



KERNFORSCHUNGSANLAGE JÜLICH GmbH

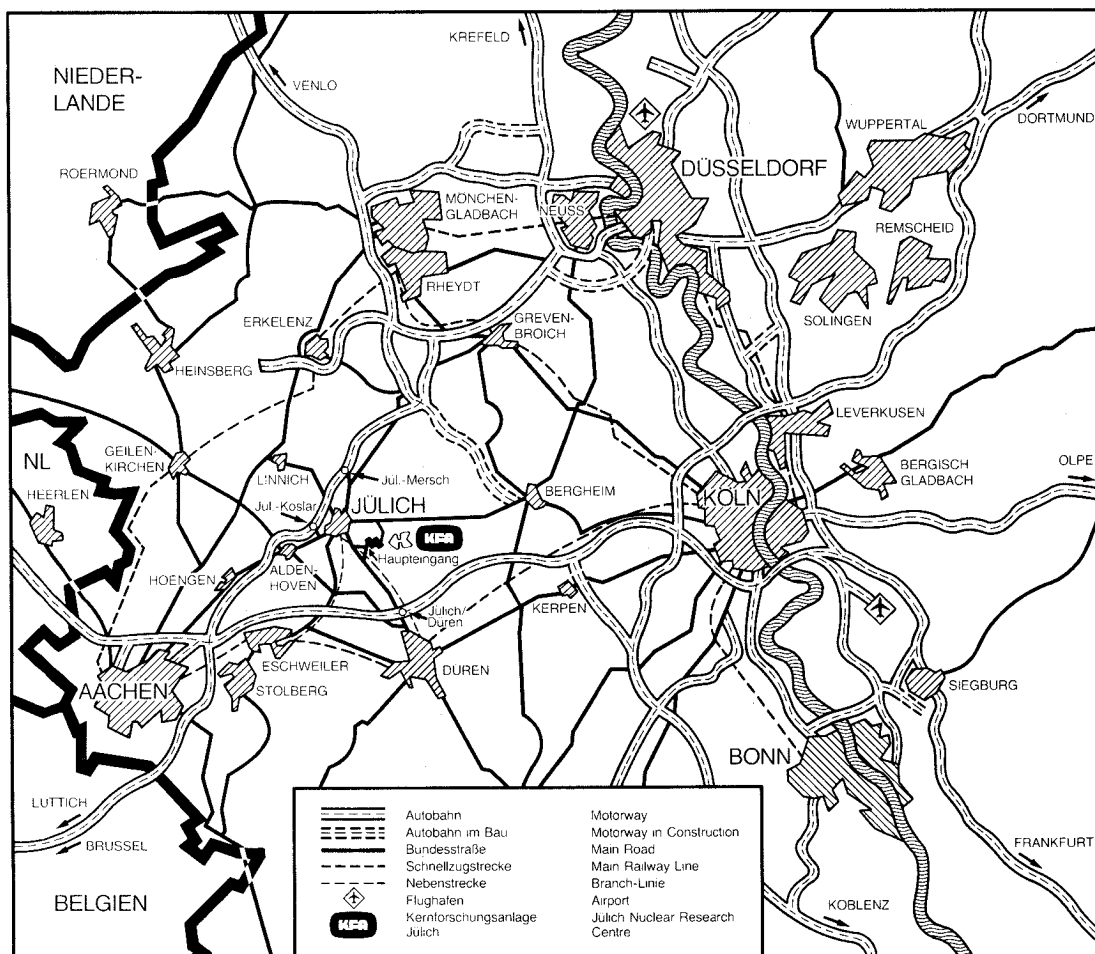
Institut für Biotechnologie

**Die Lysinbiosynthesesequenz in
Corynebacterium glutamicum:
Regulation, Klonierung und Bildung
von Lysin durch Genamplifikation**

von

Josef Cremer

**Jül-2291
Juli 1989
ISSN 0366-0885**



Als Manuskript gedruckt

Berichte der Kernforschungsanlage Jülich – Nr. 2291

Institut für Biotechnologie Jül-2291

D 61 (Diss. Uni. Düsseldorf)

Zu beziehen durch: ZENTRALBIBLIOTHEK der Kernforschungsanlage Jülich GmbH
Postfach 19 13 · D-5170 Jülich (Bundesrepublik Deutschland)
Telefon: 02461/610 · Telex: 833556-0 kf d

**Die Lysinbiosynthesesequenz in
Corynebacterium glutamicum:
Regulation, Klonierung und Bildung
von Lysin durch Genamplifikation**

von

Josef Cremer

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung.....	1
II	Material und Methoden.....	7
1.	Organismen und Plasmide.....	7
2.	Chemikalien.....	9
3.	Nährmedien, Kulturbedingungen und Puffer.....	10
4.	Bestimmung von Aminosäuren.....	14
5.	Herstellung von Rohextrakten.....	15
6.	Proteinbestimmung.....	16
7.	Bestimmung der Enzymaktivität im Rohextrakt.....	17
7.1.	Aspartatkinase.....	18
7.2.	L-Aspartat- β -semialdehyddehydrogenase.....	19
7.3.	Dihydrodipicolinatsynthase.....	20
7.4.	Dihydrodipicolinatreduktase.....	21
7.5.	Homoserindehydrogenase.....	22
8.	DNA Isolierung aus Bakterien.....	23
8.1.	Plasmidschnellisolierung aus <u>E. coli</u>	23
8.2.	Plasmidisolierung aus 1L Kulturen aus <u>E. coli</u>	24
8.3.	Plasmidschnellisolierung aus <u>C. glutamicum</u>	25
8.4.	Plasmidisolierung aus 1 L Kulturen aus <u>C. glutamicum</u>	26
8.5.	CsCl-Dichtegradientenzentrifugation.....	27
8.6.	Isolierung chromosomaler DNA aus Bakterien.....	28
9.	Analyse und Rekombination von DNA.....	28
9.1	Restriktion v. DNA u. alkalische Phosphatasebehandlung.....	28
9.2.	Auffüllen überstehender Enden mit Klenow-Fragment.....	29
9.3.	Ligation.....	29
9.4.	Ethanolpräzipitation.....	30
9.5.	Fragmentierung von DNA mit ELUTIP-d.....	30
9.6.	Transformation von kompetenten <u>E. coli</u> Zellen.....	31
9.7.	Transformation von osmotisch sensitiven <u>C. glutamicum</u> Zellen.....	33
9.8.	Transfer von DNA nach Southern.....	34
9.9.	Nichtradioaktive Markierung von DNA, Hybridisierung und Immunoassay zum Nachweis der Markierung.....	35
9.10.	In vitro Verpackung von DNA.....	37
9.11.	Agarosegelelektrophorese.....	38

9.12. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	39
---	----

III Ergebnisse.....42

1. Regulation der Lysinbiosynthese bei <u>C. glutamicum</u>	42
1.1. Wachstumsabhängigkeit der Enzymaktivitäten der Enzyme der Lysinbiosynthesesequenz ab Aspartat.....	42
1.2. Regulation der Enzymmenge.....	43
1.3. Regulation der Enzymaktivität.....	44
1.4. Einfluß des Leucins auf die Bildung der DDP-Synthase bei ruhenden Zellen.....	46
2. Subklonierung und Expression heterologer Lysinbio- synthesegene in <u>C. glutamicum</u>	47
2.1. Subklonierung des <u>asd-</u> , <u>dap A-</u> und <u>dap B-</u> Gens aus <u>E.</u> <u>coli</u> in den Pendelvektor pZ1.....	47
2.2. Hemmung der DDP-Synthase aus <u>E. coli</u> durch L- Lysin und der Vergleich der pH-abhängigkeit der DDP-Synthasen...	50
2.3. Einfluß der Überexpression von Lysinbiosynthesegenen aus <u>E. coli</u> in <u>C. glutamicum</u> DG 52-5 auf die Lysin- bildung.....	52
3. Klonierung d.Lysinbiosynthesegene aus <u>C. glutamicum</u> ...	53
3.1. Aufbau einer <u>C. glutamicum</u> ATCC 13032 Cosmidgenbank mit pHC 79 in <u>E. coli</u>	54
3.2. Überprüfung der DAP-auxotrophen <u>E. coli</u> Stämme auf Eignung zur Komplementation.....	55
3.3. Konstruktion eines Pendelvektors für <u>C. glutamicum</u> / <u>E.</u> <u>coli</u> und dessen Weiterentwicklung zum Promotorsuch- vektor.....	56
3.4. Klonierung und Restriktionskartierung der <u>lys C/asd</u> Cluster mit reguliertem und dereguliertem <u>lys C</u>	60
3.5. Deletionsanalyse des <u>lys C/asd</u> Operons mit deregu- liertem <u>lys C</u>	61
3.6. Organisation des <u>lys C/asd</u> Operons.....	63
3.7. Klonierung, Restriktionskartierung und Deletionsanalyse des <u>dap A/B</u> Clusters aus <u>C. glutamicum</u>	64
3.8. Nachweis der Herkunft der klonierten Gene durch Hybri- disierung mit chromosomaler DNA.....	66
3.9. Identifizierung des DDP-Reduktase Proteins durch SDS- Polyamidgelelektrophorese.....	68

3.10.	Subklonierung des <u>ddh</u> Gens aus <u>C. glutamicum</u> in den Pendelvektor pZ1 und Amplifikation der Diaminopimelat-dehydrogenase in <u>C. glutamicum</u>	69
3.11.	Expression der <u>C. glutamicum</u> Lysinbiosynthesegene in den <u>C. glutamicum</u> Modellstämmen.....	69
3.12.	Stabilität der Konstrukte in <u>C. glutamicum</u>	70
4.	Fermentation der rekombinanten <u>C. glutamicum</u> Stämme...	72
4.1	Einfluß der Überexpression einzelner Gene auf die Lysinbildung des Wildtyps ATCC 13032.....	72
4.2.	Substratkonkurrenz der DDP-Synthase und Hom-DH um den L-Aspartat- β -semialdehyd.....	73
4.3.	Einfluß der Überexpression einzelner Lysinbiosynthesegene auf die Lysinbildung des AEC-resistenten Stammes DG 52-5.....	74
4.4.	Einfluß der Überexpression einzelner Lysinbiosynthesegene auf die Lysinbildung des Produzentenstammes MH20 22B.....	75
4.5.	Konstruktion des <u>lys C_D</u> - und <u>dap A</u> tragenden Pendelvektors pJC 50 und der Einfluß der gemeinsamen Überexpression auf die Lysinbildung von <u>C. glutamicum</u> ATCC 13032 und DG 52-5.....	76
IV	Diskussion.....	79
V	Zusammenfassung.....	87
VI	Literatur.....	88

Abkürzungen

a	Jahr
AEC	S-(α -Aminoethyl-)Cystein
Ala	Alanin
Ap ^r	Ampicillinresistenz
ASA	Aspartat-semialdehyd
CFU	Colony Forming Unit
Cm ^r	Chloramphenicolresistenz
CsCl	Caesiumchlorid
DDP	Dihydrodipicolinat
E	Extinktion
EMK	Erlenmeyerkolben
ERG	Eppendorfreaktionsgefäß
g	Gramm
h	Stunde
Hom	Homoserin
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
Kn ^r	Kanamycinresistenz
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
Leu	Leucin
Lsg	Lösung
Lys	Lysin
Met	Methionin
min	Minute
NADP	β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NADPH	-"- (reduzierte Form)
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
rpm	return per minute
RT	Raumtemperatur
t	Tonnen
Tc ^r	Tetracyclinresistenz
U	Unit

I Einleitung

L-Lysin - eine essentielle Aminosäure - hat als Futtermittelzusatz in der Tierernährung und als Bestandteil von Infusionslösungen im medizinischen Bereich eine große wirtschaftliche Bedeutung gefunden (Kleemann et al., 1983). Die Lysinjahresproduktion von ca. 80.000 t wird über fermentative Verfahren hergestellt, in denen Melasse oder Stärkehydrolysate als Substrate dienen.

In den mikrobiellen Verfahren werden ausschließlich die Gram positiven, coryneformen Bakterien Corynebacterium glutamicum, Brevibacterium lactofermentum und Brevibacterium flavum eingesetzt. Für die Biosynthese des Lysins in diesen coryneformen Bakterien wurde ein Syntheseweg vorgeschlagen (Misono et al., 1979), in dem ausgehend von Aspartat durch Phosphorylierung Aspartylphosphat und durch Reduktion des Aspartylphosphats mit NADPH L-Aspartat- β -semialdehyd entsteht. Vom L-Aspartat- β -semialdehyd zweigt über Homoserin der Syntheseweg zum Threonin, Methionin und Isoleucin ab (Abb. 1).

Zur Lysinsynthese wird der Aldehyd nach Kondensation mit Pyruvat zu Dihydrodipicolinat (DDP) durch Reduktion des DDP mit NADPH zu Piperidein-2,6-dicarboxylat (THDP) umgewandelt. THDP steht im tautomeren Gleichgewicht mit L-2-Aminoketopimelat. Vom Aminoketopimelat sind zwei Wege bekannt die zum m-Diaminopimelat führen. Bei dem ersten Weg wird in einem Schritt Aminoketopimelat durch die Diaminopimelatdehydrogenase direkt reduktiv aminiert. Dieser Weg wird bei Bacillus subtilis beschritten (White, 1983).

Im zweiten Weg entsteht Diaminopimelat in vier enzymatischen Schritten, so wie es für E. coli gezeigt wurde (Gilvarg et al., 1959, 1960, 1984).

Für C. glutamicum konnte die Existenz des ersten Weges klar aufgezeigt werden (Misono et al., 1979). Dagegen wurde der zweite Wege in C. glutamicum nur aufgrund komplizierter Messungen zweier daran beteiligter Enzyme postuliert (Tosaka, et al., 1978d).

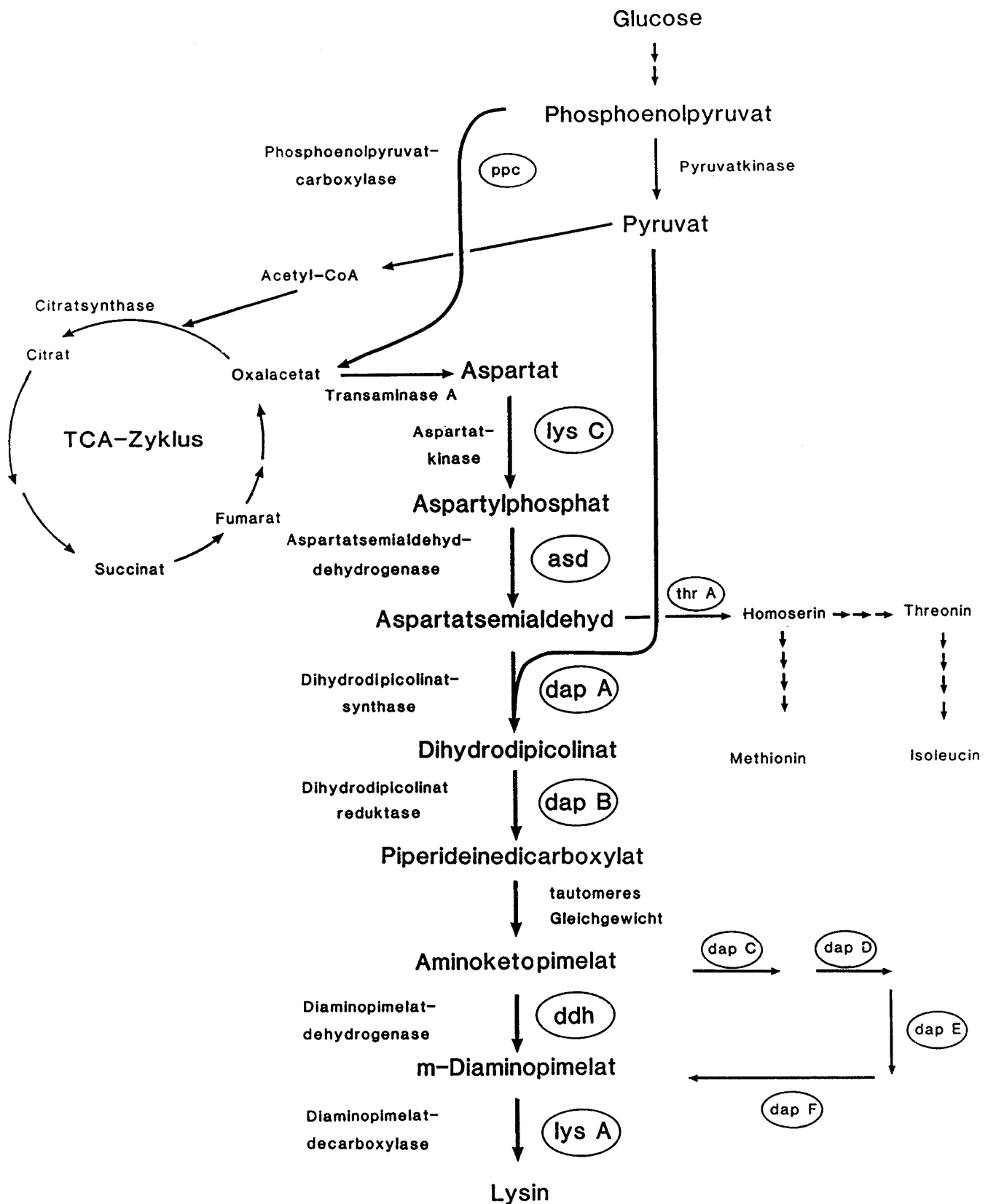


Abb. 1 : Die Lysinbiosynthese bei C. glutamicum

In E. coli kodiert: dap C die Aminoketopimelatsuccinylase, dap D die Succinyldiaminopimelataminotransferase, dap E die Succinyldiaminopimelatdesuccinylase, dap E die Diaminopimelatepimerase

Die Regulation der Lysinbiosynthese in C. glutamicum unterscheidet sich deutlich von dem für E. coli (Patte, 1983) gezeigten Regulationsmodus. Im Gegensatz zu E. coli mit drei Isoenzymen wurde in C. glutamicum nur eine einzige Aspartokinase nachgewiesen. Dieses erste Enzym des gemeinsamen Syntheseweges der Aminosäuren der Aspartatfamilie ist die wichtigste Regulationstelle der Lysinsynthese. Hier wird der Fluss des Kohlenstoffs in die Sequenz über eine konzertierte Feedbackinhibition durch Lysin und Threonin reguliert (Shio et al., 1969 ; Miyajiwa et al., 1971). In E. coli wird zusätzlich die Dihydrodipicolinatsynthase als erstes lysinspezifisches Enzym durch Lysin inhibiert (Gilvarg et al., 1962 ; Richaud et al., 1986).

Eine solche Endprodukthemmung durch Lysin wurde in C. glutamicum und B. lactofermentum nicht gefunden (Tosaka et al., 1978a). Hingegen wird berichtet, daß die DDP-Synthase durch Leucin reprimiert wird (Tosaka et al., 1978d). Diese Repression eines Lysinbiosynthesegens wurde über eine Interaktion mit der Leucinsynthese erklärt. Demnach fördert Lysin die Leucinsynthese durch Reversion der Leucininhibition des ersten leucinspezifischen Enzyms α -Iso-propylmalatsynthase (Tosaka et al., 1978d). Weitere Regulationsmechanismen sind nicht bekannt.

Unter Kenntnis des Ende der 70er Jahre gewonnenen Regulationsmodells der Lysinbiosynthese sind über klassische Mutageneseverfahren eine Reihe auxotropher und regulatorisch defekter C. glutamicum und B. lactofermentum Stämme isoliert worden, die in der Lage sind, Lysin in das Fermentationsmedium auszuscheiden. Notwendige Bedingung für die Lysinausscheidung ist stets die Ausschaltung der konzertierten Feedbackinhibition der Aspartatkinase, entweder durch Veränderung deren regulatorischer Eigenschaften (AEC^R , ML^R , CCL^R , AHV^R) oder durch Einführung von Auxotrophien, die die Threoninbildung unterbinden (Hom^- , Thr^-). Begleitend dazu wurden Stämme isoliert, bei denen durch Ausschaltung oder Herabsetzung konkurrierender Biosynthesewege (Cs^- , Ala^- , Leu^- , FP^S) der Fluß der Metabolite in Richtung Lysin begünstigt ist (s. Tab 1). Die Interpretation, der mit diesen durch Mutation entstandenen Produktionsstämmen erreichbaren

Lysinausscheidung muß unter Vorbehalt geschehen. Denn die Einführung solcher zusätzlichen Auxotrophien oder Regulationsmutationen führt nicht zwingend zur Produktionssteigerung (Shiio, 1970). Erst die anschließende Selektion solcher Mutanten auf vermehrte Lysinsekretion führte zu den gern gezeigten sukzessiven Produktionssteigerungen. Es ist daher durchaus möglich, daß in diesen auf Produktion selektierten Stämmen auch andere für die Lysinausscheidung wichtige Genorte mutiert sind (Energieversorgung, Transport).

Tabelle 1: C. glutamicum und B. lactofermentum Mutanten und deren Lysinausscheidungsvermögen

Stamm	Phänotyp	Lysin (g/l)	Referenz
<u>C. glutamicum</u>			
ATCC 13032	Wildtyp	0	Nakayama et al., 1973
ATCC 13032	Hom ⁻	29	- "-
ATCC 13032	Hom ⁻ , Leu ⁻	35	- "-
ATCC 13032	Hom ⁻ , Leu ⁻ , AEC ^R	39	- "-
<u>B. lactofermentum</u>			
AJ 1511	Wildtyp	0	Tosaka et al., 1983
AJ 3445	AEC ^r	16	- "-
AJ 3434	AEC ^r , Ala ⁻	33	- "-
AJ 11214	AEC ^r , Ala ⁻ , CCL ^r ML ^r , FP ^S	48	- "-

AHV: α -Amino- β -hydroxyvalerat, CCL: α -Chlorocaprolactam

FP: β -Fluoropyruvat, ML: Γ -Methyllysin

Solche nicht kontrollierbaren Einflüsse einer unspezifischen Mutagenese sind bei Einsatz der rekombinanten DNA Technik ausgeschlossen. Mit Hilfe dieser Technik ist es erstmals möglich, gezielte Veränderungen am Biosyntheseweg vorzunehmen und die Auswirkungen dieser einzigen "Mutation" zu studieren. Es wurde daher seit Mitte der achziger Jahre an der Einführung gentechnischer Methoden für C. glutamicum gearbeitet. Grundlage solcher Arbeiten war die Etablierung von Transformationssystemen und Konstruktion von in C. glutamicum replizierbaren und selektionierbaren Plasmiden.

Aus C. glutamicum wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen 3.0 kb große kryptische Plasmide isoliert: pHM1519 (Miwa et al., 1984), pCG1 (Ozaki, et al., 1984) und pSR1 (Yoshihama et al., 1985) die sich nach Vergleich des Restriktionsmusters als identisch erwiesen. Auf der Basis dieses Replicons wurden Vektoren konstruiert, wie pWST1 (Peoples et al., 1987) oder auch, der durch Fusion von pHM1519 mit pACYC 177 entstandene E. coli/C. glutamicum Pendelvektor pZ1 (Menkel et al., 1989).

Ein Pendelvektor bietet den Vorteil, daß viele in C. glutamicum kritische gentechnische Operationen mit den effizienteren E. coli Methoden durchgeführt werden können. Nach Abschluß der Konstruktion in E. coli können diese dann unverändert nach C. glutamicum übertragen werden.

Da C. glutamicum weder über eine natürliche noch induzierbare Kompetenz verfügt, wurden Transformationstechniken entwickelt, die eine PEG vermittelte DNA-Aufnahme ermöglichen (Yoshihama et al., 1985; Martin et al., 1987). Die dabei erreichten maximalen Transformationsraten von ca. 10^4 CFU/ μ g DNA liegen deutlich niedriger, als die für E. coli beschriebenen Transformationsraten mit 10^8 CFU/ μ g DNA (Hanahan, 1983). In jüngster Zeit wurde ein für Streptomyceten entwickeltes Konjugationssystem auf C. glutamicum übertragen, das die Mobilisierung entsprechender Vektoren (pSUP 104-Derivate, Simon et al., 1983) von E. coli nach C. glutamicum mit hoher Rate erlaubt.

Durch Einsatz der inzwischen etablierten gentechnologischen Methoden für C. glutamicum bieten sich verschiedene Möglichkeiten zur gezielten Manipulation der Lysinsynthese

an. Es ist dies die Expression heterologer Gene in C. glutamicum, die neue sonst nicht vorhandene Reaktionswege eröffnen (Menkel, et al., 1989) oder bereits vorhandene Enzyme verstärken (Cremer et al., 1988). Ferner besteht die Möglichkeit durch Integration defekter homologer Gene, die Auswirkung der gezielten Limitation von Konkurrenzreaktionen zu untersuchen. Darüberhinaus kommt natürlich auch die Überexpression der Syntheseeenzyme durch die entsprechenden homologen Gene in Betracht, über deren molekulare Organisation nur wenig bekannt ist.

Ziel dieser Arbeit war die umfassende Untersuchung der Regulation aller Enzyme die an der Umwandlung von Aspartat zu Lysin beteiligt sind. Darüber hinaus sollten die für die Syntheseeenzyme kodierenden Gene aus C. glutamicum kloniert werden. Durch gezielte, individuelle Überexpression dieser zu klonierenden Gene, sollten die enzymatischen Limitationen der betrachteten Sequenz bezüglich der Lysinausscheidung aufgezeigt werden.

II Material und Methoden

1. Organismen und Plasmide

In der vorliegenden Arbeit wurden zum Aufbau der Genbank und zur Klonierung der Lysinbiosynthesegene verschiedene E. coli Stämme verwendet. Eine Übersicht dieser Stämme gibt Tabelle 2

Tabelle 2: Verwendete E. coli Stämme und deren chromosomale Marker nach Bachmann et al., 1983

Stamm	chromosomale Marker	Herkunft
AT 999	thi-1, relA 1, <u>dap B</u> 17: Mu,	Bukhari et. al., 1971
RDA 8	thi-, ara D 139, d(argF-lac)169, str.A, <u>dap A</u> : Mu.	Richaud et al., 1981
RASA 51	thi-, ara D 139, d(argF-lac)169, str. A, <u>asd</u> : Mu.	-"
ED 8767	sup E, sup F, hsd S ⁻ , met, rec A 56	Murray et al., 1977
DH 5	thi-1, F ⁻ , end AR 1, hsd R 17 (r ⁻ ,m ⁻) sup E 44, rec A 1, gyr A 96, rel A 1.	D. Hanahan 1985

ara D : defekt in der Arabinoseverwertung
 dap B 17 : Mu :Insertion des Phagen Mu in dap B Allel Nr 17
 end AR 1 : defekt in der DNA-spezifischen Endonuklease I
 gyr A 96 : defekt in der Gyraseuntereinheit A
 rec A 1 : defekt in genereller Rekombination und Reparatur
 relA : relaxierte Kontrolle der tRNA- und rRNA-Synthese
 str. A : Streptomycinresistenz
 sup E,F : Supressormutationen für Glutamin/Tyrosin
 thi- : Thiaminauxotrophie

Für die Untersuchungen zur Regulation der Lysinbiosynthese wurden verschiedene Stämme von C. glutamicum und Brevibacterium lactofermentum verwendet die in Tabelle 3 aufgelistet sind.

Tabelle 3: Die in dieser Arbeit verwendeten C. glutamicum und Brevibacterium lactofermentum Stämme

Stamm	Phänotyp
<u>C. glutamicum</u> ATCC 13032	Wildtyp
<u>C. glutamicum</u> ATCC 13287	Hom ⁻
<u>C. glutamicum</u> ATCC 14310	Leu ⁻
DG 52-5	AEC ^r
MH 20	AEC ^r
MH 20 22B	AEC ^r , Leu ⁻
<u>B. lactofermentum</u> ATCC 13869	Leu ⁻
<u>B. lactofermentum</u> IQT 601	AEC ^r

Der mit DG bezeichnete Stamm und die Brevibacterienstämme wurden von den Asta-Werken zur Verfügung gestellt. Die mit MH gekennzeichneten Stämme hat Michael Herscheid während seiner Diplomarbeit am Institut für Biotechnologie 1 isoliert.

Die für die molekulargenetischen Arbeiten verwandten Plasmide sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: verwendete Plasmide

Plasmide	Größe	Marker	Wirt(e)	Referenz
pBR 322	4,6 kb	Ap ^r /Tc ^r	<u>E. coli</u>	Bolivar (1977)
pUC 9,18,19	2,7 kb	Ap ^r	<u>E. coli</u>	Messing (1982)
pHC 79	6,5 kb	Ap ^r /Tc ^r	<u>E. coli</u>	Hohn (1980)
pZ 1	6,9 kb	Ap ^{r*} /Kn ^r	<u>E. coli</u> / <u>C. glu.</u>	Menkel (1989)
pJC 1	6,0 kb	Kn ^r	<u>E. coli</u> / <u>C. glu.</u>	Cremer (1988)
pJC 3	6,9	Kn ^r /Cm ^{r*}	<u>E. coli</u> / <u>C. glu.</u>	Cremer (1988)
pUL 330	5,2	Kn ^r	<u>C. glu.</u>	Martin (1985)

*Die Chloramphenicolresistenz in pJC 3 wird ohne zusätzlichen Promotor nicht abgelesen. (Promotorsuchvektor)

*Die Ampizillinresistenz auf pZ 1 wird zwar in beiden Wirten exprimiert kann aber wegen der Exportbarriere nur für E. coli benutzt werden (Thierbach, persönliche Mitteilung 1986).

