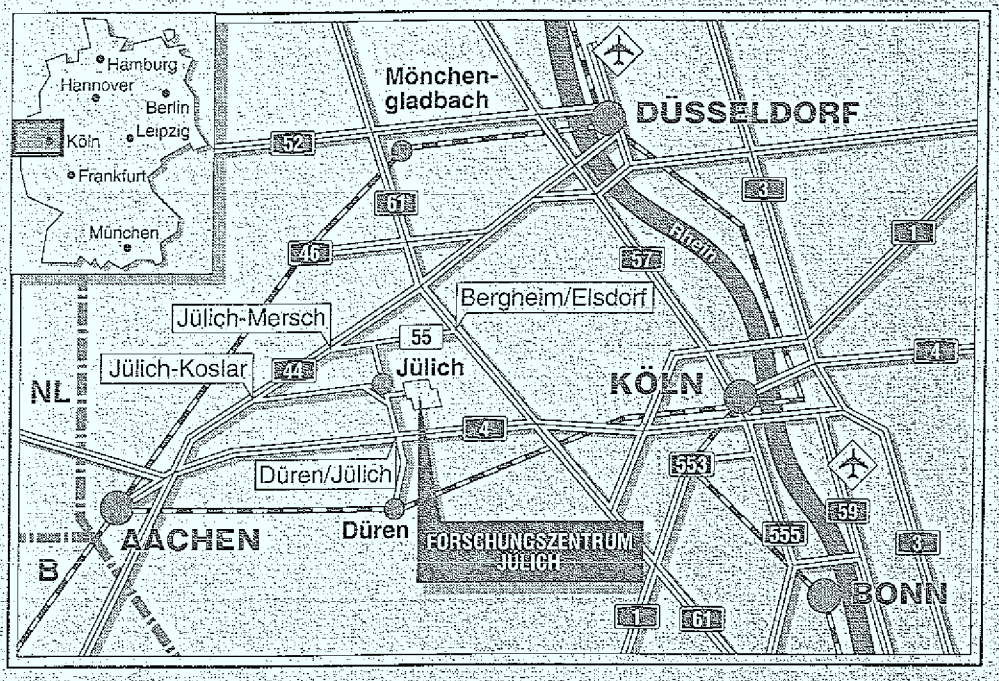
FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH

Institut für Biotechnologie

Physiologische und genetische Untersuchungen des Acetat-Stoffwechsels in *Corynebacterium glutamicum*

Dieter Reinscheid



Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 2967
ISSN 0944-2952
Institut für Biotechnologie Jül-2967
D 61 (Diss. Universität Düsseldorf)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
Telefon: 02461/61-6102 · Telefax: 02461/61-6103 · Telex: 833556-70 kfa d

Physiologische und genetische Untersuchungen des Acetat-Stoffwechsels in *Corynebacterium glutamicum*

Dieter Reinscheid

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungen

1. Aminosäuren

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

2. Nukleinsäure-Basen und Nukleotide

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil
ATP	Adenosintriphosphat
CTP	Cytidintriphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
TTP	Thymidintriphosphat
UTP	Uridintriphosphat
(mit dem Präfix 'd': 2'-Desoxy-)	
DNA	Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	Messenger RNA

3. Substrate, Produkte und Coenzyme enzymatischer Reaktionen

Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
CoA	Coenzym A
NAD	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid, oxidierte Form
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid, reduzierte Form
NADP	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, oxidierte Form
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, reduzierte Form
PEP	Phosphoenolpyruvat
HMP	4-Amino-5-Hydroxymethyl-2-Methylpyrimidinphosphat
MHET	4-Methyl-5(ß-Hydroxyethyl)Thiazol

4. Enzyme

ACS	Acetyl-CoA-Synthetase
AK	Acetat-Kinase
IC-DH	Isocitrat-Dehydrogenase
ICL	Isocitrat-Lyase
LDH	Lactat-Dehydrogenase
MSY	Malat-Synthase
PTA	Phosphotransacetylase

5. Chemikalien und Puffer

EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
MES	Morpholinoethansulfonsäure
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-Fluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Sodium Saline Citrate
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan

6. Technische Geräte und Verfahren

FPLC	Fast performance liquid chromatography
HPLC	High pressure liquid chromatography

7. Maßeinheiten

bp	Basenpaar
Ci	Curie
g	Gramm
h	Stunde
kb	Kilobasen
l	Liter
M	Mol pro Liter
min	Minute
mg	Milligramm
M_r	Molekulargewicht
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
U	Enzymeinheit (mol/min/mg Protein)
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen

8. Sonstige Abkürzungen

AS	Aminosäure
C-Terminus	Carboxyterminus von Proteinen
MM	Minimalmedium
N-Terminus	Aminoterminus von Proteinen
ORF	offenes Leseraster
UV	Ultraviolettes Licht

I. EINLEITUNG

Acetat stellt eine in der Natur weit verbreitete Kohlenstoffquelle dar, die durch Fermentation aus Kohlenhydraten gebildet wird (Gottschalk, 1985) und vielen Organismen als Kohlenstoff- und Energiequelle zum Wachstum dient (Cioni et *al.*, 1981). Um Acetat in den Zentralstoffwechsel einzuschleusen, wird dieses zunächst zu Acetyl-CoA aktiviert. In Eukaryoten erfolgt die Aktivierung des Acetats durch ein als Acetyl-CoA-Synthetase (ACS) bezeichnetes Enzym (Salzmann und Schomburg, 1990). Die ACS bildet von Acetat, ATP und freiem CoA ausgehend Acetyl-CoA, AMP und freies Phosphat. In Prokaryoten kann die Aktivierung des Acetats entweder über eine ACS oder mit Hilfe der beiden Enzyme Acetat-Kinase (AK) und Phosphotransacetylase (PTA) erfolgen (Shiio et *al.*, 1969; Brown et *al.*, 1977; Ferry 1992; Grundy et *al.*, 1993; 1994). Die AK bildet aus Acetat und ATP die Produkte ADP und Acetylphosphat, von denen letzteres durch die PTA mit freiem CoA zu Acetyl-CoA und freiem Phosphat umgesetzt wird (**Abbildung 1**).

Nach Aktivierung des Acetats wird der vom Acetyl-CoA stammende Acetyl-Rest in den Citrat-Zyklus eingeschleust. Der Citrat-Zyklus nimmt eine Schlüsselposition sowohl im Energie- als auch im Baustoffwechsel der Zelle ein. Zur Energiegewinnung wird der Acetyl-Rest in zwei oxidativen Schritten vollständig zu CO_2 oxidiert (**Abbildung 1**). Die dabei freigesetzte Energie wird in Form von Reduktionsäquivalenten bzw. ATP konserviert. Darüberhinaus dienen Metabolite des Citrat-Zyklus als Ausgangssubstanzen für anabole Reaktionen und fließen in den Baustoffwechsel des Organismus (**Abbildung 1**). Aufgrund der dualen Rolle des Citrat-Zyklus im Energie- und Baustoffwechsel besteht die Notwendigkeit, durch anaplerotische Reaktionen die dem Citrat-Zyklus entzogenen Metabolite neu zu synthetisieren. Abhängig von der Art der zur Verfügung stehenden Kohlenstoffquelle werden dabei unterschiedliche Wege beschritten. Bei Wachstum auf Kohlenhydraten werden diese zu C_3-Körpern in Form von Phosphoenolpyruvat (PEP) bzw. Pyruvat umgesetzt und dienen den Enzymen PEP-Carboxylase bzw. Pyruvat-Carboxylase als Substrate zur Synthese des Citrat-Zyklus-Metaboliten Oxalacetat (Kornberg, 1966b). Bei Wachstum auf Ethanol, Acetat oder Fettsäuren, die direkt zu Acetyl-CoA metabolisiert

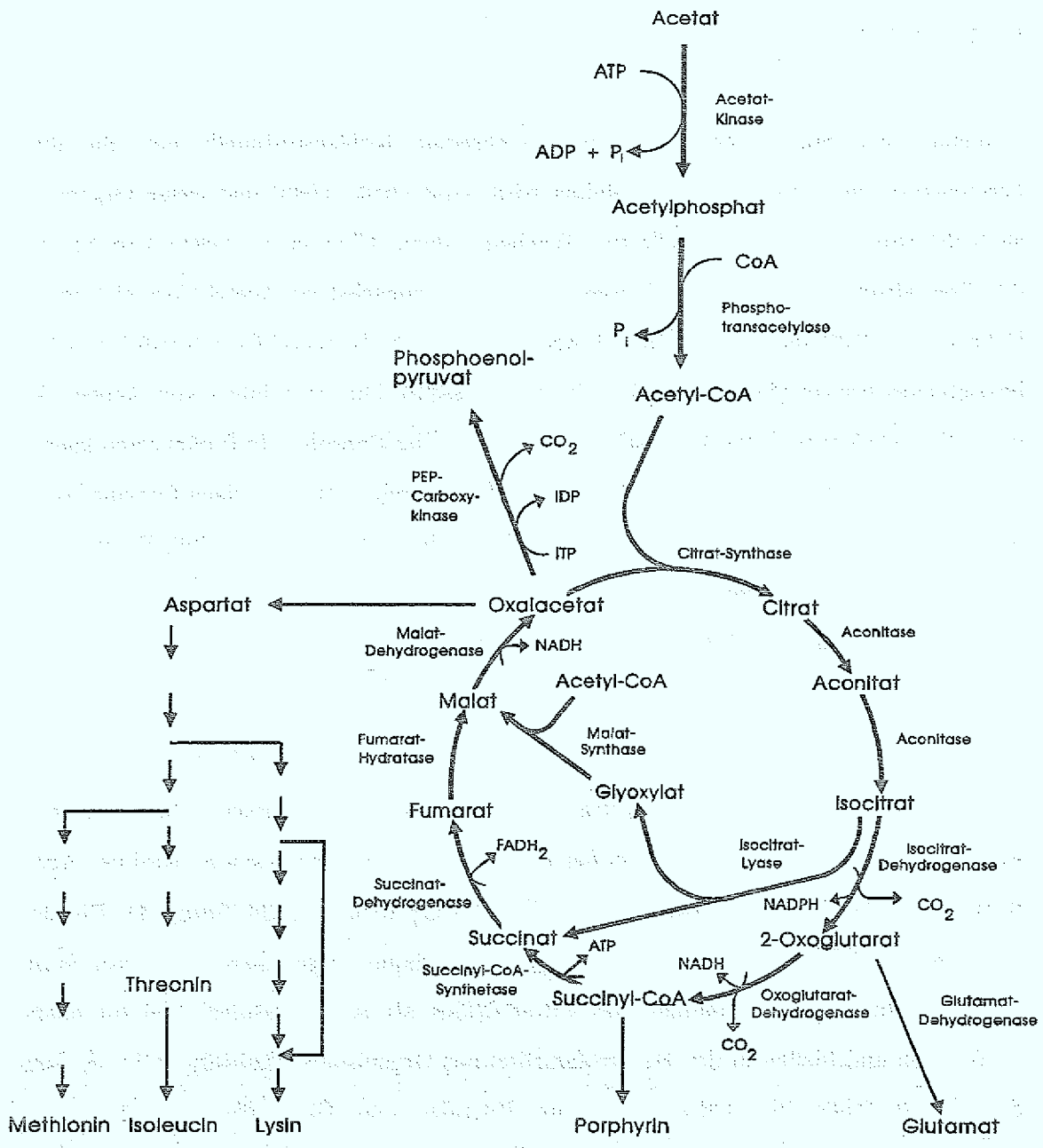


Abbildung 1. Schematische Darstellung des Citrat-Zyklus als Schaltstelle zwischen Energie- und Baustoffwechsel der Zelle. Zusätzlich zum Citrat-Zyklus sind die Acetat-aktivierenden Enzyme Acetat-Kinase und Phosphotransacetylase sowie die Schlüsselenzyme des Glyoxylat-Zyklus Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase dargestellt. Das in der Abbildung gezeigte Schema entspricht dem Stoffwechsel von *C. glutamicum*.

werden, können weder PEP-Carboxylase noch Pyruvat-Carboxylase den Citrat-Zyklus mit Kohlenstoff auffüllen, da sie auf das Vorhandensein von C_3-Körpern angewiesen sind. Um unter diesen Wachstumsbedingungen Metabolite des Citrat-Zyklus neu zu synthetisieren, bedienen sich viele Organismen des Glyoxylat-Zyklus (**Abbildung 1**). Der Glyoxylat-Zyklus stellt eine Modifikation des Citrat-Zyklus dar (Kornberg, 1966b). Beide Zyklen haben die Enzyme Succinat-Dehydrogenase, Fumarat-Hydratase, Malat-Dehydrogenase, Citrat-Synthase sowie Aconitase gemeinsam. Schlüsselenzyme des Glyoxylat-Zyklus sind Isocitrat-Lyase (ICL) und Malat-Synthase (MSY). Durch die ICL wird Isocitrat zu Succinat und Glyoxylat gespalten (Campbell et *al.*, 1953) und mit Hilfe der MSY wird von Glyoxylat und Acetyl-CoA ausgehend freies CoA und Malat gebildet (Wong und Ajl, 1955). Auf diese Weise werden die beiden CO_2-freisetzenden Schritte des Citrat-Zyklus umgangen und aus zwei Acetyl-Resten ein C_4-Körper des Citrat-Zyklus synthetisiert.

Der Glyoxylat-Zyklus ist in der Natur weit verbreitet. Seine Existenz wurde in Bakterien, Pilzen, Pflanzen, Protozoen sowie in den Organen einiger Säugetiere wie Ratte, Meerschweinchen und Mensch nachgewiesen (Cioni et *al.*, 1981; Vanni et *al.*, 1990; Davis und Goodman, 1992). In zahlreichen Organismen unterliegen die Enzyme ICL und MSY einer Regulation durch die Kohlenstoffquelle des Mediums. Für *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Nocardia salmonicolor*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Aspergillus nidulans* konnte eine Erhöhung der spezifischen Aktivität von ICL und MSY bzw. eine Steigerung der Synthese beider Enzyme bei Wachstum auf Acetat gezeigt werden (Vanderwinkel et *al.*, 1963; Sariaslani et *al.*, 1975; Armitt et *al.*, 1976; Reeves et *al.*, 1983; Fernandez et *al.*, 1993a; 1993b). Der Pilz *Yarrowia lipolytica* zeigt erhöhte Enyzmaktivitäten von ICL und MSY bei Wachstum auf Alkanen, Fettsäuren, Acetat und Ethanol (Kujau et *al.*, 1992). In einigen Organismen konnten darüberhinaus Isoenzyme von ICL und MSY nachgewiesen werden. So wurden Isoenzyme der ICL für *Yersinia pestis*, *Neurospora crassa*, *Chlorella vulgaris*, *Brassica napus* und einer *Pseudomonas* species beschrieben (Bellion und Woodson, 1975; Hillier und Charnetzky, 1981; Cioni et *al.*, 1981; Gainey et *al.*, 1991), Isoenzyme der MSY sind von *Candida tropicalis*, *S. cerevisiae* und *E. coli* bekannt (Vanderwinkel und De Vlieghere, 1968; Okada et *al.*, 1987; Hartig et *al.*, 1992; Fernandez et *al.*, 1993b).

Da Glyoxylat-Zyklus und Citrat-Zyklus einen Teil ihrer Enzyme gemeinsam besitzen, wird eine Regulation des C-Flusses am Verzweigungspunkt zwischen beiden Zyklen notwendig. Die Verzweigung zwischen beiden Zyklen erfolgt auf der Stufe des Isocitrats. Um dieses Substrat konkurriert das Glyoxylat-Zyklus-Enzym ICL mit dem Citrat-Zyklus-Enzym Isocitrat-Dehydrogenase (IC-DH). In zahlreichen Organismen ist die ICL an der Regulation des C-Flusses zwischen beiden Zyklen beteiligt, da sie durch verschiedene Metabolite des Zentralstoffwechsels in ihrer Aktivität gehemmt wird (Vanni et *al.*, 1991). In *E. coli* hingegen wird der C-Fluß zwischen beiden Zyklen durch reversible Phosphorylierung der IC-DH reguliert (LaPorte und Ikeda, 1991). Bei Wachstum auf Acetat liegt in *E. coli* der überwiegende Teil der IC-DH in der inaktiven, phosphorylierten Form vor, und daher fließt ein großer Teil des Kohlenstoffs in den Glyoxylat-Zyklus (Garnak und Reeves, 1979; Walsh und Koshland, 1985). In Gegenwart von Glucose wird die IC-DH dephosphoryliert, ist somit wieder aktiv und lenkt aufgrund ihrer hohen Affinität zu Isocitrat den C-Fluß in die Richtung des Citrat-Zyklus (Walsh und Koshland, 1985; LaPorte und Ikeda, 1991). Sowohl Phosphorylierung als auch Dephosphorylierung der IC-DH erfolgt in *E. coli* durch ein als IC-DH-Kinase/Phosphatase bezeichnetes Enzym (Garnak und Reeves, 1979; Edlin und Sundaram, 1989).

Aufgrund der Bedeutung des Glyoxylat-Zyklus für den Baustoffwechsel der Zelle wurden die Gene für ICL und MSY in zahlreichen Eukaryoten sowie in *E. coli* sequenziert (Rieul et *al.*, 1988; Byrne et *al.*, 1988; Hikida et *al.*, 1991; Barth und Scheuber, 1993; Fernandez et *al.*, 1992; 1993b). In *E. coli* liegt das ICL-Gen (*aceA*) mit dem MSY-Gen (*aceB*) und dem *aceK*-Gen, das für die IC-DH-Kinase/Phosphatase kodiert, in Form eines Operons vor, welches als *ace*-Operon bezeichnet wird (Maloy und Nunn, 1982; LaPorte et *al.*, 1985). Die Expression des *ace*-Operons unterliegt in *E. coli* sowohl einer globalen als auch einer spezifischen Regulation. An der globalen Regulation ist ein Zweikomponentensystem aus den *arcA*- und *arcB*-Genprodukten beteiligt (Iuchi et *al.*, 1988; 1989). Unter anaeroben Bedingungen reprimiert dieses System in *E. coli* die Expression von Genen des Citrat-Zyklus, des Glyoxylat-Zyklus, des Fettsäureabbaus und des Cytochrom *o*-Komplexes. Die spezifische Regulation des *ace*-Operons erfolgt in *E. coli* mit Hilfe der Genprodukte der beiden Gene *iclR* und *fadR* (Maloy und Nunn, 1982). Beide Gene kodieren für Repressoren, welche in additiver Weise die Expression des *ace*-Operons regulieren. Durch das *iclR*-Genprodukt wird die Expression des *ace*-Operons vermindert, wenn sich kein Acetat im

Medium befindet (Maloy und Nunn, 1982), und durch das *fadR*-Genprodukt erfolgt eine reduzierte Expression des *ace*-Operons, wenn keine Fettsäuren zum Wachstum zur Verfügung stehen (Simons et *al.*, 1980; Maloy und Nunn, 1982). Die Bindung beider Repressoren im Promotorbereich des *ace*-Operons bewirkt, daß die Expression des *ace*-Operons vollständig abgeschaltet wird (Maloy und Nunn, 1982).

Neben vielen anderen Organismen ist auch *Corynebacterium glutamicum* in der Lage, auf Acetat als alleiniger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Dieser Gram-positive, nicht-sporenbildende Organismus wurde erstmalig von Kinoshita et *al.* beschrieben (1957). Aufgrund seiner Fähigkeit, unter Biotinmangel große Mengen an Glutamat in das Medium auszuscheiden, wird *C. glutamicum* zu den 'Glutaminsäure-Bakterien' gezählt. Zu dieser Gruppe gehören außerdem die beiden Unterarten *C. glutamicum* ssp. *flavum* und *C. glutamicum* ssp. *lactofermentum*, die früher als *Brevibacterium flavum* bzw. *B. lactofermentum* klassifiziert wurden (Liebl et *al.*, 1991). Trotz der nahen Verwandtschaft der genannten 'Glutaminsäure-Bakterien' ist deren Unterscheidung sowohl durch Analyse von Zellwandlipiden (Liebl, 1991) als auch durch ein spezifisches DNA-Restriktions-fragment-Muster (Eikmanns et *al.*, 1991b) möglich. Charakteristisch für alle *C. glutamicum* Stämme ist ihre Unbeweglichkeit und ihre keulenförmige Gestalt (Liebl, 1991). Darüberhinaus weisen sie einen GC-Gehalt von 53-56% auf und zeigen eine Auxotrophie für Biotin (Liebl, 1991). Chemotaxonomisch zeichnen sich *C. glutamicum*-Stämme durch den Besitz einer rigiden Zellwand aus, die über *meso*-Diaminopimelat quervernetzt ist (Keddie und Cure, 1977).

C. glutamicum wird heute weltweit für die großtechnische Herstellung zahlreicher Aminosäuren eingesetzt. Neben der Produktion von Glutamat werden Mutanten von diesem Organismus für die Herstellung der essentiellen Aminosäuren Lysin, Tryptophan und Threonin verwendet (Kleemann et *al.*, 1985; Kinoshita, 1985; Shiio et *al.*, 1989). Während Glutamat als Geschmackverstärker in der Nahrungsmittelindustrie Verwendung findet (Kleemann et *al.*, 1985), werden die anderen Aminosäuren als Supplemente in der Futtermittelindustrie, als Bestandteile von Infusionslösungen und als Ausgangssubstanzen bei der Synthese von Medikamenten eingesetzt (Nakayama et *al.*, 1972; Leuchtenberger, 1984; Kleemann et *al.*, 1985).

In der Regel dienen Kohlenhydrate als Substrate bei der fermentativen Herstellung der Aminosäuren durch *C. glutamicum* (Kinoshita, 1985). Es wurde jedoch auch beschrieben, daß *C. glutamicum* mit Acetat als C-Quelle zur Herstellung von Aminosäuren eingesezt werden kann (Shiio, 1960; Nakayama, 1972; Kinoshita, 1985). Für die Produktion von Threonin durch *C. glutamicum* ssp. *flavum* konnte sogar gezeigt werden, daß bei Wachstum auf Acetat größere Threonin-Mengen als bei Wachstum auf Glucose gebildet werden (Akashi et *al.*, 1979). Aufgrund der Bedeutung des Acetat-Stoffwechsels bei der Aminosäure-Produktion von *C. glutamicum* wurden bereits 1969 die Schlüsselenzyme des Acetat-Stoffwechsels AK, PTA, ICL und MSY in diesem Organismus nachgewiesen (Shiio et *al.*, 1969). Darüberhinaus wurden aus *C. glutamicum* ssp. *flavum* sowohl ICL als IC-DH partiell gereinigt und für biochemische Untersuchungen herangezogen (Ozaki und Shiio, 1968; Shiio und Ozaki, 1968). Für die partiell gereinigte IC-DH konnte eine signifikante Hemmung der Aktivität durch ein Gemisch aus Oxalacetat und Glyoxylat nachgewiesen werden, während die partiell gereinigte ICL nur schwach durch physiologisch relevante Effektoren wie 2-Oxoglutarat, Succinat, Malat und Oxalacetat in ihrer Aktivität gehemmt wurde.

Obwohl coryneforme Bakterien bereits seit langem zur Aminosäure-Produktion eingesetzt werden, wurden erst in jüngster Zeit molekularbiologische Verfahren für diese Organismen entwickelt, mit deren Hilfe sie genetisch untersucht werden können. Durch Verwendung spezieller Vektor- und Transformationssysteme (Martin, 1989; Wohlleben et *al.*, 1993) konnten bereits zahlreiche Gene aus coryneformen Bakterien isoliert und analysiert werden. Aufgrund der Bedeutung von *C. glutamicum* für die Aminosäure-Produktion wurden in diesem Organismus vorwiegend Gene, die für Enzyme aus Aminosäure-Biosynthesewegen kodieren, untersucht. So wurden in *C. glutamicum* die Gene der Biosynthese von Lysin, Threonin, Phenylalanin und Glutamat isoliert und charakterisiert (Peoples et *al.*, 1988; Han et *al.*, 1990; Ito et *al.*, 1990; Cremer et *al.*, 1991; Börmann et *al.*, 1992). Durch Überexpression einzelner Gene für Schlüsselenzyme aus der Aminosäure-Biosynthese wurde der Kohlenstofffluß in *C. glutamicum* gezielt in die Richtung der Lysin-, Threonin-, Tyrosin- bzw. Phenylalanin-Biosynthese umgeleitet (Morinaga et *al.* 1987; Eikmanns et *al.*, 1991a; Cremer et *al.*, 1991; Ikeda und Katsumata, 1992). Gene aus der Aminosäure-Biosynthese, die in hoher Kopienzahl in *C. glutamicum* toxisch waren, konnten durch Verwendung von Vektoren mit niedriger Kopienzahl bzw. durch Integration in das Chromosom von *C.*

glutamicum in diesem Organismus exprimiert werden (Reinscheid et *al.*, 1994). Darüberhinaus wurden mittels eines als ´Genunterbrechung´ bezeichneten Verfahrens Gene aus der Aminosäure-Biosynthese inaktiviert und der Effekt auf die Produktion einzelner Aminosäuren untersucht (Schwarzer und Pühler, 1991; Schrumpf et *al.*, 1991; Börmann-El Kholi et *al.*, 1993).

