet. Ein in kleinerer Menge zusätzlich gefundenes Transkript von etwa 1,6 kb könnte jedoch, abgesehen von einem stabilen Abbauprodukt, ein aufgrund von Termination entstandenes xylA-Transkript sein, was auf einen Regulationsmechanismus des Xylose-Operons auf Transkriptionsebene hindeuten würde. Vorstellbar wäre ein der "Attenuation" analoger Mechanismus, (ROSENBERG UND COURT, 1979). Zu Aufklärung dieser Hypothese sind weitere Untersu-

chungen erforderlich.
Es konnte hiermit erstmals für Gram- negative Bakterien gezeigt werden, daß xylA und xylB, entsprechend den Befunden bei *B.subtilis* (WILHELM UND HOLLENBERG,1985; GÄRTNER ET AL.,1988), *St.xylosus* (SIZEMORE ET AL., 1991) und *A.missouriensis* (AMORE ET AL., 1989), ein Operon bilden. Der Transkriptionsstart lag bei -150 Basen vor dem Initiationskodon AUG des xylA-Gens. An den Positionen -159 und -184 finden sich in der Nukleotidsequenz Regionen, die der -10 und -35 Konsensussequenz prokaryontischer Promotoren entsprechen, (ROSENBERG UND COURT, 1979). Vor der -35 Region liegen an Position -196 und -221 zwei Konsensussequenzen für cAMP/CRP-Bindestellen (DE CROMBRUGGHE ET AL., 1984), die in guter Übereinstimmung zu Befunden dieser Arbeit, sowie Literaturdaten (WILSON UND MORTLOCK, 1973; POSTMA UND LENGELER, 1985) stehen, die eine starke Abhängigkeit der Aktivierung des Xylose-Operons durch cAMP/CRP fanden.

Der Codon-Gebrauch von Genen ist mit der Translationshäufigkeit korrelierbar,(IKEMURA ET AL., 1981). Häufig verwendete Codons weisen auf hohe Konzentrationen der mit der entsprechenden Aminosäure beladenen t-RNA in der Zelle hin. Die Analyse der in den xylAB-Genen von *K.pneumoniae* KAY 2026 verwendeten Tripletts ergab, eine Frequenz des optimalen Codon-Gebrauchs von 0,66 für xylA und 0,62 für xylB (nach IKEMURA ET AL.,1981). Diese Werte weisen daraufhin, daß die Proteine in mittleren Konzentrationen in der Zelle vorliegen. Im xylA- Gen fanden verschiedene Tripletts, die charakteristisch nur in schwach exprimierten Genen auftreten, z.B.CTA (Leu), ATA (Ile), ACA (Thr), GGA (Gly), CCC (Pro) und insbesondere CGA (Arg), keine Verwendung. Auch im xylB-Gen war der Anteil dieser Tripletts niedrig. Deutlich wurde bei beiden Genen die Bevorzugung von Codons mit G oder C in der dritten Position, was dem GC-Gehalt von 57% zuzuschreiben ist (Tab.IV.1.).
Das xylA- Gen kodiert für ein Polypeptid von 440 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 49,8 kDa, das xylB-Gen für ein 51,8 kDa großes Enzym mit 483 Aminosäuren. Das Molekulargewicht der Xyloseisomerase ist mit dem der monomeren Untereinheit der Enzyme von *E. coli*, *B.subtilis* und *Clostridien* Stämmen vergleichbar, und sie gehört damit zu den im aminoterminalen Bereich etwa 50 Aminosäuren längeren Isomerasen, verglichen zu den 43-44 kDa großen *Actinomyces*-Proteinen. Die Gruppe der ≈ 50 kDa großen Xyloseisomerasen umfaßt die mesostabilen Enzyme, die untereinander auf DNA-Sequenz-

ebene stärker übereinstimmen und andere katalytische und physikochemische Eigenschaften aufweisen (z.B.bevorzugtes Metallion $Co^{2+} \geq Mn^{2+} > Mg^{2+}$; Stöchiometrie Metallion/ Monomer= 1/1), als die temperaturstabilen *Actinomyces*-Enzyme, die Mg^{2+} zur Aktivierung bevorzugen und eine Stöchiometrie von 2 Mol Metallionen zu 1 Mol Monomer besitzen (LEE ET AL 1990; VANGRYSPERRE ET AL., 1990).
Alle Xyloseisomerasen enthalten wenig oder kein Cystein, was für thermostabile Enzyme charakteristisch ist, (FREIDMANN, 1978). Der aliphatische Index, definiert als das relative Volumen der aliphatischen Seitenketten von Ala, Val,Ile und Leu im Protein, läßt weitere Aussagen über die Temperaturstabilität zu, (IKAI, 1980). Thermostabile Proteine besitzen einen höheren aliphatischen Index von >90% als mesostabile mit <80%,(IKAI,1980). Die Xyloseisomerase von *K.pneumoniae* KAY2026 hat einen aliphatischen Index von 72%, 4 Cysteinreste im Protein und ist damit dem *E. coli* und *B. subtilis* Enzym vergleichbar (SCHELLENBERG ET AL., 1984; WILHELM UND HOLLENBERG,1985).

Das xylA-Gen von *K.pneumoniae* und die abgeleitete Aminosäuresequenz zeigen große "Homologien" zu den xylA- Genen anderer Bakterien. Xyloseisomerasen aus sechs verschiedenen Bakterien, mit durchschnittlich je 440 Aminosäuren, haben 64 Positionen (=15%) streng konserviert. Bezieht man auch die 43 kDa Isomerasen in den Vergleich ein, so sind Aminosäuren in insgesamt 49 Positionen konserviert. Die identischen Aminosäuren verteilen sich über einen weiten Bereich der Primärstruktur; die 40-45 Aminosäuren des carboxyterminalen Endes sind nicht konserviert. Auffällig sind die drei "Cluster" FHD.D..P..G bei Position 100-111, LG....V.WGGREG.E bei Position 180-196 und EPKP.EP bei Position 232-238. Aus chemischen Modifikationsstudien einzelner Aminosäuren (BATT ET AL. 1990) und Röntgenstrukturanalysen verschiedener Xyloseisomerasen (CALLENS ET AL., 1985; CARREL ET AL., 1989; HENRICK ET AL., 1990; VANGRYSPERRE ET AL., 1989) geht hervor, daß der Mechanismus der Substratumsetzung in den Xyloseisomerasen verschiedener Organismen gleich ist. Der His^{101}-Rest im konservierten Motiv FHD.D wurde als aktives Zentrum vorgeschlagen. Das an der Katalyse, einem Hydridshift, beteiligte zweiwertige Kation (Mg^{2+},Mn^{2+} oder Co^{2+}), wird durch die Carboxylgruppen der konservierten Reste Glu^{232}, Glu^{268} und Asp^{296} gebunden (CARRELL ET AL., 1989; HENRICK ET AL., 1990). Der His^{271}-Rest scheint für die Temperaturstabilität wichtig zu

sein (BATT ET AL.,1990). Die im aktiven Zentrum der Xyloseisomerase identifizierten konservierten Aminosäuren, sind auch in der *K.pneumoniae* KAY 2026 Sequenz vorhanden.

Das Fehlen konservierter Aminosäuren im carboxyterminalen Bereich läßt vermuten, daß eine strukturelle Trennung der Xyloseisomerase in zwei Domänen vorliegt; die konservierte Domäne besitzt katalytische Funktionen, die zweite nicht konservierte Domäne beeinflußt den strukturellen Aufbau (Anzahl der Untereinheiten) und die Stabilität des Enzyms. Diese Annahme wird unterstützt durch stärkere Übereinstimmungen im carboxyterminalen Ende der Xyloseisomerasen einerseits, die im nativen Zustand Dimere bilden, z.B. *E. coli*, *K.pneumoniae*, *B. subtilis* (TUCKER ET AL.,1988; WILHELM UND HOLLENBERG,1985) bzw. die hohe Identität der tetrameren Enzyme bei *Actinomyces sp.* (DAUTER ET AL.,1989). Die Teilung der Xyloseisomerase in zwei Domänen wird durch Strukturanalysen des *A.missouriensis*, (REY ET AL., 1988) und des *Arthrobacter* Stamm B3728 Enzyms bestätigt. Ein Monomer bildet in der dreidimensionalen Peptidstruktur ein "Core"-Peptid, aus dem das Carboxylende hakenförmig herausragt.

Über Struktur und Funktion der Xylulokinase ist weit weniger bekannt als über die Xyloseisomerasen. Neben der in dieser Arbeit charakterisierten Xylulokinase aus *K.pneumoniae* KAY2026, liegen noch xylB-Sequenzen von *E.coli* (LAWLIS ET AL., 1984), *St.xylosus* (SIZEMORE ET AL., 1991) und *S.violaceoniger*, (F.MARTIN,persönliche Mitteilung) sowie Teilsequenzen von *Ampulariella sp.* (SAARI ET AL. 1987) vor. Homologievergleiche zeigen, daß konservierte Aminosäurereste über einen weiten Bereich der Primärstruktur verteilt sind und in den 40-50 carboxyterminalen Aminosäuren fehlen. Es treten kurze konservierte Bereiche auf,z.B. RPA.LWND.R (Position 91-101), SDAAGT (Position 169-174), S.GTSGV (Position 252-258), PYL.GERTPHN (Position 331-342) und GPA.GAA (Position 421-427). Bemerkenswert ist auch eine interne Sequenzwiederholung LGTSGV an den Positionen 7-12 und 253-258 des xylB-Gens.
Bakterielle Zucker-Phosphatkinasen lassen sich nach ihrer Größe in zwei Klassen einteilen; einerseits die Klasse der Kinasen aus etwa 300 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von ≈30 kDa (z.B. Fruktokinase von *E.coli*; ORCHARD ET AL.,1990), andererseits die >50kDa großen Kinasen, bestehend aus etwa 480 Aminosäuren, zu denen auch

die Xylulokinasen gehören. Sequenzvergleiche zwischen Xylulokinasen, der Glukonatkinase aus *B.subtilis*, der Fucosekinase und der Glycerinkinase aus *E.coli* (REIZER ET AL.,1991) zeigten, daß die beschriebenen konservierten Regionen auch bei diesen Enzymen weitgehend erhalten waren. Insbesondere die Motive im Bereich 331-352 (PYL.GERTPHN usw.) und die interne Sequenzwiederholung an Position 7-12 und 253-258 waren in allen Sequenzen erkennbar. Ob diese Sequenzen funktionell an der Substrat- oder ATP- Bindung beteiligt sind,bleibt durch Strukturanalysen aufzuklären. Eine typische ATP-Bindestelle konnte weder in der Xylulokinase von *K.pneumoniae* KAY 2026 noch in der Fucosekinase aus *E.coli* oder der Glukonatkinase aus *B.subtilis* nachgewiesen werden.