2. Chemikalien

Soweit nicht anders aufgeführt, wurden p.a. Chemikalien der Firma Merck AG, Darmstadt verwendet.

Benson Co. Reno, USA

Aminosäure-Standard Typ H

Bethesda Research Laboratories

Agarose

Caesiumchlorid

Boehringer GmbH, Mannheim

Alkalische Phosphatase

DNA Labeling and Detection Kit Nonradioaktiv

DNA Packaging Kit

DNA Ligase T4

β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid (oxidiert)

β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduziert)

Restriktionsendonukleasen

Degussa AG, Hanau

L-Aspartat- β -semialdehyd

Difco Laboratories Detroit, USA

Bacto-Agar

Bacto-Pepton

Bacto-Trypton

Casaminoacids

Yeast-Extrakt

Du Pont

Geen Screen Plus Hybridisation Transfer Membrane

Schleicher und Schüll

ELUTIP-d

Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg

Brenztraubensäure

Polyethylenglycol

Sigma, München

S-(2-Aminoethyl)-L-Cystein

Lysozym L 6876

3. Nährmedien, Kulturbedingungen und Puffer

Für die Kultivierung der Bakterien wurden folgende Medien verwendet.

Vollmedium für C. glutamicum
(Kase et al., 1972)

C. glu. III Medium

Pepton	10,0	g/l	
Yeast-Extrakt	10,0	g/l	
NaCl	2,5	g/l	
Glukose	20,0	g/l	(getrennt autoklaviert)
pH 7,4 wird mit 4 N NaOH eingestellt			

Minimalmedium für Platten
(modifiziert n. Kase et al., 1972)

C. glu. IX Medium

(NH ₄) ₂ SO ₄	5,0	g/l	
Harnstoff	1,0	g/l	
KH ₂ PO ₄	1,0	g/l	
K ₂ HPO ₄	3,0	g/l	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,25	g/l	
CaCl	0,01	g/l	
Agar	15,0	g/l	
Spurensalze	1 ml	Stammlösung	
pH 6,8			
nach dem Autoklavieren zugeben			
Biotin	1 ml	Stammlösung	
Glukose	5,0	g/l	

Fermentationsmedium für C. glutamicum**C. glu. X Medium**

(modifiziert n. Kase et al., 1972)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	20,0 g/l
KH_2PO_4	0,5 g/l
K_2HPO_4	0,5 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,25 g/l
Spurensalze	1 ml Stammlösung
pH 6,8	
nach dem Autoklavieren zugeben	
Biotin	1 ml Stammlösung
Glucose	40,0 g/l
CaCO_3	20,0 g/l

Regenerationsagar für osmotisch sensitive C. glutamicum Zellen
(Yoshihama et al., 1985)

Trypton	10,0 g/l
Yeast-Extrakt	5,0 g/l
NaCl	10,0 g/l
Sorbit	102,0 g/l
Bacto-Agar	15,0 g/l
pH 7,5 mit 1 N NaOH einstellen	
nach dem Autoklavieren	
MgCl_2	20 ml 1 M Stammlösung
CaCl_2	20 ml 1 M Stammlösung

Sphaeroplastierungsmedium MMYE (Santamaria et al., 1985)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10,0 g/l
Harnstoff	3,0 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,4 g/l
NaCl	0,05 g/l
Yeast-Extrakt	1,0 g/l
Spurensalze	1 ml Stammlösung

Die Substanzen wurden in 970 ml Aqua dest. gelöst und in Portionen zu 97 ml im 500 ml EMK mit Schikanen autoklaviert. Nach der Sterilisation wurden die getrennt autoklavierten Komponenten zugegeben.

Glucose	10,0 g/l
K_2HPO_4	1,0 g/l
Biotin	100 µl Stammlösung
Thiamin	100 µl Stammlösung

MMYE-Glycin Medium:

Zu 100 ml MMYE Medium werden 3,2 ml Natriumglycin (200 g/l pH7,2) zugegeben.

Spurensalzstammlösung:

$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	10,0 g/l
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10,0 g/l
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	1,0 g/l
CuSO_4	0,1 g/l
$\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,02 g/l
(zum Lösen ansäuern mit HCl)	

Biotinstammlösung:

Biotin	200 mg/l
(zum Lösen 20 µl 4 N NaOH)	

Thiaminstammlösung:

Thiamin	20 mg/l
---------	---------

Vollmedium für E. coli LB (Maniatis et al., 1985)

Trypton	10,0 g/l
Yeast-Extrakt	5,0 g/l
NaCl	10,0 g/l
pH 7,5 mit 6 N HCl einstellen	

LB-Platten wurden durch Zusatz von 15 g/l Agar erhalten.

LD Medium: LB Medium plus 50 mg/l meso-D/L-Diaminopimelat

Minimalmedium für E. coli M9 (Tanaka et al., 1967)

KH ₂ PO ₄	7,0 g/l
K ₂ HPO ₄	3,0 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0 g/l
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,1 g/l
Spurensalze	1 ml Stammlösung (nach dem Autoklavieren zugeben)
Glucose	5,0 g/l
Thiamin	0,05 g/l

Durch Zugabe von 15 g/l Agar wurden M9-Platten hergestellt die unter anderem zur Komplementation der aminosäureauxotrophen E. coli Stämme benutzt wurden.

Zur Kultivierung der Corynebakterien wurden 500 ml EMK mit Schikanen mit 60 ml C. glu. X beschickt und bei 30 °C mit 140 rpm auf dem Luftschüttler geschüttelt. Zur Fermentation von E. coli wurde M9 Minimalmedium verwandt und bei 37 °C inkubiert.

Kulturbedingungen

Um Zellextrakte für Enzymbestimmungen zu gewinnen, wurden Vorkulturen in 10 ml Vollmedium angeimpft und über Nacht 16h bei 30 °C (C. glu.) oder 37 °C (E. coli) angezogen. Die Zellen wurden zweimal mit Saline gewaschen und mit einer Anfangs OD (OD₆₀₀) = 1 zur Hauptkultur in C. glu. X (C. glu.) oder M9 (E. coli) angeimpft.

Für Fermentationen erfolgte die Anzucht der Corynebakterien in 500 ml EMK mit Schikanen mit 100 ml Nährmedium in Vorkultur. Die Vorkultur wurde von einer frisch angelegten Vollmediumplatte (nicht älter als 3 Tage) angeimpft und 16h bei 30 °C mit 100 rpm geschüttelt. Zum Beimpfen der Hauptkultur wurden die Zellen einmal mit 50 ml steriler Saline gewaschen und jeweils so angeimpft, daß eine Anfangs OD von 1 vorlag. Bei den Rekombinanten Stämmen wurden 50 mg/l Kanamycin dem Medium zugesetzt.

Zur Stammhaltung wurden Stichkulturen angelegt, die über mindestens 6 Monate haltbar sind.

Die Anzucht der E. coli Stämme erfolgte bei phagenfreien Stämmen (DH 5, ED 8767) bei 37 °C und bei durch Mu-Insertion entstandenen Mutanten bei 30 °C in LB Medium in Volumina von 2 - 1000 ml. Das Wachstum der Bakterien wurde über die optische Dichte bei 600 nm verfolgt. Bei kalkhaltigem Medium wurde CaCO₃ durch Versetzen mit 2 ml 1 N HCl ausgetrieben und anschließend die OD₆₀₀ bestimmt. Alle photometrischen Bestimmungen wurden an einem Zeiss-Spektralphotometer PM6 durchgeführt.

4. Aminosäurebestimmung

Aminosäureanalysator

Die Bestimmung der ins Nährmedium ausgeschiedenen Aminosäuren und die Produktbestimmung im Homoserindehydrogenasetest erfolgten mit einem Aminosäureanalysator der Firma Biotronik, nach dem Kationenaustauscherprinzip. Die zu analysierende Probe wurde mit Probenverdünnungspuffer (pH 2,2) in den optimalen Meßbereich des Analysators (0,2 mM) verdünnt.

Zusammensetzung des Probenverdünnungspuffers:

tri-Na-Citrat · 2H₂O 9,8 g/l

Citronensäure · H₂O 14,1 g/l

Thiodiethanol 5 ml

pH 2,2 wurde mit 6 N HCl eingestellt

Der Probenverdünnungspuffer enthielt 10 mM Ornithin als internen Standard

Trennbedingungen

Trennsäule:	0,32 x 30 cm
Trennharz:	BTC 2710
Probenvolumen:	50 µl
Probenkonzentration:	maximal 30 nM pro Aminosäure und 60 nM NH ₃ / 100 µl Probe
Puffer:	Natriumcitrat/Natriumchlorid
Durchflußrate:	0,3 ml/min
Betriebstemperatur:	120 °C
Analysenzeit:	90 min
Retentionszeiten:	Lysin: 49 min

Die Flächen der Peaks wurde durch einen angeschlossenen Integrator (Shimadzu Data Prozessor Chromatopac C-R 18) ermittelt. Zur externen Eichung wurde ein käuflicher Aminosäurestandard verwandt.

HPLC

Eine weitere Möglichkeit zur Aminosäureanalyse bestand in der Reversed-Phase-Chromatographie, die sich durch wesentlich kürzere Retentionszeiten und damit hoher Analysekapazität auszeichnet. Dazu wurde eine HPLC-Anlage vom Typ Hewlett Packard HP 1090 mit angeschlossenen Rechner und Integrator benutzt.

Die primären Aminogruppen der Aminosäuren wurden zu Analysenbeginn mit o-Phtalaldehyd automatisch zu fluoreszierenden thiosubstituierten Isoindolen derivatisiert. Diese Derivate wurden aufgrund der unterschiedlichen Hydrophobizität auf der Hochdruckflüssigkeitschromatographiesäule aufgetrennt.

Trennbedingungen

Säule:	Hypersyl ODS C-18, 5 µm 100 x 2 mm
Laufmittel:	A: 0,1 M Natriumacetat pH 7,2 B: Methanol
Injektionsvolumen:	2 µl
Durchflußrate:	0,5 ml
Ofentemperatur:	40 °C
Druck:	maximal 400 bar
Laufzeit:	12 min

5. Herstellung von Rohextrakten

Zellernte

Die Zellen wurden in dem jeweiligen Medium bis zur spätexponentiellen Phase (ca 16 h Inkubation) angezogen und durch Zentrifugation in einer Beckman Kühlzentrifuge J 21 geerntet. Nach zweimaligem Waschen mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 wurden die Bakterien in 1 bis 15 ml des entsprechenden Aufschlußpuffers resuspendiert und entweder direkt aufgeschlossen oder bis zur Verwendung bei -20 °C eingefroren.

Zellaufschluß

Die, wie unter "Zellernte" beschrieben, gewonnenen Zellen wurden mit einem Ultraschall-Desintegrator (Sonifer B15 der Firma Branson Sonic Power Co. Danburg, Con. USA) aufgeschlossen. Die Beschallungszeiten betrugen je nach Aufschlussvolumen und Organismenart:

<u>C. glutamicum</u>		<u>E. coli</u>
2 x 4 min	bei 15 ml	1 x 4 min bei 15 ml
2 x 3 min	bei 5 ml	1 x 3 min bei 5 ml
2 x 2 min	bei 1 ml	1 x 2 min bei 1 ml

Die Zellen wurden während des Aufschlusses im Eiswasserbad gekühlt und nach der Ultraschallbehandlung die Zelltrümmer durch Zentrifugation in der Sigma/Beckmann Kühlzentrifuge (4 °C) abgetrennt. Der Rohextrakt wurde entweder eingefroren oder direkt für die enzymatischen Bestimmungen verwendet. Die Aspartokinase, ASA-Dehydrogenase, DDP-Synthase und DDP-Reduktase zeigten im eingefrorenen Zustand über mehrere Tage keinen Aktivitätsverlust. Die Homoserindehydrogenase wurde sofort nach dem Aufschluß vermessen, da das Enzym durch Einfrieren an Aktivität verlor.

6. Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde wahlweise die Lowry-Methode (Lowry, 1951) für geringe Proteinkonzentrationen 0,01-0,5 mg Protein/ml im glycerinfreien Rohextrakt und die Biuret-Methode für glycerinhaltigen Rohextrakt mit Proteinkonzentrationen > 1 mg Protein/ml herangezogen.

Lowry-Methode

- Test:
- 100 µl Rohextrakt (10-100 µg Protein/Ansatz) wurden mit 500 µl Lösung D in einem ERG vereinigt und gemischt.
 - Nach 10 minütiger Inkubation bei Zimmertemperatur wurden 50 µl Folinreagenz in den Bestimmungsansatz pipettiert und das ERG 10 sec auf dem Vortex-Genie geschüttelt.
 - Nach 30 min Reaktionszeit wurde die Extinktion gegen einen Blindwert ohne Protein bei 660 nm gemessen.

- Parallel zu jeder Proteinbestimmung wurde eine Eichkurve mit Rinderserumalbumin erstellt.

Reagenzien:

Lsg A	$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$	10,0 g/l
Lsg B	Natriumtartrat	20,0 g/l
Lsg C	NaCO_3	20,0 g/l
Lsg D	5 ml LSG C 50 μl Lsg A 50 μl Lsg B	

Die Lösung D muß für jede Bestimmung frisch angesetzt werden.

Biuret-Methode (Gornall et al., 1949)

- Test:
- 100 μl Rohextrakt (0,05-0,5 mg Protein/Ansatz) wurden mit 500 μl Biuretreagenz zusammen in ein ERG pipettiert und 10 sec auf dem Vortex-Genie geschüttelt.
 - Nach 30 min Reaktionszeit im Dunklen wurde die Extinktion gegen einen Leerwert ohne Protein bei 580 nm im Photometer bestimmt.
 - Um die durch Glycerin bedingte Blaufärbung vom tatsächlichen Meßwert subtrahieren zu können, wurde begleitend zu jeder Bestimmung eine Eichkurve mit Rinderserumalbumin in glycerinhaltigem Puffer erstellt (Peterson, 1979)

7. Bestimmung von Enzymaktivitäten im Rohextrakt

Die sp. Aktivitäten wurden in U/mg Protein angegeben. Eine Unit entspricht dabei der Bildung von 1 μmol Produkt pro Minute.

$$\text{sp. Akt.} = \frac{\text{dE}}{\text{min mg } \Sigma} \quad \mu\text{mol/min mg}$$

dE = Extinktion

Σ = Extinktionskoeffizient

7.1. Aspartatkinase-Aktivität

Die Aspartatkinase katalysiert die Bildung von Aspartylphosphat aus Aspartat und ATP. Wegen der Gleichgewichtslage der Reaktion (Black, 1955) ist es erforderlich, das gebildete Aspartylphosphat dem Reaktionsgleichgewicht zu entziehen. Dies erfolgt durch Anwesenheit von Hydroxylamin im Testansatz, sodaß sich Aspartylhydroxamat bildet. Dieses wird nach Ablauf der enzymatischen Reaktion im Bestimmungsansatz als Eisenkomplex nachgewiesen (Lipman, 1945). Der gesamte Test wurde in Anlehnung an den für E. coli beschriebenen Test durchgeführt (Truffau-Bachi et al., 1970).

Durchführung:

400 µl	Lsg A
50 µl	Lsg B
300 µl	Lsg C
150 µl	Rohextrakt

Der Start erfolgte durch Zugabe der Lösung B. Der Testansatz wurde bei 30 ° C inkubiert. Nach 30 min erfolgte die Zugabe von 600 µl Lösung D. Der Bestimmungsansatz wurde gevortext, abzentrifugiert, die Extinktion bei 540 nm gemessen und mit einer mit Aspartylhydroxamat erstellten Eichkurve verglichen.

Reagenzien:

Lsg A	Hydroxylamin	9,6 g
	Tris	2,7 g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	12,8 g
	MgCl ₂	1,9 g

Mit Aqua dest. wurde auf 100 ml aufgefüllt und der pH 7,5 mit 4 N NaOH eingestellt

Lsg B	ATP	144 mg
	NaHCO ₃	50 mg
	Mit Aqua dest. wurde auf 1 ml aufgefüllt.	

Lsg C Asparaginsäure 760 mg
 4 N NaOH 4,5 ml
 Mit Aqua dest. wurde auf 20 ml aufgefüllt.

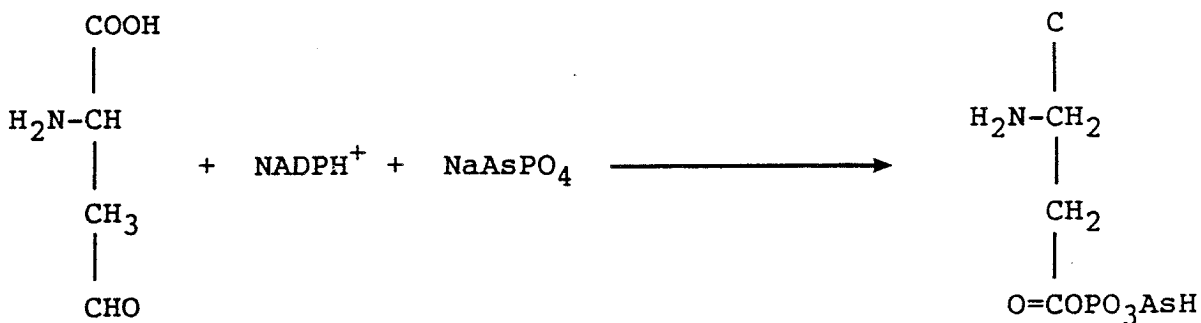
Lsg D FeCl₃ 10,0 g
 TCA 3,3 g
 Die Chemikalien wurden in 100 ml 0,7 N HCl
 aufgenommen.

Für Aspartylhydroxamat wurde parallel zu jeder Bestimmung eine Eichkurve (0,2 - 1,2 µmol) erstellt.

7.2. L-Aspartat-β-semialdehyddehydrogenase

Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurde ein modifizierter von Morgan (1967) für E. coli entwickelter Test benutzt, bei der die Umkehrreaktion der ASA-Dehydrogenase erfaßt wird.

Prinzip:



Aspartatsemialdehyd

Aspartylphosphat

Die Aspartatsemialdehyddehydrogenase katalysiert die substrat-abhängige Reduktion von NADP in der Gegenwart von Phosphat. Diese Reaktion erfolgt auch in der Gegenwart von Arsenat. Durch den raschen Zerfall des Aspartylarsenats kann sich kein Reaktionsgleichgewicht einstellen und die Umsetzung läuft gleichmäßiger ab, als bei Verwendung von Phosphat (Morgan, 1967).

Durchführung:

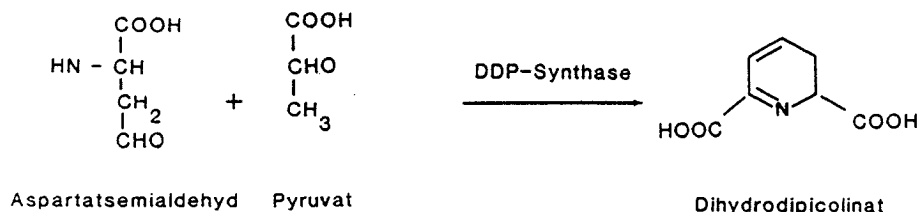
100 µl	NADP 8 mM
100 µl	Na ₂ HAsO ₄ 0,4 M
100 µl	NaCl 1,2 M
100 µl	Rohextrakt
300 µl	Diethanolamin 0,2 M pH 9,2
150 µl	H ₂ O

Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 50 µl L-ASA/Diethanolamin -Lösung. Die Extinktion wurde verfolgt und anhand dessen die sp. Aktivität berechnet. Die L-ASA/Diethanolamin-Lösung bestand aus 500 µl L-ASA plus 500 µl 0,2 M Diethanolamin pH 9,2. Durch Zugabe von 4 N NaOH wurde pH 9,2 eingestellt. Der auf diese Weise neutralisierte L-ASA war 1 h bei 0 ° C haltbar

7.3. Dihydrodipicolinatsynthase-Aktivität

Die DDP-Synthase wurde in einem modifizierten Test nach Tosaka et al. (1978a) bestimmt

Prinzip:



Die Dihydrodipicolinatsynthase (DDP-Synthase) katalysiert die Kondensation des L-Aspartat-β-semialdehyds (L-ASA) mit Pyruvat zu 2,3-Dihydrodipicolinat (DDP). Das im Test gebildete Produkt (DDP) wird im Bestimmungsansatz anhand der hochspezifischen Reaktion des DDP mit o-Aminobenzaldehyd (o-ABA) zur einer farbigen Diazoniumverbindung nachgewiesen (Sheldarski, 1971). Wegen der besseren Löslichkeit von o-ABA in Ethanol und der begünstigten Bildung der Diazoniumverbindung im stark Sauren wurde der Enzymtest zweigeteilt in Test- und Bestimmungsansatz.

Stamm AT 999 damit transformiert. Extrakte dieses Stammes enthielten die Synthase in einer sp. Akt. von 3,3 $\mu\text{mol/min mg}$ ohne jegliche Reduktase Aktivität.

Durchführung:

150 μl	L-ASA/Tris/HCl Lösung pH 7,5
50 μl	Rohextrakt AT999/pZ1/ <u>dap A</u>
	50 U/ml
20 μl	NADPH 4 mM
50 μl	Natriumpyruvat 0,2 M
630 μl	H ₂ O

L-ASA/Tris/HCl-Lösung : 500 μl L-ASA

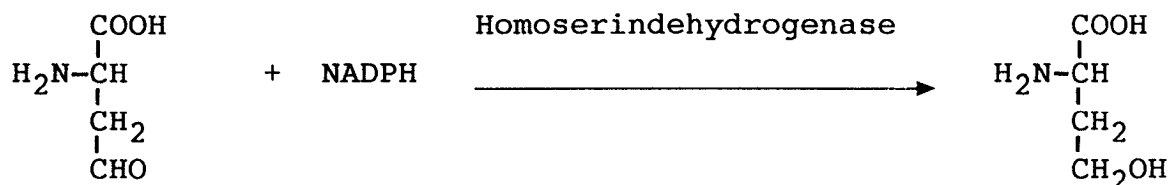
1000 μl Tris/HCl 1M pH 7,5

Die L-ASA/Tris/HCl-Lösung wurde mit 4 N NaOH auf pH 7,5 eingestellt und war bei 0 °C 2 h haltbar.

Dieser Ansatz wurde 10 min bei 30 °C inkubiert. Die Bestimmung der Reduktase Aktivität erfolgte durch Zugabe von 100 μl Rohextrakt und Verfolgung der Extinktion bei 340 nm. Der Rohextrakt wurde vorher 3 min bei 70 °C inkubiert und anschließend abzentrifugiert (10 min, 4 °C, 13000 rpm). Die Hitzebehandlung war erforderlich um NADPH Oxidase und Homoserindehydrogenase zu inaktivieren. Die Reduktase war auch nach 8 min Hitzebehandlung unverändert aktiv. Ferner zeigten gelelektrophoretische Analysen, daß das Reduktaseprotein gelöst blieb.

7.5. Homoserindehydrogenase-Aktivität

Die Bestimmung der Homoserindehydrogenase erfolgte nach einem modifizierten Test nach H. Guest (1968).



Aspartatsemialdehyd

Homoserin

Die Homoserindehydrogenase (Hom-DH) setzt ihr Substrat den L-ASA zu Homoserin um. Diese Reaktion kann über die Abnahme des reduzierten Pyridinnukleotids photometrisch verfolgt werden, oder aber es wird die Bildung des Homoserins im Aminosäureanalysator bestimmt

Durchführung:

330 µl	Kaliumphosphatpuffer 0,2 M pH 7,0
100 µl	NADPH 8 mM
5 µl	Rohextrakt
605 µl	H ₂ O

Der Start erfolgte durch Zugabe von 20 µl L-ASA/KHCO₃ pH 6,8 (500 µl L-ASA plus 200 mg KHCO₃). Die neutralisierte Aldehydlösung war etwa 1 h bei 0 °C haltbar.

8. DNA-Isolierung

8.1. Plasmidschnellisolierung aus *E. coli* (Birnboim, 1983)

Das Prinzip der Methode besteht darin, daß die Zellen mit SDS bei pH 12 -12,5 lysiert werden und gleichzeitig die chromosomale und "open circular" DNA in Einzelstrang DNA zerlegt wird, nicht aber die "covalent closed circular" Plasmid DNA. Durch Neutralisierung aggregiert die denaturierte DNA und fällt aus. Diese DNA kann also abzentrifugiert werden, wogegen die "ccc" Plasmid DNA in Lösung bleibt. Sie kann durch Phenol/Chloroform Extraktion gereinigt und durch Ethanolpräzipitation aufkonzentriert werden (Pühler et al., 1984).

Durchführung:

- 5 ml antibiotikahaltiges LB Medium wurden beimpft und 16 h über Nacht bei 37 °C geschüttelt.
- 1,5 ml der stationären Kultur wurden in einem Eppendorfreaktionsgefäß 30 sec abzentrifugiert und der Überstand restlos entsorgt.

- Die Zellen wurden in 100 µl Glucosemix resuspendiert und 3 min bei RT stehengelassen.
- Es wurden 200 µl einer 0,2 N NaOH/1%SDS-Lösung zugegeben und nach möglichst schnellem Mischen 3 min auf Eis inkubiert.
- Anschließend wurden 150 µl eiskalter K-Acetatpuffer mit Eisessig auf pH 4,8 eingestellt zugegeben, 10 sec auf dem Vortex-Genie umgekehrt geschüttelt und wieder 3 min auf Eis inkubiert.
- Durch 3 min Abzentrifugieren (13000 rpm bei RT) konnten Zellreste pelletiert werden und der plasmidhaltige Überstand (ca. 500 µl) wurde in ein frisches ERG überführt.
- Zur Aufreinigung wurde der wässrige Überstand einmal mit Phenol/Chloroform und dreimal mit Chloroform/Isoamylalkohol (jeweils 500 µl) extrahiert.
- Nach Zugabe von zwei Volumenteilen Ethanol (absolut) und 2 min Inkubation bei RT wurde die Plasmid-DNA durch 5 min Zentrifugation pelletiert.
- Das DNA-Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, in der Vakuumzentrifuge ca 5 min getrocknet und in 30 µl TE/RNase aufgenommen.
- Mit 5 µl der Plasmidlösung wurde durch Restriktionsverdau und anschließende Agarosegelelektrophorese der Erfolg der Präparation überprüft. Die restliche DNA konnte bei 4 °C verwahrt werden.

8.2. Plasmidisolierung aus 1 L-Kulturen

Um Plasmid DNA in großer Menge zu isolieren, wurden große Volumina aufgearbeitet und darüberhinaus die Tatsache ausgenutzt, daß durch Chloramphenicol die Synthese chromosomaler DNA gehemmt wird, diejenige von Plasmid DNA jedoch ungehindert weiter erfolgt (Pühler et al., 1984).

Durchführung:

- 10 ml Vorkultur wurden über Nacht bei 37 °C angezogen und damit 1 Liter LB Medium beimpft.

- Nach ca. 3 h wurde bei Erreichen der OD₆₀₀ 1 ml Chloramphenicol (50 mg/ml Ethanol) zugegeben, um die Proteinsynthese zu inhibieren und weitere 16 h bei 37 °C geschüttelt.
- Die Zellen wurden in (250 ml-Portionen im JA 10 Rotor) der Beckmannkühlzentrifuge 10 min bei 6000 rpm geerntet und in 10 ml eiskalten Sucrosemix aufgenommen.
- Nach Zugabe von 10 ml EDTA-Lsg(0,25 M) und 20 mg Lysozym blieb der Ansatz 10 min auf Eis stehen.
- Durch Zugabe von 4 ml 10% SDS, 6 ml NaCl (5 M) und 1 h Inkubation auf Eis lysierten die Zellen nach mehrmaligem Umschütteln vollständig.
- Durch 20 min Zentrifugation (JA 20) wurden die Zellreste sedimentiert, und der Überstand wurde in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt.
- Zur Präzipitation wurden zwei Volumenteile Ethanol zugegeben und 15 min auf Eis stehen gelassen. Die Plasmid DNA wurde dann durch 30 min Zentrifugation bei 18000 rpm pelletiert, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 8 ml TE-Puffer aufgenommen.
- Diese DNA wurde dann durch CsCl-Gradientenzentrifugation(s. II 8.5.) weiter aufgereinigt.

