



Institut für Biotechnologie

***Untersuchungen zur Sekretion
und zum Abbau von L-Threonin
in Corynebacterium glutamicum***

Petra Ziegler

***Untersuchungen zur Sekretion
und zum Abbau von L-Threonin
in Corynebacterium glutamicum***

Petra Ziegler

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3816
ISSN 0944-2952
Institut für Biotechnologie Jül-3816
D 61 (Diss. Universität Düsseldorf, 2000)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
☎ 02461/61-6102 · Telefax: 02461/61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Secretion and Degradation of L-Threonine in *Corynebacterium glutamicum*

The aerobic, Gram-positive soil bacterium *Corynebacterium glutamicum* is an effective producer of amino acids. It is able to excrete L-threonine which is economically important as an additive for animal feed. Recently, it was shown that an efficient production of L-threonine with *C. glutamicum* is limited by its intracellular degradation and by the low capacity of an assumed L-threonine export carrier. Hence, the present work describes the investigation of L-threonine degrading enzymes in *C. glutamicum* as well as the identification and characterization of the L-threonine export carrier gene.

Enzymatic investigations revealed that L-threonine is converted to glycine and acetaldehyde. This aldol cleavage was shown to be catalyzed by serine hydroxymethyltransferase (SHMT). The corresponding gene *glyA* was isolated and sequenced. However, since *glyA* was proved to be essential for *C. glutamicum* its inactivation was not possible. Therefore, a strain with a single chromosomal copy of *glyA* under control of the IPTG inducible *tac*-promoter was constructed. In this strain SHMT activity could be down-regulated by low IPTG concentrations to 10% of the enzyme activity of the wild type.

Previously, biochemical analyses have revealed that L-threonine efflux in *C. glutamicum* is carrier-mediated. To identify and clone the corresponding export carrier gene, an appropriate screening system for export deficient mutants was established. It was shown that the addition of the tripeptide Thr-Thr-Thr to the medium led to retarded growth due to intracellular accumulation of L-threonine. Export deficient mutants should be unable to grow under these conditions due to extremely high intracellular amounts of L-threonine. A transposon mutant bank of *C. glutamicum* was constructed. By using the tripeptide screening system, nine mutants were isolated that exhibited retarded growth in presence of Thr-Thr-Thr. Analysis of the insertion sites of the transposon showed that in one of these mutants the inactivated gene was the L-threonine export carrier gene *thrE*. This gene encodes a hydrophobic membrane protein which does not show homology to any known transporter. It is 489 amino acids in size and is predicted to possess nine putative transmembrane helices. It was proved that L-threonine export is correlated with *thrE* expression. Inactivation of *thrE* resulted in a reduced export rate for L-threonine of $1.0 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ dry weight, compared to $2.5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ dry weight for the wild type, whereas with overexpressed *thrE* L-threonine was exported at a rate of $3.8 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ dry weight. Furthermore, the substrate specificity of the L-threonine export carrier was investigated. In addition to L-threonine also L-serine is transported by ThrE.

Overexpression of *thrE* in combination with reduced L-threonine degradation led to an increase of extracellular accumulated L-threonine of about 50% in a L-threonine producing strain of *C. glutamicum*.

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG.....	1
II. MATERIAL UND METHODEN.....	7
1. Bakterienstämme und Plasmide	7
2. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen	10
2.1 Nährmedien	10
2.2 Kultivierung der Bakterien	11
3. Molekulargenetische Methoden.....	12
3.1 Isolierung von DNA.....	12
3.2 Restriktion, Modifikation und Rekombination von DNA	12
3.3 Transformation von <i>E. coli</i> und <i>C. glutamicum</i>	12
3.4 Konjugativer Plasmidtransfer von <i>E. coli</i> nach <i>C. glutamicum</i>	13
3.5 Polymerasekettenreaktion	14
3.6 DNA-Sequenzierung und Computer-gestützte Sequenzanalysen	15
3.7 Transposonmutagenese von <i>C. glutamicum</i>	16
4. Bestimmung von Aminosäuren	17
4.1 Quantitative Bestimmung mittels <i>reversed phase</i> HPLC	17
4.2 Silikonölzentrifugation zur Bestimmung intrazellulärer Aminosäuren.....	17
5. Messung von Enzymaktivitäten	19
5.1 Herstellung von Zellrohextrakten	19
5.2 Threonindehydrogenase-Aktivität	20
5.3 Threoninaldolase-Aktivität.....	21
5.4 Serinhydroxymethyltransferase-Aktivität	23
6. Bestimmung von Exportraten.....	24
6.1 Erhöhung der intrazellulären Threoninkonzentration durch Fütterung von Threonintripeptid	24
6.2 Messung von Exportraten bei deenergetisierten Zellen.....	25
7. Bestimmung der Osmolalität von Medien	26
III. ERGEBNISSE	27
1. Untersuchungen zum Threoninabbau in <i>C. glutamicum</i>	27
1.1 Enzymatische Untersuchungen zur Glycinbildung aus L-Threonin	27
1.2 Versuche zur Isolierung des Gens für eine L-Threoninaldolase (<i>lda</i>)	30
1.3 Isolierung und Charakterisierung des Gens für die Serinhydroxy- methyltransferase (<i>glyA</i>)	32
1.4 Konstruktion eines <i>C. glutamicum</i> -Stammes mit induzierbarer Expression des Gens für die Serinhydroxymethyltransferase (<i>glyA</i>)	36
1.5 Auswirkungen reduzierter <i>glyA</i> -Expression.....	39

2. Entwicklung eines Testsystems und Isolierung von Threoninexportdefekten Mutanten	45
2.1 Erhöhung der intrazellulären Threoninkonzentration durch threoninhaltige Peptide	45
2.2 Transposonmutagenese und Isolierung von peptidsensitiven Mutanten	48
2.3 Klonierung und Sequenzierung der Transposoninsertionsorte	49
3. Klonierung und Charakterisierung von orf22	53
3.1 Isolierung von orf22 aus <i>C. glutamicum</i> ATCC13032 und Konstruktion von Mutanten.....	53
3.2 Beteiligung von orf22 am Threoninexport.....	54
3.3 Untersuchungen zur Funktion von orf 22	57
4. Klonierung und Charakterisierung von orf81	60
4.1 Isolierung von orf81 aus <i>C. glutamicum</i> ATCC13032 und Konstruktion von Mutanten.....	60
4.2 Untersuchungen zur Beteiligung des orf81-Genprodukts am Threoninexport.....	61
5. Klonierung und Charakterisierung des Gens für den Threoninexportcarrier <i>thrE</i> (orf53).....	65
5.1 Isolierung von <i>thrE</i> aus <i>C. glutamicum</i> ATCC13032 und Konstruktion von Mutanten.....	65
5.2 Sequenzanalyse von <i>thrE</i> und benachbarten Genen	66
5.3 Untersuchungen zur Funktion des durch <i>thrE</i> kodierten Proteins.....	70
5.4 Substratspezifität des Threoninexportcarriers	78
5.5 Einfluß von <i>thrE</i> -Überexpression auf die Threoninbildung	79
IV. DISKUSSION	83
1. Threoninabbau in <i>C. glutamicum</i>	83
2. Transposonmutagenese und Isolierung von Threoninpeptidsensitiven Mutanten.....	87
3. Der Threoninexportcarrier ThrE.....	90
4. Threoninbildung mit <i>C. glutamicum</i>	95
V. ZUSAMMENFASSUNG	99
VI. LITERATURVERZEICHNIS	100
VII. ANHANG	116
1. Sequenzen.....	116
2. PCR- und Sequenzierungsprimer	123
2.1 Degenerierte Primer zur Identifizierung von <i>lta</i> und <i>glyA</i>	123
2.2 Primer zur Sequenzierung und Genamplifikation	123
3. Restriktionskarten der konstruierten Plasmide	125

ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
AEC	S-(2-Aminoethyl)-L-cystein
AHV	2-Amino-3-hydroxyvalerat
AKB	2-Amino-3-ketobutyrat
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATCC	Stammsammlung (<i>American Type Culture Collection</i>)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
C-/N-Terminus	Carboxy-/Aminoterminus von Peptiden
CCCP	Carbonylcyanid- <i>m</i> -chlorophenylhydrazon
CoA	Coenzym A
Da	Dalton
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DMAB	Dimethylaminobenzaldehyd
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleic Acid</i>)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
F	Farad
FBR	<i>Feedback resistant</i>
h	Stunde(n)
HEPES	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)piperazin- <i>N'</i> -(2-ethansulfonsäure)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
L	Liter
M	Molarität [mol/L]
M_r	relative molare Masse
MBTH	<i>N</i> -Methylbenzothiazolonhydrazon
MCS	Klonierungsbereich (<i>Multiple Cloning Site</i>)
MES	3-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute(n)

MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat, reduzierte Form
nm	Nanometer
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
orf	Offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
<i>ori</i>	Replikationsursprung (<i>origin of replication</i>)
P _i	anorganisches Phosphat
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PLP	Pyridoxalphosphat
s	Sekunde(n)
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium Dodecylsulfate</i>)
SHMT	Serinhydroxymethyltransferase
sp.	Species
TA	Threoninaldolase
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TDH	Threonindehydrogenase
TEA	Triethanolamin
Tet	Tetracyclin
TG	Trockengewicht
THF	Tetrahydrofolat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween-80	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Enzymeinheiten (<i>Units</i>) [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$]
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)

I. EINLEITUNG

L-Threonin ist eine für Vertebraten essentielle Aminosäure. Da neben L-Methionin und L-Lysin häufig auch L-Threonin zu den limitierenden Aminosäuren in Futterrohstoffen zählt (Kleemann *et al.*, 1985), besitzt L-Threonin eine große wirtschaftliche Bedeutung als Futtermittelzusatz. Jährlich werden zu diesem Zweck weltweit etwa 15.000 Tonnen L-Threonin eingesetzt (Leuchtenberger, 1996). Die industrielle Produktion von L-Threonin erfolgt zur Zeit ausschließlich mit Hilfe genetisch veränderter *Escherichia coli*-Stämme (Okamoto und Ikeda, 2000; Furukawa *et al.*, 1988a; Nudel *et al.*, 1987). Es sind aber auch von anderen Mikroorganismen, wie z.B. *Serratia marcescens* (Sugita und Komatsubara, 1989), *Saccharomyces cerevisiae* (Farfán *et al.*, 1999) oder *Corynebacterium glutamicum* (Katsumata *et al.*, 1987), threoninproduzierende Mutanten beschrieben worden. *C. glutamicum* ist generell für seine Fähigkeit bekannt, große Mengen an Aminosäuren zu produzieren. Dieses 1957 von Kinoshita *et al.* isolierte Bakterium ist heutzutage der bedeutendste Organismus für die mikrobiologische Produktion der Aminosäuren L-Lysin und L-Glutamat (Eggeling und Sahm, 1999; Leuchtenberger, 1996).

Die Biosynthese von L-Threonin in *C. glutamicum* erfolgt als Teil eines verzweigten Biosyntheseweges in fünf enzymatischen Schritten ausgehend von L-Aspartat (Abb. 1). Dabei katalysieren die Enzyme Aspartatkinase und Aspartatsemialdehyd-Dehydrogenase ebenfalls die ersten Schritte der Lysinbiosynthese. Zusätzlich katalysieren diese beiden Enzyme zusammen mit dem dritten Enzym, der Homoserindehydrogenase, auch die ersten Reaktionen der Biosynthese von L-Methionin. Anders als bei *E. coli* oder *B. subtilis*, die Isoenzyme der Aspartatkinase besitzen (Cohen und Saint-Girons, 1987), existiert in *C. glutamicum* nur eine Aspartatkinase (*lysC*), welche durch eine konzertierte Endprodukt-Inhibierung bei gleichzeitig vorliegendem Überschuß von L-Threonin und L-Lysin reguliert wird (Shiio und Miyajima, 1969). Da die Biosynthese von L-Lysin in *C. glutamicum* nur durch dieses Enzym reguliert wird, führt die Überexpression des Gens für die Endprodukt-resistente Aspartatkinase, *lysC^{FBR}* (Kalinowski *et al.*, 1991), bereits zur Produktion von L-Lysin (Cremer *et al.*, 1991). Innerhalb der Threoninbiosynthese unterliegen hingegen noch weitere Enzyme einer Regulation. Die Homoserindehydrogenase (*hom*) wird durch L-Threonin inhibiert (Miyajima und Shiio, 1970) und auch für die Homoserinkinase (*thrB*) wurde eine schwache Endprodukt-Inhibierung durch L-Threonin beschrieben (Miyajima *et al.*, 1968). Weiterhin wird die Expression von *hom* und *thrB*, die in *C. glutamicum* in einem Operon organisiert sind (Peoples *et al.*, 1988; Follettie *et al.*, 1988), durch L-Methionin reprimiert (Follettie *et al.*, 1988; Miyajima und Shiio, 1971).

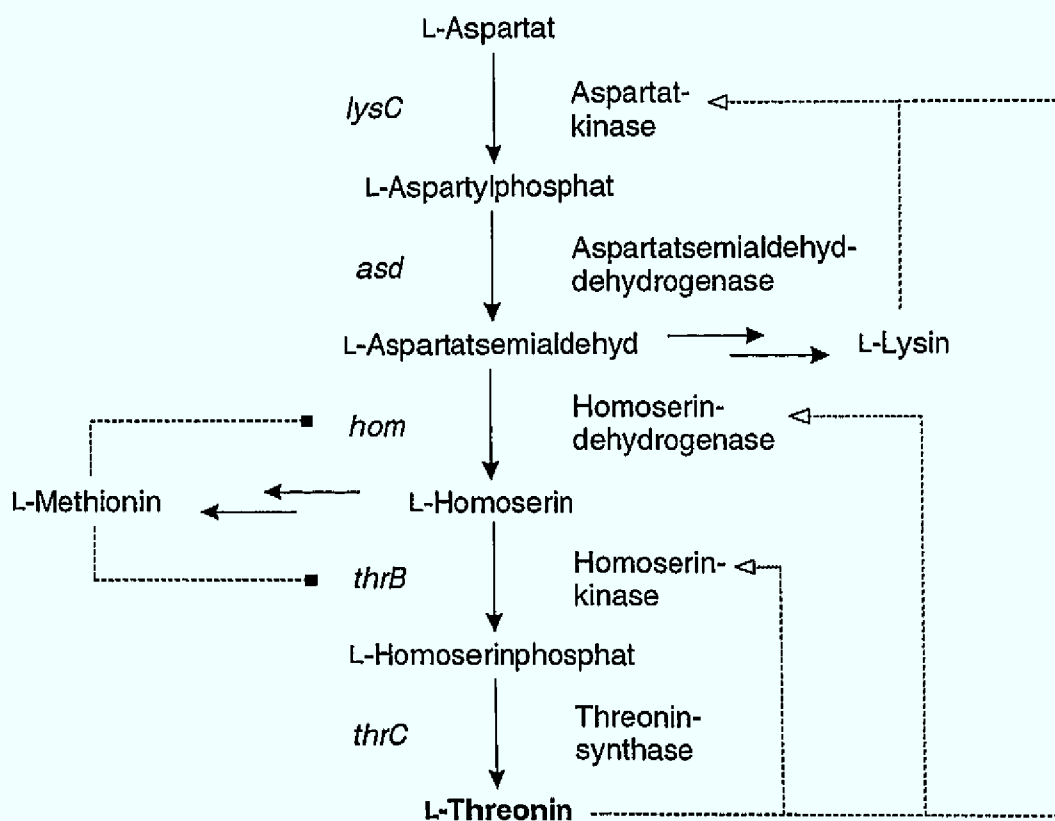


Abb. 1: Die L-Threoninbiosynthese in *C. glutamicum* als Teil des verzweigten Biosyntheseweges der Aminosäuren der Aspartatfamilie und deren Regulation.

- > Endprodukt-Inhibition
 -----■ Endprodukt-Repression

Der Lysinproduzentenstamm *C. glutamicum* MH20-22B, der eine Endprodukt-resistente Aspartatkinase besitzt, exkretiert etwa 200 mM Lysin (Schrumpf *et al.*, 1992). Die Enzyme Dihydrodipicolinatsynthase (Lysinbiosynthese) und Homoserindehydrogenase (Threoninbiosynthese) konkurrieren dabei um das gemeinsame Substrat L-Aspartatsemialdehyd (Abb. 1). Von Reinscheid *et al.* (1994) wurde gezeigt, daß in diesem Stamm eine Umlenkung des Stoffflusses von L-Lysin zu L-Threonin erreicht werden kann. Durch Überexpression des *hom^{FBR}-thrB*-Operons, welches das Gen für die Endprodukt-resistente Homoserindehydrogenase (Archer *et al.*, 1991; Reinscheid *et al.*, 1991) enthält, wird L-Aspartatsemialdehyd verstärkt zu L-Homoserin umgesetzt, so daß daraus eine Erhöhung der Threoninbildung resultiert. Auf diese Weise wurde der Threoninproduzentenstamm *C. glutamicum* MH20-22B-DR17 (Reinscheid *et al.*, 1994) erhalten. Auch in dem durch ungerichtete Mutagenese entstandenen threoninproduzierenden Stamm DM368-3 konnte die Threoninbildung durch Überexpression des *hom^{FBR}-thrB*-Operons deutlich verbessert werden (Eikmanns *et al.*, 1991).

Für eine effiziente Threoninbildung ist aber eine erhöhte Syntheserate durch Deregulation und Überexpression der Biosynthesegene allein nicht ausreichend. Ein Grund dafür ist, daß L-Threonin in Prokaryonten als Vorstufe in weiteren Reaktionen, z.B. bei der Isoleucinbiosynthese dient (Abb. 2). Entsprechend wurde bei threoninproduzierenden Stämmen von *C. glutamicum* beobachtet, daß parallel zu einer gesteigerten Threoninakkumulation auch L-Isoleucin in verstärktem Maße gebildet wird (Reinscheid *et al.*, 1994). Die Entstehung von L-Isoleucin kann durch Umsetzung von L-Threonin im bekannten Isoleucinbiosyntheseweg über die Enzyme Threonindehydratase (*ilvA*), Acetohydroxysäuresynthase (*ilvBN*), Isomero-reduktase (*ilvC*), Dihydroxysäuredehydratase (*ilvD*) und Transaminase B (*ilvE*) (Eikmanns *et al.*, 1993) erklärt werden (Abb. 2).

Weiterhin wurde in threoninproduzierenden Stämmen von *C. glutamicum* ebenfalls eine gesteigerte Glycinbildung beobachtet (Reinscheid *et al.*, 1994). Es ist nicht bekannt, durch welches Enzym die Umsetzung von L-Threonin zu Glycin in *C. glutamicum* katalysiert wird. Für eine Glycinbildung aus L-Threonin werden in Mikroorganismen zwei mögliche Reaktionswege diskutiert (Abb. 2) (McFall und Newman, 1996). Zum einen kann L-Threonin durch die NAD⁺- und Coenzym A-abhängigen Reaktionen von Threonindehydrogenase und 2-Amino-3-ketobutyrat-CoA-Lyase gespalten werden, wobei neben Glycin Acetyl-CoA entsteht (Newman *et al.*, 1976; Potter *et al.*, 1977; Komatsubara *et al.*, 1978). In *E. coli* wird L-Threonin hauptsächlich über diesen Weg abgebaut (Boylan und Dekker, 1981). Durch Reduzierung dieser Abbaureaktion konnte eine deutliche Steigerung der Threoninproduktion mit *E. coli* erreicht werden (Furukawa *et al.*, 1988b). Auch für *Corynebacterium* sp. wurde ein Abbau von L-Threonin durch eine Threonindehydrogenase-Aktivität beschrieben (Bell und Turner, 1976). Zum anderen kann der Threoninabbau zu Glycin und Acetaldehyd in einer Pyridoxalphosphat-abhängigen Aldolspaltung durch Threoninaldolase katalysiert werden (Morris, 1967; Liu *et al.*, 1998). Es wurde gezeigt, daß diese Reaktion *in vitro* auch von einigen Serinhydroxymethyltransferasen, z.B. aus *E. coli* (Schirch *et al.*, 1985) oder Rattenleber (Schirch und Gross, 1968), katalysiert wird. Hingegen dient L-Threonin für die gereinigte Serinhydroxymethyltransferase aus einem *Pseudomonas*-Stamm nicht als Substrat (Diaz-Diaz *et al.*, 1995). Es wurde lange Zeit angenommen, daß die Threoninspaltung in höheren Eukaryonten durch eine Serinhydroxymethyltransferase katalysiert wird (Voet und Voet, 1992). Aufgrund neuerer Untersuchungen wurde diese Hypothese aber wieder in Frage gestellt, so daß weiterhin ungeklärt bleibt, durch welches Enzym hier die Threoninspaltung erfolgt (Ogawa *et al.*, 2000). In Mikroorganismen hingegen ist die *in vivo*-Beteiligung einer Serinhydroxymethyltransferase am Threoninabbau nicht beschrieben.

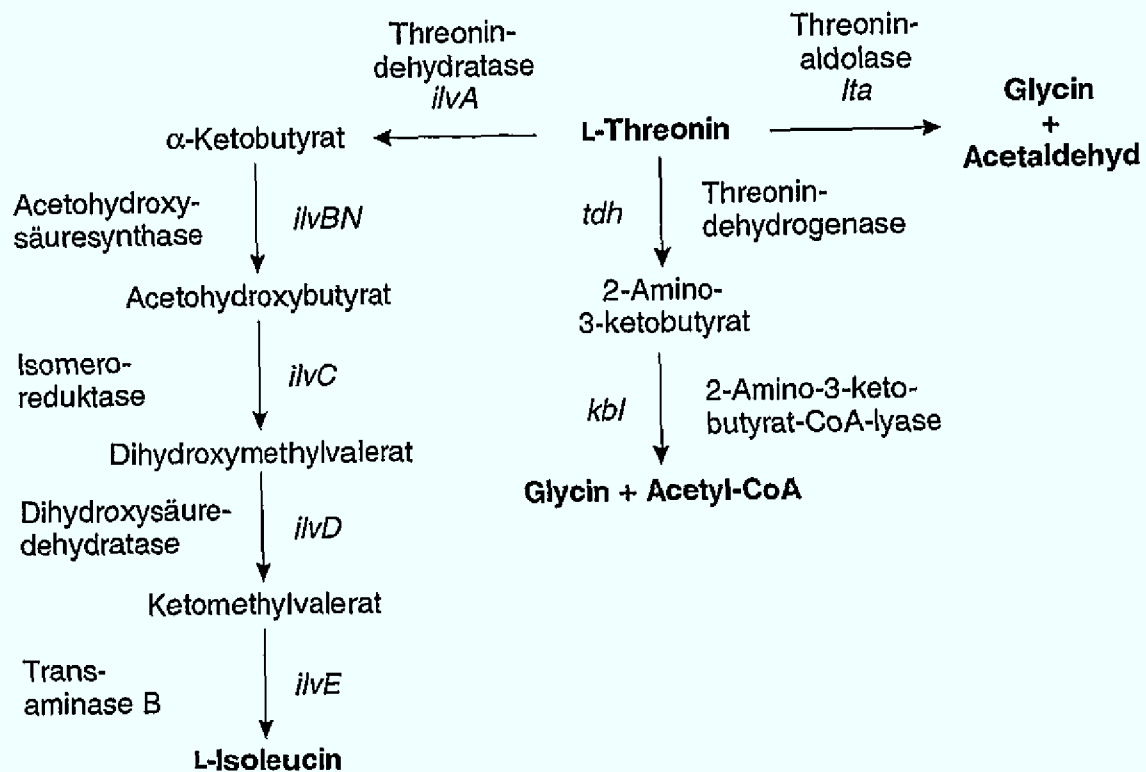


Abb. 2: Mögliche Reaktionen von L-Threonin in *C. glutamicum*. Gezeigt sind die Umsetzung zu L-Isoleucin über den bekannten Isoleucinbiosyntheseweg (links) sowie die für Mikroorganismen beschriebenen Spaltungsreaktionen zu Glycin und Acetaldehyd bzw. Glycin und Acetyl-CoA (rechts).

Von Reinscheid *et al.* (1994) wurde gezeigt, daß in *C. glutamicum* bei einer sukzessiven Erhöhung der chromosomalen Kopienzahl des *hom^{FBR}-thrB*-Operons zwar ein schrittweiser Anstieg der intrazellulären Threoninakkumulation erfolgt, extrazellulär aber keine entsprechende Erhöhung der Threoninkonzentration zu beobachten ist. Daraus kann geschlossen werden, daß die Exkretion von L-Threonin neben dem Threoninabbau einen weiteren limitierenden Schritt bei der Threoninproduktion mit *C. glutamicum* darstellt. Bei der Produktion anderer Aminosäuren, wie z.B. L-Isoleucin, konnte ebenfalls gezeigt werden, daß der Export limitierend ist (Morbach *et al.*, 1996). Auch bei der Lysinbildung durch *C. glutamicum* führt eine geringe Exportleistung zu einer intrazellulären Akkumulation von L-Lysin (Eggeling *et al.*, 1996). Obwohl der Transport von Aminosäuren aus der Zelle also offensichtlich eine wichtige Voraussetzung für die effiziente Aminosäureproduktion ist, gab es hierzu bis vor einigen Jahren keine molekularen Untersuchungen. Es wurde postuliert, daß der Aminosäureexport durch spezifische Exportcarrier vermittelt wird (Krämer, 1994a; 1994b). Diese Hypothese wurde durch die Charakterisierung der Effluxprozesse von L-Lysin (Bröer und

Krämer, 1991a), L-Isoleucin (Ebbighausen *et al.*, 1989), L-Glutamat (Hoischen und Krämer, 1989) und L-Threonin (Palmieri *et al.*, 1996) auf zellulärer Ebene in *C. glutamicum* gestützt. Bei all diesen Exportvorgängen handelt es sich um aktive, energieabhängige Transportprozesse. Im Fall der hydrophoben Aminosäure L-Isoleucin hat jedoch zusätzlich die Diffusion einen starken Anteil am Gesamtefflux (Zittrich und Krämer, 1994).

Trotz der Vielzahl an biochemischen Untersuchungen zum Aminosäureexport gelang erst kürzlich der molekulare Zugang zu einem Gen für einen solchen Aminosäureexporter. Das Gen für den Lysinexportcarrier LysE aus *C. glutamicum* konnte durch Komplementation einer im Lysinexport defekten Mutante isoliert werden (Vrljić *et al.*, 1995; 1996). Obwohl der Export von L-Lysin als ein sekundärer Transportmechanismus charakterisiert wurde (Bröer und Krämer, 1991b), besitzt der Lysinexportcarrier LysE keinerlei Sequenzähnlichkeit zu anderen sekundär aktiven Transportproteinen. Die meisten der bisher bekannten sekundär aktiven Aminosäure-Aufnahmesysteme oder Exportcarrier für toxische Substanzen gehören zur MFS-Familie (*major facilitator superfamily*) (Pao *et al.*, 1998) oder zur APC-Familie (*amino acids, polyamines, cholines*) (Saier, 1994). Die Proteine dieser Carrier-Familien sind durchschnittlich 500 Aminosäuren groß und besitzen zwölf transmembrane Bereiche. Der Lysinexportcarrier LysE hingegen ist lediglich 236 Aminosäuren groß und weist eine ungewöhnliche Topologie mit nur fünf transmembranen Helices auf (Vrljić *et al.*, 1996; Bellmann, 2000). Das LysE-Protein ist der namensgebende Vertreter einer neuen Klasse von Translokatoren, der LysE-Superfamilie (Vrljić *et al.*, 1999; Aleshin *et al.*, 1999). Es gibt noch zwei weitere Mitglieder dieser LysE-Superfamilie, für die kürzlich eine Funktion als Aminosäureexporter beschrieben wurde (Aleshin *et al.*, 1999; Zakataeva *et al.*, 1999). Bei den Proteinen RhtB und RhtC (*resistance to homoserine and threonine*) aus *E. coli* handelt es sich vermutlich um Carrier, die L-Homoserin und L-Homoserinlacton (RhtB) bzw. L-Threonin (RhtC) transportieren.

Neben diesen bisher charakterisierten Exportcarriern für Aminosäuren, die alle der LysE-Superfamilie von Translokatoren angehören, sind noch die Gene für zwei weitere putative Effluxsysteme für Aminosäuren oder deren Derivate identifiziert worden, die keine strukturelle Verwandtschaft zu LysE, RhtB und RhtC aufweisen. Zum einen wurden die Gene *azlC* und *azlD* (*azalaucine resistance*) identifiziert, welche für zwei hydrophobe Proteine kodieren, die möglicherweise gemeinsam den Export von verzweigtkettigen Aminosäuren in *B. subtilis* (Belitsky *et al.*, 1997) und in *C. glutamicum* (Kennerknecht, 1999) vermitteln. Zum anderen wurde eine Beteiligung des *mar*-Genlocus (*multiple antibiotic resistance*) am Efflux von L-Cystein in *E. coli* beschrieben (Winterhalter und Leinfelder, 1998). In diesem Fall handelt es sich wahrscheinlich aber nicht um einen spezifischen Aminosäurecarrier.

Vielmehr wird postuliert, daß das Mar-System, welches den Export von verschiedenen Antibiotika in *E.coli* katalysiert (Cohen *et al.*, 1993), auch ein für die Zelle möglicherweise toxisches Thiazolidinderivat aus Pyruvat und L-Cystein transportiert.

Über den Export von L-Threonin in *C. glutamicum* ist auf molekularer Ebene nichts bekannt. Es gibt lediglich einige biochemische Untersuchungen zur Exkretion von L-Threonin, durch welche gezeigt werden konnte, daß es sich auch hier um einen Carrier-vermittelten Transportprozeß handelt (Palmieri *et al.*, 1996). L-Threonin wird vermutlich im Antiport mit Protonen aus der Zelle transportiert; als treibende Kraft zum Transport über die Membran dient dabei das Membranpotential. Es konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Threoninexportrate und der Höhe des Membranpotentials gezeigt werden. Weiterhin wurde ausgeschlossen, daß der Threoninexport in *C. glutamicum* durch eine "Rückreaktion" des Threonin-Aufnahmecarriers katalysiert wird (Palmieri *et al.*, 1996). Die Aufnahme von L-Threonin aus dem Medium wurde für *C. glutamicum* ssp. *flavum* als Natriumionen-abhängiges Transportsystem beschrieben (Araki *et al.*, 1973; Shio *et al.*, 1973). Auch bei einem threoninproduzierenden Stamm von *C. glutamicum* wird L-Threonin im Cotransport mit einem Natriumion aufgenommen (Palmieri *et al.*, 1996). Da der Export von L-Threonin aber Na⁺-unabhängig verläuft, muß dieser Efflux durch ein separates Transportsystem vermittelt werden.

Das Ziel dieser Arbeit war zum einen die Aufklärung des Threoninabbaus in *C. glutamicum* durch enzymatische Untersuchungen und die Identifizierung der entsprechenden Gene. Es sollte untersucht werden, ob durch Inaktivierung des Threoninabbaus eine Verbesserung der Threoninproduktion erreicht werden kann. Zum anderen sollte das Gen für den Threonin-exportcarrier von *C. glutamicum* isoliert werden, um den Threoninexport molekular und funktionell charakterisieren zu können. Zur Klonierung des Gens war es notwendig, eine im Threoninexport defekte Mutante zu isolieren. Dazu mußte zunächst ein geeignetes Selektionssystem für exportdefekte Mutanten etabliert werden, welches es erlaubte, eine große Anzahl von Mutanten hinsichtlich eines möglichen Exportdefekts zu untersuchen. Zur Erzeugung dieser Mutanten sollte das neue Transposonmutagenese-System Tn5531 für *C. glutamicum* (Ankri *et al.*, 1996) eingesetzt werden, um so die unmittelbare Klonierung und schnelle Charakterisierung der Mutationsorte im Genom zu ermöglichen.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Bakterienstämme und Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme sowie deren Eigenschaften sind in Tabelle 1 und die verwendeten Plasmide in Tabelle 2 aufgeführt.

Tab. 1: Verwendete Bakterienstämme und ihre relevanten Eigenschaften.

Bakterienstamm	Genotyp / Phänotyp	Referenz
<i>E. coli</i>		
DH5 α MCR	<i>endA1 supE44 thi-1 λ^- recA1 gyrA96 relA1 deoR Δ(lacZYA-argF) U169 ϕ80dlacZΔM15 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i>	Grant <i>et al.</i> , 1990
S17-1	<i>thi-1 F' endAR1 hsdR17 supE44 λ^- pro</i>	Simon <i>et al.</i> , 1983
SCS110	<i>endA rpsL (str^R) thr leu thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ(lac-pro) [F' traD36 proAB lacI^fΔM15]</i>	Jerpseth und Kretz, 1993
GM2929	<i>dam-13::Tn9 dcm-6 hsdR2 recF143 mcrA mcrB</i>	Palmer und Marinus, 1994
GS245	<i>pheA905 araD139 lacU169 ΔglyA::mu strA thi-1</i>	Plamann <i>et al.</i> , 1983
<i>C. glutamicum</i>		
R127	Restriktionsdefekt, <i>res</i>	Liebl <i>et al.</i> , 1989
ATCC13032	Wildtypisolat	Abe <i>et al.</i> , 1967
ATCC14752	Wildtypisolat	ATCC
MH20-22B-DR17	Threoninproduzent, <i>lysC^{FBR} hom^{FBR} leuCD Kan^R</i>	Reinscheid <i>et al.</i> , 1994
DM368-2	Threonin- und Lysinproduzent, <i>lysC^{FBR} hom^{FBR} AEC^R AHV^R</i>	Degussa-Hüls AG EP-B-0 385 940 (DSM5399)
R127 Δ <i>ilvA</i>	Deletion eines 241 bp internen <i>ilvA</i> -Fragments	diese Arbeit

Tab. 1 (ff): Verwendete Bakterienstämme und ihre relevanten Eigenschaften.

Bakterienstamm	Genotyp / Phänotyp	Referenz
ATCC14752 Δ <i>ilvA</i>	Deletion eines 241 bp internen <i>ilvA</i> -Fragments	diese Arbeit
ATCC13032 Δ <i>thrE</i>	Deletion eines 968 bp internen <i>thrE</i> -Fragments	diese Arbeit
ATCC13032 <i>thrE</i> ::pK18 <i>mob'thrE'</i>	<i>thrE</i> disruptiert durch Integration des Vektors pK18 <i>mob'thrE'</i>	diese Arbeit
ATCC13032orf22 ::pK18 <i>mob'orf22'</i>	orf22 disruptiert durch Integration des Vektors pK18 <i>mob'orf22'</i>	diese Arbeit
ATCC13032orf81 ::pK18 <i>mob'orf81'</i>	orf81 disruptiert durch Integration des Vektors pK18 <i>mob'orf81'</i>	diese Arbeit
ATCC13032 ::pK18 <i>mobglyA'</i>	<i>glyA</i> disruptiert durch Integration des Vektors pK18 <i>mobglyA'</i> , so daß <i>glyA</i> im Chromosom unter Kontrolle des <i>tac</i> -Promotors vorliegt	diese Arbeit
DM368-2 ::pK18 <i>mobglyA'</i>	<i>glyA</i> disruptiert durch Integration des Vektors pK18 <i>mobglyA'</i> , so daß <i>glyA</i> im Chromosom unter Kontrolle des <i>tac</i> -Promotors vorliegt	diese Arbeit

Tab. 2: Verwendete Plasmide mit ihren Eigenschaften und Markern.

Plasmid	Marker / Eigenschaft	Referenz
pCGL0040	Donor von Tn5531 (IS1207, Kan ^R), <i>oriV_{E.c.}</i> Amp ^R	Reyes, pers. Mitteilung
pEC-T18 <i>mob2</i>	Pendelvektor, <i>oriV_{E.c.}</i> <i>oriV_{C.g.}</i> <i>mob Tet^R</i>	Degussa-Hüls AG
pUC18	Klonierungsvektor, <i>oriV_{E.c.}</i> Amp ^R	Norlander <i>et al.</i> , 1983
pVWEx2	Expressionsvektor, <i>oriV_{E.c.}</i> <i>oriV_{C.g.}</i> <i>lacI^f Ptac Tet^R</i>	Wendisch, 1997
pZ1	Pendelvektor, <i>oriV_{E.c.}</i> <i>oriV_{C.g.}</i> Kan ^R	Menkel <i>et al.</i> , 1989
pK18 <i>mob</i>	Integrationsvektor, <i>oriV_{E.c.}</i> <i>oriT mob Kan^R</i>	Schäfer <i>et al.</i> , 1994b
pK19 <i>mobsacB</i>	Integrationsvektor, <i>oriV_{E.c.}</i> <i>oriT mob sacB Kan^R</i>	Schäfer <i>et al.</i> , 1994b
pK19 <i>mobsacB</i> Δ <i>glyA</i>	pK19 <i>mobsacB</i> mit <i>glyA</i> -Sequenz, deletiert ist ein internes 781 bp <i>EcoRI/SalI</i> -Fragment von <i>glyA</i>	Willuhn, 1999

Tab. 2(ff): Verwendete Plasmide mit ihren Eigenschaften und Markern.

Plasmid	Marker / Eigenschaft	Referenz
pK19 <i>mobsacB</i> Δ <i>ilvA</i>	pK19 <i>mobsacB</i> mit <i>ilvA</i> -Sequenz, deletiert ist ein internes 241 bp <i>Bgl</i> II-Fragment von <i>ilvA</i>	Sahm und Eggeling, 1999
pK19 <i>mobsacB</i> Δ <i>thrE</i>	pK19 <i>mobsacB</i> mit <i>thrE</i> -Sequenz, deletiert ist ein internes 968 bp <i>Eco</i> RV/ <i>Sac</i> II-Fragment von <i>thrE</i>	diese Arbeit
pK18 <i>mob</i> ' <i>thrE</i> '	pK18 <i>mob</i> mit internem 411 bp <i>thrE</i> -Fragment	diese Arbeit
pK18 <i>mob</i> 'orf22'	pK18 <i>mob</i> mit internem 274 bp orf22-Fragment	diese Arbeit
pK18 <i>mob</i> 'orf81'	pK18 <i>mob</i> mit internem 368 bp orf81-Fragment	diese Arbeit
pK18 <i>mobglyA</i> '	pK18 <i>mob</i> mit 2,0 kb PCR-Fragment aus pVWEx2 <i>glyA</i> , enthält <i>lacI^f</i> , <i>P_{tac}</i> und ein 5'-terminales 437 bp <i>glyA</i> -Fragment	diese Arbeit
pUC18 <i>glyA</i>	pUC18 mit 1,6 kb PCR-Fragment aus chromosomaler DNA von ATCC13032, enthält <i>glyA</i>	Willuhn, 1999
pUC18 <i>thrE</i>	pUC18 mit 1,9 kb PCR-Fragment aus chromosomaler DNA von ATCC13032, enthält <i>thrE</i>	diese Arbeit
pEC-T18 <i>mob2thrE</i>	pEC-T18 <i>mob2</i> mit 1,9 kb <i>Sac</i> I/ <i>Xba</i> I-Insert aus pUC18 <i>thrE</i>	diese Arbeit
pVWEx2 <i>glyA</i>	pVWEx2 mit 1,4 kb <i>Tfi</i> I/ <i>Eco</i> RI-Insert aus pUC18 <i>glyA</i>	diese Arbeit
pZ1 <i>glyA</i>	pZ1 mit 1,65 kb <i>Sal</i> I/ <i>Eco</i> RI-Insert aus pUC18 <i>glyA</i>	Willuhn, 1999
pZ1 <i>thrE</i>	pZ1 mit 1,9 kb <i>Sac</i> I/ <i>Xba</i> I-Insert aus pUC18 <i>thrE</i>	diese Arbeit
pZ1orf22	pZ1 mit 1,0 kb PCR-Fragment aus chromosomaler DNA von ATCC13032, enthält orf22	diese Arbeit
pZ1orf81	pZ1 mit 1,5 kb PCR-Fragment aus chromosomaler DNA von ATCC13032, enthält orf81	diese Arbeit

Die Restriktionskarten der in dieser Arbeit konstruierten Plasmide sind in Anhang 3 aufgeführt.

2. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

2.1 Nährmedien

Nährmedien für *Escherichia coli*

Zur Kultivierung von *E. coli*-Stämmen wurde im allgemeinen LB-Vollmedium nach Sambrook *et al.* (1989) verwendet. Nur für Komplementationsversuche mit dem Glycin-auxotrophen *E. coli*-Stamm GS245 wurde YNB-Minimalmedium (Difco Laboratories, Detroit, USA) verwendet, welches zusätzlich mit 0,5% (w/v) Glukose und 50 mg/L L-Phenylalanin supplementiert wurde.

Nährmedien für *Corynebacterium glutamicum*

Zur Stammhaltung und DNA-Isolierung wurde LB-Vollmedium verwendet. Als Vollmedium für Vorkulturen wurde BHI-Komplexmedium (Difco Laboratories, Detroit, USA) eingesetzt. Für alle Kultivierungen zur Quantifizierung der Aminosäureproduktion, Messung von Exportraten und Bestimmung von Enzymaktivitäten wurde das Minimalmedium CGXII (Keilhauer *et al.*, 1993) mit 4% (w/v) Glukose benutzt. Dieses Medium besitzt durch den Zusatz von 3-(*N*-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS) sehr gute Puffereigenschaften im pH-Bereich um 7,0. Zur Regeneration der Zellen nach Elektroporation wurde BHIS-Medium (BHI-Komplexmedium mit 0,5 M Sorbitol) verwendet.

Medienzusätze

Zur Selektion rekombinanter *E. coli*-Stämme wurden dem Medium Antibiotika in den folgenden Endkonzentrationen zugesetzt:

Carbenicillin	50 µg/mL
Tetracyclin	10 µg/mL
Kanamycin	50 µg/mL

Die Selektion rekombinanter *C. glutamicum*-Stämme erfolgte mit:

Tetracyclin	5 µg/mL
Kanamycin	50 µg/mL (bei frei replizierbaren Vektoren)
	25 µg/mL (bei Integration eines Vektors in das Genom)
	15 µg/mL (nach Elektroporation und Konjugation)

Nach einer Konjugation wurde außerdem Nalidixinsäure in einer Endkonzentration von 50 µg/mL eingesetzt, um das Wachstum der *E. coli* Donorzellen zu verhindern. Die Selektion auf Excision der Vektoren pK19*mobsacB*Δ*thrE* und pK19*mobsacB*Δ*llvA* aus dem Genom von *C. glutamicum* erfolgte auf LB-Medium mit 10% (w/v) Saccharose (Schäfer *et al.*, 1994b).

Zur Herstellung von Agarplatten wurden die Medien mit 1,5% (w/v) Agar (Difco Laboratories, Detroit, USA) versetzt.

Bei Kultivierung von Leucin- oder Isoleucin-auxotrophen Stämmen in CGXII-Minimalmedium enthielt das Medium die entsprechende Aminosäure in einer Endkonzentration von 300 mg/L. Zur Expression des *glyA*-Gens, das unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren *tac*-Promotors stand, wurde dem Medium, je nach Versuchsdurchführung, 10 μ M oder 100 μ M IPTG zugesetzt. Bei Kultivierung auf Di- oder Tripeptid-haltigem Medium enthielt CGXII-Minimalmedium die Peptide in den folgenden Endkonzentrationen:

Ile-Ile	3 mM
Arg-Ala	2 mM
Thr-Ala	1 mM
Ala-Thr	1 mM
Thr-Thr-Thr	1 mM oder 2 mM
Ser-Ser-Ser	1 mM

2.2 Kultivierung der Bakterien

Die Kultivierung von *E. coli* und *C. glutamicum* erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in 500 mL Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen. Diese enthielten 100 mL Vollmedium bzw. 50 oder 60 mL CGXII-Minimalmedium. Für Plasmidisolationen im kleineren Maßstab wurden 5 mL LB-Vollmedium im Reagenzglas verwendet. Kulturen in Reagenzgläsern wurden unter Schütteln bei einer Geschwindigkeit von 180 Upm, alle anderen Kulturen bei einer Geschwindigkeit von 130 Upm inkubiert. Die Kultivierungstemperatur betrug 37 °C für *E. coli* und 30 °C für *C. glutamicum*. Zur Bestimmung von Enzymaktivitäten, Exportraten oder Aminosäure-Konzentrationen wurden die Zellen über Nacht auf Komplexmedium vorkultiviert und dann in Minimalmedium übertragen. Dazu wurden Aliquots der Vorkulturen steril entnommen, 10 min bei 5000 Upm und 4 °C abzentrifugiert, mit 50 mL steriler 0,9%-iger (w/v) NaCl-Lösung gewaschen und dann in Minimalmedium überführt. Dabei wurde, wenn nicht anders angegeben, eine anfängliche Zelldichte von $OD_{600} = 0,5$ eingestellt.

Zur Stammhaltung wurden Dauerkulturen angelegt, die aus 70% (v/v) einer über Nacht auf Komplexmedium angezogenen Kultur und 30% (v/v) sterilem Glycerin bestanden. Aliquots dieser Zellsuspensionen wurden bei -20 °C oder -70 °C aufbewahrt und zum Beimpfen von Agarplatten verwendet. Diese Stammhaltungsplatten wurden im Fall von *E. coli* für 18 Stunden bei 37 °C bzw. im Fall von *C. glutamicum* für 48 Stunden bei 30 °C inkubiert, dann bei 4 °C gelagert und 14-tägig erneuert.

3. Molekulargenetische Methoden

3.1 Isolierung von DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden der *Plasmid Purification Kit* der Firma Qiagen (Hilden) oder der *NucleoBond Kit* der Firma Macherey & Nagel (Düren) verwendet. Das Prinzip bei beiden Herstellern beruht auf der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (1979). Um Plasmid-DNA aus *C. glutamicum* zu isolieren, wurde eine modifizierte Form der alkalischen Lyse verwendet (Schwarzer und Pühler, 1991). Die Isolierung chromosomaler DNA aus *C. glutamicum* erfolgte nach Eikmanns *et al.* (1994).

3.2 Restriktion, Modifikation und Rekombination von DNA

Alle Techniken zur Restriktion, Präzipitation, Phenol-Extraktion, Klenow- oder alkalische Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Ligationen erfolgten entweder über Nacht bei 16 °C mit T4-DNA-Ligase oder wurden mit dem *Rapid Ligation Kit* (Roche Diagnostic, Mannheim) in 5 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Zur Ligation von PCR-Fragmenten wurde der *SureClone Ligation Kit* der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 0,5 bis 2%-igen Agarosegelen (Sambrook *et al.*, 1989). Wurden die im Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente für weitere Klonierungsschritte benötigt, so wurden sie mit Hilfe des *NucleoSpin Extract 2 in 1 Kit* (Macherey & Nagel) aus dem Gel isoliert und aufgereinigt.

3.3 Transformation von *E. coli* und *C. glutamicum*

Transformation von *E. coli*

Zur Transformation von *E. coli* wurde die Methode der Elektroporation angewandt (Dower *et al.*, 1988). Die Präparation der Zellen für die Elektroporation sowie die Durchführung erfolgte dabei nach Dower *et al.* (1988). Außerdem wurden *E. coli*-Zellen nach der Methode von Chung *et al.* (1989) transformiert. Die Zellen wurden dabei durch Behandlung mit Dimethylsulfoxid und Polyethylenglykol zur Aufnahme der zu transformierenden DNA vorbereitet.

Transformation von *C. glutamicum*

Zur Transformation von *C. glutamicum* wurde die Methode der Elektroporation mit anschließendem Hitzeschock angewandt (van der Rest *et al.*, 1999). Dazu wurden 10 mL LB-Medium mit 2% (w/v) Glukose (100 mL Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen) mit einer Einzelkolonie von *C. glutamicum* angeimpft und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden 100 mL LB-Vollmedium mit Wachstumsinhibitoren (4 mg/mL Isonicotinsäurehydrazid, 2,5% (w/v) Glycin und 0,1% (v/v) Tween 80; modifiziert nach Haynes und Britz (1989; 1990)) mit der Übernachtskultur angeimpft, so daß eine anfängliche Zelldichte von $OD_{600} = 0,3$ vorlag. Diese Kultur wurde für etwa 28 h bei 18 °C inkubiert. Die Kultivierung bei dieser sehr niedrigen Temperatur bewirkt eine Veränderung der Lipidzusammensetzung der Zellmembran, wodurch möglicherweise die Aufnahme von DNA bei der Elektroporation beeinflusst wird (van der Rest *et al.*, 1999). Nach Erreichen einer Zelldichte von $OD_{600} = 1,0$ wurden die Zellen für 10 min auf Eis abgekühlt und dann durch Zentrifugation (10 min, 4000 Upm, 4 °C) geerntet. Die Zellen wurden nachfolgend viermal mit 50 mL eiskaltem 10%-igen (v/v) Glycerin gewaschen, anschließend in 0,5 mL eiskaltem 10%-igen (v/v) Glycerin resuspendiert und bis zu ihrer Verwendung in Aliquots von 100 µL bei -70 °C gelagert. Zur Elektroporation wurden 100 µL Zellen mit der zu transformierenden DNA gemischt und luftblasenfrei in eine vorgekühlte, sterile Elektroporationsküvette (Typ 16 S 2086, Biorad, München) überführt. Die Elektroporation wurde dann bei einer Spannung von 2,5 kV, einem Parallelwiderstand von 600 Ω und einer Kondensatorkapazität von 25 µF in einem BIORAD GENE PULSERTM (Biorad, München) durchgeführt. Sofort nach Beendigung des elektrischen Pulses wurde die Zellsuspension in 1 mL BHIS-Medium (BHI-Komplexmedium mit 0,5 M Sorbitol) aufgenommen, in ein 2 mL-Eppendorfreaktionsgefäß überführt und 6 min bei 46 °C inkubiert. Dieser Hitzeschock inaktiviert vermutlich das Restriktionssystem von *C. glutamicum*, so daß bei Verwendung heterologer DNA eine höhere Transformationseffizienz erreicht werden kann (Schäfer *et al.*, 1994a). Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen für 60 min bei 30 °C unter Schütteln regeneriert, bevor die Zellsuspension auf Antibiotika-haltigem LBHIS-Medium (Liebl *et al.*, 1989) ausplattiert wurde.

3.4 Konjugativer Plasmidtransfer von *E. coli* nach *C. glutamicum*

Der konjugative Transfer von mobilisierbaren Plasmiden vom Donor *E. coli* S17-1 zum Rezipienten *C. glutamicum* wurde nach der Methode von Schäfer *et al.* (1990) durchgeführt. Dazu wurden 400 µL einer LB-Vorkultur des Donors in 20 mL LB-Medium (100 mL Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen) überimpft und bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0,8$ bis 1,1 inkubiert. Die Kultur wurde dann auf Eis gelagert. Pro Konjugationsansatz

wurden 3 mL einer LB-Übernachtskultur ($OD_{600} = 3$ bis 8) des Rezipienten in einem Reagenzglas einem Hitzeschock (9 min bei 48,5 °C) unterzogen. Es wird vermutet, daß dieser Hitzeschock das Restriktionssystem von *C. glutamicum* inaktiviert, so daß eine höhere Effizienz bei der DNA-Übertragung von *E. coli* nach *C. glutamicum* ermöglicht wird (Schäfer *et al.*, 1994a). Anschließend wurden 1 mL Donorzellen mit 3 mL Rezipientenzellen in einem Reagenzglas gemischt und das Zellgemisch bei Raumtemperatur zentrifugiert (5 min bei 4000 Upm). Nach Abnehmen des Überstandes wurde das Zellpellet in 100 µL LB-Medium resuspendiert und die so erhaltene Zellsuspension auf einen sterilen, auf einer LB-Agarplatte liegenden Zellulosenitratfilter (Millipore, Typ HAWP, Porengröße 0,45 µm, Millipore S.A., Molsheim, Frankreich) pipettiert. Nach dem Antrocknen der Suspension wurden die Filter für 20 h bei 30 °C inkubiert; während dieser Zeit konnte der konjugativen Plasmidtransfer von *E. coli* nach *C. glutamicum* erfolgen. Die Zellen wurden anschließend mit 600 µL LB-Medium von den Filtern abgeschwemmt und diese Suspension auf BHI-Agarplatten mit 50 µg/mL Nalidixinsäure und 15 µg/mL Kanamycin ausplattiert. Da der Donorstamm *E. coli* S17-1 Nalidixinsäure-sensitiv ist, konnten auf diesem Medium nur *C. glutamicum*-Zellen wachsen.

