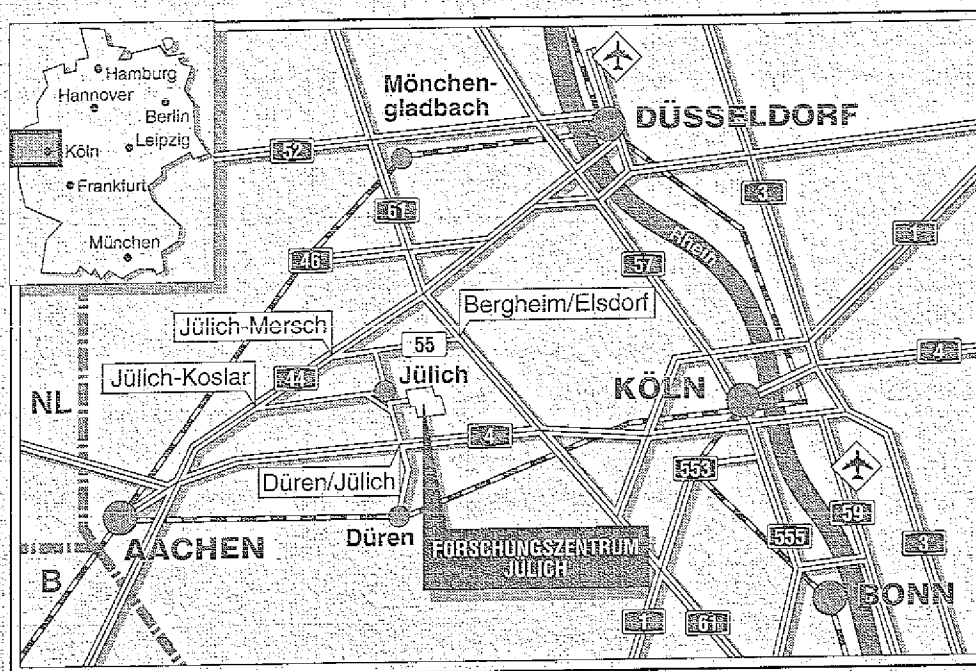


Institut für Biotechnologie

Corynebacterium glutamicum:
Untersuchungen zum Lysinexport und
Isolierung der Gene des Glutamatimports –
einem Bindeprotein-abhängigen
Transportsystem

Wolfgang Kronemeyer



Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 2954

ISSN 0944-2952

Institut für Biotechnologie Jül-2954

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

***Corynebacterium glutamicum* :**
Untersuchungen zum Lysinexport und
Isolierung der Gene des Glutamatimports –
einem Bindeprotein-abhängigen
Transportsystem

Wolfgang Kronemeyer

Handwritten text, likely a signature or name, appearing in the center of the page. The text is written in a cursive script and is somewhat faded.

Handwritten text, likely a signature or name, appearing in the center of the page. The text is written in a cursive script and is somewhat faded.

Handwritten text, likely a signature or name, appearing in the center of the page. The text is written in a cursive script and is somewhat faded.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	9
2.1. Bakterienstämme und Plasmide	9
2.2. Nährmedien und Kulturbedingungen	11
2.2.1. Nährmedien	11
2.2.2. Kultivierung der Bakterien	12
2.3. Bestimmung zellinterner und -externer Aminosäurekonzentrationen	13
2.3.1. Silikonölzentrifugation	13
2.3.2. <i>Reversed phase</i> HPLC	14
2.4. Messung der Glutamataufnahme	14
2.5. Bestimmung der Aspartatkinase-Aktivität	15
2.6. Genetische Techniken	17
2.6.1. DNA Techniken	17
2.6.2. Techniken zur Transformation von Zellen	18
2.6.3. Optimierte Methode zur Herstellung von Plasmidgenbanken in <i>C. glutamicum</i>	20
2.6.4. Herstellung von Phagenlysaten	21
2.7. Synthese, Reinigung und Markierung von Oligonukleotiden	21
2.8. Southern-Hybridisierung	22
2.9. DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse	24
3. Ergebnisse	27
3.1. Lysinexport	27
3.1.1. Untersuchung der Mutante 35/48 mit Defekt im Lysinexport	27
3.1.2. Isolierung restriktionsdefekter Mutanten von 35/48 mit Hilfe des Phagen CL31	29
3.1.3. Einführung einer Cosmidbank in 35/48res-a durch Konjugation und Komplementationsexperimente	31
3.1.3.1. Komplementationsexperimente mit einer pWK0-Plasmidgenbank	32
3.1.4. Konstruktion des restriktionsdefekten Lysinproduzenten II7/3	32
3.1.5. Methionineffekt auf die Lysinproduktion und Isolierung der Mutante NA8	34
3.1.5.1. Direkte Erstellung einer Plasmidgenbank in der Mutante NA8	36
3.2. Konstruktion von <i>low-copy</i> -Vektoren und Anwendung zur Expression eines auf <i>high-copy</i> -Vektoren instabilen Gens	37
3.2.1. Konstruktion des <i>low-copy</i> -Vektors pWK0	37
3.2.2. Konstruktion der <i>low-copy</i> -Vektoren pKW0 und pKW3	39

3.2.3. Anwendung von pWK0 zur Untersuchung der Überexpression der deregulierten Homoserindehydrogenase	42
3.3. Isolierung des Glutamataufnahmesystems	44
3.3.1. Bestimmung der Glutamataufnahme bei der Mutante M10	46
3.3.2. Komplementation von M10 mit Hilfe einer Plasmidgenbank im <i>low-copy</i> -Vektor pKW3	47
3.3.3. Eingrenzung des komplementierenden Fragments durch Hybridisierung mit einem synthetischen Oligonukleotid	48
3.3.4. Sequenzierung des komplementierenden DNA-Fragments	49
3.3.5. Homologievergleiche und Analysen der offenen Leseraster	55
3.3.5.1. Sequenzanalyse von <i>gluA</i> und dem abgeleiteten Protein	55
3.3.5.2. Sequenzanalyse von <i>gluB</i> und dem abgeleiteten Protein	58
3.3.5.3. Sequenzanalyse von <i>gluC</i> und dem abgeleiteten Protein	59
3.3.5.4. Sequenzanalyse von <i>gluD</i> und dem abgeleiteten Protein	59
3.3.6. Sequenzierung der den <i>glu</i> -Genen benachbarten DNA-Bereiche	60
3.3.7. Messung der Glutamataufnahme nach Überexpression des sequenzierten Bereiches im Wildtyp 13032	61

4. Diskussion

4.1. Lysinexport	65
4.2. Verwendung des <i>low-copy</i> -Vektors pWK0 zur Überexpression von <i>hom-1</i>	67
4.3. Glutamataufnahme	68

5. Zusammenfassung

6. Literaturverzeichnis

Abkürzungen:

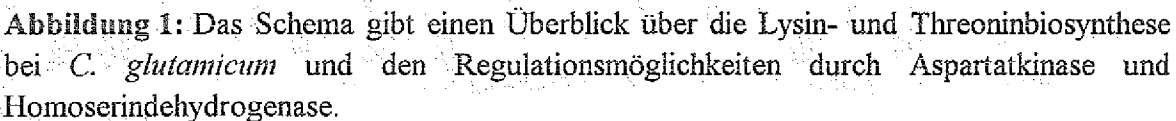
AEC	S-(β -Aminoethyl)-L-Cystein
AMPPD	3-(2'-Spiroadamantan)-4-Methoxy-4-(3"-Phosphoryloxy)-Phenyl-1,2-Dioxetan
Ap ^r	Ampicillinresistenz
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
C	Celsius
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E ₂₆₀	Extinktion bei 260 nm
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Gramm
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
kb	Kilobasen
K _M	Michaeliskonstante
Km ^r	Kanamycinresistenz
kV	Kilovolt
l	Liter
lacZ	Gen für die β -Galaktosidase
lacZ'	Genabschnitt für das α -Peptid der β -Galaktosidase
M	Molarität
mA	Milliampere
min	Minute
μ l	Mikroliter
mM	millimolar
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
N	Normalität
nmol	Nanomol
nm	Nanometer
NNG	N-Methyl-N-Nitro-N-Nitrosoguanidin
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	Offenes Leseraster
PEG	Polyethylenglycol
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumlaurylsulfat
Tc ^r	Tetracyclinresistenz
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TG	Trockengewicht
Tris	2-Amino-Hydroxymethylpropan-1,3-diol
U	Enzymeinheit, Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
W	Watt

1. Einleitung

Aminosäuren werden seit über 30 Jahren mikrobiell produziert, wobei im wesentlichen Stämme von *Corynebacterium glutamicum* verwendet werden, wozu nach neueren Untersuchungen auch *Brevibacterium lactofermentum* und *B. flavum* als Subspecies *lactofermentum* und *flavum* gezählt werden müssen (Liebl *et al.*, 1991). Glutamatproduzierende Corynebakterien wurden erstmals 1957 beschrieben (Kinoshita *et al.*). Seitdem werden *C. glutamicum*-Stämme, neben Glutamat mit einer weltweiten Jahresproduktion von zur Zeit ca. 400.000 Tonnen, vor allem für die Produktion von L-Lysin (ca. 180.000 t/Jahr) und in geringerem Umfang für die Gewinnung anderer Aminosäuren, z. B. L-Isoleucin eingesetzt (Kircher, persönliche Mitteilung). Die für Vertebraten essentiellen Aminosäuren, wie L-Lysin, L-Threonin und L-Tryptophan dienen im wesentlichen in der Tierhaltung als Futtermitteladditiv. Außerdem werden sie als pharmazeutische Grundstoffe für Infusionslösungen verwendet, während L-Glutamat hauptsächlich in der Lebensmittelindustrie als Geschmacksverstärker Anwendung findet. Während jedoch bereits der Wildtyp von *C. glutamicum* unter bestimmten Wachstumsbedingungen große Mengen Glutamat produziert, können die anderen Aminosäuren nur mit regulationsdefekten oder auxotrophen Mutanten gewonnen werden, die nach chemischer- oder UV-Mutagenese und Screening auf Resistenzen gegen Aminosäureanaloge bzw. Auxotrophien isoliert werden konnten (Kinoshita, 1985). Corynebakterien sind Gram-positive, unbewegliche Bakterien. Sie bilden keine Sporen, sind biotinauxotroph und verdanken ihren Namen dem meist keulenförmigem Aussehen (coryne = Keule). *C. glutamicum* besitzt ein Genom von 2550 Kb mit einem GC-Gehalt von 51-65 % (Martin, J. F., 1989).

Der Biosyntheseweg des L-Lysins aus L-Aspartat (Eggeling, 1994), ist in den letzten Jahren bei *C. glutamicum* eingehend untersucht worden (Abb. 1). Dabei ist die durch Lysin und Threonin gemeinsam inhibierte Aspartatkinase das einzige regulierte Enzym (Cremer *et al.*, 1988). Entsprechend führt allein eine *feedback*-resistente, nicht hemmbare Aspartatkinase zur Lysinbildung. Ansonsten hat lediglich eine Überexpression des Gens für die Diaminopimelatsynthase einen leichten stimulierenden Effekt auf die Lysinbildung bei Stämmen mit *feedback*-resistenter Aspartatkinase (Cremer *et al.*, 1991). Das Zwischenprodukt L-Aspartatsemialdehyd stellt einen Verzweigungspunkt dar, weil es das Substrat sowohl der Dihydrodipicolinsynthase für die L-Lysinbiosynthese, als auch das der Homoserindehydrogenase für die Threonin- und Methioninbiosynthese ist. Von L-Threonin ausgehend erfolgt in fünf weiteren Reaktionen die Synthese von L-Isoleucin. Neben der Besonderheit, im Gegensatz zu je drei Isoenzymen in *E. coli* (Cohen & Saint-Geront, 1987) und *Bacillus subtilis* (Zhang *et al.*, 1990) nur eine Aspartatkinase zu besitzen, ist ferner die Bildung von D,L-Diaminopimelat über zwei funktionelle Wege über die Diaminopimelatdehydrogenase und über succinylierte Intermediate ungewöhnlich (Schrumpf *et al.*, 1991). Das Verhältnis in dem beide Wege beschritten werden, ist abhängig von der Verfügbarkeit des Ammoniums, dem Kosubstrat der Dehydrogenase (Sonntag *et al.*, 1993). In *E. coli* erfolgt die Synthese ausschließlich über succinylierte Produkte (Berges *et al.*, 1986), in *B. sphaericus* über die Dehydrogenase (White, 1983) und in *B.*

Der relativ simplen Regulation der Lysinsynthese entsprechend konnte bei einer genauen Analyse des Lysin-Produktionsstamms MH20-22B von den Enzymen des Zentralstoff-



wechsels und der Lysinbiosynthese nur die *feedback*-resistente Aspartatkinase als in der Aktivität vom Wildtyp abweichend festgestellt werden (Schrumpf *et al.*, 1992). Daneben ist bekannt, daß Leucinauxotrophie vermutlich über eine Wachstumslimitation zu gesteigerter Lysinbildung führt (Pátek *et al.*, 1994). Ein weiteres Merkmal von MH20-22B ist jedoch die hohe Sekretionsrate mit 0,57 mmol Lysin/g TG pro Stunde im Vergleich zu 0,19 mmol/g TG pro Stunde bei dem Ausgangsstamm MH20 (Schrumpf *et al.*, 1992).

Transport von Aminosäuren bei *C. glutamicum*:

Die Lysinproduzenten MH20-22B und DG52-5 haben im Vergleich zu dem vom Wildtyp ausgehenden Stamm KK25, der durch Integration des Gens *lysC2(Fbr)* für die *feedback*-resistente Aspartatkinase aus MH20-22B zu einem Lysinausscheider transformiert worden war, eine fünf- bis sechsfach höhere maximale Sekretionsgeschwindigkeit. Außerdem wurden Unterschiede in der pH-Empfindlichkeit der Sekretion der einzelnen Stämme festgestellt (Bröer *et al.*, 1993). Offensichtlich wurde bei dem klassischen Screening der Produzentenstämme gleichzeitig auf eine effektivere Ausscheidung selektioniert, woraus auf eine Bedeutung des Transports bei der Lysinproduktion geschlossen werden kann (Krämer, 1994). Allgemein setzt sich in den letzten Jahren die Erkenntnis über die Bedeutung des Exports als eventuell limitierender Faktor bei der biotechnologischen Produktion durch (Konings *et al.*, 1992). Während jedoch die internen Synthesewege der mikrobiellen Produkte in der Vergangenheit intensiv erforscht wurden, ist der Transport über die Membran, insbesondere der Export, sehr vernachlässigt worden, obwohl bekannt ist, daß Bakterien eine große Anzahl von Metaboliten sekretieren können. So dienen Sekretionscarrier als Resistenzfaktor zur Entfernung toxischer Stoffe (Kaur & Rosen, 1992; Brown *et al.*, 1992), von Antibiotika (Ross *et al.*, 1990) und zur Ausschleusung von Stoffwechselendprodukten (Otto *et al.*, 1980; Gätje *et al.*, 1991). Auch sind eine Reihe von Antiportmechanismen bekannt, bei denen die Sekretion eines Stoffwechselendproduktes mit der Aufnahme des entsprechenden Ausgangssubstrates kombiniert ist, wobei Substrat und Produkt strukturell sehr ähnlich sind (Poolman, 1990). Diese dienen teilweise zur Erzeugung eines elektrochemischen Potentials und der Stabilisierung des cytoplasmatischen pH-Wertes, wie im Falle des Histidin/Histamin-Antiporters aus *Lactococcus buchneri* (Molenaar *et al.*, 1993). Dabei wird nach Decarboxylierung des Substrats Histidin intrazellulär ein Proton gebunden, wodurch das Cytoplasma alkalischer wird. Das exportierte Produkt ist weniger negativ geladen als das importierte Substrat, wodurch ein Ladungsgradient aufgebaut wird. Dasselbe Prinzip gilt beim Malat/Laktat-Antiport aus *L. lactis* (Poolman *et al.*, 1991) und beim Oxalat/Formiat Antiport aus *Oxalobacter formigenes* (Ruan *et al.*, 1992).

Für *C. glutamicum* ist aufgrund biochemischer Untersuchungen bekannt, daß es für verschiedene Aminosäuren spezifische Exportsysteme geben muß, der Export also nicht wie in früheren Arbeiten vermutet durch Umkehrung des entsprechenden Aufnahmesystems (Clement *et al.*, 1984) oder durch eine Porenbildung in der Membran (Luntz *et al.*, 1986) bewerkstelligt werden kann.

So konnte für die Lysinsekretion aus *C. glutamicum* ein Modell des Transportmechanismus erarbeitet werden, wonach die Aminosäure über einen sekundären Transportmechanismus in das Medium gelangt (Bröer & Krämer, 1991a). Dabei bindet ein positiv geladener Carrier an der cytoplasmatischen Seite das ebenfalls positiv geladene Lysin und zwei OH⁻-Ionen, wodurch die Nettoladung ausgeglichen und der energetisch ungünstige Transport eines Kations als Kotransport entgegen dem Ladungsgradienten ermöglicht wird (Bröer & Krämer, 1991b).

Die physiologische Bedeutung des Lysineexports ist vermutlich darin zu sehen, daß Lysin, ebenso wie Isoleucin, nur zur Proteinsynthese verwendet wird. Ein Abbau ist für *C. glutamicum* nicht bekannt, obwohl bei *B. ammoniagenes* die Synthese von Pimelinsäure aus Lysin zur Osmoregulation beschrieben worden ist (Gouesbet *et al.*, 1992). Der Export ist daher die einzige Möglichkeit, um hohe interne Konzentrationen dieser Aminosäuren abzubauen. Unterstützt wird diese These zum biologischen Zweck solcher Sekretionssysteme durch die Untersuchungen von Erdmann *et al.* (1993), wonach bei Wachstum auf Peptiden auch bei Wildtypzellen hohe intrazelluläre Konzentrationen an Lysin erreicht werden und Sekretion stattfindet. Metabolisierbare Aminosäuren wie Alanin werden abgebaut, während Lysin von der Zelle ausgeschieden werden muß.

Glutamat wird ebenfalls aktiv, in energieabhängiger Reaktion sekretiert (Hoischen & Krämer, 1989), was detailliert unter Biotinlimitierung untersucht worden ist (Gutmann *et al.*, 1992). Die Biotinlimitierung führt zu einem reduzierten Lipid/Proteinverhältnis, was als notwendiger Auslöser des Exports angesehen wird, jedoch nicht zu einer unspezifischen Permeabilisierung der Membran führt (Hoischen & Krämer, 1990). Bei der Glutamatsekretion wird ein *overflow*-Mechanismus diskutiert, d. h. daß trotz guter Kohlenstoff- und Stickstoffversorgung ein essentieller Metabolit im Mangel vorliegen muß, um zur Ausscheidung von Glutamat zu führen (Gutmann *et al.*, 1992).

Auch für L-Isoleucin konnte gezeigt werden, daß die Aminosäure bei *C. glutamicum* durch einen membranpotentialabhängigen Export ausgeschieden wird (Ebbighausen *et al.*, 1989a), obwohl sie auch durch Diffusion aus der Zelle austreten kann (Zittrich, 1992).

Bezüglich der Aufnahme von Aminosäuren konnte bei *C. glutamicum* gezeigt werden, daß die aktive Aufnahme von Valin, Leucin und Isoleucin voraussichtlich an den Symport von Na⁺-Ionen gekoppelt ist (Ebbighausen *et al.*, 1991). Die Lysinaufnahme erfolgt bei *C. glutamicum* durch einen Antiporter, der eine Nettoaufnahme von Lysin bei gleichzeitigem Export von Alanin, Isoleucin oder Valin erreichen kann (Bröer & Krämer, 1990). Das entsprechende Gen für das Transportsystem aus *C. glutamicum* (*lysI*), dessen Genprodukt Hydrophobizitätsuntersuchungen zufolge ein Membranprotein darstellt, konnte von Seep-Feldhaus *et al.* (1991) isoliert werden. Zellen mit deletiertem *lysI* sind resistent gegen das Lysinanalogon AEC und nehmen kein Lysin auf.

Glutamataufnahme bei *C. glutamicum*, ein Bindeprotein-abhängiges Transportsystem ?

Das Aufnahmesystem für Glutamat bei *C. glutamicum* hat eine sehr hohe Aktivität mit $15 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ bei Wachstum auf Glutamat (Krämer *et al.*, 1990a). Dagegen ist bei Wachstum auf Glukose als Kohlenstoffquelle die Aufnahmerate für Glutamat um den Faktor zehn auf $1,5 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ erniedrigt. Auch Wachstum auf Acetat reduziert die Glutamataufnahme ($3,8 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$). Das pH-Optimum des Transportsystems ist mit pH 9 sehr hoch, woraus geschlossen wurde, daß die deprotonierte Form des Glutamats transportiert wird. Ein Kotransport von H^+ , Na^+ und K^+ -Ionen konnte ausgeschlossen werden, obwohl die Zugabe von Kalium zu Zellen, die bei niedriger Kaliumkonzentration angezogen worden waren, die Glutamataufnahme stimulieren konnte. Der Kaliumeffekt wird jedoch auf eine Erhöhung des intrazellulären pH-Wertes zurückgeführt, wodurch wiederum die Glutamataufnahme gesteigert wird. Eine ähnliche Stimulation des Transports durch einen erhöhten intrazellulären pH-Wert als Folge von Kaliumzugabe wurde auch beim Glutamat/Glutamin-Aufnahmesystem aus *Streptococcus lactis* beobachtet (Poolman *et al.*, 1987). Auch in diesem Fall liegt kein Kotransport des Kaliums mit Glutamat/Glutamin vor. Ein zweiter Effekt des Kaliums bei der Glutamataufnahme bei *C. glutamicum* liegt darin begründet, daß ein cytosolischer Schwellenwert von 200 mM Kalium erreicht sein muß, damit effektiv Glutamat transportiert werden kann. Das System hat mit einem K_M -Wert von $0,5\text{-}1,3 \text{ }\mu\text{M}$ eine sehr hohe Substrataffinität und kann die Aminosäure um den Faktor 2×10^5 akkumulieren. Der Transport ist ATP-abhängig und bei cytosolischen ATP-Konzentrationen unter 1,5 mM nicht funktionell (Krämer & Lambert, 1990). Diese kinetischen Eigenschaften des Systems ließen die Annahme zu, daß es sich um ein Transportsystem handeln muß, das zu den Bindeprotein-abhängigen Aufnahmesystemen gehört. Hierbei handelt es sich um eine große Familie von Transportsystemen, deren Mitglieder für den Transport eines weiten Substratspektrums bekannt sind, wozu Saccharide, Aminosäuren, Oligopeptide, Vitamine und Phosphat gehören (Ames, 1986; Tam & Saier, 1993). Sie zeichnen sich durch eine hohe Substratspezifität und eine sehr starke Substrataffinität aus. Die K_M -Werte liegen zwischen $0,1 \text{ }\mu\text{M}$ für Aminosäuren (z. B. Histidin) und $1 \text{ }\mu\text{M}$ für Saccharide (z. B. Maltose). Außerdem können sie gegen sehr große Konzentrationsgradienten transportieren (z. B. 10^5 -fach bei Maltose). Bindeprotein-abhängige Transportsysteme werden durch ATP energetisiert, sind also "Primäre Transportsysteme". Damit grenzen sie sich von den "Sekundären Transportsystemen" ab, die vom Membranpotential oder chemischen Gradienten getrieben werden (Poolman & Konings, 1993). Dazu gehören die oben beschriebenen Aufnahmesysteme bei *C. glutamicum* für die verzweigtkettigen Aminosäuren und Lysin.

Bindeprotein-abhängige Transportsysteme sind ursprünglich von Gram-negativen Bakterien bekannt und bei diesen Organismen in der Regel aus vier Proteinen aufgebaut. Das namensgebende Bindeprotein befindet sich im Periplasma und dient der Substratbindung. Weiterhin sind zwei hydrophobe Proteine in der Cytoplasmamembran lokalisiert, mit denen das Bindeprotein interagiert. An der cytoplasmatischen Seite der Membran ist das vierte Protein zu finden, das vermutlich ebenfalls an die Membranproteine gekoppelt ist, selbst jedoch keine hydrophoben Sequenzen aufweist. Die Stöchiometrie des funktionellen Transportkomplexes besteht beispielsweise beim Maltosesystem aus *E. coli* aus einem

Bindeprotein (MalE), den beiden Membranproteinen (MalF, MalG) und einem Dimer des hydrophilen cytoplasmatischen Proteins (MalK), wie durch Rekonstitution der Komponenten in Proteoliposomen ermittelt werden konnte (Davidson & Nikaido, 1991). Dieser generelle Aufbau kann allerdings bei verschiedenen Vertretern dieser Familie abweichend sein (Ames, 1986; Higgins *et al.*, 1990). So enthält das Riboseaufnahmesystem aus *E. coli* statt des Dimers zweier cytoplasmatischer Proteine ein einziges Protein, das ungefähr die doppelte Größe anderer Proteine besitzt (Bell *et al.*, 1986). Das Oligopeptidaufnahmesystem aus *Salmonella typhimurium* enthält statt des Homodimers ein Heterodimer aus zwei verschiedenen Genprodukten. Außerdem besitzen die Maltosetransportsysteme aus *E. coli* und *S. typhimurium* jeweils ein zusätzliches Protein in der äußeren Membran, das LamB, das den Eintritt von Oligomeren der Maltose in den periplasmatischen Raum erlaubt (Smelcman & Hofnung, 1975).

Bindeprotein-abhängiger Transport bei Gram-positiven Bakterien

In den letzten Jahren sind die Gene einiger Bindeprotein-abhängiger Systeme aus Gram-positiven Organismen isoliert worden, die vom prinzipiellen Aufbau den Gram-negativen Systemen sehr ähnlich sind. Aus *Streptococcus pneumoniae* wurde ein Operon (*ami* locus) sequenziert, das sehr starke Ähnlichkeit zu dem Oligopeptidaufnahmesystem aus *E. coli* und *S. typhimurium* zeigt (Alloing *et al.*, 1990). Aus *Bacillus subtilis* wurden die Gene des Oligopeptidaufnahmesystems (Perego *et al.*, 1991) und des Dipeptidaufnahmesystems (Mathiopoulos *et al.*, 1991) isoliert. Ebenfalls ein Oligopeptidaufnahmesystem ist aus *Lactococcus lactis* bekannt (Tynkkynen *et al.*, 1993). Aus *B. stearothermophilus* kennt man das Glutaminaufnahmesystem (Wu & Welker, 1991) und aus *Mycoplasma* ein Operon mit signifikanter Ähnlichkeit zu ATP-bindenden Proteinen Gram-negativer Systeme (*hisP*, *malK*), allerdings konnte eine Funktion bislang nicht zugeordnet werden (Dudler *et al.*, 1988). Aus den Arbeiten zu dem vermutlichen Bindeprotein für Eisenhydroxamate aus *B. subtilis* (Schneider & Hantke, 1993) und zu MalX aus *Streptococcus pneumoniae*, das Ähnlichkeit zu dem Maltose-Bindeprotein aus *E. coli* aufweist (Gilson *et al.*, 1988), wird die Besonderheit bei Gram-positiven Bindeprotein-abhängigen Aufnahmesystemen deutlich. Das Bindeprotein kann nicht wie bei Gram-negativen Organismen frei beweglich sein, sondern ist über einen Lipidanker in der Cytoplasmamembran verankert (Abb. 2). Diese Struktur wird von den Signalsequenzen abgeleitet, die von Prolipoproteinen Gram-negativer Bakterien bekannte, typische Spaltstellen aus sechs Aminosäuren enthalten (Yamaguchi *et al.*, 1988). Sie werden dort von einer lipoproteinspezifischen Signalpeptidase II erkannt und anschließend am N-terminalen Cysteinrest modifiziert (Wu, 1987). Dabei wird nach Abspaltung der Signalsequenz der aminoterminalen Cysteinrest über eine Thioetherbindung mit einem Diacylglycerin in der Membran verankert. Die freie Aminogruppe kann eine Säureamidbindung mit einem weiteren Fettsäurerest eingehen, so daß das Protein letztlich über drei Acylgruppen in der Membran verankert sein kann. Der erste der sechs Reste ist meist Leucin oder Valin. Die Aminosäure vor der Spaltstelle ist stets ein Alanin oder Glycin. Die vierte Aminosäure ist Cystein, das nach der Spaltung das N-terminale Ende bildet. Das Vorhandensein einer negativen Ladung hinter der Spaltstelle entscheidet bei Gram-negativen Organismen über die Lokalisierung in der inneren oder äußeren Membran

(Yamaguchi *et al.*, 1988). Die anderen Aminosäuren sind mehr oder weniger variabel, tragen aber keine Ladungen. Dieser Mechanismus der Verankerung von Proteinen wird auch für Gram-positive Organismen vermutet (Nielsen und Lampen, 1982). Direkte Beweise dafür fehlen zwar noch, entsprechende Signalsequenzen lassen sich bei den bekannten Genen für Bindeproteine der Gram-positiven Systeme aber wiederfinden.

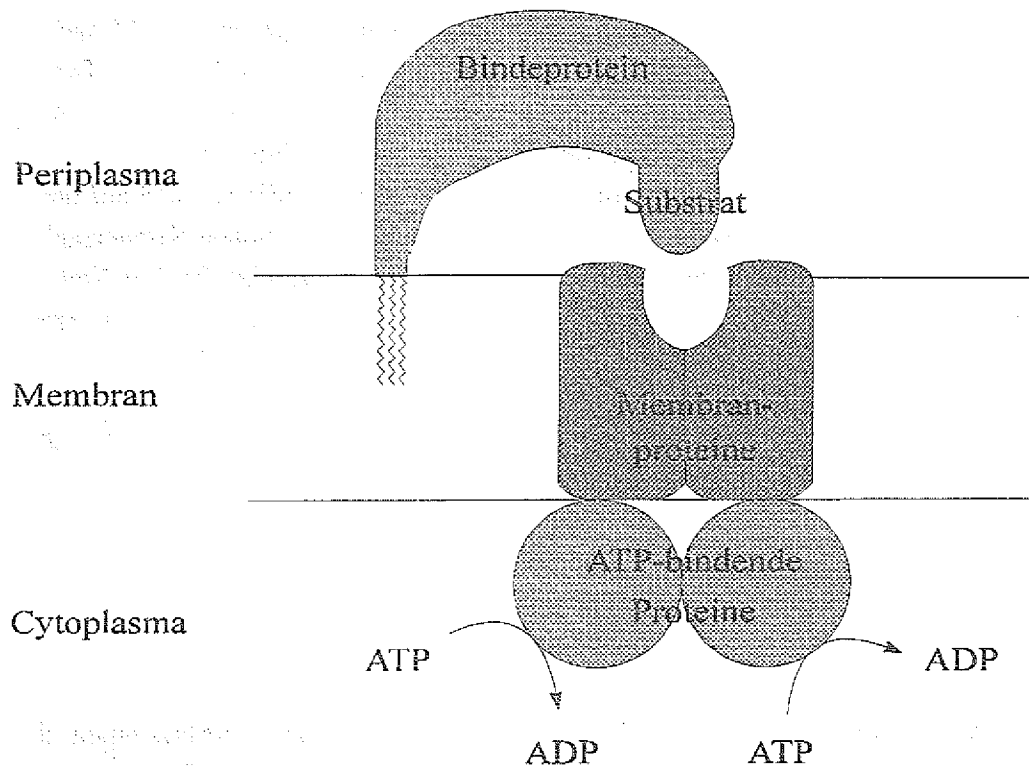


Abbildung 2: Bindeprotein-abhängige Transportsysteme bei Gram-positiven Bakterien. Das Bindeprotein ist über maximal drei Fettsäurereste in der Membran verankert. Die Membrankomponenten und die ATP-bindenden Enzyme liegen als Homo- oder Heterodimer vor. Dem Schema liegt die Annahme zugrunde, daß beide ATP-bindenden Proteine auch ATP spalten, was eine Stöchiometrie von zwei ATP pro transportiertem Substrat bedeuten würde.

Molekularbiologische Grundlagen für die Arbeit mit *C. glutamicum*:

Während bei der biochemischen Charakterisierung des Aminosäuretransports bei *C. glutamicum* große Fortschritte zu verzeichnen waren, ist die molekulare Ebene, mit Ausnahme des Gens *lysI* für das Lysinaufnahmesystem, völlig ungeklärt. Erst in den letzten Jahren konnten molekularbiologische Methoden für *C. glutamicum* wie Transformation durch Elektroporation (Liebl *et al.*, 1989; Haynes & Britz, 1990; Chan Kwo Chion *et al.*, 1991) und Konjugation (Schäfer *et al.*, 1990) etabliert werden. Verschiedene

Vektorsysteme wurden auf der Basis der kryptischen Plasmide pHM1519 (Miwa *et al.*, 1984) und pBL1 (Santamaria *et al.*, 1984) entwickelt. Diese Plasmide haben allerdings hohe Kopienzahlen in *C. glutamicum*. Ferner wurden Vektoren zur Integration in das Chromosom und Disruption von Genen entwickelt (Schwarzer & Pühler, 1991). Mit Hilfe dieser Techniken konnten in der Vergangenheit mehrere Gene aus *C. glutamicum* charakterisiert werden, allerdings wurde der größte Teil der Gene zur Biosynthese von Aminosäuren und zum Zentralstoffwechsel durch heterogene Komplementation von entsprechenden *E. coli*-Mutanten isoliert (Cremer *et al.*, 1990; Yeh *et al.*, 1988; Börmann *et al.*, 1992; Cordes *et al.*, 1992; Heery & Dunican, 1993; Follettie *et al.*, 1988; Patek *et al.*, 1994; Eikmanns *et al.*, 1989). Homologe Komplementation von *C. glutamicum*-Mutanten ist aufgrund der niedrigeren Transformationseffizienz mit weitaus größerem Aufwand verbunden und führte nur in wenigen Fällen zum Erfolg, z. B. zur Klonierung des Gens *aecD* für eine C-S Lyase, die AEC-Resistenz vermittelt (Rossol & Pühler, 1992). Auch die Gene *lysC α* und *lysC β* , die eine *feedback*-resistente Aspartatkinase kodieren, sind auf diese Weise kloniert worden (Thierbach *et al.*, 1990). Diese Gene hatten in hohen Kopienzahlen pro Zelle keine Wachstumsnachteile zur Folge, obwohl im Falle des *lysC2(Fbr)* aus MH20-22B Instabilität beobachtet wurde bei Klonierung in dem *high-copy*-Plasmid pJC1 (Cremer *et al.*, 1991). Von vielen für Membranproteine kodierenden Genen ist jedoch bekannt, daß hohe Kopienzahlen in der Zelle nicht toleriert werden und Klonierungen aus diesem Grund Probleme bereiten können (Martin, B. 1989; Henning *et al.*, 1979; Kronmeyer, 1990). Zur Klonierung von "kritischen" Genen eignen sich daher *low-copy*-Vektoren, die allerdings für *C. glutamicum* bislang nicht verfügbar waren.

Ziel der vorliegenden Arbeit:

Das Ziel der Arbeit war es, den molekularen Zugang zu den Transportsystemen des Lysinexports und der Glutamataufnahme bei *C. glutamicum* zu finden. Es sollten die Voraussetzungen für die Isolierung des Lysinexportsystems geschaffen werden. Dazu sollten geeignete Mutanten untersucht werden, die sich zur Klonierung des Gens bzw. der Gene des Exportsystems eignen. Mit diesen Mutanten sollten Experimente zur Isolierung des Gens bzw. der Gene durchgeführt werden. Bislang konnte noch kein solches Aminosäureexportsystem isoliert werden. Dazu mußten zunächst *low-copy*-Vektoren konstruiert werden, die die Isolierung von Genen erlauben, deren Kopienzahlen für die Zellen kritisch sind.

Ferner sollten die Gene für das Glutamataufnahmesystem isoliert werden, die den biochemischen Daten zufolge ein Bindeprotein-abhängiges System kodieren.

2. Material und Methoden

2.1. Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme von *E. coli* und der Gattung *C. glutamicum* sind in Tabelle 1, die Plasmide in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 1: *E. coli* und *C. glutamicum* Stämme und ihre Eigenschaften.

