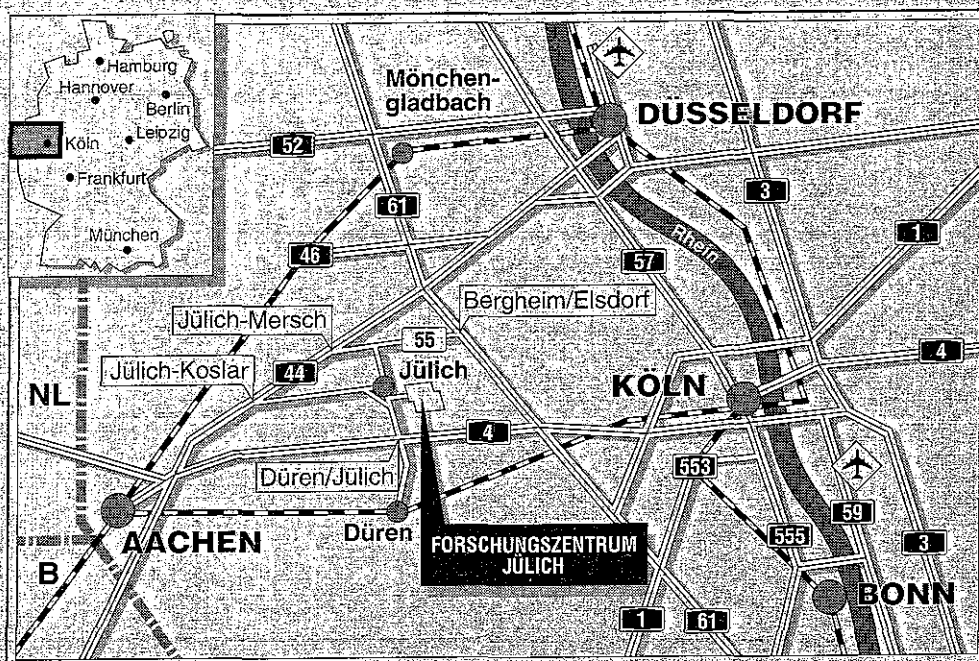


Institut für Biotechnologie

**Die Threonindehydratase aus
Corynebacterium glutamicum :
Aufhebung der allosterischen
Regulation und Struktur des Enzyms**

Bettina Möckel



Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 2906

ISSN 0944-2952

Institut für Biotechnologie Jül-2906

D 61 (Diss. Universität Düsseldorf)

Zu beziehen durch : Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

Telefon : 024 61 / 61 - 61 02 · Telefax : 024 61 / 61 - 61 03 · Telex : 833 556-70 kfa d

**Die Threonindehydratase aus
Corynebacterium glutamicum :
Aufhebung der allosterischen
Regulation und Struktur des Enzyms**

Bettina Möckel

**Die Threonindehydratase aus *Corynebacterium glutamicum*:
Aufhebung der allosterischen Regulation und
Struktur des Enzyms**

Die allosterisch regulierte Threonindehydratase ist das Schlüsselenzym der L-Isoleucinbiosynthese. Ziel dieser Arbeit war es, das Enzym aus *Corynebacterium glutamicum* und das entsprechende Gen zu charakterisieren und in der allosterischen Regulation veränderte Enzyme zu schaffen.

- In Substratsättigungskurven zeigt sich in Anwesenheit von Isoleucin ein Anstieg des Halbmaximalen Sättigungswertes ($K_{0,5}$) von 21 auf 78 mM. Die Kooperativität nimmt zu, was sich in einem Anstieg des Hill-Koeffizienten von 2,4 auf 3,7 ausdrückt.
- Das für die Threonindehydratase kodierende *ilvA* Gen liegt im Genom nicht zusammen mit *ilvB*, *ilvN* und *ilvC* vor. Aus der ermittelten Nukleotidsequenz des *ilvA* Gens läßt sich ein Polypeptid von 436 Aminosäuren ableiten. Vier Untereinheiten bilden das native Enzym. Dieses wurde isoliert und zur Herstellung polyklonaler Antikörper benutzt. Aus Vergleichen mit homologen Enzymen läßt sich herleiten, daß die Threonindehydratase in *C. glutamicum* aus einer katalytischen und einer regulatorischen Domäne besteht.
- Mit computergestützten Methoden wurde ein dreidimensionales Modell der Threonindehydratase durch "modelling by homology" erstellt. Dieses Modell zeigt, daß zwei die Domänen des Enzyms auch topologisch getrennt vorliegen.
- Neunzehn verschiedene Aminosäureaustausche wurden vorgenommen, bzw. mutierte Gene nach Selektion in einem biologischen System sequenziert. Dadurch wurde ein Spektrum veränderter Enzyme erhalten, die kinetisch charakterisiert wurden. Sie sind inaktiv, teilweise aktiv, partiell hemmbar oder nicht mehr hemmbar. Am auffälligsten ist der Austausch von Valin 323 gegen Alanin. Dieser führt zur vollständigen Aufhebung der allosterischen Hemmbarkeit durch Isoleucin, ohne daß die katalytische Aktivität beeinträchtigt ist. Die Lokalisierung der verschiedenen Mutationsorte im dreidimensionalen Modell zeigt, daß Aminosäureaustausche, die zu einer Aufhebung der allosterischen Regulation führen, bevorzugt an der Oberfläche des Polypeptids liegen.
- Eine Auswahl verschiedener *ilvA* Allele wurde in Threonin-Produktionsstämmen von *C. glutamicum* exprimiert. Durch Synthese des Enzyms mit dem Aminosäureaustausch Valin 323 gegen Alanin läßt sich bis zu 125 mM L-Isoleucin akkumulieren, ohne daß noch Threonin oder Threonin-Abbauprodukte nachweisbar sind.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	8
2.1	Organismen und Plasmide	8
2.2	Nährmedien und Kultivierungsbedingungen	10
2.2.1	Nährmedien	10
2.2.2	Kultivierungsbedingungen	10
2.2.3	Isolierung von feedback-resistenten Mutanten der Threonindehy- dratase	11
2.3	Aminosäurebestimmung	13
2.4	Herstellung von Rohextrakten	13
2.5	Proteinbestimmungen	14
2.6	Bestimmung von Enzymaktivitäten	14
2.7	Gelfiltration zur Molekulargewichtsbestimmung	16
2.8	Isolierung der Threonindehydratase	16
2.9	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	18
2.10	Gewinnung polyklonaler Antisera	18
2.11	Spezifische Detektion von Proteinen durch Western Blotting	19
2.12	Fluoreszenzspektroskopie	20
2.13	Allgemeine genetische Techniken	21
2.14	DNA:DNA-Hybridisierung	22
2.15	Synthese und Reinigung von Oligonukleotiden	24
2.15.1	Reinigung von Oligonukleotiden über NAP TM -Säulen	24
2.15.2	HPLC Reinigung von FITC-markierten Primern	25
2.16	Polymerase-Kettenreaktion	26
2.17	Ortsspezifische Mutagenese	28
2.18	Unspezifische Mutagenese	31
2.19	DNA-Sequenzierung	32
2.20	Computer-gestützte Sequenzanalyse	34
3	Ergebnisse	37
3.1	Charakterisierung des Threonindehydratase Gens <i>ilvA</i> und dessen Gen- produktes	37
3.1.1	Kinetische Analyse der Threonindehydratase	37
3.1.2	Sequenzierung des Gens	41
3.1.3	Untersuchungen zur Expression des <i>ilvA</i> Gens	45
3.1.4	Untersuchungen zur Lokalisierung des <i>ilvA</i> Gens im Genom	47
3.1.5	Bestimmung des nativen Molekulargewichtes der Threonindehy- dratase	49

3.1.6	Homologievergleich der Peptidsequenz	49
3.1.7	Isolierung der Threonindehydratase	53
3.1.8	Fluoreszenzemissionsspektroskopie	56
3.2	Ermittlung der Sekundär- und der Tertiärstruktur der Threonindehydratase	57
3.2.1	Sekundärstruktur	58
3.2.2	Modellierung der Tertiärstruktur der Threonindehydratase . . .	61
3.3	Herstellung deregulierter Threonindehydratase Mutanten	68
3.3.1	Herstellung von Mutanten durch ortsspezifische Mutagenese . .	68
3.3.2	Herstellung von Mutanten durch ungerichtete Mutagenese . . .	71
3.3.3	Genetische und biochemische Charakterisierung der mutierten Threonindehydratasen	72
3.3.4	Bestimmung der kinetischen Parameter der Enzyme	78
3.3.5	Computeranalyse der Aminosäureaustausche	84
3.4	Versuche zur Isoleucinproduktion mit deregulierter Threonindehydratase	88
4	Diskussion	91
4.1	Kinetische Eigenschaften der Threonindehydratase	91
4.2	Sequenzanalyse und Homologievergleich	93
4.3	Sekundär- und Tertiärstruktur der Threonindehydratase	96
4.4	Charakterisierung der Mutationen	99
4.5	Einfluß deregulierter Threonindehydratasen auf die Isoleucin-Produktion	102
5	Zusammenfassung	105
6	Literaturverzeichnis	106
7	Anhang	124

Abkürzungen:

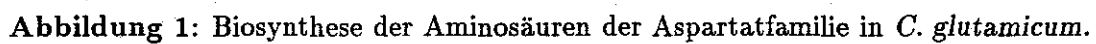
a	Jahr
AHAS	Acetohydroxysäuresynthase
A.L.F.	Automated Laser Fluoreszenz
Amp ^r	Ampicillinresistenz
ANS	1-Anilinonaphtalen-8-sulfonat
APS	Ammoniumperoxidisulfat
ATP	Adenosin-tri-phosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Celsius
Cg	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
Cm	Chloramphenicol
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FBR	feedback-resistant
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
h	Stunden
hom	Homoserindehydrogenase
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
Ile	Isoleucin
ilvA	Threonindehydratase
ilvBN	Acetohydroxysäuresynthase
ilvC	Isomeroreductase
ilvD	Dihydroxysäuresynthase
ilvE	Transaminase B
IPTG	Iso-Propyl-Thio-Galaktosid
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
Kn ^r	Kanamycinresistenz
kb	Kilobasen
l	Liter
lacZ	Strukturgen für β -Galactosidase
lacZ'	Strukturgen für α -Peptid der β -Galactosidase
Leu	Leucin
lysC	Aspartatkinase

M	Mol
MCS	multiple cloning site
min	Minute
MM	Minimalmedium
mM	Millimol
NADH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsals
nm	Nanometer
NTA	Nitrilo-Tri-Acetat
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
ORF	Open Reading Frame
PALP	Pyridoxal 5'-Phosphat
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
SSC	"sodium-sodium-citrate"
t/a	Jahres-Tonnen
TAE	Tris Acetat EDTA
TBE	Tris Borat EDTA
TE	Tris EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
tet ^r	Tetracyclinresistenz
thrC	Threoninsynthase
thrB	Homoserinkinase
Tris	2-Amino-Hydroxymethylpropan-1,3-diol
U	Unit, Enzymeinheiten
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
Val	Valin
VM	Vollmedium
V _{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
X-Gal	5-Bromo-4-chlor-3-indolyl- β -galactopyranosid
X-Phosphat	5-Bromo-4-chlor-2-indoylphosphat

1 Einleitung

Die Gram⁺ *Corynebacteria* werden industriell bei einer Reihe von unterschiedlichen biotechnologischen Prozessen eingesetzt: der Biokonversion von Steroiden (Constantinides, 1980; Leuenberger & Kieslich, 1987), der Produktion von Äpfelsäure aus Fumarsäure (Takata *et al.*, 1979) und in der Käseherstellung (Lee *et al.*, 1985; Teuber *et al.*, 1987). Bedeutung haben sie vor allem bei den fermentativen Verfahren zur Produktion von Nukleotiden gewonnen, die primär als Geschmacksverstärker in der Lebensmittelindustrie von Interesse sind (Crueger & Crueger, 1989). Der wichtigste Aspekt der industriellen Anwendung der Corynebakterien ist die fermentative Herstellung von L-Aminosäuren. So wird *Corynebacterium glutamicum* und seine Subspezies *flavum* und *lactofermentum* (Liebl *et al.*, 1991) seit seiner Entdeckung als L-Glutamat ausscheidendes Bakterium durch Kinoshita (1957) zur Produktion von L-Glutamat benutzt. Ebenso wird L-Lysin mit diesem Bakterium produziert. Zur Zeit werden weltweit 350.000 t/a L-Glutamat und 180.000 t/a L-Lysin mit *C. glutamicum* hergestellt (Leuchtenberger, 1993, persönliche Mitteilung), wobei L-Glutamat hauptsächlich als Geschmacksverstärker und L-Lysin als Futtermitteladditiv Verwendung findet (Crueger & Crueger, 1989; Hoppe & Martens, 1984). Neben L-Glutamat und L-Lysin sind auch die essentiellen Aminosäuren L-Methionin, L-Threonin, L-Isoleucin, L-Valin, L-Leucin, und L-Tryptophan, L-Tyrosin und L-Phenylalanin biotechnologisch interessant. L-Isoleucin findet Verwendung als Ergänzung von diätischen Nahrungsmitteln und als Zusatz in Infusionslösungen (Kleemann *et al.*, 1985). Obwohl L-Isoleucin, wie alle Aminosäuren, prinzipiell durch chemische Synthesen zugänglich ist, ist dieses Verfahren nicht kostengünstig, da auf diesem Wege ein Gemisch der vier Stereoisomere entsteht, aus dem das biogene L-Isoleucin isoliert werden muß. Auch die Gewinnung von L-Isoleucin aus Proteinhydrolysaten ist insbesondere wegen der Trennung der drei verzweigtkettigen Aminosäuren L-Isoleucin, L-Leucin und L-Valin im technischen Maßstab problematisch (Bitar *et al.*, 1987). Deswegen ist die Fermentation die Methode der Wahl zur selektiven Synthese der biologisch aktiven L-Form des Isoleucins.

Die Biosynthese von L-Isoleucin erfolgt in *C. glutamicum* ausgehend von L-Aspartat über die in Abbildung 1 dargestellten Reaktionsschritte innerhalb der Biosynthese der Aminosäuren der Aspartatfamilie. Eine Schlüsselrolle spielt dabei die Aspartatkinase, die in *C. glutamicum* konzertiert durch L-Threonin und L-Lysin gehemmt wird (Shiio & Miyajima, 1969). Sie reguliert die Verfügbarkeit dieser Aminosäuren innerhalb der zwei Hauptäste der Aspartatfamilie. Um Aspartatsemialdehyd konkurrieren im Biosyntheseweg die Dihydrodipicolinatsynthase und die Homoserindehydrogenase. Die Homoserindehydrogenase wird durch L-Threonin inhibiert (Miyajima & Shiio, 1970) und das entsprechende Gen durch L-Methionin reprimiert (Miyajima & Shiio, 1971). Der eigentliche L-Isoleucin-Biosyntheseweg beginnt mit der durch die Threonindehydratase (EC 4.2.1.16) katalysierten Reaktion, in der L-Threonin in einer Pyridoxal-



phosphat abhängigen Dehydrierung / Desaminierung zu α -Ketobutyrat, Ammonium und Wasser umgesetzt wird. Dabei ist die Threonindehydratase das einzige für die Isoleucinsynthese spezifische Enzym, da alle weiteren Enzyme ebenfalls an der Synthese von L-Valin und letztlich auch L-Leucin beteiligt sind. Folglich ist die Threonindehydratase ein besonders wichtiges Regulationselement bei der L-Isoleucin-Bildung (Umbarger, 1987). Ihre Aktivität wird in allen bisher untersuchten Organismen durch das Endprodukt L-Isoleucin gehemmt. Das Produkt der Reaktion der Threonindehydratase (α -Ketobutyrat) wird durch die Acetohydroxysäuresynthase weiter umgesetzt. Dieses Enzym wird durch alle drei verzweigtkettigen Aminosäuren feedback gehemmt und unterliegt der Repression durch L-Leucin (Eggeling *et al.*, 1987). Die bestehenden Regulationsmechanismen gewährleisten, daß im Wildtyp von *C. glutamicum* die Biosynthese von L-Isoleucin auf Mengen begrenzt ist, die die Zelle zum Wachstum benötigt. Diese Kontrollmechanismen müssen also ausgeschaltet werden, damit L-Isoleucin im Übermaß gebildet und ausgeschieden werden kann.

Deswegen wurde auch bei den bisher angewendeten Verfahren zur L-Isoleucin-Bildung von Vorstufen wie Hydroxybutyrat, α -Aminobutyrat, Chloro- und Bromobutyrat und α -Ketobutyrat (Nakayama & Hagino, 1972; Updike & Calton, 1982; Scheer *et al.*, 1987; Terasawa *et al.*, 1991) ausgegangen. Diese Vorstufen werden in den Isoleucin-Syntheseweg nach der Threonindehydratase eingespeist, um die effektive Regulation dieses Enzyms sowie die Regulation der Aspartatkinase und Homoserindehydrogenase zu umgehen, so daß der Precursor in wenigen Schritten zum L-Isoleucin umgesetzt werden kann. Mit Hilfe dieses Verfahrens konnten mit *C. glutamicum* bisher bis zu 19 g/l L-Isoleucin aus α -Ketobutyrat (Eggeling *et al.*, 1987) hergestellt werden. Nachteil dieser Verfahren ist allerdings der Einsatz der teuren Vorstufen. Es wurde deswegen auch versucht, durch unspezifische Mutagenese und Selektion von Stämmen mit Resistenz gegenüber Aminosäureanaloga eine L-Isoleucin-Bildung direkt aus Glukose zu erreichen. So gelang es, ausgehend von einem Threonin-Produzenten von *C. glutamicum* ssp *flavum*, durch wiederholte Mutagenese und Selektion auf Ethioninresistenz einen Stamm zu isolieren, der bis zu 20,1 g/Liter L-Isoleucin in das Kulturmedium ausscheidet (Ikeda *et al.*, 1976). In diesem Stamm ist die Aktivität der Threonindehydratase um den Faktor 24 gegenüber dem Ausgangsstamm erniedrigt, jedoch feedback-resistent gegenüber der Hemmung durch L-Isoleucin. Auf ähnlichem Wege wurden α -Amino- β -hydroxyvalerat-resistente *C. glutamicum* Mutanten als Ausgangspunkt für die Isolierung von 2-Ketomalonat oder Methyllysin resitenter Stämmen verwendet, die 16 – 17 g/l L-Isoleucin akkumulieren (Tsuchida *et al.*, 1985). Durch die Kombination der Eigenschaften von Analoga-resistenten Lysin- und Isoleucin-Produzenten durch Protoplastenfusion wurden ebenfalls Steigerungen der L-Isoleucin-Produktion erzielt (Furukawa *et al.*, 1988). Diese Stämme akkumulieren bis zu 12,1 g/l L-Isoleucin im Kulturmedium. Entscheidend für die Steigerung der Ausbeute ist in diesem Fall die Übertragung einer feedback-resistenten Aspartatkinase auf den Isoleucin-Produzenten, die eine erhöhte Kapazität für die Bereitstellung des Intermediats Aspartatsemialdehyd

vermittelt.

Die in jüngster Zeit entwickelten Techniken zu genetischen Arbeiten mit *C. glutamicum* erlauben gezielte Eingriffe in die Stoffwechselwege durch Vektoren und Transformationsmethoden (Yoshihama *et al.*, 1985; Martin, 1989; Liebl *et al.*, 1989; Schäfer *et al.*, 1990). Durch die Kombination solcher gentechnischen Methoden und physiologischen Untersuchungen können heute diejenigen Eigenschaften identifiziert werden, die einen Produktionsstamm auszeichnen, bzw. es können durch gezielte Eingriffe in den Stoffwechsel leistungsfähigere Stämme hergestellt werden. So wurde als wichtigstes Kontrollelement der L-Lysin-Biosynthese die Aspartatkinase identifiziert und das Wildtyp Aspartatkinase-Gen *lysC* sowie ein feedback-resistentes Allel *lysC^{FBR}* kloniert und sequenziert (Cremer, 1989; Kalinowski *et al.*, 1990; 1991). Damit konnte durch Integration (Bröer *et al.*, 1993) oder Überexpression (Cremer *et al.*, 1991) des feedback-resistenten Gens ein definierter Lysinausscheider hergestellt werden. L-Threonin oder L-Isoleucin wird mit solchen oder klassisch gewonnen L-Lysin-Ausscheidern nicht gebildet (Schrumpf, 1991; Reinscheid *et al.*, 1993).

Erst die erfolgte molekulare Analyse der Homoserindehydrogenase (*hom*), der Threoninkinase (*thrB*) und der Threoninsynthase (*thrC*) (Follettie *et al.*, 1988; Peoples *et al.*, 1988; Han *et al.*, 1990) ermöglichte systematische Untersuchungen dazu, wie der gesteigerte Fluß in Richtung L-Threonin möglich ist: Die Expression des *hom-thrB* Operons und von *thrC* im *C. glutamicum* Wildtyp ATCC 13032 haben keinen Einfluß auf die L-Threonin-Ausbeute (Eikmanns *et al.*, 1991a). Eine wesentlich gesteigerte L-Threonin-Ausscheidung wird allerdings erst mit einer feedback-resistenten Homoserindehydrogenase *hom^{FBR}* in einem Stamm mit gleichzeitig feedback-resistenter Aspartatkinase *lysC^{FBR}* erreicht (Reinscheid *et al.*, 1991; 1993). Diese Experimente waren nur mit Vektoren durchführbar, die in niedriger Kopienzahl in *C. glutamicum* vorliegen, bzw. unter Ausnutzung der Integrationstechnik möglich, da es offensichtlich zu einer massiven Veränderung des Zellstoffwechsels kommt. Bei Ausscheidung von 70 mM Threonin wird auch Homoserin und Glycin ausgeschieden. Vor allem wird aber auch 100 mM L-Threonin sowie 74 mM Homoserin zellintern akkumuliert. Dies bedeutet, daß jetzt ein Stamm zur Verfügung steht, der bereits große Mengen der L-Isoleucin-Vorstufe L-Threonin synthetisiert. Die cytosolische Konzentration von L-Isoleucin beträgt nur 7 mM. Folglich müssen alle Anstrengungen auf die Gewinnung einer feedback-resistenten Threonindehydratase ausgerichtet sein. Für die Reaktionsschritte, die auf die Threonindehydratase im Biosyntheseweg folgen, liegen bereits detaillierte genetische und physiologische Untersuchungen vor: Die Gene der Acetohydroxysäuresynthase und Isomeroxydase (*ilvBNC*) bilden ein Operon, dessen Transkription komplex reguliert wird (Keilhauer *et al.*, 1993). Da durch L-Leucin-Limitation eine gesteigerte Acetohydroxysäure Synthese erreicht werden kann, ist die Einführung einer Leucin-Auxotrophie und Kultivierung unter Mangelbedingungen eine einfache Methode, um die Limitation der Acetohydroxysäuresynthase aufzuheben (Scheer *et al.*, 1987). Da bei Einsatz von

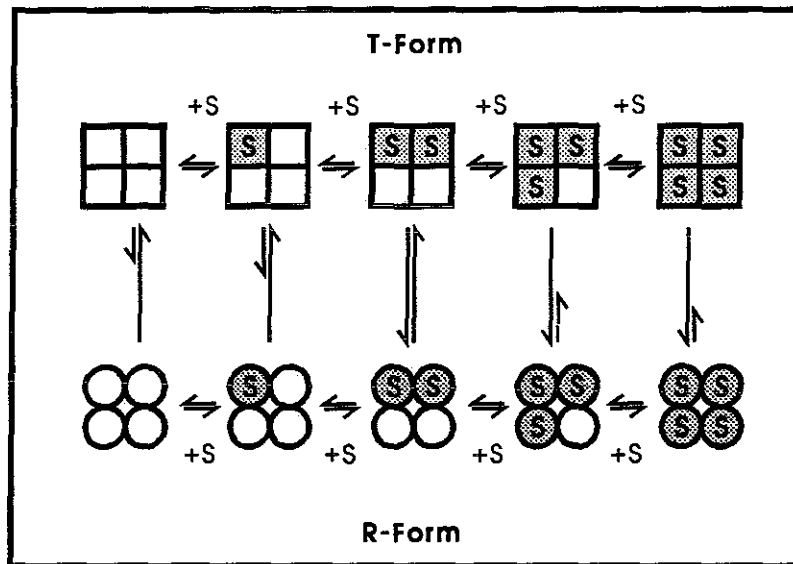


Abbildung 2: Alles- oder Nichts-Konformationsübergänge eines tetrameren Enzyms im MWC-Modell. Quadrate und Kreise stehen für den T- bzw. R-Zustand der Protomeren.

Hydroxybutyrat als Vorstufe die direkte Isoleucin-Vorstufe 2-Keto-3-methylvalerat ausgeschieden wird (Wilhelm *et al.*, 1989), ist zu schließen, daß bei erhöhtem Fluß über den Biosyntheseweg der Export des L-Isoleucins limitierend wirkt. Dafür sprechen ebenfalls die Untersuchungen zum Export des L-Isoleucins, der sowohl durch einen aktiven Efflux-Carrier (Ebbighausen *et al.*, 1989a; 1989b) als auch durch passive Diffusion erfolgt (Zittrich, 1992).

Die Tatsache, daß eine Hemmung der Threonindehydratase Aktivität durch Isoleucin erfolgt, wurde erstmals durch Umbarger beschrieben. (Umbarger & Brown, 1956; Umbarger, 1992). Changeux konnte zeigen, daß Katalyse und Regulation des Proteins allosterisch (= an anderen Orten) erfolgen (Changeux, 1961; 1963). Aus weiteren Untersuchungen ging dann das "allosteric transition Modell" hervor (Monod *et al.* 1963; 1965). Dieses Modell beschreibt Enzyme, die aus mindestens zwei identischen Untereinheiten (sogenannten Protomeren) bestehen und besagt, daß das Enzym in zwei Formen vorliegen kann (Abbildung 2). Die R-Form (*relaxed*) hat hohe Affinität zum Substrat, die T-Form (*tense*) geringe. Das grundlegende Postulat des Modells ist, daß alle Untereinheiten eines Enzymmoleküls entweder in der einen oder der anderen Form vorliegen. Bereits die Bindung eines Substratmoleküls an eine der vier Untereinheiten der Threonindehydratase überführt alle vier Untereinheiten in die R-Form. Ebenso überführt die Bindung eines Effektormoleküls (Isoleucin) das Enzym vollständig in die T-Form. Dieses Alles- oder Nichts-Prinzip beinhaltet die kooperative Wechselwirkung

der Untereinheiten. Es äußert sich in einem sigmoiden Kurvenverlauf der Substratsättigungskurven im Gegensatz zum hyperbolischen Verlauf im Falle einer Regulation nach Michaelis-Menten. Die Vorstellungen des Modells sind kürzlich durch Röntgenstrukturanalysen einiger Enzyme direkt sichtbar gemacht worden. Die Vergleiche der R- und T-Strukturen von Hämoglobin (Perutz, 1990) und Aspartat-Transcarbamoylase aus *E. coli* (Kantrowitz & Lipscomb, 1988; 1990), Glycogenphosphorylase aus Kaninchenmuskel (Barford & Johnson, 1989) und Phosphofructokinase aus *Bacillus stearothermophilus* (Schirmer & Evans, 1990) und *E. coli* (Shikahara & Evans, 1988) haben gezeigt, daß diese Änderungen primär Rotationen der Untereinheiten mit geringfügigen Translationen umfassen, wobei die Symmetrie und die individuellen Sekundärstrukturen der Protomere weitgehend erhalten bleiben (Lipscomb, 1991). Dabei werden die beiden Konformationen T und R in allen Proteinen durch einen unterschiedlichen Satz an Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Untereinheiten stabilisiert. Während der Änderung der Konformation werden die Wechselwirkungen, die den T-Zustand stabilisieren, gebrochen und durch Wechselwirkungen, die den R Status stabilisieren, ersetzt. Um die Bedeutung dieser Wechselwirkungen und die Vermittlung der allosterischen Transition zwischen den Untereinheiten zu untersuchen, wurden ortsspezifische Mutagenesen der korrespondierenden Gene und die biochemischen Analysen der erstellten Mutanten durchgeführt (Perutz, 1990).

Für die Threonindehydratase liegen jedoch Untersuchungen zur räumlichen Struktur nicht vor. Es ist nur bekannt, daß in allen bisher beschriebenen Threonindehydratasen Isoleucin der negative allosterische Effektor ist. Es ist bisher nichts über die Art der Bindung der Liganden bekannt und über den Mechanismus, durch den die Liganden eine Änderung der Enzymstruktur hervorrufen, die eine Verschiebung der Substratbindung bewirken. Die Threonindehydratasen sind Tetramere mit identischen Untereinheiten, wie für die Enzyme aus *Salmonella typhimurium* (Burns & Zarlengo *et al.*, 1968), *Escherichia coli* (Calhoun *et al.*, 1973), *Bacillus subtilis* (Hatfield & Umbarger, 1970b; 1971), *Lycopersicon esculentum* (Samach *et al.*, 1991) und *Saccharomyces cerevisiae* (Ahmed *et al.*, 1976) gezeigt wurde. Bisher wurden die Gene der Threonindehydratasen aus *E. coli* (Cox *et al.*, 1987; Lawther *et al.*, 1987), *S. typhimurium*, *B. subtilis* (Armpriester & Fink, 1991, nicht veröffentlicht), *Lactococcus lactis* (Gordon *et al.*, 1992) und der Eukaryonten *S. cerevisiae* (Kielland-Brandt *et al.*, 1984) und *Lycopersicon esculentum* (Samach *et al.*, 1991) sequenziert und aus der DNA-Sequenz die Aminosäureabfolge des Polypeptids abgeleitet. Eine Reihe von verschiedenen Selektionsverfahren wurde angewendet, um Threonindehydratase Mutanten zu isolieren, die eine veränderte Antwort auf die L-Isoleucin-Hemmung zeigen (Betz *et al.*, 1971; Vonder Haar & Umbarger, 1972; Kisumi *et al.*, 1971). Bisher sind lediglich die Sequenzen zweier *E. coli* Mutanten bekannt (Taillon *et al.*, 1988), wovon eine Mutante pH-abhängige Resistenz gegenüber der Hemmung durch L-Isoleucin zeigt (Pledger & Umbarger, 1973; Calhoun *et al.*, 1974) und die andere einen feedback-hypersensitiven Phänotyp aufweist (Rogerson & Freundlich, 1970; Calhoun, 1976). Diese Mutationen

sind im carboxy-terminalen Teil des Enzyms lokalisiert (Taillon *et al.*, 1988). Interessanterweise sind in *Echerichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* Threonindehydratasen bekannt, deren Aktivität nicht durch L-Isoleucin kontrolliert wird, da diese Enzyme zum Katabolismus von L-Threonin dienen (Goss & Datta, 1985; Bornæs *et al.*, 1992). Diesen Enzymen fehlt der carboxy-terminale Bereich, der dem der anabolen durch Isoleucin kontrollierten Enzymen entspräche (Datta *et al.*, 1987). Es wurde daher spekuliert, daß der carboxy-terminale Teil der durch L-Isoleucin regulierten Threonindehydratasen an der Bindung des Effektors L-Isoleucin oder für die Wechselwirkung der Untereinheiten untereinander beteiligt ist (Taillon *et al.*, 1988; Möckel *et al.*, 1992).

Ziel dieser Arbeit war es, Threonindehydratasen aus *Corynebacterium glutamicum* mit veränderter allosterischer Kontrolle zu erzeugen. Dazu sollte das Enzym zunächst biochemisch charakterisiert werden und die DNA-Sequenz ermittelt werden. Die daraus abgeleitete Aminosäure-Sequenz sollte dazu dienen, ein dreidimensionales Modell der Threonindehydratase zu erstellen, um gezielt Mutationen vorzunehmen zu können. Ferner sollte zusätzlich ein biologisches Selektionssystem zur Gewinnung allosterisch veränderter Mutanten aufgebaut werden. Die Kollektion gewonnener Enzyme sollte bezüglich ihrer allosterischen Eigenschaften charakterisiert und schließlich auf Eignung für gesteigerte L-Isoleucin-Bildung mit *C. glutamicum* geprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Organismen und Plasmide

In der vorliegenden Arbeit wurden *E. coli* und *C. glutamicum* Stämme verwendet, deren Eigenschaften in den Tabellen 1 und 2 zusammengefaßt sind. Tabelle 3 erklärt die Eigenschaften der verwendeten Plasmide.

Tabelle 1: Verwendete *C. glutamicum* Stämme und ihre Eigenschaften

Stamm	Eigenschaften	Referenz
ATCC 13032	Wildtyp	Abe <i>et al.</i> , 1967
R163	Restriktionsdefekt	Liebl <i>et al.</i> , 1989
MH20-22B	Lysinproduzent, <i>lysC^{FBR}</i> , <i>leuD⁻</i> ,	Menkel <i>et al.</i> , 1989
MH20-22B:DR3[2]	aus MH20-22B entwickelter Threoninproduzent, zusätzlich Homoserindehydrogenase (<i>hom^{FBR}</i> feedback-resistent) und Threoninkinase (<i>thrB</i>) zweifach im Genom integriert, Km ^r	Reinscheid <i>et al.</i> , 1993
MH20-22B:DR17[3]	wie MH20-22B:DR3[2] aus MH20-22B entwickelter Threoninproduzent jedoch <i>hom^{FBR}-thrB</i> dreifach im Genom integriert, Km ^r	Reinscheid <i>et al.</i> , 1993

Tabelle 2: Verwendete *E. coli* Stämme und ihre chromosomalen Marker nach Bachmann et al., (1983)

Stamm	Genotyp / Phänotyp	Referenz
DH 5	<i>supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i>	Meselson & Yuan, 1968
Cu 406	<i>F⁻, ilv A 454, gal T 12, λ⁻</i>	Smith et al., 1976
JM109	<i>recA1, supE44, endA1, hsdR17, gyrA96, relA1, thi, Δ(lac-proAB) F['][traD36, proAB⁺, lacI^f, lacZ ΔM15]</i>	Yanish-Perron et al., 1985

Tabelle 3: Verwendete Plasmide, ihre Eigenschaften und Marker

Plasmid	Größe	Marker / Eigenschaft	Referenz / Herkunft
pUC18, 19	2,7 kb	Amp ^r , PlacZ, lacZ', Klonierungs- und Expressionsvektor	Vieira & Messing, 1982
pTTQ19	3,6 kb	Amp ^r , Ptac, Expressionsvektor	Stark et al., 1987
pQE30	3,5 kb	Amp ^r , Chl ^r , PT5, Operatorlac, 6 x Histidin Markierungsvektor	Stüber et al., 1990a
pEU1	6,6 kb	3,0 kb Insert mit <i>ilvA^{FBR}</i> aus <i>E. coli</i> in pTTQ19	Umbarger, pers.
pCC2-42	10,2 kb	7,5 kb Insert mit <i>ilvBNC</i> aus <i>C. glutamicum</i> in pBR322	Cordes et al., 1992
pJC1	6,0 kb	Km ^r , high-copy Vektor	Cremer et al., 1988
pEKEx2	7,2 kb	Km ^r , Ptac, Expressionsvektor	Eikmanns et al., 1991b
pKW0	9,5 kb	Tet ^r , low-copy Vektor	Kronmeyer, pers.
pECM3	9,3 kb	Cm ^r , high-copy Vektor	Schäfer, pers.

2.2 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

2.2.1 Nährmedien

Nährmedien für *C. glutamicum*

Bei der Kultivierung der *C. glutamicum* Stämme wurden die Vorkulturen in C.g.III Medium angezogen (Eggeling *et al.*, 1987). Zur Bestimmung der L-Isoleucin Konzentrationen im Kulturmedium, wurden das Minimalmedium C.g.X. (Menkel *et al.*, 1989) und das Minimalmedium C.g.XII (Schrumpf, 1991) und Medium 22B (Schrumpf, 1991) verwendet. Für die Herstellung von Minimalmedien Platten wurde C.g.IX Medium eingesetzt (modifiziert nach Kase und Nakayama, 1972). Nach der Elektroporation wurden *C. glutamicum* Zellen auf Regenerationsagar LBHIS modifiziert nach Liebl *et al.* (1989) ausplattiert.

Nährmedien für *E. coli*:

Zur Kultivierung der *E. coli* Stämme wurde das Vollmedium LB nach (Sambrook *et al.*, 1989) verwendet. Bei der Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte die Anzucht in Vollmedium SOB (Hanahan, 1985). Nach der Transformation wurden die Zellen in Regenerationsmedium SOC (Hanahan, 1985) aufgenommen. Als Minimalmedien für *E. coli* wurden das Minimalmedium M9 nach Tanaka *et al.* (1967) und YNB Medium (Tanaka *et al.*, 1967) eingesetzt.

Zur Selektion auf Antibiotika-Resistenz bei rekombinanten Stämmen, wurden Antibiotika nach dem Autoklavieren zu dem auf 60°C abgekühlten Medium (VM: Komplexmedium, MM: Minimalmedium) in folgenden Konzentrationen zugesetzt:

Organismus	Antibiotikum	VM / MM µg/ml	LBHIS µg/ml
<i>E. coli</i>	Ampicillin	60	
<i>E. coli</i>	Kanamycin	50	
<i>E. coli</i>	Chloramphenicol	50	
<i>E. coli</i>	Tetracyclin	15	
<i>C. glutamicum</i>	Kanamycin	25	15
<i>C. glutamicum</i>	Chloramphenicol	15	10
<i>C. glutamicum</i>	Tetracyclin	5	3

2.2.2 Kultivierungsbedingungen

Die Kultivierung von *C. glutamicum* Stämmen erfolgte in 500 ml Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen. Die Füllmenge betrug 100 ml Nährmedium. Es wurden

Vorkulturen (Medium C.g.III) von frisch angelegten Agarplatten angeimpft und bei 30°C auf einer Rotationsschüttelmaschine bei 160 Upm 16 h inkubiert. Von diesen Kulturen wurden 10 ml geerntet, das Pellet wurde in 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen und in Aqua dest. aufgenommen. Mit dieser Zellsuspension wurde das Minimalmedium in der optischen Dichte 1 angeimpft und unter den gleichen Bedingungen wie die Vorkultur inkubiert. Für die Induktion der *tac*-Promotoraktivität bei rekombinanten Stämmen wurde eine 50 ml Kultur in C.g.III Medium bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 2 bei 30°C geschüttelt, anschließend 2 mM IPTG (Endkonzentration) zugesetzt und 1 h inkubiert.

E. coli Stämme wurden in 50 ml LB Medium bei 37°C in 500 ml Erlenmeyerkolben auf einer Rotationsschüttelmaschine bei 160 Upm kultiviert. Für die Induktion der *lacZ*-Promotoraktivität, bei rekombinanten Stämmen mit entsprechenden Plasmiden, wurden die Kulturen bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 geschüttelt. Zu diesem Zeitpunkt wurde IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert.

Das Wachstum der Bakterien wurde durch Bestimmung der optischen Dichte der Zellsuspension im Zeiss Spektralphotometer PM6 bei einer Wellenlänge von 600 nm verfolgt. Dazu wurde unlösliches CaCO₃ aus *C. glutamicum* C.g.X Kulturen durch Zusatz von 1 ml 1N HCl zum gleichen Volumen Kulturflüssigkeit entfernt.

Zum Ernten der Zellen wurden sowohl *C. glutamicum* als auch *E. coli* Kulturen in der Minifuge RF (Heraeus Christ GmbH, Osterode) bei 4°C, 5000 Upm, 10 min zentrifugiert, das Pellet in 100 mM Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,2 gewaschen und bis zur Verwendung bei -20°C aufgehoben.

Zur Stammhaltung wurden Glycerinkulturen aus 30 % (v/v) sterilem Glycerin und 70 % (v/v) einer Vorkultur angelegt. Von diesen Dauerkulturen (-20°C) wurden monatlich Stammhaltungsplatten angelegt. Im Falle von Fermentationen wurde von den Stammhaltungsplatten monatlich eine neue Platte hergestellt. Die Lagerung der Stammhaltungsplatten erfolgte bei +4°C.

2.2.3 Isolierung von feedback-resistenten Mutanten der Threonindehydratase

Die Isolierung von feedback-resistenten Threonindehydratase Mutanten wurde mit einem Plattentest durchgeführt. Zunächst wurden mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion Mutanten hergestellt, die aus *E. coli* JM109 Zellen bestand, welche im Plasmid pUC19 das mutierte *ilvA* Gen unter Kontrolle des *lacZ* Promotors trugen. Zur Isolierung feedback-resistenter Threonindehydratase Mutanten wurden die zu testenden Kolonien mit Zahnstochern parallel auf 3 verschiedene Medien übertragen. Als Kontrollmedium wurden LB-Platten verwendet, als Testmedien dienten LB-Medium mit 40 mM Threonin und LB-Medium mit 40 mM Threonin und 1 mM IPTG. Durch Zugabe von IPTG wurde die Enzymsynthese der plasmidkodierten *ilvA* Allele induziert.

L-Threonin wird als Substrat der Threonindehydratase von feedback-resistenten Enzymen in erhöhtem Maße zu α -Ketobutyrat umgesetzt. Auf Medium mit IPTG führt die Akkumulation der Ketosäure infolge der erhöhten Expression einer deregulierter Threonindehydratase zur Wachstums hemmung (LaRossa et al., 1987).

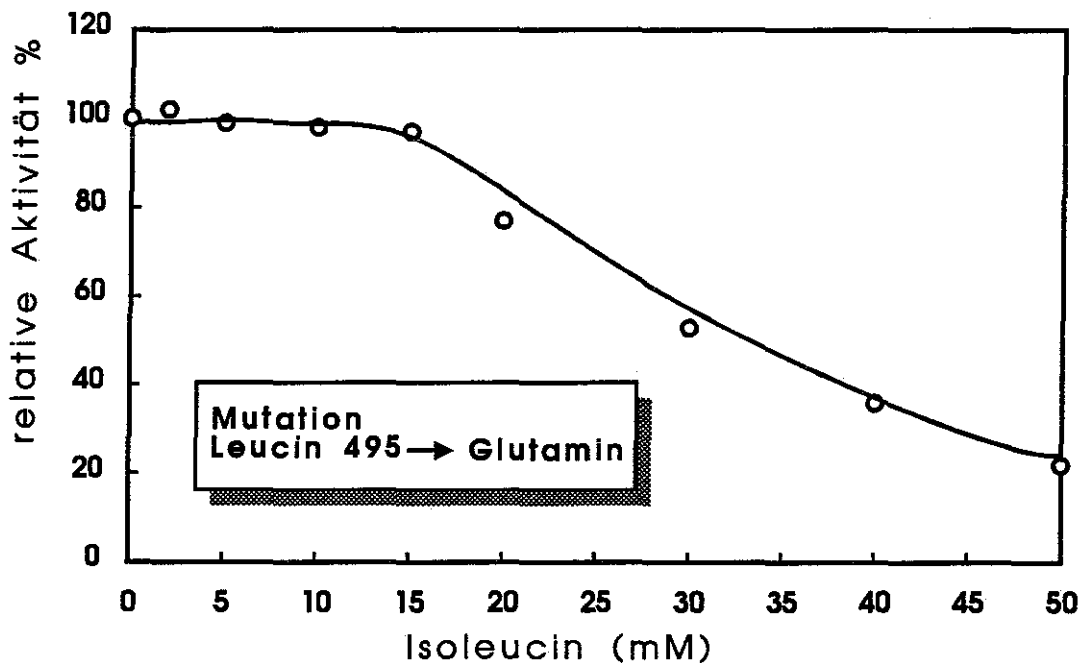


Abbildung 3: Einfluß von Isoleucin auf die Aktivität der Threonindehydratase aus *E. coli* CU406 pEU1. Das Plasmid pEU1 trägt im Vektor pTTQ19 das *ilvA* Allel 646, das für eine Threonindehydratase kodiert, die feedback-resistent gegenüber der Hemmung durch Isoleucin ist. Die Messungen wurden mit dem Semicarbazid-Test durchgeführt.

Zur Kontrolle des Testansatzes stand der *E. coli* Stamm JM109 pEU1 zur Verfügung, dessen Plasmid pEU1 im Vektor pTTQ19 unter Kontrolle des *tac* Promotors das für eine feedback-resistente Threonindehydratase kodierende *ilvA* Allel 646 aus *E. coli* trug (Aminosäureaustausch: Leucin 495 → Glutamin) (Griffo et al., 1990; Umbarger, persönliche Mitteilung). Die Überprüfung der Mutante ist in Abbildung 3 dargestellt. Um Kolonien mit dem gewünschten Phänotyp zu isolieren, wurden die beimpften Testplatten 24 h bei 37°C inkubiert und anschließend das Wachstum der Kolonien überprüft. An Hand einer durchscheinenden Kolonie-Färbung konnten diejenigen Klone identifiziert werden, die eine plasmidkodierte deregulierte Threonindehydratase aufwiesen. Die isolierten Mutanten wurden zur Kontrolle des Phänotyps in Quadrantenausstrichen erneut auf die Testmedien übertragen.

2.3 Aminosäurebestimmung

Mit der *reversed-phase*-Chromatographie erfolgte die quantitative Aminosäurebestimmung in Kulturüberständen. Verwendet wurde eine HPLC-Anlage der Firma Hewlett-Packard HP 1090 mit Fluoreszenzdetektor (HP 1046A) und Integrator HP 3392A. Die Aminosäurelösung (2 μ l) wurde durch eine automatische Vorsäulenderivatisierung mit einem o-Phthaldialdehyd/2-Mercaptoethanol-Gemisch zu stark fluoreszierenden thio-substituierten Isoindolen derivatisiert (Sternson; 1984). Die unterschiedliche Hydrophobizität dieser Derivate ermöglichte ihre Auftrennung durch die *reversed-phase*-HPLC (Jones & Gilligan, 1983) (Vorsäule: Merck Lichrosorb RP-18; Hauptsäule: Merck Lichrospher RP-18) mit einem geeigneten Laufmittelgradienten (A: 0,1 M Na-Acetat pH 7,2; B: Methanol). Mit dem Fluoreszenzdetektor wurde bei einer Exitationswellenlänge von 243 nm und einer Emissionswellenlänge von 436 nm die Detektion der Aminosäure-Derivate vorgenommen. Als interner Standard für die Berechnung der Konzentrationen wurde allen Proben Ornithin zugesetzt.

2.4 Herstellung von Rohextrakten

Die geernteten und gewaschenen *C. glutamicum* oder *E. coli* Zellen wurden mit einem Ultraschall-Desintegrator (Branson Sonifier W-250 der Firma Branson Sonic Power Co. Danburg, USA) und der Standard-Mikrospitze (Firma G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd) aufgeschlossen. Proben mit einem Volumen von 2 ml wurden in 2,5 ml Eppendorfgefäßen aufgeschlossen. Für größere Volumina wurden "Rosettengefäße" verwendet. Die vorgekühlten Proben wurden im Eiswasserbad bei den folgenden Bedingungen aufgeschlossen:

Organismus	Vol ml	Beschall- dauer min	duty- cycle %	Beschall- intensität Stufe
<i>C. glutamicum</i>	5	10	100	2,5
<i>C. glutamicum</i>	2	6	20	2
<i>E. coli</i>	2	3	20	2
<i>E. coli</i>	6	2 x 4	20	2

Nach der Ultraschallbehandlung wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation in der Kühlzentrifuge 202 MK (Sigma GmbH, Osterode) (4°C; 13.000 Upm) abgetrennt. Der Rohextrakt wurde entweder bei -20°C eingefroren oder direkt zur Bestimmung der

Enzymaktivitäten verwendet. Die Threonindehydratase zeigte bei Lagerung im eingefrorenen Zustand über mehrere Tage keinen Aktivitätsverlust.

2.5 Proteinbestimmungen

Zur Bestimmung niedriger Proteinkonzentrationen (10 - 50 μg / ml Protein) wurde die Lowry-Methode modifiziert nach Bensadoun und Weinstein (1976) verwendet. Der Proteingehalt von Proben mit 0,25 - 5 mg / ml Protein wurde nach der Biuret-Methode (Gornall *et al.*, 1949) bestimmt.

2.6 Bestimmung von Enzymaktivitäten

Die Threonindehydratase EC 4.2.1.16 katalysiert in einer α,β -Eliminierung die Desaminierung von Threonin zu α -Ketobutyrat. Pyridoxalphosphat dient als Cofaktor des Enzyms.

Semicarbazid-Test:

Das gebildete α -Ketobutyrat wurde mit Semicarbazid zum Semicarbazon umgesetzt (McGee & Doudoroff, 1954), das photometrisch nachgewiesen wurde. Die spezifische Aktivität wurde in U/mg Protein angegeben. Eine Enzymeinheit entspricht 1 μmol gebildetes Produkt pro Minute.

Reaktionsansatz:

0,08 ml	1 M K-Phosphat-Puffer pH 8,2
0,08 ml	10 mM Pyridoxal-Phosphat
x ml	Rohextrakt
580 - x ml	Aqua dest.

Durchführung:

Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 40 μl einer 0,8 M L-Threonin-Lösung. Die Reaktionsansätze wurden bei 30°C inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0 und 30 min wurden 200 μl Reaktionsansatz in Reagenzgläser mit je 20 μl TCA (36 %) (auf Eis) gegeben. Nach Beendigung der Reaktion wurde zu allen Proben 1 ml Semicarbazid-Lösung (1 g Semicarbazid HCl, 0,9 g Natriumacetat in 100 ml H₂O) zugesetzt, gemischt und 15 min bei 30°C derivatisiert. Es wurden 3 ml H₂O mit den Proben vermischt und die Extinktion gegen H₂O bei 254 nm ermittelt. Die gebildete Menge an α -Ketobutyrat wurde mittels einer Eichkurve bestimmt.

Lactatdehydrogenase-Test:

Dieser Enzymtest, der bei den kinetischen Untersuchungen der Threonindehydratase verwendet wurde, basiert auf der Kopplung der α -Ketobutyrat Bildung mit der Oxidation von NADH durch die Reaktion der Lactatdehydrogenase (Burns, 1971).

Vorbereitung des Rohextraktes:

Die Zellen wurden nach dem Ernten in Aufschlußpuffer aufgenommen und anschließend die niedermolekularen Bestandteile aus dem Extrakt mittels Sephadex G-25 Gelfiltration entfernt. Dazu wurden 2,5 ml des Rohextraktes über PD10 Säulen (Pharmacia/LKB; Freiburg) filtriert, die mit Aufschlußpuffer äquilibriert waren. Die hochmolekularen Substanzen wurden mit 3,5 ml des Aufschluß-Puffers eluiert und dieser "entsalzte" Rohextrakt für die enzymatischen Bestimmungen eingesetzt. Das Filtrat wurde auf Eis aufbewahrt.

Aufschlußpuffer:

0,1	M	Kaliumphosphat Puffer pH 7
0,2	mM	Pyridoxalphosphat
0,1	mM	Titriplex II
1	mM	DTT

Reaktionsansatz :

25	μ l	1 mM Pyridoxalphosphat
80	μ l	1 M K-Phosphat-Puffer pH 8,2
300	μ l	2 mM Effektor
50	μ l	Filtrat des Rohextraktes
x	μ l	0,8 M L-Threonin
345 - x	μ l	Aqua dest.