8.3. Plasmidschnellisolierung aus *C. glutamicum*

Da Corynebakterien durch SDS und NaOH allein nicht lysierbar sind, wurden die Zellen mit Lysozym und PEG vorbehandelt, (Katsumata et al., 1984) um dann die Lyse durch SDS bei hoher Temperatur zu erreichen. Anschließend erfolgte die Extraktion und Ausfällung wie für *E. coli* beschrieben.

Durchführung:

- 5 ml antibiotikahaltiges LB Medium wurden angeimpft und über Nacht bei 30 °C geschüttelt.
- 3 ml der Kultur wurden in einem ERG sedimentiert, der Überstand entsorgt und die Zellen in 350 µl E-Puffer aufgenommen.
- Nach Zugabe von 50 µl 24%igem PEG und 60 µl Lysozymlösung (100 mg/ml H₂O) wurde 15 min bei 30 °C unter gelegentlichem

Schütteln inkubiert.

- Danach wurde der Präparation 50 µl EDTA (0,5 M) und 120 µl 10% SDS zugegeben und 2 min bei 95 °C erhitzt.
- Der Ansatz wurde 5 min auf Eis gestellt und zur Sedimentierung der Zellreste 10 min bei 4 °C und 13000 rpm abgeschleudert.
- Der Überstand wurde wie für die E. coli Plasmidschnellisolierung beschrieben (8.2.) durch Phenol/Chloroformextraktion und Ethanolpräzipitation aufgereinigt.

8.4. Plasmidisolierung von C. glutamicum aus 1 L-Kulturen

Zur Isolation großer Mengen Plasmid DNA wurden große Volumina nach einer modifizierten Methode von Yoshihama et al. (1985) aufgearbeitet.

Durchführung:

- 10 ml antibiotikahaltiges LB Medium wurden morgens beimpft, nach 8 h in 1 L antibiotikahaltiges LB Medium überführt und 16 h über Nacht bei 30 °C geschüttelt.
- Die Zellen wurden geerntet und in 10 ml Sucrosemix aufgenommen.
- Durch Zugabe von 0,6 ml EDTA (0,25 M), 4,4 ml 4% SDS und 2,4 ml NaCl(5 M) erfolgte die Lyse über Nacht in Eis.
- Die weitere Aufarbeitung entspricht der Vorschrift für die Plasmidpräparation von E. coli aus 1 L-Kulturen.

Glucosemix	Glucose 50 mM	10,0 g/l
	EDTA 10 mM	3,75 g/l
	Tris 25 mM	3,03 g/l
	mit 6 N HCl auf pH 8,0 eingestellt	
Sucrosemix	Sucrose 0,25 M	100,0 g/l
	Tris 50 mM	6,05 g/l
	mit 6 N HCl auf pH 8,0 eingestellt	
E-Puffer	Tris 40 mM	4,85 g/l
	EDTA 2 mM	0,74 g/l
	mit Eisessig auf pH 7,9 eingestellt	

8.5. Caesiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation

Für bestimmte Experimente war es notwendig besonders reine und hochkonzentrierte DNA einzusetzen. Dazu wurde die DNA im Caesiumchlorid-Dichtegradienten zentrifugiert. Das Trennprinzip beruht auf der Herabsetzung der Dichte der DNA durch Interkalation von Ethidiumbromid. Lineare chromosomale DNA, die mehr Ethidiumbromid bindet als die kovalent geschlossene Plasmid DNA, erhält dadurch eine niedrigere sp. Dichte und kann im Gradienten abgetrennt werden (Pühler et al., 1984).

Durchführung:

In den 8 ml DNA-Lösung wie unter 8.2. und 8.4. hergestellt, wurden 8 g CsCl gelöst und dieses Volumen (10 ml) in ein Beckmann Quick-seal Ultrazentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 0,8 ml Ethidiumbromidlösung (10 g/l in H₂O) und Austarieren mit CsCl-Lsg (1 g/ml TE) wurde das Röhrchen zugeschweißt und unter Druck auf dichten Verschuß getestet. Die Ultrazentrifugation erfolgte entweder über 72 h im TI 50- oder 19 h über Nacht im TI 71 Rotor in einer Beckmann-UZ (Typ L8-70) bei 45000 bzw. 65000 rpm.

Nach der Ultrazentrifugation waren im UV-Licht zwei Banden sichtbar, deren untere, die kovalent geschlossene zirkuläre Plasmid-DNA, mit einer 2 ml Einmalspritze von der Seite her abgezogen wurde.

Die erhaltene DNA-Ethidiumbromidlösung wurde in ein frisches JA 20 Beckmann Zentrifugenröhrchen überführt, mit 2,5 Volumenteilen H₂O verdünnt und mit 2 Gesamtvolumenteilen Ethanol abs. über Nacht bei -20 °C gefällt.

Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation in der Beckmann Kühlzentrifuge im JS 13 Rotor bei 10000 rpm (30 min) pelletiert, das Sediment in 500 µl TE-Puffer aufgenommen und in ein ERG überführt.

Nach der Aufreinigung durch Phenol- und dreimal Chloroformextraktion wurde erneut mit Ethanol präzipitiert und in 100-500 µl TE-RNase (20 µg/ml) aufgenommen.

8.6. Isolierung chromosomaler DNA aus *E. coli* und *C. glutamicum*

Für die Isolierung chromosomaler DNA wurde eine Methode verwandt, die sowohl aus *E. coli* als auch *C. glu.* ca. 500 µg DNA aus 1 g feuchten Zellen liefert (Byun et al., 1986 ; Meade et al., 1982). Die Methode beruht darauf, daß die Bakterien durch Inkubation in SDS-haltigem TE-Puffer sphaeroplastiert werden. Durch Zugabe einer Proteinase werden die Zellen lysiert und gleichzeitig im Lysat vorhandene Nukleasen inaktiviert.

Durchführung:

- Die Zellen wurden über Nacht 18 h bei 30 °C in 100 ml LB Medium angezogen, am nächsten Morgen in einem sterilen Falcontube geerntet, 2 mal mit sterilem TE-Puffer gewaschen und in 10 ml TE-Puffer aufgenommen.
- Es wurden 100 mg Lysozym (für *E.coli* 10 mg) zugegeben und 8 h bei 30 °C inkubiert.
- Nach Zugabe von 2 mg Proteinase K wurde über Nacht bei 50°C inkubiert.
- Am nächsten Morgen wurde nach Zugabe von 1 ml 10% Laurylsarkosinat solange bei 50 °C inkubiert bis das Lysat vollklar erschien.
- Durch Übersichten mit 20 ml -20 °C kaltem Ethanol absolut konnte die chromosomale DNA an der Grenzschicht mit einem Glasstab herausgedreht werden.
- Die DNA wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in TE-RNase aufgenommen.

9. Analyse und Rekombination von DNA

9.1. Restriktion von DNA

Zur DNA-Spaltung wurden falls nicht anders beschrieben, 20 µl-Ansätze hergestellt.

5 µl	DNA
2 µl	Puffer 10-fach konz.
13 µl	H ₂ O
1 Unit(< 1µl)	Restriktionsenzym

Der Ansatz wurde kurz auf dem Vortex gemischt, abgeschleudert und 1 h bei 37°C inkubiert (SmaI bei 25 °C und Bst E2 bei 60 °C). Danach wurde der Verdau mit 2 µl Blaumarker gemischt, in der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt oder zu weiteren Experimenten durch Phenolextraktion und Ethanolpräzipitation aufgereinigt.

Die Abspaltung 5` ständiger Phosphatgruppen erfolgte durch Zugabe von 1 U alkalischer Phosphatase nach 1 h Verdauzeit und 1 h weiterer Inkubationszeit.

9.2. Auffüllen überstehender Enden durch Klenow Enzym

Klenow Enzym, das große Fragment der DNA-Polymerase I, konnte sowohl zum Auffüllen 5`- als auch 3`-überstehender Enden sowie zur DNA-Markierung benutzt werden.

Durchführung:

10 µl lineare DNA
 2 µl Nick Translationspuffer 10-fach
 2 µl Nukleotidmix
 5 µl H₂O
 1 µl (1U) Klenow Enzym

Der Ansatz wurde zusammenpipettiert und 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Polymerase 5 min bei 70 °C inaktiviert. Der Ansatz konnte gegebenenfalls unverändert einer alkalischen Phosphatasebehandlung unterzogen werden (Vektor-DNA). Nach Aufreinigung durch Phenolextraktion und Ethanolpräzipitation konnte die DNA zur Ligation eingesetzt werden. Der Nick Translationspuffer und Nukleotidmix wurde nach Maniatis (S. 112) hergestellt.

9.3. Ligation

Vor der Ligation wurden Reste anderer Enzyme (Restriktionsenzyme, Polymerasen) durch Phenol/Chloroform und Ethanolpräzipitation entfernt. Danach wurde die DNA in einem entsprechenden Volumen TE-Puffer aufgenommen. Die Ligation erfolgte in 20 µl Ansätzen wobei Vektor und Insert DNA in einem molaren Verhältnis

von 1:3 eingestzt wurden.

Durchführung:

x μ l	Vektor-DNA
y μ l	Insert-DNA
18 - (x+y) μ l	H ₂ O
2 μ l	Ligationspuffer
1 U	T 4 DNA Ligase

Der Ansatz wurde 16 h bei 15 ° C inkubiert und konnte ohne weitere Behandlung zur Transformation eingesetzt werden

9.4. Ethanolpräzipitation

Die DNA-Lsg wurde mit 1/4 Volumen 2 M LiCl versetzt und bei geringen DNA-Konzentrationen (10-100 ng DNA/Ansatz) 1 μ l Glykogen zugegeben. Der Ansatz wurde geschüttelt und 2 Volumenteile Ethanol abs. zupipettiert.

Nach 30 min bei - 20 °C und mindestens 30 min Zentrifugation bei 13000 rpm in der Sigmakühlzentrifuge bei 4 °C wurde der Überstand vollständig abgenommen und mit 1 ml Ethanol 70% gewaschen. Die DNA wurde in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 10 bis 20 μ l aufgenommen.

9.5. Fragmentierung durch ELUTIP-d

Zur Größenfragmentierung und Aufkonzentrierung von DNA wurden ELUTIP-d Säulchen der Firma Schleicher und Schüll verwendet, die eine Rückgewinnung von DNA aus " Low Gel Temperature Agarose" erlauben

- Linearisierte DNA wurde durch Agarosegelelektrophorese 20 V 16 h aufgetrennt. Aus dem mit Ethidiumbromid angefärbten Gel wurde auf dem UV Tisch die gewünschte DNA mit einem Skalpell herausgeschnitten.
- Der Gelstreifen wurde bei 65 °C verflüssigt und mit dem 10-

fachen Volumen Puffer 1 verdünnt.

- Die ELUTIP-d Säulchen wurden durch Spülen mit 5 ml Puffer 2 und anschließend 10 ml Puffer 1 vorbereitet.
- Nach 15 min Äquilibrierung bei 37 °C wurde der gesamte Ansatz durch die Säule gepresst und mit 3 ml Puffer 1 gespült.
- Die DNA konnte mit 500 µl Puffer 2 eluiert und durch Phenol/Chloroformextraktion und Ethanolpräzipitation gereinigt werden.

Reagenzien:

Puffer 1	Puffer 2
NaCl 0,2 M	NaCl 1,0 M
Tris 20 mM	Tris 20 mM
EDTA 1 mM	EDTA 1 mM

9.6. Transformation kompetenter *E. coli* Zellen

Für die Transformation wurden die verschiedenen *E. coli* Stämme nach einem stammspezifisch modifizierten Protokoll von D. Hanahan (1985) behandelt. Die Kompetenz von *E. coli* beruht nach Hanahan (1987) auf der Fähigkeit der Zellen mit der zu transformierenden DNA in engen Kontakt zu treten. Die Zellen können in ihrer Gesamtheit, genau wie die DNA bei pH 8,0, als Polyanion betrachtet werden. Diese für die Transformation ungünstigen elektrischen Eigenschaften müssen durch Assoziation beliebiger Kationen bei niedriger Temperatur kompensiert werden.

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurde eine Kolonie des betreffenden Stammes in 1 ml SOB Medium aufgenommen und damit 50 ml SOB Medium auf OD₆₀₀ 0,04 angeimpft. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,15 wurden die Zellen 15 min auf Eis stehen gelassen und geerntet. Das Pellet wurde in 15 ml RF1-Puffer aufgenommen und mindestens 15 min in Eis inkubiert. Die Zellen wurden wieder abzentrifugiert und in 4 ml RF2 Puffer aufgenommen. Nach 15 min in RF2 auf Eis wurden die Zellen zu 200 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 70 °C gelagert.

Diese Vorschrift wurde für jeden *E. coli* Stamm überprüft, denn es zeigte sich, daß stammspezifisch die Verlängerung der

Inkubationszeiten von RF1 (1 h bei RASA 51) oder das Weglassen der RF1 Behandlung (RDA 8) zu erheblich höheren Transformationsraten führte.

Zur Transformation wurden 200 µl, der kompetenten Zellen verwendet. Die Zellen wurden bei RT aufgetaut, bis sie flüssig waren und sofort auf Eis gestellt. Nach Zugabe der DNA (bis zu 20 µg in bis zu 100 µl) wurde 30 min im Eis inkubiert, anschließend ein Hitzeschock durchgeführt (90 sec bei 42 °C) und wieder auf Eis gestellt. Dem Transformationsansatz wurden 800 µl SOC Medium zugegeben und 1 h bei 37 °C regeneriert. Entsprechende Volumina (2 bis 250 µl) wurden auf Selektionsagar ausplattiert und 16 h bei 37 °C bebrütet.

Reagenzien:

SOB Medium

Bacto Pepton	20,0	g/l
Yeast Extrakt	5,0	g/l
NaCl	584	mg/l
KCl	186	mg/l
MgCl ₂	951	mg/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1,2	g/l

RF1-Puffer

RbCl	12,0	g/l
MnCl ₂ · 4H ₂ O	9,9	g/l
CaCl ₂ · H ₂ O	1,5	g/l
Glycerin	150,0	g/l
pH 5,8 mit 0,2 M Essigsäure eingestellt		

RF2-Puffer

RbCl	1,2	g/l
CaCl ₂	11,0	g/l
MOPS 0,5 M	20	ml
Glycerin	150,0	g/l
pH 6,8 mit 1 N NaOH eingestellt		

9.7. Transformation osmotisch sensibler *C. glutamicum* Zellen

Zur Transformation ist es erforderlich die Zellwand von *C. glutamicum* partiell aufzulösen und nach der Transformation die Regeneration auf osmotisch stabilisiertem Medium zu ermöglichen. Die DNA-Aufnahme beruht auf einer kurzfristigen Desintegration der Zellmembran, die durch PEG vermittelt wird.

Zur Herstellung osmotisch sensibler Zellen wurden die Corynebakterien in 10 ml LB 8 h bei 30 °C angezogen und als Vorkultur zum Beimpfen von 100 ml MMYE 0,63 % Glycin verwendet. Dabei wurde so angeimpft, daß nach 16 h eine OD₆₀₀ von 1 bis 2 erreicht war. (Verdopplungszeit 1 h, OD₆₀₀ = 1 $\approx$ 3 x 10⁸ Zellen/ml). Die Zellen wurden geerntet und das Pellet in 10 ml S-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 100 mg Lysozym, 2 h Inkubation bei 33 °C und schwachem Schütteln wurden die nun sphäroplastisierten Zellen mit 10 ml TSMC gewaschen. Die Zellen wurden erneut in 10 ml TSMC aufgenommen, zu 300 µl Portionen in ERG aufgeteilt und bei -70 °C verwahrt. Der Osmotisierungsgrad der Zellen wurde durch Ausplattieren einer Verdünnungsreihe von 10⁻³ bis 10⁻⁸ auf LB und SB-Agar bestimmt.

S-Puffer

Sucrose 1,64 M	8,0 ml
MgCl ₂ 1 M	0,32 ml
MMYE	16,0 ml
H ₂ O	7,68 ml

TSMC

Natriumsuccinat 0,5 M	92 ml
MgCl ₂ 1 M	1 ml
CaCl ₂ 1 M	2 ml
Tris/HCl 1 M pH 7,0	5 ml

TSMC*

TSMC	100,0 ml
Yeast Extrakt 0,2 g/ml	0,5 ml
Casaminoacids 0,2 g/ml	0,5 ml
Glucose 50 %	0,2 ml

Zur Transformation der osmotisch sensitiven Zellen wurden 300 µl Zellsuspension 1 min bei 37 °C aufgetaut und dann einer zehnmütigen Hitzebehandlung (49 °C) zur Inaktivierung der Restriktionssysteme unterzogen. Die DNA wurde zugegeben (max. 20 µg in 100 µl) und 5 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 700 µl PEG (50 % in TSMC) wurde die DNA-Aufnahme induziert und weitere 5 min bei RT stehen gelassen. Danach wurde der Ansatz in ein 10 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit 2 ml TSMC* verdünnt. Nach 16 h Regenerationszeit bei 30 °C wurde der Transformationsansatz auf antibiotikahaltiges SB Medium ausplattiert und zwischen 24 bis 48 h bebrütet.

9.8. Transfer von DNA nach Southern

DNA Fragmente die durch Agarosegelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt sind, können mit dem Verfahren nach Southern denaturiert, auf Nitrocellulose- oder Nylonfilter übertragen, und dann immobilisiert werden (Southern, 1975).

Durchführung:

Durch Agarosegelelektrophorese wurde die linearisierte DNA in einem 0,8 % Agarosegel mit 20 V 16 h über Nacht aufgetrennt. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid angefärbt und mit der Polaroidkamera MP 3 Land abfotographiert. Überflüssige Enden wurden abgetrennt, um zu möglichst kleinen Filtergrößen zu gelangen. Durch 15 min Inkubation in 100 ml 0,3 N HCl wurde die DNA zu diffusionsfähigen Stücken zerkleinert und durch 1 h Inkubation in 100 ml 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl denaturiert. Das Gel wurde 1 h in 200 ml 1 M Tris/HCl/ 1,5 M NaCl äquilibriert und konnte so zum Transfer verwendet werden. Das Gel wurde umgekehrt auf einen längeren Whatmannpapierstreifen gelegt, der mit beiden Enden in ein 2xSSC-Pufferreservoir eintauchte. Auf der Rückseite des Gels wurde der Filter genau plaziert, und das Filter mit saugfähigem Papier ca. 10 cm hoch bedeckt. Das Papier wurde mit ca. 500 g beschwert und der ganze Aufbau über Nacht stehengelassen. Nach 16 h Transfer wurde die Nylonmembran in 100 ml 2xSSC gewaschen und 1 h bei 80 °C getrocknet, um eine Vernetzung der DNA mit dem Nylon herbeizuführen. Der

Filter konnte so verwahrt und später zum Immunoassay verwendet werden.

Reagenzien:

Puffer A

Tris	12,15	g/l
NaCl	8,76	g/l
pH 7,5 mit 6 N HCl eingestellt		

Puffer B

Tris	12,15	g/l
NaCl	5,48	g/l
MgCl ₂	4,75	g/l
pH 9,5 mit 1 N HCl eingestellt		

20 x SSC-Puffer

NaCl	175,2	g/l
Natriumcitrat	88,2	g/l
pH 7,0 mit 6 N HCl eingestellt		

9.9. Nichtradioaktive Markierung von DNA, Hybridisierung und Immunoassay zum Nachweis markierter DNA

Zur DNA Markierung wurde Digoxigenin markiertes d-UTP benutzt. Nach der Hybridisierung der markierten Probe mit der Ziel-DNA wurden die Hybride durch Digoxigeninantikörper gebunden. Eine an den Antikörper konjugierte alkalische Phosphatase diente zur enzymkatalysierten Anfärbung der Markierung mit X-Phosphat (5-bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphat) und NTB (Nitroblautetrazoliumsalz) (B. Vogelstein, 1983).

Die Markierung erfolgte, indem die linearisierte und durch Phenol/Chloroformextraktion und Ethanolpräzipitation gereinigte DNA 10 min bei 95 °C aufgeschmolzen wurde. Durch schnelles Eintauchen in flüssigen Stickstoff wurde die vollständige Denaturierung der DNA aufrechterhalten.

Durchführung:

- 2 µl frisch denaturierte DNA (200 ng)
- 2 µl Hexanukleotidgemisch
- 2 µl dNTP-Markierungsgemisch
- 13 µl Aqua dest.
- 1 µl(1U) Kleenow Enzym

wurden im ERG zusammenpipettiert und danach 2h bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 2 µl EDTA 0,2 M wurde die Reaktion abgestoppt. Durch Ethanolpräzipitation wurde die markierte DNA gereinigt und konnte zur Hybridisierung verwendet werden. Das erforderliche Hexanukleotidgemisch und dNTP-Markierungsgemisch wurden dem DNA-Labeling and Detection Kit von Boehringer Mannheim entnommen.

Zur Hybridisierung wurde der Nylonfilter (s. 9.8.) in einer verschlossenen Schale mit 20 ml Hybridisierungslösung 2 h bei 68 °C prähybridisiert. Der Filter wurde anschließend in eine der Filtergröße angepaßte Folie eingeschweißt, der entstandene Beutel an einer Seite geöffnet und 2,5 ml Hybridisierungslösung mit 200 ng frisch denaturierter markierter DNA zugegeben. Die Öffnung wurde wieder verklebt und der Hybridisierungsansatz über Nacht bei 68 °C im Wasserbad inkubiert. Der Nylonfilter wurde zweimal 5 min in 2xSSC/SDS 0,1% bei RT und zweimal 15 min bei 68 °C in 0,1xSSC/SDS 0,1% gewaschen um unspezifische Bindungen abzulösen. Der Filter konnte luftgetrocknet verwahrt werden.

Hybridisierungslösung:

- 12,5 ml 20 x SSC
- 250 mg Blocking-Reagenz (Zusammensetzung wurde auf Anfrage nicht verraten)
- 500 µl 10% Natriumlaurylsarkosinat
- 100 µl 10% SDS
- auf 50 ml mit H₂O auffüllen und bei 60 °C 1 h rühren.

Zur Detektion durch die Immunreaktion wurde der trockene Filter in Puffer A kurz gewaschen, anschließend 30 min in 100 ml Blockingreagenz geschwenkt und wieder kurz in Puffer A gewaschen. Der Filter wurde in einer Plastikschiene mit 20 ml verdünnter Antikörperkonjugatlösung überschichtet und 30 min bei RT stehengelassen. Die Antikörperkonjugatlösung wurde mit zweimal 50 ml Puffer A abgewaschen und kurz in Puffer B inkubiert. Nach Überschichten mit 10 ml Färbelösung mußte der Ansatz 30 bis 90 min erschütterungsfrei im Dunkeln inkubiert werden um klare Banden erkennen zu können. Die Farbreaktion konnte zu jedem beliebigen Zeitpunkt durch Waschen mit TE-Puffer zum Stillstand gebracht werden. Durch Abfotographieren wurde das Ergebnis festgehalten.

9.10. In Vitro Verpackung von DNA

Zum Aufbau der C. glutamicum Cosmidgenbanken in E. coli wurde der DNA-Packaging Kit von Boehringer Mannheim benutzt. Die Invitroverpackung in Kombination mit Cosmidvektoren erlaubte die Klonierung großer (≈ 40 kb) DNA Fragmente und damit die Reduzierung der Zahl der zur vollständigen Repräsentation des Corynebakteriengenoms notwendigen Klone.

Durchführung:

Zur Vorbereitung der Zellen wurde der lambdasensitive E. coli Stamm ED8654 in 5 ml LB 8 h bei 37 °C angezogen und diese Vorkultur zum Animpfen von 100 ml TB Medium benutzt. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in 40 ml Lsg. 1 aufgenommen. Diese Suspension wurde im 200 ml EMK mit Schikanen 45 min intensiv geschüttelt und konnte ohne Verlust der Transduktionsaktivität 1 Woche bei 4 °C aufbewahrt werden.

Die chromosomale DNA aus C. glutamicum wurde mit dem jeweiligen Restriktionsenzym statistisch so verdaut, daß die durchschnittliche Fragmentgröße > 20 kb betrug. Das Cosmid pHc 79 wurde mit dem komplementären Restriktionsenzym vollständig verdaut und durch alkaline Phosphatase die 5'-Phosphatreste abgespalten. Die Cosmid- und Insert-DNA wurden durch T4 DNA Polymerase

verknüpft und der Ligationsansatz unbehandelt zum Verpacken verwandt.

Die Verpackungsenzyme und die Phagenhüllen aus dem Packaging Kit wurden auf Eis in einem ERG vereint und vorsichtig aufgetaut (30 min). Während des Auftauens wurde 0,5 µg DNA aus dem Ligationsansatz zugegeben und weitere 30 min auf Eis stehengelassen. Anschließend wurde 1 h bei RT inkubiert um das eigentliche Verpacken zu ermöglichen. Der Verpackungsansatz wurde mit Lsg 2 auf 100 µl aufgefüllt und zur Transduktion verwendet.

100 µl der mit Lsg. 1 behandelten ED 8654 Zellen wurde mit 10 µl Lysat in einem ERG vermischt und 20 min bei 37 °C inkubiert. Der Transduktionsansatz wurde mit 1 ml LB Medium verdünnt und die Zellen 1 h bei 37 °C regeneriert. Nach der Regeneration wurde auf antibiotikahaltigem LB-Agar mit 200 µl Aliquots ausplattiert.

Reagenzien:

TB Medium

Trypton	10 g/l
NaCl	8 g/l
Maltose	2 g/l
Thiamin	1,5 mg/l

Lsg. 1

MgSO ₄ 10 mM	1,2 g/l
-------------------------	---------

Lsg. 2

MgSO ₄ 10 mM	1,2 g/l
Tris 10 mM	1,2 g/l
Gelatine 0,01%	100 mg/l

9.11. Agarosegelelektrophorese

Zur Analyse wurde die DNA oder deren Restriktionsfragmente durch Elektrophorese in Agarosegelen aufgetrennt. Dabei wurden Elektrophoresekamern der Firma Gibco/BRL verwendet und als

Spannungsquelle diente ein Powersupply von LKB (Typ Macro-drive)

Durchführung:

Die flüssige Agarose (0,8%) wurde entweder direkt auf den abgeklebten Träger der Kammer (Modell H6) oder auf den externen Gießtisch (Modell H5) gegossen und der gewünschte Kamm eingeführt (verflüssigte Agarose ließ sich 2 Wochen im Wärmeschrank gießfertig verwahren). Die Elektrophorese wurde in Modell H6 mit 50 V und in Modell H5 mit 80 V in TBE-Puffer gefahren. Die Färbung der Gele erfolgte durch 4 min Anfärben in verd. Ethidiumbromidlösung (100 mg/l H₂O) und 10 min Entfärben in 100 ml Aqua dest. In spez. Fällen (1-10 ng DNA/Auftrag) war es notwendig 20 min in der unverdünnten Ethidiumbromidlösung anzufärben. Die starke Hintergrundfärbung ließ sich durch 10 minütige Weiterführung der Elektrophorese (bei 10 V in beiden Kammermodellen) effektiv entfernen. Die angefärbten Gele wurden mit der Polaroid-Kamera MP3 Land abfotografiert und durch Vergleich mit den aufgetragenen Molekulargewichtsstandards ausgewertet.

Reagenzien:

TBE-Puffer	10-fach
Tris	108,0 g/l
Borsäure	55,0 g/l
EDTA	3,7 g/l
mit 6 N NaOH auf pH 8,0 einstellen	

9.12. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Herstellung der Polyacrylamidgele wurden die Glasplatten und Spacer in die Spannapparatur eingesetzt und das 12 %ige Trenngel zwischen die Platten gegossen. Luftblasen wurden mit einer Kanüle abgezogen und das noch flüssige Gel mit Aqua dest. überschichtet. Nach 1h war das Gel durchgehärtet. Nach Abziehen des Wassers konnte das 8 %ige Konzentrierungsgel bis 2 mm unter den Rand eingefüllt und der Kamm eingeführt werden. Nach einer weiteren Stunde war das Gel gebrauchsfertig und wurde in die Biorad Vertikal Gel Apparatur 220 eingespannt. Die Protein-

proben und der Standard wurden im Verhältnis 1:2 mit Lsg. 5 gemischt und 5 min auf 95 °C erhitzt. Danach wurden die Proben in die Geltaschen pipettiert und die Elektrophorese gestartet.

Konzentrierungsgel: 60 V

Trenngel: 120 V

Elektrophoresepuffer: Lsg. 4

Das SDS-Polyacrylamidgel wurde nach der Elektrophorese in Coomassie Blue R 250 angefärbt und nach ca. 15 h mit 10 %iger Essigsäure wieder entfärbt bis die Banden deutlich sichtbar wurden. Das Ergebnis wurde durch Abfotographieren festgehalten.