Stamm	Genotyp, Phänotyp	Referenz bzw. Herkunft
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 R127 DG52-5 35/48 MH20-22B M10 49/3	Wildtyp Restriktionsdefekt <i>lysC^{FBR}</i> , AEC-resistent, <i>feedback</i> -resistente Aspartatkinase, Lysinproduzent Defekt in der Lysinausscheidung <i>lysC^{FBR}</i> , <i>leuCD</i> , Lysinproduzent Defekt in der Glutamataufnahme <i>lysA</i> , lysinauxotroph	Abe <i>et al.</i> , 1967 Liebl <i>et al.</i> , 1989 Degussa AG, Hanau Stammsammlung IBT1 Schrumpf <i>et al.</i> , 1992 Stammsammlung IBT1 Stammsammlung IBT1
<i>C. lilium</i> ATCC 15990	Wildtyp	American Type Culture Collection
<i>E. coli</i> DH5 S17-1 JM109	<i>supE44</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> <i>res-</i> , Pro, RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7 <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , $\Delta(lac-proAB)$, F[<i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI^qZ</i> Δ M15]	Hanahan, 1985 Simon <i>et al.</i> , 1983 Yanish-Perron <i>et al.</i> , 1985

Zur Infektion der *Corynebacterium*-Stämme wurde der Bakteriophage CL31 verwendet (Trautwetter *et al.*, 1987).

Tabelle 2: Verwendete Plasmide mit ihren Eigenschaften und Markern.

Plasmid	Größe	Marker/Eigenschaft	Referenz
pNG2	14,4 kb	Plasmid aus <i>C. diphtheriae</i> , Em ^r , repliziert in <i>E. coli</i> und <i>C. glutamicum</i>	Serwold-Davis <i>et al.</i> , 1987, 1988
pEM1	3,3 kb	oriV _{E.c.} , oriT _{E.c.} , Km ^r , Klonierungs- und Konjugationsvektor	Schrumpf <i>et al.</i> , 1991
pWK0	6,0 kb	oriV _{E.c.} , oriT _{E.c.} , oriV _{C.g.} , Km ^r , Pendelvektor mit niedriger Kopienzahl in <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit
pUC4K	4,0 kb	Ap ^r , Km ^r , PlacZ, PlacZ', Klonierungsvektor	Vieira & Messing, 1982
pGA2	19,3 kb	niedrige Kopienzahl in <i>C. glutamicum</i>	Sonnen, 1991
pFBH2	9,5 kb	Subklon von pGA2 mit oriV _{C.g.} in pK18::mob, einem pUC-Derivat	Sonnen, 1991
pHY163PLK	2,5 kb	Tc ^r , ori _{E.c.}	Ishiwa & Shibahara, 1985
pOU71	5,8 kb	oriV _{E.c.} , Ap ^r , cI ⁸⁵⁷ , λP _R , λP _L , temperaturabhängige Kopienzahl	Larsen <i>et al.</i> , 1984
pKW3	9,4 kb	oriV _{E.c.} , oriV _{C.g.} , Km ^r , cos-site, cI ⁸⁵⁷ , λP _R , λP _L , Pendelvektor, Kopienzahl in <i>E. coli</i> temperaturabhängig, in <i>C. glutamicum</i> niedrig	diese Arbeit
pKW0	9,6 kb	ori _{E.c.} , ori _{C.g.} , Tc ^r , cos-site, cI ⁸⁵⁷ , λP _R , λP _L , Kopienzahl in <i>E. coli</i> temperaturabhängig, in <i>C. glutamicum</i> niedrig	diese Arbeit
pUC18/19	2,7 kb	Ap ^r , PlacZ, lacZ', Klonierungsvektor	Vieira & Messing, 1982
pEH0	10,8 kb	oriV _{E.c.} , oriT _{E.c.} , ori _{C.g.} , Km ^r , cos-site, Pendelvektor mit hohen Kopienzahlen in <i>E. coli</i> und <i>C. glutamicum</i>	Hofmann, 1990
pHSG576	3,6 kb	Cm ^r , ori _{E.c.} , PlacZ, lacZ', niedrige Kopienzahl, Sequenzierungsvektor	Takeshita <i>et al.</i> , 1987
pEK0	6,1 kb	ori _{C.g.} , oriV _{E.c.} , Km ^r , Pendelvektor	Eikmanns <i>et al.</i> , 1991b
pJC1	6,2 kb	ori _{C.g.} , oriV _{E.c.} , Km ^r , Pendelvektor	Cremer <i>et al.</i> , 1990
pKK6D	5,4 kb	lysC2(<i>Fbr</i>), mobilisierbar	unveröffentlicht

2.2. Nährmedien und Kulturbedingungen

2.2.1. Nährmedien

Nährmedien für *C. glutamicum*:

C. glutamicum-Stämme wurden für Vorkulturen und Plasmidpräparationen in dem Vollmedium CGIII (Eggeling *et al.*, 1987) angezogen.

Die Anzucht zur Herstellung von kompetenten Zellen für die Transformation durch Elektroporation erfolgte in 2 l Erlenmeyerkolben mit 500 ml LB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989), das die Wachstumsinhibitoren Isonicotinsäurehydrazid (4 g/l), Glycin (25 g/l) und Tween 80 (1 g/l) enthielt (Haynes & Britz, 1989). Die Regeneration der Zellen nach der Elektroporation erfolgte in BHIS-Medium (37 g/l brain heart infusion, 0,5 M Sorbitol). Anschließend wurden die transformierten Zellen auf LBHIS-Agarplatten ausplattiert, die aus LB-Medium (pH 7,5) mit 37 g/l brain heart infusion (Difco), 0,5 M Sorbitol und 15 g/l Bacto-Agar (Difco) bestanden (modifiziert nach Liebl *et al.*, 1989).

Zur Bestimmung interner Aminosäurekonzentrationen wurden die Minimalmedien CGC und CGXII verwendet. Dabei enthielten die Medien zur Induktion der Lysinbildung bei *C. glutamicum* 5 mM L-Methionin. Zur Isolierung von Mutanten und zu Komplementationstests wurden CGIX-Agarplatten mit 15 g/l Bacto-Agar eingesetzt (Tabelle 3). Kohlenstoffquellen waren Glukose (40 g/l), bzw. Na-Glutamat oder Glutamin (jeweils 10 g/l). Die Anzucht der Zellen für Glutamat-Aufnahmetests erfolgte in CGT-Medium (modifiziert nach Krämer *et al.*, 1990a).

Nährmedien für *E. coli*:

E. coli-Stämme wurden zur Stammhaltung, DNA-Isolierung, zur Herstellung kompetenter Zellen und nach Transformationen in LB-Medium kultiviert (Sambrook *et al.*, 1989), wobei LB-Agarplatten 15 g/l Bacto-Agar enthielten. Als Minimalmedium wurde M9-Medium mit 20 g/l Glukose verwendet (Tanaka *et al.*, 1967).

Antibiotika:

Zur Selektion auf die entsprechenden Resistenzmarker bei *C. glutamicum* wurden zu CGIII und Minimalmedien 25 mg/l Kanamycin bzw. 5 mg/l Tetracyclin zugegeben. LBHIS-Agarplatten dagegen enthielten 10 mg/l Kanamycin bzw. 2,5 mg/l Tetracyclin. Bei *E. coli* wurden die Antibiotika zu den Medien jeweils in folgenden Konzentrationen zugegeben: 50 mg/l Kanamycin, 15 mg/l Tetracyclin, 50 mg/l Ampicillin.

Tabelle 3: Verwendete Minimalmedien für *C. glutamicum*

Substanz	CGC	CGIX	CGXII	CGT
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5 g/l	5 g/l	20 g/l	10 g/l
Harnstoff	5 g/l	5 g/l	5 g/l	3 g/l
KH_2PO_4	0,5 g/l	1 g/l	1 g/l	2 g/l
K_2HPO_4	0,5 g/l	3 g/l	1 g/l	2 g/l
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,25 g/l	0,25 g/l	0,25 g/l	0,4 g/l
MOPS	-	-	42 g/l	-
CaCl_2	10 mg/l	10 mg/l	10 mg/l	-
NaCl	-	-	-	0,05 g/l
Hefeextrakt	-	-	-	1 g/l
$\text{FeSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	10 mg/l	10 mg/l	10 mg/l	10 mg/l
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	10 mg/l	10 mg/l	10 mg/l	10 mg/l
ZnSO_4	1 mg/l	1 mg/l	1 mg/l	1 mg/l
CuSO_4	0,2 mg/l	0,2 mg/l	0,2 mg/l	0,2 mg/l
NiCl_2	0,02 mg/l	0,02 mg/l	0,02 mg/l	0,02 mg/l
Biotin	0,2 mg/l	0,2 mg/l	0,2 mg/l	0,2 mg/l
Protokatechusäure	-	-	30 mg/l	-

2.2.2. Kultivierung der Bakterien

Zur Kultivierung von *C. glutamicum*-Stämmen wurden 100 ml CGIII-Medium in 500 ml Erlenmeyerkolben mit seitlichen Schikanen von einer Stammpalte angeimpft, die von einer Einzelkolonie ausgehend angelegt worden war. Nach Inkubation für 12-16 Stunden bei 30°C und 140 Upm (Labshaker, Modell Kühner, B. Braun, Melsungen) wurden die Vorkulturen in der Minifuge RF (Heraeus Christ GmbH, Osterode) geerntet, einmal mit gleichem Volumen steriler NaCl-Lösung (9 g/l) gewaschen und 60 ml Minimalmedium pro 500 ml-Erlenmeyerkolben mit Schikanen beimpt, so daß die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm 1 betrug. Die Kulturen wurden wie die Vorkulturen inkubiert und zu geeigneten Zeitpunkten Proben genommen, bzw. die Zellen für Transportmessungen geerntet.

Für Plasmidisolierungen aus *E. coli* wurden 5 ml LB-Medium im Reagenzglas (kleine Plasmidmengen) oder 100 ml LB-Medium in einem 500 ml-Erlenmeyerkolben mit Schikanen

(große Plasmidmengen) mit einer Einzelkolonie beimpft und 10 bis 15 Stunden bei 37°C und 140 Upm inkubiert. Bei Zellen mit temperatursensitiven Plasmiden erfolgte die Anzucht bei 30°C, zur Plasmidisolierung wurden die Zellen zur größeren Plasmidausbeute in der frühen exponentiellen Phase ($OD_{600} = 0,3$) bei 42°C weiter inkubiert und nach 2 Stunden geerntet.

Alle Stämme wurden auf Vollmedium-Agarplatten bei 4°C gehalten und monatlich auf frische Platten übertragen.

Plattentest zur Lysinausscheidung:

Die Lysinausscheidung bei *C. glutamicum* wurde durch Kreuzfütterung des lysinauxotrophen Indikatorstammes *C. glutamicum* 49/3 durchgeführt. Dazu wurden Lysin-Indikatorplatten durch Zugabe des Indikatorstamms nach Anzucht in Vollmedium und zweimaligem Waschen in NaCl-Lösung (9 g/l) mit einer Konzentration von 10^7 Zellen/ml in sterilisierten und auf 45°C abgekühlten CGIX-Agar hergestellt. Zur Induktion der Lysinbildung bei *C. glutamicum* enthielten die Platten 5 mM L-Methionin. Die Platten wurden mit dem zu testenden Stamm in Form eines kurzen Strichs beimpft. Nach 1-3 Tagen Inkubation bei 30°C waren bei Lysinproduzenten deutliche Wachstumshöfe des Stammes 49/3 zu erkennen.

Plattentest zum Wachstum auf Glutamat:

Das Wachstum auf Glutamat wurde getestet, indem die Teststämme auf CGIX-Agarplatten mit 10 g/l Glutamat als einzige C-Quelle ausgestrichen wurden. Zum Test auf Wachstum mit Glutamat als einzige N-Quelle wurden CGIX-Agarplatten mit 40 g/l Glukose und 10 g/l Glutamat, aber ohne Ammoniumsulfat und Harnstoff verwendet. Nach drei bis fünf Tagen Inkubation bei 30°C wurde das Wachstum der Stämme mit dem des Wildtyps verglichen. Die jeweiligen Kontrollplatten enthielten 10 g/l Glutamin anstelle des Glutamats.

2.3. Bestimmung zellinterner und -externer Aminosäurekonzentrationen

2.3.1. Silikonölzentrifugation

Die Quantifizierung intra- und extrazellulärer Aminosäurekonzentrationen erfordert eine schnelle Trennung der Zellen von dem umgebenden Medium, sowie eine sofortige Inaktivierung des Stoffwechsels, um Abbau bzw. Synthese von Metaboliten zu unterbinden. Zu diesem Zweck wurde die Methode der Silikonölzentrifugation angewendet (Klingenberg & Pfaff, 1967). Dazu wurden vor jeder Probennahme je 30 µl 20 %iger Perchlorsäure in fünf 400-µl-Mikrozentrifugenröhrchen (Beckman Instruments GmbH, München) gegeben und mit je 65 µl Silikonöl der Dichte $1,04 \text{ g/cm}^3$ überschichtet. Die Probenahme erfolgte durch Pipettieren von je 200 µl Zellsuspension auf die Röhrchen und sofortiger hochtouriger Zentrifugation für 60 Sekunden (Microfuge E, Beckman Instruments GmbH, München). Dabei wurden die Zellen

durch das Silikonöl hindurch in die Perchlorsäure zentrifugiert, wodurch die Zellen inaktiviert wurden. Das Kulturmedium blieb aufgrund der Dichteverhältnisse auf dem Silikonöl als dritte Phase. Dieser Überstand wurde abpipettiert, direkt nach geeigneten Verdünnungen analysiert oder bei -20°C aufbewahrt.

Die Bestimmung zellinterner Aminosäurekonzentrationen erforderte weitere Aufarbeitungsschritte des Zellpellets in der Perchlorsäurephase. Dazu wurden die Röhrchen in der Silikonölphase durchtrennt, und die Perchlorsäurephasen mit dem Zellpellets aus den Spitzen in 750-µl-Reaktionsgefäße zentrifugiert (Biofuge A, Heraeus Christ GmbH, Osterode). Darauf wurden die Pellets in den Reaktionsgefäßen resuspendiert und anschließend für zehn Minuten in Ultraschallbad behandelt. Zugabe von 25 µl einer 5 M KOH, 1 M Triethanolamin-Lösung führte zur Neutralisation des Homogenats. Ausgefallenes KClO_4 , Zelltrümmer und Silikonöl wurden nach zehnminütiger Inkubation auf Eis durch Zentrifugation für zehn Minuten bei 4°C abgetrennt (Kühlzentrifuge 202 MK, Sigma GmbH, Osterode), wobei die obere, wässrige Phase mit den löslichen Zellmetaboliten abpipettiert und bei -20°C gelagert wurde.

2.3.2. *Reversed phase HPLC*

Die Bestimmung der Aminosäurekonzentrationen erfolgte mittels einer Vorsäulenderivatisierung mit o-Phthaldialdehyd mit nachgeschalteter *reversed phase* HPLC (Lindroth & Mopper, 1979; Jones & Gilligan, 1983). Dazu wurde ein HPLC-Gerät vom Typ HP 1090 M mit Fluoreszenzdetektor HP 1046 A, Systemsteuergerät PC HP 85 B, (Laufwerk 9121) und zur Integration der Extinktionschromatogramme ein Integrator vom Typ HP 3392 A eingesetzt (Hewlett-Packard, Waldbronn).

Die Vorsäulenderivatisierung erfolgte durch automatische Zugabe von 17,5 µl des o-Phthaldialdehyd/2-Mercaptoethanol-Fertigreagens zu 2,5 µl der zu analysierenden Aminosäureprobe. Dabei werden fluoreszierende, thiosubstituierte Isoindole gebildet, die auf einer *reversed phase* Säule aufgetrennt werden können (Vorsäule: Lichrosorb RP-18, 5 µm, 30 mm x 3 mm; Hauptsäule: Lichrospher RP-18, 5 µm 150 mm x 3 mm; Merck, Darmstadt). Die derivatisierten Aminosäuren wurden mit einem Gradienten aus 0,1 M Natriumacetat, pH 7,2 und Methanol mit einer Durchflußrate von 0,5 ml/min bei einer Temperatur von 40°C eluiert. Die Detektion der eluierten Derivate erfolgte durch den Fluoreszenzdetektor bei einer Anregungswellenlänge von 230 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm. Alle Proben enthielten Ornithin als internen Standard. Zur Eichung wurden externe Standards verwendet.

2.4. Messung der Glutamataufnahme

Zur Bestimmung der Glutamataufnahme bei *C. glutamicum* wurden die Bakterien in CGT-Medium mit Glukose oder Na-Glutamat als C-Quelle in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Die Ernte und das anschließende zweimalige Waschen in Puffer (50 mM Mes/Tris pH

8; 50 mM NaCl; 10 mM KCl) erfolgte bei Raumtemperatur, worauf die Zelldichte im selben Puffer auf 1 mg Trockengewicht/ml (entspricht $OD_{600} = 3$) eingestellt wurde (Krämer *et al.*, 1990a). Für die Messungen wurden jeweils 2 ml Zellsuspension bei 25°C im Wasserbad unter Rühren für 3 Minuten vorinkubiert. Gestartet wurden die Aufnahmetests durch Zugabe von 10 µl einer 20 mM Na-Glutamatlösung (Endkonzentration = 100 µM), der ^{14}C -markiertes Glutamat (Amersham Buchler, Braunschweig) mit einer Aktivität von 3-30 Bq/nmol zugesetzt worden war (Stammlösung = 9,51 GBq/mmol). Für jeden Testansatz wurden zu 6 Zeitpunkten (15-300 Sekunden) jeweils 200 µl entnommen und über eine Mehrfachfilteranlage (VF1, Amicon) abfiltriert. Die Zellen wurden dabei auf einem Glasfaserfilter (Whatman GF/F) zurückgehalten und restliches Medium durch sofortiges zweimaliges Spülen mit je 2 ml Puffer entfernt. Darauf wurden die Filter getrocknet, mit Scintillationsflüssigkeit versehen und in einem Scintillationszähler ausgewertet.

2.5. Bestimmung der Aspartatkinase-Aktivität

Herstellung der Rohextrakte und Proteinbestimmung:

Die Zellen wurden nach Anzucht in 60 ml CGXII-Medium bis zur spätexponentiellen Phase durch eine zehnminütige Zentrifugation bei 5000 Upm bei 4°C in der Minifuge RF (Heraeus Christ GmbH, Osterode) geerntet, einmal mit 100 mM Tris/Cl, 50 mM $(NH_4)_2SO_4$, pH 7,5 gewaschen und anschließend in Aufschlußpuffer aufgenommen.

Aufschlußpuffer:	Triethanolamin x HCl	50	mM	
	$(NH_4)_2SO_4$	50	mM	
	Dithiothreitol	5	mM	
	EDTA	1	mM,	pH 8,0

Zum Aufschluß der Zellen wurde ein Ultraschall-Desintegrator des Typs Branson Sonifier W=250 verwendet. Dazu wurden die Zellen für zehn Minuten mit Ultraschallpulsen (duty-cycle = 20 %) bei einer Leistungsstufe von zwei beschallt. Die Zellsuspension wurde während des Aufschlusses in einem Eisbad gekühlt. Danach wurden durch eine dreißigminütige Zentrifugation bei 13000 Upm und 4°C in der Kühlzentrifuge 202 MK (Sigma GmbH, Osterode) die Zelltrümmer abgetrennt. Der klare Überstand wurde direkt als Rohextrakt in den Enzymtest eingesetzt. Die Proteinkonzentrationen in den Rohextrakten wurden nach Biuret bestimmt (Gornall *et al.*, 1949).

Bestimmung der Enzymaktivität:

Die Aspartatkinase katalysiert die Aktivierung von L-Aspartat zu Aspartylphosphat unter Hydrolyse von ATP. In dem hier verwendeten Enzymtest reagiert das entstehende Aspartylphosphat mit dem im Überschuß vorliegenden Hydroxylamin zu Aspartylhydroxamat, das mit Fe^{3+} -Ionen einen gelbbraunen, photometrisch bestimmbaren Farbkomplex bildet (Truffa-Bachi & Cohen, 1970).

Für den Test wurden folgende Lösungen benötigt:

Lösung A:	Hydroxylamin	1,4 M
	Tris	223 mM
	(NH ₄) ₂ SO ₄	969 mM
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	93 mM
Lösung B:	ATP in 5% NaHCO ₃	288 mM
Lösung C:	Na-L-Aspartat, pH 7,5	285 mM
Lösung D:	FeCl ₃	3,3 %
	Trichloressigsäure	5 %
	HCl	1,5 N
Lösung E:	Aspartylhydroxamat	20 mM
Lösung F:	L-Lysin	500 mM
	L-Threonin	500 mM

Neben dem Test der Enzymaktivität (Reaktionsansatz) wurde in einem parallelen Ansatz (Hemmungsansatz) der Einfluß der Effektoren Lysin und Threonin auf die Enzymaktivität ermittelt. Der Leerwert wurde ohne Zugabe des Substrats L-Aspartat gemessen. Die Ansätze wurden nach folgendem Schema pipettiert:

Lösung	Reaktionsansatz	Hemmungsansatz	Leerwert
Lösung A	400 µl	400 µl	400 µl
Lösung C	300 µl	300 µl	0 µl
Wasser	25 µl	0 ml	325 µl
Lösung F	0 µl	25 µl	0 µl
Rohextrakt (=1 mg)	125 µl	125 µl	125 µl
Lösung B	50 µl	50 µl	50 µl

Die Reaktion wurde nach dreißigminütiger Inkubation bei 30°C durch Zugabe von 600 µl Lösung D abgestoppt und derivatisiert. Nach zehnminütiger Zentrifugation der Proben bei 13000 Upm wurde die Extinktion der Überstände bei 546 nm bestimmt, wobei der Blindwert abgezogen wurde. Die Eichkurve wurde mit Hilfe definierter Konzentrationen Aspartylhydroxamat (0 bis 1 µmol/Testansatz) bestimmt, wozu entsprechende Volumina Lösung E und Wasser anstelle des Rohextraktes in dem Test eingesetzt wurden.

2.6. Genetische Techniken

2.6.1. DNA-Techniken

Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA:

Zur Präparation von DNA und für Restriktionsanalysen wurde die DNA in TAE-Agarosegelen (0,8 %) aufgetrennt (Sambrook *et al.*, 1989). Dazu standen Gelkammern der Firma Gibco/BRL (Modell H5, Modell H6) zur Verfügung.

Techniken zur DNA-Rekombination:

DNA-Techniken wie Restriktionen, DNA-Fällungen, Phenol-Extraktionen, Ligationen, Klenow-Reaktionen und Behandlungen mit alkalischer Phosphatase wurden nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

DNA-Isolierung:

Die Präparation von Plasmiden aus *E. coli* erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse (modifiziert nach Birnboim & Doly, 1979) aus 3 ml Übernachtskulturen. Im größeren Maßstab aus 100 ml LB-Medium wurde die DNA durch die zusätzlichen Schritte einer Isopropanol-Fällung, sowie einer Lithiumchlorid/Tris-HCl-Behandlung zur Abtrennung von chromosomaler DNA, RNA und Salzen aufgereinigt (Sambrook *et al.*, 1989).

Für Präparationen von Derivaten des *low-copy*-Plasmides pHSG576 zur Sequenzierung wurde der Plasmid Maxi-Kit (Diagen GmbH, Hilden) verwendet, wobei 100 - 200 ml Übernachtskultur (LB-Medium) nach Herstellerangaben mit Hilfe von Säulen aufgearbeitet wurden. Die DNA konnte bei dieser Methode im Vergleich zur Methode der alkalischen Lyse im größeren Maßstab nach Sambrook *et al.* (1989) in deutlich höherer Reinheit gewonnen werden.

Plasmidpräparationen aus *C. glutamicum* wurden analog zu der *E. coli*-Methode durchgeführt. Die Lyse der Zellen wurde jedoch durch eine verlängerte Lysozym-Behandlung (1-2 Stunden) bei 37°C und erhöhter Lysozymkonzentration (50 mg/ml) unter regelmäßigem, vorsichtigem Durchmischen der Suspensionen unterstützt. Chromosomale DNA aus *C. glutamicum* wurde nach einer modifizierten Methode nach Meade *et al.* (1982) isoliert, wobei 3 ml Übernachtskulturen, die in LB-Medium mit Glukose angezogen worden waren, aufgearbeitet wurden.

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen:

DNA-Fragmente wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung mit Hilfe des Qiaex-Kits (Diagen GmbH, Hilden) aus Agarosegelen isoliert. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

Isolierungen von größenfraktionierten *Sau3A*-Fragmenten (6-12 kb) für die Herstellung von Genbanken wurden aus Agarosegelen (*low-melting-point* Agarose) mittels EluTip-Säulen (Schleicher & Schuell GmbH, Dassel) vorgenommen.

Herstellung von Deletionsklonen mit Exonuklease III:

Mit Hilfe des Enzyms Exonuklease III konnten DNA-Fragmente schrittweise deletiert werden. (Henikoff, 1984), um geeignete Klone zur Sequenzierung zu erhalten. Dazu wurde das Erase-a-Base System (Promega, Madison USA) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet.

Herstellung einer Cosmidgenbank:

Zur Herstellung von Cosmidgenbanken wurde der DNA-packaging-Kit (Boehringer, Mannheim) verwendet, wobei durch die Verpackungsreaktion in Lambda-Phagen eine Größenselektionierung der Inserts stattfand. Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers gearbeitet. In allen Fällen wurden chromosomale *Sau3A*-Fragmente mit durch *Bam*HI linearisierten pEH0 ligiert.

NNG-Mutagenese von *C. glutamicum*:

Eine Übernachtskultur des zu mutagenisierenden Stammes in 5 ml CGIII-Medium wurde mit 250 µl einer NNG-Stammlösung (5 mg NNG/ml Dimethylformamid) versetzt und 20 bis 25 min bei 30°C unter Schütteln inkubiert (Adelberg, 1958). Nach Zentrifugation wurde das Zellpellet zweimal mit NaCl-Lösung (9 g/l) gewaschen, anschließend in CGIII-Medium ohne Glukose resuspendiert und nach Zugabe von 1,5 ml Glycerin bei -20°C gelagert. Es wurden nur Zellen verwendet, bei denen nach Mutagenese eine Absterberate von 80 - 90 % zu verzeichnen war, die durch Ausplattieren auf CGIII-Platten ermittelt wurde. Bei dieser Absterberate waren in früheren Experimenten die höchsten Auxotrophieraten erhalten worden (Eggeling, persönliche Mitteilung).

2.6.2. Techniken zur Transformation von Zellen

Transformation von *E. coli*:

E. coli-Zellen wurden nach einer Methode von Chung *et al.* (1989) transformiert, wobei die Zellen in der frühen exponentiellen Phase durch Zentrifugation bei 4°C geerntet und in einem einzigen Schritt durch eine zehnminütige Inkubation auf Eis in 1/10 des Ausgangsvolumens TSS-Puffer (LB-Medium pH 6,5 mit 100 g/l PEG6000, 5 % DMSO, 50 mM MgSO₄) kompetent gemacht wurden. Anschließend wurden 100 µl der Zellen vorsichtig mit der DNA (0,1 - 1 µg) gemischt, 30 min auf Eis inkubiert, mit TSS auf 1 ml aufgefüllt und nach 50-minütiger Regeneration bei 37°C auf LB-Platten mit Antibiotikum ausplattiert.

Optimierte Methode der Elektroporation von *C. glutamicum*:

Die Elektroporation ist als Transformationsmethode von Stämmen der Gattungen *Corynebacterium* und *Brevibacterium* mittlerweile etabliert, da sie gegenüber der Protoplastentransformation (Thierbach *et al.*, 1988) deutlich erhöhte Transformationseffizienzen und eine vereinfachte Handhabung aufweist (Wolf *et al.*, 1989; Liebl *et al.*, 1989; Bonnassie *et al.*, 1990; Kurusu *et al.*, 1990).

Nach Anzucht mit Wachstumsinhibitoren (Isonicotinsäurehydrazid, Glycin, Tween 80) wurden die Zellen bei OD₆₀₀ von 0,3 - 0,5 für 15 min auf Eis gekühlt und anschließend für 10 min bei 6000 Upm und 4°C in der Zentrifuge JE-21 M/E, Rotor JA10 (Beckman Instruments GmbH, München) geerntet. Danach wurden die Zellen einmal in 450 ml H₂O dest., sowie einmal in SP-Puffer (0,5 M Sorbitol; 0,7 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH 7,3) gewaschen, schließlich in 1 ml SP-Puffer aufgenommen, zu je 100 µl portioniert und nach Einfrieren in flüssigem N₂ bei -70°C gelagert (Chan Kwo Chion *et al.*, 1991).

Zur Elektroporation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, mit DNA vorsichtig gemischt und in eisgekühlte Küvetten (Typ 16 S 2086, Biorad, München) überführt. Es wurde der Biorad Gene Pulser (Biorad, München) verwendet mit der Einstellung von 200 Ohm Parallelwiderstand, 25 µF Kapazität und einer Spannung von 2,5 kV. Die Zeitkonstante lag unter diesen Bedingungen bei 4,0 bis 4,5 ms. Nach Beendigung des Pulses wurden die Zellen sofort in 1 ml BHIS-Medium überführt und zur Regeneration 60 min bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurden die Zellen auf LBHIS-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert.

Transkonjugation:

Die Methode der Konjugation diente dazu, Plasmide aus dem Donorstamm *E. coli* S17-1 (Simon *et al.*, 1983) in *C. glutamicum* Stämme als Rezipienten einzuführen (Schäfer *et al.*, 1990). Dazu wurden 20 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum mit 400 µl einer Übernachtskultur des Donorstamms mit dem entsprechenden Plasmid angeimpft, bei OD₆₀₀ = 1 geerntet und auf Eis gekühlt. Der Rezipient wurde in 100 ml LB-Medium bei 30°C über Nacht angezogen und 5 ml davon (OD₆₀₀ = 5) einem Hitzeschock für 9 Minuten bei 48,5°C unterzogen. Darauf wurden 1 ml Donor- und 3 ml Rezipientenzellen vereinigt, kurz zentrifugiert (5 min, 5000 Upm, RT in Minifuge RF, Heraeus Christ GmbH, Osterode) und in 1 ml LB-Medium resuspendiert. Zur Konjugation wurden sterile Membranfilter auf LB-Agarplatten gelegt und die Zellsuspension darauf pipettiert. Nach dem Eintrocknen wurden die Platten 20 Stunden bei 30°C inkubiert, worauf die Filter in Eppendorfgefäße gegeben und die Zellen durch Zugabe von 600 µl LB-Medium und anschließendem Mischen resuspendiert wurden. Schließlich wurden die Zellen auf CGIII-Platten mit entsprechendem Antibiotikum zur Selektion auf Transkonjuganden und Nalidixinsäure (50 µg/ml) zur Hemmung des Wachstums von *E. coli* S17-1 ausplattiert.

2.6.3. Optimierte Methode zur Herstellung von Plasmidgenbanken in *C. glutamicum*

Zur Erstellung von Genbanken in *C. glutamicum*-Zellen wurde die Methode der Elektroporation mit Ligationsansätzen optimiert. Dabei waren die Konzentration an Ligationsprodukt und die Reinheit der DNA, die zur Elektroporation eingesetzt wurde, von besonderer Bedeutung. Die besten Ergebnisse wurden mit folgendem Protokoll erzielt.

Zunächst wurde mit *Bam*HI linearisierter und durch CIP (calf intestinal alkaline Phosphatase) behandelter Vektor pKW3 durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und wie unter 2.6.1. beschrieben isoliert. Chromosomale Fragmente wurden hergestellt durch partiellen *Sau*3A-Verdau chromosomaler DNA des Wildtyps 13032, wozu folgender Ansatz zehnfach pipettiert wurde:

20	µg	chromosomale DNA
2	µl	Restriktionspuffer A (Boehringer, Mannheim)
0,9	U	<i>Sau</i> 3A
ad 20	µl	H ₂ O

Die Ansätze wurden bei 37°C inkubiert und nach 5-14 min in minütlichen Intervallen durch Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA pH 8 und anschließender Hitzeinaktivierung für 10 min bei 70°C abgestoppt. Dann wurden die Fragmente (6-12 kb) nach Agarose-Gelelektrophorese wie beschrieben isoliert.

Die Ligationsansätze wiesen folgende DNA-Mengen auf:

300-500	ng	Vektor
2	µg	Fragmente

Die DNA wurde zunächst nach Zugabe von 0,1 Volumina 4 M LiCl und 3 Volumina Ethanol für 60 min bei -20°C gefällt, dann 45 min bei 4°C und 13000 Upm pelletiert. Nach einmaligem Waschen mit 70 % Ethanol wurde die DNA getrocknet und in 12 µl sterilem H₂O bidest. aufgenommen. Darauf wurden 1,5 µl 10 x Ligase-Puffer und 1,5 µl T4-DNA-Ligase zugegeben und der Ansatz bei 14°C über Nacht inkubiert.

Aufreinigung des Ligationsansatzes für die Elektroporation:

Der Ligationsansatz mußte vor der Elektroporation aufgereinigt werden. Dazu wurde der Ansatz mit H₂O bidest. auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt und einer Behandlung bei 70°C für 10 min unterzogen, um die Ligase zu inaktivieren (Ymer, 1991). Nach einer Extraktion mit gleichem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wurden zu der DNA-Lösung 24 µl 7,5 M Ammoniumacetat (Endkonzentration = 1,45 M) und 400 µl Ethanol abs. (-20°C) pipettiert, die DNA dann 60 min bei -20°C gefällt und anschließend 50 min bei 4°C und 13000 Upm zentrifugiert (Zabarovsky & Winberg, 1990). Das Pellet wurde dann einmal mit 70 %

Ethanol gewaschen, erneut 15 min zentrifugiert und nach dem Trocknen unter Vakuum in 10 µl sterilem H₂O bidest resuspendiert. Jeweils 2 µl davon wurden für Elektroporationen eingesetzt.

2.6.4. Herstellung von Phagenlysaten

Zur Herstellung von Phagenlysaten wurden 5 ml LB-Medium mit Zellen eines *C. glutamicum* Stammes angeimpft und bis zur exponentiellen Wachstumsphase bei 30°C angezogen. Dann wurden 10 µl einer Phagenstammlösung zugegeben, über Nacht inkubiert und anschließend durch Zugabe von 5 Tropfen Chloroform die restlichen Zellen lysiert und die Phagen freigesetzt. Die Lysate wurden bei 4°C gelagert. Die Phagenstammlösung wurde nach der Standardmethode zur Phagenisolierung und -aufreinigung mit einer CsCl-Zentrifugation nach Sambrook *et al.* (1989) hergestellt.

2.7. Synthese, Reinigung und Markierung von Oligonukleotiden

Synthese der Oligonukleotide:

Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte mit dem computergesteuerten Gen-Assembler Plus (Pharmacia/LKB, Freiburg). Die Reaktion fand in mehreren Einzelschritten in dem organischen Lösungsmittel Acetonitril statt. Dabei war das erste Nukleotid über das 3'-Ende fest an dem Trägermaterial einer Säule verankert. Das 5'-Ende war mit einer Schutzgruppe (Dimethoxytrityl) versehen. Nach Abspaltung des Dimethoxytrityls und Entfernung der Schutzgruppe durch einen Waschschrift, konnte das freie 5'-Hydroxylende mit einem zweiten Nukleotid reagieren, das zuvor durch Anlagerung eines Tetrazolrestes an das freie 3'-Hydroxylende aktiviert worden war. Dabei entstand zunächst eine Phosphitdiester-Bindung, die mit Hilfe einer Jod-vermittelten Reaktion in eine Phosphatdiester-Bindung überführt wurde. Da auch das zweite Nukleotid eine Schutzgruppe am 5'-Ende trug, war das Resultat ein Dinukleotid mit einem Dimethoxytritylrest am 5'-Ende. Da die Reaktion nur zu 99 % stattfand, mußten die übrigen, nicht geschützten 5'-Enden durch eine Capping-Reaktion inaktiviert werden. Dieser Zyklus konnte je nach Länge des gewünschten Oligonukleotids wiederholt werden (Caruthers, 1985).

Reinigung der Oligonukleotide über NAPTM 10-Säulen:

Im Anschluß an die Synthese der Oligonukleotide mußte die Schutzgruppe am 5'-Ende durch eine Ammoniak-Behandlung entfernt und das Oligonukleotid von der Säule eluiert werden. Dazu wurde die Säule in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß mit Schraubdeckel gegeben und nach Zugabe von 1 ml 30 %iger Ammoniak-Lösung (-20°C) für 16 Stunden bei 50°C inkubiert. Nach anschließender Abkühlung auf 4°C wurde das Ammoniak durch Zentrifugation in einem neuen Eppendorfgefäß (1 min, 2000 Upm) entfernt. Das Eluat mit den Oligonukleotiden wurde nun auf eine mit H₂O equilibrierte NAPTM 10-Säule (Sephadex G-25) aufgetragen und mit 1,5 ml H₂O eluiert.