Erst in jüngster Zeit wurden molekularbiologische Arbeiten zur Rolle des Zentralstoffwechsels bei der Aminosäurebildung von *C. glutamicum* begonnen. So konnten bisher aus *C. glutamicum* die Gene für PEP-Carboxylase, Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase, Triosephosphat-Isomerase, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase und Phosphoglycerokinase isoliert und sequenziert werden (Eikmanns et *al.*, 1989; von der Osten et *al.*, 1989; Eikmanns, 1992). Die Inaktivierung des PEP-Carboxylase-Gens im Chromosom von *C. glutamicum* und Analyse der entsprechenden Mutanten führte zu dem überraschenden Ergebnis, daß *C. glutamicum* dieses Enzym weder zum Wachstum auf Glucose noch zur Lysinproduktion benötigt (Peters-Wendisch et *al.*, 1993). Daraus konnte geschlossen werden, daß in *C. glutamicum* bei Wachstum auf Glucose eine alternative anaplerotische Reaktion zur PEP-Carboxylase existieren muß. Eine mögliche Alternative zur PEP-Carboxylase ist der Glyoxylat-Zyklus. So wurde z. B. für *E. coli* gezeigt, daß durch diesen Zyklus ein Defekt in der PEP-Carboxylase supprimiert werden kann (Vanderwinkel et *al.*, 1963). Da bisher nur wenige Daten zum Glyoxylat-Zyklus in *C. glutamicum* vorlagen (Kinoshita, 1985), war die Untersuchung dieses Zyklus in *C. glutamicum* von besonderem Interesse, um anaplerotische Reaktionen in diesem Organismus sowie deren Bedeutung besser zu verstehen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die physiologische und genetische Charakterisierung des Acetat-Stoffwechsels in *C. glutamicum*. Schwerpunkt der Arbeit war die Isolierung und Analyse der Gene für Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase sowie die biochemische Charakterisierung der entsprechenden Enzyme. Durch Inaktivierung der isolierten Gene im Chromosom von *C. glutamicum* wurde der Frage nachgegangen, ob diese für das Wachstum von *C. glutamicum* auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen essentiell sind. Darüberhinaus erfolgten Untersuchungen zur Regulation des Acetat-Stoffwechsels und zur Regulation des Kohlenstofflusses zwischen Citrat- und Glyoxylat-Zyklus in *C. glutamicum*. Mit Hilfe der gewonnenen Daten wurde ein Modell zur Regulation des Kohlenstoffflusses zwischen Glyoxlylat- und Citrat-Zyklus in *C. glutamicum* entworfen.

II. MATERIALIEN UND METHODEN

1. Bakterienstämme und Plasmide

In der vorliegenden Arbeit wurden die in **Tabelle 1** aufgelisteten *E. coli*- und *C. glutamicum*-Stämme verwendet.

Tabelle 1. Verwendete *E. coli* und *C. glutamicum* Stämme mit ihren genetischen Markern.

Stamm	genetischer Marker	Referenz
E. coli		
DH5	*thi-1*, *endAR1*, *hsdR17* r^-, m^+), *relA1*, *supE44*, *recA1*, *gyrA96*	Hanahan, 1985
K8-5m	*lacZ4*, oder *lacY1*, *tsx-6*, *supE44*, *galK2*, *rspL159*, *xyl-5*, *met-24*, *aceA3*, *iclR13*	Vinopal und Fraenkel, 1974
DV21AO5	*lacZ43*, *relA1*, (*speC-glc*)*63*, *spoT1*, *ppc-2*, *thi-1*, *aceB6*, Hfr	Vanderwinkel und De Vlieghere, 1968
S17-1	*thi-1*, *endAR1*, *hsdR17*, *supE44*, *pro*	Simon et *al.*, 1983
C. glutamicum		
ATCC 13032	Wildtyp	ATCC[a]
MH20-22B	AEC^R, *leuD*	Schrumpf et *al.*, 1992
ASK1	13032::pSUP301::*aceA*-Fragment	diese Arbeit
ALB1	13032::pSUP301::*aceB*-Fragment	diese Arbeit
JAA1	13032::pSUP301::*thiX*-Fragment	diese Arbeit
EGS11	13032::pSUP301::*orfZ*-Fragment	diese Arbeit

[a] American Type Culture Collection

In **Tabelle 2** sind die für genetische Arbeiten verwendeten Vektoren aufgelistet.

Tabelle 2. Verwendete Cosmide und Plasmide mit ihren Markern und Eigenschaften

Vektor	Marker/Eigenschaft[a]	Referenz
pHC79	Amp^R, Tet^R, cos, *ori* ColE1	Hohn und Collins, 1980
pACYC184	Cm^R, Tet^R, *ori* P15A	Chang und Cohen, 1978
pUC18	Amp^R, *ori* colE1	Vieira und Messing, 1982
pGEM3Z / 4Z	Amp^R, *ori* colE1, Promotoren für SP6- und T7-RNA Polymerasen	Promega, Heidelberg
pSUP301	Amp^R, Km^R, *ori*T, *ori*V	Simon et *al.*, 1983
pEK0	Km^R, *ori* pBL1, *ori* colE1	Eikmanns et *al.*, 1991c
pHCB1, pHCB2 und pHCB3	Amp^R, pHC79-Derivate mit 40 kb chromosomalen *Sau*3A-Inserts	diese Arbeit
pACB-17 und pACB-35	Cm^R, pACYC184-abgleitete Plasmide, die das *aceB*-Gen aus *C. glutamicum* auf verschiedenen *Sau*3A-Inserts tragen	diese Arbeit
pEKB0	Km^R, pEK0-Derivat mit promotorlosem *aceB*-Gen als 3,8 kb *Bst*EII-*Asp*700-Insert	diese Arbeit
pEKB1	Km^R, pEK0-Derivat mit 4,9 kb *aceB*-tragendem Insert	diese Arbeit
pEKB2	Km^R, pEK0-Derivat mit dem *aceB*-Gen auf einem 3,0 kb *Bfr*I-*Pvu*I-Fragment	diese Arbeit
pEKA1	Km^R, pEK0-Derivat mit dem *aceA*-Gen auf einem 2,1 kb *Hpa*I-*Bgl*II-Fragment	diese Arbeit
pEKAB	Km^R, pEK0-Derivat mit den Genen *aceA* und *aceB* (siehe Abbildung 13)	diese Arbeit

[a] Amp^R: Ampicillin-Resistenz
Km^R: Kanamycin-Resistenz
Tet^R: Tetracyclin-Resistenz
Cm^R: Chloramphenicol-Resistenz

2. Chemikalien

Restriktionsendonukleasen und andere Enzyme wurden von der Firma Boehringer Mannheim bezogen. Analysenreine Chemikalien wurden mit Ausnahme der unten aufgeführten Substanzen von der Firma Merck AG, Darmstadt bezogen. 4-Amino-5-Hydroxymethyl-2-Methylpyrimidinphosphat wurde freundlicherweise von der Firma Hoffmann-La Roche (Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt.

Amersham

α-[^{35}S]-dATP

Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg

Agarose

Phenol

Boehringer Mannheim, Mannheim

Ampicillin Na_2- Salz

Kanamycindisulfat

DIG DNA Labeling and Detection Kit

DIG RNA Labeling Kit

Difco Lab., Detroit, USA

Bacto-Agar

Bacto-Yeast-Extract

Bacto-Pepton

Bacto-Trypton

Brain-Heart-Infusion-Medium

Pharmacia, Freiburg

AutoRead-Sequenzierungs-Kit

Promega

Erase-A-Base-Exonuclease-Kit

Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg

Nalidixinsäure

Serdolit

Seva-Blue

Schleicher und Schuell

Nytran-Nylonfilter N13

Sigma Chemie GmbH, München

Ethidiumbromid

N-Laurylsarcosin, Na-Salz

4-Methyl-5(β-Hydroxyethyl)Thiazol

threo-(D_S)-Isocitrat

threo-(D,L)-Isocitrat

United States Biochemicals

Sequenase-Sequenzierungs-Kit

3. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

Zur Kultivierung von *E. coli* wurden folgende Medien eingesetzt:

Minimalmedium M9 (Sambrook et *al.*, 1989)

M9 - Stammlösung	100 ml
Aqua dest.	867 ml

Der pH wurde mit 1 N NaOH auf 7,3 eingestellt. Nach dem Autoklavieren wurden folgende Substanzen steril zugesetzt:

$CaCl_2$	(1 M)	0,1 ml
$MgSO_4$	(1 M)	2,0 ml
Thiamin	(170 mg/ml)	1,0 ml

C-Quellen:

Glucose	(20%) (w/v)	30,0 ml
Acetat	(15%) (w/v)	30,0 ml

Zur Kultivierung des *E. coli* Stammes K8-5m wurde dem Medium 5 ml 200 mM L-Methionin hinzugefügt. Bei Wachstum von *E. coli* DV21AO5 auf Glucose wurde dem Medium 0,3% Succinat zusetzt.

M9 - Stammlösung:

Na_2HPO_4	60 g/l
KH_2PO_4	30 g/l
NH_4Cl	10 g/l
NaCl	5 g/l

Die Salze wurden in 1 l Aqua dest. gelöst und der pH mit 10 N NaOH auf 7,25 eingestellt.

Vollmedium 2 x TY (Sambrook et *al.*, 1989)

Bacto-Trypton	16 g/l
Bacto-Yeast-Extract	10 g/l
NaCl	5 g/l

Vollmedium LB (Luria-Broth-Medium) (Sambrook et *al.*, 1989)

Bacto-Trypton	10 g/l
Bacto-Yeast-Extract	5 g/l
NaCl	10 g/l

Zur Kultivierung von *C. glutamicum* wurden folgende Medien verwendet:

Vollmedium 2 x TY (Sambrook et *al.*, 1989)
zur Zusammensetzung siehe bei Nährmedien für *E. coli*

Fermentationsmedium C.g.X. (modifiziert nach Kase et *al.*, 1972)

$(NH_4)_2SO_4$	20 g/l
KH_2PO_4	0,5 g/l
K_2HPO_4	0,5 g/l
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,25 g/l
Spurenelemente	1 ml Stammlösung
Biotin	1 ml Stammlösung

Die Substanzen wurden in 800 ml Aqua dest. gelöst, der pH auf 6,8 eingestellt und die Lösung zu je 85 ml auf 500 ml-Erlenmeyerkolben verteilt. Nach dem Autoklavieren wurden je 8 ml einer 50%igen (w/v) sterilen Glucoselösung und 2% (w/v) steriles $CaCO_3$ hinzugegeben. Die Lösung wurde mit 5 ml gewaschenen Zellen inokuliert.

Minimalmedium C.g.C. + MOPS (modifiziert nach Kase et *al.*, 1972)

$(NH_4)_2SO_4$	5	g/l
Harnstoff	5	g/l
MOPS	42	g/l
K_2HPO_4	3	g/l
KH_2PO_4	1	g/l
$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,4	g/l
$CaCl_2 \times 2H_2O$	0,1	g/l
Spurenelemente	1,0	ml
Biotin (0,2 mg/ml)	1,0	ml

Die Substanzen wurden in 970 ml Aqua dest. gelöst, der pH mit 1 N NaOH auf 6,2 eingestellt und je 54 ml auf 500 ml-Erlenmeyerkolben verteilt. Nach dem Autoklavieren wurden jeweils 6 ml 40%ige (w/v) sterile Glucose, bzw. 6 ml 20%iges (w/v) Acetat zugesetzt. Sollte das Medium beide C-Quellen enthalten, so wurden je 3 ml der beiden C-Quellen zugegeben.

Zur Kultivierung von *C. glutamicum* MH20-22B sowie den von diesen abgeleiteten Stämmen wurde jedem Kolben L-Leucin in einer Endkonzentration von 2 mM zugesetzt.

Spurenelemente:

$FeSO_4 \times 7H_4O$	10	g/l
$MnSO_4 \times H_4O$	10	g/l
$CuSO_4$	0,2	g/l
$ZnSO_4 \times 7H_2O$	1	g/l
$NiCl_2$	0,02	g/l

BHIS (Brain-Heart-Infusion-Sorbitol) (Liebl et *al.*, 1989)

Dieses Medium diente zur Regeneration von *C. glutamicum* Zellen nach Elektroporation und zur Selektion nach Konjugation.

Brain-Heart-Infusion	37	g/l
Sorbitol	102	g/l

Zur Herstellung von BHIS-Platten wurden die folgenden Substanzen zugesetzt:

Bacto-Trypton	5	g/l
Bacto-Yeast-Extract	2,5	g/l
NaCl	5	g/l
Bacto-Agar	18	g/l

BHI-Agar wurde getrennt vom Sorbitol autoklaviert. Den Platten wurde Kanamycin in einer Konzentration von 15 mg/ml und gegebenenfalls Nalidixinsäure in einer Konzentration von 50 mg/ml zugesetzt.

Antibiotika

Falls zur Selektion Antibiotika notwendig waren, wurden diese in Form von sterilfiltrierten Stammlösungen den auf 60°C abgekühlten, autoklavierten Medien zugesetzt.

Ampicillin-Stammlösung:	50 mg/ml
	Endkonzentration im Medium: 50 µg/ml
Kanamycin-Stammlösung:	50 mg/ml
	Endkonzentration im Medium: 50 µg/ml
Nalidixin-Stammlösung:	50 mg/ml in 0,4 N NaOH
	Endkonzentration im Medium: 50 µg/ml
Chloramphenicol-Stammlösung:	30 mg/ml in 100%igem Ethanol
	Endkonzentration im Medium: 30 µg/ml

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte als Flüssigkultur in Reagenzröhrchen oder in Erlenmeyerkolben mit Schikanen unter Schütteln bei 37°C. *C. glutamicum* wurde in den gleichen Gefäßen unter Schütteln bei 30°C inkubiert. Zur Stammhaltung von Bakterien wurden 700 µl exponentiell wachsende Bakterienkultur mit 300 µl Glycerin gemischt und bei -70°C gelagert. Zur Replikaplattierung wurden die Kolonien einer Vollmedium-Agar-Platte auf ein steriles Samttuch übertragen, mit welchem anschließend eine Minimalmedium-Agar-Platte beimpft wurde.

4. Quantifizierung von Acetat und Lysin

Acetat wird durch das Enzym Acetyl-CoA-Synthetase mit ATP und freiem CoA zu Acetyl-CoA umgesetzt. Das Acetyl-CoA wird durch die Citrat-Synthase mit Oxalacetat zu Citrat kondensiert. Das für letztere Reaktion benötigte Oxalacetat wird durch das Enzym Malat-Dehydrogenase aus Malat gebildet. Gleichzeitig wird durch dieses Enzym dabei NAD zu NADH reduziert. Die Menge an gebildetem NADH kann photometrisch bestimmt werden und entspricht der in den Test eingesetzten Acetat-Menge. Die Acetat-Konzentration im Kulturüberstand wurde mit dem beschriebenen Testprinzip unter Anwendung eines von der Firma Boehringer Mannheim vertriebenen Kits ermittelt.

Die Lysinbestimmung erfolgte nicht-enzymatisch mittels HPLC. Zu Analysenbeginn wurden zunächst die primären Aminogruppen des Lysins mit o-Phtalaldehyd zu fluoreszierenden, thiosubstituierten Isoindolen derivatisiert. Die Derivate wurden aufgrund ihrer unterschiedlichen Hydrophobizität durch Reversed-Phase-HPLC auf einer HPLC-Anlage vom Typ Hewlett Packard HP 1090 aufgetrennt (Lindroth und Mopper, 1979; Jones und Gilligan, 1983). Zur Trennung wurde eine Hypersyl ODS C-18 Säule mit 0,1 M Natriumacetat pH 7,2 als Laufmittel 1 und Methanol als Laufmittel 2 verwendet. Es wurde jeweils ein Volumen von 2 µl injiziert, bei einer Durchflußrate von 0,5 ml/min, einer Temperatur von 40°C, einem maximalen Druck von 400 bar und einer Laufzeit von 12 min.

5. Enzymaktivitäten, Proteinchemie und Kinetik

5.1. Bestimmung der spezifischen Aktivitäten von Acetat-Kinase, Phosphotransacetylase, Isocitrat-Lyase, Malat-Synthase und Isocitrat-Dehydrogenase

Herstellung von Zellextrakten

Die Zellen wurden in 60 ml Medium in 500 ml-Erlenmeyer Kolben mit Schikanen bis zur exponentiellen Phase gezüchtet, zweimal mit 20 ml 50 mM Tris/HCl pH 7,6 gewaschen, in 1 ml dieses Puffers resuspendiert und in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt. Für ICL-Messungen wurden der Suspension 5 mM DTT, 15 mM $MgCl_2$ und 1 mM EDTA zugesetzt. Zur Messung von AK bzw. PTA wurden 5 mM Cystein, 5 mM $MgCl_2$ und

30% Glycerin hinzugegeben. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Ultraschalldesintegrators (Branson Sonifier W-250) bei einer Pulsfrequenz von 20% und einer Leistung von 30 W für 10 min (*E. coli*: 2 min) aufgeschlossen. Nach Zentrifugation bei 13000 rpm (=13226 x g) in einer Sigma 2K15 Zentrifuge und 4°C wurde der Überstand zur Enzymaktivitätsbestimmung verwendet.

Acetat-Kinase-Test

Die Acetat-Kinase katalysiert folgende Reaktion:

$$\text{Acetat} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{Acetylphoshat} + \text{ADP}$$

Zur Bestimmung der AK wurde ein gekoppelter Test nach Stohhäcker (1990) verwendet. Das Prinzip dieses gekoppelten Testes beruht darauf, daß Acetat in Anwesenheit von ATP und AK zu Acetylphosphat umgesetzt wird. Das bei dieser Reaktion entstandene ADP wird mittels PEP und dem Enzym Pyruvat-Kinase zu ATP phosphoryliert. Pyruvat, welches neben dem ATP gebildet wird, wird in Anwesenheit von NADH und Lactat-Dehydrogenase zu Lactat reduziert. Durch die Abnahme an NADH kann die Reaktion photometrisch bei 340 nm verfolgt werden. Der Testansatz enthielt in einem Volumen von 1 ml 50 mM Tris/HCl pH 7,6, 5 mM $MgCl_2$, 3 mM ATP, 3 mM PEP, 0,3 mM NADH, 7 U Pyruvat-Kinase, 10 U Lactat-Dehydrogenase, 340 mM Na-Acetat sowie geeignete Verdünnungen an Zellextrakt.

Phosphotransacetylase-Test (modifiziert nach Brown et *al.*, 1977)

Durch die Phosphotransacetylase wird die folgende Reaktion katalysiert:

$$\text{Acetylphosphat} + \text{CoA} \rightleftharpoons \text{Acetyl-CoA} + P_i$$

Acetyl-CoA besitzt im Gegensatz zu freiem CoA ein Absorptionsmaximum bei 232 nm. Dies macht man sich sowohl bei der Messung der PTA-Aktivität als auch der MSY-Aktivität (s. u.) zunutze. Durch Messung der Extinktionszunahme bei 232 nm kann die Menge an gebildetem Acetyl-CoA bestimmt werden. Der Testansatz zur Bestimmung der PTA enthielt in einem Volumen von 1 ml 100 mM Tris/HCl pH 7,6, 5 mM $MgCl_2$, 0,5 mM Cystein, 20 mM NH_4Cl, 3 mM CoA, 20 mM Acetylphosphat und geeignete Verdünnungen an Zellextrakt.

Isocitrat-Lyase-Test

Die Isocitrat-Lyase katalysiert die folgende Reaktion:

$$\text{Isocitrat} \underset{\text{Kondensation}}{\overset{\text{Spaltung}}{\rightleftharpoons}} \text{Succinat} + \text{Glyoxylat}$$

Test der ICL-Spaltungsreaktion

Das in der Reaktion gebildete Glyoxylat wurde unter Oxidation von NADH mittels Lactat-Dehydrogenase zu Glycolat reduziert (Warren, 1970). Die Abnahme an NADH kann photometrisch bei 340 nm bestimmt werden. In einem Volumen von 1 ml enthielt jeder Testansatz 50 mM MOPS/NaOH pH 7,3, 5 mM DTT, 15 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 5 mM threo-D_S-Isocitrat, 0,2 mM NADH, 18 U Lactat-Dehydrogenase (Isoenzym I aus Schweineherz) sowie Zellextrakt bzw. gereinigte ICL.

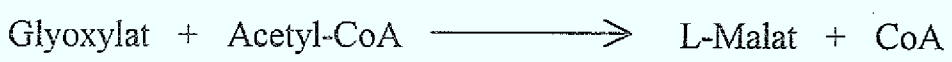
Eine Modifikation des Tests von Dixon und Kornberg (1959) wurde verwendet, um Temperatur- sowie pH-Optimum der ICL zu bestimmen. In einem Volumen von 1 ml enthielt der Testansatz 15 mM $MgCl_2$, 3,4 mM Phenylhydrazin-Hydrochlorid, 5 mM threo-D_S-Isocitrat, ICL und die unten angegebenen Puffer. In diesem Test wird aus Glyoxylat und Phenylhydrazin nicht-enzymatisch Phenylhydrazon gebildet. Der Verlauf der Phenylhydrazonbildung wurde im Photometer bei 430 nm aufgezeichnet. Zur Bestimmung des pH-Optimums wurden 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6,0-7,3 bzw. 50 mM MOPS/NaOH pH 6,7-8,0 verwendet. Die Ermittlung des Temperaturoptimums erfolgte zwischen 20°C und 60°C in 50 mM MOPS/NaOH pH 7,3.

Test der ICL-Kondensationsreaktion (MacKintosh et *al.*, 1988)

Zur Bestimmung der ICL-Kondensationsreaktion wird das von der ICL gebildete Isocitrat durch die IC-DH unter Reduktion von NADP zu 2-Oxoglutarat oxidiert. Der Reaktionsverlauf kann photometrisch durch die Bildung von NADPH bei 340 nm verfolgt werden. Der Test enthielt in einem Volumen von 1 ml 15 mM $MgCl_2$, 5 mM Succinat, 1 mM Glyoxylat, 2 mM NADP, 1U IC-DH (Schweineherz) und gereinigte ICL.

Malat-Synthase-Test

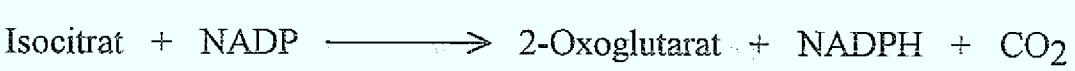
Die Malat-Synthase katalysiert die folgende Reaktion:



Zur Bestimmung der MSY-Aktivität wurde ein modifizierter Test nach Dixon und Kornberg (1959) verwendet. In einem Volumen von 1 ml enthielt der Testansatz 50 mM Tris/HCl pH 7,6, 40 mM $MgCl_2$, 2 mM Na-Glyoxylat, 0,15 mM Acetyl-CoA und Zellextrakt bzw. gereinigte MSY. Es wurde die Extinktionsabnahme bei 232 nm verfolgt, die sich aufgrund der Spaltung der Thioesterbindung von Acetyl-CoA ergibt.

Isocitrat-Dehydrogenase-Test

Von der Isocitrat-Dehydrogenase wird die folgende Reaktion katalysiert:



Zur Messung der IC-DH Aktivität in Zellextrakten von *C. glutamicum* wurde ein modifizierter Test nach Nachlas et *al.* (1963) verwendet. In einem Volumen von 1 ml enthielt der Test 100 mM Tris/HCl pH 7,6, 1 mM $MnSO_4$, 0,66 mM NADP, 1 mM threo-D_S-Isocitrat und geeignete Verdünnungen an Zellextrakt. Die Zunahme des in der IC-DH Reaktion gebildeten NADPH wurde photometrisch bei 340 nm bestimmt.

Proteinbestimmung nach Biuret (Gornall et *al.*, 1949)

Bei dieser Methode wird die Proteinkonzentration durch die Bildung von Amid-Kupfer-Chelatkomplexen bestimmt, welches mit einer Extinktionszunahme bei 580 nm einhergeht. Zur Proteinbestimmung wurden geeignete Verdünnungen der Rohextrakte bzw. der gereinigten Enzyme in einem Volumen von 1 ml hergestellt und durch Zugabe von 200 µl Trichloressigsäure (3 M) das Protein ausgefällt. Nach Lösen des Proteins in 100 µl Aqua dest. und Zugabe von 1 ml Biuret-Reagenz wurde die Probe für 30 min im Dunkeln inkubiert und anschließend deren Extinktion bei 580 nm bestimmt. Anhand einer parallel dazu erstellten Eichgerade konnte der Proteingehalt der Proben angegeben werden.

5.2. Reinigung von Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase aus *C. glutamicum*

Zur Reinigung von ICL bzw. MSY aus *C. glutamicum* wurden 60 ml einer in CgC-Acetat-Medium wachsenden Kultur verwendet. Alle Puffer zur Aufreinigung von ICL enthielten 5 mM DDT, 5 mM $MgCl_2$ und 1 mM EDTA. Die Zellen wurden zweimal mit 20 ml 50 mM Morpholinoethansulfonsäure (MES)/NaOH pH 6,0 gewaschen und in 1 ml des gleichen Puffers nach Zugabe von 5 U/ml DNase, 15 µg/ml RNase und 100 µM Phenylmethylsulfonyl-Fluorid (PMSF) resuspendiert. Aufschluß der Zellen und Entfernen von Zelltrümmern erfolgte wie unter 'Herstellung von Zellextrakten' beschrieben. Alle Aufreinigunsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Zellextrakte wurden mit 50 mM MES/NaOH pH 6 auf 10 ml verdünnt. Nach 2 h Ultrazentrifugation bei 183000 x g wurde der Überstand auf einer FPLC Anlage (Pharmacia) mit einer HR5/5 MonoQ-Anionenaustauschersäule chromatographiert. Während der ersten chromatographischen Aufreinigung wurden ICL bzw. MSY mit einem 0,1-0,4 M NaCl-Gradienten in 50 mM MES/NaOH pH 6 eluiert. Für die zweite Chromatographie wurde der Puffer der partiell gereinigten ICL bzw. MSY mittels Ultrafiltration von 50 mM MES/NaOH pH 6 zu 50 mM Tris/HCl pH 8 gewechselt. Während der zweiten chromatographischen Aufreinigung wurden ICL und MSY mit einem 0,2-0,5 M NaCl-Gradienten in 50 mM Tris/HCl pH 8 eluiert. In beiden chromatographischen Trennungen wurde die ICL jeweils vor der MSY von der Säule eluiert.

5.3. Kinetische Analysen

Zur Bestimmung von Michaelis-Konstanten wurde die doppelt-reziproke Darstellung von Substrat-Konzentration und Aktivität nach Lineweaver-Burk gewählt. Für Effektormessungen wurde bei vier unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen eine apparente Km-Bestimmung nach Lineweaver-Burk durchgeführt. Aus dem Verlauf der Geraden in Anwesenheit eines Effektors zu der in Abwesenheit eines Hemmstoffs konnte die Art der Hemmung angegeben werden. Die Inhibitor-Konstanten wurden durch Auftrag der im Lineweaver-Burk-Diagramm ermittelten Steigungen gegen die Inhibitorkonzentration gemäß der Nomenklatur nach Segel (1975) erhalten.