Die Ansätze wurden wie oben angegeben ohne L-Threonin auf Eis zusammengegeben und Threonin zum Start der Reaktion zugesetzt. Die Reaktionsansätze wurde bei 30°C inkubiert und nach 3 min die Reaktion durch Zugabe von 40 μ l TCA (36 %) 6 min auf Eis abgestoppt.

Bestimmungsansatz:

Zu den Ansätzen wurde zugesetzt:

40	μ l	2 M Tris-Base
35	μ l	4 mM NADH
80	μ l	H ₂ O
5	μ l	Lactatdehydrogenase aus Schweine-Herz (8 U)

Nach kurzem Mischen wurden die Bestimmungsansätze 15 min bei 30°C inkubiert, anschließend 10 min bei 13.000 rpm in der Sigma Tischzentrifuge abzentrifugiert und dann die Extinktion des Überstandes bei 340 nm gegen H₂O im Spektralphotometer Zeiss PM6 gemessen.

2.7 Gelfiltration zur Molekulargewichtsbestimmung

Die Gelfiltration zur Bestimmung des nativen, apparenten Molekulargewichtes der Threonindehydratase wurde mit einem FPLC-System (Pharmacia/LKB, Freiburg) über eine Superose 12 Säule (HR 10/30) durchgeführt. Es wurden 400 µl Rohextrakt nach Filtration über PD-10 Säulen (Pharmacia) bei einer Flußrate von 0,3 ml / min aufgetragen und während des Laufes Fraktionen von 0,5 ml aufgefangen. Für die Eichung der Säule wurden 0,4 ml des jeweiligen Eichproteins appliziert und die Elutionsvolumina der Eichproteine bestimmt. Durch die Auftragung der Molekülgröße gegen das Elutionsvolumen wurde eine Eichgerade ermittelt. Als Molekulargewichtsstandard wurden folgende Proteine verwendet: Ovalbumin (43.000 Da), Albumin (67.000 Da), Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (110.000 Da), Lactatdehydrogenase (140.000 Da), Alkoholdehydrogenase (150.000 Da), Aldolase (158.000 Da), Amylase (200.000 Da) und Katalase (232.000 Da).

Laufpuffer:

0,1 M Kaliumphosphat Puffer
0,2 mM Pyridoxalphosphat
0,1 mM Titriplex II
0,2 mM L-Isoleucin
1 mM DTT
pH 7,0

2.8 Isolierung der Threonindehydratase

Zur Isolierung der Threonindehydratase aus Rohextrakten wurde die Nickel-Chelat-Chromatographie verwendet. Die Methode basiert auf der selektiven Bindung von Proteinen mit aufeinanderfolgenden 6 Histidin-Resten an Nickel-NTA (Nitrilo-Tri-Acetat) Material und ermöglicht die Aufreinigung von Proteinen in einem Schritt über eine Affinitäts-Säulen-Chromatographie (Hochuli *et al.*, 1987; Stüber *et al.*, 1990a; 1990b). Die Versuchsbedingungen wurden nach dem "Quiaexpress Protein Expression and Purification System" (Diagen, Hilden) für die speziellen Anforderungen bei der Aufreinigung der Threonindehydratase angepaßt.

Zur Markierung der Threonindehydratase mit 6 Histidin-Resten am N-Terminus, wurde das *ilvA* Gen unter Verwendung der Primer A und B (Template: pBM21) mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion unter Standardbedingungen amplifiziert. Die Fragmente wurden wie in Abbildung 13 gezeigt in den Vektor pQE30 ligiert und die Ligations-

ansätze in den *E. coli* Stamm JM109 transformiert. Die erhaltenen Transformante JM109 pBM30 wurde für die beschriebene Aufreinigung der Threonindehydratase verwendet.

Verwendete Primer für die *ilvA* Amplifizierung:

A: 5'-[GCGGATCCGATGACGATGACAAAAGTGAAACATACGTGTCTG]-3'

B: 5'-[CCAGTGCCAAGCTTGCATGC]-3'

Durchführung:

- 10 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) wurden mit dem Stamm *E. coli* JM109 pBM30 angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 500 ml LB (100 µg/ml Ampicillin) 1:50 beimpft und bei 37°C geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von 0,7 - 0,9 erreicht war. Zur Induktion der Enzymsynthese wurde IPTG in einer Endkonzentration von 2 mM zugesetzt und weitere 5 h inkubiert.
- Die Zellen wurden geerntet und mittels Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Der erhaltene Rohextrakt wurde direkt zur Aufreinigung der Threonindehydratase auf die vorbereitete Affinitätssäule aufgetragen.
- Zur Vorbereitung der Affinitäts-Säule wurde das Ni-NTA Säulenmaterial (15 ml), 1:1 mit H₂O gemischt, in die Säule gefüllt und die Säule zur Equilibrierung mit 5 Volumen H₂O und dann mit 10 Volumen Aufschlußpuffer gewaschen.
- Während des folgenden Reinigungsvorganges wurden Proben von je 1 ml Volumen mit dem Fraktionssammler (Pharmacia/LKB, Freiburg) aufgefangen und die optische Dichte der Proben im Photometer bei 280 nm überprüft. Der Rohextrakt wurde mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 0,5 ml/min auf die Säule aufgetragen, anschließend die Säule mit Aufschlußpuffer gewaschen (bis zur OD₂₈₀ ≤ 0,01 (80 - 120 ml)) und mit Wasch-Puffer gespült (bis zur OD₂₈₀ ≤ 0,01 (etwa 120 ml)).
- Die Threonindehydratase wurde mit einem Gradienten von 0 - 0,250 M Imidazol eluiert, der mit Hilfe des Gradient Mixer GM (Pharmacia/LKB, Freiburg) auf die Säule aufgetragen wurde. An Hand der Bestimmung der Aktivität der Threonindehydratase, der Proteinkonzentration und der SDS-PAGE wurden die aufgefangen Fraktionen analysiert.

Aufschluß-Puffer: 50 mM Na-Phosphat pH 8,0
300 mM NaCl

Wasch-Puffer: 50 mM Na-Phosphat
300 mM NaCl
10 % Glycerin
pH auf 6,0 einstellen

Elutions-Puffer: 15 ml Wasch-Puffer
15 ml 250 mM Imidazol in Wasch-Puffer

2.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur analytischen Auftrennung von Proteinen nach der Molekülgröße wurde die Polyacrylamid-GelElektrophorese (PAGE) nach Lämmli (1970) unter denaturierenden Bedingungen verwendet. Die Herstellung des 10 %igen Gels und die Vorbereitung der Proben erfolgte wie bei Sambrook *et al.* (1989) beschrieben. Die Gelelektrophorese erfolgte in einem vertikalen Gelsystem (Dual Vertical Slab Model 220, Biorad, USA) bei 10 mA bei konstanter Stromstärke.

2.10 Gewinnung polyklonaler Antisera

Um polyklonales Antiserum gegen die Threonindehydratase aus *C. glutamicum* zu erhalten, wurde das über Nickel-NTA-Chromatographie gereinigte Protein einem Kaninchen injiziert. Zur Vorbereitung der Proteinprobe wurde ein weiterer Aufarbeitungsschritt über eine präparative SDS-PAGE mit anschließender Kaliumchlorid Färbung (Hager & Burgess, 1980) durchgeführt. Die aus dem Gel ausgeschnittene Bande wurde homogenisiert und nach der Mischung mit Adjuvant wurde das Protein-Polyacrylamid-Adjuvant Gemisch injiziert (Ausubel *et al.*, 1989).

Durchführung:

- Insgesamt wurden 575 µg der angereicherten Threonindehydratase Probe in einem präparativen SDS-Polyacrylamid-Gel (10 % Gel, 90 ml Fassungsvermögen, Abmessungen: 19 cm x 22 cm x 0,3 cm) aufgetrennt (40 A, 16 h). Danach wurde das Gel zunächst 10 Minuten mit H₂O gespült und anschließend die Threonindehydratase Proteinbande durch Ausfällung von SDS mit Kaliumchlorid sichtbar gemacht (20 Minuten in eiskaltem KCl (0,25 mM), DTT (1 mM)). Vor dem Ausschneiden der Bande wurde kurz in H₂O gewaschen und anschließend das gewünschte Protein-Gel-Stück isoliert.
- Das Isolat wurde in eiskaltem H₂O (1 mM DTT) 45 Minuten entfärbt und daran anschließend in einer X-Press Zelle bei -20°C über 2 Tage eingefroren. Mit der

hydraulischen X-Press (RD2510, Bachhofer, Reutlingen) wurde das Protein-Gel-Isolat homogenisiert. Vor der Injektion wurden Freund's Complete und Freund's Incomplete Adjuvant in gleichem Volumen zugesetzt und die Substanzen gut vermischt. Das Präparat wurde subcutan injiziert, wobei jeweils etwa 0,5 - 1 ml der Antigen-Emulsion an einer Stelle gespritzt wurden.

- Nach vier Wochen wurde mit 275 μ g Antigen die "booster-Immunisierung" vorgenommen. Zehn Tage später konnte das erste Serum zum Test der Antikörperproduktion entnommen werden.
- Zur Gewinnung des Serums wurden die festen Bestandteile des entnommenen Blutes 4 h in der Kälte sedimentiert. Der abgesetzte Blutkuchen und der Überstand wurden in Zentrifugenbecher gefüllt und bei 6000 Upm 10 min bei 4°C in der Beckman Zentrifuge J2-21M/E zentrifugiert. Das klare Serum wurde entnommen, aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

2.11 Spezifische Detektion von Proteinen durch Western Blotting

Zur Detektion von Proteinen durch Western-Blotting wurden die Proteine nach Auftrennung im SDS-Gel durch elektrophoretisches Blotting auf Nitrocellulose-Membranen übertragen. Der spezifische immunologische Nachweis der Proteine mit Antikörpern wurde nach der Methode von Towbin *et al.* (1979) durchgeführt. Die Detektion des spezifisch gebundenen Antikörpers erfolgte über einen zweiten, an Peroxidase gekoppelten Antikörper aus Ziegen, der gegen Immunglobulin G aus Kaninchen gerichtet war (Hawkes *et al.*, 1982).

Durchführung:

- Nach der Trennung der Zellproteine über SDS-Gelelektrophorese wurde das Gel 15 min in Blot-Puffer equilibriert und zum Transfer in den Semi-Dry-Blotter (Pharmacia/LKB, Freiburg) gelegt (Versuchsaufbau nach Ausubel *et al.*, 1989). Der Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembranen (Schleicher & Schuell, Dassel) erfolgte über 1 h (1 mA / cm²).
- Die proteintragende Membran wurde 1 h in Lösung I geschüttelt (bei Raumtemperatur) und anschließend in Gegenwart des spezifischen Threonindehydratase-Antikörpers (1:1000 Verdünnung in Lösung II) über Nacht bei 4°C inkubiert. Um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen, wurde die Membran zweimal in je 30 ml Lösung II bei Raumtemperatur gewaschen.
- Zur Bindung des zweiten Antikörpers (Peroxidase-gekoppeltes Anti-Kaninchen Immunglobulin aus Ziegen, Verdünnung 1:1000 in Lösung II) wurde der Filter 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

- | | | | |
|--------------------------|-----|---------|---|
| 10 x Blot Puffer: | 100 | mM | Cyclohexylaminopropansulfonsäure
pH 11 mit NaOH einstellen |
| Blot Puffer: | 200 | ml | 10 x Blot Puffer |
| | 200 | ml | Methanol
ad 2 L H ₂ O |
| Lösung I: | 10 | mM | TrisHCl pH 7,5 |
| | 3 | % | BSA |
| | 0,9 | % | NaCl |
| Lösung II: | 10 | mM | TrisHCl pH 7,5 |
| | 0,3 | % | BSA |
| | 0,1 | % | Tween 20 |
| | 0,9 | % | NaCl |
| Entwickler 1: | 120 | ml | 50 mM TrisHCl pH 7,5 |
| Entwickler 2: | 30 | ml | Ethanol |
| | 90 | mg | α -Chloro-1-Naphtol |
| Entwickler 3: | 225 | μ l | Perhydrol |

Die Fluoreszenzspektroskopie unter Verwendung des Farbstoffes 1-Anilinonaphtalen-8-sulfonat (ANS) wurde zum Nachweis verschiedener Konformationszustände der Threonindehydratase verwendet. Der Fluoreszenzfarbstoff wurde als "Reporter-Gruppe" benutzt, wobei Änderungen der Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffes auf Polaritätsverschiebungen in der Umgebung des Farbstoffes und damit auf Konformationsänderungen des Proteins hinweisen (Guilbault, 1973). 1-Anilinonaphtalen-8-sulfonat (ANS) zeigt geringe Fluoreszenz in wässriger Lösung und starke Fluoreszenz bei der Bindung an hydrophobe Regionen in Proteinen (Stryer, 1965).

Durchführung:

Es wurden 1 μM Threonindehydratase Protein in 100 mM Kaliumphosphat-Puffer (10 % (w/v) Glycerin) bei pH 8,2 mit verschiedenen Effektoren bei 30°C inkubiert. Nach Zusatz von 10 μM Farbstoff 1-Anilinonaphtalen-8-sulfonat und 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Fluoreszenz unter den angegebenen Bedingungen im Luminescence Spektrometer LS50B (Perkin Elmer) gemessen. Die Emissionsspektren wurden gegen die 1-Anilinonaphtalen-8-sulfonat (ANS) Fluoreszenz im Puffer korrigiert.

Anregungswellenlänge: λ_{ex} = 400 nm
Emissionswellenlänge: λ_{em} = 370 - 600 nm
Spaltbreite: λ_{ex} = 5 nm, λ_{em} = 10 nm
Proteinkonzentration: 1 μM
Farbstoffkonzentration: 10 μM

2.13 Allgemeine genetische Techniken

DNA-Isolierung:

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte aus 5 ml Übernacht-Kulturen (Minipräparation) nach der Methode der alkalischen Lyse modifiziert nach Birnboim & Doly (1979). Bei der Präparation im größeren Maßstab (50 ml Kulturen) wurde vor der alkalischen Lyse eine Lysozym-Behandlung der Zellen durchgeführt und die Plasmid-DNA durch eine zusätzliche Isopropanol-Fällung aufgereinigt.

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *C. glutamicum* wurden die Zellen mit Lysozym vorbehandelt, da Gram⁺ Bakterien durch SDS und EDTA allein nicht lysierbar sind. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte analog zur Plasmid-Isolierung aus *E. coli*. Zur Isolierung chromosomaler DNA aus *C. glutamicum* wurde eine modifizierte Methode nach Meade et al. (1982) verwendet.

Rekombination von DNA:

Die verschiedenen Techniken zur DNA-Rekombination wie die Spaltung mit Restriktionsenzymen, Behandlung mit alkalischer Phosphatase, Klenow-Reaktion und Ligation, Phenol-Extraktion und Ethanol-Fällung wurden nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

Gelelektrophorese:

Die Analyse von DNA oder ihren Restriktionsfragmenten erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung in TAE-Agarosegelen nach Sambrook et al. (1989). Verwendet wurden Elektrophoresekammern der Firma Gibco/BRL (Modell H5).

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen:

Die Aufreinigung von DNA erfolgte mit dem GEN CLEAN-Kit (Dianova, Hamburg) entsprechend der Herstellerangaben. Mit Hilfe dieser Methode wurde die Reinigung der DNA von Agarose und Ethidiumbromid nach der Elektrophorese, die Entsalzung

von DNA-Lösungen und die Entfernung von Proteinen sowie die Reinigung zwischen enzymatischen Reaktionen vorgenommen.

Elektroporation von *C. glutamicum* Zellen:

Zur effizienten Transformation von *C. glutamicum* Zellen ist die Elektroporation eine geeignete Methode (Liebl *et al.*, 1989; Haynes & Britz, 1989). Die kompetenten Zellen wurden nach der angegebenen Methode vorbereitet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Zur Elektroporation wurden die Elektroporations-Küvetten (Bio-Rad, 2 mm Elektroden Abstand) mit UV-Licht sterilisiert. Verwendet wurde der Bio-Rad "Gene-PulserTM" und "Pulse-Controller". Die Elektroporation erfolgte mit folgenden Einstellungen der Spannungsquelle: Widerstand: 200 Ω ; Spannung 2,5 kV; Kapazität 25 μ F. Auf LBHIS-Platten mit Antibiotikum wurden die Transformationsansätze ausplattiert und 2 Tage bei 30°C inkubiert.

Transformation von *E. coli* Zellen:

Für die Transformation der *E. coli* Stämme DH5 und JM109 wurden kompetente Zellen nach der Rubidiumchlorid-Methode, einem modifizierten Protokoll nach Hanahan (frozen storage III) (1983; 1985) hergestellt. Die Zellen wurden in Aliquots zu je 200 μ l in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Zur Transformation wurden 10 - 500 ng Plasmid-DNA verwendet. Die Transformation aller weiteren *E. coli* Stämme erfolgte nach einer "One-Step" Methode von Chung *et al.* (1989). Die vorbereiteten Zellen wurden sofort für die Transformation eingesetzt.

Verkürzung restringierter DNA mit Exonuklease III:

Die von Henikoff (1984) entwickelte Methode der Exonuklease III Behandlung zur Erzeugung sukzessiver DNA-Deletionen wurde angewendet, um überlappende Klone für die DNA-Sequenzierung zu erhalten. Das Erase-a-Base System (Promega, Madison USA) wurde nach dem Herstellerprotokoll eingesetzt.

2.14 DNA:DNA-Hybridisierung

Bei der von Southern (1975) entwickelten Methode werden DNA-Restriktionsfragmente nach einer Gelelektrophorese im Gel denaturiert, auf eine Membran übertragen und dort immobilisiert. Die DNA:DNA-Hybridisierung wurde nach dem Protokoll des nichtradioaktiven "DNA labeling and detection" -Kits der Firma Boehringer, Mannheim, durchgeführt. Nach diesem Protokoll wurde die als Sonde eingesetzte DNA mit Digoxigenin-11-dUTP markiert.

Vakuum-Transfer:

Die zu untersuchende DNA wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen gespalten und im Agarosegel (0,8 %) über Nacht aufgetrennt. Durch Vakuum-Blotting mit der Vakuum-Blotkammer LKB 2016 VacuGene (Pharmacia/LKB, Freiburg) wurde die DNA auf Nytran N Nylonmembranen (Schleicher & Schüll, Dassel) übertragen. Dazu wurde das Agarosegel in der Blotkammer 20 min mit Depurinierungs-Lösung

überschichtet, 20 min mit Denaturierungs-Lösung behandelt und anschließend 20 min mit Neutralisierungs-Puffer inkubiert. Der Transfer wurde über 60 Minuten mit einer 20 x SSC-Lösung durchgeführt. Die Immobilisierung der DNA auf der Nylonmembran erfolgte auf dem UV Transilluminator (3 min, 366 nm).

Lösungen:

Depurinierungslösung: 0,35 M HCl

Denaturierungslösung: 0,5 M NaOH
1,5 M NaCl

Neutralisierungslösung: 1,0 M Tris
1,5 M NaCl
pH 7,5

20 x SSC-Lösung: 175,32 g NaCl
88,23 g Na-Citrat
pH 7,0

Markierung der DNA-Hybridisierungssonde:

Bei der Markierung der Hybridisierungssonden wurde linearisierte, denaturierte DNA nach Hybridisierung von Hexanukleotiden ("random primed" - Methode nach Feinberg & Vogelstein, 1983) durch anschließenden Einbau von Nukleotiden durch Klenow-Polymerase mit Digoxigenin-markiertem dUTP markiert. Etwa 1 µg linearisierte DNA wurden 10 Minuten bei 100°C denaturiert, anschließend sofort in Eis abgekühlt mit Digoxigenin-11-dUTP markiert.

Markierungsansatz:

linearisierte DNA	1 µg
Hexanukleotid-Mix 10x	2 µl
dNTP-Markierungs-Mix 10x	2 µl
H ₂ O	ad 19 µl
Klenow-Enzym 2U / µl	1 µl

Der Reaktionsansatz wurde bei 37°C über Nacht (16 h) inkubiert.

Hybridisierung und Detektion der Hybridisierungssignale:

Durch eine Prähybridisierung wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abgesättigt. Dazu wurde die Membran 4 - 6 h bei 68°C in der Prähybridisierungslösung (2 x SSC, 1 % Blockingreagenz, 0,1 % Laurylsarcosine, 0,02 % SDS) inkubiert. Zur

Hybridisierung wurde der Filter in Hybridisierungslösung, bestehend aus Prähybridisierungslösung und der hitzedenaturierten Dig-dUTP-markierten DNA-Sonde, ebenfalls bei 68°C 16 h geschüttelt. Nachdem unspezifisch gebundene Sonden-DNA durch Waschen des Filters entfernt worden war (Waschlösung 1: 2 x SSC, 0,1 % SDS; Waschlösung 2 (0,1 x SSC, 0,1 % SDS), wurde die Detektion der DNA:DNA-Hybride über den immunologische Nachweis nach einer Vorschrift der Firma Boehringer Mannheim durchgeführt. Der erste Schritt der Nachweisreaktion war die Bindung eines spezifischen 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.

2.15 Synthese und Reinigung von Oligonukleotiden

Synthetische Oligonukleotide wurden als Primer bei der PCR-Reaktion, bei der gerichteten Mutagenese und für die DNA-Sequenzierung eingesetzt. Die automatische Synthese von Oligonukleotiden wurde mit dem Gene-Assembler Plus (Pharmacia/LKB, Freiburg) durchgeführt. Bei diesem Verfahren, in dem Phosphoramidite verwendet werden, ist das 3'Ende der Nukleotidkette an einer Festphase verankert. Die Synthese erfolgt durch eine Kopplung zwischen der 5'OH Gruppe eines Nukleotids mit dem Phosphat des zweiten Nukleotids unter wasserfreien Bedingungen im organischen Solvens Acetonitril. Die reaktiven Gruppen der Nukleotide sind während der Synthese durch Schutzgruppen maskiert, die im Anschluß an die Synthese entfernt werden müssen (Caruthers, 1985).

2.15.1 Reinigung von Oligonukleotiden über NAPTM-Säulen

Nach der Synthese wurden die synthetisierten Oligonukleotide vom Säulenmaterial getrennt und die verwendeten Schutzgruppen vom Syntheseprodukt abgespalten.

Durchführung:

Die Oligonukleotidlösung wurde mit 1 ml eiskalter Ammoniak-Lösung (30 %, bei -20°C gelagert) von der Säule eluiert. Das Reaktionsgefäß mit der verwendeten Säule wurde dazu 16 h bei 50°C inkubiert und anschließend die Ammoniaklösung (2000 Upm, 2 min) abgetrennt. Auf eine mit H₂O equilibrierte NAPTM-10 Säule wurde die Oligonukleotid-Lösung aufgetragen und anschließend die Primer-DNA mit 1,5 ml H₂O eluiert. Die Konzentration der gewonnenen Oligonukleotid-Lösung (1:30 verdünnt) wurde im Photometer (Zeiss PM6) bei 260 nm bestimmt. Die Probe wurde auf die gewünschte Konzentration verdünnt und zur PCR eingesetzt.

2.15.2 HPLC Reinigung von FITC-markierten Primern

Die Fluoreszenz-markierten Oligonukleotide wurden bei der nicht-radioaktiven Sequenzierung verwendet. Zur Markierung der Primer wurde bei der Synthese das 5'-Ende des Oligonukleotids mit FITC (Fluoresceinisothiocyanat) gekoppelt. Bevor die Fluoreszenz-markierten Primer für die DNA-Sequenzierung eingesetzt werden konnten, mußten sie von Verunreinigungen, die während der Synthese und der Kopplung mit FITC entstehen, gereinigt werden. Die Reinigung der markierten Produkte erfolgte über HPLC-Chromatographie. (Höpker *et al.*; Pharmacia Produkt Information).

Durchführung:

Die Oligonukleotid-Lösung wurde nach der Reinigung über die NAPTM-Säule sofort zur HPLC-Chromatographie eingesetzt (Säule: Pharmacia SuperPac^R Pep-S; 5 μ m; 250 x 4 mm; Injektionsvolumen: 200 μ l; Laufmittel A: 5 % Acetonitril in 100 mmol/l Triethylaminacetat, pH 7,0; Laufmittel B: 30 % Acetonitril in 100 mmol/l Triethylaminacetat, pH 7,0). Mit dem Fluoreszenzdetektor erfolgte die Detektion der Fluoreszenz-markierten Oligonukleotide (Excitationswellenlänge 260 nm; Emissionswellenlänge 491 nm) (Abbildung 4). Während des Laufes wurden Oligonukleotid-Fractionen aufgefangen, Fraktionen aufeinanderfolgender Läufe wurden vereinigt und in der Vakuumzentrifuge über Nacht getrocknet. Die sedimentierte Primer-DNA wurde in je 0,5 ml H₂O resuspendiert und im Dunkeln bei -20°C gelagert. Die Konzentration an gereinigtem Primer wurde photometrisch bei 260 nm ermittelt und zur Sequenzierung wurden geeignete Verdünnungen erstellt.

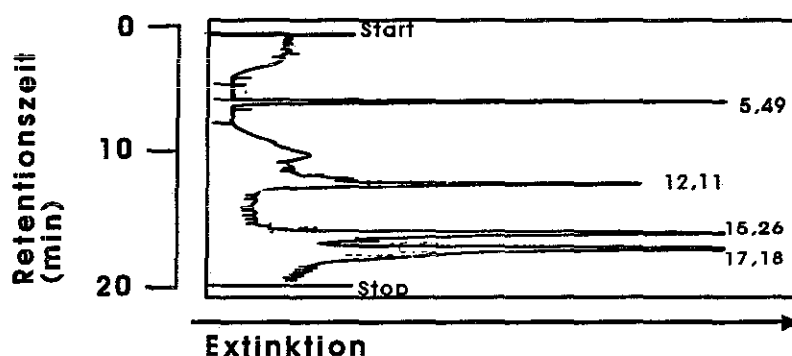


Abbildung 4: HPLC-Chromatogramm einer Trennung von FITC-markierten Oligonukleotiden von Synthesenebenprodukten (Retentionszeiten 15,26 min und 17,18 min: FITC-markierte Primer).

2.16 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zur *in vitro* Vervielfältigung von DNA-Fragmenten verwendet (Saiki *et al.*, 1985; 1988; Erlich, 1989). Zur PCR-Amplifizierung werden zwei Primer benötigt, die das zu amplifizierende DNA-Fragment eingrenzen. Ein wiederholter Zyklus der DNA-Denaturierung, des Primer-Annealings und der Kettenverlängerung der Primer mit der DNA-Polymerase ermöglicht eine Verdopplung der Anzahl der DNA-Stränge pro Zyklus. Das Ergebnis ist eine exponentielle Zunahme des spezifischen, durch die beiden Primer flankierten Fragmentes. Mit der thermostabilen *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, können die Zyklen durchlaufen werden, ohne daß Polymerase nach jedem Denaturierungsschritt neu zugesetzt werden muß (Tindall & Kunkel, 1988). Für den Reaktionsansatz wurden je zwei Oligonukleotide hergestellt, die zu der Sequenz der zu amplifizierenden DNA komplementär waren. Die Amplifizierung wurde im DNA-Thermal-Cycler der Firma Perkin Elmer durchgeführt.

Durchführung:

Die Reaktionsansätze wurden in einem 0,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß auf Eis zusammengegeben und nach Zusatz der *Taq*-Polymerase wurde das Reaktionsgemisch mit Mineralöl überschichtet, um Flüssigkeitsverlust bei hoher Temperatur vorzubeugen. Der Ablauf des Amplifizierungszyklus wurde den jeweiligen Bedingungen (z.B. Primerzusammensetzung) angepaßt. Die Annealing-Temperatur berechnet sich nach der Zusammensetzung des eingesetzten Primers nach folgender Gleichung: Pro A:T Basenpaarung mit der Template-DNA werden 2°C angerechnet, pro G:C Basenpaar 4°C hinzuaddiert. Bei Fehlpaarungen werden 1,5°C abgezogen:

$$(2^{\circ}\text{C} / \text{A:T}) + (4^{\circ}\text{C} / \text{G:C}) - (1,5^{\circ}\text{C} / \text{Mismatch}) = \text{Annealing-Temperatur}$$

Aufreinigung der PCR-Produkte:

Das Mineralöl wurde nach Ablauf der Amplifizierungszyklen vom Reaktionsansatz abgenommen, und die Lösung mit 100 µl NH₄Acetat versetzt. Es wurden 200 µl Isopropanol zugegeben und nach 1 h bei Raumtemperatur die hochmolekulare DNA 20 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 70 % Ethanol gewaschen und in 100 µl H₂O aufgenommen. Zur Konzentrationsabschätzung wurden je 5 µl der DNA-Lösung auf einem Agarosegel aufgetrennt.

Reaktionsansatz:

Primer 1	25	$\mu\text{g/ml}$	20	μl
Primer 2	25	$\mu\text{g/ml}$	20	μl
Template	10	ng	2	μl
dNTP Mix	je 1,25	mM	20	μl
Taq 10 x Puffer			10	μl
Taq-Polymerase	5	U/ μl	0,5	μl
H ₂ O			27,5	μl

Berechnung der Oligonukleotidmenge: Für ein 20mer gilt, daß eine Stammlösung mit der Extinktion 1 bei 260 nm 5 nmol Primer DNA enthält.

$$\frac{33 \mu\text{g}}{(20 \cdot 325)} = 5 \text{ nmol} = 1 A_{260}$$

Durchschnittliches Molekulargewicht dNTP: 325 Dalton

Reaktionsbedingungen:

Time Delay file	94°C	3 min
Thermo Cycle file	94°C	1 min
	59°C	2 min
	72°C	3 min
Soak file	4°C	
Segment extension		
für Amplifizierung:	10 sec	
Anzahl der Zyklen:	25	

Taq-Inkubations-Puffer 10 x:

Tris / HCl	100	mmol/l
MgCl ₂	15	mmol/l
KCl	500	mmol/l
Gelatine	1	mg/ml
pH 8,3		

2.17 Ortsspezifische Mutagenese

Die ortsspezifische Mutagenese wurde mit einer Methode nach Ito *et al.*, (1991) durchgeführt, die eine Abwandlung des "overlap-extension" Verfahrens (Higuchi *et al.*, 1988; Ho *et al.*, 1989) darstellt. Die overlap-extension Methoden zeichnen sich dadurch aus, daß die gewünschte Mutation in einem separaten Primer eingefügt werden können, der unabhängig von den Restriktionsschnittstellen zur Klonierung der Fragmente ist.

Prinzip der Methode:

In Abbildung 5 ist das Prinzip der verwendeten Methode dargestellt. Die Primer I, II und III flankieren das zu amplifizierende Fragment. Primer II zerstört dabei eine Restriktionsschnittstelle und Primer III beinhaltet eine Spaltstelle zur Reklonierung der Fragmente. Diese drei Primer können in allen Mutagenesen wieder verwendet werden. Primer IV stellt den variable Mutagenese-Primer dar, der an verschiedenen Positionen im Fragment spezifisch Mutationen einführen kann.

Durchführung:

- Zunächst wurden in unterschiedlichen Reaktionsansätzen unter Standard-Bedingungen zwei Fragmente amplifiziert. Ein Fragment wurde durch Primer I und IV flankiert und das zweite Fragment durch Primer II und III (Schritt 1).
- Ein kritischer Punkt dieser Methode ist die Aufreinigung der PCR-Produkte nach Schritt 1 des Verfahrens. Es muß gewährleistet sein, daß die amplifizierten Fragmente frei von Template- und Primer-DNA der ersten Amplifikations-Reaktion sind. Dazu werden die Produkte durch Isopropanolfällung aufgereinigt und anschließend in einem 1,1 % igem Agarosegel aufgetrennt und das amplifizierte Fragment isoliert.
- Die gereinigten Fragmente wurden in equimolaren Mengen gemischt (Schritt 2) und als Template für eine weitere PCR Reaktion mit den Oligonukleotiden I und III als Primern eingesetzt (Schritt 3).
- Zur Klonierung wurden die Amplifikations-Produkte durch Isopropanolfällung und Isolierung aus dem Agarosegel aufgereinigt und mit Restriktionsenzymen gespalten, von denen eines in Primer III schneidet (Schritt 4). Die Erkennungssequenz des zweiten Enzyms entspricht der durch Primer II zerstörten Sequenz. In Schritt 3 wurden zwei Arten von DNA-Fragmenten amplifiziert, von denen nur dasjenige DNA-Fragment, das die durch Primer IV vermittelte Mutation trug, auch durch das zweite Restriktionsenzym gespalten werden konnte. Nur die mutierte Sequenz trug nicht die durch Primer III zerstörte Spaltstelle.

Im folgenden sind die Sequenzen der verwendeten Primer der Gruppe 1 (*Nco*I - *Eco*RV Fragment) und Gruppe 2 (*Esp*I - *Hind*III Fragment) aufgeführt. Die Nummerierung

der variablen Primern (Primer IV) (1 bis 12) kennzeichnet die jeweilige, durch diesen Primer erzeugte Mutante. In der Aufstellung der Primer ist ebenfalls die Position der Mutation in der Aminosäuresequenz und der Aminosäureaustausch (1 Buchstaben Code) angegeben.

Primer Gruppe 1:

Primer I				5'-[CCGTGGCTGCTGAGATCTTGTGCG]-3'
Primer II				5'-[CCGGTCCCAGGATATCTTCCAGG]-3'
Primer III				5'-[GCTGACTTCCGTGGGCAAGAGTGC]-3'
Primer IV				
1	289	T	→ V	5'-[CGAGCATCTCAACACACACAGCGCCC]-3'
2	289	T	→ D	5'-[CGAGCATCTCATCACACACAGCGCCC]-3'
3	303	E	→ V	5'-[CGCCAGCAGGCACCGCGATGATGC]-3'
4	328	I	→ K	5'-[CCACCAGTCTTGATGCACACC]-3'
5	330	G	→ D	5'-[CGTTGTTGCCATCAGAGATGATGC]-3'
6	331	G	→ L	5'-[CGTTGTTCAAACCAGAGATGATGC]-3'

Primer Gruppe 2:

Primer I				5'-[CAACGATGTGCTGCGTTATGC]-3'
Primer II				5'-[CCAGTGCCAAGCTTGATGC]-3'
Primer III				5'-[GGAAATCGATGAGCGCTCCTTGG]-3'
Primer IV				
7	402	L	→ F	5'-[GATGCTTCATAAAGTGAATACCCACC]-3'
8	417	E	→ A	5'-[CAATTGCCGATACCTCCATACG]-3'
9	418	S	→ Q	5'-[GCAATCAATTGCCTGTTCTCCTCCATACG]-3'
10	418	S	→ A	5'-[GCAATCAATTGCTGCTTCCTCCATACG]-3'
11	418	S	→ D	5'-[GCAATCAATTGCATCTTCCTCCATACG]-3'
12	418	S	→ E	5'-[GCAATCAATTGCCTCTTCCTCCATACG]-3'

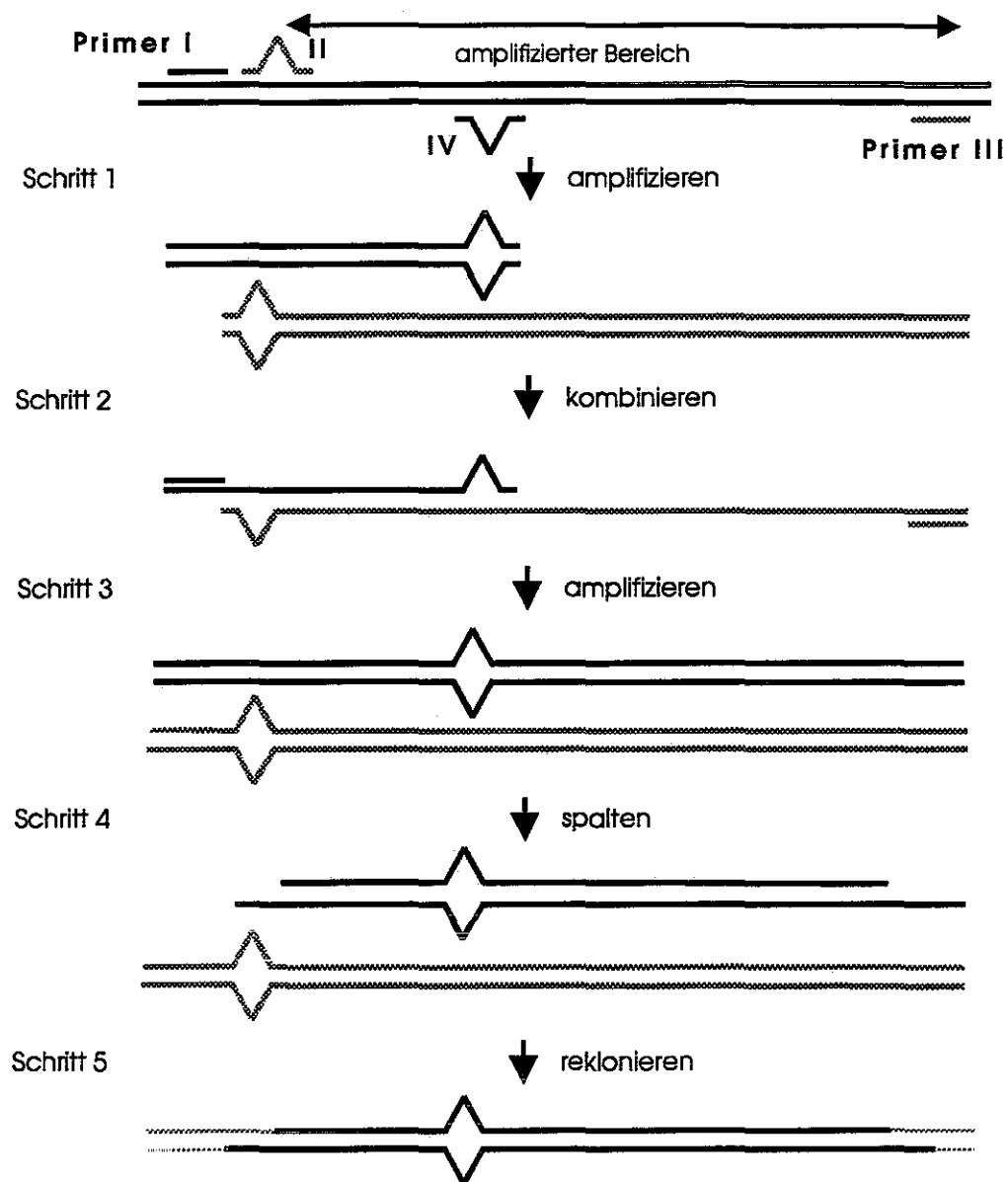


Abbildung 5: Ortspezifische Mutagenese mit der Polymerase-Kettenreaktion nach Ito et al., (1991).

2.18 Unspezifische Mutagenese

Die Polymerase-Kettenreaktion bietet auch die Möglichkeit der unspezifischen Mutagenese. Die *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* besitzt keine 3'→5'-Proofreading Funktion (Tindall & Kunkel, 1988). Aus diesem Grund liegt die Fehlerrate bei der Amplifizierung bei etwa 10^{-4} Fehlern pro eingebautem Nukleotid (Zhou *et al.*, 1991). Bei Veränderung der Reaktionsbedingungen kann die Fehlerrate weiter gesteigert werden (Leung *et al.*, 1989).

Reaktionsansätze:

Ansätze	Standard	Veränderung
1	Standard	
2	250 μ M ATP	100 μ M ATP
3	250 μ M dNTP	100 μ M dNTP
4	kein Mn^{2+}	0,5 mM Mn^{2+}
5	10 ng Template	1 ng Template

Reaktionsbedingungen:

Time Delay file	94°C	3 min
Thermo Cycle file	94°C	1 min
	55°C	2 min
	72°C	3 min
Soak file	4°C	
Segment extension		
für Amplifizierung:	10 sec	
Anzahl der Zyklen:	30	

Die zu mutagenisierende DNA-Region wurde unter Verwendung der angegebenen Primer amplifiziert. Der 5'-Primer, Oligonukleotid 1, trägt eine *Nco*I Schnittstelle, der Primer 2 eine *Hind*III Spaltstelle. Nach der Amplifizierung wurden die gewonnenen Fragmente aufgereinigt, gespalten und in den vorbereiteten Vektor kloniert.

Primer 1: 5'-[CGCAGCTGACTTCCATGGGCAAGA]-3'

Primer 2: 5'-[CCAGTGCCAAGCTTGCATGC]-3'

2.19 DNA-Sequenzierung

Mit Hilfe der Didesoxynukleotid-Terminationsmethode nach Sanger *et al.* (1977) wurde die Sequenzierung von DNA Fragmenten durchgeführt. Die ursprüngliche Methode verwendet radioaktiv markierte Nukleotide, die es ermöglichen, die DNA Fragmente durch Autoradiographie sichtbar zu machen. Bei der hier eingesetzten Vorschrift werden stattdessen Fluoreszein-markierte Primer verwendet. Der Nachweis der entstehenden Reaktionsprodukte erfolgt direkt während der Elektrophorese auf dem A.L.F.-Sequencer (Automated Laser Fluoreszenz), der die Anregung (mit Hilfe eines Laser-Strahls), sowie die automatische Detektion und Aufzeichnung des Fluoreszenz-Signals durchführt (Ansorge *et al.*, 1987).

Polyacrylamid-Gelelektrophorese:

Ohrenplatte und Thermoplatte wurden nach Reinigung mit 10 % SDS Lösung, H₂O und Ethanol mit Bind-Silan Lösung (0,4 ml Bind-Silan, 0,1 ml Essigsäure 10 %) eingerieben (oberer Rand der Platten). Zum Aufbau der Gelapparatur wurden die beiden Platten, die Spacer und der Light-Coupler zur Ausrichtung des Laser-Strahls mit Schraubklammern fixiert. Die vorbereitete, filtrierte Polyacrylamid-Lösung (33,6 g Harnstoff, 24 ml PAA-Lösung, 4,8 ml TBE, ad 80 ml H₂O) wurde mit 70 µl TEMED und 280 µl APS-Lösung versetzt und das Gemisch mit Hilfe einer 50 ml Spritze zwischen die beiden Glasplatten gegeben. Anschließend wurde der Taschenformer eingesetzt und das Gel für die Polymerisation mindestens zwei Stunden horizontal gelagert.

Für die Sequenzierung der mutagenisierten *ilvA* Gene wurden sequenzspezifische Primer mit Fluoreszenz-Markierung hergestellt, aufgereinigt und zur Sequenzierung nach den angegebenen Bedingungen eingesetzt.

Lösungen:

10 x TBE: 121,14 g Tris-Base
51,32 g Borsäure
3,72 g Na-EDTA
ad 1 Liter

PAA: Acrylamid / bis-Acrylamid 19 : 1 in 20 % Lösung
100,00 g Acrylamid
5,26 g Bisacrylamid
ad 526,3 ml

APS: 100 mg Amoniumpersulfat
+ 980 µl H₂O

Sequenzierungsreaktion:**Denaturierung:**

6 μ g DNA in 8 μ l
Fluoreszenz-Primer 2 μ l
NaOH 1 N 1 μ l
mischen, 5 min bei 70°C denaturieren

Primer-Annealing:

bei 37°C wurden zugesetzt:
HCl 1N 1 μ l
Annealing Buffer 2 μ l
DMSO 3 μ l
mischen, 15 min bei 37°C inkubieren
je 2,5 μ l Nukleotidmix in Mikrotiterplatten geben

Kettenverlängerung:

Extension-Buffer 1 μ l
T7 Polymerase (1 U/ μ l) 2 μ l
mischen, je 4,5 μ l auf vorbereitete Mikrotiterplatten geben
5 min inkubieren und Reaktion mit 5 μ l Stop-Solution abstoppen
5 min bei 80°C denaturieren
Gesamtansatz auf das Gel auftragen

Lösungen:

A Mix:	ddATP in Lösung mit dATP, dCTP, c ⁷ dGTP und dTTP
C Mix:	ddCTP in Lösung mit dATP, dCTP, c ⁷ dGTP und dTTP
G Mix:	ddGTP in Lösung mit dATP, dCTP, c ⁷ dGTP und dTTP
T Mix:	ddTTP in Lösung mit dATP, dCTP, c ⁷ dGTP und dTTP
T7 DNA Polymerase:	in gepufferter Glycerin-Lösung
M13 Universal Primer:	5'-Fluorescein-d[CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT]-3' in wässriger Lösung 0,5 μ M (0,5 pmol/ μ l)
M13 Reverse Primer:	5'-Fluorescein-d[TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC]-3' in wässriger Lösung 0,5 μ M; 0,14 A ₂₆₀ units/ml
Annealing Buffer:	gepufferte Lösung mit MgCl ₂
Extension Buffer:	gepufferte Lösung mit DTT
Enzyme Dilution Buffer:	gepufferte Lösung mit Glycerin, BSA und DTT
DMSO:	Dimethylsulfoxid
Stop Solution:	deionisiertes Formamid / Bluedextran

Sequenzspezifische Primer

1	1172	5'Fluorescein-d[GGAGACTGTTGATCCCTTTG]-3'	1191
2	1381	5'Fluorescein-d[CCTTTGCACCTGGTTCTGTC]-3'	1400
3	957	5'Fluorescein-d[GGTCAGGGCACCGTGGCTGCTG]-3'	978
4	1586	5'Fluorescein-d[CCTCAAGCGCAACAACCGTGAG]-3'	1607

Angegeben ist die Nukleotidfolge der Oligonukleotide und ihre Position in der *ilvA* Sequenz (Abbildung 9).

Gel-Elektrophorese und Auswertung: Systemeinstellungen

Strom	38	mA
Spannung	1500	Volt
Leistung	34	Watt
Temperatur	50	°C
Laser-Power	3	
Laufzeit	300	min
Signal-Detektion	2	pro Sekunde

2.20 Computer-gestützte Sequenzanalyse

Die Auswertung der Daten aus der DNA-Sequenzierung wurde mit dem Programm PC-Gene (IntelliGenetics) vorgenommen. Zur Datenbankrecherche, Kodierbereichsanalyse und für Homologievergleiche wurden die Programme aus dem HUSAR Paket 2.1 bzw. 3.0 (DKFZ, Heidelberg) angewendet. Zur weiteren Analyse wurden je nach Anforderungen verschiedene weitere Programme verwendet, wie in Tabelle 4 dargestellt.

Kodierbereichsanalyse: Codonpreference

Der Codonpreference Plot (Gribskov *et al.*, 1984) wurde eingesetzt, um kodierende Regionen in sequenzierten DNA Fragmenten zu lokalisieren. Diese computer-gestützte Analyse der Sequenzdaten ermöglichte es weiterhin, das relative Level der Expression und DNA-Sequenzierungsfehler (Insertionen oder Deletionen) zu erfassen. Diese Methode stützt sich auf den Unterschied im Codongebrauch zwischen Genen und Nicht-Gen-Bereichen der DNA. Für jede Position wird in allen drei Leserastern der Grad der Übereinstimmung mit einer vorher definierten Codon-Häufigkeitstabelle (Programm Codonfrequency) (siehe Anhang) ermittelt. Hierzu wurden alle in der EMBL Nukleotid-Datenbank verfügbaren *C. glutamicum* Gene herangezogen. Die Codonpreference Statistik erfaßt die Häufigkeit eines einzelnen Codons sowie die Frequenz aller Codons für eine Aminosäure (synonyme Familie). Lokalisiert werden die möglichen offenen Leseraster, Start- und Stopp-Codons. Als seltene Codons werden jene Codons

geführt, die weniger als 5 % der synonymen Familie ausmachen. In nicht-codierenden Regionen liegt ein hoher Anteil von seltenen Codons vor, schwach exprimierte Regionen weisen eine relativ hohe Zahl an seltenen Codons auf. Die Darstellung der Analyse besteht in einer dreiteiligen Graphik, in der für jedes der drei Leseraster die Codierwahrscheinlichkeit, Start und Stopp-Codons und seltene Codons eingetragen sind.

Homologiestudien / Datenbankrecherche

Die Programme Fasta und Blasta nutzen den Algorithmus von Lipman und Pearson (1985). Diese Methode ermöglicht die Suche nach Ähnlichkeiten zwischen einer neu bestimmten Aminosäuresequenz und in einer Datenbank verfügbaren Sequenzen. Der ursprünglich entwickelte Algorithmus von Wilbur und Lipman (1983) identifiziert Übereinstimmungen oder Gruppen von Übereinstimmungen sehr schnell mit Hilfe einer Methode, die als "lookup-table" bezeichnet wird. Beim Vergleich der Proteinsequenzen wird die Aminosäure-Austausch-Matrix (PAM-Matrix), von Dayhoff (Schwartz & Dayhoff, 1978) verwendet und seltene Übereinstimmungen von Aminosäuren stärker gewichtet als solche, die häufig auftreten.

Sekundärstrukturanalysen

Zur Voraussage der Sekundärstruktur von Peptidsequenzen wurden hauptsächlich die Programme Pepplot, Peptidestructure und Predict aus dem HUSAR Programm Paket 2.1 und 3.0 verwendet. Die Programme Pepplot und Peptidestructure ermöglichen es, verschiedene Eigenschaften der Proteinsequenz in einer graphischen Darstellung zu erfassen. Mit Hilfe des Programmes Pepplot kann außerdem eine Ausgabedatei erzeugt werden, die die Sekundärstruktur-Voraussagen nach den Methoden von Chou & Fasman (1974) und Garnier *et al.*, (1978) für jede Aminosäure in der Peptidsequenz angibt. Chou & Fasman und Garnier *et al.*, verwendeten statistische Methoden, die die Eigenschaften der Aminosäuren in bekannten Proteinstrukturen berücksichtigen. Das Programm Predict wurde zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Mutationen auf die Sekundärstruktur der Threonindehydratase verwendet. Die Methode erstellt Sekundärstruktur-Voraussagen nach vier verschiedenen Verfahren (Alb, Jamsek, Simpa, Gor (Mrazek *et al.*, (1988); Garnier *et al.*, 1978). Zur Betrachtung der Hydrophobizität der Aminosäuresequenzen wurden die Darstellungen nach Kyte & Doolittle (1982) verwendet sowie für die Darstellung begrenzter Proteinabschnitte die Programme Net (Dunnill, 1968) und Wheel (Schiffer & Edmundson, 1967) eingesetzt.

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Computer-Programme und Systeme

Programm	Anwendung	Zugang / Quelle
HUSAR	Kodierbereichsanalyse, Datenbankrecherche, Sekundärstrukturanalyse	DKFZ Heidelberg
Gemnon	Sekundärstrukturanalyse	Braunschweig GBF
PHD Neuronal Net	Sekundärstrukturanalyse	Heidelberg EMBL; Rost & Sander, 1993b
BRAGI	Darstellung und Modellierung von 3 D Strukturen	Braunschweig GBF; Schomburg & Reichelt, 1988
Insight II	Darstellung und Modellierung von 3 D Strukturen	Dayringer, 1986
Molscript	Darstellung von Proteinstrukturen	Kraulis, 1988

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des Threonindehydratase Gens *ilvA* und dessen Genproduktes

Der wichtigste Mechanismus zur Regulation von Biosynthesewegen ist die feedback-Hemmung desjenigen Enzyms, das den ersten Schritt im Biosyntheseweg katalysiert. Dieses Regulationsprinzip wurde durch Umbarger erstmals am Beispiel der feedback-Hemmung der Threonindehydratase aus *E. coli* durch Isoleucin beschrieben (Umbarger & Brown, 1956). Vor den Experimenten zur Aufhebung des Regulationsmechanismus der Threonindehydratase stand daher die biochemische Charakterisierung der Threonindehydratase und die genetische Charakterisierung des kodierenden Gens.