Die Konzentration des in H_2O gelösten Oligonukleotids nach der Aufreinigung wurde über die Extinktion bei 260 nm ($E_{260} = 1 = 33 \mu\text{g}$ einzelsträngige DNA) im Ultrospec Plus Spectrophotometer (Pharmacia/LKB, Freiburg) bestimmt.

Markierung der Oligonukleotide mit Digoxigenin:

Zur Markierung der Oligonukleotide wurde der Dig Oligonucleotide Tailing Kit (Boehringer, Mannheim) verwendet (Schmitz *et al.*, 1991). Dabei wurden Digoxigenin-markiertes dUTP und unmarkiertes dATP in einer matrizenunabhängigen Reaktion von der Terminalen Transferase an das 3'OH-Ende der Oligonukleotide angehängt. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

2.8. Southern-Hybridisierung

Die Methode der DNA:DNA-Hybridisierung wurde von Southern (1975) entwickelt, wobei mit Hilfe markierter DNA-Sonden DNA-Fragmente spezifisch nachgewiesen werden können.

DNA-Transfer durch Vakuum-Blotting:

Zunächst wurde die zu untersuchende DNA mit Restriktionsenzymen gespalten und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Für den Transfer der DNA auf Nylonmembranen Nytran N (Schleicher und Schuell, Dassel) wurde eine Vakuum-Blotkammer LKB 2016 VacuGene (Pharmacia/LKB, Freiburg) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Folgende Lösungen wurden benötigt:

A: Depurinierungslösung:	0,25	N	HCl
B: Denaturierungslösung:	1,5	M	NaCl
	0,5	M	NaOH
C: Neutralisierungslösung:	1	M	Tris-Cl, pH 5,0
	2	M	NaCl
D: 20 x SSC:	3	M	NaCl
	0,3	M	Tri-Natriumcitrat, pH 7,4

Das Verfahren beruht darauf, daß durch ein Vakuum von 50 mbar die DNA auf die Nylonmembran übertragen wird. Dazu wurde zunächst die Membran auf eine Trägerplatte gelegt und eine Plastikmaske mit Fenster darüber zentriert. Das Gel wurde auf der Maske plaziert, so daß die Membran und das Gel direkt aufeinanderlagen und die Ränder des Fensters luftdicht abgeschlossen waren. Nach Anlegen des Vakuums wurden nacheinander die Lösungen A bis C auf das Gel aufgetragen und nach 5-8 Minuten Einwirkzeit mit einer Pipette abgezogen. Der eigentliche Transfer der DNA erfolgte nach Überschichtung des Gels mit

Lösung D und 50-minütiger Transferzeit. Danach wurde die DNA auf der Membran mit Hilfe eines UV-Transilluminator (3 min, 366 nm) fixiert.

Hybridisierung:

Zu Beginn der Hybridisierung, die nach einem Protokoll der Firma Boehringer (Mannheim) erfolgte, wurde die Membran durch eine 6-8-stündige Inkubation mit einer Prähybridisierungslösung (5 x SSC, 1 % Blocking-Reagenz, 0,1 % Na-Lauroylsarkosin, 0,02 % SDS) bei 40°C inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Zur Hybridisierung wurde die Membran mit frischer Prähybridisierungslösung mit 10 pmol/ml DIG-markiertem Oligonukleotid in Folie eingeschweißt und für 12-16 Stunden bei 40°C unter leichtem Schütteln im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Membran bei der Hybridisierungstemperatur gewaschen, zweimal mit 2 x SSC, 0,1 % SDS und zweimal mit 0,1 x SSC, 0,1 % SDS für jeweils 15 Minuten und mit 100 ml/100 cm² Membran.

Detektion der Signale mit der Chemilumineszenzmethode:

Die Detektion der Signale erfolgt mit Hilfe der sensitiven Chemilumineszenzreaktion nach einer Vorschrift von Boehringer (Mannheim), woher auch das Substrat AMPPD bezogen wurde. Das Substrat wurde von der Alkalischen Phosphatase, das mittels eines Antikörperkonjugats an das Steroid-Hapten der markierten DNA-Sonde gebunden war, gespalten. Dabei wird Licht der Wellenlänge von 477 nm emittiert, das auf Röntgenfilmen (Kodak) zur Schwärzung führt.

Folgende Lösungen wurden dazu benötigt:

A: Maleinsäurepuffer: 0,1 M Maleinsäure
 0,15 M NaCl, pH 7,5

B: Waschpuffer: 0,3 % Tween 20 in Puffer A

C: Blockierungspuffer: 1 % Blockierungs-Reagens in Puffer A

D: Tris-Puffer: 0,05 M MgCl₂
 0,1 M NaCl
 0,1 M Tris-HCl, pH 9,5

Zunächst wurde die Membran nach der Hybridisierung kurz in Puffer B gewaschen und darauf 30 Minuten in Puffer C inkubiert (Schütteln bei RT). Anschließend wurde Anti-DIG-AP-Konjugat (polyklonale Anti-Digoxigenin-Fab-Fragmente aus Schaf mit konjugierter Alkalischer Phosphatase) in Puffer C verdünnt (75 mU/ml) und die Membran für 20 Minuten bei RT darin inkubiert. Nach erneutem Waschen und kurzem Äquilibrieren in Puffer D wurde die Membran 5 Minuten in Puffer D mit 20 ng/ml AMPPD zur Bindung des Substrats inkubiert, auf Filterpapier (Whatman 3MM) getrocknet und in Folie eingeschweißt. Die Exposition erfolgte bei 37°C für 1-4 Stunden.

2.9. DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse

Zur Sequenzierung wurde ein modifiziertes Verfahren der Didesoxynukleotid-Terminationsmethode nach Sanger *et al.* (1977) angewendet. Dabei wurden keine radioaktiv markierten Nukleotide, sondern Fluoreszein-markierte Primer eingesetzt. Die Detektion und automatische Auswertung der Signale erfolgte während der Elektrophorese mit dem A.L.F.-Sequencer (Automated Laser Fluoreszenz, Pharmacia, Freiburg) in Folge einer Anregung der Fluoreszenz mit Hilfe eines Laserstrahls und Aufzeichnung der Signale.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese:

Es wurden folgende Lösungen benötigt (alle Chemikalien Pharmacia, Freiburg):

10 x TBE:	121,14	mg	Tris-Base
	51,32	g	Borsäure
	3,72	g	Na-EDTA
	ad 1 l		H ₂ O

PAA (20 %):	(Acrylamid/Bis-Acrylamid 19:1)
100	g Acrylamid
5,26	g Bis-Acrylamid
	ad 526,3 ml H ₂ O

APS:	50	mg	Ammoniumpersulfat
	490	µl	H ₂ O

Thermoplatte, Ohrenplatte und Spacer wurde je dreimal mit 10 % SDS und mit Ethanol absol. gereinigt. Anschließend wurden die oberen Ränder der beiden Glasplatten mit Bind-Silan-Lösung eingerieben (0,4 ml Bind-Silan-Verdünnung (7 µl Bind-Silan Stammlösung in 2 ml Ethanol), 0,1 ml 10 % Essigsäure). Spacer, Ohrenplatte und Thermoplatte wurden nach dem Zusammensetzen mit Schraubklammern fixiert.

Die Gelmatrix (24 ml PAA; 4,8 ml 10 x TBE; 33,6 g Harnstoff; 0,5 g Serdolith; ad 80 ml H₂O) wurde zunächst filtriert und 15 min entlüftet (Wasserstrahlpumpe). Durch Zugabe von 280 µl APS und 70 µl TEMED wurde die Polymerisationsreaktion gestartet und die Lösung vorsichtig mit einer Spritze zwischen die Platten gegeben. Dann wurde der Kamm eingesetzt und mit zwei Klemmen befestigt. Die vollständige Polymerisation des Gels dauerte 2 Stunden.

Sequenzierungs-Reaktion:

Verwendet wurde der AutoReadTM Sequencing Kit (Pharmacia, Freiburg). Die Reaktion erfolgte modifiziert nach dem Fast Protocol des Herstellers.

Denaturierung:

8	µl	DNA in H ₂ O (6 µg)
2	µl	Fluoreszenz-Primer
1	µl	1 N NaOH

mischen, 10 min bei 80°C

Annealing des Primers: Zugabe von:

1	µl	1 N HCl
2	µl	Annealing Buffer
3	µl	DMSO

mischen, 15 min bei 37°C inkubieren

Zwischenzeitlich wurden in eine Mikrotiterplatte je 2,5 µl Nukleotidmix pipettiert (auf Eis) und vor der Reaktion 3 min bei 37°C vorgewärmt.

Polymerisations-Reaktion: Zugabe von:

1	µl	Extension Buffer
2	µl	T7-Polymerase (1,5 U/µl)

mischen, je 4,5 µl in die Nukleotidmische geben, nach 5 min durch Zugabe von 5 µl Stop-Solution abstoppen und auf Eis lagern.

Kurz vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben 10 min bei 80°C denaturiert und anschließend auf Eis gesetzt.

Der A.L.F.-Sequencer wurde zur Elektrophorese wie folgt eingestellt:

38	mA	Stromdurchlauf
1,5	kV	Spannung
34	W	Leistung
50	°C	Temperatur
3	W	Leistung des Lasers
380	min	Gesamtlaufzeit

Die Signaldetektion erfolgte alle 2 Sekunden.

Computer-gestützte Sequenzanalyse:

Die Auswertung der Daten aus den DNA-Sequenzierungen und die Identifizierung der offenen Leseraster wurden mit dem Programmpaket PCGENE (IntelliGenetics) vorgenommen. Dabei erfolgte die Voraussage der membranüberspannenden Helices mit den Programmen SOAP (Klein *et al.*, 1985) und RAOARGOS (Rao & Argos, 1986), die der membranassoziierten Segmente mit dem Programm HELIXMEM (Eisenberg *et al.*, 1984). Für weitere Untersuchungen wurden die Programme der HUSAR-Pakete 2.1 bzw. 3.0 angewendet. Die Programme BLASTX, BLASTP nach der Methode von Lipman & Pearson (1985) und CLUSTAL (Higgins & Sharp, 1988) dienen zu Homologievergleichsanalysen und Datenbankrecherchen. Hydrophobizitätsuntersuchungen erfolgten im Programm PEPTIDESTRUCTURE nach der Methode von Kyte & Doolittle (1982), die mit dem Programm PEPLOT ausgedruckt wurden. Die Vorhersage der Signalsequenz wurde mit SIGNALSEQ getroffen.

3. Ergebnisse

3.1. Lysinexport

3.1.1. Untersuchung der Mutante 35/48 mit Defekt im Lysinexport

Das Ziel der Experimente war die Isolierung des Gens bzw. der Gene des Lysinexportsystems aus *C. glutamicum*. Bislang ist jedoch weder ein prokaryontisches noch ein eukaryontisches Aminosäureexportsystem bekannt, das als Beispiel für diese Arbeiten dienen könnte. Daher mußte zunächst nach Entwicklung eines geeigneten Plattentests zum Nachweis der Lysinausscheidung eine Mutante gefunden werden, die für eine Komplementation mit einer Genbank herangezogen werden konnte. Als Ausgangspunkt hierzu stand eine Mutante zur Verfügung, die auf Lysin-Indikatorplatten keinen Wachstumshof aufwies (Hofmann, 1990), was auf einen Defekt im Lysinexport oder der Lysinbiosynthese hindeutete. Diese Mutante wurde nach NNG-Mutagenese des Lysin-Produktionsstamms DG52-5 isoliert und zeigte auf Voll- und Minimalmedium im Vergleich zum Ausgangsstamm normales Wachstum.

Bei dieser Mutante 35/48 wurden zunächst die intra- und extrazellulären Lysinkonzentrationen bestimmt (Tab. 4), um den Ort der Mutation näher eingrenzen zu können. Dabei zeigte der Stamm deutlich erhöhte intrazelluläre Lysinkonzentrationen, so daß ein Defekt der Lysinbiosynthese ausgeschlossen werden konnte. Im Medium dagegen waren nur geringfügige Mengen an Lysin festzustellen, d. h. die Mutation mußte diesen Ergebnissen zufolge den Lysinexport betreffen. In Abbildung 3 sind Wachstumskurven der Stämme DG52-5 und 35/48 mit parallelen intra- und extrazellulären Lysinmessungen aufgenommen, um Veränderungen im Verlauf einer Kultur zu dokumentieren. Dabei wird ersichtlich, daß die Mutante 35/48 über einen langen Zeitraum des Wachstums intrazellulär Lysin bis auf Werte von 200 mM akkumulierte, während die Lysinkonzentrationen im Überstand an der Nachweisgrenze lagen.

Tabelle 4: Vergleich der zellinternen und -externen Lysinkonzentrationen im Wildtyp 13032, dem Lysin-Produktionsstamm DG52-5 und der davon abgeleiteten Mutante 35/48 mit Defekt in der Lysinausscheidung.

Stamm	intrazelluläre Lysin- konzentration (mM)	Lysinkonzentration im Kulturmedium (mM)
WT 13032	10	< 0,05
DG52-5	40 - 50	15 - 20
35/48	bis 200	< 0,05

Bild A:

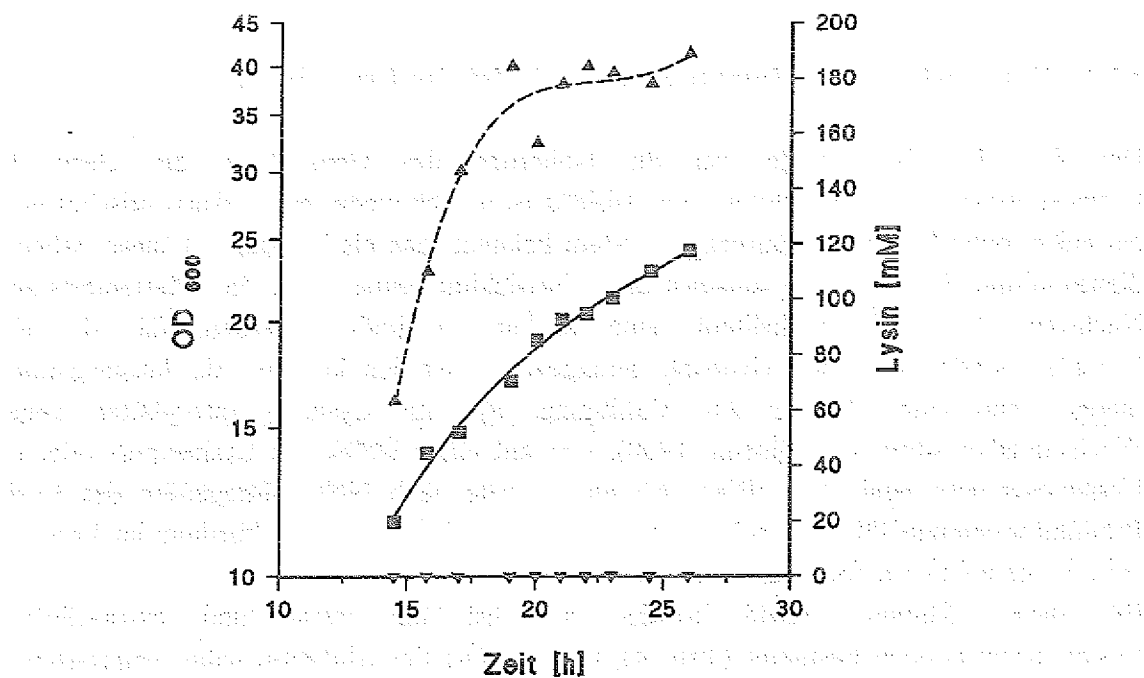


Bild B:

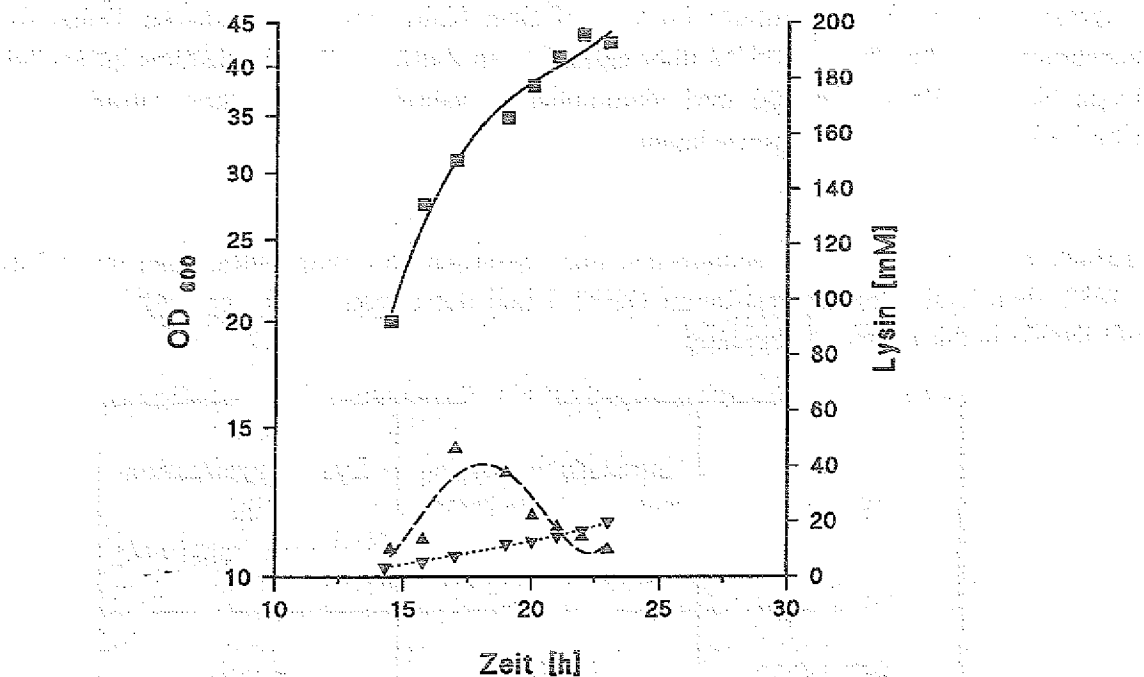


Abbildung 3: Zeitlicher Verlauf der zellinternen (▲) und -externen (▼) Lysinkonzentrationen, sowie der optischen Dichte (■) der Stämme DG52-5 und 35/48 in Abhängigkeit der Inkubationszeit. Bild A zeigt den Stamm 35/48 mit defekter Lysinausscheidung und Bild B den Lysinproduzenten DG52-5.

Im Gegensatz zu 35/48 konnten bei DG52-5 nur kurzzeitig hohe intrazelluläre Lysinkonzentrationen bis zu 45 mM gemessen werden, wobei die Konzentration im Medium kontinuierlich anstieg. Weiterhin wurden die intrazellulären Konzentrationen der Aminosäuren Aspartat, Glutamat, Threonin und Alanin erfaßt, um eventuelle Nebeneffekte der Mutation im Stamm 35/48 festzustellen, wie z. B. einen Rückstau von Metaboliten der Lysinbiosynthese oder Auswirkungen auf den von der Lysinbiosynthese abzweigenden Threoninweg (Tab. 5).

Tabelle 5: Vergleich der zellinternen Konzentrationen an Aspartat, Glutamat, Threonin und Alanin des Lysinproduktionsstamms DG52-5 und der Mutante 35/48 mit defekter Lysinausscheidung.

Stamm	interne Aminosäurekonzentrationen (mM)			
	Aspartat	Glutamat	Threonin	Alanin
35/48	20-45	bis 200	bis 43	bis 62
DG52-5	bis 21	bis 200	bis 28	bis 38

Es wurden bei 35/48 im Vergleich zu DG52-5 deutlich erhöhte Aspartatkonzentrationen gemessen, dem Ausgangssubstrat der Lysin- und Threoninbiosynthese. Außerdem wurden erhöhte Threonin- und Alanin-Werte festgestellt. Alanin entsteht durch Transaminierung von Pyruvat, das als Kosubstrat der Dihydrodipicolinatsynthese zur Bildung von L-2,3-Dihydrodipicolinat dient, einem Zwischenprodukt der Lysinbiosynthese. Die Glutamatkonzentrationen dagegen waren nahezu unverändert.

3.1.2. Isolierung restriktionsdefekter Mutanten von 35/48 mit Hilfe des Phagen CL31

Die Mutante 35/48 hatte den gewünschten Phänotyp mit Defekt im Lysinexport. Allerdings konnte mit diesem Stamm das Gen bzw. die Gene des Exportsystems durch Komplementation nicht isoliert werden, da der Stamm nur mit sehr geringer Effizienz zu transformieren war und eine Genbank mittels Transkonjugation oder Elektroporation nicht in 35/48 erstellt werden konnte. Zudem zeigten reisolierte Plasmide häufig veränderte Restriktionsmuster, die von großen Deletionen herrührten. Um dennoch das Ziel der Komplementation zu erreichen, mußte daher von 35/48 ausgehend eine Mutante isoliert werden, die einen Defekt im Restriktionssystem trägt und mit höherer Ausbeute zu

transformieren ist. Dieser Stamm sollte dann mit einer Genbank transformiert und anschließend im Plattentest auf Lysinexport getestet werden.

Zur Isolierung der beiden restriktionsdefekten Mutanten 35/48res-a und 35/48res-j wurde der Stamm 35/48 durch eine Behandlung mit NNG mutagenisiert und auf Sensitivität gegen den virulenten Bakteriophagen CL31 selektioniert. Der Phage CL31 hat als natürlichen Wirtstamm *C. lilium* (Yeh *et al.*, 1985), bildet allerdings auch auf einzelnen Stämmen von *C. glutamicum*, *Brevibacterium lactofermentum* und *Arthrobacter sp.* Plaques, jedoch mit weit geringerer Effizienz (Plauebildungseffizienz liegt bei 10^{-8} bis 10^{-6}) (Trautwetter *et al.*, 1987). Dieses Ergebnis wird auf differenzierte Restriktions- und Modifikationssysteme der Stämme zurückgeführt. Von einem *B. lactofermentum*-Stamm konnten Mutanten erhalten werden, die sensativer gegen den Phagen waren als der Ausgangsstamm (Plauebildungseffizienz lag um Faktor 10^3 höher), was auf ein defektes Restriktionssystem hindeutete (Bonnassie *et al.*, 1990b). Auch konnten diese Mutanten mit aus *E. coli* isolierten Plasmiden transformiert werden. Diese Methode der Selektion auf erhöhte Phagensensitivität zur Erkennung eines restriktionssensitiven Phänotyps sollte auch auf die Mutante 35/48 angewendet werden.

Zu diesem Zweck wurde der Stamm 35/48 einer NNG-Mutagenese unterzogen und anschließend 2070 Einzelkolonien durch Kreuzausstrich gegen ein Lysat des Phagen CL31 aus *C. lilium* auf Lyse getestet. Dabei konnten zwei Stämme (35/48res-a und 35/48res-j) identifiziert werden, die eindeutig sensitiv gegen den Phagen waren und kein Wachstum in Gegenwart des Phagen zeigten. Diese beiden Stämme schienen folglich nach den Ergebnissen mit dem Hilfsmittel des Phagen restriktionsdefekt zu sein. Zum Test auf eine tatsächlich erhöhte Transformationseffizienz und eine herabgesetzte Restriktionsaktivität wurden die Stämme daraufhin mit dem aus *E. coli* DH5 isolierten Plasmid pEH0 transformiert. Die Ergebnisse des Experiments sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Vergleich der Transformationsfrequenz des Stammes 35/48 mit defekter Lysinausscheidung mit den phagensensitiven Mutanten 35/48res-a und 35/48res-j. Der Stamm R127 mit hoher Transformationseffizienz ist als zusätzlicher Kontrollstamm aufgenommen. Die Transformationen wurden mit dem Vektor pEH0 aus *E. coli* DH5 durchgeführt.

Stamm	Transformanden/ μ g DNA
35/48res-a	10^4
35/48res-j	10^4
35/48	<5
R127	10^6

Die beiden Mutanten zeigten im Vergleich zum Ausgangsstamm stark erhöhte Transformationsraten, und bei reisolierten Plasmiden konnten Veränderungen im Restriktionsmuster nicht gefunden werden. Beide Stämme sind offensichtlich restriktionsdefekt und mit höherer Effizienz transformierbar. Die restriktionsdefekte Mutante R127 ist als Vergleichsstamm in die Tabelle aufgenommen.

Neben der erhöhten Transformationsrate mußten die Eigenschaften der intrazellulären Lysinbildung und des defekten Lysinexports überprüft werden, die gegenüber 35/48 unverändert sein sollten. Dabei ergaben die Bestimmungen der internen Lysinkonzentrationen bis zu 250 mM Lysin in beiden Stämmen, ein Wert, der gegenüber 35/48 sogar geringfügig erhöht war. Im Medium jedoch waren die Werte im Vergleich zum Ausgangsstamm identisch ($< 0,05$ mM), so daß die Mutationen im Lysinexport, sowie die Lysinbiosynthese als unverändert anzusehen waren. Aufgrund des identischen Verhaltens beider Mutanten wurde für weitere Arbeiten nur ein Stamm, 35/48res-a, verwendet.

3.1.3. Einführung einer Cosmidbank in 35/48res-a durch Konjugation und Komplementationsexperimente

Zur Komplementation der Mutante 35/48res-a wurde eine in *E. coli* DH5 mit dem Vektor pEH0 erstellte *Sau3A*-Cosmidbank chromosomaler DNA aus *C. glutamicum* DG52-5 mittels Transkonjugation in die Mutante eingeführt. Zunächst wurde der Donorstamm *E. coli* S17-1 mit 140 einzelnen Cosmiden (durchschnittliche Insertgröße von 35 kb) transformiert, die nach der Berechnungsformel von Clarke & Carbon (1976) bei einer Genomgröße von 2550 kb (Martin, J. F., 1989) das Genom mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,99 abdecken. Darauf folgte die separate Transkonjugation zwischen den S17-1-Transformanten als Donor und 35/48res-a als Rezipienten. Mit den 140 Cosmiden waren in 137 Fällen Transkonjuganten des Stammes 35/48res-a zu erhalten, mit drei Cosmiden dagegen konnten auch nach mehrfachen Wiederholungsexperimenten keine Transkonjuganten isoliert werden. Zur Kontrolle der 137 Transkonjuganten wurden die Cosmide aus dem Rezipienten (aus jeweils fünf Transkonjuganten pro Cosmid) präpariert und das Restriktionsmuster überprüft. Dabei waren in 95 Fällen Cosmide mit unveränderter Größe und Restriktionsmuster festzustellen, 42 Cosmide dagegen wiesen deutliche Deletionen auf. Auch hierbei führten Wiederholungsexperimente zu identischen Ergebnissen. Außerdem waren die Transkonjugantenzahlen mit den 42 veränderten Cosmiden im Vergleich zu den 95 intakt reisolierten Cosmiden bis zu dem Faktor 10^2 herabgesetzt. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß eine große Anzahl der Cosmide DNA-Abschnitte enthielt, deren Präsenz offensichtlich nicht von der Zelle toleriert wurde. Als Grund hierfür müssen die nachteiligen Auswirkungen der Überexpression bestimmter Gene auf *high copy*-Vektoren wie pEH0 angesehen werden. Es ist bekannt, daß vor allem die Überexpression von Genen, die Membranproteine, bzw. membranassoziierte Proteine kodieren, zur Wachstumshemmung führt (Henning *et al.*, 1979; Martin, B., *et al.*, 1989; Kronmeyer, 1990).

Insgesamt konnten 68 % der Cosmide intakt aus den Rezipienten reisoliert werden, was bedeutet, daß ein bestimmtes Gen mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,73 repräsentiert sein

sollte (Clarke & Carbon, 1976). Eine Komplementation von 35/48res-a, d. h. wiederhergestellte Lysinausscheidung auf Lysin-Indikatorplatten, konnte mit den 95 Transkonjuganden von 35/48res-a mit intakten Cosmiden nicht erzielt werden.

Die Schlußfolgerung aus diesen Experimenten mußte somit sein, daß die Klonierung des gesuchten DNA-Abschnitts, der das Lysinexportsystem kodiert, nur mit einem *low-copy*-Vektor zu erreichen sein würde.

3.1.3.1. Komplementationsexperimente mit einer Plasmidgenbank in pWK0

Da im Verlauf der Arbeit ein *low-copy*-Replikon aus *C. diphtheriae* verfügbar wurde (Serwold-Davis, T. M., University of Washington, USA), konnte der Pendelvektor pWK0 mit niedriger Kopienzahl in *C. glutamicum* verwendet werden, dessen Konstruktion unter 3.2.1. beschrieben ist. Mit diesem Plasmid wurde nach *Bam*HI-Restriktion mit anschließender Behandlung mit alkalischer Phosphatase (CIP) und chromosomalen Fragmenten (4-5 kb) des Lysin-Produktionsstammes DG52-5 eine Genbank mit 7000 Klonen in *E. coli* DH5 erstellt, die das Genom mit einer Wahrscheinlichkeit von > 0,99 abdeckt. Nach Vereinzelung der Klone zu je 100 Kolonien/LB-Platte wurden die Zellen mit je 3 ml LB-Medium abgeschwemmt, vereinigt und die Plasmide isoliert. Nach Transformation von 35/48res-a mit dem Plasmidgemisch wurden 30.000 Einzelkolonien auf Komplementation getestet, d. h. auf Lysinausscheidung auf Lysin-Indikatorplatten. Es konnten keine komplementierenden Klone erhalten werden. Dies könnte darauf zurückgeführt werden, daß der Vektor zwar in *C. glutamicum* ein *low-copy*-Vektor ist, in *E. coli* allerdings eine hohe Kopienzahl aufweist. Falls das Gen, bzw. die Gene in *E. coli* abgelesen werden und einen nachteiligen Effekt verursachen, würde bereits in *E. coli* gegen Plasmide mit dem gesuchten DNA-Bereich selektioniert und die entsprechenden Plasmide wären in den Plasmidpräparationen nicht mehr enthalten. Das Fazit aus diesem Ansatz war folglich, daß *E. coli* als Zwischenwirt einer Genbank mit chromosomaler DNA aus *C. glutamicum* umgangen werden mußte. Dazu eignete sich die Mutante 35/48res-a jedoch nicht, da die Transformationseffizienz trotz des restriktionsdefekten Charakters zu niedrig war, um den Stamm direkt mit einem Ligationsansatz zu transformieren.

3.1.4. Konstruktion des restriktionsdefekten Lysinproduzenten II7/3

Das Ziel der Konstruktion des Stammes II7/3 war die Isolierung einer exportdefekten Mutante, ausgehend von einem restriktionsdefekten Stamm mit hoher Transformationsrate. Dieser Stamm sollte dann direkt mit einer Genbank transformierbar sein, so daß *E. coli* als Zwischenwirt nicht benötigt werden würde. Dazu eignete sich der Stamm R127 (Liebl *et al.*, 1989), der eine Transformationsrate von 10^6 Transformanden/ μ g DNA zeigt (Tab. 6). Zunächst mußte dieser Stamm allerdings zu einem Lysinproduzenten transformiert werden. Zu diesem Zweck wurde das Gen *lysC2(Fbr)*, das für die *feedback*-resistente Aspartatkinase des Lysinproduzenten MH20-22B kodiert (Schrumpf *et al.*, 1992), in das Chromosom von R127 integriert. Dazu wurde das Plasmid pKK6D mit dem Gen

lysC2(Fbr) mittels Transkonjugation in R127 eingeführt. Da das Plasmid in *C. glutamicum* nicht repliziert, konnte direkt durch Selektion auf Kanamycin- und AEC-Resistenz auf Rekombination des Plasmids in das Chromosom selektioniert werden (Stamm R127<pKK6D>II). Nach einer zweiten Rekombination, die durch mehrfaches Überimpfen in LB-Flüssigmedium ohne Zugabe von Antibiotikum hervorgerufen wurde, konnte durch Selektion auf Kanamycin-Sensitivität und AEC-Resistenz der Stamm II7/3 isoliert werden, der das Gen *lysC2(Fbr)* im Chromosom trägt, jedoch das Wildtyp-Gen und den Vektoranteil verloren hat. Zur Überprüfung des Stammes wurden die Aspartatkinase-Aktivitäten gemessen (Tab. 7).

Tabelle 7: Bestimmung der Aspartatkinase-Aktivität in dem Stamm R127, der Kanamycin-resistenten Transkonjugande R127<pKK6D>II mit integriertem Vektor und dem Gen *lysC2(Fbr)* für die feedback-resistente Aspartatkinase, sowie dem davon isolierten Kanamycin-sensitiven Stamm II7/3, der den Vektoranteil und das ursprüngliche Gen für die feedback-sensitive Aspartatkinase verloren hat.

Stamm	spezifische Aktivität [$\mu\text{mol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$]	
	ohne Lysin, Threonin	mit Lysin, Threonin
R127	0,011	0,001
R127<pKK6D>II	0,021	0,014
II7/3	0,014	0,011

Der Stamm II7/3 besaß somit wie R127 nur eine einfache Aspartatkinase-Aktivität, die sich jedoch, im Gegensatz zum Ausgangsstamm, nicht mehr durch Zugabe der allosterischen Inhibitoren Lysin und Threonin hemmen ließ. Dagegen zeigte der Stamm R127<pKK6D>II, bei dem nur die erste Rekombination erfolgt war, eine doppelte Aspartatkinase-Aktivität, wobei nach Hemmung der Wildtyp-Aktivität in Anwesenheit von Lysin und Threonin entsprechend nur noch die einfache Aktivität des *feedback*-resistenten Enzyms meßbar war. Die Messungen der Lysinkonzentrationen im Stamm II7/3 ergaben Werte bis 30 mM internes Lysin und bis 25 mM Lysin im Medium. Außerdem waren auf Lysin-Indikatorplatten deutliche Wachstumshöfe des Indikatorstammes 49/3 in der Umgebung von II7/3 erkennbar, so daß es sich bei diesem Stamm um einen Produktionsstamm mit dem gewünschten Genotyp und Phänotyp handelt.

Von dem Stamm II7/3 sollte eine Mutante isoliert werden, die einen Defekt in der Lysinausscheidung trägt und sich daher für Komplementationsexperimente zur Isolierung des Gens bzw. der Gene des Lysinexportsystems eignen würde. Dazu wurde eine NNG-Mutagenese durchgeführt und 20.000 Einzelkolonien auf Lysin-Indikatorplatten getestet. 93

Mutanten konnten erhalten werden, die keinen Wachstumshof des lysinauxotrophen Stammes 49/3 aufwiesen. Von diesen waren 17 Stämme noch AEC-resistent, die jedoch nur interne Lysinkonzentrationen von 5-12 mM enthielten, was dem Konzentrationsniveau des Wildtyps entspricht. Offensichtlich hatten alle Mutanten die Fähigkeit zur Lysinproduktion als Folge der Bildung einer *feedback*-resistenten Aspartatkinase verloren. Die Schlußfolgerung aus diesen Experimenten mußte sein, daß eine Mutation im Lysinexport-System bei Produktionsstämmen nachteilig für die Zelle sein muß. Bei dem Stamm 35/48 könnte aufgrund einer zweiten Mutation dieser nachteilige Effekt toleriert werden. Diese Hypothese würde eventuell die schlechte Handhabbarkeit der Mutante 35/48 und die Tatsache erklären, daß von dem Stamm II7/3 keine Nichtausscheider mit hohen internen Lysinkonzentrationen isoliert werden konnten. Das Ziel mußte demnach sein, ein induzierbares System zur Lysinproduktion zu entwickeln, um Mutanten mit defektem Lysinexport zu erhalten, ohne daß ein Selektionsdruck durch sehr hohe intrazelluläre Lysinakkumulation entsteht.

3.1.5. Methionineffekt auf die Lysinproduktion und Isolierung der Mutante NA8

Das Ziel der Entwicklung eines induzierbaren Systems zur Lysinproduktion war die Vermeidung eines aus den vorangegangenen Experimenten geschlossenen permanenten negativen Selektionsdrucks auf Produktionsstämme, die durch einen Defekt des Lysinexports sehr hohe intrazelluläre Lysinkonzentrationen anhäufen, so daß entsprechende Mutanten vermutlich nicht zu isolieren sind oder mehrere Mutationen tragen. Mit Hilfe eines induzierbaren Systems sollte es möglich sein, Stämme zu verwenden, die keine Lysinproduzenten sind und nur unter definierten Bedingungen Lysin produzieren. Mutanten mit defektem Lysinexport sollten unter Bedingungen, die nicht zur Lysinproduktion führen keinem Selektionsdruck ausgesetzt sein.