3.5 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde sowohl zur *in vitro* Vervielfältigung von DNA-Fragmenten (Saiki *et al.*, 1988; Tindall und Kunkel, 1988), als auch analytisch zur Überprüfung von Insertions- und Deletionsmutanten eingesetzt. Dabei wurden jeweils zwei Oligonukleotide als Primer eingesetzt, die den zu amplifizierenden DNA-Bereich flankierten. Zur Durchführung der PCR wurde ein Thermocycler der Firma Biozym Diagnostik (Oldendorf) verwendet. Als Matrizen-DNA wurde üblicherweise genomische DNA aus durch Hitzebehandlung aufgeschlossenen Bakterienzellen verwendet. Dazu wurde eine Kolonie des zu untersuchenden Stammes in 100 µL sterilem Wasser resuspendiert und die Suspension für 5 min bei 95 °C inkubiert, um die Zellen aufzuschließen. Nur bei Verwendung von degenerierten Primern wurde isolierte chromosomale DNA als Matrize eingesetzt, da aufgrund der Degeneration der Primer in diesem Fall eine höhere Konzentration von Matrizen-DNA benötigt wurde. Die *annealing*-Temperatur wurde aus der Basenzusammensetzung der verwendeten Primer (siehe Anhang 2.2) mit folgender Formel berechnet: *annealing*-Temperatur = 2 °C (pro A-T-Basenpaarung mit der Matrizen-DNA) + 4 °C (pro G-C-Paarung) – 5 °C (Sambrook *et al.*, 1989). Die DNA-Polymerisation erfolgte bei 72 °C, wobei sich die Elongationszeit nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments richtete. Die *Taq*-Polymerase kann etwa 1000 Basen pro Minute synthetisieren, so daß die Polymerisationszeit durch Multiplikation der Länge des erwarteten PCR-Fragments (in kb) mit 1,5 min errechnet

wurde. Wenn nicht anders angegeben, wurden 30 Zyklen durchgeführt. Nach Beendigung der Reaktion wurde ein Aliquot jedes Ansatzes entnommen und durch Agarosegelelektrophorese analysiert. Wurden die amplifizierten DNA-Fragmente für weitere Klonierungsschritte benötigt, so wurden sie mit Hilfe des *NucleoSpin Extract 2 in 1 Kit* (Macherey & Nagel) aufgereinigt.

Die Überprüfung von Insertions- und Deletionsmutanten wurde mit *Taq*-DNA-Polymerase der Firma Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten, die für weitere Klonierungsschritte benötigt wurden, wurde mit dem *ExpandTM High Fidelity PCR System* der Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) nach den Herstellerangaben durchgeführt. Dieser Kit enthält ein Gemisch aus der schnellen *Taq*-Polymerase und der fehlerkorrigierenden *Pwo*-Polymerase, was zu einer geringeren Fehlerquote bei der Amplifikation führt (Barnes, 1994).

3.6 DNA-Sequenzierung und Computer-gestützte Sequenzanalysen

Alle DNA-Sequenzierungen wurden nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* (1977) mit den im Anhang 2.2 aufgeführten Primern bei der Firma Agowa (Berlin) durchgeführt.

Die so erhaltenen DNA-Sequenzen wurden mit dem Programm *Clone Manager for Windows* (Version 4.01; Scientific & Educational Software) zusammengefügt. Auch zur Analyse von Restriktionsschnittstellen und offenen Leserahmen wurde dieses Programm verwendet. Die Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurde mit Hilfe des Programms *Protean* (Programmpaket Lasergene, Biocomputing Software for Windows, DNASTAR, Madison, USA) durchgeführt. Dieses Programm ermöglicht neben der Bestimmung der molaren Masse und der Aminosäurezusammensetzung eines Proteins auch eine Hydrophobizitätsanalyse nach dem Algorithmus von Kyte und Doolittle (1982). Zum Sequenzvergleich von Polypeptiden wurde das *Multiple Sequence Alignment* Programm ClustalW 1.8 (Jeanmougin *et al.*, 1998) verwendet. Die Datenbankvergleiche zur Suche nach DNA- und Proteinsequenzen mit Ähnlichkeit zu den in dieser Arbeit ermittelten Sequenzen erfolgte mittels der Programme BLASTX, BLASTN und BLASTP (Altschul *et al.*, 1997) mit den am *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, Washington, USA) zur Verfügung stehenden Datenbanken (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Zur Vorhersage der Sekundärstruktur von Polypeptidsequenzen wurde für Membranproteine das Programm PHD.htm *Neuronal Net* (Rost *et al.*, 1995) und für cytosolische Proteine das Programm PHD.sec (Rost und Sander, 1993; 1994) eingesetzt.

3.7 Transposonmutagenese von *C. glutamicum*

Zur Transposonmutagenese von *C. glutamicum* ATCC14752 Δ ilvA wurde das Transposon Tn5531 (Ankri *et al.*, 1996) verwendet. Dazu wurde zunächst aus dem *E. coli*-Stamm GM2929 (Palmer und Marinus, 1994) das Plasmid pCGL0040 (Reyes, pers. Mitteilung) isoliert, welches das Transposon Tn5531 enthält. *C. glutamicum* ATCC14752 Δ ilvA wurde durch Elektroporation (Haynes und Britz, 1989) mit der isolierten Plasmid-DNA transformiert. Die Präparation der Zellen und die Durchführung der Elektroporation erfolgte dabei nach einer Methode von Reyes (pers. Mitteilung). Dazu wurden 5 mL BHI-Medium mit einer Einzelkolonie von *C. glutamicum* ATCC14752 Δ ilvA angeimpft und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Mit 1,0 mL dieser Übernachtskultur wurden 100 mL BHI-Vollmedium (+ 0,1% (v/v) Tween 80 als Wachstumsinhibitor) angeimpft. Diese Kultur wurde bis zum Erreichen einer Zelldichte von OD₆₀₀ = 1,5 (ca. 3 h) bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden dann für 10 min auf Eis abgekühlt und durch Zentrifugation (10 min, 4000 Upm, 4 °C) geerntet. Zur vollständigen Entfernung des Mediums wurden die Zellen nachfolgend einmal mit 100 mL eiskaltem Wasser, einmal mit 50 mL eiskaltem Wasser und einmal mit 2 mL eiskaltem 10%-igen (v/v) Glycerin gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 0,7 mL eiskaltem 10%-igen (v/v) Glycerin resuspendiert. Diese Suspension konnte bis zu ihrer Verwendung in Aliquots von 100 µL bei -70 °C gelagert werden. Zur Elektroporation wurden 100 µL Zellen mit 2 µL Plasmid-DNA von pCGL0040 gemischt und luftblasenfrei in eine vorgekühlte, sterile Elektroporationsküvette (Typ 16 S 2086, Biorad, München) überführt. Die Elektroporation wurde bei einer Spannung von 2,5 kV, einem Parallelwiderstand von 200 Ω und einer Kondensatorkapazität von 25 µF in einem BIORAD GENE PULSER™ (Biorad, München) durchgeführt. Sofort nach Beendigung des elektrischen Pulses wurde die Zellsuspension in 1 mL BHI-Medium aufgenommen und für 90 min bei 30 °C unter Schütteln regeneriert, bevor die Zellsuspension auf 15 µg/mL Kanamycin enthaltene LBHIS-Medium (Liebl *et al.*, 1989) ausplattiert wurde. Diese Platten wurden drei bis fünf Tage bei 30 °C inkubiert. Durch das in pCGL0040 enthaltene Transposon Tn5531 wird eine Kanamycinresistenz vermittelt. Da das Plasmid pCGL0040 in *C. glutamicum* nicht frei replizierbar ist, konnten nur solche Klone von *C. glutamicum* wachsen, bei denen eine Transposition mit Tn5531 stattgefunden hatte. Pro Transformationsansatz wurden auf diese Weise bis zu 500 Transposonmutanten erhalten.

4. Bestimmung von Aminosäuren

4.1 Quantitative Bestimmung mittels *reversed phase* HPLC

Zur Bestimmung der extrazellulären Aminosäurekonzentrationen im Kulturüberstand wurden von der jeweiligen Kultur zum gewünschten Zeitpunkt Proben entnommen, die darin enthaltenen Zellen kurz abzentrifugiert (5 min, 13000 Upm, Raumtemperatur) und der Kulturüberstand zur Analyse eingesetzt.

Die quantitative Bestimmung der Aminosäurekonzentrationen wurde mittels *reversed phase* HPLC nach Derivatisierung mit *o*-Phthaldialdehyd durchgeführt (Lindroth und Mopper, 1979). Die Derivatisierung erfolgte dabei in einer automatischen Vorsäulenderivatisierung, indem 1 µL der zu analysierenden Aminosäurelösung mit 20 µL *o*-Phthaldialdehyd/2-Mercaptoethanol-Fertigreagenz (Pierce Europe BV, Oud-Beijerland, Niederlande) gemischt und eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Die so entstehenden fluoreszierenden, thio-substituierten Isoindole (Jones and Gilligan, 1983) wurden dann über eine kombinierte Vorsäule (40 × 4 mm, Hypersil ODS 5 µm) und Hauptsäule (120 × 4 mm, Hypersil ODS 5 µm; beide Säulen von CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe) mit einem Gradientenprogramm mit zunehmend unpolarer Phase (Methanol) aufgetrennt. Das polare Eluent war Natriumacetat (0,1 M, pH 7,2) und die Flußrate betrug 0,8 mL/min (modifiziert nach Lindroth und Mopper, 1979). Die Fluoreszenzdetektion der derivatisierten Aminosäuren erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 230 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm. Es wurde ein HPLC-Gerät der Serie HP1100 (Hewlett-Packard, Waldbronn) mit angeschlossenem Fluoreszenzdetektor (G1321A) verwendet; die Systemsteuerung und Auswertung der Daten erfolgte mit einer HP-Chem-Station (Hewlett-Packard). Die Aminosäurekonzentration der analysierten Probe wurde über einen Vergleich mit einem externen Standard und Asparagin als zusätzlichem internen Standard berechnet.

4.2 Silikonölzentrifugation zur Bestimmung intrazellulärer Aminosäuren

Um die Konzentrationen intrazellulärer Aminosäuren bestimmen zu können, war es notwendig, den Stoffwechsel der Zellen schnell zu inaktivieren und gleichzeitig eine rasche und vollständige Abtrennung der Bakterien vom Kulturüberstand zu erreichen. Als geeignete Methode wurde dazu die Silikonölzentrifugation nach Klingenberg und Pfaff (1977) verwendet. Hierbei wurden jeweils 30 µL 20%-ige (v/v) Perchlorsäure und 65 µL Silikonöl (Dichte = 1,04 g × cm⁻³) in 400 µL-Mikrozentrifugenröhrchen (Beckman Instruments GmbH, München) vorgelegt. Um genügend Probenmaterial zu erhalten, wurden pro Meßpunkt drei

so vorbereitete Silikonölröhrchen verwendet. Jeweils 100 µL einer Bakterienkultur wurden auf die Silikonölschicht pipettiert und sofort für 30 s bei 13750 Upm in einer Mikrofuge E (Beckman Instruments GmbH) zentrifugiert. Auf diese Weise wurden die Zellen schnell vom Medium getrennt. Das Kulturmedium verblieb dabei als Überstand auf der Silikonölphase. Die Überstände aus den drei Silikonölröhrchen wurden abgenommen, vereinigt und zur Bestimmung der extrazellulären Aminosäuren (siehe 4.1) eingesetzt. Zur Quantifizierung der zellinternen Aminosäuren wurde das in der Perchlorsäurephase befindliche Zellpellet nach der Methode von Hoischen und Krämer (1989) aufgearbeitet. Dazu wurden die Zellen durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und die erhaltenen Extrakte mit 5 M KOH und 1 M Triethanolamin neutralisiert. Nach einem abschließenden Zentrifugationsschritt (10 min, 13000 Upm, 4 °C) wurden die erhaltenen Überstände zur Bestimmung der Aminosäuren mittels *reversed phase* HPLC (siehe 4.1) eingesetzt.

Die Berechnung der intrazellulären Aminosäurekonzentrationen erfolgte mit folgender Formel:

$$C_{\text{int}} = \frac{(C_{\text{int, gem}} \times 100) - (c_{\text{ex}} \times 0,0599 \times \text{OD}_{600})}{0,04 \times \text{OD}_{600}}$$

C_{int} : errechnete intrazelluläre Aminosäurekonzentration [mM]
 $C_{\text{int, gem}}$: gemessene intrazelluläre Aminosäurekonzentration [mM]
 c_{ex} : gemessene extrazelluläre Aminosäurekonzentration [mM]
 OD_{600} : Zelldichte während der Kurzzeitfermentation

Durch diese Formel erfolgte die Berechnung der tatsächlichen intrazellulären Konzentration unter Berücksichtigung:

- der bei der Aufarbeitung des Zellpellets durchgeführten Verdünnungsschritte ($C_{\text{int, gem}} \times 100$)
- eines Korrekturfaktors, der den Fehler einbezieht, der durch die Aminosäurekonzentration im an den Zellen anhaftenden Medium bedingt ist ($c_{\text{ex}} \times 0,0599 \times \text{OD}_{600}$)
- des intrazellulären Zellvolumens der eingesetzten Zellen ($0,04 \times \text{OD}_{600}$)

Dabei wurden die folgenden Parameter zugrunde gelegt (Gutmann, 1993):

$$\text{OD}_{600} = 1 \quad \equiv 0,3 \text{ mg Zell-Trockengewicht} \times \text{mL}^{-1}$$

$$\text{Zellvolumen} \equiv 2,0 \text{ µL} \times (\text{mg Zell-Trockengewicht})^{-1}$$

5. Messung von Enzymaktivitäten

5.1 Herstellung von Zellrohextrakten

Für die Enzymtests zur Messung von Threoninaldolase- und Serinhydroxymethyltransferase-Aktivität wurden *C. glutamicum*-Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase aus 100 mL CGXII-Medium nach 10 h Kultivierung durch Zentrifugation geerntet (10 min, 5000 Upm, 4 °C). Da für die Threonindehydrogenase gezeigt wurde, daß die Aktivität in der stationären Phase maximal ist (Ravnikar und Somerville, 1987), wurden *C. glutamicum*-Zellen zur Messung der Threonindehydrogenase-Aktivität aus 50 mL CGXII-Medium nach 24 h Kultivierung geerntet. Die Zellen wurden jeweils einmal mit dem im Enzymtest verwendeten Puffer gewaschen und in demselben Puffer resuspendiert, so daß das Endvolumen 5 mL betrug. Sollte die Threoninaldolase- oder Serinhydroxymethyltransferase-Aktivität bestimmt werden, so wurde diese Zellsuspension zur Stabilisierung des zu untersuchenden Enzyms zusätzlich mit Pyridoxalphosphat (PLP, Endkonzentration 20 µM) und Dithiothreitol (DTT, Endkonzentration 1 mM) versetzt. Die Zellen wurden in ein 10 mL-Glashörnchen überführt und der Zellaufschluß bei 0 °C durch einen Ultraschalldesintegrator (Branson Sonifier W-250, Branson Sonic Power Co, Danbury, USA; Beschalldauer 6 min, Pulslänge 100%, Beschallintensität 2,5) durchgeführt. Nach der Ultraschallbehandlung wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (30 min, 13000 Upm, 4 °C) abgetrennt. Der Überstand wurde als zellfreier Rohextrakt direkt zur Bestimmung der Enzymaktivitäten eingesetzt. Sollte jedoch die Cofaktor-Abhängigkeit einer Reaktion getestet werden oder führten die im Rohextrakt vorhandenen niedermolekularen Bestandteile zu einer Störung bei dem Enzymtest, so wurde der Überstand zunächst über eine PD-10 Säule mit einem Ausschlußvolumen von 5 kDa (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) nach Herstellerangaben gereinigt, um z.B. nicht-kovalent gebundene Cofaktoren abzutrennen. Das Säuleneluat wurde dann als entsalzter Rohextrakt zur Bestimmung der Enzymaktivitäten verwendet.

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen in Zellrohextrakten erfolgte photometrisch nach einer Methode von Bensadoun und Weinstein (1976). Der Proteingehalt wurde dabei über eine mit Rinderserumalbumin (BSA) als Standard erstellte Eichkurve ermittelt.

5.2 Threonindehydrogenase-Aktivität

Zur Messung der Threonindehydrogenase (TDH)-Aktivität in den Rohextrakten von *C. glutamicum* wurden zwei verschiedene Testsysteme verwendet.

Quantifizierung von Glycin

Zur Messung der TDH-Aktivität wurde das in der Reaktion gebildete Glycin mittels *reversed phase* HPLC quantifiziert (siehe 4.1). Der Reaktionsansatz wurde mit der nachfolgend angegebenen Zusammensetzung (modifiziert nach Six, pers. Mitteilung; Aronson *et al.*, 1989) bei 37 °C inkubiert.

Reaktionsansatz:	300 µL	TEA/KP _i -Puffer (200 mM TEA, 25 mM KP _i , pH 8,6)	
	100 µL	KCl (400 mM)	
	70 µL	NAD ⁺ (100 mM)	
	70 µL	CoA (50 mM)	
	17,5 µL	L-Threonin (200 mM)	
	42,5 µL	Wasser, deion.	
	100 µL	Rohextrakt	Σ 700 µL

Die Reaktion wurde nach 5-minütiger Vorinkubation bei 37 °C durch Zugabe des Substrats L-Threonin gestartet. Um die Zeitabhängigkeit der Reaktion beobachten zu können, wurden vier Reaktionen parallel angesetzt. Jeweils ein Reaktionsansatz wurde nach 0, 30, 60 oder 90 min durch Zugabe von 300 µL 15%-iger (w/v) TCA-Lösung gestoppt. Durch 10-minütige Inkubation auf Eis und nachfolgender Zentrifugation (10 min, 13000 Upm, 4 °C) wurden die in der Lösung befindlichen Proteine abgetrennt. Der Überstand wurde mit 100 µL Neutralisierungspuffer (31,8 g K₂CO₃ in 100 mL Tris/HCl (20 mM, pH 8.0) gelöst) neutralisiert und diese Lösung zur Quantifizierung der Glycinkonzentration mittels *reversed phase* HPLC eingesetzt. Zur Kontrolle wurde der Enzymtest parallel ohne Zugabe von Rohextrakt durchgeführt.

Quantifizierung von Aminoaceton

Bei der Threoninspaltung durch Threonindehydrogenase entsteht intermediär 2-Amino-3-ketobutyrat, das bei Abwesenheit von Coenzym A rasch zu Aminoaceton decarboxyliert (Marcus und Dekker, 1993). Aminoaceton konnte nach Derivatisierung mit Ehrlich's Reagenz in einer colorimetrischen Reaktion quantifiziert werden (Mauzerall und Granick, 1956; Gibson *et al.*, 1958). Aminoaceton reagiert mit Acetylaceton zu einem in α -Position unsubstituierten Pyrrol, welches mit Dimethylaminobenzaldehyd (DMAB) einen roten Farbstoff bildet.

Der Reaktionsansatz wurde in der folgenden Zusammensetzung (Boylan und Dekker, 1981) 30 min bei 37 °C inkubiert.

Reaktionsansatz:	800 µL Tris/HCl-Puffer (250 mM, pH 8,4)	
	50 µL NAD ⁺ (100 mM)	
	250 µL L-Threonin (500 mM, pH 8,4)	
	400 µL Wasser, deion.	
	100 µL Rohextrakt	Σ 1,6 mL

Die Reaktion wurde nach 5-minütiger Vorinkubation bei 37 °C durch Zugabe von NAD⁺ gestartet. Nach 30-minütiger Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 400 µL 25%-iger (w/v) TCA-Lösung gestoppt. Durch 10-minütige Inkubation auf Eis und nachfolgender Zentrifugation (10 min, 13000 Upm, 4 °C) wurden die in der Lösung befindlichen Proteine abgetrennt. Der Überstand wurde dann zum Nachweis von Aminoaceton eingesetzt.

Reaktionsansatz:	500 µL Überstand	
	500 µL Natriumacetat-Puffer (2 M, pH 4,6)	
	50 µL NaOH (2,5 M)	
	25 µL Acetylaceton	Σ 1,075 mL

Dieser Ansatz wurde 10 min auf 100 °C erhitzt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde 1 mL frisch angesetztes Ehrlich's Reagenz (0,2 g DMAB in 8,4 mL Eisessig gelöst, + 1,6 mL 70%-ige (v/v) Perchlorsäure) hinzugegeben. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde dann die Absorption bei 553 nm gemessen. Als Blindwert diente dabei jeweils eine entsprechende Probe ohne L-Threonin, so daß nur die threoninabhängige Bildung von Aminoaceton erfaßt wurde.

5.3 Threoninaldolase-Aktivität

Auch zur Messung der Threoninaldolase (TA)-Aktivität in den Rohextrakten von *C. glutamicum* wurden zwei verschiedene Testsysteme verwendet.

Quantifizierung von Glycin

Das bei der Threoninspaltung gebildete Glycin wurde mittels *reversed phase* HPLC quantifiziert. Der Reaktionsansatz wurde in der folgenden Zusammensetzung (modifiziert nach Komatsubara *et al.*, 1978) bei 30 °C inkubiert.

Reaktionsansatz: 400 μ L entsalzter Rohextrakt (in TEA/ KP_i -Puffer (200 mM TEA,
25 mM KP_i , pH 8,6))
100 μ L PLP (2 mM)
100 μ L L-Threonin (200 mM)
100 μ L L-Isoleucin (10 mM)
300 μ L Wasser, deion. Σ 1,0 mL

Die Reaktion wurde für 60 oder 120 min bei 30 °C inkubiert. Nach 0 und 60 bzw. 0 und 120 min wurden jeweils 500 μ L des Reaktionsansatzes entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 125 μ L 25%-iger (w/v) TCA-Lösung gestoppt. Durch 15-minütige Inkubation auf Eis und nachfolgender Zentrifugation (15 min, 13000 Upm, 4 °C) wurden die in der Lösung befindlichen Proteine abgetrennt. Nach Neutralisation des Überstandes mit 50 μ L Neutralisierungspuffer (31,8 g K_2CO_3 in 100 mL Tris/HCl (20 mM, pH 8.0) gelöst) wurde diese Lösung zur Quantifizierung der Glycinkonzentration mittels *reversed phase* HPLC eingesetzt.

Quantifizierung von Acetaldehyd

Der bei der Threoninspaltung durch Threoninaldolase entstehende Acetaldehyd wurde nach Derivatisierung mit *N*-Methylbenzothiazolonhydrazon (MBTH) und Komplexbildung mit Eisen(III)ionen in einer colorimetrischen Reaktion quantifiziert (Paz *et al.*, 1965).

Der Reaktionsansatz wurde mit der nachfolgend angegebenen Zusammensetzung (modifiziert nach Komatsubara *et al.*, 1978) bei 30 °C inkubiert.

Reaktionsansatz: 400 μ L entsalzter Rohextrakt (in TEA/ KP_i -Puffer (200 mM TEA,
25 mM KP_i , pH 8,6))
100 μ L PLP (2 mM)
100 μ L L-Threonin (200 mM) oder Wasser (für Blindwert)
100 μ L L-Isoleucin (10 mM)
300 μ L Wasser, deion. Σ 1,0 mL

Die Reaktion wurde für 60 bis 120 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 250 μ L 25%-iger (w/v) TCA-Lösung gestoppt. Durch 15-minütige Inkubation auf Eis und nachfolgender Zentrifugation (15 min, 13000 Upm, 4 °C) wurden die Proteine abgetrennt. Der Überstand wurde dann zum Nachweis von Acetaldehyd eingesetzt. Dazu wurden 800 μ L des Überstandes mit 200 μ L 1%-iger (w/v) MBTH-Lösung gemischt und der pH-Wert durch Zugabe von 45 μ L Neutralisierungspuffer (31,8 g K_2CO_3 in 100 mL Tris/HCl (20 mM, pH 8.0) gelöst) auf 3 bis 4 eingestellt. Dieser Ansatz wurde 3 min auf

100 °C erhitzt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden 2,5 mL einer frisch angesetzten 0,2%-igen (w/v) FeCl_3 -Lösung hinzugegeben. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde diese Lösung dann mit 6,5 mL Aceton versetzt und sofort die Absorption bei 670 nm gemessen. Als Blindwert diente dabei jeweils eine entsprechende Probe ohne L-Threonin. Auf diese Weise wurde nur die threoninabhängige Bildung von Acetaldehyd erfaßt.

5.4 Serinhydroxymethyltransferase-Aktivität

Zur Messung der Serinhydroxymethyltransferase-Aktivität wurde das in der Reaktion gebildete Glycin mittels *reversed phase* HPLC quantifiziert (siehe 4.1). Der Enzymtest wurde in folgender Zusammensetzung durchgeführt (Willuhn, 1999; modifiziert nach Scrimgeour und Huennekens, 1962).

Reaktionsansatz:	300 µL	HEPES/NaOH-Puffer (200 mM, pH 7,0)
	200 µL	Rohextrakt (in HEPES/NaOH-Puffer, 200 mM, pH 7,0)
	100 µL	PLP (2 mM)
	50 µL	THF (18 mM in 0,1%-iger (w/v) DTT-Lösung)
	200 µL	Substrat (100 mM L-Threonin oder 100 mM L-Serin)
	150 µL	Wasser, deion.
		Σ 1,0 mL

Die Reaktion wurde nach 5-minütiger Vorinkubation bei 37 °C durch Zugabe des Substrats (vorgewärmt auf 37 °C) gestartet. Der Reaktionsansatz wurde lediglich 15 min inkubiert, da von Willuhn (1999) gezeigt wurde, daß eine lineare Zunahme der Glycinbildung nur über diesen Zeitraum meßbar ist. Jeweils 500 µL des Reaktionsansatzes wurden daher nach 0 und 15 min durch Zugabe von 125 µL 25%-iger (w/v) TCA-Lösung gestoppt. Durch Inkubation auf Eis für 15 min und nachfolgender Zentrifugation (15 min, 13000 Upm, 4 °C) wurden die in der Lösung befindlichen Proteine abgetrennt. 480 µL des Überstandes wurden mit 40 µL Neutralisierungspuffer (31,8 g K_2CO_3 in 100 mL Tris/HCl (20 mM, pH 8.0) gelöst) neutralisiert. In dieser Lösung wurde Glycin durch *reversed phase* HPLC quantifiziert. Zur Kontrolle wurde der Enzymtest parallel ohne Zugabe von Rohextrakt durchgeführt.

6. Bestimmung von Exportraten

6.1 Erhöhung der intrazellulären Threoninkonzentration durch Fütterung von Threonintripeptid

Zur Bestimmung der Threoninexportraten wurde eine modifizierte Form der Kurzzeitfermentation nach Hoischen und Krämer (1989) verwendet. Die Zellen wurden nach Vorkultivierung in BHI-Medium über Nacht in CGXII-Medium mit 1 mM Thr-Thr-Thr überführt, wobei eine anfängliche Zelldichte von $OD_{600} = 2$ eingestellt wurde. Diese Kultur wurde für zwei Stunden bei 30 °C inkubiert. Während dieser Zeit erfolgte eine Beladung der Zellen mit L-Threonin, da das Threonintripeptid von den Zellen aufgenommen und hydrolysiert wurde, so daß eine hohe zellinterne Threoninkonzentration vorhanden war. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation vom Medium abgetrennt (10 min, 5000 Upm, 4 °C) und einmal mit eiskaltem CGXII-Medium gewaschen. Die Zellen wurden dann in auf 30 °C vorgewärmtem CGXII-Medium resuspendiert, wodurch der Threoninexport induziert wurde. Das Kultivierungsgefäß hatte dabei ein Volumen von 40 mL und enthielt 10 mL CGXII-Medium. Um eine hohe intrazelluläre Threoninkonzentration während des gesamten Meßzeitraumes aufrechtzuerhalten, enthielt das Medium zusätzlich 1 mM Threonintripeptid, welches während der Messung von *C. glutamicum* weiter aufgenommen und hydrolysiert wurde. Die Zelldichte wurde auf $OD_{600} = 8$ bis 10 (entsprechend 2,4 bis 3,0 mg Zell-Trockengewicht $\times$ mL⁻¹) eingestellt. Die Kultur wurde bei 30 °C inkubiert, wobei eine Belüftung der Zellen durch schnelles Rühren (650 Upm) mit einem Magnetrührer erfolgte. Über einen Meßzeitraum von 2 h wurden alle 15 min Proben entnommen und zur Bestimmung der exkretierten und zellinternen Aminosäurekonzentrationen eingesetzt. Aus den extrazellulären Threoninkonzentrationen konnte jeweils aus der Steigung einer Ausgleichsgeraden, die durch die Meßpunkte gelegt wurde, unter Berücksichtigung der eingesetzten Zellmenge, die Exportrate für L-Threonin berechnet werden.

Die Bestimmung der Exportraten für L-Serin wurde analog durchgeführt, indem eine Beladung der Zellen mit L-Serin durch Kultivierung mit 1 mM Ser-Ser-Ser erfolgte.

6.2 Messung von Exportraten bei deenergetisierten Zellen

Zur Messung der Exportraten bei deenergetisierten Zellen wurde eine modifizierte Form der unter 6.1 beschriebenen Methode zur Bestimmung von Exportraten verwendet. Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an die von Palmieri *et al.* (1996) beschriebenen Methodik, wobei zum Abbau des Membranpotentials Carbonylcyanid-*m*-chlorophenylhydrazon (CCCP) verwendet wurde. Die Zellen wurden zunächst nach Vorkultivierung in BHI-Medium über Nacht in CGXII-Medium mit 2 mM Thr-Thr-Thr überführt, wobei eine anfängliche Zelldichte von $OD_{600} = 2$ eingestellt wurde. Während einer 2-stündigen Inkubation bei 30 °C erfolgte wiederum eine Beladung der Zellen mit L-Threonin. Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation geerntet (10 min, 5000 Upm, 4 °C) und einmal mit eiskaltem Exportpuffer (siehe unten; Palmieri *et al.*, 1996) gewaschen. Um die Threoninexkretion zu induzieren, wurden die Zellen in auf 30 °C vorgewärmtem Exportpuffer resuspendiert. Die Zelldichte wurde dabei auf $OD_{600} = 8$ bis 10 (entsprechend 2,4 bis 3,0 mg Zell-Trockengewicht $\times$ mL⁻¹) eingestellt. Diese Suspension wurde bei 30 °C inkubiert, eine Belüftung der Zellen erfolgte dabei durch schnelles Rühren (650 Upm) mit einem Magnet-rührer. Es wurden jeweils zwei Ansätze parallel durchgeführt. Zur Deenergetisierung der Zellen wurde zu einem Ansatz CCCP in einer Endkonzentration von 20 μ M gegeben. Durch den Abbau des Membranpotentials durch CCCP war die weitere energieabhängige Aufnahme von Threonintri-peptid während der Messung in diesem Fall nicht möglich (vergl. 6.1). Daher konnte die Messung hier nur über einen kurzen Zeitraum von 20 min durchgeführt werden, da die intrazelluläre Threoninkonzentration danach stark absank. Über den Meß-zeitraum von 20 min wurden alle 3 min Proben entnommen und zur Bestimmung der exkretierten Aminosäurekonzentrationen eingesetzt. Dazu wurden pro Meßpunkt 200 μ L der Zellsuspension entnommen und die darin enthaltenen Zellen sofort abzentrifugiert (1 min, 13000 Upm, Raumtemperatur). Der Überstand wurde zur Bestimmung der exkretierten Aminosäuren eingesetzt (siehe 4.1). Aus den extrazellulären Threoninkonzentrationen konnten aus den Steigungen der Ausgleichsgeraden, die durch die Meßpunkte (t_0 bis 20 min) einer solchen Kurzzeitfermentation gelegt wurden, die Exportraten für L-Threonin ohne und mit Zugabe von 20 μ M CCCP berechnet werden.

Exportpuffer:	100 mM MES/Tris-Puffer (pH 7,5)
	100 mM NaCl
	100 mM KCl
	500 mM Mannitol
	20 mM Glukose

7. Bestimmung der Osmolalität von Medien

Zur Bestimmung der Gesamt-Osmolalität in BHI-Komplexmedium und CGXII-Minimalmedium wurde ein Gefrierpunktsmomometer OSMOMAT 030 der Firma Gonotec GmbH (Berlin) verwendet. Dabei wurde die Osmolalität einer Lösung durch vergleichende Messungen der Gefrierpunkte von reinem Wasser und der zu untersuchenden Lösung bestimmt. Während Wasser einen Gefrierpunkt von 0 °C besitzt, zeigt z.B. eine Lösung mit einer Salzkonzentration von 1 Osmol/kg einen Gefrierpunkt von -1,860 °C (Holleman und Wiberg, 1985).

Zur Messung einer Probelösung wurden 50 µL des zu untersuchenden Mediums blasenfrei in ein Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert. Dieses Meßgefäß wurde so in dem Gerät plaziert, daß der Temperaturfühler von der Probeflüssigkeit umgeben war. Die Probelösung wurde dann mit einem Peltier-Kühlsystem so abgekühlt, daß es nicht zu einer Kristallisation kam. Hatte die Probe eine bestimmte Temperatur unterhalb des Gefrierpunktes erreicht, so wurde automatisch die Kristallisation durch Impfen der Lösung mit Eiskristallen eingeleitet. Dadurch stieg die Temperatur spontan bis auf die Kristallisationstemperatur (Gefrierpunkt) an. Diese Temperatur wurde von dem Gerät erfaßt und automatisch unter Berücksichtigung der Kalibrierwerte in Osmolalitätswerte umgerechnet.

III. ERGEBNISSE

1. Untersuchungen zum Threoninabbau in *C. glutamicum*

Von Reinscheid *et al.* (1994) wurde beobachtet, daß in einem *C. glutamicum*-Stamm mit deregulierter Threoninbiosynthese neben L-Threonin auch Glycin und L-Isoleucin in verstärktem Maße gebildet und exkretiert werden. Während die Isoleucinbildung durch weitere Umwandlung von Threonin im Isoleucinbiosyntheseweg (Eikmanns *et al.*, 1993) erklärt werden konnte, war nicht bekannt, welches Enzym die Umsetzung von Threonin zu Glycin in *C. glutamicum* katalysiert.

1.1 Enzymatische Untersuchungen zur Glycinbildung aus Threonin

Zur Aufklärung des Threoninabbaus in *C. glutamicum* wurde zunächst versucht, bekannte Enzymaktivitäten, für die eine Glycinbildung aus Threonin beschrieben wurde, in *C. glutamicum* nachzuweisen.

a) Threonindehydrogenase (TDH)

Für *Corynebacterium* sp. B6 und *Brevibacterium* sp. P2 und B10 ist ein Abbau von Threonin durch Threonindehydrogenase bekannt (Bell und Turner, 1976). Bei diesem Abbauweg wird die Spaltung von Threonin zu Glycin und Acetyl-CoA durch die NAD^+ - und Coenzym A-abhängige, gekoppelte Reaktion von Threonindehydrogenase (TDH) und Aminoketobutyrat (AKB)-CoA-Lyase katalysiert (Abb. 3).

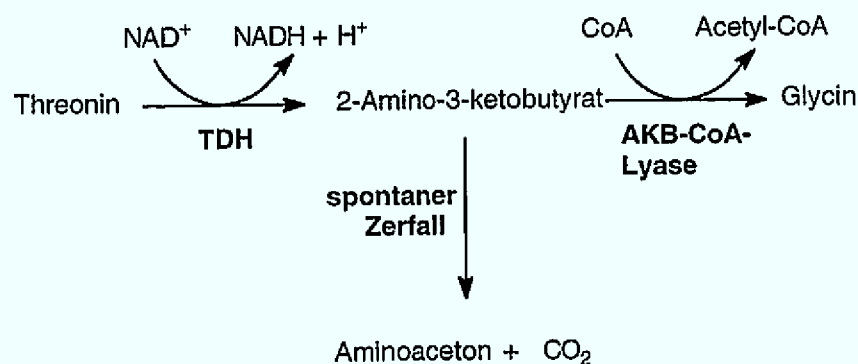


Abb. 3: Threoninspaltung zu Glycin und Acetyl-CoA durch die gekoppelte Reaktion von Threonindehydrogenase und Aminoketobutyrat-CoA-Lyase.

Es wurde zunächst untersucht, ob eine TDH-Aktivität in den Rohextrakten vom Wildtyp *C. glutamicum* ATCC13032 und dem threoninproduzierenden Stamm MH20-22B-DR17 (Reinscheid *et al.*, 1994) vorhanden ist. Dazu wurde ein diskontinuierlicher Enzymtest mit Threonin als Substrat durchgeführt und die Enzymaktivität mittels zwei verschiedener Ansätze gemessen. Zum einen wurde das bei der Spaltung entstehende Glycin durch HPLC-Analyse quantifiziert. In den Rohextrakten beider Stämme wurde eine geringe threonin-abhängige Bildung von Glycin (entsprechend einer Enzymaktivität von 2 mU) nachgewiesen, allerdings trat diese Glycinbildung unabhängig von der Anwesenheit der Cofaktoren NAD⁺ und Coenzym A im Enzymtest auf. Dies sprach gegen eine Katalyse der Threoninspaltung durch Threonindehydrogenase und Aminoketobutyrat-CoA-Lyase. Um dieses Ergebnis zu überprüfen, wurde zum anderen versucht, das Reaktionsprodukt Aminoaceton nachzuweisen. In Abwesenheit von Coenzym A decarboxyliert das intermediär gebildete, instabile 2-Amino-3-ketobutyrat schnell zu Aminoaceton (Abb. 3), da keine weitere Umsetzung zu Glycin und Acetyl-CoA stattfinden kann (Marcus und Dekker, 1993). Aminoaceton kann nach Derivatisierung mit Ehrlich's Reagenz in einer colorimetrischen Reaktion quantifiziert werden (Mauzerall und Granick, 1956). Mit diesem Ansatz war weder beim Wildtyp ATCC13032 noch bei dem Stamm MH20-22B-DR17 eine Aminoacetonbildung meßbar, so daß davon auszugehen ist, daß in *C. glutamicum* keine Threonindehydrogenase vorhanden ist.

b) Threoninaldolase (TA) und Serinhydroxymethyltransferase (SHMT)

Eine weitere Möglichkeit des Threoninabbaus ist die in Abbildung 4A gezeigte Pyridoxal-phosphat-abhängige Spaltung von Threonin zu Glycin und Acetaldehyd. Diese Aldolspaltung wird in vielen Organismen durch eine Threoninaldolase (TA) katalysiert (Monschau *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998b). Dieselbe Umsetzung kann aber auch von einer Serinhydroxymethyltransferase (SHMT) katalysiert werden (Schirch *et al.*, 1985; Schirch und Gross, 1968).

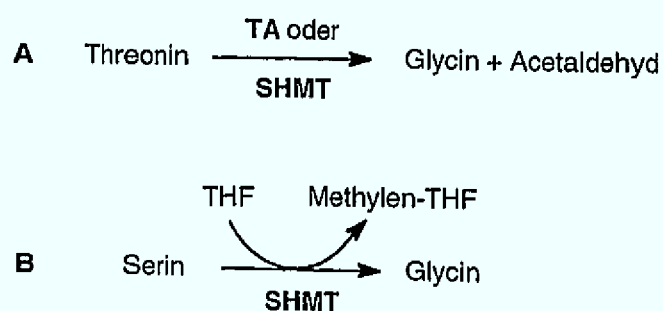


Abb. 4: Threoninspaltung zu Glycin und Acetaldehyd durch Threoninaldolase oder Serinhydroxymethyltransferase (A) und Serinspaltung zu Glycin und Methylen-Tetrahydrofolat durch Serinhydroxymethyltransferase (B).

SHMT ist ein ubiquitär vorkommendes Enzym, dessen Hauptaktivität die Pyridoxalphosphat-abhängige Umsetzung von Serin zu Glycin unter Übertragung einer C₁-Einheit auf Tetrahydrofolat (THF) ist (Abb. 4B). Mit aufgereinigter SHMT aus *Escherichia coli* (Schirch *et al.*, 1985) und Rattenleber (Schirch und Gross, 1968) wurde *in vitro* gezeigt, daß auch eine Threoninspaltung durch dieses Enzym katalysiert werden kann. In diesem Fall wird kein Tetrahydrofolat als Cofaktor benötigt, da anstatt einer C₁-Einheit freier Acetaldehyd entsteht. Es wurde deshalb versucht, eine Aldolase-Aktivität in den Rohextrakten vom Wildtyp ATCC13032 und dem Stamm MH20-22B-DR17 nachzuweisen. Durch Quantifizierung des gebildeten Glycins mittels HPLC-Analyse wurde eine Enzymaktivität von 2,2 mU für den Wildtyp ATCC13032 und 2,0 mU für den Stamm MH20-22B-DR17 ermittelt. Da die Enzymaktivität in beiden Stämmen vergleichbar war, wurden alle weiteren Versuche nur noch mit dem Wildtyp durchgeführt. Zur Verifizierung dieser Messung wurde auch das zweite Spaltprodukt Acetaldehyd in einem colorimetrischen Test nachgewiesen. Dazu wurde die threoninabhängige Aldehydbildung durch Derivatisierung mit *N*-Methylbenzothiazolonhydrazon (MBTH) und Komplexbildung mit Eisen(III)ionen quantifiziert (Paz *et al.*, 1965). Die in 90 min gebildete Menge an Acetaldehyd war dabei mit 160 µM etwa doppelt so hoch wie die gemessene Glycinkonzentration (78 µM). Allerdings muß beachtet werden, daß die colorimetrische Aldehydbestimmung mit einem großen Fehler behaftet ist. Durch die Komplexbildung werden alle im Rohextrakt vorhandenen Aldehyd-Verbindungen erfaßt, so daß bereits beim Blindwert eine sehr hohe Extinktion gemessen wurde. Die bei Zugabe von Threonin zusätzliche Extinktion ist im Verhältnis zu diesem Hintergrundwert klein (ca. 10%). Die Zunahme der Acetaldehydkonzentration bestätigt aber, daß bei der Spaltung von Threonin neben Glycin auch Acetaldehyd gebildet wird, so daß eine Aldolase oder die Aldolaseaktivität der Serinhydroxymethyltransferase für den Threoninabbau in *C. glutamicum* verantwortlich sein muß. Die Threoninspaltung führt zu einer stöchiometrischen Bildung von Glycin und Acetaldehyd (Abb. 4A). Es war daher ausreichend, eines dieser beiden Reaktionsprodukte zu quantifizieren. Da ein spezifischer Nachweis von Glycin durch *reversed phase* HPLC möglich war, wurde die Aktivität bei allen weiteren Enzymtest nur durch Quantifizierung von Glycin bestimmt.

Um zu prüfen, ob Tetrahydrofolat als Cofaktor bei der Threonin- bzw. Serinspaltung in *C. glutamicum* benötigt wird, wurde im folgenden die Tetrahydrofolat-Abhängigkeit der Spaltungsreaktionen im Wildtyp ATCC13032 untersucht (Tab. 3).

Substrat	THF im Enzymtest	Glycin [μ M]
20 mM Serin	+	677
	-	4
20 mM Threonin	+	297
	-	294

Tab. 3: Abhängigkeit der Serin- bzw. Threoninspaltung von dem Cofaktor Tetrahydrofolat. Die jeweiligen Reaktionsansätze wurden 90 min bei 30 °C inkubiert.

Eine serinabhängige Glycinbildung war nur bei Anwesenheit von Tetrahydrofolat zu beobachten, während die threoninabhängige Glycinbildung unabhängig von der Anwesenheit von Tetrahydrofolat war. *C. glutamicum* besitzt also eine Serinhydroxymethyltransferase. Da die SHMT für die Spaltung von Threonin aber kein Tetrahydrofolat benötigt (siehe Abb. 4), läßt sich auf diese Weise nicht unterscheiden, ob die Umsetzung von Threonin zu Glycin und Acetaldehyd ebenfalls durch die SHMT katalysiert wird, oder ob es eine separate Threoninaldolase in *C. glutamicum* gibt. Im folgenden wurde daher versucht, die Gene für beide Enzyme aus *C. glutamicum* ATCC13032 zu identifizieren.

1.2. Versuche zur Isolierung des Gens für eine L-Threoninaldolase (*Ita*)

Die Identifizierung des Gens für eine L-Threoninaldolase aus *C. glutamicum* sollte durch eine Polymerasekettenreaktion (PCR) erfolgen. Um geeignete Primer auszuwählen, wurde das *Ita*-Gen aus *Aeromonas jandaei*, welches für eine L-Threoninaldolase kodiert (Liu *et al.*, 1997a), sowie durch Datenbankrecherchen ermittelte mögliche *Ita*-Gene aus neun weiteren Organismen verwendet. Ein Homologievergleich der abgeleiteten Proteinsequenzen zeigte, daß die putativen Threoninaldolasen insgesamt nur schwache Ähnlichkeiten zueinander aufwiesen. Erst bei einem Homologievergleich von lediglich vier Aminosäuresequenzen aus *A. jandaei*, *E. coli*, *C. elegans* und *S. cerevisiae* konnten konservierte Bereiche identifiziert werden, aus denen degenerierte Primer für eine PCR-Reaktion abgeleitet wurden (siehe Anhang 2.1). Insgesamt wurden drei verschiedene *forward*- bzw. zwei verschiedene *reverse*-Primer synthetisiert. Alle sechs möglichen Primer-Kombinationen wurden in PCR-Reaktionen mit chromosomaler DNA aus *C. glutamicum* ATCC13032 als Matrize eingesetzt. Trotz Variation der PCR-Versuchsbedingungen wurde in keinem Fall ein spezifisches Fragment der erwarteten Größe (350 bis 500 bp) erhalten. Daher wurden insgesamt sechs, bei den

PCR-Reaktionen amplifizierte DNA-Banden, die mit ca. 450 bp etwa der erwarteten Größe entsprachen, isoliert, in den Vektor pUC18 kloniert und einzelsträngig ansequenziert. Der anschließende Datenbankvergleich zeigte jedoch, daß keine der abgeleiteten Aminosäuresequenzen dieser klonierten PCR-Fragmente Ähnlichkeiten zu bekannten Threoninaldolasen aufwies. Die Klonierung eines *lta*-Gens aus *C. glutamicum* ist mit diesem Ansatz also nicht gelungen.

Eine weitere Möglichkeit, *lta* zu isolieren, ist die Komplementation des Glycin-auxotrophen *Escherichia coli* GS245 (Plamann *et al.*, 1983). Dieser Stamm, der von Prof. Dr. G. Stauffer (University of Iowa) zur Verfügung gestellt wurde, besitzt eine spezifische Deletion im Serinhydroxymethyltransferase-Gen *glyA*. Er wurde bereits erfolgreich zur Klonierung des *lta*-Gens aus *Pseudomonas* sp. eingesetzt (Liu *et al.*, 1998b). Es war daher davon auszugehen, daß die Glycin-Auxotrophie von *E. coli* GS245 auch durch ein mögliches *lta*-Gen von *C. glutamicum* komplementiert werden würde. *E. coli* GS245 wurde mit verschiedenen Genbanken von *C. glutamicum* transformiert und die erhaltenen Transformanten auf Glycin-freiem YNB-Minimalmedium auf das Wachstum Glycin-prototropher (Gly⁺) Klone selektiert. Bei Transformation von *E. coli* GS245 mit zwei verschiedenen pBR322-Plasmidgenbanken (Insertgröße 3 – 7 kb bzw. 9 – 20 kb) wurden insgesamt mehr als 100.000 Klone auf Komplementation des Glycin-auxotrophen Phänotyps überprüft. Desweiteren wurde eine pHCT9-Cosmidgenbank (Insertgröße ca. 30 kb) zur Komplementation verwendet, dabei wurden 5000 Klone untersucht. In keinem Fall wurde ein Klon mit Gly⁺-Phänotyp isoliert, obwohl prinzipiell neben *lta* auch durch *glyA*, dem Gen für die Serinhydroxymethyltransferase, eine Komplementation erfolgen könnte. Die Tatsache, daß überhaupt kein Glycin-prototropher Klon gefunden wurde, läßt vermuten, daß dieser *E. coli*-Stamm generell nicht zur heterologen Komplementation mit DNA aus *C. glutamicum* geeignet ist.

Auch bei der Datenbanksuche in dem mittlerweile vollständig sequenzierten Genom von *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv wurde keine Sequenz mit Ähnlichkeiten zu bekannten *lta*-Genen gefunden (Cole *et al.*, 1998). Aufgrund der nahen Verwandtschaft von *C. glutamicum* zu *M. tuberculosis* ist es sehr wahrscheinlich, daß auch *C. glutamicum* keine Threoninaldolase besitzt. Es wurden daher Experimente zur Klonierung und Charakterisierung des Gens für die Serinhydroxymethyltransferase aus *C. glutamicum* durchgeführt und dessen Rolle beim Threoninabbau eingehender untersucht.

1.3. Isolierung und Charakterisierung des Gens für die Serinhydroxymethyltransferase (*glyA*)

Serinhydroxymethyltransferasen und die entsprechenden *glyA*-Gene sind aus sehr vielen Organismen bekannt. Auch aus *Corynebacterium* sp. P-1 war die Aminosäuresequenz des C-terminalen Teils der SHMT bekannt (Chlumsky *et al.*, 1995). Um geeignete Primer für die Isolierung des *glyA*-Gens aus *C. glutamicum* mittels PCR auszuwählen, wurde ein Homologievergleich der SHMT-Sequenzen aus *Corynebacterium* sp. P-1, *Hyphomicrobium methylovorum*, *Escherichia coli* und *Bradyrhizobium japonicum* durchgeführt. Dieser Vergleich zeigte, daß diese Aminosäuresequenzen über weite Bereiche hochkonserviert sind, so daß degenerierte Primer abgeleitet werden konnten (siehe Anhang 2.1). Insgesamt wurden je zwei verschiedene *forward*- und *reverse*-Primer synthetisiert und alle vier möglichen Primerkombinationen in PCR-Reaktionen mit chromosomaler DNA von *C. glutamicum* ATCC13032 als Matrize eingesetzt. Bei Verwendung der Primer SHMT-1 und SHMT-3 gelang es bei einer *Annealing*-Temperatur von 55 °C, ein spezifisches DNA-Fragment mit der erwarteten Größe von ca. 375 bp zu amplifizieren. Dieses Fragment wurde in die *Sma*I-Schnittstelle des Vektors pUC18 kloniert und das Insert einzelsträngig sequenziert. Der Datenbankvergleich zeigte, daß die abgeleitete Aminosäuresequenz des klonierten PCR-Fragments hohe Identitäten zu bekannten Serinhydroxymethyltransferasen aufwies.

Im Verlauf der Arbeit wurde die vollständige *glyA*-Sequenz von *Brevibacterium flavum* aus einer japanischen Patentschrift (JP-A-08107788) zugänglich. Anhand dieser Sequenzinformationen wurden die Primer *glyA1-forw.* und *glyA1-rev.* ausgewählt, um das vollständige *glyA*-Gen aus *C. glutamicum* ATCC13032 zusammen mit ca. 250 bp stromaufwärts und ca. 50 bp stromabwärts liegenden DNA-Bereichen mittels PCR zu amplifizieren. Dieses PCR-Fragment wurde in den Vektor pUC18 kloniert und das vollständige Insert doppelsträngig sequenziert (Willuhn, 1999). Die Sequenzanalyse ergab, daß auf dem klonierten Fragment ein vollständiger offener Leserahmen von 1302 bp lokalisiert ist. Ein Sequenzvergleich dieses orfs mit der *glyA*-Sequenz von *Brevibacterium flavum* ergab, daß sich beide Sequenzen in lediglich acht Basen unterscheiden, wodurch in zwei Fällen ein Aminosäureaustausch bedingt ist. Ein Sequenzvergleich der von *glyA* aus *C. glutamicum* ATCC13032 abgeleiteten Aminosäuresequenz mit bekannten SHMT-Sequenzen zeigte hohe Sequenzidentitäten. Die höchste Übereinstimmung war mit den SHMT-Sequenzen von *Mycobacterium tuberculosis* (73% identische Aminosäuren), *Bacillus subtilis* (53% Identität) und *Escherichia coli* (48% Identität) festzustellen (Abb. 5).