3.1.1 Kinetische Analyse der Threonindehydratase

Das erste Ziel der Untersuchungen war, durch die Bestimmung der kinetischen Eigenschaften (Parameter V_{max} , $K_{0,5}$ und des Hill-Koeffizienten) die Regulation der Threonindehydratase aus *Corynebacterium glutamicum* zu charakterisieren.

Die wichtigen Voraussetzungen für diese Untersuchungen waren ein *C. glutamicum* Stamm, in dem die Threonindehydratase hoch exprimiert werden konnte sowie ein sensitiver Enzymtest für die Analyse der Regulation des Enzyms. Zur Konstruktion des verwendeten Stammes wurde ein Exonuklease III Deletionsfragment von 1537 bp verwendet (siehe Sequenzanalyse, Abbildung 9). Auf diesem Fragment sind alle notwendigen Signalsequenzen für Transkription und Translation des *ilvA* Gens in *C. glutamicum* vorhanden. Als *E. coli* / *C. glutamicum* Shuttle-Plasmid diente der Expressionsvektor pEKEx2 (Eikmanns et al., 1991b), der über einen induzierbaren *tac*-Promotor verfügt. Das Insert-Fragment wurde als *EcoRI* Fragment aus pBM1/Exo8 isoliert, in den *EcoRI* geschnittenen Vektor pEKEx2 ligiert und in den *Escherichia coli* Stamm JM109 transformiert. Die Ligation des Fragmentes erfolgte in beiden möglichen Orientierungen zur Leserichtung des induzierbaren *tac*-Promotors des Vektors pEKEx2. Die erhaltenen Plasmide pBM10 und pBM10_{inv}, mit dem *ilvA* kodierenden Fragment in, bzw. entgegen der *tac* Leserichtung, wurden mittels Elektroporation in den *C. glutamicum* Stamm ATCC 13032 transformiert.

Für die Untersuchung der kinetischen Eigenschaften der Threonindehydratase wurde der Stamm ATCC 13032 pBM10_{inv} verwendet. Rohextrakte dieses Stammes wurden gelfiltriert und konnten direkt im diskontinuierlichen Enzymtest eingesetzt werden. Dabei wurde das gebildete α -Ketobutyrat durch die Lactatdehydrogenase reduziert und an Hand der Abnahme des NADH die α -Ketobutyrat Konzentration bestimmt. Dieser neuentwickelte Enzymtest (der Stopp- und Neutralisierungsschritte enthält) ist wegen seiner Sensitivität besonders geeignet.

Für die Bestimmung der Anfangs-Reaktionsgeschwindigkeit der Threonindehydratase wurden 77 μg Rohextrakt und steigende Mengen Threonin eingesetzt. Die Enzymaktivität zeigte eine sigmoide Abhängigkeit von der Konzentration des Substrates Threonin (Abbildung 6 A). Im Eadie-Plot (Abbildung 7 A), der einen konkaven Kurvenverlauf zeigte, konnte ein deutliches Maximum der Reaktionsgeschwindigkeit (V) beobachtet werden, was die positive homotrophe Kooperativität des Enzyms eindeutig nachwies (Dahlquist, 1978). Wurden die Messungen in Gegenwart von Isoleucin (0,625 mM) ausgeführt (Abbildung 6 B), waren wesentlich höhere Substratkonzentrationen zur Sättigung nötig. Der sigmoide Kurvenverlauf der Substratsättigungskurve war deutlich stärker ausgeprägt. Die Threonindehydratase war in Anwesenheit von Isoleucin bei Konzentrationen, wo das Enzym ohne Isoleucin bereits halbmaximale Aktivität zeigte, inaktiv. Entsprechend der zunehmenden Kooperativität der Substratbindung zeigte sich eine Verschiebung des Maximums der Kurve in der Eadie-Auftragung (Abbildung 7 B). Demgegenüber wurde in Gegenwart von Valin (0,75 mM) die Sättigung des Enzyms schon bei geringeren Threonin Konzentrationen erreicht. Der Kurvenverlauf zeigte eine hyperbole Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Threoninkonzentration, wie bei einer Michaelis-Menten-Kinetik. Im Eadie-Plot wurde die fehlende Kooperativität der Substratbindung (Abbildung 7 C) durch eine Gerade beschrieben, aus deren Steigung sich die Substratkonzentration errechnen läßt, die für eine halbmaximale Sättigung des Enzyms erforderlich ist ($-1/K_{0,5}$).

Aus den Substratsättigungskurven wurden die in Tabelle 5 zusammengefaßten Daten für die kinetischen Parameter V_{max} , $K_{0,5}$ und den Hill-Koeffizienten berechnet. Der sigmoide Kurvenverlauf der Substratsättigungskurve wurde durch einen Hill-Koeffizienten von 2,4 beschrieben. Es wurde aus den Meßdaten ein V_{max} -Wert von 0,31 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ und ein $K_{0,5}$ von 21 mM errechnet. Bei Zugabe des negativen heterotropen Effektors Isoleucin stieg der $K_{0,5}$ -Wert um Faktor 3,7 auf 78 mM, was eine erniedrigte Affinität des Enzyms zu seinem Substrat Threonin anzeigte. Der Hill-Koeffizient von 3,7 beschreibt die Zunahme der Kooperativität durch einen negativen heterotropen Effektor. Der positive Effektor Valin bewirkte eine entgegengesetzte Verschiebung der kinetischen Parameter $K_{0,5}$ und des Hill-Koeffizienten und ermöglichte die Aktivierung des Enzyms. Dementsprechend sank der Hill-Koeffizient auf 1,2, was einen Verlust der Kooperativität in Gegenwart von Valin anzeigte. Der $K_{0,5}$ sank auf eine niedrige Substratkonzentration von 12 mM und V_{max} betrug 0,45 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$.

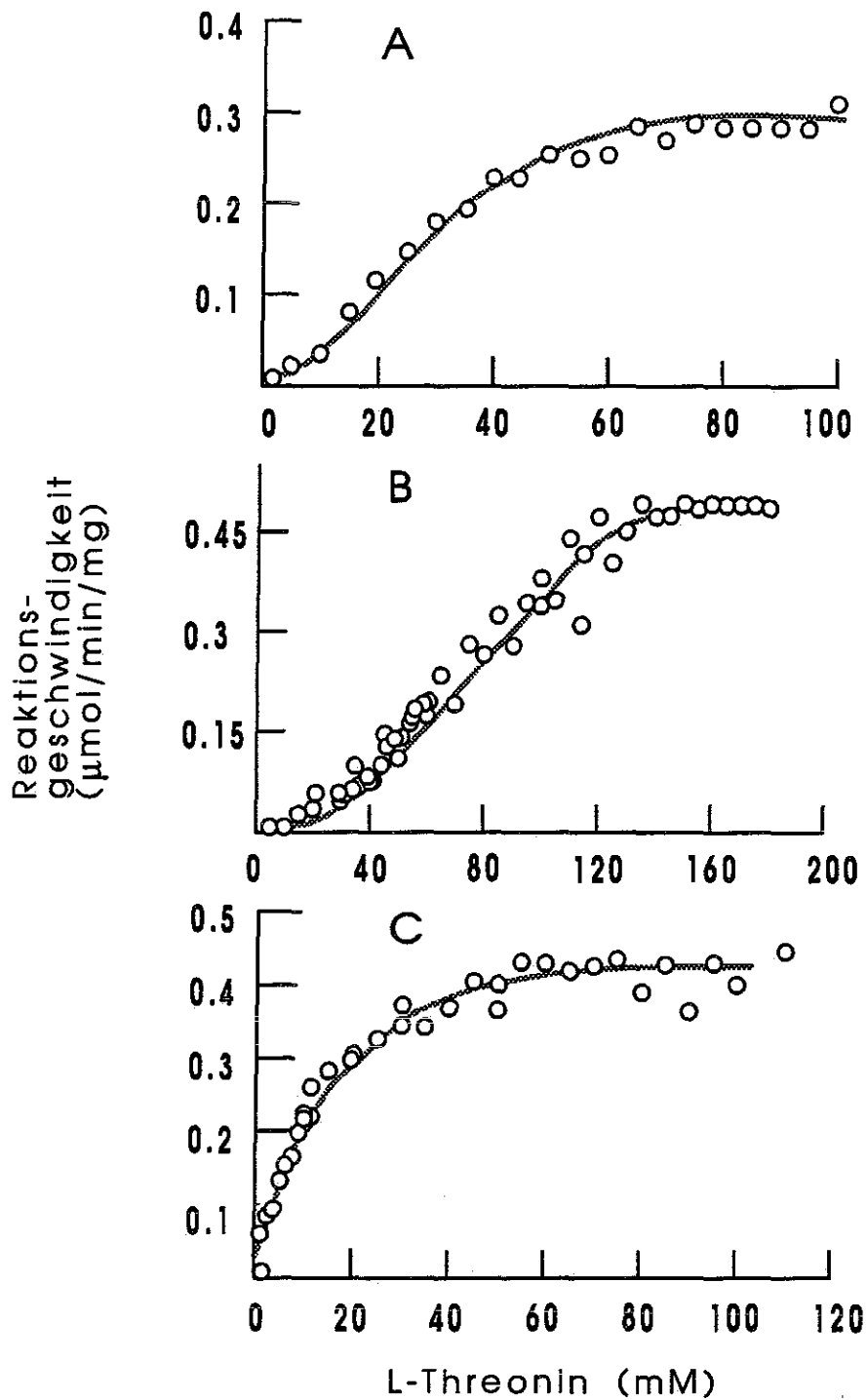


Abbildung 6: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Threonindehydratase aus *C. glutamicum* von der Substratkonzentration. Die Abbildung A zeigt die Substratsättigungskurve ohne Zugabe von Effektor, Bild B bei Zusatz von 0,625 mM Isoleucin und Bild C bei Zusatz von 0,75 mM Valin. In allen Ansätzen wurde 77 μg Protein eingesetzt. Die Messungen erfolgten mit dem Lactatdehydrogenase-Test.

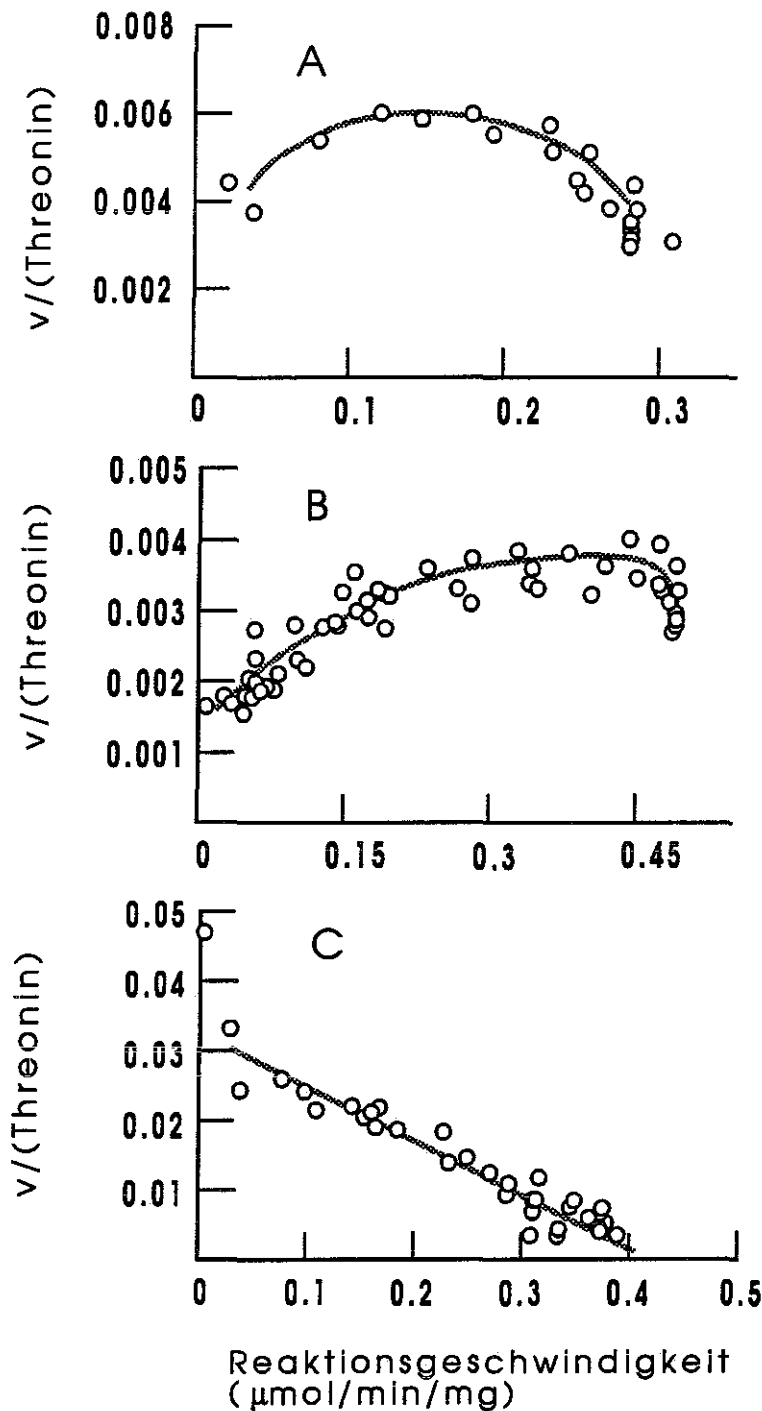


Abbildung 7: Eadie-Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit der Threonindehydratase aus *C. glutamicum* in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. Die Darstellung A zeigt die Auftragung ohne Zugabe von Effektor, Bild B bei Zusatz von 0,625 mM Isoleucin und Bild C bei Zusatz von 0,75 mM Valin.

Tabelle 5: Vergleich der kinetischen Parameter V_{max} , $K_{0,5}$ und nH der Threonindehydratase aus *Corynebacterium glutamicum* ohne Zugabe eines Effektor, mit Effektor Isoleucin und Valin. Die Enzymmessungen erfolgten mit dem Lactatdehydrogenase-Test. Aus den Messwerten der Substratsättigungskurven in Abbildung 7 wurden die angegebenen Parameter mit Hilfe der Hill-Gleichung durch eine nicht lineare Ausgleichsrechnung nach der Methode der kleinsten Quadrate (least-square fit) bestimmt (Johnson & Frasier, 1985).

Parameter	Effektor		
	ohne Effektor	Isoleucin 0,625 mM	Valin 0,75 mM
$V_{max} [\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}\cdot\text{mg}}]$	0,31	0,51	0,45
nH	2,4	3,7	1,2
$K_{0,5} [\text{mM}]$	21	78	12

Damit zeigte die Threonindehydratase aus *C. glutamicum* ein grundsätzlich ähnliches Verhalten bezüglich der Effektoren Isoleucin und Valin, wie es kürzlich für das Enzym aus *E. coli* beschrieben wurde (Eisenstein, 1991). Die physiologische Bedeutung der Isoleucin Inhibition ist offensichtlich, da durch diesen Regulationsmechanismus der Stofffluß durch den Biosyntheseweg kontrolliert wird. Ebenso wird durch die Aktivierung der Threonindehydratase durch Valin die Verfügbarkeit der Aminosäure Isoleucin reguliert.

3.1.2 Sequenzierung des Gens

Das Gen der Threonindehydratase *ilvA* war durch heterologe Komplementation einer Isoleucin-auxotrophen *E. coli* Mutante, die keine meßbare Aktivität der Threonindehydratase zeigte, isoliert worden (Cordes *et al.*, 1992). Zur Sequenzierung des *ilvA* Gens wurde aus dem Ausgangscosmid pCC4 (Cordes *et al.*, 1992) das 2,85 kb *Hind*III Fragment (Abbildung 8) rekloniert. Dieses Fragment wurde in beiden Orientierungen in den *Hind*III geschnittenen Vektor pUC18 ligiert. Von den erhaltenen Plasmiden pBM1 und pBM1_{inv} wurden mit Hilfe der Exonuklease III sukzessive Deletionen erzeugt. Dazu wurden die Plasmide mit *Bam*HI (Erzeugung 5'-überhängender Enden)

und mit *KpnI* (Erzeugung 3'-überhängender Enden) geöffnet und dann einer limitierten Exo III-Nuklease Behandlung unterzogen. Die unterschiedlich verkürzten Plasmide wurden durch Restriktionsanalyse überprüft und geeignete Deletionsklone ausgewählt. Die Nukleotidsequenz des *ilvA* Gens sowie der benachbarten Regionen wurde über einen Bereich von 1925 bp sequenziert. Nach der Didesoxy-Methode nach Sanger (1977) wurde die Sequenzierung unter Verwendung des AutoRead Sequencing KitsTM (Pharmacia/LKB, Freiburg) durchgeführt. Abbildung 8 zeigt die Sequenzierungsstrategie, nach der die Nukleotidsequenz in Abbildung 9 ermittelt wurde.

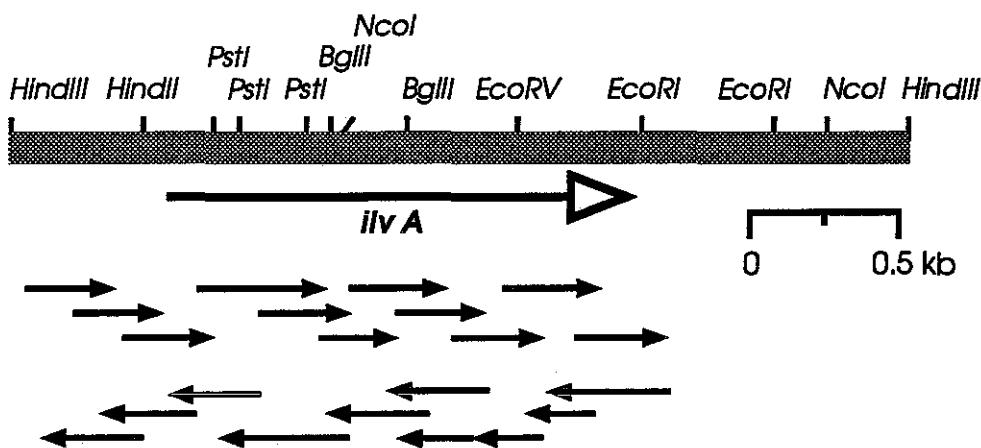


Abbildung 8: Restriktionskarte und Sequenzierungsstrategie für das chromosomale *HindIII* Fragment in pBM1 und pBM1_{inv}. Lage und Richtung der Transkription des Gens der Threonindehydratase (*ilvA*) sind eingezeichnet. In pBM1 wird *ilvA* in derselben Richtung wie *lacZ'* des Plasmids pUC18 transkribiert. Die Pfeile zeigen Lage und Orientierung der sequenzierten DNA-Fragmente.

Zur Identifizierung des Leserasters wurde eine Codierbereichsanalyse mit dem Programm "Codonpreference" durchgeführt (Gribkov et al., 1984) (Abbildung 10), wozu eine Codon-Häufigkeitstabelle (Anhang) aller zur Zeit bekannten Gensequenzen aus *C. glutamicum* erstellt wurde. Die Analyse der Leseraster ergab ein "Offenes-Leseraster" mit 4 möglichen Translationsstartpunkten bei den Nukleotiden 432, 447, 468 und 471. Da zur Identifizierung der potentiellen Ribosomenbindungsstelle des *ilvA* Gens die Sequenz des 3'-Endes der 16S ribosomalen RNA aus Corynebakterien nicht vorlag, wurde ein Sequenzvergleich mit den Shine-Dalgarno Sequenzen aus *E. coli* (Shine & Dalgarno, 1974) und *B. subtilis* (Moran et al., 1982) vorgenommen, die hohe Über-

CGCCATTGCTGAGCATTGAGCTGCCITTCAGAGCTGCCTGGCCAGGTTTCGTTTCCATCGACTGGATTTCATCATCATCAAGGATCTGTGATGAGGTGAT 100
 GTTGTCTGAGAGCTGTGTCACTGCGTCAGAGGACTGAGCCTGGGCAACTGGAGTGAACACGGACAATGCCACAGCGCTTGCTGTAACAAGGGTCAAAGTA 200
 CTTGACGCAAAAGACAAAACCTTTCTCCTGGCAATAAATATGCGGATTACTATGGAACAAGATAGAAGATTGGATAGCGAAAGCTATCCTCAACTCGT 300
 GGAAAGTGTAGTGCCACAACACAGTATTGGCTAGAAAACAATCTATAGCATTGTTCTACAAAGAGCTTGTTGGAAATAAAACCTATGCCAAAGTAGGTG 400
 CAATTCTAGGAGAAGATTACACTAGTCAACCATGAGTGAAACATACGTGTCTGAGAAAAGTCCAGGAGTGATGGCTAGCGGAGCGGAGCTGATTCTGTGCC 500
 RBS HindIII pBM10, pBM10inv
 M S E T Y V S E K S P G V M A S G A E L I R A
 pBM11
 GCCGACATTCAAACGGCGCAGGCACGAATTTCTCCGTCAATTGCACCAACTCCATTGCAGTATTGCCCTCGTCTTTCTGAGGAAACCGGAGCGGAAATCT 600
 A D I Q T A Q A R I S S V I A P T P L Q Y C P R L S E E T G A E I
 ACCTTAAGCGTGAGGATCTGCAGGATGTTCTGTTCTACAAGATCCGCGGTGCGCTGAACTCTGGAGCGCAGTCACCCCAAGAGCAGCGCGATGCAGGTAT 700
 Y L K R E D L Q D V R S Y K I R G A L N S G A Q S P Q E Q R D A G I
 CGTTGCCGATCTGCAGGTAAACCATGCCAGGGCGTGGCCTATGTGTGCAAGTCTTGGGCGTTTCAGGGACGCATCTATGTTCTGTGCAGACTCCAAAG 800
 V A A S A G N H A Q G V A Y V C K S L G V Q G R I Y V P V Q T P K
 CAAAAGCGTGACCGCATCATGTTTCACGGCGGAGAGTTTGTCTCCTTGGTGGTCACTGGCAATAACTTCGACGAAGCATCGGCTGCAGCGCATGAAGATG 900
 Q K R D R I M V H G G E F V S L V V T G N N F D E A S A A A H E D
 CAGAGCGCACCGGCGCAACGCTGATCGAGCCTTTTCGATGCTCGCAACACCGTCATCGGTCAGGGCACCGTGGCTGCTGAGATCTTGTGCGAGCTGACTTC 1000
 A E R T G A T L I E P F D A R N T V I G Q G T V A A E I L S Q L T S
 CATGGGCAAGAGTGAGATCACGTGATGGTTCCAGTCGGCGGTGGCGGACTTCTTGCAAGTGTGGTCAGCTACATGGCTGATATGGCACTCGCACTGCG 1100
 M G K S A D H V M V P V G G G G L L A G V V S Y M A D M A P R T A
 ATCGTTGGTATCGAACACGCGGAGCAGCATCCATGCAGGCTGCATTGCACAATGGTGGACCAATCACTTTGGAGACTGTTGATCCCTTTGTGGACGGCG 1200
 I V G I E P A G A A S M Q A A L H N G G P I T L E T V D P F V D G
 CAGAGGTCAAACGTGTGCGAGATCTCAACTACCATCGTGGAGAAGAACCAGGGTCGCGTGACATGATGAGCGGACCGAGGCGCTGTGTGTACTGA 1300
 A E V K R V G D L N Y T I V E K N Q G R V H M M S A T E G A V C T E
 GATGCTCGATCTTTACCAAACGAAGGCATCATCGGGAGCCTGCTGGCGCGCTGTCTATCGCTGGGTTGAAGGAAATGTCCTTTGCACCTGGTTCTGTC 1400
 M L D L Y Q N E G I I A E P A G A L S I A G L K E M S F A P G S V
 GTGGTGTGATCATCTCTGGTGGCAACAACGATGTGCTGCGTTATGCGGAAATCGCTGAGCGCTCCTTGGTGCACCGCGGTTTGAAGCACTACTTCTTGG 1500
 V V C I I S G G N N D V L R Y A E I A E R S L V H R G L K H Y F L
 TGAACCTCCCGCAAAAGCCTGGTCAGTTGCGTCACTTCCCTGGAAGATATCCTGGGACCGGATGATGACATCAGCTGTTTGAGTACCTCAAGCGCAACAA 1600
 V N F P Q K P G Q L R H F L E D I L G P D D D I T L F E Y L K R N N
 CCGTGAGACCGGTACTGCGTTGGTGGGATTCACTTGAGTGAAGCATCAGGATTGGATTCTTTGCTGGAACGATATGGAGGAATCGGCAATTGATTCCCGT 1700
 R E T G T A L V G I H L S E A S G L D S L L E R M E E S A I D S R
 CGCCTCGAGCGGGGCACTCCTGAGTACGAATACTTGACCTAAACATAGCTGAAGGCCACCTCAATCGAGGTGGCCCTTTTCTAGTTTCGGGTCAGGATCG 1800
 R L E P G T P E Y E Y L T
 CAAAGCCCCACGGCTGAAGGGTTGTGGAGGTGTGCGTGACGGTGGGGGAAGTGAAGCTGTAAATCAGCTCGCCGCAAGCGGGACGGTGATGGTGTGCTC 1900
 EcoRI
 GGAGAAATTCGCCAGAATTCGGCCG

Abbildung 9: Nukleotidsequenz des Gens der Threonindehydratase (*ilvA*) aus *C. glutamicum* und der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz. Die potentielle Ribosomen-Bindungsstelle und der Transkriptions-Terminator sind unterstrichen. Die Pfeile kennzeichnen die 5'-Enden der Insertionen in den Deletionsplasmiden pBM10_{inv} und pBM11.

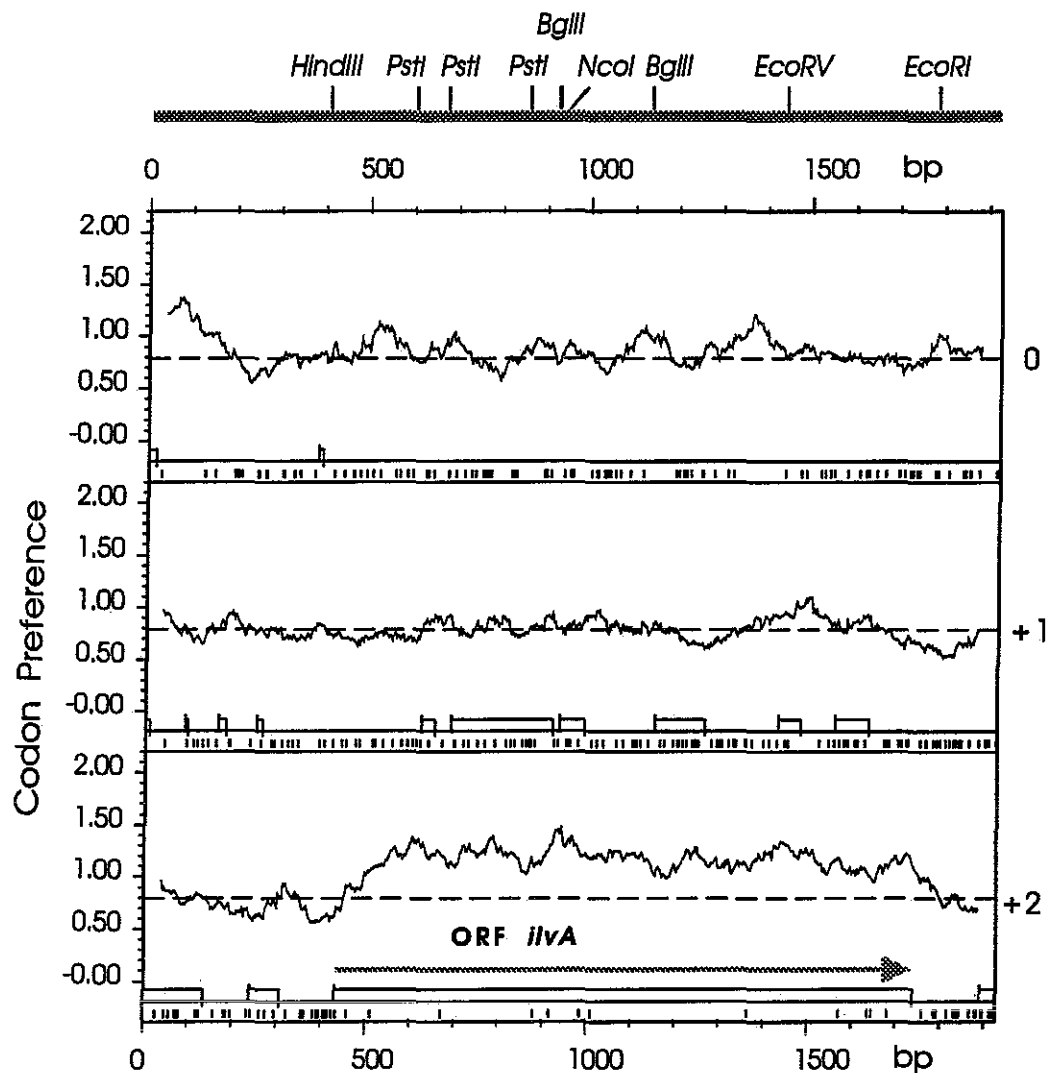


Abbildung 10: Codierbereichsanalyse des Gens der Threonindehydratase und angrenzender Bereiche nach Gribskov et al., (1984).

Abgebildet sind die drei möglichen Leseraster (0, +1, +2) eines DNA Stranges (5'→3' Richtung). Die gepunktete Linie kennzeichnet die Codierwahrscheinlichkeit für eine Zufallssequenz mit der gleichen Zusammensetzung wie die Codonhäufigkeitstabelle. Unter der Codierwahrscheinlichkeits-Statistik sind offene Leseraster als Rechtecke gekennzeichnet. ATG Startcodons und Stoppcodons sind als vertikale Striche auf dieser Zeile angegeben. Seltene Codons (5 % einer synonymen Familie oder weniger) sind als Striche unterhalb der Leseraster Auftragung dargestellt.

einstimmung mit den Ribosomenbindungsstellen bei corynebacteriellen Genen zeigen (Martin, 1989). Stromaufwärts der codierenden Region des *ilvA* Gens wurde eine Sequenz identifiziert, die deutliche Ähnlichkeit zu der komplementären Sequenz des 3'-Endes der 16S rRNA aus *B. subtilis* zeigte (Moran *et al.*, 1982). Bei den Nukleotiden 408 bis 417 5'-AGGAGAAGAT-3' liegt eine mögliche Ribosomenbindungsstelle. Diese Nukleotidfolge liegt 20 Nukleotide vor dem ATG Codon in Position 432, das daher den potentiellen Startpunkt der Translation darstellt.

Das Stoppcodon, welches das offene Leseraster terminiert, liegt bei Nukleotid 1740. Neun Nukleotide stromabwärts der *ilvA* codierenden Region liegt ein Bereich, der eine invertierte Basenwiederholung aufweist und dem eine Reihe von Thymidin Nukleotiden folgen. Aus dieser Sequenz konnte ein korrespondierender mRNA "hairpin loop" mit einer freien Energie von ΔG° (25°C) von -25,4 kcal/mol (-106,3 KJ/mol) (Williams & Tinoco, 1986; Tinoco, 1973), abgeleitet werden. Die Struktur dieses Bereiches ist vergleichbar mit derjenigen von ρ -unabhängigen Terminatoren aus *E. coli*, die eine GC-reiche "stem-loop" Struktur zeigen, wobei sich an der Spitze des "hairpins" in typischer Weise eine Folge von vier Nukleotiden befindet (Rosenberg & Court, 1979). Durch diese identifizierten Signalsequenzen wird ein Leseraster eingegrenzt, das eine Länge von 1308 Nukleotiden besitzt, was einem Protein von 436 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 46.599 Da entspricht. Die Nukleotidsequenz weist den für *C. glutamicum* charakteristischen GC-Gehalt von 55 % auf.

3.1.3 Untersuchungen zur Expression des *ilvA* Gens

Bisher liegen keine Consensussequenzen vor, die eine Identifizierung von *C. glutamicum* Promotorsequenzen an Hand der DNA-Sequenz ermöglichen (Schwinde *et al.*, 1993). Daher wurden Untersuchungen der Expression des Gens der Threonindehydratase durchgeführt, um neben der Sequenzinformation weitere Aufschlüsse über die Lage von Promotor und Ribosomenbindungsstelle zu erhalten. Dazu wurden die Plasmide pBM10, pBM10_{inv}, pBM11 und pBM11_{inv} verwendet. In pBM10, pBM10_{inv} liegt ein 1537 bp *EcoRI* Fragment mit dem *ilvA* Gen in, bzw. entgegen der Leserichtung des *tac*-Promotors im Plasmid pEKEx2 vor. Zur Konstruktion der Plasmide pBM11, pBM11_{inv} wurde ein um 49 Nukleotide am 3'-Ende verkürztes Fragment durch *HindII* Spaltung des 1537 bp Fragmentes erstellt (Abbildung 9). Das Fragment wurde in den Vektor pEKEx2 (*EcoRI* gespaltenen, mit Klenow Polymerase aufgefüllte Enden) ligiert. Das *HindII* - *EcoRI* Fragment in den Vektoren pBM11, pBM11_{inv} trägt die gesamte *ilvA* kodierende Region, der *HindII* Schnitt befindet sich zwischen der durch Computeranalysen vorausgesagten Ribosomenbindungsstelle und dem möglichen Translationsstart. In dem erstellten Plasmid pBM11 liegt das *ilvA* Gen in Leserichtung des induzierbaren *tac*-Promotors des Vektors pEKEx2 vor.

Die erhaltenen Plasmide pBM11, pBM11_{inv} sowie die Plasmide pBM10 und pBM10_{inv}, wurden in den *C. glutamicum* Stamm ATCC 13032 durch Elektroporation transfor-

Tabelle 6: Spezifische Threonindehydratase-Aktivität in *E.coli* DH5 und *C. glutamicum* ATCC 13032 mit den Plasmiden pEKE_x2, pBM10, pBM10_{inv}, pBM11 und pBM11_{inv}. Die Anzucht der Stämme erfolgte in LB Medium. Die Induktion der Enzymsynthese erfolgte durch IPTG Induktion.

Stamm		Plasmid	Induktion – + spez. Aktivität [U/mg]	
<i>E. coli</i>	DH5	pEKE _x 2	<0,01	<0,01
<i>E. coli</i>	DH5	pBM10	<0,01	1,60
<i>E. coli</i>	DH5	pBM10 _{inv}	<0,01	<0,01
<i>C. glutamicum</i>	ATCC 13032	pEKE _x 2	0,06	0,05
<i>C. glutamicum</i>	ATCC 13032	pBM10	1,80	2,10
<i>C. glutamicum</i>	ATCC 13032	pBM10 _{inv}	1,90	2,10
<i>C. glutamicum</i>	ATCC 13032	pBM11	0,07	0,09
<i>C. glutamicum</i>	ATCC 13032	pBM11 _{inv}	0,06	0,06

miert. Mit Hilfe dieser Konstrukte wurde im folgenden untersucht, ob auf den klonierten Fragmenten die Signalsequenzen zur Transkription und Translation des *ilvA* Gens vorhanden waren bzw. ob nach Induktion der Transkription vom plasmidkodierten *tac*-Promoter aus, die Translation des *ilvA* Genproduktes von der Ribosomenbindungsstelle des Gens aus erfolgt. Dazu wurde zunächst die Aktivität der Threonindehydratase (ohne IPTG Induktion des *tac*-Promotors) in den verschiedenen Stämmen bestimmt. In Tabelle 6 sind die Ergebnisse von Expressionsstudien der rekombinanten *C. glutamicum* Stämme dargestellt. Die Plasmide pBM10 und pBM10_{inv} ermöglichten auch ohne Induktion der Transkription die Überexpression des *ilvA* Genes in *C. glutamicum* von 1,800 µmol/min/mg. Diese Befunde, die einer etwa 30 fachen Aktivität des Wildtyp Stammes ATCC 13032 entsprachen, zeigten an, daß alle notwendigen Informationen für Transkription und Translation auf diesem Fragment vorhanden waren. Die Untersuchungen in *E. coli* zeigten jedoch, daß die Konstrukte pBM10 und pBM10_{inv} keine unter diesen Versuchsbedingungen meßbare Überexpression der Threonindehydratase aus *C. glutamicum* im heterologen System ermöglichten. Es ist jedoch gezeigt worden, daß die Komplementation der *ilvA* negativen *E. coli* Mutante CU406 durch diese

Konstrukte erfolgt.

Durch IPTG Induktion wurde eine deutliche Überexpression des *ilvA* Gens in *E. coli* pBM10 erreicht. Die Ribosomenbindungsstelle des *ilvA* Gens wurde also auch im Gram⁻ Organismus effizient genutzt, da die Proteinbildung nach Induktion der Transkription in hohem Maße erfolgte. In *C. glutamicum* war vom Plasmid pBM11, pBM11_{inv} aus jedoch auch nach IPTG Induktion keine Überexpression der Threonindehydratase meßbar. Dies bedeutet, daß im Plasmid pBM11 keine funktionierende Ribosomenbindungsstelle vorhanden war, sodaß keine Translation des Transkriptes erfolgen konnte. Diese Befunde demonstrieren eine enge Nachbarschaft von Promotor und Ribosomenbindungsstelle, was ebenfalls für eine Reihe von Genen aus *Streptomyces* (Strohl, 1992) und das *thrC* Gen (Han et al., 1990) aus *C. glutamicum* dargelegt worden ist.

3.1.4 Untersuchungen zur Lokalisierung des *ilvA* Gens im Genom

Die Gene, die für die Enzyme des Isoleucin-Biosyntheseweges kodieren, liegen in verschiedenen Organismen als Operon oder auch eng benachbart vor. Bei den Enterobacteriaceen sind die Gene für vier der fünf Enzyme des Isoleucin-Biosyntheseweges im *ilvG-MEDA* Operon lokalisiert, *ilvC* und die Gene für zwei Isoenzyme der Acetohydroxysäuresynthase AHAS *ilvIH* und *ilvBN* liegen getrennt vor (Squires et al., 1981; Wek & Hatfield, 1986; Lawther et al., 1987). In *B. subtilis* findet man die Gene *ilvBNC* und *ilvAD* jeweils in einem Operon lokalisiert (Mackey et al., 1984; Piggot & Hoch, 1985; Grandoni et al., 1992) und *Lactococcus lactis* weist ein *ilvDBNCA* Operon auf (Godon et al., 1992). Aus *C. glutamicum* ist neben dem *ilvA* Gen der *ilvBNC* Gencluster isoliert und sequenziert, der für die Acetohydroxysäuresynthase AHAS und die Isomeroeductase kodiert (Cordes et al., 1992; Keilhauer et al., 1993). Um eine Lokalisierung des *ilvA* Gens relativ zur Lage des *ilvBNC* Genclusters im Genom von *C. glutamicum* zu charakterisieren, wurde durch eine Southern-Blot Analyse die genomische Organisation analysiert.

Für die Hybridisierungsstudien wurden zwei verschiedene DNA-Sonden verwendet, wobei eine Sonde für das *ilvA* Gen und eine zweite DNA-Probe für den *ilvBNC* Gencluster hergestellt wurde. Als *ilvA* spezifische Sonde wurde das 2,85 kb *Hind*III Fragment (Abbildung 11) aus pBM1 gewählt. Aus dem *ilvBNC* Operon wurde ein internes *Dra*I – *Sph*I 2,3 kb Fragment isoliert (Keilhauer et al., 1993). Beide Fragmente wurden Digoxigenin-dUTP markiert. Zur Kartierung der chromosomalen Umgebung der beiden Gen-Fragmente wurde chromosomale DNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 mit Restriktionsenzymen gespalten, die resultierenden DNA Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nylonmembranen übertragen und gegen die *ilvA* bzw. *ilvBNC* spezifische Sonde hybridisiert.

Es wurden insgesamt 15 verschiedene Restriktionsenzyme zur Spaltung der chromosomalen DNA verwendet, wobei bevorzugt solche Enzyme eingesetzt wurden, die im

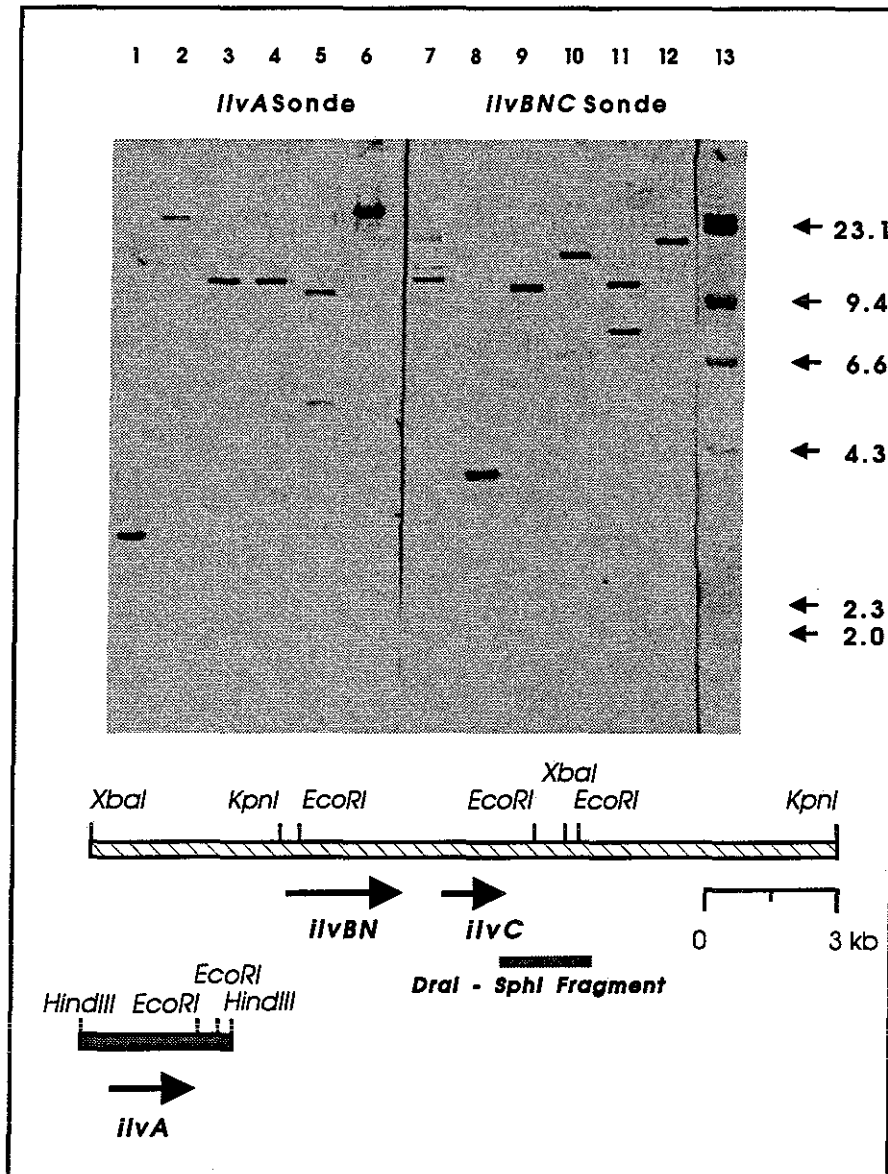


Abbildung 11: Southern-Hybridisierung zur Lokalisierung des *ilvA* Gens und des *ilvBNC* Operons im Genom von *C. glutamicum*. Im oberen Teil sind die Ergebnisse der Filterhybridisierung dargestellt; der untere Teil zeigt die abgeleitete Kartierung der Lage des *ilvBNC* Operons.

Chromosomale DNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde mit den Restriktionsenzymen *HindIII* (Spur 1 und 7), mit *DraI* (Spur 2 und 8), *KpnI* (Spur 3 und 9), *XbaI* (Spur 4 und 10), *BglII* (Spur 5 und 11) und *HpaI* (Spur 4 und 12) gespalten. In Spur 13 ist als Molekulargewichtsmarker *HindIII* gespaltene λ -DNA aufgetragen. Die Spuren 1 bis 6 wurde mit der *ilvA* spezifischen Digoxigenin-UTP markierten Sonde hybridisiert; für die Spuren 7 bis 12 wurde die *ilvBNC* Probe verwendet.

C. glutamicum Genom selten schneiden. Bei keinem der Ansätze fand sich mit den beiden Sonden ein identisches Hybridisierungsmuster. Das *ilvA* Gen und der *ilvBNC* Gencluster liegen daher räumlich getrennt im Genom von *C. glutamicum* vor. In Abbildung 11 ist eine Auswahl der Ansätze eines solchen Hybridisierungs-Experimentes gezeigt, in dem die chromosomale DNA mit den Enzymen *Hind*III, *Dra*I, *Kpn*I, *Xba*I, *Bgl*II und *Hpa*I gespalten wurde. Da die *Kpn*I und *Xba*I Schnittstellen im *ilvBNC* Operon durch die Sequenzierung identifiziert wurden (Keilhauer et al., 1993), ist die Kartierung der chromosomalen Umgebung des *ilvBNC* Operons möglich. In beide Richtungen, von der Position des *ilvBNC* Operons aus, erlaubte dieser Ansatz, die minimale Entfernung der beiden Gen-Fragmente zu bestimmen. Aus den Daten wurde errechnet, daß das *ilvA* Gen und der *ilvBNC* Gencluster mindestens 6 kb voneinander entfernt im Genom von *C. glutamicum* liegen.

3.1.5 Bestimmung des nativen Molekulargewichtes der Threonindehydratase

Für die Bestimmung des Molekulargewichtes des nativen Threonindehydratase Enzyms wurde ein Extrakt von *C. glutamicum* ATCC 13032/pBM10_{inv} verwendet. Das *ilvA* Gen liegt in diesem Stamm auf dem Multicopy-Plasmid pEXEx2 vor, sodaß eine schnelle und einfache Bestimmung auch in verdünnten Rohextraktfraktionen möglich wurde. Durch Gelfiltration wurde ein Molekulargewicht von 210.000 ± 20.000 Da bestimmt. Dieser Wert entspricht etwa den Molekulargewichten, die für die Enzyme aus *Salmonella typhimurium* (Hatfield & Burns, 1970), *Brevibacterium flavum* (Miyajima & Shio, 1972) und *Bacillus subtilis* (Hatfield & Umbarger, 1970b; 1971) ermittelt wurden.

Da das aus der Nukleotidsequenz abgeleitete Translationsprodukt eine molare Masse von 46.599 Da aufwies, ergab sich aus dem apparenten Molekulargewicht des nativen Enzyms, daß die Threonindehydratase aus *C. glutamicum* ein Tetramer aus vier identischen Untereinheiten darstellt. Die berechnete Masse des Tetramers beträgt 186.396 Da. Somit entspricht der Aufbau des Enzyms aus *C. glutamicum* dem Aufbau der Threonindehydratase aus *Escherichia coli* (Cox et al., 1987; Lawther et al., 1987) und Tomate *Lycopersicon esculentum* (Samach et al., 1991).

3.1.6 Homologievergleich der Peptidsequenz

Der Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz des *ilvA* Gens aus *C. glutamicum* mit den Sequenzen anderer Threonindehydratase und weiteren Proteinen ähnlicher Funktion, sollte zum Verständnis der strukturellen Organisation des Proteins und der Identifizierung von funktionellen Domänen dienen. Mit Hilfe von Datenbankrecherchen in den Protein- und Nukleotid-Datenbanken (Programme FASTA und BLASTA) wurden Proteine identifiziert, die Ähnlichkeiten zur Aminosäuresequenz der Threonindehydratase aufwiesen.

<i>Cg ilvA</i>	MSETYVSEKSPGVMASGAELIRAADIQTAQARISSVIAPTPLQYCPRLSEETGAEIYLKR	60
<i>Ec ilvA</i>	MADSQPLSGAPEGAELRAVIRAPVVEAAQV-----TPLQKMEKSSRDNDVILVKE	52
<i>Ec tdc</i>	MHITYDLPVAIDDIIEAKQRLAGRIYK-----TGMPRSNYFSERCKGEIFLKF	49
	• ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ • ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	
<i>Cg ilvA</i>	EDLQDVRSYKIRGALNSGAQSPQEQRDAGIVAASAGNHAQGVAYVCKSLGVQGRIVVPVQ	120
<i>Ec ilvA</i>	EDRQPVHSEKIRGAYAMMAGITEEQKAHGVITASAGNHAGGVAFSSARIGVKALIVMTA	112
<i>Ec tdc</i>	ENMQRTGSFKIRGAFNKLSSLTDAEKRGVVACSAGNHAQGVSLSCAMLGIDGKVMPKG	109
	• ○ • ○ • ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ • ○ ○ ○ • ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ • ○ ○ ○ ○ ○ ○	
<i>Cg ilvA</i>	TPKQKRDRIMVHGGEFVSLVVTGNNFDEASAAAHEDAERTGATLIEPFDARNTVIGQGTV	180
<i>Ec ilvA</i>	ADLVVDVARGFGE---VLHGANDEKAKAIEISQQQFTWVPEPDHEMIIAGGGTL	169
<i>Ec tdc</i>	APKSKVAATCDYSAE---VVLHGDNFNDTIAKVSEIVEMEGRIFIPPYDDPKVIAGQGTI	166
	○ ○ ○ • ○ ○ ○ ○ ○ • ○ ○ ○ ○ ○ ○ • ○ • ○ ○ • ○ ○ • ○ ○ ○ ○ • ○ ○ ○ ○	
<i>Cg ilvA</i>	AAEILSQLTSMGKSADHVMVPVGGGGLLAGVVSYMADMAPRTAIVGIEPAGAASMQAALH	240
<i>Ec ilvA</i>	ALQLLQDAHL---DRVFVPGGGGLAGGVAVLIKQLMRQIKVIAAEADSACLKAAD	225
<i>Ec tdc</i>	GLEIMEDLYDV---DNVIVPIGGGGLIAGIAVAIKSINPTIRVIGVQSENVHGMAASFH	223
	○ • ○ ○ ○ • ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ • ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ • ○ ○ ○	
<i>Cg ilvA</i>	NGGPITLETVPFVDGAEVKRVGDLNYTIVEKNQGRVHMSATEGAVCTEMLDLYQNEGI	300
<i>Ec ilvA</i>	AGHPVDIPRVLGEEVAKRIEDETTERLCDEYLDIITD--SDAICAMKOLFEDVEA	283
<i>Ec tdc</i>	SGEITTHRTTGTLAGDCDVS RPGNLTYEIVRELVDIVLVS--EDEIRNSMIALIQRNKV	281
	• ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ • ○ ○ ○ • ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ • ○ ○	
<i>Cg ilvA</i>	IAEPAGALSIALGLKE---MSFAPGSVVVCIISGGNNDVLRyAEIAERSLVHRGLKHYFLV	357
<i>Ec ilvA</i>	VAEPGALALAGMKKIALHNIRGERLAHLSCANVNHGGRYVSERCEEEQRALLAV	343
<i>Ec tdc</i>	VTEGAGALACAALLSGKLDQYIQNRKTVSIISSGNIDLSRVSQITGFVDA	329
	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ • ○ ○ ○ ○ ○ ○ • ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ •	
<i>Cg ilvA</i>	-----	
<i>Ec ilvA</i>	TIPEEKSELKFCQLLGRSVVEFNFFADAKNACIFVGVRLSRGLEERKEILQMLNDGG	403
<i>Cg ilvA</i>	-----	
<i>Ec ilvA</i>	YSVVDLSDEMAKLVRYMGGGRPSHPLOERLYSEFEFSPGALLREL-NTLGTYNNIS	382 462
	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	
<i>Cg ilvA</i>	FEYLKRNNRETGTALVGIHLSEASGLDSLLEERMEESAIDSRRLPGTPEYEYL--T	436
<i>Ec ilvA</i>	FHY--SSHETDYGRVIAAFELGDHE--PDSETRLNEGGYDCHD-ETNNPAFRFFLAG	514
	• ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ • ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ • ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○	

Abbildung 12: Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenz des *ilvA* Gens aus *C. glutamicum* (*Cg*) mit den Sequenzen der anabolen Threonindehydratase *ilvA* und der katabolen Threonindehydratase *tdc* aus *E. coli* (*Ec*). Identische Aminosäuren in allen Threonindehydratasen sind durch geschlossene Kreise gekennzeichnet und ähnliche Reste durch offene Kreise. Ähnlichkeiten sind definiert durch den Einsatz der Dayhoff PAM Matrix mit einem Score von 8.