Die Entwicklung eines solchen Systems gelang aufgrund der Beobachtung, daß die Zugabe von Methionin zur Lysinsekretion beim Wildtyp führt. Da Methionin die Repression der Gene für die Homoserindehydrogenase und die Homoserinkinase bewirkt (Follettie *et al.*, 1988), wird auf diese Weise die Threoninbiosynthese unterdrückt, wodurch letztlich die intrazelluläre Threoninkonzentration sinkt (Vrljic, 1993). Bereits Shio & Sano (1969) konnten zeigen, daß eine erniedrigte interne Threoninkonzentration die Lysinproduktion steigert, da die Aspartatkinase nur durch Lysin und Threonin gemeinsam inhibiert werden kann. Ein vermutlicher zweiter Effekt läßt sich aus der Konkurrenz der Homoserindehydrogenase mit der Dihydrodipicolinatsynthase um das gemeinsame Substrat L-Aspartatsemialdehyd ableiten (siehe Abb. 1). Eine Repression des Seitenweges der Lysinbiosynthese, der zu den Aminosäuren L-Threonin, L-Methionin und L-Isoleucin führt, muß zwangsläufig eine größere Verfügbarkeit des L-Aspartatsemialdehyds für die Lysinbiosynthese zur Folge haben.

Nach der Beobachtung der erhöhten Lysinbildung durch Zugabe von Methionin wurde der Methionineffekt näher charakterisiert (Vrljic, 1993). Dabei zeigte sich beim Wildtyp 13032, daß durch Zugabe von 5 mM Methionin in das Kulturmedium bereits der maximale Effekt auf die Lysinbildung erzielt werden konnte, was zu einer Erhöhung der intrazellulären Lysinkonzentration von 15-30 mM in der exponentiellen und 40-70 mM in der stationären

Wachstumsphase führte, im Gegensatz zu 10-15 mM bzw. 15-25 mM ohne Methioninzugabe. Im Medium waren in Anwesenheit von Methionin bis zu 5 mM Lysin zu messen. Ohne Methionin lagen die Werte unter 0,05 mM Lysin. Ansonsten konnte mit keiner anderen Aminosäure (Valin, Prolin, Arginin, Tryptophan, Cystein) ein vergleichbarer Effekt auf die Lysinbildung erzielt werden. Lediglich bei Zugabe von 5 mM Isoleucin, das in hoher Konzentration die Homoserindehydrogenase hemmt (Miyajima *et al.*, 1968), konnten leicht erhöhte Lysinkonzentrationen bis 0,14 mM im Medium gemessen werden. Der Methionineffekt wirkt folglich spezifisch, wodurch die einleitend erläuterte Hypothese der fehlenden Inhibition der Aspartatkinase aufgrund eines Threoninmangels untermauert werden konnte.

Auch mit der restriktionsdefekten Mutante R127 läßt sich wie beim Wildtyp durch Methioninzugabe die Lysinbildung induzieren. Dieser Stamm weist gegenüber dem Wildtyp unter den untersuchten Wachstumsbedingungen jeweils leicht erhöhte Lysinkonzentrationen auf, mit 20-30 mM intrazellulär und bis 1,5 mM Lysin im Medium ohne Methioninzugabe in der stationären Wachstumsphase. Im induzierten Zustand konnten 50-100 mM zellintern und 6-8 mM Lysin im Medium bestimmt werden. Von dem Stamm R127 sollte eine Mutante mit Defekt im Lysinexport isoliert werden, die folglich auch nach Zugabe von Methionin keine erhöhten Mengen Lysin ausscheidet, intrazellulär dagegen Lysin anhäuft. Aufgrund der hohen Transformationsrate und des restriktionsdefekten Charakters sollte mit dieser Mutante die Möglichkeit bestehen, eine Genbank zu erstellen und eine Komplementation auf Indikatorplatten zu erreichen.

In gemeinsamer Arbeit mit M. Vrljic konnte darauf die Mutante NA8 mit defekter Lysinausscheidung von dem restriktionsdefekten Stamm R127 isoliert werden. Dazu wurde R127 mit NNG mutagenisiert und anschließend 12000 Einzelkolonien auf Indikatorplatten mit 5 mM Methionin getestet. Von diesen Kolonien zeigten 108 keinen bzw. einen im Vergleich zum Ausgangsstamm deutlich kleineren Wachstumshof des lysinauxotrophen Stammes 49/3. Nach einem Wiederholungsexperiment auf Indikatorplatten wurden elf Klone mit deutlich verkleinertem Wachstumshof in die engere Wahl gezogen, von denen allerdings acht ein verringertes Wachstum zeigten. Von den verbleibenden Klonen wurden in Flüssigkultur die intra- und extrazellulären Lysinkonzentrationen bestimmt, von denen bei einem Stamm (NA8) die erwarteten erhöhten intrazellulären Konzentrationen bei stark herabgesetzten externen Werten gemessen werden konnten. Die Meßwerte dieses Stammes im Vergleich zum Ausgangsstamm sind in Tabelle 8 dokumentiert.

NA8 sekretiert nach Zugabe von Methionin kaum Lysin (bis 0,7 mM im Medium im Vergleich zu 5,9 mM bei R127) und besitzt hohe interne Lysinkonzentrationen (bis 174 mM im Vergleich zu 53 mM bei R127). Ohne Methioninzugabe liegen die internen Lysinkonzentrationen in der Mutante NA8 bei 62 mM, im Ausgangsstamm bei 22 mM (Vrljic, 1993).

Tabelle 8: Bestimmung der intra- und extrazellulären Lysinkonzentrationen des Stammes R127 und der von R127 isolierten Mutante NA8, die auf Indikatorplatten mit Methionin einen stark verkleinertem Wachstumshof aufwies.

Stamm	Zugabe von 5 mM Methionin	OD ₆₀₀	Lysinkonzentration (mM)	
			intrazellulär	im Kulturmedium
R127	+	29,1	53	5,9
"	-	34,3	22	1,0
NA8	+	28,1	174	0,7
"	-	21,8	62	0,1

3.1.5.1. Direkte Erstellung einer Plasmidgenbank in der Mutante NA8

Um eine Plasmidgenbank in *C. glutamicum* erstellen zu können, mußte zunächst die Transformation durch Elektroporation mit Ligationsansätzen optimiert werden. Es wurden dazu erhöhte Mengen DNA (300-500 ng Vektor, 2 µg Fragmente) eingesetzt, die vor der Ligation gefällt und konzentriert wurden. Nach der Ligation wurde die Ligase durch Hitze inaktiviert (Ymer, 1991), der Ansatz darauf mit Phenol/Chloroform extrahiert und anschließend mit Ammoniumacetat und Ethanol gefällt. Ammoniumacetat, an dieser Stelle eingesetzt, führte im Vergleich zu Natriumacetat und Lithiumchlorid zu dreifach höheren Transformationsraten bei der nachfolgenden Elektroporation. In die Elektroporation wurden jeweils ca. 400 ng Ligationsprodukt eingesetzt. Auf die Weise konnte direkt und quantitativ eine Plasmidgenbank in *C. glutamicum* NA8 erstellt und der unerwünschte Umweg über den Zwischenwirt *E. coli* vermieden werden. Es wurden der *low-copy*-Vektor pKW3 und chromosomale DNA des Produktionsstammes DG52-5 verwendet, denn nach Untersuchungen von Bröer *et al.* (1993) unterscheiden sich die Lysinexport-Systeme von Produktionsstämmen durch höhere Exportraten vom Wildtypsystem. Da es sich beim Ausgangsstamm von NA8 nicht um einen Lysin-Produktionsstamm handelt, waren von der Komplementation mit DNA aus DG52-5 eine effektivere Lysinsekretion und deutlichere Wachstumshöfe auf Lysin-Indikatorplatten erwartet worden.

Es wurden insgesamt 5700 Klone enthalten, von denen 50 % ein Insert von durchschnittlich 5 kb enthielten, wie nach Plasmidpräparationen aus 40 Klonen berechnet wurde. Nach Clarke & Carbon (1976) wäre damit ein Gen im Genom von 2550 kb (Martin, J. F., 1989) mit einer Wahrscheinlichkeit von >0,99 repräsentiert. Eine Komplementation auf Indikatorplatten konnte jedoch nicht erreicht werden.

3.2. Konstruktion von *low-copy*-Vektoren und Anwendung zur Expression eines auf *high-copy*-Vektoren instabilen Gens

3.2.1. Konstruktion des *low-copy*-Vektors pWK0

Um die negativen Effekte von *high-copy*-Vektoren bei der Klonierung von Membranproteine kodierenden Genen zu vermeiden, wurde der Pendelvektor pWK0 (Abb. 4) konstruiert, der in *C. glutamicum* in niedriger und in *E. coli* in hoher Kopienzahl vorliegt. Dazu wurde das 14,4 kb-Plasmid pNG2 aus *C. diphtheriae* mit Erythromycin als Resistenzmarker (Serwold-Davis & Groman, 1988) verwendet, das sowohl in *C. glutamicum*, als auch in *E. coli* stabil repliziert (Serwold-Davis *et al.*, 1987). Der in beiden Organismen funktionelle Replikationsursprung konnte auf einem 2,6 kb-*EcoRI*-*ClaI*-Fragment lokalisiert werden (Serwold-Davis *et al.*, 1990). Der Vektor wurde zunächst mit *ClaI* linearisiert, die überstehenden Enden dann mit Klenow-Enzym aufgefüllt und anschließend mit *EcoRI* nachgeschnitten. Als Vektor für *E. coli* wurde pEM1 gewählt (Schrumpf *et al.*, 1991), der eine in *E. coli* und *C. glutamicum* gut selektionierbare Kanamycin-Resistenz, den *oriT* für konjugativen DNA-Transfer und eine Klonierungsstelle besitzt, die aus pUC18 (Vieira & Messing, 1982) stammt. Das Plasmid pEM1 wurde mit *SacI* verdaut, mit Klenow-Enzym *blunt ends* erzeugt, und der Vektor schließlich mit *EcoRI* nachgeschnitten. Die Restriktionsansätze wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und das aus pNG2 stammende 2,6 kb-Fragment, sowie das 3,4 kb-Fragment aus pEM1 isoliert, ligiert und *E. coli* DH5 mit dem Ligationsansatz transformiert. Das resultierende Plasmid pWK0 (Reinscheid *et al.*, 1994) besitzt in *C. glutamicum* eine Kopienzahl von <5, wie aus Enzymmessungen der in pWK0 klonierten *feedback*-resistenten Homoserindehydrogenase (Reinscheid *et al.*, 1994) und Konzentrationsabschätzungen aus Plasmidpräparationen im Vergleich zu den gut untersuchten Plasmiden pEK0 (Eikmanns *et al.*, 1991b) und pJC1 (Cremer *et al.*, 1990) bestimmt wurde. Dazu wurden pEK0, pJC1 und pWK0 aus jeweils 1 ml Kultur des *C. glutamicum* Wildtyps 13032 bei $OD_{600} = 5$ isoliert und gleiche Volumina mit *BamHI* linearisiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und die DNA-Konzentrationen verglichen. Dabei betrug die abgeschätzte Menge an pWK0 10 % der Vergleichsvektoren (Abb. 5). Außerdem wurde *E. coli* DH5 mit jeweils 1 µl aus 50 µl Gesamtmenge dieser Präparationen transformiert und die Kolonien ausgezählt. Mit pWK0 wurden 40 Transformanden erhalten, im Vergleich zu pEK0 mit 360 und pJC1 mit 440 Transformanden. Aus diesen Ergebnissen ist zu schließen, daß der Vektor pWK0 in zehnfach niedrigerer Kopienzahl in *C. glutamicum* vorliegt als die Vergleichsvektoren pEK0 und pJC1.

Der Pendelvektor pWK0 hat in *E. coli* eine Kopienzahl von >200, wie aus Plasmidpräparationen und Gelanalysen abgeschätzt wurde. Diese sehr hohe Anzahl ist auf den pEM1-Anteil zurückzuführen, der letztlich das Plasmid pK19 (Pridmore, 1987) als Hintergrund enthält. Bei pK19 wird vermutet, daß das Transkript des Gens für die *Km^r* nicht terminiert ist und daher bis in den Bereich des Replikationsursprungs transkribiert wird. Daraus würde eine häufigere Initiation der Replikation und eine höhere Kopienzahl resultieren. Der auf dem pNG2-Fragment lokalisierte Replikationsursprung für *C. glutamicum* ist auch in *E. coli* funktionell und führt in *E. coli* zu einer Kopienzahl von

100/Zelle (Serwold-Davis *et al.*, 1987). Beide Replikationsursprünge in pWK0 müssen in *E. coli* stabil sein, da keine Deletionen oder Veränderungen des Restriktionsmusters beobachtet werden konnten, und der Vektor nach Präparation aus *E. coli* in *C. glutamicum* repliziert. Das Plasmid pWK0 hat eine Größe von 6 kb und besitzt eine Klonierungsstelle mit singulären Schnittstellen für *Bam*HI, *Xba*I, *Sal*I, *Pst*I und *Sph*I. Die ebenfalls singuläre *Eco*RI-Schnittstelle befindet sich außerhalb der Klonierungsstelle.

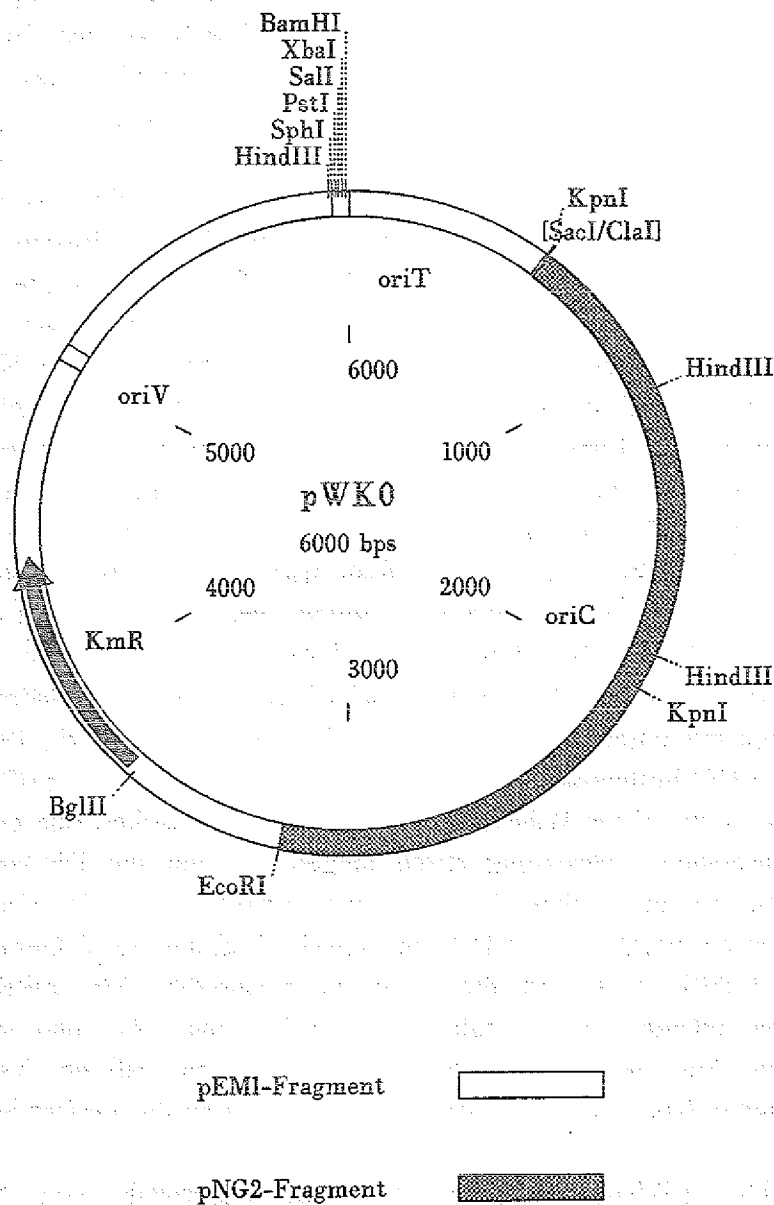


Abbildung 4: Restriktionskarte von dem Plasmid pWK0 mit Kanamycin-Resistenz (KmR), den Replikationsursprüngen für vegetative Replikation in *E. coli* (oriV) und in *C. glutamicum* (oriC), sowie zur Transkonjugation (oriT). Singuläre Restriktionsschnittstellen sind *Bam*HI, *Xba*I, *Sal*I, *Pst*I, *Sph*I, *Hind*III und *Eco*RI.

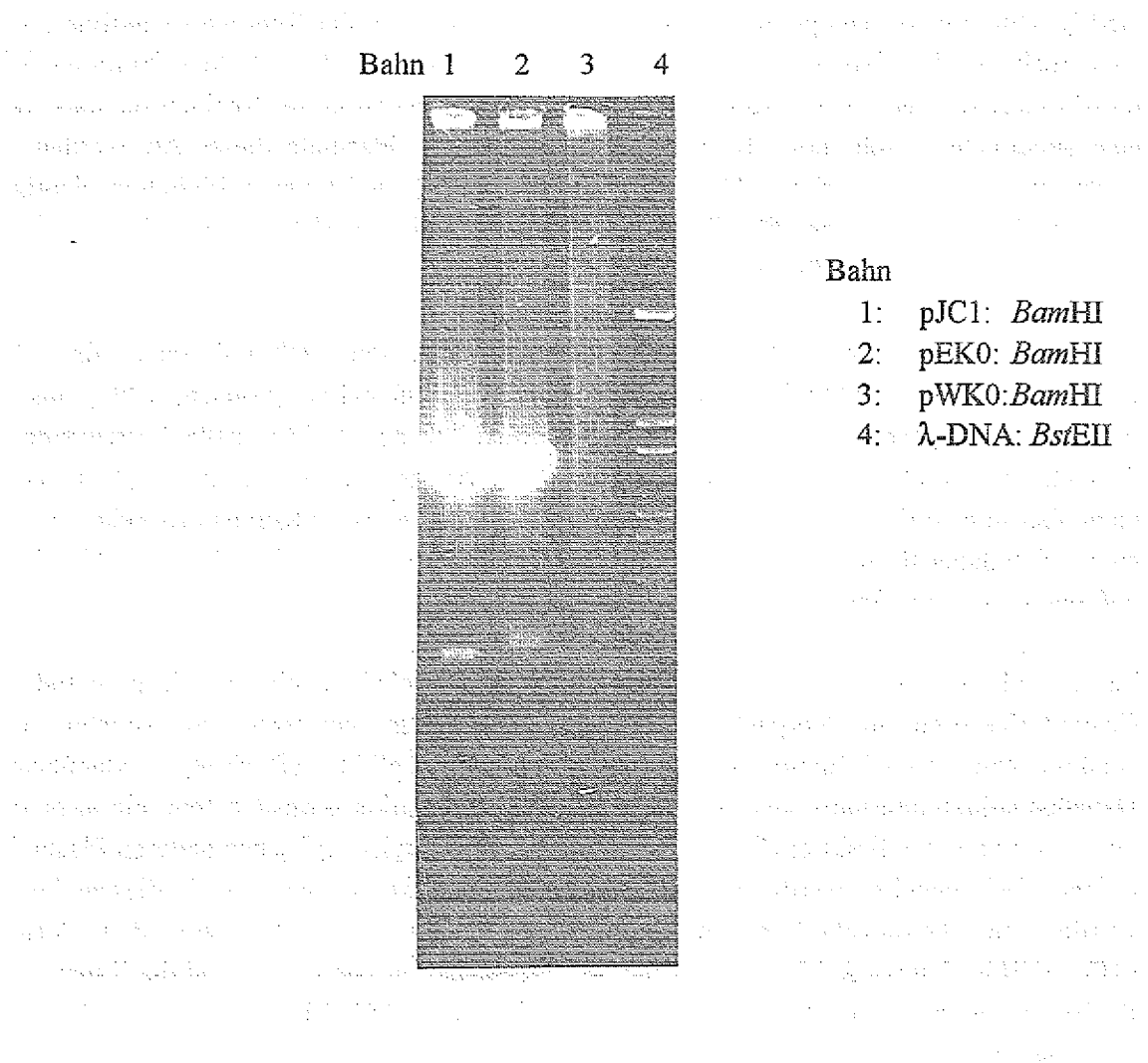


Abbildung 5: Konzentrationsvergleich von pJC1, pEK0 und pWK0 aus *C. glutamicum* 13032 bei $OD_{600} = 5$ isoliert und in gleichen Volumina gelöst. Jeweils 3 μ l mit *Bam*HI verdaut.

3.2.2. Konstruktion der *low-copy*-Vektoren pKW0 und pKW3

Das Ziel der Konstruktion der Plasmide pKW0 und pKW3 (Abb. 6) war, Vektoren zu erhalten, die sowohl in *C. glutamicum* als auch *E. coli* in niedriger Kopienzahl vorliegen. Darüberhinaus sollte durch Verwendung des Vektors pOU71 (Larsen *et al.*, 1984), der den Replikationsursprung für *E. coli* liefert, die Möglichkeit gegeben sein, durch Temperaturanstieg auf 42°C in *E. coli* eine hohe Kopienzahl mit höheren Ausbeuten bei Plasmidpräparationen zu erreichen. Diese Option ergibt sich aus der Tatsache, daß das für die Initiation der Replikation in *E. coli* wichtige Gen *repA* (Light & Molin, 1981) unter Kontrolle des temperatursensitiven Repressors ci^{857} aus dem Phagen Lambda steht. Bei einer Temperatur von 30°C ist der starke Repressor aktiv und blockiert den starken Promotor λP_R , der ebenfalls aus dem Phagen Lambda stammt. Die Kopienzahl ist dann sehr

niedrig. Durch einen Temperaturanstieg auf 42°C jedoch wird der Repressor inaktiviert, der nicht mehr an den Promotor binden kann, so daß *repA* von dem starken Promoter λP_R transkribiert werden kann. Dadurch findet eine häufige Initiation der Replikation statt, was eine entsprechend sehr hohe Kopienzahl zur Folge hat. Plasmide dieser Art werden als *runaway*-Plasmide bezeichnet (Nordström & Uhlin, 1992) und können folglich in niedriger Kopienzahl gehalten und für Plasmidisolierungen oder Analysen von Genprodukten kurzzeitig auf 42°C geshiftet werden.

Zur Konstruktion der *low-copy*-Vektoren wurde der DNA-Bereich für den corynebakteriellen Replikationsursprung aus dem Plasmid pGA2 (Sonnen, 1991) aus *C. glutamicum* eingesetzt, um im Gegensatz zu dem für den Vektor pWK0 verwendeten Bereich aus pNG2, einen Replikationsursprung zu verwenden, der nur in *C. glutamicum*, nicht aber in *E. coli* repliziert. Das Plasmid pGA2 liegt in 5 bis 10 Kopien pro Zelle vor und eignet sich daher für die Konstruktion eines Pendelvektors mit niedrigen Kopienzahlen in *E. coli* und *C. glutamicum*.

Ferner sollte eine *cos-site* in den *low-copy*-Plasmiden enthalten sein, um sie potentiell als Cosmid-Vektoren in Verpackungen in Lambda-Pagen einsetzen zu können. Das entsprechende DNA-Fragment stammte aus dem Plasmid pBTI-1 (Boehringer, Mannheim). Daneben sollten alternativ zwei verschiedene Resistenzmarker enthalten sein, die in *E. coli* und *C. glutamicum* funktionell sind, damit die Plasmide bei Bedarf neben anderen Plasmiden in einer Zelle gehalten werden und separat selektioniert werden können. Zu diesem Zweck wurden die Tetracyclin-Resistenz, kodiert von dem Gen *tetA* aus dem Vektor pHY163PLK (Ishiwa & Shibahara, 1985) zur Konstruktion von pKW0 und die Kanamycin-Resistenz, die ursprünglich aus *Tn903* stammt (Oka *et al.*, 1981) und aus pUC4K (Vieira & Messing, 1982) isoliert wurde, zur Konstruktion von pKW3 verwendet.

Zur Klonierung wurde zunächst die *cos-site* als 0,5 kb *Pst*I-Fragment in die *Pst*I-Stelle des Vektors pUC19 ligiert, was das Zwischenkonstrukt pUC19cos ergab. Der Replikationsursprung für *C. glutamicum* wurde als 3,4 kb *Hind*III/*Sal*I-Fragment aus pFBH2 isoliert, einem Subklon von pGA2, und *blunt end* in die *Sal*I/Klenow-Schnittstelle von pUC19cos ligiert. Das resultierende Plasmid war pUC19cos-oriCg. Darauf wurde das Gen *tetA* (1,7 kb) als *Eco*RI/*Acc*I/Klenow-Fragment erhalten und in die *Sma*I-Schnittstelle von pUC19cos-oriCg kloniert, mit dem Plasmid pUC19-cos-oriCg-Tc^r als Produkt. Aus diesem Vektor konnte die ganze Klonierungsstelle mit den drei Inserts mit Hilfe eines partiellen *Hind*III-Verdau mit nachfolgender Klenow-Auffüllung und anschließender *Eco*RI-Restriktion isoliert werden. Das Plasmid pOU71 (Larsen *et al.*, 1984), das den Replikationsursprung für *E. coli* und die DNA-Bereiche aus dem Phagen Lambda trägt, wurde partiell mit *Pst*I geschnitten, mit Klenow-Enzym behandelt und anschließend mit *Eco*RI nachgeschnitten. Auf diese Weise konnte nach Isolierung aus einem Agarosegel ein 3,3 kb Fragment mit dem gewünschten DNA-Bereich erhalten und ein nicht benötigter Bereich von 2,5 kb deletiert werden. Das 3,3 kb Fragment und die aus pUC19cos-oriCg-Tc^r isolierte Klonierungsstelle mit den drei Inserts wurden ligiert und nach Transformation von *E. coli* DH5 das Plasmid pKW0 mit der Größe von 9,6 kb erhalten. pKW0 enthält mit

EcoRI und *KpnI*, sowie *BamHI* singuläre Klonierungsschnittstellen, die durch das Gen für die Tetracyclin-Resistenz getrennt sind.

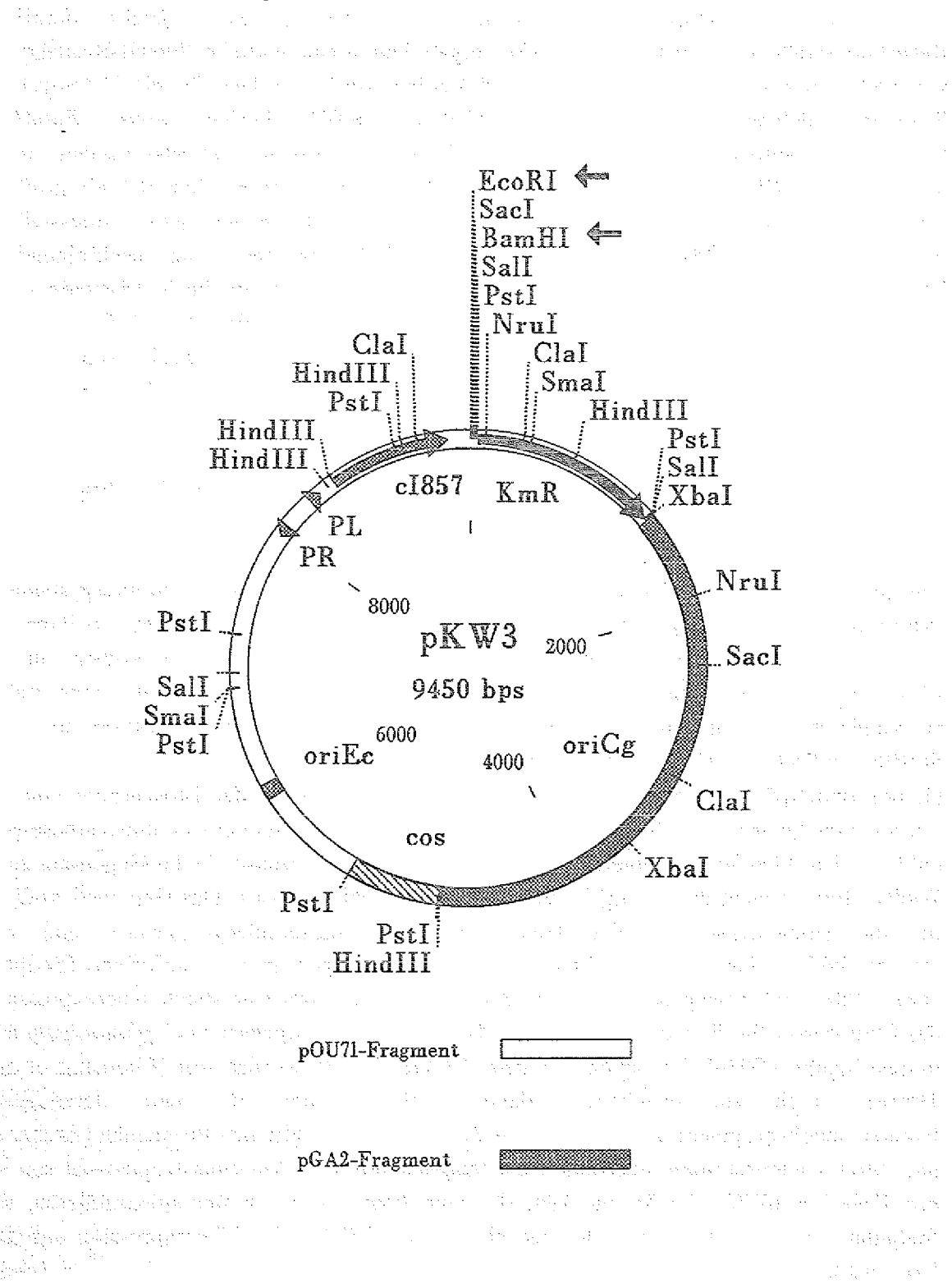


Abbildung 6: Restriktionskarte von pKW3 mit den singulären Schnittstellen *EcoRI* und *BamHI*. Der Vektor enthält eine Kanamycin-Resistenz (KmR), die Replikationsursprünge für die vegetative Replikation in *E. coli* (oriEc) und *C. glutamicum* (oriCg), sowie eine Cosmiderkennungsstelle (cos). Die starken Promotoren aus dem Phagen Lambda (P_L , P_R) stehen unter Kontrolle des von dem Gen *cI*⁸⁵⁷ kodierten Repressors.

Zur Konstruktion von pKW3 wurde die Tetracyclin-Resistenz in pKW0 durch die Kanamycin-Resistenz ersetzt. Das Gen für die Aminoglycosid-3'-Phosphotransferase wurde als 1,3 kb-*Bam*HI-Kassette aus pUC4K isoliert und in die singuläre *Bam*HI-Restriktionsstelle ligiert, was Vektor pKW1 ergab. Durch eine partielle *Bam*HI-Restriktion von pKW1 und einem nachfolgendem *Kpn*I-Verdau wurde das Gen für die Tetracyclin-Resistenz deletiert (pKW2). Der Vektor pKW2 besitzt zwei *Bam*HI-Restriktionsschnittstellen, wovon eine durch einen partiellen *Bam*HI-Verdau und anschließender Klenow-Auffüllung entfernt werden konnte, was zu dem 9,2 kb großen Plasmid pKW3 führte. Dieses Plasmid besitzt die benachbart liegenden Klonierungsstellen *Eco*RI und *Bam*HI. Beide Plasmide, pKW0 und pKW3, wurden in den nachfolgenden Experimenten zur Erstellung von Plasmidgenbanken eingesetzt, da beide Plasmide eine singuläre *Bam*HI-Schnittstelle zur Klonierung von chromosomalen *Sau*3A-Fragmenten enthalten. Dabei stellte sich pKW3 mit der Kanamycin-Resistenz als der geeignetere Vektor für die für diesen Zweck notwendige, quantitative Ausbeute an Transformanten heraus.

3.2.3. Anwendung von pWK0 zur Untersuchung der Überexpression der deregulierten Homoserindehydrogenase

Mit der Konstruktion der Vektoren mit niedrigen Kopienzahlen in *C. glutamicum* standen Werkzeuge zur Verfügung, um eine schwache Überexpression des Gens *hom-1* (Eikmanns *et al.*, 1991a), das für eine *feedback*-resistente Homoserindehydrogenase kodiert, in *C. glutamicum* zu untersuchen. Es sollte gezeigt werden, ob das Gen in *C. glutamicum* stabil zu klonieren war, und welche Auswirkungen die schwache Überexpression auf den Stofffluß in Richtung Threonin bzw. Lysin hat.

Homoserindehydrogenase und Homoserinkinase katalysieren bei der Biosynthese von L-Threonin die beiden ersten Reaktionen nach der Abzweigung von dem Lysinbiosyntheseweg (Abb. 1). Das Gen *hom-1* kodiert für eine Homoserindehydrogenase, die im Gegensatz zum Wildtyp-Enzym nicht durch Zugabe von L-Threonin inhibiert wird. Das Gen *thrB* kodiert für die Homoserinkinase. Die Gene für die Homoserindehydrogenase und die Homoserinkinase liegen in einem Operon vor und werden gemeinsam transkribiert (Peoples *et al.*, 1988). Auf bislang verfügbaren *high-copy*-Plasmiden war eine stabile Überexpression des Gens *hom-1* für die *feedback*-resistente Homoserindehydrogenase in *C. glutamicum* nur in dem Stamm DM368-3 möglich, aus dem das Gen isoliert worden war (Eikmanns *et al.*, 1991a). Auch ein unabhängig davon isoliertes und für eine deregulierte Homoserindehydrogenase kodierendes Gen *homdr* führte zu gleichen Problemen (Archer *et al.*, 1991). Genetisch stabil waren die Gene lediglich in *E. coli*. Mit einer Kopienzahl von <5 pro Zelle bot pWK0 die Möglichkeit, das Gen *hom-1* schwach überzuexprimieren, die Stabilität des Gens in niedriger Kopienzahl und die Effekte der Überexpression auf den Kohlenstofffluß in Richtung Threonin, Methionin und Isoleucin zu untersuchen (Reinscheid *et al.*, 1994).

Zur Subklonierung der Gene *hom-1* und *thrB* wurde ein 3,7 kb *Sa*II-Fragment aus pEK-homFBR-thrB (Eikmanns *et al.*, 1991a) isoliert, mit dem durch *Sa*II linearisierten und mit alkalischer Phosphatase behandelten Vektor pWK0 ligiert und *E. coli* DH5 mit dem Ligationsansatz transformiert. Mit dem dabei erhaltenen Vektor pWK-hom-1 wurden der

Wildtyp 13032 und der Lysin-Produktionsstamm MH20-22B (Schrumpf *et al.*, 1992) transformiert. Die Aktivitätsmessungen der Homoserindehydrogenase und der Homoserinkinase ergaben eine drei- bis vierfache Wildtyp-Aktivität, wobei sich 75 bis 80 % der Homoserindehydrogenase-Aktivität nicht durch L-Threonin inhibieren ließen (Reinscheid *et al.*, 1994). Das läßt auf eine Kopienzahl des Plasmids pWK-hom-1 von drei bis vier pro Zelle schließen. Die Verdopplungszeiten von 13032<pWK-hom-1> lagen bei 130 min und von MH20-22B<pWK-hom-1> bei 200 min. Damit teilten sich die Zellen in derselben Geschwindigkeit wie die Stämme ohne Plasmid.

Zur Stabilitätsuntersuchung des überexprimierten *hom-1* wurden 13032<pWK-hom-1> und MH20-22B<pWK-hom-1> durch regelmäßiges Überimpfen in frisches Medium für über 70 Generationen auf Vollmedium ohne Kanamycin gezogen. Danach wurden die Zellen auf CGIII-Platten ausplattiert und jeweils 50 Einzelkolonien davon auf Kanamycin-Platten getestet, wobei alle Kolonien unveränderte Resistenz zeigten. Bei jeweils sechs dieser Kolonien wurde zudem die Aktivität der Homoserindehydrogenase bestimmt. Alle Kolonien waren in bezug auf Gesamtaktivität und Inhibition durch L-Threonin unverändert (Reinscheid *et al.*, 1994).

Ferner wurden bei den Stämmen die externen Aminosäurekonzentrationen bestimmt, um Veränderungen des Stoffflusses in Richtung Threonin und Isoleucin feststellen zu können, die durch Überexpression von *hom-1* hervorgerufen wurden (Tab. 9).

Tabelle 9: Aminosäurebildung bei Überexpression des Gens *hom-1* mit Hilfe des *low-copy*-Vektors pWK0 im Wildtyp 13032 und dem Lysinproduzenten MH20-22B im Vergleich zu den Stämmen ohne Plasmid.