<i>C. glut.</i>	1	MTDAHQADDVRYQPTNEIDPEVAAALAGELARQDTHIEMIASENFVPRSVLQAQGSVLTN
<i>M. tuber.</i>	1	-----MSAPLAEDPDIAELIAKELGRQDTHIEMIASENFVPRAVLQAQGSVLTN
<i>B. subtilis</i>	1	-----MKHLPAODEOVFNALIKNERERQOTKIEHIASENFVSEAVMEQAQGSVLTN
<i>E. coli</i>	1	-----MLKREMNADYDAELWQAMEQEKVRQEEHIEHIASENYTSPRVMQAQGSVLTN
<i>C. glut.</i>	61	KYAEGLPGRRYYGGCEQVDIREDLARDRAKALFGAEFANVQPHSGAQANAAVLMTLAEPG
<i>M. tuber.</i>	51	KYAEGLPGRRYYGGCEHVDVVENLARDRAKALFGAEFANVQPHSGAQANAAVLHALLSPG
<i>B. subtilis</i>	50	KYAEGLPGRRYYGGCEHVDVVEDLARDRAKALFGAEHVNVPQPHSGAQANNAVYFTILEQG
<i>E. coli</i>	54	KYAEGLPGRRYYGGCEHVDIVEQLALDRAKALFGADVANVQPHSGSQANNAVYTTALLP
<i>C. glut.</i>	121	DKIMGHSIAHGCHLTHGMRNFSGKLYENFVAVGVDPETMRYDMDQVREIALKEQPKVITA
<i>M. tuber.</i>	111	ERILGHSILANGGHLTHGMRNFSGKLYENGFGVDPATHLIDMDAVRATALEFRPKVITA
<i>B. subtilis</i>	110	DTVLGNNLEHGGHLTHGSPVNFSGVQYNEVEYGVDKETQYIDYDDVREKALAHKPKIIVA
<i>E. coli</i>	114	DTVLGNNLAHGHLTHGSPVNFSGKLYNIVPYGIDATG-HIDYADIEKQAKHKKPKIILG

<i>C. glut.</i>	181	GWSAYPRHLDFEAFQSIAAEVCAKLWVDMAHFAGLVAAGLHPSFPVPYSDVVSSTVHKTLG
<i>M. tuber.</i>	171	GWSAYPRVLDFAAFRSIADEVGAKLLVDMAHFAGLVAAGLHPSFPVPHADVSTTTHKTLG
<i>B. subtilis</i>	170	GASAYPRTEDEKKFREIADEVGAYFMVDMAHFAGLVAAGLHPNPVPYADFVLTTHKTLR
<i>E. coli</i>	173	GSAYSGVVDWAKMREIADSIGAYLFVDMAHVAGLVAAGVYPNPVPHAHVVTTTHKTLA

<i>C. glut.</i>	241	GPRSGHLLAK---QBYAKKINSVFPFGQGGPLMHVAAKATSLKIAAGTEQFRDROARTL
<i>M. tuber.</i>	231	GPRSGHLLYK---QBYAKAINS AVFPFGQGGPLMHVIAAGKAVALKIAATPEFADRQRRTL
<i>B. subtilis</i>	230	GPRSGHLLQ---EEFGKKIKTSIFPGIQGGPLMHVIAAKAVSFGEVLQDDFKTYAQNVI
<i>E. coli</i>	233	GPRSGHLLAKGGSEELYKKINS AVFPFGQGGPLMHVIAAGKAVALKEAMEPEFKTYQQQVA

<i>C. glut.</i>	298	EGARILAERLTASDAKAAGVDVIRGGTDVHLVLADLRNSQMDGQQAEDLLHEVGITVNRN
<i>M. tuber.</i>	288	SGARILADRLMAPDVAKAGVSVVSGGTDVHLVLVDLRDSPLDGQQAEDLLHEVGITVNRN
<i>B. subtilis</i>	287	SNARILAEALTK-----EGIQIVSGGTDNHLVLVDLRSLGLTGKVAEHVLDENIGITSNIN
<i>E. coli</i>	293	KNAKALVIEVFLE-----RCYKVVSGGTDNHLFLVDLVDKNIITGKEADAALGRANITVNRN
<i>C. glut.</i>	358	AVPNDPRPPMVTSGIRIGTPALATRGEDIPAFTEVADIIIGTALANG-KSADIESLRGRVA
<i>M. tuber.</i>	348	AVPNDPRPPMVTSGIRIGTPALATRGEGTEFTEVADIIATATATG-SSVDVSAIKDRAT
<i>B. subtilis</i>	342	AVPNDPEKPEVTSGIRIGTAATVSRGEDGDALEEVCAIIALALKNHEDECKUEEARORVA
<i>E. coli</i>	348	AVPNDPRSPFVTSGIRVGTPTATRRGEKGAEAKEIAGWACDVLDSINDEAVIERIKGVIL
<i>C. glut.</i>	417	KLAADMPLYEGLEDWRTV--
<i>M. tuber.</i>	407	KLARADMPLYDGLLEWSIVGR
<i>B. subtilis</i>	402	ALTDKMPLYKELEY-----
<i>E. coli</i>	408	DLCAADMPVIA-----

Abb. 5: Homologievergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz des klonierten *glyA*-Gens aus *C. glutamicum* ATCC13032 (1. Zeile) mit den bekannten Sequenzen von Serinhydroxymethyltransferasen aus *M. tuberculosis*, *B. subtilis* und *E. coli* unter Verwendung des *Multiple Sequence Alignment* Programms ClustalW 1.8 (Jeanmougin *et al.*, 1998) (schwarz: identische AS, grau: ähnliche AS). Die abgeleitete Aminosäuresequenz des ursprünglich durch degenerierte Primer erhaltenen PCR-Fragments ist markiert (*).

Zur Überexpression des *glyA*-Gens in *C. glutamicum* wurde *glyA* in den *E. coli*-*C. glutamicum*-Pendelvektor pZ1 (Menkel *et al.*, 1989) kloniert. Das resultierende Plasmid pZ1*glyA* (Willuhn, 1999) wurde mittels Elektroporation in den vom Wildtyp abgeleiteten Stamm R127 eingebracht und die Serinhydroxymethyltransferase-Aktivitäten mit Threonin als Substrat bestimmt. Im Rohextrakt des Überexprimierers *C. glutamicum* R127pZ1*glyA* wurde eine ca. 15-fach erhöhte SHMT-Aktivität im Vergleich zu dem Kontrollstamm R127pZ1 gemessen (Tab. 4). Somit wurde gezeigt, daß die Serinhydroxymethyltransferase von *C. glutamicum* an der Spaltung von Threonin zu Glycin beteiligt ist.

<i>C. glutamicum</i> -Stamm	Glycin [μ M]	SHMT-Aktivität [mU]
R127pZ1	50	1,6
R127pZ1 <i>glyA</i>	700	25,0

Tab. 4: Serinhydroxymethyltransferase-Aktivität in Rohextrakten von *C. glutamicum* R127pZ1 und R127pZ1*glyA*. Die Enzymaktivität wurde mit 20 mM Threonin als Substrat über einen Meßzeitraum von 15 min bestimmt.

Um zu überprüfen, ob sich eine verstärkte *glyA*-Expression auf die Threonin- und Glycinakkumulation bei einem threoninproduzierenden Stamm von *C. glutamicum* auswirkt, wurde der Einfluß der *glyA*-Überexpression in dem threoninbildenden Stamm DM368-2 (Degussa-Hüls AG) untersucht. Dazu wurden die Plasmide pZ1 und pZ1*glyA* durch Elektroporation in *C. glutamicum* DM368-2 eingebracht. Die so erhaltenen Stämme DM368-2pZ1 und DM368-2pZ1*glyA* wurden in CGXII-Minimalmedium kultiviert und die extrazellulären Threonin- und Glycinkonzentrationen nach 24 h, 48 h und 72 h bestimmt (Abb. 6). Bei Überexpression von *glyA* exkretierte *C. glutamicum* DM368-2 bis zu 3 mM mehr Glycin als der Kontrollstamm, während die Threoninakkumulation bis zu ca. 1,5 mM verringert war.

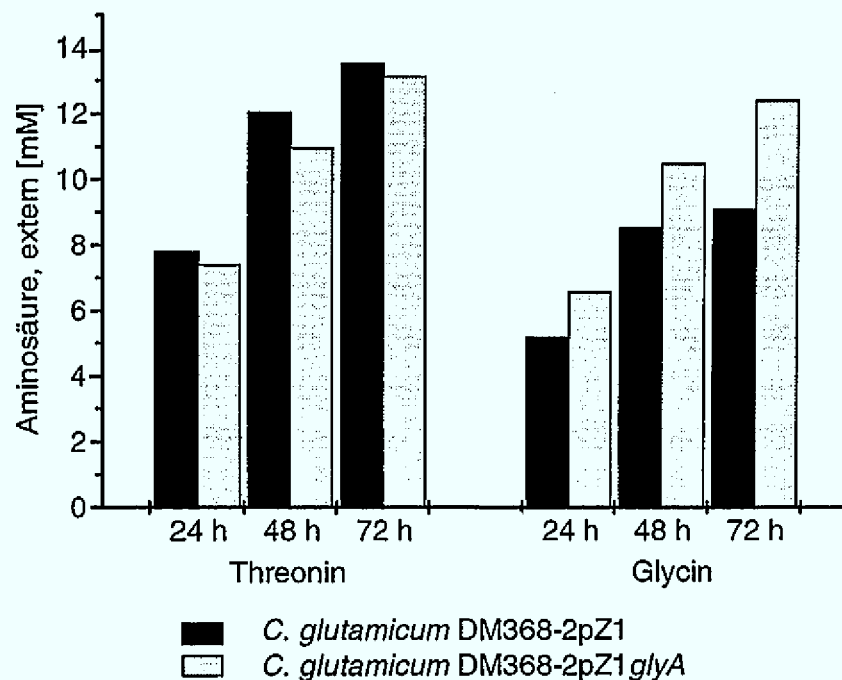


Abb. 6: Threonin- und Glycinakkumulation bei Überexpression von *glyA* in *C. glutamicum* DM368-2. Dargestellt sind die externen Aminosäurekonzentrationen nach 24 h, 48 h und 72 h Kultivierungsdauer.

Um zu untersuchen, ob die Inaktivierung von *glyA* zu einer vollständigen Verhinderung des Threoninabbaus führt, oder ob es eventuell noch weitere in den Threoninmetabolismus involvierte Gene gibt, sollte eine *glyA*-Deletionsmutante konstruiert werden. Dazu wurde der Deletionsvektor pK19*mobsacBΔglyA* (Willuhn, 1999) durch Elektroporation in verschiedene *C. glutamicum*-Stämme (ATCC13032, DM368-2 und R127) eingebracht. In allen Fällen wurden kanamycinresistente Klone erhalten, bei denen der Vektor pK19*mobsacBΔglyA* durch eine homologe Rekombination im Genom integriert vorlag. Um auf ein zweites Rekombinationsereignis, d.h. auf die Excision des Vektors, zu selektieren, wurden diese Klone auf Saccharose-haltigem Medium ausplattiert. Die Expression des im Deletionsvektor vorhandenen *sacB*-Gens ist bei Anwesenheit von Saccharose toxisch für *C. glutamicum* (Jäger *et al.*, 1992), so daß nur solche Klone wachsen können, die den Vektor durch ein zweites Rekombinationsereignis wieder verloren haben. Bei diesem Schritt wurden insgesamt mehrere hundert Klone erhalten, die durch Excision des Vektors wieder kanamycinsensitiv geworden waren. Etwa 100 dieser Klone wurden mittels PCR mit *glyA*-flankierenden Primern auf eine Deletion im *glyA*-Gen überprüft. Im Falle einer erfolgreichen Deletion sollte dabei ein 274 bp großes DNA-Fragment amplifiziert werden, im Fall der wiederhergestellten Wildtypsituation ein 1113 bp-Fragment. Bei allen überprüften Klonen wurde bei der Amplifizierung aber ein etwa 1000 bp großes DNA-Fragment erhalten. Der

zweite Rekombinationsschritt erfolgte also jedesmal so, daß das vollständige *glyA*-Gen wiederhergestellt wurde. Es konnte somit in keinem der verwendeten *C. glutamicum*-Stämme eine *glyA*-Deletionsmutante konstruiert werden. Aus diesen Experimenten ist zu schließen, daß eine Inaktivierung von *glyA* in *C. glutamicum* nicht möglich ist. Offensichtlich ist die durch *glyA* kodierte Serinhydroxymethyltransferase als Enzym des C₁-Stoffwechsels essentiell für *C. glutamicum*. Aus anderen Organismen, wie z.B. *E. coli* (Plamann *et al.*, 1983) oder *S. cerevisiae* (McNeil *et al.*, 1994) sind jedoch SHMT-Defektmutanten beschrieben worden. Allerdings besitzen diese Organismen neben der SHMT noch alternative Möglichkeiten zur Synthese von C₁-Einheiten, beispielsweise durch das *Glycine Cleavage System* (Kikuchi, 1973). Über die Existenz eines solchen Enzymsystems in *C. glutamicum* ist nichts bekannt.

1.4 Konstruktion eines *C. glutamicum*-Stammes mit induzierbarer *glyA*-Expression

Da eine Inaktivierung von *glyA* nicht möglich war, sollte ein *C. glutamicum*-Stamm konstruiert werden, der die chromosomale Kopie des *glyA*-Gens unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors enthält, um eine gezielte niedrigere Expression von *glyA* zu ermöglichen. Ein gut induzierbares Promotorsystem ist z.B. der *tac*-Promotor *P_{tac}* (Amann *et al.*, 1983; De Boer *et al.*, 1983). Da bereits gezeigt wurde, daß das *P_{tac}*-System auch in coryneformen Bakterien funktionell ist (Tsuchiya und Morinaga, 1988), wurde dieser Promotor für die induzierbare Expression von *glyA* gewählt.

In Abbildung 7 ist die Vorgehensweise zur Konstruktion des Vektors pK18mob*glyA*' dargestellt. Dazu wurde zunächst aus dem Plasmid pUC18*glyA* ein 1418 bp großes *EcoRI*/*TfiI*-Fragment isoliert, welches das vollständige *glyA*-Gen ohne den Promotorbereich umfaßt. Die Enden des Fragments wurden mit Klenow-Polymerase geglättet und in den mit *Bam*HI-geschnittenen und mit Klenow-Polymerase behandelten Expressionsvektor pVWEx2 (Wendisch, 1997) ligiert. Dieser Vektor enthält das Gen für den *lac*-Repressor sowie den induzierbaren *tac*-Promotor, so daß im resultierenden Plasmid pVWEx2*glyA* das *glyA*-Gen unter Kontrolle dieses Promotors vorliegt. Durch eine PCR-Reaktion mit pVWEx2*glyA* als Matrize und unter Verwendung der Primer *glyA2-forw.* und *glyA2-rev.* (siehe Anhang 2.2) wurde dann ein 2 kb großes DNA-Fragment amplifiziert, auf welchem das Gen für den *lac*-Repressor (*lac*^R), der *tac*-Promotor (*P_{tac}*) sowie 437 bp des 5'-Endes von *glyA* vorlagen. Dieses Fragment wurde mit Hilfe der angefügten Restriktionsstellen von *Eco*RI und *Bam*HI in den mit *Eco*RI/*Bam*HI linearisierten Vektor pK18mob (Schäfer *et al.*, 1994b) kloniert.

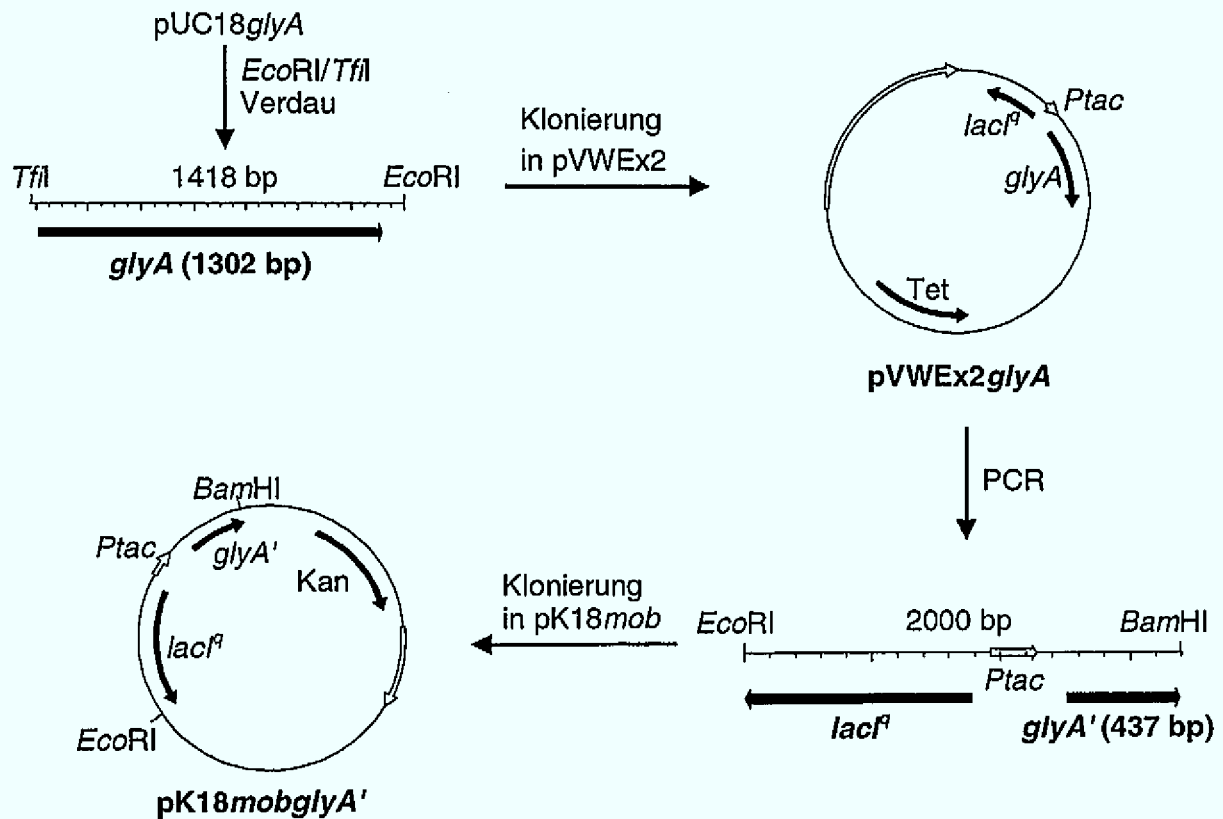


Abb. 7: Schema zur Konstruktion des Vektors *pK18mobglyA'*. Dargestellt ist die Klonierung des *glyA*-Gens in den Vektor *pVWEx2* sowie die Amplifizierung und Klonierung des *lacI^r-Ptac-glyA'*-Fragments.

Kan: Kanamycinresistenzgen, Tet: Tetracyclinresistenzgen, *lacI^r*: *lac*-Repressor-gen, *Ptac*: *tac*-Promotor, *glyA'*: 5'-Ende des *glyA*-Gens.

Auf diese Weise wurde das Plasmid *pK18mobglyA'* erhalten (Abb. 7). Dieses Plasmid wurde dann durch konjugativen Transfer von *E. coli* S17-1 in *C. glutamicum* ATCC13032 und DM368-2 überführt. Die Integration des Vektors in das Genom des jeweiligen *C. glutamicum*-Stammes erfolgte über homologe Rekombination eines 437 bp großen *glyA'*-Fragments (Abb. 8). Auf diese Weise wurden die Mutanten ATCC13032::*pK18mobglyA'* und DM368-2::*pK18mobglyA'* konstruiert. Der korrekte Integrationsort von *pK18mobglyA'* wurde in mehreren Klonen beider Stämme durch eine Polymerasekettenreaktion nachgewiesen (Abb. 9). Diese Mutantenstämme besitzen chromosomal kodiert nur eine intakte Kopie von *glyA* unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren *tac*-Promotors, während der natürliche Promotor nur noch eine unvollständige Kopie von *glyA* kontrolliert (siehe Abb. 8 unten). Wie im folgenden gezeigt wird, kann das *glyA*-Gen in diesen Stämmen also nur noch unter induzierenden Bedingungen exprimiert werden.

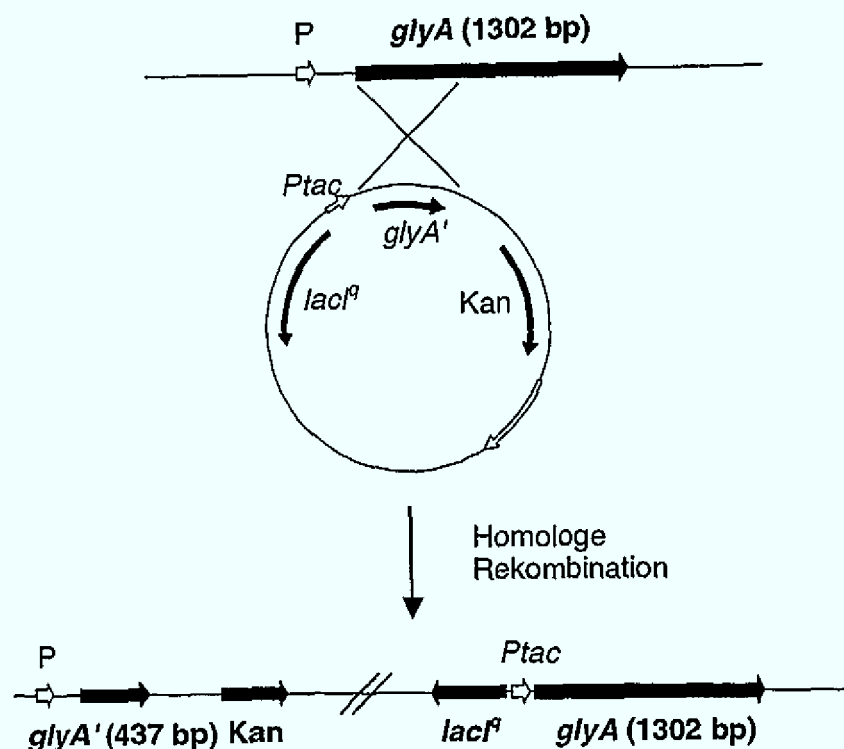


Abb. 8: Konstruktion der Stämme *C. glutamicum* ATCC13032::pK18mobglyA' bzw. DM368-2::pK18mobglyA' durch Integration von pK18mobglyA' in das Genom von *C. glutamicum* über homologe Rekombination.

Kan: Kanamycinresistenzgen, *lacI^q*: *lac*-Repressorgen, *P_{tac}*: *tac*-Promotor, *P*: natürlicher Promotor von *glyA*, *glyA'*: 5'-Ende des *glyA*-Gens.

In zwei Klonen von *C. glutamicum* ATCC13032::pK18mobglyA' und in vier Klonen von DM368-2::pK18mobglyA' wurde mittels PCR mit dem vektorspezifischen Primer RSP und dem *glyA*-spezifischen Primer *glyA2*-rev. (siehe Anhang 2.2) die Integration des Vektors pK18mobglyA' in das Bakterienchromosom überprüft. Im Falle einer erfolgreichen Integration dieses Plasmids sollte dabei ein 2000 bp großes DNA-Fragment amplifiziert werden, während in den Ausgangsstämmen ATCC13032 und DM368-2 keine PCR-Amplifikation möglich sein sollte. Wie in Abbildung 9 zu sehen ist, war die Integration des Vektors pK18mobglyA' bei allen untersuchten Klonen erfolgreich (Spuren 3+4 und 6 bis 9). Hier wurde jeweils eine spezifische Bande von 2,0 kb amplifiziert; bei den Negativkontrollen (Spuren 2 und 5) wurde hingegen kein spezifisches PCR-Fragment erhalten.

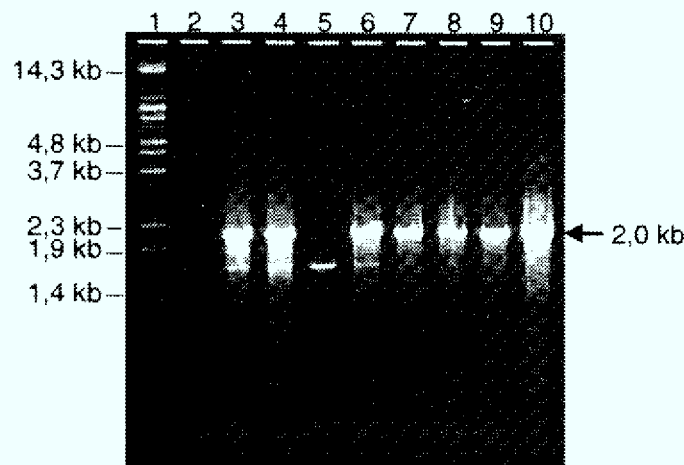


Abb. 9: Agarosegelfoto der durch PCR amplifizierten Fragmente aus chromosomaler DNA der konstruierten Stämme *C. glutamicum* ATCC13032::pK18mobglyA' bzw. DM368-2::pK18mobglyA'.

- Spur 1: Größenstandard (λ -DNA, BstEII-geschnitten)
- Spur 2: amplifizierte DNA aus ATCC13032 (Negativkontrolle)
- Spur 3+4: amplifizierte DNA aus ATCC13032::pK18mobglyA'
- Spur 5: amplifizierte DNA aus DM368-2 (Negativkontrolle)
- Spur 6 bis 9: amplifizierte DNA aus DM368-2::pK18mobglyA'
- Spur 10: amplifizierte DNA aus dem Plasmid pK18mobglyA' (Positivkontrolle)

1.5 Auswirkungen reduzierter glyA-Expression

Die Mutanten *C. glutamicum* ATCC13032::pK18mobglyA' und DM368-2::pK18mobglyA' wurden im Vergleich zu den Kontrollstämmen ATCC13032pZ1 bzw. DM368-2pZ1 in Hinblick auf ihre Serinhydroxymethyltransferase-Aktivität charakterisiert. Bei dem Stamm DM368-2::pK18mobglyA' wurde außerdem das Wachstumsverhalten und die Threoninakkumulation untersucht.

a) Serinhydroxymethyltransferase-Aktivität

In den unter 1.4 beschriebenen Mutantenstämmen *C. glutamicum* ATCC13032::pK18mobglyA' und DM368-2::pK18mobglyA' sollte eine Expression von *glyA* nur bei Zugabe von IPTG stattfinden, da die Stämme nur eine intakte Kopie von *glyA* unter Kontrolle des IPTG-induzierbaren *tac*-Promotors besitzen. Es wurde daher untersucht, ob durch Variation der verwendeten IPTG-Konzentrationen eine gezielte Beeinflussung der *glyA*-Expression und damit auch der Serinhydroxymethyltransferase-Aktivität möglich ist. Von Fürste *et al.* (1986) wurde beschrieben, daß bereits die Zugabe von 100 μ M IPTG eine starke Expression der unter *tac*-Promotor stehenden Gene induziert. Da in den folgenden Experimenten aber eine

geringe Expression von *glyA* angestrebt werden sollte, wurden die IPTG-Konzentration lediglich im Bereich von 0 bis 100 μM variiert. Die SHMT-Aktivität wurde in Rohextrakten von *C. glutamicum* DM368-2::pK18*mobglyA'* bei Anzucht in CGXII-Medium mit 0, 10 oder 100 μM IPTG im Vergleich zum Kontrollstamm DM368-2pZ1 bestimmt (Tab. 5).

<i>C. glutamicum</i> -Stamm	IPTG-Konzentration [μM]	SHMT-Aktivität [mU]	
		mit Serin	mit Threonin
DM368-2pZ1	0	25,8	1,6
DM368-2::pK18 <i>mobglyA'</i>	0	2,1	< 0,2
	10	5,1	0,8
	100	21,8	1,7

Tab. 5: Serinhydroxymethyltransferase-Aktivitäten in Rohextrakten von *C. glutamicum* DM369-2pZ1 und DM368-2::pK18*mobglyA'*. Die Stämme wurden für 10 h in CGXII-Minimalmedium mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen kultiviert und die Enzymaktivitäten mit 20 mM Serin bzw. 20 mM Threonin als Substrat bestimmt.

Bei Kultivierung ohne IPTG wies der Stamm DM368-2::pK18*mobglyA'* nur eine basale SHMT-Aktivität von 2,1 mU (Substrat: Serin) bzw. < 0,2 mU (Substrat: Threonin) auf. Diese geringe Enzymaktivität ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß der verwendete *tac*-Promotor auch ohne IPTG-Zugabe eine schwache Expression der durch ihn kontrollierten Gene zuläßt. Ein solcher Effekt wurde auch bei anderen Studien festgestellt (Perez *et al.*, 1998; Micka *et al.*, 1991). Die Zugabe von 10 μM IPTG führte zu einer leichten Erhöhung der SHMT-Aktivität, aber erst bei Zugabe von 100 μM IPTG während der Kultivierung wurden sowohl für das Substrat Serin, als auch für Threonin, Enzymaktivitäten erreicht, die den Werten des Kontrollstammes DM368-2pZ1 entsprachen. Um zu überprüfen ob die SHMT-Aktivität in dem durch ungerichtete Mutagenese entstandenen Stamm DM368-2 vergleichbar mit der Enzymaktivität im Wildtyp war, wurde der Enzymtest mit Serin als Substrat mit dem vom Wildtyp abgeleiteten Stamm ATCC13032::pK18*mobglyA'* wiederholt (Tab. 6). Die Ergebnisse dieser Messungen stimmen sehr gut mit den Werten für DM368-2::pK18*mobglyA'* überein.

<i>C. glutamicum</i> -Stamm	IPTG-Konzentration [μM]	SHMT-Aktivität [mU] mit Serin
ATCC13032pZ1	0	19,3
ATCC13032::pK18 <i>mobglyA'</i>	0	1,6
	10	6,1
	100	22,9

Tab. 6: Serinhydroxymethyltransferase-Aktivitäten in Rohextrakten von *C. glutamicum* ATCC13032pZ1 und ATCC13032::pK18*mobglyA'*. Die Stämme wurden für 9 h in CGXII-Minimalmedium mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen kultiviert und die Enzymaktivitäten mit 20 mM Serin als Substrat bestimmt.

Durch die Konstruktion der Stämme *C. glutamicum* ATCC13032::pK18*mobglyA'* und DM368-2::pK18*mobglyA'* ist es somit gelungen, die Expression von *glyA* durch Variation der IPTG-Konzentration gezielt zu beeinflussen. Dabei konnte die SHMT-Aktivität bei Anzucht der Zellen ohne IPTG bis auf ca. 10% der normalen Enzymaktivität verringert werden.

b) Wachstumsverhalten

Die Versuche zur Inaktivierung von *glyA* haben gezeigt, daß die *glyA*-Expression für *C. glutamicum* essentiell ist. Daher wurde im folgenden untersucht, ob eine verringerte Expression von *glyA* einen Einfluß auf das Wachstum von *C. glutamicum* hat. Dazu wurde der Stamm DM368-2::pK18*mobglyA'* zunächst in BHI-Komplexmedium mit 100 μM IPTG über Nacht vorkultiviert. Die Zellen wurden anschließend mit dem doppelten Volumen Saline gewaschen, in CGXII-Minimalmedium mit 0, 10 oder 100 μM IPTG mit einer Anfangs-OD₆₀₀ von 0,5 angeimpft und das Wachstum im Vergleich zu *C. glutamicum* DM368-2pZ1 über einen Zeitraum von 72 h verfolgt. Wie aus Abb. 10 zu ersehen ist, konnte *C. glutamicum* DM368-2::pK18*mobglyA'* auch ohne Zugabe von IPTG wachsen, wobei eine Wachstumsverzögerung zu beobachten war und auch eine leicht verringerte End-OD₆₀₀ erreicht wurde. Bereits bei Zugabe von nur 10 μM IPTG zum Medium war das Wachstum vergleichbar mit dem der Kontrolle DM368-2pZ1. Möglicherweise ist die während der Vorkultivierung in BHI-Medium + 100 μM IPTG erfolgte *glyA*-Expression ausreichend, um den Zellen zunächst auch während der Kultivierung in CGXII-Medium ein Wachstum zu ermöglichen. Diese Vermutung wurde überprüft, indem der Stamm DM368-2::pK18*mobglyA'* aus CGXII-Medium ohne IPTG nach einigen Stunden Wachstum nochmals in frisches CGXII-Medium ohne IPTG überimpft wurde. In diesem Fall war über einen Zeitraum von 70 h praktisch kein Wachstum

mehr zu beobachten (Ergebnis nicht gezeigt). Dies ist wiederum ein Hinweis darauf, daß die Expression von *glyA* für *C. glutamicum* essentiell ist.

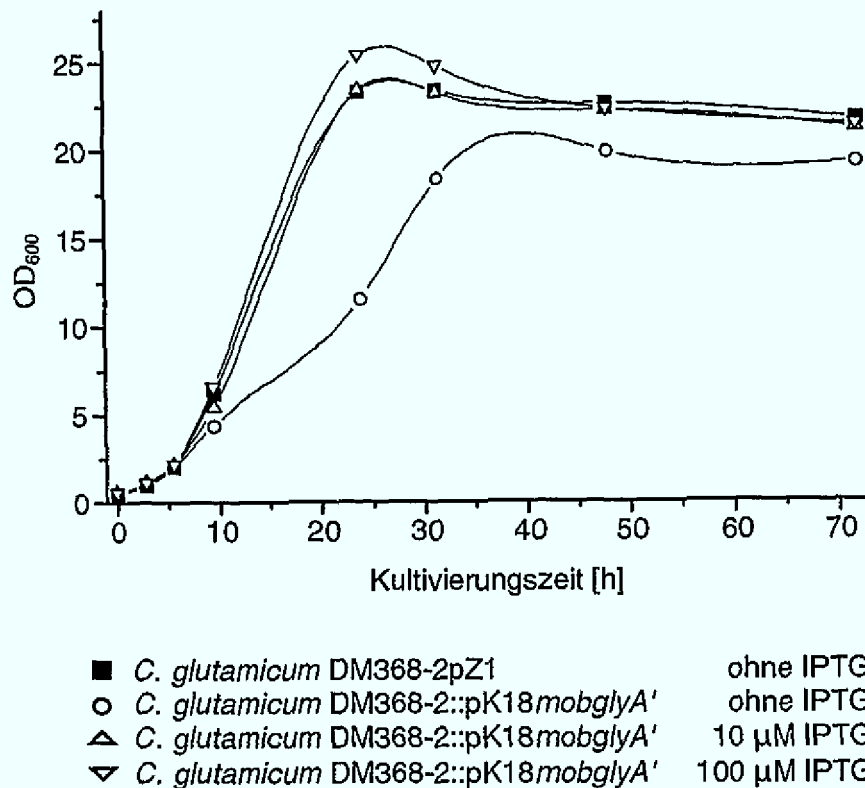


Abb. 10: Wachstum von *C. glutamicum* DM368-2pZ1 und DM368-2::pK18mobglyA' in CGXII-Minimalmedium mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen. Angegeben ist das Wachstum (OD₆₀₀) in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer.

c) Threoninakkumulation

Von Reinscheid *et al.* (1994) war beobachtet worden, daß die Threoninbildung bei einem threoninproduzierenden Stamm von *C. glutamicum* durch die katabole Umsetzung von Threonin zu Glycin beeinträchtigt wurde. Daher sollte untersucht werden, ob eine Verbesserung der extrazellulären Threoninakkumulation durch verringerte *glyA*-Expression, und dadurch bedingten, verminderten Threoninabbau, möglich ist. *C. glutamicum* DM368-2pZ1 und DM368-2::pK18mobglyA' wurden dazu, wie bereits beschrieben, unter Zugabe verschiedener IPTG-Konzentrationen kultiviert und die extrazellulären Threonin- und Glycinkonzentrationen nach 24 h, 48 h und 72 h bestimmt (Abb. 11). Nach 24 h Kultivierung war die Threoninakkumulation bei DM368-2::pK18mobglyA' ohne IPTG-Zugabe noch deutlich geringer als bei der Kontrolle DM368-2pZ1, was wahrscheinlich auf das verzögerte Wachstum bei dieser Kultivierung zurückzuführen ist. Nach 48 h aber betrug sie 11,8 mM

und war damit um ca. 10% höher als bei dem Vergleichsstamm DM368-2pZ1 mit 10,7 mM. Nach 72 h Kultivierung war sogar eine um ca. 20% höhere Threoninakkumulation zu beobachten. Auch bei Kultivierung mit 10 µM IPTG waren noch leicht erhöhte Threoninkonzentrationen meßbar, während bei Kultivierung mit 100 µM IPTG etwa die Werte des Kontrollstammes erreicht wurden (Abb. 11A). Diese Beobachtung stimmt gut mit dem Ergebnis überein, daß bei Zugabe von 100 µM IPTG bei DM368-2::pK18*mobglyA'* auch eine dem Kontrollstamm vergleichbare Serinhydroxymethyltransferase-Aktivität meßbar war. Die extrazelluläre Glycinakkumulation war bei Kultivierung von *C. glutamicum* DM368-2::pK18*mobglyA'* ohne IPTG nach 48 h um 2,5 mM und nach 72 h um 1,7 mM geringer als beim Vergleichsstamm DM368-2pZ1 (Abb. 11B). Bei Zugabe von 10 µM IPTG wurde eine etwa dem Kontrollstamm entsprechende Glycinkonzentration bestimmt, obwohl die Serinhydroxymethyltransferase-Aktivität bei Kultivierung von DM368-2::pK18*mobglyA'* mit 10 µM IPTG deutlich geringer war als bei dem Vergleichsstamm DM368-2pZ1 (siehe Tab. 5). Vermutlich beeinflussen *in vivo* also noch weitere Faktoren, wie z.B. die Regulation der Serinhydroxymethyltransferase oder der Efflux von Glycin bzw. Threonin die extrazelluläre Akkumulation dieser Aminosäuren.

Durch die Versuche zur Verringerung des Threoninabbaus zu Glycin wurde gezeigt, daß es möglich ist, die Threoninbildung mit *C. glutamicum* durch eine reduzierte Expression von *glyA* zu verbessern.

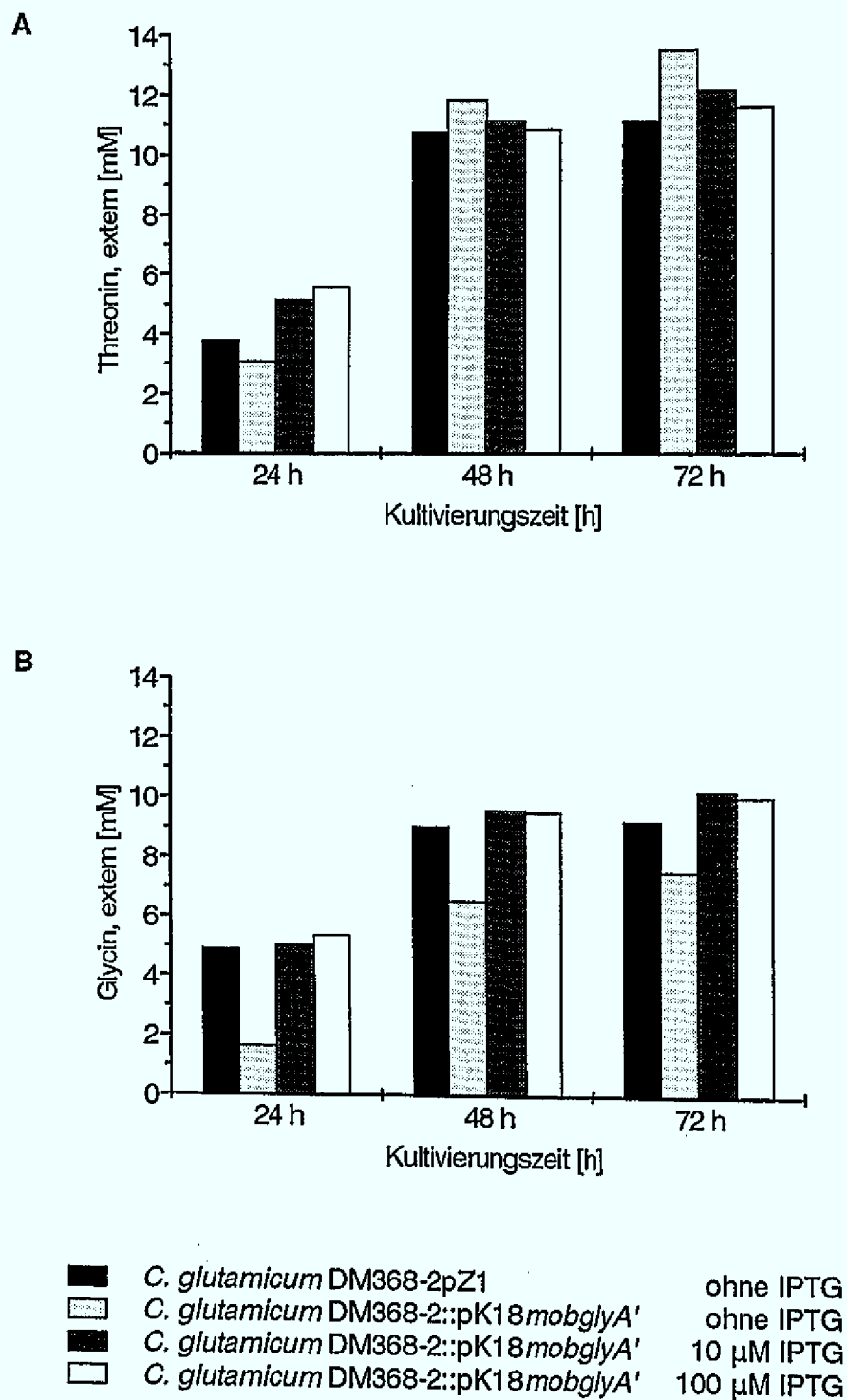


Abb. 11: Aminosäureakkumulation bei induzierter *glyA*-Expression in *C. glutamicum* DM368-2::pK18mobglyA' im Vergleich zu DM368-2pZ1. Dargestellt sind die externen Threoninkonzentrationen (A) und Glycinkonzentrationen (B) nach 24 h, 48 h und 72 h Kultivierungsdauer.

2. Etablierung eines Testsystems und Isolierung von Threoninexport-defekten Mutanten

Biochemische Untersuchungen bei *C. glutamicum* haben gezeigt, daß der Export von Threonin durch einen aktiven Transportmechanismus vermittelt wird (Palmieri *et al.*, 1996). Um das Gen für diesen Threoninexportcarrier identifizieren und klonieren zu können, mußte eine im Threoninexport defekte Mutante isoliert werden. Dazu war es zunächst notwendig, ein geeignetes Selektionssystem für die Isolierung exportdefekter Mutanten zu etablieren.

2.1 Erhöhung der intrazellulären Threoninkonzentration durch threoninhaltige Peptide

Von Vrljić *et al.* (1996) war gezeigt worden, daß eine Mutante von *C. glutamicum*, in der das Gen für den Lysinexportcarrier *lysE* deletiert wurde, nicht mehr in der Lage ist, in Anwesenheit des Dipeptids Lysyl-alanin zu wachsen. Dieser peptidsensitive Phänotyp ist auf eine starke intrazelluläre Lysinakkumulation von bis zu 1 M zurückzuführen. Es wurde daher untersucht, ob ein analoger Effekt bei der Fütterung threoninhaltiger Peptide als Basis dienen könnte, ein Selektionssystem für die Isolierung einer im Threoninexport defekten Mutante zu entwickeln. Da gezeigt wurde, daß *C. glutamicum* verschiedene Peptide mit unterschiedlicher Effizienz aufnimmt (Erdmann *et al.*, 1993), wurde zunächst geprüft, welches threoninhaltige Peptid zu einer hohen internen Threoninkonzentration führt, und ob gegebenenfalls bereits beim Wildtyp eine erhöhte Threoninkonzentration zu verlangsamten Wachstum führt. Dazu wurde der Stamm *C. glutamicum* R127 (Liebl *et al.*, 1989) in CGXII-Minimalmedium in Anwesenheit von je 1 mM Threonyl-alanin (Thr-Ala), Alanyl-threonin (Ala-Thr) oder Threonyl-threonyl-threonin (Thr-Thr-Thr) kultiviert und das Wachstum über einen Zeitraum von 70 h verfolgt (Abb. 12A). Bei Zugabe der Dipeptide Thr-Ala und Ala-Thr war bereits eine deutliche Wachstumsverzögerung erkennbar, doch die stärkste Wachstums-
hemmung wurde bei der Anwesenheit von 1 mM Thr-Thr-Thr erreicht. Da beobachtet wurde, daß die intrazelluläre Threoninkonzentration in allen Fällen schnell wieder absank (nicht gezeigt), wurde die interne Threoninakkumulation während einer Kurzzeitermentation mit den verschiedenen threoninhaltigen Peptiden detailliert untersucht. Dazu wurde *C. glutamicum* R127 bei einer optischen Dichte von ca. 8 bis 10 kultiviert und die interne Threoninkonzentration über einen Zeitraum von 5 h bestimmt (Abb. 12B).

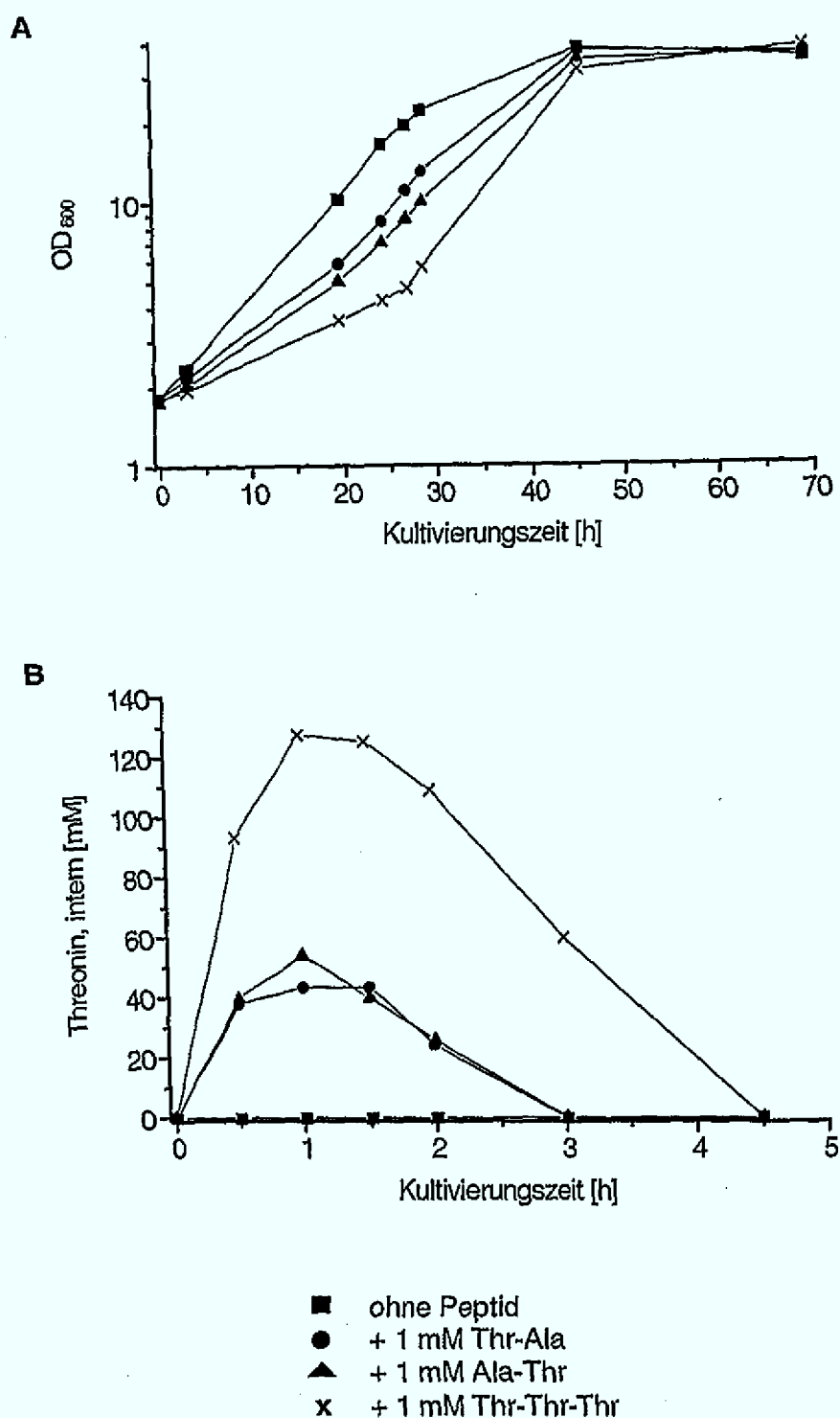


Abb. 12: Kultivierung von *C. glutamicum* R127 in CGXII-Medium mit verschiedenen Peptiden. Gezeigt sind das Wachstum über einen Zeitraum von 70 h (A) und die interne Threoninkonzentration im Verlaufe einer Kurzzeitfermentation über 5 h (B).

Während ohne Zugabe von Peptiden intrazellulär kein Threonin nachweisbar war, waren bei Anwesenheit der Dipeptide Thr-Ala und Ala-Thr intern bis ca. 50 mM Threonin meßbar. Mit 1 mM Thr-Thr-Thr wurde bei diesem Experiment sogar eine maximale intrazelluläre Konzentration von 130 mM erreicht. Interessanterweise trat eine erhöhte zellinterne Threoninakkumulation nur über einen Zeitraum von einigen Stunden auf. Trotzdem war diese Akkumulation eindeutig mit einer länger anhaltenden Wachstumsverzögerung zu korrelieren (vergl. Abb. 12A und 12B). Es wurde vermutet, daß das schnelle Absinken der zellinternen Threoninkonzentration zumindest teilweise auf die Umsetzung von Threonin zu Isoleucin zurückzuführen ist. Um eine weitere Erhöhung der intrazellulären Threoninakkumulation zu erreichen, wurde daher *ilvA* inaktiviert. Das *ilvA*-Gen kodiert für die Threonindehydratase aus *C. glutamicum* (Möckel *et al.*, 1992). Die Deletion von *ilvA* in *C. glutamicum* R127 wurde wie für den Wildtyp ATCC13032 beschrieben (Reuter, 1998) durchgeführt. Bei Kultivierung der Stämme R127 und R127 Δ *ilvA* in CGXII-Medium (+ 300 mg/L Isoleucin) mit 1 mM Thr-Thr-Thr wurde bei der Δ *ilvA*-Mutante eine stark erhöhte intrazelluläre Threoninakkumulation erreicht (Ergebnis nicht gezeigt).

Es wurde also gezeigt, daß in *C. glutamicum* ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten zellinternen Threoninakkumulation und einem verzögerten Wachstum besteht. Eine im Threoninexport defekte Mutante sollte sehr hohe Threoninkonzentrationen im Zellinneren akkumulieren, so daß die Identifizierung einer solchen Mutante anhand des stark verzögerten Wachstums in Gegenwart threoninhaltiger Peptide möglich sein sollte. Als Ausgangsstamm für eine ungerichtete Mutagenese wurde im folgenden eine *ilvA*-Deletionsmutante von *C. glutamicum* verwendet, weil eine solche Mutante aufgrund der nicht vorhandenen Threoninumsatzung zu Isoleucin Threonin stärker akkumuliert als ein vergleichbarer Stamm mit intaktem *ilvA*-Gen. Da mit dem Tripeptid Thr-Thr-Thr die höchste zellinterne Threoninkonzentration erreicht werden konnte, wurde für die weiteren Experimente dieses Peptid verwendet.

2.2 Transposonmutagenese und Isolierung von peptidsensitiven Mutanten

Um eine im Threoninexport defekte Mutante zu isolieren, wurde eine ungerichtete Mutagenese mittels eines Transposons durchgeführt. Die Transposonmutagenese besitzt gegenüber der bisher für *C. glutamicum* verwendeten chemischen Mutagenese mit *N*-Nitro-*N*-Nitroso-*N*-Methylguanidin (NNG) mehrere Vorteile (Mahillon und Chandler, 1998). Zum einen ist der Mutationsort im Genom durch ein Antibiotikum-Resistenzgen markiert, so daß eine direkte Klonierung des Insertionsortes zur Sequenzierung des inaktivierten Gens möglich wird. Zum anderen treten üblicherweise keine Mehrfachmutationen auf, wie es bei chemischer Mutagenese oder UV-Mutagenese häufig der Fall ist.