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen der *C. glutamicum* Threonindehydratase mit dem entsprechenden Protein aus *E. coli* mit dem Programm CLUSTAL von Higgins & Sharp (1988) zeigte, daß die beiden Enzyme 26 % identische Aminosäuren aufweisen. Betrachtete man zusätzlich die konservativen Aminosäureaustausche nach der Dayhoff PAM Matrix (Dayhoff, 1978), so wurden 54 % Übereinstimmung gefunden. Wurde nur der N-terminale Teil der Proteine (Aminosäure 1 - 347 des *C. glutamicum* Enzyms) berücksichtigt, so fanden sich 36,8 % identische Aminosäuren. Der Vergleich der N-terminalen Bereiche der verschiedenen Threonindehydratasen ist in Tabelle 7 zusammengefaßt. In diesem Teil der biosynthetischen Threonindehydratasen stimmen die Peptidsequenzen aus verschiedenen Species in mindestens 34 % ihrer Aminosäuren überein. Im N-terminalen Bereich liegen distinkte Regionen mit hohem Grad an Sequenzidentität vor (Abbildung 12) (Taillon *et al.*, 1988). Zum Teil sind diese Bereiche außerdem in Proteinen ähnlicher Funktion hoch konserviert. Die eukaryotischen L-Serindehydratasen, die ebenfalls in einer Pyridoxalphosphat-abhängigen Reaktion eine α, β -Elimination durchführen (Ogawa *et al.*, 1989), zeigten ebenfalls deutliche Ähnlichkeit zu den Threonindehydratasen auf (Tabelle 7), was sich vor allem in den Bereichen widerspiegelt, die für die Bindung des Coenzym verantwortlich sind. Unter den α, β -Eliminasen wies auch die β -Untereinheit der Tryptophansynthase Homologien mit den N-terminalen Sequenzen der Threonindehydratasen auf. Dieser Bereich der Threonindehydratase weist außerdem einen hohen Grad an Übereinstimmung über die gesamte Länge der katabolen Threonindehydratase aus *E. coli* auf (33,7 %). Aufgrund des hohen Anteils identischer Aminosäuren im N-terminalen Bereich dieser mechanistisch verwandten Enzyme, kann dieser N-terminale Bereich der Threonindehydratasen als katalytische Domäne bezeichnet werden.

In der C-terminalen Domäne des *C. glutamicum* Enzyms sind dagegen keine distinkten Regionen hoher Homologie konserviert. Zum C-terminalen Bereich der biosynthetischen Threonindehydratase findet sich keine korrespondierende Sequenz im *tdc* Genprodukt der katabolen Threonindehydratase. Die katabole Threonindehydratase aus *E. coli* katalysiert ebenfalls die Pyridoxalphosphat-abhängige Desaminierung von Threonin (Datta *et al.*, 1987). Jedoch werden die katabolischen Threonindehydratasen nicht durch Isoleucin feedback gehemmt (Hirose *et al.*, 1991). Aus diesem Grund ist zu schließen, daß der carboxy-terminale Teil der biosynthetischen Enzyme für die allosterische Regulation der Threonindehydratasen durch Isoleucin verantwortlich ist. Es können daher zwei Domänen unterschieden werden, wobei die N-terminale Domäne für die katalytische Funktion der Threonindehydratase verantwortlich ist und die C-terminale Domäne die allosterische Regulation vermittelt.

Das Translationsprodukt des *C. glutamicum* *ilvA* Gens ist jedoch mit 436 Aminosäuren wesentlich kürzer, als das korrespondierende Genprodukt aus *E. coli* (514 Aminosäuren). Um die Homologie zwischen der Threonindehydratase aus *C. glutamicum* und der Peptidsequenz aus *E. coli* zu erhöhen, mußte eine Lücke von 95 Aminosäuren in der

Tabelle 7: Vergleich der Sequenzen bekannter Threonin- und Serindehydratase aus Pro- und Eukaryonten sowie der Tryptophansynthase β -Untereinheit mit der Threonindehydratase aus *C. glutamicum* Hilfe des Programmes Gap. Betrachtet sind die N-terminalen Bereiche der Enzyme (Aminosäure 1 - 347 der *C. glutamicum* Threonindehydratase). Die Anzahl identischer Aminosäuren ist, bezogen auf die Vergleichslänge des kürzeren Peptids, in Prozent oberhalb der Diagonalen angegeben. Unterhalb der Diagonalen sind die Werte für die Anzahl ähnlicher Aminosäuren angegeben.

	Cg ilvA 347	Bs ilvA 333	Ll ilvA 352	Ec ilvA 334	Sc ILV1 388	Le ILVA 414	Ec tdcB 329	Ra SDHL 363	Sc SDHL 335	St trpB 394
Cg ilvA		43,2	41,5	36,8	34,3	35,2	33,7	21,9	22,1	19,6
Bs ilvA	64,8		50,8	40,2	39,6	40,5	34,9	26,4	24,0	16,5
Ll ilvA	57,9	69,7		37,7	35,8	40,1	34,7	23,9	22,7	13,6
Ec ilvA	58,2	62,0	60,1		49,4	47,6	35,6	21,3	22,5	17,9
Sc ILV1	53,9	59,5	53,2	67,1		42,8	34,0	20,1	22,1	13,7
Le ILVA	55,1	61,0	60,8	65,3	61,3		35,9	21,5	22,1	14,5
Ec tdcB	55,8	58,7	52,1	59,6	56,8	56,3		21,5	19,8	11,6
Ra SDHL	41,3	48,7	44,5	42,1	41,6	42,4	41,9		32,5	16,5
Sc SDHL	44,5	46,3	42,3	42,8	41,7	42,8	40,3	52,4		20,3
St trpB	43,3	38,7	34,3	40,6	34,9	37,7	34,9	37,7	39,8	

Cg	ilvA	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	L-Threonindehydratase biosynthetisch
Bs	ilvA	<i>Bacillus subtilis</i>	L-Threonindehydratase biosynthetisch
Ll	ilvA	<i>Lactococcus lactis</i>	L-Threonindehydratase biosynthetisch
Ec	ilvA	<i>Escherichia coli</i>	L-Threonindehydratase biosynthetisch
Sc	ILV1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	L-Threonindehydratase biosynthetisch
Le	ILVA	<i>Lycopersicon esculentum</i>	L-Threonindehydratase biosynthetisch
Ec	tdcB	<i>Escherichia coli</i>	L-Threonindehydratase katabolisch
Ra	SDHL	<i>Rattus norvegicus</i>	L-Serindehydratase
Sc	SDHL	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	L-Serindehydratase
St	trpB	<i>Salmonella typhimurium</i>	Tryptophansynthase β -Untereinheit

C. glutamicum Sequenz eingefügt werden, die den amino-terminalen und den carboxy-terminalen Teil des Proteins voneinander trennt. Hinsichtlich ihrer Länge ließen sich die anabolen Threonindehydratase klar in zwei Klassen einteilen. Das Enzym aus *C. glutamicum* und die Sequenzen aus *Lactococcus lactis* und aus *Bacillus subtilis* bilden mit 436, 450 bzw. 441 Aminosäuren Länge eine Klasse. Die andere Klasse wird von den Enzymen aus *E. coli* (514 Aminosäuren) *Saccharomyces cerevisiae* (578 Aminosäuren) und Tomate (595 Aminosäuren) gebildet, die alle die zusätzlichen etwa 95 Aminosäuren enthalten, die N- und C-terminalen Bereich des Enzyms trennen.

3.1.7 Isolierung der Threonindehydratase

Zur Aufreinigung der Threonindehydratase wurde eine kombinierte gentechnische und biochemische Methode benutzt, die die Isolierung eines durch 6 Histidin-Reste modifizierten Genproduktes in einem Schritt über eine Affinitäts-Chromatographie ermöglichte (Hochuli *et al.*, 1988; Janknecht *et al.*, 1991). Dazu wurden die Codons für 6 Histidin-Reste durch die Klonierung im Expressionsvektor pQE30 vor die kodierende Region des *ilvA* Gens gesetzt. Zur Klonierung wurde das *ilvA* Gen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion unter Verwendung zweier Primer (siehe Material und Methoden) amplifiziert. Die Primer waren so gewählt, daß sie die notwendigen Schnittstellen zur Klonierung des Gens lieferten (*Bam*HI / *Kpn*I) und das PCR-Amplifikationsprodukt in den ebenfalls *Bam*HI / *Kpn*I geschnittenen Vektor pQE30 kloniert werden konnte (Abbildung 13). Mit dem Vektor pQE30 lag ein Plasmid vor, das die Expression eines Gens von einem regulierbaren Promotor / Operator Element aus ermöglichte (Stüber *et al.*, 1990a). Der Vektor lieferte einen IPTG induzierbaren Promotor und eine synthetische Ribosomenbindungsstelle zur effizienten Überexpression des klonierten Gens in *E. coli*.

Außerdem waren auf dem Vektor die 6 Histidin-Codons vorhanden, mit denen die *ilvA* Sequenz am N-terminalen Ende durch die Klonierung im richtigen Leseraster fusioniert wurde. Mit dem Ligationsansatz wurde der *E. coli* Stamm JM109 transformiert, die erhaltenen Transformanten durch Restriktionsanalyse und Kontrolle der Aktivität und Regulation der Threonindehydratase überprüft und einer der Transformanten (pBM30) für die Aufreinigung des Proteins ausgewählt.

Für die Reinigung der Threonindehydratase wurde der Stamm *E. coli* JM109 pBM30 in LB Medium kultiviert und die Überexpression der Threonindehydratase durch IPTG Zugabe ins Medium induziert. Die Zellen wurden geerntet, mit Ultraschall aufgeschlossen und der Rohextrakt direkt zur Reinigung des Proteins auf die vorbereitete Affinitätssäule aufgebracht. Die hohe Affinität zwischen der Folge von 6 Histidin-Resten und dem verwendeten Säulenmaterial, der Ni-NTA-Agarose, ermöglichte die Aufreinigung der 6 Histidin-markierten Threonindehydratase. Mit einem Gradienten von 0 – 250 mM Imidazol, das die Histidin-Reste von den Koordinationsstellen der Nickel-Ionen verdrängt (Janknecht *et al.*, 1991), wurde die Threonindehydratase

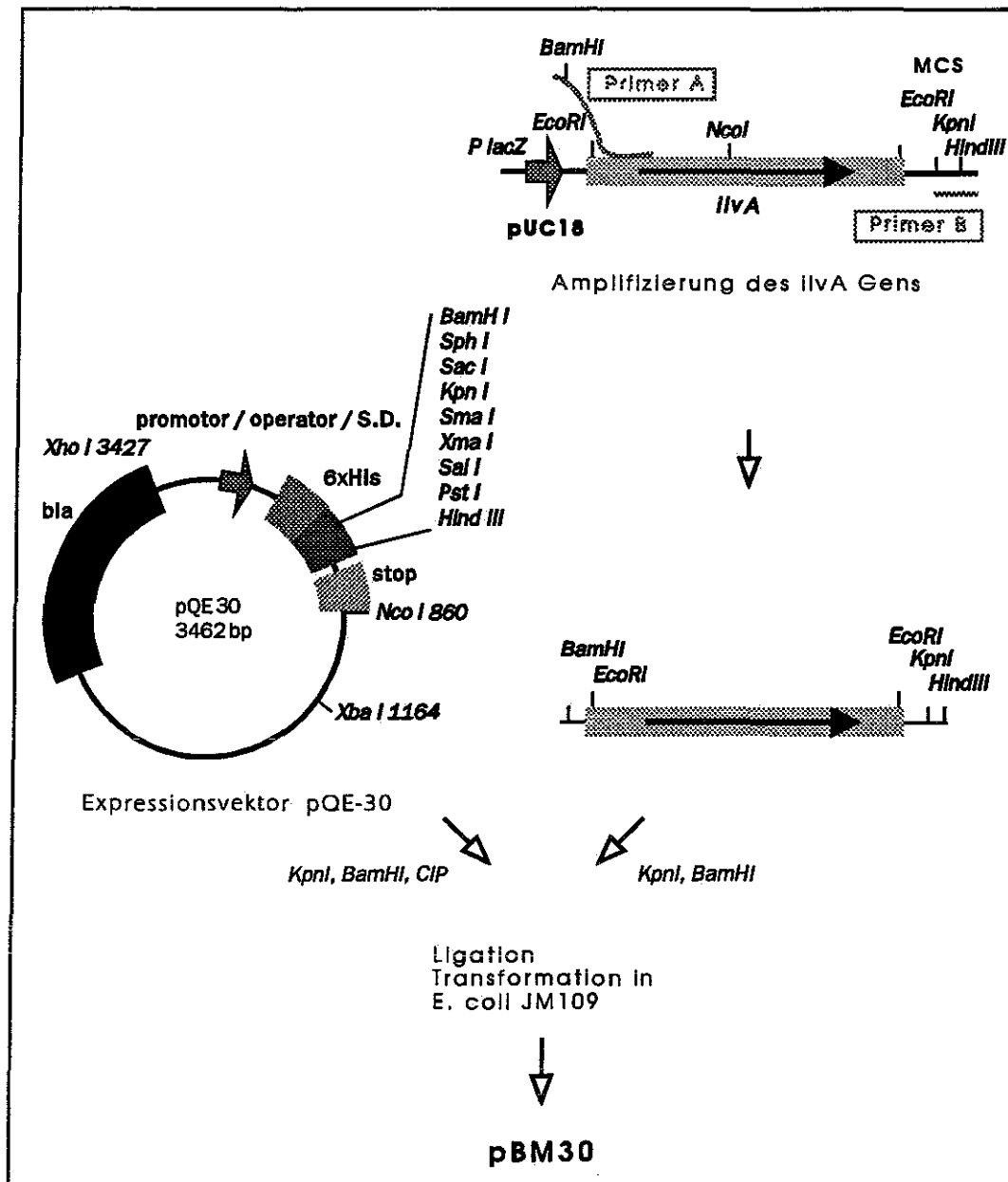


Abbildung 13: Vorgehen bei der Amplifizierung des *ilvA* Gens und der Klonierung im Vektor pQE30. Mit Primer A wurde eine *BamHI* Schnittstelle am 5'Ende des *ilvA* Gens eingefügt. Die Sequenz des Primers B entspricht der Multiplen Klonierungsstelle (MCS) des Vektors. Die Amplifizierung des Fragmentes erfolgte unter Standardbedingungen. Das PCR Produkt wurde nach *BamHI* / *KpnI* Spaltung in den ebenfalls *BamHI* / *KpnI* gespaltenen und alkalische Phosphatase behandelten Vektor pQE30 ligiert, und die Ligationsansätze in den *E. coli* Stamm JM109 transformiert.

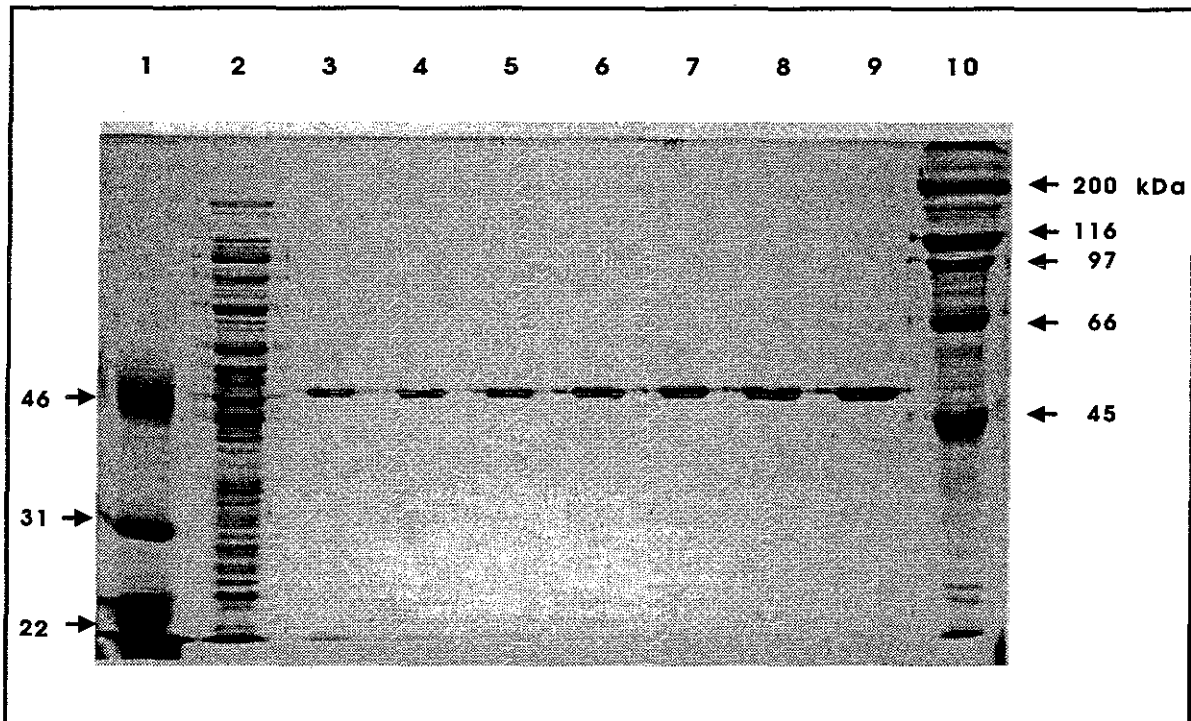


Abbildung 14: SDS-Gelelektrophorese der isolierten Threonindehydratase aus *C. glutamicum* und des zur Reinigung eingesetzten Rohextraktes. Für die Auftrennung wurde ein 10 %iges SDS-Polyacrylamid-Gel verwendet. Spur 1: Proteinlängenstandard, Spur 2: Rohextrakt, Spur 3-9: Fraktionen 191-197, Spur 10: Proteinlängenstandard.

von der Affinitätssäule eluiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden auf Aktivität der Threonindehydratase überprüft und die Reinigung des Proteins auf einem SDS-Gel kontrolliert.

Abbildung 14 zeigt ein SDS-Gel, auf dem der eingesetzte Rohextrakt (Probe 2) sowie Fraktionen des aufgereinigten Proteins (Probe 3 – 9) aufgetragen sind. Die Fraktionen wurden vereinigt und die Aktivität der Threonindehydratase bestimmt. Durch Vergleich mit Rinderserum Albumin bekannter Konzentration wurde die Konzentration der Threonindehydratase im Eluat auf einem SDS-Gel bestimmt. Insgesamt wurden aus einer 500 ml Kultur 190,60 Units Threonindehydratase (3 mg Protein; 66,4 U/mg) isoliert. Die Ausbeute an Threonindehydratase Protein betrug 70 % des vorhandenen Threonindehydratase Proteins im Rohextrakt.

Zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern wurde die isolierte Threonindehydratase in einem präparativen SDS-Polyacrylamid Gel aufgetrennt und nach Anfärbung mit KCl aus dem Gel ausgeschnitten. Das ausgeschnittenen Gelstück wurde in der X-Press homogenisiert, anschließend mit Freund's-Complete und Incomplete Adjuvant versetzt und einem Kaninchen injiziert. Nach 4 Wochen wurde die erste Blutprobe zur Kontrolle der Antigen-Antikörperreaktion entnommen. Das abgetrennte Blutserum wurde 1:1000 verdünnt im Western-Blot eingesetzt.

3.1.8 Fluoreszenzemissionsspektroskopie

Um nachzuweisen, daß durch verschiedene Effektoren unterschiedliche Konformationen der Threonindehydratase stabilisiert werden, wurde der Einfluß von Liganden auf die Fluoreszenzemission eines Protein-gebundenen Farbstoffes untersucht. Der Fluoreszenzfarbstoff 1-Anilinonaphtalen-8-sulfonsäure (ANS) wurde aufgrund seiner Wechselwirkung mit hydrophoben Bereichen von Proteinen als Indikator für Strukturänderungen herangezogen (Stryer, 1965; Guilbault, 1973; Goto & Fink, 1989). 1-Anilinonaphtalen-8-sulfonsäure (ANS) bindet an die Threonindehydratase mit deutlicher Verstärkung seiner Fluoreszenz. Abbildung 15 zeigt die Fluoreszenz von 1-Anilinonaphtalen-8-sulfonsäure (ANS) bei Bindung an die Threonindehydratase. Durch Zugabe des Effektors Isoleucin wurde die Fluoreszenz des Farbstoffes reduziert. Solche Änderung der Fluoreszenz von "Reporter-Gruppen" können durch Veränderungen ihrer molekularen Umgebung, wie Konformationsänderungen des Proteins, hervorgerufen werden.

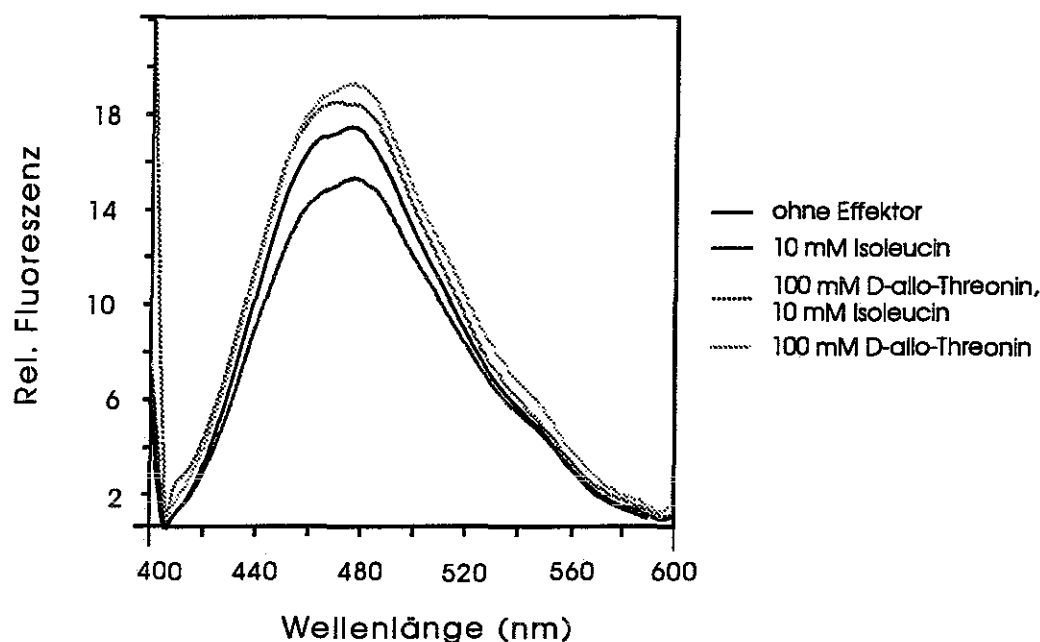


Abbildung 15: Fluoreszenzemissionsspektren des freien Farbstoffes 1-Anilinonaphtalen-8-sulfonsäure (ANS) und bei Bindung an die Threonindehydratase sowie in Gegenwart des Substratanalogons D-allo-Threonin und des Inhibitors L-Isoleucin. 1 μ M Threonindehydratase wurden mit 0,2 M D-Allothreonin oder 10 mM L-Isoleucin 10 min bei 30°C vorinkubiert, mit 10 μ M ANS versetzt und nach 10 min bei Raumtemperatur die Fluoreszenzemission bei $\lambda_{ex} = 390$ nm, $\lambda_{em} = 400 - 600$ nm aufgenommen. Die Spektren wurden gegen 10 μ M ANS enthaltenden Puffer korrigiert.

Mit Hilfe eines Substrat-Analogons sollte die Stabilisierung eines weiteren Konformati-

onszustandes gezeigt werden. Durch die Bestimmung der Aktivität der Threonindehydratase in Gegenwart von D-allo-Threonin wurde nachgewiesen, daß die Aktivität des Enzyms durch das Substrat-Analogon irreversibel gehemmt wird. Tatsächlich zeigte die *C. glutamicum* Threonindehydratase nur noch 2 % Restaktivität nach Inkubation mit D-allo-Threonin. Dieses Substratanalogon wirkt in der Threonindehydratase als "Dead-End" Substrat, das nach Reaktion mit dem Protein die Umsetzung des eigentlichen Substrates L-Threonin verhindert (Hofler & Burns, 1978). In den Fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen induzierte die Bindung von D-allo-Threonin eine Zunahme der ANS-Fluoreszenz. Gleichzeitig verhinderte die Bindung des Substratanalogons, wie in Abbildung 15 gezeigt, den durch Isoleucin-Bindung hervorgerufenen Effekt der Fluoreszenzabnahme. Die Effektorbindung bewirkte keine drastischen Effekte auf die Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffes, sondern erzeugte geringe Veränderungen der Fluoreszenzintensität. Demnach wurden durch die Effektorbindung keine starken Veränderungen der Proteinstruktur induziert. Die Unterschiede in der Fluoreszenz des Farbstoffes wurden durch Änderungen in der Quartärstruktur des Proteins, induziert durch die Bindung des negativen Effektor oder des Substrat-Analogon, hervorgerufen.

3.2 Ermittlung der Sekundär- und der Tertiärstruktur der Threonindehydratase

Die Ermittlung der Sekundär- und Tertiärstruktur eines Polypeptids ist ein wichtiges Werkzeug für die Planung von ortsgerichteten Mutagenesen und der Untersuchung von Mutanten. In einem dreidimensionalen Modell können mit erhöhter Genauigkeit Bereiche in der Sequenz eines Enzyms identifiziert werden, die funktionelle Aufgaben in der Struktur erfüllen. Die Methode des "Modelling by Homology" ermöglicht es, ausgehend von der bekannten Struktur eines Proteins ein dreidimensionales Modell eines homologen Proteins zu erstellen (Greer, 1991; Schomburg, 1988; Recktenwald et al., 1993). Notwendige Voraussetzung ist dazu die Verfügbarkeit eines Proteins bekannter 3D Struktur, das genügend hohe Homologie zum Testprotein besitzt (Taylor, 1988). Für die Threonindehydratase aus *C. glutamicum* lieferten Datenbank-Recherchen Ähnlichkeiten mit der Tryptophansynthase β -Untereinheit aus *Salmonella typhimurium*. Von diesem Protein, das wie die Threonindehydratase eine α, β -Elimination ausführt, bei der aber Serin Substrat ist, stehen die durch Röntgenstrukturanalyse bestimmten Atom-Koordinaten (Hyde et al., 1988) in der Brookhaven-Datenbank (Bernstein et al., 1977) zur Verfügung.

Für die Modellierung der dreidimensionalen Struktur der Threonindehydratase war ein optimales Alignment mit der Aminosäuresequenz der Tryptophansynthase und eine genaue Lokalisierung der Sekundärstruktur-Elemente der Threonindehydratase erforderlich. Dabei konnte die Genauigkeit der Sekundärstruktur-Voraussagen durch das Hinzuziehen von Informationen aus dem Alignment der Sequenzfamilien der Threon-

indehydratasen und der Tryptophansynthasen erhöht werden (Zvelebil *et al.*, 1987; Barton & Russel, 1993).

3.2.1 Sekundärstruktur

Zur Erstellung der Strukturvoraussage für die Sekundärstruktur der Threonindehydratase wurde entsprechend des Schemas Abbildung 16 vorgegangen. Im ersten Schritt wurde ein Alignment der Threonindehydratase aus *C. glutamicum* mit den Aminosäuresequenzen der Threonindehydratasen vorgenommen, die in den Datenbanken SwissProt und der EMBL Nukleotid Datenbank zur Verfügung standen (*E. coli*, *L. esculentum*, *S. cerevisiae*, *B. subtilis*). Das Alignment der Sequenzen wurde mit dem Programm CLUSTAL (Higgins & Sharp, 1988) vorgenommen. Zusätzlich wurde für jede der genannten Sequenzen eine Sekundärstruktur-Voraussage nach den statistischen Methoden von Chou und Fasman (1974a; 1974b) und Garnier (1978) getroffen und die Lokalisierung der Strukturelemente im Alignment eingezeichnet. An denjenigen Positionen des Alignments, für die in mehreren Sequenzen eine identische Sekundärstruktur vorhergesagt wurde, wurde davon ausgegangen, daß mit hoher Wahrscheinlichkeit die betreffende Struktur (Konsensus-Vorhersage) vorliegt.

Auf die gleiche Weise wurde ein Alignment der Sequenzen der β -Untereinheiten von verschiedenen Tryptophansynthasen erstellt (*S. typhimurium* (Crawford *et al.*, 1980); *Acinetobacter calcoaceticus* (Kishan & Hillen, 1990); *Pseudomonas aeruginosa* (Hadero & Crawford, 1986); *Pseudomonas putida* (Eberly & Crawford, 1989); *Bacillus stearothermophilus* (Ishiwata *et al.*, 1989); *Bacillus subtilis* (Henner *et al.*, 1985); *Lactobacillus casei* (Natori *et al.*, 1990) und *Brevibacterium lactofermentum* (Matsui *et al.*, 1986)). Wiederum wurden die Sekundärstruktur-Voraussagen im Alignment eingetragen und die Konsensus Strukturvoraussage, wie für die Threonindehydratase ausgeführt, ermittelt. Dabei flossen ebenfalls die Sekundärstruktur-Lokalisierungen in der 3D Struktur der Tryptophansynthase β -Untereinheit mit ein. Zusätzlich wurde ein direkter Vergleich der Peptidsequenzen der Tryptophansynthase β -Untereinheit mit der Threonindehydratase aus *C. glutamicum* mit Hilfe der Methode von Niefind & Schomburg (1991) erstellt, die eine Ähnlichkeitsmatrix, also strukturelle Ähnlichkeiten der Aminosäuren, berücksichtigt. Mit dieser Methode wird man den strukturellen Besonderheiten der Aminosäurefolge eher gerecht. Dieses Alignment wurde mit Hilfe der Informationen aus Strukturvorhersagen und Vergleich der Sequenzfamilien überarbeitet, um eine optimale Anpassung des Modells an die dreidimensionale Vorlage zu erzielen. Die daraus resultierende Lokalisierung der Sekundärstruktur-Elemente α -Helix (H) und β -Faltblatt (E) entlang der Aminosäuresequenz ist in Tabelle 8 dargestellt (Methode IBT).

Unabhängig von der Strukturvoraussage nach Chou & Fasman und Garnier wurde eine

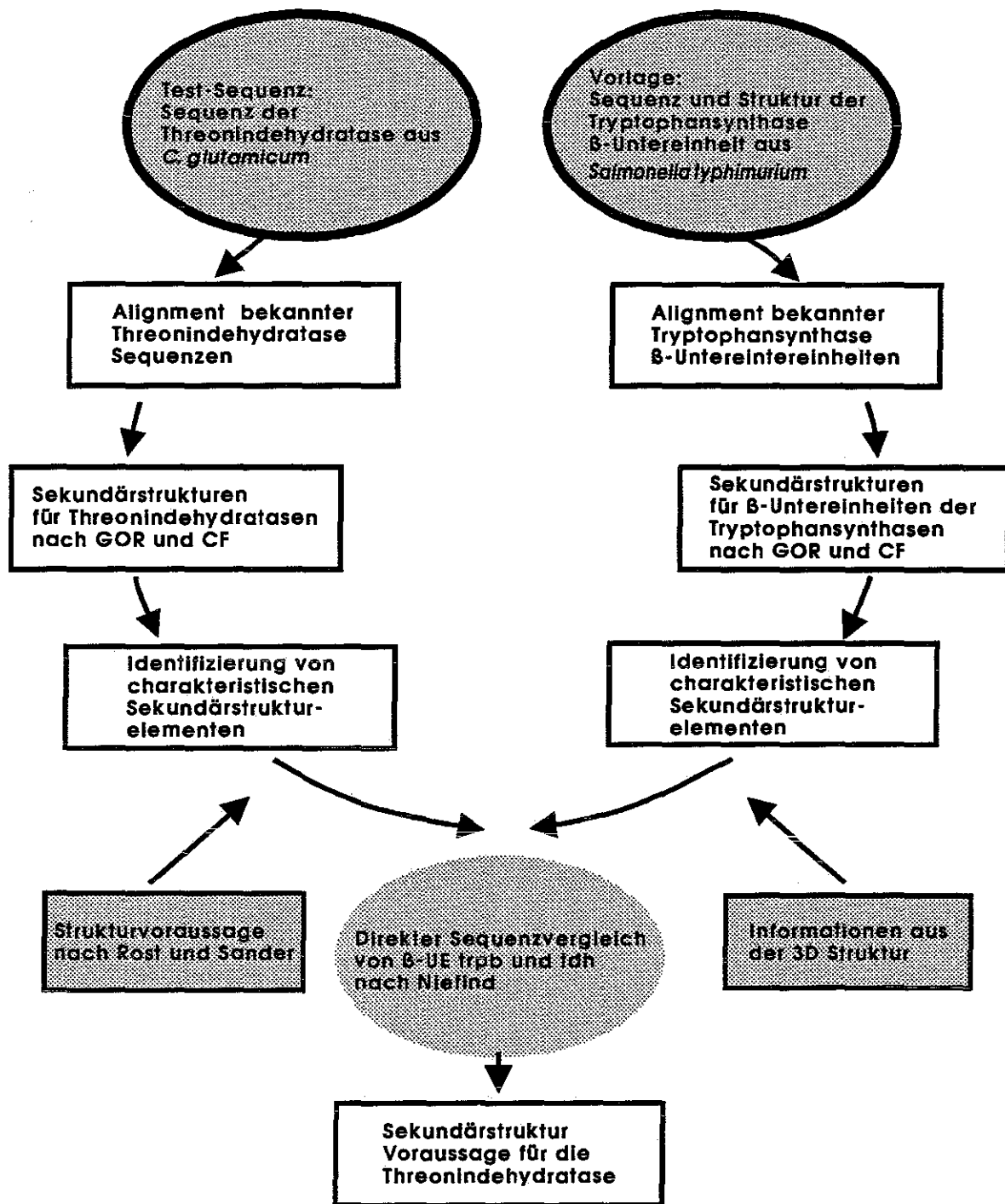


Abbildung 16: Vorgehensweise bei der Voraussage der Sekundärstruktur der Threonindehydratase aus *C. glutamicum*. (GOR: Garnier 1978; CF: Chou & Fasman, 1974a; trpB: Tryptophansynthase β -Untereinheit; tdh: Threonindehydratase)

Tabelle 8: Vergleich der Ergebnisse der Sekundärstruktur-Voraussagen für die Threonindehydratase nach Rost & Sander (PHD) (1992), sowie der in dieser Arbeit verwendeten Methode (IBT) und der statistischen Verfahrens nach Garnier (GOR) (1978).

Die Buchstaben H bzw. E kennzeichnen die Sekundärstruktur-Elemente α -Helix oder β -Faltblatt. Angegeben sind die Aminosäure-Positionen der verschiedenen Strukturen in der Peptidsequenz und die Art der jeweiligen Struktur.

PHD				IBT				GOR			
18	-	20	H	7	-	20	H	14	-	27	H
23	-	35	H	23	-	34	H	29	-	32	H
36	-	38	E	41	-	45	E	33	-	43	E
55	-	60	E	54	-	60	E	51	-	64	H
69	-	79	H	70	-	80	H	66	-	72	E
83	-	85	H								
90	-	94	E	87	-	93	E	89	-	92	E
98	-	108	H	99	-	107	H	101	-	108	E
113	-	117	E	111	-	117	E	113	-	120	E
123	-	130	H	123	-	128	H	128	-	136	H
136	-	141	E	134	-	142	E	137	-	141	E
146	-	159	H	146	-	157	H	147	-	160	H
164	-	165	E	164	-	168	E	165	-	167	E
173	-	175	E					172	-	176	E
179	-	190	H	178	-	191	H	180	-	188	H
197	-	202	E	196	-	202	E	195	-	202	E
206	-	218	H	206	-	218	H	208	-	214	E
								216	-	220	H
223	-	227	E	222	-	229	E	222	-	227	E
230	-	240	H	233	-	240	H	233	-	239	H
252	-	254	E	249	-	254	E	246	-	250	E
258	-	261	E	257	-	261	E	257	-	261	E
265	-	273	H	266	-	274	H	266	-	271	E
277	-	282	E	277	-	282	E	276	-	293	H
285	-	297	H	284	-	296	H	296	-	304	H
305	-	318	H	302	-	318	H	308	-	318	H
324	-	329	E	321	-	327	E	323	-	328	E
335	-	348	H	335	-	345	H	338	-	345	H
352	-	359	E	354	-	360	E	356	-	359	E
367	-	372	H	367	-	374	H	368	-	374	H
380	-	388	E	380	-	386	E	381	-	385	E
395	-	405	E	395	-	402	E	395	-	400	E
411	-	418	H	408	-	418	H	401	-	419	H

weitere Sekundärstruktur-Voraussage für die Threonindehydratase nach einem neuen Verfahren zur Lokalisierung von Sekundärstrukturen nach Rost und Sander (1993a; 1993b) getroffen, das gegenüber den rein statistischen Methoden Informationen aus Proteinfamilien mit einbezieht. Die Methode beruht auf der Beobachtung, daß Informationen über die Evolution einer Proteinsequenz die Genauigkeit einer Strukturvoraussage erhöhen (Maxfield & Scheraga, 1979; Zvelebil *et al.*, 1987). Hierbei wird ein Sequenz-Alignment nach der Methode MaxHom (Sander & Schneider, 1991) erstellt, das als Eingangsprofil für die Sekundärstruktur-Voraussage mit Hilfe eines neuronalen Netzwerkes diene. Als Ausgabe erhält man die Angabe über die Position und die Art der vorausgesagten Sekundärstruktur sowie eine Bewertung der Genauigkeit der Voraussage für jede Aminosäureposition. Die Ergebnisse der neuronalen Netzwerk Methode (PHD) (Rost *et al.*, 1993) sind ebenfalls in Tabelle 8 zusammengefaßt.

Der Vergleich der Ergebnisse der Strukturvoraussage der neuronalen Netzwerk Methode (PHD) mit den Voraussagen der kombinierten Methode (IBT1) zeigte, daß die Art der Voraussagen über die gesamte Länge des Proteins sehr gut übereinstimmen. Bei der genauen Lokalisierung der Strukturen weichen die beiden Methoden um etwa 12 % voneinander ab. Demgegenüber zeigt die Methode nach GOR (Garnier, 1978), die nur das statistische Vorkommen der Aminosäuren in bestimmten Strukturen benutzt, deutliche Unterschiede sowohl in der Art der Voraussage (α -Helix oder β -Sheet) als auch in der Positionierung der jeweiligen Struktur.

3.2.2 Modellierung der Tertiärstruktur der Threonindehydratase

Das bei der Ermittlung der Sekundärstruktur erstellte Alignment (Abbildung 17) der Aminosäuresequenzen der Threonindehydratase aus *C. glutamicum* und der Tryptophansynthase β -Untereinheit aus *S. typhimurium* diene als Eingabe für das computer-gestützte "Molecular Modelling" der dreidimensionalen Struktur der Threonindehydratase. Verwendet wurde das Programm BRAGI (Schomburg & Reichelt, 1988), das für die Darstellung und Modellierung von Proteinstrukturen erstellt wurde. Entsprechend der Informationen des Alignments (Abbildung 17) wurde die Aminosäuresequenz der Tryptophansynthase durch die Sequenz der Threonindehydratase ersetzt, wobei Insertionen und Deletionen zunächst ausgespart blieben. Im ersten Schritt wurde somit ein Hybridprotein hergestellt, das Teile der Vorlage mit den Sequenzen des zu modellierenden Proteins vereinte. Der nächste Schritt umfaßte die Modellierung von Deletionen und Insertionen im Testprotein. Dabei wurde auf eine "loop data bank" zurückgegriffen. So mußten z.B. bei der Modellierung der Struktur zwischen Helix 11 und Sheet 12 zwei Aminosäuren deletiert werden. Dazu konnte z.B. eine Folge von 5 Aminosäuren durch einen Loop von 3 Aminosäuren ersetzt werden (analog 4 $\rightarrow$ 2). Aus der Datenbank konnten automatisch eine Reihe von Loop-Strukturen ausgewählt werden, die an die Stelle der ursprünglichen Aminosäurefolge die gewünschte Anzahl an Aminosäuren setzte. Nach Auswahl der geeigneten Loop-Struktur schloß sich an jeden Schritt dieser

	Helix 1	Helix 2	Sheet 1	
	<u>MTTLLNPYFGEFGGMYVPQILMPALNQLEEFVRAQKDPEFQAQFADLLKNYAGRPTALT</u>			60
	----- <u>MSETYVSEKSPGVMASGAELIRAADIQTAQARISSVIAPTPLQ</u>			
	Sheet 2	Helix 3	Sheet 3	
	<u>KCQNITAGTRTTLYLKREDLLHGGAHKTNQVLGQALLAKRMGKSEIIAETGAGQHGVASA</u>			120
	<u>YCPRLSEETGAETIYLKREDLQDVRSYKIRGALNSGAQSPQEQRDAGIVAASAGNHAQGVA</u>			
Helix 4	Sheet 4	Helix 5	Sheet 5	Helix 6
<u>LASALLGLKCRIYMGAKDVERQSPNVFRMLM--GAEVIPVHSGSATLKDACNEALRDWS</u>				
<u>YVCKSLGVQGRIYV-----PVQTPKQKRDRI MVHGGFVSLVVTGNNFDEASAAAHEDAE</u>				
	Sheet 6	Helix 7	Helix 8	Sheet 7
	<u>GSYETAHYMLGTAAGPHPYPTIVREFQRMIGEETKAQILDKEGRLPDAVIACVGGGSNAI</u>			240
	<u>RTGATLIEPFDARNTVIGQGTVAAEILSQLTSM-----GKSADHVMVPVGGGGLLA</u>			
Helix 9	Sheet 8	Goldberg-Loop		
<u>GMFADFINDTS-VGLIGVEPGGHHGIETGEH--GAPLKHGRVGIYFGMKAPMMQTADGGIE</u>				300
<u>GVVSYMADMAPRTAIVGIEPAGAASMQAALHNGGPITLETVDPFVDGAEVKRVG-----</u>				
	Helix 10	Sheet 9	Helix 11	
	<u>ESYSISAGLDFPSVGPQHAYLNSIGRADYVSITDDEALEAFKTLRHEGIIPALESSHAL</u>			360
	----- <u>DLNYTIVEKNQGRVHMMSATEGAVCTEMLDLYQNEGII--AEPAGAL</u>			
Helix 12	Sheet 10	Helix 13		
<u>-AHALKMMREQPEKEQLLVNLSGRGDKDIFTVHDILKARGEI-----</u>				420
<u>SIAGLKEMSFAP--GSVVCCIISGGNNDVLRVYAEIAERSLVHRGLKHYFLVNFQKPQLR</u>				
-----				480
<u>HFLEDILGPDDDITLFEYLKRNNRETGTALVGIHLSEASGLDSLLERMEESAIDSRRLPE</u>				
.....				

<u>GTPEYEYLT</u>				

Abbildung 17: Alignment der Sequenz der β -Untereinheit der Tryptophansynthase aus *S. typhimurium* (oben) und der Threonindehydratase aus *C. glutamicum* (unten) für die Modellierung der dreidimensionalen Struktur der Threonindehydratase. Eingezeichnet sind die Positionen der Sekundärstruktur-Elemente. Durch Punkte (...) gekennzeichnet ist ein deutlich hydrophiler Bereich in der C-terminalen Domäne der Threonindehydratase.

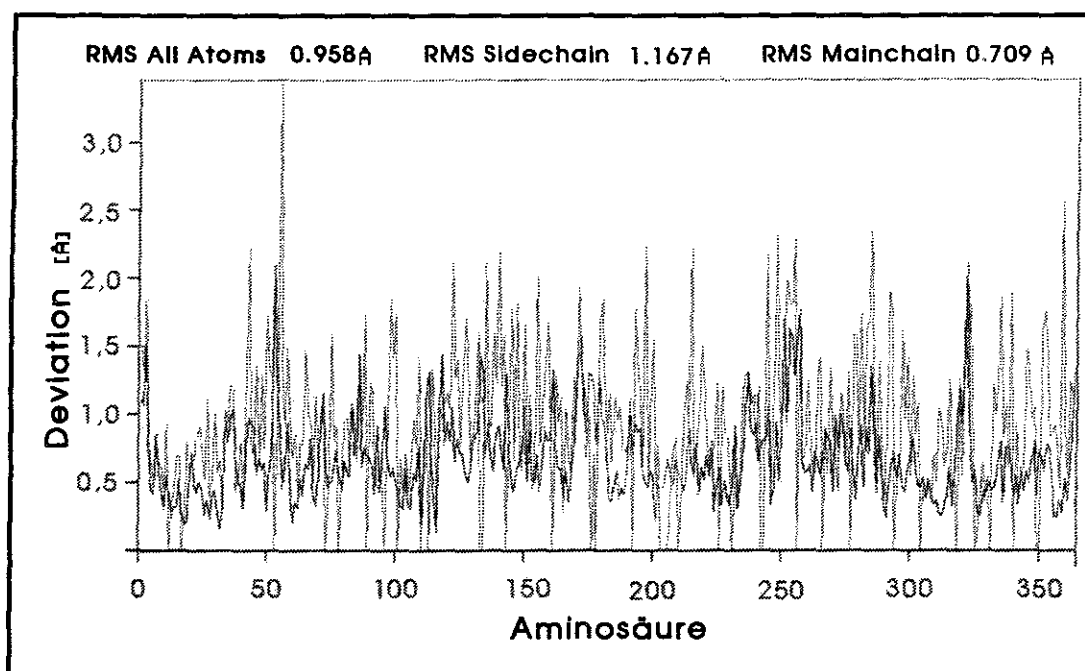


Abbildung 18: Auftragung der RMS-Werte (Root Mean Square Deviation) der Protein Hauptkette und der Seitenketten im Modell der Threonindehydratase vor / nach der AMBER Energieminimierungsrechnung entlang der Aminosäuresequenz.

Modellierungen eine Energieminimierungs-Rechnung mit Hilfe des Programmpaketes AMBER (Kini & Evans, 1991) (Assisted Model Building with Energy Refinement) an, um die Auswirkungen auf die Gesamtstruktur des Proteins zu betrachten. In verschiedenen Bereichen wurden zunächst mehrere Modellierungsvorschläge erstellt und im Anschluß an die Energieminimierung die optimale Version ausgewählt.

Zur Entfernung aller zu engen Kontakte innerhalb des Proteins wurde nach Fertigstellung der Modellierung eine abschließende Energieminimierungsrechnung durchgeführt. Die Bestimmung der RMS-Werte (Root Mean Square Deviation) ermöglicht es, einen Vergleich der beiden Strukturen vor bzw. nach der Energieminimierung vorzunehmen. In Abbildung 18 sind die RMS-Werte für das Modell der Threonindehydratase vor und nach dem letzten Energieminimierungsschritt entlang der Aminosäuresequenz dargestellt.

Große RMS-Werte ergeben sich, wenn starke Wechselwirkungen der Seitenketten oder der Hauptkette im Molekül eine starke Änderung der Lage der Atome im Raum notwendig machen. Wie aus Abbildung 18 hervorgeht, sind die durch die Energiemi-

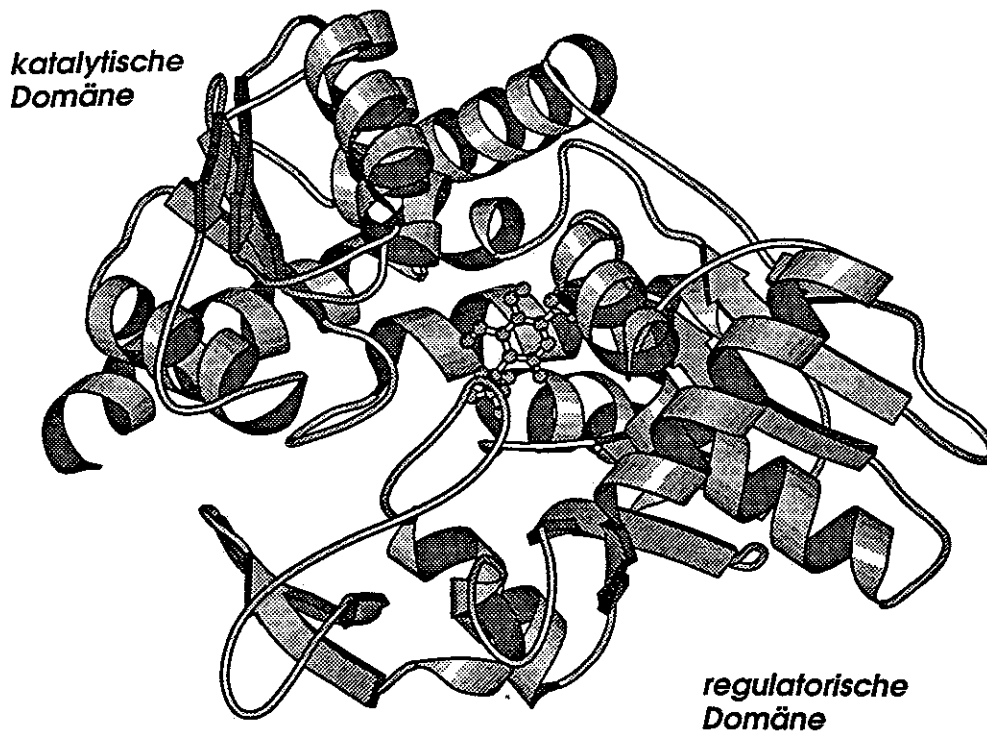


Abbildung 19: Modell der dreidimensionalen Struktur der Threonindehydratase aus *C. glutamicum*. Dargestellt sind die α -Helix Strukturen und β -Sheet Strukturen (Pfeile). Die Lokalisierung der Strukturelemente aus den Atom-Koordinaten des Modells erfolgte durch das Programm DSSP (Kabsch & Sander, 1983).

mierung erzeugten Kettenverschiebungen der Hauptkette des Proteins gering. Diese Überprüfung zeigt, daß mit den Modellierungsvorgängen am Protein keine starken Veränderung der Gesamtstruktur verbunden waren.