Stamm	Aminosäurekonzentration (mM)				
	Threonin	Homoserin	Isoleucin	Glycin	Lysin
extrazellulär:					
WT	<1	<1	<1	15±3	<1
WT<pWK-hom-1>	<1	<1	<1	16±7	<1
MH20-22B	<1	<1	<1	14±3	208±13
MH20-22B<pWK-hom-1>	69±3	23±2	34±3	26±5	57±5
intrazellulär:					
MH20-22B	9±1	4±1	4±2	3±1	26±2
MH20-22B<pWK-hom-1>	100±14	74±12	7±2	13±2	20±2

Aus dem Vergleich der Aminosäurekonzentrationen folgt, daß bei dem Lysinproduzenten MH20-22B durch Überexpression von *hom-1* eine deutliche Umlenkung des Stoffflusses vom Lysinweg in Richtung Threonin erfolgte. Die erhöhten Aktivitäten von

Homoserindehydrogenase und Homoserinkinase führten zu einer verstärkten Ausscheidung von L-Threonin von <1 mM auf 69 mM im Medium. Die intrazelluläre Threoninkonzentration war ungefähr zehnfach auf 100 mM erhöht. Auch das Zwischenprodukt Homoserin und die aus Threonin in fünf Einzelschritten gebildete Aminosäure L-Isoleucin wurden verstärkt ausgeschieden, während die beiden Metabolite bei dem Stamm ohne Plasmid wie auch Threonin nur in Konzentrationen <1 mM im Kulturmedium meßbar waren. Im Falle des Homoserins war auch im Cytosol mit 74 mM statt 4 mM bei MH20-22B eine stark erhöhte Konzentration zu messen. Beim Isoleucin ließ sich die im Vergleich zum Ausgangsstamm kaum erhöhte intrazelluläre Konzentration dadurch erklären, daß die Aminosäure neben dem Transport auch durch Diffusion aus der Zelle austreten kann (Zittrich, 1992). Glycin ist als Abbauprodukt des L-Threonins bekannt. Die dazu notwendigen Enzyme Threonindehydrogenase und 2-Amino-3-Oxybutyrat-CoA-Ligase wurden in Corynebakterien nachgewiesen und werden durch Threonin induziert (Bell & Turner, 1976). Bei Überexpression von *hom-1* in MH20-22B war die Konzentration von Glycin im Medium gegenüber dem Stamm ohne Plasmid um den Faktor zwei auf 26 mM erhöht, intrazellulär um den Faktor vier auf 13 mM. Da durch Überexpression von *hom-1* nicht nur Threonin verstärkt intrazellulär akkumuliert und zugleich in das Medium ausgeschieden wurde, sondern auch Homoserin als Vorprodukt, sowie Isoleucin und Glycin als Folge- oder Abbauprodukte in höheren Konzentrationen zu finden waren, mußte angenommen werden, daß der Export von Threonin ein limitierender Faktor der Threoninproduktion gewesen sein könnte. Entsprechend der höheren Ausscheidung von Aminosäuren des Threoninweges sind die Mengen an L-Lysin im Cytosol und im Medium herabgesetzt. Extrazellulär konnten statt 208 mM Lysin bei MH20-22B nur noch 57 mM mit überexprimiertem *hom-1* festgestellt werden. Intrazellulär dagegen war die Konzentration von 26 mM auf 20 mM Lysin nur leicht erniedrigt. Dieses Ergebnis wurde auf die starke Exportaktivität bei MH20-22B zurückgeführt (Bröer *et al.*, 1993), die dafür sorgte, daß synthetisiertes Lysin effektiv in das Medium transportiert wurde. Eine herabgesetzte Lysinsynthese wie bei Überexpression von *hom-1* in MH20-22B machte sich daher offensichtlich nur extrazellulär deutlich bemerkbar, nicht jedoch intrazellulär, wo die Lysinkonzentration auch in MH20-22B relativ niedrig war.

Beim Wildtyp hat die Überexpression von *hom-1* und *thrB* keine Auswirkungen auf die Aminosäureproduktion. Da die Aspartatkinase in diesem Stamm durch L-Threonin und L-Lysin streng reguliert wird, steht offensichtlich zu wenig L-Aspartatsemialdehyd als Ausgangssubstrat zur Verfügung, so daß die stärkere Aktivität eines in der Biosynthese nachfolgenden Enzyms keine Änderung der Produktion erreichen kann.

3.3. Isolierung des Glutamataufnahmesystems

Neben den Arbeiten zum Lysinexportsystem war die Isolierung der Gene des Glutamataufnahmesystems aus *C. glutamicum* das Hauptziel der Arbeit. Aus früheren Arbeiten war deutlich geworden, daß *C. glutamicum* ein spezifisches Aufnahmesystem für Glutamat besitzen muß (Krämer & Lambert, 1990b). Frühere Experimente, das System durch heterologe Komplementation einer *E. coli*-Mutante zu isolieren, waren nicht erfolgreich (Peckhaus, persönliche Mitteilung). Daher wurde versucht, die Gene des

Aufnahmesystems durch homologe Komplementation einer entsprechenden Mutante von *C. glutamicum* zu isolieren. Zu diesem Zweck war eine Mutante nach NNG-Mutagenese des Wildtyps 13032 isoliert worden, die auf CGIX-Medium mit Glutamat als einziger C-Quelle nicht mehr wachsen kann. Mit Glutamin als C-Quelle war jedoch normales Wachstum wie beim Wildtyp festzustellen (Peekhaus, persönliche Mitteilung). Beide Aminosäuren werden in *C. glutamicum* durch separate Transportsysteme aufgenommen (Krämer & Lambert, 1990a). Da sich die Abbauewege von Glutamin und Glutamat nur durch einen zusätzlichen Desaminierungsschritt beim Glutamin unterscheiden, diente Glutamin als Kontroll-Aminosäure, um Mutationen des intrazellulären Abbaus ausschließen zu können. Messungen der Glutamataufnahme in der Mutante bestätigten den gewünschten Phänotyp mit einem auf 25 % herabgesetzten Transport dieser Aminosäure bei dieser Mutante. Um für eine Komplementation jedoch quantitativ eine Plasmidgenbank durch Elektroporation mit Ligationsansätzen in *C. glutamicum* etablieren zu können, mußte der Stamm eine hohe Transformationsrate haben. Dazu wurde die Mutante mit NNG mutagenisiert und auf hohe Transformationsraten mit Plasmiden aus *E. coli* selektiert (Peekhaus, persönliche Mitteilung). Dabei wurde die Mutante M10 mit einer erhöhten Transformationsrate von 10^5 Transformanden/ μ g DNA isoliert, die zur Erstellung einer Plasmidgenbank mit Hilfe der optimierten Methode der Elektroporation mit Ligationsansätzen ausreichend sein sollte. Vorab wurde jedoch zur Überprüfung des Phänotyps das Wachstum von M10 in Form eines Plattentests auf Glutamat bzw. Glutamin als C- oder N-Quelle getestet. Dabei zeigte sich, daß M10 Glutamat als C-Quelle nicht verwerten, allerdings mit Glutamat oder Glutamin als alleiniger N-Quelle wachsen kann. Die Ergebnisse dieses Plattentests sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Wachstum des Wildtyps 13032 und der Mutante M10 auf Minimalmedium-Platten mit jeweils 10 g/l Glutamat bzw. Glutamin als einzige C- bzw. N-Quelle.

Stamm	N-Quelle		C-Quelle	
	Glutamat	Glutamin	Glutamat	Glutamin
WT13032	+	+	+	+
M10	+	+	-	+

3.3.1. Bestimmung der Glutamataufnahme bei der Mutante M10

Zur weiteren Überprüfung der Mutante M10 wurde zunächst die Glutamataufnahme-Aktivität der Mutante M10 gemessen, um die Mutation auf die Gene des Glutamataufnahmesystems eingrenzen zu können. Dazu wurde die Glutamataufnahme im Vergleich zum Wildtyp 13032 in CGT-Medium mit Glukose bestimmt. Dabei wurde für M10 eine Aufnahme rate für Glutamat von $0,53 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ bestimmt, ein Wert der nur 30 % der Aufnahmeaktivität des Wildtyps mit einer Aufnahme rate von $1,83 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ entspricht. Aus diesen Ergebnissen folgt, daß bei M10 tatsächlich die Glutamataufnahmeaktivität erniedrigt ist. Der Aufnahmetest ist als Diagramm in Abbildung 7 dargestellt.

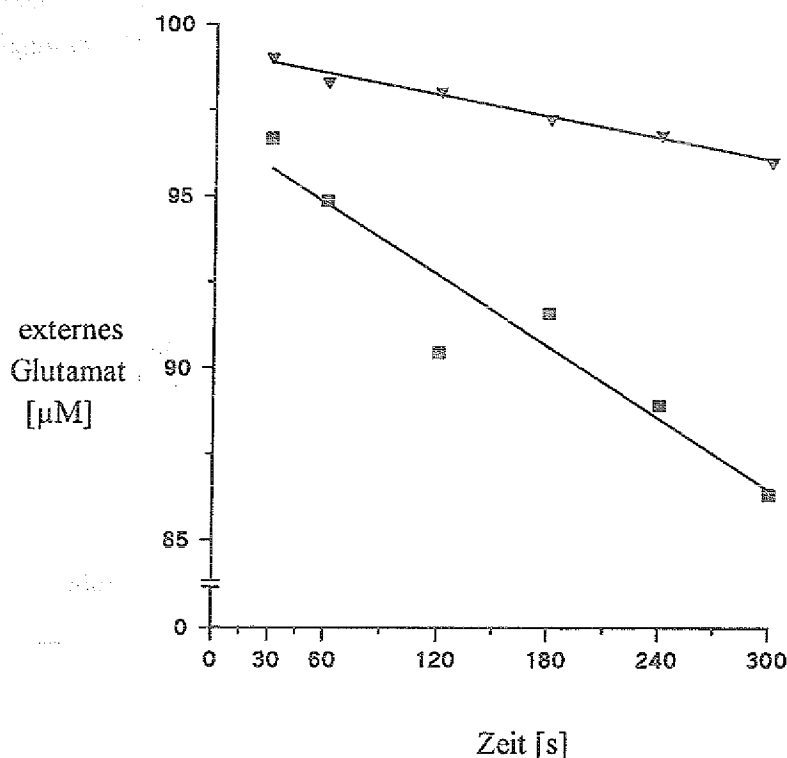


Abbildung 7: Bestimmung der Glutamataufnahmeaktivität, dargestellt als Abnahme des externen Glutamats, nach Anzucht in CGT-Medium mit Glukose als C-Quelle bei der Mutante M10 (▽), die mit Glutamat als C-Quelle kein Wachstum zeigte und dem Wildtyp 13032 (■) als Kontrollstamm. Für M10 wurde eine Aufnahme rate von $0,53 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ gemessen, im Vergleich zu $1,83 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ beim Wildtyp.

3.3.2. Komplementation von M10 mit Hilfe einer Plasmidgenbank im *low-copy*-Vektor pKW3

Mit dem Ziel der Isolierung der Gene für die Glutamataufnahme wurde zunächst eine Plasmidgenbank mittels optimierter Elektroporation mit aufgereinigten Ligationsansätzen in dem Stamm M10 erstellt. In vorangegangenen Experimenten konnte eindeutig gezeigt werden, daß M10 eine erniedrigte Aufnahmeaktivität für Glutamat besitzt. Durch Komplementation von M10, d. h. wiederhergestelltes Wachstum mit Glutamat als einziger C-Quelle, sollten die gesuchten Gene isoliert werden können. Dazu wurden der mit *Bam*HI linearisierte Vektor pKW3 und chromosomale *Sau*3A-Fragmente des Wildtyps 13032 mit 6-12 kb Größe verwendet. Es wurden mit sechs Ligationsansätzen insgesamt 12000 Transformanten erhalten, von denen mindestens 4000 ein Insert von >5 kb enthielten, wie in Stichprobentests von 20 Plasmidisolierungen pro Transformationsansatz ermittelt wurde. Das bedeutet eine Wahrscheinlichkeit für die Präsenz eines Gens von >0,99. Die Transformanten wurden auf CGIX-Agarplatten getestet, die Glutamat als einzige C-Quelle enthielten, bzw. Glutamin als Positivkontrolle. Zwei der Transformanten zeigten auf Glutamat als C-Quelle ein dem Wildtyp vergleichbares, deutliches Wachstum. Aus beiden Stämmen wurden die Plasmide isoliert und M10 retransformiert, worauf die deutliche Komplementation wiederholt werden konnte. Die beiden Plasmide mit der Bezeichnung pKW11 bzw. pKW12, wurden einer Restriktionsanalyse unterzogen. Dabei wiesen die mit verschiedenen Enzymen geschnittenen Plasmide jeweils identische Restriktionsmuster auf. Die Inserts umfaßten in beiden Fällen 19 kb.

Mit den Retransformanten M10<pKW11> und M10<pKW12> wurde die Aufnahmeaktivität für Glutamat bei in CGT-Medium mit Glukose angezogenen Zellen bestimmt. Dabei konnte bei beiden Retransformanten eine deutlich erhöhte Aufnahmerate von 3,90 bzw. 4,96 nmol x mg⁻¹ x min⁻¹ gemessen werden, im Vergleich zu den Kontrollstämmen M10 mit einer Aufnahmerate von 0,47 nmol x mg⁻¹ x min⁻¹ und dem Wildtyp mit 1,58 nmol x mg⁻¹ min⁻¹ (Tab. 11).

Tabelle 11: Glutamataufnahmeraten der Mutante M10 mit den komplementierenden Plasmiden pKW11 und pKW12. Als Kontrollen sind die Mutante M10 ohne Plasmid und der Wildtyp 13032 gemessen worden.

Stamm	Aufnahmerate [nmol x mg TG ⁻¹ x min ⁻¹]
M10	0,47
M10<pKW11>	3,90
M10<pKW12>	4,96
WT 13032	1,58

Das bedeutet für die Retransformanten eine ungefähr dreifach höhere Aktivität als beim Wildtyp, ein Wert der mit der Kopienzahl der Plasmide erklärt werden kann, die aus Plasmidpräparationen auf ca. 5 Kopien pro Zelle geschätzt wurde. Deutlich geht aus den Messungen hervor, daß der Defekt in der Glutamataufnahme von M10 komplementiert werden konnte, so daß in pKW11 und pKW12 die Gene für die Glutamataufnahme enthalten sein mußten.

Da beide Plasmide den Aufnahmedefekt von M10 komplementierten und nach Restriktionsanalysen identisch schienen, wurde zur weiteren Eingrenzung und Subklonierung der Gene des Glutamataufnahmesystems pKW12 verwendet, der im Vergleich zu pKW11 zu etwas höheren Aufnahmeraten geführt hatte.

3.3.3. Eingrenzung des komplementierenden Fragments durch Hybridisierung mit einem synthetischen Oligonukleotid

Ausgehend von den bislang bekannten biochemischen Daten der Glutamataufnahme bei *C. glutamicum* (Krämer *et al.*, 1990a), die einleitend dargestellt wurden, mußte geschlossen werden, daß es sich bei diesem Transportsystem um ein Bindeprotein-abhängiges Aufnahmesystem handeln muß. Da es sich bei Bindeprotein-abhängigen Systemen üblicherweise um mehrere Proteine handelt, deren Gene in Operonen von ca. vier bis sechs kb organisiert sind, mußte das komplementierende DNA-Fragment des großen Inserts von 19 kb näher eingegrenzt werden. Zu diesem Zweck wurde die Eigenschaft Bindeprotein-abhängiger Transportsysteme ausgenutzt, daß sie stark konservierte ATP-Bindestellen besitzen (Higgins *et al.*, 1986). Eine dieser Stellen, die auch als "site A" bezeichnet wird (Walker *et al.*, 1982; Ames, 1986) sollte mittels Hybridisierung mit einem degenerierten Oligonukleotid lokalisiert werden. Aus dem Vergleich mit bekannten Systemen, wobei Transportsysteme aus Gram-positiven Bakterien stärker berücksichtigt wurden, ergab sich folgende konservierte Aminosäuresequenz einer "site A". Die unterstrichenen Aminosäuren wurden als konserviert angenommen, während die anderen variabel sind:

V G E S G S G K S

Auf der Grundlage der von Eikmanns (1992) publizierten *codon usage* für schwach exprimierte Gene von *C. glutamicum* wurde nun ein diese Aminosäuresequenz kodierendes, degeneriertes Oligonukleotid mit folgender Basenabfolge synthetisiert:

5'	GTT	GGC	GAA	TCC	GGC	TCC	GGC	AAC	TCC	3'
	T	C	A	C	C	C	C	G	C	
	G	C	A	T	C	T	C	G	T	
	G	T	G	T	T	T	T	G	T	
	C	T	G	A	T	A	T	A	A	
	A	A	G	G	A	G	A	A	G	

Die Häufigkeit des Auftretens der jeweils dritten Base eines Triplets spiegelt die Varianzhäufigkeit nach der verwendeten *codon usage* wider. Nach Markierung mit Digoxigenin wurde dieses degenerierte Oligonukleotid als Sonde bei Southern-Hybridisierungen mit dem Plasmid pKW12 eingesetzt, das mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten worden war. Die besten Signale konnten bei einer Hybridisierungstemperatur von 40°C detektiert werden.

Signale zeigten sich bei einem 8 kb *ClaI*-Fragment, einem 4,5 kb *SaII*-Fragment, einem 3,7 kb *EcoRI/SaII*-Fragment, einem 13,8 kb *EcoRI*-Fragment, einem 10 kb *SmaI*-Fragment, sowie einem 6,6 kb *HindIII*-Fragment.

Das kleinste und damit für die Subklonierung und anschließende Sequenzierung geeignetste Fragment war demnach das 3,7 kb *EcoRI/SaII*-Fragment. Das 13,8 kb-*EcoRI*-Fragment mußte aus dem Vektor pKW3 und dem angrenzenden Insert von ca. 4,5 kb zusammengesetzt sein. Bei den anderen Fragmenten mußte es sich um DNA Bereiche handeln, die benachbarte Sequenzen des 3,7 kb *EcoRI/SaII*-Fragments umfaßten.

3.3.4. Sequenzierung des komplementierenden DNA-Fragments

Zur Sequenzierung des mit dem Oligonukleotid hybridisierenden DNA-Bereichs wurde das 3,7 kb *EcoRI/SaII*-Fragment aus pKW12 isoliert, mit Klenow-Enzym behandelt und in die *SmaI*-Klonierungsschnittstelle des Vektors pHSG576 (Takeshita *et al.*, 1987) kloniert. Dabei wurden die Plasmide pHSG-Glu2 und pHSG-Glu3 erhalten, die das Insert in unterschiedlicher Orientierung trugen. Der Vektor pHSG576 liegt aufgrund seines Replikationsursprungs aus pSC101 (Cohen & Chang, 1977) in *E. coli* in niedriger Kopienzahl vor. Damit sollten negative Effekte durch eine mögliche Überexpression der Gene in *E. coli* vermieden werden, die zu Mutationen führen könnten. Außerdem enthält das Plasmid die Klonierungsregion aus pUC9 (Vieira & Messing, 1982), wodurch sich der Vektor zur Sequenzierung mit Universal Primern eignete. Mit Hilfe der Exonuklease III-Behandlung wurden von beiden Plasmiden Deletionsklone hergestellt, indem die sich als schützende 3'-überhängende Schnittstelle eignende *PstI*-Restriktionsstelle (Hoheisel, 1993) aus der Klonierungsregion und die benachbarte *SaII*-Stelle (5'-Überhang) als Startpunkt für den Exonuklease III-Abbau verwendet wurden. Nachdem aufgrund der Sequenzierung von Deletionsklonen und Homologieanalysen erste Informationen über die ungefähre Ausdehnung von offenen Leserastern bekannt waren, wurden ferner kleine Subfragmente, die keine ganzen Proteine kodieren konnten, in dem leichter handhabbaren Vektor pUC18 (Vieira & Messing, 1982) kloniert, um bestehende Lücken in der Sequenz zu schließen.

An einem Ende des 3,7 kb-Fragments war der Anfang eines Leserasters (ORF4) festzustellen, dessen 3'-Ende nicht auf dem Fragment lokalisiert war. Daher wurde der Vektor pKW12 mit *EcoRI* geschnitten und das große Fragment (13,8 kb) religiert. Nach den Sequenzinformationen und dem Hybridisierungsexperiment mußte dabei der komplette bisher sequenzierte Abschnitt mit dem angrenzenden, gesuchten Bereich auf dem resultierenden Plasmid pKW12-*EcoRI* enthalten sein. Nach vorheriger Restriktionsanalyse wurden ein 0,3 kb und ein 0,5 kb *SaII*-Fragment in pUC18 kloniert, die das 3'-Ende des ORF 4 enthalten sollten. Außerdem wurde ein Abschnitt kloniert, der mit dem 3,7 kb und den kleinen *SaII*-Fragmenten überlappt. Die Sequenz zeigte, daß alle offenen Leseraster, die

vermutlich die Gene des Transportsystems kodieren, auf einem Abschnitt von 3977 Basenpaaren lokalisiert sind, der sich aus dem 3,7 kb *EcoRI/SalI*-Fragment und dem angrenzenden 0,3 kb *SalI*-Fragment zusammensetzt. Das 0,5 kb *SalI*-Fragment liegt hinter dem 3'-Ende des ORF4. Die Sequenzierungsstrategie mit der Restriktionskarte des gesamten 3977 Basenpaare umfassenden Fragments ist in Abbildung 8 dargestellt. Die komplette DNA-Sequenz mit den abgeleiteten Proteinsequenzen ist in Abbildung 9 gezeigt.

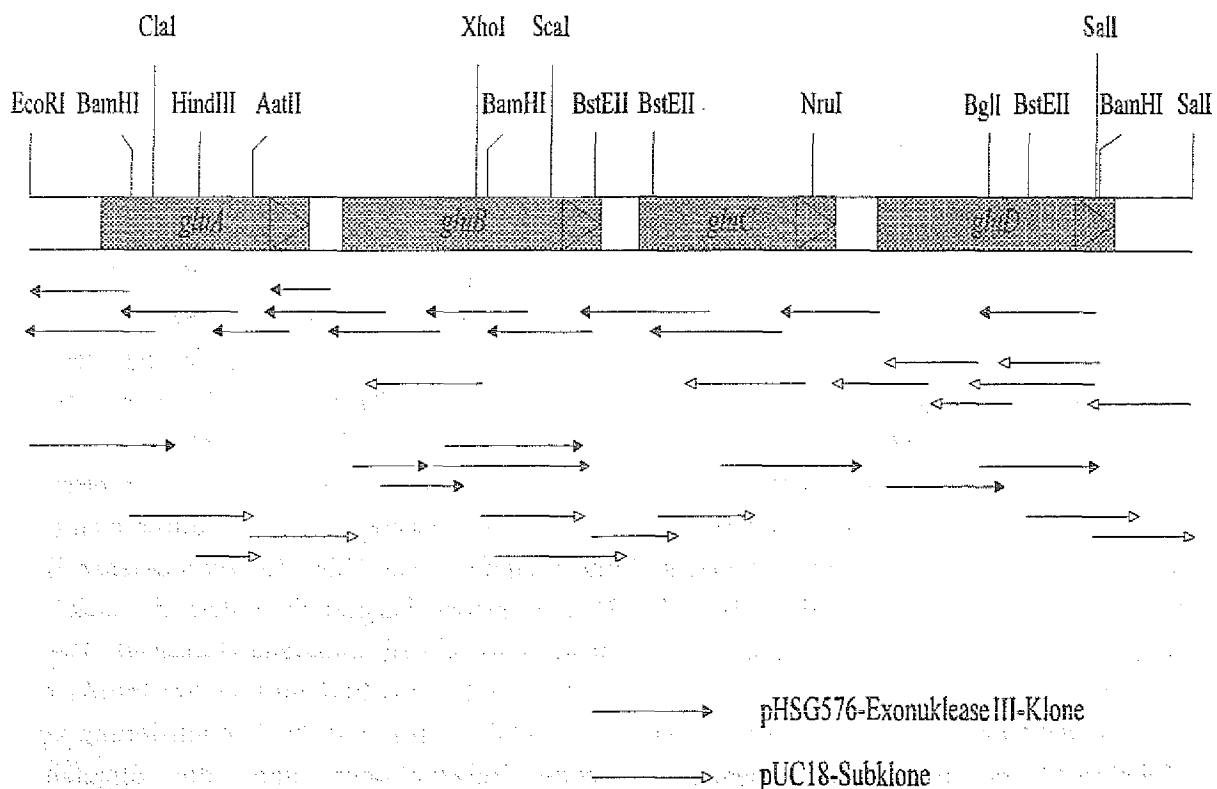


Abbildung 8: Sequenzierungsstrategie des *glu*-Locus (3,977 kb) aus *C. glutamicum* mit Restriktionskarte. Die geschlossenen Pfeile stellen Exonuklease III-Klone im Vektor pHSG576 dar. Subklone in pUC18 sind durch offene Pfeile gekennzeichnet. Die Boxen repräsentieren die vier offenen Leseraster die als potentielle Gene auf Homologien zu bekannten Genen untersucht wurden (siehe 3.5.5.).

1 CACATTGCGACGCTTATTTAACACGCAATATCTATCATGTGATAGGTAA
51 TTTCGGACAGGATCGGAGACTACCCCCAAACCTTGCCCCCTACCGACCTG
101 CGAAAATGCTGGTAAATGTAGTGCTATTTGTTTCAAATGGACTCATTCA
151 CACAATTGCGAACATTCTCGGCACAACTGCTTTAAGCTACCCTTATGAC
201 GCAGACCACAGAATCCCCGATGATCAAGATGACGGGAGTGCAAAAATACT
M I K M T G V Q K Y
gluA
251 TCGGCGACTTTCATGCCCTTACGGATATTGATCTTGAAATTCAGAGGA
F G D F H A L T D I D L E I P R G
301 CAAGTTGTCGTCGTACTTGGACCATCCGGATCCGGCAAGTCAACCCTTG
Q V V V V L G P S G S G K S T L C
351 CCGCACGATCAACCGTCTCGAAACCATCGAGGAAGGCACCATCGAAATCG
R T I N R L E T I E E G T I E I
401 ATGGAAAGGTTCTCCCAGAAGAAGGTAAAGGCTTAGCCAATCTCCGCGCC
D G K V L P E E G K G L A N L R A
451 GATGTCGGAATGGTATTCCAGTCCTTCAACCTCTTCCCCACCTCACCAT
D V G M V F Q S F N L F P H L T I
501 CAAAGACAACGTCACTCTTGCACCCATCAAAGTGCGAAAGATGAAAAAGT
K D N V T L A P I K V R K M K K
551 CTGAAGCCGAAAAGCTTGCGATGAGCCTGTTGGAACGCGTCGGCATCGCA
S E A E K L A M S L L E R V G I A
601 AACCAAGCTGATAAATATCCGGCGCAACTGTCCGGCGGTCAGCAACAGCG
N Q A D K Y P A Q L S G G Q Q Q R
651 TGTGGCCATCGCGTGTGCACTTGCGATGAACCCAAAGATCATGCTTTTCG
V A I A C A L A M N P K I M L F
701 ACGAGCCCACCTCCGCCCTTGACCCTGAAATGGTCAACGAAGTGTGAC
D E P T S A L D P E M V N E V L D
751 GTCATGGCAAGCCTTGCCAAGGAAGGCATGACGATGGTGTGTGTTACCCA
V M A S L A K E G M T M V C V T H
801 CGAGATGGGATTGCGACGCAAAGCAGCCGATCGTGTGTTGTTTCATGGCGG
E M G F A R K A A D R V L F M A
851 ATGGGCTCATTGTGGAAGATACGGAACCAGATTCTTCTTACCAACCCT
D G L I V E D T E P D S F F T N P
901 AAGTCTGATCGTGCAAAAGACTTCCTCGGCAAGATCCTTGCCCAGTAGTT
K S D R A K D F L G K I L A H -
951 TTTGCTGCGCCTCTATCTTCAGAGTCACTTCTTTCAGTGTCAATTTTTCTC
1001 GGCCCTAATCCCCCGCTGGAGTTCAATCAGCGATTGCAACCTTTTAGATA

1951 AGTGTGACGGCTTTAAAAGCCAGCTTTAAGAAATGTGCGTGGCGCTTAAA
 - ----->
 2001 ACCCCGAAAGCGCCACGCACAACCCATTTAAGTTCATGATTTATTTCCAT
 <-----
 2051 CCTTAACAAGGAGCACCACCACATGAGCACTTTGTGGGCGGATCTGGGTC
 M S T L W A D L G
 gluC
 2101 CGTCTCTACTTCCAGCTTTTTGGGTGACCATCAAACCTCACCATTTATTC
 P S L L P A F W V T I K L T I Y S
 2151 GCCATCGGCGCCATGATTTTCGGAACCATCCTCACCACAATGAGGGTCTC
 A I G A M I F G T I L T T M R V S
 2201 GCCCGTTAAATCCTCCGCACGTTGTCCACGGCGTACATCAACACAGTCC
 P V K I L R T L S T A Y I N T V
 2251 GAAATACCCCACTTACTCTTGTGGTGCTGTTTTGCTCCTTTGGCCTTTAC
 R N T P L T L V V L F C S F G L Y
 2301 CAAAACCTCGGGTTGACTTTGGCGGGCCGTGAAAGCTCCACATTCTTGGT
 Q N L G L T L A G R E S S T F L V
 2351 GGATAATAACTTCCGCTTGGCCGTA CTGGCTTCATTTTGTACACCTCAA
 D N N F R L A V L G F I L Y T S
 2401 CCTTCGTTGCCGAGTCCCTGCGTTCGGGTATTAACACCGTGCACTTTGGG
 T F V A E S L R S G I N T V H F G
 2451 CAAGCAGAAGCTGCGCGTTCCCTAGGACTGGGCTTTGGCGCGACTTTCCG
 Q A E A A R S L G L G F G A T F R
 2501 TTCCATTATTTTCCCGCAGGCTGTGCGCGCCGCGATCGTCCCTTTGGGCA
 S I I F P Q A V R A A I V P L G
 2551 ACACACTGATCGCACTGACTAAGAACACCACCATCGCCTCTGTCATTGGA
 N T L I A L T K N T T I A S V I G
 2601 GTTGGCGAAGCCTCCCTGCTGATGAAAGCCACCATCGAAAATCACGCCAA
 V G E A S L L M K A T I E N H A N
 2651 CATGCTATTTGTCGTGTTGCGGATCTTCGCCGTTGGCTTCATGATTCTGA
 M L F V V F A I F A V G F M I L
 2701 CCTGCCTATGGGCCTTGGCTTGGGCAAACCTCTCTGAGCGTTTGGCGGTGA
 T C L W A L A W A N S L S V W R -
 2751 AGAAGTAATGGCTAATACAGTTCGCGCAACAGTCCTCTACGATGCTCCTG
 2801 GACCAAAGGGCCGTCGATTCAACCTCATAATCACCATTCTCACGGTGTT
 2851 CTGGGATTGGTGGCTCCTCTTCTGGATTGGCTCCATGCTTTCAGGCAACG
 M L S G N
 gluD

2901 GCCAACTCGATGCCAACAAATGGACTCCGTTTCATCAATTCCCAAACCTGG
 G Q L D A N K W T P F I N S Q T W
 2951 ACCACCTACATTCTTCCTGGTTTGTGGGGCACGCTGAAATCTGCCGTGTT
 T T Y I L P G L W G T L K S A V F
 3001 CTCGGTGATCTTGGCTCTGGTCATGGGTACCGCACTGGGTCTTGGCCGTA
 S V I L A L V M G T A L G L G R
 3051 TCTCTGAAATCAGGATTCTCCGCTGGTTCTGCGCCGTCATCATCGAGACT
 I S E I R I L R W F C A V I I E T
 3101 TTCCGAGCCATTCCGGTTCTGATCCTCATGATTTTCGCCTACCAGATGTT
 F R A I P V L I L M I F A Y Q M F
 3151 CGCCCAGTACAACATCGTGCCGTCGAGCCAGCTCGTGTTCCGCCGCCGTGG
 A Q Y N I V P S S Q L V F A A V
 3201 TATTCGGTCTGACCATGTACAACGGTTCTGTGATCGCAGAGATTCTGTGT
 V F G L T M Y N G S V I A E I L C
 3251 TCTGGTATCGCTTCCCTGCCTAAGGGGCAGAAGGAAGCAGCGATTGCGTT
 S G I A S L P K G Q K E A A I A L
 3301 GGGTATGTCTTCTAGGCAAACCACCTGGTCAATCTTGTTGCCTCAGGCCG
 G M S S R Q T T W S I L L P Q A
 3351 TGGCTGCAATGCTCCCAGCGTTGATCTCTCAGATGGTTATTGCACTGAAG
 V A A M L P A L I S Q M V I A L K
 3401 GACTCCGCACTTGGTTACCAGATCGGCTACATTGAAGTGGTTCGTTCCGG
 D S A L G Y Q I G Y I E V V R S G
 3451 TATTCAGTCCGCGTCTGTCAACCGCAACTACCTTGCAGCGCTGTTTGTG
 I Q S A S V N R N Y L A A L F V
 3501 TTGCGCTGATCATGATTGTTCTGAACTTCTCCCTCACCGCTCTGGCTTCT
 V A L I M I V L N F S L T A L A S
 3551 CGCATCGAGCGCCAGTTGCGTGCAGGTAGGGCTCGTAAGAACATTGTTGC
 R I E R Q L R A G R A R K N I V A
 3601 CAAGGTCCTTGAGCAGCCAGATCAAGGTCTGGAGACCAAGGACAATGTCA
 K V P E Q P D Q G L E T K D N V
 3651 ATGTCGACTGGCAGGATCCTGATTATAAGGATCTGAAAACCCCTGGAGTT
 N V D W Q D P D Y K D L K T P G V
 3701 CAGTAACTCCCTTACCCCGGATGATTCCCATCCGGGGTTTAGTTTTTCAA
 Q - -----> <-----
 3751 ATCCTCGATTGCGCGGTCTAGCGCTTCCCGCGCAAGGTCCATGGACATTC
 3801 CAGCCGGAAATCCCCGCGGTAGAGCGCACCAACGACGGGCCGAAGCGCTT
 3851 TGTCGTAGTCGGCGCGGTCTGCGGAATCTTGGTCTCTGAGCGCGCCTTT

3901 TTCACGGCCACCGCCCGCGCCGTGTCCCGCTCATCGGCCTGGTCGATTTG

3951 CTCAAGCGCCGCAGCACGCGTTTGCTT

Abbildung 9: Die komplette Sequenz des *glu*-Locus mit den vier offenen Leserastern, die die Gene *gluA*, *gluB*, *gluC* und *gluD* darstellen, und den abgeleiteten Aminosäuresequenzen. Die Pfeile unter der Sequenz markieren die potentiellen "stem-loops". Der Poly T-Schwanz am 3'-Ende der vermutlichen Terminationsschleife ist unterstrichen dargestellt. Die Konsensussequenz der Signalsequenz-Spaltstelle im Bindeprotein ist doppelt unterstrichen und der N-terminale Cysteinrest des reifen Proteins durch einen Doppelpfeil gekennzeichnet.

3.3.5. Homologievergleiche und Analysen der offenen Leseraster

Aus der Sequenzanalyse des *glu*-Locus konnten vier "Offene Leseraster" (ORF) identifiziert werden, die sich alle in der gleichen Leserichtung befinden. Alle "Offenen Leseraster" zeigten bei Datenbankanalysen der von den DNA-Sequenzen abgeleiteten Peptide (Programme BLASTP und BLASTX des HUSAR Pakets 2.1 bzw. 3.0 beim DKFZ in Heidelberg) starke Ähnlichkeiten zu Proteinen anderer Bindeprotein-abhängiger Transportsysteme. Sie wurden mit *gluA* bis *gluD* bezeichnet, da es sich um die Gene des Glutamataufnahmesystems handeln muß.

3.3.5.1. Sequenzanalyse von *gluA* und dem abgeleiteten Protein

Das Gen *gluA* umfaßt 726 Basenpaare (Abb. 9). Das abgeleitete Protein besteht aus 242 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 26485 Da und hat einen hydrophilen Charakter. In der Sequenz ist deutlich die "site A" zu finden, die zu dem Hybridisierungssignal geführt hat. Die Aminosäuresequenz des konservierten Bereichs zur ATP-Bindung lautet:

L G P S G S G K S

und stimmt folglich sehr gut mit der vermuteten Konsensussequenz überein, lediglich zwei Aminosäurereste sind gegenüber der für die Oligonukleotidsynthese verwendeten Sequenz ausgetauscht.