5.4. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Bestimmung des Molekulargewichts von ICL und MSY sowie zur Bestimmung des Anteils dieser Enzyme am Gesamtzellprotein wurde eine Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt (Laemmli, 1970). Es wurde dazu eine Sturdier SE 400 Apparatur (Hoefer, San Francisco, USA) mit 14cm x 16cm x 1,5 mm Gelen verwendet. Das Trenngel besaß ein Volumen von ca. 27 ml und bestand aus 11,3 ml 30%igem Acrylamid/Bisacrylamid (36,5:1), 5,4 ml Glycerin (45%), 6,75 ml Tris/HCl (1,5 M; pH 8,8), 3,1 ml A. dest. 0,27 ml SDS (10%), 0,13 ml Ammoniumpersulfat (10%) und 13 µl TEMED. Das Sammelgel hatte ein Volumen von ca. 8 ml und enthielt 1,04 ml 30%iges Acrylamid/Bisacrylamid (36,5:1), 2 ml Tris/HCl (0,5 M; pH 6,8), 4,88 ml A. dest., 80µl SDS (10%), 40µl Ammoniumpersulfat (10%) und 8µl TEMED. Die Gele wurden bei 8 mA für 14 h laufengelassen. Als Molekulargewichtstandard diente Standardlösung 1 (Boehringer Mannheim). Zur Bandenfixierung wurden die Gele für 30 min in 10% Methanol inkubiert. Die Anfärbung der Proteinbanden erfolgte über einen Zeitraum von 20 min mittels einer Serva-Blue Färbelösung (0,05% (w/v) Serva-Blue, 10% Methanol). Zum Entfernen unspezifischer Färbung wurde das Gel für 2 h in 10%iger Essigsäure inkubiert.

5.5. N-Terminus-Sequenzierung

Um den N-Terminus von gereinigter ICL bzw. MSY zu bestimmen, wurden diese durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Elektroblotting in einer Biometra Fast Blot 33 Aparatur auf eine Polyvinyliden-Difluorid-Membran (Millipore) übertragen. Die Proteine wurden anschließend in einer Applied Biosystems 477A Sequenzier-Apparatur mit on-line HPLC (Modell 120) sequenziert.

5.6. Gelfiltration zur nativen Größenbestimmung

Die native Größe von ICL und MSY wurde mittels FPLC auf einer Superdex 200 Säule (Pharmacia) mit 100 mM Tris/HCl pH 7,6, 100 mM NaCl und 5 mM $MgCl_2$ durchgeführt. Zur Größenbestimmung der ICL enthielt der Puffer zusätzlich 5 mM DTT und 1 mM EDTA. Als Größenstandard dienten Katalase (232000), Aldolase (158000), Rinderserumalbumin (67000) und Ovalbumin (43000).

6. Isolierung und Reinigung von DNA

Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Um geringe Mengen Plasmid-DNA aus *E. coli* zu isolieren, wurde eine modifizierte Methode der alkalischen Lyse nach Birnboim (1983) verwendet. Es wurden dazu 1,5 ml einer Übernachtkultur durch Zentrifugation sedimentiert und die Zellen anschließend in 100 µl Lösung A (25 mM Tris/HCl pH 8,0, 50 mM Glucose, 10 mM EDTA) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lsg. B (1% SDS, 0,2 M NaOH) erfolgte die Lyse der Zellen bei gleichzeitiger Denaturierung von Proteinen und chromosomaler DNA. Durch Gabe von 150 µl Lsg. C (5 M K-Acetat, 1,8 M Essigsäure) ging bei neutralem pH die Plasmid-DNA wieder in ihre native, superhelikale Form über. Mit Hilfe einer Phenol/Chloroform-Behandlung wurde die Plasmid-DNA von verbliebenem Protein befreit. Nach anschließender Ethanolfällung wurden Ausbeuten von 5 bis 20 µg DNA erhalten.

Um große Mengen an sauberem Plasmid zu erhalten (z. B. zum Sequenzieren) wurde eine alkalische Lyse, modifiziert nach Sambrook et *al.* (1989) durchgeführt. Bei dieser Methode wurde Plasmid-DNA aus 70 ml *E. coli*-Kultur mit entsprechend erhöhten Volumina von Lsg. A, B und C isoliert. Durch Zugabe von 12 ml Isopropanol wurde die Plasmid-DNA gefällt und anschließend der Ansatz für 10 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml A. dest. gelöst und durch Zugabe von 2 ml $LiCl_2$ Lösung (5 M $LiCl_2$; 50 mM Tris/HCl pH 7,5) selektiv RNA ausgefällt. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte eine 20-minütige Zentrifugation bei 4000 rpm und 4°C. Der Überstand wurde einer Ethanolpräzipitation unterzogen, das Pellet in 400 µl TE gelöst und der Ansatz für 30 min mit 5 µl RNase H (10 mg/ml) inkubiert. Nach zweimaliger Phenolisierung des Ansatzes, und zweimaliger Chloroform-Behandlung wurde die wässrige Phase mit 1/10 Volumen Na-Acetat (3 M pH 5,2) versetzt und die Plasmid-DNA durch Ethanol gefällt. Die DNA wurde unter Vakuum getrocknet und in 100 µl TE-Puffer aufgenommen. Die Ausbeute lag bei ca. 200 µg Plasmid-DNA.

Präparation von Plasmid-DNA aus *C. glutamicum* (Reinscheid et *al.*, 1994)

Coryneforme Bakterien sind aufgrund der Dicke und Zusammensetzung ihrer Zellwand durch SDS und NaOH allein nicht lysierbar. Aus diesem Grunde muß durch Gabe von Lysozym zunächst die Zellwand abgebaut werden, bevor Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse gewonnen werden kann. Die Zellen wurden daher bei der Ernte mit TES Puffer (50 mM Tris/HCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, pH 8,0) gewaschen, in 200 µl Lsg. A mit 20 mg/ml Lysozym aufgenommen und für 2 h bei 37°C inkubiert. Die weiteren Schritte zur Isolierung der Plasmid-DNA erfolgten wie für *E. coli* beschrieben.

Isolierung chromosomaler DNA aus *C. glutamicum*

Chromosomale DNA aus *C. glutamicum* wurde mittels einer modifizierten Methode nach Meade et *al.* (1982) isoliert. Aus einer Übernachtkultur wurden 1,5 ml durch Zentrifugation sedimentiert. Das Pellet wurde in 600 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,6, 1 mM EDTA) resuspendiert und erneut durch Zentrifugation sedimentiert. Nach Aufnahme des Pellets in 500 µl Lysozym-Lösung (15 mg/ml in TE-Puffer) wurde die Suspension für 3 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl SDS (10%) zugesetzt, zur Lyse der Zellen der Ansatz 10 min auf 65°C erhitzt und einer viermaligen Phenol/Chloroform Extraktion unterzogen. Nach Ethanolfällung wurde die DNA bei 4°C gelagert.

7. Transformationstechniken

7.1. Transformation von Plasmid-DNA nach *E. coli*

Zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen wurde eine Modifikation der von Sambrook et *al.* (1989) beschriebenen $CaCl_2$ Methode verwendet. Eine 50 ml *E. coli* Kultur in 2 x TY Medium wurde bei einer optischen Dichte von 0,5 durch Zentrifugation sedimentiert, in 15 ml 70 mM $CaCl_2$, 20 mM $MgSO_4$ aufgenommen und für 30 min bei 0°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut durch Zentrifugation sedimentiert und in 4 ml 70 mM $CaCl_2$, 20 mM $MgSO_4$ resuspendiert. Aliquots wurden mit 20% Glycerin versetzt und bei -70°C gelagert.

Für die Transformation wurden je 100 µl kompetente Zellen mit der zu transformierenden DNA versetzt. Nach 30 minütiger Inkubation in Eiswasser erfolgte bei 42°C für 90 sec ein Hitzeschock, innerhalb dessen die Plasmid-DNA von den Zellen aufgenommen wurde. Die Regeneration der Zellen und die Ausprägung der Antibiotika-Resistenz fand in je 500 µl 2 x TY Vollmedium statt. Zur Selektion wurden die Zellen auf LB-Agarplatten mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert.

7.2. Elektroporation von *C. glutamicum*

Die Herstellung kompetenter *C. glutamicum*-Zellen zur Elektroporation erfolgte nach einer modifizierten Methode nach Haynes und Britz (1989). Es wurde dazu der entsprechende Stamm in 500 ml LB, 4 mg/ml Isonicotinsäurehydrazid, 2,5% Glycerin und 0,1% Tween 80 bis zu einer opischen Dichte von 0,5 gezüchtet, anschließend 20 min auf Eis inkubiert und durch Zentrifugation bei 4°C sedimentiert. Die Zellen wurden 1 x mit 250 ml, 2 x mit 100 ml und 1 x mit 50 ml 10%igem Glycerin gewaschen, in 2 ml 10%igem Glycerin aufgenommen, zu je 200 µl auf 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt und bei -70°C gelagert.

Die Elektroporation von *C. glutamicum* erfolgte nach einem Protokoll von Liebl et *al.*, (1989). Die zur Elektroporation verwendeten Kammern wurden zunächst unter UV-Licht sterilisiert und anschließend bei 4°C vorgekühlt. An der Spannungsquelle zur Elektroporation (Bio-Rad, Gene-Pulser) wurden die folgenden Einstellungen vorgenommen: Widerstand : 200 W; Spannung : 2,5 kV; Kapazität : 25 mF. In eine Elektroporations-kammer wurden 50 µl kompetente *C. glutamicum*-Zellen gegeben und mit der zu transformierenden DNA vermischt. Nach erfolgter Elektroporation wurde der Ansatz mit 0,6 ml BHIS versetzt, die Suspension in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 50 min bei 30°C und 125 rpm geschüttelt. Von jedem der Elektroporationansätze wurden zweimal je 300 µl auf BHIS-Kanamycin-Platten ausplattiert.

7.3. Konjugativer Transfer von Plasmiden aus *E. coli* nach *C. glutamicum*

Die Konjugation zwischen *E. coli* und *C. glutamicum* erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Schäfer et *al.* (1990). Mit 50 µl Übernachtkultur eines rekombinanten *E. coli* S17-1-Donorstammes wurden 5 ml 2 x TY inokuliert. Nachdem die Donorkultur eine optische Dichte von 1 erreicht hatte, wurde sie für 10 min auf Eis inkubiert. Der *C. glutamicum*-Rezipient wurde über Nacht in 70 ml 2 x TY gezüchtet und anschließend zur Inaktivierung des Restriktionssystems für 9 min bei 48,5°C inkubiert. Es wurden 1 ml Donor mit 3 ml Rezipient in einem Greiner-Röhrchen gemischt und durch Zentrifugation sedimentiert. Die Zellen wurden in 150 µl LB-Medium resuspendiert und auf einen Zellulosenitratfilter (25 mm Durchmesser; 0,45 µm Porengröße), der auf einer LB-Platte lag, übertragen. Die Suspension wurde 20 h bei 30°C inkubiert, anschließend der Filter in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Zellen mit 600 µl LB Medium abgeschwemmt. Es wurden jeweils 300 µl auf BHIS-Platten ausplattiert, denen das Antibiotikum Nalidixinsäure zum Abtöten des *E. coli*-Donors und Kanamycin zur Selektion von pSUP301 tragenden *C. glutamicum*-Stämmen zugesetzt worden war.

8. Analyse und Rekombination von DNA

8.1. Restriktion und Modifikation von DNA

Bei analytischen Restriktionen wurden ca. 100 ng DNA in einem Volumen von 10 µl für 60 min geschnitten. Die eingesetzte enzymatische Aktivität betrug 1 U. Für präparative Restriktionen wurden 2 -3 µg DNA in 50 µl mit ca. 20 U enzymatischer Aktivität für 90 min geschnitten. War eine Restriktion mit verschiedenen Enzymen erforderlich, die in unterschiedlichen Puffersystemen ihre optimale Aktivität zeigten, so erfolgte zwischen den verschiedenen Restriktionen eine Fällung der DNA durch Ethanol. Zur Modifikation überhängender 5'-Enden wurden diese mittels Klenow-Polymerase zu glatten Enden aufgefüllt und überhängende 3'-Enden mit dem gleichen Enzym zu glatten Enden abgebaut (Sambrook et *al.*, 1989). Vektor-DNA wurde mit alkalischer Phosphatase behandelt, um die Rezirkularisierung in einer Ligation zu verhindern. Das Einbringen von DNA in linearisierte Vektoren erfolgte mit Hilfe der DNA-Ligase des Bakteriophagen T4.

8.2. Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung der DNA erfolgte jeweils nach der Kettenbabbruchmethode von Sanger et *al.* (1977). Zur nicht-radioaktiven Sequenzierung wurden zunächst Deletionsplasmide konstruiert, die anschließend mit Fluoreszenz-markierten Primern sequenziert wurden. Die radioaktive Sequenzierung erfolgte nach einem als 'Primer Walking' bezeichneten Verfahren (Sambrook et *al.*, 1989). Bei dieser Methode werden anhand der Sequenzinformation des bereits sequenzierten Bereiches neue Primer synthetisiert, um von diesen ausgehend weiterzusequenzieren.

Herstellung von Deletionsplasmiden

Deletionsplasmide wurden mit Hilfe des 'Erase-a-base'-Kits von Promega (Madison, Wisconsin) erzeugt. Die Plasmid-DNA wurde zunächst mit einem 3'-Enden-erzeugenden sowie einem 5'-Enden-erzeugenden Restriktionsenzym geschnitten und anschließend durch Zusatz von Ethanol gefällt. Nach Trocknung der verdauten DNA wurde diese in 50 µl Exo III-Puffer (66 mM Tris/HCl pH 8; 7 mM $MgCl_2$) aufgenommen und mit 1,4 µl Exonuklease III (250 U) versetzt. Exonuklease III baut DNA an ihren 5'-überhängenden Enden ab, wohingegen 3'-überhängende Enden vor dem Abbau geschützt sind. Zum Stop der Exonuklease III-Reaktion wurden in 30 sec Abständen jeweils 2,5 µl Aliquots dem Ansatz entnommen, in 7,5 µl S1 Mix (60 U S1 Nuklease in 40 mM K-Acetat; 0,34 M NaCl; 1,4 mM $ZnSO_4$; 5% Glycerin; pH 4,6) überführt und auf Eis gelagert. Um einzelsträngige DNA abzubauen, wurden die Ansätze für 30 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl S1 Stop-Puffer (0,3 M Tris; 0,05 M EDTA) beendet. Zum Auffüllen überhängender Enden wurden die Ansätze einer Behandlung mit Klenow-Polymerase unterzogen, anschließend ligiert und in den *E. coli*-Stamm DH5 transformiert.

Nicht-Radioaktive Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmid-Deletionskonstrukte erfolgte unter Verwendung des 'AutoRead' Sequenzierungs-Kits von Pharmacia. Zur Denaturierung der DNA wurden in einem Volumen von 10 µl insgesamt 6 µg DNA mit 2 µl Fluoreszenz-Primer (Sequencing oder Reverse Sequencing) und 1 µl NaOH (1 M) vermischt und für 5 min bei 70°C inkubiert. Zur Anlagerung des Primers wurden dem Ansatz 1 µl HCl (1 M), 2 µl Anlagerungspuffer und 3 µl Dimethylsulfoxid zugesetzt und dieser für 15 min bei 37°C

inkubiert. Zum Start der Kettenabbruchreaktion wurden 1 µl Polymerisationspuffer und 2 µl T7 DNA-Polymerase (3 U) zugesetzt, je 4,5 µl dieses Ansatzes mit 2,5 µl Desoxy/Didesoxy-Mix vermischt und der Ansatz für 5 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 µl Stop-Lösung beendet, die Proben bei 80°C denaturiert und bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mit einer A.L.F. (automated laser fluorescent) DNA-Sequenzier-apparatur (Pharmacia). Zur Herstellung des Sequenzgels wurden 16 ml 30%iges Acryamid/Bisacrylamid (19:1), 33,6 g Harnstoff (Ultra Pure) und 0,5 g Ionenaustauscher (Serdolit, Serva) gemischt und mit A. dest. auf 70 ml aufgefüllt. Nach Lösen des Harnstoffs wurde die Lösung durch einen Filter mit 0,45 µm Durchmesser filtriert, anschließend 4,8 ml 10 x TBE (1 M Tris, 0,83 M Borsäure, 10 mM EDTA) zugesetzt und der Ansatz mit A. dest. auf 80 ml aufgefüllt. Die Polymerisation des Gels erfolgte nach Zugabe von 70 µl TEMED und 280 µl 10%igem Ammoniumpersulfat.

Radioaktive Sequenzierung

Zur radioaktiven Sequenzierung mittels 'Primer Walkings' wurden die unten aufgelisteten Primer verwendet. Die Sequenzierung wurde mit einem Sequenase Sequenzierungs-Kit (USB) und α-[^{35}S]-dATP (Amersham) durchgeführt. Zur Denaturierung der DNA wurden 2 µg DNA mit 40 µl Denaturierungspuffer (0,2 M NaOH) versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 4 µl Neutralisierungspuffer (2,5 M NH_4-Acetat pH 4,6) und 100 µl absoluter Ethanol (-20°C) zugesetzt und der Ansatz bei -70°C für 10 min inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C wurde das Pellet mit 1 ml 70%igem Ethanol (-20°C) gewaschen, erneut für 10 min bei 13000 rpm und 4°C abzentrifugiert und unter Vakuum getrocknet. Zur Anlagerung des Primers wurde die denaturierte DNA mit 1 µl Primer und 2 µl Reaktionspuffer (0,2 M Tris/HCl pH 7,5; 0,1 M $MgCl_2$; 0,25 M NaCl) versetzt, mit A. dest. auf 10 µl aufgefüllt und für 20 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde gestartet durch Zugabe von 1 µl DTT (0,1 M), 2 µl Markierungs-Mix (je 7,5 µM dGTP, dCTP, dTTP), 0,5 µl α-[^{35}S]-dATP (5 µCi) und 2 µl Sequenase. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT wurden zur Kettenabbruchreaktion je 3,5 µl dem Ansatz entnommen und in vier Gefäße mit unterschiedlichen Terminations-Mixen (je 80 µM dNTP, 8 µM ddNTP, 50 mM NaCl) überführt. Nach 5 min Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 4 µl Stop-Lösung (95% Formamid; 20 mM EDTA;

0,05 % Bromphenolblau; 0,05% Xylen Cyanol FF) beendet. Die Proben wurden für 3 min bei 95°C denaturiert und bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Zur gelelektrophoretischen Auftrennung der Sequenzreaktion wurde ein Polyacrylamid Sequenzgel nach den Angaben von Sambrook et al. (1989) hergestellt. In einem Volumen von 100 ml enthielt dies 42,04 g Harnstoff, 20 ml 30%iges Acrylamid/Bisacrylamid (19:1), 10 ml 10 x TBE (108 g Tris, 55 g Borsäure, 7,4 g EDTA), 600 µl 10%iges Ammoniumpersulfat und 100 µl TEMED.

Primer zur Sequenzierung von *aceA*:
(die Primer liegen in **Abbildung 5** in dem Bereich von bp 961 bis bp 2059)

ACE1: GTCCTACGCACCATACGCAGA
ACE2: GGAGCCACTATCGACTACGCG
ACE3: ACGAGAGCTGCAGACAG
ACE4: ACTACGGCATGTTCGAC
ACE5: CACATCTCACACGATAGG
ACE6: CTATCGTGTGAGATGTG
ACE7: AGCGCACCAATGAGATC

Primer zur Sequenzierung von *orfZ*:
(die Primer liegen in **Abbildung 7** in dem Bereich von bp 371 bis 1350

ORF1: TGATCGGTGTAGTAGCG
ORF2: GTGATGTCGGCGATATAG
ORF3: AGTGCTGCTGCCTGTGAT
ORF4: AATCCGCAGGCTCTCGCA
ORF5: TCCAACATGAGCTCATC
ORF6: AGTACGTTGTGCACGATA

Herstellung von Primern zur Sequenzierung

Die Synthese von Oligonukleotiden zur DNA-Sequenzierung wurde mit einem Gene Assembler Plus (Pharmacia) durchgeführt (Caruthers et *al.*, 1985). Nach Beendigung der DNA-Synthese wurden die Oligonukleotide durch 16-stündige Inkubation in 1 ml 30%iger Ammoniaklösung bei 50°C von der Säule eluiert. Zur Reinigung der Oligonukleotide wurde eine NAP-10 Säule (Pharmacia) mit 15 ml A. dest. äquilibriert und die Oligonukleotidlösung aufgetragen. Die Oligonukleotide wurden mit 1,5 ml A. dest. von der Säule eluiert und die Menge der gereinigten DNA photometrisch bei 260 nm bestimmt. Eine Extinktion bei 260 nm von 1 und einer Küvettenschichtdicke von 1 cm entspricht einer einzelsträngigen DNA-Menge von 33 µg/ml (Sambrook et *al.*, 1989).

8.3. Southern-Blot-Analyse

Zur Analyse von DNA durch Southern-Hybridisierung wurde die zu untersuchende DNA zunächst mit den gewünschten Restriktionsenzymen geschnitten und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die im Gel befindlichen DNA-Fragmente wurden nach einer modifizierten Methode von Southern (1975) zunächst denaturiert und anschließend auf einen Filter übertragen. Mit Hilfe eines 'DIG DNA Labeling and Detection Kits' von Boehringer Mannheim wurden digoxigenin-markierte DNA-Sonden hergestellt und gegen die DNA-Fragmente auf dem Filter hybridisiert. Durch ein enzymatisches Verfahren konnten die DNA-DNA-Hybridisierungsbanden auf dem Filter sichtbar gemacht werden.

Auftrennung der DNA und Übertragung auf einen Filter (Southern, 1975)

Nach Restriktionsverdau der DNA wurde diese auf einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt. Der Laufpuffer der Elektrophorese bestand aus 40 mM Tris/HCl pH 8; 10 mM Na-Acetat; 1 mM EDTA. Das Agarosegel wurde in Laufpuffer angesetzt. Der 10 x Ladepuffer bestand aus 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol und 30% Glycerin. Durch vakuumunterstützte Diffusion nach einer Methode von Gross et *al.*, (1988) wurde die im Gel enthaltene DNA auf einen Nylonfilter (Nytran N13, Schleicher und Schüll) übertragen. Dazu wurde das Gel für jeweils 10 min mit den folgenden Lösungen überschichtet: Depurinierungslösung (0,25 M NaOH), Denaturierungslösung I (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl) und Neutralisierungslösung I (1,0 M Tris/HCl pH 5,0; 2,0 M NaCl). Nach Überschichten des Gels mit Transfer-Lösung (0,3 M Na-Citrat pH 7,0; 3,0 M NaCl) wurde die DNA innerhalb von 60 min auf den Filter übertragen. Der Nylonfilter wurde 5 min bei RT getrocknet und die DNA durch 3-minütige UV-Bestrahlung bei 366 nm auf dem Filter fixiert.

Hybridisierung der DNA gegen eine spezifische DNA-Sonde (Southern, 1975)

Die Hybridisierung der DNA gegen spezifische DNA-Sonden wurde nach einem im 'DIG DNA Labeling and Detection Kit' enthaltenen Protokoll durchgeführt. Der Filter wurde zunächst mit 70 ml Prähybridisierungs-Lösung (0,1% Na-Laurylsarcosin, 0,02% SDS, 1% Blocking Reagenz, 5 x SSC: 0,75 M NaCl, 75 mM Na-Citrat pH 7,0) bei 68°C für 8 h

inkubiert und anschließend mit Hybridisierungslösung (10 ml Prähybridisierungslösung plus 500 ng frisch denaturierte, digoxigenierte Sonde) bedeckt. Die Hybridisierung erfolgte für 10 h bei 68°C.

Nachweis der Hybridisierungsbanden

Zur Detektion der DNA-DNA-Hybridisierungsbanden wurde der 'DIG DNA Labeling and Detection Kit' von Boehringer Mannheim verwendet. Zum Entfernen von nicht gebundener Sonde wurde der Filter zweimal für 8 min bei RT in je 100 ml 2 x SSC, 0,1 % SDS und zweimal für 20 min bei 68°C in je 100 ml 0,1 x SSC, 0,1% SDS inkubiert. Die folgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Der Filter wurde in Puffer 1 (150 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl) gewaschen und für 30 min 20 ml Puffer 1 plus 0,5% Blocking Reagenz inkubiert. Anschließend wurde erneut mit Puffer 1 gewaschen und nach Zugabe von 25 ml Puffer 1, dem 5 µl Antikörper-Konjugat zugesetzt worden war, der Ansatz für 30 min inkubiert. Das nicht gebundene Antikörper-Konjugat wurde durch zweimalige, 15 minütige Inkubation des Filters in 100 ml Puffer 1 entfernt. Der Filter wurde mit 20 ml Puffer 2 (100 mM Tris/HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM $MgCl_2$) für 2 min äquilibriert und anschließend in 10 ml frisch angesetzter Färbelösung (45 µl NBT Lösung, 35 µl X-Phosphat Lösung in Puffer 2) im Dunkeln inkubiert, bis die zu detektierenden Banden eine ausreichende Intensität aufwiesen. Die Reaktion wurde beendet, indem der Filter für 5 min mit 50 ml TE pH 8,0 gewaschen wurde. Die Membran wurde in nassem Zustand fotografiert.

Herstellung einer digoxigenin-markierten DNA-Probe:

Zur Herstellung der digoxigenierten *aceA*-Sonde wurde ein *aceA*-tragendes 1,5 kb *Bgl*II-*Bfr*I-Fragment und zur Herstellung der *aceB*-Sonde ein *aceB*-tragendes 0,8 kb *Sma*I-*Kpn*I-Fragment aus dem Plasmid pACB-35 isoliert. Durch *Bam*H1-Verdau des Plasmids pACB-17 wurde aus diesem eine *orfZ*-tragende 0,9 kb-Bande isoliert. Die Markierung der DNA-Fragmente erfolgte mit dem von Boehringer vertriebenen 'DIG DNA Labeling and Detection Kit'.