Zur Erzeugung einer Transposonbank wurde Tn5531 (Ankri *et al.*, 1996) verwendet. Als Ausgangsstamm für die Mutagenese wurde das Wildtypisolat *C. glutamicum* ATCC14752 eingesetzt, da mit Tn5531 in den Stämmen R127 und ATCC13032 keine unspezifische Integration des Transposons in das Chromosom erreicht werden konnte (Burkovski, pers. Mitteilung). Wie für *C. glutamicum* R127 beschrieben, wurde auch in diesem Stamm das Gen für die Threonindehydratase *ilvA* inaktiviert. *C. glutamicum* ATCC14752 kann nur mit nicht-methylierter DNA transformiert werden (Vertès *et al.*, 1993), so daß eine Konjugation mit *E. coli* S17-1, wie sie üblicherweise zur Integration eines Vektors in das *C. glutamicum* Genom durchgeführt wird, in diesem Fall nicht möglich war. Der Deletionsvektor pK19*mobsacBΔilvA* (Sahm und Eggeling, 1999) wurde daher zunächst in den Methylase-negativen Stamm *E. coli* SCS110 (Jerpseth und Kretz, 1993) eingebracht. Mit nicht-methylierter Plasmid-DNA, die aus diesem Stamm präpariert wurde, konnte dann *C. glutamicum* ATCC14752 durch Elektroporation transformiert und die Deletion von *ilvA* mit dem bei Schäfer *et al.* (1994b) beschriebenen System zum Genaustausch durchgeführt werden. Der so erhaltene Stamm ATCC14752Δ*ilvA* wurde im folgenden als Ausgangsstamm für die Transposonmutagenese mit Tn5531 verwendet. Die Mutagenese wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, durchgeführt. Insgesamt wurden dabei in mehreren parallelen Ansätzen etwa 2000 kanamycinresistente Klone erzeugt. Diese wurden einzeln auf CGXII-Agarplatten (+ 300 mg/L Isoleucin und 25 µg/mL Kanamycin) ohne bzw. mit 2 mM Threonintripeptid gepickt und das Wachstumsverhalten über einen Zeitraum von 30 Stunden beobachtet. Aus den ca. 2000 untersuchten Transposonmutanten wurden nach diesem ersten Selektionsschritt etwa 150 Klone identifiziert, die in Gegenwart von 2 mM Thr-Thr-Thr scheinbar schlechter wuchsen als der Kontrollstamm ATCC14752Δ*ilvA*. Da die Wachstumsunterschiede auf den Agarplatten aber sehr schlecht erkennbar waren, wurde der Phänotyp der identifizierten Mutanten durch einen Einzelkolonieausstrich auf Tripeptid-haltigem CGXII-Medium überprüft. Nach diesem Selektionsschritt wurden 21 Klone erhalten, die auf GCXII-

Agarplatten mit 2 mM Thr-Thr-Thr erneut deutlich schlechteres Wachstum als der Kontrollstamm ATCC14752 Δ ilvA zeigten, ohne Threonintripeptid aber normal wuchsen. Diese 21 Mutantenstämme wurden in CGXII-Flüssigmedium ohne bzw. mit 2 mM Threonintripeptid kultiviert und die Wachstumskurven im Vergleich zum Ausgangsstamm ATCC14752 Δ ilvA aufgenommen. Dabei zeigte sich überraschenderweise, daß der auf Agarplatten beobachtete Phänotyp in Flüssigkultur nur bei wenigen der untersuchten Klone zu verifizieren war. Von den 21 untersuchten Mutanten zeigte sich in zwei Fällen, daß die Stämme auch ohne Zugabe von Tripeptid verzögert wuchsen, so daß der Wachstumsdefekt hier also nicht in Zusammenhang mit einer hohen internen Threoninkonzentration stehen konnte. Bei weiteren zehn Klonen war in Flüssigkultur keine signifikante Wachstumsverzögerung bei Anwesenheit von 2 mM Thr-Thr-Thr zu beobachten. Lediglich neun Mutantenstämme zeigten auch in Flüssigkultur den erwarteten Phänotyp, wobei die Stärke der Wachstumsverzögerung bei diesen Mutanten sehr verschieden war. Die Wachstumskurven für drei ausgewählte Transposonmutanten werden im folgenden in den Abschnitten 3 bis 5 gezeigt. Für alle peptidsensitiven Mutanten wurde der beobachtete Wachstumsdefekt mit Hilfe eines Wachstumsindex quantifiziert (Tab. 7). Dieser Index ist das Verhältnis der optischen Dichte der Mutante zu der des Kontrollstammes nach 23 Stunden Kultivierung in CGXII-Medium mit 2 mM Tripeptid. Die neun Transposonmutanten, die einen Wachstumsindex von kleiner 0,8 aufwiesen, wurden im folgenden näher charakterisiert.

2.3 Klonierung und Sequenzierung der Transposoninsertionsorte

Zur Charakterisierung dieser Mutanten wurde der Insertionsort des Transposons Tn5531 im Chromosom der Mutanten kloniert und ansequenziert, um so eine Information über die von Tn5531 inaktivierten Gene zu erhalten. Dazu wurde zunächst die chromosomale DNA dieser Stämme isoliert und mit *Eco*RI bzw. in einem zweiten Ansatz mit *Xba*I verdaut. Der vollständige Restriktionsansatz wurde dann jeweils mit dem ebenfalls *Eco*RI- bzw. *Xba*I-geschnittenen Vektor pUC18 ligiert, so daß statistisch alle durch die Restriktion erhaltenen DNA-Fragmente in pUC18 kloniert vorlagen. Wie in Abbildung 13 zu erkennen ist, sind die Erkennungssequenzen der verwendeten Restriktionsenzyme nur einmal in der DNA-Sequenz des Transposons vorhanden. Bei *Eco*RI-Verdau der chromosomalen DNA erhält man also ein spezifisches Fragment, welches neben dem Kanamycinresistenzgen des Transposons den stromaufwärts zu Tn5531 gelegenen angrenzenden DNA-Bereich aus dem Genom der Mutante enthält. Bei der zweiten Klonierung (*Xba*I-Restriktionsansatz) sind auf dem DNA-Fragment entsprechend das Kanamycinresistenzgen und der stromabwärts zu Tn5531 gelegene angrenzende DNA-Bereich vorhanden.

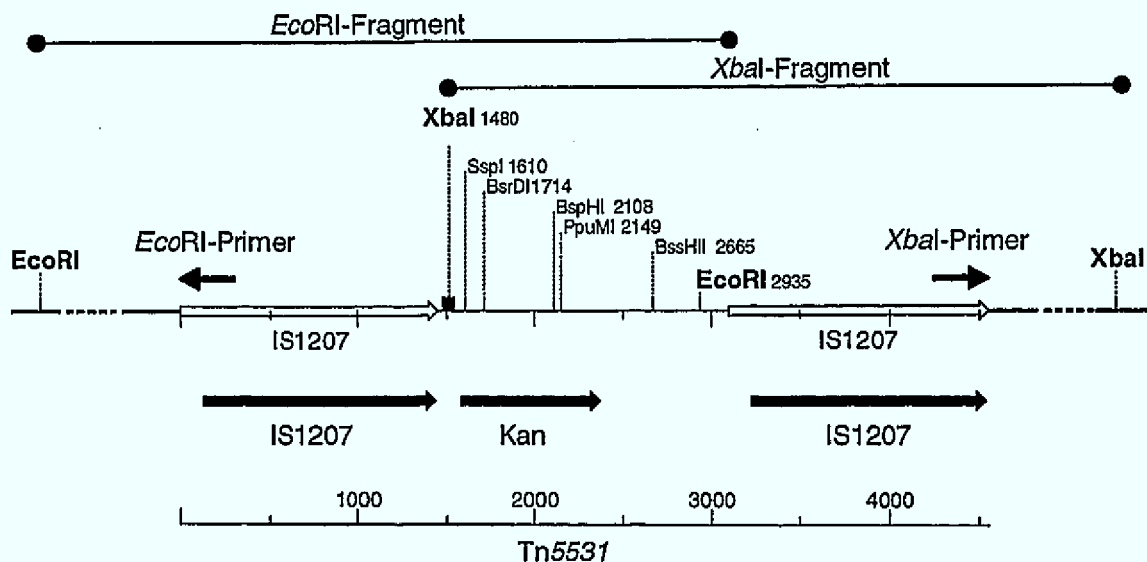


Abb. 13: Schema zur Klonierung der Insertionsorte von Tn5531. Dargestellt sind eine Restriktionskarte des Transposons, die durch *EcoRI*- bzw. *XbaI*-Verdau erhaltenen Fragmente sowie die Lage der zur Sequenzierung der angrenzenden DNA-Bereiche verwendeten Primer (Kan: Kanamycinresistenzgen).

Mit den erhaltenen Plasmidpools pUC18*EcoRI* und pUC18*XbaI* wurde *E. coli* DH5 α MCR (Grant *et al.*, 1990) transformiert. Die Transformationsansätze wurden auf LB-Agarplatten mit 25 μ g/mL Kanamycin (Resistenz vermittelt durch das Transposon) und 50 μ g/mL Carbenicillin (Resistenz vermittelt durch den Klonierungsvektor) selektiert. Auf diese Weise wurden ausschließlich Klone erhalten, bei denen der Insertionsort des Transposons in pUC18 kloniert vorlag. Bei allen neun peptidsensitiven Transposonmutanten wurde so durch *EcoRI*- und *XbaI*-Restriktion der Insertionsort von Tn5531 kloniert. Bei jedem Ansatz wurden dabei 1 bis 15 Klone erhalten, die beide Resistenzmarker trugen. Aus jeweils maximal drei dieser Klone wurde die Plasmid DNA isoliert und durch Restriktionsanalyse die Größe der klonierten Inserts (ca. 3,5 bis 12 kb) bestimmt. Von je einer dieser Plasmidpräparationen wurde dann die Sequenz des an das Transposon angrenzenden DNA-Bereichs ermittelt. Zur Ansequenzierung wurden die in Abbildung 13 eingezeichneten Primer (siehe Anhang 2.2) verwendet. Durch die Lokalisierung dieser Primer direkt am 5'- (*EcoRI*-Primer) bzw. 3'-Ende (*XbaI*-Primer) des Transposons wurde direkt eine Sequenzinformation über die durch Tn5531 inaktivierten Gene erhalten. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen dieser Gene wurden dann mit Hilfe des BLASTX-Suchprogramms (Altschul *et al.*, 1997) mit bereits publizierten Sequenzen in der Datenbank verglichen. In Tabelle 7 sind die Ergebnisse des Datenbankvergleichs und eine Übersicht über die durchgeführten Klonierungen des Transposoninsertionsortes für alle neun untersuchten Mutanten zusammenfassend dargestellt.

Mutante	Klonierung <i>Eco</i> RI- Seite	<i>Xba</i> I- Seite	Wachstums- index *)	Ähnlichkeit der abgeleiteten Aminosäure- sequenzen der durch Tn5531 unterbrochenen offenen Leserahmen zu bekannten Sequenzen [Datenbankeintrag]
22	✓	✓	0,48	- Putatives Protein (<i>Aquifex aeolicus</i>) [AE000675] - Putative Permease (<i>Sinorhizobium meliloti</i>) [AF055582] - Hypothetisches Protein (<i>Mycobacterium leprae</i>) [U15181] - Putativer Aminosäurecarrier HI0183 (<i>Haemophilus influenzae</i>) [P44555]
27	✓	✓	0,54	keine signifikante Ähnlichkeit
39	-	✓	0,66	Tn-Insertion 150 bp stromaufwärts eines orfs mit Ähnlichkeit zu: - Hypothetisches Protein Rv1321 (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>) [Q10634] - Hypothetisches Protein B1549_C3_223 (<i>Mycobacterium leprae</i>) [P53524]
40	✓	✓	0,11	- Hypothetisches Protein Rv2752c (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>) [AL008967] - Hypothetisches Protein SC9A10.09 (<i>Streptomyces coelicolor</i>) [AL031260]
47	✓	✓	0,54	- kodierender Bereich AF2041 (<i>Archaeoglobus fulgidus</i>) [AE000962]
53	✓	✓	0,12	- Putatives Membranprotein Rv3737 (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>) [AL022121] - Putatives Membranprotein (<i>Streptomyces coelicolor</i>) [AL049841]
70	✓	✓	0,39	- Hypothetisches Protein OtsB (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>) [Z74025]
78	✓	✓	0,58	keine signifikante Ähnlichkeit
81	✓	✓	0,78	- orf3 (<i>Streptomyces lividans</i>) [Z70724] - Hypothetisches Protein YgaE (<i>Bacillus subtilis</i>) [Z82044] - Hypothetisches transmembranes Protein in <i>fda</i> 3'-Region (orf3) (<i>Corynebacterium glutamicum</i>) [Q99340]

Tab. 7: Zusammenfassung der Klonierungs- und Sequenzierungsergebnisse der durch Transposonmutagenese inaktivierten Gene aus neun peptidsensitiven Mutanten.
 *) Der Wachstumsindex ist das Verhältnis der optischen Dichte der Mutante zu der des Kontrollstammes ATCC14752 Δ *ilvA* nach 23 Stunden Kultivierung in CGXII-Medium mit 2 mM Tripeptid.

Durch den Datenbankvergleich mit bekannten Sequenzen war nun eine weitere Einengung der Mutantenzahl möglich. Es ist davon auszugehen, daß es sich bei dem gesuchten Threoninexportcarrier um ein in der Membran lokalisiertes Protein handelt. Daher sollte der peptidsensitive Phänotyp nur in solchen Transposonmutanten auf einen Defekt im Threoninexport zurückzuführen sein, bei denen durch Tn5531 ein Gen inaktiviert ist, das für ein mögliches Membranprotein kodiert. Der Sequenzvergleich zeigte, daß das Transposon in zwei Fällen (Mutanten Nr. 27 und 78) in einen DNA-Bereich gesprungen war, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz keinerlei Ähnlichkeit zu Datenbankeinträgen aufwies. Bei einer Mutante (Nr. 39) war die Transposoninsertion etwa 150 bp stromaufwärts eines offenen Leserahmens erfolgt. Die abgeleitete Proteinsequenz dieses offenen Leserahmens zeigte lediglich Ähnlichkeit zu zwei nicht charakterisierten hypothetischen Proteinen aus *M. tuberculosis* und *M. leprae*. In drei weiteren Transposonmutanten (Nr. 40, 47 und 70) war Tn5531 in offene Leserahmen inseriert, deren abgeleitete Aminosäuresequenzen Identitäten zu hypothetischen Proteinen aufwiesen, bei denen es aber aufgrund der Primärsequenz keinen Anhaltspunkt dafür gab, daß es sich hierbei um Membranproteine handeln könnte. Nur in drei der untersuchten Mutanten (Nr. 22, 53 und 81) wies die abgeleitete Proteinsequenz der durch das Transposon inaktivierten offenen Leserahmen Ähnlichkeiten zu möglichen Membranproteinen auf.

Durch das in dieser Arbeit etablierte Testsystem war es also letztendlich möglich, aus einer Transposonbank von ca. 2000 Klonen drei Mutantenstämme zu identifizieren, bei denen der peptidsensitive Phänotyp offensichtlich auf die Integration des Transposons in ein für ein Membranprotein kodierendes Gen zurückzuführen ist. Bei einer dieser drei Transposonmutanten könnte es sich also um die gesuchte Threoninexport-Defektmutante handeln. Um dies zu überprüfen, wurden die drei in Frage kommenden Gene orf22, orf53 und orf81 im folgenden detailliert untersucht. Dazu mußte jedes dieser Gene zunächst aus dem Wildtyp *C. glutamicum* ATCC13032 isoliert werden, um Stämme zu konstruieren, in denen die Gene inaktiviert bzw. überexprimiert wurden. Mit Hilfe solcher Stämme sollte dann der Einfluß der Genprodukte von orf22, orf53 und orf81 auf den Threoninexport in *C. glutamicum* untersucht werden.

3. Klonierung und Charakterisierung von orf22

3.1 Isolierung von orf22 aus *C. glutamicum* ATCC13032 und Konstruktion von Mutanten

Zur Untersuchung, ob es sich bei dem in Mutante 22 inaktivierten Gen um das gesuchte Threoninexportcarriergen aus *C. glutamicum* handelt, wurde orf22 zunächst aus dem Wildtyp ATCC13032 isoliert und in diesem Stamm inaktiviert sowie überexprimiert.

Die vollständige DNA-Sequenz von orf22 (siehe Anhang 1) war durch das *C. glutamicum*-Genomprojekt der Degussa-Hüls AG zugänglich. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab, daß orf22 vermutlich 756 bp groß ist, was einem Protein von 252 Aminosäuren entspricht. Anhand dieser Sequenzinformation wurden die Primer orf22-1 und orf22-2 (siehe Anhang 2.2) ausgewählt, um das vollständige Gen zusammen mit ca. 200 bp stromaufwärts und ca. 100 bp stromabwärts liegenden DNA-Bereichen mittels PCR aus dem Wildtyp ATCC13032 zu amplifizieren. Das isolierte ca. 1,0 kb große PCR-Fragment wurde zur Überexpression in den mit *ScaI* linearisierten *E. coli*-*C. glutamicum*-Pendelvektor pZ1 (Menkel *et al.*, 1989) kloniert. Das resultierende Plasmid pZ1orf22 wurde dann durch Elektroporation in den Wildtyp ATCC13032 eingebracht, so daß der *C. glutamicum*-Stamm ATCC13032pZ1orf22 (Überexprimierer) erhalten wurde. Um eine Inaktivierungsmutante von orf22 zu konstruieren, wurde zunächst ein internes, 274 bp großes Fragment von orf22 in einer PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA von ATCC13032 als Matrize amplifiziert. Dazu wurden die Primer orf22-3 und orf22-4 (siehe Anhang 2.2) verwendet. Das erhaltene PCR-Fragment wurde in den mit *SmaI* linearisierten Inaktivierungsvektor pK18mob (Schäfer *et al.*, 1994b) ligiert und *C. glutamicum* ATCC13032 durch Elektroporation mit dem resultierenden Plasmid pK18mob'orf22' transformiert. Der Vektor pK18mob'orf22' ist in *C. glutamicum* nicht frei replizierbar, kann aber durch homologe Rekombination des klonierten, internen orf22-Fragments in das Chromosom von *C. glutamicum* integrieren. Diese Integration führte zur Unterbrechung von orf22. In dem auf diese Weise erhaltenen Stamm ATCC13032orf22::pK18mob'orf22' wurde der korrekte Integrationsort des Plasmids durch PCR nachgewiesen (Ergebnis nicht gezeigt). Mit den konstruierten Stämmen (Inaktivierungsmutante und Überexprimierer von orf22) war es nun möglich, einen Einfluß von orf22 bzw. dessen Genprodukt, auf den Threoninexport in *C. glutamicum* zu untersuchen. Dazu wurden diese Stämme im folgenden im Vergleich zum Wildtyp hinsichtlich ihres Wachstums in Anwesenheit von threoninhaltigen Peptiden und in Hinblick auf die Threoninexportraten charakterisiert.

3.2 Beteiligung von orf22 am Threoninexport

Es sollte zunächst mit den unter 3.1 beschriebenen Stämmen überprüft werden, ob die gezielte Inaktivierung von orf22 ein verzögertes Wachstum bei Anwesenheit von Threonin-tripeptid zur Folge hat, so wie es in der Transposonmutante 22 beobachtet worden war. Durch Bestimmung der Effluxraten für Threonin sollte außerdem untersucht werden, ob das orf22-Genprodukt am aktiven Threoninexport beteiligt ist.

Zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens wurden der Überexprimierer *C. glutamicum* ATCC13032pZ1orf22, die Inaktivierungsmutante ATCC13032orf22::pK18mob'orf22' und der Kontrollstamm ATCC13032pZ1 in CGXII-Minimalmedium mit und ohne Zusatz von 2 mM Threonintri-peptid kultiviert und das Wachstum über einen Zeitraum von 35 h verfolgt (Abb. 14). In CGXII-Medium ohne Tripeptid wuchsen der Kontrollstamm ATCC13032pZ1 und die Inaktivierungsmutante ATCC13032orf22::pK18mob'orf22' identisch, während die Inaktivierungsmutante bei Anwesenheit von Thr-Thr-Thr ein leicht verzögertes Wachstum im Vergleich zum Kontrollstamm zeigte. Ein ähnlicher Phänotyp war auch bei der Transposonmutante 22 beobachtet worden. Die Peptidsensitivität in dieser Transposonmutante war also offensichtlich auf die Inaktivierung von orf22 durch Integration von Tn5531 zurückzuführen. Um zunächst auszuschließen, daß das leicht verzögerte Wachstum der Inaktivierungsmutante in Anwesenheit von Threonintri-peptid unspezifisch auch bei anderen, nicht threoninhaltigen Peptiden auftritt, wurde das Wachstum des Kontrollstamms ATCC13032pZ1 und der Inaktivierungsmutante ATCC13032orf22::pK18mob'orf22' bei Zugabe verschiedener Peptide untersucht. Dazu wurden beide Stämme in CGXII-Medium mit 2 mM Arginyl-alanin oder 3 mM Isoleucyl-isoleucin über einen Zeitraum von 32 h kultiviert und das Wachstum verfolgt. Dabei zeigte sich, daß der Stamm ATCC13032orf22::pK18mob'orf22' bei Anwesenheit dieser Peptide im Vergleich zur Kontrolle kein verzögertes Wachstum aufwies. Der bei Zugabe von Thr-Thr-Thr beobachtete Wachstumsdefekt ist also spezifisch für threoninhaltige Peptide. Der Überexprimierer ATCC13032pZ1orf22 zeigte allerdings ein unerwartetes Wachstumsverhalten (Abb. 14). Der Stamm wuchs in CGXII-Medium langsamer als der Kontrollstamm und erreichte auch eine deutlich geringere End-OD₆₀₀, unabhängig davon, ob Threonintri-peptid zugegeben wurde oder nicht. Dieses ungewöhnliche Wachstumsverhalten bei Überexpression von orf22 wurde durch weitere Kultivierungsversuche detailliert untersucht.

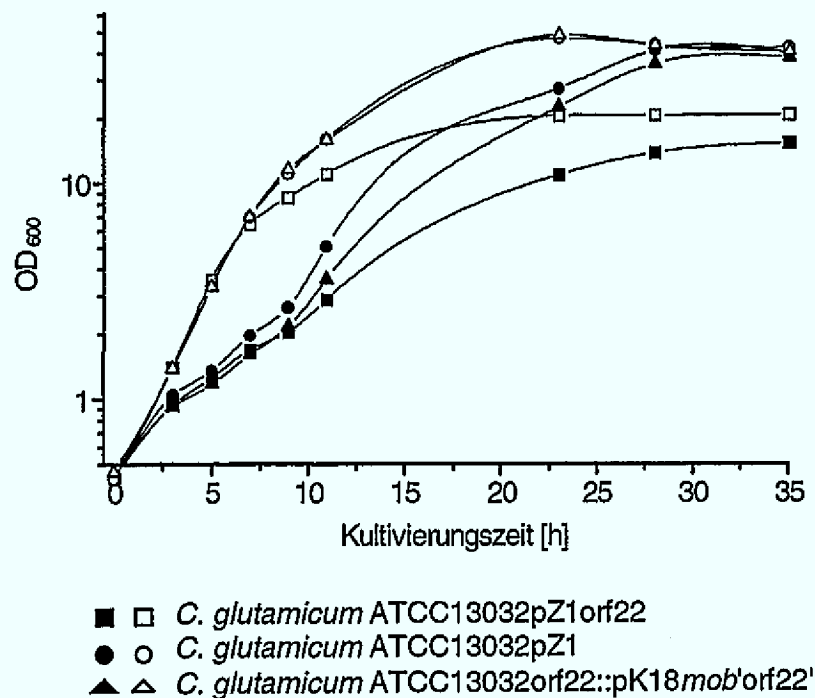


Abb. 14: Wachstum von *C. glutamicum* ATCC13032pZ1orf22, ATCC13032pZ1 und ATCC13032orf22::pK18mob'orf22' in CGXII-Minimalmedium ohne (offene Symbole) und mit (geschlossene Symbole) 2 mM Thr-Thr-Thr. Dargestellt ist das Wachstum (OD_{600}) in logarithmischer Auftragung in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer.

Die Bestimmung der Threonineffluxraten bei den Stämmen mit unterschiedlicher *orf22*-Expression sollte Aufschluß über eine Beteiligung des *orf22*-Genprodukts am Threoninexport geben. Zur Bestimmung der Effluxraten wurden der Überexprimierer *C. glutamicum* ATCC13032pZ1orf22, die Inaktivierungsmutante ATCC13032orf22::pK18mob'orf22' und der Kontrollstamm ATCC13032pZ1 zunächst zwei Stunden in CGXII-Medium mit 1 mM Threonintri-peptid inkubiert. Über einen Zeitraum von 120 Minuten wurde dann die Zunahme der extrazellulären Threoninkonzentration in CGXII-Medium mit Threonintri-peptid verfolgt. Wie in Abbildung 15 zu erkennen ist, war der Anstieg der externen Threoninkonzentrationen bei allen drei Stämmen über etwa 90 Minuten linear, so daß die Auswertung durch Anlegen einer Ausgleichsgeraden durch die ersten sieben Meßpunkte erfolgte. Die Steigungen der drei Ausgleichsgeraden unterschieden sich dabei nur gering. Unter Berücksichtigung der eingesetzten Zellmengen wurden aus diesen Steigungen die Threoninexportraten berechnet. Aus Tabelle 8 ist ersichtlich, daß die Überexpression bzw. Inaktivierung von *orf22* keinen nennenswerten Einfluß auf den Threoninefflux zeigte.

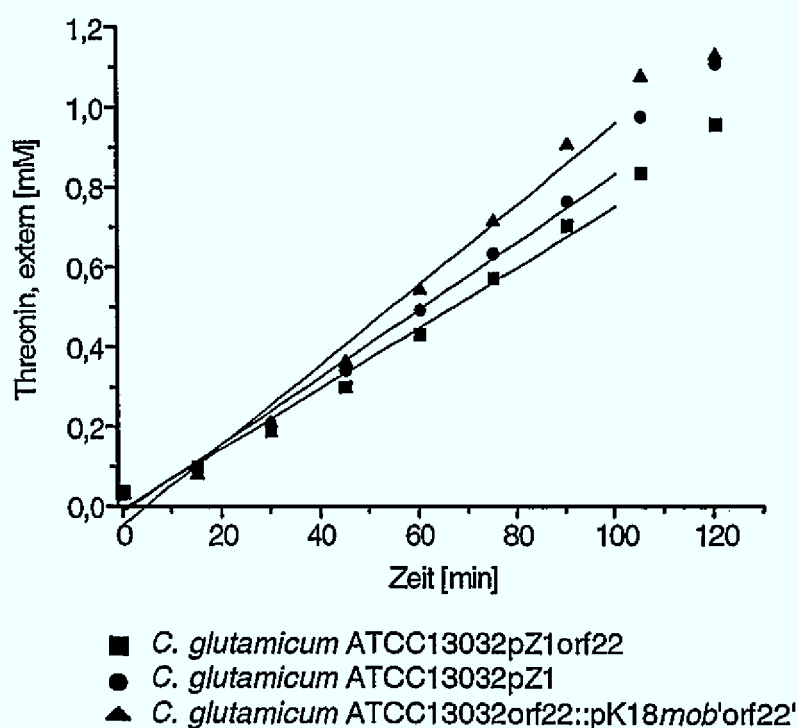


Abb. 15: Extrazelluläre Threoninkonzentrationen bei *C. glutamicum* ATCC13032pZ1orf22, ATCC13032pZ1 und ATCC13032orf22::pK18mob'orf22'. Dargestellt ist die extrazelluläre Threoninkonzentration in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer.

Um den Fehler bei der Bestimmung von Exportraten abzuschätzen, wurde die Messung mit dem Kontrollstamm *C. glutamicum* ATCC13032pZ1 mehrmals wiederholt. Dabei zeigte sich, daß die für diesen Stamm ermittelten Threoninexportraten stets im Bereich von 2,3 bis 2,9 nmolx(minxmg TG)⁻¹ lagen.

<i>C. glutamicum</i> -Stamm	Threoninexportrate [nmolx(minxmg TG) ⁻¹]
ATCC13032pZ1orf22	2,8
ATCC13032pZ1	2,9
ATCC13032orf22::pK18mob'orf22'	3,5

Tab. 8: Threoninexportraten bei *C. glutamicum* ATCC13032pZ1orf22, ATCC13032pZ1 und ATCC13032orf22::pK18mob'orf22'. Die Raten wurden aus den Steigungen der in Abb. 15 gezeigten Ausgleichsgeraden berechnet.

Wenn das orf22-Genprodukt am Export von Threonin beteiligt wäre, so müßte die Exportrate bei Inaktivierung des Gens geringer sein als bei der Kontrolle. Da bei Inaktivierung von orf22 aber sogar eine leicht erhöhte Threoninexportrate gemessen wurde (Tab. 8), ist auszuschließen, daß es sich bei orf22 um das gesuchte Gen für den Threoninexportcarrier handelt.

Aufgrund des unerwarteten Phänotyps des orf22-Überexprimierers bei Wachstum in CGXII-Minimalmedium wurden im folgenden noch weitere Untersuchungen zur Funktion von orf22 in *C. glutamicum* durchgeführt.

3.3 Untersuchungen zur Funktion von orf22

Um Informationen über die mögliche Funktion von orf22 in *C. glutamicum* zu erhalten, wurde zunächst die Sequenz durch Datenbankrecherchen analysiert. Die aus orf22 abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte unter anderem Ähnlichkeit zu einem putativen Aminosäurecarrier aus *Haemophilus influenzae* (Fleischmann *et al.*, 1995) (vergl. Tab. 7). Desweiteren waren schwache Sequenzidentitäten zu Aquaporinen aus verschiedenen Eukaryonten vorhanden. Aquaporine sind kanalbildende Proteine, die sowohl in Gram-negativen Prokaryonten (Calamita *et al.*, 1995) als auch in Eukaryonten (Heymann *et al.*, 1998) gefunden wurden, während aus Gram-positiven Bakterien bisher keine Aquaporine bekannt sind. Sie gehören zur *Major Intrinsic Protein* (MIP) Familie und vermitteln den schnellen Transport von Wasser durch die Zellmembran (Park und Saier, 1996). Die Größe des aus orf22 abgeleiteten Polypeptids von 252 Aminosäuren würde gut mit der bisher bekannter Aquaporine übereinstimmen. Ein genauer Sequenzvergleich zeigte jedoch, daß ein für Proteine der MIP-Familie typisches, hochkonserviertes Sequenzmotiv (Park und Saier, 1996) in der aus orf22 abgeleiteten Aminosäuresequenz nicht vorhanden ist (Abb. 16). Auch die mit Hilfe des Sekundärstrukturvorhersage-Programms PHD.htm *Neuronal Net* (Rost *et al.*, 1995) vorhergesagte Topologie mit 8 transmembranen Bereichen stimmte nicht mit der Anzahl und Anordnung der transmembranen Helices in bekannten und z.T. kristallisierten Aquaporinen (Walz *et al.*, 1997) überein. Es ist also unwahrscheinlich, daß es sich bei orf22 um das Gen für ein klassisches Aquaporin handelt. Da aus Gram-positiven Bakterien bisher jedoch keine Aquaporine beschrieben wurden, wäre es aber denkbar, daß diese eine andere Struktur als die bereits charakterisierten Aquaporine aus Gram-negativen Prokaryonten und Eukaryonten besitzen. Die aus orf22 abgeleitete Aminosäuresequenz wies keine weiteren Ähnlichkeiten zu Proteinen mit bekannter Funktion auf, so daß es nicht möglich war, anhand der Sequenzanalyse Rückschlüsse auf eine mögliche Funktion von orf22 in *C. glutamicum* zu ziehen.

Orf22	1	-----LIVLTITATVLLASVILGAILQRMATGLGVGLV
<i>R. rattus</i>	1	MPSEKDGARKSLMORLALKSRITAKETLSEFLGTFITIVLGCCSSIAQAVLSRERFEGGIIIT
<i>H. sapiens</i>	1	MQPEGAEKGSFKQRLVLKSSIAKETLSEFLGTFILIVLGCCGVAQAALLSRGRFEGGVIT

Orf22	32	TGPVLTSTHIGPLAGVTIMVNGLSITINAVNNAWSVRKRTDWAKERILAGALVLGSPVAVAVV
<i>R. rattus</i>	61	NIQFASAVVMALYVTFGLSGGHINPAVSEFAMCVFGRMEWFKPPFYVGAQFLGAFVGAATV
<i>H. sapiens</i>	61	NVGFSAVAMALYVAGGVSGGHINPAVSLAMCTFGRMKWFKLPFYVGAQFLGAFVGAATV

Orf22	92	YFINGPWLLIFVG-----AMVLLALGVSLFPTEKFAIKQEKALPMATFGMTGGF
<i>R. rattus</i>	121	FGIYYDGLMAFAGGKLLVGENATAHIFATYPAPETSTPGAEVDQVVSMTFLLHIVFAMF
<i>H. sapiens</i>	121	FGIYYDGLMSFAGGKLLVGENATAHIFATYPAPYISLANAEADQVVATMELLHIVFADF

Orf22	141	MSFVAGTAG--PSLTVVARISRWYRDFVATLHPVLLVANITVSELLKVLIGGLDFGGAP
<i>R. rattus</i>	181	DSRNLCVPRGLEPVTISLLIIVLSCSPGLNSGCAMNPARDLSPRLFTALAGWGFEVFTVG
<i>H. sapiens</i>	181	DSRNLCVPRGLEPVTATGLLIIVTASSLGLNSGCAMNPARDLSPRLFTALAGWGFEVFRAG

Orf22	199	AWLNIGAVAMIEVGAWLGEIVNAKVSTPMAKRIATILAAAGAAVVLFRGIMEIV-
<i>R. rattus</i>	241	NNFWWLPVVGPMIGAEILGGLIYVLEIOMHHSEKIDPDNKAEPSENNLEKHELSVIM
<i>H. sapiens</i>	241	NNFWWLPVVGPIVGAVTGGLIYVLEIHHPEPDSVEKAEQSEDKPEKYELSVIM

Abb. 16: Homologievergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz des klonierten orf22 aus *C. glutamicum* ATCC13032 (1. Zeile) mit den Sequenzen der Aquaporine aus *Rattus rattus* und *Homo sapiens* unter Verwendung des *Multiple Sequence Alignment* Programms ClustalW 1.8 (Jeanmourgin *et al.*, 1998) (schwarz: identisch AS, grau: ähnliche AS). Das für Proteine der MIP-Familie hochkonservierte Sequenzmotiv Asn-Pro-Ala ist markiert (*).

Wie in Abschnitt 3.2 gezeigt wurde, wächst der Stamm ATCC13032pZ1orf22 in CGXII-Medium deutlich schlechter als der Kontrollstamm mit Leerplasmid (Abb. 14). Da dieser Wachstumsdefekt in BHI-Komplexmedium nicht auftrat, konnte es sich hier nicht um einen unspezifischen negativen Effekt der orf22-Überexpression handeln, sondern mußte auf eine Besonderheit des CGXII-Mediums zurückzuführen sein. Ein Unterschied zwischen den beiden Medien besteht z.B. im osmotischen Druck. Dieser wurde in beiden Medien bestimmt. Dabei zeigte sich, daß CGXII-Medium mit 1040 mosmol/kg eine verhältnismäßig hohe Osmolalität besitzt, während in BHI-Medium nur 350 mosmol/kg meßbar sind. Es wäre also denkbar, daß das orf22-Genprodukt an der Osmoregulation in *C. glutamicum* beteiligt ist. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden weitere Wachstumsexperimente mit dem orf22-Überexprimierer und dem Kontrollstamm durchgeführt. Wenn das schlechtere Wachstum von *C. glutamicum* ATCC13032pZ1orf22 nur durch die höhere Osmolalität des CGXII-Mediums verursacht würde, müßte der gleiche Wachstumsdefekt auch in Komplexmedium mit einer hohen Osmolalität zu beobachten sein. Daher wurde der orf22-Überexprimierer in BHI-Medium mit 0,75 M NaCl (entsprechend einer Osmolalität von ca. 1800 mosmol/kg)

kultiviert und das Wachstum im Vergleich zum Kontrollstamm verfolgt. Es zeigte sich, daß beide Stämme in diesem Medium gleich gut wachsen konnten. Das schlechtere Wachstum von *C. glutamicum* ATCC13032pZ1orf22 in CGXII-Medium war also nicht einfach auf die hohe Osmolalität dieses Mediums zurückzuführen. Allerdings sind in CGXII-Medium keine kompatiblen Solute, wie z.B. Prolin oder Glycinbetain, vorhanden, die in Komplexmedium zur Bewältigung von Osmostreß beitragen könnten (Farwick *et al.*, 1995). Deshalb wurden nochmals Wachstumskurven beider Stämme in CGXII-Medium mit und ohne Zugabe von je 5 mM Glycinbetain und 5 mM Prolin aufgenommen. Wie aus Abbildung 17 ersichtlich, verlangsamt sich das Wachstum von *C. glutamicum* ATCC13032pZ1orf22 auch bei Anwesenheit dieser kompatiblen Solute bereits nach etwa 9 h. Die Zugabe dieser Solute bewirkte also keine Komplementierung des durch orf22-Überexpression bedingten Wachstumsdefektes in CGXII-Medium. Diese Experimente zeigen insgesamt, daß eine Beteiligung des orf22-Genprodukts an der Osmoregulation in *C. glutamicum* unwahrscheinlich ist.

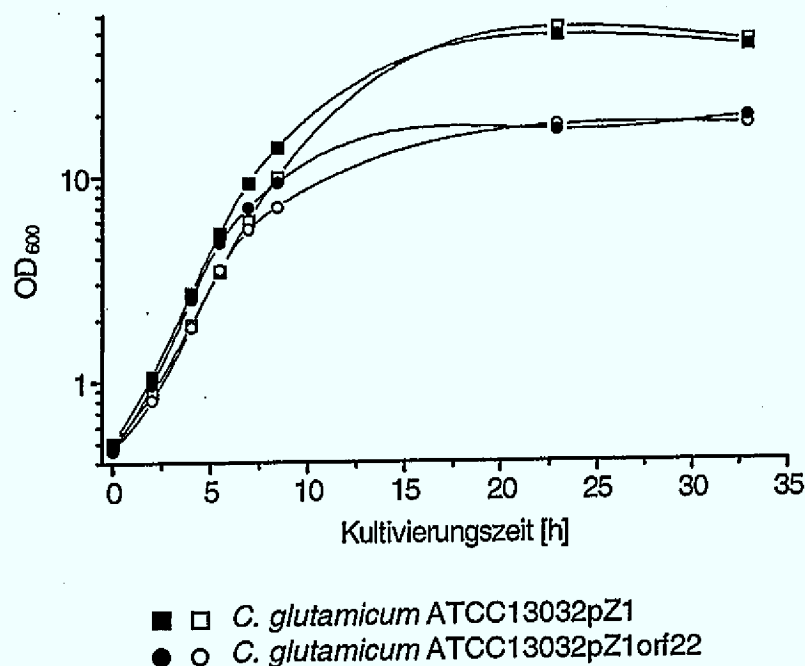


Abb. 17: Wachstum von *C. glutamicum* ATCC13032pZ1orf22 und ATCC13032pZ1 in CGXII-Minimalmedium ohne (offene Symbole) und mit (geschlossene Symbole) 5 mM Prolin und 5 mM Glycinbetain. Dargestellt ist das Wachstum (OD₆₀₀) in logarithmischer Auftragung in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer.

Es muß also festgestellt werden, daß die Funktion von orf22 in *C. glutamicum* ungeklärt bleibt. Obwohl eine orf22-Inaktivierungsmutante einen spezifisch bei Threonintripeptid auftretenden Wachstumsdefekt aufweist, konnte eine Beteiligung des orf22-Genprodukts am Threoninexport und an der Osmoregulation ausgeschlossen werden.

4. Klonierung und Charakterisierung von orf81

4.1 Isolierung von orf81 aus *C. glutamicum* ATCC13032 und Konstruktion von Mutanten

Auch bei dem in Mutante 81 inaktivierten Gen sollte untersucht werden, ob es sich um das gesuchte Threoninexportcarriergen aus *C. glutamicum* handelt. Dazu wurde die DNA-Sequenz von orf81 zunächst analysiert. Anschließend wurde orf81 aus dem Wildtyp ATCC13032 isoliert und in diesem Stamm inaktiviert sowie überexprimiert.

Durch das *C. glutamicum*-Genomprojekt der Degussa-Hüls AG war die vollständige DNA-Sequenz von orf81 (siehe Anhang 1) zugänglich. Eine Analyse der Nukleotidsequenz ergab, daß orf81 1068 bp groß ist und somit für ein Protein von 356 Aminosäuren kodiert. Bei dem orf81-Genprodukt handelt es sich um ein vorwiegend hydrophobes Protein (ca. 40% hydrophobe Aminosäuren), was eine Lokalisierung in der Membran vermuten läßt. Eine Hydrophobizitätsanalyse nach dem Algorithmus von Kyte und Doolittle (1982) ergab, daß stark hydrophobe Bereiche vorhanden sind, die sich hauptsächlich in der N-terminalen Hälfte des Proteins befinden. Die Datenbanksuche mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz von orf81 zeigte, daß es lediglich Ähnlichkeiten zu Proteinen mit unbekannter Funktion gab. Die höchste Identität trat dabei mit 26% identischen und 46% ähnlichen Aminosäuren zu einem hypothetischen Protein aus *Streptomyces lividans* auf (Betzler *et al.*, 1997).

Zur funktionellen Charakterisierung wurde orf81 zunächst aus dem Wildtyp ATCC13032 isoliert. Anhand der DNA-Sequenzinformation aus dem *C. glutamicum*-Genomprojekt wurden dazu die Primer orf81-1a und orf81-2 (siehe Anhang 2.2) ausgewählt. Das vollständige Gen wurde dann zusammen mit ca. 300 bp stromaufwärts und ca. 150 bp stromabwärts liegenden DNA-Bereichen mittels PCR aus dem Wildtyp ATCC13032 amplifiziert. Dabei wurde ein ca. 1,5 kb großes PCR-Fragment isoliert und zur Überexpression in den mit *ScaI* linearisierten *E. coli*-*C. glutamicum*-Pendelvektor pZ1 (Menkel *et al.*, 1989) kloniert. *C. glutamicum* ATCC13032 wurde dann durch Elektroporation mit dem resultierenden Plasmid pZ1orf81 transformiert, so daß der Stamm *C. glutamicum* ATCC13032pZ1orf81 (Überexprimierer) erhalten wurde. Zur Konstruktion einer Inaktivierungsmutante von orf81 wurde ein internes Fragment von orf81 in einer PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA vom Wildtyp ATCC13032 als Matrize und den Primern orf81-3 und orf81-4 (siehe Anhang 2.2) amplifiziert. Das erhaltene 368 bp große PCR-Fragment wurde in den mit *SmaI* linearisierten Inaktivierungsvektor pK18mob (Schäfer *et al.*, 1994b) ligiert und das resultierende Plasmid pK18mob'orf81' durch Elektroporation in *C. glutamicum* ATCC13032 eingebracht. Da der

Vektor pK18*mob'*orf81' in *C. glutamicum* nicht frei replizierbar ist, erfolgte eine Integration in das Chromosom von *C. glutamicum* durch homologe Rekombination des klonierten internen orf81-Fragments. Diese Integration führte zur Unterbrechung von orf81. In dem auf diese Weise erhaltenen Stamm ATCC13032orf81::pK18*mob'*orf81' wurde der korrekte Integrationsort des Plasmids durch PCR nachgewiesen (Ergebnis nicht gezeigt). Ein Einfluß von orf81 bzw. dessen Genprodukt, auf den Threoninexport in *C. glutamicum* konnte nun mit den konstruierten Stämmen (Inaktivierungsmutante und Überexprimierer von orf81) untersucht werden. Dazu wurden diese Stämme im folgenden im Vergleich zum Wildtyp hinsichtlich ihres Wachstums in Anwesenheit von threoninhaltigen Peptiden und in Hinblick auf die Threoninexportraten charakterisiert.

4.2 Untersuchungen zur Beteiligung des orf81-Genprodukts am Threoninexport

Mit den in 4.1 beschriebenen Stämmen sollte zunächst überprüft werden, ob bei gezielter Inaktivierung von orf81 ein verzögertes Wachstum bei Anwesenheit von Threonintri-peptid auftritt, so wie es in der Transposonmutante 81 der Fall war. Außerdem sollte durch Bestimmung der Effluxraten für Threonin untersucht werden, ob das orf81-Genprodukt am aktiven Threoninexport beteiligt ist.

Zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens wurden der Überexprimierer *C. glutamicum* ATCC13032pZ1orf81, die Inaktivierungsmutante ATCC13032orf81::pK18*mob'*orf81' und der Kontrollstamm ATCC13032pZ1 in CGXII-Minimalmedium mit und ohne Zusatz von 2 mM Threonintri-peptid kultiviert und das Wachstum verfolgt. Wie in Abbildung 18 zu sehen ist, wuchsen alle drei Stämme in CGXII-Medium ohne Tripeptid identisch. Bei Anwesenheit von Thr-Thr-Thr zeigte die Inaktivierungsmutante ATCC13032orf81::pK18*mob'*orf81' jedoch ein leicht verzögertes Wachstum im Vergleich zum Kontrollstamm ATCC13032pZ1. Der gleiche Phänotyp war auch bei der Transposonmutante 81 beobachtet worden. Es konnte also verifiziert werden, daß die Threoninpeptidsensitivität in dieser Transposonmutante auf die Integration von Tn5531 in den orf81 zurückzuführen war. Der Überexprimierer ATCC13032pZ1orf81 wuchs bei Tripeptidzugabe nur geringfügig besser als der Kontrollstamm. Wäre das orf81-Genprodukt direkt an dem Export von Threonin beteiligt, so würde man bei Überexpression des Gens eigentlich eine deutlich verminderte Sensitivität gegenüber Thr-Thr-Thr erwarten, weil akkumuliertes Threonin effektiver aus der Zelle transportiert wird.

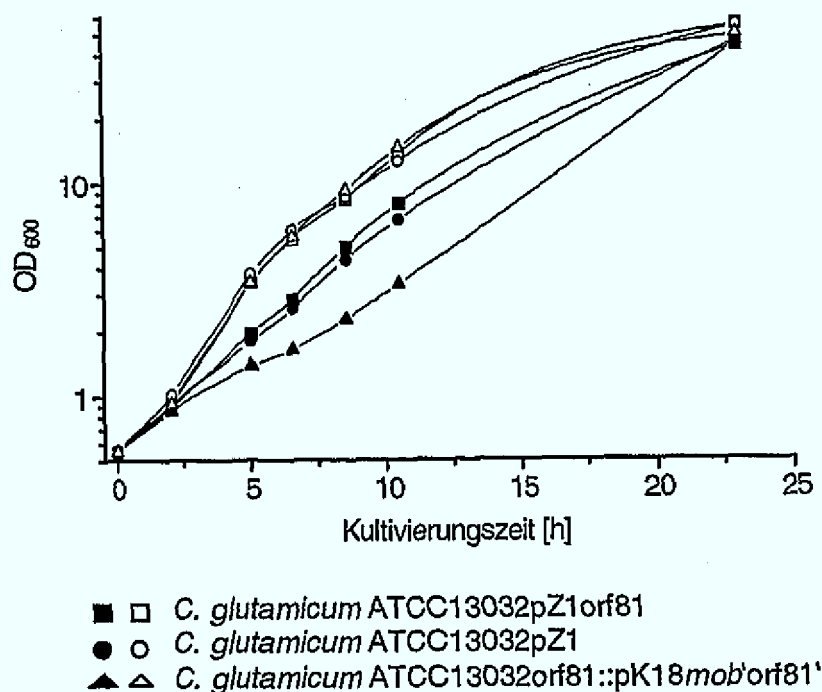


Abb. 18: Wachstum von *C. glutamicum* ATCC13032pZ1orf81, ATCC13032pZ1 und ATCC13032orf81::pK18mob'orf81' in CGXII-Minimalmedium ohne (offene Symbole) und mit (geschlossene Symbole) 2 mM Thr-Thr-Thr. Dargestellt ist das Wachstum (OD_{600}) in logarithmischer Auftragung in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer.

Es wurde weiterhin überprüft, ob das verzögerte Wachstum der *orf81*-Inaktivierungsmutante in Anwesenheit von Threonintriptid spezifisch für dieses threoninhaltige Peptid ist, oder ob die Wachstumsverzögerung auch bei anderen Peptiden auftritt. Dazu wurde die Inaktivierungsmutante ATCC13032orf81::pK18mob'orf81' in CGXII-Minimalmedium mit 2 mM Arginylalanin oder 3 mM Isoleucyl-isoleucin über einen Zeitraum von 32 h kultiviert und das Wachstum im Vergleich zum Kontrollstamm ATCC13032pZ1 verfolgt. Dabei zeigte es sich, daß der Stamm ATCC13032orf81::pK18mob'orf81' bei Anwesenheit dieser Peptide im Vergleich zur Kontrolle kein verzögertes Wachstum aufwies. Der bei Thr-Thr-Thr beobachtete Wachstumsdefekt war also offensichtlich spezifisch für threoninhaltige Peptide.

Durch Messung der Threonineffluxraten sollte daher für die Stämme mit unterschiedlicher *orf81*-Expression eine Beteiligung des *orf81*-Genprodukts am Threoninexport untersucht werden. Zur Bestimmung dieser Effluxraten wurden der Überexprimierer *C. glutamicum* ATCC13032pZ1orf81, die Inaktivierungsmutante ATCC13032orf81::pK18mob'orf81' und der Kontrollstamm ATCC13032pZ1 zunächst für zwei Stunden in CGXII-Medium mit 1 mM Thr-Thr-Thr kultiviert, so daß eine Beladung der Zellen mit Threonin erfolgen konnte.

Die Zunahme der extrazellulären Threoninkonzentrationen wurde dann in CGXII-Medium mit Threonintriptid über einen Zeitraum von 120 Minuten verfolgt (Abb. 19). Bei allen drei Stämmen war der Anstieg der externen Threoninkonzentration über den gesamten Zeitraum linear, so daß eine Auswertung durch Anlegen einer Ausgleichsgeraden durch alle Meßpunkte möglich war. Die Steigungen dieser Ausgleichsgeraden unterschieden sich bei den drei Stämmen kaum. Unter Berücksichtigung der eingesetzten Zellmengen wurden daraus die Threoninexportraten berechnet (Tab. 9). Sowohl bei Überexpression als auch bei Inaktivierung von orf81 wurde ein leicht erhöhter Threoninefflux gemessen. Wäre das orf81-Genprodukt am Threoninexport beteiligt, so sollte die Exportrate bei Inaktivierung des Gens jedoch geringer sein als bei der Kontrolle. Außerdem müßte eine Inaktivierungsmutante in diesem Fall intrazellulär mehr Threonin anreichern als der Kontrollstamm. Die Messung der internen Threoninkonzentrationen während dieser Kurzzeitfermentation zeigte jedoch, daß alle drei Stämme intrazellulär etwa gleich viel Threonin (250 mM) akkumulierten.

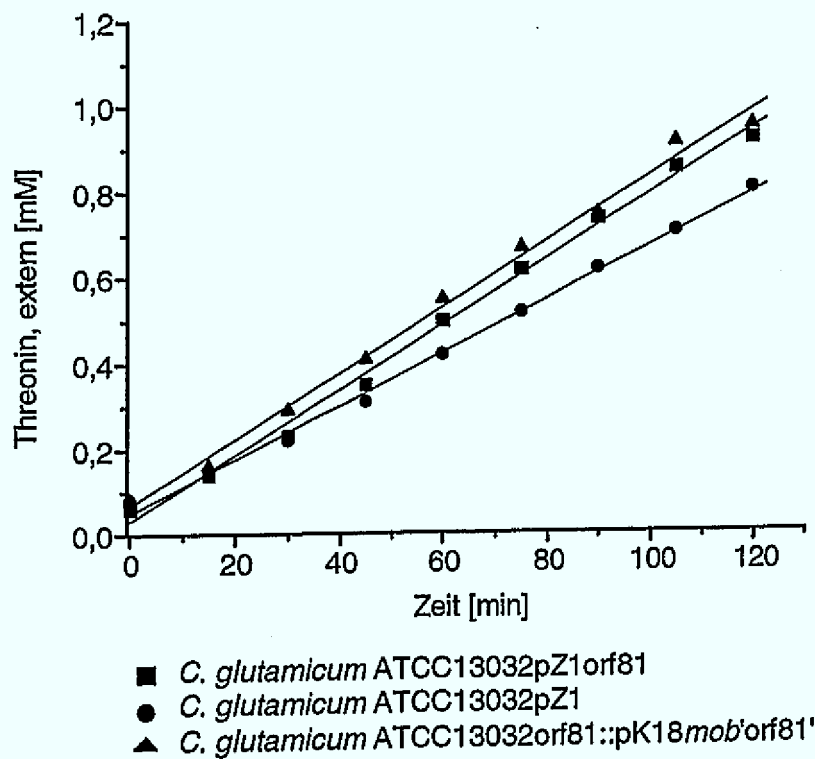


Abb. 19: Extrazelluläre Threoninkonzentrationen bei *C. glutamicum* ATCC13032pZ1orf81, ATCC13032pZ1 und ATCC13032orf81::pK18mob'orf81'. Dargestellt ist die extrazelluläre Threoninkonzentration in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

<i>C. glutamicum</i> -Stamm	Threoninexportrate [nmolx(minxmg TG) ⁻¹]
ATCC13032pZ1orf81	3,0
ATCC13032pZ1	2,4
ATCC13032orf81::pK18mob'orf81'	3,5

Tab. 9: Threoninexportraten bei *C. glutamicum* ATCC13032pZ1orf81, ATCC13032pZ1 und ATCC13032orf81::pK18mob'orf81'. Die Raten wurden aus den Steigungen der in Abb. 19 gezeigten Ausgleichsgeraden berechnet.