Reagenzien:

Lsg. 1	Acrylamid	30,0 g
	Bisacrylamid	0,8 g
	ad 100 ml H ₂ O	
Lsg. 2	Tris	6,0 g
	SDS	0,4 g
	ad 100 ml pH 6,8	
Lsg. 3	Tris	18,2 g
	SDS	0,4 g
	ad 100 ml pH 8,8	
Lsg. 4	Tris	6,0 g/l
	Glycylglycerin	28,8 g/l
	SDS	1,0 g/l
	mit 1 N HCL auf pH 8,3 eingestellt	
Lsg. 5	Tris	0,12 g
	EDTA	0,029 g
	SDS	1,0 g
	ad 100 ml pH 8,0	
Lsg. 6	Bromphenolblau	1 mg/ml 60 % Glycerin
Lsg. 7	TEMED	
Lsg. 8	(NH ₂ S ₂ O ₈)	

Trenngel 12% :

Lsg. 1	10,23	ml
Lsg. 3	6,25	ml
TEMED	0,025	ml
H ₂ O	8,25	ml
entgasen		
LSG. 8	0,25	ml

Konzentrierungsgel 8% :

Lsg. 1	6,5	ml
Lsg. 3	6,3	ml
TEMED	0,025	ml
entgasen		
Lsg. 8	0,25	ml

III Ergebnisse

1. Regulation der Lysinbiosynthese bei *C. glutamicum*

1.1. Wachstumsabhängigkeit der Enzymaktivitäten bei *C. glutamicum*

Um die Vergleichbarkeit, der bei Enzymmessungen gewonnenen Daten zu gewährleisten, wurden wachstumsabhängig die sp. Aktivitäten der Aspartatkinase, Aspartatsemialdehyddehydrogenase, Dihydrodipicolinatsynthase, Dihydrodipicolinat-reduktase, Diaminopimelatdehydrogenase und Diaminopimelat-decarboxylase bestimmt. In Abb. 2 wird deutlich, daß die sp. Aktivitäten entweder keine Änderung über die Zeit erfahren, wie das bei Aspartatkinase, DDP-Synthase, DDP-Reduktase, DAP-dehydrogenase und DAP-decarboxylase der Fall war, oder aber ihre maximale sp. Aktivität nach 16 h erreichen (was einer Übernachtinkubation entspricht). Bei Probennahme in der spätlogarithmischen Phase sind die Enzymaktivitäten vergleichbar.

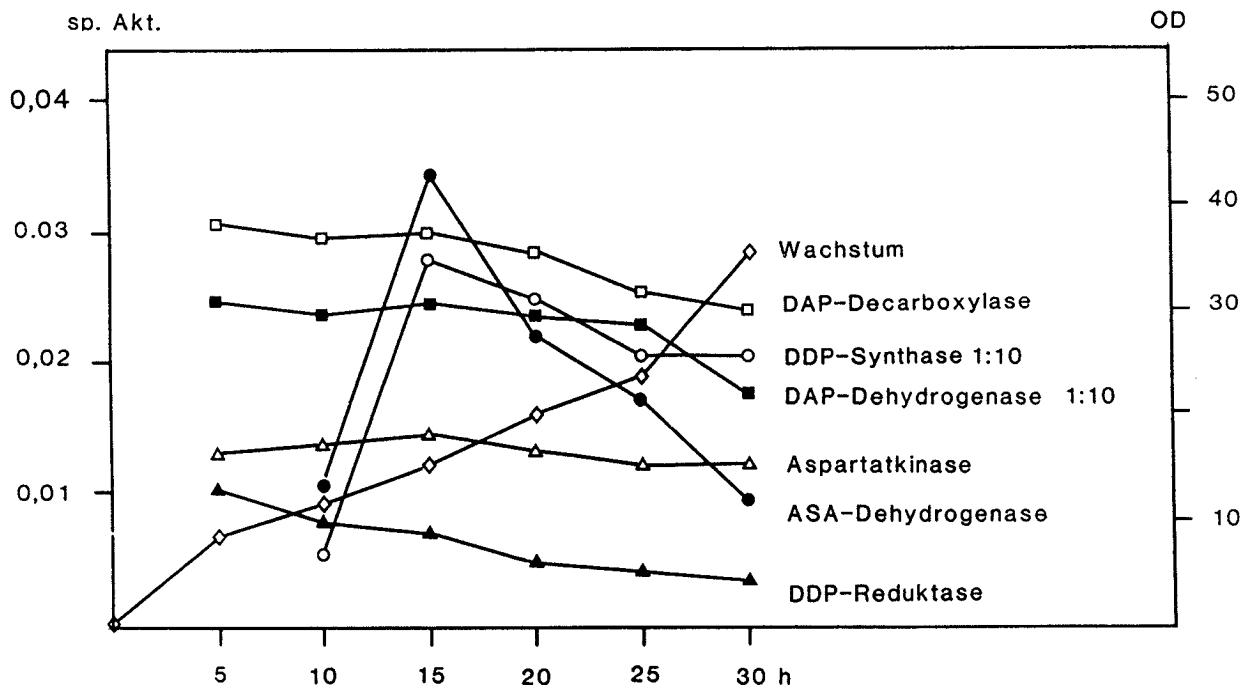


Abb. 2 : Spezifische Aktivitäten lysinbiosynthetischer Enzyme während des Wachstum in Minimalmedium *C. glu.* X

1.2. Regulation der Enzymmenge

Aus den Untersuchungen zur Regulation der Lysinbiosynthese in C. glutamicum ging hervor, das die Synthesegene in der betrachteten Sequenz keiner Kontrolle durch Induktion oder Repression unterliegen. Die in der Literatur beschriebene Repression durch Leucin konnte nicht bestätigt werden (Tosaka et al., 1978).

Im Gegensatz zur vielfältig kontrollierten Lysinsynthese beim Gram negativen E. coli konnte kein drastischer Einfluß der verwendeten Effektoren auf die Bildung der Lysinbiosyntheseenzyme festgestellt werden (s. Tabelle 5) (Patte et al., 1983). Die Homoserindehydrogenase katalysiert neben den Enzymen der Zellwandsynthese die einzige Verzweigungsreaktion in der betrachteten Sequenz (s. Abb. 1) und wird durch 10 mM Methionin im Kulturmedium auf 18 % der Enzymmenge ohne Effektor reprimiert. Dagegen bewirkt die Zugabe von 10 mM Leucin im Kulturmedium eine Derepression der Hom-Dehydrogenase auf den doppelten Wert (s. Tab. 5). DAP-dehydrogenase und DAP-decarboxylase werden auf DNA-Ebene nicht reguliert (Cremer al., 1988).

Tabelle 5 : Spezifische Aktivitäten der Enzyme der Lysin-synthese und der Homoserindehydrogenase in Extrakten von C. glutamicum ATCC 13032

Wachstumsbe- dingungen	Aspartat kinase	Aspartat semialdehyd dehydrogenase	Dihydrodi- picolinat Synthase
Komplexmedium	0,012	0,020	0,23
Minimalmedium	0,015	0,019	0,20
- " - + 10 mM Leu	0,012	0,015	0,22
- " - + 10 mM Ile	0,016	0,012	0,23
- " - + 10 mM Lys	0,013	0,013	0,21
- " - + 10 mM Met	0,012	0,015	0,22
- " - + 10 mM Thr	0,013	0,013	0,23
- " - +Lys/Thr/Met	0,012	0,015	0,23

Wachstumsbe- dingungen	Dihydrodi- picolinat Synthase	Homoserin dehydrogenase
Komplexmedium	-	0,02
Minimalmedium	0,06	0,39
-"- + 10 mM Leu	0,05	0,87
-"- + 10 mM Ile	0,06	0,46
-"- + 10 mM Lys	0,07	0,32
-"- + 10 mM Met	0,05	0,07
-"- + 10 mM Thr	0,07	-
-"- + -"- Lys/Thr/Met	0,04	0,08

1.3. Regulation der Enzymaktivitäten

Im Gram negativen E. coli wird die DDP-Synthase als erstes lysinspezifisches Enzym durch eine Feedbackhemmung mittels Lysin sehr strikt reguliert (Gilvarg et al., 1962). Bei den Experimenten zur Inhibition der DDP-Synthase aus C. glutamicum wurde keine Feedback Inhibition durch Lysin festgestellt. Auch die anderen getesteten Aminosäuren hatten keine inhibitorische Wirkung auf die DDP-Synthase. Als einziges Enzym der untersuchten Enzyme wurde die Aspartatkinase konzentriert inhibiert durch Lysin und Threonin. Bei Zugabe von je 10 mM Lysin und Threonin in den Testansatz wurde die Aspartatkinaseaktivität auf 25 % des Ausgangswertes (s. Tab.6) erniedrigt. Die Hom-dehydrogenase wurde durch 10 mM Threonin auf 4 % und durch 10 mM Isoleucin auf 44 % des Ausgangswertes inhibiert (s. Tab. 6). Das erste Enzym der Isoleucin, Methionin und Threoninsynthese unterliegt damit sowohl auf DNA- als auch auf Enzymebene einer Endproduktinhibition.

Tabelle 6 :Hemmung von Enzymen der Lysinbiosynthese aus
C. glutamicum durch verschiedene Aminosäuren

Die Zellen für die Herstellung der Extrakte wurden in Minimalmedium C. glu X angezogen. Die Aminosäurekonzentration im Ansatz betrug 10 mM.

Zugabe von	Aspartat kinase U/mg	Aspartat semialdehyd dehydrogenase U/mg	Dihydrodi picolinat Synthase U/mg
nichts	0,012	0,019	0,28
L-Leucin	0,014	0,015	0,28
L-Lysin	0,012	0,012	0,28
L-Methionin	0,014	0,015	0,27
L-Isoleucin	0,015	0,016	0,29
L-Threonin	0,010	0,010	0,027
Lys/Thr/Met	0,003	0,011	0,28

	Dihydrodipicolinat Reduktase U/mg	Homoserin dehydrogenase U/mg
nichts	0,06	0,47
L-Leucin	0,05	0,50
L-Lysin	0,06	0,42
L-Methionin	0,06	0,44
L-Isoleucin	0,05	0,21
L-Threonin	0,05	0,02
Lys/Thr/Met	0,06	0,02

Es wurde ebenfalls der Einfluß höherer Effektorkonzentrationen (Lys, DAP, AEC, Leu) auf die Aktivität der DDP-Synthase geprüft, in der Annahme, daß die Corynebakterienenzyme erst bei höheren Konzentrationen inhibiert werden. Es zeigte sich aber auch bei Zugabe von höheren Leucin und Lysinmengen (bis 100 mM) in den

Reaktionsansatz kein inhibitorischer Einfluß dieser Aminosäuren auf die DDP-Synthaseaktivität.

1.4. Einfluß des Leucins auf die Bildung der DDP-Synthase bei ruhenden Zellen

Um die in der Literatur beschriebene Repression der DDP-Synthase durch Leucin (Tosaka et al., 1978) näher zu untersuchen, wurde der leucinauxotrophe C. glutamicum Stamm ATCC 14310 in Gegenwart von 300 mg/l L-Leucin in Minimalmedium C. glu X über 16 h angezogen. Nach zweimaligem Waschen mit 100 ml steriler Saline wurden die Zellen in leucinfreies Minimalmedium C. glu. X überführt und weitere 6 h geschüttelt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben zur Enzymbestimmung entnommen und aufgearbeitet. Die sp. Aktivitäten, die dabei bestimmt wurden, zeigten keinen Unterschied zur Ausgangsaktivität. Damit ist eine Repression der DDP-Synthase in C.-glutamicum durch Leucin auszuschließen (s. Tab. 7).

Tabelle 7 : Spezifische Aktivitäten der DDP-Synthase des leucinauxotrophen C. glutamicum ATCC 14310 unter dereprimierenden Bedingungen

Zeitpunkt in h	sp. Aktivität in U/mg
0	0,231
1	0,220
2	0,242
4	0,244
6	0,246

2. Subklonierung und Expression heterologer Lysinbiosynthesegene in *C. glutamicum*

2.1. Subklonierung des *asd*-, *dap A*- und *dap B*-Gens aus *E. coli* in den Pendelvektor pZ 1

Zur Ermittlung von Engpässen (enzymatischen Limitationen) in der Lysinbiosynthese, für eine Überproduktion dieser Aminosäure, sollten die Enzymaktivitäten der an der Synthese beteiligten Enzyme mit Hilfe molekulargenetischer Methoden erhöht werden. Dieser Ansatz wurde sowohl mit den entsprechenden Genen aus *E. coli* als auch *C. glutamicum* verwirklicht. Da bei der Verwendung heterologer Gene die potentielle Gefahr von Rekombinationsereignissen (von *C. glutamicum* existieren keine rec Mutanten) umgangen wird und weil die bereits gut charakterisierten *E. coli* Gene sofort verfügbar waren wurden zunächst die Gene der ASA-Dehydrogenase (*asd*), der DDP-Synthase (*dap A*) und der DDP-Reduktase (*dap B*) aus *E. coli* herangezogen. Es bestand außerdem ein grundsätzliches Interesse daran zu erfahren, ob die *E. coli* Gene (Bouvier et al., 1984; Dauce-Le Reverend et al., 1982; Haiza et al., 1982; Richaud et al., 1981; Richaud et al., 1986) in *C. glutamicum* überexprimierbar sind.

Dazu wurde das Gen der DDP-Synthase (*dap A*) als 1,2 kb Sma I - Pst I Fragment aus pDA8 isoliert und mit dem Sca I - Pst I verdauten und alkalische Phosphatase behandelten Pendelvektor pZ 1 (s. Abb. 3) ligiert. Durch Selektion auf Komplementation der *dap A* (-) Mutante *E. coli* RDA 8 und auf Ampicillinsensitivität wurden Klone erhalten, die das gewünschte Plasmidkonstrukt trugen. Analog dazu wurde auch das Gen der Aspartatsemialdehyddehydrogenase (*asd*) als 1,7 kb Bam HI Fragment isoliert und in die Bgl II Schnittstelle des Pendelvektors pZ 1 inseriert. Hier erfolgte die Selektion durch Komplementation der *asd* minus Mutante *E. coli* RASA 51. Das Gen der DDP-Reduktase (*dap B*) wurde als 2,3 kb Hpa I - Cla I Fragment nach Klenowbehandlung in die Sca I Schnittstelle des Pendelvektors pZ 1 inseriert (s. Abb. 3).

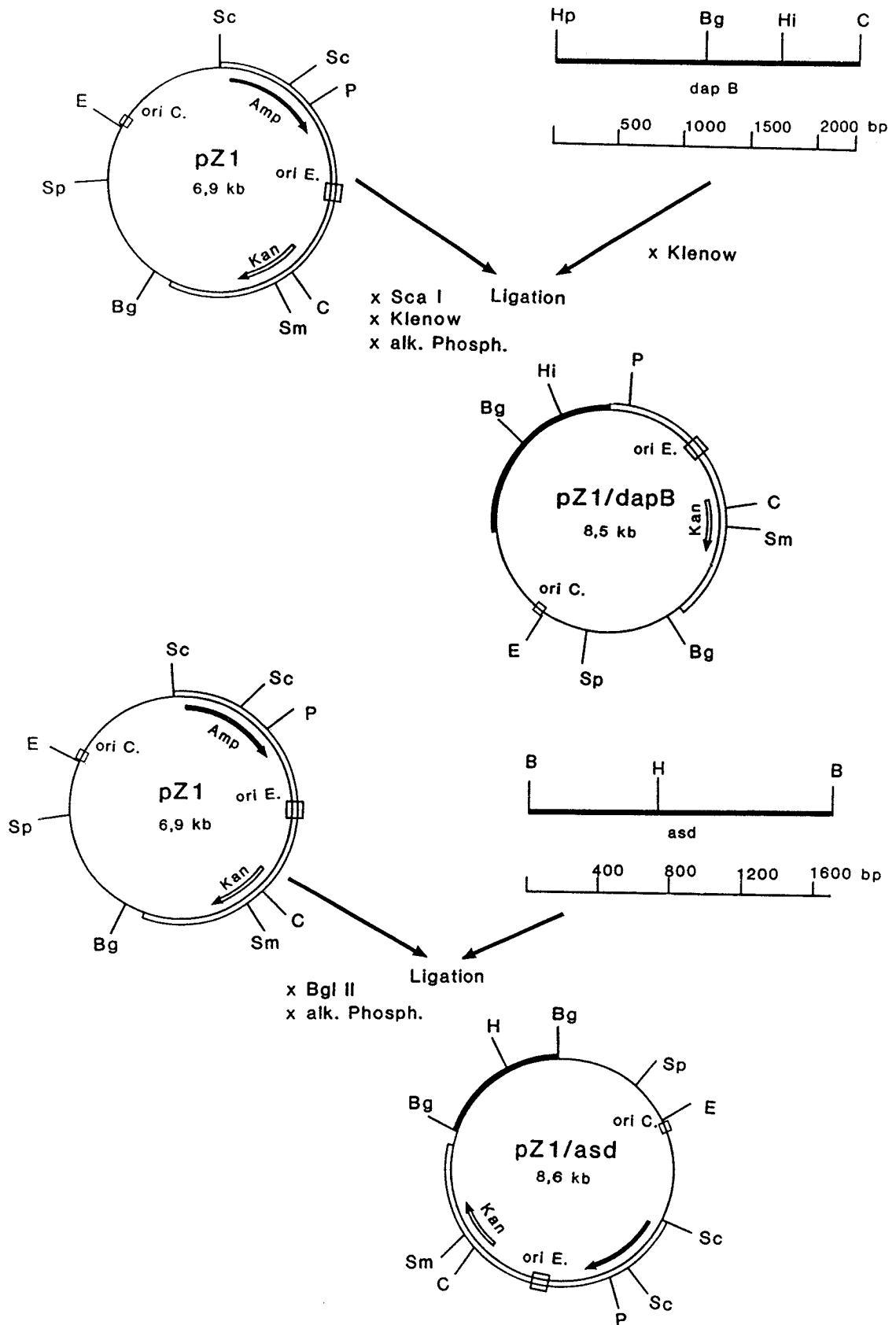


Abb. 3 : Subklonierung der *E. coli* Gene *asd*, und *dap B* in den Pendelvektor pZ 1 (B = Bam HI, Bg = Bgl II, C = Cla I, E = Eco RI, H = Hind III, P = Pst I, S = Sal I, Sc = Sca I, Sm = Sma I, Sp = Sph I)

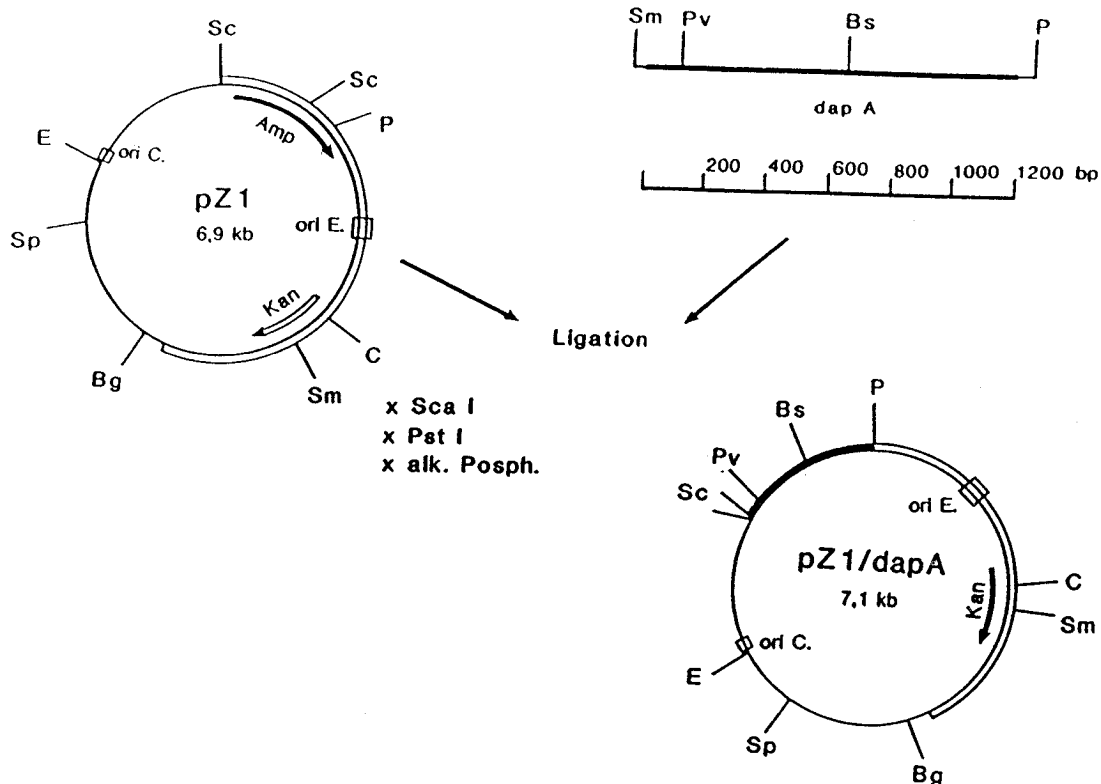


Abb. 3 : Subklonierung des *E. coli* *dap A* Gens auf den Pendelvektor pZ 1. (Bg = Bgl II, Bs = Bst EII, C = Cla I, E = Eco RI, P = Pst I, Pv = Pvu II, Sc = Sca I, Sm = Sma I, Sp = Sph I,)

Die bei der Subklonierung erhaltenen Konstrukte (pZ 1/asd, pZ 1/dap A, pZ 1/dap B) wurden durch Sphaeroplastentransformation (Thierbach et al., 1988) nach *C. glutamicum* übertragen. Die dabei erhaltenen Klone wurden durch Plasmidschnellisolierung überprüft und die Enzymaktivitäten im Rohextrakt bestimmt.

Ein Vergleich der sp. Aktivitäten der Konstrukte in den beiden Wirtsorganismen zeigte deutlich, daß die *E. coli* Gene in Corynebakterien transkribiert werden und daß es zur 7 bis 13 fachen Amplifikation der Enzymaktivitäten kommt (s. Tab. 8). Die sp. Aktivitäten, die in *E. coli* erreicht wurden, waren absolut betrachtet mit denen in *C. glutamicum* vergleichbar. Die Überexpression der *E. coli* Gene in *C. glutamicum* zeigte, daß die heterologen Promotoren in *C. glutamicum* erkannt werden. Vektorkodierte Promotoren konnten wegen der Unabhängigkeit der Überexpression von der Orientierung der Gene im Vektor ausgeschlossen werden.

Tabelle 8 : Spezifische Aktivitäten lysinbiosynthetischer E. coli Enzyme durch Überexpression der entsprechenden Gene in E. coli und C. glutamicum.

Enzym	sp. Akt. U/mg		chromosomal kodierte	
	in <u>E. coli</u> (Faktor der Überexpression)	in <u>C.glu.</u>	sp. Akt. in <u>E. coli</u>	sp akt. in <u>C. glu</u>
ASA-Dehydrogn.	0,131 (8)	0,132 (7)	0,016	0,019
DDP-Synthase	1,56 (13)	1,450 (7)	0,120	0,200
DDP-Reduktase	0,76 (13)	0,630 (11)	0,060	0,060

2.2. Hemmung der DDP-Synthase aus E. coli durch L-Lysin und der Vergleich der pH-Abhängigkeit der DDP-Synthasen

Aus den Untersuchungen zur Regulation der DDP-Synthase in E. coli war bekannt, daß die Synthase des Enterobakteriums durch Lysin gehemmt wird (Gilvarg et al., 1962, Richaud et al., 1986) . Für die Bestimmung von Engpässen durch Amplifikation der am Syntheseweg beteiligten Enzyme war es notwendig zu erfahren, wie sich die Feedbackinhibition auf das Enzym aus E. coli in C. glutamicum auswirkt. In vitro Inhibitionsstudien an Rohextrakten der rekombinanten Corynebakterien mit überexprimiertem dap A Gen aus E. coli zeigten eine drastische Feedbackinhibition der DDP Synthase (s. Abb.4). Durch Zugabe von 1 mM L-Lysin in den Reaktionsansatz sank die sp. Aktivität auf 60 %, bei Zugabe von 5 mM auf 50 % und bei Zugabe von 10 mM auf 35 % des Ausgangswertes ab. Allerdings kam es dann durch Zugabe höherer Lysinmengen nicht zum vollständigen Absinken der DDP-Synthaseaktivität auf das Niveau, der vom Corynebacterienchromosom kodierten Aktivität, wie in Abb. 4 gezeigt wird.

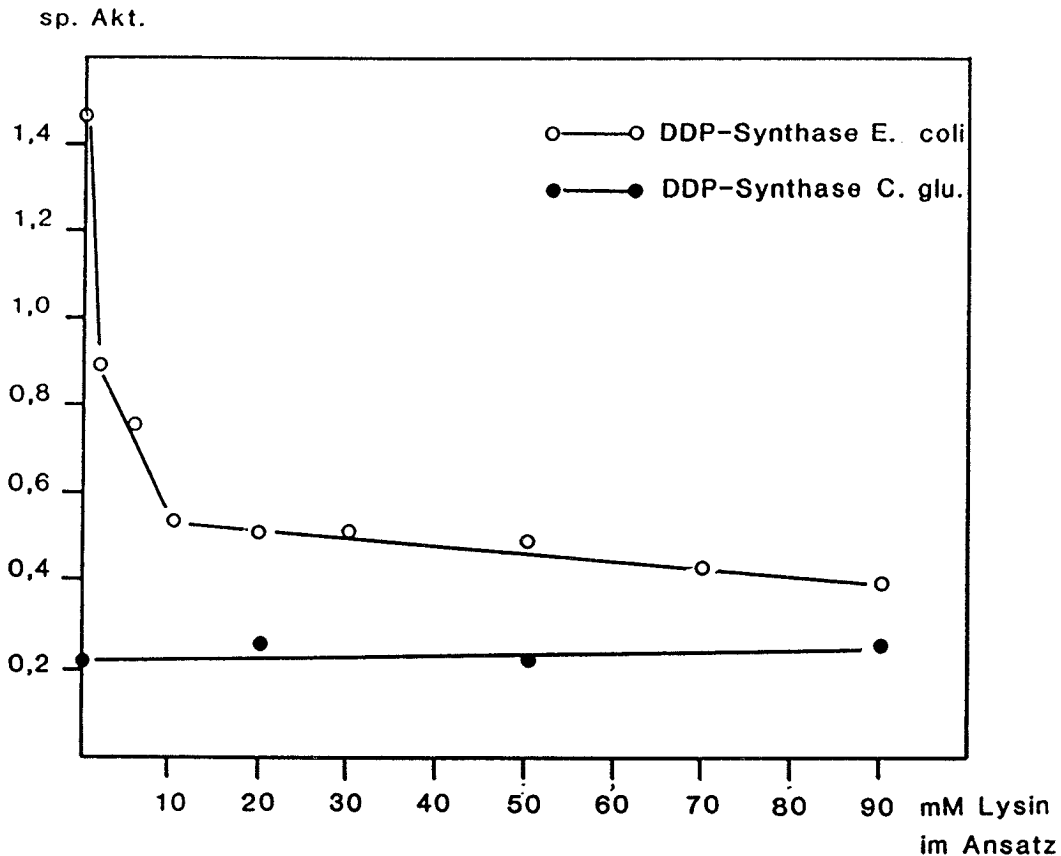


Abb. 4 : Inhibition der in *C. glutamicum* überexprimierten *E. coli*-DDP-Synthase durch L-Lysin: o—o sp. Akt. der DDP-Synthase aus *E. coli* in *C. glutamicum* ATCC 13032, ●—● sp. Akt. der chromosomalen DDP-Synthase in *C. glutamicum* ATCC 13032.