In einer Sequenzanalyse mit Hilfe des Programms CLUSTAL (Higgins & Sharp, 1988) wurde GluA mit den entsprechenden Proteinen aus den Glutaminaufnahmesystemen GlnQ aus *Bacillus steaothermophilus* (Wu & Welker, 1991) und GlnQ aus *E. coli* (Nohno *et al.*, 1986) verglichen (Abb. 10). Außerdem wurden MalK (Gilson *et al.*, 1982) aus dem Maltosetransportsystem und HisP (Kraft & Leinwand, 1987) aus dem Histidintransportsystem, jeweils von *E. coli*, in den Vergleich miteinbezogen. Diese beiden Systeme sind in *E. coli* und *S. typhimurium* sehr ähnlich und sind die am genauesten untersuchtesten Bindeprotein-abhängigen Systeme (Schneider, 1990; Ames, 1990). Der

Ähnlichkeitsgrad ist mit 62 % bzw. 58 % identischen und 77 % bzw. 74 % ähnlichen Aminosäureresten bei den ersten 200 Aminosäuren zu GlnQ aus *B. stearothermophilus* bzw. *E. coli* am deutlichsten.

Insgesamt sind fünf konservierte Bereiche zu erkennen, die nach Ames (1986) mit "site A - D", und "site F" bezeichnet sind und in allen analogen Proteinen Bindeprotein-abhängiger Systeme auftreten. Zwischen "site B" und "site F" existiert ein Bereich mit vier ähnlichen Aminosäuren, der bei Ames als "site E" (Konsensus I-X E-L-K) benannt ist, aufgrund der relativ schwachen Ausprägung bei dem Sequenzvergleich jedoch hier nicht gekennzeichnet ist. "Site A" und "site B" werden auch als "Walker sites" (Walker *et al.*, 1982) bezeichnet und sind die Konsensussequenzen, die eine Nukleotidbindungs-falte bilden und für die Bindung und Hydrolyse von Nukleotiden verantwortlich gemacht werden, wie durch kristallographische Studien untermauert werden konnte (Fry *et al.*, 1986). Die beiden "Walker-sites" sind Bestandteil vieler funktionell sehr unterschiedlicher Enzyme, die lediglich Nukleotidbindung und -spaltung gemeinsam haben (Higgins *et al.*, 1986). Bei "site A" wird vermutet, daß der Lysinrest direkt an der Nukleotidbindung beteiligt ist, während die anderen Aminosäuren einen glycinreichen Loop bilden, der Konformationsänderungen eingehen kann. "Site B" besteht aus einem Aspartatrest, der vermutlich MgATP bindet, mit vorausgehend vier hydrophoben Resten, die einen wasserfreien Raum schaffen sollen (Fry *et al.*, 1986; Higgins *et al.*, 1988). Die Funktionen der konservierten "sites C-F" sind unklar.

Mit Ausnahme von MalK muß die recht exakte Übereinstimmung in der Länge der verglichenen Proteine und die ähnlichen Distanzen zwischen den konservierten Bereichen hervorgehoben werden. MalK ist um einen carboxyterminalen Abschnitt von ca. 140 Aminosäuren gegenüber GluA (*C. glutamicum*), HisP, GlnQ (*E. coli*) und GlnQ (*B. stearothermophilus*) vergrößert. Dieser carboxyterminalen Domäne wird beim Maltosesystem eine regulatorische Funktion zugeschrieben und erhält daher eine Sonderstellung (Schneider & Walter, 1991; Kühnau *et al.*, 1991).

3.3.5.2. Sequenzanalyse von *gluB* und dem abgeleiteten Protein

Das Gen *gluB* ist 120 Basen von *gluA* entfernt und besteht aus 885 Basenpaaren (Abb. 9), die für ein überwiegend hydrophiles Protein von 295 Aminosäuren mit 31667 Da kodieren. Auffallend an diesem Protein ist die sehr starke Homologie zu GlnH aus *B. stearothermophilus*, dem Bindeprotein des Glutaminaufnahmesystems mit 32 % identischen und 51 % ähnlichen Aminosäuren über einen Bereich von 203 Aminosäuren. Ausgenommen sind lediglich die ersten 42 Aminosäuren am N-terminalen Ende und das carboxyterminale Ende, das bei GlnH fehlt. Das N-terminale Ende hat eine auffallende Ähnlichkeit zu MalX (Gilson *et al.*, 1988), einem membrangebundenen Protein aus *S. pneumoniae* und ist aufgrund des hydrophoben Charakters mit vorangehend wenigen positiven Ladungen vermutlich eine Signalsequenz, was auch durch eine Computeranalyse mit dem Programm SIGNALSEQ bestätigt wurde:

M S A K R T F T R I G A I L G A T A L A G V T L T A - C G D S S G
+ + + -

Die postulierte Signalsequenz besteht aus 26 Aminosäuren mit drei positiv geladenen Aminosäuren am N-Terminus. Der hydrophobe Abschnitt umfaßt 21 Aminosäuren, indem lediglich eine positive Ladung (Arginin) enthalten ist. Abgesehen von den ersten sechs Aminosäuren sind 18 der folgenden 26 Aminosäuren ähnlich zu dem entsprechenden MalX-Bereich. Die unterstrichenen Aminosäuren zeigen eine typische Konsensussequenz, die auch bei MalX auftritt und von Gram-negativen Prolipoproteinen bekannt ist (Yamaguchi *et al.*, 1988). Dort dient diese Sequenz als Spaltstelle für eine lipoproteinspezifische Signalpeptidase, einer Signalpeptidase II, mit anschließender Lipidmodifizierung am N-terminalen Cysteinrest (Wu, 1987).

Auffallend an der intergenischen Region zwischen *gluB* und *gluC* ist ein Bereich, der einen "stem-loop" mit einer freien Energie von -27,4 kcal/mol bilden kann. Dabei besteht der "stem" aus 14 G/C-reichen Basenpaarungen und der "loop" aus zehn ungepaarten Basen. Dahinter folgt kein ausgeprägter Poly-T-Abschnitt, so daß die Vermutung naheliegt, daß es sich um eine RNA-stabilisierende Schleife handelt. Dieser Mechanismus, mit einer vermutlich stärkeren Expression von *gluB* und erhöhter Synthese des Bindeproteins im Vergleich zu den anderen Proteinen, wird ebenfalls bei den entsprechenden Genen der Oligopeptidaufnahmesysteme aus *S. typhimurium* (Hiles *et al.*, 1987) und *B. subtilis* (Perego *et al.*, 1991) diskutiert. Desweiteren befindet sich am 3'-Ende von *gluB* eine Nukleotidsequenz, die einen "stem-loop" mit einer freien Energie von -11,2 kcal/mol bilden kann. Da die Sequenz mit acht Basenpaarungen im "stem" und drei freien Basen im "loop" jedoch noch in der Kodierungsregion liegt, ist eine Funktion als Stabilisations- oder Terminationsschleife unwahrscheinlich.

3.3.5.3. Sequenzanalyse von *gluC* und dem abgeleiteten Protein

Der dritte "Offene Leseraster" umfaßt 675 Basenpaare, die ein Protein von 225 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 24334 Da ergeben (Abb. 9). Es ist 124 Bp von *gluB* entfernt. Nach den Programmen SOAP und RAOARGOS zur Bestimmung membranüberspannender Segmente handelt es sich um ein integrales Membranprotein mit drei transmembranen Helices, die sich über die Aminosäuren 22-38, 97-113 und 195-211 erstrecken. Allerdings wurden in dem Programm HELIXMEM zwei weitere Segmente von den Aminosäuren 64-84 und 145-165 als membranassoziierte Helices identifiziert (Abb. 11). Die von anderen Membranproteinen Bindeprotein-abhängiger Systeme bekannte Konsensussequenz EAA---G-----I-LP findet sich in *GluC* wieder, allerdings führt ein Basenaustausch zu einem Phenylalaninrest anstelle des Leucinrestes.

3.3.5.4. Sequenzanalyse von *gluD* und dem abgeleiteten Protein

Das Gen *gluD* beinhaltet 819 Basenpaare, die ein Protein von 273 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 29841 kodieren (Abb. 9). Das Protein umfaßt nach den Programmen SOAP und RAOARGOS vier potentielle transmembrane Helices von den Aminosäuren 29-54, 75-90, 150-171 und 200-221. Nach dem Programm HELIXMEM wurde ein zusätzliches Segment von den Aminosäuren 101-121 als membranassoziiert erkannt (Abb. 11). Das Gen ist 138 Basen von *gluC* entfernt. Sieben Basen hinter dem Gen befindet sich die Struktur eines potentiellen "stem-loops" mit einer errechneten freien Energie von -26,6 kcal/mol, bestehend aus zehn G/C-reichen Basenpaarungen im "stem" und vier ungepaarten Basen im "loop". Darauf folgt eine Serie von insgesamt sieben Thymidinresten. Hierbei kann es sich um eine Terminationsschleife handeln, die die Transkription unabhängig von einem Terminationsfaktor beendet.

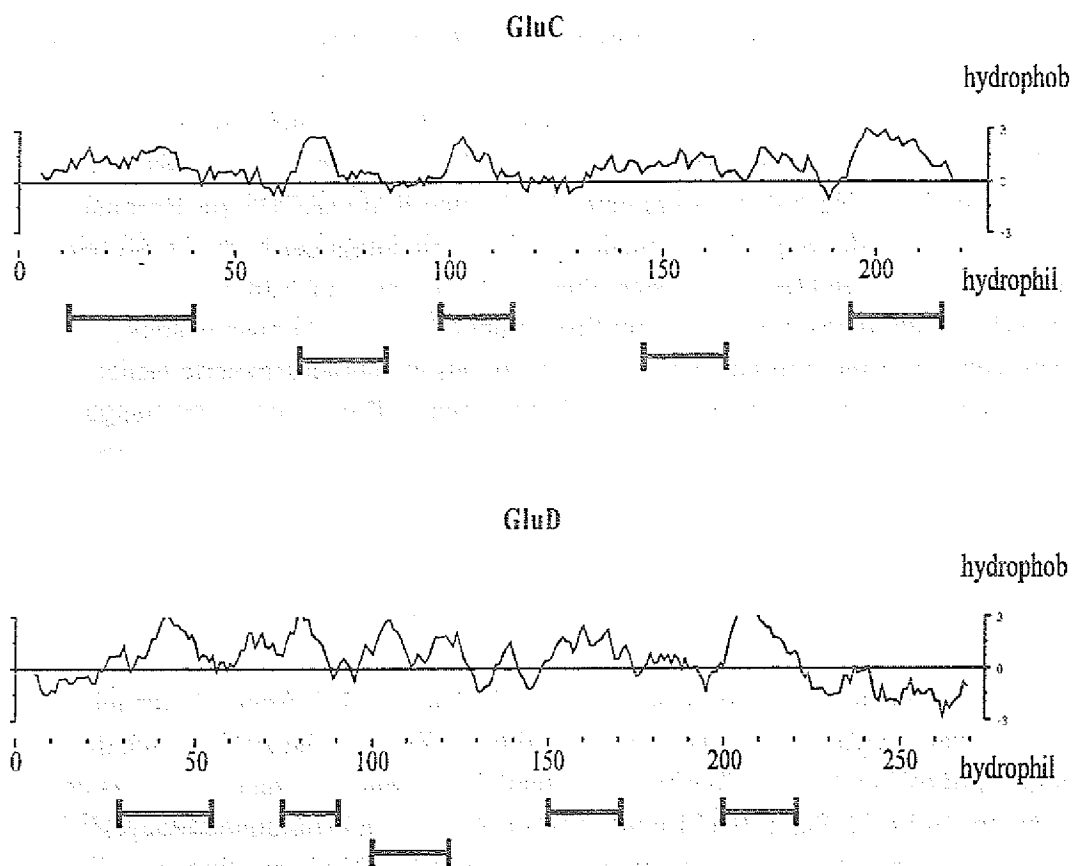


Abbildung 11: Die Hydrophobizitätskurven der Gene *gluC* und *gluD* wurden mit dem Programm PEPLOT nach der Methode von Kyte & Doolittle (1982) erstellt. Die mit den Programmen SOAP und RAOARGOS ermittelten transmembranen Segmente sind als Balken unter die Sequenzen gezeichnet. Die nach unten versetzt gezeichneten Balken stellen die nach dem Programm HELIXMEM identifizierten zusätzlichen membranassoziierten Helices dar.

3.3.6. Sequenzierung der den *glu*-Genen benachbarten DNA-Bereiche

Zur Kontrolle, ob vor dem 5'-Ende von *gluA* ein weiteres Gen des Transportsystems lokalisiert ist, wurde das 8 kb-*ClaI*-Fragment aus pKW12, das ebenfalls bei der Hybridisierung ein Signal zeigte, in pHSG576 subkloniert (pHSG8,0). Nach der Restriktionskarte des 3,7 kb *EcoRI/SalI*-Fragments und dem Hybridisierungsergebnis, mußte das 8 kb *ClaI*-Fragment die ersten 390 Basenpaare des 3,7 kb-Fragments mit der Konsensussequenz für die "site A" und den am 5'-Ende von *gluA* gelegenen Bereich beinhalten. Nach vorhergehender Erstellung einer Restriktionskarte des 8 kb-Fragments wurden durch geeignete Restriktionen (*SalI* bzw. *HindIII*) die Deletionsklone pHSG4 und pHSG6 isoliert, die 1 bzw 1,2 kb der beiden Enden des großen Fragments enthalten. Nach der Sequenzierung war bei pHSG4 eindeutig die "site A" kodierende Region zu finden, so daß bei diesem Plasmid wie erwartet der benachbarte Abschnitt von *gluA* kloniert worden war. In der anderen Leserichtung wurden 412 Basen sequenziert, d. h. die Sequenz reicht bis auf 200 Basen an das 3,7 kb-Fragment heran. Die erhaltene

Sequenz wurde mit dem Programm BLASTX des HUSAR-Pakets 2.1 auf Homologien zu anderen Proteinen getestet. Es waren jedoch weder zu Transportproteinen noch zu Regulationsproteinen signifikante Ähnlichkeiten festzustellen, so daß der am 5'-Ende des 3,7 kb-Fragments gelegene Bereich als Kodierungsregion für weitere Gene des Glutamataufnahmesystems unwahrscheinlich ist.

Aus der Sequenzanalyse konnten weder ein Promotor vor *gluA* oder den anderen Genen, noch Ribosomenbindungsstellen identifiziert werden. Da für *C. glutamicum* Konsensussequenzen für Promotoren und Ribosomenbindungsstellen bislang nicht bekannt sind, gestaltet sich die Erkennung solcher Regionen aus der Sequenz sehr schwierig.

Auf dem Bereich, der dem 3'-Ende von *gluD* benachbart und auf dem 0,5 kb *SaII*-Fragment enthalten ist, konnte im Abstand von 663 Basen zu *gluD* das 3'-Ende des Gens *recA* (Billman-Jacobe, unveröffentlicht) identifiziert werden, das in entgegengesetzter Orientierung abgelesen wird. Es kann daher davon ausgegangen werden, daß der komplette DNA-Bereich, der das Glutamataufnahmesystem kodiert, kloniert und sequenziert werden konnte.

3.3.7. Messung der Glutamataufnahme nach Überexpression des sequenzierten Bereiches im Wildtyp 13032

Zur Überprüfung, daß der sequenzierte Abschnitt mit den vier Genen *gluA*, *gluB*, *gluC* und *gluD*, tatsächlich die Gene des Glutamataufnahmesystems enthält, wurde die Glutamataufnahmeaktivität im Wildtyp mit dem Plasmid pKW12-EcoRI im Vergleich zu dem Stamm mit den Klonierungsvektor pKW3 und dem Plasmid pKW12 gemessen. Das Plasmid pKW12-EcoRI (siehe 3.5.4.) trägt das komplette aus dem sequenzierten 3,977 kb und dem 0,5 kb *SaII*-Fragment bestehende 4,5 kb-Fragment im Hintergrund von pKW3. Das Plasmid pKW12-EcoRI führte ebenso wie pKW12 zur Komplementation der Mutante M10 mit Wachstum auf Glutamat als einziger C-Quelle. Die Bestimmungen der exakten Aufnahmezeiten in diesem Experiment wurden in dem Wildtyp 13032 durchgeführt, da M10 als undefinierte NNG-Mutante zu diesem Zweck ungeeignet erschien. Die Messungen erfolgten mit allen drei Stämmen nach Anzucht in CGT-Medium a) mit Glukose und b) mit Glutamat als Kohlenstoffquelle.

Ein Vergleich der Aufnahmeaktivitäten zeigt, daß mit dem Plasmid pKW12-EcoRI bei Anzucht mit Glutamat mit $14,9 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ eine vergleichbar hohe Transportrate erreicht wird wie mit dem Plasmid pKW12 mit $17,0 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$. Beide Aufnahmezeiten liegen deutlich über dem mit pKW3 gemessenen Kontrollwert von $5,0 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$. Da der Vektor pKW3 kein Insert trägt, handelt es sich in diesem Fall nur um die chromosomal kodierte Aufnahmeaktivität des Wildtyps. Bei Wachstum auf Glukose sind die Aufnahmezeiten erwartungsgemäß niedriger (Krämer *et al.*, 1990a). Aber auch hier war mit $2,11 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ mit pKW12-EcoRI eine deutlich erhöhte Aktivität gegenüber dem Kontrollexperiment mit pKW3 ($0,43 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) festzustellen. Überraschend ist allerdings bei Wachstum auf Glukose die um den Faktor zwei höhere Rate mit dem Plasmid pKW12 ($4,61 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) gegenüber dem Wert mit pKW12-EcoRI. Insgesamt waren die Aufnahmezeiten mit pKW12-EcoRI

jedoch gegenüber pKW3 fünffach (Glukose) bzw dreifach (Glutamat) erhöht, woraus folgt, daß auf dem 4,5 kb-Insert mit den sequenzierten Genen alle essentiellen Gene zur Glutamataufnahme enthalten sind. Die mit pKW12-EcoRI ermittelten Werte sind zwar in beiden Fällen etwas niedriger als mit pKW12, jedoch sprechen die vergleichbar hohen Aufnahmeraten bei Anzucht der Zellen auf Glutamat gegen einen genetischen Unterschied der beiden Plasmide in bezug auf die Glutamataufnahme.

Außerdem belegen die Daten, daß die Glutamataufnahme im Wildtyp mit allen drei Plasmiden bei Wachstum auf Glutamat induzierbar ist, wie bereits für den Wildtyp ohne Plasmid beschrieben (Krämer *et al.*, 1990a). Auch dieses Ergebnis spricht dafür, daß alle notwendigen Gene des Transportsystems mit dem sequenzierten Bereich erfaßt wurden. In Abbildung.11 sind die Experimente als Diagramm dargestellt, in Tabelle 12 sind die daraus errechneten Aufnahmeraten zusammengefaßt.

Bild A

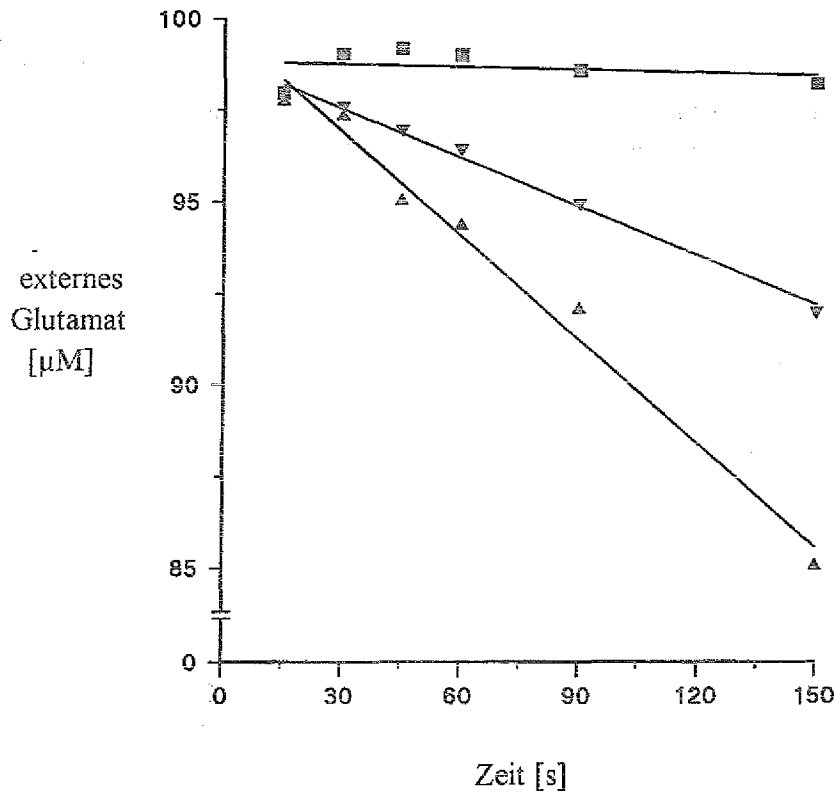


Bild B

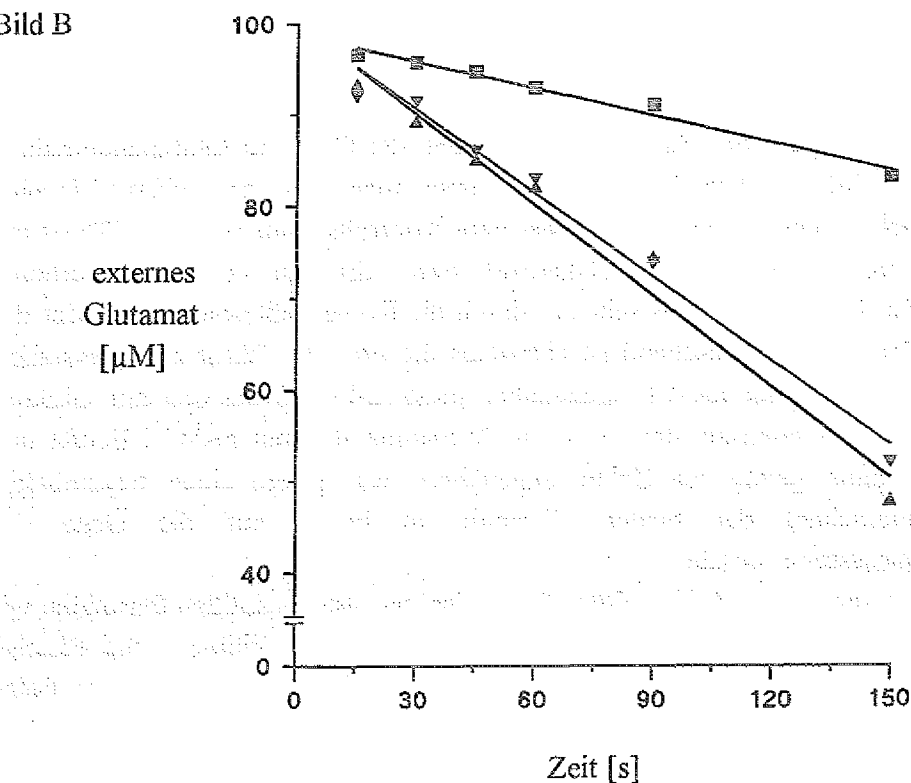


Abbildung 11: Glutamataufnahme, dargestellt als Abnahme des externen Glutamats, vom Wildtyp 13032 mit pKW12-EcoRI (▼), das den sequenzierten Bereich als Insert enthält, von 13032 mit pKW12 (▲) und von 13032 mit dem Klonierungsvektor pKW3 (■). Bild A zeigt die Aufnahme bei Anzucht auf Glukose und Bild B bei Anzucht auf Glutamat als jeweils einziger C-Quelle.

Tabelle 12: Glutamataufnahmeraten des in Abb. 12 gezeigten Aufnahmetests mit Glukose- bzw. Glutamat-gezogenen Zellen des Wildtyps 13032 mit den Plasmiden pKW12-EcoRI, pKW12 und pKW3.

Stamm	C-Quelle	Aufnahmerate [nmol x mg ⁻¹ x min ⁻¹]
WT <pKW3>	Glukose	0,43
WT <pKW12>	"	4,61
WT <pKW12-EcoRI>	"	2,11
WT <pKW3>	Glutamat	5,0
WT <pKW12>	"	17,0
WT <pKW12-EcoRI>	"	14,90

Die Aufnahmeraten zeigen, daß das 4,5 kb-Fragment alle Gene zur Glutamataufnahme beinhalten muß, obwohl die Aufnahme gegenüber dem Ausgangsplasmid pKW12 in allen Experimenten leicht erniedrigt war. Gegenüber dem Kontrollstamm WT<pKW3> ist mit WT<pKW12-EcoRI> eine vierfach (Glukose) bzw. dreifach (Glutamat) erhöhte Aufnahmeaktivität festzustellen, was sehr gut durch die Kopienzahl von drei bis vier des Vektors zu erklären ist. Überraschend ist allerdings die um den Faktor zwei verstärkte Aufnahme des Wildtyps mit pKW12 gegenüber pKW12-EcoRI bei den auf Glukose gezogenen Zellen. Im Gegensatz dazu sind die Aufnahmeraten mit pKW12-EcoRI und pKW12 auf Glutamat gezogenen Zellen angenähert, was gegen einen wesentlichen genetischen Unterschied der beiden Plasmide in bezug auf die Gene des Glutamataufnahmesystems spricht.

Außerdem belegen die Daten, daß die Gene des Aufnahmesystems auf den Plasmiden wie beim Wildtyp mit pKW3 in diesem Experiment und für den Wildtyp ohne Plasmid beschrieben (Krämer *et al.*, 1990a), eine induzierbare Glutamataufnahme zur Folge haben.

4. Diskussion

4.1. Lysinexport

Die in dieser Arbeit vorgelegten Untersuchungen bestätigen die anhand biochemischer Daten aufgestellte Hypothese von Bröer & Krämer (1991a), daß der Export von Lysin bei *C. glutamicum* von einem spezifischen Transportsystem katalysiert wird. Es konnten mit den Stämmen 35/48 und 35/48res-a Mutanten mit einem spezifischen Defekt des Lysinexports isoliert werden. Selbst bei internen Konzentrationen von bis zu 250 mM Lysin waren im Medium lediglich Werte bis 0,05 mM feststellbar. Zudem zeigte der zeitliche Verlauf des Wachstums nahezu konstant hohe Innenkonzentrationen fast während der gesamten exponentiellen Wachstumsphase. Dagegen scheidet der Ausgangsstamm DG52-5 bis zu 20 mM Lysin aus bei cytosolischen Konzentrationen bis zu 50 mM. Entsprechend verhält sich die interne Konzentration des Aspartats, dem Ausgangssubstrat der Lysinsynthese. Bei 35/48 liegen die Werte grundsätzlich höher und steigen kontinuierlich bis auf 45 mM gegen Ende des Wachstums an. Bei DG52-5 jedoch ist ein Anstieg der Konzentration nur bis zu dem Zeitpunkt der kurzfristig hohen Lysinkonzentration festzustellen (21 mM), danach erfolgt eine drastische Abnahme auf Werte unter 2 mM. Diese geringe Aspartatkonzentration im Produzentenstamm DG52-5 kann durch verstärkte Aspartatkinase-Aktivität bei gleichzeitig erhöhter Lysinexportrate erklärt werden (Schrumpf, 1991). Im Einklang damit steht, daß im Stamm DG52-5 durch Zugabe der Aspartatvorstufe Fumarat eine Erhöhung der Aspartatkonzentration und der Lysinausscheidung erreicht werden kann (Menkel *et al.*, 1989). Offensichtlich verursacht der Defekt im Lysinexport bei 35/48 trotz des *feedback*-resistenten Charakters der Aspartatkinase einen Rückstau des Ausgangssubstrats Aspartat. Interessanterweise konnte beim Threonin, das ebenfalls von Aspartat ausgehend synthetisiert wird, nur eine leichte Konzentrationserhöhung bei 35/48 gegenüber DG52-5 festgestellt werden. Die Hemmung der Homoserindehydrogenase durch Threonin und die Repression der Homoserindehydrogenase und Homoserinkinase durch Methionin (Miyajima & Shio, 1971; Follett *et al.*, 1988) sorgen also für einen strikt regulierten Substratfluß in Richtung Threonin, Isoleucin und Methionin.

Eine Komplementation der restriktionsdefekten Mutante 35/48res-a konnte nicht erreicht werden, obwohl die in dem Vektor pWK0 erstellte Plasmidgenbank eine rechnerische Wahrscheinlichkeit der Repräsentation eines Gens von >0,99 ergab. Der Nachteil dieses Ansatzes war der notwendige Umweg über *E. coli*, da der Vektor in *E. coli* eine hohe Kopienzahl aufwies. Falls das Gen bzw. die Gene für den Lysinexporter in *E. coli* exprimiert wurde(n), hatten die entsprechenden Transformanten durch zu hohe Konzentration des Membranproteins vermutlich einen erheblichen Wachstumsnachteil, wie es für andere Membranproteine gezeigt werden konnte (Henning *et al.*, 1979; Martin *et al.*, 1989; Kronmeyer, 1990). Folglich könnten bei diesem Schritt die potentiell komplementierenden Klone ausselektiert worden sein, oder nur solche Klone mit verändertem Gen gewachsen sein. Besonders deutlich wurde die negative Wirkung einzelner Genabschnitte bei dem Konjugationsexperiment zur Komplementation von 35/48res-a mit Hilfe einer

Cosmidgenbank. Bei dem verwendeten Vektor pEH0 handelt es sich um einen *high-copy*-Vektor, was zur Folge hatte, daß nur 68 % der Cosmide intakt in dem Rezipienten erhalten wurden.

Das Experiment zur Isolierung eines Lysin-Nichtausscheiders ausgehend von II7/3 zeigte eine grundsätzliche, weitere Problematik bei der molekularen Analyse des Lysinexports auf. Trotz der großen Anzahl getesteter Klone konnte die gewünschte Mutante nicht isoliert werden. Daraus muß auf einen negativen Effekt einer solchen Mutation, die zu einer hohen internen Lysinkonzentration führt, geschlossen werden. Wie bei der Mutante 35/48 belegt, führt der Exportdefekt nicht nur zu erhöhten Lysinkonzentrationen, sondern auch zu einem Rückstau zumindest bis zum Aspartat. Die Vermutung liegt daher nahe, daß in 35/48 eine zweite Mutation notwendig sein könnte, um diese Veränderung im Stofffluß zu bewältigen. Da der Ausgangsstamm von 35/48, DG52-5, durch mehrere Mutations- und Selektionsschritte isoliert wurde, die stets auf Veränderung im Lysinstoffwechsel ausgelegt waren, könnten hier Mutationen vorliegen, die hohe Lysinkonzentrationen und den Rückstau der Zwischenprodukte tolerierbar machten. Der Ausgangsstamm von II7/3, R127, dagegen ist nie auf Lysinproduktion selektioniert worden und in dieser Hinsicht vermutlich genotypisch wie der Wildtyp. Unterstützt wird diese Annahme durch die Beobachtung, daß die Überexpression von Genen für deregulierte Homoserindehydrogenasen auf *high-copy*-Vektoren zu offensichtlich toxischer Akkumulation von Intermediaten führt und im Wildtyp nicht akzeptiert wird (Eikmanns *et al.*, 1991a; Archer *et al.*, 1991) (siehe unten). In beiden Fällen treten gravierende Konzentrationsänderungen von Zwischen- und Endprodukten auf, die in Produktionsstämmen toleriert werden, im Wildtyp jedoch nicht. Wo die möglichen Mutationen liegen, ist bislang ungeklärt. Ein denkbarer Ansatzpunkt wäre hierbei das Diaminopimelat, das nicht nur zur Lysinbiosynthese verwendet wird, sondern auch ein wichtiger Bestandteil der Zellwand ist. Ein Rückstau des Lysins könnte durch erhöhte Verfügbarkeit des Diaminopimelats Einfluß auf die Zellwandsynthese haben. Dies könnte auch eine Erklärung für die niedrige Transformationsrate der Mutante 35/48 sein, die möglicherweise auf eine veränderte, dickere Peptidoglycanschicht zurückzuführen wäre.

Einerseits war trotz des durch Sensitivität gegen den Phagen CL31 erreichten restriktionsdefekten Phänotyps von 35/48res-a die Transformationseffizienz des Stammes zu gering, um eine Plasmidgenbank direkt durch Transformation mit Ligationsansätzen zu erstellen. Andererseits hatten die versuchten Umwege über *E. coli* dagegen offensichtliche Selektionsnachteile. Außerdem mußte aus dem Experiment mit dem Stamm II7/3 angenommen werden, daß ein Defekt im Lysinexport einen Wachstumsnachteil für die Zelle bedeutet, da entsprechende Mutanten nicht isoliert werden konnten. Aus diesen Erfahrungen mußte die Schlußfolgerung gezogen werden, daß nur durch ein System mit induzierbarer Lysinproduktion in dem restriktionsdefekten und mit ausreichender Effizienz transformierbaren Stamm R127 die Voraussetzungen für die Isolierung des Exportsystems geschaffen werden können. Aus diesem Grund wurde der Methionineffekt auf die Lysinbiosynthese getestet, da nach Zugabe von Methionin auf Indikatorplatten bei dem Wildtyp und R127 eine Lysinausscheidung beobachtet wurde. Methionin reprimiert die Gene der Homoserindehydrogenase und der Homoserinkinase (Follettie *et al.*, 1988), was zu einer Reduktion der konkurrierenden Threoninsynthese und damit zu einer höheren Verfügbarkeit von L-Aspartasemialdehyd zur Lysinbiosynthese (Cremer *et al.*, 1988) führt.

Dies bedeutet weiterhin eine Senkung der intrazellulären Threoninkonzentration, so daß vermutlich die Aspartatkinase nicht mehr vollständig inhibiert werden kann, die nur durch Lysin und Threonin gemeinsam effektiv gehemmt wird (Cremer *et al.*, 1988). Dieser Effekt, daß niedrige Threoninkonzentrationen die Lysinproduktion steigern, wurde zwar bereits in einer Arbeit von Shiio & Sano (1969) beschrieben, allerdings wurden in dem Fall threoninauxotrophe Mutanten verwendet, die folglich überhaupt kein Threonin synthetisieren konnten. Bei Wachstum mit Methionin dagegen konnte beim Wildtyp noch eine Restaktivität der Homoserindehydrogenase von 30 % gegenüber Wachstum ohne Methionin gemessen werden (Follettie *et al.*, 1988). Es handelt sich demnach nicht um eine sehr strikte Regulation. Die genauen Auswirkungen des Methionineffektes wurden im Rahmen einer Diplomarbeit analysiert (Vrljic, 1993), worauf in gemeinsamer Arbeit die Mutante NA8 isoliert werden konnte, die bei Wachstum mit Methionin nur bedingte Lysinsekretion zeigte, aber zellintern Lysin akkumulierte. Zudem ist bei diesem Stamm immer noch die hohe Transformationsrate wie beim Ausgangsstamm R127 vorhanden (Vrljic, 1993). Damit sollten die Vorbedingungen zur Isolierung des gesuchten Gens vorliegen: Defekt im Lysinexport und gleichzeitig kein negativer Selektionsdruck durch zu hohe Lysinkonzentration, weil es sich um eine induzierbare Steigerung der Lysinsynthese handelt. Bei Wachstum auf Medium ohne Methionin sollten die nur leicht erhöhten Konzentrationen keine Auswirkungen zeigen. Es konnte gezeigt werden, daß die Einführung einer Plasmidgenbank nach direkter Transformation mit Ligationsansätzen möglich ist. Die zur Erstellung der Genbank verwendete chromosomale DNA sollte den Vorteil bergen, Lysinexporter zu kodieren, die eine höhere Transportrate besitzen (Bröer *et al.*, 1993) und damit einen deutlicheren Wachstumshof auf Indikatorplatten hervorrufen. Aus den Ergebnissen muß mittlerweile angenommen werden, daß der veränderte Lysinexport bei DG52-5 jedoch gerade die Ursache dafür war, daß eine Komplementation nicht erreicht werden konnte. Vermutlich kann eine Komplementation nur mit chromosomaler DNA aus dem Ausgangsstamm R127 erfolgreich sein. Entsprechende Experimente werden durchgeführt.