Die Klonierung des Xylose-Operons auf Vektoren mit hoher Kopienzahl führte erst nach Deletion des 5'-upstream Bereichs, der den xyl-Promotor sowie die Bindestelle des cAMP/CRP-Komplexes umfaßt, zur Überexpression der Gene ausgehend von vorgeschalteten starken Promotoren, (z.B.pSP6). Diese Beobachtungen wurden auch bei der Klonierung der *E.coli* Xyloseisomerase gemacht, (BATT ET AL.,1984; ROSENFELD ET AL.,1984; SCHELLENBERG ET AL.,1984) und deuten auf eine starke Abhängigkeit der Genexpression von in der Synthese limitierten Aktivatormolekülen, wie cAMP/CRP und möglicherweise eines zusätzlichen XylR Aktivatorproteins, hin. Die Aktivierung der xylAB Expression wird durch eine Aussage von BATT ET AL., (1985) gestützt, daß Tn10-Insertionen 1-2 kb distal zum *E.coli* xylA Gen einen pleiotropen *Xyl*$^-$ Phänotyp verursachten, was durch Inaktivierung des Aktivators oder seiner DNA-Bindestelle erklärbar ist. Darüberhinaus wurden bislang keine Mutanten mit konstitutiver Expression der Xylose-Gene isoliert, was als Hinweis auf die Abhängigkeit der Genexpression durch einen Aktivator zu verstehen ist. Es ist weiter bekannt, daß das Xylose-Operon von *E.coli* und *K. pneumoniae* der Katabolitrepression unterliegt und abhängig ist von cAMP,(DAVID UND WIESMEYER,1970; POSTMA UND LENGELER, 1985).
Die Klonierung des xylA-Gens von *K.pneumoniae* KAY2026, eingeschlossen seiner 5'-upstream Region auf Vektoren mit hoher Kopienzahl, verursachte einen Xylose negativen Phänotyp in den plasmidtragenden Stämmen, darauf beruhend, daß die Expression der chromosomalen xylAB-Gene verhindert war. Vergleichbare Befunde wurden auch bei der Klonierung des *E.coli* xylA-Gens gemacht (BATT ET AL. 1984; ROSENFELD ET AL.,1984; SCHELLENBERG ET AL.,1984) und so dis-

kutiert, daß der Effekt auf die Titration eines Aktivators, z.B. Xylose, xylA-DNA, -RNA oder -Protein, durch das in hoher Kopienzahl vorliegende xylA-Gen zurückzuführen war. Der *trans*-Effekt wurde nicht aufgeklärt und die verantwortliche Region nicht eingegrenzt. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigten, daß der *trans*-Effekt keine funktionell aktive Xyloseisomerase benötigt, sondern durch den 5'-upstream Bereich, der den Promotor und die benachbarte cAMP/ CRP-Bindestelle einschließt, bedingt ist. Hieraus wurde folgendes Modell abgeleitet: Die Überexpression der cAMP/ CRP-Bindestelle auf Vektoren mit hoher Kopienzahl führt zur Titration eines positiven Aktivators, entweder CRP oder XylR, so daß die Aktivierung der chromosomalen xylAB-Gene verhindert wird und phänotypisch Xylose-negative Kolonien entstehen. Diese Ergebnisse erklären auch Beobachtungen von BATT ET AL.,(1986), die bei Überexpression des promotorlosen xylA-Gens ausgehend vom tac-Promotor,(DE BOER ET AL.,1983) nach Induktion mit IPTG einen Xyl⁻Phänotyp, in nicht induzierten Zellen aber Xylose-positive Kolonien fanden. Der ptac enthält auch die Konsensussequenz für cAMP/CRP-Bindung. Unter reprimierten Bedingungen findet keine Aktivator-Bindung statt (möglicherweise durch Repressor sterisch verhindert), nach Induktion kann jedoch auch hier die Titration des Aktivators erfolgen, der zur Expression des chromosomalen Xylose-Operons benötigt wird.
Zusammenhänge zwischen Xylose-negativem Phänotyp und dem veränderten Supercoil der xyl-DNA in Gyrase B defekten *E.coli* Stämmen wurden von FRIEDMAN ET AL., (1984) beschrieben. Die Abhängigkeit der Expression des Xylose-Operons von einer funktionell aktiven Gyrase B, steht in Übereinstimmung zu Aussagen von SANZEY ET AL.,(1979), daß über Katabolit-Repression regulierte Operone, sensitiv gegenüber Veränderungen im Supercoil sind. Diese Befunde unterstützen die in der vorliegenden Arbeit gefundene Bedeutung des cAMP/CRP-Komplexes für die Aktivierung der Xylose-Gene.

Grundlage für einen Xylose-Stoffwechsel in *Zymomonas mobilis* war die stabile Expression der heterologen Gene für Xyloseisomerase und Xylulokinase in dem Bakterium. Da die zu Beginn dieser Arbeit zur Verfügung stehenden schlecht mobilisierbaren Expressionsvektoren pPTZ1 und pPTZ3, (REYNEN ET AL.,1990) aufgrund von Rekombina-

tionen keine stabile Genexpression ermöglichten, (diese Arbeit, UHLENBUSCH ET AL.,1991; WILDEN, Diplomarbeit 1990), wurde im Verlauf der Arbeit ein verbesserter Expressionspendelvektor konstruiert. Dieser neue Vektor pPTZom3, basierend auf dem Konstrukt pPTZ3, (p_{pdc}, T_1T_2, singuläre Schnittstellen, tet^R) ist aufgrund der neu eingeführten Replikations- und Mobilisationsfunktionen des RSF1010-Derivats pSUP104, (SIMON ET AL.,1983) sowie dem Ersatz des die Rekombinationsereignisse bedingenden pZM02-Anteils durch einen nicht homologen pZM03-Anteils mit "ori"-Funktion (MISAWA UND NAKAMURA, 1989; SCORDAKI UND DRAINAS, 1991), mit erhöhter Frequenz ($\approx 10^{-6}$) erstmals auch nach *Z.mobilis* CP4 einführbar und stabil replizierbar. Rekombinationsereignisse mit kryptischen Plasmiden oder dem Chromosom von *Z.mobilis* waren nicht mehr zu beobachten. Mit diesem nur 8,7kb großen Expressionsvektor liegt nun ein geeigneter *E.coli/ Z.mobilis* Pendelvektor vor, der verglichen zu in der Literatur beschriebenen *Z.mobilis* Vektoren, (BYUN ET AL., 1986;TONOMURA ET AL.,1986;CONWAY ET AL.,1987; LIU ET AL.,1988; CHO ET AL.,1989) erhebliche Vorteile aufweist. Der Vektor ist mit 8,7 kb relativ klein, verfügt über singuläre Schnittstellen, definierte Replikations- und Mobilisationsfunktionen und den gut charakterisierten starken *Z.mobilis* eigenen Promotor des Pyruvat-Decarboxylase Gens, (CONWAY ET AL., 1987; REYNEN UND SAHM, 1988), der die Expression heterologer Gene ermöglicht. Abgesehen vom *Z.mobilis* Promotor des adhB-Gens, (MACKENZIE ET AL.,1989) wurden für Vektorkonstruktionen bislang entweder undefinierte *Z.mobilis* oder fremde Promotoren verwendet, die häufig nur zu schwacher Expression heterologer Gene in *Z.mobilis* führten.

Unter Verwendung des neuen Expressionsvektors pPTZom3 wurden die Gene für Xyloseisomerase und Xylulokinase in *Z.mobilis* CP4 exprimiert. Es wurden spezifische Aktivitäten von 0,13U/mg für die Isomerase und 1,3U/mg für die Kinase bestimmt. Diese spezifischen Aktivitäten sind mit den in *E.coli* und *K.pneumoniae* Wildtyp-Stämmen vorliegenden Aktivitäten vergleichbar.

Die in *E.coli* gefundene 5-6 fache Überexpression der promotorlosen Xylose-Gene mit vorgeschalteten fremden Promotoren war in *Z. mobilis* nicht vorhanden. Dies läßt sich einerseits mit der erheblich niedrigeren Kopienzahl der *Z.mobilis* Expressionsvektoren, verglichen zu den in *E.coli* verwendeten Vektoren ($pGEM7Zf^+$,pUC19),

erklären. Darüberhinaus entscheidet aber auch der Codon-Gebrauch, bzw. der GC-Gehalt der eingeführten Gene über die Expressionsstärke, (IKEMURA ET AL.,1981). Je besser diese Parameter bei Donor und Akzeptorstamm übereinstimmen, desto höhere Expression ist zu erwarten. Der GC-Gehalt der heterologen *K. pneumoniae* DNA liegt mit 57% etwas höher als der GC-Gehalt von *Z.mobilis*-DNA, der etwa 49% beträgt, so daß *K.pneumoniae* diejenigen Tripletts bevorzugt, die in der dritten Position ein G oder C haben.