Je 1 µg des zu markierenden Fragmentes wurde 10 min bei 95°C in einem Heizblock zur Denaturierung der DNA inkubiert. Anschließend wurden 2 µl Hexanukleotid-Gemisch sowie 2 µl dNTP-Markierungs-Gemisch zugegeben, der Ansatz auf 19 µl mit A. dest. aufgefüllt und die nicht-radioaktive Markierung durch Zusatz von 1 µl Klenow-Polymerase (2 U)

gestartet. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch Gabe von 2 µl EDTA (0,2 M; pH 8,0) beendet. Zur Fällung der DNA wurden 2 µl LiCl (5 M) und 75 µl 100%iger Ethanol (-20°C) zugesetzt, der Ansatz gemischt und über Nacht bei -20°C inkubiert. Nach 15 min Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C wurde das Präzipitat mit 100 µl 70%igem Ethanol (-20°C) gewaschen. Das Pellet wurde 5 min unter Vakuum getrocknet und anschließend in 40 µl 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,6 aufgenommen.

9. Präparation und Analyse von RNA

9.1. Isolierung von RNA aus *C. glutamicum* (Schwinde et *al.*, 1993)

Vor Verwendung der zur RNA-Isolierung benötigten Gefäße und Lösungen wurden diese zur Inaktivierung von RNasen zweimal autoklaviert. Zur Isolierung von RNA aus *C. glutamicum* wurden die Zellen bei 30°C in 2 x TY-Vollmedium bis zu einer optischen Dichte von maximal 4 wachsengelassen, 10 min in Eiswasser inkubiert und anschließend 5 min bei 4000 rpm und 4°C sedimentiert. Die Bakterien wurden in 10 ml eiskaltem Waschpuffer (50 mM Tris/HCl pH 6,6; 50 mM NaCl) resuspendiert und erneut für 5 min bei 4000 rpm und 4°C sedimentiert. Nach Resuspension in 5 ml 60°C heißem Aufschlußpuffer (10 mM Na-Acetat pH 5,0; 1% SDS) wurden 5 ml 60°C heißes, wassergesättigtes, saures Phenol zugegeben. Der Ansatz wurde für 10 min unter gelegentlichem Schütteln bei 60°C inkubiert, anschließend 10 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Falcon-Gefäß überführt. Die Phenolextraktion wurde insgesamt dreimal wiederholt. Zur Fällung der RNA wurde nach der letzten Phenol-Behandlung der wässrige Überstand mit 0,1 Volumen Na-Acetatpuffer (3,0 M pH 5,2; eisgekühlt) sowie 2,5 Volumen absolutem Ethanol (-20°C) versetzt und für 2 h bei -20°C inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 5000 rpm wurde das Präzipitat mit 5 ml 70%igem Ethanol (-20°C) gewaschen, erneut für 10 min bei 4°C mit 5000 rpm zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes 5 min unter Vakuum getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 100 µl A. dest., dem 2 µl RNasin (80 U) zugesetzt worden waren, resuspendiert.

9.2. Northern-Blot-Analyse

Um RNA durch Northern-Hybridisierung zu analysieren, wurde diese zunächst unter denaturierenden Bedingungen nach einer Methode von Alwine et *al.* (1977) auf einem Agarosegel aufgetrennt und anschließend auf einen Filter übertragen. Mit Hilfe eines 'DIG RNA Labeling Kits' von Boehringer Mannheim wurden digoxigenin-markierte RNA-Sonden hergestellt und gegen die auf dem Filter befindliche RNA hybridisiert. Durch ein enzymatisches Verfahren, wurden die RNA-RNA-Hybridisierungsbanden in einer Farbreaktion sichtbar gemacht.

Auftrennung der RNA und Übertragung auf einen Filter

Die RNA wurde in einem Formaldehyd-enthaltenden 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt, das nach einem Protokoll von Alwine et *al.* (1977) hergestellt worden war. Es wurden dazu 20 ml 5 x RNA-Puffer (0,2 M MOPS; 50 mM Na-Acetat; 10 mM EDTA) mit 63 ml A. dest. und 0,8 g Agarose gemischt, aufgekocht und nach Abkühlen auf 50°C der Lösung 17 ml deionisiertes Formaldehyd zugesetzt. Als Laufpuffer diente 1 x RNA-Puffer. Der RNA-Ladepuffer setzte sich aus 75µl Formamid, 30 µl Formaldehyd, 30 µl 5 x RNA-Puffer, 15 µl 10 x Ladepuffer (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 30% Glycerin) und 1 µl Ethidumbromid (10 mg/ml) zusammen. Die gelelektrophoretisch aufgetrennte RNA wurde vakuumunterstützt nach einer Methode von Gross et *al.* (1988) auf eine Nylonmembran übertragen. Dazu wurde das Gel für jeweils 10 min mit A. dest., Denaturierungslösung II (50 mM NaOH; 10 mM NaCl) und Neutralisierungslösung II (100 mM Tris/HCl pH 7,4) bedeckt. Anschließend wurde das Gel mit Transfer-Lösung (0,3 M Na-Citrat pH 7,0; 3,0 M NaCl) überschichtet und innerhalb von 60 min die RNA auf den Filter übertragen. Die Nylonmembran wurde zwischen Whatman-Papier getrocknet, die transferierte RNA für 3 min mit UV (366 nm) fixiert und der Filter für 2 h bei 80°C inkubiert.

Hybridisierung der RNA gegen eine spezifische RNA-Sonde (Alwine et *al.*, 1977)
Zur Hybridisierung wurde die Membran für 8 h bei 46°C in 80 ml Prähybridisierungslösung II (1 x SSC; 50% (v/v) Formamid; 0,1% (w/v) Natriumlaurylsarcosin; 0,02% (w/v) SDS; 5% Blocking-Reagenz) inkubiert. Anschließend wurde die Prähybridisierungslösung gegen 7 ml Hybridisierungslösung (Prähybridisierungslösung mit frisch denaturierter RNA Sonde) ausgetauscht und der Ansatz über Nacht bei 46°C inkubiert.

Nachweis der Hybridisierungsbanden
Die Detektion der RNA-Banden erfolgte in der bereits beim Southern-Blot beschriebenen Weise.

Herstellung einer digoxigenin-markierten RNA-Probe
Zur Herstellung einer digoxigenin-markierten *aceA*-Sonde wurde ein *Bam*H1-*Sma*I Fragment des *aceA*-Gens in den mit *Xho*II-*Nru*I geschnittenen Vektor pGEM3Z (Promega, Heidelberg) ligiert und das resultierende Plasmid mit *Sal*I geschnitten. Um eine digoxigenin-markierte Sonde des *aceB*-Gens herzustellen wurde ein *Eco*RI-*Sal*I Fragment des *aceB*-Gens in den mit *Eco*RI-*Sal*I geschnittenen Vektor pGEM4Z (Promega, Heidelberg) ligiert und das Konstrukt mit *Eco*RI geschnitten. Die Markierung der Fragmente erfolgte mit dem von Boehringer Mannheim vertriebenen 'DIG RNA Labeling and Detection Kit'.

Jeder Markierungs-Ansatz enthielt in einem Volumen von 20 µl: 1 µg linearisierter DNA, 0,5 µl (ca. 20 U) RNase-Inhibitor, 6 µl ATP-, CTP-, GTP- Gemisch (1:1:1), 2 µl UTP-, DIG-11-UTP-Gemisch (1:1), 2 µl 10 x Transkriptionspuffer, 3 µl A. dest. und 2 µl SP6- bzw. T7-RNA-Polymerase. Der Ansatz wurde für 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend die DNA durch Zugabe von 2 µl DNase RQ1 (2 U) und 15-minütiger Inkubation bei 37°C entfernt. Die RNA des Ansatzes wurde durch zweimalige Phenolextraktion gereinigt, mit Ethanol präzipitiert, in 40 µl A. dest. aufgenommen und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

III. ERGEBNISSE

1. Untersuchungen zur Aktivität von Isocitrat-Lyase, Malat-Synthase und Isocitrat-Dehydrogenase in *C. glutamicum*

In vielen Organismen wird die Aktivität von Isocitrat-Lyase (ICL), Malat-Synthase (MSY) und Isocitrat-Dehydrogenase (IC-DH) durch die Kohlenstoffquelle (C-Quelle) des Mediums reguliert (Cioni et *al.*, 1981; Reeves et *al.*, 1983; LaPorte und Ikeda, 1991). Durch enzymatische Messungen wurde die Frage untersucht, ob auch in *C. glutamicum* die Aktivität dieser drei Enzyme von der C-Quelle des Mediums abhängig ist. An diese Messungen schlossen sich Untersuchungen zur Abhängikeit der ICL-, MSY- und IC-DH-Aktivität von der Wachstumsphase an.

1.1. Einfluß der Kohlenstoffquelle auf die spezifische Aktivität von Isocitrat-Lyase, Malat-Synthase und Isocitrat-Dehydrogenase in *C. glutamicum*

In Extrakten des *C. glutamicum*-Stammes ATCC 13032 (Wildtyp) wurde die Aktivität von ICL, MSY und IC-DH nach Wachstum auf verschiedenen Medien bestimmt, um den Einfluß der C-Quelle auf die Aktivität der drei Enzyme zu untersuchen. Das Ergebnis dieses Versuches ist in **Tabelle 3** dargestellt. Bei Wachstum von *C. glutamicum* auf Vollmedium sowie auf Minimalmedium (MM) mit Glucose, Pyruvat oder Lactat als C-Quelle zeigte die ICL spezifische Aktivitäten zwischen 0,01 U/mg und 0,12 U/mg und die MSY wies spezifische Aktivitäten zwischen 0,03 U/mg und 0,09 U/mg auf. Ähnlich niedrige Aktivitäten beider Enzmye wurden beobachtet, wenn Zwischenprodukte des Citrat-Zyklus oder Substanzen, die direkt in den Citrat-Zyklus eingeschleust werden können, z. B. Glutamat, als C-Quellen angeboten wurden. Bei Wachstum auf Acetat stieg die Aktivität der ICL auf 2,7 U/mg und die der MSY auf 2,1 U/mg an. Wurde Acetat den oben genannten C-Quellen zugesetzt, so führte dies ebenfalls zu einem starken Anstieg der ICL- und MSY-Aktivitäten auf Werte von circa 1,1 U/mg bzw. 0,9 U/mg. Die IC-DH aus *C. glutamicum* zeigte im Gegensatz zu ICL und MSY annähernd gleiche Aktivität auf allen angebotenen C- Quellen. Diese Ergebnisse zeigen, daß in *C. glutamicum* die Aktivitäten von ICL und MSY, nicht jedoch die der IC-DH, einer Kontrolle durch die C-Quelle des Mediums unterliegen.

Tabelle 3. Spezifische Aktivitäten von Isocitrat-Lyase, Malat-Synthase und Isocitrat-Dehydrogenase in Zellextrakten von *C. glutamicum* nach Wachstum auf Medien mit unterschiedlichen C-Quellen.

Medium	spezifische Aktivität in U/mg		
	Isocitrat-Lyase	Malat-Synthase	Isocitrat-Dehydrogenase
2 x TY (Vollmedium)	0,01	0,03	0,86
Minimalmedium mit je 10 g/l:			
Glucose	0,01	0,04	1,07
Pyruvat	0,12	0,09	1,36
Lactat	0,08	0,07	1,43
Citrat	0,01	0,05	1,10
Succinat	0,01	0,04	1,05
Fumarat	0,02	0,05	1,11
Glutamat	0,01	0,04	1,09
Acetat	2,70	2,12	1,10
10 g/l Acetat plus jeweils 10 g/l:			
2 x TY	1,05	0,84	0,93
Glucose	1,11	0,97	1,05
Pyruvat	0,97	0,73	1,27
Lactat	0,97	0,86	1,35
Citrat	0,75	0,50	1,02
Succinat	1,66	0,92	1,24
Fumarat	1,28	0,91	1,12
Glutamat	1,20	1,33	1,12

1.2. Einfluß der Wachstumsphase auf die Aktivität von Isocitrat-Lyase, Malat-Synthase und Isocitrat-Dehydrogenase in *C. glutamicum*

Um den Einfluß der Wachstumsphase auf die Aktivität von ICL und MSY und IC-DH zu ermitteln, wurde *C. glutamicum* von Vollmedium auf Acetat-MM überführt. Über einen Zeitraum von 23 h wurde die spezifische Aktivität der drei Enzyme in Zellextrakten von *C. glutamicum* bestimmt. Parallel dazu wurde die optische Dichte sowie die Acetat-Konzentration der Kultur gemessen. Das Ergebnis ist in **Abbildung 2** dargestellt.

Die ersten drei Stunden nach Inokulation befand sich die Kultur in der lag-Phase. Die lange Anlaufphase dürfte darauf zurückzuführen sein, daß Acetat in der ungeladenen Form in die Zelle diffundieren kann und auf das Membranpotential entkoppelnd wirkt (Sheu et *al.*, 1972). Für Acetat-Konzentrationen von 200 mM wurde für *Bacillus subtilis* bereits ein Zusammenbruch des Membranpotentials beschrieben (Sheu et *al.*, 1972). Diese Konzentration entspricht ungefähr der in den Versuch eingesetzen Kalium-Acetat-Menge von 20 g/l. Es darf daher spekuliert werden, daß bei Kalium-Acetat-Konzentrationen von 20 g/l *C. glutamicum* zunächst einen großen Teil seines Energiestoffwechsels zur Aufrechterhaltung des Membranpotentials aufwenden muß und nur wenig Kohlenstoff in den Baustoffwechsel schleusen kann. Erst nachdem die Acetat-Konzentration des Mediums unter einen kritischen Schwellenwert gesunken ist, kann der Anteil des in den Baustoffwechsel fließenden Kohlenstoffs gesteigert werden.

Aus der lag-Phase ging die *C. glutamicum*-Kultur in die exponentielle Wachstumsphase über, in welcher sie für ungefähr neun Stunden verblieb. Zwölf Stunden nach Inokulation erfolgte der Übergang in die stationäre Phase. Zum gleichen Zeitpunkt war auch das im Medium befindliche Acetat aufgebraucht. Dies deutet an, daß das Verschwinden des Acetats die Ursache für den Übergang in die stationäre Phase war.

Hinsichtlich der Enzymaktivitäten wurde für die IC-DH aus *C. glutamicum* eine annähernd gleichbleibende Aktivität über den gesamten Wachstumsverlauf beobachtet. Hingegen wiesen sowohl ICL als auch MSY aus *C. glutamicum* zwei Stunden nach Inokulation einen drastischen Anstieg ihrer spezifischen Aktivität auf. Beide Enzyme erreichten nach ungefähr

acht Stunden, d. h. in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase, ihr Aktivitätsmaximum. Nach Übergang der Zellen in die stationäre Phase sanken die spezifischen Aktivitäten von ICL und MSY über einen Zeitraum von circa 15 h auf die Hälfte ihres Maximalwertes ab. Es kann vermutet werden, daß die Ursache für diese Aktivitätsabnahme in einem verstärkten Abbau von ICL und MSY bzw. in einer verminderten Neusynthese beider Enzyme zu suchen ist.

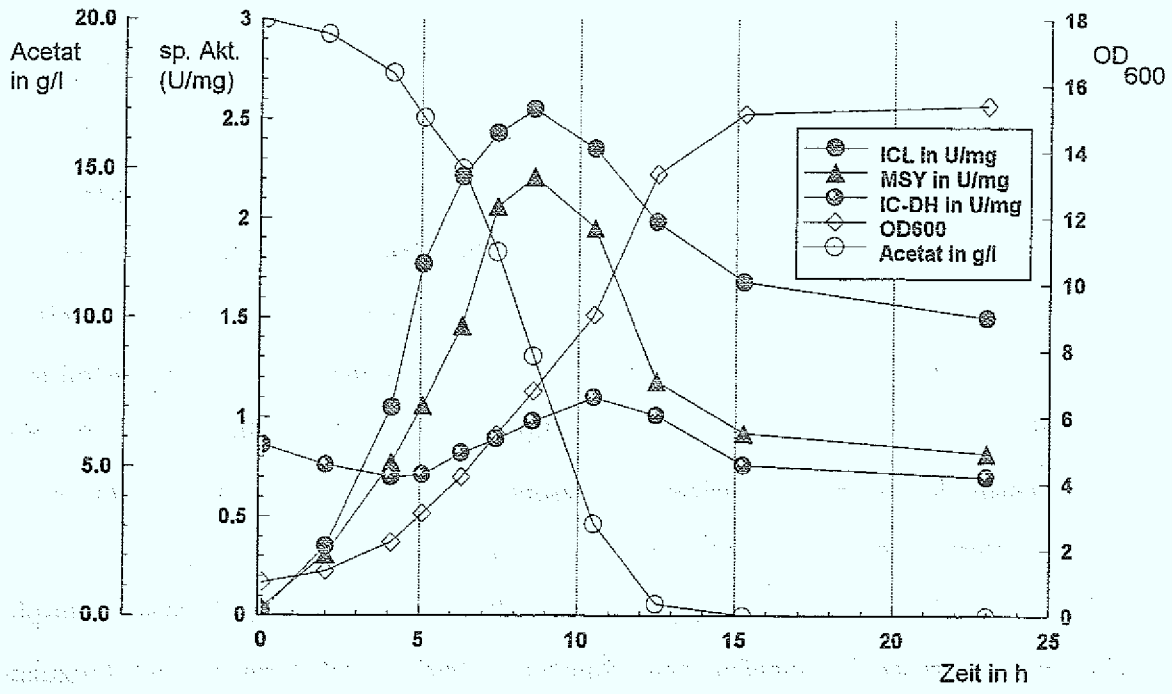


Abbildung 2. Zeitlicher Verlauf der spezifischen Aktivitäten von Isocitrat-Lyase (ICL), Malat-Synthase (MSY) und Isocitrat-Dehydrogenase (IC-DH) bei Wachstum des *C. glutamicum*-Wildtyps in Acetat-MM. Neben den Enzymaktivitäten wurde die optische Dichte der Kultur bei 600 nm (OD_{600}) sowie die Acetatkonzentration des Mediums (g/l) bestimmt. Als Inokulum diente eine in Vollmedium gezüchtete Vorkultur.

2. Isolierung und Analyse des Isocitrat-Lyase-Gens (*aceA*) und des Malat-Synthase-Gens (*aceB*) aus *C. glutamicum*

2.1. Isolierung des *aceB*-Gens aus *C. glutamicum* durch heterologe Komplementation einer *E. coli*-Mutante

Es wurde der Versuch unternommen, sowohl das *aceA*-Gen als auch das *aceB*-Gen aus *C. glutamicum* durch heterologe Komplementation geeigneter *E. coli*-Mutanten zu isolieren. Bei den verwendeten *E. coli*-Mutanten handelte es sich um den ICL-defekten Stamm K8-5m sowie den MSY-defekten Stamm DV21AO5. Beide Mutanten sind aufgrund ihrer Defekte nicht mehr in der Lage, auf Acetat-MM zu wachsen (Vinopal et *al.*, 1974; Vanderwinkel und De Vlieghere, 1968). Um das *aceA*-Gen aus *C. glutamicum* zu isolieren, wurde eine *C. glutamicum*-Cosmid-Genbank (Börmann et *al.*, 1992) in die *E. coli*-Mutante K8-5m transformiert. Von etwa 40000 rekombinanten Klonen zeigte jedoch keiner Wachstum auf Acetat-MM. Dies deutete an, daß entweder das *aceA*-Gen aus *C. glutamicum* in *E. coli* nicht exprimiert wird oder die ICL aus *C. glutamicum* andere biochemische Eigenschaften als das entsprechende *E. coli* Enzym aufweist, die eine Komplementation dieser Mutante nicht erlauben.

Zur Isolierung des *aceB*-Gens aus *C. glutamicum* wurde die Cosmid-Genbank in die *E. coli*-Mutante DV21AO5 transformiert. Dabei wurden etwa 1000 Transformanten erhalten, von denen nach Selektion auf Acetat-MM drei Klone Wachstum zeigten. Die entsprechenden Cosmide dieser Klone wurden als pHCB1, pHCB2 und pHCB3 bezeichnet. Nach Retransformation dieser Cosmide in den Stamm DV21AO5 waren die rekombinanten Stämme erneut in der Lage, auf Acetat-MM zu wachsen. Dies zeigte, daß die Cosmide pHCB1, pHCB2 und pHCB3 dem Stamm DV21AO5 die Fähigkeit zu Wachstum auf Acetat vermittelten. Um zu untersuchen, ob die Cosmide tatsächlich das gewünschte *aceB*-Gen aus *C. glutamicum* trugen, wurde die spezifische MSY-Aktivität in Zellextrakten der in **Tabelle 4** aufgeführten *E. coli*-Stämme bestimmt. Da in *E. coli* die Gene *aceA* und *aceB* ein Operon bilden, bestand die Möglichkeit, zusammen mit dem *aceB*-Gen auch das *aceA*-Gen aus *C. glutamicum* isoliert zu haben. Aus diesem Grunde wurde parallel zur MSY-Aktivität auch die ICL-Aktivität in den jeweiligen *E. coli*-Stämmen bestimmt (**Tabelle 4**). In dem *E. coli*-Kontrollstamm DH5 konnten sowohl nach Wachstum auf Acetat-MM als auch auf

Glucose/Succinat-MM die Aktivitäten von MSY und ICL nachgewiesen werden. Bei Wachstum dieses Stammes auf Acetat war die Aktivität beider Enzyme deutlich gegenüber der bei Wachstum auf Glucose/Succinat erhöht. Da die Mutante DV21AO5 nicht auf Acetat wuchs, konnte in dieser die Aktivität von MSY und ICL nur nach Wachstum auf Glucose/Succinat-MM bestimmt werden. Es zeigte sich, daß *E. coli* DV21AO5 sowie der Stamm DV21AO5, der den Vektor pHC79 ohne Insert trug, keine nachweisbare MSY-Aktivität besaß. Die Stämme DV21AO5(pHCB1), DV21AO5(pHCB2) und DV21AO5(pHCB3) zeigten keine erhöhte ICL-Aktivität im Vergleich zum Ausgangsstamm DV21AO5, wiesen aber MSY-Aktivitäten auf, die deutlich über der des *E. coli*-Wildtyps lagen. Es zeigte sich, daß die MSY-Aktivität der genannten rekombinanten *E. coli*-Stämme nicht von der C-Quelle des Mediums abhängig war. Aus den vorliegenden Ergebnissen konnte der Schluß gezogen werden, daß die isolierten Cosmide das gewünschte *aceB*-Gen aus *C. glutamicum* trugen. Die enzymatischen Daten gaben jedoch keinen Hinweis auf die Existenz eines *aceA*-Gens auf diesen Cosmiden.

Tabelle 4. Spezifische Malat-Synthase- und Isocitrat-Lyase-Aktivitäten in Extrakten der *E. coli*-Stämme DH5, DV21AO5 und der rekombinanten DV21AO5-Stämme nach Wachstum in Minimalmedium mit Acetat bzw. Glucose/Succinat als C-Quellen.

	spezifische Aktivität in U/mg			
	Malat-Synthase	Isocitrat-Lyase	Malat-Synthase	Isocitrat-Lyase
E. coli-Stamm	Acetat als C-Quelle		Glucose/Succinat als C-Quellen*	
DH5 (Kontrolle)	0,25	0,24	0,02	0,02
DV21AO5	n. b.	n. b.	< 0,01	0,08
DV21AO5(pHC79)	n. b.	n. b	< 0,01	0,07
DV21AO5(pHB1)	**0,35**	0,28	**0,30**	0,09
DV21AO5(pHB2)	**0,28**	0,25	**0,32**	0,05
DV21AO5(pHB3)	**0,33**	0,25	**0,26**	0,03
DV21AO5(pACB-17)	**0,24**	0,23	**0,29**	0,06
DV21AO5(pACB-35)	**0,26**	0,27	**0,25**	0,08

* Da der Stamm DV21AO5 keine PEP-Carboxylase besitzt, muß er bei Wachstum auf Glucose mit Succinat supplementiert werden; n. b.: nicht bestimmbar, da kein Wachstum.

2.2. Subklonierung und Restriktionskartierung des *aceB*-Gens und angrenzender DNA-Bereiche aus *C. glutamicum*

Zur näheren Eingrenzung des MSY-komplementierenden DNA-Bereiches wurde das Cosmid pHB1 mit *Sau*3A partiell geschnitten, Fragmente im Größenbereich von 2,0 - 6,0 kb in die *Bam*HI-Schnittstelle des *E. coli*-Plasmids pACYC184 ligiert und in die Mutante DV21AO5 transformiert. Durch Selektion auf Wachstum mit Acetat als einziger C-Quelle wurden zwei Stämme isoliert, die Plasmide mit Inserts von circa 5,5 kb trugen. Die entsprechenden Plasmide wurden als pACB-17 und pACB-35 bezeichnet. Stämme der Mutante DV21AO5, die diese Plasmide trugen, wiesen unabhängig von der C-Quelle des Mediums MSY-Aktivität auf (**Tabelle 4**). Die Inserts der Plasmide pACB-17 und pACB-35 wurden einer Restriktionskartierung unterzogen, durch die gezeigt werden konnte, daß beide Inserts einen großen Bereich gemeinsam besaßen (**Abbildung 3**).