Der hohe Grad an Übereinstimmungen der Sekundärstruktur zwischen Tryptophansynthase β -Untereinheit und Threonindehydratase im N-terminalen Bereich der Enzyme ermöglichte eine genaue Modellierung des aktiven Zentrums der Threonindehydratase. In Abbildung 19 ist das Modell der Threonindehydratase und in Abbildung 20 und 21 das aktive Zentrum der Threonindehydratase schematisch dargestellt. Das Coenzym Pyridoxalphosphat ist über eine Schiff-Base kovalent an die ϵ -Aminogruppe von Lysin 70 (Tryptophansynthase β -Untereinheit: Lysin 87) gebunden. Im Modell der Threonindehydratase legt sich die unter den α,β -Eliminasen hochkonservierte Folge von Glycin-Resten als Loop-Struktur um die Phosphat-Gruppe des Coenzym. Die negative Ladung des Phosphat-Restes wird wie in der Tryptophansynthase durch das positive elektrostatische Feld des N-Terminus von Helix 9 (Aminosäure 206 - 218)

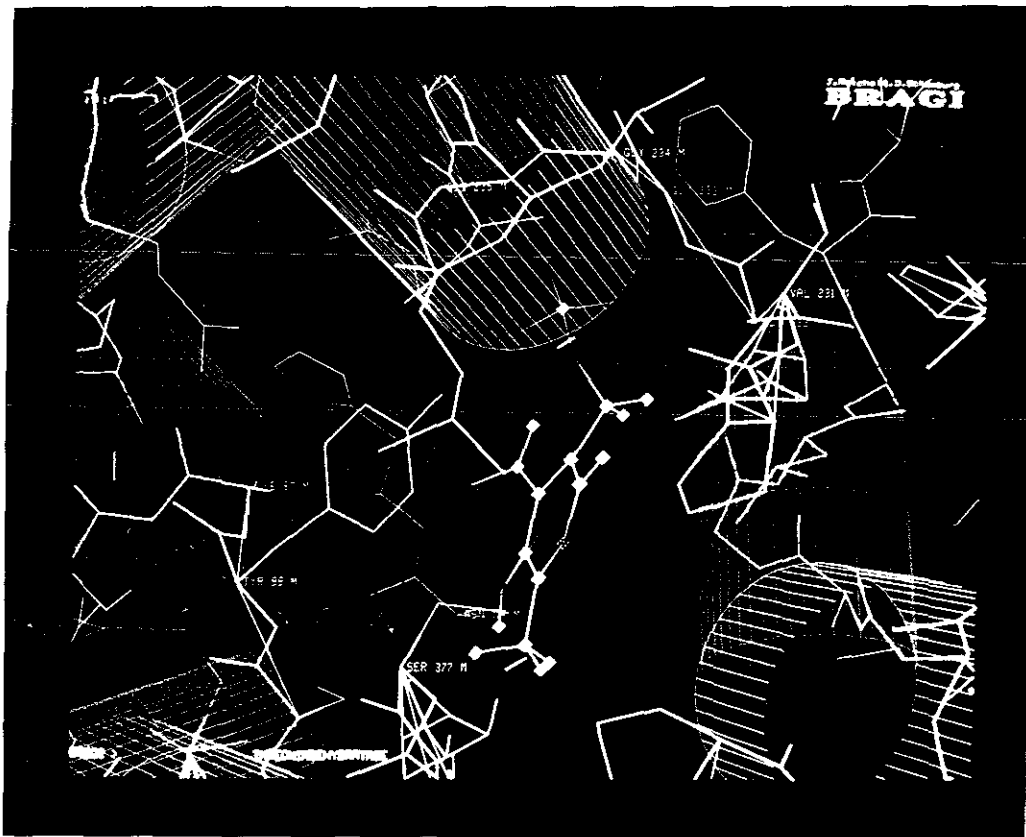


Abbildung 20: Dreidimensionales Modell des aktiven Zentrums der Threonindehydratase aus *C. glutamicum*. α -Helix Strukturen sind durch rot gefärbte Zylinder angedeutet. Im Zentrum der Abbildung befindet sich das Coenzym Pyridoxalphosphat.

neutralisiert. In Abbildung 20 ist die Lage der Helix zum Coenzym im Modell der Threonindehydratase dargestellt. In der Threonindehydratase wurde durch die Modellierung von Helix 7/8 die Ausrichtung des positiven Dipolmomentes von Helix 9 auf den Phosphatrest des Coenzym verstärkt. Ein weiteres Element der Ladungsneutralisierung wird in der Tryptophansynthase durch das Imidazol von Histidin 86 geliefert. Anstatt Histidin befindet sich in der Threonindehydratase in dieser Position Tyrosin 69. Das Stickstoffatom des Pyridin-Ringes des Coenzym liegt in Wasserstoffbrücken-Distanz zur Hydroxylgruppe von Serin 329 (Serin 377 in der Tryptophansynthase). Die Carboxyl-Gruppe von Glutamat 303 (Glutamat 350 in der Tryptophansynthase) ist ebenfalls nahe dem Stickstoffatom des Coenzym lokalisiert. Diese Lage ermöglicht keine starken ionischen Wechselwirkungen, jedoch scheint die Position dieser Ladung eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung der optimalen Konformation dieses Bereiches zu spielen. Asparagin 97 (Asparagin 114 in der Tryptophansynthase) kann mit dem Stickstoffatom der Schiff-Base wechselwirken.

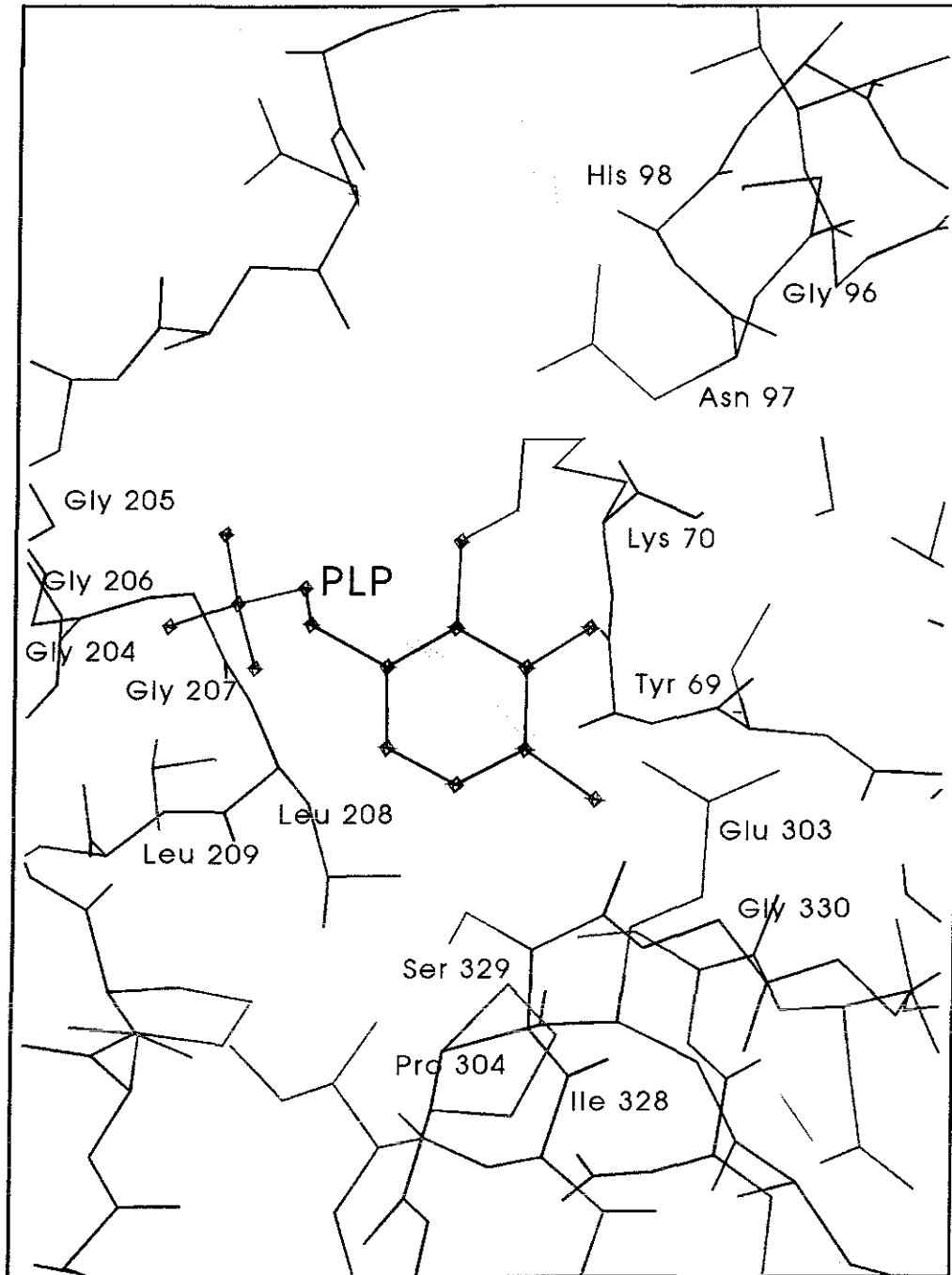


Abbildung 21: Schematische Darstellung des aktiven Zentrums der Threonindehydratase aus *C. glutamicum*. Im Zentrum der Abbildung ist das Coenzym Pyridoxalphosphat dargestellt, das über eine Schiff-Base kovalent am Lysin 70 des Proteins gebunden ist.

Die Aminosäure Asparagin 97 liegt in einer Folge von neun hochkonservierten Aminosäuren, die sowohl für die Konformation des aktiven Zentrums als auch für die korrekte Substratbindung verantwortlich sind.

Nach den Untersuchungen des Reaktionsmechanismus der Tryptophansynthase aus *S. typhimurium* (Lu *et al.*, 1993), der Aspartat-Aminotransferase aus Hühner Mitochondrien (Ziak *et al.*, 1990) und der D-Aminosäure-Aminotransferase aus *B. subtilis* (Bhatia *et al.*, 1993) ist die Aminosäure Lysin 87 der Tryptophansynthase β -Untereinheit nicht nur für die Bindung des Coenzyms verantwortlich. Demnach katalysiert diese Aminosäure die Entfernung des α -Protons vom Substrat Threonin. Die Aminosäure Lysin 87 abstrahiert das α -Proton und protoniert ebenfalls die OH-Gruppe des Substrates für die β -Eliminierung. Weiterhin spielt dieser Lysin-Rest eine entscheidende Rolle bei der Bildung des externen Aldimins, der Substrat-Bindung und der Produkt-Freisetzung (Lu *et al.*, 1993). Da der Aufbau des aktiven Zentrums der Tryptophansynthase β -Untereinheit und der Threonindehydratase einen hohen Grad an Übereinstimmung aufweist, kann man davon ausgehen, daß die Aminosäure Lysin 70, die in der Threonindehydratase das Coenzym bindet, eine ähnliche Funktion bei der Katalyse der Reaktion ausübt.

3.3 Herstellung deregulierter Threonindehydratase Mutanten

Der Sequenzvergleich verschiedener Threonindehydratasen zeigte, daß der N-terminale Teil des Proteins die wesentlichen Strukturelemente der katalytischen Funktion enthält. Demgegenüber ist der C-terminale Bereich für die allosterische Regulation des Proteins entscheidend. Um Mutanten zu erhalten, die in der allosterischen Regulation durch Isoleucin verändert sind, wurde daher als Zielort für die Mutagenese derjenige Teil des *ilvA* Gens gewählt, der für den C-Terminus der Threonindehydratase kodiert. Dazu wurden zwei verschiedene Methoden verwendet, die ortsspezifische Mutagenese und die ungerichtete Mutagenese. Die Auswahl der Mutationsorte und der auszutauschenden Aminosäuren für die ortsspezifische Mutagenese erfolgte mit Hilfe der Informationen der Sekundärstruktur und des dreidimensionalen Modells der Threonindehydratase. Die ungerichtete Mutagenese erforderte dagegen die Entwicklung eines biologischen Testsystems mit dessen Hilfe Mutanten, die den gewünschten Phänotyp tragen, identifiziert werden konnten.

3.3.1 Herstellung von Mutanten durch ortsspezifische Mutagenese

Zur ortsspezifischen Mutagenese des Threonindehydratase Gens wurde die Polymerase Kettenreaktion verwendet. Die eingesetzte Methode nach Ito *et al.*, (1991) beruht auf dem Prinzip der "overlap-extension" Methode, wobei durch einen variablen Mutagenese-Primer die gewünschte Mutation in das amplifizierte DNA-Fragment eingeführt wurde. Insgesamt wurden 12 Mutanten durch ortsspezifische Mutagenese hergestellt, die sich in zwei Gruppen einteilen ließen, welche sich durch die verwendeten Primer und die Lage des amplifizierten DNA-Fragmentes unterschieden. Die amplifizierten Fragmente der Gruppe 1 erstreckten sich von der *NcoI* Schnittstelle (Nukleotid 1001) im *ilvA* Gen bis zur *EcoRV* Schnittstelle (Nukleotid 1546) (Abbildung 9). Zu dieser Gruppe zählen die Mutanten 1, 2, 3, 4, 5 und 6. Ebenso wurden die Fragmente der Gruppe 2 amplifiziert (Mutante 7, 8, 9, 10, 11 und 12), die durch eine *ilvA* interne *EspI* (Nukleotid 1455) Schnittstelle und die *HindIII* Schnittstelle der multiplen Klonierungsstelle des Vektors flankiert waren.

Für die Klonierung der PCR Produkte wurden die beiden Plasmide pBM20 und pBM21 konstruiert. Zur Herstellung des Plasmids pBM20 wurde ein 1537 bp *EcoRI* Fragment aus pBM1 / Exo8 (Abbildung 9) in den Vektor pUC19 (*EcoRI* Schnittstelle) ligiert, wo es unter Kontrolle des *lacZ*-Promotors vorlag; in pBM21 lag dasselbe Fragment im Vektor pUC18 vor. Die Expression des *ilvA* Gens war bei Verwendung dieser Konstrukte in *E. coli* JM109 durch IPTG induzierbar, sodaß alle folgenden Untersuchungen in *E. coli* durchgeführt werden konnten. Aus dem Plasmid pBM20 wurde ein internes *NcoI* - *EcoRV* Fragment deletiert, welches den amplifizierten PCR Produkten der Gruppe 1

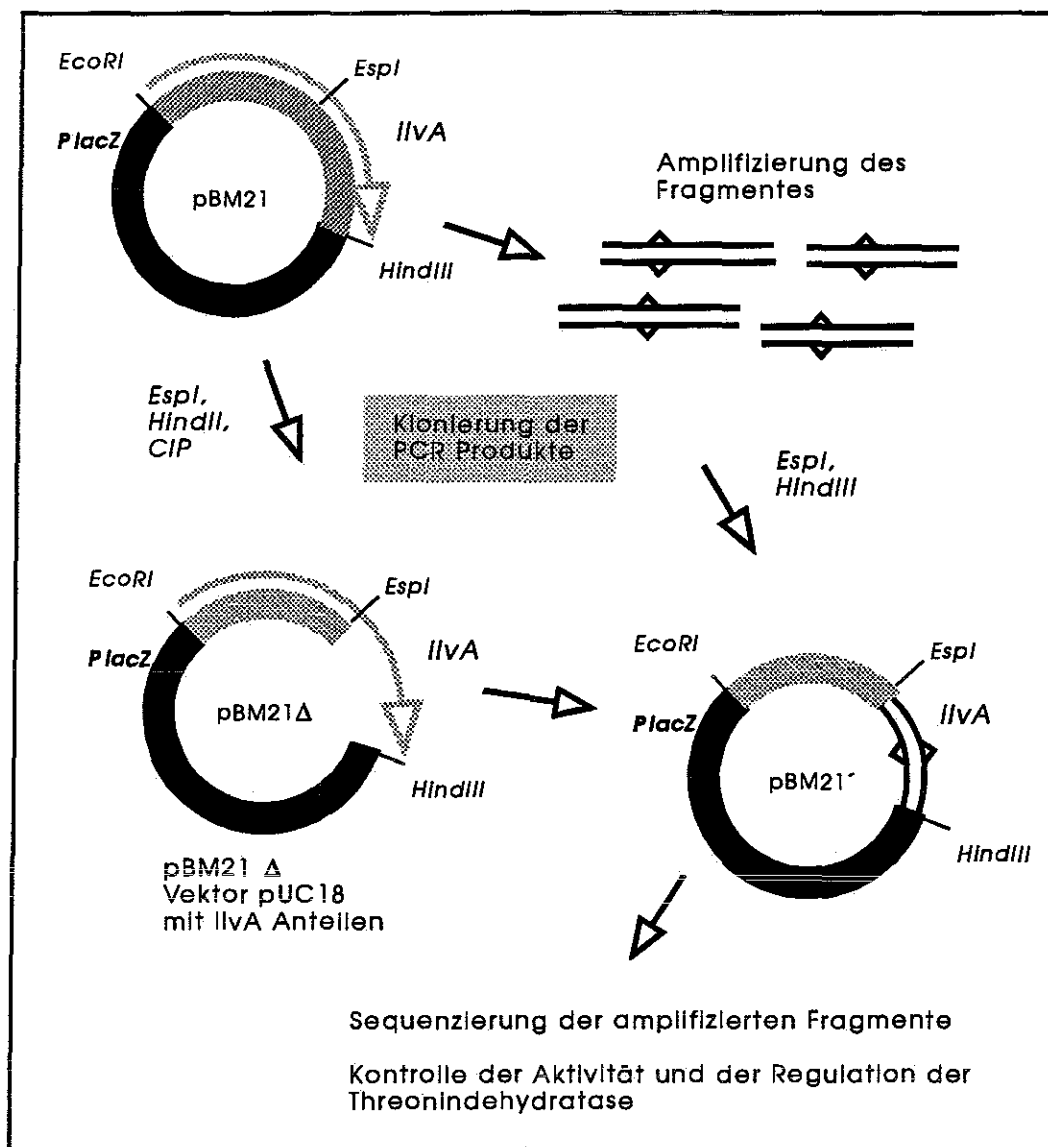


Abbildung 22: Versuchsablauf zur Mutagenese des C-terminalen Teils der DNA-Sequenz des Threonindehydratase Gens und Klonierung der amplifizierten Fragmente.

entspricht. Entsprechend wurde aus pBM21 ein *EspI* – *HindIII* Fragment entfernt für die Klonierung der Gruppe 2 Fragmente (Abbildung 22). Die PCR Produkte wurden nach Spaltung mit den Enzymen *NcoI* und *EcoRV* (bzw. *EspI* – *HindIII*) in das jeweilige vorbereitete Plasmid (pBM20 Δ , pBM21 Δ) ligiert und in den *E. coli* Stamm JM109 transformiert. Aus den erhaltenen Transformanten wurden durch Restriktionsanalyse diejenigen ausgewählt, die das amplifizierte Fragment im Vektor inseriert trugen.

Bei der Planung der ortsspezifischen Mutagenese mußten zunächst der Mutationsort und die Art des Aminosäureaustausches festgelegt werden. Im ersten Schritt des Auswahlverfahrens für die Mutationen 4, 5 und 6 wurden konservierte und variable Regionen im Alignment der verschiedenen Threonindehydratase Sequenzen lokalisiert. Der Bereich um die Aminosäuren 328 – 331 ist in den verschiedenen Threonindehydratasen hoch konserviert. Diese Aminosäurefolge befindet sich im Protein am Übergang zwischen N-terminaler und C-terminaler Domäne. Nach den Sekundärstruktur-Voraussagen bilden die Aminosäuren 328 bis 334 eine Loop-Struktur, die unmittelbar auf ein β -Faltblatt folgt. Die Aminosäure Isoleucin 328, die aufgrund ihrer Eigenschaften die Ausbildung des β -Faltblattes begünstigt, wurde durch Lysin ersetzt, das nach Chou & Fasman (1974a; 1974b) eher Faltblatt "brechende" Eigenschaften besitzt. Mit dieser Mutation wurde weiterhin eine negative Ladung in einen hydrophoben Bereich des Proteins eingebracht, was ebenfalls die Störung lokaler Strukturen bewirken kann. Die Aminosäure Serin 418 wurde aus zwei Gründen ausgetauscht. Zum einen war bekannt, daß der Austausch von Leucin 495 $\rightarrow$ Glutamin in der *E. coli* Threonindehydratase zur feedback Resistenz führt (Umbarger, persönliche Mitteilung). Das Alignment ergab, daß die Aminosäure 495 in der *E. coli* Threonindehydratase der Position 418 im *C. glutamicum* Enzym entspricht. Zum anderen ergaben die Sekundärstruktur-Voraussagen, daß die Aminosäure Serin 418 am Rand einer Helix positioniert ist. Bei der Auswahl der eingesetzten Aminosäuren wurden die Klassifizierungen von Aminosäureaustauschen nach Argos (1987) berücksichtigt. Für den Austausch von Glutamat gegen Alanin wird demnach ein hoher H-H-Wert angegeben, das heißt eine hohe Wahrscheinlichkeit, daß die lokalisierte Helix bei Ausführung des angegebenen Aminosäureaustausches erhalten bleibt. Es wurden solche Aminosäuren für den Austausch von Serin 418 ausgewählt, die wie Serin die Ausbildung einer α -Helix begünstigen, um die vorausgesagte Struktur in diesem Bereich beizubehalten.

Die mutagenisierten DNA-Fragmente wurden nach ihrer Klonierung sequenziert. Dabei diente die Sequenzierung der Überprüfung zweier Kriterien: Zum einen wurde kontrolliert, daß die gewünschte, durch den Mutagenese-Primer kodierte, Mutation vorhanden war, zweitens mußte gewährleistet sein, daß keine zusätzliche Mutation im klonierten Fragment während der Amplifizierung eingefügt worden war. Dazu wurden die amplifizierten DNA-Fragmente unter Verwendung spezifischer Primer sequenziert. Diejenigen Transformanten, die den oben angegebenen Kriterien genügten, wurden im nächsten Schritt auf Aktivität und Regulation der Threonindehydratase im Enzymtest untersucht.

3.3.2 Herstellung von Mutanten durch ungerichtete Mutagenese

Neben der gerichteten Mutagenese der allosterischen Domäne der Threonindehydratase wurde auch eine ungerichtete Mutagenese zur Isolierung regulatorisch veränderter Threonindehydratasen benutzt. Zur Durchführung dieses Ansatzes mußte zusätzlich ein biologisches Testsystem entwickelt werden, um schnell die gewünschten feedback-resistenten Mutanten identifizieren zu können. Die Polymerase-Kettenreaktion bietet eine effiziente Möglichkeit zur Erzeugung einer Reihe von unterschiedlichen Punktmutationen in einem DNA-Fragment. Die *Taq*-Polymerase besitzt keine 3' → 5' Exonuklease Aktivität (Proofreading-Funktion) (Tindall & Kunkel 1988) und zeigt daher eine im Vergleich zu Polymerasen mit sogenannter Proofreading-Funktion erhöhte Fehlerrate von 10^{-5} – 10^{-4} pro eingebautem Nukleotid. Durch die Veränderung der Reaktionsbedingungen läßt sich die Häufigkeit der auftretenden Punktmutationen noch weiter steigern (Leung *et al.*, 1989).

Zur Mutagenese mit der *Taq*-Polymerase wurden zwei Primer verwendet (siehe Material und Methoden), wobei der 5'-Primer die *ilvA* interne *NcoI* Schnittstelle (Position 1001 in Abbildung 9) trägt und der 3'-Primer die *HindIII* Erkennungsstelle der Multiple-Cloning-Site des Vektors enthält. Die beiden Oligonukleotide ermöglichten so die Amplifizierung eines DNA-Fragmentes, das 741 bp des *ilvA* Gens beinhaltet und für den C-terminalen Teil der Threonindehydratase kodiert. Die Amplifikationsprodukte wurden in das Plasmid pBM20Δ inseriert, aus dem die entsprechende Wildtypsequenz entfernt worden war. Dazu wurde aus dem Ausgangsplasmid pBM20 das *NcoI* – *HindIII* Fragment ausgeschnitten und der übrige Anteil des Plasmids pBM20Δ isoliert. Dieses Fragment enthielt den gesamten Vektoranteil des Plasmides sowie den N-terminalen Bereich des *ilvA* Gens. Um eine Kollektion von Mutanten zu erzeugen, wurden die Amplifikationsprodukte mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *HindIII* gespalten, gereinigt, mit dem Plasmid pBM20Δ ligiert und somit das *NcoI* – *HindIII* Fragment der Wildtyp *ilvA*-Sequenz durch eine Reihe von Amplifikationsprodukten ersetzt. Kompetente Zellen des *E. coli* Stammes JM 109 wurden mit den Ligationsansätzen transformiert und die erhaltenen Transformanten wurden durch Restriktionsanalyse überprüft.

Da im Plasmid pBM20 das *ilvA* Gen unter Kontrolle des *lacZ*-Promotors vorliegt, konnte die Threonindehydratase aus *C. glutamicum* durch IPTG-Induktion in *E. coli* exprimiert werden. Die Selektion von feedback-resistenten Mutanten konnte daher leicht in *E. coli* durchgeführt werden. Kernstück der Isolierung feedback-resistenter Enzyme war ein biologisches Testsystem, bei dem der toxische Effekt des Produktes der Threonindehydratase Reaktion α -Ketobutyrat genutzt wurde. Für *E. coli* und *S. typhimurium* ist bekannt, daß α -Ketobutyrat in hohen Konzentrationen der Zelle schadet, da es in verschiedene Stoffwechselwege eingreift und als Struktur analogon mit einer Reihe von Substraten konkurriert (VanDyk & LaRossa, 1986; Danchin *et al.*, 1984; Daniel *et al.*, 1984). Es galt deswegen Bedingungen einzustellen, unter denen die

zellinterne Akkumulation von α -Ketobutyrat im Plattentest erkannt werden konnte. Für *E. coli* K-12 Stämme ist bekannt, daß zugesetztes Valin im Medium die Acetohydroxysäuresynthase I (*ilvBN*) und III (*ilvIH*) in ihrer Aktivität hemmt und die Acetohydroxysäuresynthase III (*ilvGM*) in Folge einer Leserastermutation nicht exprimiert wird (Favre *et al.*, 1976; Lawther *et al.*, 1981; 1982; Umbarger, 1987). Daher wurde *E. coli* JM109 auf Komplexmedium kultiviert, wo die Aktivität der Isoenzyme der Acetohydroxysäure stark reduziert ist. Dem Medium wurde zusätzlich 40 mM Threonin zugesetzt, um ausreichend Substrat für die Threonindehydratase bereitzustellen. Liegt unter diesen Bedingungen eine feedback-resistente Threonindehydratase vor, so wird Threonin ungehindert zu α -Ketobutyrat umgesetzt, das aufgrund der reduzierten Aktivität der Acetohydroxysäuresynthase in der Zelle akkumuliert. Die toxische Wirkung von α -Ketobutyrat wird dann im Plattentest an der Wachstumshemmung erkennbar. Zur Kontrolle des Testansatzes stand ein Plasmid pEU1 zur Verfügung, auf dem das Gen einer feedback-resistenten Threonindehydratase aus *E. coli* unter Kontrolle des induzierbaren *tac*-Promotors kloniert war (Umbarger, persönliche Mitteilung). Die Überprüfung zeigte, daß die Threonindehydratase dieser Mutante erst durch 30 mM Isoleucin um 50 % in ihrer Aktivität gehemmt wird (Abbildung 3). Um die Zusammensetzung der Testmedien festzulegen, wurde das Wachstum des Kontrollstammes auf einer Reihe unterschiedlicher Medien untersucht. Es wurden verschiedene Minimal- und Vollmedien verwendet sowie die Konzentration des zugesetzten IPTG, zur Induktion der Expression des *ilvA* Gens, und die Konzentration an L-Threonin, L-Valin und L-Isoleucin variiert. Die Wachstumshemmung des Kontrollstammes war auf LB-Medium mit 40 mM L-Threonin und 1 mM IPTG im direkten Vergleich mit Platten ohne IPTG deutlich zu erkennen. Daher wurden die zu untersuchenden Mutanten parallel auf diese Testmedien Platten übertragen. Die Isolierung der feedback-resistenten Mutanten wurde nach dem in Abbildung 23 dargestellten Ablauf durchgeführt. Es wurden etwa 10.000 Transformanten auf die Testmedien aufgebracht und auf Wachstumshemmung durch Akkumulation von α -Ketobutyrat überprüft. Ausgewählt wurden solche Transformanten, die auf Medien mit Threonin normales Wachstum und auf Medien mit Threonin und IPTG eine weißliche, durchscheinende Koloniefärbung aufwiesen. Die im ersten Schritt ausgewählten 86 Transformanten wurden erneut auf den gewünschten Phänotyp überprüft, wozu ein Quadrantenausstrich auf den Testmedien angelegt wurde. Es wurden 35 Transformanten, die auch im Quadrantenausstrich die durchscheinende Färbung aufwiesen, für die weitere Charakterisierung ausgewählt.

3.3.3 Genetische und biochemische Charakterisierung der mutierten Threonindehydratasen

Zur biochemischen Charakterisierung der hergestellten Threonindehydratase Mutanten wurden im ersten Schritt Isoleucin-Hemmkurven von allen Mutanten ermittelt, die durch ortsspezifische Mutagenese hergestellt worden waren und von 35 Mutanten,

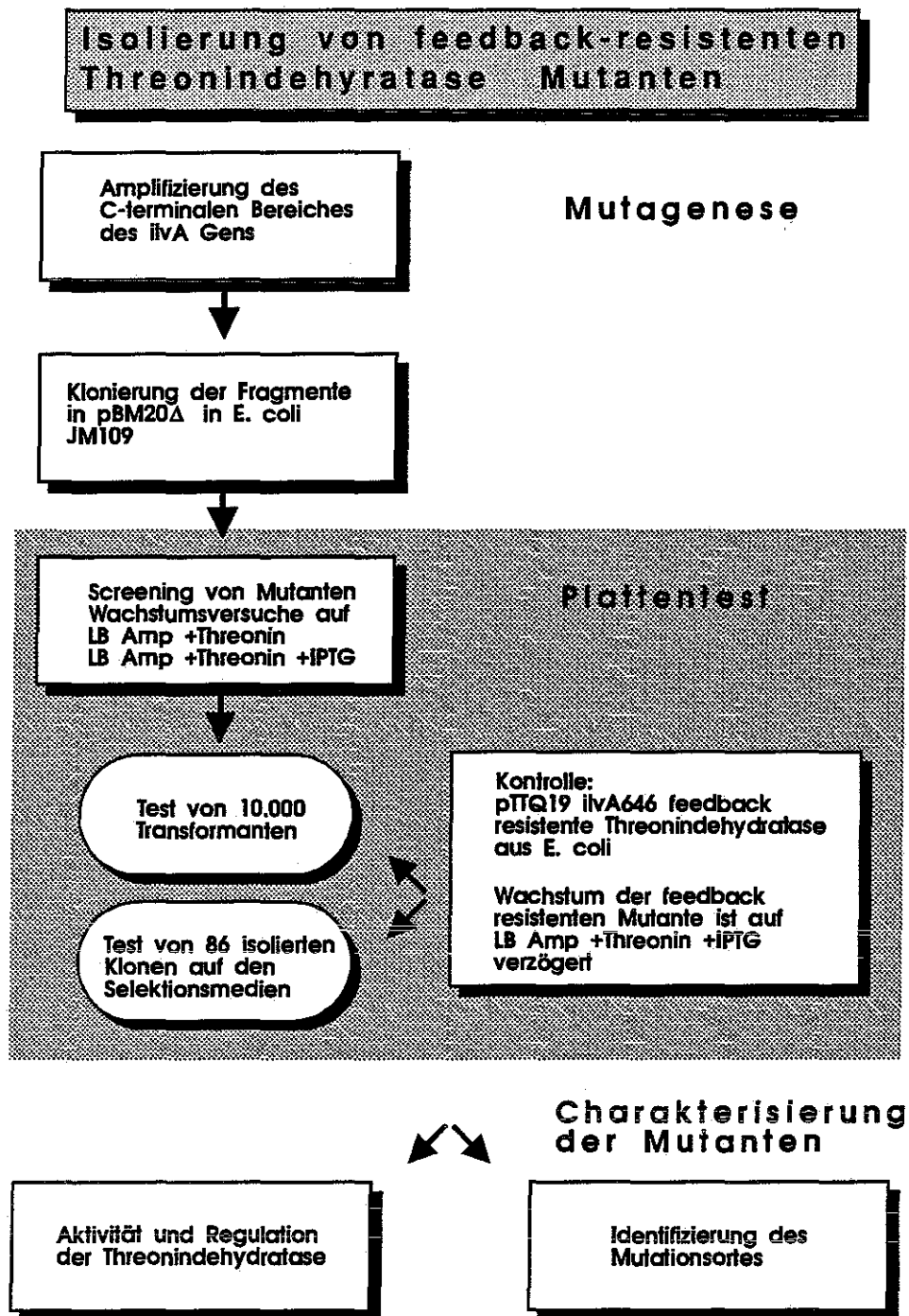


Abbildung 23: Vorgehen zur Isolierung feedback-resistenter Threonindehydratase Mutanten nach unspezifischer Mutagenese mit einem biologischen Testsystem.

die durch unspezifische Mutagenese erstellt worden waren. Dazu wurde bei steigender Konzentration des Inhibitors Isoleucin die Aktivität der Threonindehydratase bestimmt. In Abbildung 24 sind diese Hemmkurven für einige Threonindehydratase Mutanten dargestellt. Aus den ermittelten Daten sind die Werte für die Aktivität der Enzyme und die Restaktivität bei Zugabe von 5 mM des Inhibitors in Tabelle 9 zusammengefaßt.

Durch den ortsspezifischen Austausch der Aminosäure Threonin 289 gegen Valin oder Aspartat (Mutante 1 und 2) wurde keine Veränderung der Hemmung der Threonindehydratase durch Isoleucin erzielt. Die Aktivität des Enzyms ohne Zusatz von Isoleucin und bei Zugabe von 5 mM Effektor waren nicht signifikant verändert. Im Vergleich zum Wildtyp wies die Mutante 7 (Leucin 402 → Phenylalanin) eine geringe Hypersensitivität gegenüber der Isoleucin-Hemmung auf. Die Mutante 8 (Glutamat 417 → Alanin) zeigte bei Zusatz von 5 mM Isoleucin geringere Hemmbarkeit durch Isoleucin als die Wildtyp Threonindehydratase. Nahezu inaktive Threonindehydratasen wurden durch den Austausch der Aminosäuren Glutamat 303 gegen Valin (Mutante 3), Isoleucin 328 gegen Lysin (Mutante 4), Glycin 330 gegen Aspartat (Mutante 5), Glycin 331 gegen Leucin und Glycin 96 gegen Aspartat (Mutante 13) erzeugt (Tabelle 9). Die Aktivität der Threonindehydratase war bei diesen Mutanten auf weniger als 1,5 % der Aktivität des Wildtyp-Enzyms reduziert. Der Austausch der Aminosäure Serin 418 erzeugte Varianten der Threonindehydratase, die erniedrigte Aktivität des Enzyms aufwiesen, durch Isoleucin jedoch deutlich weniger gehemmt wurden als der Wildtyp, wie ebenfalls an Hand der Isoleucin-Hemmkurven ersichtlich war (Abbildung 24).

Durch die unspezifische Mutagenese waren Mutanten hergestellt worden, von denen 12 eine im Vergleich zur Wildtyp Threonindehydratase deutlich veränderte Regulation aufwiesen. Hiervon wurden sechs Mutanten weitergehend charakterisiert (Abbildung 24). Unter diesen Mutanten ließen sich verschiedene Gruppen in dieser ersten Charakterisierung unterscheiden. Die Mutanten 38¹ und 14² zeigten die gewünschte Resistenz der Threonindehydratase gegenüber steigenden Mengen Isoleucin im Testansatz und wurden bei hoher Aktivität der Threonindehydratase, die dem Wert des Wildtyps entsprach, nicht durch Isoleucin gehemmt. Eine Mutante (Mutante 16³) wies bei niedriger Grundaktivität ebenso die Resistenz gegenüber der feedback-Hemmung durch Isoleucin auf. Bei einer weiteren Gruppe (Mutante 50⁴ und 54⁵) war die Grundaktivität der Threonindehydratase deutlich verringert (ohne Zusatz des Effektors Isoleucin) (Abbildung 24, Tabelle 9).

¹Der Aminosäureaustausch wurde wie in Tabelle 9 dargestellt durch Sequenzierung der DNA-Sequenz ermittelt. Val 323 → Alanin

²Histidin 278 → Arginin, Leucin 351 → Serin

³Aspartat 378 → Glycin

⁴Alanin 257 → Glycin

⁵Methionin 235 → Valin

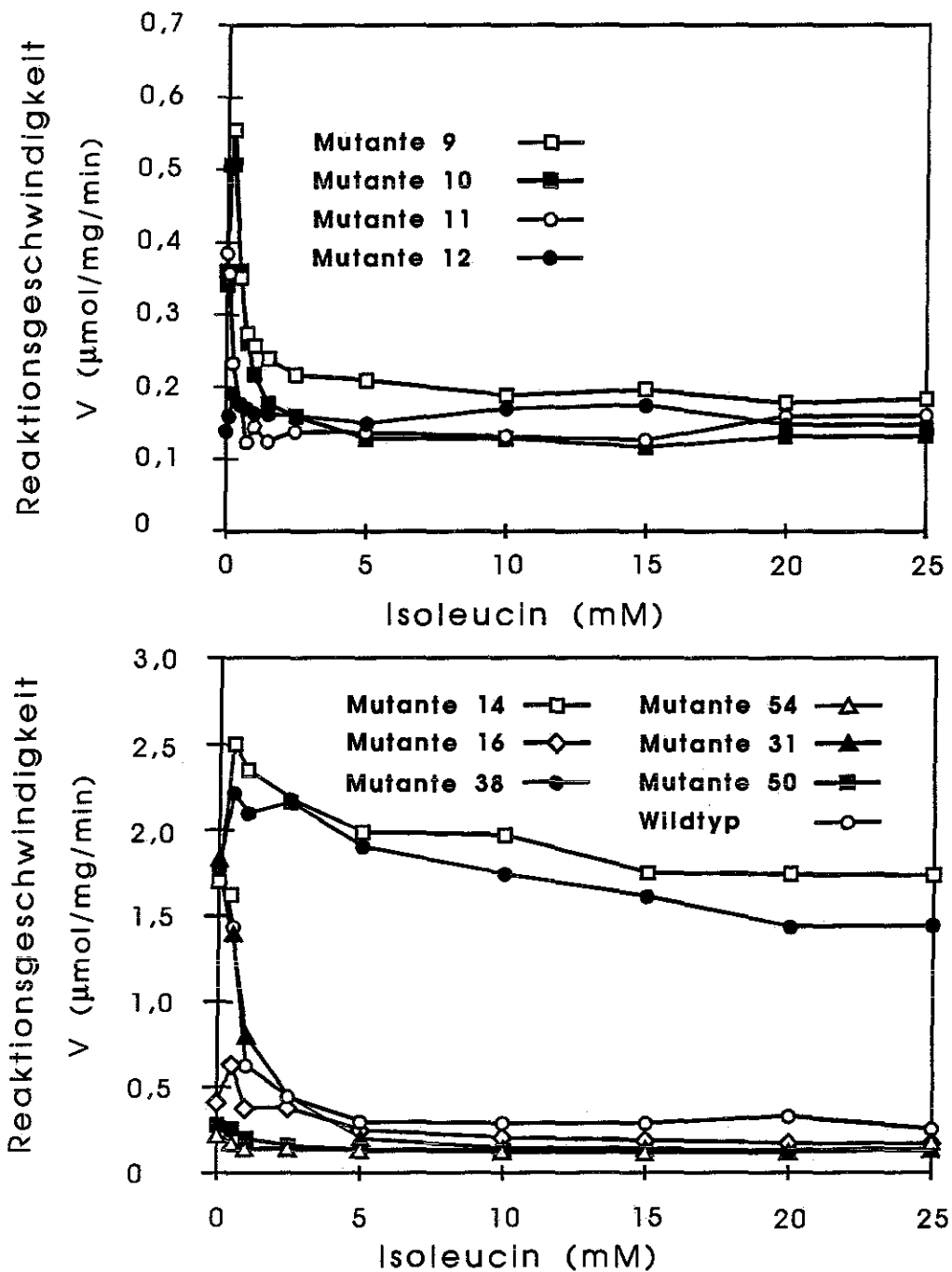


Abbildung 24: Einfluß von Isoleucin auf die Aktivität der Threonindehydratase von Mutanten, die durch ortsspezifische Mutagenese (oben) und durch unspezifischen Mutagenese (unten) hergestellt wurden. Die Aktivität wurde bei steigender Menge Isoleucin im Semicarbazid-Test ermittelt. Es wurden 40 mM L-Threonin im Test eingesetzt.

Tabelle 9: Zusammenfassung der Mutationsorte der durch ortsspezifische und unspezifische Mutagenese erstellten Threonindehydratase Mutanten und Einfluß von L-Isoleucin auf die Aktivität der Threonindehydratase. Zur Kennzeichnung der Nukleotidaustausche ist das erste Nukleotid des jeweils relevanten Triplets in der Sequenz des *ilvA* Gens angegeben. Die spezifische Aktivität der Threonindehydratase wurde im Semicarbazid-Test bestimmt (ohne Zusatz von Isoleucin und mit Zusatz von 5 mM Isoleucin).

	Nukleotidaustausch			Aminosäureaustausch			Spez. Akt. (U/mg)	
	Position	Wildtyp	Mutante	Position	Wildtyp	Mutante	-Ile	5mM Ile
	Wildtyp						1,561	0,240
1	1296	ACT	GTT	289	Thr	Val	1,732	0,250
2	1296	ACT	GAT	289	Thr	Asp	1,580	0,220
3	1338	GAG	GTG	303	Glu	Val	0,021	0,018
4	1413	ATG	AAG	328	Ile	Lys	0,021	0,016
5	1419	GGT	GAT	330	Gly	Asp	0,019	0,015
6	1422	GGC	TTG	331	Gly	Leu	0,023	0,021
7	1634	TTG	TTT	402	Leu	Phe	1,811	0,100
8	1680	GAA	GCA	417	Glu	Ala	1,620	0,420
9	1683	TCG	CAG	418	Ser	Gln	0,359	0,209
10	1683	TCG	GCA	418	Ser	Ala	0,342	0,129
11	1683	TCG	GAT	418	Ser	Asp	0,385	0,137
12	1683	TCG	GAG	418	Ser	Glu	0,139	0,151
13	717	GGT	GAT	96	Gly	Asp	0,024	0,021
14	1263	CAC	CGC	278	His	Arg	1,708	1,989
+	1482	TTG	TCG	351	Leu	Ser		
38	1398	GTC	GCC	323	Val	Ala	1,771	1,907
16	1560	GAT	GGT	378	Asp	Gly	0,412	0,251
31	1578	TTT	TGT	383	Phe	Cys	1,932	0,590
50	1200	GCA	GGA	257	Ala	Gly	0,220	0,132
54	1134	ATG	GTG	235	Met	Val	0,280	0,136

Zur Lokalisierung der Mutationsorte wurden die amplifizierten DNA-Fragmente derjenigen Mutanten sequenziert, die durch unspezifische Mutagenese erzeugt worden waren. Im Vergleich mit der Wildtypsequenz wurden die jeweiligen Mutationsorte identifiziert. Unter 10 analysierten Fragmenten fanden sich sechs, auf denen Nukleotidaustausche vorlagen, die zu einer Änderung der Aminosäuresequenz des Proteins führten. Art und Position der Mutationen sind in Tabelle 9 zusammengefaßt. Die Mutationsorte waren über den gesamten Bereich des mutagenisierten Fragmentes verteilt. Unter den Mutationen fanden sich bevorzugt (in 6 von 7 Fällen) Transitionen ($A/T \rightarrow C/G$), was den von Zhou *et al.* (1991) und Dunning *et al.* (1988) beschriebenen Ergebnissen bei der ungerichteten Mutagenese mit Hilfe der *Taq*-Polymerase entspricht. Die Betrachtung der Codon-Usage zeigte, daß in keinem Fall durch die Nukleotidaustausche Triplets entstanden, die zu den seltenen Codons in *E. coli* oder *C. glutamicum* (Eikmanns, 1992) gehören. An den Aminosäureaustauschen wird deutlich, daß die Mutationen bevorzugt zum Einbau von kleineren, weniger sperrigen Resten führen. Um die Eigenschaften der Mutanten hinsichtlich ihrer Regulation genauer zu charakterisieren, wurden im nächsten Schritt die Substratsättigungskurven der Threonindehydratase erstellt.

3.3.4 Bestimmung der kinetischen Parameter der Enzyme

Um die veränderte Regulation der hergestellten Threonindehydratase Mutanten an Hand der kinetischen Parameter $K_{0,5}$, V_{max} und der Hill-Koeffizienten zu beschreiben, wurde die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Threonindehydratase von der Substratkonzentration (Substratsättigungskurven) untersucht. Der Einfluß des heterotrophen Effektors Isoleucin wurde ebenfalls durch die Aufnahme von Substratsättigungskurven charakterisiert (Abbildungen 25 und 27).

Aus den ermittelten Daten wurden die kinetischen Parameter $K_{0,5}$, V_{max} und die Hill-Koeffizienten nach der Hill-Gleichung durch eine nicht lineare Ausgleichsrechnung nach der Methode der kleinsten Quadrate (least-square fit) bestimmt (Johnson & Frasier, 1985). Um die V_{max} Werte direkt vergleichen zu können und mögliche Effekte unterschiedlicher IPTG-Induktion auszuschließen, war es notwendig, die Konzentration des Threonindehydratase Proteins im Rohextrakt zu bestimmen. Von den Rohextrakten wurden dazu Aliquots zur Bestimmung der Konzentration an Threonindehydratase verwendet. Durch eine Western-Blot Analyse wurde mit einem Antikörper, der gegen die Threonindehydratase aus *C. glutamicum* gerichtet war, die spezifische Anfärbung des Proteins ermöglicht und im Vergleich mit Proteinproben bekannter Konzentration der Gehalt an Threonindehydratase im Rohextrakt ermittelt. In Tabelle 10 sind die V_{max} -Werte und die Werte für $K_{0,5}$ sowie die Hill-Koeffizienten für 10 Mutanten zusammengefaßt.

Durch die ortsspezifische Mutagenese waren Mutanten mit Aminosäureaustausch in Position 418 der Threonindehydratase hergestellt worden, deren Eigenschaften signifikant von denen des Wildtyps abwichen (Abbildung 25, Tabelle 10). Die Substratsättigungskurven zeigten erhöhte Sigmoidität, was ebenfalls durch die Erhöhung der Hill-Koeffizienten für alle vier Mutanten beschrieben wird (Tabelle 10). Allen mutierten Enzymen war die Eigenschaft gemeinsam, daß V_{max} gegenüber dem Wildtyp-Enzym erniedrigt war und der $K_{0,5}$ -Wert erhöht, also die Affinität zum Substrat erniedrigt ist. Besonders deutlich zeigten sich die Effekte jedoch bei Mutante 12, in deren Sequenz Serin 418 gegen Glutamat ausgetauscht ist. Die Threonindehydratase der Mutante 12 wies einen im Vergleich zum Wildtyp um den Faktor 6 erhöhten $K_{0,5}$ -Wert auf. Aus den Meßdaten ließ sich für dieses Enzym ein Hill-Koeffizient von 3,75 errechnen. Die Kooperativität gegenüber der Substratbindung war durch die Mutation demnach deutlich verstärkt. Bei diesen Mutanten mit Aminosäureaustausch in Position 418 der Peptidsequenz bewirkte der Zusatz des Inhibitors Isoleucin eine Abnahme der Kooperativität der Substratbindung im Vergleich zu den Messungen ohne Zusatz von Isoleucin (Abbildung 25). Dementsprechend sank die Steigung der ermittelten Geraden in der Hill-Auftragung (Abbildung 26), die die Werte der Hill-Koeffizienten wiedergibt. Durch den Austausch von Serin 418 gegen Aspartat oder Glutamat wurde die Affinität der Threonindehydratase zum Substrat Threonin stark beeinträchtigt, wie durch die sehr

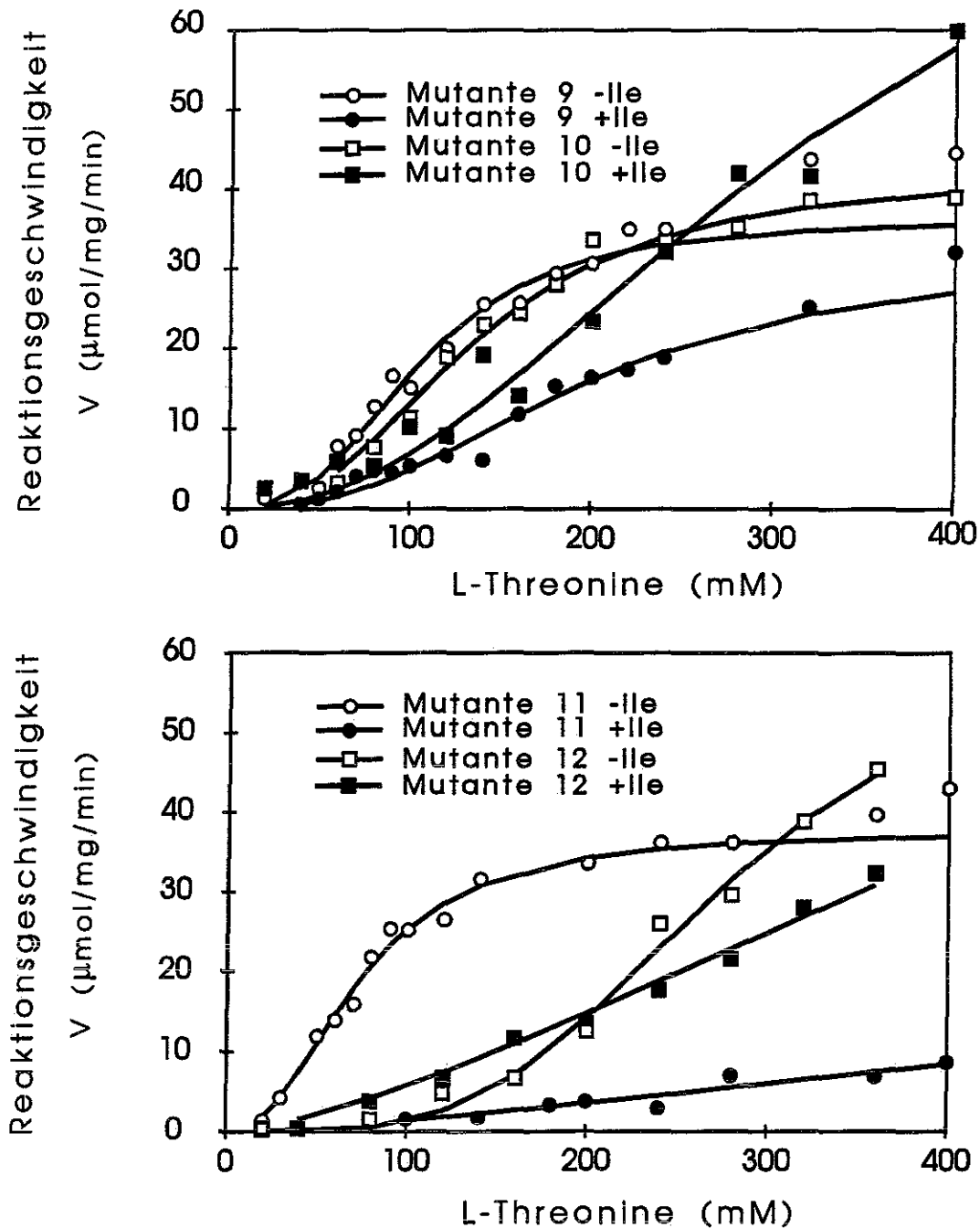


Abbildung 25: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration (Substratsättigungskurven) der Threonindehydratase Mutanten mit Aminosäureaustausch in Position 418. Mutante 9: Serin 418 → Glutamin, Mutante 10: Serin 418 → Alanin, Mutante 11: Serin 418 → Aspartat, Mutante 12: Serin 418 → Glutamat. Dargestellt sind die Substratsättigungskurven, die ohne Zusatz von Isoleucin und mit Zusatz von Isoleucin (0.625 mM) ermittelt wurden. Die Bestimmung der Aktivität der Threonindehydratase erfolgte mit dem Lactatdehydrogenase-Test.