Die Überexpression eines heterologen Gens führt nur dann zu einer tatsächlichen höheren enzymatischen Aktivität wenn das entsprechende Enzym unter den Bedingungen des Wirtes funktionstüchtig ist. Es wurden daher die pH-Abhängigkeiten der beiden DDP-Synthasen im Rohextrakt miteinander verglichen (s. Abb. 5). Beide Enzyme zeigten eine etwa gleiche pH-Abhängigkeit und ein Optimum bei pH 8,2. Dies ließ den Schluß zu, daß die *E. coli* DDP-Synthase in Bezug auf die pH-Wertabhängigkeit in Corynebakterien funktionstüchtig ist.

sp. Aktivität

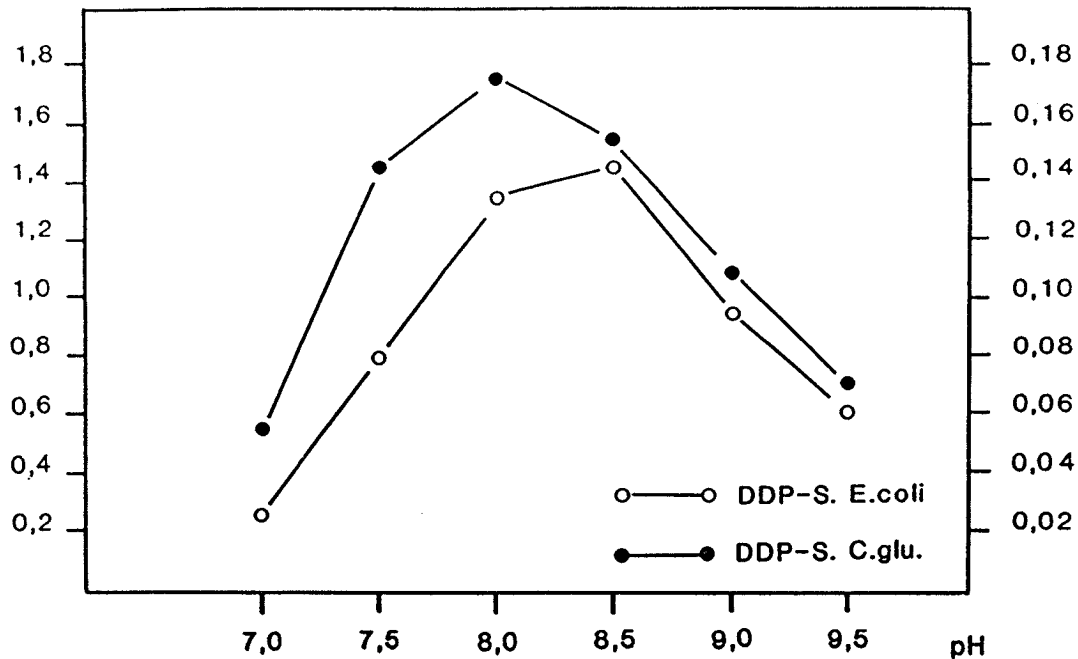


Abb. 5 : Abhängigkeit der DDP-Synthase aus E. coli und der DDP-Synthase aus C. glutamicum vom pH-Wert

2.3. Einfluß der Überexpression von Lysinbiosynthesegenen aus E. coli in C. glutamicum DG 52-5 auf die Lysinausscheidung

Um den Einfluß der Überexpression der E. coli Gene asd, dap A und dap B auf die Lysinausscheidung zu untersuchen, wurden die unter 2.1. beschriebenen Konstrukte in den als AEC^r beschriebenen C. glutamicum Stamm DG 52-5 transformiert. Dieser Corynebakterienstamm wurde in einem klassischen Mutageneseverfahren als AEC^r und lysinausscheidende Mutante isoliert. Diese Transformanten wurden im Minimalmedium C. glu. X fermentiert. Aus den im Kulturmedium bestimmten Lysinkonzentrationen (Tab.10) ließ sich ein steigender Effekt für den Stamm mit amplifizierter DDP-Synthase aufzeigen. Diese Steigerung konnte als weiterer Beweis für die Funktion des E. coli Enzyms in C. glutamicum herangezogen werden. Die Überexpression der beiden anderen Gene in DG 52-5 führte nicht zur vermehrten Ausscheidung der Aminosäure ins Kulturmedium.

Tabbelle 9 : Einfluß der Überexpression der E. coli Gene asd , dap A, und dap B in C. glutamicum DG 52-5 auf die Lysinausscheidung

Plasmid/Gen	sp. Akt.	mM Lysin	mM Lysin
	in U/mg	Exp 1	Exp 2
	nach 24 h	nach 72 h	nach 73 h
pZ 1/ -	-	33 ± 3	31 ± 2
pZ 1/ <u>asd</u>	0,15	34 ± 2	32 ± 2
pZ 1/ <u>dap A</u>	1,45	40 ± 1	42 ± 3
pZ 1/ <u>dap B</u>	0,64	32 ± 1	32 ± 1

3. Klonierung der Lysinbiosynthesegene aus *C. glutamicum*

Die Untersuchungen zur Regulation der Lysinbiosynthese in C. glutamicum hatten ergeben, daß in Bezug auf die Regulation große Unterschiede zwischen E. coli und C. glutamicum bestehen. So wurde die Aspartatkinase der Corynebakterien durch konzertierte Feedbackinhibition durch Threonin und Lysin in ihrer Aktivität reguliert. In E. coli wo drei Isoenzyme (Truffau-Bachi et al., 1973) gefunden wurden, wird jedes dieser Enzyme einzeln reguliert. In C. glutamicum wurde aber nur eine Aspartatkinase gefunden (Shiio et al., 1969; Nakayama et al., 1966). Weiterhin konnte durch die Subklonierung des E. coli dap A Gens gezeigt werden, daß sich das E. coli Gen wegen der Endprodukthemmung nur bedingt zur Synthesewegsanalyse in Corynebakterien eignet. Es war daher notwendig die Gene der Lysinbiosynthese aus C. glutamicum zu klonieren. Da diaminopimelatauxotrophe Corynebakterien wegen mangelnder Diaminopimelataufnahme nicht erhalten wurden (Eggeling persönliche Mitteilung 1986), wurde die heterologe Komplementation mit diaminopimelatauxotrophen Mutanten von E. coli als Klonierungsstrategie eingeschlagen.

3.1. Aufbau einer *C. glutamicum* ATCC 13032 Cosmidgenbank mit pHC 79 in *E. coli*

Zum Aufbau der Genbank wurde eine Methode benutzt, die es erlaubte mit einer möglichst kleinen Zahl von Klonen das Corynebakterienchromosom repräsentativ abzudecken bzw. große Fragmente der chromosomalen DNA in einen Vektor zu integrieren. Zur Klonierung größerer DNA-Fragmente bot sich die Cosmidklonierung an, (Collins et al., 1978) die den Einbau großer (32-46 kb) Fragmente ins Cosmid erlaubt. Zusätzlich zu der hohen Aufnahmekapazität des Cosmids wird über die Verpackungsreaktion des Ligationsansatzes eine Selektion auf die Größe der Insertion vorgenommen. In vitro werden ausschließlich Ligationsprodukte verpackt, die im Abstand von 38 - 52kb cos-Stellen aufweisen (Hohn et al. 1975). Chromosomale DNA des *C. glutamicum* Wildtyps ATCC 13032 wurde mit der Restriktionsendonuklease Sau 3A statistisch verdaut und eine von der Fragmentgröße her geeignete Präparation (s. Abb. 6 Spur C) in die Ligation eingesetzt.

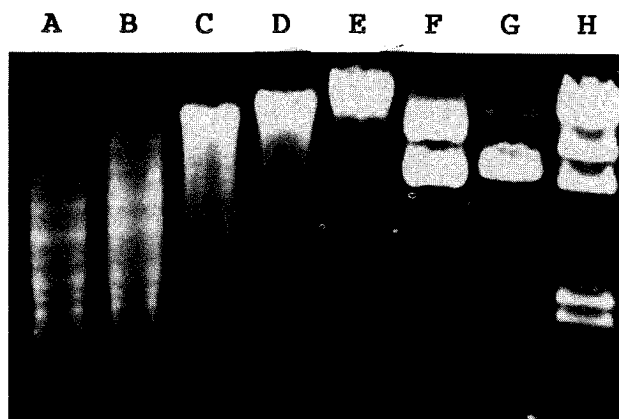


Abb. 6 : Gelelektrophoretische Auftrennung des abgestuften Verdaus chromosomaler DNA mit der Restriktionsendonuklease Sau 3A

Spur A: 0,4 U/μg DNA 15 min bei 37 °C

B: 0,1 U/μg DNA -"-

C: 0,025 U/μg DNA -"-

D: 0,012 U/μg DNA -"-

E: chr. DNA unverd. -"-

F: pHC 79 unverd.

G: pHC 79 X Bam HI 30 min bei 37 °C

H: Lambda X Eco RI

Aus Vorversuchen wurden folgende die Ligation begünstigenden Bedingungen abgeleitet. Der Gesamt-DNA-Gehalt sollte 0,5 - 1,0 µg/µl und das Vektor/Insert-Verhältnis 1:3 betragen. Der Ligationsansatz wurde nach der In vitro Verpackung in den E. coli Stamm ED 8767 transduziert. Plasmidschnellisolationen der erhaltenen Transduktanten zeigten, daß durchschnittliche Insertionen von ca. 40 kb Größe vorlagen. Nach der Korrelation (Clarke et al., 1976) zwischen Genom- und Insertgröße sowie der Repräsentationswahrscheinlichkeit:

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-X/Y)}$$

N = Zahl der Klone
P = Repräsentationsw.
X = Insertgröße
Y = Genomgröße

benötigt man bei einer für Corynebakterien angenommenen Genomgröße von 2500 kb (Martin et al., 1987) und einer vorgegebenen Repräsentationswahrscheinlichkeit von 99,9 %

$$N = \frac{\ln(1-0,999)}{\ln(1-40/2500)} = \frac{-0,6908}{-0,0161} = 429$$

429 unterschiedliche Transduktanden um das Genom repräsentativ abzudecken. Tatsächlich wurden 1500 Klone zu je 100 vereint vermehrt und die Cosmid-Hybrid DNA durch Plasmidisolation gewonnen. Diese DNA-Präparation wurde direkt zur Komplementation der DAP-auxotrophen E. coli Mutanten eingesetzt.

3.2. Überprüfung der DAP-auxotrophen E. coli Stämme auf Eignung zur Komplementation

Um eine erfolgreiche Klonierung der Lysinbiosynthesegene aus C. glutamicum zu gewährleisten, mußten die Reversionsraten und Transformationsraten der verfügbaren E. coli Mutanten überprüft werden. Von den zehn getesteten Stämmen erfüllten drei (s. Tab. 11) die Voraussetzung für eine erfolgreiche Klonierung nämlich einer Reversionsrate im Bereich $< 10^{-9}$, verbunden mit einer maximalen Transformationsrate mit reiner pH₇ 79 DNA von $10^5/\mu\text{g}$.

Tabelle 10 : Reversions- und Transformationsraten von di-aminopimelatauxotrophen E. coli Mutanten
Die Reversionsraten wurden in Bezug zur Di-aminopimelatauxotrophie ermittelt.

Stamm/Defekt in	Reversions- raten	max. Transfrate /µg pHC 79 DNA CFU	Quelle
AT997 <u>dap A</u>	10^{-6}	10^4	B. Bachmann
AT998 -"-	10^{-5}	-	B. Bachmann
RDA 8 -"-	$< 10^{-9}$	10^5	J.C. Patte
AT999 <u>dap B</u>	$< 10^{-9}$	10^5	B. Bachmann
Hfr3000 <u>asd</u>	10^{-7}	10^3	B. Bachmann
HfrG6M2 -"-	10^{-5}	-	B. Bachmann
RASA 51 -"-	$< 10^{-9}$	10^5	J.C. Patte
GT 3 <u>lys C</u>	0	-	J.C. Patte
RDD 32 <u>dap D</u>	$< 10^{-9}$	10^4	J.C. Patte
RDE 51 <u>dap E</u>	$< 10^{-9}$	10^3	J.C. Patte

Aufgrund der anfangs gestellten Bedingungen erschienen drei der getesteten Stämme als geeignet und zwar der dap A defekte Stamm RDA 8, der dap B defekte Stamm AT999 und der asd defekte Stamm RASA 51.

3.3. Konstruktion eines Pendelvektors für C. glutamicum/E. coli und dessen Weiterentwicklung zum Promotorsuchvektor

Von dem für die Subklonierung der E. coli Gene benutzten Pendelvektor pZ 1 (Menkel et al., 1989) waren lediglich zwei zur Klonierung geeignete Einzelschnittstellen bekannt. Der Vektor wurde durch Restriktionskartierung auf zusätzliche Einzelschnittstellen überprüft. Es wurden dabei keine weiteren geeigneten Schnittstellen gefunden aber eine Reihe gängiger Restriktionsenzyme, die pZ 1 nicht schneiden (Kpn I, Xba I, Bam HI, Sal I) findet man auf der multiplen Klonierungsstelle von pUC 18. Zur Erweiterung der Klonierungsmöglichkeiten wurde nach Pst I und Sma I Verdau von pUC 18 das Linkerfragment dieses Vektors aus einem Polyacrylamidgel

isoliert und mit dem Sca I und Pst I verdauten Vektor pZ 1 ligiert.

Dieser Ligationsansatz wurde in kompetente Zellen von E. coli DH 5 transformiert und der Erfolg der Klonierung durch Plasmidschnellisolierung und Restriktionsverdau (Bam HI, Sal I, Xba I, und Sma I) überprüft. Durch den Sma I Verdau konnte der Einbau eines Linkermultimers ausgeschlossen werden, da die Sma I Schnittstelle in der geplanten Konstruktion eliminiert wurde. Es wurde ein Plasmid erhalten, daß als Pendelvektor für E. coli/C. glutamicum dient, eine Kanamycinresistenz trägt und eine multiple Klonierungsstelle besitzt. Der Vektor wurde pJC 1 genannt (s. Abb. 7).

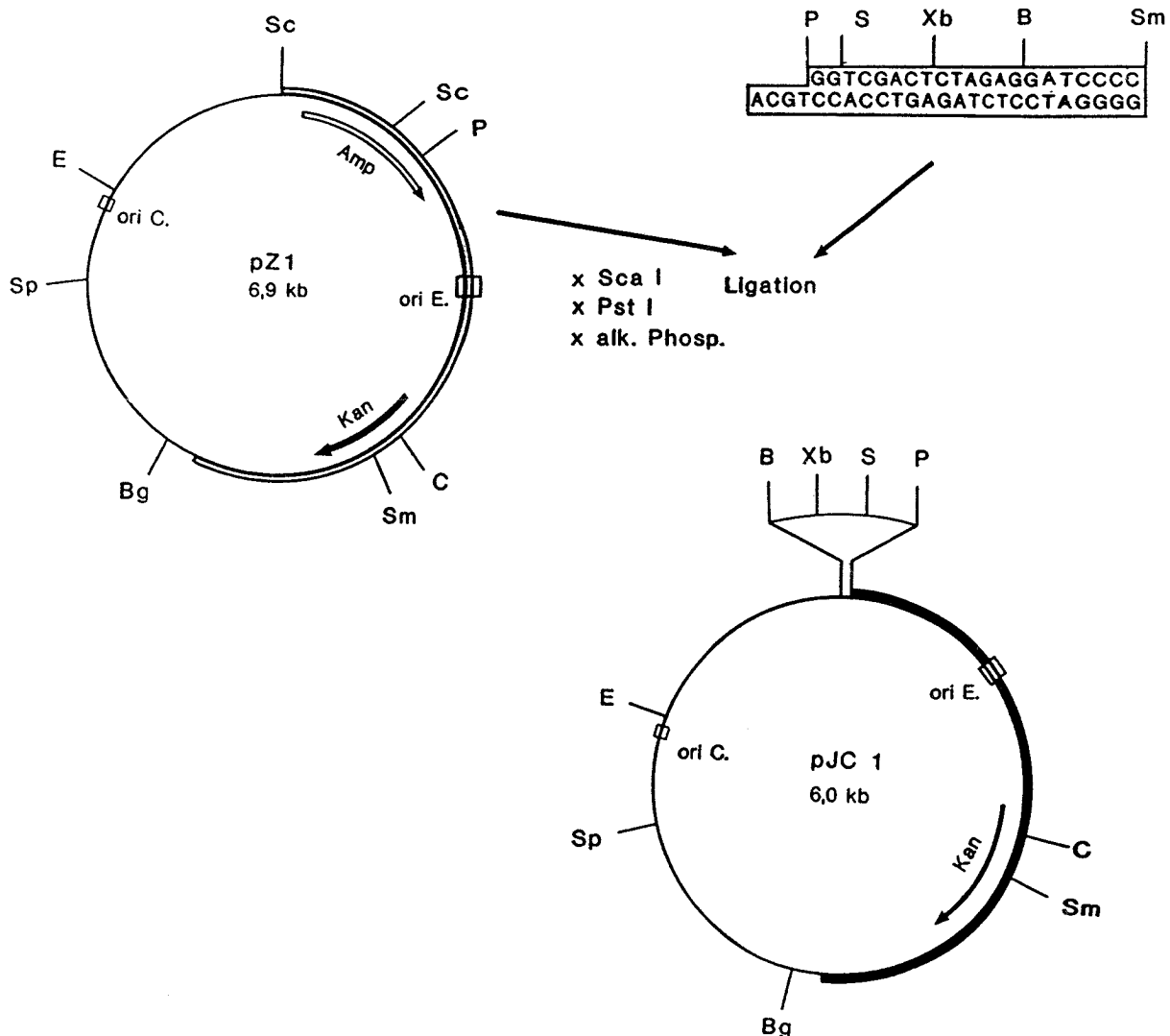


Abb. 7 : Konstruktion des Pendelvektors pJC 1 (B = Bam HI, Bg = Bgl II, C = Cla I, E = Eco RI, P = Pst I, S = Sal I, Sc = Sca I, Sm = Sma I, Sp = Sph I, X = Xba I)

Ausgehend vom Pendelvektor pJC 1 wurde ein Promotorsuchvektor entwickelt der es erlaubt in C. glutamicum funktionstüchtige Promotoren zu lokalisieren.

Der Vektor pJC 1 wurde Sal I und Eco RI gespalten und mit dem trp a terminatortragenden Eco RI - Sal I Fragment des E. coli/C. glutamicum Pendelvektors pWST 1 (Peoples et al., 1988) ligiert. Dabei wurde ein Konstrukt (pJC 2) mit gerichtetem rho-unabhängigen Terminator (Christie et al., 1981) erhalten (s. Abb. 8). In die Pst I Schnittstelle dieses Vektors wurde nach Restriktionsverdau mit Pst I, Klenowbehandlung und Abspaltung der 5' Phosphatreste mit alk. Phosphatase das promotorlose Chloramphenicol Acetyltransferasegen (Alton et al., 1978) inseriert. Durch Plasmidschnellisolation und Restriktionsverdau konnten in der Agarosegelelektrophorese Klone identifiziert werden, die das CAT-Gen in der vom Terminator geschützten Richtung enthielten (s. Abb. 8).

Die Funktion des Promotorsuchvektors in C. glutamicum wurde durch Insertion des lac Z Promotors aus pUC 18 in die multiple Klonierungstelle zwischen trp a Terminator und promotorlosem CAT-Gen überprüft. Der Vektor vermittelt durch Insertion eines Promotors in Leserichtung des CAT Chloramphenicolresistenz sowohl in E. coli als auch in C. glutamicum (s. Tab. 11).

Tabelle 11 : Chloramphenicolresistenz durch Insertion des lac Z Promotors in pJC 3

Plasmid	Cm ^r in <u>E. coli</u>	Cm ^r in <u>C. glutamicum</u>
pJC 3	-	-
pJC 3/lac Z	+	+

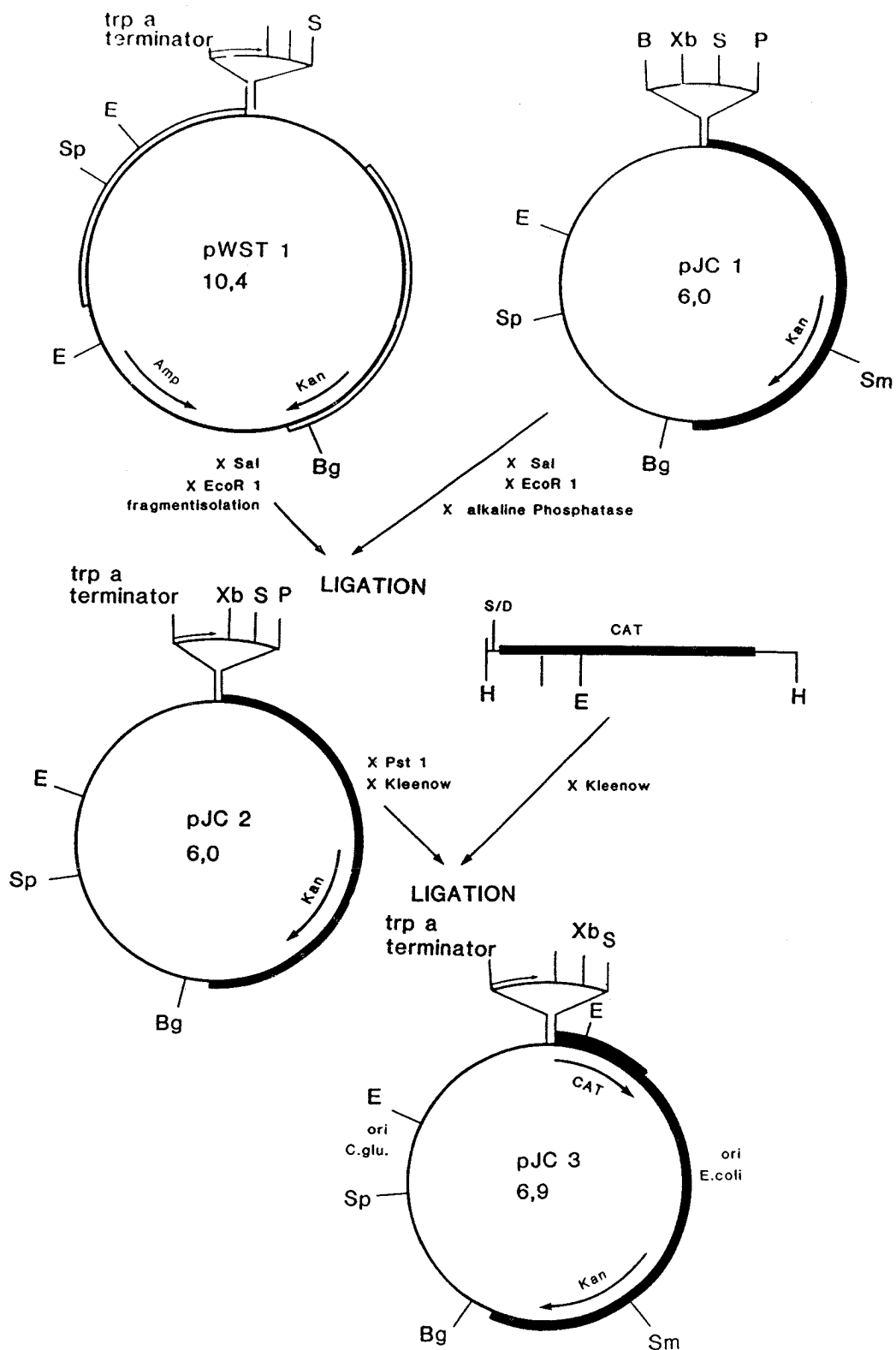


Abb. 8 : Weiterentwicklung des Pendelvektors pJC 1 zum Promotor-suchvektor pJC 3 für *C. glutamicum* Promotoren.

(B = Bam HI, Bg = Bgl II, E = Eco RI, P = Pst I, S = Sal I, Sm = Sma I, Sp = Sph I, X = Xba I)

3.4. Klonierung und Restriktionskartierung der lys C/asd Cluster mit reguliertem und dereguliertem lys C

Durch Komplementation des asd defekten E. coli Stammes RASA 51 mit der Cosmidgenbank wurden 5 prototrophe Klone erhalten, die identische 15 kb große Insertionen im Cosmid trugen. Unabhängig davon fand J. Kalinowski, der ein AEC^r vermittelndes DNA Fragment sequenzierte, einen Bereich mit Aminosäuresequenzhomologie zum asd Gen von Streptococcus mutans. Allerdings konnte man diesen Klonen keine Aspartatsemialdehyddehydrogenaseaktivitäten zuordnen. Um diese neue Information über die Clusterung von AEC^r und asd Gen näher untersuchen zu können, wurde eine neue Cosmidgenbank mit chromosomaler DNA des als AEC^R und Leu⁻ beschriebenen C. glutamicum Stammes MH 20 22B aufgebaut. Plasmidschnellisolierung einer repräsentativen Anzahl von Transduktanten zeigten durchschnittliche Inserts von ca. 38 kb (s. Abb. 9).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

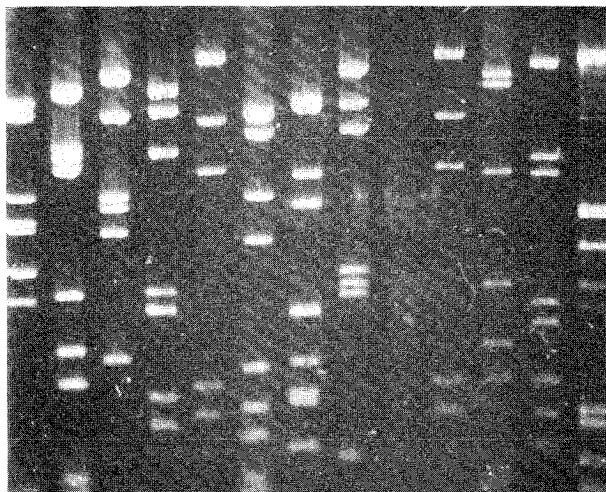


Abb. 9 : Agarosegelelektrophorese von repräsentativen Plasmidisolationen aus Klonen der Cosmidbank mit chromosomaler DNA aus C. glutamicum MH 20 22B

Spur 1-4 : Transduktanden 1-4 X Hind III

5,10 : DNA Standard Lambda X Hind III

6-9 : Transduktanden 6-9 X Hind III

11-13 : Transduktanden 11-13 X Hind III

Mit dieser neuen Cosmidgenbank konnte erneut ein prototropher RASA 51 Klon isoliert werden, der eine ca 40 kb große Insertion trug. Nach Subklonierung der beiden asd tragenden Cosmide unterschiedlicher Herkunft, als 9,1 kb Bam HI Fragmente in den Pendelvektor pJC1, wurden die Konstrukte über Sphäroplastentransformation in C. glutamicum ATCC 13032 übertragen. Durch Bestimmung der Enzymaktivitäten konnte gezeigt werden, daß beide Subklone das lys C Gen tragen, (s. Tab. 11) da es in C. glutamicum zur Amplifikation der Aspartatkinase kommt. Weiterhin konnte erstmalig gezeigt werden, daß die deregulierte Aspartatkinase mit der AEC^r identisch ist, denn im Falle des AEC^r und Überexpression für lys C vermittelnden Klones entfällt die Feedbackinhibition (s. Tab. 12) durch Lysin und Threonin.

Tabelle 12 : Überexpression der regulierten (lys C_R) und deregulierten (lys C_D) Aspartatkinase aus C. glutamicum ATCC 13032 bzw. MH 20 22B

Plasmid/Gen	sp. Akt. in U/mg ohne Zusatz	sp. Akt. in U/mg + 10 mM Lys/Thr
pJC 1/ -	0,014	0,000
pJC 1/ <u>lys C_R</u>	0,144	0,005
pJC 1/ <u>lys C_D</u>	0,162	0,115

3.5. Deletionsanalyse des lys C/asd Operons mit dereguliertem lys C

Bei der Restriktionskartierung der beiden 9,1 kb lys C/asd Cluster wurde kein Unterschied bezüglich des Restriktionsmusters festgestellt. Zur Untersuchung der Genorganisation des Clusters mittels Deletionsanalyse wurde das DNA Fragment mit dereguliertem lys C herangezogen (pJC 30). Die enzymatischen Bestimmungen erfolgten in C. glutamicum ATCC 13032, um die AEC^r auflösen zu können.

Durch Deletion eines 4,5 kb Xba I - Bam HI Fragments entstand ein AEC^r vermittelndes Konstrukt (pJC 31 s. Abb. 10)

mit Überexpression für asd, aber ohne entsprechende Überexpression für das lys C Gen. Aus Vorexperimenten mit einem weiteren Subklon (pJC 32) der ein 1,7 kb Dra I Fragment trug, war bekannt, daß dieses Dra I Fragment zwar für das funktionstüchtige Aspartatsemialdehyddehydrogenaseprotein kodiert, daß aber durch die Dra I-Klonierung der Promotor des asd Gens deletiert wurde. Aus der Orientierungsabhängigkeit der Überexpression des 1,7 kb Dra I Fragments auf pUC 18 in E. coli DH 5 ließ sich die Leserichtung des asd Gens herleiten (s. Tab. 13).

Tabelle 13 : Subklonierung des asd Gens auf pUC 18 und Bestimmung der Leserichtung.

Die in Abb. 10 gezeigte Orientierung entspricht der Orientierung I.

Plasmid/Gen/Orientierung	sp. Akt. der ASA-DH in <u>E. coli</u> DH 5 in U/mg
pUC 18/ <u>asd</u> /I	0,179
pUC 18/ <u>asd</u> /II	0.015

Aus der Sequenzinformation war bekannt (Kalinowski, persönliche Mitteilung 1988), daß der Leserahmen des AEC^r vermittelten Gens exakt an der upstream Dra I Schnittstelle des 1,7 kb asd Fragments endet. Wenn also pJC 32 ein promotorloses asd Gen darstellt, die Region upstream des Fragments jedoch zum lys C Gen gehört und die Expression von asd nicht an die von lys C gekoppelt ist (pJC31), dann mußte der Promotor für asd im lys C zu finden sein. Weitere Subklone zeigten, daß die Überexpression des asd Gens an die Ausprägung von AEC^r gekoppelt ist (s. Abb. 10).