Die Bestimmung der Threoninexportraten zeigt also, daß eine Beteiligung des orf81-Genprodukts am Threoninexport auszuschließen ist, obwohl die orf81-Inaktivierungsmutante einen spezifisch bei Threonintripeptid auftretenden Wachstumsdefekt aufweist. Da auch die Sequenzdaten zu orf81 keine Hinweise auf eine mögliche Funktion von orf81 zulassen, bleibt die Funktion dieses offenen Leserahmens in *C. glutamicum* ungeklärt.

5. Klonierung und Charakterisierung des Gens für den Threoninexportcarrier *thrE* (orf53)

Wie in den folgenden Abschnitten gezeigt wird, handelt es sich bei dem identifizierten orf53 um das gesuchte Gen für den Threoninexportcarrier aus *C. glutamicum*. Dieses Gen wird daher im folgenden mit *thrE* (für *threonine export*) bezeichnet.

5.1 Isolierung von *thrE* aus *C. glutamicum* ATCC13032 und Konstruktion von Mutanten

Um Untersuchungen zur Funktion des von *thrE* kodierten Proteins in *C. glutamicum* durchführen zu können, mußte *thrE* zunächst mittels PCR aus *C. glutamicum* ATCC13032 isoliert werden. Im folgenden sollte dann eine *thrE*-Inaktivierungsmutante und ein *thrE*-Überexprimierer von ATCC13032 konstruiert werden.

Durch die Klonierung und Sequenzierung des Insertionsortes von Tn5531 in der Transposonmutante 53 war die Sequenz der stromaufwärts und stromabwärts von Tn5531 liegenden DNA-Bereiche in dieser Mutante bekannt. Anhand dieser Sequenzinformation aus *C. glutamicum* ATCC14752 wurden die Primer *thrE-forward* und *thrE-reverse* (siehe Anhang 2.2) ausgewählt. In einer PCR-Reaktion wurde mit diesen Primern und chromosomaler DNA des Wildtyps ATCC13032 als Matrize das vollständige *thrE*-Gen zusammen mit ca. 200 bp stromaufwärts und ca. 100 bp stromabwärts liegenden DNA-Bereichen amplifiziert. Das isolierte ca. 1,9 kb große PCR-Fragment (siehe Abb. 20) wurde in den mit *Sma*I linearisierten Klonierungsvektor pUC18 ligiert. Das klonierte Insert des resultierenden Plasmids pUC18*thrE* wurde mittels *Primer-Walking* vollständig doppelsträngig sequenziert (siehe Anhang 1). Ein Vergleich der so erhaltenen *thrE*-Sequenz aus *C. glutamicum* ATCC13032 mit der *thrE*-Sequenz aus ATCC14752 zeigte, daß sich die Gene beider Stämme an 18 Positionen unterscheiden. Diese Nukleotidaustausche führen aber in keinem Fall zu einem Aminosäureaustausch in den abgeleiteten Peptidsequenzen. Zur Überexpression wurde *thrE* als 1,9 kb großes *Sac*I/*Xba*I-Fragment aus dem Vektor pUC18*thrE* isoliert. Die 5'- und 3'-überstehenden Enden dieses Fragments wurden durch Klenow-Behandlung geglättet und dann in den mit *Sca*I linearisierten *E. coli*-*C. glutamicum*-Pendelvektor pZ1 (Menkel *et al.*, 1989) kloniert. Das so entstandene Plasmid pZ1*thrE* wurde durch Elektroporation in den Wildtyp ATCC13032 eingebracht, so daß, wie im folgenden gezeigt wird, der Überexprimierer *C. glutamicum* ATCC13032pZ1*thrE* erhalten wurde. Um eine Inaktivierungsmutante

von *thrE* zu konstruieren, wurde aus dem Plasmid pUC18*thrE* durch Restriktion mit *Clal* und *EcoRV* ein internes, 411 bp großes Fragment von *thrE* isoliert (siehe Abb. 20). Dieses DNA-Fragment wurde nach Klenow-Behandlung in den mit *SmaI* linearisierten Inaktivierungsvektor pK18*mob* (Schäfer *et al.*, 1994b) ligiert. Mit dem resultierenden Plasmid pK18*mob'thrE* wurde *C. glutamicum* ATCC13032 durch Elektroporation transformiert. Durch homologe Rekombination des klonierten, internen *thrE*-Fragments konnte der Vektor in das Chromosom von *C. glutamicum* integrieren und führte so zur Inaktivierung von *thrE*. Der korrekte Integrationsort des Plasmids wurde in dem auf diese Weise erhaltenen Stamm ATCC13032*thrE::pK18mob'thrE* durch PCR nachgewiesen. Die erhaltene Nukleotidsequenz von *thrE* stand nun für eine genaue Sequenzanalyse des Gens und des daraus abgeleiteten Proteins zur Verfügung. Mit den konstruierten Stämmen (Inaktivierungsmutante und Überexprimierer von *thrE*) konnten außerdem Untersuchungen zur Funktion des durch *thrE* kodierten Proteins durchgeführt werden. Dazu wurden diese Stämme im Vergleich zum Wildtyp hinsichtlich ihres Wachstums in Anwesenheit von threoninhaltigen Peptiden und in Hinblick auf die Threoninexportraten charakterisiert.

5.2 Sequenzanalyse von *thrE* und benachbarten Genen

Durch das *C. glutamicum*-Genomprojekt der Degussa-Hüls AG standen neben der Nukleotidsequenz des *thrE*-enthaltenen Inserts von pUC18*thrE* (siehe 5.1) auch Sequenzinformationen über die angrenzenden DNA-Bereiche im Chromosom von *C. glutamicum* ATCC13032 zur Verfügung. Abbildung 20 zeigt das *thrE*-Gen mit den benachbarten DNA-Bereichen (je ca. 1 kb stromaufwärts und stromabwärts) im Genom von *C. glutamicum* ATCC13032. Auf dem dargestellten 3,3 kb großen DNA-Fragment konnten drei offene Leserahmen identifiziert werden. Der mittlere orf -*thrE*- ist 1467 bp groß und kodiert, wie in Abschnitt 5.3 gezeigt wird, für den Threoninexportcarrier von *C. glutamicum* (Sequenz: siehe Anhang 1). In der ursprünglich isolierten Transposonmutante 53 war das Transposon Tn5531 243 bp stromabwärts des wahrscheinlichen Startcodons von *thrE* inseriert gewesen und hatte so zur Inaktivierung von *thrE* in dieser Mutante geführt. Das *thrE*-Gen kodiert für ein Protein aus 489 Aminosäuren (M_r 51697). Ein Datenbankvergleich des aus *thrE* abgeleiteten Polypeptids ergab, daß das *thrE*-Genprodukt keinerlei Ähnlichkeit zu Proteinen bekannter Funktion besitzt. Es gibt lediglich zwei Proteine unbekannter Funktion, die signifikante Ähnlichkeit zu dem Polypeptid ThrE aufweisen. Die höchste Sequenzidentität mit 29,6% identischen Aminosäuren besteht zu dem hypothetischen Protein Rv3737 aus *Mycobacterium tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998). Bei diesem Protein handelt es sich um ein putatives Membranprotein aus 529 Aminosäuren.

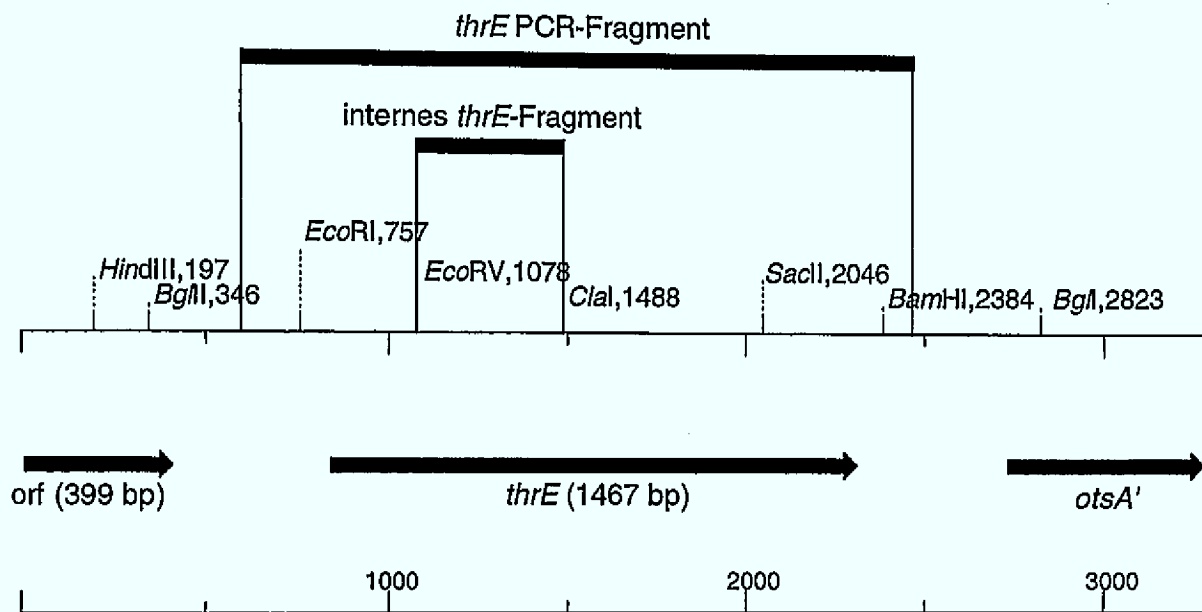


Abb. 20: Restriktionskarte eines 3,3 kb großen Fragments aus dem Chromosom von *C. glutamicum* ATCC13032 mit dem *thrE*-Genlocus und den benachbarten offenen Leserahmen. Gezeigt sind außerdem die Fragmente, die zur Klonierung von *thrE* und zur Konstruktion einer *thrE*-Inaktivierungsmutante verwendet wurden.

Weiterhin gibt es ein zu ThrE ähnliches Protein (22,0% identische Aminosäuren) aus *Streptomyces coelicolor* (Redenbach *et al.*, 1996). Auch bei diesem Protein aus 578 Aminosäuren handelt es sich möglicherweise um ein Membranprotein. Die hydrophoben Bereiche in diesem Protein befinden sich dabei in der C-terminalen Hälfte des Proteins, während der N-Terminus eher hydrophil ist. In Abbildung 21 ist der Sequenzvergleich des ThrE-Proteins aus *C. glutamicum* mit den hypothetischen Proteinen aus *M. tuberculosis* und *S. coelicolor* gezeigt. Bei dem von *thrE* kodierten Polypeptid handelt es sich um ein sehr hydrophobes Protein, 46% der vorhandenen Aminosäuren besitzen hydrophobe Reste. Eine Hydrophobizitätsanalyse nach dem Algorithmus von Kyte und Doolittle (1982) mit einem Fenster von 13 Aminosäuren zeigte, daß sich im zentralen Bereich der Aminosäuren 140 bis 440 ausgedehnte hydrophobe Regionen befinden (Abb. 22). Mit Hilfe des Sekundärstrukturvorhersage-Programms PHD.htm Neuronal Net (Rost *et al.*, 1995) wurden für ThrE die in Abbildung 22 markierten neun transmembranen Bereiche ermittelt, wenn für die Vorhersage der Sekundärstruktur der in Abbildung 21 gezeigte Sequenzvergleich von ThrE, Rv3737 und dem Protein aus *S. coelicolor* verwendet wurde. In einem N-terminalen Bereich von etwa 160 Aminosäuren des ThrE-Proteins befinden sich nach dieser Vorhersage keine transmembranen Bereiche. Auffällig ist weiterhin, daß der C-Terminus des Proteins sehr hydrophil ist.

ThrE	1	-----MLESFAT
Rv3737	1	-----MDQDRSDNTA
<i>S. coeli</i>	61	TESETTSEFSLPDGLEVPQAPPADTEGSAFTMPSTHSAWTAPTFTPTASGFPVAVSLMDVP
ThrE	7	LRGRISTYDAKAAPPSP---LAPIDLTGHSQVAGVNLAAFIGDILLSSGTSNSDTKV
Rv3737	11	LRRGRIALRGRRDPLFVAGRRSRTSGGIDOLHTRVLDLITRLAEVLLSSGSGTADVVA
<i>S. coeli</i>	121	WQDRMRAMLMPVNERPAP-EPSQKHDDTGPVPRVLDLITRIGELLACGEGAEDVEA
ThrE	64	QVRVTSAYGLYTHVDITNNTITFHNIGVERKDPVNVFHVVGILDITNESKLSVDRLI
Rv3737	71	TAQDVAAQQLTDCVVDITVTHI-ITSSALHTDTPPVITMRSVETRSDYSRRLAELDRLV
<i>S. coeli</i>	180	AMPFAVCRSYGLDRCEPNVTFLL-SISYQPSLVEDPVTASRIVERRGTDYIRLAAVFHLV
ThrE	124	RSIQAG--ATPPEVAEKILDELEQSPASVGFVVALGCMAMMCGAVAVLLGGGWQVSYIAF
Rv3737	130	QRITSG--GVAVDOAHEAMDELTERPHYPRTWATACAGFALGVAMLLGGTWLTCVIAA
<i>S. coeli</i>	239	DDLEDPDTNTSIEFAYRRLAEIRNRHPYPTWVLTWASGLIAGGASHLVGGGLTVFFAAM
ThrE	182	HTAFTILATTSFLCKKGLPTFFQNVGGEIATILPASLAYSHALQFGLKPKSQILLASGIV
Rv3737	188	VTSGVIDRLGRLLNRIGTPLFFQVFGAGIATLVAVAYTHAGQD-----PIALVATGIV
<i>S. coeli</i>	299	FGSMIGORLAWLCAGRGLPKQCFVAAAMPAPMGVVLTVTHVDVK----ASAVITGGLF
ThrE	242	VLLAGITLVQSIQDGHGAPVTASARFFETLFTGCTVAGVGLGHO---LSEITHVMPLP
Rv3737	243	VLLSGMITLVGSMQDAVTCMMPTALARLGDALFLTAGIVVGHLLSRGVTNAGHOLEHVD
<i>S. coeli</i>	355	ALLPGRALVAGVQDGTGCVTTAAARILLEVMYFVSIVAGVLVLY---FGVOLGAELN
ThrE	298	AMESAAAPNYSSTFARIAGG-VTAAAFVAGCYAEWSVVTAGLIALMGSAFYV--LEFVV
Rv3737	303	ATTILATPGMPLPILVAVSGAALSGVCLTIASVAPLRVATAGLSAGIAELVLIG-LGAA
<i>S. coeli</i>	411	PDAKLGTDGP---FVQLFASMLLSLAFATLLQOERATVIAVTLNGGTAWCVYGAMNYAG
ThrE	355	YIGPVSAALAAATAVGFTGCLLARRFLTPPLIVATAGITPMLPGLATVRCMYAT-LNDQT
Rv3737	362	GFCRVVATWTAALGVGFLATLDSIRROAPALVTATAGITPMLPGLAVERAVFAFVNDTP
<i>S. coeli</i>	468	DISPVASTAAAAGLVGLFGQLMSRYFASALPYTTAATGPMLPGSATYFGLLGI-AGEV
ThrE	414	LMGFINTAVANATASSLAAGVVLGENTARRLR-----PP--RFNPYRAFTK
Rv3737	422	DGGLTQLLEAAATAMALGSGVVLGEFTASPLRYGAGRIGDLFRIEGPPGLRAVGRVRL
<i>S. coeli</i>	527	DSGLLSLSNAVALAMATAIGVNLGGETSRFLK-----VP---
ThrE	459	ANEFSSFOEAE--QNORRQRKPKTNORFGN-KR-----
Rv3737	482	QPAKSOOPTGTGCGQRWRSVALEPTTADDVDAGYRGDWPATCTSATEVR
<i>S. coeli</i>	562	-----GAASAAGRRAAKRTGTF-----

Abb. 21: Homologievergleich von ThrE aus *C. glutamicum* ATCC13032 (1. Zeile) mit den Sequenzen des Proteins Rv3737 aus *M. tuberculosis* und einem putativen Protein aus *S. coelicolor* unter Verwendung des Multiple Sequence Alignment Programms ClustalW 1.8 (Jeanmougin *et al.*, 1998) (schwarz: identisch AS, grau: ähnliche AS). Die Lage der nach Rost *et al.* (1995) ermittelten transmembranen Bereiche in ThrE ist markiert (*).

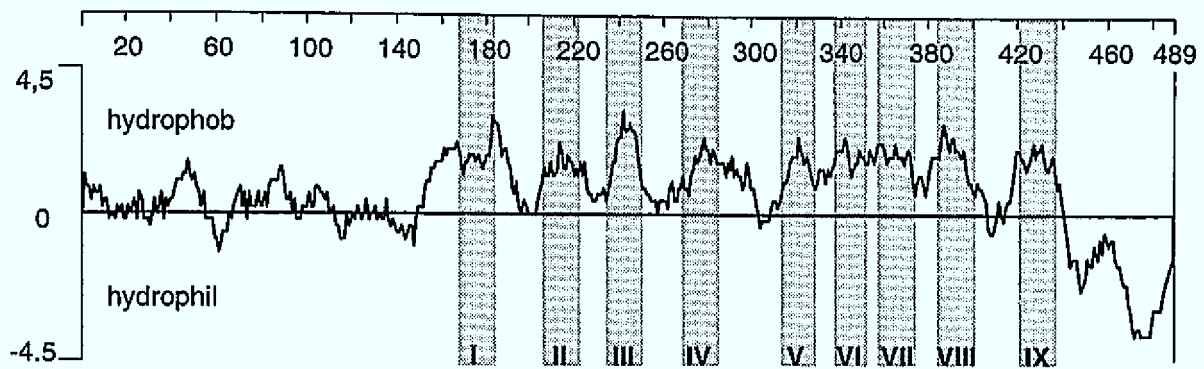


Abb. 22: Hydrophobizitätsanalyse für ThrE nach Kyte und Doolittle (1982) mit einem Fenster von 13 Aminosäuren. Aufgetragen ist die durchschnittliche lokale Hydrophobizität auf der vertikalen Achse für den jeweilige Aminosäurerest auf der horizontalen Achse. Die Lage der mit Hilfe des Sekundärstrukturvorhersage-Programms PHD.htm *Neuronal Net* (Rost *et al.*, 1995) vorhergesagten neun transmembranen Bereiche ist durch die grauen Balken markiert.

Das durch *thrE* kodierte Protein aus *C. glutamicum* besitzt also auf Ebene der Primärstruktur keine Ähnlichkeit zu bekannten Transportproteinen. Auch zu dem einzigen bisher bekannten funktionell charakterisierten Aminosäureexporter, dem Lysinexportcarrier LysE aus *C. glutamicum* (Vrlić *et al.*, 1996), ist keinerlei Ähnlichkeit feststellbar. Aufgrund der vorhergesagten Sekundärstruktur ist ebenfalls keine Zuordnung zu einer bekannten Transporterfamilie möglich (Saier, 2000; <http://www.biology.ucsd.edu/~jpaulsen/transport/index.html>). Der Threoninexportcarrier ThrE repräsentiert also offensichtlich das erste Mitglied einer neuen Transporterfamilie.

Benachbart zu *thrE* befindet sich stromaufwärts in einem Abstand von 429 bp ein zweiter vollständiger, 399 bp umfassender offener Leserahmen in gleicher Orientierung (siehe Abb. 20). Datenbankanalysen mit dem aus diesem orf abgeleiteten Polypeptid, bestehend aus 133 Aminosäuren (M_r 15492), zeigten, daß es nur schwache Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen in der Datenbank gibt. Die beste Übereinstimmung ergab sich mit 19,5% identischen Aminosäuren zu dem hypothetischen Transkriptionsregulator MTH1328 aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Smith *et al.*, 1997). Dieses putative Protein besteht aus nur 69 Aminosäuren und besitzt ein mögliches Helix-Turn-Helix Motiv (HTH-Motiv), was ein charakteristisches Merkmal DNA-bindender Proteine ist (Brennan und Matthews, 1989). Desweiteren gibt es in *Mycobacterium tuberculosis* ein mit 18,1% identischen Aminosäuren ähnliches Protein Rv0474 (Cole *et al.*, 1998). Bei diesem hypothetischen Protein (140 AS) handelt es sich möglicherweise ebenfalls um ein Regulatorprotein, da es Sequenzähnlichkeiten (30,6% Identität) zu dem Transkriptionsregulator SinR aus *Bacillus subtilis* (Gaur

et al., 1991; Mandic-Mulec *et al.*, 1995) aufweist und ebenfalls ein HTH-Motiv besitzt. Mittels des Programms PHD.sec (Rost und Sander, 1993, 1994), einem Sekundärstrukturvorhersage-Programm für cytoplasmatische Proteine, konnte in der abgeleiteten Aminosäuresequenz des offenen Leserahmens aus *C. glutamicum* ebenfalls ein HTH-Motiv im N-terminalen Bereich der Sequenz (AS 10 bis 43) ermittelt werden. Möglicherweise kodiert dieses Gen in *C. glutamicum* also auch für ein Protein mit regulatorischer Funktion. Stromabwärts von *thrE* befindet sich in einem Abstand von 422 bp ein dritter, unvollständiger orf (Abb. 20). Datenbankvergleiche zeigten, daß die abgeleitete Aminosäuresequenz dieses orfs große Sequenzähnlichkeit (63% Identität) zum N-terminalen Bereich der Trehalose-6-phosphat Synthase (OtsA) aus *M. tuberculosis* (De Smet *et al.*, 2000) und zu zahlreichen weiteren Trehalose-6-phosphat Synthasen aus verschiedenen Organismen aufweist. Somit handelt es sich hier höchstwahrscheinlich um das 5'-terminale Ende des *otsA*-Gens aus *C. glutamicum*.

5.3 Untersuchungen zur Funktion des durch *thrE* kodierten Proteins

Mit Hilfe der unter 5.1 beschriebenen Stämme konnten nun Untersuchungen zur Funktion des durch *thrE* kodierten Proteins durchgeführt werden. Zunächst wurde überprüft, ob das bei der ursprünglichen Transposonmutante 53 beobachtete verzögerte Wachstum in Anwesenheit von Threonintripeptid auch bei gezielter Inaktivierung von *thrE* auftrat. Außerdem wurde die Funktion des durch *thrE* kodierten Proteins als Threoninexportcarrier durch Messung der Threonineffluxraten gezeigt.

Um das Wachstumsverhalten zu untersuchen, wurden der Überexprimierer *C. glutamicum* ATCC13032pZ1*thrE*, die Inaktivierungsmutante ATCC13032*thrE*::pK18*mob'thrE* und der Kontrollstamm ATCC13032pZ1 in CGXII-Medium mit und ohne Zusatz von 2 mM Threonintripeptid kultiviert und das Wachstum über 48 h verfolgt (Abb. 23). Alle drei Stämme wuchsen in CGXII-Medium ohne Tripeptid identisch. Bei Anwesenheit von Thr-Thr-Thr zeigten die Stämme jedoch ein unterschiedliches Wachstum. Die Inaktivierungsmutante ATCC13032*thrE*::pK18*mob'thrE* wuchs im Vergleich zum Kontrollstamm deutlich verzögert. Dieses Wachstum entsprach dem Phänotyp, der auch bei der Transposonmutante 53 beobachtet worden war. Es konnte also verifiziert werden, daß die Peptidsensitivität in dieser Transposonmutante auf die Integration von Tn5531 in das *thrE*-Gen zurückzuführen war. Der Überexprimierer ATCC13032pZ1*thrE* wuchs bei Tripeptidzugabe deutlich besser als der Kontrollstamm. Dies war ein Hinweis dafür, daß *thrE* den Threoninexportcarrier kodiert. Die Überexpression des Threoninexportergens *thrE* sollte einen effektiveren Transport von Threonin und damit auch eine geringere Akkumulation von Threonin zur Folge haben.

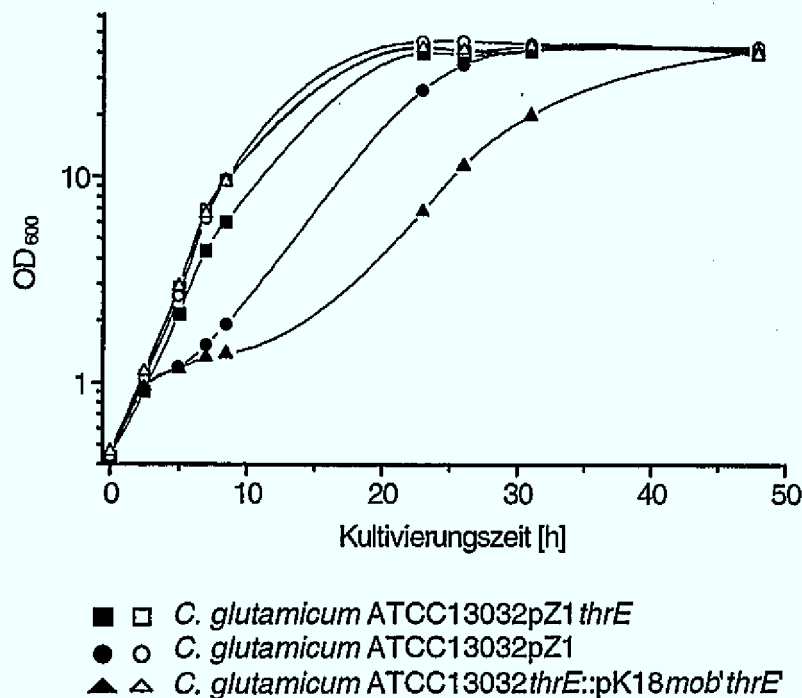


Abb. 23: Wachstum von *C. glutamicum* ATCC13032pZ1*thrE*, ATCC13032pZ1 und ATCC13032*thrE*::pK18mob'*thrE* in CGXII-Minimalmedium ohne (offene Symbole) und mit (geschlossene Symbole) 2 mM Thr-Thr-Thr. Dargestellt ist das Wachstum (OD_{600}) in logarithmischer Auftragung in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer.

Zum Nachweis, daß der beobachtete Wachstumsdefekt der *thrE*-Inaktivierungsmutante spezifisch bei threoninhaltigen Peptiden auftritt, wurde das Wachstum des Kontrollstamms ATCC13032pZ1 und der Inaktivierungsmutante ATCC13032*thrE*::pK18mob'*thrE* bei Zugabe verschiedener Peptide untersucht. Beide Stämme wurden in CGXII-Medium mit 2 mM Arginyl-alanin oder 3 mM Isoleucyl-isoleucin kultiviert und Wachstumskurven aufgenommen. Es zeigte sich, daß *C. glutamicum* ATCC13032*thrE*::pK18mob'*thrE* in Anwesenheit dieser Peptide genauso gut wachsen konnte wie der Kontrollstamm. Das verzögerte Wachstum bei *thrE*-Inaktivierung trat also spezifisch bei Threonintri-peptid auf.

Um die Funktion des durch *thrE* kodierten Proteins als Threoninexportcarrier zu zeigen, wurden die Threoninexportraten für die drei Stämme bestimmt. Dazu wurden der Überexprimerer *C. glutamicum* ATCC13032pZ1*thrE*, der Kontrollstamm ATCC13032pZ1 und die Inaktivierungsmutante ATCC13032*thrE*::pK18mob'*thrE* zunächst für zwei Stunden in CGXII-Minimalmedium mit 1 mM Threonintri-peptid kultiviert, um eine Beladung der Zellen mit Threonin zu ermöglichen. Die Messung der Threoninsekretion erfolgte dann in einer Kurzzeitfermentation (Abb. 24).

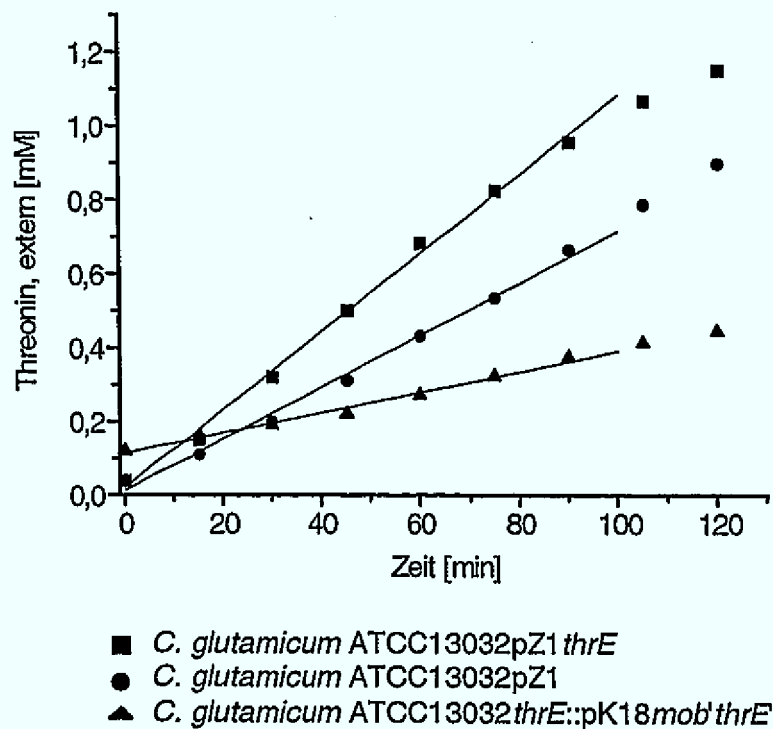


Abb. 24: Threoninsekretion bei *C. glutamicum* ATCC13032pZ1*thrE*, ATCC13032pZ1 und ATCC13032*thrE*::pK18*mob'thrE*. Dargestellt ist die extrazelluläre Threoninkonzentration in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

Bei allen drei Stämmen war der Anstieg der extrazellulären Threoninkonzentrationen über einen Zeitraum von mindestens 90 min linear. Die Auswertung erfolgte daher jeweils durch Anlegen einer Ausgleichsgeraden durch die ersten sieben Meßpunkte. Wie aus Abbildung 24 ersichtlich, ist die Steigung dieser Ausgleichsgeraden bei dem *thrE*-Überexprimierer deutlich steiler als bei dem Kontrollstamm. Bei der *thrE*-Inaktivierungsmutante hingegen verläuft die Ausgleichsgerade sehr viel flacher. Aus den Steigungen der Geraden wurden unter Berücksichtigung der eingesetzten Zellmengen die Exportraten für Threonin berechnet (Tab. 10).

<i>C. glutamicum</i> -Stamm	Threoninexportrate [nmol×(min×mg TG) ⁻¹]
ATCC13032pZ1 <i>thrE</i>	3,8
ATCC13032pZ1	2,5
ATCC13032 <i>thrE</i> ::pK18 <i>mob'thrE</i>	1,0

Tab. 10: Threoninexportraten bei *C. glutamicum* ATCC13032pZ1*thrE*, ATCC13032pZ1 und ATCC13032*thrE*::pK18*mob'thrE*. Die Raten wurden aus den Steigungen der in Abb. 24 gezeigten Ausgleichsgeraden berechnet.

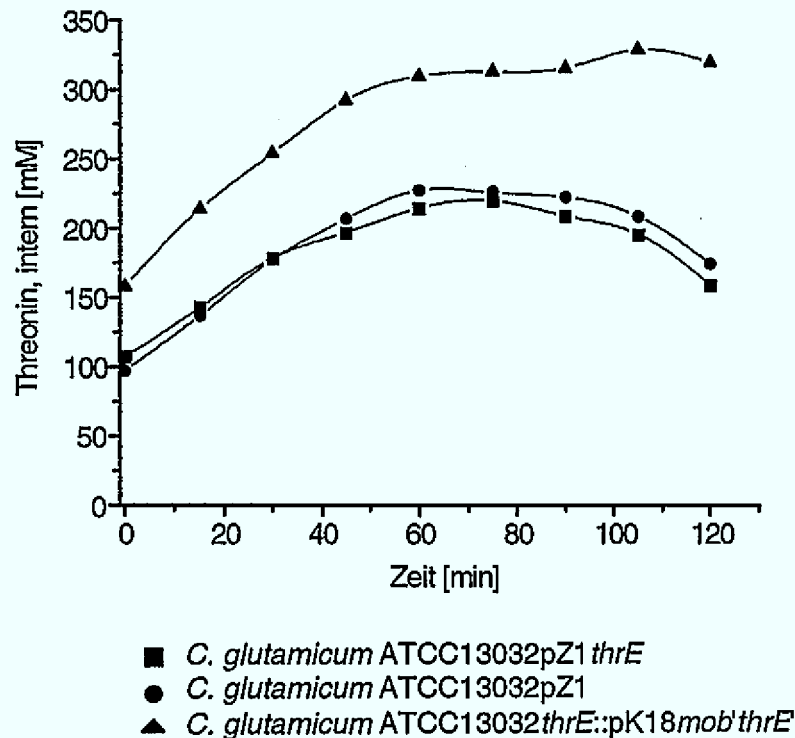


Abb. 25: Zellinterne Threoninakkumulation bei *C. glutamicum* ATCC13032pZ1*thrE*, ATCC13032pZ1 und ATCC13032*thrE*::pK18*mob'**thrE*. Dargestellt ist die intrazelluläre Threoninkonzentration in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

Parallel zu den extrazellulären wurden auch die zellinternen Threoninkonzentrationen zu jedem Meßpunkt dieser Kurzzeitfermentation bestimmt (Abb. 25). Dabei zeigte sich, daß bei dem Überexprimierer ATCC13032pZ1*thrE* die interne Threoninkonzentration mit bis zu 220 mM vergleichbar mit den Werten des Kontrollstamms ATCC13032pZ1 (max. 230 mM) war. Eigentlich wäre zu erwarten gewesen, daß die intrazelluläre Threoninakkumulation bei dem *thrE*-Überexprimierer aufgrund des verbesserten Threoninexports geringer ist als bei dem Kontrollstamm. Möglicherweise wird aber durch Überexpression von *thrE* auch die Aufnahme bzw. -hydrolyse von Threonintri-peptid beschleunigt, so daß die intrazelluläre Threoninkonzentration aus diesem Grund nur gering verändert war. Die Inaktivierungsmutante ATCC13032*thrE*::pK18*mob'**thrE* akkumulierte über den gesamten Zeitraum von zwei Stunden intrazellulär deutlich mehr (bis zu 330 mM) Threonin als der Kontrollstamm. Diese verstärkte Akkumulation ist auf den stark verlangsamten Efflux von Threonin bei Inaktivierung von *thrE* zurückzuführen.

Die veränderten Threoninexportraten in Stämmen mit unterschiedlicher Expression von *thrE* belegen also, daß es sich bei dem untersuchten Gen *thrE* um das Gen für den Threonin-exportcarrier aus *C. glutamicum* handelt. Bei der Inaktivierungsmutante war aber noch ein geringer Threoninefflux von $1,0 \text{ nmol} \times (\text{min} \times \text{mg TG})^{-1}$ meßbar. Es sollte daher im folgenden

geklärt werden, ob dieser verbleibende Efflux nur durch Diffusion zu erklären ist, oder ob es eventuell noch einen zweiten aktiven Exportmechanismus für Threonin in *C. glutamicum* gibt. Um zu untersuchen, ob der in der *thrE*-Inaktivierungsmutante vorhandene Efflux energieabhängig war, wurden in einer weiteren Kurzzeitfermentation die Threoninexportraten bei Zugabe von 20 μM Carbonylcyanid-*m*-chlorophenylhydrazon (CCCP) gemessen. CCCP bewirkt die Aufhebung des Membranpotentials, indem es, wie in Abbildung 26 dargestellt, Protonen durch die Cytoplasmamembran transportiert (Benz und McLaughlin, 1983). Da von Palmieri *et al.* (1996) gezeigt wurde, daß der Threoninexport in *C. glutamicum* abhängig vom Membranpotential ist, sollte ein bei Zugabe von CCCP verbleibender Efflux im wesentlichen auf Diffusion zurückzuführen sein.

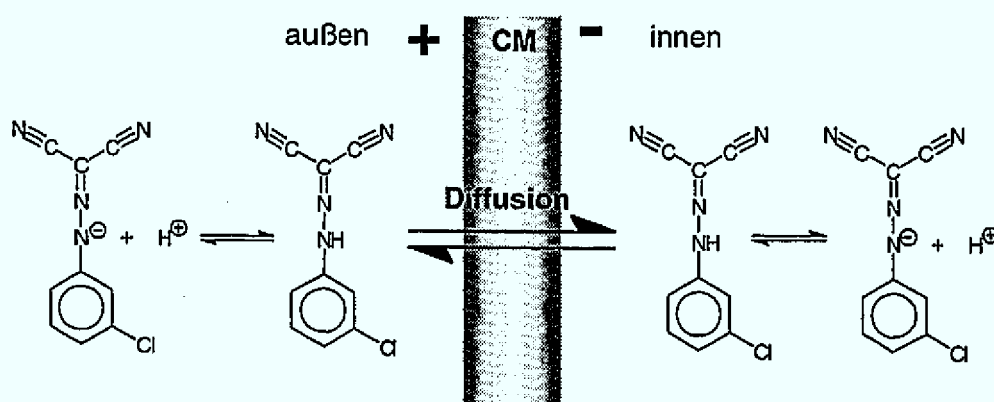


Abb. 26: Mechanismus der Wirkungsweise von Carbonylcyanid-*m*-chlorophenylhydrazon (CCCP), CM: Cytoplasmamembran.

Zur Bestimmung der Exportraten in Gegenwart von CCCP wurden der Wildtyp ATCC13032 und die Inaktivierungsmutante ATCC13023*thrE*::pK18*mob'thrE'* wiederum für zwei Stunden in CGXII-Minimalmedium mit 2 mM Threonin-Tripeptid inkubiert. Die Messung der Threoninsekretion wurde dann jeweils mit und ohne Zugabe von 20 μM CCCP über einen Zeitraum von 20 min durchgeführt. Wie aus Abbildung 27 ersichtlich, bewirkte die Zugabe von CCCP sowohl beim Wildtyp als auch bei der *thrE*-Inaktivierungsmutante einen verlangsamten Threoninefflux. Bei beiden Stämmen war der Anstieg der externen Threoninkonzentrationen über den gesamten Meßzeitraum linear, so daß die Auswertung durch Anlegen von Ausgleichsgeraden durch alle Meßpunkte erfolgte.

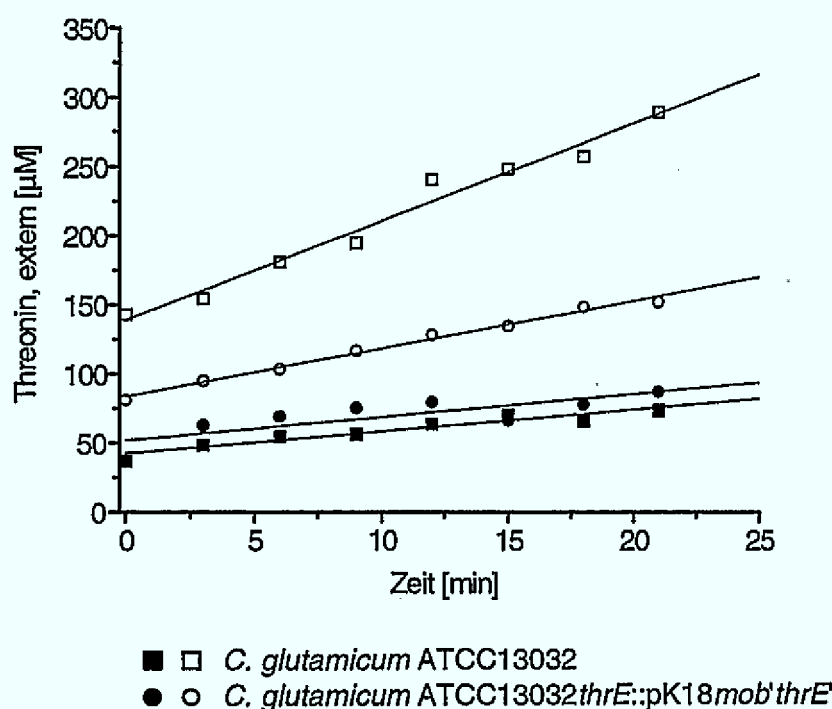


Abb. 27: Threoninsekretion bei *C. glutamicum* ATCC13032pZ1 und ATCC13032*thrE*::pK18*mob'thrE* ohne (offene Symbole) und mit (geschlossene Symbole) 20 µM CCCP. Dargestellt ist die externe Threoninkonzentration in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

Aus den Steigungen dieser Geraden wurden die Effluxraten bestimmt (Tab. 11). Dabei zeigte sich, daß der in der *thrE*-Inaktivierungsmutante gemessenen Efflux von Threonin offenbar nicht allein durch Diffusion bedingt war. Bei Zugabe von CCCP sanken die Exportraten sowohl beim Wildtyp als auch bei der Inaktivierungsmutante auf $0,6 \text{ nmol} \times (\text{min} \times \text{mg TG})^{-1}$. Es waren also nur etwa 50% des bei *C. glutamicum* ATCC13032*thrE*::pK18*mob'thrE* gemessenen Threoninefflux diffusionsbedingt.

<i>C. glutamicum</i> -Stamm	Threoninexportrate [nmol × (min × mg TG) ⁻¹]	
	ohne CCCP	20 µM CCCP
ATCC13032	2,9	0,6
ATCC13032 <i>thrE</i> ::pK18 <i>mob'thrE</i>	1,2	0,6

Tab. 11: Threoninexportraten bei *C. glutamicum* ATCC13032*thrE*::pK18*mob'thrE* und ATCC13032 mit und ohne CCCP-Zugabe. Die Raten wurden aus den Steigungen der in Abb. 27 gezeigten Ausgleichsgeraden berechnet.

Für den aktiven Threoninexport in der *thrE*-Inaktivierungsmutante sind im wesentlichen zwei Erklärungen möglich. Entweder gibt es neben dem ThrE-vermittelten Transport von Threonin noch einen weiteren energieabhängigen Exportmechanismus für Threonin in *C. glutamicum*, oder die *thrE*-Inaktivierungsmutante besitzt noch eine Restaktivität. Bei dem Stamm ATCC13032*thrE::pK18mob'thrE* ist das *thrE*-Gen lediglich durch Integration des Vektors pK18mob'*thrE*' 238 bp stromabwärts vom 5'-Ende des Gens unterbrochen, so daß es vorstellbar ist, daß ein verkürztes ThrE-Polypeptid mit einer Rest-Transporteraktivität gebildet wird. Um diesen zweiten Fall auszuschließen, wurde eine Deletionsmutante konstruiert, bei der das *thrE*-Gen im Chromosom fast vollständig deletiert ist. Zur Konstruktion eines Deletionsvektors wurde zunächst aus dem Plasmid pUC18*thrE* ein 968 bp großes, internes *SacII*/*EcoRV*-Fragment von *thrE* entfernt. Aus dem resultierenden Vektor pUC18Δ*thrE* wurde ein *SacI*/*XbaI*-Fragment isoliert, auf welchem das unvollständige *thrE*-Gen vorlag. Die 3'- und 5'-überstehenden Enden dieses Fragments wurden durch Klenow-Behandlung geglättet und dieses DNA-Fragment in den mit *SmaI* linearisierten Vektor pK19*mobsacB* (Schäfer *et al.*, 1994b) ligiert. Der so erhaltene Deletionsvektor pK19*mobsacB*Δ*thrE* wurde durch Elektroporation in *C. glutamicum* ATCC13032 eingebracht und die Deletion mit dem bei Schäfer *et al.* (1994b) beschriebenen System zum Genaustausch durchgeführt. Dabei wurden im ersten Schritt kanamycinresistente Klone erhalten, bei denen der Vektor pK19*mobsacB*Δ*thrE* durch eine homologe Rekombination im Genom integriert vorlag. Um auf ein zweites Rekombinationsereignis, d.h. auf die Excision des Vektors zu selektieren, wurden diese Klone auf Saccharose-haltigem Medium ausplattiert. Die Expression des im Deletionsvektor vorhandenen *sacB*-Gens ist bei Anwesenheit von Saccharose toxisch für *C. glutamicum* (Jäger *et al.*, 1992), so daß nur solche Klone wachsen konnten, die den Vektor durch ein zweites Rekombinationsereignis wieder verloren hatten. Bei diesem Schritt wurden insgesamt 41 Klone erhalten, die durch Excision des Vektors wieder kanamycinsensitiv geworden waren. Diese Klone wurden mittels PCR mit den *thrE*-flankierenden Primern *thrE-forward* und *thrE-reverse* (siehe Anhang 2.2) auf eine Deletion im *thrE*-Gen überprüft. Im Falle einer erfolgreichen Deletion sollte dabei ein 896 bp großes DNA-Fragment amplifiziert werden, im Fall der wiederhergestellten Wildtypsituation ein 1864 bp-Fragment. Bei 23 der überprüften Klone wurde bei der Amplifizierung ein etwa 900 bp großes DNA-Fragment erhalten, welches dem um 968 bp verkürzten *thrE*-Gen entsprach. In Abbildung 28 sind für zwei dieser Klone die durch PCR amplifizierten DNA-Fragmente gezeigt. Somit wurde die erfolgreiche Konstruktion des Stammes *C. glutamicum* ATCC13032Δ*thrE* belegt.

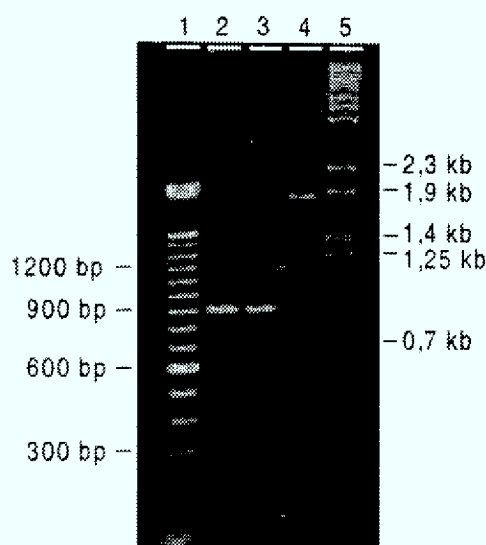


Abb. 28: Agarosegelfoto der durch PCR amplifizierten Fragmente aus chromosomaler DNA der Stämme *C. glutamicum* ATCC13032 Δ *thrE* und ATCC13032. Die unterschiedliche Größe der erhaltenen PCR-Produkte bestätigt die Deletion eines 968 bp *thrE*-Fragments in zwei Klonen von *C. glutamicum* ATCC13032 Δ *thrE*.

- Spur 1: Größenstandard (100 bp-Leiter, Gibco-BRL, Life Technologies, Eggenstein)
 Spur 2+3: amplifizierte DNA aus ATCC13032 Δ *thrE*
 Spur 4: amplifizierte DNA aus ATCC13032
 Spur 5: Größenstandard (λ -DNA, BstEII-geschnitten)

Mit der Deletionsmutante ATCC13032 Δ *thrE* und dem Wildtyp ATCC13032 wurden nun nochmals die Threoninexportraten bestimmt (Tab. 12). Die Messung der extrazellulären Threoninkonzentration über einen Zeitraum von 120 min und die Berechnung der Exportraten erfolgte dabei wie bereits für die *thrE*-Inaktivierungsmutante beschrieben. Die dabei für *C. glutamicum* ATCC13032 Δ *thrE* gemessene Effluxrate stimmte gut mit dem zuvor für ATCC13032*thrE*::pK18*mob*⁺*thrE* ermittelten Wert von $1,0 \text{ nmol} \times (\text{min} \times \text{mg TG})^{-1}$ überein. Aus diesem Grund konnte eine Rest-Transporteraktivität des verkürzten Threoninexportcarriers ThrE in der *thrE*-Inaktivierungsmutante ausgeschlossen werden.

<i>C. glutamicum</i> -Stamm	Threoninexportrate [nmol $\times$ (min $\times$ mg TG) ⁻¹]
ATCC13032	2,3
ATCC13032 Δ <i>thrE</i>	1,2

Tab. 12: Threoninexportraten bei der Deletionsmutante *C. glutamicum* ATCC13032 Δ *thrE* und beim Wildtyp ATCC13032.

Der bei Inaktivierung von *thrE* verbleibende Efflux von Threonin in *C. glutamicum* ist also zu etwa 50% durch Diffusion bedingt, der restliche Export von Threonin muß durch einen weiteren energieabhängigen Prozeß katalysiert werden. Es wäre beispielsweise denkbar, daß Threonin durch eine Nebenaktivität eines anderen Aminosäure-Exporters aus der Zelle transportiert werden kann.

5.4 Substratspezifität des Threoninexportcarriers

Für verschiedene Aminosäure-Transportsysteme ist bekannt, daß sie mehrere strukturell verwandte Substrate transportieren können. So exportiert z.B. der Lysinexportcarrier LysE aus *C. glutamicum* neben Lysin auch Arginin (Vrlić, pers. Mitteilung). Weiterhin wurde beschrieben, daß das Na⁺-gekoppelte Aufnahmesystem SstT aus *E. coli* (Okawa *et al.*, 1998) neben Serin auch Threonin transportiert. Es sollte daher untersucht werden, ob die in *C. glutamicum* beobachteten Effekte auf das Exportverhalten bei Überexpression bzw. Inaktivierung von *thrE* spezifisch für Threonin sind, oder ob auch andere Aminosäuren durch ThrE exportiert werden können.

Die Serinexportraten bei unterschiedlicher Expression von *thrE* wurden bestimmt. Dazu wurden der Überexprimerer *C. glutamicum* ATCC13032pZ1*thrE*, der Kontrollstamm ATCC13032pZ1 und die Inaktivierungsmutante ATCC13032*thrE::pK18mob'thrE* zunächst für zwei Stunden in CGXII-Minimalmedium mit 1 mM des serinhaltigen Peptids Ser-Ser-Ser inkubiert. Die Bestimmung des Serinefflux erfolgte dann in CGXII-Medium mit 1 mM Serin-tripeptid über einen Zeitraum von 120 min. Aus dem Anstieg der extrazellulären Serinkonzentration wurden unter Berücksichtigung der eingesetzten Zellmengen die in Tabelle 13 aufgeführten Exportraten für Serin berechnet. Die Überexpression von *thrE* bewirkte eine leichte Erhöhung der Exportrate, während der Serinefflux bei *thrE*-Inaktivierung deutlich verringert war. Es kann also davon ausgegangen werden, daß auch Serin von ThrE transportiert wird. Insgesamt waren die für Serin bestimmten Exportraten niedriger als für Threonin. Dies könnte eventuell bedeuten, daß ThrE für Serin eine geringere Affinität als für Threonin besitzt. Desweiteren wurden die Glycinexportraten bei unterschiedlicher Expression von *thrE* gemessen. Das bei der Messung der Threoninexportraten mit Thr-Thr-Thr akkumulierte Threonin wurde teilweise zu Glycin abgebaut und exkretiert. Bei diesem Experiment konnte also parallel die extrazelluläre Glycinkonzentration bestimmt werden. Aus der Zunahme dieser Glycinkonzentrationen bei den drei Stämmen wurden dann wiederum die in Tabelle 13 aufgeführten Exportraten für Glycin berechnet. Dabei zeigte sich, daß der Glycinefflux in *C. glutamicum* nicht durch die Überexpression bzw. Inaktivierung von *thrE*

beeinflusst wurde. Als weiteres Kontrollexperiment wurde auch der Lysinexport bei allen drei Stämmen untersucht. Hier zeigte sich ebenfalls, daß der Expressionsstatus von *thrE* keinen Einfluß auf den Lysinefflux hatte. Der Threoninexportcarrier ThrE aus *C. glutamicum* transportiert also neben Threonin auch die strukturell sehr ähnliche Aminosäure Serin, nicht aber Glycin und Lysin.

<i>C. glutamicum</i> -Stamm	Serinexportrate [nmolx(minxmg TG) ⁻¹]	Glycinexportrate [nmolx(minxmg TG) ⁻¹]
ATCC13032pZ1 <i>thrE</i>	1,9	0,8
ATCC13032pZ1	1,4	0,9
ATCC13032 <i>thrE</i> ::pK18 <i>mob'thrE</i>	0,6	0,9

Tab. 13: Serin- und Glycinexportraten bei *C. glutamicum* ATCC13032*thrE*::pK18*mob'thrE* ATCC13032pZ1 und ATCC13032pZ1*thrE*.