Ein Vergleich des Codon-Gebrauchs von *Z.mobilis* mit den im Xylose-Operon von *K.pneumoniae* KAY2026 verwendeten Tripletts, (Tab. IV.1) zeigt, daß insbesondere zwei sehr häufig verwendete Codons, nämlich GAG für Glu (3,2mol% in xylA; 2,1mol% in xylB) und GGG für Gly (1,4mol% in xylA; 2,5mol% in xylB), in geringerem Maße aber auch GTA für Val (0,5 mol% in xylA; 0,4 mol% in xylB) translationsregulierend wirken könnten, da diese Tripletts in *Z. mobilis* durchschnittlich nur mit einer Häufigkeit von <0,1 mol% vorkommen, (nach GUNASEKARAN ET AL., 1990). In Regionen der mRNA, in denen diese seltenen Codons gehäuft auftreten, können daher vorübergehende Translationspausen auftreten (MORTON ET AL., 1983). HOEKEMA ET AL.(1987) diskutieren solche Verzögerungen im Zusammenhang mit der Abnahme der Stabilität sowohl der mRNA als auch des gebildeten Polypeptids. Da die in *Z.mobilis* gefundenen Enzymaktivitäten jedoch darauf hinweisen, daß Xyloseisomerase und Xylulokinase stabil exprimiert werden, ist davon ausgehen, daß die Translation durch die für *Z.mobilis* seltenen Codons nicht erheblich limitiert wird.

Im Konstrukt pZY225, gehen den Xylose-Genen 16 bp des pdc-Gens, einschließlich des pdc-Initiationscodons AUG voran (abgeleitet von pPTZ3; REYNEN ET AL.,1990), so daß die Translation entweder am Startcodon des pdc-Gens starten konnte, was zur Bildung eines XylA -Fusionsproteins führen würde, daneben war ein Translationsstart beim AUG des xylA-Gens möglich. Da im Vektor pZY226 (pPTZ7 stammt von pPTZ4 ab; REYNEN ET AL.,1990; UHLENBUSCH ET AL.,1991), in dem keine Proteinfusionen mehr entstehen können, die Expression von xylAB- Genen nicht erhöht war, ist davon auszugehen, daß auch im Vektor pZY225 keine Begrenzung der Translation durch Fusionsproteine vorlag.

Amino-säure	Codon	Codongebrauch (mol%) *Z.mobilis*	*K.pneumoniae* xylA	*K.pneumoniae* xylB	*E.coli*
Phe	UUU	0,7	2,3	0,6	1,3
	UUC	2,5	3,2	1,7	2,2
Leu	UUA	0,6	0,2	0,8	0,7
	UUG	1,5	0,5	0,4	0,9
	CUU	2,3	0,5	1,0	0,8
	CUC	1,7	1,6	1,7	0,8
	--> CUA	<0,1	0	0,2	0,2
	CUG	3,5	6,6	7,7	6,8
Ile	AUU	1,7	1,6	0,8	2,2
	AUC	3,3	0,9	2,1	3,7
	--> AUA	<0,1	0	0	0,2
Met	AUG	2,6	2,5	3,7	2,8
Val	GUU	5,0	1,1	0,2	2,9
	GUC	2,2	1,4	2,3	1,2
	GUA	<0,1	■ 0,5	■ 0,4	1,8
	GUG	0,6	2,7	3,7	2,2
Ser	UCU	1,1	0,2	0,6	1,3
	UCC	1,4	0,7	0,4	1,5
	UCA	0,6	0	0,2	0,4
	UCG	0,5	0,9	1,4	0,6
	AGU	0,3	0	0,4	0,3
	AGC	1,7	1,4	2,9	0,5
Pro	CCU	0,8	0,5	0,2	0,5
	CCC	0,6	0,7	1,0	0,3
	CCA	0,5	0	0	0,7
	CCG	2,7	2,5	4,1	2,5
Thr	ACU	0,8	0,2	0	1,1
	ACC	3,7	4,1	1,7	2,4
	ACA	0,2	0	0	0,3
	ACG	1,2	0,7	2,1	0,8
Ala	GCU	7,4	1,1	0,4	2,6
	GCC	3,8	5,0	5,8	2,2
	GCA	2,6	0,2	1,4	2,3
	GCG	1,2	2,7	6,0	3,2
Tyr	UAU	1,5	2,0	1,0	1,0
	UAC	0,4	2,3	0,6	1,5
His	CAU	1,5	3,4	1,4	0,7
	CAC	1,3	0,5	2,1	1,2
Gln	CAA	0,7	0,9	0,8	1,0
	CAG	1,7	5,5	3,1	3,2
Asn	AAU	1,7	1,1	0,6	1,0
	AAC	2,5	3,6	0,8	2,8
Lys	AAA	4,2	3,4	2,1	4,1
	AAG	2,4	1,6	1,2	1,3
Asp	GAU	4,2	3,6	3,5	2,5
	GAC	2,4	2,5	2,7	3,0
Glu	GAA	5,4	3,6	2,7	4,9
	GAG	<0,1	■ 3,2	■ 2,1	1,8
Cys	UGU	0,2	0,2	0,2	0,4
	UGC	1,6	0,7	1,2	0,5
Trp	UGG	1,8	1,8	2,5	0,7
Arg	CGU	1,8	1,1	1,0	3,1
	CGC	1,7	2,3	2,7	2,0
	--> CGA	0,2	0	0,2	0,2
	--> CGG	0,2	1,1	1,2	0,2
	AGA	0,2	0,5	0,2	<0,1
	AGG	0	0	0,2	<0,1
Gly	GGU	5,1	1,1	1,2	3,8
	GGC	2,6	6,1	5,6	3,1
	--> GGA	0,4	0	0,2	0,4
	GGG	<0,1	■ 1,4	■ 2,5	0,6

Tab. IV.1.: Codongebrauch des Xylose-Operons aus *K.pneumoniae* KAY 2026 im Vergleich zu *Z.mobilis* (nach GUNASEKARAN ET AL.,1990; Mittelwerte aus *gap,pgk,adh,pdc,phoC*) und *E.coli* Genen. Unterstrichene Aminosäuren werden im jeweiligen Stamm am häufigsten für die entsprechende Aminosäure verwendet.
--> : Translationsregulierende Codons nach IKEMURA ET AL.,1981
■ : Mögliche Limitierungen der Translation aufgrund des seltenen Gebrauchs dieser Tripletts in *Z.mobilis*

Die in *Z.mobilis*/ pZY225 bzw./ pZY226 gefundenen Enzymaktivitäten für Xyloseisomerase 0,13- 0,2 U/mg und Xylulokinase 1,3-1,6 U/mg entsprechen größenordnungsmäßig den Aktivitäten der ENTNER-DOUDOROFF- bzw. der Glykolyse-Enzyme in *Z.mobilis*, (ALGAR UND SCOPES, 1985; OSMAN ET AL.,1987). Auch hier zeigen Isomerasen die Tendenz zu niedrigeren spezifischen Aktivitäten, z.B.Triosephosphat-Isomerase:60 mU/mg; Phosphoglukoseisomerase: 0,8 U/mg, als die irreversible Reaktionen katalysierenden Kinasen, z.B. Glukokinase: 1U/mg; Phosphoglyceratkinase: 3U/mg; Pyruvatkinase: 4,5 U/mg. Das Gleichgewicht reversibler Reaktionen wird durch erhöhte Aktivitäten nachfolgender irreversibler Enzymreaktionen deutlich verschoben und der Metabolitfluß erhöht. Die unter Einbeziehung der Wachstumsrate μ_{Xyl} ($0,15h^{-1}$) sowie dem Wachstumsertrag Y_{Xyl} (3,9 g Trockengewicht/ Mol Xylose; nach FELDMANN, Diplomarbeit 1988) berechnete Mindestaktivität für anaeroben Xyloseabbau in *Klebsiella*, liegt bei ≈1,3 U/ mg Protein. Diese in vivo zu fordernde Aktivität, die noch durch das Zusammenwirken mit anderen Enzymreaktionen sowie durch den Abfluß von Metaboliten in den Anabolismus beeinflußbar ist, stimmt mit den gemessenen Aktivitäten überein. Versucht man für die Umsetzung von Xylose in *Z. mobilis*, Mindestaktivitäten der beteiligten Enzyme anzugeben, so reichen hier ≈ 0,7 U/ mg aus, unter den vom Glukose-Wachstum bekannten, abgeleiteten Voraussetzungen, daß die Wachstumsrate μ≈ 1/4 der enterobakteriellen Rate entspricht und der Wachstumsertrag mindestens 50% niedriger als der enterobakterielle Ertrag ist (SWINGS UND DELEY, 1977). Damit sollten die spezifischen Aktivitäten der Xylose-Gene auf den Plasmiden pZY225 und pZY226 den Xylose-Abbau nicht limitieren. In *Z. mobilis* CP4/ pZY228 könnte die Xylulokinase mit 0,25 U/mg einen effizienten Xyloseumsatz begrenzen, jedoch ermöglicht auch die Fruktokinase mit einer spezifischen Aktivität von 0,6 U/mg (ALGAR UND SCOPES, 1984) *Z.mobilis*-Stämmen Wachstum auf Fruktose.
Da die Affinität der Xylulokinase zum Xylitol in den Mutantenplasmiden pZY225-XR4 bzw. im abgeleiteten Plasmid pZY228 deutlich reduziert wurde, und somit die stark wachstumshemmend wirkende Xylitol-5-Phosphat Bildung weitgehend überwunden wurde, sollte man abwägen zwischen dem Nachteil, den die mutierte Kinase mit erniedrigter Aktivität für einen Xyloseabbau in *Z.mobilis* bietet und dem Vorteil, den die veränderte Xylulokinase mit sich bringt. Als Fernziel sollte aber die Ausschaltung der NADPH-abhängigen Aldose-Reduktase angestrebt werden, um die Xylitol-5-Phosphat-Bildung zu

verhindern und die Xyloseumsetzung durch erhöhte Xylulokinase-Aktivität, zu steigern.