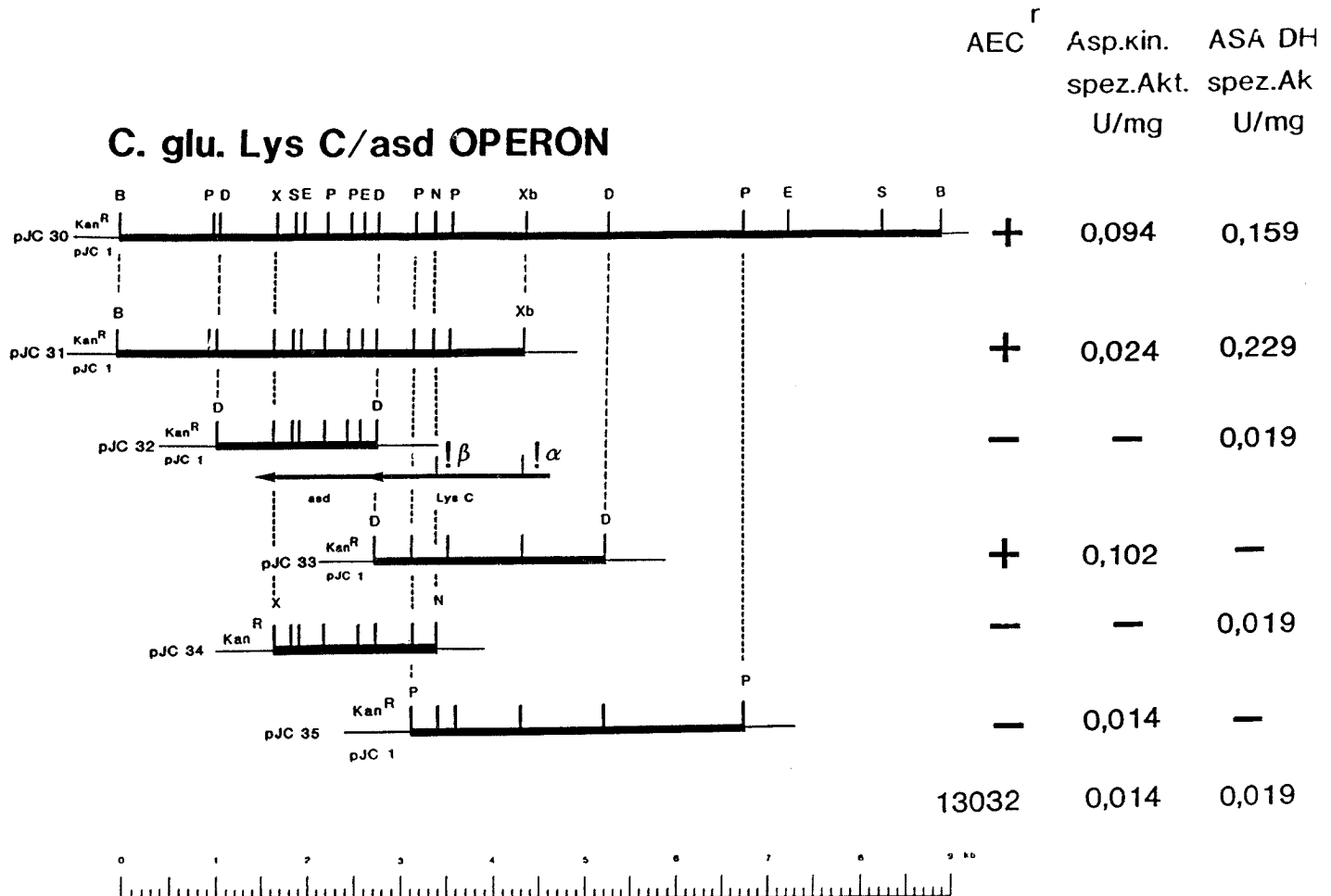


Abb. 10 : Übersicht der wichtigsten Subklone des *asd/lys C* Operons, sowie der damit erreichbaren sp. Akt. im *C. glutamicum* Wildtyp ATCC 13032

(B = Bam HI, D = Dra I, E = Eco RI, N = Nae I,
P = Pst I, S = Sal I, X = Xho I, Xb = Xba I)

3.6. Organisation des *asd/lys C* Operons

Die gemeinsame Expression von *asd* Gen und AEC^r ließ die Vermutung zu, daß das *lys C* und *asd* Gen in einer besonderen Operonstruktur organisiert sind. In Analogie zur Organisation des Gens der Aspartatkinase II des Gram positiven Bakteriums *B. subtilis*, (Bondaryk et al., 1985a,b) deren Untereinheiten durch zwei überlappende Gene kodiert werden, kann für *C. glutamicum* folgendes Modell vorgeschlagen werden

(s. Abb. 14). Die Aspartokinase wird durch zwei Untereinheiten ("α und β") gebildet, deren kodierende Gene ("α-Lys C" Gen und "β-lys C" Gen) über den "β-Anteil" überlappen und mit eigenem Promotoren ausgestattet sind. Das kürzere "β-Gen" kodiert dabei die regulatorischen Eigenschaften der Aspartatkinase und initiiert die Transcription des asd Gens.

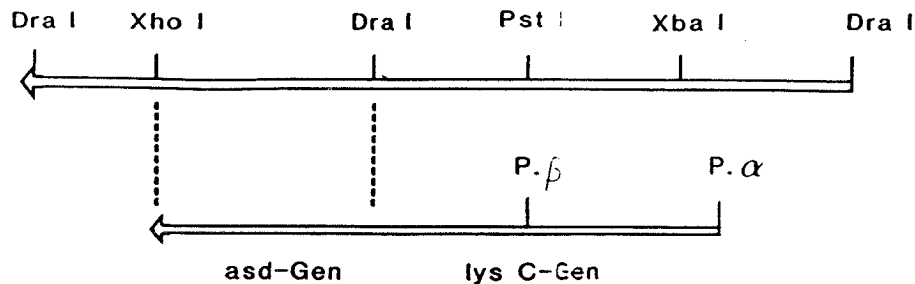


Abb. 11 : Organisation des lys C/asd Operons und Aufbau des lys C Gens aus zwei überlappenden Genen

3.7. Klonierung, Restriktionskartierung und Deletionsanalyse des dap A/ dap B Clusters aus C. glutamicum

Durch Komplementation des dap A defekten E. coli Stammes RDA 8 mit der unter 3.1. beschriebenen Cosmidgenbank wurde ein Cosmid mit ca. 40 kb chromosomaler Insertion erhalten, Im parallel durchgeführten Komplementationsexperiment mit dem dap B defekten E. coli Stamm AT999 wurde ebenfalls ein Cosmid mit ca 42 kb Insertion isoliert. Subklonierungen der Bgl II Fragmente beider Cosmide unter Selektion auf dap A bzw. dap B zeigten ein 7,0 kb großes Bgl II Fragment auf das Kreuzkomplementation ermöglicht. Weitere Kreuzkomplementationen der Cosmide mit anderen DAP-auxotrophen E. coli Stämmen traten nicht auf (s. Tab. 14).

Von dem gemeinsamen 7,0 kb Bgl II Fragment wurde eine Restriktionskarte angefertigt (s. Abb.12). Das Fragment wurde zur näheren Lokalisation der Gene der DDP-Synthase (dap A) und DDP-Reduktase (dap B) einer Deletionsanalyse unterzogen. Dabei konnte über Komplementation der dap A kodierende Bereich auf ein 1,8 kb Sph I - Bam HI Fragment und der dap B kodierende Bereich auf ein 1,9 kb Cla I Fragment einschränkt werden (s. Abb 12).

Tabelle 14: Kreuzkomplementation der beiden aus E. coli
RDA 8 und AT99 isolierten Cosmide mit diamino-
pimelatauxotrophen E. coli Mutanten.

Stamm/defekt in	Cosmid aus RDA 8 40 kb	Cosmid aus AT999 40 kb
RASA 51/ <u>asd</u>	-	-
RDA 8/ <u>dap A</u>	+	+
AT999/ <u>dap B</u>	+	+
RDD 32/ <u>dap D</u>	-	-
RDE 51/ <u>dap E</u>	-	-

C. glu. dap A/B CLUSTER

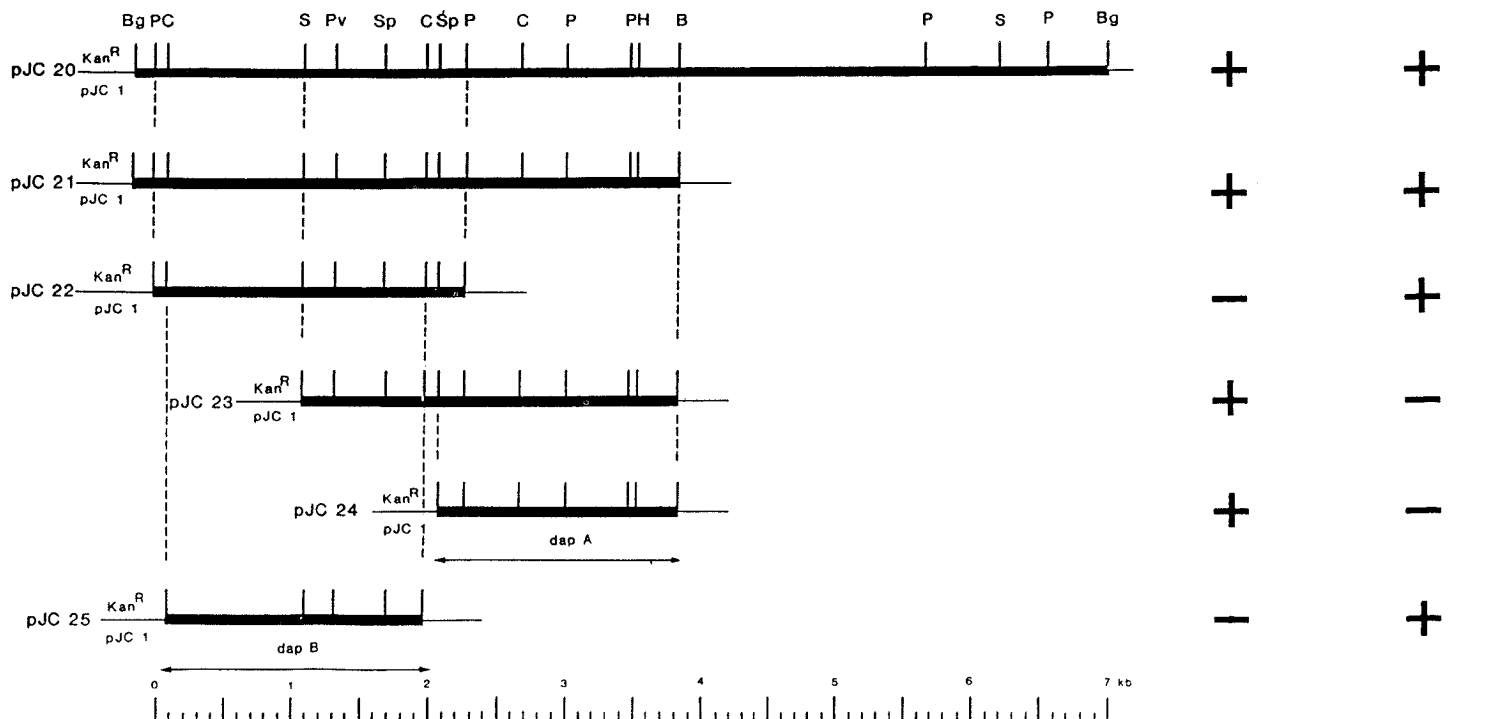


Abb.12 : Deletionsanalyse des dap A/B Clusters aus C. glutamicum
(B = Bam HI, Bg = Bgl II, C = Cla I, H = Hind III,
P = Pst I, Pv = Pvu II, S = Sal I, Sp = Sph I)

Transformation dieser Subklone in C. glutamicum und anschließende Bestimmung der Enzymaktivitäten zeigte die orientierungsunabhängige Überexpression beider Gene in C. glutamicum auf. Aus der Übereinstimmung der Enzymaktivitäten die mit dem gesamten Cluster (pJC20) erreicht wurden, und denen der einzelnen Gene konnte eine Organisation in Form eines Operons ausgeschlossen werden (s. Tab. 15).

Tabelle 15 : Expression des dap A und dap B Gens in C. glutamicum ATCC 13032

Plasmid/Orientierung	sp. Akt. in U/mg der DDP-Synthase	sp. Akt. in U/mg der DDP-Reduktase
pJC 20 / I	2,8	0,84
pJC 20 / II	3,0	0,98
pJC 24 / I	3,0	-
pJC 24 / II	2,9	-
pJC 25 / I	-	0,76
pJC 25 / II	-	1,04

3.8. Nachweis der Herkunft der klonierten Gene durch Hybridisierung mit chromosomaler DNA

Um den Nachweis zu erbringen, daß die aus der Cosmidgenbank klonierten Gene dap A und dap B tatsächlich aus C. glutamicum stammen, wurde ein gemeinsames 2,25 kb Pst I Fragment mit Digoxigenin d-UTP markiert. Durch Hybridisierung dieses Fragmentes mit entsprechend verdauter chromosomaler DNA aus verschiedenen Organismen (hier E. coli und C. glutamicum) sollte das Restriktionsmuster des Fragmentes in der chromosomalen DNA des Spenders sichtbar werden. Auf dem Immunoblot (s. Abb. 13) wurde dieses Muster in den mit chromosomaler DNA aus C. glutamicum beladenen Spuren 3 und 4 sichtbar. Damit ist die Herkunft der Gene aus C. glutamicum nachgewiesen.

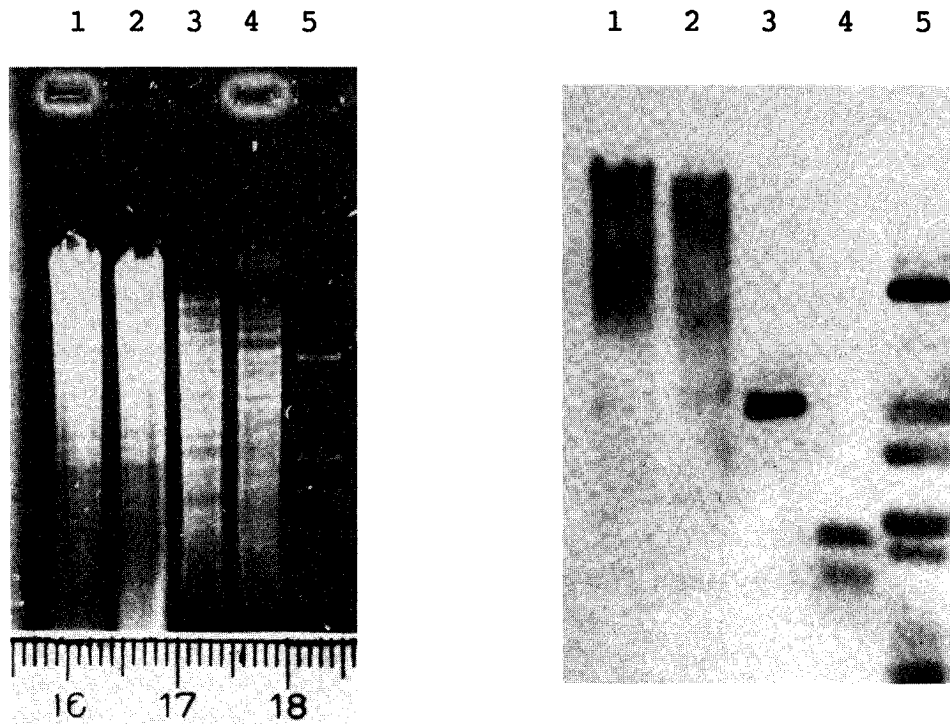
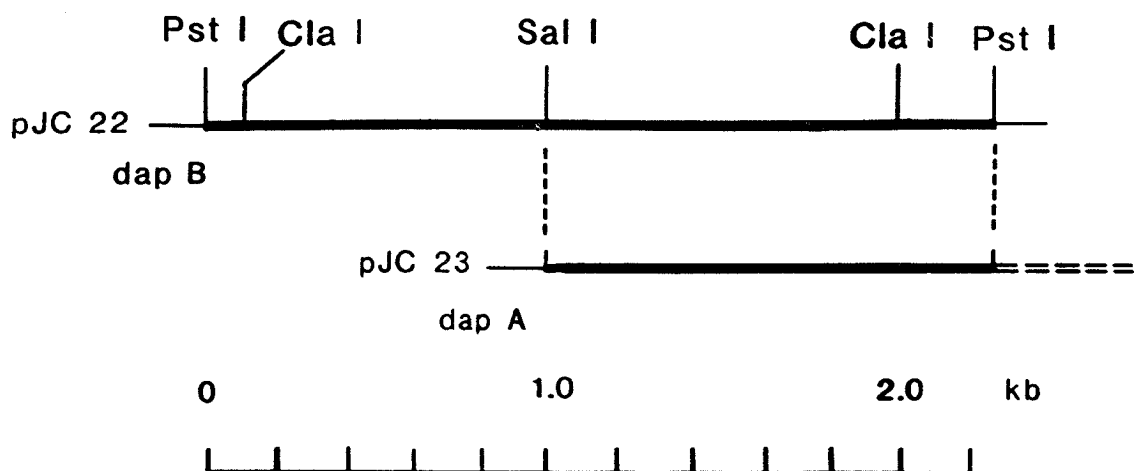


Abb. 12 : Nachweis der Herkunft der klonierten Gene dap A und dap B durch Hybridisierung mit chromosomaler DNA aus E. coli und C. glutamicum mittels nichtradioaktiver Markierung und Immunoassay zum Nachweis der Markierung.



- Spur 1: chr. DNA aus E. coli X Pst I
 2: chr. DNA aus E. coli X Sal I X Cla I
 3: chr. DNA aus C. glutamicum X Pst I
 4: chr. DNA aus C. glutamicum X Sal I X Pst I
 5: markierter Standard

3.9. Identifizierung des DDP-Reduktase Proteins durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Klonierung des dap B Gens von C. glutamicum eröffnete die Möglichkeit das DDP-Reduktase Protein durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese zu identifizieren. Bei der Etablierung des DDP-Reduktasetests unter II, 7.4. konnte die Hitzestabilität des Enzyms gezeigt werden. Diese Hitzestabilität in Verbindung mit der Amplifikation des Proteins durch Überexpression ließ im Vergleich zu Extrakten ohne entsprechende Überproduktion eine deutliche Bande im Bereich von 30.000 Dalton auftreten (s. Abb 14). Dieses Molekulargewicht im SDS-Polyacrylamidgel steht in Analogie zur DDP-Reduktase aus E. coli, die aus drei identischen Untereinheiten mit $M = 28798$ Dalton zusammengesetzt ist (Bouvier et al., 1984).

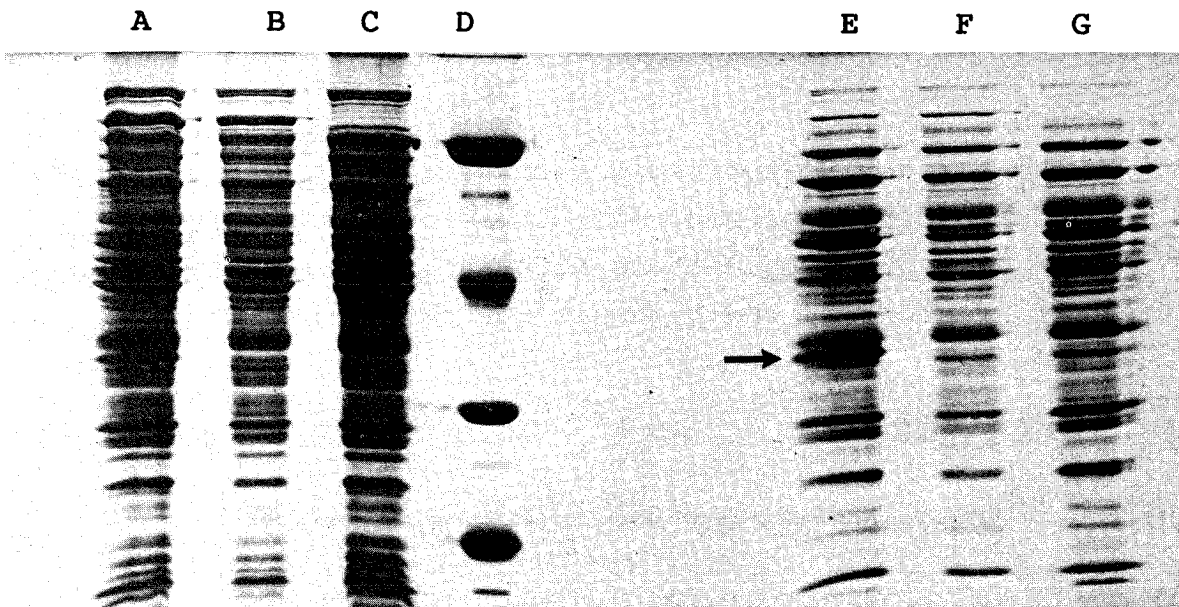


Abb. 14 : Identifizierung des DDP-Reduktase Proteins aus C. glutamicum durch Amplifizierung und Anreicherung durch Hitzebehandlung

Spur A: Extrakt aus C. glutamicum/pZ 1/dap B

B: - "- /pZ 1/ -

C: - "- / - / -

D: Molekulargewichtsstandard

E: Extrakt aus C. glutamicum/pZ 1/dap B/ 3 min 70 °C

F: - "- /pZ 1/ - / - "-

G: - "- / - / - / - "-

3.10. Subklonierung des ddh Gens aus *C. glutamicum* in den Pendelvektor pZ 1 und Amplifikation der Diaminopimelatdehydrogenase in *C. glutamicum*

Von der Degussa AG, Frankfurt wurde ein Plasmid (pTG 1228) zur Verfügung gestellt, welches ein RDD 32 und RDE 51 komplementierendes, d.h. für das ddh Gen aus *C. glutamicum* kodierendes DNA Fragment enthielt. Durch Kpn I - Eco RI Verdau wurde ein 2,8 kb Fragment isoliert und durch Kleenow-polymerase die überstehenden Enden aufgefüllt. Der Pendelvektor pZ 1 wurde mit Sca I (erzeugt glatte Enden) verdaut und mit alkalischer Phosphatase die 5' Phosphate abgespalten. Nach der Ligation der beiden Komponenten wurde der gesamte Ansatz in den dap D-defekten *E. coli* Stamm RDD 32 transformiert und auf Einbau des ddh Gens durch Ausplattieren auf diaminopimelatfreiem LB-Medium selektioniert. Plasmidschnellisolationen der prototrophen Klone zeigten die beiden möglichen Orientierungen des ddh Gens im (pJC 40 I und II) Pendelvektor.

Durch Sphäroblastentransformation wurden beide Konstrukte in *C. glutamicum* übertragen und die sp. Akt. der Diaminopimelatdehydrogenase ermittelt. Das Enzym wurde in beiden Orientierungen ca. 10-fach überexprimiert, woraus abzuleiten war daß die Transcription vom eigenen Promotor initiiert wurde. Auf die Anwesenheit dieses Promotors wurde durch Vergleich mit der Restriktionsanalyse der Sequenz des ddh Gens aus *Brevibacterium lactofermentum* geschlossen (Ishino, 1987).

3.11. Expression der *C. glutamicum* Lysinbiosynthesegene in den *C. glutamicum* Modellstämmen

Die Auswirkungen der individuellen Amplifikation, der an der Lysinbiosynthese beteiligten Enzyme, sollten in Stämmen mit abgestuftem Lysinausscheidungsvermögen betrachtet werden. Dazu wurden die korrespondierenden Gene jeweils einzeln auf *C. glutamicum*/E. coli Pendelvektoren subkloniert und durch Sphäroblastentransformation in drei verschiedene *C.*

glutamicum Stämme übertragen. Als Modellstämme in Bezug auf die Lysinausscheidung wurden der Wildtyp ATCC 13032, der als AEC^r beschriebene DG 52-5 und der phänotypisch AEC^r und Leu⁻ charakterisierte MH 20 22B ausgewählt. Ohne Manipulation wurde vom Corynebakterien Wildtyp kein Lysin ausgeschieden, von DG 52-5 ca. 40 mM nach 48 h und von MH 20 22B werden bis 100 mM nach 48 h (im Medium C. glu. X) exkretiert.

Die Expression der Gene bzw. die Amplifikation der entsprechenden Enzyme wurde durch Bestimmung der Enzymaktivität im Rohextrakt während der Fermentation zum Zeitpunkt 24 h überprüft (s. Tab. 16). Es konnte gezeigt werden, daß die betrachteten Enzyme 10 bis 15-fach amplifiziert werden.

Tabelle 16 : Enzymaktivitäten durch Überexpression individueller Gene in den C. glutamicum Modellstämmen

*Plus 10 mM Lys + 10 mM Thr

	<u>sp. Aktivität in U/mg</u>			
Stamm	13032	13032	52-5	MH20-22B
Plasmid	-	+	+	+
Aspartatkinase	0,015	0,20	0,29	0,11
*Aspartatkinase	0,000	0,20	0,29	0,11
Aspartatsemialdehyd-DH	0,016	0,246	0,139	0,122
DDP-Synthase	0,23	3,05	1,88	1,47
DDP-Reduktase	0,06	1,33	1,08	1,20
DAP-Dehydrogenase	0,13	2,5	2,1	1,6
**DAP-Decarboxylase	0,03	0,28	0,27	0,13

3.12. Stabilität der Konstrukte in C. glutamicum

Um die Stabilität der Konstrukte in C. glutamicum zu überprüfen, wurden die rekombinanten Corynebakterienstämme ohne

Selektionsdruck (Kanamycin) über ca. 30 Generationen im Vollmedium kultiviert. Eine Verdünnungsreihe jedes Klon wurde auf LB ausplattiert und Platten mit 100 - 200 Klonen auf LB_{Kan}-Platten gestempelt. Aus dem Erhalt der Kanamycin-resistenz und des Restriktionsmusters (Plasmidschnell-isolation) in der Agarosegelelektrophorese wurde auf die Plasmidstabilität geschlossen. Alle Konstrukte mit Ausnahme der deregulierten Aspartatkinase in C. glutamicum ATCC 13032 zeigten 100 % ige Stabilität. Die deregulierte Aspartatkinase in ATCC 13032 läßt sich nur durch Selektionsdruck durch AEC und Kanamycin erhalten. Aus Bestimmungen der internen Aminosäurekonzentrationen der rekombinanten C. glutamicum Stämme ist bekannt, daß bezeichnenderweise ATCC 13032 mit überexprimierter deregulierter Aspartatkinase intern extreme Lysininnenkonzentrationen aufweist (145 mM). Ob diese Anhäufung von Lysin die Instabilität der ATCC 13032 Klone erklärt, wird zur Zeit untersucht (Schrumpf, persönliche Mitteilung 1989).

Tabelle 17 : Stabilität der rekombinanten C. glutamicum Stämme bei Kultivierung ohne Selektionsdruck

Stamm/Gen	Kan ^r Klone %	Gesamtplasmid erhalten
13032/pJC 1	100	+
- " - / <u>lys C_D</u>	5	+
- " - / <u>lys C_R</u>	100	+
- " - / <u>asd</u>	99	+
- " - / <u>dap A</u>	100	+
- " - / <u>dap B</u>	100	+
- " - / <u>ddh</u>	100	+
- " - / <u>lys A</u>	98	+
52-5/ <u>lys C_D</u>	100	+
- " - / <u>lys C_R</u>	100	+
- " - / <u>asd</u>	100	+
- " - / <u>dap A</u>	100	+
- " - / <u>dap B</u>	100	+
- " - / <u>ddh</u>	99	+

Stamm/Gen	Kan ^R Klone	Gesamtplasmid erhalten
MH 20 22B/ <u>lys C_D</u>	100	+
-"- / <u>asd</u>	100	+
-"- / <u>dap A</u>	96	+
-"- / <u>dap B</u>	98	+
-"- / <u>ddh</u>	100	+
-"- / <u>lys A</u>	100	+

4. Fermentation der rekombinanten *C. glutamicum* Stämme

4.1. Einfluß der Überexpression einzelner Gene auf die Lysin- bildung des Wildtyps ATCC 13032

Die Fermentationen der rekombinanten *C. glutamicum* Stämme im Minimalmedium *C. glu.* X wurden mit Ausnahme derer mit deregulierter Aspartatkinase ohne Selektionsdruck durchgeführt. Die Stämme mit deregulierter Aspartatkinase wurden sowohl in Vor- als auch in Hauptkultur mit Kanamycin (50 µg/ml) auf den Erhalt der Konstruktion selektioniert. Zur Absicherung der Daten wurden von jedem Stamm drei parallele Kolben fermentiert und der durchschnittliche Lysingehalt im Fermentationsmedium nach ca. 48 h bestimmt. Bei der Fermentation der *C. glutamicum* ATCC 13032 Stämme wurde bei Überexpression des deregulierten lys C und des dap A Gens Lysinausscheidung beobachtet (s Tab. 19). Die Amplifikation der deregulierten Aspartatkinase führte zur Ausscheidung von 34 - 48 mM Lysin, einer Lysinmenge, wie sie auch vom einfach AEC^r DG 52-5 ausgeschieden wurde (40 mM s. Tab. 18). Die Amplifikation der regulierten Aspartatkinase führte hingegen nicht zur Ausscheidung von Lysin aus ATCC 13032. Dieses bewies erstmalig den direkten Zusammenhang zwischen Lysinausscheidung und Deregulation der Aspartatkinase. Bisherige Arbeiten zu diesem Thema (Shiio et al., 1970) wurden ausschließlich mit mutagenisierten Zellen durchgeführt, die potentiell jede andere Mutation tragen können, die zur Lysinausscheidung führt (z.B. Homoserinauxotrophie). Bei der Einführung der AEC^r bzw. deregulierten Aspartatkinase durch die Sphäroblastentransformation sind solche Mutationen auszu-

schließen, denn der Effekt ist retransformierbar. Die Amplifikation der DDP-Synthase ermöglichte ebenfalls Lysinausscheidung beim Wildtyp. Die dabei erreichten Endwerte lagen mit durchschnittlich 12 mM deutlich niedriger als die durch Überexpression von lys C_D erreichten Werte. Die Überexpression der Gene asd, dap B, ddh und lys A führten zu keiner meßbaren (0,1 mM) Ausscheidung von Lysin (s. Tab. 18).