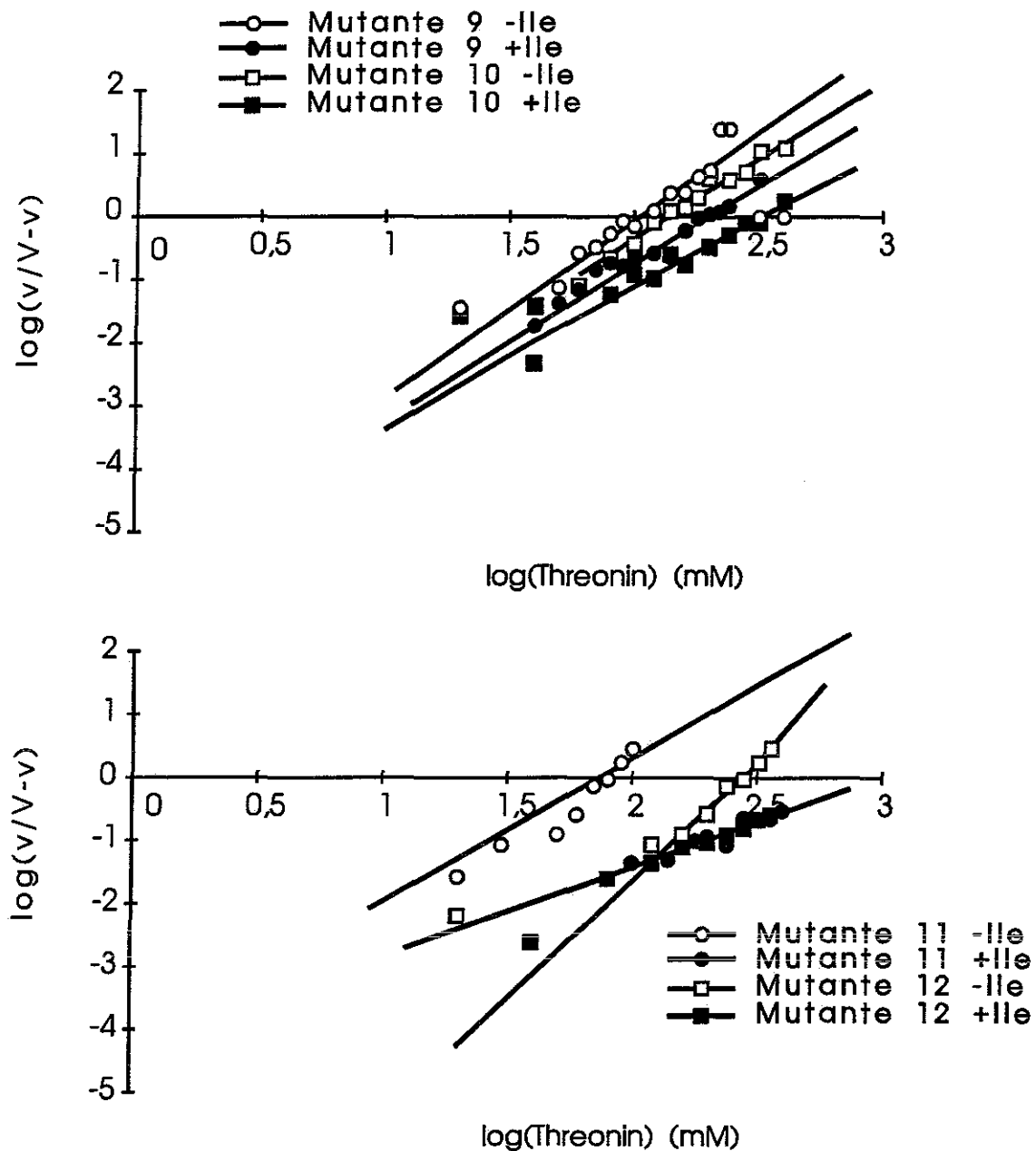


Abbildung 26: Hill-Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit der Threonindehydratase, die in Abhängigkeit von der Substratkonzentration ermittelt wurde, für die Threonindehydratase Mutanten mit Aminosäureaustausch in Position 418. Mutante 9: Serin 418 → Glutamin, Mutante 10: Serin 418 → Alanin, Mutante 11: Serin 418 → Aspartat, Mutante 12: Serin 418 → Glutamat.

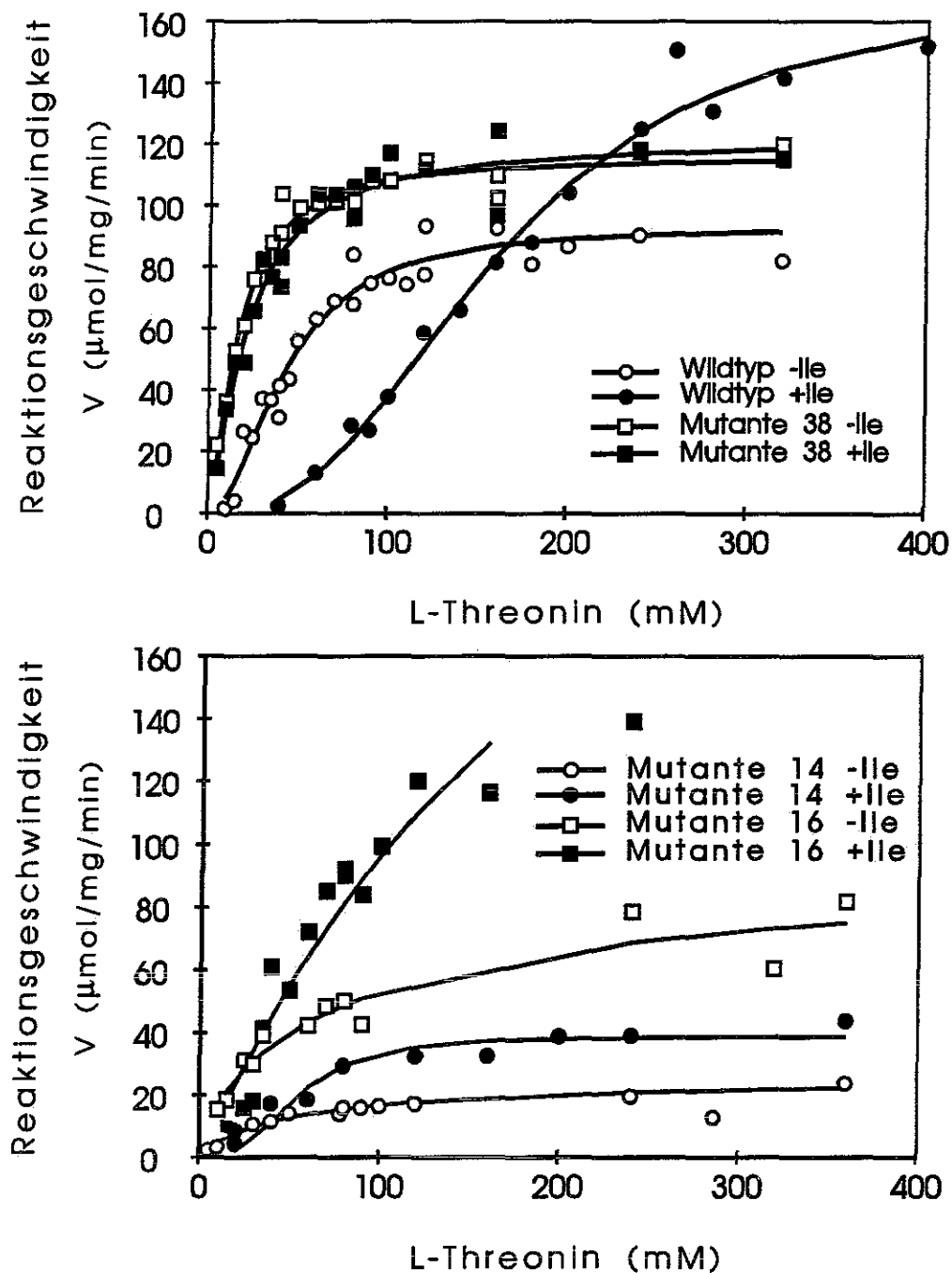


Abbildung 27: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration für die Mutanten 38 (Valin 323 $\rightarrow$ Alanin), 14 (Histidin 278 $\rightarrow$ Arginin, Leucin 351 $\rightarrow$ Serin) und 16 (Aspartat 378 $\rightarrow$ Glycin) sowie für die Wildtyp Threonindehydratase.

Dargestellt sind die Substratsättigungskurven, die ohne Zusatz von heterotrophem Effektor und mit Zusatz von Isoleucin (0.625 mM) ermittelt wurden. Die Bestimmung der Aktivität der Threonindehydratase erfolgte mit dem Lactatdehydrogenase-Test.

hohen $K_{0,5}$ -Werte beschrieben wird.

Von den durch ungerichtete Mutagenese hergestellten Mutanten wurden sechs an Hand ihrer Substratsättigungskurven charakterisiert. Der Aminosäureaustausch Valin 323 gegen Alanin in Mutante 38 führte zu einem vollständigen Verlust der Sigmoidität der Substratsättigungskurve (Abbildung 27). Die Mutante zeigte weder den typischen homotropen noch heterotropen Effekt des allosterisch regulierten Enzyms. Stattdessen wies die ermittelte Substratsättigungskurve einen hyperbolen Verlauf auch bei Zugabe des Effektors Isoleucin (0,625 mM) auf, wie die durch Valin aktivierte Wildtyp Threonindehydratase. Der Inhibitor Isoleucin hatte also keinerlei Einfluß auf die Aktivität und die Regulation des Enzyms (Tabelle 10).

Die Mutante 14 zeigte bei reduzierter Aktivität der Threonindehydratase und Verlust an Kooperativität (Hill-Koeffizient 0,9) im Vergleich zum Wildtyp einen nahezu unveränderten $K_{0,5}$ -Wert. Die besondere Eigenschaft von Mutante 14 war, daß der $K_{0,5}$ -Wert bei Zusatz des Effektors Isoleucin ebenfalls unverändert blieb, während bei der Wildtyp Threonindehydratase die Affinität zum Substrat um Faktor 4 abnahm. Mutante 16, in deren Aminosäuresequenz Aspartat 378 gegen Glycin ausgetauscht ist, wies einen deutlich erhöhten $K_{0,5}$ -Wert (4 facher Wert der Wildtyp Threonindehydratase) auf, der jedoch durch die Zugabe von Isoleucin nicht beeinflußt wurde. Auffällig war die stark erhöhte Aktivität (V_{max}) in der Substratsättigungskurve in Gegenwart von Isoleucin (Abbildung 27). Dies zeigte, daß in dieser Threonindehydratase Mutante die Aktivität des Enzyms bei Zusatz von Isoleucin deutlich gesteigert wurde.

Verschiedene weitere Mutanten (50, 54, 31) zeigten Unterschiede in den kinetischen Parametern, die jedoch keine so deutliche Veränderungen zu den Eigenschaften des Wildtyp Enzyms darstellten, wie die oben genannten Beispiele. Die kinetischen Eigenschaften dieser Mutanten sind zusammen mit denen der Mutanten 38, 14 und 16 tabellarisch zusammengefaßt (Tabelle 10). Diese eher moderaten Änderungen der Enzymregulation äußern sich in erniedrigtem V_{max} oder $K_{0,5}$ -Wert oder verändertem Hill-Koeffizient.

Tabelle 10: Kinetische Charakterisierung von mutierten Threoninehydratasen und Einfluß von Isoleucin auf die kinetischen Parameter. Die Berechnung der Parameter erfolgte an Hand der Daten aus den Substratsättigungskurven nach der Hill-Gleichung. Die Proteinkonzentrationen wurden durch Western-Blot Analyse bestimmt. Die Isoleucin Konzentration im Testansatz betrug 0,625 mM.

Mutante	ohne Isoleucin			mit Isoleucin		
	V_{max} [$\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}\cdot\text{mg}}$]	Hill	$K_{0,5}$ [mM]	V_{max} [$\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}\cdot\text{mg}}$]	Hill	$K_{0,5}$ [mM]
Wildtyp	93.23	1.98	43.44	170.60	3.3	163.78
9 Glutamin 418	36.37	2.83	105.38	21.72	2.49	198.31
10 Alanin 418	42.14	2.54	136.17	94.28	2.16	323.48
11 Aspartat 418	37.70	2.31	73.36	38.41	1.45	955.80
12 Glutamat 418	61.10	3.75	274.80	161.60	1.44	978.18
14 Arginin 278 + Serin 351	26,43	0,89	53,70	38,93	2,99	54,37
16 Glycin 378	100,58	0,76	205,90	305,80	1,07	205,87
38 Alanin 323	116,10	1,47	16,56	121,29	1,37	21,91
31 Cystein 383	74,86	2,65	16,26	157,19	2,41	157,02
54 Valin 235	36,57	2,19	32,67	92,19	1,83	216,08
50 Glycin 257	48,10	3,5	31,96	111,57	2,34	177,00

3.3.5 Computeranalyse der Aminosäureaustausche

Um einen Zusammenhang zwischen Mutation und Phänotyp der Mutanten herstellen zu können, wurden verschiedene Kriterien angelegt, die in Tabelle 11 zusammengefaßt sind. Zum einen wurde untersucht, ob die jeweilige Mutation in konservierten oder variablen Regionen der Peptidsequenz lokalisiert ist. Der Aminosäureaustausch der Mutante 38 befindet sich in einer hochkonservierten Region des Proteins, die sich zwischen N- und C-terminalem Bereich befindet. Die Sequenzfolge ist nicht nur in den Threonindehydratase sondern auch in eukaryotischen L-Serindehydratase und der Tryptophansynthase β -Untereinheit konserviert. Die beiden lokalisierten Mutationen der Mutante 14 hingegen befinden sich in nicht konservierten Bereichen des Proteins. An Hand von Sekundärstruktur-Voraussagen ließ sich abschätzen, ob die Mutationen eine Auswirkung auf die Ausbildung der lokalen Strukturelemente des Proteins haben. So wurde von verschiedenen Methoden im Bereich um die Aminosäure 278 eine β -Faltblatt Struktur vorausgesagt. Der Austausch der Aminosäure Histidin 278 gegen Arginin führt dazu, daß in den Strukturvoraussagen nach ALB und JAMSEK (Mrazek & Kypr, 1988) kein β -Sheet mehr an dieser Position lokalisiert wird. Der Austausch der Aminosäure 323 Valin $\rightarrow$ Alanin der Mutante 38 bewirkte, daß das lokalisierte β -Sheet um die Aminosäuren 321 bis 327 verkürzt wird. Ein wichtiger Aspekt der Strukturuntersuchungen war es, die Mutationsorte im dreidimensionalen Modell der Threonindehydratase zu lokalisieren (Abbildung 29). Die Aminosäure 323 befindet sich an der Oberfläche des Proteins am Rande eines β -Faltblattes, das zum aktiven Zentrum hin verläuft (Abbildung 28) und an der Bindung des Coenzym Pyridoxalphosphat beteiligt zu sein scheint. Eine Veränderung der Struktur des β -Faltblattes kann sich an dieser Position somit direkt auf die Struktur des aktiven Zentrums auswirken. Eine weitere Mutation, die an der Oberfläche der Threonindehydratase im dreidimensionalen Modell liegt, ist der Aminosäureaustausch 278 Histidin $\rightarrow$ Arginin. Die Aminosäure 257 (Mutante 50, Alanin $\rightarrow$ Glycin) liegt in einem Bereich der dem sogenannten "Goldberg-Loop" (Högberg-Raibaud & Goldberg, 1977) entspricht. Diese Region bildet eine flexible Loop-Struktur aus, die an der Wechselwirkung zwischen den Untereinheiten beteiligt sein könnte. Die Mutationsorte Valin 323 (Mutation 38), Histidin 278 (Mutation 14), Alanin 257 (Mutante 50) und Methionin 235 (Mutante 54) liegen im dreidimensionalen Modell der Threonindehydratase an der Oberfläche des Proteins in einem eng umgrenzten Bereich. Im Vergleich zur Gesamtoberfläche des Proteins macht dieser Bereich nur etwa ein Fünftel der Oberfläche aus.

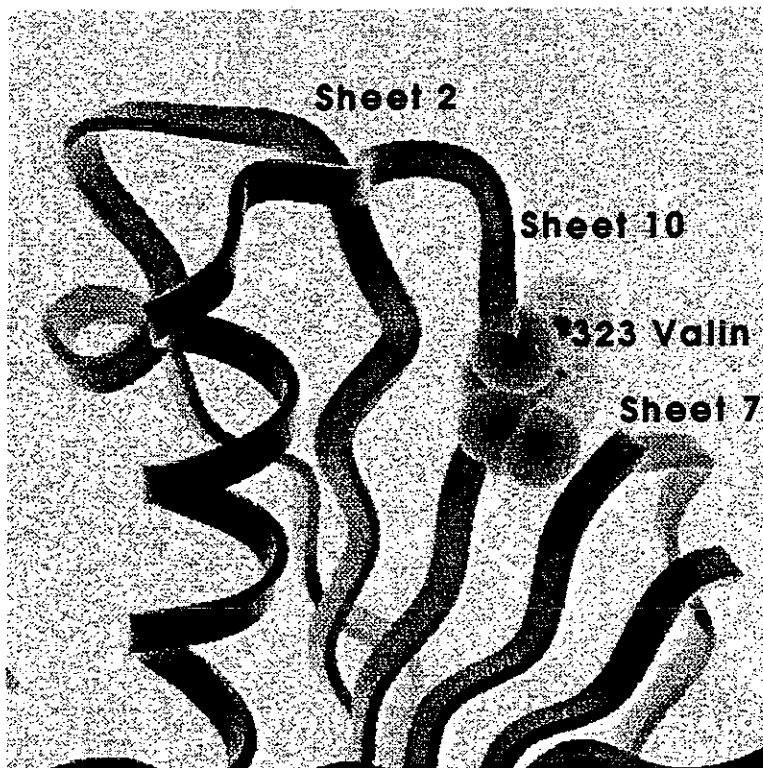


Abbildung 28: Lokalisierung des Mutationsortes Valin 323 im dreidimensionalen Modell der Threonindehydratase. Die Aminosäure Valin 323 ist durch Darstellung im Kalottenmodell gekennzeichnet.

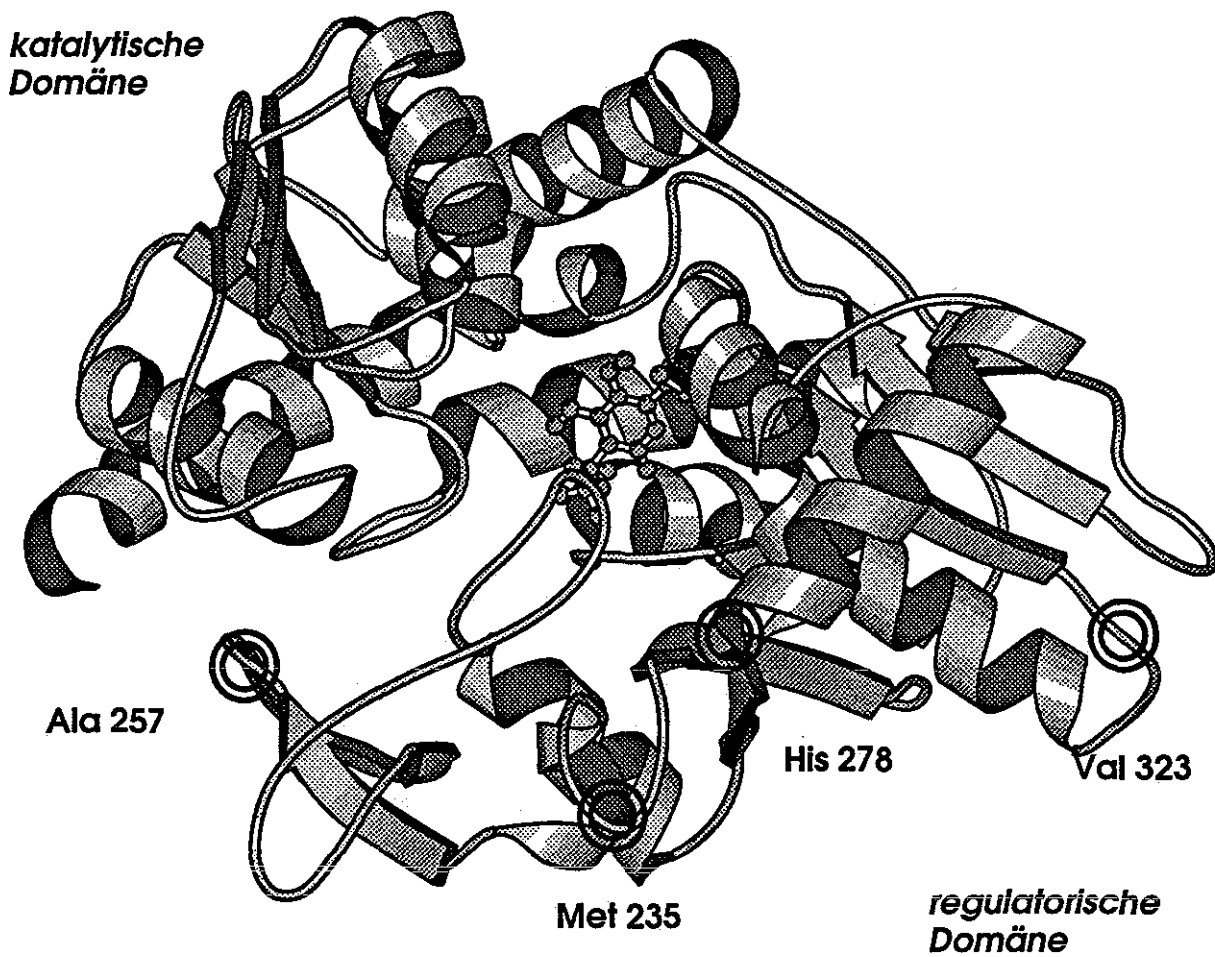


Abbildung 29: Lokalisierung der Mutationsorte Valin 323, Histidin 278, Alanin 257 und Methionin 235 im dreidimensionalen Modell der Threonindehydratase.

Tabelle 11: Computeranalyse der Aminosäureaustausche der verschiedenen Mutanten. Zusammengefaßt sind die Ergebnisse der Sekundär- und Tertiärstruktur-Untersuchungen sowie die Lokalisierung der Aminosäureaustausche im Alignment der Threonindehydratasen.

Austausch	Lage im Alignment	Sekundärstruktur / Hydrophobizität	Tertiärstruktur
38 Val 323→Ala	hochkonservierter Bereich	Turn vor β -Sheet, sehr hydrophob, durch Mutation wird das β -Sheet verkürzt	Lage an der Oberfläche, Beginn von β -Sheet 10, Orientierung des β -Sheets zum aktiven Zentrum
16 Asp 378→Gly	in <i>C. glutamicum</i> , <i>L. lactis</i> und <i>B. subtilis</i> konserviert	Turn zwischen α -Helix und β -Sheet; Tendenz zum Turn wird verstärkt	
14 His 278→Arg	nicht konserviert	β -Sheet 9, fällt durch Mutation weg	Lage an der Oberfläche, keine direkte Verbindung zum aktiven Zentrum
+ Leu 351→Ser	nicht konserviert	Turn zwischen Helix und β -Sheet, hydrophile Region	
50 Ala 257→Gly	zum Teil konserviert	Turn zwischen zwei β -Sheets, hydrophile Region, Tendenz zum Turn verstärkt	Lage an der Oberfläche, "Loop-Region"
31 Phe 383→Cys	konservierter Bereich	β -Sheet	
54 Met 235→Val	nicht konservierter Bereich	hydrophobe Region	Lage an der Oberfläche, Bereich der "Loop-Region"

3.4 Versuche zur Isoleucinproduktion mit deregulierter Threonindehydratase

Die Regulation der Threonindehydratase durch Isoleucin limitiert in *C. glutamicum* Wildtyp Stämmen wirksam die Isoleucin-Biosynthese aus Glukose. Mit Hilfe der *ilvA* Allele, die für feedback-resistente Threonindehydratasen kodieren, sollte daher dieser limitierende Schritt aufgehoben werden. Um den Einfluß der Deregulation der Threonindehydratase auf die Isoleucin-Produktion aus Glukose zu betrachten, wurden die *ilvA* Gene der Mutanten 38, 16 und 14 in *C. glutamicum* Stämme kloniert. Die mutierten *ilvA* Gene mußten dazu in *E. coli* / *C. glutamicum* Pendelvektoren umklontiert werden. Dazu wurden zwei Vektoren ausgewählt, von denen der Vektor pWK0 in *C. glutamicum* in einer niedrigen Kopienzahl von etwa 4 pro Zelle vorliegt (Kronmeyer, pers. Mitteilung) und der zweite Vektor pECM3 eine hohe Kopienzahl in *C. glutamicum* aufweist (Schäfer, persönliche Mitteilung). Die *ilvA* Gen Fragmente der Mutanten 38, 14, und 16 sowie das Wildtyp *ilvA* Gen wurden aus den entsprechenden pBM20⁺ Plasmiden als *EcoRI* Fragmente isoliert und in die Vektoren ligiert. Die erhaltenen Plasmide wurden mittels Elektroporation in die *C. glutamicum* Threoninproduzenten MH20-22B:DR3[2] und MH20-22B:DR17[3] (Reinscheid *et al.*, 1993) übertragen und die erhaltenen Stämme wurden auf Regulation und Aktivität der Threonindehydratase überprüft.

Die erhaltenen *C. glutamicum* Stämme wurden in verschiedenen Medien kultiviert und das gebildete Aminosäurespektrum untersucht (Tabelle 12 und 13). Da im Ausgangsstamm MH20-22B der Stofffluß effektiv über die deregulierte Aspartatkinase zum Lysin-Biosyntheseweg geleitet wird (Schrumpf *et al.*, 1992), wurde weder Threonin noch Isoleucin im Fermentationsmedium nachgewiesen. Die *C. glutamicum* Threonin-Produzentenstämme MH20-22B-DR3[2] (*hom^{FBR}-thrB* zweimal inseriert) und MH20-22B-DR17[3] (*hom^{FBR}-thrB* dreimal inseriert) (Stamm I und Stamm II), die aus dem Lysinproduzenten MH20-22B entwickelt worden sind, tragen die Gene der feedback-resistenten Homoserindehydrogenase (*hom^{FBR}*) und das Gen der Threoninsynthase (*thrB*) im Genom integriert (Reinscheid *et al.*, 1993). Dadurch wird der Stofffluß effektiv in den Threonin-Biosyntheseweg umgeleitet. Diese Threonin Produzenten (Stamm I und Stamm II) akkumulierten neben erheblichen Mengen Threonin (56 mM) (Tabelle 12) jedoch auch verschiedene Nebenprodukte, Homoserin (26 mM) als Intermediat der Threoninbiosynthese, sowie Glycin (23 mM), das als Abbauprodukt von Threonin entsteht (Bell & Turner, 1976). Bei Überexpression des Wildtyp *ilvA* Gens mit Hilfe des "low-copy" Vektors pKW0 wurden noch bis zu 21 mM Threonin gebildet, während die Stämme, die eines der deregulierten *ilvA* Allele trugen, kein Threonin sondern deutlich erhöhte Mengen an Isoleucin ausschieden.

Um eine weitere Steigerung der Isoleucin-Ausbeute zu erzielen, wurde mit dem Vektor pECM3 die Kopienzahl der *ilvA* Allele erhöht. Wie in Tabelle 13 zusammengefaßt,

Tabelle 12: Einfluß der Amplifikation der *ilvA* Allele der Mutanten 38, 16 und 14 im Vergleich mit dem Wildtyp *ilvA* Allel ("low-copy" Vektor pKW0) auf die Aminosäureproduktion mit *C. glutamicum*. Aufgeführt sind die Endkonzentrationen (mM) nach 72 stündiger Kultivierung in C.g. XII Medium mit 4 % Glukose.

Zum Vergleich sind die entsprechenden Werte für den Ausgangsstamm MH20-22B angegeben. Als Stamm I ist der Threoninproduzent MH20-22B-DR3[2] (*hom^{FBR}-thrB* zweimal integriert) bezeichnet, als Stamm II MH20-22B-DR17[3] (*hom^{FBR}-thrB* dreimal integriert).

Stamm	Hom [mM]	Gly [mM]	Thr [mM]	Ile [mM]	Lys [mM]
MH20-22B	–	3	–	1	76
Stamm I	20	23	36	16	26
Stamm I pKW0 <i>ilvA</i>	8	7	14	40	26
Stamm I pKW0 <i>ilvA</i> 14	1	3	–	55	24
Stamm I pKW0 <i>ilvA</i> 16	–	2	–	50	22
Stamm I pKW0 <i>ilvA</i> 38	–	1	–	53	20
Stamm II	26	19	56	15	17
Stamm II pKW0 <i>ilvA</i>	11	7	21	40	22
Stamm II pKW0 <i>ilvA</i> 14	–	1	–	54	14
Stamm II pKW0 <i>ilvA</i> 16	–	2	–	46	14
Stamm II pKW0 <i>ilvA</i> 38	2	3	–	49	18

Tabelle 13: Einfluß der Glukosekonzentration auf die Aminosäureproduktion in *C. glutamicum* auf C.g.XII Medium (4 % Glukose) und 22B-Medium (10 % Glukose). Aufgeführt sind die Endkonzentrationen nach 72 stündiger Kultivierung. Verwendet wurden der Ausgangsstamm MH20-22B, Stamm I MH20-22B-DR3[2] (*hom^{FBR}-thrB* zweimal integriert), sowie Stamm I mit dem *ilvA* Wildtyp Allel bzw. Allel 38 im "high-copy" Vektor pECM3.

Stamm	C.g.XII 4 % Glukose Ile	22B-Medium 10 % Glukose				
		Hom	Gly	Thr	Ile	Lys
MH20-22B	1	–	7	–	2	158
Stamm I	12	42	38	53	29	61
Stamm I pECM3 <i>ilvA</i>	50	8	7	–	88	55
Stamm I pECM3 <i>ilvA</i> 38	58	–	–	–	125	59

wurde durch die erhöhte Kopienzahl des Wildtyp *ilvA* Allels und des *ilvA* Allels der Mutante 38 eine geringe Erhöhung der Isoleucin-Produktion erreicht. Daher wurden erste Ansätze zur Optimierung der Fermentationsbedingungen zur weiteren Steigerung der Isoleucin-Bildung durchgeführt. Durch eine Erhöhung der Substratkonzentration von 4 % Glukose im Medium C.g.XII auf 10 % Glukose im, für den Lysin-Produzenten MH20-22B (Ausgangsstamm für die Entwicklung des Threonin- bzw. Isoleucin-Produktionsstammes) optimierten, 22B Medium wurden erheblich größere Mengen der betrachteten Aminosäuren gebildet (Tabelle 13). Auf diesem Medium akkumulierte der Threonin-Produzent (Stamm I) erhöhte Mengen der Nebenprodukte Homoserin und Glycin, bildet jedoch auch größere Mengen an Threonin. Die Expression des Wildtyp *ilvA* Gens ermöglichte neben der Reduzierung der Nebenproduktbildung, eine gesteigerte Umsetzung des Threonins und damit eine Isoleucin-Ausbeute von bis zu 88 mM. Mit dem feedback-resistenten *ilvA*^{FBR} Allel 38 wurden weder Homoserin noch Glycin, aber 125 mM Isoleucin gebildet.

4 Diskussion

4.1 Kinetische Eigenschaften der Threonindehydratase

Die Regulation von Biosynthesewegen wird vor allem durch die Endprodukt-Hemmung von Enzymen erzielt, die am Beginn der Biosynthesewege stehen. Daher war die Untersuchung der kinetischen Eigenschaften der Threonindehydratase, des Schlüsselenzyms der Isoleucin-Biosynthese, von primärem Interesse, um die Limitierung des Stoffflusses im Isoleucin-Biosyntheseweg zu verstehen und gegebenenfalls diese Limitierung aufzuheben.

Die Threonindehydratase aus *C. glutamicum* zeigte in Abwesenheit der heterotropen Effektoren das typische kooperative Verhalten der Substratsättigungs-Kurven allosterisch regulierter Enzyme (Changeux, 1963). Diese homotrophe Kooperativität wurde im Eadie-Plot durch den konkaven Verlauf der Kurve deutlich. Die ersten Messungen von Changeux (1961) zur Analyse der Regulation der Threonindehydratase aus *E. coli*, ermittelten eine sigmoide Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Threoninkonzentration, während spätere Untersuchungen jedoch in verschiedenen Ansätzen diesen sigmoiden Verlauf der Substratsättigungskurve nur in Anwesenheit von L-Isoleucin zeigten (Harding, 1969; Hatfield & Umbarger, 1970). Erst in den neuesten Untersuchungen zur Threonindehydratase aus *E. coli* wird die Kooperativität der Substratbindung ebenfalls gezeigt (Eisenstein, 1991, Umbarger, 1990), wie auch für die Threonindehydratasen aus *Saccharomyces cerevisiae* (Katsunuma *et al.*, 1971), *Brevibacterium flavum* (Miyajima & Shiio, 1972) und *Rhodopseudomonas spheroides* (Datta, 1971) beschrieben. Für die biosynthetischen Threonindehydratasen aus *Salmonella typhimurium* (Burns & Zarlengo, 1968; Decedue *et al.*, 1975), *Bacillus subtilis* (Hatfield & Umbarger, 1970b) und *Euglena gracilis* (Oda *et al.*, 1983) wurden Michaelis-Menten-Kinetiken ermittelt. Diese Enzyme zeigen nur in Anwesenheit von L-Isoleucin die sigmoide Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration.

Der ermittelte $K_{0,5}$ -Wert liegt für die Threonindehydratase aus *C. glutamicum* mit 21 mM höher als die, für die Enzyme aus Hefe (7 mM (Katsunuma *et al.*, 1971; Ahmed *et al.*, 1976), *B. subtilis* (3,6 mM (Hatfield & Umbarger, 1970b)), und *E. coli* (8 mM (Eisenstein, 1991)) ermittelten Werte. Da in *C. glutamicum* die zellinterne Konzentration an Threonin, dem Substrat der Threonindehydratase, bei 8 – 18 mM liegt (Schrumpf, 1992), ist dies jedoch verständlich. Bei dieser Konzentration im Sättigungsbereich erster Ordnung des Enzyms ($[S] \ll K_{0,5}$), weist das Enzym die größte Empfindlichkeit auf und es reagiert auf Änderungen der Substratkonzentration mit der größtmöglichen Geschwindigkeit. Daher liegt für die Mehrzahl aller Enzyme, wie für die Threonindehydratase, die zelluläre Substratkonzentration unterhalb des $K_{0,5}$ -Wertes im sogenannten *in vivo* Bereich zwischen $0,05 K_{0,5}$ und $1 K_{0,5}$ (Jungermann & Möhler, 1984).

Es ist bekannt, daß der Wert für den Hill-Koeffizient, der die Kooperativität der Liganden-Bindung beschreibt, maximal der Zahl der Substratbindungsplätze entspre-

chen kann. Die kinetischen Untersuchungen ergaben Werte für den Hill-Koeffizient in Abwesenheit der heterotropen Effektoren von 2,4. Bei Zusatz von Isoleucin steigt der Hill-Koeffizient auf 3,6, was auf 4 aktive Zentren in der Threonindehydratase hinweist. Dieses Ergebnis stimmt überein mit der Untersuchung der Quartärstruktur der Threonindehydratase, wo ein Molekulargewicht ermittelt wurde, das 4 identischen Untereinheiten entspricht. Für die Threonindehydratase aus *E. coli* wurde über den Pyridoxalphosphat-Gehalt von gereinigtem Enzym auf die Zahl der aktiven Untereinheiten geschlossen. Diese Experimente von Eisenstein (1991) zur Threonindehydratase aus *E. coli* zeigte, daß 1 Mol Pyridoxalphosphat pro Untereinheit des Enzyms gebunden ist und demnach vier katalytische Zentren zur Verfügung stehen.

In Gegenwart von Valin wies die Threonindehydratase eine hyperbole Kinetik auf, was maximale Aktivierung durch diesen Liganden bedeutet und entsprechend durch einen Hill-Koeffizienten von 1,2 beschrieben wird. Dieses Verhalten ist für alle biosynthetischen Threonindehydratasen bekannt (Calhoun *et al.*, 1973; Eisenstein, 1991; Miyajima & Shio, 1972). Bei Zugabe von Isoleucin ist die Aktivität des Enzyms bei Substratkonzentrationen, die dem $K_{0,5}$ in Abwesenheit des Effektors entsprechen, nahezu Null. Bei der Threonindehydratase aus *E. coli* ist dieser Effekt des Liganden Isoleucin jedoch noch deutlicher ausgeprägt (Eisenstein, 1991).

Die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung zum Nachweis unterschiedlicher Konformationen der Threonindehydratase hat gezeigt, daß durch die Bindung des Effektors Isoleucin und des Substratanalogons, D-allo-Threonin, unterschiedliche Veränderungen der Proteinstruktur induziert werden. Durch die Bindung des Substrat-Analogons, D-allo-Threonin, wird das Protein in einer der Konformationen quasi fixiert, sodaß die andere Konformation nicht mehr eingenommen werden kann. Dies wird durch die Funktion des D-allo-Threonins erklärt, das an Pyridoxalphosphat bindet, wobei der Cofaktor für den erneuten Reaktionszyklus jedoch nicht mehr freigesetzt und so das Enzym inaktiviert wird (Holler & Burns, 1978). Durch die Liganden-Bindung werden keine extremen Veränderungen der Struktur des Proteins induziert. Ähnliche Ergebnisse wurden für verschiedene Enzyme wie die Transaldolase (Brand, 1970) beschrieben (Holler *et al.*, 1971; Guilbault, 1973). In diesen Beispielen bewirkt die Liganden-Bindung an das Protein ebenfalls eine geringfügige Verstärkung oder Abschwächung der Fluoreszenz des gebundenen Farbstoffes. Treten drastische Veränderungen der Enzymstruktur auf, wie zum Beispiel die Denaturierung eines Proteins, so erfolgen Verschiebungen des Emissionsmaximums sowie starke Veränderungen der Fluoreszenzintensität des Farbstoffes (Goto & Fink, 1989). Dies bedeutet, daß die Sekundär- und Tertiärstruktur der Threonindehydratase bei der Liganden-Bindung weitgehend erhalten bleibt und sich die Änderungen der Konformation wahrscheinlich auf die Quartärstruktur beschränken.

4.2 Sequenzanalyse und Homologievergleich

Im Vergleich der Aminosäuresequenzen wies die 436 Aminosäuren umfassende Proteinsequenz der Threonindehydratase 54 % Ähnlichkeit mit der Threonindehydratase aus *E. coli* auf. Es zeigte sich jedoch ein drastischer Unterschied zwischen den Sequenzen. Die Threonindehydratase aus *E. coli* ist mit 514 Aminosäuren (Lawther *et al.*, 1987) deutlich größer als das *ilvA* Genprodukt aus *C. glutamicum* (436 Aminosäuren). Um maximale Homologie zwischen den beiden Proteinsequenzen zu erhalten, mußte eine Lücke von 95 Aminosäuren zwischen dem N- und C-terminalen Bereich des *C. glutamicum* Proteins eingefügt werden. Diese Lücke macht den größten Teil der Längendifferenz zwischen den beiden Enzymen aus. Die Sequenzen der Threonindehydratase aus *Saccharomyces cerevisiae* (Kielland-Brandt *et al.*, 1984) und *Lycopersicon esculentum* (Samach *et al.*, 1991) gehören zur Klasse der *E. coli* ähnlichen Threonindehydratase. Zur *C. glutamicum* Klasse der biosynthetischen Threonindehydratase kann die kürzlich veröffentlichte Sequenz aus *Lactococcus lactis* (Godon *et al.*, 1992) und die Sequenz aus *B. subtilis* (Armpriester & Fink, 1991) hinzugezählt werden, da diesen Proteinen ebenfalls der Bereich von etwa 95 Aminosäuren zwischen N- und C-Terminus fehlt.

Eine ähnliche Situation eines nicht-homologen Inserts im *E. coli* Protein findet sich bei den Peptidsequenzen der Isomero-reduktasen. Auch bei diesen Enzymen können die Proteine in zwei Klassen eingeteilt werden, wobei das *C. glutamicum* Enzym (Keilhauer *et al.*, 1993) wiederum die Klasse der kürzeren Peptide repräsentiert (Abbildung 30). Zu dieser Klasse gehören ebenfalls die *ilvC* Genprodukte aus *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis* und *Rhizobium meliloti*. Die Klasse der *E. coli* (Lawther *et al.*, 1987; Cox *et al.*, 1987) ähnlichen Isomero-reduktasen enthält einen zusätzlichen Bereich von 135 Aminosäuren, der den *C. glutamicum* ähnlichen Enzymen fehlt und das Protein ebenfalls in eine N- und eine C-terminale Domäne teilt (Keilhauer *et al.*, 1993).

In der N-terminalen Region der Threonindehydratase können verschiedene distinkte Regionen hoher Homologie ausgemacht werden, denen bestimmte Funktionen in der Katalyse zuzuordnen sind. Betrachtet man die Gruppe der α, β -Eliminasen, so findet sich eine Reihe von Sequenzmotiven wieder. In allen Pyridoxalphosphat-abhängigen Enzymen wird das Coenzym über eine Schiff-Base kovalent an die ϵ -Aminogruppe eines Lysin-Restes gebunden. Im Motiv K-X₈-S-(Y, F, oder I)-K-X-R-G (Aminosäure 59 bis 73) trägt der zweite Lysin-Rest das Pyridoxalphosphat (Abbildung 12). Dieses Motiv liegt auch in der katabolen Threonindehydratase aus *E. coli* vor, für die gezeigt worden ist, daß das Coenzym über eine Schiff-Base an die ϵ -Aminogruppe des Lysin-Restes gebunden ist (Datta *et al.*, 1987). Die Konsensussequenz findet sich ebenfalls in bakteriellen D-Serindehydratase, eukaryotischen L-Serindehydratase (Marceau *et al.*, 1988; Ogawa *et al.*, 1989) und in Threoninsynthase (Han *et al.*, 1990; Parsot, 1986), die ebenso wie die Threonindehydratase die Bildung eines α -Aminocrotonats bzw. Aminoacrylats als Intermediat ihrer Reaktion gemeinsam haben.

Von Aminosäure 94 bis 102 der Threonindehydratase (Abbildung 12) aus *C. glutami-*

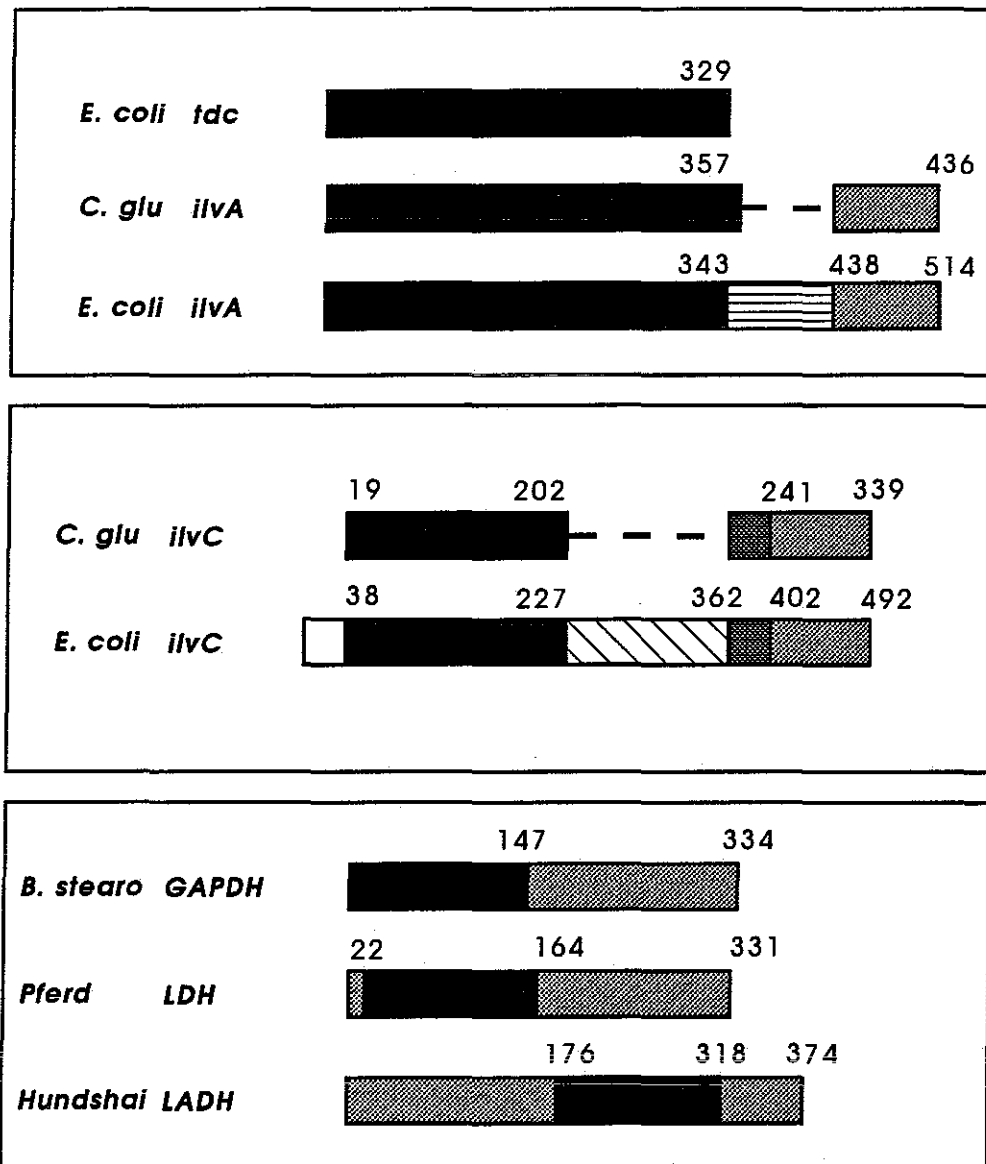


Abbildung 30: Aufbau von Enzymen aus Domänen. Im oberen Teil der Abbildung sind die Sequenzen der Threonindehydratasen aufgetragen, im mittleren Teil die Isomero-reduktasen und im unteren Teil die Sequenzen verschiedener Dehydrogenasen. Die in den jeweiligen Gruppen identisch markierten Bereiche sind stark homolog und es werden ihnen vergleichbare Funktion zugeordnet.

(Threonindehydratase katabol (*tdc*); Threonindehydratase biosynthet. (*ilvA*); Isomero-reduktase (*ilvC*); Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*); Lactatdehydrogenase (*LDH*); Alkoholdehydrogenase (*LADH*); *C. glutamicum* (*C. glu*); *Bacillus stearothermophilus* (*B. stearo*))

cum erstreckt sich das Motiv S-A-G-N-H-A-Q-G-V-A, das in allen bekannten Threonindehydratase-Sequenzen vollkommen identisch ist. Die Tryptophansynthasen weisen ein sehr ähnliches, hoch konserviertes Motiv (Aminosäure 111 - 120 Tryptophansynthase *S. typhimurium*) G-A-G-Q-H-G-V-A-(T/S)-A in ihrer Sequenz auf, in dem die Aminosäuren Glycin 111 und 116 wahrscheinlich an der Substratbindung beteiligt sind (Hyde & Miles, 1990; Miles, 1991b) und die Aminosäure Glutamin 114 an der Bindung des Coenzym (Hyde *et al.*, 1988). Die starke Konservierung dieser Sequenz sowie die Reduzierung der Aktivität der Threonindehydratase durch den Austausch der Aminosäure Glutamin 96 gegen Aspartat (diese Arbeit) sprechen dafür, daß dieser Bereich auch in der Threonindehydratase an der Bindung von Substrat und Coenzym beteiligt ist.

Einen weiteren funktionell wichtigen Bereich bildet eine Folge von Glycin-Resten in Position 203 bis 206 (Abbildung 12). Solche Glycin-reichen Regionen sind ein charakteristisches Merkmal in vielen Pyridoxalphosphat-abhängigen Enzymen (Marceau *et al.*, 1988) und sind ebenfalls als wichtiges strukturelles Merkmal für die Nukleotidbindung bekannt (Wierenga *et al.*, 1986). Die Poly-Glycin Folge ermöglicht eine ungewöhnlichen Konformation der Peptidkette, so daß sich die Aminosäurekette als Loop um den Phosphatrest des Coenzym legen kann und dessen Bindung durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken stabilisiert (Schulz & Schirmer, 1978; Hyde *et al.*, 1988). In den β -Untereinheiten der Tryptophansynthasen ist ebenfalls im aktiven Zentrum diese Glycin-reiche Region vorhanden, die für die Lokalisierung des Coenzym entscheidend ist (Crawford *et al.*, 1980; Burns & Yanofsky, 1989; Miles, 1991b). Außerdem weisen D-Serindehydratase und die ebenfalls Pyridoxalphosphat-abhängigen Alanin-Racemasen und Serin-Hydroxymethyltransferase diese charakteristischen Bereiche auf (Marceau *et al.*, 1988).