Eine weitere entscheidende Voraussetzung für einen katabolen Xylosestoffwechsel sind die Enzyme Ribose-5-Phosphat-Isomerase (PRI), Ribulose-5-Phosphat-Epimerase (PRE), Transketolase und Transaldolase des nicht oxidativen Pentose-Phosphat-Weges, (HORECKER,1962). In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, daß PRI (1,6 U/mg), PRE (0,6 U/mg) und sehr niedrige Transketolase- Aktivitäten (≈1-2 mU/mg) in *Z.mobilis* vorliegen. Bislang war man aufgrund von Untersuchungen von McGILL UND DAWES, (1971), davon ausgegangen, daß *Z.mobilis* keine Transketolase besaß. Dagegen sprachen jedoch die physiologischen Fähigkeiten von *Z.mobilis*, der sowohl aromatische Aminosäuren,die als Vorstufe das durch die Transketolase gebildete Erythrose-4-Phosphat benötigen, als auch sämtliche Pentose-Phosphat abhängigen Metabolite, wie RNA, DNA, Histidin und Hopanoidseitenketten, synthetisieren kann. Aus ^{13}C-Markierungsexperimenten der Hopanoide von *Z.mobilis* schloß SUTTER (1991), daß die Pentosen der Hopanoidseitenketten von Xylulose -5-Phosphat abstammten. Dies läßt sich nun unter Einbeziehung der Enzyme Transketolase, PRI, und PRE erklären. Bislang konnte mit der eingesetzten Analytik keine Transaldolase-Aktivität in *Z. mobilis* nachgewiesen werden. Theoretisch ist vorstellbar, daß dieses Enzym nicht benötigt wird, da alle Vorstufen für anabole Prozesse durch die reversiblen Reaktionen der nachgewiesenen Enzyme Transketolase, PRI und PRE gebildet werden können. Auch von Transaldolase-negativen *S.cerevisiae* Mutanten ist bekannt, daß dieses Enzym für das Wachstum auf C6- Zuckern nicht essentiell ist (SCHAAF ET AL., 1990).
Berechnet man die für den anabolen Stoffwechsel erforderliche Mindestaktivität der Transketolase in *E.coli* B, unter der Voraussetzung, daß der Bedarf an Erythrose-4-Phosphat als Vorstufe der aromatischen Aminosäuren etwa 360µmol/gTG beträgt (nach NEIDHARDT, 1990), so ist eine spezifische in vivo Aktivität von ≈18 nmol/mg Protein zu fordern. Überträgt man diese Abschätzung auf *Z.mobilis*, dessen Generationszeit etwa um den Faktor 4 niedriger ist,so würde hier eine Transketolase-Aktivität von 4-5mU/mg Protein für anabole Zwecke ausreichen. Dieser Wert stimmt gut mit dem gemessenen überein, ist aber für katabolen Xyloseabbau viel zu niedrig, (in *E.coli*: 60-65 mU/mg). In der vorliegenden Arbeit konnte die Transketo-

lase-Aktivität in *Z.mobilis* durch Einbringung des aus *E.coli* klonierten tkt-Gens, (SPRENGER, unveröffentlicht) im Vektor pZY228 ($xylAB^+$ tkt^+) auf 150 mU/mg gesteigert werden. Diese in *Z.mobilis*/ pZY 228 gemessene spezifische Aktivität ist um den Faktor 2,5 höher als die in *E.coli* Wildtyp vorliegende Transketolase-Aktivität, die katabolen Xyloseumsatz ermöglicht.

In der vorliegenden Arbeit wurde für *Z.mobilis* erstmalig gezeigt, daß die Xylose-resistenten CP4/ pZY228 Stämme durch Einführung der heterologen Gene xylAB sowie des tkt-Gens befähigt waren, ^{14}C-[U]-Xylose zu $^{14}CO_2$ umzusetzen. Intrazelluläre Metabolituntersuchungen von *Z.mobilis* CP4/pZY228 Zellextrakten zeigten, daß mit der Umsetzung von Xylose eine Akkumulation von Sedoheptulose-7-Phosphat einherging. Dies ist in Übereinstimmung zu Befunden in Transaldolase-negativen *S.cerevisiae* Mutanten (SCHAAF ET AL.,1990). Auch in Xylulose umsetzenden *S.cerevisiae* Stämmen, (SENAC UND HAHN-HÄGERDAL, 1990), kam es aufgrund zu niedriger Transaldolase-Aktivität (≈5 mU/mg) zur Akkumulation von Sedoheptulose-7-Phosphat. Unter dieser Voraussetzung wird das Glycerinaldehyd-3-Phosphat aus der Transketolase-Reaktion, um das Pentose-Phosphat-Weg und Glykolyse "kompetetieren", über die Glykolyse metabolisiert. Dieser Befund traf auch für *Z. mobilis* CP4/ pZY228 zu. Die Arbeiten mit Xylose-Reduktase und Xylitol-Dehydrogenase rekombinanten *S.cerevisiae* Stämmen, weisen ebenfalls daraufhin (AMORE; Dissertation Düsseldorf, 1990), daß der Pentose-Phosphat-Weg in diesem Organismus zu schwach für einen anaeroben Xylose-Abbau ist.

Vergleicht man den Entwicklungsstand der Konstruktion einer unter anaeroben Bedingungen Xylose vergärenden *S.cerevisiae* Hefe mit dem in dieser Arbeit konstruierten *Z.mobilis* CP4/pZY228 Stamm, so lassen sich im Hinblick auf eine Ethanolproduktion folgende Schlußfolgerungen ziehen:
Rekombinante *S.cerevisiae* Stämme wachsen aerob langsam auf Xylose, jedoch ist der anaerobe Abbau bislang entweder durch unzureichende Aktivitäten des Pentose-Phosphat-Weges limitiert oder/und die unterschiedliche Coenzymabhängigkeit der zweistufigen Umsetzung von Xylose zur Xylulose, die sich nicht durch Einführung bakterieller Xyloseisomerase-Gene umgehen ließ, (AMORE; Dissertation Düsseldorf, 1990).

In *Z.mobilis* CP4/ pZY228 ist die direkte Isomerisierung von Xylose zu Xylulose und die Phosphorylierung zum Xylulose-5-Phosphat durch das neu eingeführte Xylose-Operon aus *K.pneumoniae* KAY2026 gewährleistet. Die Rekombinanten wachsen jedoch auch nach zusätzlicher Einführung eines Transketolase-Gens im Gegensatz zu rekombinanten *S.cerevisiae* Stämmen bislang nicht auf Xylose. Der dafür verantwortliche Engpaß ist vermutlich die fehlende bzw. zu niedrige Transaldolase-Aktivität. Es gilt in einem weiteren Schritt die Transaldolase zu erhöhen, um eine effizientere Einschleusung von Xylose in den Zentralstoffwechsel nach dem in Abb.IV.2 dargestellten Schema zu erreichen. Unter der Voraussetzung eines ausreichenden Energiegewinns, sollte dann Wachstum auf Xylose möglich sein.