Tabelle 18 : Lysinausscheidung durch Überexpression individueller Gene in C. glutamicum ATCC 13032

Stamm/Gen	sp. Akt. in 13032 U/mg	sp. Akt. 13032/Plasmid U/mg	Fermentation mM Lysin		
			Exp.1	Exp.2	Exp.3
13032/-	-	-	0	-	-
13032/ <u>lys C_R</u>	0,014	0,100	0	0	0
13032/ <u>lys C_D</u>	-	0,196	34	42	48
13032/ <u>asd</u>	0,019	0,159	0	0	0
13032/ <u>dap A</u>	0,23	3,01	13	11	11
13032/ <u>dap B</u>	0,06	1,04	0	0	0
13032/ <u>ddh</u>	0,15	1,18	0	0	0
13032/ <u>lys A</u>	0,020	0,24	0	0	0

4.2. Substratkonkurrenz der DDP-Synthase und Hom-DH um den Aspartatsemialdehyd

Bei der Fermentation der ATCC 13032 Stämme mit individueller Amplifikation der DDP-Synthase war Lysinausscheidung beobachtet worden. Dieses Phänomen war aufgrund der regulatorischen Untersuchungen nicht zu erklären. Die DDP-Synthase wird zwar nicht reguliert, sie steht aber in ständiger Konkurrenz mit der Homoserindehydrogenase um das gemeinsame Substrat den L-Aspartat- β -semi-aldehyd. Trägt man die sp. Aktivitäten der beiden Enzyme gegenüber der Substratkonzentration auf (s. Abb. 15), dann erkennt man eindeutig die höhere Affinität der Homoserindehydrogenase zum Aldehyd. Durch die Amplifikation der DDP-Synthase um das ca. zehn-

fache wird die niedrigere Affinität im Vergleich zur Homoserin-DH kompensiert. Es kann dadurch auch bei geringen Substratkonzentrationen (ATCC 13032 hat eine inhibierbare Aspartatkinase) Aspartatsemialdehyd zu Dihydrodipicolinat kondensiert werden. Im gegenläufigen Experiment mit gleichzeitig amplifizierter DDP-Synthase und Homoserindehydrogenase wurde keine Lysinausscheidung beobachtet.

spez.Akt.

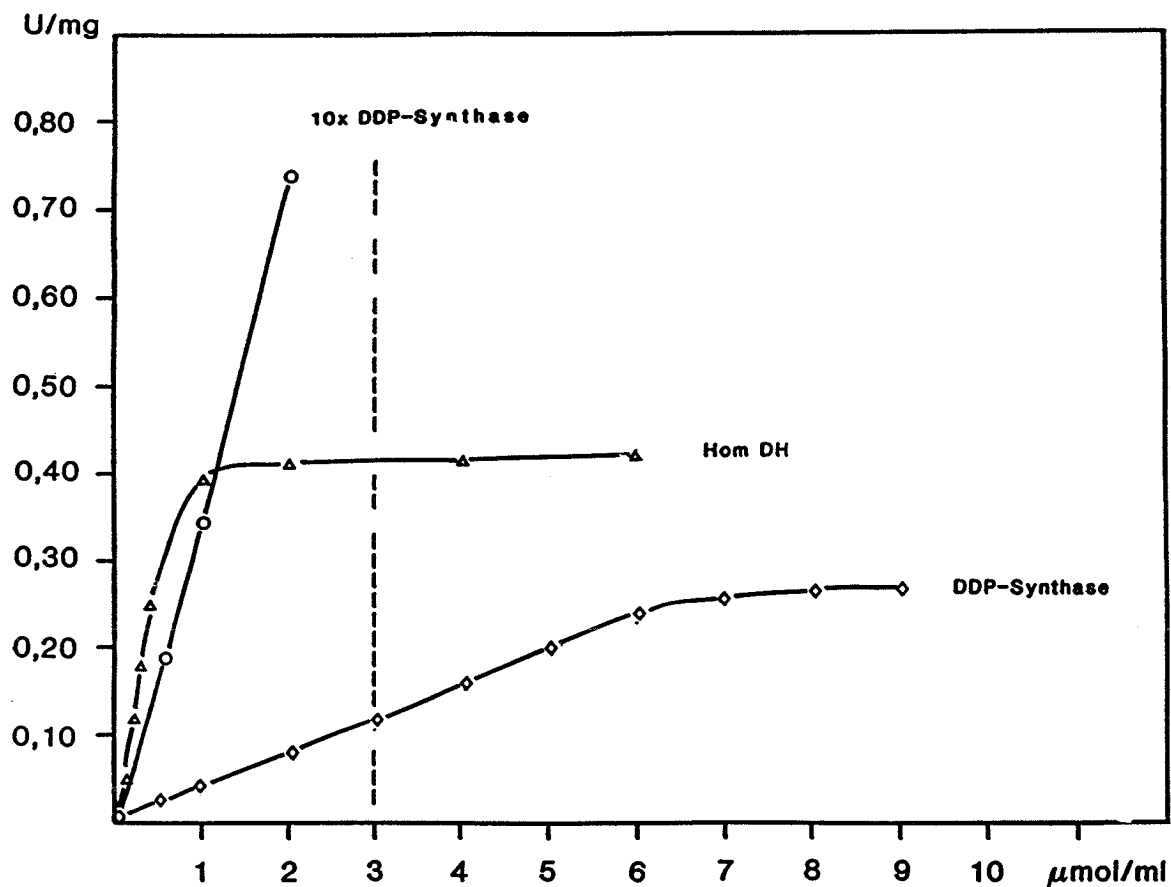


Abb. 15 : Substratkonkurrenz der DDP-Synthase und Homoserindehydrogenase um den L-Aspartat-β-semialdehyd (DDP = Dihydrodipicolinat, Hom = Homoserindehydrogenase, L-ASA = L-Aspartat-β-semialdehyd)

4.3. Einfluß der Überexpression einzelner Lysinbiosynthesegene auf die Lysinbildung des AEC^R Stammes DG 52-5

Die Untersuchungen zur Auswirkung der individuellen Überexpression der lysinbiosynthetischen Gene im phänotypisch als AEC^R beschriebenen C. glutamicum Stamm DG 52-5 wurden ver-

gleichbar zu denen mit C. glutamicum ATCC 13032 durchgeführt. Die Analyse des Fermentationsmediums zeigte eine signifikante Erhöhung (20 %) der Lysinausscheidung in Stämmen mit amplifizierter deregulierter Aspartatkinase und DDP-Synthase. Beide Enzyme waren auch im AEC^R DG 52-5 als limitierend anzusehen. Die Überexpression der anderen Gene führte nicht zu veränderter Lysinexkretion(s. Tab. 19).

Tabelle 19 : Lysinbildung mit C. glutamicum DG 52-5 durch Überexpression individueller Gene

Plasmid/Gen	Enzym	Lysin mM
pJC 1/ -	-	40 ± 2
pJC 1/ <u>lys C_D</u>	dereg. Aspartatkinase	48 ± 3
pJC 1/ <u>lys C_R</u>	regul. Aspartatkinase	40 ± 2
pJC 1/ <u>asd</u>	L-ASA-Dehydrogenase	40 ± 2
pJC 1/ <u>dap A</u>	DDP-Synthase	48 ± 2
pJC 1/ <u>dap B</u>	DDP-Reduktase	40 ± 2
pJC 1/ <u>ddh</u>	DAP-Dehydrogenase	39 ± 2
pJC 1/ <u>lys A</u>	DAP-Decarboxylase	39 ± 2

4.4. Einfluß der Überexpression einzelner Gene auf die Lysinbildung des Lysinhyperproduzenten MH 20 22B

Die Fermentation des C. glutamicum Stammes MH 20 22B, der in der Lage ist Lysin bis 270 mM im Fermentationsmedium zu akkumulieren, brachte keine Aussage bezüglich eventueller Limitationen der Lysinausscheidung. Die Instabilität der Lysinausscheidung, die sich durch völlig abweichende Lysinwerte bemerkbar machte, ließen eine Interpretation nicht zu. Auffällig war lediglich die Tatsache, daß der Aus- oder Abfall der Lysinexkretion oft mit wesentlich besserem Wachstum verbunden war (s. Tab. 20).

Tabelle 20 : Lysinbildung mit C. glutamicum MH20-22B durch Überexpression individueller Gene

Fermentation in C. glu. X mit 10 % Glucose und 40 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Plasmid/Gen	OD ₆₀₀ 26 h	Gluc in %	Lysin _{26h} mM	OD ₆₀₀ 52 h	Gluc in %	Lysin _{52h} mM
pJC 1 / -	44	> 5	67	53	> 3	209
- " - / <u>lys C_D</u>	40	- " -	72	41	- " -	196
- " - / <u>lys C_R</u>	42	- " -	19	42	- " -	34
- " - / <u>asd</u>	42	- " -	19	42	- " -	34
- " - / <u>dap A</u>	16	- " -	18	65	- " -	79
- " - / <u>ddh</u>	50	- " -	64	50	- " -	157

	OD ₆₀₀ 73 h	Gluc in %	Lysin _{73h} mM	OD ₆₀₀ 95 h	Gluc in %	Lysin _{95h} mM
MH20 22B/ -	50	1	267	35	0	277
- " - / <u>lys C_D</u>	40	3	239	35	3	240
- " - / <u>lys C_R</u>	80	0	39	76	0	51
- " - / <u>asd</u>	80	0	39	76	0	51
- " - / <u>dap A</u>	64	0	90	-	-	
- " - / <u>ddh</u>	58	< 1	157	80	0	155

4.5. Konstruktion eines lys C_D und dap A tragenden Pendelvektors pJC 50 und der Einfluß der gemeinsamen Überexpression auf die Lysinbildung von C. glutamicum ATCC 13032 und DG 52-5

Aus den Daten unter 4.1. und 4.3. war klar hervorgegangen, daß die Überexpression der Gene der Aspartatkinase und DDP-Synthase eine signifikante Steigerung der Lysinausscheidung bewirkte. Es stellte sich daher die Frage, ob dieser Effekt additiv wirksam wird. Dazu wurde in den dap A tragenden Vektor pJC 23 (Abb. 16) durch Pvu II-Verdau und anschließende Abspaltung der 5' Phosphatreste das lys C_D als Dra I Fragment inseriert. Durch Plasmidschnellisolation und Restriktionsverdau wurden die erhaltenen Klone analysiert und

die beiden möglichen Orientierungen des lys C_D identifiziert. Durch Sphäroplastentransformation wurden beide Orientierungen in die C. glutamicum Stämme ATCC 13032 und DG 52-5 übertragen.

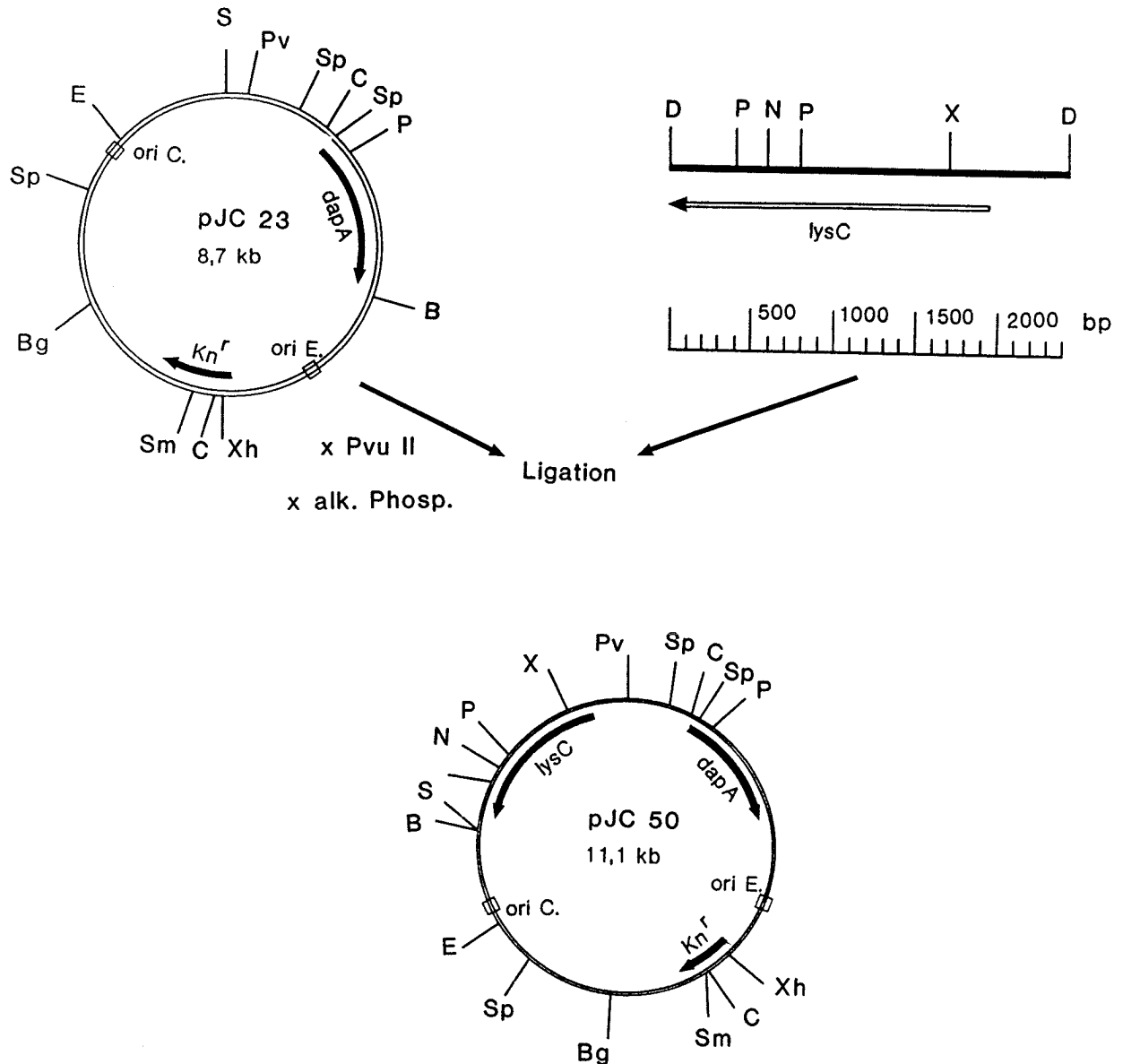


Abb. 15 : Konstruktion eines lys C_D und dap A tragenden Pendel-
vektors pJC 50 (Bg = Bgl II, C = Cla I, D = Dra I,
E = Eco RI, N = Nae I, P = Pst I, Pv = PVU II,
S = Sal I, Sm = Sma I, Sp = Sph I, Xh = Xho I)

Der Vergleich, der Fermentationsdaten der C. glutamicum Stämme ATCC 13032 und DG 52-5 mit individueller und gemeinsamer Amplifikation der Aspartatkinase und DDP- Synthase, zeigt für den Wildtyp ATCC 13032 einen deutlichen Unterschied der Lysinausscheidung. Aufgrund der bereits erwähnten hohen internen Lysinkonzentrationen während der Hauptproduktionsphase (145 mM) stellt sich die Frage warum hier die Erhöhung der DDP-Synthasemenge additiv auf die Lysinausscheidung wirkt. Eine Erklärung dieses Phänomens wäre die, daß in ATCC 13032 die DDP-Synthase in der Anfangsphase der Fermentation, in der nur wenig Lysin ausgeschieden wird, eine Limitation darstellt

Für den Stamm DG 52-5 wurde eine drastische Erhöhung der Lysinausscheidung durch die gemeinsame Überexpression der DDP-Synthase und Aspartatkinase bestimmt. Dieser stark fördernde Einfluß der gemeinsamen Amplifikation zeigt, daß die DDP-Synthase nach der Überexpression der Aspartatkinase ein nächster limitierender Schritt in der Lysinsynthese des Produzentenstammes ist.

Tabelle 21 : Lysinbildung in C. glutamicum ATCC 13032 und DG 52-5 bei gemeinsamer Überexpression von Aspartokinase und DDP-Synthase

Stamm/Gen	sp. Akt. Aspartokinase U/mg	sp. Akt. DDP-Synthase U/mg	Lysin mM
13032/ -	0,012	0,20	0
13032/ <u>lys C_D</u>	0,200	0,20	42
13032/ <u>dap A</u>	0,012	3,10	12
13032/ <u>lys C_D</u> / <u>dap A</u>	0,180	1,95	50
DG 52-5/ -	0,014	0,21	40
DG 52-5/ <u>lys C_D</u>	0,240	0.21	48
DG 52-5/ <u>dap A</u>	0,015	1,85	48
DG 52-5/ <u>lys C_D</u> / <u>dap A</u>	0,210	2,05	70

IV Diskussion

In den fünfziger Jahren begann Kyowa Hakko und kurze Zeit später Ajinomoto mit der mikrobiellen Lysinbildung durch auxotrophe Mutanten von C. glutamicum (Nakayama, 1983) bzw. Brevibacterium lactofermentum. C. glutamicum und B. lactofermentum gelten als äußerst eng verwandte Organismen (Abe et al., 1967; Park et al., 1987; Stackebrandt et al., 1980). Wissenschaftliche Publikationen in denen versucht wird, die Lysinbiosynthese zu ergründen erscheinen erstmals 1966 (Nakayama et al., 1966) und weitere grundsätzliche Arbeiten zur Regulation der Aminosäurebildung in den folgenden 10 Jahren. Das sich aus diesen frühen Arbeiten ergebende Bild ist, daß der Aspartatkinase eine zentrale Rolle bei der Kontrolle der Lysinbildung zukommt. Dieses Enzym wird durch die gleichzeitige Anwesenheit von Lysin und Threonin in seiner Aktivität feedback gehemmt (Miyajima et al. 1971). Mutanten die insensitive gegenüber dieser feedback Hemmung sind scheiden bis zu 5 g/l Lysin ins Kulturmedium aus (Kase et al., 1974; Nakayama et al., 1966; Shiio et al., 1970). Solche Mutanten mit deregulierter Aspartatkinase lassen sich entweder durch Resistenz gegenüber einem Lysin-analogon (AEC) + Threonin oder durch Resistenz gegenüber einem Threoninanalogen (AHV) + Lysin isolieren (Sano et al., 1970; Shiio et al., 1969; Tosaka et al., 1978). Obwohl die Aspartatkinase letztlich auch die Synthese von Threonin, Methionin und Isoleucin katalysiert, scheiden Mutanten mit deregulierter Aspartatkinase diese Aminosäuren nicht aus. Dies akzentuiert die zusätzliche Kontrolle des Methionin/Threonin/Isoleucin Zweigs der Aspartatfamilie über die Homoserindehydrogenaseregulation, sowie die offensichtlich "einfache" Regulation der Lysinbiosynthese.

Der gleiche Effekt der zur Feedbackinsensitivität der Aspartatkinase führt, wird auch durch threonin- oder homoserin-auxotrophe Mutanten erreicht. Einige Produktionsstämme mit diesen Eigenschaften sind beschrieben (Shiio et al., 1969). Die Deregulation der Aspartatkinase ist das einzige Charakteristikum eines Produktionsstammes, das mit großer Sicherheit als für die Sekretion notwendige Veränderung benannt werden kann. Da bislang keine gezielte gentechnische Ver-

änderung möglich war und alle Stämme zunächst auf Sekretion, dann auf Regulation untersucht wurden (Shiio et al., 1969; Tosaka et al., 1983), war bislang auch unklar ob die Dereglulation allein hinreichend oder nur eine notwendige Voraussetzung für die Sekretion von Lysin ist.

Eine weitere Steigerung der Lysinsekretion wurde bis zum heutigen Tage ausschließlich durch NMG Mutagenese, Selektion aminosäureanalogaresistenter Mutanten mit nachfolgendem Screening auf erhöhte Ausscheidung erreicht. Im Nachhinein wurde versucht, einige zentrale Enzyme des Kohlenstoffflusses (Anabolismus) zu messen und eine Veränderung eines solchen Enzyms mit der veränderten Sekretion in Zusammenhang zu bringen. Es gibt jedoch (mit Ausnahme der Aspartatkinase) nicht verschiedene Stämme mit verringerter Pyruvatdehydrogenase, Citratsynthase oder deregulierter Phosphoenolpyruvatcarboxylase, die zu gleicher gesteigerter Sekretion führen. Die Dihydrodipicolinatsynthase in Brevibacterium lactofermentum wurde als erstes lysinspezifisches Enzym näher untersucht (Tosaka et al., 1978d). Es wird berichtet, daß dieses Enzym durch Leucin reprimiert wird.

In dieser Arbeit wurde die Repression und Feedbackhemmung der Aspartatkinase, Aspartatsemialdehyddehydrogenase, Dihydrodipicolinatsynthase, Dihydrodipicolinatreduktase und Diaminopimelatdehydrogenase untersucht. Keines der genannten Enzyme wird in seiner Menge reguliert. Dies trifft auch für die Dihydrodipicolinatsynthase zu. Wegen des offensichtlichen Widerspruches zu den von Tosaka et al. 1978 für B. lactofermentum berichteten Befunden, wurde Regulation der Synthase auch in diesem Organismus untersucht. Alle durchgeführten Experimente zeigen, daß sowohl in B. lactofermentum als auch in C. glutamicum die Synthase nicht reguliert wird. Es ist daher davon auszugehen, daß aufgrund experimenteller Irrtümer diese häufig zitierte Regulation der DDP-Synthase-expression falsch ist.

Da die DDP-Synthase das erste spezifische Enzym der Diaminopimelat- und Lysinsynthese darstellt, wäre eine Regulation an der Verzweigungsstelle des Aspartatsemialdehyds durch die DDP-Synthase zu Dihydrodipicolinat bzw. durch die Homoserindehydrogenase zu Homoserin zu erwarten. In der Tat wird in E. coli die DDP-Synthase durch Lysin in ihrer Aktivität ge-

hemmt (Patte, 1983; Richaud et al., 1986). Wie der in dieser Arbeit durchgeführte gentechnische Ansatz zeigt ist tatsächlich die sp. Aktivität der Synthase ein Kontrollelement des Aspartatflusses zu Lysin. Darüber hinaus ergaben die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen zur Regulation der Homoserindehydrogenase zum beobachteten "Leucineffekt" auf die Lysinsekretion das folgende: Die Homoserindehydrogenase wird nämlich nicht nur durch Methionin reprimiert und durch Threonin bzw. Isoleucin inhibiert, sondern die Kultivierung in Anwesenheit von Leucin bewirkt eine ca. zweifach erhöhte sp. Aktivität. Wie für B. lactofermentum (Miyajima et al., 1971) und in dieser Arbeit auch für C. glutamicum gezeigt, führt dies zu verringerter Lysinsekretion und Ausscheidung von Isoleucin. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Regulation zeigen also, daß mit Ausnahme der Aspartatkinase keines der fünf Lysinbiosynthesegene in der Aktivität und Menge reguliert wird. Dies ist auch für die Diaminopimelatdecarboxylase, das letzte Enzym in der Lysinsynthese der Fall (Cremer et al., 1988).

Das asd Gen aus C. glutamicum konnte durch heterologe Komplementation von E. coli RASA 51 kloniert werden. Dies war für lys C nicht möglich, da keine geeignete E. coli Mutante mit stabilem Defekt in allen drei Isoenzymen zur Verfügung stand (Patte et al., 1972; Theze et al., 1974). Trotz der zentralen Rolle der Aspartatkinase gelang es bislang noch nicht das Protein zu isolieren, um dadurch eine Klonierung des lys C Gens über Antikörper zu ermöglichen. Die Sequenzanalyse eines 1,4 kb großen AEC^r vermittelnden DNA-Fragments, die parallel zu dieser Arbeit durchgeführt wurde, ergab, daß lys C und asd offensichtlich benachbart vorliegen (Kalinowski persönliche Mitteilung 1988). Aufgrund dieser Information konnte sowohl das lys C Gen des Wildtyps ATCC 13032, als auch das Gen der deregulierten Aspartatkinase aus einem AEC^r Stamm, über Komplementation der asd defekten Mutante RASA 51 kloniert werden. Der für das asd Gen kodierende Bereich konnte auf ein 1,2 kb großes Fragment eingegrenzt werden. Dies entspricht etwa der Größe wie sie von Streptococcus mutans berichtet wurde (Cardineau et al., 1987). Das asd Gen aus

Brevibacterium lactofermentum wurde bereits kloniert (Katsumata et al., 1986) jedoch sind keine weiteren Angaben zur Minimalgröße, Promotorlokalisation oder gar Genomorganisation durchgeführt. Direkt benachbart zu asd liegt lys C. Diese Genanordnung ist bislang bei keinem Bakterium beschrieben. Innerhalb von lys C - 0,7 kb upstream - befindet sich der asd Promotor. Da in dieser Arbeit lys C auch aus einem AEC^r Stamm isoliert werden konnte, war es erstmals möglich nachzuweisen, daß die AEC^r durch ein mutiertes lys C Gen bewirkt wird. Interessanterweise ergab die Analyse, daß die AEC^r auch durch den 0,7 kb Upstreambereich von asd vermittelt wird, ohne daß die Aspartatkinaseaktivität erhöht wird. Dies bedeutet, daß der intergene asd-Promotor neben der Aspartatsemialdehyddehydrogenase die Transcription eines weiteren Genproduktes initiiert, das die Kinaseregulation beeinflußt. Für Bacillus subtilis ist gezeigt, daß die Aspartatkinase durch zwei überlappende Gene kodiert wird. Das für die kleinere β -Untereinheit kodierende Gen ist Teil des größeren für die α -Untereinheit kodierenden Gens (Chen et al., 1988; Moir et al., 1977). Beide Gene werden in B. subtilis unabhängig voneinander transkribiert (Chen et al., 1988).

In Analogie zur B. subtilis Struktur des Aspartatkinasegens, sowie aufgrund der Analysen dieser Arbeit und inzwischen vorliegender Sequenzinformation läßt sich folgendes Modell zur Aspartatkinase darstellen:

Die Aspartatkinase aus C. glutamicum wird durch zwei Untereinheiten gebildet, wobei das entsprechende " β -Gen" Teil des " α -Gens" ist. Jedes dieser Gene ist mit einem eigenen Promotor ausgestattet. Dies geht eindeutig aus den enzymatischen Messungen bzw. Vermittlung der AEC^r hervor.

Da ein Promotor " α -lys C" ein zweiter Promotor - innerhalb " α -lys C beginnend - " β -lys C plus asd Transcription vermittelt, sind auch zwei m-RNAs zu erwarten (s. Abb. 16).

Die Informationen zur Translation des asd Gens und des " β -lys C lägen dann unter Annahme gleich Syntheseraten doppelt vor. Der Grund davor könnte sein, daß ein höherer Anteil an " β -lys C" für die effiziente Zusammenlagerung des Aspartatkinaseproteins nötig ist. Eine andere Interpretationsmöglichkeit wäre die, daß ein zweiter Promotor im lys C Gen

nötig ist um einen Synthesegradienten entweder auf Transcriptions- oder Translationsebene auszugleichen. Die bisherigen Sequenzierungsdaten bestätigen das hier dargestellte Modell bezüglich der Translationsstart bzw. -stop Regionen (Kalinowski, persönliche Mitteilung).