5.5 Einfluß von *thrE*-Überexpression auf die Threoninbildung

Von Reinscheid *et al.* (1994) wurde postuliert, daß der Threoninexport einen limitierenden Schritt in der Threoninproduktion mit *C. glutamicum* darstellt. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, führt die Überexpression des Threoninexportcarriergens *thrE* zu einer gesteigerten Exportrate für Threonin von 3,8 nmolx(minxmg TG)⁻¹ (siehe Tab. 10). Durch die Überexpression von *thrE* in einem threoninproduzierenden Stamm von *C. glutamicum* sollte sich prinzipiell also auch die externe Threoninakkumulation verbessern lassen. Es wurde daher der Effekt einer *thrE*-Überexpression in den Stämmen *C. glutamicum* DM368-2 und MH20-22B-DR17 bzw. in Kombination mit einem verringerten Threoninabbau in dem Stamm DM368-2::pK18*mobglyA'* untersucht.

a) *thrE*-Überexpression in *C. glutamicum* DM368-2 und MH20-22B-DR17

Um zu überprüfen, ob sich eine verstärkte *thrE*-Expression auf die Threonin- und Glycinakkumulation bei einem threoninproduzierenden Stamm von *C. glutamicum* auswirkt, wurde zunächst der Einfluß der *thrE*-Überexpression in dem threoninbildenden Stamm DM368-2 untersucht. Dazu wurden die Plasmide pZ1 und pZ1*thrE* durch Elektroporation in *C. glutamicum* DM368-2 eingebracht. Die so erhaltenen Stämme DM368-2pZ1*thrE* und DM368-2pZ1 wurden in CGXII-Minimalmedium kultiviert und die extrazellulären Threonin- und Glycinkonzentrationen nach 24 h, 48 h und 72 h bestimmt (Abb. 29). Bei Überexpression

von *thrE* exkretierte *C. glutamicum* DM368-2 nach 24 h bereits 5,7 mM Threonin. Die Threoninbildung war damit um 46% höher als bei dem Vergleichsstamm DM368-2pZ1 mit 3,9 mM. Nach 48 h und 72 h Kultivierung war bei *thrE*-Überexpression noch eine um etwa 35% gesteigerte Threoninakkumulation zu beobachten. Die extrazelluläre Glycinakkumulation war bei *C. glutamicum* DM368-2pZ1*thrE* nach 48 h und 72 h Kultivierungsdauer um jeweils 2,3 mM niedriger als bei dem Vergleichsstamm mit Leerplasmid. Diese verringerte Glycinbildung ist wahrscheinlich auf den schnelleren Export von Threonin zurückzuführen, so daß bei *thrE*-Überexpression zellintern weniger Threonin für den Abbau zu Glycin zur Verfügung steht.

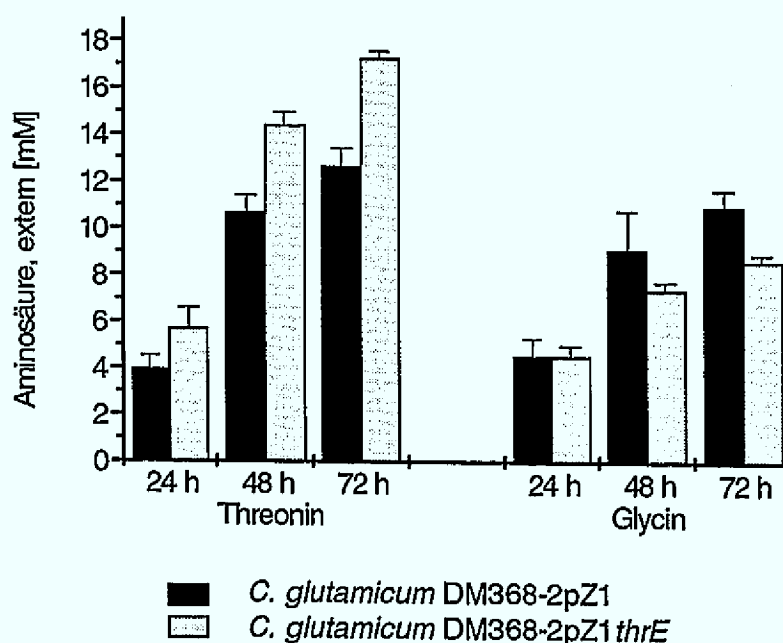


Abb. 29: Threonin- und Glycinbildung bei Überexpression von *thrE* in *C. glutamicum* DM368-2. Dargestellt sind die externen Aminosäurekonzentrationen nach 24 h, 48 h und 72 h Kultivierungsdauer.

Bei dem Stamm DM368-2 handelt es sich um einen Threoninproduzenten, der Threonin nur bis zu einer Endkonzentration von etwa 13 mM bildet. Um zu untersuchen, ob sich der positive Effekt der *thrE*-Überexpression auch in einem anderen Threoninproduzenten auswirkt, wurde das *thrE*-Gen auch in *C. glutamicum* MH20-22B-DR17 (Reinscheid *et al.*, 1994) überexprimiert. Dieser Stamm akkumuliert in CGXII-Medium ca. 50 mM Threonin. Da der Stamm MH20-22B-DR17 chromosomal integriert ein Kanamycinresistenzgen besitzt, konnte die Überexpression von *thrE* nicht mit dem Vektor pZ1*thrE* durchgeführt werden, da auch dieses Plasmid Kanamycinresistenz vermittelt. Das *thrE*-Gen wurde daher zunächst in den *E. coli*-*C. glutamicum*-Pendelvektor pEC-T18*mob2* umkloniert. Dazu wurde *thrE* als 1,9 kb großes *SacI/XbaI*-Fragment aus dem Vektor pUC18*thrE* isoliert. Dieses Fragment wurde

dann in den ebenfalls mit *SacI/XbaI* linearisierten Vektor pEC-T18*mob2* ligiert. Das so entstandene Plasmid pEC-T18*mob2thrE* und der Kontrollvektor pEC-T18*mob2* wurden durch Elektroporation in den Stamm MH20-22B-DR17 eingebracht. Auf diese Weise wurden die Stämme MH20-22B-DR17 pEC-T18*mob2* und MH20-22B-DR17 pEC-T18*mob2thrE* erhalten. Diese wurden in CGXII-Minimalmedium (300 mg/L Leucin, 25 µg/mL Kanamycin, 5 µg/mL Tetracyclin) kultiviert und nach 48 h und 72 h Kultivierungsdauer die extrazellulären Konzentrationen an Threonin, Glycin, Isoleucin und Lysin bestimmt (Tab. 14). Auch bei diesem Threoninproduzenten war die Threoninakkumulation bei Überexpression von *thrE* um 30% (nach 48 h) bzw. um 39% (nach 72 h) höher als bei dem Kontrollstamm mit Leerplasmid. Die durch Umsetzung von Threonin gebildeten Aminosäuren Glycin und Isoleucin wurden, vermutlich aufgrund der niedrigeren zellinternen Threoninkonzentration bei *thrE*-Überexpression, in deutlich geringerem Maße exkretiert. Auch die Bildung von Lysin, welches der Stamm MH20-22B-DR17 neben Threonin bildet, war leicht erniedrigt.

<i>C. glutamicum</i> -Stamm	Threonin [mM]		Glycin [mM]		Isoleucin [mM]		Lysin [mM]	
	48 h	72 h	48 h	72 h	48 h	72 h	48 h	72 h
pEC-T18 <i>mob2</i>	48,9	48,6	25,7	25,1	11,8	11,6	11,9	12,1
pEC-T18 <i>mob2thrE</i>	63,2	67,6	17,4	19,8	6,0	6,0	10,0	10,7

Tab. 14: Externe Akkumulation der Aminosäuren Threonin, Glycin, Isoleucin und Lysin bei Überexpression von *thrE* (*C. glutamicum* MH20-22B-DR17 pEC-T18*mob2thrE*) im Vergleich zum Kontrollstamm mit Leervektor (*C. glutamicum* MH20-22B-DR17 pEC-T18*mob2*).

Durch diese Experimente wurde gezeigt, daß sich die Threoninbildung durch Überexpression des Threoninexportcarriergens *thrE* in verschiedenen *C. glutamicum*-Stämmen deutlich steigern läßt. Dadurch bedingt ist gleichzeitig eine geringere Synthese der bei der Kultivierung entstehenden Nebenprodukte Glycin, Isoleucin und Lysin.

b) *thrE*-Überexpression in *C. glutamicum* DM368-2::pK18*mobglyA'*

Wie bereits gezeigt wurde, führte neben der Überexpression des Threoninexportcarriergens *thrE* auch die Verringerung des Threoninabbaus zu Glycin durch reduzierte *glyA*-Expression zu einer Verbesserung der Threoninbildung. Im folgenden wurde daher untersucht, wie sich die Kombination beider Effekte in einem Stamm auf die extrazelluläre Threoninakkumulation auswirkt. Dazu wurde der Stamm *C. glutamicum* DM368-2::pK18*mobglyA'*, in dem die Expression von *glyA* durch IPTG induzierbar ist, mit den Plasmiden pEC-T18*mob2thrE* und

pEC-T18*mob2* durch Elektroporation transformiert. Die so erhaltenen Stämme DM368 2::pK18*mobglyA'*pEC-T18*mob2* und DM368 2::pK18*mobglyA'*pEC-T18*mob2thrE* wurden in CGXII-Medium (25 µg/mL Kanamycin, 5 µg/mL Tetracyclin) mit 0, 10 oder 100 µM IPTG kultiviert und die extrazellulären Threoninkonzentrationen nach 24 h, 48 h und 72 h bestimmt (Abb. 30). Die externe Threoninkonzentration war bei beiden Stämmen abhängig von der zugesetzten IPTG-Menge. Bei zusätzlicher Expression von *thrE* war die Threoninbildung in allen Fällen aber bis zu 50% höher (Kultivierung mit 10 µM IPTG) als bei der entsprechenden Kultivierung des Stamms mit Leervektor.

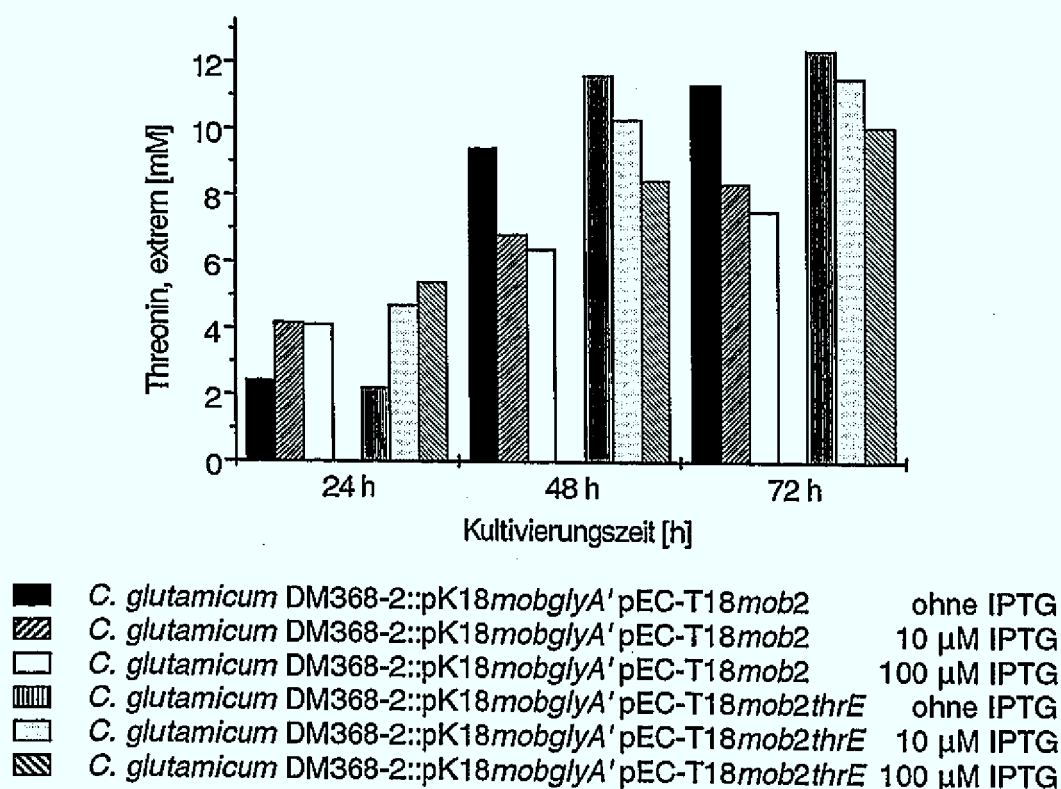


Abb. 30: Threoninbildung bei durch IPTG-Zugabe induzierter *glyA*-Expression und gleichzeitiger Überexpression von *thrE* (*C. glutamicum* DM368-2::pK18*mobglyA'*pEC-T18*mob2thrE*) im Vergleich zum Stamm ohne *thrE*-Überexpression (DM368-2::pK18*mobglyA'*pEC-T18*mob2*). Dargestellt ist die externe Threoninkonzentration nach 24 h, 48 h und 72 h Kultivierungsdauer.

Dieser Versuch zeigt, daß es möglich ist, die Ausbeute an Threonin in dem threoninproduzierenden Stamm *C. glutamicum* DM368-2 durch eine Kombination von verringertem Threoninabbau und verstärktem Threoninexport deutlich zu verbessern.

IV. DISKUSSION

1. Threoninabbau in *C. glutamicum*

Für *Corynebacterium* sp. wurde ein Abbau von Threonin zu Glycin und Acetyl-Coenzym A durch eine Threonindehydrogenase beschrieben (Bell und Turner, 1976). Entgegen der Vermutung, daß die Threoninspaltung auch in *C. glutamicum* von einer Threonindehydrogenase katalysiert wird (Reinscheid *et al.*, 1994), wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, daß der Abbau in *C. glutamicum* über eine Spaltung des Threonins zu Glycin und Acetaldehyd verläuft. Diese Reaktion wird in vielen Mikroorganismen durch eine Threoninaldolase katalysiert (Liu *et al.*, 1997a; 1997b; 1998a; 1998b). Auch in Rattenleber wurde die Aldolspaltung von Threonin beobachtet, allerdings gab es gegensätzliche Interpretationen, ob diese Reaktion von einer Threoninaldolase (Malkin und Greenberg, 1964) oder durch eine Nebenaktivität der Serinhydroxymethyltransferase (Schirch und Gross, 1968) katalysiert wird. Trotz zahlreicher Untersuchungen zur *in vitro*-Aktivität von Serinhydroxymethyltransferase (SHMT) mit Threonin als Substrat ist die Frage der *in vivo*-Beteiligung der SHMT am Threoninabbau in höheren Eukaryonten noch immer umstritten (Ogawa *et al.*, 2000). In Mikroorganismen gab es dagegen bisher keinerlei Hinweise für eine *in vivo*-Beteiligung der SHMT an der Threoninspaltung. Für *C. glutamicum* wurde nun jedoch eindeutig gezeigt, daß die Umsetzung von Threonin zu Glycin und Acetaldehyd auch *in vivo* von der SHMT katalysiert wird. Durch die Isolierung und Überexpression des für die SHMT kodierenden *glyA*-Gens wurde eine Steigerung des Threoninabbaus erreicht. Da keine weiteren threoninabbauenden Enzymaktivitäten identifiziert werden konnten, handelt es sich bei *C. glutamicum* also offensichtlich um das erste Beispiel eines Mikroorganismus, der die SHMT auch zur Spaltung von Threonin nutzt.

Um eine Verringerung des Threoninabbaus zu erreichen, wurde versucht, die SHMT-katalysierte Reaktion durch Deletion von *glyA* zu inaktivieren. Da SHMT-Defektmutanten bereits beispielsweise aus *E. coli* (Plamann *et al.*, 1983) oder *S. cerevisiae* (McNeil *et al.*, 1994) bekannt waren, war es zunächst sehr überraschend, daß in *C. glutamicum* keine Deletion von *glyA* möglich war. Es stellt sich also die Frage, warum die SHMT ein für *C. glutamicum* essentielles Enzym ist, während das z.B. für *E. coli* nicht der Fall ist. Die SHMT ist ein ubiquitär vorkommendes, zentrales Enzym im C₁-Stoffwechsel. Bei Wachstum von *E. coli* auf Glukose werden 15% des assimilierten Kohlenstoffs in Serin oder seine Metabolite eingebaut (Stauffer, 1996). Die SHMT katalysiert die Umsetzung von Serin zu Glycin unter Übertragung einer C₁-Einheit auf Tetrahydrofolat. Glycin kann dann für biosynthetische

Zwecke genutzt werden oder durch das in vielen Organismen vorhandene *Glycine Cleavage System* (GCV) zu Ammoniak, Kohlendioxid und einer weiteren C₁-Einheit gespalten werden (Kikuchi, 1973). Insbesondere die bei der Reaktion entstehenden C₁-Einheiten sind wichtige Metabolite im Zellstoffwechsel; sie werden beispielsweise für die Biosynthese von Methionin, Purinen und Thymin benötigt (Mudd und Cantoni, 1964). Wenn die Zelle also neben der Spaltung von Serin noch eine weitere Quelle für Glycin besitzt, kann sie die benötigten C₁-Einheiten durch das *Glycine Cleavage System* generieren. Für *E. coli* wurde von Ravnkar und Somerville (1987) gezeigt, daß Threonin über den sogenannten *Tut* (*threonine utilization*) *cycle* unter Verwendung von Threonindehydrogenase und 2-Amino-3-ketobutyrylase zu Glycin und weiter zu C₁-Einheiten umgesetzt werden kann, auch wenn das *glyA*-Gen inaktiviert wurde. Auch *S. cerevisiae* besitzt mit Threoninaldolase und Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase, welche die Umwandlung von Glyoxylat und Alanin zu Glycin und Pyruvat katalysiert, noch weitere Enzyme für die Bildung von Glycin (Monschau *et al.*, 1997), so daß die SHMT nicht essentiell ist. In *C. glutamicum* stellt sich die Situation hingegen anders dar. Wenn die SHMT in *C. glutamicum* das einzige Enzym ist, durch das Glycin gebildet werden kann, dann ist die Funktion dieses Enzyms essentiell für die Bildung von C₁-Einheiten. Bei einer nicht funktionsfähigen SHMT könnten weder in dieser Reaktion Tetrahydrofolat-gebundene C₁-Einheiten synthetisiert werden, noch stünde Glycin für die Bildung der notwendigen C₁-Einheiten durch ein möglicherweise vorhandenes *Glycine Cleavage System* zur Verfügung. Da nicht bekannt ist, ob *C. glutamicum* überhaupt ein funktionsfähiges *Glycine Cleavage System* besitzt, ist die Serinspaltung in diesem Bakterium möglicherweise sogar die einzige Quelle für an Tetrahydrofolat gebundene C₁-Einheiten. Die oxidative Glycinspaltung in Methylen-Tetrahydrofolat, Ammoniak und Kohlendioxid durch das *Glycine Cleavage System* spielt zwar bei vielen Organismen eine wichtige Rolle im C₁-Stoffwechsel (Kikuchi, 1973), es gibt aber auch Beispiele für Organismen, die kein *Glycine Cleavage System* besitzen. So wurde beispielsweise für den filamentösen Pilz *Ashbya gossypii* gezeigt, daß kein solches Enzymsystem vorhanden ist (Monschau, 1998). Da *C. glutamicum* wahrscheinlich nicht über eine alternative Möglichkeit zur Synthese von Glycin und damit auch von C₁-Einheiten verfügt, wird es verständlich, warum die SHMT für *C. glutamicum* essentiell ist und eine Deletion von *glyA* folglich nicht möglich ist.

Da eine vollständige Inaktivierung der Serinhydroxymethyltransferase in *C. glutamicum* aus den genannten Gründen nicht möglich ist, mußte eine andere Möglichkeit gesucht werden, um zumindest eine Verringerung des Threoninabbaus in *C. glutamicum* erreichen zu können. Daher wurde ein Stamm konstruiert, in dem das chromosomale *glyA*-Gen unter Kontrolle des induzierbaren *tac*-Promotors steht, so daß eine gezielte niedrigere Expression von *glyA* erreicht werden konnte. Dadurch konnte die SHMT-Aktivität auf etwa 10% der Aktivität im

Wildtyp gesenkt werden, was zu einer verbesserten Threoninbildung mit *C. glutamicum* führt. Eine weitere Möglichkeit, die Expression von *glyA* in *C. glutamicum* zu vermindern, könnte z.B. die Einführung von Punktmutationen im natürlichen Promotorbereich von *glyA* sein. In *E. coli* wurde gezeigt, daß eine Mutation im -35 Bereich des *glyA* Promotors zu einer gesteigerten Expression von *glyA* führt (Lorenz *et al.*, 1996). Ebenso müßte es möglich sein, Promotormutanten zu isolieren, die eine geringere *glyA*-Expression aufweisen. Von Lorenz *et al.* (1996) wurde ebenfalls gezeigt, daß eine Deletion der letzten drei Codons des *glyA*-Strukturgens von *E. coli* zu einer um 75% verminderten SHMT-Aktivität führt. Auch die Einführung einer solchen Mutation im *glyA*-Gen von *C. glutamicum* erscheint vielversprechend. Ein Vorteil der in dieser Arbeit durchgeführten Konstruktion mit einem induzierbaren Promotor liegt jedoch in der Möglichkeit, die *glyA*-Expression durch IPTG-Zugabe beeinflussen zu können, so daß je nach Fragestellung eine bestimmte SHMT-Aktivität gezielt eingestellt werden kann.

Da der Threoninabbau in *C. glutamicum* bisher das einzige Beispiel für die *in vivo*-Katalyse der Spaltung durch eine Serinhydroxymethyltransferase ist, stellt sich die Frage, ob es molekulare Ursachen für diese Fähigkeit der SHMT aus *C. glutamicum* gibt. Es sind zahlreiche Untersuchungen zum Mechanismus der SHMT bekannt. So wurde z.B. die Rolle bestimmter Aminosäurereste an der Cofaktor-Bindung, der Oligomerisierung und der katalytischen Aktivität sowohl durch Mutationsanalysen (Jagath *et al.*, 1997; Fitzpatrick und Malthouse, 1998) als auch durch Kristallstrukturbestimmungen (Scarsdale *et al.*, 1999; 2000) eingehend untersucht. Da die SHMT neben der Spaltung von Serin bzw. Threonin bei anderen Substraten, wie z.B. Alanin oder Aminomalonat, auch unspezifische Reaktionen wie Decarboxylierungen oder Transaminierungen katalysieren kann (Shostak und Schirch, 1988), wurden bereits auch Untersuchungen zur Ursache der Reaktionsspezifität durchgeführt (Schirch *et al.*, 1991). Dabei zeigte sich, daß bei Threonin als Substrat, genau wie bei Serin, keine solche Nebenreaktionen auftreten. Daraus wurde geschlossen, daß die Bindung von Threonin durch SHMT prinzipiell in gleicher Weise erfolgt wie die Serinbindung an das Enzym. Von Angelaccio *et al.* (1992) wurde schließlich untersucht, wodurch die Substratspezifität der SHMT zustandekommt. Der Cofaktor Pyridoxalphosphat (PLP) ist kovalent an einen spezifischen Lysinrest des Enzyms gebunden. Diese PLP-Bindungsregion ist in der SHMT sehr stark konserviert. Auffällig ist vor allem eine Abfolge von vier Threoninresten, die bei vielen SHMTs zu 100% konserviert ist (Abb. 31). Es wurde vermutet, daß eine Beteiligung dieser Threoninreste in der Bindung des Cofaktors PLP oder des Substrats durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken besteht. Zur Funktionsanalyse wurde jeder dieser Threoninreste in der SHMT aus *E. coli* einzeln gegen einen Alaninrest ausgetauscht. Eine der Mutanten, bei welcher der in Abbildung 31 mit einem Pfeil gekennzeichnete Threoninrest

ausgetauscht wurde, zeigte einen 6-fach erniedrigten k_{cat} -Wert für die Spaltung von Serin, während der k_{cat} -Wert mit Threonin als Substrat bei dieser Mutante um den Faktor 2,5 erhöht war (Angelacchio *et al.*, 1992). Dieser Threoninrest ist also zumindest teilweise an der Substratspezifität des Enzyms beteiligt. In der SHMT aus *C. glutamicum* ist genau dieser Rest gegen ein Serin ausgetauscht. Derselbe Aminosäureaustausch ist auch bei den Enzymen aus *Corynebacterium* sp. (Chlumsky *et al.*, 1995) und *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998) vorhanden. Da Serin genau wie Threonin eine Hydroxylgruppe besitzt, sollte auch ein Serinrest in dieser Position in der Lage sein, mögliche wichtige Wasserstoffbrücken auszubilden. Serin hat aber einen um eine Methylgruppe kleineren Seitenrest, so daß sich möglicherweise genau daraus die für das Substrat Threonin benötigte, geringfügig größere Bindungstasche des Enzyms ergibt. Weiterhin ist auffällig, daß in der SHMT aus *C. glutamicum* drei der vier konservierten Threoninreste nicht vorhanden sind (siehe Abb. 31). Es ist also denkbar, daß die Eigenschaft der Serinhydroxymethyltransferase aus *C. glutamicum*, Threonin *in vivo* als Substrat zu akzeptieren, durch die Veränderungen in diesem Bereich des Enzyms zustande kommt. Wenn dies tatsächlich der Fall wäre, könnte man also eventuell durch Austausch dieser Reste eine SHMT in *C. glutamicum* konstruieren, die Serin mit unveränderter Aktivität umsetzen kann, während die Spaltung von Threonin gar nicht mehr, oder zumindest im verringerten Umfang, stattfindet.

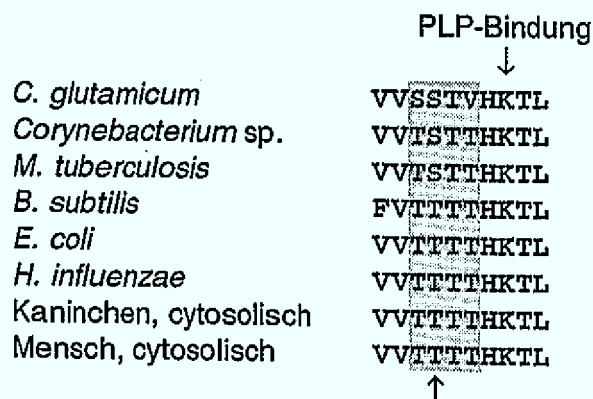


Abb. 31: Vergleich der stark konservierten Pyridoxalphosphat (PLP)-Binderegion aus verschiedenen Serinhydroxymethyltransferasen. Gezeigt ist der Lysinrest, welcher PLP kovalent gebunden enthält, sowie ein dazu benachbarter Bereich mit den in vielen SHMTs hochkonservierten Threoninresten (grau unterlegt).

2. Transposonmutagenese und Isolierung von Threoninpeptid-sensitiven Mutanten

Um das Gen für den Threoninexportcarrier von *C. glutamicum* isolieren zu können, mußte ein geeignetes Selektionssystem zur Isolierung exportdefekter Mutanten etabliert werden. Von Vrljić *et al.* (1996) war gezeigt worden, daß eine Mutante von *C. glutamicum*, die eine Deletion in dem Lysinexportcarriergen *lysE* besitzt, in Lysyl-alanin-haltigem Medium nicht wachsen kann. Ausgehend von dieser Beobachtung wurde ein Selektionssystem für Threoninexport-defekte Mutanten entwickelt. Es wurde gezeigt, daß die Fütterung des Tripeptids Threonyl-threonyl-threonin zu einer hohen intrazellulären Threoninkonzentration führt und daß diese Akkumulation mit einer Wachstumsverzögerung korreliert. Die Identifizierung einer im Threoninexport defekten Mutante war also anhand eines stark verzögerten Wachstums in Anwesenheit von Threonintri-peptid möglich. Eine wichtige Grundlage für den erfolgreichen Einsatz dieses Selektionssystems war dabei das Auftreten einer langanhaltenden und deutlich zu beobachtenden Wachstumsverzögerung bei Tripeptidfütterung.

Obwohl eine erhöhte intrazelluläre Threoninakkumulation nach Zugabe von Threonintri-peptid bei *C. glutamicum* nur über einen kurzen Zeitraum von einigen Stunden auftritt, ist eine Wachstumsverzögerung auch noch nach etwa 24 h zu beobachten. Das verlangsamte Wachstum ist also wahrscheinlich auf einen sekundären Effekt, hervorgerufen durch die zwischenzeitlich hohe zellinterne Threoninkonzentration, zurückzuführen. Kürzlich wurde für *C. glutamicum* gezeigt, daß eine Verringerung der Wachstumsrate mit einer Akkumulation des Guaninnukleotids ppGpp korreliert (Ruklisha *et al.*, 1995). Die Anreicherung von ppGpp als Antwort auf Aminosäuremangelbedingungen und andere Streßsituationen sowie die dadurch ausgelösten Veränderungen im Stoffwechsel sind als stringente Kontrolle sowohl bei Gram-negativen (Cashel *et al.*, 1996) als auch bei Gram-positiven Bakterien (Henkin, 1993) bekannt. Das RelA-Protein aus *E. coli*, ein Ribosomen-assoziiertes Protein, welches die Biosynthese von ppGpp katalysiert, wird aktiviert, wenn unbeladene tRNAs an das Ribosom binden (Goldman und Jakubowski, 1990). Auch bei *C. glutamicum* wurde ein *rel*-Gen identifiziert, dessen Genprodukt die stringente Kontrolle bei Aminosäuremangel auslöst (Wehmeier *et al.*, 1998). Eine Mangelsituation für eine bestimmte Aminosäure kann unter Umständen auch durch die hohe Konzentration einer anderen Aminosäure bedingt werden. So bewirkt beispielsweise die Zugabe von Valin bei *E. coli* einen Isoleucinmangel (Cashel *et al.*, 1996). Möglicherweise wird in *C. glutamicum* durch die Anwesenheit sehr hoher zellinterner Threoninkonzentrationen ein Methioninmangel ausgelöst. Die Homoserindehydrogenase katalysiert die Bildung von Homoserin, welches sowohl eine Vorstufe bei der Threonin- als auch bei der Methioninbiosynthese darstellt. Durch die Endprodukt-Hemmung

der Homoserindehydrogenase durch Threonin (Miyajima und Shio, 1970) wird also unter Umständen ein Mangel an Methionin bewirkt. Dieser Methioninmangel könnte zur Synthese von ppGpp und damit zu einem, durch die stringente Kontrolle hervorgerufenen, verlangsamten Wachstum führen. Es ist also durchaus möglich, daß die bei dem verwendeten Selektionssystem ausgelöste kurzzeitige Erhöhung der intrazellulären Threoninkonzentration eine längerfristige Auswirkung auf das Wachstum von *C. glutamicum* hat. Bei einer im Threoninexport defekten Mutante wird Threonin über einen längeren Zeitraum als beim Wildtyp akkumuliert. Die Aufhebung der Wachstumshemmung durch Hydrolyse von ppGpp zu GDP und Pyrophosphat würde erst zu einem späteren Zeitpunkt erfolgen, so daß daraus der beobachtete Wachstumsunterschied resultieren könnte.

Das in dieser Arbeit beschriebene Selektionssystem zur Erhöhung der zellinternen Threoninkonzentration wurde eingesetzt, um durch ungerichtete Mutagenese erhaltene Mutanten von *C. glutamicum* hinsichtlich einer erhöhten Sensitivität gegenüber Threonintriptid zu testen. Zur Mutagenese wurde dabei, im Gegensatz zur üblicherweise für *C. glutamicum* durchgeführten chemischen Mutagenese mit *N*-Nitro-*N*-Nitroso-*N*-Methylguanidin, ein neues Transposonsystem verwendet. Schon mehrfach wurde die Isolierung von Insertions-elementen und natürlichen Transposons aus coryneformen Bakterien beschrieben (Tauch *et al.*, 1995a; 1995b; 1998). Die Integration erfolgt dabei jedoch häufig nicht unspezifisch, so daß sie zur Durchführung einer ungerichteten Mutagenese ungeeignet sind. So wurde beispielsweise gezeigt, daß die Insertionssequenz IS*Cg2* eine konservierte Zielsequenz besitzt (Quast *et al.*, 1999). Auch das aus IS31831 abgeleitete Transposon Tn31831 integriert an einer bestimmten Zielsequenz (Vertès *et al.*, 1994a; 1994b). Für das in dieser Arbeit verwendete Transposon Tn5531 (Ankri *et al.*, 1996) wurde jedoch gezeigt, daß die Integration in das Genom von *C. glutamicum* unspezifisch erfolgt (Burkovski, pers. Mitteilung). Diese Tatsache wurde auch durch die Charakterisierung der in der vorliegenden Arbeit isolierten Transposonmutanten bestätigt. Insgesamt wurden aus neun der etwa 2000 untersuchten Mutanten die Insertionsorte von Tn5531 kloniert und sequenziert. Dabei zeigte sich, daß die Integration jedesmal an verschiedenen Stellen des Chromosoms erfolgt war, und es konnte auch keine spezifische Zielsequenz an der Integrationsstelle identifiziert werden.

Die Sequenzierung der Transposoninsertionsorte in den neun Threoninpeptid-sensitiven Mutanten ergab, daß Tn5531 jedesmal in offene Leserahmen inseriert war, deren abgeleitete Aminosäuresequenzen ausschließlich Ähnlichkeiten zu hypothetischen Proteinen unbekannter Funktion aufweisen oder aber überhaupt keine signifikante Ähnlichkeit zu anderen Datenbankeinträgen besitzen. Es ist also anhand der Sequenzinformationen keine

Aussage möglich, worin die erhöhte Sensitivität dieser Mutanten gegenüber Threonintripeptid begründet ist. Eine erhöhte zellinterne Threoninkonzentration hat aber, wie bereits diskutiert wurde, möglicherweise weitreichende, nicht bekannte Auswirkungen auf regulatorische Vorgänge in der Zelle. Es ist also durchaus möglich, daß in einigen dieser Mutanten Gene durch das Transposon inaktiviert wurden, die z.B. für eine korrekte Regulation der stringenten Kontrolle benötigt werden. So könnten beispielsweise Gene inaktiviert worden sein, die für Proteine kodieren, welche bisher in *C. glutamicum* nicht charakterisierte, regulatorische Funktionen bei den durch ppGpp ausgelösten Veränderungen des Zellmetabolismus ausüben (Cashel *et al.*, 1996; Codon *et al.*, 1995). Bei den nicht näher charakterisierten Transposonmutanten ist prinzipiell auch eine mehrfache Integration von Tn5531 denkbar, so daß der beobachtete Phänotyp in einem solchen Fall nicht aus der Insertion in dem klonierten Bereich resultieren würde. Obwohl es für Mehrfachintegrationen von Tn5531 bisher keinerlei Hinweise gibt (Reyes, pers. Mitteilung), ist diese Möglichkeit ohne weitere Überprüfungen nicht mit Sicherheit auszuschließen. Außerdem wäre eine spontane Positionsänderung des Transposons innerhalb des Genoms nach bereits erfolgter Transposition denkbar. Dieses Phänomen ist als Spontagenese bekannt (Dong *et al.*, 1992).

In drei der untersuchten Mutanten zeigte sich, daß die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der durch Tn5531 inaktivierten Gene Ähnlichkeiten zu hypothetischen Membranproteinen aufweisen. Diese drei Gene (orf22, orf53 und orf81) wurden weiter charakterisiert. Da gerichtete Inaktivierungsmutanten dieser Gene denselben Threonintripeptid-sensitiven Phänotyp zeigen, wie die ursprünglich isolierten Transposonmutanten, können unspezifische Effekte durch das Transposon hier ausgeschlossen werden. Die erhöhte Sensitivität gegenüber Threonintripeptid wird also durch Inaktivierung von orf22, orf53 oder orf81 ausgelöst. Da neben dem Gen für den Threoninexportcarrier (*thrE* = orf53) auf diese Weise zwei weitere Gene für putative Membranproteine identifiziert wurden, stellt sich die Frage, welche Funktion diese Proteine in *C. glutamicum* besitzen. Für orf22 wurde gezeigt, daß dessen Überexpression bzw. Inaktivierung keinen nennenswerten Einfluß auf den Threoninefflux besitzt. Da die aus orf22 abgeleitete Aminosäuresequenz schwache Sequenzidentitäten zu Aquaporinen aus einigen Eukaryonten aufweist, könnte es sich möglicherweise um das Gen für ein solches Kanalprotein handeln. Aquaporine sind kanalbildende Proteine, die zur MIP (*major intrinsic protein*)-Familie gehören (Park und Saier, 1996). Bekannte prokaryontische Vertreter dieser Protein-Familie sind der Wasserkanal AqpZ (Calamita *et al.*, 1995) aus *E. coli* oder der Glycerin-Diffusions-Facilitator GlpF aus *E. coli* (Weissenborn *et al.*, 1992). Ein detaillierter Sequenzvergleich des aus orf22 abgeleiteten Polypeptids mit bekannten Proteinen der MIP-Familie zeigt, daß typische hochkonservierte Sequenzmotive in dem orf22-Genprodukt nicht vorhanden sind. Es sind allerdings bisher noch keine Aquaporine aus

Gram-positiven Bakterien beschrieben. Daher wäre es möglich, daß sich diese von den bisher bekannten Mitgliedern der MIP-Familie unterscheiden. Weitere Untersuchungen legten zunächst die Vermutung nahe, daß das orf22-Genprodukt an der Osmoregulation in *C. glutamicum* beteiligt sein könnte. Da beschrieben ist, daß Proteine der MIP-Familie bei der Osmoregulation eine wichtige Rolle einnehmen können (Delamarche *et al.*, 1999; Tamás *et al.*, 1999), wurde diese Hypothese experimentell überprüft. Eine Beteiligung des aus orf22 abgeleiteten Polypeptids an der Osmoregulation erscheint nach den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen unwahrscheinlich. Es bleibt letztendlich also ungeklärt, warum die Inaktivierung von orf22 ein leicht verlangsamtes Wachstum in Gegenwart von Threonin-tripeptid zur Folge hat und welche Funktion das orf22-Genprodukt in *C. glutamicum* ausübt.

Auch für das aus orf81 abgeleitete Polypeptid konnte eine direkte Beteiligung am Export von Threonin ausgeschlossen werden. Es gibt in der Datenbank lediglich ein hypothetisches Protein mit signifikanter Ähnlichkeit zu dem orf81-Genprodukt. Über die Funktion dieses Proteins aus *Streptomyces lividans* ist nichts bekannt (Betzler *et al.*, 1997), so daß sich anhand der Sequenzidentitäten zwischen dem orf81-Genprodukt und diesem Protein keine Rückschlüsse auf eine mögliche Funktion in *C. glutamicum* ziehen lassen. Da die intrazelluläre Threoninakkumulation durch die Überexpression bzw. Inaktivierung von orf81 nicht beeinflußt wird, ist der Threoninpeptid-sensitive Phänotyp bei orf81-Inaktivierung nicht auf eine Erhöhung der zellinternen Threoninkonzentration zurückzuführen. Dieser Phänotyp war bei orf81-Inaktivierung insgesamt nur schwach ausgeprägt, so daß es sich hier vermutlich um einen der oben diskutierten sekundären Effekte der intrazellulären Threoninakkumulation handelt. Die Funktion des orf81-Genprodukts bleibt ebenfalls ungeklärt.

3. Der Threoninexportcarrier ThrE

Die biochemische Charakterisierung des Threoninexportes bei *C. glutamicum* hat gezeigt, daß es sich um einen sekundären Transportprozeß handelt, bei dem Threonin vermutlich im Antiport mit Protonen aus der Zelle transportiert wird. Als treibende Kraft zum Transport dient dabei das Membranpotential (Palmieri *et al.*, 1996). Es wurde daher vermutet, daß sich der Threoninexportcarrier einer der bekannten Klassen von Membranpotential-abhängigen Effluxproteinen zuordnen läßt. Viele Exportcarrier, deren Gene bisher kloniert werden konnten, katalysieren den Transport von toxischen Substanzen, wie z.B. Antibiotika. Neben ATP-abhängigen Transportprozessen sind hier vor allem Protonen-getriebene Effluxsysteme weit verbreitet (Bolhuis *et al.*, 1997). Die Mehrzahl dieser Protonen-abhängigen *Multidrug* Effluxsysteme läßt sich in drei Familien von Transportproteinen einteilen (Paulsen *et al.*,

1996a). Die Proteine der großen MFS-Familie (*major facilitator superfamily*) (Pao *et al.*, 1998) haben eine durchschnittliche Größe von 500 Aminosäuren und können zwölf bis vierzehn transmembrane Bereiche ausbilden. Weitere sekundär aktive Carrier, die den Export von toxischen Substanzen katalysieren, gehören meist der RND-Familie (*resistance/nodulation/cell division*) (Saier *et al.*, 1994) oder der SMR-Familie (*small multidrug resistance*) (Paulsen *et al.*, 1996b) an. Die Mitglieder der RND-Familie sind sehr große Proteine mit etwa 1000 Aminosäuren. Sie bilden, wie die Proteine der MFS-Familie, meist zwölf Transmembranhelices aus, besitzen aber zusätzlich zwei extrem lange, extrazelluläre Bereiche zwischen der 1. und 2. bzw. zwischen der 7. und 8. Helix. Im Gegensatz dazu gehören der SMR-Familie Membranproteine mit einer typischen Länge von nur 110 Aminosäuren an, die vier transmembrane Helices ausbilden. Kürzlich wurde mit der LysE-Superfamilie eine zusätzliche Klasse von Translokatoren entdeckt (Vrljić *et al.*, 1999; Aleshin *et al.*, 1999), deren Mitglieder ca. 200 bis 240 Aminosäuren groß sind. Namensgebender Vertreter dieser Familie ist der Lysinexportcarrier LysE aus *C. glutamicum* (Vrljić *et al.*, 1996), für den eine ungewöhnliche Topologie mit fünf Transmembranhelices beschrieben ist (Vrljić *et al.*, 1999; Bellmann, 2000). Zu derselben Klasse gehören auch die putativen Homoserin- bzw. Threoninexportcarrier RhtB und RhtC aus *E. coli* (Aleshin *et al.*, 1999; Zakataeva *et al.*, 1999). Überraschenderweise zeigt die abgeleitete Aminosäuresequenz des in dieser Arbeit klonierten Threoninexportcarriergens *thrE* weder auf Ebene der Primärsequenz noch strukturell Ähnlichkeiten zu einem der genannten Exportproteine. Mit einer Größe von 489 Aminosäuren ähnelt das ThrE-Polypeptid zwar am ehesten einem typischen Vertreter der MFS-Familie, aber da ThrE nur neun potentielle transmembrane Bereiche besitzt, ist eine Zuordnung zur MFS-Familie aufgrund dieser Sekundärstruktur nicht möglich. Ein Datenbankvergleich ergab, daß die Primärstruktur des *thrE*-Genprodukts keine Ähnlichkeit zu Proteinen bekannter Funktion zeigt. Es gibt lediglich zwei Proteine unbekannter Funktion, die Sequenzidentitäten zu ThrE aus *C. glutamicum* zeigen. Die größte Ähnlichkeit besteht zu dem hypothetischen Membranprotein Rv3737 aus *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998). Anhand der Genomsequenzdaten von *M. tuberculosis* wurde eine Zuordnung aller potentiellen Membranproteine dieses Bakteriums zu den bislang charakterisierten Familien von Transportproteinen durchgeführt (<http://www.biology.ucsd.edu/~ipaulsen/transport/mtub.html>). Die Klassifizierung des Proteins Rv3737 war aufgrund zu schwacher Sequenzidentitäten zu bekannten Transportern jedoch nicht möglich (Paulsen, pers. Mitteilung). Damit kann trotz der Ähnlichkeit von ThrE zu diesem Protein auf keine Zugehörigkeit zu einer der Klassen geschlossen werden. Der Threoninexportcarrier ThrE ist also offenbar der erste Vertreter einer neuen Familie von Transportproteinen.

Mittels des Sekundärstrukturvorhersage-Programms PHD.htm *Neuronal Net* (Rost *et al.*, 1995) wurde die in Abbildung 32 gezeigte mögliche Topologie des ThrE-Polypeptids mit neun transmembranen Helices ermittelt. Sehr auffällig ist der extrem lange N-Terminus des Proteins, der sich nach der Strukturvorhersage im extra-cytoplasmatischen Raum befindet.

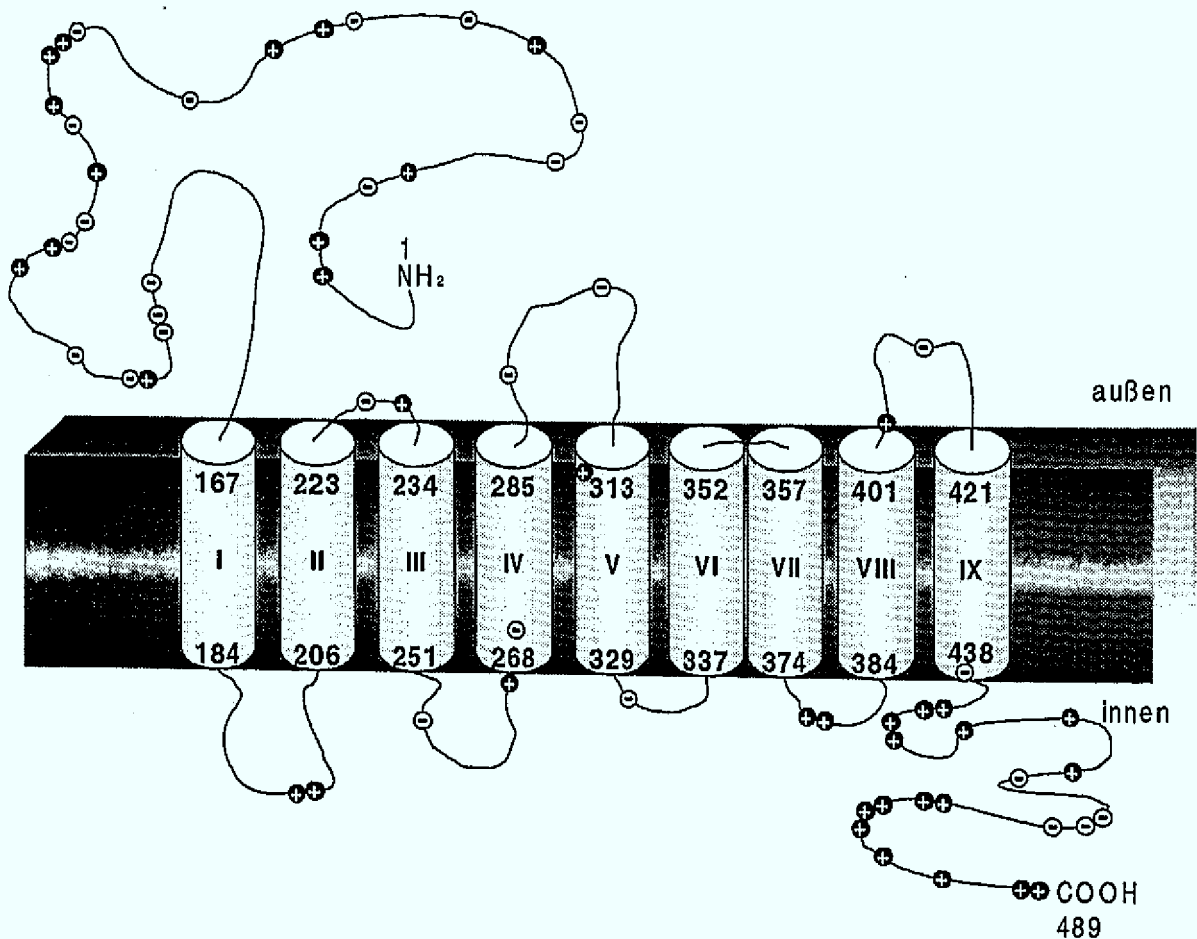


Abb. 32: Hypothetisches Topologiemodell des Threoninexportcarriers ThrE. Gezeigt ist die Anordnung der neun transmembranen Helices nach dem Sekundärstrukturvorhersageprogramm PHD.htm *Neuronal Net* (Rost *et al.*, 1995), die geladenen Aminosäurereste sind mit + oder – markiert.

Diese Topologie ist für sekundäre Transportsysteme, bei denen sich N- und C-Terminus üblicherweise im Cytoplasma befinden, ungewöhnlich. Es gibt jedoch auch sekundäre Transportproteine, bei denen der N-Terminus extrazellulär lokalisiert ist. So wird beispielsweise für den Glycinbetain-Transporter ProW aus *E. coli* (Haardt und Bremer, 1996), für das Transportproteine DcuA für C₄-Dicarbonsäuren aus *E. coli* (Golby *et al.*, 1998) und für den Ammoniumtransporter aus Hefe (Marini *et al.*, 2000) eine solche Topologie mit extrazellulärem N-Terminus beschrieben. Ein weiteres auffälliges Strukturmerkmal bei dem ThrE-Polypeptid aus *C. glutamicum* ist die Möglichkeit zur Ausbildung einer amphiphilen α -Helix am aminoterminalen Ende im Bereich der Aminosäurereste 38 bis 56 (siehe Abb. 33). Eine ganz

ähnliche Topologie ist auch für das Membranprotein ProW beschrieben (Haardt und Bremer, 1996). Hierbei handelt es sich um die transmembrane Komponente des Glycinbetain-Aufnahmesystems ProU aus *E. coli* (Gowrishankar, 1989). Für dieses Protein wurden sieben transmembrane Bereiche ermittelt, wobei sich hier, wie bei ThrE, ein langer N-terminaler Rest von 100 Aminosäuren im Periplasma befindet. Innerhalb des N-Terminus von ProW gibt es auch einen Bereich, der eine amphiphile α -Helix ausbilden könnte. Zunächst wurde vermutet, daß diese amphiphile Helix zusätzlich die Membran durchspannt, so daß sich eine Topologie mit acht Transmembranhelices ergeben würde. Die durchgeführten Fusionsstudien zeigen jedoch, daß eine Lokalisation dieses amphiphilen Bereichs im Periplasma wahrscheinlicher ist (Haardt und Bremer, 1996). Die Funktion dieses langen N-Terminus bei ProW ist nicht vollständig geklärt, es wird aber eine mögliche Funktion als Osmosensor diskutiert. Eine solche Eigenschaft wurde bereits für den N-Terminus des Glycinbetain-Aufnahmesystems BetP aus *C. glutamicum* gezeigt (Peter *et al.*, 1998). Hier befindet sich das aminoterminal Ende von BetP allerdings im Cytoplasma. Bei dem Threoninexportcarrier ThrE ist eine mögliche Funktion des N-Terminus als Sensor aufgrund der extrazellulären Lokalisation schwer vorstellbar, da der einzige Parameter, dessen Detektion beim Export von Threonin sinnvoll erscheint, die zellinterne Threoninkonzentration wäre.

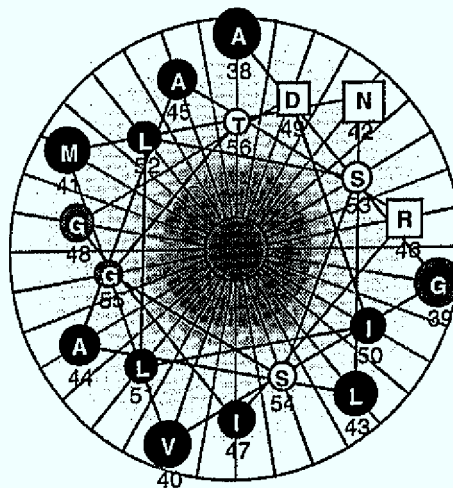


Abb. 33: Mögliche α -helicale Anordnung der Aminosäurereste 38 bis 56 von ThrE. Unpolare Aminosäuren sind schwarz, polare Aminosäuren weiß markiert. Die Aminosäurereste mit einem Hydrophobizitätswert von größer -3,2 (D,N,R) sind zusätzlich durch einen Kasten gekennzeichnet.

Möglicherweise ist der ausgedehnte N-Terminus von ThrE aber auch direkt an der Ausbildung des Translokationskanals beteiligt. Für die kanalbildenden Proteine der MIP-Familie (*major intrinsic protein*) (Park und Saier, 1996) ist beispielsweise beschrieben, daß

Bereiche des Proteins, die nicht als Helices die Membran durchspannen, dennoch innerhalb des Kanals lokalisiert sind (Walz *et al.*, 1997; Heymann *et al.*, 1998). Die funktionell und mechanistisch große Bedeutung dieser Regionen für den Transportvorgang wurde hierbei durch Mutationsstudien belegt (Jung *et al.*, 1994). Weiterhin wäre vorstellbar, daß der aminoterminal Bereich von ThrE als globuläre Struktur den Translokationskanal des Transportproteins verschließen könnte. Ein solcher Mechanismus ist als "ball and chain" Modell bei eukaryontischen Kaliumkanälen bekannt (Hoshi *et al.*, 1990; Zagotta *et al.*, 1990), allerdings ist der "ball"-bildende N-Terminus hier deutlich kürzer als im Fall von ThrE.