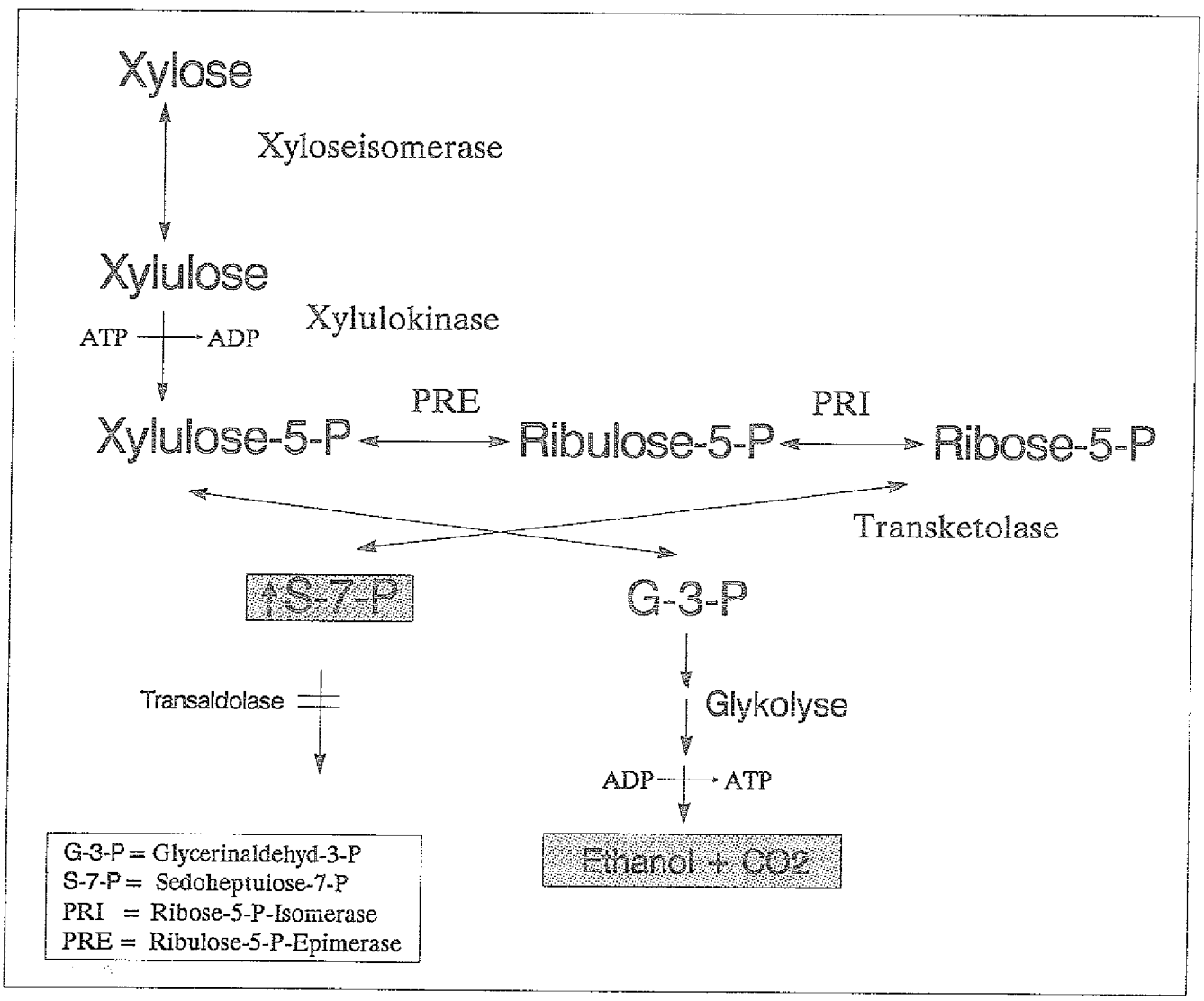


Abb. IV.2: Schema der katabolen Xyloseumsetzung in $xylAB^+$ tkt^+ rekombinanten *Z.mobilis* Stämmen CP4/ pZY228

V. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen katabolen Xylose-Stoffwechsel in *Z.mobilis* zu etablieren.

1. Die erforderlichen Gene, xylA für die Xyloseisomerase und xyl B für die Xylulokinase, wurden aus einer Cosmid-Genbank von *K. pneumoniae* KAY2026 durch Komplementationsanalysen in *E.coli xyl*$^-$ Mutanten isoliert und in pUC-Vektoren subkloniert. Durch Transposonmutagenese und Promotoranalysen wurde die Genanordnung p_{xyl}, xylA gefolgt von xylB, ermittelt.XylA und xylB bilden eine Transkriptionseinheit. Der Transkriptionsstart lag bei -150 Basen vor dem Startcodon des xylA- Gens. Die Sequenzierung des Xylose-Operons ergab zwei große, offene Leseraster; 1320bp kodieren für das xylA-Gen, 1449 bp für xylB. Zwischen den beiden Strukturgenen befindet sich eine intergenische Region von 89bp, in der die Ausbildung einer Terminationsstruktur möglich ist. Das xylA- Gen kodiert für ein Protein mit 440 Aminosäuren und einem M_G von 49,8 kDa. Das xylB- Gen bildet ein 483 Aminosäuren langes Protein von 51,8 kDa. Sequenzvergleiche mit verwandten Zuckerkinasen zeigten konservierte Bereiche auf, jedoch ist weder eine klassische ATP-Bindestelle noch eine Substratbindestelle erkennbar.

2. Die Klonierung des xylA-Gens einschließlich des 5'-"upstream" Bereiches auf Vektoren mit hoher Kopienzahl, führte in *E. coli* Wildtypzellen zu einem Xylose- negativen Phänotyp. Dieser Effekt benötigte keine aktive Xyloseisomerase. Durch Verkürzung der 5'-"upstream" Region mit Exonuklease III, wurde der verantwortliche Bereich auf etwa 200 bp eingegrenzt. Durch Rekonstitution des Operons wurde gezeigt, daß die Region "upstream" des xylA-Strukturgens lag und den Promotorbereich und die benachbarte cAMP/CRP-Bindestelle umfasste. Nach Entfernung der xyl-Promotorregion war erstmals eine Überexpression der klonierten Gene mit vorgeschalteten, fremden Promotoren (z.B.SP6) möglich. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, daß der Xylose-negative Phänotyp auf der Titration eines in seiner Synthese limitierten, positiven Regulators, entweder eines XylR-Aktivatorproteins oder des CRP-Proteins beruhte, wodurch die Aktivierung der chromosomalen Xylose-Gene verhindert wurde.

3. Zur Expression des Xylose-Operons in *Z.mobilis* CP4 wurde ein verbesserter Vektor entwickelt. In diesem gut mobilisierbaren und stabilen Vektor, wurden die Xylose-Gene mit dem *Z.mobilis*- eigenen Promotor des Pyruvat-Decarboxylase-Gens exprimiert. Die spezifische Aktivität für die Xyloseisomerase lag bei 0,13 U/mg Protein, die Xylulokinase wurde mit 1,3-1,6 U/mg gebildet.

4. Die Expression der Xylose-Gene führte nicht zum Wachstum von *Z.mobilis* CP4/pZY225 auf Xylose als Kohlenstoff- und Energiequelle. Stattdessen wurden die Rekombinanten in Gegenwart von 1-5% Xylose stark im Wachstum gehemmt.
Xylose wurde von *Z.mobilis* mit einem bisher noch nicht beschriebenen Enzym, einer NADPH-abhängigen Aldose-Reduktase, zum Xylitol reduziert. Durch Phosphorylierung des Xylitols mit der Xylulokinase, akkumulierten die plasmidtragenden Stämme Xylitol-5-Phosphat (10-15mM), was zur Wachstumshemmung führte. Durch die Isolierung von zwei Mutantenplasmiden pZY225 -XR4 bzw.-7, bei denen die Xylulokinase, wahrscheinlich aufgrund einer veränderten Substratbindestelle, reduzierte Affinität zum Xylitol besitzt,konnte dieser Hemmeffekt weitgehend überwunden werden.

5. Für den Xyloseumsatz sind neben Xyloseisomerase und Xylulokinase, die Enzyme des nicht- oxidativen Pentose-Phosphat-Weges erforderlich. Die Bestimmung dieser Enzyme in *Z.mobilis* CP4 ergab, daß Ribose-5-Phosphat-Isomerase (1,6 U/mg), Ribulose-5-Phosphat-Epimerase (0,64 U/mg) und eine sehr niedrige Transketolase- Aktivität (1-2 mU/mg) vorhanden sind. Die Aktivität einer Transaldolase war nicht nachweisbar.

6. Die Einführung des *E.coli* Transketolase-Gens (tkt) in das Plasmid pZY225-XR4, vermittelte *Z.mobilis* CP4/ pZY228 eine spezifische Transketolase-Aktivität von 0,15 U/mg Protein. Die $xylAB^+$ tkt^+ rekombinanten Stämme setzten ^{14}C-[U] Xylose zu $^{14}CO_2$ um.Diese Umsetzung war, aufgrund der fehlenden/ oder limitierten Transaldolase-Aktivität, mit einer Akkumulation von etwa 9mM Sedoheptulose-7-Phosphat verbunden.
Durch die Expression der Gene für Xyloseisomerase, Xylulokinase und Transketolase in *Z.mobilis* CP4, ist die Etablierung eines katabolen Xylose-Stoffwechsels weitgehend gelungen.

VI. Literaturverzeichnis

Afendra, A.S., und C.Drainas. 1987. Expression and stability of a recombinant plasmid in *Zymomonas mobilis* and *Escherichia coli*. J.Gen.Microbiol.133: 127-134

Algar, E.M. und R.K. Scopes. 1985. Studies on cell-free metabolism: Ethanol production by extracts of *Zymomonas mobilis*. J. Biotechnol. 2: 275-287

Altenbuchner, J., K.Schmid, R.Schmitt. 1983.Tn1721-encoded tetracycline resistance: mapping of structural and regulatory genes mediating resistance. J.Bacteriol.153: 116-123

Alterthum, F. und L.Ingram. 1989. Efficient ethanol production from glucose,lactose and xylose by recombinant *Escherichia coli*. Appl. Environm. Microbiol. 55: 1943-1948

Amore, R. und C.P. Hollenberg. 1989. Xylose isomerase from *Actinoplanes missouriensis*: primary structure of the gene and the protein. Nucl.Acids Res.17: 7515

Amore, R., M. Wilhelm, C.P. Hollenberg. 1989. The fermentation of xylose- an analysis of the expression of *Bacillus* and *Actinoplanes* xylose isomerase genes in yeast. Appl.Microbiol.Biotechnol. 30: 351-357

Amore,R. 1990. Ansätze zur Entwicklung eines Xylose fermentierenden *Saccharomyces cerevisiae* Stammes: Analyse des Xylose-Isomerasegens aus *Actinoplanes missouriensis* und Xylose-Reduktasegens aus *Pichia stipitis* in der Bäckerhefe. Dissertation Universität Düsseldorf

Bachmann, B.J. und K.B. Low. 1980. Linkage map of *Escherichia coli* K-12. Microbiol.Rev. 44: 1-56

Barnell, W.O., K.Cheol Yi, T.Conway. 1990. Sequence and genetic organization of a *Zymomonas mobilis* gene cluster that encodes several enzymes of glucose metabolism. J.Bacteriol.172: 7227-7240

Batt, C.A., A.C.Jamieson, M.A.Vandeyar. 1990. Identification of essential histidine residues in the active site of *Escherichia coli* xylose (glucose) isomerase. Proc.Natl.Acad. Sci.USA 87: 618-622.