Um die Region einzuengen, die zur Komplementation des MSY Defektes von DV21AO5 führte, wurden unterschiedliche Fragmente aus dem Plasmid pACB-35 in den mit *Sal*I-*Kpn*I geschnittenen *C. glutamicum/E. coli*-Pendelvektor pEK0 ligiert. Die resultierenden Plasmide wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, den MSY-Defekt von *E. coli* DV21AO5 zu komplementieren. Die Ergebnisse dieser Subklonierung sind in **Abbildung 3** dargestellt. Es zeigte sich, daß ein 3,8 kb *Bst*EII-*Asp*700, sowie ein 5,0 kb *Asp*700-Fragment den MSY-Defekt von *E. coli* DV21AO5 komplementieren konnten. Die entsprechenden Plasmide wurden als pEKB0 bzw. pEKB1 bezeichnet und nach *C. glutamicum* transformiert. Dabei wurde festgestellt, daß durch das Plasmid pEKB0 die MSY-Aktivität in *C. glutamicum* nicht erhöht werden konnte. Dies deutete an, daß auf dem 3,8 kb *Bst*EII-*Asp*700-Insert des Plasmids pEKB0 der corynebakterielle Promotor des *aceB*-Gens fehlte. Dagegen führte das Plasmid pEKB1 zu einer Erhöhung der MSY-Aktivität in *C. glutamicum*. Dieses Ergebnis ließ vermuten, daß das *aceB*-Gen aus *C. glutamicum* zusammen mit den zur Expression benötigten Strukturen auf dem 5,0 kb *Asp*700-Fragment vorlag.

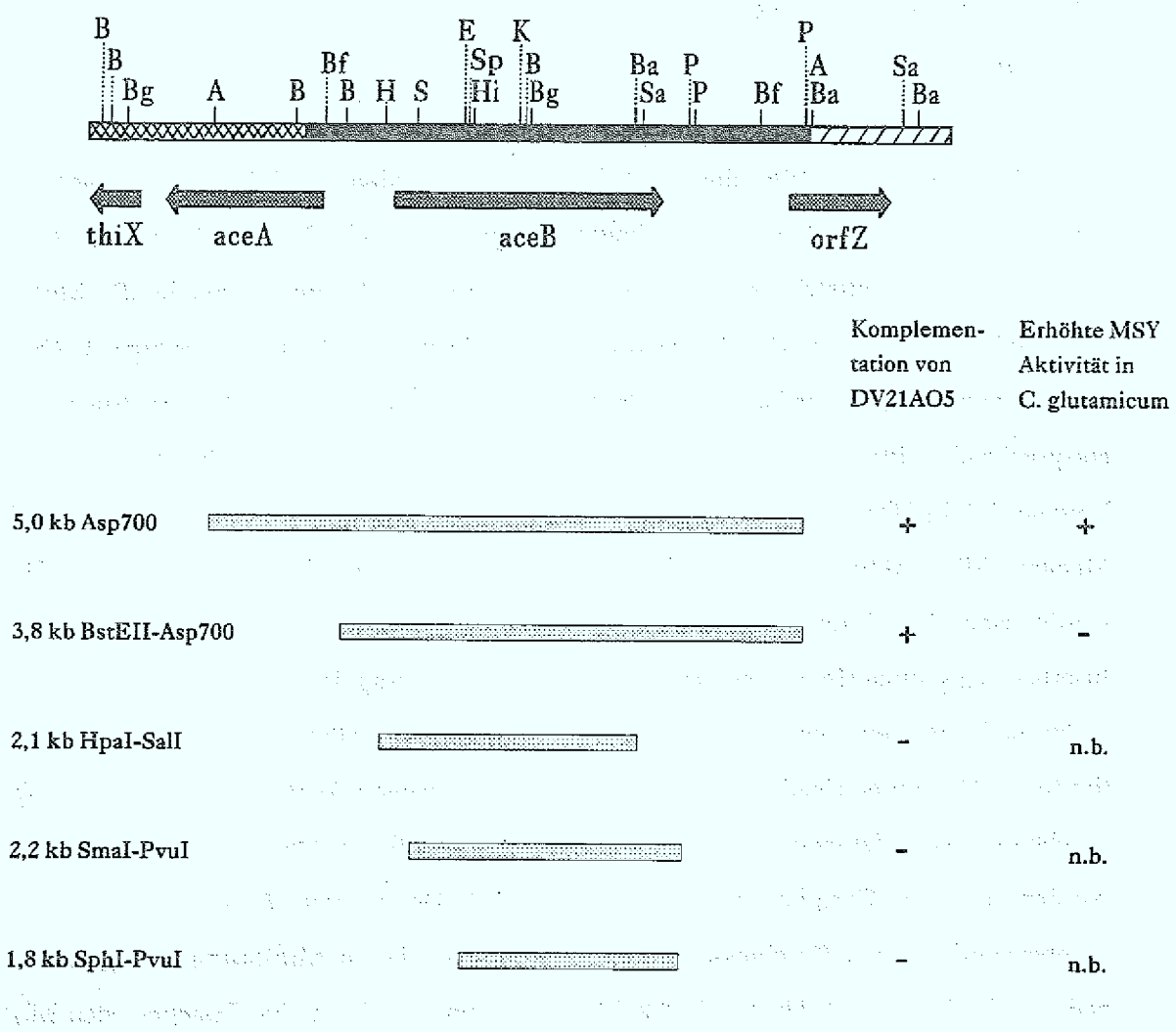


Abbildung 3. Restriktionskarte des Malat-Synthase komplementierenden DNA-Bereiches aus *C. glutamiucum*, offene Leseraster innerhalb dieser Region und Ergebnisse zu Subklonierungexperimenten. Der schwarz ausgefüllte Balken gibt den überlappenden Bereich der Inserts von pACB-17 und pACB-35 an. Durch Schrägstriche wurde der nur in pACB-17, durch überkreuzende Schrägstriche der nur in pACB-35 vorhandene Bereich gekennzeichnet. Unterhalb der Restriktionskarte geben Pfeile die Lage und Orientierung offener Leseraster an. Im unteren Teil der Abbildung zeigen schattierte Balken die Lage und Größe von subklonierten Fragmenten. Die Ergebnisse der Komplementation von DV21AO5 sowie die Überexpression in *C. glutamicum* sind im rechten Teil der Abbildung dargestellt. *aceA*, *aceB*: Gene für Isocitrat-Lyase bzw. Malat-Synthase; *thiX*: Gen aus der Thiamin-Biosynthese; *orfZ*: Offenes Leseraster unbekannter Funktion. Restriktionsenzyme: A: *Asp*700; B: *Bst*EII; Ba: *Bam*HI; Bf: *Bfr*I; Bg: *Bgl*II; E: *Eco*RI; Hi: *Hin*dIII; K: *Kpn*I; P: *Pvu*I; Sa: *Sal*I. Sonstige Abkürzungen: n. b.: nicht bestimmt.

2.3. Southern-Blot-Analyse des *aceB*-Gens und angrenzender DNA-Bereiche aus *C. glutamicum*

Southern-Blot-Experimente wurden durchgeführt, um nachzuweisen, daß die Organisation der Inserts von pACB-17 und pACB-35 mit der chromosomalen Organisation in *C. glutamicum* übereinstimmt. Als Sonden für den linken und den mittleren Teil des kartierten Bereiches wurden ein 1,5 kb *Bgl*II-*Bfr*I-Fragment bzw. ein 0,8 kb *Sma*I-*Kpn*I-Fragment, für den rechten Teil ein 0,9 kb *Bam*H1-Fragment verwendet (siehe **Abbildung 3**). Chromosomale *C. glutamicum*-DNA sowie DNA der Plasmide pAB-17 und pAB-35 wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten und gegen jeweils eine der drei DNA-Sonden hybridisiert. Das dabei erhaltene Ergebnis ist in **Abbildung 4** dargestellt. Chromosomale *C. glutamicum*-DNA sowie die des Plasmids pAB-35 zeigten nach *Bgl*II-Verdau und Hybridisierung gegen die 1,5 kb *Bgl*II-*Bfr*I-Sonde jeweils ein Signal bei 3,3 kb. *Asp*700-geschnittene, chromosomale *C. glutamicum*-DNA und die des Plasmids pAB-35 ergab nach Hybridisierung gegen die 0,8 kb *Sma*I-*Kpn*I-Sonde in beiden Fällen ein Signal bei 5,0 kb. Ein *Sal*I-Verdau von chromosomaler *C. glutamicum*-DNA und der des Plasmids pAB-17 führte mit der 0,9 kb *Bam*H1-Sonde zu je einem Signal bei 2,1 kb. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Organisation der Inserts von pACB-17 und pACB-35 mit der Organisation im Chromosom von *C. glutamicum* übereinstimmt.

2.4. Sequenzierung des Malat-Synthase-komplementierenden Bereiches aus *C. glutamicum*: Identifizierung der Gene *aceA*, *aceB*, *thiX* und *orfZ*

Zur Sequenzierung des 5,0 kb *Asp*700-Fragments wurde dies in zwei sich überlappende Fragmente, ein 2,6 kb *Asp*700-*Kpn*I- und ein 2,8 kb *Hin*dIII-*Asp*700-Fragment unterteilt (siehe **Abbildung 3**). Das erste Fragment wurde in beiden Orientierungen in die *Xba*I-Schnittstelle des *E. coli*-Vektors pUC18 und das zweite Fragment, ebenfalls in beiden Orientierungen, in die *Eco*RI-Schnittstelle von pUC18 ligiert. Von den entsprechenden Plasmiden wurden Deletionskonstrukte hergestellt, die anschließend mit der Strangabbruchmethode nach Sanger et *al.* (1977) sequenziert wurden.

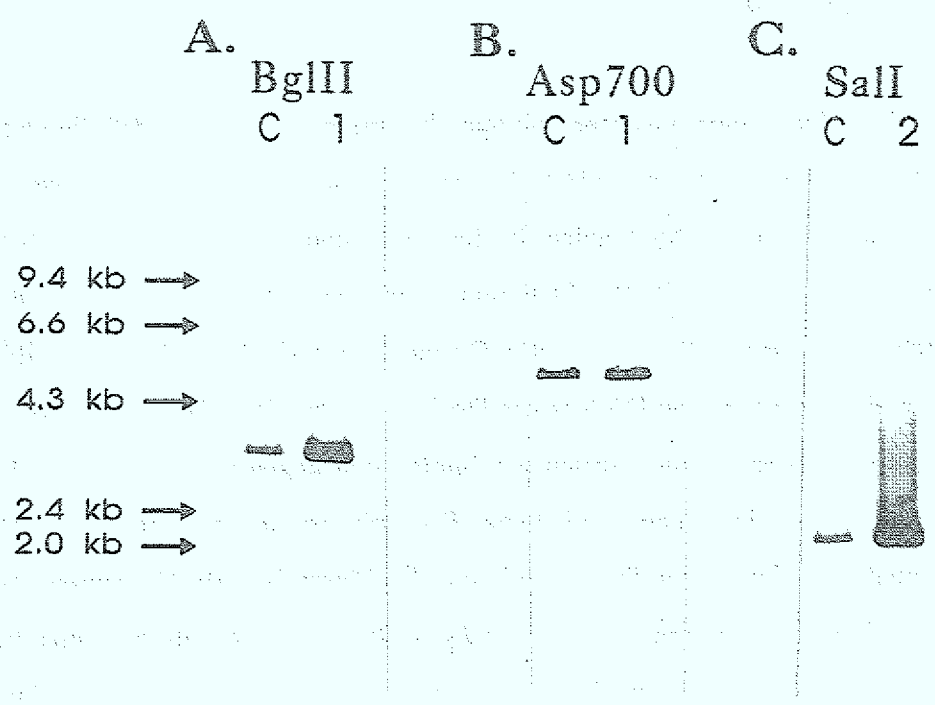


Abbildung 4. Southern-Blot-Hybridisierung chromosomaler *C. glutamicum*-DNA und DNA der Plasmide pACB-17 bzw. pACB-35. Die DNA wurde mit den in der Abbildung angegebenen Restriktionsenzymen geschnitten und (**A.**) gegen ein 1,5 kb *Bgl*II-*Bfr*I-Fragment, (**B.**) gegen ein 0,8 kb *Sma*I-*Kpn*I-Fragment und (**C.**) gegen 0,9 kb *Bam*H1-Fragment aus dem Malat-Synthase-komplementierenden Bereich von *C. glutamicum* hybridisiert. Spur C: chromosomale *C. glutamicum*-DNA; Spur 1: DNA des Plasmids pACB-35; Spur 2: DNA des Plasmids pACB-17.

Durch computerunterstützte Suche nach potentiell kodierenden Regionen wurden auf dem sequenzierten Fragment insgesamt drei offene Leseraster (ORF) identifiziert. Die Lage der drei ORFs sowie deren Ausdehnung ist in **Abbildung 3** schematisch dargestellt. Das erste der drei ORFs, das als *aceB* bezeichnet wurde, lag vollständig auf dem sequenzierten Fragment vor. Die beiden anderen ORFs stellten jeweils nur die 5' Enden potentieller Gene dar. Das erste dieser beiden ORFs, in **Abbildung 3** als *aceA* bezeichnet, lag in entgegengesetzter Orientierung zu *aceB*. Die von *aceA* abgeleitete Aminosäure (AS)-

Sequenz zeigte hohe Ähnlichkeit zu den N-Termini bekannter ICLs (siehe dazu Kapitel 2.5.). Dies deutete an, daß auf dem isolierten DNA-Fragment auch das *aceA*-Gen lokalisiert war. Mittels 'Primer Walkings' wurde der noch fehlende Bereich des potentiellen *aceA*-Gens aus *C. glutamicum* in Plasmid pACB-35 sequenziert. Das zweite der beiden unvollständigen ORFs wurde in **Abbildung 3** als *orfZ* bezeichnet. Die von ihm abgeleitete Aminosäure (AS)-Sequenz zeigte Ähnlichkeit zu membranständigen Transportproteinen. Da aufgrund der Lage dieses ORFs zu *aceA* und *aceB* die Möglichkeit bestand, daß *orfZ* eine Funktion bei der Acetat Aufnahme spielen könnte, wurde mit Hilfe von 'Primer Walking' die noch fehlende Sequenz dieses ORFs in Plasmid pACB-17 bestimmt.

Charakterisierung des *aceA*-Gens und stromabwärts gelegener Bereiche

Die Nukleinsäuresequenz von *aceA* ist zusammen mit der davon abgeleiteten AS-Sequenz in **Abbildung 5** dargestellt. Das *aceA*-Gen beginnt bei bp 137 und endet bei bp 1432. Es kodiert für ein Polypeptid von 432 AS mit einem Molekulargewicht von 47228. Der Codon-Gebrauch in dem *aceA*-Gen stimmt mit dem hoch-exprimierter corynebakterieller Gene überein (Eikmanns, 1992). Vor dem potentiellen Startcodon von *aceA* findet sich eine typische Ribosomenbindungsstelle (AAGGAAG) und 27 bp hinter dem Ende des Strukturgens liegt eine potentielle rho-unabhängige Terminationsstruktur. Für die Bildung der Terminationsschleife wurde eine freie Energie von -18 kcal/mol berechnet.

In einem Abstand von 214 bp hinter dem Ende von *aceA* beginnt in gleicher Orientierung zu *aceA* ein weiteres ORF, welches als *thiX* bezeichnet wurde. Da es bis zum Ende des sequenzierten Bereichs durch kein Stopcodon terminiert wird, stellt es wahrscheinlich nur das 5' Ende eines Gens dar. Das ORF zeigt vor seinem potentiellen Startcodon eine gute Ribosomenbindungsstelle (GAAAGG) und weist einen Codon-Gebrauch von mäßig-exprimierten corynebakteriellen Genen auf (Eikmanns, 1992). Die abgeleitete AS-Sequenz zeigt keinerlei Ähnlichkeit zu Sequenzen in der SWISSPROT-Datenbank.

```
                 .         .         .         .         .         .         .         .         .         .
  1    TGCCCGATGGAGCAATGTGTGAACCACGCCACCACGCAAACCGATGCACATCACGTCGAAACAGTGACAGTGCATTAGCTCATACTTTGT
                 .         .         .         .         .         .         .         .         .         .
 91    GGTCGGCACCGCCCATTGCGAATCAGCACTTAAGGAAGTGACTTTGATGTCAAACGTTGGAAAGCCACGTACCGCACAGGAAATCCAGCA
                                        RBS          M  S  N  V  G  K  P  R  T  A  Q  E  I  Q  Q
                 .         .         .         .         .         .         .         .         .         .
181    GGATTGGGACACCAACCCTCGTTGGAACGGCATCACCCGCGACTACACCGCAGACCAGGTAGCTGATCTGCAGGGTTCCGTCATCGAGGA
        D  W  D  T  N  P  R  W  N  G  I  T  R  D  Y  T  A  D  Q  V  A  D  L  Q  G  S  V  I  E  E
                 .         .         .         .         .         .         .         .         .         .
271    GCACACTCTTGCTCGCCGCGGCTCAGAGATCCTCTGGGACGCAGTCACCCAGGAAGGTGACGGATACATCAACGCGCTTGGCGCACTCAC
        H  T  L  A  R  R  G  S  E  I  L  W  D  A  V  T  Q  E  G  D  G  Y  I  N  A  L  G  A  L  T
```

```
361   CGGTAACCAGGCTGTTCAGCAGGTTCGTGCAGGCCTGAAGGCTGTCTACCTGTCCGGTTGGCAGGTCGCAGGTGACGCCAACCTCTCCGG
       G  N  Q  A  V  Q  Q  V  R  A  G  L  K  A  V  Y  L  S  G  W  Q  V  A  G  D  A  N  L  S  G

451   CCACACCTACCCTGACCAGTCCCTCTACCCAGCGAACTCCGTTCCAAGCGTCGTTCGTCGCATCAACAACGCACTGCTGCGTTCCGATGA
       H  T  Y  P  D  Q  S  L  Y  P  A  N  S  V  P  S  V  V  R  R  I  N  N  A  L  L  R  S  D  E

541   AATCGCACGCACCGAAGGCGACACCTCCGTTGACAACTGGGTTGTCCCAATCGTCGCGGACGGCGAAGCTGGCTTCGGTGGAGCACTCAA
       I  A  R  T  E  G  D  T  S  V  D  N  W  V  V  P  I  V  A  D  G  E  A  G  F  G  G  A  L  N

631   CGTCTACGAACTCCAGAAGGCAATGATCGCAGCTGGCGCTGCAGGCACCCACTGGGAAGACCAGCTCGCTTCTGAAAAGAAGTGTGGCCA
       V  Y  E  L  Q  K  A  M  I  A  A  G  A  A  G  T  H  W  E  D  Q  L  A  S  E  K  K  C  G  H

721   CCTCGGCGGCAAGGTTCTGATCCCAACCCAGCAGCACATCCGCACCCTGAACTCTGCCCGCCTTGCAGCAGACGTTGCAAACACCCCAAC
       L  G  G  K  V  L  I  P  T  Q  Q  H  I  R  T  L  N  S  A  R  L  A  A  D  V  A  N  T  P  T

811   TGTTGTTATCGCACGTACCGACGCTGAGGCAGCAACCCTGATCACCTCTGACGTTGATGAGCGCGACCAACCATTCATCACCGGTGAGCG
       V  V  I  A  R  T  D  A  E  A  A  T  L  I  T  S  D  V  D  E  R  D  Q  P  F  I  T  G  E  R

901   CACCGCAGAAGGCTACTACCACGTCAAGAATGGTCTCGAGCCATGTATCGCACGTGCAAAGTCCTACGCACCATACGCAGATATGATCTG
       T  A  E  G  Y  Y  H  V  K  N  G  L  E  P  C  I  A  R  A  K  S  Y  A  P  Y  A  D  M  I  W

991   GATGGAGACCGGCACCCCTGACCTGGAGCTCGCTAAGAAGTTCGCTGAAGGCGTTCGCTCTGAGTTCCCAGACCAGCTGCTGTCCTACAA
       M  E  T  G  T  P  D  L  E  L  A  K  K  F  A  E  G  V  R  S  E  F  P  D  Q  L  L  S  Y  N

1081  CTGCTCCCCATCCTTCAACTGGTCTGCACACCTCGAGGCAGATGAGATCGCTAAGTTCCAGAAGGAACTCGGCGCAATGGGCTTCAAGTT
       C  S  P  S  F  N  W  S  A  H  L  E  A  D  E  I  A  K  F  Q  K  E  L  G  A  M  G  F  K  F

1171  CCAGTTCATCACCCTCGCAGGCTTCCACTCCCTCAACTACGGCATGTTCGACCTGGCTTACGGATACGCTCGCGAAGGCATGACCTCCTT
       Q  F  I  T  L  A  G  F  H  S  L  N  Y  G  M  F  D  L  A  Y  G  Y  A  R  E  G  M  T  S  F

1261  CGTTGACCTGCAGAACCGTGAGTTCAAGGCAGCTGAAGAGCGTGGCTTCACCGCTGTTAAGCACCAGCGTGAGGTTGGCGCAGGCTACTT
       V  D  L  Q  N  R  E  F  K  A  A  E  E  R  G  F  T  A  V  K  H  Q  R  E  V  G  A  G  Y  F

1351  CGACCAGATCGCAACCACCGTTGACCCGAACTCTTCTACCACCGCTTTGAAGGGTTCCACTGAAGAAGGCCAGTTCCACAACTAGGACCT
       D  Q  I  A  T  T  V  D  P  N  S  S  T  T  A  L  K  G  S  T  E  E  G  Q  F  H  N  -

1441  ACAGGTTCTGACAATTTAAATCTCCCTACATCTGTACAACGGATGTAGGGAGTTTTTCCTTATATATGCCCTCCACAAATCCCCTATCGT
                          ——  ————————>  <————————

1531  GTGAGATGTGTTTCATAGGTGCCCCCAACGTTGCCTGTTGACTGCAAATTTTCCGAAAGAATCCATAAACTACTTCTTTAAGTCGCCAGA

1621  TTAAAGTCGTCAATGAAAGGACATACATGTCTATTTCCCGCACCGTCTTCGGCATCGCAGCCACCGCAGCCCTGTCTGCAGCTCTCGTTG
                     RBS        M  S  I  S  R  T  V  F  G  I  A  A  T  A  A  L  S  A  A  L  V

1711  CGTGTTCTCCACCTCACCAGCAGGATTCCCCAGTCCAGCGCACCAATGAGATCTTGACTACTTCTCAGAACCCAACTTCTGCGAGCAGCA
      A  C  S  P  P  H  Q  Q  D  S  P  V  Q  R  T  N  E  I  L  T  T  S  Q  N  P  T  S  A  S  S

1801  CCTCAACCTCTTCCGCAACGACTACTTCCTCAGCTCCTGTGGAAGAGGACGTAGAGATCGTTGTTTCACCAGCAGCGTTGGTGGACGGTG
      T  S  T  S  S  A  T  T  T  S  S  A  P  V  E  E  D  V  E  I  V  V  S  P  A  A  L  V  D  G

1891  AGCAGGTTACCTTCGAAATCTCTGGACTTGATCCAGAGGGCGGCTACTACGCAGCGATCTGCGATTCCGTAGCGAACCCTGGTAACCCAG
      E  Q  V  T  F  E  I  S  G  L  D  P  E  G  G  Y  Y  A  A  I  C  D  S  V  A  N  P  G  N  P

1981  TTCCTTCTTGCACCGGCGAAATGGCTGATTTCACGTCCCAGGCATGGTTGAGCAACTCCCAGCCCGGCGCGACTGTAGA
      V  P  S  C  T  G  E  M  A  D  F  T  S  Q  A  W  L  S  N  S  Q  P  G  A  T  V
```

Abbildung 5. Nukleinsäure-Sequenz und die davon abgeleitete Aminosäure-Sequenz der Gene *aceA* und *thiX* aus *C. glutamicum*. Mögliche Ribosomenbindungsstellen wurden unterstrichen und mit 'RBS' gekennzeichnet. Der potentielle Terminator der Transkription von *aceA* ist durch antiparallel verlaufende Pfeile dargestellt.