Neben dem sehr ausgedehnten aminoterminalen Bereich von ThrE ist ein ebenfalls langer, stark geladener C-Terminus auffällig (siehe Abb. 32). Der C-Terminus befindet sich nach der Topologievorhersage im Cytoplasma. Von den 50 carboxyterminalen Aminosäuren besitzen vier saure (D,E) und sechzehn basische (K,R) Reste, so daß eine Nettoladung dieses Proteinbereichs von +12 resultiert. Ein ähnlich stark positiv geladener C-Terminus ist bei dem Glycinbetain-Aufnahmecarrier BetP aus *C. glutamicum* vorhanden (Peter *et al.*, 1998). Hier wurde durch schrittweise Verkürzungen des C-terminalen Endes gezeigt, daß dieser Bereich des Proteins für die Regulation von BetP auf Aktivitätsebene essentiell ist. Ein BetP-Protein mit verkürztem C-Terminus ist schon bei geringer Osmolalität aktiv, wohingegen das Wildtyp-BetP erst bei höheren Osmolalitäten aktiviert wird. Eine mögliche Regulation auf Aktivitätsebene ist für die bisher bekannten Aminosäureexportcarrier nicht untersucht. Für den Lysinexporter LysE aus *C. glutamicum* wurde die Regulation auf transkriptioneller Ebene durch das Regulatorprotein LysG eingehend untersucht (Bellmann, 2000). Eine zusätzliche Regulation der Carrieraktivität erscheint im Fall von LysE unwahrscheinlich, müßte im Fall des Threoninexporters ThrE aufgrund der auffälligen Sekundärstrukturmerkmale aber geprüft werden. Obwohl die für ThrE ermittelte Carriertopologie nur hypothetisch ist, ergeben sich durch das Modell einige Hinweise auf die möglichen Funktionen einzelner Regionen des Proteins. Für eine genaue Analyse der funktionellen Bereiche von ThrE wäre natürlich eine experimentelle Überprüfung des Topologiemodells notwendig.

Obwohl durch die Vielzahl der schon vollendeten Genomprojekte eine sehr große Menge von Sequenzdaten zur Verfügung steht, sind mit den hypothetischen Proteinen aus *M. tuberculosis* und *S. coelicolor* bisher nur zwei zu ThrE ähnliche Proteine bekannt. Offensichtlich handelt es sich bei dem hier identifizierten Carrier um einen insgesamt sehr selten vorkommenden Carriertyp. Es ist weiterhin ungewöhnlich, daß die bisher identifizierten Exportcarrier für Aminosäuren ganz unterschiedlichen Transporterfamilien angehören. Man hätte eigentlich erwarten können, daß sekundär aktive Transporter, die einander ähnliche Substrate wie beispielsweise Aminosäuren transportieren, auch strukturell miteinander

verwandt sind. Bei vielen Aminosäure-Aufnahmesystemen ist dies auch der Fall (Ortiz-Lopez *et al.*, 2000; Sophianopoulou und Diallinas, 1995). Die bisher aus Prokaryonten identifizierten Aminosäureexporter hingegen unterscheiden sich sehr stark in ihrer Primär- und Sekundärstruktur. Selbst Transporter, die die gleiche Aminosäure transportieren, besitzen unter Umständen keine strukturelle Verwandtschaft. So gehört der putative Threoninexportcarrier RhtC aus *E. coli* (Zakataeva *et al.*, 1999) zur LysE-Superfamilie, während der Threoninexporter ThrE aus *C. glutamicum*, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, einen neuen Strukturtyp repräsentiert. Dagegen wird der Export von Isoleucin in *C. glutamicum* wiederum durch ein anderes Transportsystem katalysiert (Kennerknecht, 1999). Möglicherweise vermitteln dabei zwei Membranproteine gemeinsam den Isoleucinexport. Ein ähnliches System für den Transport verzweigtkettiger Aminosäuren ist auch für *B. subtilis* beschrieben (Belitsky *et al.*, 1997). Neben diesen spezifischen Exportcarriern für Aminosäuren ist ein Fall aus *E. coli* bekannt, bei dem ein Cysteinderivat durch das Mar-System (*multiple antibiotic resistance*) exportiert wird (Winterhalter und Leinfelder, 1998). Hierbei handelt es sich aber sehr wahrscheinlich um einen unspezifischen Nebeneffekt, da das Mar-System üblicherweise Antibiotika exportiert (Cohen *et al.*, 1993). Möglicherweise ist auch bei anderen Aminosäureexportern die eigentliche natürliche Funktion nicht bekannt. Die große Vielfalt an Exportertypen könnte auch ein Hinweis darauf sein, daß Exportmechanismen für Aminosäuren verhältnismäßig spät in der Evolution entstanden sind. Die Isolierung weiterer Aminosäureexporter wird zukünftig zeigen, ob zu den hier beschriebenen Typen von Transportproteinen noch andere, bislang unbekannte Klassen hinzukommen.

4. Threoninbildung mit *C. glutamicum*

Die fermentative Produktion von Threonin wird heutzutage mit Hilfe genetisch veränderter *E. coli*-Stämme durchgeführt (Okamoto und Ikeda, 2000; Furukawa *et al.*, 1988a; 1988b). Zahlreiche Untersuchungen zur Threoninbiosynthese in *C. glutamicum* haben gezeigt, daß prinzipiell auch mit *C. glutamicum* die Überproduktion von Threonin möglich ist (Reinscheid *et al.*, 1994; Eikmanns *et al.*, 1991). Ausgehend von dem lysinproduzierenden Stamm MH20-22B (Schrumpf *et al.*, 1992) kann durch Überexpression des Gens *hom^{FBR}*, welches für eine Endprodukt-resistente Homoserindehydrogenase kodiert (Archer *et al.*, 1991; Reinscheid *et al.*, 1991), eine Umlenkung des Stoffflusses von Lysin zu Threonin erreicht werden. Dabei wird jedoch nur eine maximale extrazelluläre Threoninakkumulation von 69 mM erhalten, da eine stabile Überexpression des *hom^{FBR}-thrB*-Operons in *C. glutamicum* nur mit einer Kopienzahl von vier bis fünf möglich ist (Reinscheid *et al.*, 1994). Eine stärkere Überexpression dieses Operons ist auch in anderen *C. glutamicum*-Stämmen nicht möglich

(Archer *et al.*, 1991; Nakamori *et al.*, 1987). Außerdem wurde beobachtet, daß bei einer sukzessiven Erhöhung der Kopienzahl des *hom^{FBR}-thrB*-Operons zwar eine schrittweise gesteigerte intrazelluläre Threoninakkumulation von bis zu 100 mM erreicht wird, die extrazelluläre Threoninkonzentration aber nicht proportional ansteigt. Daraus kann geschlossen werden, daß der Export von Threonin einen limitierenden Schritt bei der Threoninproduktion mit *C. glutamicum* darstellt, und daß die dadurch bedingte zellinterne Akkumulation von Threonin möglicherweise toxisch für *C. glutamicum* ist. Mit der in dieser Arbeit durchgeführten Isolierung und Klonierung des Threoninexportcarriergens *thrE* ist somit der Zugang zu einem wichtigen Target zur Steigerung der Threoninbildung ermöglicht worden. Es wurde gezeigt, daß durch Überexpression von *thrE* in verschiedenen threoninproduzierenden *C. glutamicum*-Stämmen eine um bis zu etwa 40% gesteigerte extrazelluläre Threoninkonzentration erreicht werden kann. Somit steht nun neben den Threoninbiosynthesegenen mit *thrE* ein neues Zielgen zur Verfügung, dessen Überexpression eine verstärkte Threoninbildung zur Folge hat. Da gezeigt wurde, daß der Threoninexportcarrier ThrE neben Threonin auch Serin transportieren kann, wäre die Überexpression von *thrE* auch in einem serinproduzierenden Stamm von *C. glutamicum* (Sugimoto *et al.*, 1999) vielversprechend.

Der intrazelluläre Abbau von Threonin stellt eine weitere Limitierung bei einer effizienten Threoninproduktion mit *C. glutamicum* dar. Von Reinscheid *et al.* (1994) wurde bei dem Stamm MH20-22B-DR17 beobachtet, daß parallel zu einer gesteigerten Threoninakkumulation auch Isoleucin und Glycin in verstärktem Maße gebildet werden. Um die Umsetzung von Threonin zu Isoleucin zu verhindern, wurde das Gen für die Threonindehydratase *ilvA* (Möckel *et al.*, 1992) durch Deletion eines internen Fragments inaktiviert. In einem Stamm mit dieser Mutation wird mehr Threonin als im Wildtyp akkumuliert. Durch Einbringen der *ilvA*-Deletion in einen Produktionsstamm könnte also die Threoninproduktion weiter verbessert werden. Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit der Threoninabbau zu Glycin aufgeklärt. Wie bereits diskutiert wurde, kann dieser Abbau nicht vollständig unterbunden werden, da die Serinhydroxymethyltransferase, die diese Reaktion katalysiert, für *C. glutamicum* essentiell ist. Durch eine verringerte Expression des *glyA*-Gens, das für die Serinhydroxymethyltransferase kodiert, kann aber die extrazelluläre Threoninkonzentration bei *C. glutamicum* um bis zu 20% gesteigert werden.

In Abbildung 34 ist der Threoninmetabolismus in *C. glutamicum* zusammenfassend dargestellt. Neben einer verstärkten Biosynthese von Threonin kann auch die Fütterung von threoninhaltigen Peptiden zu einer Erhöhung des Threoninpools in *C. glutamicum* beitragen. Die Eigenschaft von *C. glutamicum*, kurze Peptide aufzunehmen und zu hydrolysieren (Erdmann *et al.*, 1993), wurde in der vorliegenden Arbeit genutzt, um hohe zellinterne

Threoninkonzentrationen zu erreichen. Es sind mögliche Targets im Threoninstoffwechsel gezeigt, deren Beeinflussung durch gentechnische Veränderungen zu einer effizienteren Threoninproduktion mit *C. glutamicum* beitragen könnte (Abb. 34). Die Erhöhung der Syntheserate durch Überexpression und Deregulation der Biosynthesegene sowie die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zum Abbau und Export von Threonin wurden bereits diskutiert. Eine weitere wichtige Voraussetzung stellt die ausreichende Bereitstellung der Vorstufe Oxalacetat für die Threoninbiosynthese dar. Für einen threoninproduzierenden Stamm von *Serratia marcescens* ist beispielsweise beschrieben, daß die Überexpression des *ppc*-Gens aus *E. coli*, welches für eine Phosphoenolpyruvatcarboxylase kodiert, eine Steigerung der Threoninproduktion um 20% bewirkt (Sugita und Komatsubara, 1989). In *C. glutamicum* ist die Pyruvatcarboxylase (*pyc*) das hauptsächlich aktive anaplerotische Enzym zur Bildung von Oxalacetat (Peters-Wendisch *et al.*, 1998). Durch Überexpression von *pyc* in dem threoninproduzierenden Stamm DM368-3 (Eikmanns *et al.*, 1991) kann auch hier eine um etwa 20% erhöhte Threoninbildung erreicht werden (Peters-Wendisch, pers. Mitteilung). Weiterhin könnte die Inaktivierung des Threoninaufnahmesystems einen positiven Einfluß auf die Threoninbildung mit *C. glutamicum* haben. Es ist bekannt, daß Threonin von *C. glutamicum* durch ein sekundär aktives Transportsystem aufgenommen wird (Palmieri *et al.*, 1996; Araki *et al.*, 1973; Shio *et al.*, 1973). Das Gen für dieses Aufnahmesystem ist bisher allerdings unbekannt. Für *E. coli* wurde bereits gezeigt, daß ein Stamm, der bis zu 100 g/L Threonin produziert, ein defektes Threoninaufnahmesystem besitzt (Okamoto *et al.*, 1997). Dadurch wird in diesem Stamm die Verringerung der extrazellulären Threoninkonzentration durch Wiederaufnahme des ausgeschiedenen Threonins verhindert.

Die Kombination aller genannten Effekte in *C. glutamicum* stellt einen interessanten Ansatz dar, um die gezielte Konstruktion eines effizienten Threoninproduzenten mittels *metabolic design* durchzuführen.

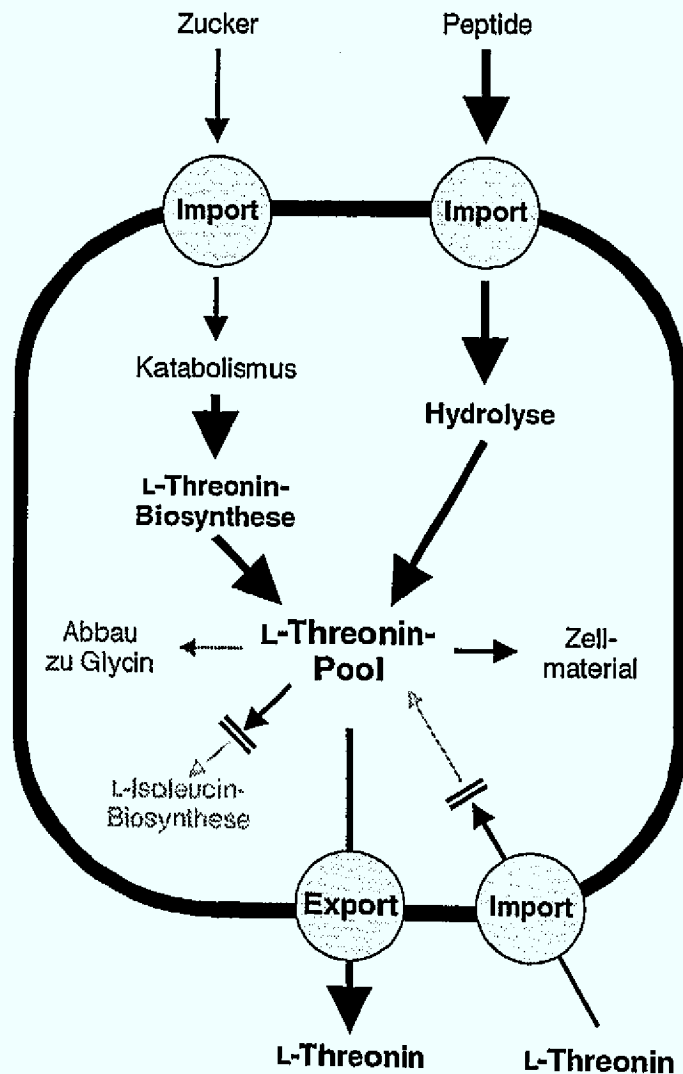


Abb.34: Zusammenfassende Darstellung des Threoninmetabolismus in *C. glutamicum*. Der L-Threonin-Pool wird durch Aufnahme und zellinterne Hydrolyse von Peptiden, durch die L-Threonin-Biosynthese und durch Aufnahme von extrazellulärem L-Threonin erhöht; durch Umsetzung zu Glycin und L-Isoleucin sowie durch Export wird der L-Threonin-Pool erniedrigt. Gezeigt sind die möglichen gezielten Veränderungen im Metabolismus, um die Produktion von L-Threonin mit *C. glutamicum* zu verbessern.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Es ist bekannt, daß die Herstellung der essentiellen Aminosäure L-Threonin mit dem Bakterium *Corynebacterium glutamicum* möglich ist. Allerdings ist eine effiziente Bildung von L-Threonin durch den zellinternen Abbau und durch eine geringe Threoninexportrate limitiert. Ziel dieser Arbeit war es daher, den Abbau von L-Threonin zu untersuchen und insbesondere das Gen für den Threoninexportcarrier aus *C. glutamicum* zu klonieren und zu charakterisieren.

1. Wie enzymatische Untersuchungen ergaben, wird L-Threonin in *C. glutamicum* durch die Serinhydroxymethyltransferase (SHMT) zu Glycin und Acetaldehyd gespalten. Das Gen für die SHMT (*glyA*) wurde isoliert und charakterisiert. Die SHMT ist für *C. glutamicum* vermutlich essentiell, da eine Inaktivierung von *glyA* nicht möglich war.
2. Um eine Verbesserung der Threoninbildung zu erreichen, wurde der Abbau von L-Threonin zu Glycin reduziert. Dazu wurde ein Stamm konstruiert, in dem das chromosomale *glyA*-Gen unter Kontrolle des induzierbaren *tac*-Promotors steht, so daß die Expression des *glyA*-Gens durch IPTG-Zugabe gezielt beeinflußt werden konnte. Dadurch gelang es, die SHMT-Aktivität in *C. glutamicum* bis auf ca. 10% der im Wildtyp vorhandenen Enzymaktivität zu verringern.
3. Für die Klonierung des Threoninexportcarriergens aus *C. glutamicum* wurde zunächst ein Selektionssystem zur Isolierung einer im Threoninexport defekten Mutante etabliert. Durch Zugabe von threoninhaltigen Peptiden wurde eine hohe zellinterne Threoninkonzentration erreicht. Diese korrelierte mit verzögertem Wachstum, so daß die Identifizierung einer im Threoninexport defekten Mutante anhand eines sehr stark verzögerten Wachstums in Gegenwart threoninhaltiger Peptide möglich war. Aus 2000 durch Transposonmutagenese erhaltenen Mutanten wurden neun Threoninpeptid-sensitive Klone isoliert, bei denen der Mutationsort im Chromosom charakterisiert wurde.
4. Bei einem dieser Klone handelte es sich um die gesuchte Threoninexport-Defektmutante. Das in dieser Transposonmutante inaktivierte Gen *thrE* (*L-threonine export*) kodiert für ein Polypeptid (489 AS) mit neun potentiellen transmembranen Helices und einem Molekulargewicht von 51697. Dieses Polypeptid besitzt keine Sequenzähnlichkeit zu Proteinen bekannter Funktion. Die Überexpression von *thrE* führte mit $3,8 \text{ nmol} \times (\text{min} \times \text{mg TG})^{-1}$ zu einer deutlich erhöhten Threoninexportrate im Vergleich zu dem Ausgangsstamm mit $2,5 \text{ nmol} \times (\text{min} \times \text{mg TG})^{-1}$. Der Threoninefflux betrug bei Inaktivierung von *thrE* nur noch $1,0 \text{ nmol} \times (\text{min} \times \text{mg TG})^{-1}$. Neben L-Threonin transportiert der Threoninexportcarrier ThrE auch die strukturell sehr ähnliche Aminosäure L-Serin.
5. Durch Überexpression des Threoninexportcarriergens *thrE* und gleichzeitiger Reduktion des Threoninabbaus konnte die extrazelluläre Akkumulation von L-Threonin in dem Stamm *C. glutamicum* DM368-2 um 50% gesteigert werden.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- Abe, S., Takayama, K. und Kinoshita, S. (1967)** Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **13**: 279-301.
- Aleshin, V.V., Zakataeva, N.P. und Livshits, V.A. (1999)** A new family of amino-acid-efflux proteins. *TIBS* **24**: 133-135.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zahng, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D.J. (1997)** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Amann, E., Brosius, J. und Ptashne, M. (1983)** Vectors bearing a hybrid *trp-lac* promoter useful for regulated expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene* **25**: 167-178.
- Angelaccio, S., Pascarella, S., Fattori, E., Bossa, F., Strong, W. und Schirch, V. (1992)** Serine hydroxymethyltransferase: origin of substrate specificity. *Biochemistry* **31**: 155-162.
- Ankri, S., Serebrijski, I., Reyes, O. und Leblon, G. (1996)** Mutations in the *Corynebacterium glutamicum* proline biosynthetic pathway: a natural bypass of the *proA* step. *J. Bacteriol.* **178**: 4412-4419.
- Araki, K., Oka, T. und Nakayama, K. (1973)** Na⁺-dependent transport of amino acids and its significance for growth of a lysine-producing bacterium. *Agric. Biol. Chem.* **37**: 1357-1366.
- Archer, J.A.C., Solow-Cordero, D.E. und Sinskey, A.J. (1991)** A C-terminal deletion in *Corynebacterium glutamicum* homoserine dehydrogenase abolishes allosteric inhibition by L-threonine. *Gene* **107**: 53-59.
- Aronson, B.D., Levinthal, M. und Somerville, R.L. (1989)** Activation of a cryptic pathway for threonine metabolism via specific IS3-mediated alteration of promoter structure in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**: 5503-5511.
- Barnes, W.M. (1994)** PCR amplification of up to 35 kb with high fidelity and high yield from λ -bacteriophage template. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 2216-2220.
- Belitzky, B.R., Gustafsson, M.C.U., Sonenshein, A.L. und von Wachenfeld, C. (1997)** An *lrp*-like gene of *Bacillus subtilis* involved in branched-chain amino acid transport. *J. Bacteriol.* **179**: 5448-5457.
- Bell, S.C. und Turner, J.M. (1976)** Bacterial catabolism of threonine. Threonine degradation initiated by L-threonine-NAD⁺ oxidoreductase. *Biochem. J.* **156**: 449-458.

- Bellmann, A. (2000)** Der Lysinexportcarrier in *Corynebacterium glutamicum* -Topologie und Regulation-. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Bensadoun, A. und Weinstein, D. (1976)** Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal. Biochem.* **70**: 241-250.
- Benz, R. und McLaughlin, S. (1983)** The molecular mechanism of action of the proton ionophore FCCP (carbonylcyanide *p*-trifluormethoxyphenylhydrazone). *J. Biophys.* **41**: 381-398.
- Betzler, M., Tlölke, I. und Schrempf, H. (1997)** Amplification of a *Streptomyces lividans* 4.3 kb DNA element causes overproduction of a novel hypha- and vesicle-associated protein. *Microbiol.* **143**: 1243-1252.
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979)** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* **7**: 1513-1523.
- Bolhuis, H., van Veen, H.W., Poolman, B., Driessen, A.J.M. und Konings, W.N. (1997)** Mechanisms of multidrug transporters. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**: 55-84.
- Boylan, S.A. und Dekker, E.E. (1981)** L-Threonine dehydrogenase. Purification and properties of the homogeneous enzyme from *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem.* **256**: 1809-1815.
- Brennan, R.G. und Matthews, B.W. (1989)** The helix-turn-helix DNA binding motif. *J. Biol. Chem.* **264**: 1903-1906.
- Bröer, S. und Krämer, R. (1991a)** Lysine excretion by *Corynebacterium glutamicum*.
1. Identification of a specific secretion carrier system. *Eur. J. Biochem.* **202**: 131-135.
- Bröer, S. und Krämer, R. (1991b)** Lysine excretion by *Corynebacterium glutamicum*.
2. Energetics and mechanism of the transport system. *Eur. J. Biochem.* **202**: 137-143.
- Cashel, M., Gentry, D.R., Hernandez, V.J. und Vinella, D. (1996)** The stringent response.
In: *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, Vol. 2, S. 1458-1496,
Neidhardt, F.C. et al. (Eds.) American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Calamita, G., Bishai, W.R., Preston, G.M., Guggino, W.B. und Agre, P. (1995)** Molecular cloning and characterization of AqpZ, a water channel from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **270**: 29063-29066.
- Chlumsky, L.J., Zhang, L. und Jorns, M.S. (1995)** Sequence analysis of sarcosine oxidase and nearby genes reveals homologies with key enzymes of folate one-carbon metabolism. *J. Biol. Chem.* **270**: 18252-18259.

- Chung, C.T., Niemela, S.L. und 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.
- Codon, C., Squires, C. und Squires, C.L. (1995)** Control of rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **59**: 623-645.
- Cohen, G.N. und Saint-Girons, I. (1987)** Biosynthesis of threonine, lysine, and methionine. In: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*, Vol. 1, S. 429-444, Neidhardt, F.C. et al. (Eds.) American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Cohen, S.P., Hachler, H. und Levy, S.B. (1993)** Genetic and functional analysis of the multiple antibiotic resistance (*mar*) locus in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**: 1484-1492.
- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D. et al. (1998)** Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**: 537-544.
- Cremer, J., Eggeling, L. und 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**: 1746-1752.
- De Boer, H.A., Comstock, L.J. und Vasser, M. (1983)** The *tac* promoter: a functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 21-35.
- Delamarche, C., Thomas, D., Rolland, J.-P., Froger, A., Gouranton, J., Svelto, M., Agre, P. und Calamita, G. (1999)** Visualization of AqpZ-mediated water permeability in *Escherichia coli* by cryoelectron microscopy. *J. Bacteriol.* **181**: 4193-4197.
- De Smet, K.A.L., Weston, A., Brown, I.N., Young, D.B. und Robertson, B.D. (2000)** Three pathways for trehalose biosynthesis in mycobacteria. *Microbiol.* **146**: 199-208.
- Diaz-Diaz, M., Ward, O.P., Honek, J. und Lajoie, G. (1995)** Enzymes from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 11097 participating in biotransformation of acetaldehyde and glycine to threonine isomers. *Can. J. Microbiol.* **41**: 438-443.
- Dong, Q., Sadouk, A., van der Lelie, D., Taghavi, S., Ferhat, A., Nuyten, J.M. et al. (1992)** Cloning and sequencing of IS1086, an *Alcaligenes eutrophus* insertion element related to IS30 and IS4351. *J. Bacteriol.* **174**: 8133-8138.
- Dower, W.J., Miller, J.F. und Ragsdale, C.W. (1988)** High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acid Res.* **16**: 6127-6145.
- Ebbighausen, H., Weil, B. und Krämer, R. (1989)** Isoleucine excretion in *Corynebacterium glutamicum*: evidence for a specific efflux carrier system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 184-190.

- Eggeling, L., De Graaf, A.A. und Sahm, H. (1996) Quantifying and directing metabolite flux: application to amino acid overproduction. *Adv. Biochem. Engineering* **54**: 2-30.
- Eggeling, L. und Sahm, H. (1999) L-Glutamate and L-lysine: traditional products with impetuous developments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 146-153.
- Eikmanns, B.J., Eggeling, L. und Sahm, H. (1993) Molecular aspects of lysine, threonine, and isoleucine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *Antonie van Leeuwenhoek* **64**: 145-163.
- Eikmanns, B.J., Metzger, M., Reinscheid, D., Kircher, M. und Sahm, H. (1991) 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., Thum-Schmitz, N., Eggeling, L., Lüdtke, K. und Sahm, H. (1994) Nucleotid sequence, expression and transcriptional analysis of *gltA* gene encoding citrate synthase. *Microbiol.* **140**: 1817-1828.
- Erdmann, A., Weil, B. und Krämer, R. (1993) Lysine secretion by wild-type *Corynebacterium glutamicum* triggered by dipeptide uptake. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 3115-3122.
- Farfán, M.-J., Aparicio, L. und Calderón, I.L. (1999) Threonine overproduction in yeast strains carrying the *HOM3-R2* mutant allele under the control of different inducible promoters. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 110-116.
- Farwick, M., Siewe, R.M. und Krämer, R. (1995) Glycine betaine uptake after hyperosmotic shift in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **177**: 4690-4695.
- Fitzpatrick, T.B. und Malthouse, J.P.G. (1998) The effect of histidine-228 on the catalytic efficiency and stereospecificity of the serine hydroxymethyltransferase catalysed exchange of the α -proton of amino acids. *Biochim. Biophys. Acta* **1386**: 220-226.
- Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R. et al. (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**: 496-512.
- Follettie, M.T., Shin, H.K. und Sinskey, A.J. (1988) Organization and regulation of the *Corynebacterium glutamicum* *hom-thrB* and *thrC* loci. *Mol. Microbiol.* **2**: 53-62.
- Fürste, J.P., Pansegrau, W., Frank, R., Blöcker, H., Scholz, P., Bagdasarian, M. und Lanka, E. (1986) Molecular cloning of the plasmid RP4 primase region in a multi-host range *tacP* expression vector. *Gene* **48**: 119-131.
- Furukawa, S., Ozaki, A. und Nakanishi, T. (1988a) L-Threonine production by L-aspartate- and L-homoserine-resistant mutant of *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 550-553.

- Furukawa, S., Ozaki, A., Kotani, Y. und Nakanishi, T. (1988b)** Breeding of L-threonine hyper-producer of *Escherichia coli* W. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 253-257.
- Gaur, N.K., Oppenheim, J. und Smith, I. (1991)** The *Bacillus subtilis* *sin* gene, a regulator of alternate developmental processes, codes for a DNA-binding protein. *J. Bacteriol.* **173**: 678-686.
- Gibson, K.D., Laver, W.G. und Neuberger, A. (1958)** Initial stages in the biosynthesis of porphyrins. The formation of δ -aminolaevulinic acid from glycine and succinyl-coenzyme A by particles from chicken erythrocytes. *Biochem. J.* **70**: 71-81.
- Golby, P., Kelly, D.J., Guest, J.R. und Andrews, S.C. (1998)** Topological analysis of DcuA, an anaerobic C₄-dicarboxylate transporter of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**: 4821-4827.
- Goldman, E. und Jakubowski, H. (1990)** Uncharges tRNA, protein synthesis, and the bacterial stringent response. *Mol. Microbiol.* **19**: 2035-2040.
- Gowrishankar, J. (1989)** Nucleotide sequence of the osmoregulatory *proU* operon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**: 1923-1931.
- Grant, S.G.N., Jessee, J., Bloom, F.R. und Hanahan, D. (1990)** Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4645-4649.
- Gutmann, M. (1993)** Glutamatsekretion bei *Corynebacterium glutamicum*: Mechanismus und physiologische Bedeutung des Carrier-vermittelten Exports. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Haardt, M. und Bremer, E. (1996)** Use of *phoA* and *lacZ* fusions to study the membrane topology of ProW, a component of the osmoregulated ProU transport system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**: 5370-5381.
- Haynes, J.A. und Britz, M.L. (1989)** Electrotransformation of *Brevibacterium lactofermentum* and *Corynebacterium glutamicum*: growth in tween 80 increases transformation frequencies. *FEMS Microbiol. Lett.* **61**: 329-334.
- Haynes, J.A. und Britz, M.L. (1990)** The effect of growth conditions of *Corynebacterium glutamicum* on the transformation frequency obtained by electroporation. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 255-263.
- Henkin, T.M. (1993)** Ribosomal structure and genetics. In: *Bacillus subtilis and other Gram-positive bacteria*, S. 676, Sonenshein, A.L. et al. (Eds.) American Society for Microbiology, Washington D.C..
- Heymann, J.B., Agre, P. und Engel, A. (1998)** Progress on the structure and function of aquaporin 1. *J. Struc. Biol.* **121**: 191-206.

- Hoischen, C. und Krämer, R. (1989)** Evidence for an efflux carrier system involved in the secretion of glutamate by *Corynebacterium glutamicum*. *Arch. Microbiol.* **151**: 342-347.
- Holleman, A.F. und Wiberg, E. (1985)** in: *Lehrbuch der anorganischen Chemie*. 91.-100. Auflage, S. 40-42, Verlag Walter de Gruyter & Co., Berlin, New York.
- Hoshi, T., Zagotta, W.N. und Aldrich, R.W. (1990)** Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science* **250**: 533-538.
- Jäger, W., Schäfer, A., Pühler, A., Labes, G. und Wohlleben, W. (1992)** Expression of the *Bacillus subtilis sacB* gene leads to sucrose sensitivity in the Gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* but not in *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* **174**: 5462-5465.
- Jagath, J.R., Sharma, B., Rao, N.A. und Savithri, H.S. (1997)** The role of His-134, -147, and -150 residues in subunit assembly, cofactor binding, and catalysis of sheep liver cytosolic serine hydroxymethyltransferase. *J. Biol. Chem.* **272**: 24355-24362.
- Jeanmougin, F., Thompson, J. D., Gouy, M., Higgins, D. G. und Gibson, T. J. (1998)** Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem. Sci.* **23**: 403-405.
- Jerpseth, B. und Kretz, P.L. (1993)** SCS110: *Dam*⁻, *dcm*⁻, *endA*⁻ *Escherichia coli*[®] competent cells. *STRATEGIES in Mol. Biol.* **6**: 22.
- Jones, B.M. und Gilligan, J.P. (1983)** o-Phthaldialdehyde precolumn derivatization and reversed-phase-high-performance liquid chromatography of polypeptide hydrolysates and physiological fluids. *J. Chromatogr.* **266**: 471-482.
- Jung, J., Preston, G., Smith, B., Guggino, W. und Agre, P. (1994)** Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model. *J. Biol. Chem.* **269**: 14648-14654.
- Kalinowski, J., Cremer, J., Bachmann, B., Eggeling, L., Sahm, H. und Pühler, A. (1991)** Genetic and biochemical analysis of the aspartatokinase from *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Microbiol.* **5**: 1197-1204.
- Katsumata, R., Mizukami, T., Kikuchi, Y. und Kino, K. (1987)** Threonine production by the lysine producing strain of *Corynebacterium glutamicum* with amplified threonine biosynthetic operon. In: *Fifth international symposium on the genetics of industrial microorganisms*, S. 217-226, Alacevic, M., Hranneli, D. und Toman, Z. (Eds.).
- Keilhauer, C., Eggeling, L. und Sahm, H. (1993)** Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon. *J. Bacteriol.* **175**: 5595-5603.
- Kennerknecht, N. (1999)** Transposonmutagenese bei *Corynebacterium glutamicum*: Charakterisierung peptidsensitiver Mutanten. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

- Kikuchi, G. (1973)** The glycine cleavage system: composition, reaction mechanism, and physiological significance. *Mol. Cell. Biochem.* **1**: 169-187.
- Kinoshita, S., Udaka, S. und Shimono, M. (1957)** Studies on the amino acid fermentation, I. Production of L-glutamic acid by various microorganism. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **3**: 193-205.
- Kleemann, A. Leuchtenberger, W., Hoppe, B. und Tanner, H. (1985)** Amino acids. In: *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry A2*. S. 57-97, Bartholomé, E., Biekert, E. und Hellmann, H. (Eds.) VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim, New York, Basel, Cambridge.
- Klingenberg, M. und Pfaff, E. (1977)** Means of terminating reactions. *Meth. Enzymol.* **10**: 680-684.
- Komatsubara, S., Murata, K., Kisumi, M. und Chibata, I. (1978)** Threonine degradation by *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* **135**: 318-323.
- Krämer, R. (1994a)** Systems and mechanisms of amino acid uptake and excretion in prokaryotes. *Arch. Microbiol.* **162**: 1-13.
- Krämer, R. (1994b)** Secretion of amino acids by bacteria: physiology and mechanism. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**: 75-94.
- Kyte, J. und Doolittle, R.F. (1982)** A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**: 105-132.
- Leuchtenberger, W. (1996)** Amino acids - technical production and use. In: *Biotechnology*, Vol. 6, S. 466-502, Rehm, H.-J., Reed, G., Pühler, A. und Stadler, P. (Eds.) VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Liebl, W., Bayerl, A., Stillner, U. und Schleifer, K.H. (1989)** High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **65**: 299-304.
- Lindroth, P. und Mopper, K. (1979)** High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthalaldehyde. *Anal. Chem.* **51**: 1167-1174.
- Liu, J.-Q., Dairi, T., Itoh, N., Kataoka, M., Shimizu, S. und Yamada, H. (1998a)** Gene cloning, biochemical characterization and physiological role of a thermostable low-specificity L-threonine aldolase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **255**: 220-226.
- Liu, J.-Q., Dairi, T., Kataoka, M., Shimizu, S. und Yamada, H. (1997a)** L-allo-Threonine aldolase from *Aeromonas jandaei* DK-39: gene cloning, nucleotide sequencing, and identification of the pyridoxal 5'-phosphate-binding lysine residue by site-directed mutagenesis. *J. Bacteriol.* **179**: 3555-3560.

- Liu, J.-Q., Ito, S., Dairi, T., Itoh, N., Kataoka, M., Shimizu, S. und Yamada, H. (1998b)** Gene cloning, nucleotide sequencing, and purification and characterization of the low-specificity L-threonine aldolase from *Pseudomonas* sp. strain NCIMB 10558. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 549-554.
- Liu, J.-Q., Nagata, S., Dairi, T., Misono, H., Shimizu, S. und Yamada, H. (1997b)** The Gly1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a low-specific L-threonine aldolase that catalyzes cleavage of L-*allo*-threonine and L-threonine to glycine. Expression of the gene in *Escherichia coli* and purification and characterization of the enzyme. *Eur. J. Biochem.* **245**: 289-293.
- Lorenz, E., Plamann, M.D. und Stauffer, G.V. (1996)** *Escherichia coli* cis- and trans-acting mutations that increase *glyA* gene expression. *Mol. Gen. Genet.* **250**: 81-88.
- Mahillon, J. und Chandler, M. (1998)** Insertion sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 725-774.
- Malkin, L.I. und Greenberg, D.M. (1964)** Purification and properties of threonine and allothreonine aldolase from rat liver. *Biochem. Biophys. Acta* **85**: 117-131.
- Mandic-Mulec, I., Doukhan, L. und Smith, I. (1995)** The *Bacillus subtilis* SinR protein is a repressor of the key sporulation gene *spo0A*. *J. Bacteriol.* **177**: 4619-4627.
- Marcus, J.P. und Dekker, E.E. (1993)** pH-dependent decarboxylation of 2-amino-3-ketobutyrate, the unstable intermediate in the threonine dehydrogenase-initiated pathway for threonine utilization. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **190**: 1066-1072.
- Marini, A.-M., Springael, J.-Y., Frommer, W.B. und André, B. (2000)** Cross-talk between ammonium transporters in yeast and interference by the soybean SAT1 protein. *Mol. Microbiol.* **35**: 378-385.
- Mauzerall, D. und Granick, S. (1956)** The occurrence and determination of δ -aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. *J. Biol. Chem.* **219**: 435-446.
- McFall, E. und Newman, E.B. (1996)** Amino acids as carbon sources. In: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*, Vol. 1, S. 368-379, Neidhardt, F.C. et al. (Eds.) American Society for Microbiology, Washington D.C.
- McNeil, J.B., McIntosh, E.M., Taylor, B.V., Zhang, F., Tang, S. und Bogner, A.L. (1994)** Cloning and molecular characterization of three gens, including two genes encoding serine hydroxymethyltransferases, whose inactivation is required to render yeast auxotrophic for glycine. *J. Biol. Chem.* **269**: 9155-9165.
- Menkel, E., Thierbach, G., Eggeling, L. und 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**: 684-688.

- Micka, B., Groch, N., Heinemann, U. und Marahiel, M.A. (1991) Molecular cloning, nucleotid sequence, and characterization of the *Bacillus subtilis* gene encoding the DNA-binding protein Hbsu. *J. Bacteriol.* **173**: 3191-3198.
- Miyajima, R., Otsuka, S.I. und Shio, I. (1968) Regulation of aspartate family amino acid biosynthesis in *Brevibacterium flavum*; I. Inhibition by amino acids of the enzymes in threonine biosynthesis. *J. Biochem.* **63**: 139-148.
- Miyajima, R. und Shio, I. (1970) Regulation of aspartate family amino acid biosynthesis in *Brevibacterium flavum*; III. Properties of homoserine dehydrogenase. *J. Biochem.* **68**: 311-319.
- Miyajima, R. und Shio, 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.
- Möckel, B., Eggeling, L. und Sahm, H. (1992) Functional and structural analyses of threonine dehydratases from *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **174**: 8065-8072.
- Monschau, N. (1998) Untersuchungen zur Biosynthese von Glycin als Vorstufe von Riboflavin in *Ashbya gossypii*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Monschau, N., Stahmann, K.-P., Sahm, H., McNeil, J.B. und Bogner, A.L. (1997) Identification of *Saccharomyces cerevisiae* GLY1 as a threonine aldolase: a key enzyme in glycine biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **150**: 55-60.
- Morbach, S., Sahm, H. und Eggeling, L. (1996) L-Isoleucine production with *Corynebacterium glutamicum*: further flux increase and limitation of export. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4345-4351.
- Morris, J.K. (1967) Utilization of L-threonine by a Pseudomonad: a catabolic role for L-threonine aldolase. *Biochem. J.* **115**: 602-605.
- Mudd, S.H. und Cantoni, G.L. (1964) Biological transmethylation, methyl-group neogenesis and "one-carbon" metabolic reactions dependent upon tetrahydrofolic acid. In: *Comprehensive Biochemistry*, Vol. 15, S. 1-47, Florkin, M. und Stotz, E.H. (Eds.) Elsevier Publishing Co., Amsterdam.
- Nakamori, S., Ishida, M., Takagi, H., Ito, K., Miwa, K. und Sano, K. (1987) Improved L-threonine production by the amplification of the gene encoding homoserine dehydrogenase in *Brevibacterium lactofermentum*. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 87-91.
- Newman, E.B., Kapoor, V. und Potter, R. (1976) Role of L-threonine dehydrogenase in the catabolism of threonine and synthesis of glycine by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **126**: 1245-1249.

- Norlander, J.M., Kempe, T. und Messing, J. (1983) Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene* 26: 101-106.
- Nudel, B.C., Corradini, C., Fraile, E. und Giulietti, A.M. (1987) Plasmid maintenance and threonine production by recombinant *Escherichia coli* strains. *Biotechnol. Lett.* 9: 77-82.
- Ogawa, H., Gomi, T. und Fujioka, M.. (2000) Serine hydroxymethyltransferase and threonine aldolase: are they identical? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32: 289-301.
- Ogawa, W., Kim, Y.-M., Mizushima, T. und Tsuchiya, T. (1998) Cloning and expression of the gene for the Na⁺-coupled serine transporter from *Escherichia coli* and characteristics of the transporter. *J. Bacteriol.* 180: 6749-6752.
- Okamoto, K. und Ikeda, M. (2000) Development of an industrially stable process for L-threonine fermentation by an L-methionine-auxotrophic mutant of *Escherichia coli*. *J. Biosci. Bioengin.* 89: 87-89.
- Okamoto, K., Kino, K. und Ikeda, M. (1997) Hyperproduction of L-threonine by an *Escherichia coli* mutant with impaired L-threonine uptake. *Biosci. Biotech. Biochem.* 61: 1877-1882.
- Ortiz-Lopez, A., Chang, H.-C. und Bush, D.R. (2000) Amino acid transporters in plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1465: 275-280.
- Palmer, B.R. und Marinus, M.G. (1994) The *dam* and *dcm* strains of *Escherichia coli* - a review. *Gene* 143: 1-12.
- Palmieri, L., Berns, D., Krämer, R. und Eikmanns, M. (1996) Threonine diffusion and threonine transport in *Corynebacterium glutamicum* and their role in threonine production. *Arch. Microbiol.* 165: 48-54.
- Pao, S.S., Paulsen, I. und Saier, M.H. (1998) Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 1-34.
- Park, J.H. und Saier, M.H. (1996) Phylogenetic characterization of the MIP family of transmembrane channel proteins. *J. Membrane Biol.* 153: 171-180.
- Paulsen, I.T., Brown, M.H. und Skurray, R.A. (1996a) Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev.* 60: 575-608.
- Paulsen, I.T., Skurray, R.A., Tam, R., Saier, M.H., Turner, R.J., Wiener, J.H. *et al.* (1996b) The SMR family: a novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs. *Mol. Microbiol.* 19: 1167-1175.
- Paz, M.A., Blumenfeld, O.O., Rojkind, M., Henson, E., Furfine, C. und Gallop, P.M. (1965) Determination of carbonyl compounds with *N*-methyl benzothiazolone hydrazone. *Arch. Biochem. Biophys.* 109: 548-559.

- Peoples, O.P., Liebl, W., Bodis, M., Maeng, P.J., Follettie, M.T., Archer, J.A. und Sinskey, A.J. (1988)** Nucleotide sequence and fine structural analysis of the *Corynebacterium glutamicum* *hom-thrB* operon. *Mol. Microbiol.* **2**: 63-72.
- Perez, C.A., Marini, P. und de Mendoza, D. (1998)** Effects on *Bacillus subtilis* of conditional expression of the *accBC* operon encoding subunits of acetyl coenzyme A carboxylase, the first enzyme of fatty acid synthesis. *Microbiol.* **144**: 895-903.
- Peter, H., Burkovski, A. und Krämer, R. (1998)** Osmo-sensing by N- and C-terminal extensions of the glycine betaine uptake system BetP of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Chem.* **273**: 2567-2574.
- Peters-Wendisch, P.G., Kreutzer, C., Kalinowski, J., Pátek, M., Sahm, H. und Eikmanns, B.J. (1998)** Pyruvate carboxylase from *Corynebacterium glutamicum*: characterization, expression and inactivation of the *pyc* gene. *Microbiol.* **144**: 915-927.
- Plamann, M., Stauffer, L.T., Urbanowski, M.L. und Stauffer, G.V. (1983)** Complete nucleotide sequence of the *E. coli* *glyA* gene. *Nucleic Acid Res.* **11**: 2065-2075.
- Potter, R., Kapoor, V. und Newman, E.B. (1977)** Role of threonine dehydrogenase in *Escherichia coli* threonine degradation. *J. Bacteriol.* **132**: 385-391.
- Quast, K., Bathe, B., Pühler, A. und Kalinowski, J. (1999)** The *Corynebacterium glutamicum* insertion sequence *ISCg2* prefers conserved target sequences located adjacent to genes involved in aspartate and glutamate metabolism. *Mol. Gen. Genet.* **262**: 568-578.
- Ravnikar, P.D. und Somerville, R.L. (1987)** Genetic characterization of a highly efficient alternate pathway of serine biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**: 2611-2617.
- Redenbach, M., Kieser, H.M., Denapate, D., Eichner, A., Cullum, J., Kinashi, H. und Hopwood, D.A. (1996)** A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosom. *Mol. Microbiol.* **21**: 77-96.
- Reinscheid, D.J., Eikmanns, B.J. und Sahm, H. (1991)** Analysis of a *Corynebacterium glutamicum* *hom* gene coding for a feedback-resistant homoserine dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **173**: 3228-3230.
- Reinscheid, D.J., Kronmeyer, W., Eggeling, L., Eikmanns, B.J. und 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**: 126-132.
- Reuter, U. (1998)** Genetische und physiologische Untersuchungen zur Pantothenat- und Valinbildung in *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

- Rost, B., Casadio, R., Fariselli, P. und Sander, C. (1995) Transmembrane helices predicted at 95% accuracy. *Protein Sci.* 4: 521-533.
- Rost, B. und Sander, C. (1993) Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. *J. Mol. Biol.* 232: 584-599.
- Rost, B. und Sander, C. (1994) Combining evolutionary information and neural networks to predict protein secondary structure. *Proteins* 19: 55-77.
- Ruklisha, M., Viesturs, U. und Labane, L. (1995) Growth control and ppGpp synthesis in *Brevibacterium flavum* cells at various medium mixing rates and aeration intensities. *Acta Biotechnol.* 15: 41-48.
- Sahm, H. und Eggeling, L. (1999) D-Pantothenate synthesis in *Corynebacterium glutamicum* and use of *panBC* and genes encoding L-valine synthesis for D-Pantothenate overproduction. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1973-1979.
- Saier, M.H. (1994) Computer-aided analyses of transport protein sequences: gleaned evidence concerning function, structure, biogenesis, and evolution. *Microbiol. Rev.* 58: 71-93.
- Saier, M.H. (2000) A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 354-411.
- Saier, M.H., Tam, R., Reizer, A. und Reizer, J. (1994) Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol. Microbiol.* 11: 841-847.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higushi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 23: 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, C. und Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- Scarsdale, J.N., Kazanina, G., Radaev, S., Schirch, V. und Wright, H.T. (1999) Crystal structure of rabbit cytosolic serine hydroxymethyltransferase at 2,8 Å resolution: mechanistic implications. *Biochemistry* 38: 8347-8358.
- Scarsdale, J.N., Radaev, S., Kazanina, G., Schirch, V. und Wright, H.T. (2000) Crystal structure at 2,4 Å resolution of *E.coli* serine hydroxymethyltransferase in complex with glycine substrate and 5-formyl tetrahydrofolate. *J. Mol. Biol.* 296: 155-168.

- Schäfer, A., Kalinowski, J., Simon, R., Seep-Feldhaus, A.-H. und Pühler, A. (1990) High-frequency conjugal plasmid transfer from Gram-negative *Escherichia coli* to various Gram-positive coryneform bacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 1663-1666.
- Schäfer, A., Kalinowski, J. und Pühler, A. (1994a) Increased fertility of *Corynebacterium glutamicum* recipients in intergeneric matings with *Escherichia coli* after stress exposure. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 756-759.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. und Pühler, A. (1994b) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73.
- Schirch, L. und Gross, T. (1968) Serine transhydroxymethylase. Identification as the threonine and allothreonine aldolases. *J. Biol. Chem.* **243**: 5651-5655.
- Schirch, L., Hopkins, S., Villar, E. und Angelaccio, S. (1985) Serine hydroxymethyltransferase from *Escherichia coli*: purification and properties. *J. Bacteriol.* **163**: 1-7.
- Schirch, V., Shostak, K., Zamora, M. und Gautam-Basak, M. (1991) The origin of reaction specificity in serine hydroxymethyltransferase. *J. Biol. Chem.* **266**: 759-764.
- Schrumpf, B., Eggeling, L. und Sahm, H. (1992) Isolation and prominent characteristics of an L-lysine hyperproducing strain of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 566-571.
- Schwarzer, A. und Pühler, A. (1991) Manipulation of *Corynebacterium glutamicum* by gene disruption and replacement. *Bio/Technology* **9**: 84-87.
- Scrimgeour K.G und Huennekens F.M. (1962) Serine hydroxymethylase. In: *Methods in enzymology*, Vol. V, S. 838-843, Colowick, S.P. und Kaplan, N.O. (Eds.) Academic Press, New York.
- Shiio, I. und Miyajima, R. (1969) Concerted inhibition and its reversal by end products of aspartate kinase in *Brevibacterium flavum*. *J. Biochem.* **65**: 849-859.
- Shiio, I., Miyajima, R. und Kashima, N. (1973) Na⁺-dependent transport of threonine in *Brevibacterium flavum*. *J. Biochem.* **73**: 1185-1193.
- Shostak, K. und Schirch, V. (1988) Serine hydroxymethyltransferase: mechanism of the racemization and transamination of D- and L-alanine. *Biochemistry* **27**: 8007-8014.
- Simon, R., Priefer, U. und Pühler, A. (1983) A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Bio/Technology* **11**: 784-791.

- Smith, D.R., Doucette-Stamm, L.A., Deloughery, C., Lee, H.-M., Dubois, J., Aldredge, T. et al. (1997)** Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* deltaH: functional analysis and comparative genomics. *J. Bacteriol.* **179**: 7135-7155.
- Sophianopoulou, V. und Diallinas, G. (1995)** Amino acid transporters of lower eukaryotes: regulation, structure and topogenesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **16**: 53-75.
- Stauffer, G.V. (1996)** Biosynthesis of serine, glycine, and one-carbon units. In: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*, Vol. 1, S. 506-513, Neidhardt, F.C. et al. (Eds.) American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Sugimoto, M., Osumi, T., Nakamatsu, T., Hibino, W. und Ito, M. (1999)** Method of producing L-serine by fermentation. Europäische Patentanmeldung EP 0 931 833 A2.
- Sugita, T. und Komatsubara, S. (1989)** Construction of a threonine-hyperproducing strain of *Serratia marcescens* by amplifying the phosphoenolpyruvate carboxylase gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 290-293.
- Tamás, M.J., Luyten, K., Sutherland, F.C.W., Hernandez, A., Albertyn, J., Valadi, H. et al. (1999)** Fps1p controls the accumulation and release of the compatible solute glycerol in yeast osmoregulation. *Mol. Microbiol.* **31**: 1087-1104.
- Tauch, A., Kassing, F., Kalinowski, J. und Pühler, A. (1995a)** The erythromycin resistance gene of the *Corynebacterium xerosis* R-plasmid pTP10 also carrying chloramphenicol, kanamycin, and tetracycline resistances is capable of transposition in *Corynebacterium glutamicum*. *Plasmid* **33**: 168-179.
- Tauch, A., Kassing, F., Kalinowski, J. und Pühler, A. (1995b)** The *Corynebacterium xerosis* composite transposon Tn5432 consists of two identical insertion sequences, designated IS1249, flanking the erythromycin resistance gene *ermCX*. *Plasmid* **34**: 119-131.
- Tauch, A., Zheng, Z., Pühler, A. und Kalinowski, J. (1998)** *Corynebacterium striatum* chloramphenicol resistance transposon Tn5564: genetic organization and transposition in *Corynebacterium glutamicum*. *Plasmid* **40**: 126-129.
- Tindall, K.R. und Kunkel, T.A. (1988)** Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* **27**: 6008-6013.
- Tsuchiya, M. und Morinaga, Y. (1988)** Genetic control systems of *Escherichia coli* can confer inducible expression of cloned genes in coryneform bacteria. *Bio/Technology* **6**: 428-430.
- van der Rest, M.E., Lange, C. und Molenaar, D. (1999)** A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 541-545.