Batt, C.A., E. O'Neill, S.R. Novak, J. Ko und A. Sinskey. 1986. Hyperexpression of *Escherichia coli* xylose isomerase. Biotechnol. Progress 2: 140-144.

Batt, C.A., M.S.Bodis, S.K.Picataggio, M.C.Claps, S.Jamas, A.J. Sinskey. 1985. Analysis of xylose operon regulation by Mud (Ap^r, *lac*) fusion: trans effect of plasmid coded xylose operon. Can. J. Microbiol. 31: 930-933.

Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. Trends in Biotechnol. 3: 286-290

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

Boehringer Mannheim GmbH. 1984. Methoden der Lebensmittelanalytik

Börmann, E., B.Eikmanns, H.Sahm. 1991. Isolation, expression and molecular analysis of the *Corynebacterium glutamicum gdh* gene encoding glutamate dehydrogenase. eingereicht bei Mol.Gen. Genet.

Bolivar, F., R.L.Rodriguez, P.J.Greene, M.C.Betlach, H.L.Heynecker, H.W. Boyer, J.H.Crosa, S.Falkow. 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles.II. A multipurpose cloning system. Gene 2: 95-113

Boyer, H.W., und D. Roulland-Dussoix. 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 41:459-472.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.

Brestic-Goachet, N., P. Gunasekaran, B. Cami, J. Baratti. 1990. Transfer and expression of a *Bacillus licheniformis* a- amylase gene in *Zymomonas mobilis*. Arch. Microbiol. 153: 219-225

Brestic-Goachet,N., P.Gunasekaran, B.Cami, J.C.Baratti. 1989. Transfer and expression of an *Erwinia chrysanthemi* cellulase gene in *Zymomonas mobilis*. J.Gen.Microbiol.135: 893-902

Brickman, E., L.Soll, J.Beckwith.1973. Genetic characterization of mutations which affect catabolite-sensitive operons in *Escherichia coli*, including deletions of the gene for adenyl cyclase. J.Bacteriol. 116: 582-587

Briggs, K.A., W.E. Lancashire, B.S. Hartley.1984. Molecular cloning , DNA structure and expression of the *Escherichia coli* D-xylose isomerase. EMBO J.3: 611-616.

Bringer, S., H.Sahm, W.Swyzen. 1984. Ethanol production by *Zymomonas mobilis* and its application on an industrial scale. Biotechnol. Bioeng. Symp. 14: 311-319

Bringer, S., R.K. Finn, H. Sahm. 1984. Effects of oxygen on the metabolism of *Zymomonas mobilis*. Arch. Microbiol. 139: 376-381

Bringer-Meyer, S., K.-L.Schimz, H.Sahm. 1986. Pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. Isolation and partial characterization. Arch. Microbiol. 146: 105-110

Brosius, J., und A.Holy. 1984.Regulation of ribosomal RNA promotors with a synthetic lac operator. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81: 6929-6933

Bruinenberg,P.M., P.H.M.de Blot, J.P.van Duijken, W.A.Scheffers. 1983. The role of redox balance in the anaerobic fermentation of xylose by yeasts. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.18: 287-292

Buchholz, S.E., M.M. Dooley, D.E. Eveleigh. 1987. *Zymomonas*- an alcoholic endigma. TIBTECH 5: 199-203

Buchholz, S.E., M.M.Dooley, D.E.Eveleigh. 1989. Growth of *Zymomonas mobilis* on lactose: gene cloning in combination with mutagenesis. J. Industr. Microbiol. 4: 19-27

Byun, M.O.K., J.B.Kaper, L.O.Ingram. 1986. Construction of a vector for the expression of foreign genes in *Zymomonas mobilis*. J.Industr.Microbiol. 1: 9-15

Carey, V.C., S.K.Walia, L.O.Ingram. 1983. Expression of a lactose transposon (Tn951) in *Zymomonas mobilis*. 46: 1163-1168

Carrell, H.L., J.P.Glusker, V.Burger, F. Manfre, D.Tritsch, J-F. Biellmann.1989. X-ray analysis of D-xylose isomerase at 1.9 A: Native enzyme in complex with substrate and with a mechanism-designed inactivator. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 86: 4440-4444.

Cho, D.W., P.L.Rogers, S.F.Delaney. 1989. Construction of a shuttle vector for *Zymomonas mobilis*. Appl.Microbiol.Biotechnol. 32: 50-53

Collyer, C.A. und D.M. Blow. 1990. Observations of reaction intermediates and the mechanism of aldose-ketose interconversion by D-xylose isomerase. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87: 1362-1366.

Conway, T., M.O.-K.Byun, L.O.Ingram. 1987a. Expression vector for *Zymomonas mobilis*. Appl.Env.Microbiol. 53: 235-241

Conway, T., Y.A.Osman, J.I.Konnan, E.M.Hoffmann, L.O.Ingram. 1987b. Promotor and nucleotide sequences of the *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase. J.Bacteriol. 169: 949-954

Dauter, Z., M.Dauter, J.Hemker, H.Witzel, K.S.Wilson. 1989. Crystallization and preliminary analysis of glucose isomerase from *Streptomyces albus*. FEBS Letters 247: 1-8

David, J.D. und H. Wiesmeyer. 1970. Control of xylose metabolism in *Escherichia coli*. Biochim.Biophys.Acta 201: 497-499.

De Boer, H.A., L.J.Comstock, M.Vasser. 1983. The *tac* promotor: A functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promotors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 21-25

de Crombrugghe, B., S.Busby, H. Buc. 1984. Cyclic AMP receptor protein: Role in transcription activation. Science 224:831-838.

Dekker, K., H.Yamagata, K.Sakaguchi, S.Udaka.1991.Xylose (glucose) isomerase gene from the thermophile *Clostridium thermohydrosulfuricum*; Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli*. Agric.Biol.Chem. 55: 221-227.

DiMarco, A.A. und A.H. Romano. 1985. D-glucose transport system of *Zymomonas mobilis*. Appl. Environm. Microbiol.49: 151-157

Drocourt, D., S.Bejar, T.Calmels, J.P. Reynes, G. Tiraby. 1988. Nucleotide sequence of the xylose isomerase gene from *Streptomyces violaceoniger*. Nucl.Acids Res. 16: 9337.

Du Preez, J.C., M.Bosch, B.A.Prior.1986. Xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: effects of pH, temperature, and substrate concentration. Enzyme.Microbiol.Technol.8: 360-364

Entner, N. und M.Doudoroff.1952. Glucose and gluconic acid oxidation of *Pseudomonas saccharophila*. J.Biol.Chem. 196: 853-862

Eveleigh, D.E., H.W.Stokes, E.L.Dally.1983. Recombinant DNA approaches for enhancing the ethanol productivity of *Zymomonas mobilis*. In: Wise, D.L. (ed) Organic chemicals from biomass. The Benjamin/ Cummings Publishing Company, London: 70-91

Farber, G.K., A.Glasfeld, G.Tiraby, D.Rings, G.A.Petsko. 1989. Crystallographic studies on the mechanism of xylose isomerase. Biochemistry 28: 7289-7297

Fein, J.E., R.C.Charley, K.A. Hopkins, B. Lawers, H.G. Lawford. 1983. Development of a simple defined medium for continuous ethanol production by *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Lett. 5: 1-6

Feinberg, K. und R.Vogelstein. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specificity Anal. Biochem. 132: 6-13

Feldmann, S. 1988. Untersuchungen zur Ethanolbildung aus Xylose durch einen genetisch modifizierten Stamm von *Klebsiella planticola*. Diplomarbeit Universität Marburg

Feldmann,S., G.A.Sprenger, H.Sahm.1989. Ethanol production from xylose with a pyruvate-formate-lyase mutant of *Klebsiella planticola* carrying a pyruvate-decarboxylase gene from *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 31: 152-157

Figurski, D.H. und D.R.Helinski. 1979. Replication of an origin containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 1648-1652

Freidman, S.M.(ed).1978. In: Biochemistry of thermophily. Academic Press Inc., New York

Friedman, D.I., E.J. Olson, D. Carver, M. Gellert. 1984. Synergistic effect of *himA* and *gyrB* mutations: Evidence that Him functions control expression of *ilv* and *xyl* Genes. J.Bacteriol. 157: 484-489.

Gärtner, D., M.Geissendörfer, W. Hillen.1988. Expression of the *Bacillus subtilis xyl* operon is repressed at the level of transcription and is induced by xylose. J.Bacteriol. 170: 3102-3109.

Gibbs, M., und R.D. DeMoss. 1951. Ethanol formation in *Pseudomonas lindneri*. Arch.Biochem.Biophys. 34: 478-479

Glover,D.M.1985. DNA Cloning I,IRL Press, Oxford, Washington,DC

Gong,C.S., L.F.Chen, M.C.Flickinger, G.T.Tsao. 1981. Conversion of hemicellulose carbohydrates. Adv. Biochem. Engin. 20: 93-118

Goodman, A.E., A.T.Strzelecki, P.L.Rogers. 1984. Formation of ethanol from lactose by *Zymomonas mobilis*. J.Biotechnol.1:219-228

Grunstein, M. und D.S.Hogness. 1975. Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNA's that contain a specific gene. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 72: 3961-3965

Gunasekaran,P., T.Karunakaran, B.Cami, A.G.Mukundan, L.Preziosi, J.Baratti. 1990. Cloning and sequencing of the *sacA* gene:characterization of a sucrase from *Zymomonas mobilis*. J.Bacteriol. 172: 6727-6735

Gunasekera, A., Y.W.Ebright, und R.H.Ebright.1990.DNA-sequence recognition by CAP:role of the adenine N^6 atom of base pair 6 of the DNA site. Nucl.Acid.Res. 18: 6853-6856.