4.2. Verwendung des *low-copy*-Vektors pWK0 zur Überexpression von *hom-1*

Mit der Konstruktion der *low-copy*-Vektoren pWK0 auf der einen und pKW0 und pKW3 auf der anderen Seite, ist es möglich geworden, Gene zu klonieren, deren Kopienzahlen für die Zelle sehr kritisch sind. Besonders deutlich wird diese Eigenschaft aus den Arbeiten zur Überexpression des Gens *hom-1*, das eine feedback-resistente Aspartatkinase kodiert. Auf bislang verfügbaren Vektoren konnte das Gen nicht stabil im *C. glutamicum*-Wildtyp exprimiert werden (Eikmanns *et al.*, 1991a). Offensichtlich sind die ausgelösten Konzentrationsänderungen der Zwischen- und Endprodukte so stark, daß sie nur der Ursprungstamm von *hom-1* aufgrund einer vermutlichen zweiten Mutation tolerieren kann, nicht aber der Wildtyp, der diese zweite Mutation nicht besitzt. Archer *et al.* (1991) hatten aufgrund ähnlicher Ergebnisse mit einem unabhängig davon isolierten Gen für eine deregulierte Homoserindehydrogenase die Hypothese aufgestellt, das Gen sei im *C. glutamicum*-Wildtyp nicht zu klonieren, da eine zweite Mutation zur Tolerierung der

veränderten Stoffkonzentrationen notwendig sei. Diese Hypothese läßt sich aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit mit dem Gen *hom-1* so zwar nicht halten, denn *hom-1* zumindest ließ sich im Wildtyp klonieren, allerdings nur auf dem *low-copy*-Vektor pWK0 mit <5 Kopien pro Zelle (Reinscheid *et al.*, 1994). Auf dem Vektor pWK0 konnte das Gen auch ohne Selektionsdruck für mindestens 70 Generationen stabil gehalten werden.

Im Lysinproduktionsstamm MH20-22B konnte durch die dosierte Überexpression des Gens eine deutliche Umlenkung des Stoffflusses von Lysin in Richtung Threonin gezeigt werden. Dadurch konnte eine höhere Konzentration an Threonin im Medium gemessen werden, aber auch das Zwischenprodukt Homoserin und die von Threonin abgeleiteten Aminosäuren Isoleucin und Glycin traten erhöht auf. Das läßt darauf schließen, daß der Threoninexport für die Threoninbildung limitierend ist (Reinscheid *et al.*, 1994).

Der Vorteil der Vektoren pKW0 und pKW3 ist die niedrige Kopienzahl in *C. glutamicum* und *E. coli*, während pWK0 in *E. coli* eine sehr hohe Kopienzahl besitzt. Die Kopienzahl in *E. coli* kann von Bedeutung sein, wenn ein Gen aus *C. glutamicum* auch in *E. coli*, dem geeigneteren Stamm für Klonierungszwecke, abgelesen wird und in hoher Kopienzahl einen negativen Effekt auf die Zelle ausübt. Auch in einem umgekehrten Fall, in dem das Gen für eine *feedback*-resistente Homoserindehydrogenase aus *E. coli* in *B. flavum* überexprimiert wurde, war Instabilität des Gens zu beobachten (Pátek *et al.*, 1993). Mit den beiden verschiedenen Vektortypen liegen Werkzeuge vor, die die Klonierung von kritischen Genen erlauben, wie bei der Glutamataufnahme gezeigt. Außerdem können durch moderate Überexpression von Genen Stoffumlenkungen untersucht werden, die als Meßwerte zwischen einfacher Kopie der Gene im Chromosom und starker Überexpression auf *high-copy*-Plasmiden zur Erforschung der Stoffwechselwege von Bedeutung sind, wie im Fall des Gens *hom-1* für die Homoserindehydrogenase aus *C. glutamicum*.

4.3. Glutamataufnahme

Glutamat wird bei *C. glutamicum* durch ein System aufgenommen, das eindeutig zu den Bindeprotein-abhängigen Aufnahmesystemen gehört und damit ein Mitglied der "ABC-Familie" (ATP-binding cassette) oder "Traffic ATPases" ist (Ames *et al.*, 1990), wozu neben den Aufnahmesystemen auch viele Exportsysteme gezählt werden, wie das MDR Protein (Multi Drug Resistance) beim Menschen (Endicott & Ling, 1989), das CFTR-Protein, dessen Defekt beim Menschen die Cystische Fibrose hervorruft (Riordan *et al.*, 1989) oder die Erythromycin-Resistenz bei *Staphylococcus epidermidis* (Ross *et al.*, 1990). Es konnte nachgewiesen werden, daß zur Glutamataufnahme bei *C. glutamicum* die Expression von vier Genen ausreichend ist, die ein hydrophiles ATP-bindendes Protein, zwei hydrophobe, vermutlich integrale Membranproteine und ein Bindeprotein kodieren. Die Gene konnten aufgrund der eindeutigen Ähnlichkeiten zu den Genen vieler anderer Bindeprotein-abhängiger Systeme zugeordnet werden. Auffallend sind dabei die Homologien zu anderen Aminosäure-Transportsystemen, insbesondere für Glutamin in *B. stearothermophilus* (Wu & Welker, 1991) und *E. coli* (Nohno *et al.*, 1986). Hier zeigt sich die häufig beobachtete Eigenschaft Bindeprotein-abhängiger Systeme, daß die Ähnlichkeit zu Systemen gleicher oder ähnlicher Substratspezifität verwandtschaftlich weit entfernter Organismen größer ist als zu Systemen nah verwandter Organismen mit anderer

Substratspezifität (Alloing *et al.*, 1990; Tam & Saier, 1993). Signifikant sind ferner die Ähnlichkeiten zu den entsprechenden Proteinen der Octopin- und Nopalinaufnahmesysteme aus *Agrobacterium tumefaciens* (Zanker *et al.*, 1992), dessen Gene (*occ*- und *noc*-Region) auf dem Ti-Plasmid lokalisiert sind. Dabei handelt es sich um Verbindungen, die von Arginin abgeleitet sind, in Pflanzentumoren synthetisiert werden und nur von dem Bakterium metabolisiert werden können.

Ungewöhnlich ist die Lokalisierung des Gens für das Bindeprotein zwischen den Genen für das ATP-bindende Protein (*gluA*) und den Membranproteinen (*gluC*, *gluD*). Üblicherweise findet man die Gene für den Transportkomplex in einem *cluster* und das Gen des Bindeproteins stromaufwärts oder stromabwärts gelegen. Allerdings wurde auch beim *noc*-Operon diese Reihenfolge der Gene gefunden (Abb. 12).

Ungewöhnlich sind ferner die relativ großen Abstände zwischen den Genen. Die Gene *gluA* und *gluB* trennen 120 bp, *gluB* und *gluC* 124 bp und *gluC* und *gluD* 138 bp. Bei den anderen Aufnahmesystemen Gram-positiver Organismen liegen die Gene stets weniger als 20 bp auseinander oder überlappen sogar (Tynkkynen *et al.*, 1993; Perego *et al.*, 1991; Mathiopoulos *et al.*, 1991; Alloing *et al.*, 1990). Ausnahmen stellen lediglich die Bereiche hinter den Genen der Bindeproteine dar mit 69 bp hinter *ami A/B* und *amiC* (Alloing *et al.*, 1990), 40 bp zwischen *glnQ* und *glnH* (Wu & Welker, 1991) und 108 bp zwischen *oppA* und *oppB* (Perego *et al.*, 1991). Beim Dipeptidaufnahmesystem (*dciA*-Locus) aus *B. subtilis* (Mathiopoulos *et al.*, 1991) und Oligopeptidaufnahmesystem (*ami*-Locus) aus *S. pneumoniae* (Alloing *et al.*, 1990) gibt es Hinweise, daß die Gene mit einem einzigen Transkript als Operon abgelesen werden. Dies ist für die Zelle ökonomisch, da die Proteine des Transportkomplexes in exakter Stöchiometrie vorliegen müssen. Das Bindeprotein kann jedoch offensichtlich in wechselnder Menge auftreten. Für das Oligopeptidsystem aus *B. subtilis* (Perego *et al.*, 1991) wird angenommen, daß die potentielle "stem-loop"-Struktur in der Region von 108 bp hinter dem Gen für das Bindeprotein die mRNA stabilisiert, was zu stärkerer Expression und höherer Proteinmenge führt. Zwischen *gluB* und *gluC* ist ebenfalls die Sequenz für einen ausgeprägten "stem-loop" vorhanden, der dieselbe vermutete Funktion der mRNA-Stabilisierung ausüben könnte. Falls die Gene als Operon abgelesen werden, würde demnach auch *gluA* stärker exprimiert, da solche "stem-loops" vor dem Abbau der mRNA vom 3'-Ende schützen und *gluA* stromaufwärts von *gluB* lokalisiert ist.

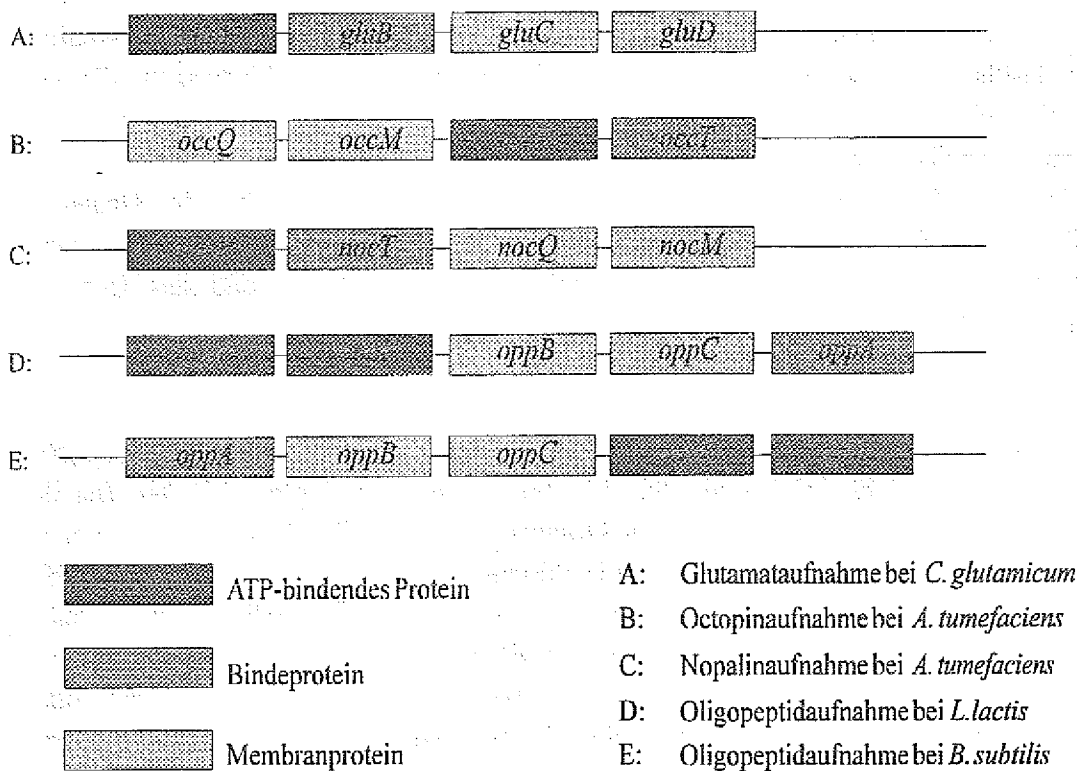


Abbildung 12: Dargestellt ist die schematische Anordnung der Gene verschiedener Bindeproteinabhängiger Aufnahmesysteme. Größe der Gene und Abstände zwischen den Genen sind dabei nicht berücksichtigt. Es können ein oder zwei Gene für ATP-bindende Untereinheiten existieren.

Besonders deutlich war die Homologieanalyse im Fall des Gens für das ATP-bindende Protein GluA mit 62 % identischen und 77 % ähnlichen der ersten 200 Aminosäuren des abgeleiteten Proteins im Vergleich zum GlnQ des Glutaminaufnahmesystems aus *B. stearothermophilus*. Im selben Rahmen liegt der Vergleich zum GlnQ aus *E. coli* mit 58 % identischen und 74 % ähnlichen Aminosäureresten. Dies ist typisch für die cytoplasmatischen Proteine Bindeprotein-abhängiger Transportsysteme, die stets untereinander über einen Bereich von ca. 200 Aminosäuren eine sehr ausgeprägte Ähnlichkeit aufweisen. Auffallend sind besonders zwei konservierte Abschnitte, die als "site A" und "site B" oder als "Walker sites" bezeichnet werden. Sie treten ebenfalls in Proteinen auf, die an keinem Transportvorgang beteiligt sind und völlig andere biologische Funktionen ausüben, wie ATP-Synthasen, Kinasen, Myosin und anderen ATP-bindenden Enzymen (Walker *et al.*, 1982; Higgins *et al.*, 1986). Die beiden "Walker sites" bilden eine Nukleotidbindungsfalte, wobei die glycinreiche "siteA" (Konsensus: GXXGXGKS) am Ende einer α -Helix lokalisiert ist und einen Loop bildet. Dieser Loop kann Konformationsänderungen eingehen, wodurch der Lysinrest in direkte Nachbarschaft der Phosphatreste des gebundenen Mg^{2+} -ATP gelangt. "Site B" besteht aus einem Aspartatrest,

der sich durch Ausbildung des Loops in der räumlichen Nähe der "site A" befindet und aufgrund seiner negativen Ladung mit dem positiv geladenen Mg^{2+} interagiert. Die dem Aspartat benachbarten hydrophoben Aminosäuren sorgen dabei für einen wasserfreien Raum (Walker *et al.*, 1982; Higgins *et al.*, 1988). Kristallographische Untersuchungen an der Adenylatkinase konnten den grundsätzlichen Aufbau der Nukleotidbindungsfalte bestätigen (Fry *et al.*, 1986).

Die Existenz einer eindeutigen Nukleotidbindungsstelle ließ die Schlußfolgerung zu, daß der Transport durch ATP-Spaltung energetisiert wird. Tatsächlich konnten mit verschiedenen Methoden Nukleotidbindungen der cytoplasmatischen Komponenten solcher Systeme gezeigt werden, z. B. durch Bindung von 8-Azido-ATP an gereinigtem HisP (Hobson *et al.*, 1984) und MalK (Walter *et al.*, 1992). Außerdem wurde bei Transportmessungen mit den Histidin- und Maltosesystemen in intakten *E. coli*-Zellen (Joshi *et al.*, 1989), mit dem in Liposomen rekonstituiertem Maltosesystem aus *E. coli* (Davidson & Nikaido, 1990) und mit dem rekonstituierten Histidinsystem aus *S. typhimurium* in *inside-out*-Vesikeln aus *E. coli* (Ames *et al.*, 1989) die Abhängigkeit von ATP festgestellt. Zudem wurde durch Derivatisierung von HisP aus *E. coli* mit 8-Azido-ATP und anschließender Peptidanalyse eine Markierung an der "site A" nachgewiesen (Mimura *et al.*, 1990). Allerdings waren dies lediglich indirekte Beweise. Inzwischen konnten jedoch direkte ATPase-Aktivitäten des gereinigten MalK (Walter *et al.*, 1992; Morbach *et al.*, 1993) und MglA des Galaktosetransportsystems (Richarme *et al.*, 1993) aus *S. typhimurium* gemessen werden, sodaß mit allen Experimenten der eindeutige Beweis der ATP-Spaltung zur Energetisierung des Transports Bindeprotein-abhängiger Systeme gegeben sein dürfte. Die cytoplasmatischen ATP-bindenden Proteine sind strukturell und funktionell so ähnlich, daß im Fall des MalK und des entsprechenden Proteins des Glycerin-3-Phosphats aus *E. coli* (UgpC) eine Austauschbarkeit der Proteine für beide Systeme gezeigt werden konnte (Hekstra & Tommassen, 1993). Die Universalität der Nukleotidbindestelle beweist ein zumindest für die Maltoseaufnahme funktionelles Hybridprotein, das die "site A" von MalK und "site B" von HisP aus *S. typhimurium* enthält und nach *in vitro*-Fusion der entsprechenden Genabschnitte synthetisiert wurde (Schneider & Walter, 1991).

Da GluA alle bekannten konservierten Bereiche anderer ATP-bindender Proteine umfaßt, kann man davon ausgehen, daß es sich um eine ATPase zur Energetisierung des Glutamattransports handelt. Interessant ist an diesem Protein ferner, daß die Länge recht genau mit GlnQ aus *E. coli* und *B. stearothermophilus* und HisP aus *E. coli* übereinstimmt, lediglich MalK aus *E. coli* besitzt einen darüber hinausgehenden C-terminalen Schwanz, der für einen regulatorischen Effekt verantwortlich gemacht wird (Schneider & Walter, 1991; Kühnau *et al.*, 1991). Aus diesen Sequenzvergleichen kann abgeleitet werden, daß GluA eine solche regulatorische Funktion nicht besitzt. Daher muß die Glutamataufnahme, die bei Wachstum auf Glukose nur 10 % des induzierten Zustands beträgt von einem anderen Protein reguliert werden. Da auf den DNA-Bereichen, die an den *glu*-Locus angrenzen, kein Gen für ein Regulatorprotein entdeckt werden konnte, muß es von einem entfernten Locus kodiert werden. Dieses Ergebnis ist nicht ungewöhnlich, auch im Fall der Maltoseaufnahme ist das Gen des Induktors MalT entfernt von den Genen des Transportsystems lokalisiert (Schwartz, 1987).

Da auf dem DNA-Abschnitt, der den Defekt der Mutante M10 komplementiert nur ein Gen identifiziert werden konnte, das ein Protein zur ATP-Bindung kodiert, müßte der aktive Transportkomplex ein Homodimer aus zwei GluA-Proteinen enthalten. Man geht davon aus, daß stets zwei ATP-bindende Proteine zum Transportkomplex zählen, die als Homodimer oder als Heterodimer zweier verschiedener Proteine vorliegen. Diese Rückschlüsse lassen sich ziehen aufgrund von Transportsystemen ziehen, bei denen die Peptidketten nicht separate Proteine, sondern Domänen eines großen Proteins darstellen (Higgins *et al.*, 1990). Außerdem wurde beim Maltose-Transportsystem diese Stöchiometrie gefunden (Davidson & Nikaido, 1991). Zudem führten Untersuchungen zur Stöchiometrie der ATP-Hydrolyse zu zwei ATP pro transportiertem Substrat (Mimmack *et al.*, 1989). Als Ausnahme von der Regel muß in diesem Zusammenhang allerdings das Ergebnis von Perego *et al.* (1991) zum Oligopeptidaufnahmesystem aus *B. subtilis* gesehen werden, bei dem OppF aus dem Heterodimer OppD/OppF fehlen kann, ohne den Transport zu stören.

Von besonderer Bedeutung bei Bindeprotein-abhängigen Systemen Gram-positiver Bakterien ist das Bindeprotein, das bei Gram-negativen Organismen frei im Periplasma beweglich ist. Der Grad der Übereinstimmung ist wie bei GluA zu dem entsprechenden Protein des Glutaminaufnahmesystems (GlnH) aus *B. stearothermophilus* am höchsten, liegt jedoch mit 32 % identischen und 51 % ähnlichen Aminosäuren über einen Bereich von 203 der 295 Aminosäurereste erheblich niedriger. Ausgenommen sind die N-terminalen 42 Aminosäuren, wovon die ersten 26 bei GluB eine eindeutige Signalsequenz bilden und der C-terminale Bereich, der bei GlnH fehlt.

Bei den Bindeproteinen können im Gegensatz zu den ATP-bindenden Proteinen keine ausgeprägt konservierten Bereiche identifiziert werden. Dabei sind die Proteine verwandtschaftlich weit voneinander entfernter Bakterien, die aber identische Substrate transportieren, zueinander ähnlicher als verschiedene Bindeproteine eines Organismus mit unterschiedlichen Substraten (Tam & Saier, 1993). Bindeproteine sind hydrophil, haben eine hohe Substratspezifität und eine niedrige Bindungskonstante (0,1 bis 1 μM). Da sie bei Gram-negativen Bakterien nach osmotischer Schockbehandlung leicht in größerer Menge zu reinigen sind, konnten anhand von Kristallisationsexperimenten und Computeranalysen in den letzten Jahren die dreidimensionalen Strukturen mehrerer Bindeproteine aufgedeckt werden, z. B. für Maltose aus *E. coli* (Spurlino *et al.*, 1991), für Lysin/Arginin/Ornithin aus *S. typhimurium* (Kang *et al.*, 1991) und für Dipeptide aus *E. coli* (Dunten *et al.*, 1993). Dabei ist in allen Fällen das Protein aus zwei globulären Domänen aufgebaut, die durch zwei oder drei kurze Peptide miteinander verknüpft sind und eine tiefe Spalte bilden, die die Substratbindestelle enthält. Bei Bindung des Liganden konnte gezeigt werden, daß sich die Domänen annähern (Oh *et al.*, 1993; Olah *et al.*, 1993; Sharff *et al.*, 1992). Daraus resultiert die Annahme, daß das Bindeprotein alternierend in einer offenen und einer geschlossenen Form vorliegen kann, und der Ligand die geschlossene Form stabilisiert (Oh *et al.*, 1993). Genetische Analysen von Hor & Shuman (1993) am Maltosesystem aus *E. coli* bewiesen, daß das Bindeprotein mit der N-terminalen Domäne mit MalG, dem einen Membranprotein, und der C-terminalen Domäne mit MalF, dem zweiten Membranprotein, in Kontakt tritt. Zusammen mit den Studien zur Ligandenbindung erklärt sich daraus das Modell, daß nur die mit dem Liganden beladene, geschlossene Form des Bindeproteins mit

dem Membrankomplex interagieren kann, weil die Domänen angenähert sind und an beiden Membranproteinen binden können.

Die Signalsequenz von GluB zeigt eine signifikante Ähnlichkeit zu dem N-terminalen Ende von MalX (Gilson *et al.*, 1988) aus *S. pneumoniae*, einem Protein das wiederum auffallende Sequenzübereinstimmungen mit MalE aus *E. coli* aufweist. Die Signalsequenz von GluB unterscheidet sich in der Länge mit 26 Aminosäureresten und in der Anzahl der Ladungen (drei positive am N-Terminus) von der Signalsequenz des Proteins PS1 aus *C. glutamicum*, das 43 Aminosäuren mit fünf positiven und einer negativen Ladung umfaßt (Joliff *et al.*, 1992). Neben PS1, dessen genaue Funktion nicht bekannt ist, kennt man nur die Sequenz eines zweiten exportierten Proteins aus *C. glutamicum*, PS2, dem eine Aufgabe in der Struktur der Zelloberfläche zugesprochen wird (Peyret *et al.*, 1993). Dessen Signalsequenz ist 30 Aminosäuren lang und ähnelt der von GluB (zwei positive Ladungen) mit Ausnahme der Spaltstelle. Die beiden Proteine stellen mindestens 90 % der ins Medium exportierten Proteine aus *C. glutamicum* dar, müssen also effektiv transportiert werden. Mit GluB steht die dritte Signalsequenz dieses Organismus zur Verfügung. Daneben konnte aus Kulturüberstand von *C. murisepticum* eine Invertase gereinigt werden, die ebenfalls exportiert werden muß (Nadkarni *et al.*, 1993). Allerdings ist in diesem Fall noch keine Sequenz bekannt.

Während in bezug auf den industriell interessanten Proteinexport *E. coli* und *Bacillus* intensiv erforscht werden, ist *C. glutamicum* bislang völlig vernachlässigt worden. Mit dem heutigen Wissen, daß auch in diesem Stamm Proteinexport stattfindet und der Kenntnis verschiedener Signalsequenzen, die zu unterschiedlich effizientem Transport führen, könnte sich für *C. glutamicum* eine neue, intensive Forschungsrichtung eröffnen.

Da bei Gram-positiven Zellen die äußere Membran fehlt, muß das Bindeprotein an der Zellwand verankert sein, vermutlich in Form einer Lipidmodifizierung wie bei Lipoproteinen Gram-negativer Organismen (Wu, 1987). Daß an der Membran befestigte Bindeproteine grundsätzlich funktionell sein können, zeigen Untersuchungen mit *E. coli*-Mutanten, deren Maltose-Bindeproteine noch exportiert, allerdings nicht mehr prozessiert und dadurch an der Cytoplasmamembran festgehalten wurden. Die Mutanten konnten jedoch Maltose aufnehmen (Fikes & Bassford, 1987). Offensichtlich reicht die zweidimensionale Bewegung eines verankerten Bindeproteins für seine Funktion beim Transport aus. Unterstützung erhält diese Vermutung aus den Arbeiten von Brass *et al.* (1986), wonach in der gelartigen Matrix des Periplasmas der größte Teil der Diffusionsbewegungen nur zweidimensional stattfindet, da ohnehin nur 3-4 Proteine räumlich zwischen innerer und äußerer Membran Platz finden. Tatsächlich deutet z. B. die Globomycin-Hemmung bei der Prozessierung des Eisenhydroxamat-Bindeproteins aus *B. subtilis* auf den Mechanismus der Lipidmodifizierung hin (Schneider & Hantke, 1993). Die aus Gram-negativen Organismen bekannte konservierte Spaltstelle ist bei GluB mit der Sequenz LTACGD ebenso klar zu erkennen wie auch in allen anderen vermutlichen Bindeproteinen aus Gram-positiven Bakterien. Interessanterweise enthält die GluB-Sequenz an zweiter Stelle hinter der voraussichtlichen Spaltstelle zwischen dem Alanin- und Cysteinrest einem negativ geladenen Aspartatrest. Die negative Ladung ist bei Gram-negativen Zellen entscheidend für die Lokalisierung in der inneren Membran (Yamaguchi *et al.*, 1988). Ein Fehlen dieser

negativen Ladung sorgt für einen Export in die äußere Membran. Bei allen anderen Gram-positiven Spaltstellen fehlt die negative Ladung, trotzdem werden die Proteine selbstverständlich in der Cytoplasmamembran verankert. Daraus muß abgeleitet werden, daß Gram-positive Lipoproteine nicht exakt nach dem Gram-negativen Muster prozessiert werden. Für GluB müßte angenommen werden, daß bei Mutation des negativen Aspartatrestes keine Verankerung mehr möglich ist. Als eine besondere Situation muß in diesem Zusammenhang die Beobachtung von Perego *et al.* (1991) gesehen werden, daß OppA in der logarithmischen Phase an der Membran befestigt ist, in der stationären Phase zu über 90 % im Medium zu finden ist. Hierbei wird eine spezielle Form des Proteinexports diskutiert, die bei Lipoproteinen aus Gram-negativen Bakterien nicht bekannt ist.

Über die zwei integralen Membranproteine der Bindeprotein-abhängigen Transportsysteme ist im Vergleich zu den anderen Komponenten weit weniger bekannt. Generell bilden beide Proteine jeweils sechs transmembrane Helices (Hiles *et al.*, 1987), der gesamte Komplex also zwölf (Maloney, 1990). Ausnahmen von dieser Regel sind das Maltosesystem mit acht (MalF) und sechs (MalG) transmembranen Helices (Schneider, 1992) und das Arabinoseaufnahmesystem, das nur ein Membranprotein mit ungefähr der doppelten Größe enthält (Scripture *et al.*, 1987). Vor diesem Hintergrund muß bei den abgeleiteten Membranproteinen GluC und GluD die Anzahl der eindeutig identifizierten transmembranen Helices mit insgesamt sieben als ungewöhnlich angesehen werden. Dabei konnten bei GluC drei und GluD vier solcher Helices erkannt werden. Allerdings sind bei GluC zwei und GluD ein weiteres Segment als membranassoziiert identifiziert worden, die möglicherweise ebenfalls die Membran überqueren, so daß sich theoretisch zehn transmembrane Helices ergeben würden. Generell findet man in anderen Systemen eine Zahl von zwölf mit jeweils sechs membranüberspannenden Segmenten pro Protein (Maloney, 1990; Hiles *et al.*, 1987), wobei Ausnahmen von der Regel bekannt sind, z. B. 14 transmembrane Bereiche beim Maltoseaufnahmesystem (Schneider, 1992). Vorausgesetzt, es handelt sich bei GluC und GluD nur um insgesamt sieben Transmembranhelices, wäre eine diskutierbare Variante ein Heterotetramer aus jeweils zwei GluC und zwei GluD Proteinen, wobei sich rechnerisch 14 transmembrane Helices ergeben würden. Da die Anzahl der Helices bei GluC/GluD sehr stark von der Regel abweicht und andererseits die Zahl zwölf plusminus zwei sich immer wiederfindet, muß diese Möglichkeit realistisch erscheinen. Bei den Mitgliedern der "ABC-Familie" ist die Zahl der Proteine, aus denen sich ein Transportsystem zusammensetzt, häufig sehr variabel, die Motive jedoch sind stark konserviert.

Untersuchungen zur Funktion der Membranproteine beim Maltosesystem lassen den Schluß zu, daß der Membrankomplex aus MalG, MalF und MalK in einer aktiven oder inaktiven Konformation vorliegen kann, wobei durch Bindung des beladenen Bindeproteins die aktive Form induziert wird (Dean *et al.*, 1992). Weitere Hinweise zeigen, daß dabei durch die Bindung des Bindeproteins ein Signal über MalG und MalF zu MalK weitergeleitet wird, das die ATP-Spaltung auslöst (Davidson *et al.*, 1992).

GluC und GluD enthalten eine konservierte Sequenz EAA---G-----I-LP, die bei mehreren untersuchten Membranproteinen entdeckt wurde (Schneider, 1992; Dassa, 1993), deren Funktion allerdings nicht geklärt ist. Allerdings führt ein Basenaustausch bei *gluC* zu dem Austausch von Leucin gegen Phenylalanin, was aber den Transport offensichtlich nicht

beeinflusst. GluD dagegen trägt exakt den konservierten Bereich. Hinter dem Gen *gluD* ist ein "stem-loop" zu identifizieren, der mit einer freien Energie von -26,6 kcal/mol stark ausgeprägt ist. Da sich im Anschluß daran insgesamt sieben Thymidinreste befinden, scheint es sich hier vermutlich um eine Schleife zur Transkriptionstermination zu handeln, die nicht von Terminationsfaktoren abhängig ist (Knippers, 1990). Abgesehen von der "stem-loop"-Struktur hinter *gluB*, die der Stabilisierung der mRNA dienen könnte, finden sich in der gesamten Sequenz keine weiteren Strukturen, die deutlich als Transkriptionsterminatoren zu identifizieren wären. Daraus läßt sich der Hinweis ableiten, daß die Gene als Operon abgelesen werden und hinter *gluD* das Transkript abbricht.

Das Glutamataufnahmesystem in *C. glutamicum* ist ein weiteres Beispiel für die Universalität der "Traffic ATPases". Die stets sehr ähnlichen Motive dieser Transporterfamilie finden sich bei vielen verschiedenen Organismen, von Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien über eukaryontische Einzeller und Protozoen bis zum Menschen (Ames et al., 1990; Higgins et al., 1990; Blight & Holland, 1990). Dabei eignet sich der grundsätzliche Aufbau der Transporter sowohl für die Aufnahme (Ames, 1986), als auch für die Ausschleusung einer großen Zahl von Metaboliten (Fath & Kolter, 1993). Allerdings ist bislang kein System isoliert worden, das in beide Richtungen transportieren kann.

Bei *C. glutamicum* ist nicht nur die Glutamataufnahme sehr gut untersucht, sondern auch der Export von Glutamat. Da die Gene des Aufnahmesystems nun verfügbar sind, könnte zum erstenmal durch gezielte Inaktivierung des Aufnahmesystems auch der genetische Beweis erbracht werden, daß Aufnahme und Export von verschiedenen Transportsystemen bewerkstelligt werden. Ferner muß noch definitiv gezeigt werden, daß die Bindeproteine bei Gram-positiven Organismen tatsächlich wie vermutet über einen Lipidanker in der Membran verankert sind.

5. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, molekularen Zugang zu Aminosäuretransportsystemen bei *C. glutamicum* zu schaffen, speziell zum Lysinexport und Glutamataufnahmesystem.

- ◆ Es wurden Mutanten mit defektem Lysinexportsystem isoliert und charakterisiert, die Lysin intrazellulär anhäufen. Dazu wurde eine Mutante (35/48) des Lysinproduzenten DG52-5 verwendet, von der mit Hilfe eines Bakteriophagen ein restriktionsdefekter Stamm isoliert wurde. Außerdem wurde ein System zur induzierbaren Lysinproduktion durch Methioninzugabe bei Nichtproduzenten, wie dem Wildtyp, entdeckt. Unter Ausnutzung dieses Effektes wurde eine weitere Mutante (NA8) vom restriktionsdefekten Stamm R127 isoliert, die bei Wachstum auf Methionin kein Lysin ausscheidet.
- ◆ Zur Klonierung von Genen, die in hohen Kopienzahlen Wachstumsnachteile für die Zelle mit sich führen, wurden *low-copy*-Vektoren (pKW0, pKW3) konstruiert, die in *C. glutamicum* in niedriger Kopienzahlen vorliegen und in *E. coli* induzierbar sind, d. h. bei 30°C in niedriger und bei 42°C in hoher Kopienzahl in der Zelle vorkommen. Außerdem wurde der Vektor pKW0 mit niedriger Kopienzahl in *C. glutamicum* und hoher Kopienzahl in *E. coli* entwickelt.
- ◆ Mit Hilfe des *low-copy*-Vektors pKW0 konnte das Gen *hom-1* erstmals in *C. glutamicum* MH20-22B exprimiert und damit der Stofffluß von Lysin nach Threonin erfolgreich umgelenkt werden. Die bei verschiedenen Bedingungen ausgeschiedenen und cytosolisch akkumulierten Aminosäuren lassen den Schluß zu, daß der Threoninexport bei hoher Syntheseleistung limitierend wird.
- ◆ Die in der Glutamataufnahme defekte Mutante M10 konnte mit einer Plasmidgenbank in dem *low-copy*-Vektor pKW3 komplementiert werden. Das komplementierende DNA-Fragment wurde durch Hybridisierung mit einem synthetisierten, degenerierten Oligonukleotid gegen einen Abschnitt, der eine konservierte Sequenz zur Nukleotidbindung kodiert, eingegrenzt. Durch Sequenzierung konnten vier Gene identifiziert werden, die als Cluster auf einem 3,977 kb-Fragment lokalisiert sind. Alle Gene zeigen signifikante Ähnlichkeiten zu Genen von Bindeprotein-abhängigen Transportsystemen. Die Funktionalität der vier Gene konnte anhand von Glutamataufnahmemessungen nachgewiesen werden.

6. Literaturverzeichnis:

- Abe, S., Takayama, K., Kinoshita, S. (1967). Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 13: 279-301.
- Adelberg, E. A. (1958). Selection of bacterial mutants which excrete antagonists of antimetabolites. *J. Bacteriol.* 76: 326-328.
- Alloing, G., Trombe, M.-C., Claverys, J.-P. (1990). The *ami* locus of the Gram-positive bacterium *Streptococcus pneumoniae* is similar to binding protein-dependent transport operons of Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* 4 (4): 633-644.
- Ames, G. F.-L. (1986). Bacterial periplasmic transport systems: Structure, mechanism, and evolution. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 397-425.
- Ames, G. F.-L., Nikaido, K., Groarke, J., Petithory, J. (1989). Reconstitution of periplasmic transport in inside-out membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 264: 3998-4002.
- Ames, G. F.-L., Mimura, C. S., Shyamala, V. (1990). Bacterial periplasmic permeases belong to a family of transport proteins operating from *Escherichia coli* to human: Traffic ATPases. *FEMS Microbiol. Rev.* 75: 429-446.
- Archer, J. A. C., Solow-Cordero, D. E., Sinskey, A. J. (1991). A C-terminal deletion in *Corynebacterium glutamicum* homoserine dehydrogenase abolishes allosteric inhibition by L-threonine. *Gene* 107: 53-59.
- Bell, S. C. & Turner, J. M. (1976). Bacterial catabolism of threonine; threonine degradation initiated by L-threonine-NAD⁺-oxidoreductase. *Biochem. J.* 156:449-458.
- Bell, A. W., Buckel, S. D., Groarke, J. M., Hope, J. N., Kingsley, D. H., Hermodson, M. A. (1986). The nucleotide sequence of the *rbsD*, *rbsA*, *rbsC* genes of *Escherichia coli* K12. *J. Biol. Chem.* 261: 7652-7658.
- Berges, D. A., DeWolf, W. E., Dunn, G. L., Newman, D. J., Schmidt, S. J., Taggart J. J., Gilvarg, C. (1986). Studies on the active site of succinyl-CoA:tetrahydrodipicolinate N-succinyltransferase. *J. Biol. Chem.* 261: 6160-6167.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.
- Blight, M. A., & Holland, I. B. (1990). Structure and function of haemolysin B, P-glycoprotein and other members of a novel family of membrane translocators. *Mol. Microbiol.* 4: 873- 880.
- Bonnassie, S., Burini, J.-F., Oreglia J., Trautwetter, A., Patte, J.-C., Sicard, A. M. (1990a). Transfer of plasmid DNA to *Brevibacterium lactofermentum* by electrotransformation. *J. Gen. Microbiol.* 136: 2107-2112.