Charakterisierung des *aceB*-Gens aus *C. glutamicum*

In **Abbildung 6** ist der intergenische Bereichs zwischen *aceA* und *aceB*, sowie die von *aceB* abgeleitete Proteinsequenz dargestellt. Das *aceB*-Gen beginnt bei bp 622 und endet bei bp 2838. Es kodiert für ein Polypeptid von 739 AS mit einem Molekulargewicht von 82362. Vor dem potentiellen Startcodon (ATG_{622}) befindet sich eine typische Ribosomenbindungsstelle (AAGGAG) und 108 bp hinter dem Ende von *aceB* ein potentieller, rho-unabhängiger Terminator. Die berechnete freie Energie zur Ausbildung der Haarnadelstruktur liegt bei -41 kcal/mol. Der Codon-Gebrauch im *aceB*-Gen entspricht dem hoch-exprimierter corynebakterieller Gene (Eikmanns, 1992).

```
   1  ACGTGGCTTTCCAACGTTTGACATCAAAGTCACTTCCTTAAGTGCTGATTCGCAATGGGCGGTGCCGACCACAAAGTATGAGCTAATGCA
                     aceA            RBS

  91  CTGTCACTGTTTCGACGTGATGTGCATCGGTTTGCGTGGTGGCGTGGTTCACACATTGCTCCATCGGGCATTGGTGCGTCAATCGGTTTG

 181  GGTTTTTAAGTTTTGTGCGGGGGTGGTCACCCCTGTTGTGAAGTTTGCAAAGTTCTGGCTTCGCAGAAAAAGTGGGCGGGGGAGTTGCTA

 271  GTACGGATGTACTGGGCAAATGCTCTGAAATGGGAAAATGCAGGCACCGCAACGTTCCGTAGGTTTCGAAGGTGTGACCTAGATAAAAGT

 361  CGGGGTTAGGCGGGGGTAATGACTTAGTAAAGTTCGCAAACCCCTTTTGCTGGTGACGGTGATCACTTAGTCTGATCACATCGCCAAACA

 451  CGATAAGGGTTGAAATCGAAAGAAGAGTGGCACCTAGATTCCAGAGGTAGTCAGAGTGCTTTTCTTAAAAGAGTTTTCACAACCGTTAAC

 541  GCGTAGCCAAACAAGAAGGATTCGCATTCTTCTGGTTTAGGCACAGGTCATCTAAAACCCATGCTTTAAAAGGAGCCTTCAATGACTGAA
                                                                         RBS          M  T  E

 631  CAGGAACTGTTGTCTGCTCAGACTGCCGACAACGCTGGAACTGACAGCACCGAACGCGTTGACGCGGGCGGAATGCAGGTTGCAAAAGTT
       Q  E  L  L  S  A  Q  T  A  D  N  A  G  T  D  S  T  E  R  V  D  A  G  G  M  Q  V  A  K  V

 721  CTCTACGACTTTGTAACCGAAGCGGTACTCCCTCGCGTGGGTGTGGATGCGGAAAAGTTCTGGTCCGGATTCGCCGCCATCGCCCGGGAC
       L  Y  D  F  V  T  E  A  V  L  P  R  V  G  V  D  A  E  K  F  W  S  G  F  A  A  I  A  R  D

 811  CTCACCCCACGCAACCGCGAGCTGCTTGCTCGCCGCGATGAACTGCAGATGCTTATCGACGACTACCACCGCAACAACTCCGGCACCATC
       L  T  P  R  N  R  E  L  L  A  R  R  D  E  L  Q  M  L  I  D  D  Y  H  R  N  N  S  G  T  I

 901  GACCAAGAGGCGTACGAGGATTTCCTCAAAGAAATCGGATACTTGGTTGAGGAGCCAGAAGCTGCAGAAATCCGTACCCAAAACGTCGAT
       D  Q  E  A  Y  E  D  F  L  K  E  I  G  Y  L  V  E  E  P  E  A  A  E  I  R  T  Q  N  V  D

 991  ACGGAAATCTCCAGCACCGCAGGACCTCAGCTGGTTGTTCCAATTCTGAACGCACGCTTCGCGCTGAACGCTGCCAATGCTCGCTGGGGT
       T  E  I  S  S  T  A  G  P  Q  L  V  V  P  I  L  N  A  R  F  A  L  N  A  A  N  A  R  W  G

1081  TCCCTCTACGATGCGTTGTACGGCACCAACGCCATCCCAGAAACTGATGGCGCTGAAAAGGGCAAGGAGTACAACCCGGTCCGCGGCCAG
       S  L  Y  D  A  L  Y  G  T  N  A  I  P  E  T  D  G  A  E  K  G  K  E  Y  N  P  V  R  G  Q

1171  AAGGTCATCGAGTGGGGTCGTGAATTCCTCGACAGCGTTGTCCCACTGGACGGTGCTTCGCATGCCGATGTTGAGAAGTACAACATCACC
       K  V  I  E  W  G  R  E  F  L  D  S  V  V  P  L  D  G  A  S  H  A  D  V  E  K  Y  N  I  T

1261  GATGGAAAGCTTGCAGCCCACATTGGAGATAGCGTCTACCGACTGAAAAACCGTGAATCCTACCGTGGCTTCACCGGCAACTTCCTTGAT
       D  G  K  L  A  A  H  I  G  D  S  V  Y  R  L  K  N  R  E  S  Y  R  G  F  T  G  N  F  L  D

1351  CCAGAAGCAATCCTGCTGGAAACCAACGGCCTGCACATCGAGCTGCAGATCGATCCTGTCCACCCAATCGGCAAGGCAGACAAGACTGGT
       P  E  A  I  L  L  E  T  N  G  L  H  I  E  L  Q  I  D  P  V  H  P  I  G  K  A  D  K  T  G
```

```
1441  CTCAAAGACATCGTTTTGGAATCTGCGATCACCACGATCATGGACTTCGAAGACTCCGTTGCAGCTGTTGATGCTGAAGACAAGACCTTA
       L  K  D  I  V  L  E  S  A  I  T  T  I  M  D  F  E  D  S  V  A  A  V  D  A  E  D  K  T  L

1531  GGTTACTCTAACTGGTTCGGACTCAACACCGGCGAACTGAAAGAAGAGATGTCCAAGAACGGACGCATCTTCACCCGTGAGCTCAACAAG
       G  Y  S  N  W  F  G  L  N  T  G  E  L  K  E  E  M  S  K  N  G  R  I  F  T  R  E  L  N  K

1621  GACCGCGTCTACATTGGCCGCAATGGTACCGAGCTGGTTCTGCACGGTCGTTCCCTGCTGTTCGTCCGCAACGTTGGTCACCTCATGCAA
       D  R  V  Y  I  G  R  N  G  T  E  L  V  L  H  G  R  S  L  L  F  V  R  N  V  G  H  L  M  Q

1711  AACCCATCCATCTTGATTGATGGCGAGGAGATCTTCGAAGGCATCATGGATGCTGTCTTGACCACTGTTTGTGCCATCCCAGGAATTGCT
       N  P  S  I  L  I  D  G  E  E  I  F  E  G  I  M  D  A  V  L  T  T  V  C  A  I  P  G  I  A

1801  CCGCAGAACAAGATGCGCAATTCCCGCAAGGGCTCCATCTACATCGTGAAGCCTAAGCAGCACGGCCCTGAAGAAGTCGCGTTCACCAAC
       P  Q  N  K  M  R  N  S  R  K  G  S  I  Y  I  V  K  P  K  Q  H  G  P  E  E  V  A  F  T  N

1891  GAGCTCTTCGGCCGCGTTGAGGATCTGCTTGATCTGCCACGCCACACCTTGAAGGTTGGTGTTATGGATGAGGAGCGTCGCACGTCCGTG
       E  L  F  G  R  V  E  D  L  L  D  L  P  R  H  T  L  K  V  G  V  M  D  E  E  R  R  T  S  V

1981  AACCTGGATGCCAGCATCATGGAAGTTGCTGACCGCTTGGCATTCATCAACACTGGCTTCCTGGACCGCACCGGCGATGAAATCCACACC
       N  L  D  A  S  I  M  E  V  A  D  R  L  A  F  I  N  T  G  F  L  D  R  T  G  D  E  I  H  T

2071  TCCATGGAAGCAGGCGCCATGGTGCGCAAGGCTGATATGCAGACCGCACCGTGGAAGCAGGCCTACGAGAACAACAACGTTGATGCAGGT
       S  M  E  A  G  A  M  V  R  K  A  D  M  Q  T  A  P  W  K  Q  A  Y  E  N  N  N  V  D  A  G

2161  ATTCAGCGTGGTCTTCCTGGCAAGGCTCAGATCGGTAAGGGCATGTGGGCGATGACTGAACTCATGGCAGAAATGCTGGAGAAGAAGATC
       I  Q  R  G  L  P  G  K  A  Q  I  G  K  G  M  W  A  M  T  E  L  M  A  E  M  L  E  K  K  I

2251  GGCCAGCCACGCGAAGGCGCCAACACTGCATGGGTTCCTTCACCAACTGGTGCGACGCTGCACGCAACGCACTACCACTTGGTTGATGTG
       G  Q  P  R  E  G  A  N  T  A  W  V  P  S  P  T  G  A  T  L  H  A  T  H  Y  H  L  V  D  V

2341  TTCAAGGTTCAAGACGAACTGCGTGCTGCCGGCCGCCGCGACAGCCTGCGCAACATTCTCACCATTCCAACCGCACCAAACACCAATTGG
       F  K  V  Q  D  E  L  R  A  A  G  R  R  D  S  L  R  N  I  L  T  I  P  T  A  P  N  T  N  W

2431  TCTGAGGAAGAGAAGAAGGAAGAGATGGACAACAACTGCCAGTCCATCCTCGGATACGTTGTGCGCTGGGTTGAGCACGGTGTTGGTTGC
       S  E  E  E  K  K  E  E  M  D  N  N  C  Q  S  I  L  G  Y  V  V  R  W  V  E  H  G  V  G  C

2521  TCCAAGGTTCCAGACATCCATGACATCGACCTCATGGAAGACCGCGCAACGCTGCGTATTTCCTCGCAGATGCTGGCCAACTGGATCCGC
       S  K  V  P  D  I  H  D  I  D  L  M  E  D  R  A  T  L  R  I  S  S  Q  M  L  A  N  W  I  R

2611  CATGATGTTGTCTCGAAGGAGCAGGTCTTGGAGTCACTGGAACGAATGGCAGTGGTCGTCGACAAGCAAAATGCGGGCGACGAGGCCTAC
       H  D  V  V  S  K  E  Q  V  L  E  S  L  E  R  M  A  V  V  V  D  K  Q  N  A  G  D  E  A  Y

2701  CGCGATATGGCGCCGAACTACGACGCCTCCCTCGCCTTCCAGGCGGCTAAGGACTTGATTTTCGAAGGCACCAAGTCCCCATCGGGCTAC
       R  D  M  A  P  N  Y  D  A  S  L  A  F  Q  A  A  K  D  L  I  F  E  G  T  K  S  P  S  G  Y

2791  ACCGAGCCCATCTTGCACGCACGCCGCCGCGAGTTCAAAGCAAAAAACTAAGCACGCTTTTCGACGCTTACCTGCATCCCAACGGTGACT
       T  E  P  I  L  H  A  R  R  R  E  F  K  A  K  N  -

2881  GACTGCCCCGGAGCCACCCTCACTCCTTTTTGGTCAGCACCCAAAAGCGCCGGTTCAACACACACAAAGTCGCGCCATTCACCTTCGCCA
                                                                                  ---------->

2971  ATATCGGCCACGGTGGAGGCGCGACTTTCGCCTGGATTCCACACCACAGTGGAATCATGACCATCGCCCTCAATGGTGATGATGCGATCG
      <----------
```

Abbildung 6. Nukleinsäure-Sequenz und die davon abgeleitete Aminosäure-Sequenz des *aceB*-Gens aus *C. glutamicum* sowie die Nukleinsäure-Sequenz des intergenischen Bereiches zwischen den Genen *aceA* und *aceB*. Die Ribosomenbindungsstelle des *aceB*-Gens wurde unterstrichen und mit 'RBS' gekennzeichnet. Der potentielle Terminator der Transkription von *aceB* ist durch antiparallele Pfeile dargestellt.

Analyse des offenen Leserasters *orfZ* aus *C. glutamicum*

Die Nukleinsäuresequenz von *orfZ* ist zusammen mit der davon abgeleiteten AS-Sequenz in **Abbildung** 7 dargestellt. Das ORF beginnt bei bp 334 und endet bei bp 1305. Es kodiert für ein Polypeptid von 324 AS mit einem Molekulargewicht von 34232. Der Codon-Gebrauch von *orfZ* stimmt mit dem mäßig-exprimierter corynebakterieller Gene überein (Eikmanns, 1992). Vor dem potentiellen Startcodon (GTG_{154}) findet sich eine nur teilweise mit einer typischen Ribosomenbindungsstelle übereinstimmende Sequenz (TGGAGT). In einem Abstand von ungefähr 140 bp hinter *orfZ* konnten zwei zum Teil überlappende Terminationsstrukturen identifiziert werden. Die freie Energie zur Ausbildung der Haarnadelstruktur liegt für den ersten Terminator bei -28 kcal/mol und für den zweiten bei -33 kcal/mol.

```
   1  TCCAAACCAAGCAGTCCACCAAACCATGGAGCAATGATGGGCACACCACCCCTAATTGCATTTCCCTCCCCATATTGGGAAGCGGAGCTA
  91  ACAAACAACAGCTCACCTTCAGGTGATTCGGCGTGAACAATATGAGCGCCAGCGGGGGAGATTTCCAAGCCACCGGAGGTAATAAAAGTA
 181  GTCATACTTCCAAAGTATAGGCCGGAATTGCCCCCACGTTGTGCCTTAAGCATCACTACTGCGTTAAGGTATGAAAGTTCGCACACCAGC
 271  GATTTAATTCTGTGCCCACCACTAGCACGACCATTTCAGTTTTAACTTTCTTGGAGTTTTCTAGTGTCCAAAACAGAAGAAGGCCGTTCA
                                                        RBS       V  S  K  T  E  E  G  R  S
 361  GCGGCCATAATTATTTACGCGTTTCCAACTTTCATTCTGCTGGGCGCGATCATTGCGTTTATCTTCCCGGAACCATTCATTCCGCTGACA
       A  A  I  I  I  Y  A  F  P  T  F  I  L  L  G  A  I  I  A  F  I  F  P  E  P  F  I  P  L  T
 451  AACTACATTAATATCTTCCTCACGATCATCATGTTCACCATGGGTTTGACCTTGACGGTGCCCGATTTTCAGATGGTGCTTAAACGTCCA
       N  Y  I  N  I  F  L  T  I  I  M  F  T  M  G  L  T  L  T  V  P  D  F  Q  M  V  L  K  R  P
 541  CTGCCTATCTTGATCGGTGTAGTAGCGCAGTTTGTCATCATGCCATTCCTGGCGATCGTGGTTGCGAAAATGTTCAACCTCAACCCAGCA
       L  P  I  L  I  G  V  V  A  Q  F  V  I  M  P  F  L  A  I  V  V  A  K  M  F  N  L  N  P  A
 631  CTCGCCGTTGGCCTTCTCATGCTGGGATCCGTTCCGGGTGGCACCTCCTCCAATGTGATTGCGTTTCTCGCCCGAGGAGATGTCGCGCTA
       L  A  V  G  L  L  M  L  G  S  V  P  G  G  T  S  S  N  V  I  A  F  L  A  R  G  D  V  A  L
 721  TCGGTCACCATGACCTCTGTGTCCACCATTGTTTCCCCAATCATGACGCCTTTCCTCATGCTCATGCTGGCAGGTACTGAAACCGCCGTC
       S  V  T  M  T  S  V  S  T  I  V  S  P  I  M  T  P  F  L  M  L  M  L  A  G  T  E  T  A  V
 811  GATGGTGGAGGCATGGCGTGGACTTTGGTACAAACAGTGCTGCTGCCTGTGATCATCGGCCTAGTTCTGCGTGTCTTCTTGAACAAGTGG
       D  G  G  G  M  A  W  T  L  V  Q  T  V  L  L  P  V  I  I  G  L  V  L  R  V  F  L  N  K  W
 901  ATCGACAAGATTTTGCCGATCCTTCCTTATCTCTCCATCCTCGGTATCGGTGGCGTGGTGTTCGGCGCAGTCGCAGCCAACGCGGAACGA
       I  D  K  I  L  P  I  L  P  Y  L  S  I  L  G  I  G  G  V  V  F  G  A  V  A  A  N  A  E  R
 991  CTCGTGTCTGTCGGACTCATCGTGTTCGTTGCAGTTATCGTGCACAACGTACTTGGATACGTTGTGGGATACCTCACCGGCCGTGTATTC
       L  V  S  V  G  L  I  V  F  V  A  V  I  V  H  N  V  L  G  Y  V  V  G  Y  L  T  G  R  V  F
1081  AAATTCCCAGAAGCAGCAAACCGCACCATGGCGATTGAAATCGGAACCCAATCCGCAGGCCTCGCATCGGGAATGGCAGGACGATTCTTC
       K  F  P  E  A  A  N  R  T  M  A  I  E  I  G  T  Q  S  A  G  L  A  S  G  M  A  G  R  F  F
1171  ACCCCAGAAGCAGCCCTTCCAGGTGCTGTCGCTGCCTTGGTCCACAACATCACCGGCGCAGTTTATGTTGGGCTGGTACGAAACAGGCCT
       T  P  E  A  A  L  P  G  A  V  A  A  L  V  H  N  I  T  G  A  V  Y  V  G  L  V  R  N  R  P
```

```
1261   TTGACTAAGGCATCAAGGAAGAAGGAATCCGTCGCGGTTTCCAGCTAACTTATTTGCTGCCCGTTAGAGGCGCTGAGTTTTTGACACGGG
        L  T  K  A  S  R  K  K  E  S  V  A  V  S  S  -

1351   CGTGCCCTTGGATGAGCTCATGTTGGAGCTTCTAACGGCTATACAGAGAGTCGACTTTTTCGAGTTCTTATCTAGTTTTTGAGCCAGACC

1441   AAACCACGCTGCCCACGAAAACTGTTTTTCAGTTTCGTGGGCATTTCTGACCGGTTTTGAGGGCTTAAAACCAGTCACAGATGCCCACGG
```

Abbildung 7. Nukleinsäure-Sequenz und die davon abgeleitete Aminosäure-Sequenz des offenen Leserasters *orfZ* aus *C. glutamicum*. Die potentielle Ribosomenbindungsstelle ist unterstrichen und mit 'RBS' gekennzeichnet. Mögliche Terminatoren der Transkription von *orfZ* wurden durch antiparallele Pfeile dargestellt.

2.5. Vergleich von Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase aus *C. glutamicum* mit den entsprechenden Enzymen anderer Organismen

Aminosäure-Sequenzvergleich der Isocitrat-Lyase aus *C. glutamicum* mit anderen Isocitrat-Lyasen

Ein Vergleich der von *aceA* abgeleiteten AS-Sequenz mit den AS-Sequenzen anderer ICLs ist in **Abbildung 8** dargestellt. Die ICL aus *C. glutamicum* zeigt 57%, 37%, 38% bzw. 36% Identität zu den entsprechenden ICLs von *E. coli* (Rieul et al., 1988), *C. tropicalis* (Atomi et al., 1990), *N. crassa* (Gainey et al., 1992) bzw. *B. napus* (Comai et al., 1989). Unter Berücksichtigung konservativer Austausche beträgt die Ähnlichkeit des *C. glutamicum* Enzyms zu den genannten Enzymen sogar 70%, 53%, 51% bzw. 50%. Bereiche, in denen die Enzyme besonders hohe Identität zueinander aufweisen, sind in **Abbildung 8** unterstrichen dargestellt. Der Sequenzvergleich zeigt weiterhin, daß die ICLs aus *E. coli* und *C. glutamicum* um circa 120 AS kleiner sind als die entsprechenden eukaryotischen Enzyme. Ursache für die geringere Größe sind zwei Lücken gleicher Lage und Ausdehnung innerhalb der beiden prokarotischen ICLs. Verglichen mit dem Enzym von *B. napus* beginnt die erste Lücke in der ICL aus *C. glutamicum* bei AS 13 und überspannt einen Bereich von 16 AS. Die zweite Lücke fängt bei AS 253 an und dehnt sich über 102 AS aus.

```
                 .         .         .         .         .         .         .         .
CGICL    MSNVGKPRTAQEIQQD-------------WDTNPRWNGITRDYTADQVADLQGSVIEEHTLARRGSEILWDAVTQEGD-G    66
ECICL    MKT--RTQQIEELQKE-------------W-TQPRWEGITRPYSAEDVVKLRGSVNPECTLAQLGAAKMWRLLHGESKKG    64
CTICL    MAYTK-----IDINQEEADFQKEVAEIKKWWSEPRWRKTKRIYSAEDIAKKRGTLKIAYP-SSQQSDKLFKLLEKHDAEK    74
NCICL    MAANNMVNPAVDPALEDELFAKEVEEVKKWWSDSRWRQTKRPFTAEQIVSKRGNLKIEYA-SNAQAKKLWKILEDRFAKR    79
BNICL    MAASFSVPSMI--MEEEGRFEAEVAEVQTWWSSERFKLTRRPYTARDVVALRGHLKQGYA-SNEMAKKLWRTLKSHQANG    77
         *             s             * s  *s  s * ss* sss  s* s  s s s   s  ss  s

                 .         .         .         .         .         .         .         .
CGICL    YINALGALTGNQAVQQVRAGLKAVYLSGWQVAGDANLSGHTYPDQSLYPANSVPSVVRRINNALLRSDEIARTE-----G   141
ECICL    YINSLGALTGGQALQQAKAGIEAVYLSGWQVAADANLAASMYPDQSLYPANSVPAVVERINNTFRRADQIQWSA-----G   139
CTICL    SVSFTFGALDPIHVAQMAKYLDSIYVSGWQCSSTASTSNEPSPDLADYPMDTVPNKVEHLWFAQLFHDRKQREERLNMTK   154
NCICL    DASYTYGCLEPTMVTQMAKYLDTVYVSGWQSSSTASSSDEPGPDLADYPYTTCPNKVGHLFMAQLFHDRKQRQERLSVPK   159
BNICL    TASRTFGALDPVQVTMMAKHLDTIYVSGWQCSSTHTSTNEPGPDLADYPYDTVPNKVEHLFFAQQYHDRKQREARMSYMSR   157
            s   s  s   s      ssss*s****sss s ss   ** s ** ss *s * ss  s    *  ss s

                 .         .         .         .         .         .         .         .
CGICL    DTSVDNWVV----PIVADGEAGFGGALNVYELQKAMIAAGAAGTHWEDQLASEKKCGHLGGKVLIPTQQHIRTLNSARLA   217
ECICL    IEPGDPRYVDYFLPIVADAEAGFGGVLNAFELMKAMIEAGAAAVHFEDQLASVKKCGHMGGKVLVPTQEAIQKLVAARLA   219
CTICL    EERANTPYIDFLRPIIADADTGHGGITAIIKLTKLFIERGAAGIHIEDQAPGTKKCGHMAGKVLVPVQEHINRLVAIRAS   234
NCICL    DQREKTPYIDFLRPIIADADTGHGGLTAVMKLTKLFIEKGAAGIHIEDQAPGTKKCGHMAGKVLVPIQEHINRLVAIRAQ   239
BNICL    EERAKTPFVDYLKPIIADGDTGFGGTTATVKLCKLFVERGAAGVHIEDQSSVTKKCGHMAGKVLVAVSEHINRLVAARLQ   237
          s s    s    **s**sss* **  s  s* * sss ***ss* ***  s *****ss****sss s *s * s *

                 .         .         .         .         .         .         .         .
CGICL    ADVANTPTVVIARTDAEAATLITSDVDERDQPFITG-------------------------------------------   253
ECICL    ADVTGVPTLLVARTDADAADLITSDCDPYDSEFITG-------------------------------------------   255
CTICL    ADIFGSNLLAVARTDSEAATLITSTIDHRDHYFIIGATNPES--GDLAALMAEAEAKGIYGDELARIETEWTKKAGLKLF   312
NCICL    ADIMGSDLLCIARTDAEAATLITTTIDPRDHAFILGCTNPDL--EPLAHLMMKAEAEGKTGAQLQAIEDDWLAKADLKRF   317
BNICL    FDVMGTETVLVARTDAVAATLIQSNIDSRDHQFILGVTNPSLRGKSLSSLLAEGMAVGNNGPALQAIEDQWLSSARLNTF   317
          *s s   s s****s **s** ss *  *  ** *

                 .         .         .         .         .         .         .         .
CGICL    ---------------------------------------------------------ERTAEGYYHVKNGLEPCIARAK   275
ECICL    ---------------------------------------------------------ERTSEGFFRTHAGIEQAISRGL   277
CTICL    HEAVIDEIKAGNYSNKEAL--IKKFTDKVNPLSHTSHKEAKKLAKELTGKDIYFNHDVARAREGYYRYQGGTQCAVMRGR   390
NCICL    DEAVLDVIAKGKFSNAKDL--AAKYQAAVKG-KQISNREARAIARQLLGQEIFFDWESPRTREGYYRLKGGCDCSINRAI   394
BNICL    SDAVVEALKRMNLSENEKSRRVNEWLNHARYENCLSNEQGRELAAKLGVTDLFWDWDLPRTREGFYRFQGSVTAAVVRGW   397
                                                                 *s **sss sss    s *s

                 .         .         .         .         .         .         .         .
CGICL    SYAPYADMIWMETGTPDLELAKKFAEGVRSEFPDQLLSYNCSPSFNWSAH-LEADEIAKFQKELGAMGFKFQFITLAGFH   354
ECICL    AYAPYADLVWCFTSTPDLELARRFAQAIHAKYPGKLLAYNCSPSFNWQKN-LDDKTIASFQQQLSDMGYKFQFITLAGIH   356
CTICL    AFAPYADLIWMESALPDYNQAKEFADGVKAAVPDQWLAYNLSPSFNWN-KAMPADEQETYIKRLGQLGYVWQFITLAGLH   469
NCICL    SYAPYCDAIWMESKLPDYAQAEEFAKGPRVW-PEQKLAYNLSPSFNWK-TAMGRDDQETYIRRLAKLGYCWQFITLAGLH   473
BNICL    AFAQIADLIWMETASPDLNECTQFAEGVKSKTPEVMLAYNLSPSFNWDASGMTDQQMMEFIPRIARLGYCWQFITLAGFH   477
         ss*s  * s* *s  ** s    **ss s   *s  *s** ******    s  s    s   ss s*s s*******s*

                 .         .         .         .         .         .         .         .
CGICL    SLNYGMFDLAYGYAR-EGMTSFVDLQNREFKAAEERGFTAVKHQREVGAGYFDQIATTVDPNSST-TALKGSTEEGQFHN   432
ECICL    SMWFNMFDLANAYAQGEGMKHYVEKVQQPEFAAAKDGYTFVSHQQEVGTGYFDKVTTIIQGGTSSVTALTGSTEESQF--   434
CTICL    TTALAVDDFANQYSQ-IGMRAYGQTVQQPEI---EKGVEVVKHQKWSGANYIDGLLRMVSGGVTSTAAMGAGVTEDQFKE   545
NCICL    TTALISDQFAKAYSK-IGMRAYGELVQEPEI---DNGVDVVKHQKWSGATYVDELQKMVTGGVSSTAAMGKGVTEDQFH-   549
BNICL    ADALVVDTFAKDYAR-RGMLAYVERIQREER---SNGVDTLAHQKWSGANYYDRYLKTVQGGISSTAAMGKGVTEEQFKE   553
         s       s*  *ss  **  s s  s       s * s s **s  *ss* *     s  s ss s*s  sss*s**

                 .         .
CGICL    ------------------------   432
ECICL    ------------------------   434
CTICL    T-------------------KAKV   550
NCICL    ------------------------   547
BNICL    TWTRPGAAGMGEGTSLVVAKSRM    576
```

Abbildung 8. Sequenzvergleich der Isocitrat-Lyasen aus *C. glutamicum* (CGICL), *E. coli* (ECICL), *C. tropicalis* (CTICL), *N. crassa* (NCICL), und *B. napus* (BNICL). Identische Aminosäuren sind durch einen Stern, ähnliche Aminosäuren durch ein 's' gekennzeichnet. Bereiche, in denen die Enzyme einen hohen Grad an Ähnlichkeit zueinander aufweisen, wurden unterstrichen.