Hanahan, D. 1985. Techniques for transformation of *E.coli*. DNA Cloning Volume 1, ed. D.M.Glover, IRL Press Oxford,Washington DC

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

Henrick,K., C.A.Collyer, D.M. Blow.1989. Structures of D-xylose isomerase from *Arthrobacter* strain B3728 containing the inhibitors xylitol and D-sorbitol at 2.5 Å and 2.3Å resolution, respectively. J.Mol.Biol. 208: 129-157

Hoekema, A, R.A.Kastelein, M.Vasser, H.A. de Boer. 1987. Codon replacement in the PGK1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: Experimental approach to study the role of biased codon usage in gene expression. Mol.Cell.Biol.7: 2914-2924

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

Hohn,B. 1979. In vitro packaging of λ and cosmid DNA. Methods in Enzymology. 68: 299-309

Hollenberg, C.P. und M.Wilhelm.1987.New substrates for old organisms.In:Biotec.Vol.1.Gustav Fischer,Stuttgart, New York.21-31

Holm, L. 1986.Codon usage and gene expression. Nucl.Acids Res. 14: 3075-3087

Horecker, B.L. 1962. Pentose metabolism in bacteria. New York, N.Y., Wiley

Ikai,A. 1980. Thermostability and aliphatic index of globular proteins. J.Biochem. 88: 1895-1898

Ikemura, T. 1981. Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurence of the respective codons in protein genes. J.Mol.Biol. 151: 389-409

Ingram, L.O. und T. Conway.1988. Expression of different levels ethanologenic enzymes from *Zymomonas mobilis* in recombinant strains of *E.coli*. Appl.Environm.Microbiol. 54: 397-404

Jeffries, T.W. 1983. Utilization of xylose by bacteria, yeasts and fungi. Adv.Biochem.Engin.Biotechnol. 27: 1-32.

Josephson, B.L. und D.G.Fraenkel. 1969. Transketolase mutants of *Escherichia coli*. J.Bacteriol. 100: 1289-1295

Kersters,K. und J. DeLey. 1968. The occurence of the Entner-Doudoroff pathway in bacteria. Antonie van Leeuwenhoek. J.Microbiol.Serol. 31: 393-406

Khym, J.X., L.P.Zill.1951. The separation of monosaccharides by ion exchange. J.Amer. Chem. Soc.73: 2399-2400

Kirk,T. und H. M. Chang (eds). 1990. Biotechnology in pulp and paper manufacture. Applications and fundamental investigations. Butterworth-Heinemann

Klingenberg, M. und E. Pfaff. 1967. Means of terminating reactions. Meth. Enzymol. 10: 680-684

Kötter, P.1991. Xylose-Verwertung mit *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation Universität Düsseldorf.

Kreuzer, P., D.Gärtner, R.Allmansberger, W.Hillen. 1989. Identification and sequence analysis of the *Bacillus subtilis* W23 encoded *xyl*R gene and *xyl* operator. J.Bacteriol. 171: 3840-3845

Lawlis, V.B., M.S. Dennis, E.Y. Chen, D.H. Smith, D.J. Henner. 1984. Cloning and sequencing of the xylose isomerase and xylulose kinase genes of *Escherichia coli*. Appl.Environ.Microb. 47: 15-21.

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

Lee, C., M. Bagdasarian, M. Meng, J.G. Zeikus. 1990. Catalytic mechanism of xylose (glucose) isomerase from *Clostridium thermosulfurogenes*. J.Biol.Chem. 265: 10082-19090

Lejeune, A., D.E.Eveleigh, C.Colson. 1988. Expression of an endoglucanase gene of *Pseudomonas fluorescens va.cellulosa* in *Zymomonas mobilis*. FEMS Microbiol. Letters 49: 363-366

Lengeler, J. 1980. Characterization of mutants of *Escherichia coli* K12, selected by resistance to streptozotin. Mol. Gen.Genet. 179: 49-54

Lennox, E.S. 1955. Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. Virology 1: 190-206

Lindner, P. 1928. Atlas der mikroskopischen Grundlagen der Gärungskunde, 3rd.Edn.,Berlin, Tafel 28

Liu.C.-Q., A.E.Goodman, N.W.Dunn .1988. Expression of the cloned *Xanthomonas* D-xylose catabolic genes in *Zymomonas mobilis*. J.Biotechnol.7: 61-70

Low,B. 1968. Formation of merodiploids with a class of rec⁻ recipient strains of *Escherichia coli* K12. Proc.Natl.Acad.Sci. 60: 160-167

Mackenzie, K.F., T.Conway, H.C.Aldrich, L.O.Ingram. 1989. Expression of *Zymomonas mobilis adhB* (encoding alcohol dehydrogenaseII) and *adhB-lacZ* operon fusions in recombinant Z.*mobilis*. J.Bacteriol. 171: 4577-4582

Maleszka, R., P.Y. Wang, H. Schneider. 1982. A Col E1 hybrid plasmid containing *Escherichia coli* genes complementing D-xylose negative mutants of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Can.J.Biochem. 60: 144-151.

Mc Conkey, A. 1905. Lactose fermenting bacteria in faeces. J. Hyg. 5: 333-378

Mc Gill,D.J. und E.A.Dawes. 1971. Glucose and fructose metabolism in *Zymomonas anaerobia*. Biochem.J.125: 1059-1068

Meselson, M., und F.W.Stahl. 1958. The replication of DNA in *Escherichia coli*. Proc.Natl.Acad.Sci. 44: 671-682

Misawa, N. und K.Nakamura. 1989. Expression and stability of a β-glucosidase gene of *Ruminococcus albus* in *Zymomonas mobilis*. Agric.Biol.Chem. 53: 723-727

Misawa, N. und K.Nakamura.1989. Nucleotide sequence of the 2,7 kb plasmid of *Zymomonas mobilis* ATCC 10988.J.Biotechnol.12:63-70

Misawa, N., T.Okamoto, und K.Nakamura. 1988. Expression of a cellulase gene in *Zymomonas mobilis*. J.Biotechnol.7: 167-178

Morton,J., R.Lloubes, S.Varenne, M.Chartier, C.Lazdunski.1983. Complete nucleotide sequence of the structural gene for colicin A, a gene translated at a uniform rate. J.Mol.Biol.170: 271-285

Murray, N.E., W.J.Brammar, K.Murray. 1977. Lambdoid phages that simplify the recovery of in vitro recombinants. Mol.Gen.Genet. 150: 53-61

Neidhardt,F.C., J.L.Ingraham, M.Schaechter (eds.).1990. Physiology of the bacterial cell; a molecular approach. Sunderland Massachusetts

Neuberger, M.S., B.S.Hartley, J.E. Walker. 1981. Purification and properties of D-ribulokinase and D-xylulokinase from *Klebsiella aerogenes*. Biochem.J. 193: 513-524.

Orchard, L.M.D., und H.L.Kornberg. 1990. Sequence similarities between the gene specifying 1-phosphofructokinase (*fru*K), genes specifying other kinases in *Escherichia coli* K12, and *lac*C of *Staphylococcus* aureus. Proc.R.Soc.London B 242: 87-90

Osman,Y.A., T.Conway, S.J.Bonetti, L.O.Ingram. 1987. Glycolytic flux in *Zymomonas mobilis*: Enzyme and metabolic levels during batch fermentation. J.Bacteriol.169: 3726-3736

Postma, P.W., und J.W. Lengeler. 1985. Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems in bacteria. Microbiol.Rev. 49: 232-269.

Queen,C., L.J. Korn. 1984. A comprehensive sequence analysis program for the IBM personal computer. Nucl.Acids.Res.: 581-599

Reizer,A., J.Deutscher, M.H.Saier jr, J.Reizer. 1991. Analysis of gluconate (*gnt*) operon of *Bacillus subtilis*. Mol.Microbiol.5: 1081-1089.

Rey,F.,J.Jenkins, J.Janin, I.Lasters, P.Alard, M.Claessens, G. Matthyssens, S.Wodak.1988. Structural analysis of the 2.8Å model of xylose isomerase from *Actinoplanes missouriensis*. Proteins 4: 165-172

Reynen, M. und H.Sahm. 1988. Comparison of the structural genes for pyruvate decarboxylase in different *Zymomonas mobilis* strains. J.Bacteriol. 170: 3310-3313

Reynen, M., I.Reipen, H.Sahm, G.A. Sprenger. 1990. Construction of expression vectors for the gram negative bacterium *Zymomonas mobilis*. Mol.Gen.Gen. 223: 335-341

Rogers, P.L., K.J.Lee, M.L.Skotnicki, D.E.Tribe. 1982. Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. Adv.Biochem.Eng. 23: 27-84

Rosenberg, S.L. 1980. Fermentation of pentose sugars to ethanol and neutral products by microorganisms. Enzyme.Microb. Technol. 2: 185-193

Rosenberg,M., und D.Court. 1979. Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. Annu.Rev. Genet. 13: 319-353

Rosenfeld, S.A., P.E. Stevis, N.W.Y. Ho. 1984. Cloning and characterization of the *xyl* genes from *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. 194: 410-415.

Saari,G.C., A.A.Kumar, G.H.Kawasaki, M.Y.Insley, P.J. O'Hara. 1987. Sequence of the *Ampullariella* sp. strain 3876 gene coding for xylose isomerase. J.Bacteriol.169: 612-618

Sahm, H. 1979. Pflanzliche Rückstände als Substrate in der Biotechnologie. Forum Mikrobiologie 2: 177-182

Sambrook J., E.F.Fritsch, and T Maniatis. 1989. Molecular Cloning, a Laboratory Manual,CSH Laboratory,Cold Spring Harbor N.Y.