- Bonnassie, S., Oreglia, J., Trautwetter, A., Sicard, A. M. (1990b). Isolation and characterization of a restriction and modification deficient mutant of *Brevibacterium lactofermentum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 72: 143-146.
- Börmann, E. R., Eikmanns, B. J., Sahm, H. (1992). Molecular analysis of the *Corynebacterium glutamicum* *gdh* gene encoding glutamate dehydrogenase. *Mol. Microbiol.* 6 (3): 317-326.
- Brass, J. M., Higgins, C. F., Foley, M., Rugman, P. A., Birmingham, J., Garland, P. J. (1986). Lateral diffusion of proteins in the periplasm of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 165: 787-794.
- Bröer, S. & Krämer, R. (1990). Lysine uptake and exchange in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 172 (12): 7241-7248.
- Bröer, S. & Krämer, R. (1991a). Lysine excretion by *Corynebacterium glutamicum* 1. Identification of a specific secretion carrier system. *Eur. J. Biochem.* 202: 131-135.
- Bröer, S. & Krämer, R. (1991b). Lysine excretion by *Corynebacterium glutamicum* 2. Energetics and mechanism of the transport. *Eur. J. Biochem.* 202: 137-143.
- Bröer, S., Eggeling, L., Krämer, R. (1993). Strains of *Corynebacterium glutamicum* with different lysine productivities may have different lysine excretion systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (1): 316-321.
- Brown, N. L., Rouch, D. A., Lee, B. T. (1992). Copper resistance determinants in bacteria. *Plasmid* 27: 41-51.
- 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.
- Chan Kwo Chion, C. K. N., Duran, R., Arnaud, A., Galzy, P. (1991). Electrotransformation of whole cells of *Brevibacterium* sp. R312 a nitrile hydratase producing strain: Construction of a cloning vector. *FEMS Microbiol. Lett.* 81: 177-184.
- 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.
- Clarke, L. & Carbon, J. (1976). A colony bank containing synthetic Col EI hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* 9: 91-99.
- Clement, Y., Escoffier, B., Trombe, M. C., Laneelle, G. (1984). Is glutamate excreted by its uptake system in *Corynebacterium glutamicum*? A working hypothesis. *J. Gen. Microbiol.* 130: 2589-2594.
- Cohen, S. N. & Chang, A. C. Y. (1977). Revised interpretation of the origin of the pSC101 plasmid. *J. Bacteriol.* 132: 734-737.

- Cohen, G. N. & Saint-Geront, I. (1987). Biosynthesis of threonine, lysine and methionine. In: Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Brooks Low, K., Magasanik, B., Schaechter, M., Umberger, H. E. (Eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and molecular biology, Vol I: (pp 429-444), American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- 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.
- 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., Eggeling, L., Sahm, H. (1990). Cloning the *dapA* *dap B* cluster of the lysine-secreting bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Gen. Genet.* 220: 478-480.
- Cremer, J., Eggeling, L., Sahm, H. (1991). Control of the lysine biosynthesis sequence in *Corynebacterium glutamicum* as analyzed by overexpression of the individual corresponding genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (6): 1746-1752.
- Dassa, E. (1993). Sequence-function relationships in MalG, an inner membrane protein from the maltose transport system in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 7 (1): 39-47.
- Davidson, A. L. & Nikaido, H. (1990). Overproduction, solubilization, and reconstitution of the maltose transport system from *Escherichia coli*. *J. Biol.Chem.* 265: 4254-4260.
- Davidson, A. L. & Nikaido, H. (1991). Purification and characterization of the membrane-associated components of the maltose transport system from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 266: 8946-8951.
- Davidson, A. L., Shuman, H. A., Nikaido, H. (1992). Mechanism of maltose transport in *Escherichia coli*: Transmembrane signaling by periplasmic binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2360-2364.
- Dean, D. A., Hor, L.-I., Shuman, H. A., Nikaido, H. (1992). Interaction between maltose-binding protein and the membrane-associated maltose transporter complex in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 6 (15): 2033-2040.
- Dudler, R., Schmidhauser, C., Parish, R. W., Wettenhall, R. E. H., Schmidt, T. (1988). A *mycoplasma* high-affinity transport system and the *in vitro* invasiveness of mouse sarcoma cells. *EMBO J.* 7 (12): 3963-3970.
- Dunten, P. W., Harris, J. H., Feiz, V., Mowbray, S. L. (1993). Crystallization and preliminary X-ray analysis of the dipeptide binding protein from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 231: 145-147.
- Ebbighausen, H., Weil, B., Krämer, R. (1989a). Isoleucine excretion in *Corynebacterium glutamicum*: evidence for a specific efflux carrier system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31: 184-190.

- Ebbighausen, H., Weil, B., Krämer, R. (1989b). Transport of branched-chain amino acids in *Corynebacterium glutamicum*. *Arch. Microbiol.* 151: 238-244.
- Eggeling, L., 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.
- Eggeling, L. (1994). Biology of L-lysine overproduction by *Corynebacterium glutamicum*. *Amino Acids* 6: 261-272.
- Eikmanns, B. J., Follettie, M. T., Griot, M. U., Sinskey, A. J. (1989). The phosphoenolpyruvate carboxylase gene of *Corynebacterium glutamicum*: Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression. *Mol. Gen. Genet.* 218: 330-339.
- Eikmanns, B. J., Metzger, M., Reinscheid, D., Kircher, M., 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 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 3-phosphoglycerate kinase, and triosephosphate isomerase. *J. Bacteriol.* 174 (19): 6076-6086.
- Eisenberg, D., Schwarz, E., Komaromy, M., Wall, R. (1984). Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J. Mol. Biol.* 179: 125-142.
- Endicott, J. E. & Ling, V. (1989). The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 137-171.
- Erdmann, A., Weil, B., Krämer, R. (1993). Lysine secretion by wild-type *Corynebacterium glutamicum* triggered by dipeptide uptake. *J. Gen. Microbiol.* 139: 3115-3122.
- Fath, M. J. & Kolter, R. (1993). ABC transporters: Bacterial exporters. *Microbiol. Rev.* 57 (4): 995-1017.
- Fikes, J. D. & Bassford, P. J. (1987). Export of unprocessed precursor maltose-binding protein to the periplasm of *Escherichia coli* cells. *J. Bacteriol.* 169: 2352-2359.
- Follettie, 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.
- Fry, D. C., Kuby, S. A., Mildvan, A. S. (1986). ATP-binding site of adenylate kinase: Mechanistic implications of its homology with ras-encoded p21, F1-ATPase, and other nucleotide-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 907-911.

- Gätje, G., Müller, V., Gottschalk, G. (1991). Lactic acid excretion via carrier-mediated facilitated diffusion in *Lactobacillus helveticus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34: 778-782.
- Gilson, E., Nikaido, H., Hofnung, M. (1982). Sequence of the *malK* gene in *E. coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* 10: 7449-7458.
- Gilson, E., Alloing, G., Schmidt, T., Claverys, J.-P., Dudler, R., Hofnung, M. (1988). Evidence of high affinity binding-protein dependent transport systems in Gram-positive bacteria and in *Mycoplasma*. *EMBO J.* 7 (12): 3971-3974.
- Gornall, A. G., Bardawill, C. J., David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177: 751-766.
- Gouesbet, G., Blanco, C., Hamelin, J., Bernard, T. (1992). Osmotic adjustment in *Brevibacterium ammoniagenes*: Pipecolic acid accumulation at elevated osmolalities. *J. Gen. Microbiol.* 138: 959-965.
- Gutmann, M., Hoischen, C., Krämer, R. (1992). Carrier-mediated glutamate secretion by *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation. *Biochim. Biophys. Acta* 1112: 115-123.
- Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of *Escherichia coli*. In: D. M. Glover (Ed.), DNA cloning: A practical approach, Vol. I (109-135), IRL-Press, Oxford.
- Haynes, J. A. & Britz, M.L. (1989). Electrotransformation of *Brevibacterium lactofermentum*: growth in tween 80 increases transformation frequencies. *FEMS Microbiol. Lett.* 61: 329-334.
- Heery, D. M. & Dunican, L. K. (1993). Cloning of the *trp* gene cluster from a tryptophan-hyperproducing strain of *Corynebacterium glutamicum*: Identification of a mutation in the *trp* leader sequence. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (3): 791-799.
- Hekstra, D., & Tommassen, J. (1993). Functional exchangeability of the ABC proteins of the periplasmic binding protein-dependent transport systems Ugp and Mal of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175 (20): 6546-6552.
- Henikoff, S. (1984). Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene* 28: 351-359.
- Henning, U., Royer, H.-D., Teather, R. M., Hindennach, I., Hollenberg, C. P. (1979). Cloning of the structural gene (*ompA*) for an integral outer membrane protein of *Escherichia coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (9): 4360-4364.
- Higgins, C. F., Hiles, I. D., Salmond, G. P. C., Gill, D. R., Downie, J. A., Evans, I. J., Holland, I. B., Gray, L., Buckel, S. D., Bell, A. W., Hermodson, M. A. (1986). A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature* 323: 448-450.

Higgins, C. F., Gallagher, M. P., Mimmack, M. L., Pearce, S. R. (1988). A family of closely related ATP-binding subunits from prokaryotic and eukaryotic cells. *BioEssays* 8 (4): 111-116.

Higgins, C. F., Hyde, S. C., Mimmack, M. M., Gileadi, U., Gill, D. R., Gallagher, M. P. (1990). Binding protein-dependent transport systems. *J. Bioenerget. Biomemb.* 22 (4): 571-592.

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

Hiles, I. D., Gallagher, M. P., Jamieson, D. J., Higgins, C. F. (1987). Molecular characterization of the oligopeptide permease of *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* 195: 125-142.

Hobson, A. C., Weatherwax, R., Ames, G. F.-L. (1984). ATP-binding sites in the membrane components of the histidine permease, a periplasmic transport system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 7333-7337.

Hofmann, E. (1990). Isolierung und Charakterisierung von *Corynebacterium glutamicum*-Mutanten mit Defekt im Lysinsekretionssystem und Versuche zur Komplementation einer sekretionsdefekten Mutante mit Hilfe einer Cosmid-Genbank. Diplomarbeit, Universität zu Köln.

Hoheisel, J. D. (1993). On the activities of *Escherichia coli* Exonuclease III. *Anal. Biochem.* 209: 238-246.

Hoischen, C & Krämer, R. (1989). Evidence for an efflux carrier system involved in the secretion of glutamate by *Corynebacterium glutamicum*. *Arch. Microbiol.* 151: 342-347.

Hoischen, C. & Krämer, R. (1990). Membrane alteration is necessary but not sufficient for effective glutamate secretion in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 172 (6): 3409-3416.

Hor, L.-I., Shuman, H. A. (1993). Genetic analysis of periplasmic binding protein dependent transport in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 233: 659-670.

Ishiwa, H. & Shibahara, H. (1985). New shuttle vectors for *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. III. Nucleotide sequence analysis of tetracycline resistance gene of pAM α 1 and ori-177. *Jpn. J. Genet.* 60: 485-498.

Joliff, G., Mathieu, L., Hahn, V., Bayan, N., Duchiron, F., Renaud, M., Shechter, E., Leblon, G. (1992). Cloning and nucleotide sequence of the *cspI* gene encoding PS1, one of the two major secreted proteins of *Corynebacterium glutamicum*: the deduced N-terminal region of PS1 is similar to the *Mycobacterium* antigen 85 complex. *Mol. Microbiol.* 6(16): 2349-2362.

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.

- Joshi, A. K., Ahmed, S., Ames, G. F.-L. (1989). Energy coupling in bacterial periplasmic transport systems. *J. Biol. Chem.* 264: 2126-2133.
- Kang, C.-H., Shin, W.-C., Yamagata, Y., Gokcen, S., Ames, G. F.-L., Kim, S.-H. (1991). Crystal structure of the lysine-, arginine-, ornithine-binding protein (LAO) from *Salmonella typhimurium* at 2.7-Å resolution. *J. Biol. Chem.* 266: 23893-23899.
- Kaur, P. & Rosen, B. P. (1992). Plasmid-encoded resistance to arsenic and antimony. *Plasmid* 27: 29-40.
- Kinoshita, S., Udaka, S., Shimono, M. (1957). Amino acid fermentation. I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 3: 193-205.
- Kinoshita, S. (1985). Glutamic acid bacteria. In: Demain, A. L. & Solomon, N. A. (Eds.), *Biology of industrial microorganisms*, (pp 115-142), The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc.
- Klein, P., Kanehisa, M., DeLisi, C. (1985). The detection and classification of membrane-spanning proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 815: 468-476.
- Klingenberg, M. & Pfaff, E. (1967). Means of terminating reactions. In: Estabrook, R. W., Pullmann, M. R. (Eds.), *Methods in Enzymology*, Vol. X (pp 680-684), Academic Press Inc., London, New York.
- Knippers, R. (1990). *Molekulare Genetik*. 5. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Konings, W. N., Poolman, B., Driessen, A. J. M. (1992). Can the excretion of metabolites by bacteria be manipulated? *FEMS Microbiol. Rev.* 88: 93-108.
- Kraft, R. & Leinwand, L. A. (1987). Sequence of the complete P protein gene and part of the M protein gene from the histidine transport operon of *Escherichia coli* compared to that of *Salmonella typhimurium*. *Nucleic Acids Res.* 15: 8568.
- Krämer, R., Lambert, C., Hoischen, C., Ebbighausen, H. (1990a). Uptake of glutamate in *Corynebacterium glutamicum* 1. Kinetic properties and regulation by internal pH and potassium. *Eur. J. Biochem.* 194: 929-935.
- Krämer, R. & Lambert, C. (1990b). Uptake of glutamate in *Corynebacterium glutamicum* 2. Evidence for a primary active transport system. *Eur. J. Biochem.* 194: 937-944.
- Krämer, R. (1994). Secretion of amino acids by bacteria: Physiology and mechanism. *FEMS Microbiol. Rev.* 13: 75-94.
- Kronmeyer, W. (1990). Charakterisierung von Maltose-Transportmutanten bei *Salmonella typhimurium*. Diplomarbeit, Universität Osnabrück.

- Kühnau, S., Reyes, M., Sievertsen, A., Shuman, H., Boos, W. (1991). The activities of the *Escherichia coli* MalK protein in maltose transport, regulation and inducer exclusion can be separated by mutations. *J. Bacteriol.* 173: 2180-2186.
- Kurusu, Y., Kainuma, M., Inui, M., Satoh, Y., Yukawa, H. (1990). Electroporation-transformation system for coryneform bacteria by auxotrophic complementation. *Agric. Biol. Chem.* 54 (2): 443-447.
- Kyte, J. & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydrophatic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105-132.
- Larsen, J. E. L., Gerdes, K., Light, J., Molin, S. (1984). Low-copy-number plasmid-cloning vectors amplifiable by derepression of an inserted foreign promoter. *Gene* 28: 45-54.
- Liebl, W., Ehrmann, M., Ludwig, W., Schleifer, K. H. (1989). High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 65: 299-304.
- Liebl, W., Ehrmann, M., Ludwig, W., Schleifer, K. H. (1991). Transfer of *Brevibacterium divaricatum* DSM 20297T, *Brevibacterium flavum* DSM 20411, *Brevibacterium lactofermentum* DSM 20412 and DSM 1412, and *Corynebacterium lilium* DSM 20137T to *Corynebacterium glutamicum* and their distinction by rRNA gene restriction patterns. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41 (2): 255-260.
- Light, J. & Molin, S. (1981). Replication control functions of plasmid R1 act as inhibitors of expression of a gene required for replication. *Mol. Gen. Genet.* 184: 56-61.
- Lindroth, P. & Mopper, K. (1979). High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthaldialdehyde. *Anal. Chem.* 51 (11): 1167-1174.
- Lipman, D. J. & Pearson, W. R. (1985). Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science* 227: 1435-1441.
- Luntz, M. G., Zhdanova, N. I., Bourd, G. I. (1986). Transport and excretion of L-lysine in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Gen. Microbiol.* 132: 2137-2146.
- Martin, B., Alloing, G., Boucraut, C., Claverys, J.P. (1989). The difficulty of cloning *Streptococcus pneumoniae* *mal* and *ami* loci in *Escherichia coli*: Toxicity of *malX* and *amiA* gene products. *Gene* 80: 227-237.
- Martin, J. F. (1989). Molecular genetics of amino acids-producing *Corynebacteria*. Reprinted from: Banmberg, S., Hunter, I., Rhodes, M. (Eds.), Society for General Microbiology Symposium, (pp 25-59); 44. Cambridge University Press.
- Mathiopoulos, C., Mueller, J. P., Slack, F. J., Murphy, C. G., Patankar, S., Bukusoglu, G., Sonenshein, A. L. (1991). A *Bacillus subtilis* dipeptide transport system expressed early during sporulation. *Mol. Microbiol.* 5 (8): 1903-1913.

- 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 *Th* 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (3): 684-688.
- Mimmack, M. L., Gallagher, M. P., Hyde, S. C., Pearce, S. R., Booth, I. R., Higgins, C. F. (1989). Energy-coupling to periplasmic binding protein-dependent transport systems: Stoichiometry of ATP hydrolysis during transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8257-8261.
- Mimura, C. S., Admon, A., Hurt, K., Ames, G. F.-L. (1990). The nucleotide-binding site of HisP, a membrane protein of the histidine permease. *J. Biol. Chem.* 265: 19535-19542.
- Miwa, K., Matsui, H., Terabe, H., Nakamori, S., Sano, K., Mamose, H. (1984). Cryptic plasmids in glutamic acid producing bacteria. *Agric. Biol. Chem.* 48: 2901-2903.
- Miyajima, R., Otsuka, S.-I., Shiio, I. (1968). Regulation of aspartate family amino acids of the enzymes in threonine biosynthesis. *J. Biochem.* 63: 139-148.
- Miyajima, R. & Shiio, I. (1971). Regulation of aspartate family amino acid biosynthesis in *Brevibacterium flavum*; IV. Repression of the enzymes in threonine biosynthesis. *Agric. Biol. Chem.* 35: 424-430.
- Molenaar, D., Bosscher, J. S., ten Brink, B., Driessen, A. J. M., Konings, W. N. (1993). Generation of a proton motive force by histidine decarboxylation and electrogenic histidine/histamine antiport in *Lactobacillus buchneri*. *J. Bacteriol.* 175 (10): 2864-2870.
- Morbach, S., Tebbe, S., Schneider, E. (1993). The ATP-binding cassette (ABC) transporter for maltose/maltodextrins of *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 268: 18617-18621.
- Nadkarni, M. A., Pandey, V. N., Pradhan, D. S. (1993). An invertase with unusual properties secreted by sucrose-grown cells of *Corynebacterium murisepticum*. *Ind. J. Biochem. Biophys.* 30: 156-159.
- Nielsen, J. B. K. & Lampen, J. O. (1982). Glyceride-cysteine lipoproteins and secretion by gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 152 (1): 315-322.
- Nohno, T., Saito, T., Hong, J.-S. (1986). Cloning and complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* glutamine operon (*glnHPQ*). *Mol. Gen. Genet.* 205: 260-269.
- Nordström, K. & Uhlin, B. E. (1992). Runaway-replication plasmids as a tool to produce large quantities of proteins from cloned genes in bacteria. *Bio/Technology* 10: 661-666.
- Oh, B.-H., Pandit, J., Kang, C.-H., Nikaido, K., Gokcen, S., Ames, G. F.-L., Kim, S.-H. (1993). Three dimensional structures of the periplasmic lysine/arginine/ornithine-binding protein with and without a ligand. *J. Biol. Chem.* 268: 11348-11355.

Oka, A., Sugisaki, H., Takanami, M. (1981). Nucleotide sequence of the kanamycin resistance transposon *Tn903*. *J. Mol. Biol.* 147: 217-226.

Olah, G. A., Trakhanov, S., Trehwella, J., Quioco, F. A. (1993). Leucine/isoleucin/valine-binding protein contracts upon binding of ligand. *J. Biol. Chem.* 268: 16241-16247.

Otto, R., Sonnenberg, A. S. M., Veldkamp, H., Konings, W. N. (1980). Generation of an electrochemical proton gradient in *Streptococcus cremoris* by lactate efflux. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 5502-5506.

Pátek, M., Hochmannova, J., Nesvera, J. (1993). Production of threonine by *Brevibacterium flavum* containing threonine biosynthetic genes from *Escherichia coli*. *Folia Microbiol.* 38: 355-359.

Pátek, M., Krumbach, K., Eggeling, L., Sahm, H. (1994). Leucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: Enzyme activities, structure of *leuA*, and effect of *leuA* inactivation on lysine synthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (1): 133-140.

Peoples, O. P., Liebl, W., Bodis, M., Maeng, P.J., Follettie, M.T., Archer, J. A., Sinskey, A. J. (1988). Nucleotide sequence and final structural analysis of the *Corynebacterium glutamicum* *hom-thrB* operon. *Mol. Microbiol.* 2: 63-72.

Perego, M., Higgins, C. F., Pearce, S. R., Gallagher, M. P., Hoch, J. A. (1991). The oligopeptide transport system of *Bacillus subtilis* plays a role in the initiation of sporulation. *Mol. Microbiol.* 5 (1): 173-185.

Peyret, J. L., Bayan, N., Joliff, G., Guli-Krzywicki, T., Mathieu, L., Shechter, E., Leblon, G. (1993). Characterization of the *cspB* gene encoding PS2, an ordered surface-layer protein in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Microbiol.* 9(1): 97-109.

Poolman, B., Hellingwerf, K. J., Konings, W. N. (1987). Regulation of the glutamate-glutamine transport system by intracellular pH in *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 169: 2272-2276.

Poolman, B. (1990). Precursor/product antiport in bacteria. *Mol. Microbiol.* 4 (10): 1629-1636.

Poolman, B., Molenaar, D., Smid, E. J., Ubbink, T., Abee, T., Renault, P. P., Konings, W. N. (1991). Malolactic fermentation: electrogenic malate uptake and malate/lactate antiport generate metabolic energy. *J. Bacteriol.* 173: 6030- 6037.

Poolman, B. & Konings, W. N. (1993). Secondary solute transport in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1183: 5-39.

Pridmore, R. D. (1987). New and versatile cloning vectors with kanamycin-resistance marker. *Gene* 56: 309-312.

- Rao, J. K. M. & Argos, P. (1986). A conformational preference parameter to predict helices in integral membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 869: 197-214.
- Reinscheid, D. J., Kronmeyer, W., Eggeling, L., Eikmanns, B. J., Sahm, H. (1994). Stable expression of *hom-1 -thrB* in *Corynebacterium glutamicum* and its effect on the carbon flux to threonine and related amino acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (1): 126-132.
- Richarmie, G., Yaagoubi, A. E., Kohiyama, M. (1993). The MglA component of the binding protein-dependent galactose transport system of *Salmonella typhimurium* is a galactose-stimulated ATPase. *J. Biol. Chem.* 268: 9473-9477.
- Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B.-S., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.-L., Drumm, M. L., Iannuzzi, M. C., Collins, F. S., Tsui, L.-C. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: Cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245: 1066-1073.
- Ross, J. I., Eady, E. A., Cove, J. H., Cuncliffe, W. J., Baumberg, S., Wootton, J. C. (1990). Inducible erythromycin resistance in *staphylococci* is encoded by a member of the ATP-binding transport super-gene family. *Mol Microbiol.* 4 (7): 1207-1214.
- Rossol, I. & Pühler, A. (1992). The *Corynebacterium glutamicum aecD* gene encodes a C-S lyase with α,β -elimination activity that degrades aminoethylcysteine. *J. Bacteriol.* 174 (9): 2968- 2977.
- Ruan, Z.-S. , Anantharam, V., Crawford, I. T., Ambudkar, S. V., Rhee, S. Y., Allison, M. J., Maloney, P. C. (1992). Identification, purification, and reconstitution of OxIT, the oxatate:formate antiport protein of *Oxalobacter formigenes*. *J. Biol. Chem.* 267: 10537-10543.
- 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.
- Sanger, F., Nicklen, C., Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (12): 5463-5467.
- Santamaria, R. I., Gil, J. A., Martin, J. F. (1985). High frequency transformation of *Brevibacterium lactofermentum*. *J. Gen. Microbiol.* 130: 2-10.
- Schäfer, A., Kalinowski, J., Simon, R., Seep-Feldhaus, A.-H., Pühler, A. (1990). High-frequency conjugal plasmid transfer from gram-negative *Escherichia coli* to various gram-positive coryneform bacteria. *J. Bacteriol.* 172 (3): 1663-1666.
- Schmitz, G.G., Walter, T., Seibl, R., Kessler, C. (1991). Nonradioactive labeling of oligonucleotides in vitro with the hapten digoxigenin by tailing with terminal transferase. *Anal. Biochem.* 192: 222-231.

Schneider, E. (1990). Periplasmic binding protein-dependent transport of maltose/maltodextrins in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. In: A. Jacob (Ed.), Trends in Biomembranes and Bioenergetics, Vol 1 (pp 201-218), Research Trends for the Council of Scientific Research Integration, Trivandrum, India.

Schneider, E. & Walter, C. (1991). A chimeric nucleotide-binding protein, encoded by a *hisP-malK* hybrid gene, is functional in maltose transport in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* 5 (6): 1375-1383.

Schneider, R. & Hantke, K. (1993). Iron-hydroxamate uptake systems in *Bacillus subtilis*: identification of a lipoprotein as part of a binding protein-dependent transport system. *Mol. Microbiol.* 8 (1): 111-121.

Schrumpf, B. (1991). Lysinbildung mit *Corynebacterium glutamicum*: Analyse des Metabolitflusses durch Bestimmung zellinterner Aminosäurekonzentrationen und enzymatische Untersuchungen. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Schrumpf, B., Schwarzer, A., Kalinowski, J., Pühler, A., Eggeling, L., Sahm, H. (1991). A functionally split pathway for lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 173 (14): 4510-4516.

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.

Schwartz, M. (1987). The maltose regulon. In: Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., Brooks Low, K., Magasanik, B., Schaechter, M., Umberger, H. E. (Eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and molecular biology, Vol I (pp 1482-1502), American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Scripture, J. B., Voelker, C., Miller, S., O'Donnell, R. T., Polgar, L., Rade, J., Horazdovsky, B. F., Hogg, R. W. (1987). High affinity L-arabinose transport operon nucleotide sequence and analysis of gene products. *J. Mol. Biol.* 197: 37-64.

Seep-Feldhaus, A. H., Kalinowski, J., Pühler, A. (1991). Molecular analysis of the *Corynebacterium glutamicum lysI* gene involved in lysine uptake. *Mol. Microbiol.* 5 (12): 2995-3005.

Serwold-Davis, T. M., Groman, N., Rabin, M. (1987). Transformation of *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans*, *Corynebacterium glutamicum*, and *Escherichia coli* with the *C. diphtheriae* plasmid pNG2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 4964-4968.

Serwold-Davis, T. M. & Groman, N. B. (1988). Identification of a methylase gene for erythromycin resistance within the sequence of a spontaneously deleting fragment of *Corynebacterium diphtheriae* plasmid pNG2. *FEMS Microbiol. Lett.* 56: 7-14.

Serwold-Davis, T. M., Groman, N. B., Kao, C. C. (1990). Localization of an origin of replication in *Corynebacterium diphtheriae* broad host range plasmid pNG2 that also functions in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 66: 119-124.

- Sharff, A. J., Rodseth, L. E., Spurlino, J. C., Quioco, F. A. (1992). Crystallographic evidence of a large ligand-induced hinge-twist motion between the two domains of the maltodextrin binding protein involved in active transport and chemotaxis. *Biochemistry* 31: 10657-10663.
- Shiio, I. & Sano, K. (1969). Microbial production of L-lysine II. Production by mutants sensitive to threonine or methionine. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 15: 267-287.
- Simon, R., Priefer, U., Pühler, A. (1983). A broad host range vector mobilization system for in vivo genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology* 1: 784-791.
- Smelcman, S. & Hofnung, M. (1975). Maltose transport in *Escherichia coli*: Involvement of the bacteriophage lambda receptor. *J. Bacteriol.* 124: 112-118.
- Sonnen, H. (1991). Molekulargenetische Charakterisierung von Phagen-Wirt-Beziehungen bei Coryneformen Aminosäure-Produzenten. Dissertation, Technische Hochschule Darmstadt.
- Sonntag, K., Eggeling, L., De Graaf, A. A., Sahm, H. (1993). Flux partitioning in the split pathway of lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. Quantification by ^{13}C and ^1H -NMR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* 213: 1325-1331.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Spurlino, J. C., Lu, G.-Y., Quioco, F. A. (1991). The 2.3-Å resolution structure of the maltose- or maltodextrin-binding protein, a primary receptor of bacterial active transport and chemotaxis. *J. Biol. Chem.* 266: 5202-5219.
- Stirling, D. A., Hulton, C. S. J., Waddell, L., Park, S. F., Stewart, G. S. A. B., Booth, I. R., Higgins, C. F. (1989). Molecular characterization of the *proU* loci of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* encoding osmoregulated glycine betaine transport systems *Mol. Microbiol.* 3: 1025-1038.
- Sugar, I. P., Förster, W., Neumann, E. (1987). Model of cell electrofusion: membrane electroporation, pore coalescence and percolation. *Biophys. Chem.* 26: 321-335.
- Sundharadas, G. & Gilvarg, C. (1967). Biosynthesis of 2,6-diaminopimelate acid in *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Chem.* 242: 3983-3988.
- Tam, R. & Saier, M. H. (1993). Structural, functional, and evolutionary relationship among extracellular solute-binding receptors of bacteria. *Microbiol. Rev.* 57: 320-346.
- Takeshita, S., Sato, M., Toba, M., Masahashi, W., Hashimoto-Gotoh, T. (1987). High-copy-number and low-copy-number plasmid vectors for *lacZ* α -complementation and chloramphenicol- or kanamycin-resistance selection. *Gene* 61: 63-74.

- 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.
- Thierbach, G., Schwarzer, A., Pühler, A. (1988). Transformation of spheroplasts and protoplasts of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29: 356-362.
- Thierbach, G., Kalinowski, J., Bachmann, B., Pühler, A. (1990). Cloning of a DNA fragment from *Corynebacterium glutamicum* conferring aminoethyl cysteine resistance and feedback resistance to aspartokinase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 443-448.
- Trautwetter, A., Blanco, C., Sicard, A. M. (1987). Structural characteristics of the *Corynebacterium lilium* Bacteriophage CL31. *J. Virol.* 61 (5): 1540-1545.
- Truffa-Bachi, P. & Cohen, G. N. (1970). Aspartokinase I and Homoserindehydrogenase I (Escherichia coli K12). In: Tabor, H., White-Tabor, C. (Eds), *Methods in Enzymology*, Vol. XVII A (pp 649-699), Academic Press Inc., London, New York.
- Tynkkynen, S., Buist, G., Kunji, E., Kok, J., Poolman, B., Venema, G., Haandrikman, A. (1993). Genetic and biochemical characterization of the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 175 (23): 7523-7532.
- Vieira, J. & Messing, J. (1982). The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic primers. *Gene* 19: 259-268.
- Vrljic, M.-M. (1993). Versuche zur Isolierung am Lysinexport beteiligter Gene in *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Walker, J. E., Saraste, M., Rundswick, M. J., Gay, N. J. (1982). Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1: 945-951.
- Walter, C., Höner zu Bentrup, K., Schneider, E. (1992). Large scale purification, nucleotide binding properties, and ATPase activity of the MalK subunit of *Salmonella typhimurium* maltose transport complex. *J. Biol. Chem.* 267: 8863-8869.
- White, P. J. (1983). The essential role of diaminopimelate dehydrogenase in the biosynthesis of lysine by *Bacillus sphaericus*. *J. Gen. Microbiol.* 129: 739-749.
- Wolf, H., Pühler, A., Neumann, E. (1989). Electrotransformation of intact and osmotically sensitive cells of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30: 283-289.
- Wu, H. C. (1987). Posttranslational modification and processing of membrane proteins in bacteria. In: M. Inouye (Ed.), *Bacterial Outer Membrane as Model System*, (pp 37-71), New York, Academic Press.
- Wu, L. & Welker, N. E. (1991). Cloning and characterization of a glutamine transport operon of *Bacillus stearothermophilus* NUB36: Effect of temperature on regulation of transcription. *J. Bacteriol.* 173 (15): 4877-4888.

Yamaguchi, K., Yu, F., Inouye, M. (1988). A single amino acid determinant of the membrane localization of lipoproteins in *E. coli*. *Cell* 53: 423-432.

Yanish-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119.

Yeh, P., Oreglia, J., Sicard, A. M. (1985). Transfection of *Corynebacterium lilium* protoplasts. *J. Gen. Microbiol.* 131: 3179-3183.

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

Ymer, S. (1991). Heat inactivation of DNA ligase prior to electroporation increases transformation efficiency. *Nucleic Acids Res.* 19 (24): 6960.

Zabarovsky, E. R. & Winberg, G. (1990). High efficiency electroporation of ligated DNA into bacteria. *Nucleic Acids Res.* 18 (19): 5912.

Zanker, H., von Lintig, J., Schröder, J. (1992). Opine transport genes in the octopine (occ) and nopaline (noc) catabolic region in Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 174 (3): 841-849.

Zhang, J.-J., Hu, F.-M., Chen, N.-Y., Paulus, H. (1990). Comparison of the three aspartokinase isoenzymes in *Bacillus subtilis* Marburg and 168. *J. Bacteriol.* 172 (2): 701-708.

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

1. The first part of the paper is devoted to the study of the properties of the function $f(x)$ defined by the equation

2. The second part of the paper is devoted to the study of the properties of the function $f(x)$ defined by the equation

3. The third part of the paper is devoted to the study of the properties of the function $f(x)$ defined by the equation

4. The fourth part of the paper is devoted to the study of the properties of the function $f(x)$ defined by the equation

5. The fifth part of the paper is devoted to the study of the properties of the function $f(x)$ defined by the equation

6. The sixth part of the paper is devoted to the study of the properties of the function $f(x)$ defined by the equation

7. The seventh part of the paper is devoted to the study of the properties of the function $f(x)$ defined by the equation

8. The eighth part of the paper is devoted to the study of the properties of the function $f(x)$ defined by the equation

9. The ninth part of the paper is devoted to the study of the properties of the function $f(x)$ defined by the equation

10. The tenth part of the paper is devoted to the study of the properties of the function $f(x)$ defined by the equation

11. The eleventh part of the paper is devoted to the study of the properties of the function $f(x)$ defined by the equation

12. The twelfth part of the paper is devoted to the study of the properties of the function $f(x)$ defined by the equation

13. The thirteenth part of the paper is devoted to the study of the properties of the function $f(x)$ defined by the equation

14. The fourteenth part of the paper is devoted to the study of the properties of the function $f(x)$ defined by the equation

15. The fifteenth part of the paper is devoted to the study of the properties of the function $f(x)$ defined by the equation

16. The sixteenth part of the paper is devoted to the study of the properties of the function $f(x)$ defined by the equation

17. The seventeenth part of the paper is devoted to the study of the properties of the function $f(x)$ defined by the equation

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

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. H. Sahm für die Überlassung des Themas, seine Unterstützung und sein großes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. R. Krämer danke ich für das stete Interesse und die freundliche Übernahme des Korreferates.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. L. Eggeling für die intensive Betreuung, die ständige Diskussionsbereitschaft und die vielen Ratschläge, die erheblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Bei K. Krumbach möchte ich mich für die wertvolle Mitarbeit bedanken.

Allen Mitgliedern des Institutes danke ich für die freundliche Aufnahme, die Unterstützung und Hilfsbereitschaft. Besonders bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe bedanke ich mich: H. Cichorius, J. Engelmann, M. Vrljic, A. Wehrmann, C. Keilhauer, S. Oberle, S. Morakabath. Herrn Dr. B. Eikmanns danke ich für die freundliche Unterstützung

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

...the

...the

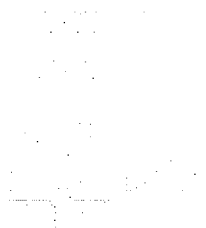
...the

...the

...the

...the

...the



Jül-2954

August 1994

ISSN 0944-2952