Aminosäure-Sequenzvergleich der Malat-Synthase aus *C. glutamicum* mit anderen Malat-Synthasen

Anhand der DNA-Sequenz konnte für die MSY aus *C. glutamicum* eine Länge von 739 AS vorhergesagt werden. Die entsprechenden Enzyme anderer Organismen weisen Größen von 533 AS bis 568 AS auf (Hikida et *al.*, 1991; Fernandez et *al.*, 1993b). Dies deutet an, daß das corynebakterielle Enzym um mindestens 170 AS länger ist als die bisher bekannten MSY-Enzyme. In einem Sequenzvergleich zeigte der C-Terminus der MSY aus *C. glutamicum* schwache Ähnlichkeit zu den MSYs anderer Organismen. Innerhalb der N-terminalen 200 AS der MSY aus *C. glutamicum* wurde jedoch keine Übereinstimmung mit bekannten Sequenzen festgestellt. Dies läßt vermuten, daß die MSY aus *C. glutamicum* aufgrund einer Verlängerung des N-Terminus um circa 170 AS größer ist als die entsprechenden MSYs anderer Organismen. In **Abbildung 9** wurden die C-terminalen 579 AS der MSY aus *C. glutamicum* mit den MSY-Enzymen aus *E. coli* (Byrne et *al.*, 1988), *S. cerevisiae* (Hartig et *al.*, 1992), *N. crassa* (Sandemann et *al.*, 1991) und *B. napus* (Comai et *al.*, 1989) verglichen. Wie aus der Abbildung hervorgeht, sind nur an wenigen Stellen der fünf MSYs identische AS zu erkennen. Hoch konservierte Bereiche der MSYs aus *E. coli*, *S. cerevisiae*, *N. crassa* und *B. napus* sind mit einem Balken gekennzeichnet. Auffallend ist, daß die Sequenz des corynebakteriellen Enzyms innerhalb dieser Bereiche die größte Übereinstimmung zu den Sequenzen anderer MSYs aufweist.

```
                    .         .         .         .         .         .         .         .
CGMSY  ...GTNAIPETDGAEKGKEYNPVRGQKVIEWGREFLDSVVPLDGASHADVEKYNITDGKLAAHIGDSVYRLKNRESYRGFTGN   240
ECMSY     MTEQAT------------TTDELAFTRPYGEQEKQILTAEAVEFLTELVTHFTPQR--NKLLAARIQQQQDIDNGTLP-D    65
SCMSY     M---VKVSL--DNVKLLVDVDKEPFFKPSSTTVGDILTKDALEFIVLLHRTFNNKR--KQLLENRQVVQKKLDSGSYHLD    73
NCMSY     M---ASVE------TLLQGVTISG---PIEEHQRKILTPQALSFVALLHRSFNQTR--KNLLERRHVRQAEIDRGVLP-D    65
BNMSY     MELETSVY--RPNVAVYDSPDGVEVRGRYDQVFAKILTRDALGFVAELQREFRGHV--RYAMECRREVKRRYNSGAVP-G    75
                                                ss  ss                          s

                    .         .         .         .         .         .         .         .
CGMSY     FLDPEAILLETNGLHIELQIDPVHPIGKADKTGLKDIVLESAITTIMDFEDSVAAVDAEDKTLGYSNWFGLNTGELKEEM   320
ECMSY     FISETASIRDA-DWK-IRGIPADLEDRRVEITGPVERKM-----VINALNANVKVFMADFEDSLAPDWNKVIDGQINLRD   138
SCMSY     FLPETANIRNDPTWQ-GPILAPGLINRSTEITGPPLRNM-----LINALNAPVNTYMTDFEDSASPTWNNMVYGQVNLYD   147
NCMSY     FLPETKHIRENPTWKGAAPAAPPLVDRRVEMTGPTDRKM-----VVNALNSDVYTYMADFEDSSAPTWANMVNGQVNLYD   140
BNMSY     FDPSTKFIRDG-EWV-CASVPPAVADRRVEITGPVERKM-----IINALNSGAKVFMADFEDALSPSWENLMRGQVNLKD   148
          *     s s                 s **    s     s         s       *  s  * s

                    .         .         .         .         .         .         .         .
CGMSY     SKNGRIFTRELNKDRVYIGRNGTELVLHGRSLLFVRNVGHLMQNPSILIDGEEIFEGIMDAVLTTVCAIPGIAPQNKMRN   400
ECMSY     AVNGTISYTNEA-GKIYQLKPN---P----AVLICRVRGLHLPEKHVTWRGEAIPGSLFDFALYFFHNYQAL-------L   203
SCMSY     AIRNQIDFDTPR--KSYKLNGN---V-ANLPTIIVRPRGWHMVEKHLYVDDEPISASIFDFGLYFYHNAKEL-------I   214
NCMSY     AIRRQIDFKQGP--KEYKL-RTDRTL----PTLIVRPRGWHLEEKHVTIDGEPVSGSLFDFGLYFFHNAKEL-------V   206
BNMSY     AVDGSITFNDKARNKVYKLNDQ---V----AKLFVRPRGWHLPEAHILIDGEPATGCLVDFGLYFFHNYAKF----RQTQ   217
              *       s *               s  *  *  s    s    *     s  *  *
```

```
                 .         .         .         .         .         .         .         .
CGMSY    SRKGSIYIVKPKQHGPEEVAFTNELFGRVEDLLDLPRHTLKVGVMDEERRTSVNLDASIMEVADRLAFINTG---FLDRT   477
ECMSY    AKGSGPYFYLPKTQSWQEAAWWSEVFSYAEDRFNLPRGTIKATLLIETLPAVFQMDEILHALRDHIVGLNCGRWDYIFSY   283
SCMSY    KLGKGPYFYLPKMEHHLEAKLWNDVFCVAQDYIGIPRGRIRATVLIETLPAAFQMEEIIYQLRQHSSGLNCGRWDYIFST   294
NCMSY    QRGFGPYFYPPKMESHLEARLWNDAFNLAQDYVGIPLSTIRGTVLIETITAAFEMDEIIFELRNHTSGLNRGGWDYIFPF   286
BNMSY    GSGFGPFFYLPKMEHSREAKIWNSVFERAEKMAGIERGSIRATVLIETLPAVFQMNEILYELRDHSVGLNCGRWDYIFSY   297
              s   **    *       *        s   sss  ss *      s   s  s  s   s* *   ss s
                 .         .         .         .         .         .         .         .
CGMSY    GDEIHTSMEAGAMVRKADMQTAPWKQAYENNNVDAGIQRGLPGKAQIGKGMWAMTELMAEMLEKKIGQPREGANTAWVPS   557
ECMSY    IKTLKNYPDRVLPDRQAVTMDKPFLNAYSRLLIKTCHKRGAFAMGGMAAFIPSKDEEHNNQV-LN-KVKADKSLEANNGH   361
SCMSY    IKRLRNDPNHILRNRNQVTMTSPFMDAYVKRLINTCHRRGVHAMGGMAAQIPIKDDPAANEKAMTKVRN-DKIRELTNGH   373
NCMSY    IKEVRRFPNFVLPDRSDVTMTVPFMEAYVKLLIKTLHRLVVHAMG-MAAQIPIKDDKAANDKAMEGVVRADKLREARAGH   365
BNMSY    VKTFQAHPDRLLPDRVLVGMGQHFMRSYSDLLIRTCHKRGVHAMGGMAAQIPIRDDPKANEMALD-LVKKDKLREVRAGH   376
            s         *       s   *   s   s           s   s             s
                 .         .         .         .         .         .         .         .
CGMSY    PTGATLHATHYHL-VDVFKVQDELRAAGRRDSLRNILTIPTAPNTNWSEEEKKEE-MDNNCQSILGYVVRWVEHGVGCSK   635
ECMSY    DGTWIAHPGLADTAMAVFNDILGSRKNQLEVMREQDAPITADQLLAPCDGERTEEGMRANIRVAVQYIEAWI-SGNGCVP   440
SCMSY    DGSWVAHPALAPICNEVFINMG-TPNQIYFIPENVVTAAN-LLETKIPNGEITTEGIVQNLDIGLQYMEAWL-RGSGCVP   450
NCMSY    DGTWVAHPALASIALEVFNKHMPTPNQLFNRREDVKIGQQDLLNMNVP-GSSTEDGIRKNLNTGLGYTEPWI-RGVGCVP   443
BNMSY    DGTWAAHPGLIPICMDAFSHMGNNPNQIKSMKRDDASAITEEDLLQIPRGVRTLEGLRLNTRVGIQYLAAWL-TGSGSVP   455
            *         *                                      s s  *    s *   *s  * *
                 .         .         .         .         .         .         .         .
CGMSY    VPDIHDIDLMEDRATLRISSQMLANWIRHDVVSKEQVLESLERMAVVVD---------KQ-NAGDEAYRDMAPNYDASLA   705
ECMSY    -----IYGLMEDAATAEISRTSIWQWIHHQKTLSN---GKPVTKALFRQMLGEEMKVIAS-ELGEERFSQGRFDDAARLM   511
SCMSY    -----INNLMEDAATAEVSRCQLYQWVKHGVTLKDTG--EKVTPELTEKILKEQVERLSKASPLGDKNKFAL---AAKYF   520
NCMSY    -----IKHPQEDAATAEVSRSQLWQWVKHRVTTAEGK--HVDKRYPLKLLKEADRQRLAK-APQGNKFNLA----AQYFA   511
BNMSY    -----LYNLMEDAATAEISRVQNWQWIRYGVELDGDGLGVRVSKELFGRVVEEEMERIEK-EVGKDKFKRGMYKEACKMF   529
                  ** **  s*      * ss
                 .         .         .
CGMSY    FQAAKDLIFEGTKSPSGYTEPILHARRREFKAKN    739
ECMSY    EQITTSDELIDFLTLPGYRLLA------------    533
SCMSY    LPEIRGEKFSEFLTTLLYDEIVSTKATPTDLSKL    555
NCMSY    SQVTGE-DYADFLTCLLYNEITSAGNSLPASKL-    543
BNMSY    TKQCTAAELDDFLTLAVYDHIVAHYP-INASRL-    561
                       *
```

Abbildung 9. Aminosäure-Sequenzvergleich der Malat-Synthasen aus *C. glutamicum* (CGMSY), *E. coli* (ECMSY), *S. cerevisiae* (SCMSY), *N. crassa* (NCMSY) und *B. napus* (BNMSY). Identische Aminosäuren sind mit einem Stern, ähnliche mit einem 's' gekennzeichnet. Bereiche, in denen die Enzyme aus *E. coli*, *S. cerevisiae*, *N. crassa* und *B. napus* starke Ähnlichkeit zueinander aufweisen, wurden unterstrichen.

2.6. Charakterisierung der von *orfZ* aus *C. glutamicum* abgeleiteten Aminosäure-Sequenz

Mit Hilfe der Methode von Capaldi und Vanderkooi (1972) wurden in dem von *orfZ* abgeleiteten Polypeptid 68% hydrophobe und 32% hydrophile AS identifiziert. Es kann somit davon ausgegangen werden, daß *orfZ* für ein stark hydrophobes Protein kodiert.

In dem abgeleiteten Polypeptid wurden darüberhinaus mit der Methode von Rao und Argos (1986) zehn potentielle, transmembrane Bereiche identifiziert. Ein Hydrophobizitätsplot des von *orfZ* abgeleiteten Proteins ist in **Abbildung 10** dargestellt.

Ein Vergleich des von *orfZ* abgeleiteten Polypeptids mit Sequenzen aus der SWISSPROT-Datenbank zeigte, daß ORFZ signifikante Ähnlichkeit zu einem Na^+/Gallensalz-Kotransporter aus der Rattenleber (Hagenbuch et *al.*, 1991) aufwies. In Bezug auf seine Substratspezifität wird der Na^+/Gallensalz-Kotransporter als multispezifisch bezeichnet, da er sowohl Steroide (z. B. Taurocholat und Quabain) als auch organische Anionen (z.B. Rifampicin und Bilirubin) sowie Peptide (z.B. Phalloidin und Somatostatin-Analoga) transportiert (Frimmer und Ziegler, 1988). In **Abbildung 11** ist ein Sequenzvergleich der von *orfZ* abgeleiteten AS-Sequenz mit der des Na^+/Gallensalz-Kotransporters dargestellt. Beide Proteine weisen insgesamt 21% Identität zueinander auf. Unter Berücksichtigung konservativer AS-Austausche beträgt die Ähnlichkeit sogar 41%.

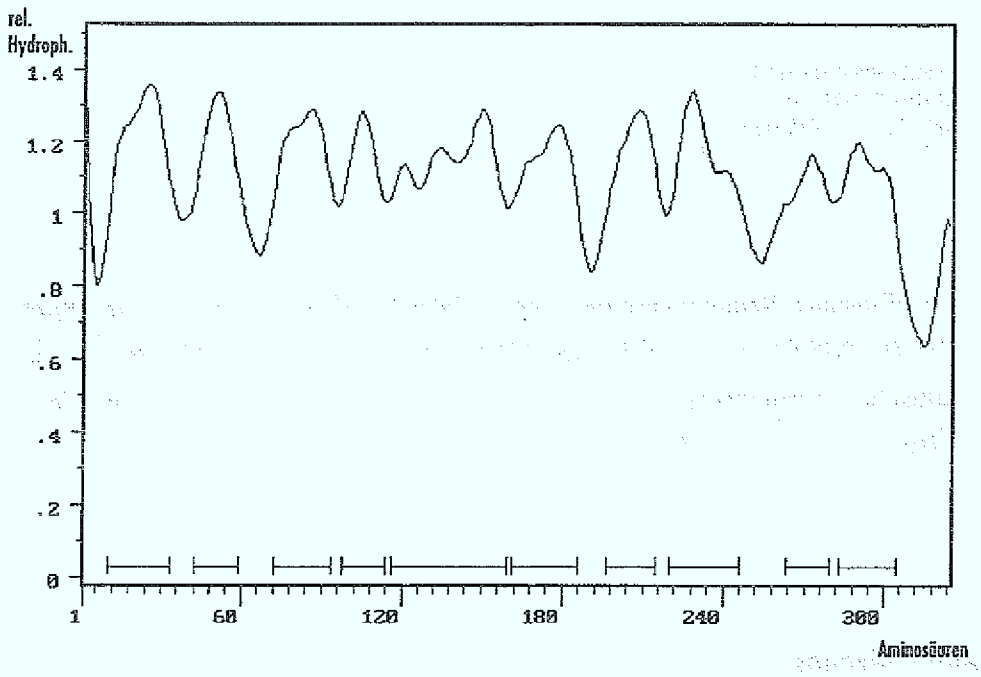


Abbildung 10. Hydrophobizitätsplot des von dem offenen Leseraster *orfZ* aus *C. glutamicum* kodierten Polypeptids. Als mathematische Grundlage des Plots diente die Methode von Rao und Argos (1986). Potentielle transmembrane Bereiche sind im unteren Teil des Bildes als Balken dargestellt. Abkürzungen: rel. Hydroph.: relative Hydrophobizität.

Durch Sequenzvergleiche Na^+-abhängiger Symportsysteme war ein aus fünf AS bestehendes konserviertes Motiv (G-39-A-X-X-X-X-L-X-X-X-G-R) identifiziert worden, welches Bedeutung innerhalb des Transportprozesses bei Bindung bzw. Erkennung der Substrate besitzen könnte (Deguchi et *al.*, 1990). Dieses Motiv ist jedoch weder innerhalb der Sequenz des Na^+/Gallensalz-Kotransporters noch in der von *orfZ* abgeleitenten AS-Sequenz zu finden. Es kann somit keine Aussage gemacht werden, ob *orfZ* tatsächlich für einen Na^+-abhängigen Transporter kodiert. Durch Vergleich der von *orfZ* abgeleiteten AS-Sequenz mit in der PROSITE-Datenbank gespeicherten Sequenzen, konnte ein für bindeproteinabhängige Transportsysteme typisches Motiv identifiziert werden (in **Abbildung 11** unterstrichen), welches innerhalb der Sequenz des Na^+/Gallensalz-Kotransporters nicht vorhanden ist. Die Gene bindeproteinabhängiger Transportsysteme sind in der Regel in Form von Operons organisiert. Innerhalb der 915 bp zwischen *aceB* und *orfZ* wurden keine potentiell kodierenden ORFs identifiziert. Auch in dem aus 489 bp bestehenden Bereich hinter dem Ende von *orfZ* wurden keine ORFs gefunden deren abgeleitete AS-Sequenz Ähnlichkeit zu Komponenten bindeproteinabhänigiger Transportsysteme aufwies. Es bleibt daher weiterhin zu klären, ob *orfZ* tatsächlich für ein bindeproteinabhängiges Transportprotein kodiert.

```
                    .         .         .         .         .         .         .         .
CGORFZ      VSKTEEGRSAAIIIQAFPTFILLGAIIAFIFPEPFIPLTNYINIFLTIIMFTMGLTLTVPDFQMVLKRPLPILIGVVAQF    80
RNNATA      ME-----------VHNVSAPFNFSLPPGFGHRATDKALSIILVLMLLLIMLSLGCTMEFSKIKAHLWKPKGVIVALVAQF    69
            s           s    s         *        *s  s s * s** ss* *s        * s*  sss s****
                    .         .         .         .         .         .         .         .
CGORFZ      VINPFLAIVVAKMFNLNPALAVGLLMLGSVPGGTSSNVIAFLARGDVALSVTMTSVSTIVSPIMTPFLMLMLAGTETAVD   160
RNNATA      GINPLAAFLLGKIFHLSNIEALAILICGCSPGGNLSNLFTLAMKGDMNLSIVMTTCSSFSALGMMPLLLYVYSKGIYDGD   149
             ***  * ss *s* *    *s s*s *  ***  **s s   s**s **s **s *s  s  * * *s s s      *
                    .         .         .         .         .         .         .         .
CGORFZ      GGGMAW-----TLVQIVLLPVIIGLVLRVFLNKWIDKILPILPYLS-ILGIGGVVFGAVAANAERLVSVGLIVFVAVIVH   234
RNNATA      LKDKVPYKGIMISLVIVLIPCTIGIVLKSKRPHYVPYILKGGMIITFLLSVAVTALSVINVGNSIMFVMTPHLLATSSLM   229
                        s  **s*  **s**s     ss  **     ss s* s       s     s  s  s  s  s
                    .         .         .         .         .         .         .         .
CGORFZ      NVLGYVVGYLTGRVFKFPEAANRTMAIEIGTQSAGLASGMAGRFFTPEAALPGAVAALVHNI----TGAVYVGLVRNRPL   310
RNNATA      PFSGFLMGYILSALFQLNPSCRRTISMETGFQNIQLCSTILNVTFPPEVIGPLFFFPLLYMIFQLAEGLLIIIIFRCYEK   309
               *sss**s   s*    s  **sss* * *   * * s    * **   *     *s *      * s s s *
                    .         .         .         .         .
CGORFZ      TKASRKKESVAVSS-------------------------------------     324
RNNATA      IKPPKDQTKITYKAAATEDATPAALEKGTHNGNIPPLQPGPSPNGLNSGQMAN     362
             *  s    ss  s
```

Abbildung 11. Sequenzvergleich des von *orfZ* aus *C. glutamicum* abgeleiteten Polypeptids (CGORFZ) mit dem Na^+/Gallensalz-Kotransporter aus der Rattenleber (RNNATA). Identische Aminosäuren wurden durch einen Stern, ähnliche durch ein ´s´ gekennzeichnet. In ORFZ ist der Bereich unterstrichen, der ein Motiv für ein bindeproteinabhängige Transportsysteme trägt.

2.7. Überexpression der Gene *aceA* und *aceB* in *C. glutamicum*

Um zu prüfen, ob die Gene *aceA* und *aceB* sowohl gemeinsam als auch getrennt voneinander funktionsfähig sind, wurden diese in Form geeigneter Fragmente in *C. glutamicum/E. coli*-Pendelvektoren kloniert. Zur Konstruktion des Plasmids pEKA1, welches das *aceA*-Gen ohne angrenzende Bereiche von *aceB* trägt, wurde das *aceA*-Gen aus Plasmid pAB-35 als 2,1 kb *Hpa*I-*Bgl*II-Fragment (siehe **Abbildung 3**) isoliert und in die *Bam*HI Schnittstelle des *C. glutamicum/E. coli*-Pendelvektors pEK0 ligiert. Eine Restriktionskarte von pEKA1 ist in **Abbildung 12** dargestellt. Um das *aceB*-Gen getrennt von *aceA*-Anteilen zu exprimieren, wurde aus pAB-35 das *aceB*-Gen als *Bfr*I-*Pvu*I-Fragment (siehe **Abbildung 3**) isoliert und in die *Bam*HI-Schnittstelle von pEK0 ligiert. Das resultierende Plasmid wurde als pEKB2 bezeichnet und ist in **Abbildung 12** gezeigt. Die Konstruktion des Plasmids pEKAB, in welchem *aceA* und *aceB* gemäß ihrer chromosomalen Orientierung exprimiert wurden, gestaltete sich aufwendiger als die der Plasmide pEKA1 und pEKB2. In **Abbildung 13** ist die Strategie zur Konstruktion von pEKAB aus den beiden Plasmiden pEKB1 und pACB-35 dargestellt. Es wurde zunächst das Plasmid pEKB1 durch *Eco*RI-Behandlung linearisiert und die überhängenden Enden durch *Klenow*-Polymerase zu glatten Enden aufgefüllt. Anschließend wurde durch *Kpn*I-Verdau ein 2,5 kb Fragment herausgeschnitten, auf dem das unvollständige *aceA*-Gen und Teile des *aceB*-Gens lagen. Parallel dazu wurde aus dem Plasmid pACB-35 nach *Bgl*II-, *Klenow*-Polymerase- und *Kpn*I-Behandlung ein Insert herausgeschnitten, auf dem das *aceA*-Gen vollständig vorlag und welches die in pEKB1 herausgeschnittenen Teile des *aceB*-Gens trug. In einer gerichteten Ligation enstand aus beiden Fragmenten der Vektor pEKAB, in dem die Gene *aceA* und *aceB* vollständig und gemäß ihrer chromosomalen Anordnung vorliegen.

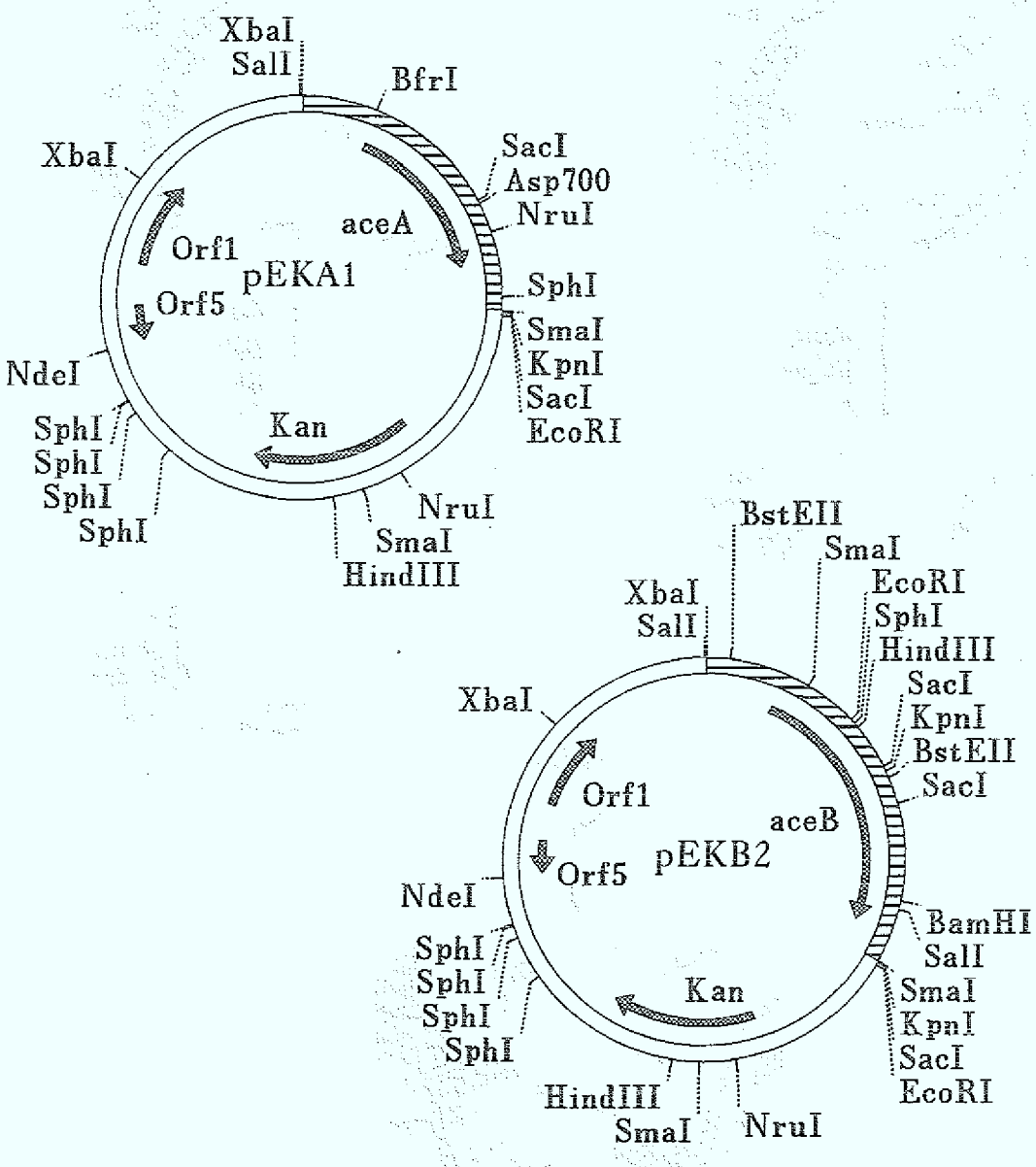


Abbildung 12. Restriktionskarten der *C. glutamicum/E. coli* Pendelvektoren pEKA1 und pEKB2, welche die Gene *aceA* bzw. *aceB* tragen. Der schraffierte Bereich gibt die in die Vektoren ligierten Inserts aus *C. glutamicum* an.