Anschließend an diesen Bereich findet sich bis zur Aminosäure 346 ebenfalls eine stark konservierte Region. Dieser Sequenzbereich zeigt außerdem geringe Homologie zur Pyridoxylphosphat abhängigen D-Aminosäure-Aminotransferase aus *B. subtilis* (Tanizawa *et al.*, 1989). Die Konservierung dieser Region (Aminosäure 327 - 332) in der katabolen Threonindehydratase aus *E. coli* spricht dafür, diesen Bereich der katalytischen Domäne des Enzym zuzuordnen. Für diese Einteilung sprechen ebenfalls die Konservierung dieser Sequenz in der β -Untereinheit der Tryptophansynthase und die Beteiligung der Aminosäure Serin 377 (Serin 328 in der Threonindehydratase) an der Bindung von Pyridoxalphosphat (Hyde *et al.*, 1988). Da der Austausch der Aminosäuren Serin 328, Glycin 330 und Glycin 331 in der Threonindehydratase außerdem eine Inaktivierung des Enzym (diese Arbeit) bewirkt, kann davon ausgegangen werden, daß dieser Bereich eine essentielle Rolle für die katalytische Funktion des Enzym spielt.

Im C-terminalen Bereich können keine distinkten Regionen hoher Homologie ausgemacht werden. Daher ist es nicht möglich, hier verschiedenen Sequenzabschnitten eindeutige Funktionen zuzuweisen. Hydrophobizitätsanalysen (Kyte & Doolittle, 1982)

der verwandten Threonindehydratasen zeigten, daß der C-terminale Bereich des Enzyms eine deutlich hydrophile Region darstellt. Betrachtet man die Verteilung geladener Aminosäurereste im Protein, so ist ihr Anteil in diesem Bereich erhöht. Große Regionen dieses C-terminalen Bereiches werden daher vermutlich an der Oberfläche des Enzyms zur hydrophilen Umgebung hin exponiert sein. Alle diese Ergebnisse sprechen dafür, den amino-terminalen Bereich (Aminosäure 1 - 347) als katalytische Domäne, den carboxy-terminalen Teil (Aminosäure 348 - 436) als regulatorische Domäne zu bezeichnen.

Ein solcher Aufbau von Enzymen aus unterschiedlich kombinierten Modulen, ist weit verbreitet. Dabei wird jeder dieser funktionellen Domänen eine bestimmte Aufgabe im Protein zugeordnet (Schulz & Schirmer, 1979). Bei den Lactatdehydrogenasen kann man eine Substrat- und eine NADH-bindende Domäne unterscheiden, die, wie in Abbildung 30 gezeigt, ihren Platz im N- und C-terminalen Bereich des Enzyms tauschen können (Branden & Tooze, 1990). Die EnzymII-Komplexe des PTS Systems zeigen eine noch weitaus größere Variabilität. Sie sind ebenfalls aus mehreren Domänen unterschiedlicher Funktion aufgebaut, wobei die Domänen entweder kovalent verknüpft oder assoziiert in variablen Kombinationen vorliegen können (Saier & Reizer, 1992). Es sind für die PTS Proteine ebenfalls Beispiele beschrieben, die zusätzliche Sequenzeinschübe von etwa 40 Aminosäuren tragen (Fischer & Hengstenberg, 1992; Sprenger, 1993), die in diesem Fall als flexible "hinge-region" für einen intramolekularen Transfer von Phosphatgruppen diskutiert werden.

Neben der Einteilung der Threonindehydratase in zwei funktionelle Domänen zeigten diese Untersuchungen die Besonderheit des Enzyms aus *C. glutamicum*: Die carboxy-terminale Domäne des *C. glutamicum* Typs stellt aufgrund der Kürze der Sequenz die Essenz der katalytischen Domäne der allosterisch kontrollierten Threonindehydratasen dar.

4.3 Sekundär- und Tertiärstruktur der Threonindehydratase

Bei der Modellierung der dreidimensionalen Struktur der Threonindehydratase wurde davon ausgegangen, daß Proteinstrukturen in stärkerem Maße konserviert sind als Aminosäuresequenzen (Chothia & Lesk, 1986). So wird angenommen, daß eine limitierte Zahl an Faltungsmotiven in der Natur genutzt wird (Bowie *et al.*, 1991) und alle Proteinstrukturen Variationen dieser Motive darstellen. Von den geschätzten 1000 existierenden Proteinfamilien, den Sequenzgruppen mit ähnlichem Faltungsmotiv (Chothia, 1992), ist bisher nur für einen geringen Anteil die räumliche Struktur bekannt. Als erster Schritt bei der Modellierung der Proteinstruktur der Threonindehydratase mußte daher ein passendes Faltungsmotiv identifiziert werden. Bisher stehen Röntgenstrukturdaten von vier Pyridoxalphosphat-abhängigen Enzymen zur Verfügung, der Aspartat-Aminotransferase (Smith *et al.*, 1986; Kamitori *et al.*, 1990; Jäger *et al.*, 1989), der Glycogenphosphorylase (Madsen & Withers, 1986),

der ω -Aminosäure:Pyruvat-Aminotransferase (Watanabe *et al.*, 1989) und der Tryptophansynthase (Hyde *et al.*, 1988). Einzig die Tryptophansynthase β -Untereinheit weist sowohl mechanistisch als auch hinsichtlich ihrer Primärstruktur Ähnlichkeiten zu Threonindehydratase auf. Die isolierte β -Untereinheit führt wie die Threonindehydratase eine α,β -Eliminierung aus, wobei Serin das Substrat ist. Deswegen diente die β -Untereinheit der Tryptophansynthase aus *Salmonella typhimurium* als Faltungsvorlage für die Struktur der Threonindehydratase aus *C. glutamicum*.

Die methodischen Fortschritte im Bereich der Strukturanalyse seit der Entwicklung der statistischen Methoden von Chou & Fasman (1974a) und Garnier (1978) und der auf physikalisch-chemischen Eigenschaften beruhenden Methode nach Lim (1974), haben eine Reihe von erfolgreichen Strukturvoraussagen ermöglicht. Die wesentlichen Verbesserungen der Genauigkeit der Voraussagen wurden durch die Einbeziehung von Informationen aus den Verwandtschaftsbeziehungen von Proteinsequenzen erzielt. Durch den direkten Vergleich von Modell und anschließend erfolgter Röntgenstrukturanalyse sind die Modelle für die SH3 Domäne der Tyrosinkinasen (Benner & Gerloff, 1993; Benner *et al.*, 1993; Rost & Sander, 1992; Musacchio *et al.*, 1992), Nitrogenase MoFe Protein aus *Acetobacter vinelandii* (Gerloff *et al.*, 1993; Kim & Rees, 1992) oder die Calcium-abhängigen Proteine der Annexin Familie (Barton *et al.*, 1991) direkt überprüfbar. Die Genauigkeit der Strukturvoraussagen überschritt dabei zum Teil erstmals die 70 % Grenze der Genauigkeit der Modelle.

Bei der Modellierung der dreidimensionalen Struktur der Threonindehydratase ermöglichte die Ausgangssituation eine vielversprechende Modellierung des aktiven Zentrums der Threonindehydratase. In diesem Bereich sind die Sequenzen der Threonindehydratase und der Tryptophansynthase, die an der Bindung des Coenzym beteiligt sind, konserviert. Diese Homologien wurden ebenfalls auf der Ebene der Sekundärstruktur deutlich, wo die Positionierung der Sekundärstruktur-Elemente von Vorlage und Modell sehr gut angepaßt werden konnte. Der hohe Grad an Übereinstimmung ermöglichte eine weitgehende Anpassung der beiden Strukturen, so daß nur eine limitierte Anzahl von Loop-Strukturen modelliert werden mußten, um Insertionen bzw. Deletionen in das Modell einzufügen.

Im C-terminalen Bereich erwies sich jedoch die Modellierung als problematisch, da die Tryptophansynthase hier eine von der Threonindehydratase deutlich abweichende Sequenz und Struktur aufweist. Die Tryptophansynthase β -Untereinheit wird in zwei Domänen geteilt, die N-terminale und C-terminale Domäne, die durch eine Scharnier-Region von 50 Aminosäuren (260 – 310) voneinander getrennt sind (Hyde *et al.*, 1988). In dieser Verbindungsregion befindet sich der sogenannte Goldberg-Loop (Aminosäure 273 – 283), der eine hochflexible Protease-sensitive Folge von Aminosäuren ausmacht, die mehrere Kontakte zur α -Untereinheit der Tryptophansynthase herstellt (Högborg-Raibaud & Goldberg, 1977; Linkens *et al.*, 1993; Hyde *et al.*, 1988) (Abbildung 31). Die Flexibilität dieser Region ermöglicht der β -Untereinheit in begrenztem Maße Konformationsänderungen einzugehen, während der übrige Teil des Proteins ausreichende

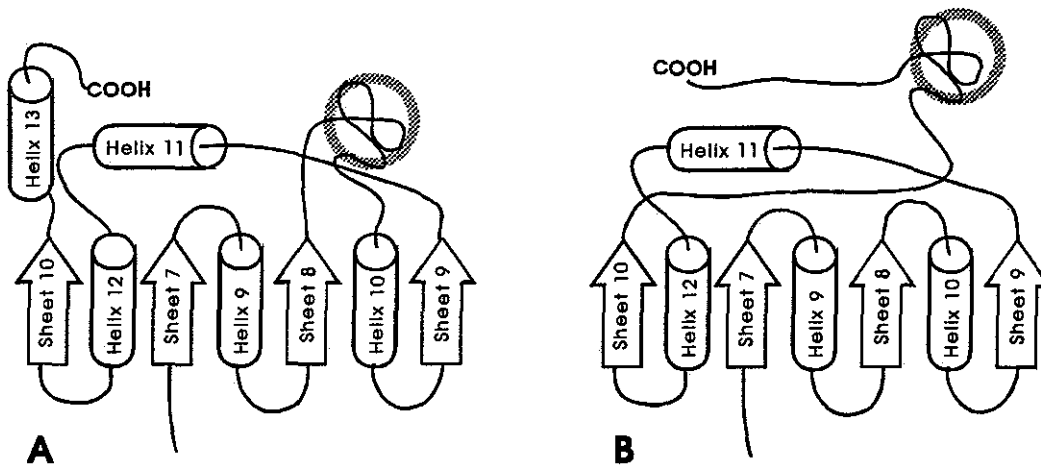


Abbildung 31: Topologie-Modell des C-terminalen Bereiches der Tryptophansynthase β -Untereinheit (A) zur ausgetauschten Sequenzabfolge der Threonindehydratase (B). Der grau markierte Bereich entspricht der "Scharnier-Region".

Festigkeit bewahrt (Zhao & Sommerville, 1992; 1993). Dieser Loop-Region schreibt man eine Rolle bei der allosterischen Wechselwirkung zwischen α - und β -Untereinheiten der Tryptophansynthase zu (Kaufmann *et al.*, 1991; Miles, 1991a), durch die im Tryptophansynthase Bienzymkomplex die Aktivität der aufeinanderfolgenden Reaktionen in der α - und β -Untereinheit koordiniert wird (Houben & Dunn, 1990; Brzović *et al.*, 1992). Durch diese Form der Wechselwirkung wird eine 1:1 Korrespondenz zwischen der Spaltung von Indol-3-Glycerinphosphat in der α -Untereinheit und L-Tryptophan-Bildung in der β -Untereinheit eingestellt, um eine effiziente Synthese von L-Tryptophan zu erzielen (Kirscher *et al.*, 1991). Im Modell der Threonindehydratase könnte dieser hochflexible Loop ebenfalls an der Vermittlung der allosterischen Transition beteiligt sein und ein Umschalten zwischen einer "offenen" und einer "geschlossenen" Konformation vermitteln. Die Verschiebung solcher Loop-Elemente ist in vielen Beispielen an der Regulation der biochemischen Aktivität beteiligt (Kempner, 1993).

In der Threonindehydratase ist die Sequenz des Proteins in dem Bereich, welcher der Scharnier-Region entspricht, allerdings verändert. Verschiedene Anzeichen, wie Übereinstimmungen zwischen der Scharnier-Region der Tryptophansynthase (Aminosäure 260 - 310) und C-Terminus der Threonindehydratase (Aminosäure 375 - 430) sowie die Betrachtung der Hydrophobizität der Bereiche (hier nicht gezeigt), sprechen dafür, daß sich die Sequenz der Scharnier-Region in der Threonindehydratase am C-terminalen Ende befindet. Daraus läßt sich eine strukturelle Homologie der Threonindehydratase zur β -Untereinheit der Tryptophansynthase bei unterschiedlicher Peptidkettenanord-

nung postulieren (Abbildung 31).

4.4 Charakterisierung der Mutationen

Das erstellte dreidimensionale Modell der Threonindehydratase ermöglichte die Zuordnung der Mutationen zum katalytischen und regulatorischen Bereich der Threonindehydratase. So sind alle diejenigen Aminosäureaustausche, die eine starke Reduktion der Aktivität des Enzyms zur Folge haben, in unmittelbarer Beziehung zum aktiven Zentrum lokalisiert. Die Mutation Glutamat 303 → Valin führte zu einer Inaktivierung des Enzyms. Im Strukturmodell der Threonindehydratase liegt diese Aminosäure in unmittelbarer Nähe des Coenzym Pyridoxalphosphat. In der Tryptophansynthase β -Untereinheit führte ein Austausch der entsprechenden Aminosäure Glutamat 350 gegen Alanin zu einer Änderung der Orientierung des Pyrimidinringes des Coenzym im aktiven Zentrum. Die Folge ist eine unvollständige Reaktion, in der das Enzym mit seinem Substrat Serin irreversibel inaktiviert wurde (Kayastha *et al.*, 1991). Die Ladung des Glutamats an dieser Position ist für die Orientierung der Komponenten des aktiven Zentrums von Bedeutung (Hyde *et al.*, 1988).

Die Mutationen in den Positionen 328, 330 und 331 führten alle zu einer deutlichen Reduktion der Aktivität der Threonindehydratase. Dieser Bereich faltet sich im dreidimensionalen Modell der Threonindehydratase zum aktiven Zentrum hin und ist nicht nur in den Threonindehydratasen sondern auch in der Tryptophansynthase (Burns *et al.*, 1989; Crawford *et al.*, 1980) hoch konserviert. So liegt in der Tryptophansynthase an der Position, die Glycin 330 der Threonindehydratase entspricht, (Glycin 378 Tryptophansynthase aus *S. typhimurium*) ebenfalls stets die Aminosäure Glycin vor. Der Austausch von Glycin gegen eine größere Aminosäure an dieser Position hätte die deutliche Verschiebung des Coenzym zur Folge (Hyde *et al.*, 1988; Miles, 1991b). Von Taillon *et al.*, (1988) wurde diese Region bereits dem regulatorischen Bereich des Enzyms zugeordnet. Das Modell der Threonindehydratase sowie die Inaktivierung der Threonindehydratase und der Tryptophansynthase durch den Austausch der Aminosäuren in diesem Bereich, sprechen aber dafür, daß dieser Bereich zum katalytischen Anteil der Enzyme gezählt werden muß.

Der Austausch der Aminosäure Serin 418 gegen Glutamat, Glutamin, Alanin und Aspartat macht den Einfluß unterschiedlicher Aminosäurereste in einer unveränderten Umgebung deutlich. Auf unterschiedliche Weise stören die eingesetzten Aminosäuren die Strukturen, die für die Vermittlung der allosterischen Eigenschaften im Protein von Bedeutung sind. Der gezielte Austausch einer Aminosäure gegen eine Reihe anderer Reste kann, wie für das Beispiel der Aspartokinase I-Homoserindehydrogenase I aus *Serratia marcescens* gezeigt, ganz unterschiedliche Effekte hervorrufen (Omori & Komatsubara, 1993). An der Position Serin 352 dieses Enzyms wurden 13 verschiedene Aminosäuren eingesetzt und die Auswirkungen auf die allosterische Regulation des En-

zyms untersucht. Das Spektrum der erzeugten Phänotypen reichte von der Aktivierung der Enzyme, über feedback-resistente Mutanten bis zu unveränderter Regulation. Wird eine solche Untersuchung an einer Position im Protein durchgeführt, die eine Rolle bei der Regulation der Enzymaktivität oder der Funktion des Enzyms spielt, können also unterschiedliche regulatorische Varianten erzeugt werden (Wente & Schachmann, 1991; Omori & Komatsubara, 1993).

Der Austausch der Aminosäure Serin 418 in der Threonindehydratase gegen Glutamat, Glutamin, Aspartat oder Alanin induzierte in allen Fällen eine Veränderung der Regulation des Proteins. Es zeigte sich jedoch, daß in den Mutanten die Affinität des Enzyms zum Substrat und die Aktivität der Threonindehydratase stark beeinträchtigt waren. Am deutlichsten war diese Änderung im Fall des Austausch von Serin 418 $\rightarrow$ Glutamat, der eine Zunahme des $K_{0,5}$ -Wertes um mehr als Faktor 6 bewirkt. Der Austausch der Aminosäure Glutamat 50 gegen Glutamin in der katalytischen Untereinheit der Aspartat-Transcarbamoylase erzeugte ein Enzym, welches ebenfalls eine extreme Steigerung des $K_{0,5}$ -Wertes zeigt. Neben der 20 fachen Zunahme der Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Sättigung des Enzyms erreicht wird, sinkt der V_{max} -Wert um den Faktor 8 (Ladjimi & Kantrowitz, 1988). Aufgrund der Röntgenstrukturanalysen dieses Enzyms ist bekannt, daß die Aminosäure Glutamat 50 an der Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen den Domänen einer katalytischen Untereinheiten beteiligt ist, die die aktive R-Konformation des Enzyms stabilisieren. Die Mutation verhindert die Ausbildung der Wechselwirkung innerhalb der katalytischen Untereinheit, sodaß ein Zustand niedriger Aktivität und niedriger Substrataffinität (T-Konformation) stabilisiert wird und das Enzym keine Kooperativität mehr zeigt (Ladjimi *et al.*, 1988; Ladjimi & Kantrowitz, 1988). Die vier Aminosäureaustausche in Position 418 bewirken eine Reduzierung von V_{max} und eine Erhöhung von $K_{0,5}$. In Analogie zur Aspartat-Transcarbamoylase kann man daraus schließen, daß das Vorhandensein von Serin 418 für die Aufrechterhaltung des "high-affinity, high-activity" Zustandes des aktiven Zentrums notwendig ist (Newton & Kantrowitz, 1990).

Die Threonindehydratase Mutante 38, in deren Sequenz Valin 323 gegen Alanin ausgetauscht ist, zeichnet sich dadurch aus, daß sie hyperbole Substratsättigungskurven sowohl ohne Zusatz des Inhibitors Isoleucin als auch mit Isoleucin zeigt. Dies bedeutet, daß ein vollständiger Verlust der allosterischen Regulation des Proteins vorliegt. Tatsächlich wurde für eine Mutante der regulatorischen Untereinheit der Aspartat-Transcarbamoylase (Asparagin 111 $\rightarrow$ Alanin) mit ähnlichen Eigenschaften gezeigt, daß dieses Enzym in der aktiven R-Form vorliegt (Eisenstein *et al.*, 1992). Diese Mutation liegt in der Aspartat-Transcarbamoylase an der Verbindungsfläche zwischen katalytischer und regulatorischer Untereinheit, die maßgeblich an der allosterischen Transition beteiligt ist. Die Lokalisierung der Mutation im dreidimensionalen Modell der Threonindehydratase zeigte, daß diese Mutation an der Oberfläche des Proteins liegt und über ein β -Faltblatt in direkter Verbindung mit dem aktiven Zentrum des Enzyms steht. Die deutlich hydrophobe Umgebung der Aminosäure 323 im dreidimensionalen Modell der

Threonindehydratase spricht dafür, daß in dieser Region Wechselwirkung zwischen den Untereinheiten des Threonindehydratase Tetramers stattfinden. Der Kinetik entsprechend liegt dieses mutierte Enzym ebenfalls in der aktivierten R-Konformation vor. Eine Destabilisierung der T-Konformation würde zu einem solchen Phänotyp führen, der weder homotrophe noch heterotrophe allosterische Regulation zeigt.

In Mutante 16 führt der Aminosäureaustausch von Aspartat 378 gegen Glycin zu einer 5 fachen Erhöhung des $K_{0,5}$ -Wertes. Es sind verschiedene Beispiele von Mutanten der Aspartat-Transcarbamoylase bekannt, in denen ein Aminosäureaustausch die Affinität zum Substrat stark erniedrigt und damit zu einer Erhöhung des $K_{0,5}$ führt. In den meisten Fällen ist die Reduktion des $K_{0,5}$ -Wertes jedoch auch mit einer Erniedrigung der Enzymaktivität verbunden (Peterson *et al.*, 1992; Stebbins *et al.*, 1990). Ähnlich wie die Aspartat-Transcarbamoylase Mutanten mit Aminosäureaustausch Glutamin 231 gegen Asparagin oder Isoleucin, zeigt Mutante 16 auch keine Kooperativität im Hinblick auf die Substratbindung. Den Mutanten ist gemeinsam, daß sie einen Verlust der homotropen Kooperativität aufweisen, während die heterotropen Effektoren weiterhin drastische Effekte auf die Aktivität ausüben (Peterson *et al.*, 1992; Stebbins *et al.*, 1990). Erstaunlich ist, daß Isoleucin sich bei der Threonindehydratase Mutante 16 als positiver Effektor erweist, der eine Erhöhung der Aktivität des Enzyms induziert. Der Mutationsort (Glutamin 231) ist in der Aspartat-Transcarbamoylase in einer Loop-Region lokalisiert, deren Konformationsänderung einen wesentlichen Anteil an der allosterischen Transition ausmacht, die die homotrophe und heterotrophe Kooperativität vermittelt (Stebbins *et al.*, 1990). Die Wechselwirkung der Aminosäure Glutamin 231 mit Arginin 234 ist dabei essentiell für die Ausbildung der hochaffinen Substratbindungsstelle. Da der Mutationsort der Mutante 16 in der flexiblen "Loop-Region" lokalisiert ist, unterstützen diese Befunde die Vorstellung von der Rolle dieser Loop-Region in der allosterischen Transition der Threonindehydratase.

Die beschriebenen Beispiele machen deutlich, daß bei einer regulatorischen Mutation, die die Veränderungen der allosterischen Eigenschaften eines Proteins induziert, nicht der Bindungsort des allosterischen Effektors betroffen sein muß. Bei der Aspartat-Transcarbamoylase, die regulatorische und katalytische Domäne des Enzyms auf unterschiedlichen Untereinheiten trägt, ist durch ortsspezifische Mutagenesen die Bedeutung der Wechselwirkungen zwischen den Domänen einer Untereinheit und den Berührungsflächen zwischen den Untereinheiten deutlich geworden. Die Eigenschaften der isolierten Mutanten und die Homologie zwischen der Scharnier-Region der Tryptophansynthase β -Untereinheit und dem C-Terminus der Threonindehydratase, weisen darauf hin, daß dieser Bereich der Threonindehydratase ebenfalls eine essentielle Rolle in der Wechselwirkung der Untereinheiten und der allosterischen Transition spielt.

4.5 Einfluß deregulierter Threonindehydratasen auf die Isoleucin-Produktion

Für die rationale Stammkonstruktion eines *C. glutamicum* Isoleucin-Produktionsstammes war es notwendig, nacheinander alle limitierenden Faktoren der Isoleucin-Biosynthese auszuschalten. Den Ausgangspunkt lieferte dabei der *C. glutamicum* Stamm MH20-22B, der als Lysin-Produzent über eine feedback-resistente Aspartatkinase verfügte. Aufgrund einer weiteren Eigenschaft, der Leucin-Auxotrophie (Schrumpf *et al.*, 1992), eignet sich dieser Stamm besonders für die Konstruktion eines Isoleucin-Produzenten. Die Leucin-Auxotrophie ermöglicht nämlich bei Kultivierung unter Leucin-Mangelbedingungen infolge eines zellinternen Leucin-Mangels die Derepression der durch Leucin, Valin und Isoleucin reprimierbaren Acetohydroxysäuresynthase (Scheer *et al.*, 1987; Eggeling *et al.*, 1987; Eggeling, 1986). Das von der Threonindehydratase gebildete α -Ketobutyrat kann unter diesen Bedingungen effektiv durch die dereprimierte Acetohydroxysäuresynthase umgesetzt werden, was eine erhöhte Isoleucin-Ausbeute zur Folge hat. Außerdem können hohe zellinterne α -Ketobutyrat Konzentrationen durch den Eingriff der Oxosäure als Substratanalogon in verschiedene Stoffwechselreaktionen zur Synthese von toxischen Produkten führen, wie für *E. coli* und *S. typhimurium* gezeigt ist (LaRossa *et al.*, 1987; Danchin *et al.*, 1984) oder die Bildung unerwünschter Nebenprodukte bei der Fermentation bewirken (Terasawa *et al.*, 1991). Aus diesen Gründen ist die Derepression der Acetohydroxysäuresynthase und die damit verbundene erhöhte Umsetzung von Ketobutyrat eine notwendige Voraussetzung für die Isoleucinbildung.

Auf dem Biosyntheseweg zum Isoleucin erweist sich die Regulation der Homoserindehydrogenase als ein entscheidender Engpaß für den Substratfluß (Reinscheid *et al.*, 1991, 1993). Durch die Integration des *hom^{FBR}-thrB* Operons im Genom des Lysin-Produzenten MH20-22B wird der Stofffluß in Richtung Threonin umgelenkt. Dieser Threonin-Produzent ist der ideale Stamm für die Konstruktion eines Isoleucin-Produzenten. Bei der Expression des Wildtyp Allels der Threonindehydratase, war die effektive feedback-Hemmung des Enzyms durch Isoleucin dafür verantwortlich, daß vorhandenes Threonin nicht vollständig durch die Threonindehydratase umgesetzt wurde. Die Akkumulation von Threonin führte zur Bildung und Ausscheidung von erheblichen Mengen der Threonin-Vorstufe Homoserin (8 - 11 mM) und dem Threonin Abbauprodukt Glycin (7 mM) (Bell & Turner; 1976). Die Expression der drei *ilvA* Allele, die für deregulierte Threonindehydratasen kodieren (Mutante 38, 16 und 14), führte in allen Fällen zu einer weiteren Steigerung der Isoleucin Ausbeute im Vergleich zum überexprimierten Wildtyp Allel. Von diesen Stämmen wurden Homoserin und Glycin entweder gar nicht oder in geringen Mengen (1 - 2 mM) ausgeschieden. Neben der Erhöhung der Kopienzahl des Vektors hatte die Erhöhung der Substrat-Konzentration jedoch entscheidenden Einfluß auf die Isoleucin-Ausbeute. Da weder Threonin noch Homoserin oder Glycin im Medium detektierbar waren, wird unter den gewählten Fer-

mentationsbedingungen effizient Threonin zu Ketobutyrat umgesetzt. Die erzielten Isoleucinausbeuten von 125 mM sind vergleichbar mit den Isoleucin-Konzentrationen, die bei Zufütterung der Vorstufen Hydroxybutyrat, Ketobutyrat oder Aminobutyrat, zum Zweck der Umgehung der Threonindehydratase Regulation, erreicht werden (Kinoshita, 1966; Scheer *et al.*, 1988; Eggeling, 1986). Die Limitation der Isoleucin-Bildung aus Glukose auf der Stufe der Threonindehydratase wurde somit vollständig aufgehoben. Tatsächlich wird jedoch unter Verwendung der L-Isoleucin-Vorstufen Hydroxybutyrat auch bei der Fermentation von Leucin-auxotrophen Stämmen unter Leucin-Mangelbedingungen, eine Anzahl von Nebenprodukten gebildet (Wilhelm *et al.*, 1989; Scheer, 1988). Aus Literaturdaten läßt sich ebenfalls entnehmen, daß in keinem Fall eine vollständige Umsetzung der Vorstufen zum Produkt erfolgt (Matsushima, 1976; Updike & Calton, 1982). Die Analyse der Nebenprodukte während der Hydroxybutyrat Fermentation zeigten, daß dabei Konkurrenzreaktionen um α -Ketobutyrat eine Rolle spielen. Eine Akkumulation von Aminobutyrat, das durch Aminierung von Ketobutyrat erzeugt wird oder von Decarboxylierungsprodukten der Ketosäure, traten infolge einer Limitierung durch die Acetohydroxysäuresynthase im Kulturmedium auf (Kisumi *et al.*, 1970; Scheer, 1988; Wilhelm *et al.*, 1989). Außerdem ist die Anhäufung der direkten Isoleucin-Vorstufe 2-Keto-3-methylvalerat auf Begrenzung durch die Kapazität des aktiven Isoleucin Sekretionssystems zurückzuführen (Ebbighausen *et al.*, 1989a).

Diese ersten Experimenten zur Isoleucin-Produktion aus Glukose unter Verwendung feedback-resistenter Threonindehydratasen zeigten direkt, daß die Ausschaltung der Isoleucin-Hemmung des Enzyms eine notwendige Voraussetzung für eine effektive Isoleucin-Produktion in *C. glutamicum* ist. In Zukunft kann durch die systematische Optimierung der Kopienzahl des verwendeten Klonierungsvektors und der Kulturbedingungen, eine weitere Erhöhung der Produktbildung erreicht werden.

Auf dem Weg zum Verständnis der allosterischen Regulation von Enzymen ermöglichte das Studium von Mutanten, Aminosäuren mit Schlüsselrollen in der Funktion der Kooperativität zu finden (Perutz, 1990). Durch die Isolierung und Charakterisierung der Mutanten in dieser Arbeit, stehen eine Reihe von Informationen zur Verfügung, die solche Schlüsselpositionen in der Peptidkette der Threonindehydratase beschreiben und Bereiche des Enzyms identifizieren, die an der allosterischen Regulation beteiligt sind.

"It is a fundamental question, however, whether the interactions between inhibitor sites and substrate sites or between regulatory and catalytic domains are essentially the same or different when the domains are covalently linked instead of being on separate subunits. It is a question that can be answered only by future structure-function analyses being done with the background of a good three-dimensional model of an enzyme such as threonine deaminase." Umbarger, 1992.

Wie von Umbarger (1992) beschrieben, wird letztendlich erst die Lösung der Röntgenstruktur dieses Enzyms, in Kombination mit der Untersuchung der Mutanten, die Erklärung des genauen Mechanismus der allosterischen Transition ermöglichen. Vor allem lieferte jedoch die Isolierung der feedback-resistenten Threonindehydratasen, neben den Informationen zur Struktur und der Regulation des Enzyms, eines der wichtigsten Elemente der Flußkontrolle der Isoleucin-Biosynthese. Eine Analyse der zellinternen Metabolitkonzentrationen in den erstellten Stämmen wird weitere Hinweise auf limitierende Faktoren bei der Isoleucin-Produktion geben.

5 Zusammenfassung

Die allosterisch regulierte Threonindehydratase ist das Schlüsselenzym der L-Isoleucinbiosynthese. Ziel dieser Arbeit war es, das Enzym aus *Corynebacterium glutamicum* und das entsprechende Gen zu charakterisieren und in der allosterischen Regulation veränderte Enzyme zu schaffen.

- In Substratsättigungskurven zeigt sich in Anwesenheit von Isoleucin ein Anstieg des Halbmaximalen Sättigungswertes ($K_{0,5}$) von 21 auf 78 mM. Die Kooperativität nimmt zu, was sich in einem Anstieg des Hill-Koeffizienten von 2,4 auf 3,7 ausdrückt.
- Das für die Threonindehydratase kodierende *ilvA* Gen liegt im Genom nicht zusammen mit *ilvB*, *ilvN* und *ilvC* vor. Aus der ermittelten Nukleotidsequenz des *ilvA* Gens läßt sich ein Polypeptid von 436 Aminosäuren ableiten. Vier Untereinheiten bilden das native Enzym. Dieses wurde isoliert und zur Herstellung polyklonaler Antikörper benutzt. Aus Vergleichen mit homologen Enzymen läßt sich herleiten, daß die Threonindehydratase in *C. glutamicum* aus einer katalytischen und einer regulatorischen Domäne besteht.
- Mit computergestützten Methoden wurde ein dreidimensionales Modell der Threonindehydratase durch "modelling by homology" erstellt. Dieses Modell zeigt, daß zwei die Domänen des Enzyms auch topologisch getrennt vorliegen.
- Neunzehn verschiedene Aminosäureaustausche wurden vorgenommen, bzw. mutierte Gene nach Selektion in einem biologischen System sequenziert. Dadurch wurde ein Spektrum veränderter Enzyme erhalten, die kinetisch charakterisiert wurden. Sie sind inaktiv, teilweise aktiv, partiell hemmbar oder nicht mehr hemmbar. Am auffälligsten ist der Austausch von Valin 323 gegen Alanin. Dieser führt zur vollständigen Aufhebung der allosterischen Hemmbarkeit durch Isoleucin, ohne daß die katalytische Aktivität beeinträchtigt ist. Die Lokalisierung der verschiedenen Mutationsorte im dreidimensionalen Modell zeigt, daß Aminosäureaustausche, die zu einer Aufhebung der allosterischen Regulation führen, bevorzugt an der Oberfläche des Polypeptids liegen.
- Eine Auswahl verschiedener *ilvA* Allele wurde in Threonin-Produktionsstämmen von *C. glutamicum* exprimiert. Durch Synthese des Enzyms mit dem Aminosäureaustausch Valin 323 gegen Alanin läßt sich bis zu 125 mM L-Isoleucin akkumulieren, ohne daß noch Threonin oder Threonin-Abbauprodukte nachweisbar sind.

6 Literaturverzeichnis

- Abe, S., Takayama, K., Kinoshita, S. (1967). Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 13: 279 - 301.
- Ahmed, S. I., Bollon, A. P., Rogers, S. J., Magee, P. T. (1976). Purification and properties of threonine deaminase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimie* 58: 225 - 232.
- Argos, P. (1987). Analysis of sequence-similar pentapeptides in unrelated protein tertiary structures. Strategies for protein folding and a guide for site-directed mutagenesis. *J. Mol. Biol.* 197: 331 - 348.
- Armstrong & Fink (1991). EMBL Nukleotid-Datenbank.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. (eds.) (1989). Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons.
- Bachmann, B. J. (1983). Linkage map of *Escherichia coli* K-12. *Microbiological Reviews* 47: 180 - 230.
- Barford, D. & Johnson, L. N. (1989). The allosteric transition of glycogen phosphorylase. *Nature* 340: 609 - 616.
- Barton, G. J., Newman, R. H., Freemont, P. S., Crumpton, M. J. (1991). Amino acid sequence analysis of the annexin super-gene family of proteins. *Eur. J. Biochem.* 198: 749 - 760.
- Barton, G. J. & Russell, R. B. (1993). Protein structure prediction. *Nature* 361: 505 - 506.
- Bell, S. C. & Turner, J. M. (1976). Bacterial catabolism of threonine; threonine degradation initiated by L-threonine-NAD⁺ oxidoreductase. *Biochem. Journal* 156: 449 - 458.
- Benner, S. A., Cohen, M. A., Gerloff, D. (1993). Predicted secondary structure for the Src homology 3 domain. *J. Mol. Biol.* 229: 295 - 305.
- Benner, S. A. & Gerloff, D. L. (1993). Predicting the conformations of proteins: Man versus machine. *FEBS Letters* 325 (1, 2): 29 - 33.
- Bensadoun, A. & Weinstein, D. (1976). Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal. Biochem.* 70: 241 - 250.
- Bernstein, F. C., Koetzle, T. F., Williams, G. J. B., Meyer, E. F., Brice, M. D., Rodgers, J. R., Kennard, O., Shimanouchi, T., Tasumi, M. (1977). The Protein Data Bank: A computer-based archival file for macromolecular structures. *J. Mol. Biol.* 112: 535 - 542.
- Betz, J. L., Hereford, L. M., Magee, P. T. (1971). Threonine deaminase from *Saccharomyces cerevisiae* mutationally altered in regulatory properties. *Biochemistry* 10 (10): 1818 - 1824.
- Bhatia, M. B., Futaki, S., Ueno, H., Manning, J. M., Ringe, D., Yoshimura, T., Soda, K. (1993). Kinetic and stereochemical comparison of wild-type and active-site K145Q

mutant enzyme of bacterial D-amino acid transaminase. *J. Biol. Chem.* 268 (10): 6932 - 6938.

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

Bitar, M. C., Sabot, J. L., Aviron-Violet, P. (1987). Procédé de séparation d'amono acides. Europ. Patent EB 0251852A1. Anmelder: Rhone-Poulenc.

Bornaes, C., Petersen, J. G. L., Holmberg, S. (1992). Serine and threonine catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: The CHA1 polypeptide is homologous with other serine and threonine dehydratases. *Genetics* 131: 531 - 539.

Bowie, J. U., Lüthy, R., Eisenberg, D. (1991). A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science* 253: 165 - 253.

Branden, C. & Tooze, J. (1990). Introduction to protein structure. Garland Publishing, Inc. New York.

Bröer, S., Eggeling L., Krämer, R. (1993). Strains of *Corynebacterium glutamicum* differing in lysine productivity may have different lysine excretion systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 316 - 321.

Brzovic, S., Ngo, K., Dunn, M. F. (1992). Allosteric interactions coordinate catalytic activity between successive metabolic enzymes in the tryptophan synthase bienzyme complex. *Biochemistry* 31: 3831 - 3839.

Burns, R. O. (1971). L-threonine deaminase - biosynthetic *Salmonella typhimurium*. *Methods Enzymol.* 211: 555 - 560.

Burns, D. M. & Yanofsky, C. (1989). Nucleotide sequence of the *Neurospora crassa* *trp-3* gene encoding tryptophan synthetase and comparison of the *trp-3* polypeptide with its homologs in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 264: 3840 - 3848.

Burns, R. O. & Zarlengo, M. H. (1968.) Threonine deaminase from *Salmonella typhimurium*: I. Purification and properties. *J. Biol. Chem.* 243 (1): 178 - 185.

Calhoun, D. H., Rimerman, R. A., Hatfield, G. W. (1973.) Threonine deaminase from *Escherichia coli*: I. Purification and properties. *J. Biol. Chem.* 248 (10): 3511 - 3516.

Calhoun, D. H., Kuska, J. I., Hatfield, G. W. (1974). Threonine deaminase from *Escherichia coli* II. Maturation and physical properties of the enzyme from a mutant altered in its regulation of gene expression. *J. Biol. Chem.* 250 (10): 127 - 131.

Calhoun, D. H. (1976). Threonine deaminase from *Escherichia coli*. Feedback-hypersensitive enzyme from a genetic regulatory mutant. *J. Bacteriol.* 126 (1): 46 - 63.

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

Changeux, J.-P. (1961). The feedback control mechanism of biosynthetic L-threonine deaminase by L-isoleucine. *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* 26: 313 - 318.

Changeux, J.-P. (1963). Allosteric interactions on biosynthetic L-threonine deaminase from *Escherichia coli* K-12. *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* 28: 497 - 504.

- Chothia, C.** (1992). One thousand families for the molecular biologist. *Nature* 357: 543 - 545.
- Chothia, C. & Lesk. A. M.** (1986). The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO Journal* 5 (4): 823 - 826.
- Chou, P. Y. & Fasman, G. D.** (1974a). Conformational parameters for amino acids in helical, β -sheet, and random coil regions calculated from proteins. *Biochemistry* 13: 211 - 222.
- Chou, P. Y. & Fasman, G. D.** (1974b). Prediction of protein conformation. *Biochemistry* 13: 222 - 244.
- Chung, C. T., Niemela, S. L., Miller, R. H.** (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2172 - 2175.
- Constantinides, A.** (1980). Steroid transformation at high substrate concentrations using immobilized *Corynebacterium simplex* cells. *Biotechnol. Bioeng.* 22: 119 - 136.
- Cordes, C., Möckel, B., Eggeling, L., Sahm, H.** (1992). Cloning, organization and functional analysis of *ilvA*, *ilvB* and *ilvC* genes from *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 112 : 113 - 116.
- Cox, J. L., Cox, B. J., Fidanza, V., Calhoun, D. H.** (1987). The complete nucleotide sequence of the *ilvGMEDA* cluster of *Escherichia coli* K-12. *Gene* 56: 185 - 198.
- Crawford, I. P., Nichols, B. P., Yanofsky, C.** (1980). Nucleotide sequence of the *trpB* gene in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* 142: 489 - 502.
- Cremer, J., Treptow, C., Eggeling, L., Sahm, H.** (1988). Regulation of enzymes of lysine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Gen. Microbiol.* 134: 3221 - 3229.
- Cremer, J.** (1989). Die Lysinbiosynthesesequenz in *Corynebacterium glutamicum*: Regulation, Klonierung und Bildung von Lysin durch Genamplifikation. Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Cremer, J., Eggeling, L., Sahm, H.** (1991). Control of the lysine biosynthetic sequence in *Corynebacterium glutamicum* as analyzed by overexpression of the individual corresponding genes. *App. Environ. Microbiol.* 57 (6): 1746 - 1752.
- Crueger, W. & Crueger, A.** (1989). Biotechnologie - Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie. Oldenbourg Verlag, München.
- Dahlquist, F. W.** (1978). The meaning of Scatchard and Hill plots. *Methods Enzymol.* 48: 270 - 299.
- Danchin, A., Dondon, L., Daniel, J.** (1984). Metabolic alterations mediated by 2-ketobutyrate in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genetics* 193: 473 - 478.
- Daniel, J., Joseph, E., Danchin, A.** (1984). 2-Ketobutyrate as an alarmone in *Escherichia coli* K-12: Inhibition of adenylate cyclase activity mediated by phosphoenolpyruvate: Glucose phosphotransferase transport system. *Mol. Gen. Genetics* 193: 467 - 472.
- Datta, P.** (1971). Threonine deaminase - biosynthetic *Rhodopseudomonas spheroides*. *Methods Enzymol.* 211: 566 - 571.

- Datta, P., Goss, T. J., Omnaas, J. R., Patil, R. V. (1987). Covalent structure of biodegradative threonine dehydratase of *Escherichia coli*: Homology with other dehydratases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 393 - 397.
- Dayhoff, M. O. (1978). A model of evolutionary change in proteins. Matrices for detecting standard relationships, p. 345 - 358. In M. O. Dayhoff (ed.), *Atlas of protein sequence and structure*, vol. 5, suppl. 3. National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C.
- Dayringer, H. E., Tramontano, A., Sprang, S. R., Fletterick, R. J. (1986). Interactive program for visualization and modelling of proteins, nucleic acids and small molecules. *J. Molecular Graphics* 4: 82 - 87.
- Decedue, C. J., Hofler, J. G., Burns, R. O. (1975). Threonine deaminase from *Salmonella typhimurium*. Relationship between regulatory sites. *J. Biol. Chem.* 25: 1563 - 1570.
- Dunnill (1968). The use of helical net-diagrams to represent protein structures. *Biophysical Journal* 8: 865 - 875.
- Dunning, A. M., Talmud, P., Humphries, S. E. (1988). Errors in polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* 16 (21): 10393.
- Ebbighausen, H., Weil, B., Krämer, R. (1989a). Isoleucine excretion in *Corynebacterium glutamicum*: evidence for a specific efflux carrier system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31 (2): 184 - 190.
- Ebbighausen, H., Weil, B., Krämer, R. (1989b). Transport of branched-chain amino acids in *Corynebacterium glutamicum*. *Arch. Microbiol.* 151: 238 - 244.
- Eberly, L. & Crawford, I. P. (1989). Nucleotide sequence of tryptophan synthase from *Pseudomonas putida*. *Biochimie* 71: 521 - 531.
- Eggeling, I. (1986). Untersuchungen zur Umsetzung von 2-Ketobutyrat zu L-Isoleucin mit *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf.
- Eggeling, I., Cordes, C., Eggeling, L., Sahm, H. (1987). Regulation of acetohydroxy acid synthase in *Corynebacterium glutamicum* during fermentation of α -ketobutyrate to L-isoleucine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25: 346 - 351.
- Eikmanns, B. J., Metzger, M., Reinscheid, D., Sahm, H. (1991a). Amplification of three threonine biosynthesis genes in *Corynebacterium glutamicum* and its influence on carbon flux in different strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34: 617 - 622.
- Eikmanns, B. J., Kleinertz, E., Liebl, W., Sahm, H. (1991b). A family of *Corynebacterium glutamicum* / *Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing. *Gene* 102: 93 - 98.
- Eikmanns, B. J. (1992). Identification, sequence analysis, and expression of a *Corynebacterium glutamicum* gene cluster encoding the three glycolytic enzymes glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase, 3-phosphoglycerate kinase, and triosephosphate isomerase. *J. Bacteriol.* 174 (19): 6076 - 6086.
- Eisenstein, E. (1991). Cloning, expression, purification, and characterization of biosynthetic threonine deaminase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 266 (9): 5801 - 5807.
- Eisenstein, E., Han, M. S., Woo, T. S., Ritchey, J. M., Gibbons, I., Yang, Y.

- R., Schachman, H. K. (1992). Negative complementation in aspartate transcarbamylase: Analysis of hybrid enzyme molecules containing different arrangements of polypeptide chains from wild-type and inactive mutant catalytic subunits. *J. Biol. Chem.* 267 (31): 22148 - 22155.
- Erlich, H. A. (ed.) (1989). PCR Technology: Principles and applications for DNA amplification. Stockton, New York.
- Favre, R., Wiater, A., Puppo, S., Iaccarino, M. (1976). Expression of a valine-resistant acetolactate synthase activity mediated by the *ilvO* and *ilvG* genes of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genetics* 143: 243 - 252.
- Feinberg, K. & Vogelstein, R. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specificity. *Anal. Biochem.* 132: 6 - 13.
- Fischer, B. & Hengstenberg, W. (1992). Mannitol-specific enzyme II of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system of *Staphylococcus carnosus*. *J. Biochem.* 204: 963 - 969.
- Follettie, M. T., Shin, H. K., Sinskey, A. J. (1988). Organization and regulation of the *Corynebacterium glutamicum* *hom-thrB* and *thrC* loci. *Mol. Microbiol.* 2 (1): 53 - 62.
- Furukawa, S., Azuma, T., Nakanishi, T., Sugimoto, M. (1988). Breeding an L-isoleucine producer by protoplast fusion of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29: 248 - 252.
- Garnier, J. (1978). Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predictiong the secondary structure of globular proteins. *J. Mol. Biol.* 120: 97 - 120.
- Gerloff, D. L., Jenny, T. F., Knecht, L. J., Gonnet, G. H., Benner, S. A. (1993). The nitrogenase MoFe protein: A secondary structure prediction. *FEBS Letters* 318 (2): 118 - 124.
- Godon, J.-J., Chopin, M.-C., Ehrlich, S. D. (1992). Branched-chain amino acid biosynthesis genes in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *J. Bacteriol.* 174 (20): 6580 - 6589.
- Gornall, A. G., Bardawill, C. J., David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biolog. Chem.* 177, 751 - 766.
- Goss, T. J. & Datta, P. (1985). Molecular cloning and expression of the biodegradative threonine dehydratase gene (*tdc*) of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genetics* 201: 308 - 314.
- Goto, Y. & Fink, A. L. (1989). Conformational states of β -lactamase: Molten-globule states at acidic and alkaline pH with high salt. *Biochemistry* 28: 945 - 952.
- Grandoni, J. A., Zahler, S., Calvo, J. M. (1992). Transcription regulation of the *ilv-leu* operon of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 174: 3212 - 3219.
- Greer, J. (1991). Comparative modeling of homologous proteins. *Methods Enzymol.* 202: 239 - 252.
- Gribskov, M., Devereux, J., Burgess, R. R. (1984). The codon preference plot: graphic analysis of protein coding sequences and prediction of gene expression. *Nucl. Acids. Res.* 12 (1): 539 - 549.

- Griffo, G., Lago, C. T., DeFelice, M. (1990). The mechanism of transient inhibition of *Escherichia coli* K-12 growth by leucine. In Barak, Z., Chipman, D. M., Schloss, I. V. (eds.) Biosynthesis of branched chain amino acids. VCH Publishers, New York. p. 81 - 90.
- Guilbault, G. G. (1973). Practical Fluorescence. Theory, methods, and techniques. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Hadero, A. & Crawford, I. P. (1986). Nucleotide sequence of the genes for tryptophan synthase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Biol. Evol.* 3: 191 - 204.
- Han, K.-S., Archer, J. A. C., Sinskey, A. J. (1990). The molecular structure of the *Corynebacterium glutamicum* threonine synthase gene. *Mol. Microbiol.* 4 (10): 1693 - 1702.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166 : 557 - 580.
- Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of *Escherichia coli*. p. 109 - 136. In D. M. Glover (ed.), DNA cloning, vol. 1. IRL Press, Oxford.
- Harding, W. M. (1969). Relationship between stability of threonine deaminase and its apparent kinetics. *Arch. Biochem. Biophys.* 129: 57 - 61.
- Harger, D. A., & Burgess, R. R. (1980). Elution of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels, removal of sodium dodecyl sulfate, and renaturation of enzymatic activity: results with Sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase, wheat germ DNA topoisomerase, and other enzymes. *Anal. Biochem.* 109: 76 - 86.
- Hatfield, G. W. & Burns, R. O. (1970). Threonine deaminase from *Salmonella typhimurium* III. The intermediate substructure. *J. Biol. Chem.* 245 (4): 787 - 791.
- Hatfield, G. W. & Umbarger, H. E. (1970a). Threonine deaminase from *Bacillus subtilis*; II. The steady state kinetic properties. *J. Biol. Chem.* 245 (7): 1742 - 1747.
- Hatfield, G. W. & Umbarger, H. E. (1970b). Threonine deaminase from *Bacillus subtilis*; I. Purification of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 245 (7): 1736 - 1741.
- Hatfield, G. W. & Umbarger, H. E. (1971). L-Threonine deaminase, biosynthetic *Bacillus subtilis*. *Methods Enzymol.* 211: 561-566
- Hawkes, R., Niday, E., Gordon, J. (1982). A dot-immunoblotting assay for monoclonal and other antibodies. *Anal. Biochem.* 119: 142 - 147.
- Haynes, J. A. & Britz, M. L. (1990). The effect of growth conditions of *Corynebacterium glutamicum* on the transformation frequency by electroporation. *J. Gen. Microbiol.* 136: 255 - 263.
- Henikoff, S. (1984). Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted break-points for DNA sequencing. *Gene* 28: 351 - 359.
- Henner, D. J., Band, L., Shimotsu, H. (1985). Nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis* tryptophan operon. *Gene* 34: 169 - 177.
- Higgins, D. G., Sharp, P. M. (1988). CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* 73: 237 - 244.
- Higushi, R., Krummel, B., Saiki, R. K. (1988). A general method for in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: Study of protein and DNA interactions.

Nucleic Acids Res. 16: 7351 - 7367.

Hirose, K., Kawata, Y., Yumoto, N., Tokushige, M. (1991). Identification of lysyl residues at the AMP-binding site of biodegradative threonine deaminase from *Escherichia coli*. *J. Biochem.* 110: 971 - 975.

Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., Pease, L. R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using polymerase chain reaction. *Gene* 77: 51 - 59.

Hochuli, E., Döbeli, H., Schacher, A. (1987). New metal chelate adsorbents selective for proteins and peptide containing neighbouring histidine residues. *J. Chromatography* 411: 177 - 184.

Hochuli, E., Bannwarth, W., Döbli, H., Stüber, D. (1988). Genetic approach to facilitate with a novel metal chelate adsorbent. *Bio/Technology* 11: 1321 - 1325.