Sanger,F.,S.Nicklen,A.R.Coulson.1977. DNA Sequencing with chain termination inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467

Sanzey, B. 1979. Modulation of gene expression by drugs affecting deoxyribonucleic acid gyrase. J.Bacteriol.138: 40-47

Sarthy, A.V., B.L.McConough, Z.Lobo, J.A.Sundstrom, C.E.Furlong, B.D.Hall. 1987. Expression of the *Escherichia coli* xylose isomerase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl.Eur.Microbiol. 53: 1996-2000

Scangos, G.A. und A.M.Reiner. 1979. A unique pattern of toxic synthesis in pentitol catabolism: implications for evolution. J. Mol.Evol.12: 189-195

Schaaf,I.,S.Hohmann, F.K.Zimmermann.1990. Molecular analysis of structural gene for yeast transaldolase. Eur.J.Biochem. 188: 597-603

Schellenberg, G.D., A.Sarthy, A.E.Larson, M.P.Backer, J.W. Crabb, M.Lidstrom, B.D.Hall, C.E. Furlong .1984. Xylose isomerase from *Escherichia coli*. Characterization of the protein and the structural gene. J.Biol.Chem. 259: 6826-6832.

Scordaki, A., und C.Drainas.1987. Analysis of natural plasmids of *Zymomonas mobilis* ATCC10988. J.Gen.Microbiol. 133: 2547-2556

Scordaki, A. und C.Drainas. 1990. Analysis and stability of *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 plasmid pZMO3. eingereicht.

Senac,T. und B.Hahn-Hägerdal.1990.Intermediary metabolite concentrations in xylulose- and glucose- fermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. Appl.Environm.Microbiol. 56: 120-126

Shamanna, D.K., und K.E. Sanderson. 1979. Genetics and regulation of D-xylose utilization in *Salmonella typhimurium* LT2. J. Bacteriol. 139:71-79.

Shine, J., und L.Dalgarno. 1974. The 3'terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 71: 1342-1346

Simon,R., U.Priefer, A.Pühler.1983. Vector plasmids for in vivo and in vitro manipulations of gram-negative bacteria. In: Pühler, A.(ed) Molecular genetics of the bacteria- plant interaction. Springer Verlag, Berlin Heidelberg. 98-106

Simpson, F.J. 1966. D-Xylulokinase. Meth.Enzym..9: 454-458

Sizemore, C., E.Buchner, T.Rygus, C.Witke, F.Götz, W. Hillen. 1991. Organization, promotor analysis and transcriptional regulation of the *Staphylococcus xylosus* xylose utilization operon. im Druck.

Skotnicki, M.L., D.E.Tribe, P.L.Rogers.1980. R-plasmid transfer in *Zymomonas mobilis*. Appl.Env.Microbiol. 40: 7-12

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

Sprenger, G.A. und J.W. Lengeler. 1984. L-sorbose metabolism in *Klebsiella pneumoniae* and Sor^- derivatives of *Escherichia coli* K-12 and chemotaxis toward sorbose. J.Bacteriol. 157: 39-45.

Stevis, P.E., und N.W.Y. Ho .1987. Positive selection vectors based on xylose utilization suppression. Gene 55: 67-74.

Stevis, P.E., und N.W.Y.Ho. 1985. Overproduction of D-xylose isomerase in *Escherichia coli* by cloning the D-xylose isomerase gene. Enz.Microb.Technol. 7: 592-596.

Su, P.,S.F. Delaney, P.L.Rogers.1989. Cloning and expression of a β-glucosidase gene from *Xanthomonas albilineans* in *Escherichia coli* and *Zymomonas mobilis*. J.Biotechnol. 9: 139-152

Sutter, B. 1991. Biosynthèse isoprénique chez les procaryotes: un modèle innovateur *Zymomonas mobilis*. Dissertation L'université de Haute-Alsace

Swings, J. und J.DeLey. 1977. The biology of *Zymomonas*. Bacteriological.Rev. 41: 1-46

Tabor, S. und C.C.Richardson. 1987. DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. Proc. Natl. Acad.Sci. USA 84: 4767-4771

Tanaka, S., S.A. Lerner, E.C.C. Lin .1967. Replacement of a phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase by a nicotinamide adenine dinucleotide-linked dehydrogenase for the utilization of mannitol. J. Bacteriol. 93: 642-648.

Tchola, O., B.L.Horecker. 1966.Transaldolase.in: W.A.Wood (ed), Methods in Enzymology, Vol.IX, Academic Press, New York: 499-505

Tinoco, I., P.N.Borer, B.Dengeler, M.J.Levine, C.O.Uhlenbeck, D.M. Crothers, J.Gralla. 1973. Improved estimation of secondary structure in ribonucleic acids. Nature new Biol. 246: 40-41

Tiraby, G., S.Bejar, D.Drocourt, J.P.Reynes, P.J.Sicard, G.K. Farber, A.Glasfeld, D.Ringe, G.A. Petsko .1990. Genetic, enzymatic, and crystallographic studies of the glucose isomerases of two *Streptomyces* species.In: C.Hershberger (ed). Genetics of Industrial Microorganisms.

Tonomura, K., T. Okamoto, M.Yasui, H.Yanase. 1986. Shuttle vectors for *Zymomonas mobilis*. Agric.Biol.Chem. 50: 805-808

Tucker,M.Y., M.P.Tucker, M.E.Himmel, K.Grohmann, S.M.Lastick. 1988. Biotechnol.Lett.10: 79-84

Ubben,D. und R.Schmitt. 1986. Tn1721 derivatives for transposon mutagenesis, restriction mapping and nucleotide analysis. Gene 41: 145-152

Uhlenbusch,I., H.Sahm, G.A.Sprenger. 1991. Expression of an L-alanine dehydrogenase gene in *Zymomonas mobilis* and excretion of L-alanine. Appl. Environm. Microbiol.57: 1360-1366

Ullmann, A., und A. Danchin.1983. Role of cyclic AMP in bacteria. Adv.Cycl.Nucl.Res. 15: 1-53.

Valentin-Hansen, P., B.Holst, L.Sogaard-Andersen, J.Martinussen, J.Nesvera, S.R. Douthwaite .1991. Design of cAMP-CRP-activated promoters in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 5: 433-437.

Vangrysperre, W., J.van Damme, J.Vandekerckhove, C.K.De Bruyne, R. Cornelis, H.Kersters-Hilderson.1990. Localization of the essential histidine and carboxylate group in D-xylose isomerases. Biochem. J. 265: 699-705.

Vieira, J. und J.Messing. The pUC plasmids, and M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene 19: 259-268

Viikari,L. und M.Korhola. 1986. Fructose metabolism in *Zymomonas mobilis*. Appl.Microbiol.Biotechnol. 24: 471-476

Vogelstein, R und J. Gillespie. 1979. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 76: 615-619

Walker, M.J. und J.M.Pemberton. 1988. Construction of transposon encoding genes for β-glucosidase, amylase and polygalacturonate *trans*- eliminase from *Klebsiella oxytoca* and their expression in a range of gram-negative bacteria. Curr.Microbiol.17:69-75

Wilden, H. 1990. Untersuchungen zur Einführung rekombinanter Plasmide in das Bakterium *Z. mobilis*. Diplomarbeit Univ. Köln

Wilhelm, M. und C.P. Hollenberg. 1985. Nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis* xylose isomerase gene: extensive homology between the *Bacillus* and the *Escherichia coli* enzyme. Nucl.Acids Res. 13: 5717-5722

Wilhelm, M.und C.P.Hollenberg.1984.Selective cloning of *Bacillus subtilis* xylose isomerase and xylulokinases genes in *Escherichia coli* by IS5-mediated expression. EMBO J. 3: 2555-2560

Wilson, B.L. und R.P. Mortlock. 1973. Regulation of D-xylose and D-arabitol catabolism by *Aerobacter aerogenes*. J. Bacteriol. 113: 1404-1411.

Wood,T. 1970.Spectrophotometric assay for D-ribose-5-phosphate ketol-isomerase and for D-ribulose-5-phosphate-3-epimerase. Anal. Biochem. 33: 297-306

Wovcha, M.G., D.L. Steuerwald, K.E. Brooks. 1983. Amplification of D-xylose and D-glucose isomerase activities in *Escherichia coli* by gene cloning. Appl.Environm.Microbiol. 45: 1402-1404

Yamanaka, K. 1975. Xyloseisomerase. Meth.Enzym. 41: 588-593

Yanase,H., J.Kurii,K.Tonomura. 1988. Fermentation of lactose by *Zymomonas mobilis* carrying a lac^+ recombinant plasmid. J.Ferment. Technol. 66: 409-415

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie I des Forschungszentrums Jülich GmbH angefertigt.

Herrn Professor Dr.H. Sahm danke ich für die Überlassung des Themas, sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit und die großzügige Unterstützung.

Bei Herrn Professor Dr. C.P. Hollenberg bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr.G.A. Sprenger für seine ständige Diskussionsbereitschaft und Ratschläge, die diese Arbeit begleitet haben.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Biotechnologie I gilt mein Dank für die freundliche Aufnahme und stets gewährte Unterstützung und Hilfsbereitschaft. Hierbei möchte ich besonders Herrn Dr. B. Eikmanns und Herrn Dr. C.-L. Schimz für wertvolle Diskussionen danken, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH

KFA

Jül-2544
November 1991
ISSN 0366-0885