- Vertès, A.A., Asai, Y., Inui, M., Kobayashi, M., Kurusu, Y. und Yukawa, H. (1994a) Transposon mutagenesis of coryneform bacteria. *Mol. Gen. Genet.* **245**: 397-405.
- Vertès, A.A., Hatakeyama, K., Inui, M., Kobayashi, M., Kurusu, Y. und Yukawa, H. (1993) Replacement recombination in coryneform bacteria: high efficiency integration requirement for non-methylated plasmid DNA. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**: 2036-2038.
- Vertès, A.A., Inui, M., Kobayashi, M., Kurusu, Y. und Yukawa, H. (1994b) Isolation and characterization of IS31831, a transposable element from *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Microbiol.* **11**: 739-746.
- Voet, D. und Voet, J.G. (1992) in: *Biochemie*. S. 690-692, VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim, New York, Basel, Cambridge.
- Vrljić, M., Garg, J., Bellmann, A., Wachi, S., Freudl, R., Malecki, M.J. et al. (1999) The LysE superfamily: topology of the lysine exporter LysE of *Corynebacterium glutamicum*. A paradigm for a novel superfamily of transmembrane solute translocators. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**: 327-336.
- Vrljić, M., Kronmeyer, W., Sahm, H. und Eggeling, L. (1995) Unbalance of L-lysine flux in *Corynebacterium glutamicum* and its use for the isolation of excretion-defective mutants. *J. Bacteriol.* **177**: 4021-4027.
- Vrljić, M., Sahm, H. und Eggeling, L. (1996) A new type of transporter with a new type of cellular function: L-lysine export from *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Microbiol.* **22**: 815-826.
- Walz, T., Hirai, T., Murata, K., Heymann, J.B., Mitsuoka, K., Fujiyoshi, Y. et al. (1997) The three-dimensional structure of aquaporin-1. *Nature* **387**: 624-627.
- Wehmeier, L., Schäfer, A., Burkovski, A., Krämer, R., Mechold, U., Malke, H., Pühler, A. und Kalinowski, A. (1998) The role of the *Corynebacterium glutamicum* *rel* gene in (p)ppGpp metabolism. *Microbiol.* **144**: 1853-1862.
- Weissenborn, D.L., Wittehundt, N. und Larson, T.J. (1992) Structure and regulation of the *glpFK* operon encoding glycerol diffusion facilitator and glycerol kinase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **267**: 6122-6131.
- Wendisch, V. (1997) Physiologische und NMR-spektroskopische Untersuchungen zur *in vivo*-Aktivität zentraler Stoffwechselwege im Wildstamm und in rekombinanten Stämmen von *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Willuhn, J. (1999) Serinhydroxymethyltransferase und Threoninabbau in *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit, Technische Universität Berlin.

- Winterhalter, C. und Leinfelder, W. (1998)** Mikroorganismen und Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Cystein, L-Cystin, N-Acetyl-Serin oder Thiazolidinderivaten. Europäische Patentanmeldung EP 0 885 962 A1.
- Zagotta, W.N., Hoshi, T. und Aldrich, R.W. (1990)** Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB. *Science* **250**: 568-571.
- Zakataeva, N.P., Aleshin, V.V., Tokmakova, I.L., Troshin, P.V. und Livshits, V.A. (1999)** The novel transmembrane *Escherichia coli* proteins involved in the amino acid efflux. *FEBS Lett.* **452**: 228-232.
- Zittrich, S. und Krämer, R. (1994)** Quantitative discrimination of carrier-mediated excretion of isoleucine from uptake and diffusion in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **176**: 6892-6899.

VII. ANHANG

1. Sequenzen

Es sind jeweils die Nukleotidsequenzen in 5' → 3'-Richtung und bei kodierenden Bereichen die abgeleiteten Aminosäuresequenzen im Einbuchstabencode gezeigt. Die putativen Start- und Stopcodons sind durch Unterstreichung markiert.

Konstrukt zur regulierbaren *glyA*-Expression *lacI^f*-*Ptac*-*glyA'* (Insert von pK18*mobglyA'*)

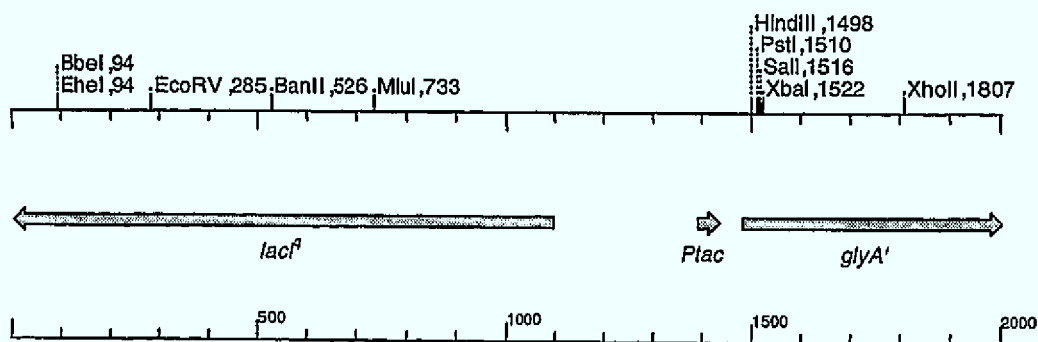


Abb. 35: Insert des Vektors pK18*mobglyA'*.

lacI^f: Nukleotide 1097 – 6 (Gegenstrang)

Ptac: Nukleotide 1391 – 1434

glyA': Nukleotide 1562 – 1999

Die Lage des *lacI^f*-Gens sowie des *tac*-Promotors sind in der Sequenz mit Pfeilen gekennzeichnet, die abgeleitete Aminosäuresequenz des 5'-Fragments von *glyA* ist angegeben.

```

AATTCCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCG      60
|<== lacIf ==|
GCCAACGCG GGGGAGAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCCAGGGTGGTTTTTCTTTTCACC      120
AGTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTTCACCGCCTGGCCCTGAGAGAGTTGCAGCAAG      180
CGGTCCACGCTGGTTTGCCCCAGCAGGCGAAAATCCTGTTTGATGGTGGTTGACGGCGGG      240
ATATAACATGAGCTGTCTTCGGTATCGTCGTATCCCACTACCGAGATATCCGCACCAACG      300
CGCAGCCCGGACTCGGTAATGGCGCGCATTCGCGCCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACC      360
AGCATCGCAGTGGGAACGATGCCCTCATTACGATTTGCATGGTTTGTGAAAACCGGAC      420

```

ATGGCACTCCAGTCGCCTTCCCGTTCCGCTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATAT	480
TTATGCCAGCCAGCCAGACGCGAGACGCGCCGAGACAGAACTTAATGGGCCCCGCTAACAGC	540
GCGATTTGCTGGTGACCCAATGCGACCAGATGCTCCACGCCAGTCGCGTACCGTCTTCA	600
TGGGAGAAAATAATACTGTTGATGGGTGTCTGGTCAGAGACATCAAGAAATAACGCCGGA	660
ACATTAGTGCGAGGCAGCTTCCACAGCAATGGCATCCTGGTCATCCAGCGGATAGTTAATG	720
ATCAGCCCAGTACGCGGTTGCGCGAGAAGATTGTGCACCGCCGCTTTACAGGCTTCGACG	780
CCGCTTCGTTCTACCATCGACACCACCACGCTGGCACCCAGTTGATCGGCGCGAGATTTA	840
ATCGCCGCGACAATTTGCGACGGCGCGTGCAGGGCCAGACTGGAGGTGGCAACGCCAATC	900
AGCAACGACTGTTTGCCCGCCAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCC	960
GCCATCGCCGCTTCCACTTTTTCCCGCGTTTTTCGCAGAAACGTGGCTGGCCTGGTTCACC	1020
ACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAGACACCGGCATACTCTGCGACATCGTATAACGTTACT	1080
GGTTTCACATTCCACCACCTGAATTGACTCTCTTCCGGGCGCTATCATGCCATACCGCGA	1140
<===== <i>lacI</i> ^q =====>	
AAGGTTTTGCACCATTGATGGTGTCAACGTAAATGCATGCCGCTTCGCCCTTCGCGCGCG	1200
AATTGCAAGCTGATCCGGGCTTATCGACTGCACGGTGCACCAATGCTTCTGGCGTCAGGC	1260
AGCCATCGGAAGCTGTGGTATGGCTGTGCAGGTCGTAAATCACTGCATAATTCGTGTGCG	1320
TCAAGGCGCACTCCCGTTCTGGATAATGTTTTTTGCGCCGACATCATAACGGTTCTGGCA	1380
AATATTCTGAAATGAGCTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTG	1440
===== <i>Ptac</i> =====>	
AGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGAATTAAAGATATGACCATGATTACGCCAAG	1500
CTTGTCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCATTCGTCTTGTGAAAGGTTAGCTGACCT	1560
GATGACCGATGCCCCACCAAGCGGACGATGTCCGTTACCAGCCACTGAACGAGCTTGATCC	1620
M T D A H Q A D D V R Y Q P L N E L D P	
TGAGGTGGCTGCTGCCATCGCTGGGGA ^Δ CTTGCCCGTCAACGCGATACATTAGAGATGAT	1680
E V A A A I A G E L A R Q R D T L E M I	
CGCGTCTGAGAACTTCGTTCCCCGTTCTGTTTTGCAGGCGCAGGGTTCGTCTTACCAA	1740
A S E N F V P R S V L Q A Q G S V L T N	
TAAGTATGCCGAGGGTTACCTGGCCGCCGTTACTACGGTGGTTGCGAACAAGTTGACAT	1800
K Y A E G Y P G R R Y Y G G C E Q V D I	

CATTGAGGATCTTGACGTCGTCGGAAGGCTCTCTTCGGTGCAGAGTTCGCCAATGT	1860
I E D L A R D R A K A L F G A E F A N V	
TCAGCCTCACTCTGGCGCACAGGCTAATGCTGCTGTGCTGATGACTTTGGCTGAGCCAGG	1920
Q P H S G A Q A N A A V L M T L A E P G	
CGACAAGATCATGGGTCTGTCTTTGGCTCATGGTGGTCACTTGACCCACGGAATGAAGTT	1980
D K I M G L S L A H G G H L T H G M K L	
GACTTCTCCGAAAGCTGG	2000
N F S G K L	

orf22 (Insert von pZ1orf22)

orf22: Nukleotide 192 (oder 198) – 947

AGGAGAACCCACCGAGGAGGAGATCGACACCCTTCCACGGTTGGCCACCAAATGGGTTCGC	60
ACAAAACCCACAACCGCTGCCACTGGGAGAGGTTGACTACAAGCGCTGAACGTTGAGTTT	120
GAGTTTGGTCCATTGAGGGGTAAAGGCTTACCTCTCGACTAGGTGGGGTGGGCGTAGAGC	180
GCCTATTCTGATTGATCGTGTTAACCATCGCTATTGTACTTCTCGCGTCAGTCCTCATCG	240
L I V L T I A I V L L A S V L I G	
GTGCTCTTCTCCAACGCATGACAGGATTGGGCGTCGGTCTAGTTACCGGCCCAGTCCTGA	300
A L L Q R M T G L G V G L V T G P V L T	
CTTCTTTGTTAGGGCCGCTAGCAGGCGTGACCATGGTGAATGGTCTGTCCATCATCAACG	360
S L L G P L A G V T M V N G L S I I N A	
CGGTGAATAATGCGTGGTTCGGTGCCAAACGCACTGACTGGGCCAAATCCGAATTCTTG	420
V N N A W S V R K R T D W A K F R I L A	
CCGGCGCTTTGGTGCTTGGTTCTGTTCTGCTGTTGCAAGTGGTGTATTTCTTAACGGAC	480
G A L V L G S V P A V A V V Y F L N G P	
CATGGCTGTTGATTTTCGTTGGTGCGATGGTGCTGCTCGCGTTGGGTGTTTCCCTGTTCC	540
W L L I F V G A M V L L A L G V S L F P	
CAACAGAGAAATTCGCACTCAAGCAAGAAGCTAAACTGCCTATGGTCATCTTCGGCATGA	600
T E K F A L K Q E A K L P M V I F G M I	
TTGGTGGATTCAATGCCACTGTTGCAGGCATCGCAGGGCCATCCCTGACTGTTTATGCGC	660
G G F M S T V A G I A G P S L T V Y A R	
GCCTGAGCCGCTGGGATTACCGCGACTTTGTGGCCACCTTGCACCCAGTTCTACTCGTGG	720
L S R W D Y R D F V A T L H P V L L V A	

CCAACACCGTATCGTTCCTGCTCAAGGTTATCTTGATCGGTGGACTCGATTTCGGTGGCG 780
 N T V S F L L K V I L I G G L D F G G A

CACCCGCATGGCTCTGGATCGGTGCCGTAGCGATGATCTTTGTTCGGTGCTTGGTTGGGTG 840
 P A W L W I G A V A M I F V G A W L G E

AAATCGTCAACGCTAAGGTGTCCACCCCAATGGCCAAGCGCATCGCTACGCTCCTGGCAG 900
 I V N A K V S T P M A K R I A T L L A A

CAGCTGGTGCCGCGAGTGGTGTGTTCGAGGCATCATGGAATTGGTTAGCGGTCTTAAT 960
 A G A A V V L F R G I M E L V stop

TGGTGGGAAGTTGAGCAGAAGTTAATCGGTCTCGAGGTTTTTCGAGACCTTCGTATCCC 1020

ATCAAATCCCAGTAACGCCAGG 1042

orf81 (Insert von pZ1orf81)

orf81: Nukleotide 326 – 1393

TGCACCCACGACCTCAAGGCAAACTTGACTCCGCCGGCATCCCAGCCGACTGGAACCTC 60
 CGCCCAACCGGCACCCACTCATGGGGCTGGTGGCAAGATGACCTCCGCGGATCTTGGACC 120
 ACCTTCGCTCGTGCCTTTGAGCTAGAGGCCTAGAAACAGATTAAACATTGAAACCGGCTG 180
 CCTTTTAGATATAAAAGGCAGCCGGTTTTTGCCATCTTTATTGCCTCGCCATACTAGGCTC 240
 GGCCTTTTCGACGGGAACTCGGATAGGCTTCTGTAAAACCATCCCCGTTGAAGAGAGACT 300
 CGTGGCTGAAATAACCACCCCATTAATGGAAAAAATTCGCTCACCCGCGAGTCCAATCAGA 360
 M E K I R S P A V Q S D

TGCACTGCAGGTTTTTAAATCAGCACTTGCTGCGACAGTCACGTGGTGGATTTCGGTTAA 420
 A L Q V F K S A L A A T V T W W I S V N

CCTCCTTAACCTCCCAACTACCCTTTTTAGCTCCCTGGGTAGCGTTAATGACGATGCAATT 480
 L L N S Q L P F L A P W V A L M T M Q F

CACCGTCTACCACACCTTTATCAGTGAATTCAGACTGCAATTGCTTCTGTTCATCGGAGT 540
 T V Y H T F I S G I Q T A I A S V I G V

TGGACTTTCCTTTGTCATAGGCACTTACTTAGACGTCAGTGTGTGGACTTTTGGCCTTGC 600
 G L S F V I G T Y L D V S V W T F G L A

AATGGTCATAGGATTAATAGGTGCACGAGTACCAAAGCTCCGCGCGGAAGGAATAGGTAT 660
 M V I G L I G A R V P K L R A E G I G I

TGCTACTACATCCATTTTCTTCTTGCCTCCGGGTTTGATGATCAACAACCCCTTCTATA A T T S I F L L A S G F D D Q Q P L L Y	720
CGACCGTATTTTAGAGATCCTGCTCGGCGTGGCTGTTGCCATAGCCATCAACCTCATCAT D R I L E I L L G V A V A I A I N L I I	780
CTTTCCTCCCTTACGCGACCAGGAGGCAAACATGGTGGTAGGAACTTAGATCGGAGGAT F P P L R D Q E A N M V V G N L D R R M	840
GGGTGAGGTTTACAAAAAATGGCCGATGAGCTTGCAGAAAAGTGGAATATCGACAATGC G E V L Q K M A D E L A E K W N I D N A	900
AGATGAGTGGCTGGAAGAAATTAATTCTATTAACAATGACCTAGAAAAAGCGTGGCACTC D E W L E E I N S I N N D L E K A W H S	960
CGTGCGGTTGCTCGCGAAAGCCGTCGAGTTAATCCTCGTAAATCCGCATCCAAGAGGG V R F A R E S R R V N P R K I R I Q E G	1020
CCGCCCCCAGCCTACGGAAACAAGTTATGAATCAAACCTCACCAGCATTGATGAAGGGAT R P Q P T E T S Y E S N L T S I D E G I	1080
CGCTCATTTACGCCACCTTGCCCGTACTCTTTCGTGATACCCCGATTATAGATTCCGACTG A H L R H L A R T L R D T P I I D S D W	1140
GGATCCAGTATTCAGCAACAGTGGGTATCCCTTATGCACGATGCCGGAGCTTTGCTCGC D P V F Q Q Q W V S L M H D A G A L L A	1200
AGATCCGAATCAGGAAATAGATCCTATCCGCGACCGGCTCTCTAAACTTTCAAGTGAGAT D P N Q E I D P I R D R L S K L S S E M	1260
GAGTGAGGATCAACAATTAACCTCAAAGAAGTGGCCTATCTATGGTTCTCTCCTCACCAG S E D Q Q L T S K K W P I Y G S L L T S	1320
TTTGTTTCACCTTTCTGCGCTTGCCGATGATGCTCTGACCACCAGAAAAACGGAAGATAA L F H L S A L A D D A L T T R K T E D K	1380
AGAGCATAATAGTTAAATTCGCCGTAATCATTTACAGCACTCACC GGCTATGTGTGAAAG E H N S stop	1440
TGGCATTACACAACCTCTCTTTTAGCCCAGAAGCTTCTGAACAAGAGTGTGTTGGTAACCAA T	1500
TCGGCCACGTCACAGTTGCCGGGTCTGACACTATCCCAGCCAGTTA	1547

thrE (Insert von pUC18*thrE*)*thrE*: Nukleotide 243 – 1709

CCCCTTTGACCTGGTGTATTGAGCTGGAGAAGAGACTTGAACTCTCAACCTACGCATTA	60
CAAGTGCCTTGCCTGCCAATTGCGCCACTCCAGCACCGCAGATGCTGATGATCAACAAC	120
TACGAATACGTATCTTAGCGTATGTGTACATCACAATGGAATTCGGGGCTAGAGTATCTG	180
GTGAACCGTGATAAACGACCTGTGATTGGACTCTTTTTCTTGCAAAATGTTTTCCAGC	240
GGATGTTGAGTTTTGCGACCCCTTCGTGGCCGCATTTCAACAGTTGACGCTGCAAAAGCCG	300
M L S F A T L R G R I S T V D A A K A A	
CACCTCCGCCATCGCCACTAGCCCCGATTGATCTCACTGACCATAGTCAAGTGGCCGGTG	360
P P P S P L A P I D L T D H S Q V A G V	
TGATGAATTTGGCTGCGAGAATTGGCGATATTTTGCTTTCTTCAGGTACGTCAAATAGTG	420
M N L A A R I G D I L L S S G T S N S D	
ACACCAAGGTACAAGTTGAGCAGTGACCTCTGCGTACGGTTTGTACTACACGCACGTGG	480
T K V Q V R A V T S A Y G L Y Y T H V D	
ATATCACGTTGAATACGATCACCATCTTCACCAACATCGGTGTGGAGAGGAAGATGCCGG	540
I T L N T I T I F T N I G V E R K M P V	
TCAACGTGTTTCATGTTGTAGGCAAGTTGGACACCAACTTCTCCAAACTGTCTGAGGTTG	600
N V F H V V G K L D T N F S K L S E V D	
ACCGTTTGATCCGTTCCATTCCAGGCTGGTGGCAGCCCCGCTGAGGTTGCCGAGAAAATCC	660
R L I R S I Q A G A T P P E V A E K I L	
TGGACGAGTTGGAGCAATCCCCTGCGTCTTATGGTTTCCCTGTTGCGTTGCTTGGCTGGG	720
D E L E Q S P A S Y G F P V A L L G W A	
CAATGATGGGTGGTGTCTGTTGCTGTGCTGTTGGGTGGTGGATGGCAGGTTTCCCTAATTG	780
M M G G A V A V L L G G G W Q V S L I A	
CTTTTATTACCGCTTCACGATCATTGCCACGACGTCATTTTTGGGAAAGAAGGGTTTGC	840
F I T A F T I I A T T S F L G K K G L P	
CTACTTTCTTCCAAATGTTGTTGGTGGTTTTATTGCCACGCTGCCTGCATCGATTGCTT	900
T F F Q N V V G G F I A T L P A S I A Y	
ATTCTTTGGCGTTGCAATTTGGTCTTGAGATCAAACCGAGCCAGATCATCGCATCTGGAA	960
S L A L Q F G L E I K P S Q I I A S G I	
TTGTTGTGCTGTTGGCAGGTTTGACACTCGTGCAATCTCTGCAGGACGGCATCACGGGGCG	1020
V V L L A G L T L V Q S L Q D G I T G A	
CTCCGGTGACAGCAAGTGCACGATTTTTCGAAACACTCCTGTTTACCGCGGCATTGTTG	1080
P V T A S A R F F E T L L F T G G I V A	

CTGGCGTGGGTTTGGGCATTCAGCTTTCTGAAATCTTGCAATGTCATGTTGCCCTGCCATGG G V G L G I Q L S E I L H V M L P A M E	1140
AGTCCGCTGCAGCACCTAATTATTCGTCTACATTCGCCCCGATTATCGCTGGTGGCGTCA S A A A P N Y S S T F A R I I A G G V T	1200
CCGCAGCGGCCTTCGCAGTGGGTTGTTACGCGGAGTGGTCCTCGGTGATTATTGCGGGGC A A A F A V G C Y A E W S S V I I A G L	1260
TTACTGCGCTGATGGGTTCTGCGTTTATTACCTCTTCGTTGTTTATTAGGCCCCGTCT T A L M G S A F Y Y L F V V Y L G P V S	1320
CTGCCGCTGCGATTGCTGCAACAGCAGTTGGTTTCACTGGTGGTTTGCTTGCCCCGTGAT A A A I A A T A V G F T G G L L A R R F	1380
TCTTGATTCCACCGTTGATTGTGGCGATTGCCGGCATCACACCAATGCTTCCAGGTCTAG L I P P L I V A I A G I T P M L P G L A	1440
CAATTTACCGCGAATGTACGCCACCCTGAATGATCAAACACTCATGGGTTTCACCAACA I Y R G M Y A T L N D Q T L M G F T N I	1500
TTGCGGTTGCTTTAGCCACTGCTTCATCACTTGCCGCTGGCGTGGTTTGGGTGAGTGGGA A V A L A T A S S L A A G V V L G E W I	1560
TTGCCCCGAGGCTACGTCGTCACCACGCTTCAACCCATACCGTGCAATTTACCAAGGCGA A R R L R R P P R F N P Y R A F T K A N	1620
ATGAGTTCTCCTTCCAGGAGGAAGCTGAGCAGAATCAGCGCCGGCAGAGAAAACGTCCAA E F S F Q E E A E Q N Q R R Q R K R P K	1680
AGAC ¹ TAATCAGAGATTTCGGTAATAAAAGGTAAAAATCAACCTGCTTAGGCGTCTTTTCGCT T N Q R F G N K R stop	1740
TAAATAGCGTAGAATATCGGGTCGATCGCTTTTAAACACTCAGGAGGATCCTTGCCGGGCC A A A T A G C G T A G A A T A T C G G G T C G A T C G C T T T T A A A C A C T C A G G A G G A T C C T T G C C G G C C	1800
AAAATCACGGACACTCGTCCCACCCAGAAATCCCTTCACGCTGTTGAAGAGGAAACCGCA A A A A T C A C G G A C A C T C G T C C C A C C C A G A A T C C C T T C A C G C T G T T G A A G A G G A A A C C G C A	1860
GCCG	1864

2. PCR- und Sequenzierung-Primer

2.1 Degenerierte Primer zur Identifizierung von *lta* und *glyA*

IUPAC-Code: K=(G/T), N=(A/C/G/T), R=(A/G), S=(C/G), Y=(C/T)

lta (Threoninaldolase)

forward-Primer:

TA-1	5'-GGN GAY GAY GTN TAY GGN GAN G-3'
TA-2	5'-GGN AAR GAR GCN GSN CTN TTC-3'

reverse-Primer:

TA-3	5'-CGT TGA ANA KNC GNG CNC CRT C-3'
TA-3.1	5'-CCN ACN GGN GYN CCN ARN CCY TT-3'
TA-3.2	5'-ACY TTN CCR TTR TGN GTR TTY TC-3'

glyA (Serinhydroxymethyltransferase)

forward-Primer:

SHMT-1	5'-GAY ATG GCN CAC TTC GCN GG-3'
SHMT-2	5'-CCN CAC GCN CAC GTN GTN AC-3'

reverse-Primer:

SHMT-3	5'-ACN ARG TGN ACR TCN GTN CC-3'
SHMT-4	5'-AGN CCN GAN GTN GTC ATN GG-3'

2.2 Primer zur Sequenzierung und Genamplifizierung

Standardprimer zur Sequenzierung

Universal	5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'
RSP	5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT G-3'

Primer zur Ansequenzierung der Transposoninsertionsorte

<i>EcoRI</i> -Primer	5'-CGG GTC TAC ACC GCT AGC CCA GG-3'
<i>XbaI</i> -Primer	5'-CGG TGC CTT ATC CAT TCA GG-3'

Primer zur vollständigen Sequenzierung von *thrE*

810-98-F1	5'-AGC AGT GAC CTC TGC GTA CG-3'
810-98-F2	5'-GGT TTG ACA CTC GTG CAA TC-3'
810-98-F3	5'-CTG AAT GAT CAA ACA CTC ATG-3'

810-98-R1 5'-GTG AAA CCA ACT GCT GTT GC-3'

810-98-R2 5'-GTG GCA ATG ATC GTG AAC G-3'

810-98-R3 5'-ACT TGA CTA TGG TCA GTG AG-3'

Primer zur Isolierung von *glyA*

glyA1-forw. 5'-GCT TGC AGC GTT TTG CTC TGC C-3'

glyA1-rev. 5'-ACC CGT AAC CTC TTC CAC ATA GG-3'

Primer zur Isolierung von *lacI^f-Ptac-glyA'* aus pVWEx2*glyA*

glyA2-forw. 5'-CCG GAA TTC TCA CTG CCC GCT TTC CAG TC-3'

mit angefügter, durch Unterstreichung gekennzeichneteter *EcoRI*-Erkennungssequenz

glyA2-rev. 5'-CGG GAT CCC AGC TTT CCG GAG AAG TTC AAC-3'

mit angefügter, durch Unterstreichung gekennzeichneteter *BamHI*-Erkennungssequenz

Primer zur Isolierung und Inaktivierung von *orf22*

orf22-1 5'-CCT GGC GTT ACT GGG ATT TGA TG-3'

orf22-2 5'-AGG AGA ACC CAC CGA GGA GGA GAT-3'

orf22-3 5'-TGG CCA CAA AGT CGC GGT AAT CC-3'

orf22-4 5'-GGC GCT TTG GTG CTT GGT TCT GT-3'

Primer zur Isolierung und Inaktivierung von *orf81*

orf81-1a 5'-TGC ACC CAC GAC CTC AAG-3'

orf81-2 5'-TAA CTG GCT GGG ATA GTG TCA GAC-3'

orf81-3 5'-ATC CTG CTC GGC GTG GCT GTT-3'

orf81-4 5'-CGG GCA AGG TGG CGT AAA TGA G-3'

Primer zur Isolierung von *thrE*

thrE-for. 5'-CCC CTT TGA CCT GGT GTT ATT G-3'

thrE-rev. 5'-CGG CTG CGG TTT CCT CTT-3'

3. Restriktionskarten der konstruierten Plasmide

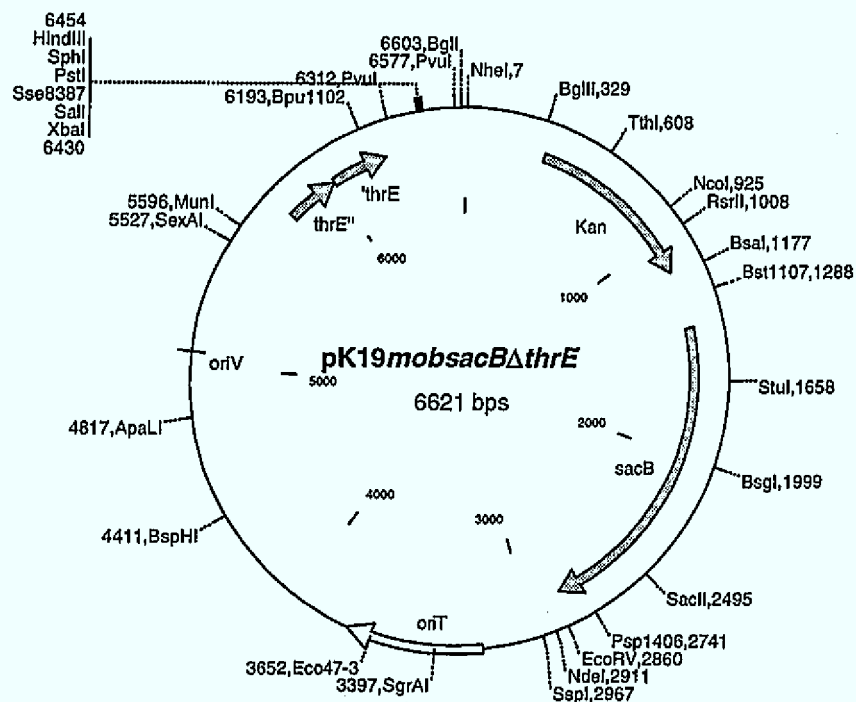


Abb. 36: Plasmid pK19mobsacBΔthrE (pK19mobsacB mit thrE-Sequenz, deletiert ist ein internes 968 bp EcoRI/SacII-Fragment von thrE)

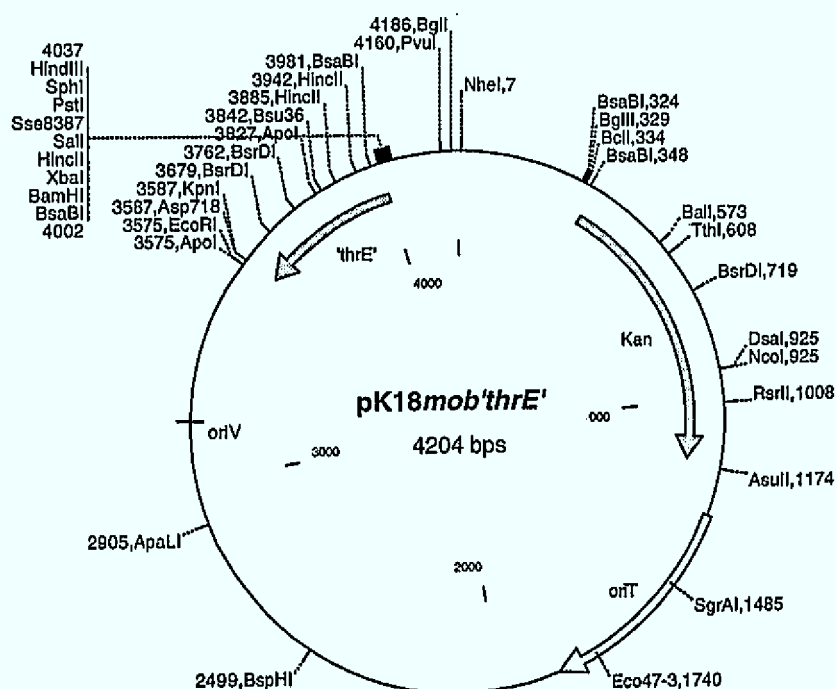


Abb. 37: Plasmid pK18mob'thrE' (pK18mob mit internem 411 bp thrE-Fragment)

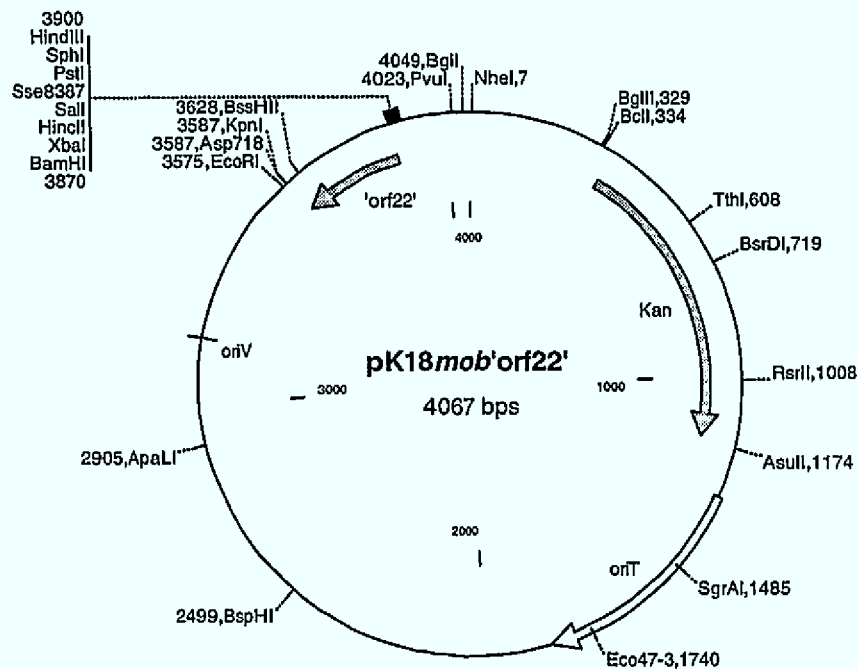


Abb. 38: Plasmid pK18mob'orf22' (pK18mob mit internem 274 bp orf22-Fragment)

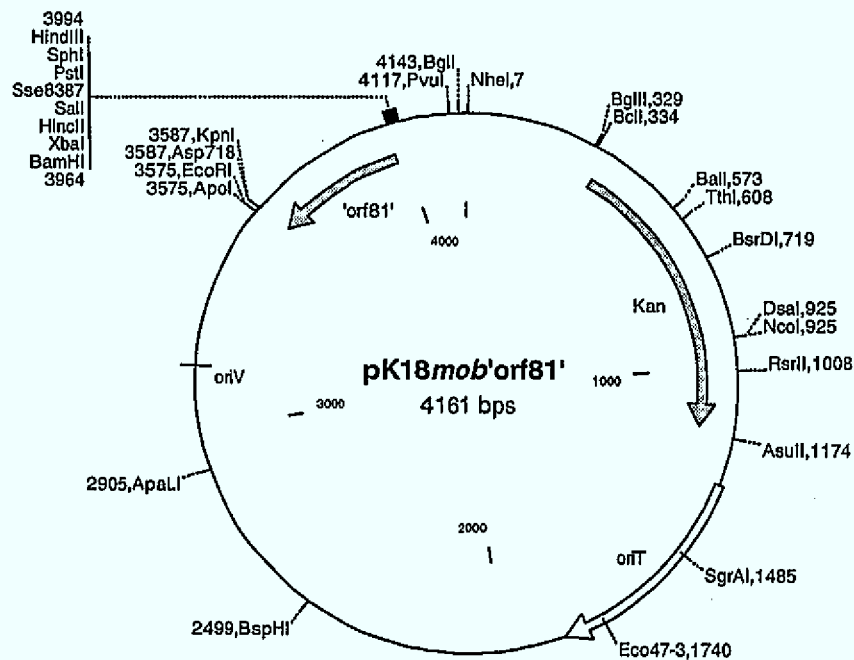


Abb. 39: Plasmid pK18mob'orf81' (pK18mob mit internem 368 bp orf81-Fragment)

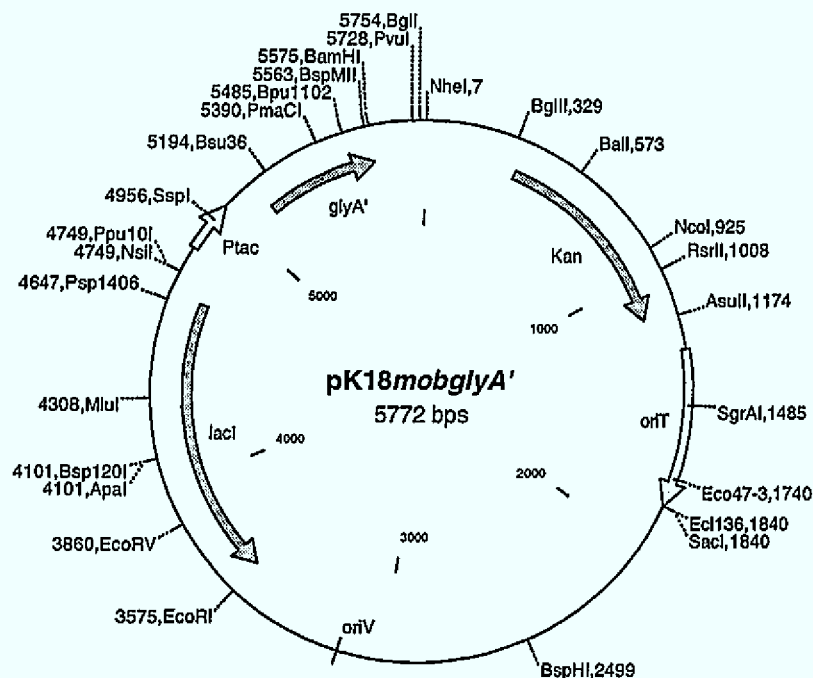


Abb. 40: Plasmid *pK18mobglyA'* (*pK18mob* mit 2,0 kb PCR-Fragment aus *pVWEx2glyA*, enthält *lacI*^r, *Ptac* und ein 5'-terminales 437 bp *glyA*-Fragment)

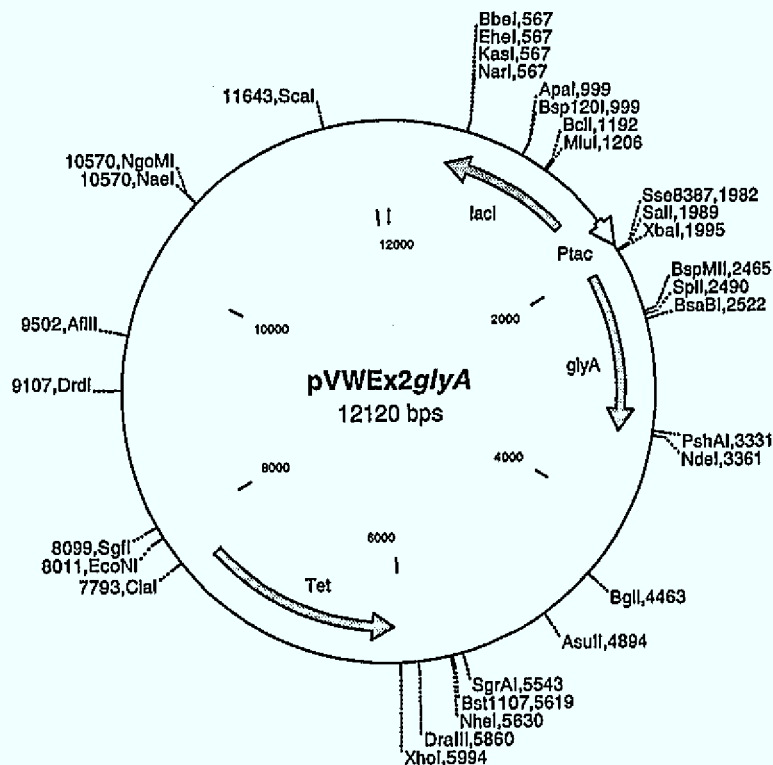


Abb. 41: Plasmid *pVWEx2glyA* (*pVWEx2* mit 1,4 kb *TfiI*/*EcoRI*-Insert aus *pUC18glyA*)

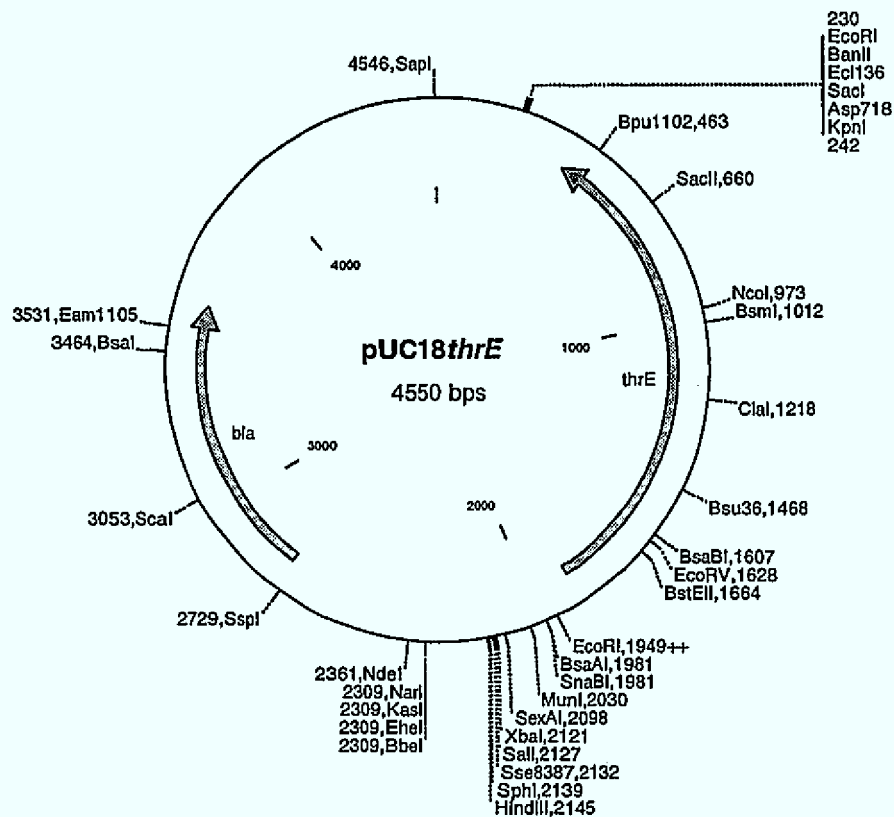


Abb. 42: Plasmid pUC18*thrE* (pUC18 mit 1,9 kb PCR-Fragment aus chromosomaler DNA von *C. glutamicum* ATCC13032, enthält *thrE*)

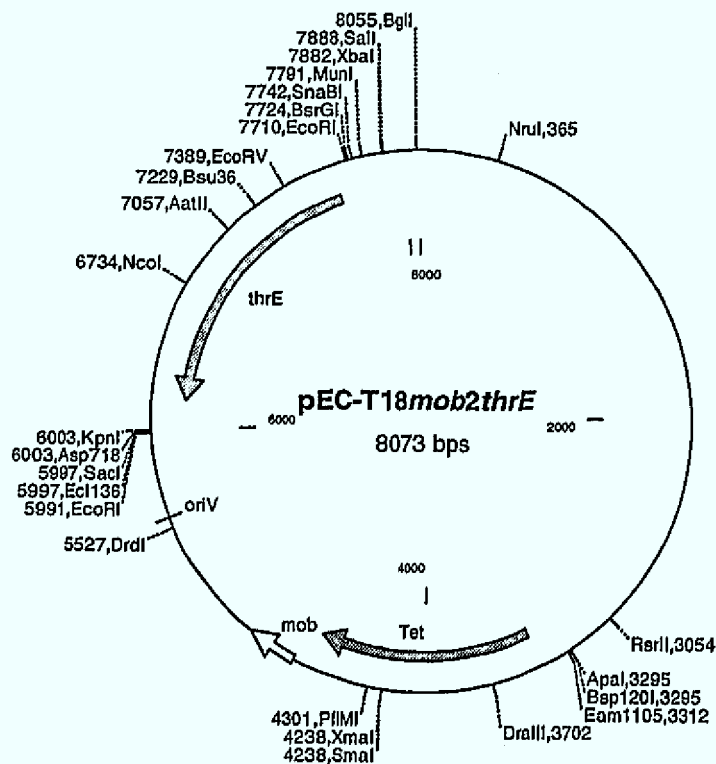


Abb. 43: Plasmid pEC-T18*mob2thrE* (pEC-T18*mob2* mit 1,9 kb *SacI/XbaI*-Insert aus pUC18*thrE*)

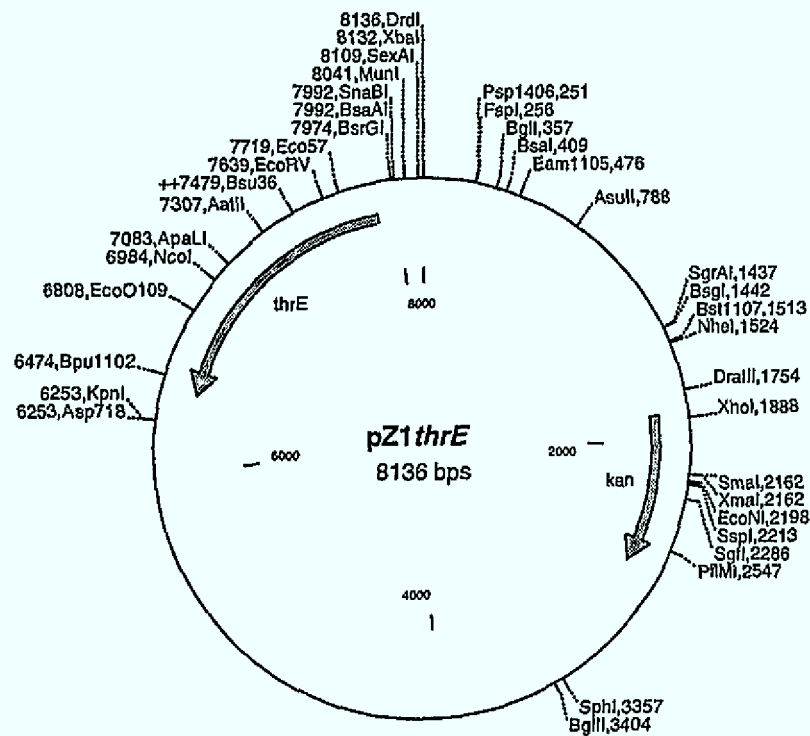


Abb. 44: Plasmid pZ1*thrE* (pZ1 mit 1,9 kb *SacI/XbaI*-Insert aus pUC18*thrE*)

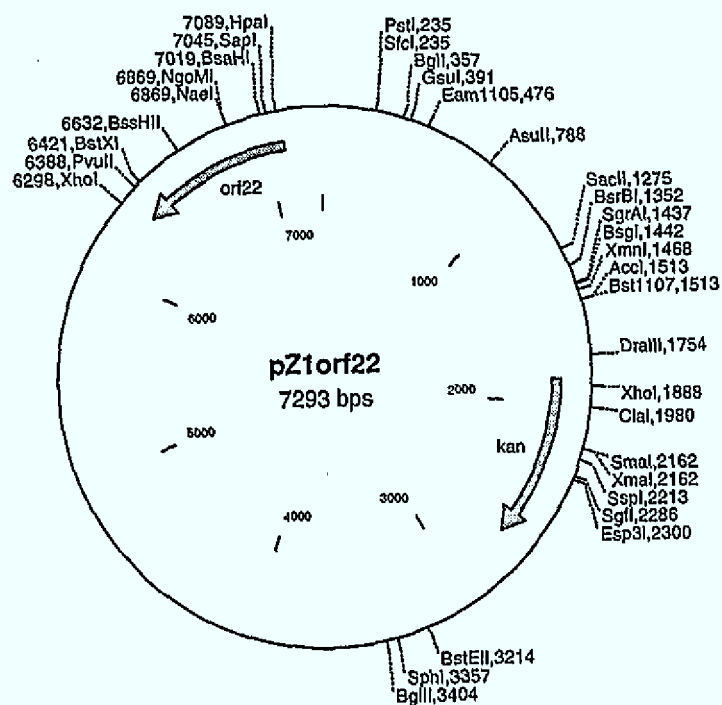


Abb. 45: Plasmid pZ1orf22 (pZ1 mit 1,0 kb PCR-Fragment chromosomaler DNA von *C. glutamicum* ATCC13032, enthält orf22)

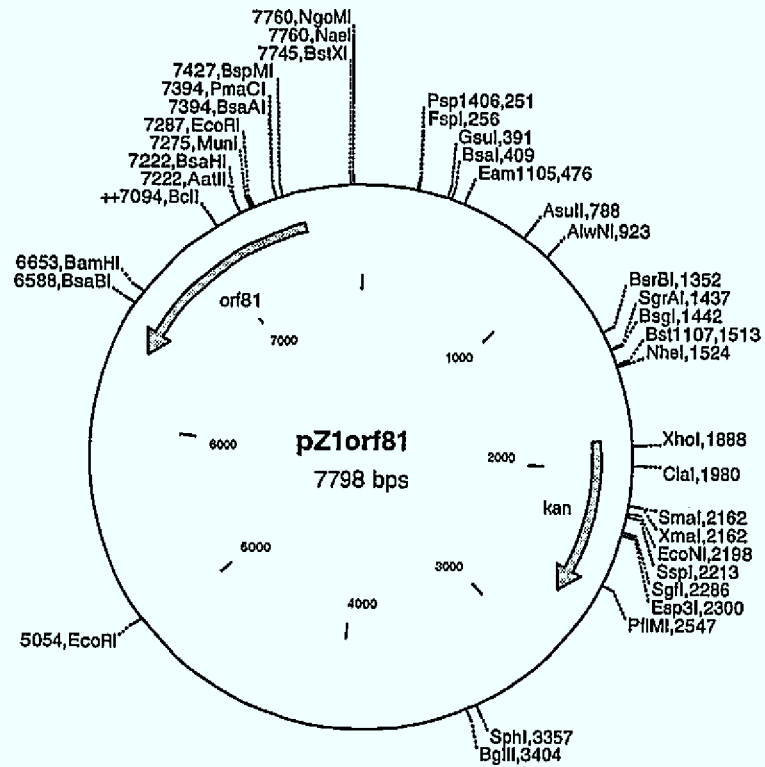


Abb. 46: Plasmid pZ1orf81 (pZ1 mit 1,5 kb PCR-Fragment chromosomaler DNA von *C. glutamicum* ATCC13032, enthält orf81)

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie 1 des Forschungszentrums Jülich angefertigt.

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

Herrn Prof. Dr. Westhoff danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Der Degussa-Hüls AG danke ich für die finanzielle Unterstützung und für das Interesse an dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Lothar Eggeling, der durch seine engagierte Betreuung, seine ständige Diskussionsbereitschaft und seinen unerschütterlichen Optimismus einen großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit trägt.

Bei allen Aminosauriern und verwandten Spezies (Anja B., Anja S., Doris, Eva, Frank, Juliane, Karin, Lothar, Madhavan, Marina, Nicole, Petra, Silke, Sören, Thomas, Udo, Uwe, Volker und Yvonne) möchte ich mich nicht nur für die gute Zusammenarbeit bedanken, sondern auch dafür, daß ich die Zeit in Jülich immer in angenehmer Erinnerung behalten werde.

Anja, Ines & Sigi danke ich für die abwechslungsreiche Abendgestaltung in Jülich und umzu (wie der Norddeutsche zu sagen pflegt). Bei Uwe & Yvonne bedanke ich mich für die fröhliche und freundschaftliche Büroatmosphäre; Dietmar & Arne gilt mein Dank für die vielen aufmunternden Flurdiskussionen und die Kaffeeverpflegung bei den Wochenend-Schichten.

Allen Mitarbeitern des Instituts danke ich für die freundliche Aufnahme, für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und für ihre stete Hilfsbereitschaft.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern dafür bedanken, daß sie mich immer in jeder Hinsicht unterstützt und ermutigt haben. Auf diese Weise haben sie sehr entscheidend dazu beigetragen, daß ich jetzt an dieser Stelle stehen kann. Mein besonderer Dank gilt auch Olli für sein Verständnis und für seine liebevolle Unterstützung.

Forschungszentrum Jülich



Jül-3816
Oktober 2000
ISSN 0944-2952