Hofler, J. G. & Burns, R. O. (1978). Threonine deaminase from *Salmonella typhimurium*. Effect of regulatory ligands on the binding of substrates and substrate analogues to the active sites and the differentiation of the activator and inhibitor sites from the active sites. *J. Biol. Chem.* 253 (4): 1245 - 1251.

Högberg-Raibaud, A. & Goldberg, M. E. (1977). Isolation and characterization of independently folding regions of the beta chain of *Escherichia coli* tryptophan synthetase. *Biochemistry* 16: 4014 - 4020.

Holler, E., Bennett, E. L., Calvin, M. (1971). 2-p-Toluidinylnaphthalene-6-sulfonate, a fluorescent reporter group for L-isoleucyl-tRNA synthetase. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 45 (2): 409 - 415.

Höpker, H. R., Schriek, U., Wiesner, P. HPLC-purification of fluorescent primers for A.L.F. (Automated Laser Fluorescence DNA Sequencing). *Pharmacia product information*.

Hoppe, B. & Martens, J. (1984). Aminosäuren - Herstellung und Gewinnung. *Chemie in unserer Zeit* 18: 73 - 78.

Houben, K. F. & Dunn, M. F. (1990). Allosteric effects acting over a distance of 20 - 25 Å in the *Escherichia coli* tryptophan synthase holoenzyme complex increase ligand affinity and cause redistribution of covalent intermediates. *Biochemistry* 29: 2421 - 2429.

Hyde, C. C., Ahmed, S. A., Padlan, E. A., Miles, E. W., Davies, D. R. (1988). Three-dimensional structure of the tryptophan synthase $\alpha_2\beta_2$ multienzyme complex from *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 263 (33): 17857 - 17871.

Hyde, C. C. & Miles, E. W. (1990). The tryptophan synthase multienzyme complex: Exploring structure-function relationships with x-ray crystallography and mutagenesis. *Bio/Technology* 8: 27 - 32.

Ikeda, S., Fujita, I., Yoshinaga, F. (1976). Screening of L-isoleucine producers among ethionine resistant mutants of L-threonine producing bacteria. *Agric. Biol. Chem* 40 (3): 511 - 516.

Ishiwata, K. I., Yoshino, S., Iwamori, S., Suzuki, T., Makiguchi, N. (1989). Cloning and sequencing of *Bacillus stearothermophilus* tryptophan synthase genes. *Agric. Biol. Chem.* 53: 2941 - 2948.

- Ito, W., Ishiguro, H., Kurosawa, Y. (1991). A general method for introducing a series of mutations into cloned DNA using the polymerase chain reaction. *Gene* 102: 67 - 70.
- Jäger, J., Köhler, E., Tucker, P., Sauder, U., Housley-Markovic, Z., Fotheringham, I., Edwards, M., Hunter, M., Kirschner, K., Jansonius, J. N. (1989). Crystallization and preliminary X-ray studies of an aspartate aminotransferase mutant from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 209: 499 - 501.
- Janknecht, R., De Martynoff, G., Lou, J., Hipskind, R. A., Nordheim, A., Stunnenberg, H. G. (1991). Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 8972 - 8976.
- Johnson, M. L. & Frasier, S. G. (1985). Nonlinear least-squares analysis. *Meth. Enzymol.* 117: 301 - 342.
- Jones, B. M. & Gilligan, J. P. (1983). O-Phthaldialdehyde precolumn derivatization and reversed-phase-high-performance liquid chromatography of polypeptide hydrolysates and physiological fluids. *J. Chromatography* 266: 471 - 482.
- Jungermann, K. & Möhler, H. (1984). *Biochemie*. Springer Verlag, Berlin.
- Kabsch, W. & Sander, C. (1983). Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen bonded and geometrical features. *Biopolymers* 22: 2577 - 2637.
- Kalinowski, J., Bachmann, B., Thierbach, G., Pühler, A. (1990). Aspartatekinase genes *lysC α* and *lysC β* overlap and are adjacent to the aspartate β -semialdehyde dehydrogenase gene *asd* in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Gen. Gen.* 224: 317 - 324.
- Kalinowski, J., Cremer, J., Bachmann, B., Eggeling, L., Sahm, H., Pühler, A. (1991). Genetic and biochemical analysis of the aspartokinase from *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Microbiol.* 5 (5): 1197 - 1204.
- Kamitori, S., Hirotsu, K., Higushi, T., Kondo, K., Inoue, K., Kurimatsu, S., Kagamiyama, H., Higushi, Y., Yasuoka, N., Kusunoki, M., Matsuura, Y. (1990). Three-dimensional structure of aspartate aminotransferase from *Escherichia coli* at 2.8 Å resolution. *J. Biochem.* 104: 317 - 318.
- Kantrowitz, E. R. & Lipscomb, W. N. (1988). *Escherichia coli* aspartate transcarbamylase: the relationship between structure and function. *Science* 241: 669 - 674.
- Kantrowitz, E. R. & Lipscomb, W. N. (1990). *Escherichia coli* aspartate transcarbamylase: Part III: The molecular basis for a concerted allosteric transition. *Trends Biochem. Sci.* 15: 53 - 59.
- Kase, H. & Nakayama, K. (1972). Production of L-threonine by analog-resistant mutants. *Agric. Biol. Chem.* 36 (9), 1611 - 1621.
- Kase, H. & Nakayama, K. (1974). Mechanism of L-threonine and L-lysine production by analog-resistant mutants of *Corynebacterium glutamicum*. *Agric. Biol. Chem.* 38: 993 - 1000.
- Katsunuma, T., Elsässer, S., Holzer, H. (1971). Purification and some properties of threonine dehydratase from yeast. *Eur. J. Biochem.* 24: 83 - 87.
- Kaufmann, M., Schwartz, T., Jaenicke, R., Schnackerz, K. D., Meyer, H. E., Bartholmes, P. (1991). Limited proteolysis of the β_2 -dimer of tryptophan synthase yields

- an enzymatically active derivative that binds α -subunits. *Biochemistry* 30: 4173 - 4179.
- Kayastha, A. M., Sawa, Y., Nagata, S., Miles, E. W. (1991). Site-directed mutagenesis of the β subunit of tryptophan synthase from *Salmonella typhimurium*. Role of active site glutamic acid 350. *J. Biol. Chem.* 266 (12): 7618 - 7625.
- Keilhauer, C., Eggeling, L., Sahm, H. (1993). Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: Molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon. *J. Bacteriol.* 175 (17)
- Kempner, E. S. (1993). Movable lobes and flexible loops in proteins. Structural deformations that control biochemical activity. *FEBS Letters* 326 (1,2,3): 4 - 10.
- Kielland-Brandt, M. C. Holmberg, S., Petersen, J. G. L., Nilsson-Tillgren, T. (1984). Nucleotide sequence of the gene for threonine deaminase (*ILV1*) of *Saccharomyces cerevisiae*. *Carlsberg Res. Commun.* 49: 567 - 575.
- Kim, J., Rees, D. C. (1992). Crystallographic structure and functional implications of the nitrogenase molybdenum-iron protein from *Azotobacter vinelandii*. *Nature* 360: 553 - 560.
- Kini R. M. & Evans, H. J. (1991). Molecular modeling of proteins: A strategy for energy minimization by molecular mechanics in the AMBER force field. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 9 (3): 475 - 488.
- Kinoshita, S., Ukada, S., Shimono, M. (1957). Studies on the amino acid fermentation: I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 3: 193 - 205.
- Kinoshita, S. (1966). US Patent 3262861.
- Kirschner, K., Lane, A. N., Strasser, A. W. M. (1991). Reciprocal communication between the lyase and synthase active sites of the tryptophan synthase holoenzyme complex. *Biochemistry* 30: 472 - 478.
- Kishan, V. & Hillen, W. (1990). Molecular cloning, nucleotide sequence, and promoter structure of the *Acinetobacter calcoaceticus trpFB* operon. *J. Bacteriol.* 172: 6151 - 6155.
- Kisumi, M., Kato, J., Komatsubara, S., Chibata, I. (1970). Increase in isoleucine accumulation by 2-aminobutyric acid resistant mutants of *Serratia marcescens*. *Appl. Microbiol.* 21 (4): 569 - 574.
- Kisumi, M., Komatsubara, S., Sugiura, M., Chibata, I. (1971). Properties of isoleucine hydroxamate-resistant mutants of *Serratia marcescens*. *J. Gen. Microbiol.* 69: 291 - 297.
- Kleemann, A., Leuchtenberger, W., Hoppe, B., Tanner, H. (1985). Amino Acids, p. 57 - 97. In Gerhartz (ed.), *Ullmanns encyclopedia of industrial chemistry*, vol. 2A. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany.
- Kraulis, P. J. (1988). MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 24: 946 - 950.
- Kyte, J. & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105 - 132.
- Ladjimi, M. M., Middleton, S. A., Kelleher, K. S., Kantrowitz, E. R. (1988). Relationship between domain closure and binding, catalysis, and regulation in *Escherichia*

- coli* aspartate transcarbamoylase. *Biochemistry* 27: 268 - 276.
- Ladjimi, M. M. & Kantrowitz, E. R. (1988). A possible model for the concerted allosteric transition in *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase as deduced from site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 27: 276 - 283.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680 - 685.
- LaRossa, R. A., Van Dyk, T. K., Smulsky, D. R. (1987). Toxic accumulation of a-ketobutyrate caused by inhibition of the branched-chain amino-acid biosynthetic enzyme acetolactate synthase in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 169 (4): 1372 - 1378.
- Lawther, R. P., Calhoun, D. H., Adams, C. W., Hauser, C. A., Gray, J., Hatfield, W. (1981). Molecular basis of valine resistance in *Escherichia coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78 (2): 922 - 925.
- Lawther, R. P., Calhoun, D. H., Gray, J., Adams, C. W., Hauser, C. A., Hatfield, W. (1982). DNA sequence fine structure analysis of *ilvG* (*ilvG*⁺) mutations of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 149 (1): 294 - 298.
- Lawther, R. P., Wek, R. C., Lopes, J. M., Pereira, R., Taillon, B. E., Hatfield, W. G. (1987). The complete nucleotide sequence of the *ilvGMEDA* operon of *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acid Res.* 15: 2127 - 2155.
- Lee, C. W., Lucas, S., Desmoazeaud, M. J. (1985). Phenylalanin and tyrosine catabolism in some cheese coryneform bacteria. *FEMS Microbiol. Letters* 26: 201 - 205.
- Leuenberger, G. W. & Kieslich, K. (1987). Biotransformation. p. 467 - 497. In Handbuch der Biotechnologie. Präve, P., Faust, U., Sittig, W., Sukatsch, D. A. (ed.) Oldenburg Verlag, München.
- Leung, D. W., Chen, E., Goeddel, D. V. (1989). A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Technique* 1 (1): 11 - 15.
- Liebl, W., Bayerl, A., Schein, B., Stillner, U., Schleifer, K. H. (1989). High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Letters* 65: 299 - 304.
- Liebl, W., Ehrmann, M., Ludwig, W., Schleifer, K. H. (1991). Transfer of *Brevibacterium divarticum* DSM 20297^T, "*Brevibacterium flavum*" DSM 20411, "*Brevibacterium lactofermentum*" DSM 20412 and DSM 1412, and *Corynebacterium lilium* DSM 20137^T to *Corynebacterium glutamicum* and their distinction by rRNA gene restriction patterns. *Intern. J. Systematic Bacteriol.* 41 (2): 255 - 260.
- Lim, V. I. (1974). Structural principles of the globular organization of protein chains. A stereochemical theory of globular protein secondary structure. *J. Mol. Biol.* 88: 857 - 872.
- Linkens, H.-J., Djavadi-Ohanian, L., Goldberg, M. E. (1993). Nicking of the tryptophan synthase β_2 -subunit at Glu-296 prevents the conformational change undergone on binding the α -subunit. *FEBS Letters* 320 (3): 224 - 228.
- Lipman, D. J. & Pearson, W. R. (1985). Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science* 227: 1435 - 1441.

- Lipscomb, W. N. (1991). Structure and function of allosteric enzymes. *Chemtracts. Biochemistry and Molecular Biology* 2: 1 - 15.
- Lu, Z., Nagata, S., McPhie, P., Miles, E. W. (1993). Lysine 87 in the β -subunit of the tryptophan synthase that forms an internal aldimine with pyridoxal phosphate serves critical roles in transimination, catalysis, and product release. *J. Biol. Chem.* 268 (12): 8727 - 8734.
- Mackey, C. J., Warburg, R. J., Halvorson, H. O., Zahler, S. A. (1984). Genetic and physical analysis of the *ilvBC-leu* region in *Bacillus subtilis*. *Gene* 32: 49 - 56.
- Madsen, N. B. & Withers, S. G. (1986). Glycogen phosphorylase. In *Chemical, Biochemical, and Medical Aspects of Vitamin B₆, Pyridoxal Phosphate* (Dolphin, D., Poulson, R., Avramovic, O. (eds.) part B, pp. 355 - 389. John Wiley & Sons, New York.
- Marceau, M., McFall, E., Lewis, S. D., Shafer, J. A. (1988). D-Serine dehydratase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 263: 1692 - 16933.
- Martin, J. F. (1989). Molecular genetics of amino acid-producing corynebacteria. Reprinted from: Banmberg, S., Hunter, I., Rhodes, M. (ed.), *Society for General Microbiology Symposium* 44, Cambridge University Press. 25-59.
- Matsui, K., Sano, K., Ohtsubo, E. (1986). Nucleotide sequence of tryptophan synthase from *Brevibacterium lactofermentum*. *Nucleic Acids Res.* 14: 10113 - 10114.
- Matsushima, H. (1976). Studies on the microbial production of L-isoleucine. *J. Ferment. Technol.* 54 (5): 340 - 349.
- Maxfield, F. R. & Scheraga, H. A. (1979). Improvement in the prediction of protein backbone topography by reduction of statistical errors. *Biochemistry* 18: 697 - 704.
- McGee, J. & Doudoroff, M. (1954). A new phosphorylated intermediate in glucose oxidation. *J. Biol. Chem.* 210: 617 - 626.
- Meade, H. M., Song, S. R., Ruvkun, G. B., Brown, S. E., Ausubel, F. M. (1982). Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn mutagenesis. *J. Bacteriol.* 149: 114 - 122.
- Menkel, E., Thierbach, G., Eggeling, L., Sahm, H. (1989). Influence of increased aspartate availability on lysine formation by a recombinant strain of *Corynebacterium glutamicum* and utilization of fumarate. *App. Environ. Microbiol.* 55 (3): 684 - 688.
- Meselson, M. & Yuan, R. (1968). A DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nature* 247: 1110 - 1114.
- Miles, E. W. (1991a). The tryptophan synthase $\alpha_2\beta_2$ complex: Cleavage of a flexible loop in the α subunit alters allosteric properties. *J. Biol. Chem.* 266 (17): 10715 - 10718.
- Miles, E. W. (1991b). Structural basis for catalysis by tryptophan synthase. *Archives in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* 64: 93 - 172.
- Miyajima, R. & Shiio, I. (1970). Regulation of aspartate family amino acid biosynthesis in *Brevibacterium flavum* III. Properties of homoserine dehydrogenase. *J. Biochem.* 68: 311 - 319.
- Miyajima, R. & Shiio, I. (1971). Regulation of aspartate family amino acids biosynthesis in *Brevibacterim flavum*. IV. Repression of the enzymes in threonine biosynthesis. *Agric.*

Biol. Chem. 35: 424 - 430.

Miyajima, R. & Shiio, I. (1972). Regulation of aspartate family amino acid biosynthesis in *Brevibacterium flavum*; VI. Effects of isoleucine and valine on threonine dehydratase activity and its formation. *J. Biochem.* 71: 951 - 960.

Möckel, B., Eggeling, L., Sahm, H. (1992). Functional and structural analyses of threonine dehydratase from *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 174 (24): 8065 - 8072.

Monod, J., Changeux, J.-P., Jacob, F. (1963). Allosteric proteins and cellular control systems. *J. Mol. Biology* 6: 306 - 329.

Monod, J., Wyman, J., Changeux, J.-P. (1965). On the nature of allosteric transitions: A plausible model. *J. Molecular Biology* 12: 88 - 118.

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

Mrazek, J. & Kypr, J. (1988). Computer programm Jamsek combining statistical and stereochemical rules for the prediction of protein secondary structure. *CABIOS* 4 (2): 297 - 302.

Musacchio, A., Noble, M., Paupit, R., Wierenga, R., Saraste, M. (1992). Crystal structure of a Src-homology 3 (SH3) domain. *Nature* 359: 851 - 855.

Myers, E. W. & Miller, W. (1988). Optimal alignments in linear space. *Cabios* 4: 11 - 17.

Nakayama, K. & Hagino, S. H. (1972). Preparation of L-isoleucine by fermentation. US Patent 3.671.396

Natori, Y., Kano, Y., Imamoto, F. (1990). Nucleotide sequences and genomic constitution of five tryptophan genes of *Lactobacillus casei*. *J. Biochem.* 107: 248 - 255.

Newton, C. J. & Kantrowitz, E. R. (1990). Importance of domain closure for homotropic cooperativity in *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase. *Biochemistry* 29: 1444 - 1451.

Niefind, K. & Schomburg, D. (1991). Amino acid similarity coefficients for protein modeling and sequence alignment derived from main-chain folding angles. *J. Mol. Biology* 219: 48 - 53.

Oda, Y., Nakano, Y., Kitaoka, S. (1983). Occurrence and some properties of two threonine dehydratases in *Euglena gracilis*. *J. Gen. Microbiol.* 129: 57 - 61.

Ogawa, H., Gomi, H., Konishi, K., Date, T., Nakanishi, H., Nose, K., Matsuda, Y., Peraino, C., Pitot, H. C., Fujioka, M. (1989). Human liver serine dehydratase. *J. Biol. Chem.* 264: 15818 - 15823.

Omori, K. & Komatsubara, S. (1993). Role of serine 352 in the allosteric response of *Serratia marcescens* aspartokinase I-homoserine dehydrogenase I analyzed by site-directed mutagenesis. *J. Bacteriol.* 175 (4): 959 - 965.

Parsot, C. (1986). Evolution of biosynthetic pathways: a common ancestor for threonine synthase, threonine dehydratase and D-serine dehydratase. *EMBO J.* 5: 3013 - 3019.

Peoples, O. P., Liebl, W., Bodis, M., Maeng, M., Follettie, M. T., Archer, J. A.,

- Sinskey, A. J. (1988). Nucleotide sequence and fine structure analysis of the *Corynebacterium glutamicum* *hom-thrB* operon. *Mol. Microbiol.* 2: 53 - 62.
- Peterson, C. B., Burman, D. L., Schachman, H. K. (1992). Effects of replacement of active site residue glutamine 231 on activity properties of aspartate transcarbamoylase. *Biochemistry* 31: 8508 - 8515.
- Perutz, M. (1990). Mechanism of cooperativity and allosteric regulation in proteins. Cambridge University Press, Cambridge.
- Pledger, W. J. & Umbarger, H. E. (1973). Isoleucine and valine metabolism in *Escherichia coli* XXI. Mutations affecting derepression and valine resistance. *J. Bacteriol.* 114 (1): 183 - 194.
- Recktenwald, A., Schomburg, D., Schmid, R. D. (1993). Protein engineering and design. Methods and the industrial relevance. *J. Biotech.* 28: 1 - 23.
- Reinscheid, D. J., Eikmanns, B. J., Sahm, H. (1991). Analysis of a *Corynebacterium glutamicum* *hom* gene coding for feedback-resistant homoserine dehydrogenase. *J. Bacteriol.* 173: 3228 - 3230.
- Reinscheid, D. J., Kronemeyer, W., Eggeling, L., Eikmanns, B. J., Sahm, H. (1993). Stable expression of *hom^{FBR}-thrB* in *Corynebacterium glutamicum* and its effect on the carbon flux to threonine and related amino acids. in Press.
- Rogerson A. C. & Freundlich, M. (1970). Control of isoleucine, valine, and leucine biosynthesis VIII. Mechanism of growth inhibition by leucine in relaxed and stringent strains of *Escherichia coli* K-12. *Biochim. Biophys. Acta* 208: 87 - 98.
- Rosenberg, M. & Court, D. (1979). Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Annu. Rev. Genet.* 13: 319 - 353.
- Rost, B., & Sander, C. (1992). Jury returns on structure prediction. *Nature* 360: 540.
- Rost, B. & Sander, C. (1993a). Prediction of protein secondary structure at better than 70 % accuracy. *J. Mol. Biol.* 232: 584 - 599.
- Rost, B. & Sander, C. (1993b). Improved prediction of protein secondary structure by use of sequence profiles and neural networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 7558 - 7562.
- Rost, B., Schneider, R., Sander, C. (1993). Progress in protein structure prediction. *TIBS* 18: 120 - 123.
- Saier, M. H. & Reizer, J. (1992). Proposed uniform nomenclature for the proteins and protein domains of the bacterial phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. *J. Bacteriol.* 174 (5): 1433 - 1438.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350 - 1354.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higushi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 23 : 487 - 491.
- Samach, A., Hareven, D., Gutfinger, T., Ken-Dror, S., Lifschitz, E. (1991). Bio-

- synthetic threonine deaminase gene of tomato: isolation, structure, and upregulation in floral organs. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2678 - 2682.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Sander, C. & Schneider, R. (1991). Database of homology-derived protein structures and the structural meaning of sequence alignment. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics* 9: 56 - 68.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74 (12), 5463 - 5467.
- Schäfer, A., Kalinowski, J., Simon, R., Seep-Feldhaus, A. H., Pühler, A. (1990). High frequency conjugal transfer from *Escherichia coli* to various Gram-positive coryneform bacteria. *J. Bacteriol.* 172: 1663 - 1666.
- Scheer, E., Cordes, C., Eggeling, L., Sahm, H. (1987). Regulation of acetohydroxy acid synthase in *Corynebacterium glutamicum* during isoleucine formation from α -hydroxybutyric acid. *Arch. Microbiol.* 149: 173 - 174.
- Scheer, E. (1988). Untersuchungen zur L-Isoleucinbildung aus D,L-2-Hydroxybutyrat mit *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf.
- Scheer, E., Eggeling, L., Sahm, H. (1988). Improved D,L- α -hydroxybutyrate conversion with *Corynebacterium glutamicum* mutants to L-isoleucine with increased D-lactate utilization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28: 474 - 477.
- Schiffer, M. & Edmundson, A. A. (1967). Use of helical wheel to represent the structure of proteins and to identify segments with helical potential. *Biophys. Journal* 7: 121 - 135.
- Schirmer, T. & Evans, P. R. (1990). The structural basis of the allosteric behaviour of phosphofructokinase. *Nature* 343: 140 - 145.
- Schomburg, D. (1988). Computer aided protein design: Methods and applications *GBF Monographs* Vol 12, 45-56, Advances in Protein Design, International Workshop 1988, Ed. H. Blöcker et al. VCH Weinheim.
- Schomburg, D. & Reichelt, J. (1988). BRAGI: A comprehensive protein modeling program system. *J. Mol. Graphics* 6: 161 - 165.
- Schrumpf, B. (1991). Lysinbildung mit *Corynebacterium glutamicum*: Analyse des Metabolitflusses durch Bestimmung zellinterner Aminosäurekonzentrationen und enzymatische Untersuchungen. Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Schrumpf, B., Eggeling, L., Sahm, H. (1992). Isolation and prominent characteristics of an L-lysine hyperproducing strain of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37: 566 - 571.
- Schulz, G. E. & Schirmer, R. H. (1979). Principles of protein structure. Spriner Verlag, Heidelberg.
- Schwinde, J. W., Thum-Schmitz, N., Eikmanns, B. J., Sahm, H. (1993). Transcriptional analysis of the *gap-pgk-tpi-ppc* gene cluster of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 175: 3905 - 3908.

- Shiio, I. & Miyajima, R. (1969). Concerted inhibition and its reversal by end products of aspartate kinase in *Brevibacterium flavum*. *J. Biochem.* 65: 849 - 850.
- Shikahara, Y. & Evans, P. R. (1988). Crystal structure of the complex of phosphofructokinase from *Escherichia coli* with its reaction products. *J. Mol. Biol.* 204: 973 - 994.
- Shine, J. & Dalgarno, L. (1974). The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16s ribosomal RNA: complementary to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71 (4): 1342 - 1346.
- Smith, J. M., Smolin, D. E., Umbarger, H. E. (1976). Polarity and regulation of the *ilv* gene cluster in *Escherichia coli* strain K-12. *Mol. Gen. Genetics* 148: 111 - 124.
- Smith, D. L., Ringe, D., Finlayson, W. L., Kirsch, J. F. (1986). Preliminary X-ray data for aspartate aminotransferase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 28: 8161 - 8167.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503 - 517.
- Sprenger, G. A. (1993). Two open reading frames adjacent to the *Escherichia coli* K-12 transketolase (*tkt*) gene show high similarity to the mannitol phosphotransferase system enzymes from *Escherichia coli* and various Gram-positive bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*. in press.
- Squires, C. H., DeFelice, M., Wessler, S. R., Calvo, J. M. (1981). Physical characterization of the *ilvHI* operon of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 147: 797 - 804.
- Stark, M. (1987). Multicopy expression vectors carrying the *lac* repressor gene for regulated high-level expression of genes in *E. coli*. *Gene* 51: 255 - 267.
- Stebbins, J. W., Zhang, Y., Kantrowitz, E. R. (1990). Importance of residues arg-167 and gln-231 in both allosteric and catalytic mechanism of *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase. *Biochemistry* 29: 3821 - 3827.
- Sternson, L. A., Stobaugh, J. F., Repta, A. J. (1984). Rational design and evaluation of improved o-phthalaldehyde-like fluorogenic reagents. *Anal. Biochem.* 144: 233 - 246.
- Strohl, W. R. (1992). Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent sterptomycete promoters. *Nucl. Acids Res.* 20 (5): 961 - 974.
- Stryer, L. (1965). The interaction of a naphthalene dye with apomyoglobin and apohemoglobin. A fluorescent probe of non-polar binding sites. *J. Mol. Biol.* 13: 482 - 495.
- Stüber, D., Matile, H., Garotta, G. (1990a). System for high-level production in *Escherichia coli* and rapid purification of recombinant proteins: Application to epitope mapping, preparation of antibodies, and structure-function analysis. *Immunological Methods*, Vol. 4, Lefkovits, I., Permis, B. eds.; San Diego Academic Press, 121 - 152.
- Stüber, D., Bannwarth, W., Pink, J. R. L., Meloen, R. H., Matile, H. (1990b). New B cell epitopes in the *Plasmodium falciparum* malaria circumsporozoite protein. *Eur. J. Immunol.* 20: 819 - 824.
- Taillon, B. E., Little, R., Lawther, R. P. (1988). Analysis of the functional domains of biosynthetic threonine deaminase by comparison of the amino acid sequences of three wild-type alleles to the amino acid sequence of biodegradative threonine deaminase. *Gene* 63: 245 - 252.

- Takata, J., Yamamoto, K., Tosa, T., Chibata, J. (1979). Screening of microorganisms having high fumarase activity and their immobilization with carrageenan. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotech.* 7: 161 - 172.
- Tanaka, S., Lerner, S. A., Lin, E. C. C. (1967). Replacement of a phosphoenolpyruvate phosphotransferase by a nicotinamide adenine dinucleotide-linked dehydrogenase for the utilization of mannitol. *J. Bacteriol.* 93: 642 - 648.
- Tanizawa, K., Asano, S., Masu, Y., Kuramitsu, S., Kagamijama, H., Tanaka, H., Soda, K. (1989). The primary structure of thermostable D-amino acid aminotransferase from a thermostable *Bacillus* species and correlation with L-amino acid aminotransferase. *J. Biol. Chem.* 264: 2450 - 2454.
- Taylor, W. R. (1988). Pattern matching methods in protein sequence comparison and structure prediction. *Protein Engineering* 2 (2): 77 - 86.
- Terasawa, M., Inui, M., Goto, M., Kurusu, Y., Yukawa, H. (1991). Derepression of by-product formation during L-isoleucine production by a living-cell reaction process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35: 348 - 351.
- Teuber, M., Geis, A., Kursch, U., Lembke, J., Moebus, O. (1987). Biotechnologische Verfahren zur Herstellung von Lebensmitteln und Futtermitteln., p. 269 - 313 In *Handbuch der Biotechnologie*. Präve, P., Faust, U., Sittig, W., Sukatsch, D. A. (ed.) R. Oldenburg Verlag, München.
- Tindall, K. R., & Kunkel, T. A. (1988). Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* 27: 6008 - 6013.
- Tinoco, I., Borer, P. N., Dengler, B., Lewine, M. D., Uhlenbeck, O. C., Crothers, D. M., Gralla, J. (1973). Improved estimation of secondary structure in ribonucleic acids. *Nature New Biology* 246: 40 - 41.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67: 4350 - 4354.
- Tsuchida, T., Otsuka, N., Sonoda, H. (1985). European patent application 0.167.132
- Umbarger, H. E. & Brown, B. (1956). Threonine deamination in *Escherichia coli*: I. D- and L-threonine deaminase activities of cell-free extracts. *J. Bacteriol.* 71: 443 - 449.
- Umbarger, H. E. (1987). Biosynthesis of the branched-chain amino acids, p. 352 - 367. In Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Low, K. B., Magasanik, M., Schaechter, M., Umbarger, H. E. (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Umbarger, H. E. (1990). The study of branched chain amino acid biosynthesis - its roots and its fruits, p. 1 - 24. In Barak, Z., Chipman, D. M., Schloss, I. V. (eds), *Biosynthesis of branched chain amino acids*. VCH Publishers, New York.
- Umbarger, E. (1992). The origin of a useful concept - Feedback inhibition. *Protein Science* 1: 1392 - 1395.
- Updike, M. H. & Calton, G. J. (1982). Fermentative preparation of L-isoleucine. US Patent 4.329.427

- VanDyk, T. K. & LaRossa, R. A. (1986). Sensitivity of a *Salmonella typhimurium* aspC mutant to sulfometuron methyl, a potent inhibitor of acetolactate synthase II. *J. Bacteriol.* 165 (2): 386 - 392.
- Vieira, J. & Messing, J. (1982). The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic primers. *Gene* 19: 259 - 268.
- Vonder Haar, R. & Umbarger, H. E. (1972). Isoleucine and valine metabolism in *Escherichia coli* XIX: Inhibition of isoleucine biosynthesis by Glycyl-Leucine. *J. Bacteriol.* 112 (1): 142 - 147.
- Watanabe, N., Sakabe, K., Sakabe, N., Higashi, T., Sasaki, T., Aibara, S., Morita, Y., Yonaha, K., Toyama, S., Fukutani, H. (1989). Crystal structure analysis of ω -amino acid: Pyruvate aminotransferase with a newly developed Weissberg camera and an imaging plate using synchrotron radiation. *J. Biochem.* 105: 1 - 3.
- Wek, R. C. & Hatfield, G. W. (1986). Nucleotide sequence and in vivo expression of *ilvY* and *ilvC* genes in *Escherichia coli* K-12. *J. Biochem. Chem.* 261: 2441 - 2450. *Nucl. Acids Res.* 14 (6): 2763 - 2777.
- Wente, S. R. & Schachman, H. K. (1991). Different amino acid substitutions at the same position in the nucleotide-binding site of aspartate transcarbamoylase have diverse effects on the allosteric properties of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 266 (5): 20833 - 20839.
- Wierenga, R. K., Terpstra, P., Hol, W. G., Hol, J. (1986). Prediction of the occurrence of the ADP-binding $\beta\alpha\beta$ -fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J. Mol. Biol.* 187: 101 - 107.
- Wilbur, W. J. & Lipman, D. J. (1983). Rapid similarity searches of nucleic acid and protein data banks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 726 - 730.
- Wilhelm, C., Eggeling, I., Nassenstein, A., Jeben, C., Eggeling, L., Sahm, H. (1989). Limitations during hydroxybutyrate conversion to isoleucine with *Corynebacterium glutamicum*, as analysed by the formation of by-products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31 : 458 - 462.
- Williams, A. L. & Tinoco, I. (1986). A dynamic programming algorithm for finding alternative RNA secondary structure. *Nucleic Acids Res.* 14: 299 - 315.
- Yanish-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. (1985). Improved M13 phage vectors and host strains: nucleotide sequence of the M12mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103 - 119.
- Yoshihama, M., Higashiro, K., Rao, E. A., Akedo, M., Shanabruch, W. G., Follettie, M. T., Walker, G. C., Sinskey, A. J. (1985). Cloning vector systems for *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 162 (2): 591 - 597.
- Zhao, G.-P., Somerville, R. L. (1992). Genetic and biochemical characterization of the *trpB8* mutation of *Escherichia coli* tryptophan synthase. *J. Biol. Chem.* 267 (1): 526 - 541.
- Zhao, G.-P., Somerville, R. L. (1993). A single amino acid switch within the "hinge" region of the tryptophan synthase β subunit of *Escherichia coli* that leads to diminished association with α subunit and arrested conversion of ESII to product. *J. Biol. Chem.* 268 (20): 14921 - 14931.
- Zhou, Y., Zhang, X., Ebricht, R. H. (1991). Random mutagenesis of gene-sized DNA

molecules by use of PCR with Taq DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 19 (21): 6052.

Ziak, M., Jaussi, R., Gehring, H., Christen, P. (1990). Aspartate aminotransferase with pyridoxal-5'-phosphate-binding lysine residue replaced by histidine retains partial catalytic competence. *Eur. J. Biochem.* 187: 329 - 333.

Zittrich, S. G. (1992). Biochemische und molekulargenetische Untersuchung zur Isoleucinsekretion bei *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Zvelebil, M. J., Barton, G. J., Taylor, W. R., Sternberg, M. J. E. (1987). Prediction of protein secondary structure and active sites using the alignment of homologous sequences. *J. Mol. Biol.* 195: 957 - 961.

7 Anhang

Chemikalien: Soweit nicht in dieser Tabelle aufgeführt wurden die Chemikalien von der Firma Merck AG, Darmstadt bezogen.

Tabelle 14: Chemikalien und anderes Material

<i>Bethesda Research Laboratories</i>	Agarose
<i>BIO101 Inc.</i>	GENCLEAN-Kit
<i>Boehringer GmbH, Mannheim</i>	Adenosindiphosphat, Di-Na-Salz Alkalische Phosphatase Ampicillin (Trihydrat) DNA labeling and detection kit DNA Ligase T4 Isopropyl- β -thiogalaktosid (IPTG) Kanamycin Klenow-Polymerase Nukleotide, dATP, dCTP, dGTP, dTTP Restriktionsendonukleasen Rinder-Serumalbumin RNase A Taq-Polymerase X-Gal
<i>Diagen GmbH, Hilden</i>	Quiaexpress Protein Expression and Purification Kit
<i>Difco Lab., Detroit, USA</i>	Bacto-Agar Bacto-Peptone Bacto-Tryptone Brain-Heart-Infusion-Medium Yeast-Extrakt

<i>Pharmacia</i>	Acetonitril Auto-Read-sequencing Kit Dichlorethan NAP TM -10-Säule Phosphoramidite T7-DNA-Polymerase
<i>Promega</i>	Exonuklease III Kit
<i>Schleicher und Schuell</i>	Nytran-Nylonfilter N13
<i>Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg</i>	Harnstoff Sodiumdodecylsulfat Polyethylenglycol 6000
<i>Sigma, München</i>	Lysozym L6876

Ein-und Drei-Buchstaben Code der Aminosäuren:

Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Aspartat	Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q	Serin	Ser	S
Glutamat	Glu	E	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Try	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V

Kodon-Häufigkeitstabelle (Tabelle 15) für *C. glutamicum*. Die Tabelle wurde mit dem Programm Codonfrequency erstellt. Für die Erstellung der Tabelle wurden die Sequenzen der *C. glutamicum* Gene *aecD*, *asd*, *dapA*, *ddh*, *fda*, *gdh*, *hom-thrB*, *ilvBNC*, *lysA*, *lysC*, *lysI*, *pheA*, *thrC*, *trpE* verwendet. Die Daten aus der Tabelle wurden für die Codierbereichsanalyse mit dem Programm Codonpreference verwendet.

Tabelle 15: Kodon-Häufigkeitstabelle für *C. glutamicum*. Die Tabelle wurde mit dem Programm Codonfrequency erstellt.

Amino- säure	Codon	Anzahl	Anteil	Amino- säure	Codon	Anzahl	Anteil
Gly	GGG	24	0,04	Trp	TGG	79	1,00
Gly	GCA	114	0,19	End	TGA	17	0,49
Gly	GGT	173	0,28	Cys	TGT	17	0,29
Gly	GGC	299	0,49	Cys	TGC	41	0,71
Glu	GAG	216	0,45	End	TAG	3	0,09
Glu	GAA	266	0,55	End	TAA	15	0,43
Asp	GAT	197	0,45	Tyr	TAT	48	0,27
Asp	GAC	244	0,55	Tyr	TAC	133	0,73
Val	GTG	183	0,29	Leu	TTG	114	0,18
Val	GTA	64	0,10	Leu	TTA	23	0,04
Val	GTT	210	0,33	Phe	TTT	61	0,24
Val	GTC	185	0,29	Phe	TTC	195	0,76
Ala	GCG	124	0,15	Ser	TCG	40	0,09
Ala	GCA	253	0,32	Ser	TCA	43	0,09
Ala	GCT	220	0,28	Ser	TCT	97	0,21
Ala	GCC	203	0,25	Ser	TCC	181	0,39
Arg	AGG	13	0,03	Arg	CGG	25	0,06
Arg	AGA	13	0,03	Arg	CGA	59	0,13
Ser	AGT	21	0,05	Arg	CGT	114	0,25
Ser	AGC	80	0,17	Arg	CGC	226	0,50
Lys	AAG	192	0,78	Gln	CAG	155	0,67
Lys	AAA	54	0,22	Gln	CAA	78	0,33
Asn	AAT	57	0,24	His	CAT	47	0,28
Asn	AAC	184	0,76	His	CAC	119	0,72
Met	ATG	129	1,00	Leu	CTG	214	0,33
Ile	ATA	5	0,01	Leu	CTA	37	0,06
Ile	ATT	131	0,33	Leu	CTT	119	0,18
Ile	ATC	256	0,65	Leu	CTC	138	0,21
Thr	ACG	36	0,09	Pro	CCG	43	0,13
Thr	ACA	43	0,10	Pro	CCA	151	0,45
Thr	ACT	70	0,17	Pro	CCT	95	0,28
Thr	ACC	261	0,64	Pro	CCC	50	0,15

Restriktionskarten verschiedener in dieser Arbeit konstruierter und verwendeter Plasmide:

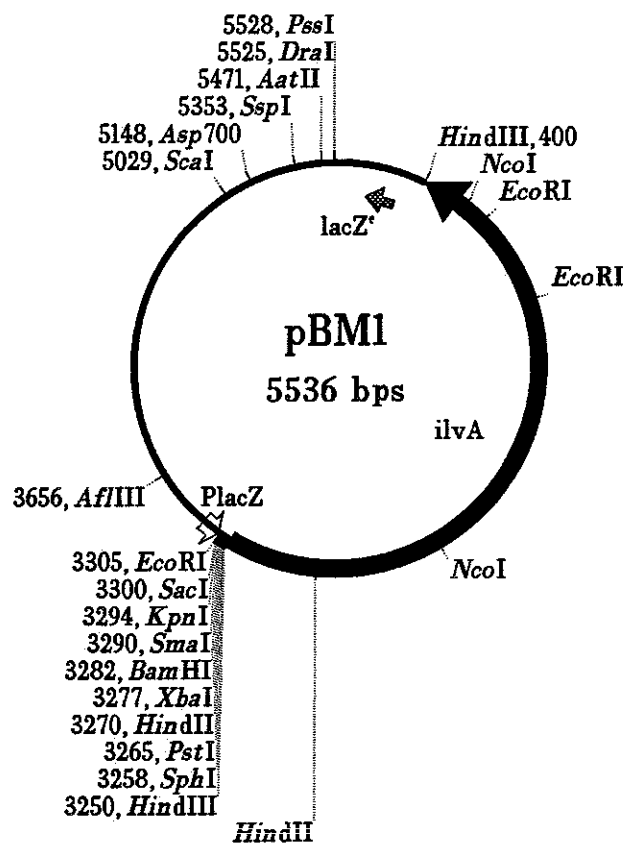


Abbildung 32: Plasmid pBM1 (2,85 kb *HindIII* Insert mit *ilvA* Gen im Vektor pUC18 (diese Arbeit).

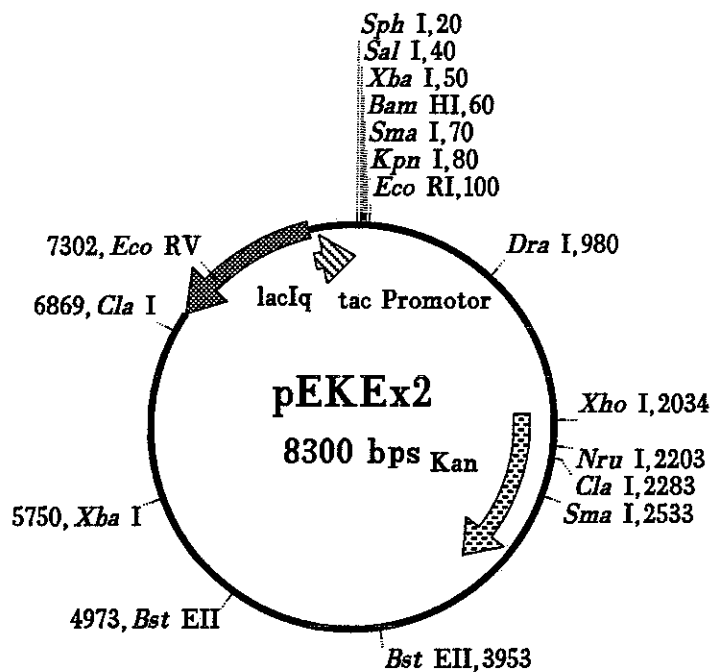


Abbildung 33: Plasmid PEKEEx2 (*C. glutamicum* Expressionsvektor) (Eikmanns et al., 1991b).

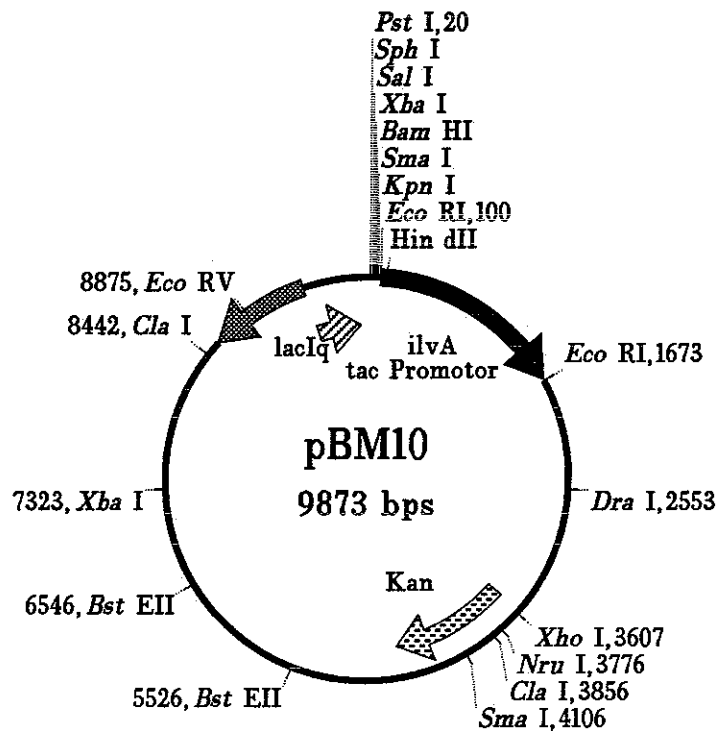


Abbildung 34: Plasmid pBM10 (*ilvA* 1573 bp *Eco*RI Insert im Expressionsvektor pEKEEx2) (diese Arbeit).

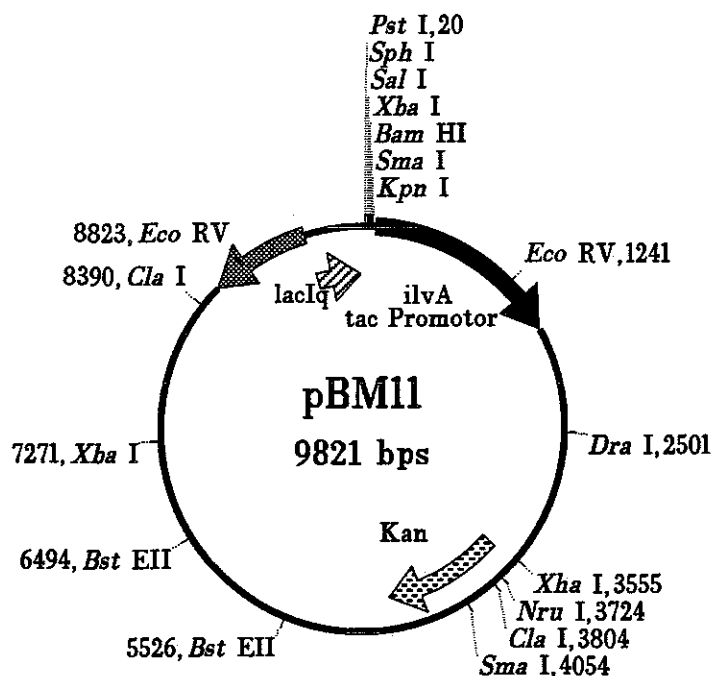


Abbildung 35: Plasmid pBM11 (*ilvA* 1521bp *Hind*II - *Eco*RI Insert im Vektor pEKEx2) (diese Arbeit).

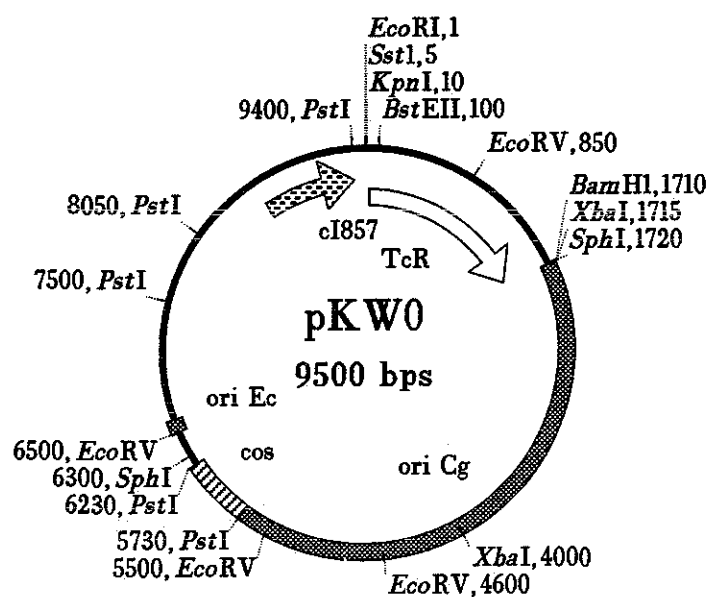


Abbildung 36: Plasmid pKW0 (*E. coli* - *C. glutamicum* Klonierungsvektor)(Kronemeyer, persönliche Mitteilung).

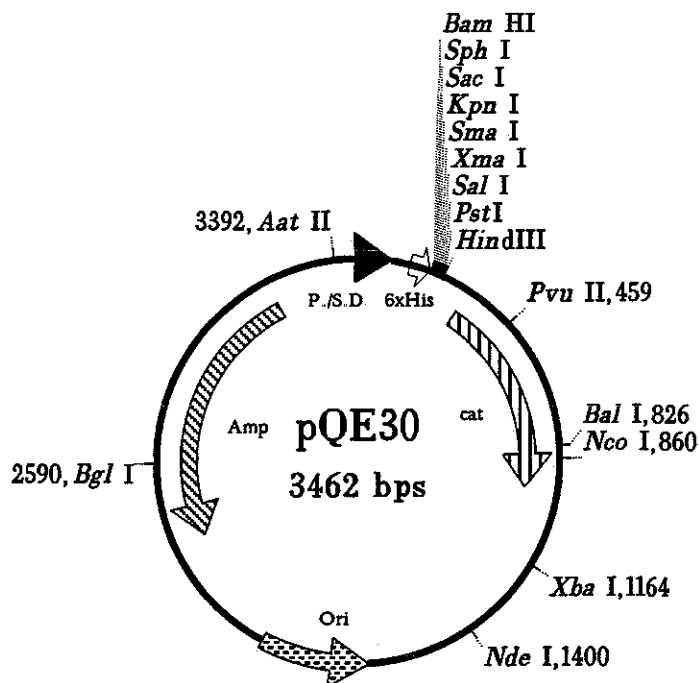


Abbildung 37: Plasmid pQE30 (Expressionsvektor zur 6xHistidin Markierung) (Stüber et al., 1990a).

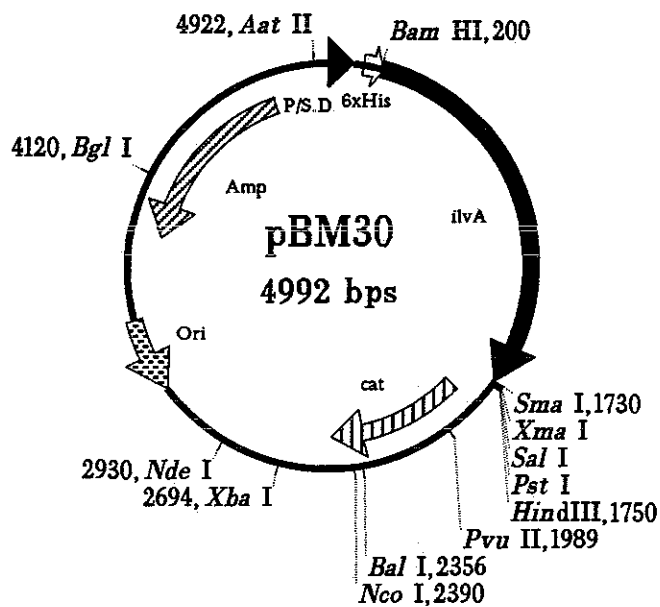


Abbildung 38: Plasmid pBM30 (1543bp *ilvA* Insert im Vektor pQE30) (diese Arbeit).

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie I der Forschungsanlage Jülich GmbH angefertigt.

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

Herrn Prof. Dr. M. Ciriacy-Wantrup danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates und Herrn Prof. Dr. A. Pühler für die Erstellung des Gutachtens.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. L. Eggeling für die intensive Betreuung, die ständige Diskussionsbereitschaft und seine Ratschläge, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen Mitarbeitern des Institutes danke ich für die freundliche Aufnahme, ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft. Vor allem danke ich den Mitgliedern der Arbeitsgruppe: H. Cichorius, J. Engelmann, C. Keilhauer, W. Kronemeyer, K. Krumbach, S. Oberle, M. Vrlić, A. Wehrmann. Mein Dank gilt ebenfalls Dr. B. Eikmanns, Dr. K. L. Schimz, Dr. M. Pohl (Institut für Enzymtechnologie) und Dr. K. D. Aumann (GBF Braunschweig) für ihre freundliche Unterstützung.

Diese Arbeit wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Forschung und Technologie und der Degussa AG, Hanau finanziert.

Jül-2906

Mai 1994

ISSN 0944-2952