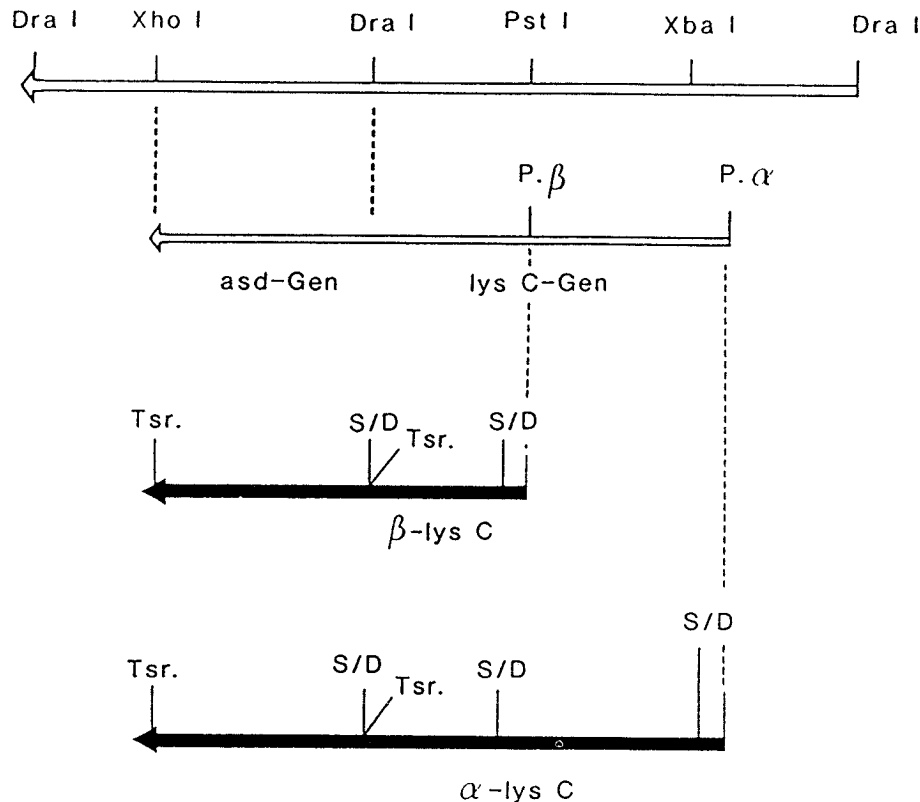


Abb. 17 : Modell der Genorganisation des *lys C/asd* Clusters.
(S/D = Translationsstart, Tsr. = Translationsstopp,
P. = Promotor)

Die Klonierung der Lysinbiosynthesegene erfolgte in allen Fällen durch heterologe Komplementation von *E. coli* Mutanten. Auf diese Weise gelang es unabhängig voneinander dap A, sowie dap B zu isolieren. Obwohl die Lysinbiosynthesegene von *E. coli* alle vereinzelt auf dem *E. coli*-Chromosom vorliegen (Patte, 1983), wurde durch Kreuzkomplementation eine mögliche Clusterung der beiden Gene untersucht. Eine Clusterung von Genen eines Syntheseweges scheint in Gram positiven Bakterien nämlich häufig aufzutreten (Zalkin

et al., 1988). Es wurde mit beiden Cosmiden eine Kreuzkomplementation erhalten, sodaß dap A und dap B benachbart vorliegen müssen. Die genauere Analyse ergab, daß beide Gene auf einem 7 kb Fragment eng benachbart sind. Dies wurde nicht nur durch Komplementation, sondern auch durch Enzymtests bestätigt, die im Falle des dap B Genprodukts erst durch die in dieser Arbeit entwickelte Methode möglich wurde. Von der Klonierung des dap A Gens aus C. glutamicum ist bereits 1988 durch Yeh berichtet. Der gleiche Autor berichtet auch von der Klonierung des dap B Gens. Jedoch wurden hier keine Enzymtests durchgeführt und die räumliche Nähe der beiden Gene wurde nicht erkannt. Da beide Gene in den beiden möglichen Orientierungen im Vektor pJC1 integriert jeweils die gleiche sp. Aktivität vermitteln, ist davon auszugehen, daß beide Gene einen eigenen Promotor besitzen.

Die Klonierung der sechs Lysinbiosynthesegene des Corynebakterien Wildtyps, sowie des zusätzlichen Gens für die feedbackinsensitive Aspartatkinase aus einem AEC^r Stamm hat die physiologischen Studien zur Limitation des Flusses von Aspartat zu Lysin ermöglicht. Mit jedem Gen konnte durch Amplifikation eine mehr als achtfach erhöhte sp. Aktivität erreicht werden. Die Überexpression der feedbacksensitiven Aspartatkinase in ATCC 13032 führte zu keiner Lysinausscheidung, wogegen durch Überexpression der feedbackinsensitiven Aspartatkinase im Wildtyp Lysin ausgeschieden wird. Damit ist erstmalig gezeigt, daß die Deregulation der Aspartatkinase eine hinreichende Bedingung zur Ausscheidung von Lysin darstellt. Hinreichend ist sogar die Expression eines Teils des lys C Gens, das AEC^r verleiht und entsprechend des in Abb. 11 dargestellten Modells für die regulatorische Untereinheit der Aspartatkinase kodiert. Die Überexpression dieser regulatorischen Untereinheit die selbst keine katalytische Aktivität hat, zusammen mit der gemessenen Lysinausscheidung setzt voraus, daß sich in vivo heterologe Dimere aus chromosomal kodierter katalytischer Untereinheit und vektorkodierter regulatorischer Untereinheit bilden. Für die Flusskontrolle ist wichtig festzuhalten, daß die etwa achtfache Überexpression der de-

regulierten Aspartatkinase im Wildtyp zu 40 mM Lysin führt, und mit der Überexpression der AEC^r vermittelnden Untereinheit ohne Amplifikation der Aspartatkinase im Wildtyp auch bereits 30 mM sekretiert werden. Dies zeigt, daß der Fluss von Aspartat zu Lysin bei alleiniger Veränderung der Aspartatkinase durch die Amplifikation der deregulierten Aspartatkinase bereits nicht linear kontrolliert wird. Überraschenderweise führte auch die Überexpression des dap A Gens im Wildtyp zu einem Lysinproduzenten bisher unbekannten Typs. Da die Synthase in ihrer Aktivität nicht reguliert wird besteht offensichtlich eine Flusskontrolle in der Synthesesequenz durch die Verfügbarkeit des Substrats. Dies ist in Abb 14 illustriert: Bei gleicher sp.Aktivität der Homoserindehydrogenase und DDP-Synthase, fließt aufgrund der geringeren Affinität der Synthase zum Aspartat-semialdehyd, der Aldehyd bevorzugt in Richtung Homoserin. Im Falle der Überexpression der Synthase - und gleicher Aldehydkonzentration - wird die Geschwindigkeit der Synthasereaktion erhöht, was genügt um im Wildtyp ca 12 mM Lysin zu exkretieren. Entsprechend unterbleibt die Lysinexkretion im Wildtyp bei gleichzeitiger Amplifikation von Synthase und Homoserindehydrogenase. Demnach sind erstmalig zwei, etwa gleichwertige Elemente der Flusskontrolle erkannt, nämlich die Aspartatkinase und DDP-Synthase. In dem AEC^r Stamm DG 52-5 wurden ebenfalls alle sechs Lysinbiosynthesegene überexprimiert. Wie bereits im Wildtyp ergab die Überexpression der Synthase eine gesteigerte Lysinsekretion. Damit besteht in DG 52-5 trotz der deregulierten Aspartatkinase noch eine Kontrolle des Flusses durch die Synthase. In einem japanischen Patent ist die Steigerung der Sekretion durch Überexpression der DDP-Synthase in einem Produktionsstamm beschrieben (Katsumata et al., 1986). Jedoch ist der dabei verwandte Stamm nicht näher charakterisiert, und ferner liegen keine Untersuchungen im Wildtyp und zu Enzymaktivitäten vor. In DG 52-5 ergibt neben der Synthase ebenfalls die Überexpression der feedbackinsensitiven Aspartatkinase eine gesteigerte Sekretion auf ca 50 mM Lysin. Dies zeigt, daß normal exprimierte, deregulierte Aspartatkinase eine noch teilweise wirksame Kontrolle auf den Fluss ausübt. Bei gemeinsamer Überexpression der

Aspartatkinase und DDP-Synthase wird eine Lysinsekretion von ca 70 mM erreicht. Dieses wiederum zeigt, daß in DG 52-5 bei zehnfach erhöhter deregulierter Aspartatkinase der Synthase eine wichtige Kontrollfunktion zukommt.

Einen anderen Weg um erhöhten Fließraten zu erreichen beschrieben Menkel et al., (1988) indem sie die Aspartatversorgung durch Expression des Aspartasegens aus E. coli (bei Zugabe von Fumarat) erhöhten. Ebenso gelang es durch Amplifikation der Phosphoenolpyruvatcarboxylase (Eikmanns persönliche Mitteilung) erhöhte Lysinbildungsraten zu erreichen. Diese Befunde zeigen, daß durch erhöhte Aspartatversorgung die Geschwindigkeit der Aspartatkinasereaktion erhöht werden kann. Aufgrund des bisher beschriebenen gentechnischen Ansatzes ist jedoch offen, ob die erhöhte Aspartatversorgung weiter notwendig ist um erhöhte Sekretionsraten zu bewirken. Es ist aber eindeutig, daß im Wildtyp ATCC 13032, sowie in DG 52-5 keine Kontrolle des Flusses durch die Aspartatsemialdehyddehydrogenase, DDP-Reduktase, Diaminopimelatdehydrogenase und Diaminopimelatdecarboxylase erfolgt. Eine Kontrolle des Flusses durch die Verfügbarkeit der Substrate (NADPH, ATP, NH_3 , NADH) ist möglich. Vielversprechend ist es den für die "biotechnologische Synthesesequenz" bisher nicht berücksichtigten Sekretionsprozess mit in Erwägung zu ziehen. Die zur Zeit durchgeführten Messungen zur Lysininnenkonzentration (Schrumpf persönliche Mitteilung 1989) lassen vermuten das neben DDP-Synthase und Aspartatkinase der Sekretionsprozess ein wichtiges Kontrollelement der "biotechnologischen Synthese-sequenz" ist.

V Zusammenfassung

Bei den Untersuchungen zur Regulation der Lysinbiosynthese wurde als zentrale Kontrollstelle des Flusses von Aspartat zu Lysin, die gemeinsame Feedbackhemmung der Aspartatkinase durch Lysin und Threonin ermittelt. Keines der fünf weiteren Lysinbiosynthesegene wird in Enzymaktivität oder Enzymmenge reguliert. Trotzdem kommt der Dihydrodipicolinatsynthase eine wichtige Rolle bei der Flusskontrolle des Aspartat-semialdehyds zu Dihydrodipicolinat zu, da eine Erhöhung der DDP-Synthaseaktivität in einer erhöhten Lysinbildung resultiert.

Durch die Klonierung der Gene der Lysinbiosynthesesequenz ab Aspartat, sowie des Gens der feedbacksensitiven Aspartatkinase konnte die räumliche Nähe von lys C und asd Gen, sowie von dap A und dap B Gen gezeigt werden. Das ddh Gen und lys A Gen sind nicht geclustert. Das Aspartatkinasegen (lys C) und das Aspartat- β -semi-aldehyddehydrogenasegen (asd) sind in Form eines Operons organisiert. Es konnte gezeigt werden, daß die Aspartatkinase von zwei überlappenden Genen kodiert wird. Dabei konnte dem kleineren " β -lys C" Gen, das ein Teil des " α -lys C" ist, die regulatorische d.h. AEC^r verleihende Funktion zugeordnet werden. Die Transcription des asd Gens wird durch einen intergenen Promotor im lys C Gen initiiert, der gleichzeitig auch der Promotor des " β -lys C" ist. Für den dap A und dap B Cluster wurde eine von der Orientierung unabhängige Überexpression im Enzymtest nachgewiesen, sodaß hier eine Organisation im Operon auszuschließen ist.

Durch die individuelle Amplifikation der an der Lysinsynthese beteiligten Enzyme mit Hilfe der rekombinanten DNA Technik wurde die Kontrolle des Flusses von Aspartat zu Lysin und Diaminopimelat durch die Aspartatkinase und DDP-Synthase in C. glutamicum erkannt. Die Lysinausscheidung in C. glutamicum DG 52-5 wurde durch die gemeinsame Amplifikation der Aspartatkinase und DDP-Synthase um 60 % gesteigert.

VI Literaturverzeichnis

- Abe, S.; Takayama, K.; Kinoshita, S. (1967)
Taxonomic studies on glutamic acid producing bacteria
Journal of General and Applied Microbiology 13, 279 - 301
- Alton, N.K.; Vapnek, D. (1979)
Nature 282, 864
- Bachmann, B.J. (1983)
Linkage Map of Escherichia coli K-12, Edition 7
Microbiological Reviews 47, 180 -230
- Birnboim, H.C. (1983)
A rapid alkaline extraction method for the isolation of
plasmid DNA. Methods in Enzymology. Vol. 100, 243-255
- Black, S.; Wright, N. G. (1955)
 β -Aspartokinase and β -Aspartylphosphat.
The Journal of Biological Chemistry 213, 27 - 38
- Black, S.; Wright, N. G. (1955)
Aspartic β -Semialdehyddehydrogenase and Aspartic β -Semialde-
hyde.
The Journal of Biological Chemistry 213, 39 - 50
- Bolivar, F.; Soberon, X.; Covarubias, L. (1980)
Construction and Characterization of New Cloning Vehicles
Gene 9, 287 -305
- Bondaryk, R.; Paulus, H. (1985a)
Cloning and Structure of the Gene for Subunits of Asparto-
kinase II from Bacillus subtilis
Journal of Biological Chemistry 260 (1), 585 -591

Bondaryk, R.P.; Paulus, H. (1985b)

Expression of the Gene for *Bacillus subtilis* Aspartokinase II in *Escherichia coli*

Journal of Biological Chemistry 260 (1), 592 -597

Bouvier, J.; Richaud, C.; Richaud, F.; Patte, J.C.;

Stragier, P. (1984)

Nucleotide Sequence and Expression of the *E. coli* Dap B Gene

Journal of Biological Chemistry 259 (23), 14829 - 14834

Bukhari, A.; Taylor, A. (1971)

Genetic Analysis of Diaminopimelic Acid- and Lysine - Requiring Mutants of *Escherichia coli*

Journal of Bacteriology 105 (3), 844 - 854

Byun, M.O.-K.; Kaper, J.B.; Ingram, L.O. (1986)

Construction of a vektor for the Expression of foreign genes in *Zymomonas mobilis*.

Journal of Industrial Microbiology 1, 9 -15

Cardineau, G.; Curtis, R. (1987)

Nucleotide Sequence of the *asd* Gen of *Streptococcus mutans*

The Journal of Biological Chemistry 262, 3344 - 3353

Chen, N.; Paulus, H. (1988)

Mechanism of Expression of the Overlapping Genes of *Bacillus subtilis* Aspartokinase II

Journal of Biological Chemistry 263 (19), 9526 -9532

Christie, G.C. (1981)

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 78, 4180

Clarke, L.; Carbon, J. (1976)

A colony bank containing synthetic Col EI hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome

Cell 9, 91 - 99

Cohen, N.G. (1970)

Aspartokinase I

In: "Methods in Enzymology", Tabor, H. (ed.)

Academic Press, New York, Vol. XVII, 695 -699

Collins, J.; Hohn, B. (1978)

Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 75, 4242

Cremer, J.; Treptow, C.; Eggeling, L.; Sahm, H. (1988)

Regulation of Enzymes of Lysine Biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*

Journal of General Microbiology 134 (12), 3221 -3229)

Dauce-Le Reverend, B.; Boitel, M.; Deshamps, A.; Lebeault, J.M.; Sano, K.; Takanami, K.; Patte, J.C. (1982)

Improvement of *Escherichia coli* strains Overproducing Lysine Using Recombinant DNA Techniques

European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology 15, 227 - 231

Ebbighausen, H.; Weil, B.; Krämer, R. (1989)

Evidence for a specific efflux carrier system involved in isoleucine excretion in *Corynebacterium glutamicum*

In: Tagungsprogramm der VAAM-, DGHM-, NVvM-Frühjahrstagung '89, Marburg

Forum Mikrobiologie 12 (1-2), 31

Gilvarg, C.; Yugari, Y. (1962)

Cordinated endproduct inhibition in lysine synthesis in *E. coli*

Biochimica et Biophysica Acta 62, 610 -612

Gornal, A.G.; Bardawill, C.J.; Maxima, M.D. (1949)

Determination of serum proyeins by means of the biuret reaction

Journal of Biological Chemistry 177, 751 -756

Guest, H. (1970)

Homoserine Dehydrogenase

In: "Methods in Enzymology", Tabor, H. (ed.)

Academic Press, New York, Vol. XVII, 703 - 708

Haziza, C.; Stragier, P.; Patte, J.C. (1982)

Nucleotide sequence of the *asd* gene of *Escherichia coli*:

absence of a typical attenuation signal

The EMBO Journal 1 (3), 379 -384

Hanahan, D. (1983)

Studies on Transformation of *Escherichia coli* with plasmids

Journal of Molecular Biology 166 557 -580

Hanahan, D. (1985)

DNA-cloning Vol. 1, ed. D. M. Glover,

IRL-Press Oxford-Washington DC, ISBN 0-9479746-18-7.

Hanahan, D. (1987)

Mechanism of DNA Transformation

In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*

American Society for Microbiology Vol.2, 1177 - 1184

Hoischen, C.; Krämer, R. (1989)

Effekt of biotin on the regulation of glutamate secretion in *Corynebacterium glutamicum*

In: Tagungsprogram der VAAM-, DGHM-, NVvM-Frühjahrstagung
`89, Marburg

Forum Mikrobiologie 12 (1-2), 64

Hohn, B.; Collins, J. (1980)

A small cosmid for efficient cloning of large DNA fragments

Gene 11, 291 -298

Ishino, S.; Mizukami, T.; Yamaguchi, K.; Katsumata, R.;

Araki, K. (1987)

Nucleotide sequence of the meso-diaminopimelate-D-dehydrogenase gene from *Corynebacterium glutamicum*

Nucleic Acids Research 15, 3917

Ishino, S.; Mizukami, T.; Yamaguchi, K.; Katusmata, R.;
Araki, K. (1988)

Cloning and sequencing of the meso-diaminopimelate-D-
dehydrogenase (ddh) gene of *Corynebacterium glutamicum*
Agricultural and Biological Chemistry 52, 2903 - 2909

Kase, H.; Nakayama, K. (1972)

Production of L-Threonin by Analog-resitent Mutants
Agricultural and Biological Chemistry 36 (9), 1611 --1621

Kase, H. (1974)

Mechanism of L-Threonin and L-Lysine Production by Analog
Resitent mutants of *Corynebacterium glutamicum*
Agricultural and Biological Chemistry 38, 993 - 1000

Katsumata, R.; Ozaki, A.; Oka, T.; Furuya, A. (1984)

Protoplast transformation of glutamate producing bacteria
with plasmid DNA
Journal of Bacteriology 159 (1), 306 - 311

Katsumata, R.; Mizukami, T.; Oka, T. (1986)

Process for producing L-lysine
European Patent Application 0197335

Kinoshita, S.; Ukada, S.; Shimono, M. (1957)

Studies on the Amino Acid Fermentation
I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms
Journal of General and Applied Microbiology 3, 193 - 205

Kinoshita, S.; Nakayama, K.; Kitada, S. (1958)

L-Lysine Production using Microbial Auxotrophs
Journal of General and Applied Microbiology 4 (4), 128 - 129

Kleemann, A.; Leuchtenberger, W.; Hoppe, B.; Tanner, H.
(1983)

Amino Acids
Ullmanns Encyclopedia of Industrial Chemistry 2A 57 - 97

- Lipman, F.; Tuttle, L. C. (1945)
A specific Micromethod for the Determination of Acyl
Phosphates
The Journal of Biological Chemistry 159, 21 - 28
- Maniatis, T.; Fritsch, E. F. ; Sambrook, J. (1982)
Molecular Cloning: A Laboratory Manual
Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Martin, J.F.; Santamaria, R.; Sandoval, H.; Real, G.;
Mateos, L.M.; Gil, J.A.; Aguilar, A. (1987)
Cloning systems in Aminoacid-producing Corynebacteria
BIO/TECHNOLOGY 5, 137 -146
- Menkel, E.; Zivadinovic, D.; Thierbach, G.; Eggeling, L.;
Sahm, H. (1989)
Use of fumaric acid and aspA (aspartase) of Escherichia
coli to increase lysine formation with Corynebacterium
glutamicum
Applied and Enviromental Microbiology 55 (3), 684 -688
- Messing, J.; Vieira, J. (1982)
Gene 19, 259
- Misono, H.; Togawa, H.; Yamamoto, T.; Soda, K. (1979)
meso- α , -Diaminopimelate D-Dehydrogenase
Journal of Bacteriology 137 (1), 22 -27
- Miwa, K.; Matsui, H.; Terabe, M.; Nakamori, S.; Sano, K.
Momose, H. (1984)
Cryptic plasmids in glutamic acid bacteria
Agricultural and Biological Chemistry 48, 2901 -2903
- Miyajima, R.; Shiio, I. (1971)
Regulation of aspartate family amino acid biosynthesis in
Brevibacterium flavum
Agric. Biol. Chem. 35(3), 424 -430

Moir, D.; Paulus, H. (1977)

Immunological and chemical comparison of the nonidentical subunits of the aspartokinase II from *Bacillus subtilis*
Journal of Biological Chemistry 252, 4655 - 4661

Morgan, R. (1970)

Aspartic Semialdehyde Dehydrogenase
In : *Methods in Enzymology*, Tabor, H. (ed.)
Academic Press, New York, Vol. XVII, 708 - 713

Murray, N. E.; Brammar, W.J.; Murray, K. (1977)

Lamboid phages that simplify the recovery of in vitro recombinants.
Molecular and General Genetics 150, 53 - 61

Nakayama, K.; Tanaka, H.; Hagino, H.; Kinoshita, S. (1966)

Studies on Lysine Fermentation Pat V
Agric. Biol. Chem. 30 (6), 611 -616

Nakayama, K. (1983)

Comprehensiv Biolotechnology Vol2, 3 ed. Moo-Young Pergamon Press Oxford

Ozaki, A.; Katsumata, R.; Oka, T.; Furuja, A.; (1984)

Functional Expression of the Genes of *Escherichia coli* in Gram positive *Corynebacterium glutamicum*
Molecular and General Genetics 196, 175 -178

Park, Y.; Hori, H.; Suzuki, K.; Oswa, S.; Komagata, K. (1987)

Phylogenetic Analysis of the Coryneform Bacteria by 5S RNA Sequences
Journal of Bacteriology 169, 1801 - 1806

Patte, J.C. (1983)

In: *Amino Acids: biosynthesis and genetic regulation*
Hermann, K. (ed.)
Addison-Westley 3, 213 - 228

Peoples, O.P.; Liebel, W.; Bodis, M.; Maeng, P.J.; Folletie, M.; Archer, J.A.; Sinskey, A.J. (1988)

Organisation and regulation of the *Corynebacterium glutamicum* hom-thrB operon

Molecular Microbiology 2 (1), 53 - 63

Pühler, A.; Timmis, K. N. (1984)

Advanced Molecular Genetics

Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo

Richaud, F.; Richaud, C.; Haizzia,; Patte, J.C. (1981)

Isolement et purification de genes d'Escherichia coli K 12 impliquees dans la biosynthese de la lysine.

Comptes Rendus De L'Academie de Sciences Serie III 293 (9), 507 - 512

Richaud, F.; Richaud, C.; Ratet, P.; Patte, J.C. (1986)

Chromosomal Location and Nucleotid Sequence of the Escherichia coli dap A Gene

Journal of Bacteriology 166 (1), 297 -300

Sano, K.; Shio, I. (1970)

Microbial production of L-Lysine

Journal of General and Applied Microbiology 16, 373 -391

Santamaria, R. I.; Gil, J. A.; Mesas, J. M.; Martin, J. F. (1984)

Characterization of an endogenous plasmid and development of cloning vectors and a transformation system in Brevibacterium lactofermentum

Journal of General Microbiology 130, 2237 - 2246

Santamaria, R. I.; Gil, J. A.; Martin, J. F. (1985)

High-frequency transformation of Brevibacterium lactofermentum protoplasts by Plasmid DNA

Journal of Bacteriology (162 (1), 463 - 467

Sheldarski, J.; (1970)

In: Methods in Enzymology, Tabor, H. (ed.)

Academic Press, New York, Vol. XVII, 129 -134

Shiio, I.; Torido, Y.; Sugimoto, S.; (1984)

Production of L-Lysine by Pyruvate Dehydrogenase Mutants of *Brevibacterium flavum*

Agric. Biol. Chem. 48(12), 3091 - 3098

Simon, R.; Priefer, U.; Pühler, A. (1983)

In: Molecular Genetics of the Bacteria Plant Interaction
Vector Plasmids for in-Vivo and in-Vitro Manipulations of
Gram-negative Bacteria

Springer, 98 - 106

Stackebrandt, E.; Lewis, B. (1980)

Phylogentic structure of the coryneform group

Zentralblatt für Bacteriologie 1, 137 - 149

Thierbach, G.; Schwarzer, A.; Pühler, A. (1988)

Transformation of Spheroplast and Protoplasts of *Corynebacterium glutamicum*

Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356 - 362

Tanaka, S.; Lerner, S. A.; Lin, E. (1967)

Replacement of a phosphoenolpyruvat-dependent phosphotransferase by a nicotinamide adenine dinucleotide-linked dehydrogenase for the utilisation of mannitol

Journal of Bacteriology 93, 642 - 648

Theze, J.; Margaritta, D.; Cohen, G.N.; Borne, F.; Patte, J.C. (1974)

Mapping of the structural genes of the three aspartokinases and of the the two homoserine dehydrogenases of *E. coli* K 12
Journal of Bacteriology 117, 133 - 143

Tosaka, O.; Takinami, K.; (1978a)

Pathway and Regulation of Lysine Biosynthesis in *Brevibacterium lactofermentum*

Agric. Biol. Chem. 42 (1), 95 -100

Tosaka, O.; Takinami, K.; Hirose, Y. (1978b)
L-Lysine Production by S-(2-Aminoethyl)-Cystein and α -Amino
 β -hydroxyvaleric Acid Resistant Mutants of *Brevibacterium*
lactofermentum

Agric. Biol. Chem. 42 (4), 745 - 752

Tosaka, O.; Takanami, K.; Hirose, Y. (1978c)
Production of L-Lysine by Leucine Auxotrophs derived from
AEC^r Mutant of *Brevibacterium lactofermentum*

Agric. Biol. Chem. 42 (6), 1181 - 1186

Tosaka, O.; Hirakawa, H.; Takinami, K.; Hirose, Y. (1978d)
Regulation of Lysine Biosynthesis by Leucine in
Brevibacterium lactofermentum

Agric. Biol. Chem. 42 (8), 1501 -1506

Tosaka, O.; Enei, H. Hirose, Y. (1984)
Production of L-Lysine by Fermentation
Trends in Biotechnology 1 (3), 70 -74

Truffau-Bachi, P. (1973)
Microbial Aspartokinases
in: P. D. Boyer (ed.) : The Enzymes
Academic Press Inc. New York Vol 8 (15)

Vogelstein, B.; Feinberg, A.P. (1983)
Anal. Biochem. 132, 6

Yamakura, F.; Ikeda, Y.; Kimura, K.; Saskawa, T. (1974)
Partial Purification and some Properties Pyruvate-aspartic
Semialdehyde Condensing Enzyme from Sporulating *Bacillus*
subtilis
Journal of Biochemistry 76, 611 - 621

Yoshihama, M.; Higashiro, K.; Rao, E. A.; Akedo, M.; Shana-
bruch, W. G.; Follettie, M. T.; Walker, G. C.; Sinskey, A.J.
(1985)
Cloning Vector System for *Corynebacterium glutamicum*
Journal of Bacteriology 162 (2), 591 - 597

Zalkin, H.; Ebole, D.J. (1988)

Organisation and Regulation of Genes encoding Biosynthetic
in *Bacillus subtilis*

The Journal of Biological Chemistry 263, 1595 - 1598

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie I der Kernforschungsanlage Jülich durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Sahm danke ich für die Überlassung des Themas, die großzügige Unterstützung der Arbeit, und das Interesse am Fortgang der Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Lothar Eggeling für die vertrauensvolle Betreuung, die Ratschläge und Hilfe mit der er diese Arbeit begleitet hat.

Weiterhin möchte ich Frau Chichorius, Frau Krumbach und Herrn Engelmann für ihre wertvolle Mitarbeit danken.

Allen Mitarbeitern des Instituts gilt mein Dank für die freundliche Aufnahme, Aufgeschlossenheit und stets gewährte Unterstützung.

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