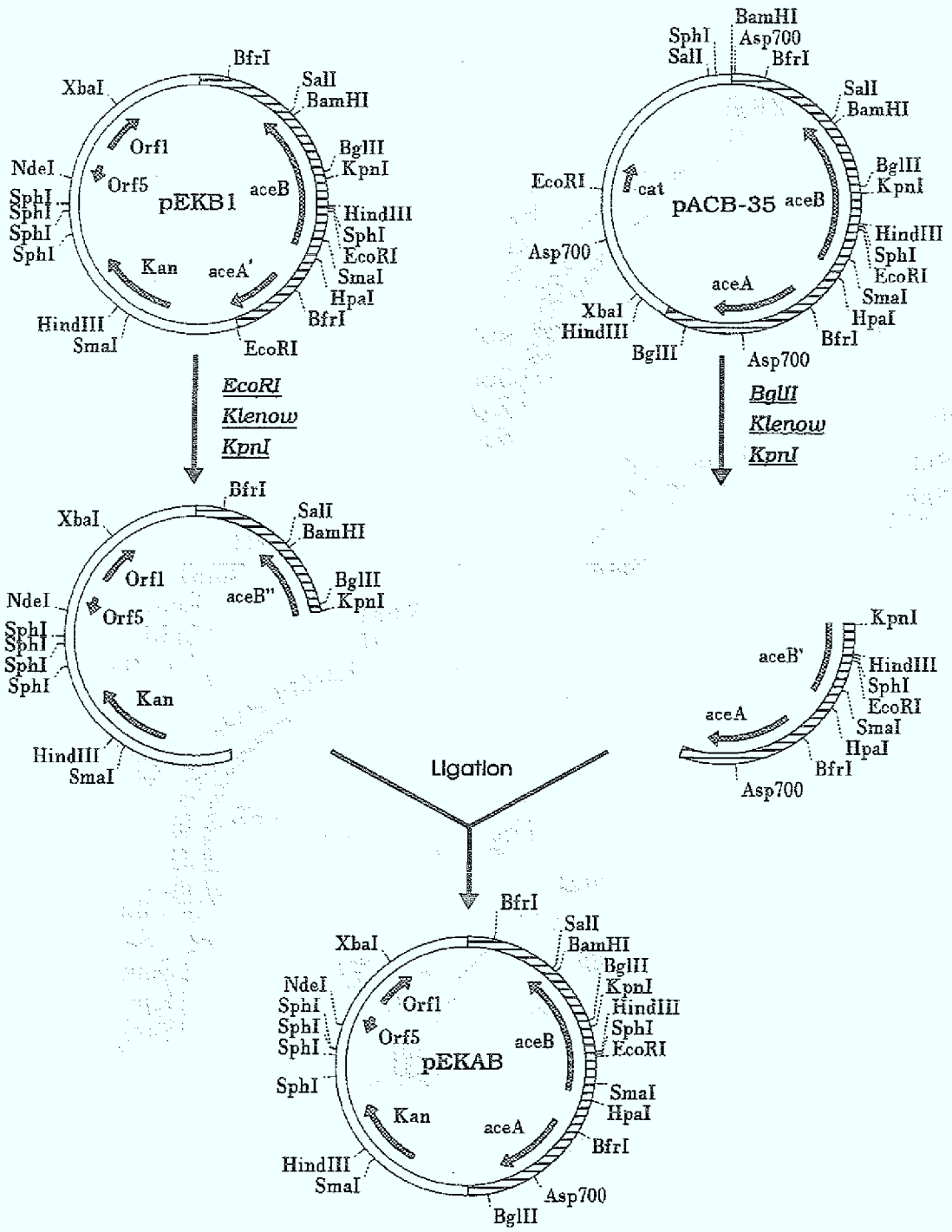


Abbildung 13. Konstruktion des *C. glutamicum/E. coli* Pendelvektors pEKAB aus den Plasmiden pEKB1 und pACB-35. Auf dem Plasmid pEKAB liegen die Gene *aceA* und *aceB* in ihrer chromosomalen Organisation vor und werden gemeinsam exprimiert. Abkürzungen: *aceA*, *aceB*: Gene für Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase; *aceA*': unvollständiges *aceA*-Gen.

Durch Elektroporation wurden die Plasmide pEKA1, pEKB2 und pEKAB in den *C. glutamicum*-Wildtyp transformiert. In den entsprechenden rekombinanten Stämmen wurde die Aktivität von ICL und MSY nach Wachstum in Glucose-MM bzw. Acetat-MM bestimmt. Die Ergebnisse dieser Messung sind in **Tabelle 5** dargestellt. Nach Wachstum auf Glucose zeigten die Stämme 13032(pEKA1) und 13032(pEKAB) zehn- bzw. siebenfach höhere ICL-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp. Die Stämme 13032(pEKB2) und 13032(pEKAB) wiesen bei Wachstum auf Glucose neun- bzw. dreizehnfach gesteigerte MSY-Aktivität verglichen mit der des Wildtyps auf. Nach Wachstum auf Acetat waren bei allen Stämmen die Aktivitäten von ICL und MSY gegenüber denen nach Wachstum auf Glucose deutlich erhöht. Es zeigte sich, daß mit Acetat als C-Quelle die ICL- bzw. MSY-Aktivitäten der Stämme 13032(pEKA1) und 13032(pEKB2) dreifach, die des Stammes 13032(pEKAB) zweifach gegenüber der des Wildtyps erhöht waren. Durch die vorliegenden Ergebnisse konnte die Funktionalität der isolierten Gene *aceA* und *aceB* aus *C. glutamicum* belegt werden. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß auch bei Überexpression von *aceA* und *aceB* die Aktivität von ICL und MSY in Abhängigkeit von der C-Quelle des Mediums reguliert wird.

Tabelle 5. Spezifische Aktivitäten von Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase in Zellextrakten des *C. glutamicum*-Wildtyps und der rekombinanten *C. glutamicum*-Stämme 13032(pEK0), 13032(pEKA1), 13032(pEKB2) und 13032(pEKAB) nach Wachstum in Glucose- bzw. Acetat-MM.

C. glutamicum Stamm	spezifische Aktivität in U/mg			
	Isocitrat-Lyase	Malat-Synthase	Isocitrat-Lyase	Malat-Synthase
	Glucose als C-Quelle		Acetat als C-Quelle	
Wildtyp	0,01	0,04	2,62	2,11
13032(pEK0)	0,01	0,04	2,84	2,23
13032(pEKA1)	**0,10**	0,06	**7,41**	2,03
13032(pEKB2)	0,01	**0,35**	2,30	**6,22**
13032(pEKAB)	**0,07**	**0,53**	**5,08**	**4,62**

2.8. Analyse der *aceA*- und *aceB*-spezifischen Transkripte in *C. glutamicum*

Um die *aceA*- und *aceB*-spezifischen Transkripte in *C. glutamicum* analysieren zu können, wurde Gesamt-RNA des *C. glutamicum*-Wildtyps nach Wachstum auf Glucose- bzw. Acetat-MM isoliert. Durch Northern-Blot-Analyse wurde die Länge der *aceA*- bzw. *aceB*-spezifischen Transkripte sowie deren Menge auf beiden C-Quellen bestimmt. In **Abbildung 14** ist das Ergebnis dieser Untersuchung dargestellt. Sowohl bei Wachstum auf Glucose-MM als auch auf Acetat-MM wurde für das Transkript des *aceB*-Gens eine Länge von 2,75 kb und für das von *aceA* eine Länge von 1,5 kb erhalten. Da die Strukturgene von *aceB* und *aceA* eine Länge von 2,2 kb bzw. 1,3 kb besitzen, zeigt dieses Ergebnis, daß beide Gene monocistronisch organisiert sind. Die Tatsache, daß die Transkriptlänge der Gene unabhängig von der C-Quelle des Mediums war, deutet darauf hin, daß sowohl bei Wachstum auf Glucose als auch auf Acetat die jeweils gleichen Promotoren oder zumindest nah beieinander gelegene Promotoren genutzt werden. Unter der Voraussetzung, daß die Transkription an den vorhergesagten Terminatoren beendet wird, können für die Gene *aceA* und *aceB* die Transkriptionsstartpunkte ungefähr vorhergesagt werden. Der Transkriptionsstartpunkt des *aceA*-Gens kann in einem Bereich von etwa 100 Basen vor dem Startcodon von *aceA* angenommen werden und der des *aceB*-Gens sollte sich ungefähr 350 Basen vor dem Startcodon des *aceB*-Gens befinden. Dies deutet an, daß die Transkriptionsstartpunkte beider Gene nah beieinander liegen. Ein Vergleich der Bandenintensitäten im Northern-Blot zeigt, daß die Transkripte beider Gene bei Wachstum auf Acetat in erheblich größerer Menge vorhanden sind als bei Wachstum auf Glucose (**Abbildung 14**). Durch Verwendung unterschiedlicher Verdünnungen der Gesamt-RNA nach Wachstum von *C. glutamicum* auf Acetat, läßt sich das Verhältnis der *aceB*- bzw. *aceA*-spezifischen Transkripte bei Wachstum auf Glucose bzw. Acetat quantifizieren. Bei Wachstum von *C. glutamicum* auf Acetat-MM zeigt das *aceB*-Gen eine circa 50-fach gesteigerte, und das *aceA*-Gen eine ungefähr 200-fach erhöhte Transkription im Vergleich zu der bei Wachstum auf Glucose-MM. Die Ergebnisse belegen, daß beide Gene in ihrer Expression auf transkriptioneller Ebene reguliert werden.

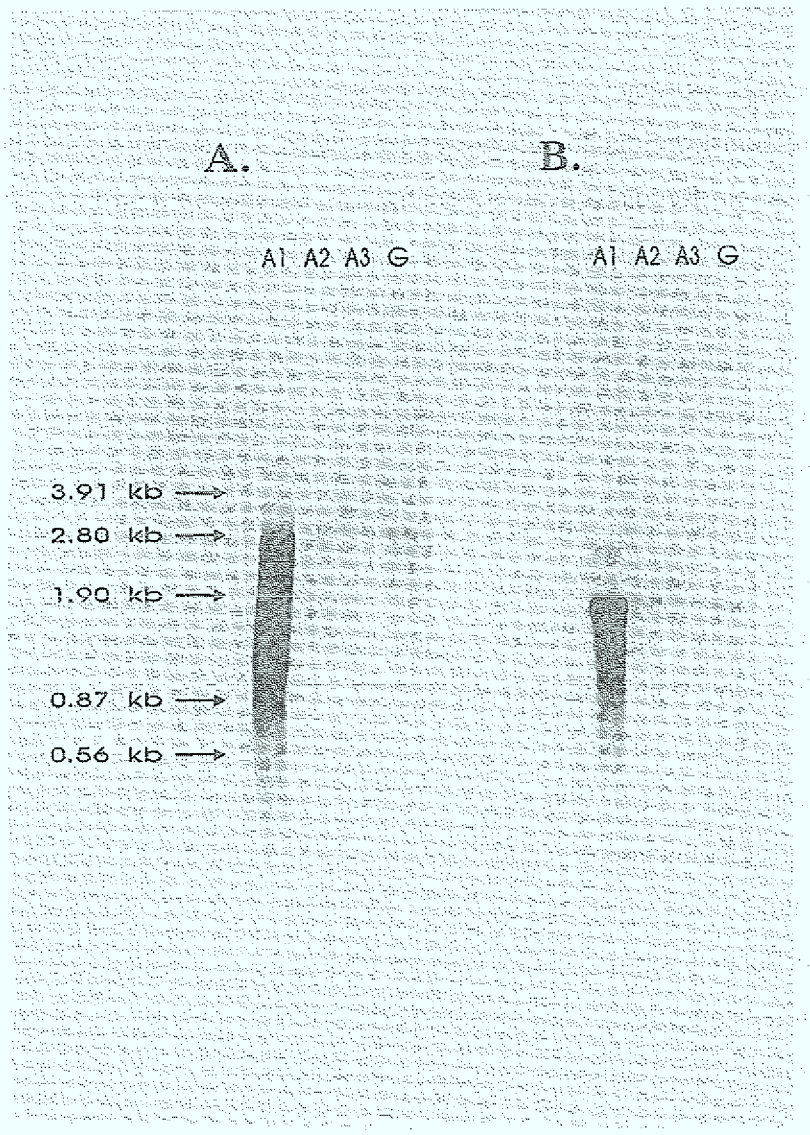


Abbildung 14. Northern-Blot-Analyse der Transkripte von *aceA* bzw. *aceB* nach Wachstum von *C. glutamicum* auf unterschiedlichen C-Quellen. Die Gesamt-RNA wurde (**A.**) gegen eine *aceB*-spezifische, bzw. (**B.**) gegen eine *aceA*-spezifische Sonde hybridisiert. Spur A1: 10 µg Gesamt-RNA nach Wachstum von *C. glutamicum* auf Acetat-MM; Spur A2, A3: Verdünnungen der A1 Fraktion um den Faktor 1:200 bzw. 1:400. Spur G: 10 µg Gesamt-RNA nach Wachstum von *C. glutamicum* auf Glucose-MM.

2.9. Versuch, ein an der Regulation beteiligtes Protein auszutitrieren

Nachdem gezeigt worden war, daß die Expression der Gene *aceA* und *aceB* in *C. glutamicum* auf transkriptioneller Ebene reguliert wird, wurde die Frage untersucht, ob an dieser Regulation ein Regulatorprotein beteiligt ist, welches in dem intergenischen Bereich zwischen *aceA* und *aceB* bindet. Von *E. coli* sind Beispiele bekannt, in denen durch Amplifikation einer DNA-Region, an die ein Regulatorprotein bindet, das betreffende Regulatorprotein austitriert werden konnte (Collado-Vides et *al.*, 1991). Das Austitrieren eines Regulatorproteins führt zu einer veränderten Expression der von diesem Protein regulierten Gene.

Zur Untersuchung der Frage, ob in *C. glutamicum* ein an der Regulation der Gene *aceA* und *aceB* beteiligtes Protein austitriert werden kann, wurde der intergenische Bereich zwischen *aceA* und *aceB* als *Bfr*I-*Dra*I-Fragment isoliert und in die *Bam*HI-Schnittstelle des Vektors pEK0 ligiert. Von dem Vektor pEK0 ist bekannt, daß er mit circa 30 Kopien pro Zelle vorliegt. Das aus der Ligation resultierende Plasmid wurde in den *C. glutamicum*-Wildtyp transformiert. Nach Wachstum auf Glucose- bzw. Acetat-MM wurden in dem entsprechenden rekombinanten Stamm die Aktivitäten von ICL und MSY bestimmt und mit denen des Stammes 13032(pEK0) verglichen. Es zeigte sich, daß sich die Aktivitäten beider Stämme weder bei Wachstum auf Glucose-MM noch bei Wachstum auf Acetat-MM voneinander unterschieden. Aus diesem Experiment muß gefolgert werden, daß, falls ein Regulatorprotein an der Regulation von *aceA* und *aceB* beteiligt ist, dieses nicht durch 30-fache Amplifikation des bindenden DNA-Bereiches austitriert werden kann.

3. Physiologische Untersuchungen zur Funktion des Glyoxylat-Zyklus in *C. glutamicum*

Durch Inaktivierung der Gene *aceA* bzw. *aceB* im Chromosom von *C. glutamicum* wurde untersucht, ob beide Gene zum Wachstum auf Acetat-MM benötigt werden und ob ein Defekt in diesen Genen einen Einfluß auf die Aminosäurebildung eines Produktionsstammes ausübt. Ferner wurde durch Inaktivierung der offenen Leseraster *orfZ* und *thiX* der Frage nachgegangen, ob sie im Acetat-Stoffwechsel von *C. glutamicum* eine Rolle spielen.

3.1. Inaktivierung der Gene *aceA und aceB* im Chromosom von *C. glutamicum* und Analyse der Mutanten

Die Inaktivierung der Gene *aceA* bzw. *aceB* im Chromosom von *C. glutamicum* erfolgte mit Hilfe eines als 'Genunterbrechung' bezeichneten Verfahrens (Schwarzer und Pühler, 1991). Um in *C. glutamicum* das *aceA*-Gen zu inaktivieren, wurde ein *aceA*-internes 0,32 kb *Asp*700-*Bgl*I und um das *aceB*-Gen zu inaktivieren, ein *aceB*-internes 0,41 kb *Sph*I-*Kpn*I-Fragment in den mit *Sca*I geschnittenen Vektor pSUP301 ligiert. Die beiden resultierenden Plasmide wurden in den *E. coli*-Donorstamm S17-1 transformiert und durch Konjugation aus diesem Stamm nach *C. glutamicum* übertragen. Der Vektor pSUP301 vermittelt Resistenz gegenüber Kanamycin, ist jedoch in *C. glutamicum* nicht-replikativ. Durch Selektion auf Kanamycin-Resistenz wurden Klone erhalten, bei denen das pSUP301-Derivat in das Chromosom integriert sein mußte und in diesem passiv mitrepliziert wird. Der Einbau des pSUP301-Derivates in das Chromosom von *C. glutamicum* erfolgt in der überwiegenden Anzahl der Fälle über homologe Rekombination. Da der Vektor pSUP301 keine Anteile aus dem *C. glutamicum*-Chromosom trägt, konnte angenommen werden, daß die homologe Rekombination zwischen den im Chromosom von *C. glutamicum* befindlichen Genen *aceA* bzw. *aceB* und den internen Fragmenten dieser Gene in den pSUP301-Derivaten erfolgt war. Durch den Einbau der pSUP301-Derivate in die Gene *aceA* bzw. *aceB* sollte deren Leseraster unterbrochen und somit die Gene inaktiviert worden sein. Der *C. glutamicum*-Stamm mit potentiellem Defekt im *aceA*-Gen wurde als ASK1, und jener mit potentiellem Defekt im *aceB*-Gen als ALB1 bezeichnet.

Durch Southern-Blot-Analyse wurde der Frage nachgegangen, ob die zur 'Genunterbrechung' verwendeten pSUP301-Derivate tatsächlich in die gewünschten Gene integriert worden waren, d. h. in der Mutante ASK1 in das *aceA*-, und in der Mutante ALB1 in das *aceB*-Gen.

*Sph*I-geschnittene, chromosomale DNA des *C. glutamicum*-Wildtyps sowie die des Stammes ASK1 wurde gegen eine *aceA*-Sonde hybridisiert (**Abbildung 15**). Bei erfolgreicher Inaktivierung von *aceA* sollte bei dem Stamm ASK1 ein Signal bei 9,1 kb auftreten, das aus dem chromosomalen 2,7 kb *Sph*I-Fragment und den 6,4 kb des in *aceA* inserierten pSUP301-Derivates resultiert. Chromosomale DNA des Wildtyps zeigte das zu

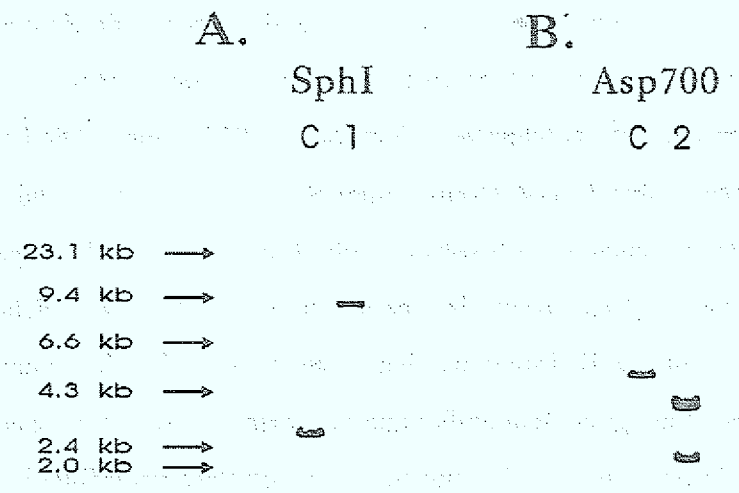


Abbildung 15. Southern-Blot-Hybridisierung chromosomaler DNA des (C) *C. glutamicum*-Wildtyps sowie der von diesem abgeleiteten Mutanten (1) ASK1 und (2) ALB1. Die DNA wurde mit den in der Abbildung angegebenen Restriktionsenzymen geschnitten und (**A.**) gegen eine *aceA*-spezifische bzw. (**B.**) gegen eine *aceB*-spezifische Sonde hybridisiert.

erwartende Signal bei 2,7 kb und chromosomale DNA des Stammes ASK1 zeigte ein Signal bei circa 9,0 kb. Dieses Ergebnis belegt, daß in dem Stamm ASK1 das pSUP301-Derivat in das *aceA*-Gen integriert wurde.

Um für den Stamm ALB1 zu zeigen, daß das pSUP301-Derivat in das *aceB*-Gen integriert worden war, wurde eine *aceB*-spezifische Sonde gegen *Asp*700 verdaute chromosomale DNA des *C. glutamicum*-Wildtyps und des Stammes ALB1 hybridisiert (**Abbildung 15**). Von dem Vektor pSUP301 ist bekannt, daß er zwei *Asp*700 Restriktionsschnittstellen in einem Abstand von 5,0 kb besitzt. In einem *Asp*700-Verdau wird dieses 5,0 kb Fragment herausgeschnitten und ist somit in einer Southern-Blot-Hybridisierung nicht detektierbar. Aus diesem Grund ist in dem Stamm ALB1 nicht ein Signal bei 11,3 kb zu erwarten, was die Summe aus dem chromosomalen 5,0 kb *Asp*700-Fragment und den 6,3 kb des integrierten pSUP301-Derivates ist, sondern es sind vielmehr zwei Signale zu erwarten, deren Summe 6,3 kb ergibt, da die aus dem Vektor geschnittene 5,0 kb Bande mit einer *aceB*-spezifischen Sonde nicht detektiert wird. Im Southern-Blot zeigte chromosomale DNA des Wildtyps das zu erwartende Signal bei 5,0 kb. Die Mutante ALB1 wies zwei Signale, eines bei 2,1 kb und eines bei 4,0 kb auf. Die Summe beider Signale entspricht den zu erwartenden 6,3 kb. Dieses Ergebnis bestätigt, daß in dem Stamm ALB1 ein pSUP301-Derivat in das *aceB*-Gen integriert wurde.

Um zu testen, ob die Integration der pSUP301-Derivate in den Mutanten ASK1 und ALB1 zur Inaktivierung des *aceA*- bzw. *aceB*-Gen geführt hatte, wurden in dem *C. glutamicum*-Wildtyp sowie in den Mutanten ASK1 und ALB1 die Enzymaktivitäten von ICL und MSY bestimmt. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in **Tabelle 6** dargestellt. Der Stamm ASK1 besaß weder auf Glucose-MM noch auf Glucose/Acetat-MM nachweisbare ICL-Aktivität, zeigte jedoch unveränderte MSY-Aktivität im Vergleich zum *C. glutamicum*-Wildtyp. Umgekehrt verhielt es sich mit der Mutante ALB1, die normale ICL-Aktivität aber keine detektierbare MSY-Aktivität aufwies. Die enzymatischen Messungen belegen somit, daß in dem Stamm ASK1 das *aceA*-Gen und in dem Stamm ALB1 das *aceB*-Gen inaktiviert wurde.

Tabelle 6. Isocitrat-Lyase- und Malat-Synthase-Aktivitäten des *C. glutamicum*-Wildtyps und der *C. glutamicum*-Mutanten ASK1 und ALB1 nach Wachstum in Glucose- bzw. Glucose/Acetat-MM.

C. glutamicum Stamm	spezifische Aktivität in U/mg			
	Isocitrat-Lyase	Malat-Synthase	Isocitrat-Lyase	Malat-Synthase
	Glucose als C-Quelle		Glucose/Acetat als C-Quellen	
Wildtyp	0,01	0,04	1,21	1,14
ASK1	**< 0,001**	0,04	**< 0,001**	1,08
ALB1	0,01	**< 0,01**	1,23	**< 0,01**

Um zu untersuchen, ob die Inaktivierung der Gene *aceA* bzw. *aceB* einen Einfluß auf das Wachstumsverhalten von *C. glutamicum* hat, wurde das Wachstum des Wildtyps mit dem der Mutanten ASK1 und ALB1 auf unterschiedlichen C-Quellen verglichen. **Tabelle 7** gibt das Ergebnis dieser Wachstumsversuche wieder. Sowohl die ICL-defekte Mutante ASK1 als auch der MSY-defekte Stamm ALB1 zeigte im Vergleich zum *C. glutamicum* Wildtyp unverändertes Wachstumsverhalten mit Glucose als C-Quelle. Im Gegensatz zum Wildtyp waren jedoch beide Mutanten nicht mehr in der Lage, auf Acetat zu wachsen. Wurde ein Gemisch aus Acetat plus Glyoxylat als C-Quelle angeboten, so zeigte die ICL-defekte Mutante ASK1 erneut Wachstum. Da *C. glutamicum* nicht in der Lage ist, auf Glyoxylat zu wachsen, zeigt dieses Ergebnis, daß ASK1 aufgrund seines ICL-Defektes kein Glyoxylat mehr bildet und daß durch Gabe von Glyoxylat dieser Defekt aufgehoben werden kann. Die MSY-defekte Mutante ALB1 wurde durch ein Gemisch aus Glucose und Acetat in ihrem Wachstum gehemmt. Es kann vermutet werden, daß die Mutante ALB1 in Anwesenheit von Acetat toxische Konzentrationen an Glyoxylat akkumuliert, da sie keine funktionelle MSY besitzt. Durch die Wachstumsexperimente konnte somit gezeigt werden, daß die Gene *aceA* und *aceB* für das Wachstum von *C. glutamicum* auf Acetat essentiell sind.

Tabelle 7. Wachstumsverhalten des *C. glutamicum*-Wildtyps und der Stämme ASK1 und ALB1 auf Minimalmedium mit verschiedenen C-Quellen. ++: sehr gutes Wachstum; +: gutes Wachstum; +/-: schlechtes Wachstum; -: kein Wachstum

	Kohlenstoffquelle				
C. glutamicum Stamm	Glucose	Acetat	Glyoxylat	Acetat plus Glyoxylat	Acetat plus Glucose
Wildtyp	++	+	-	+	++
ASK1	++	-	-	+	++
ALB1	++	-	-	-	+/-

Um der Frage nachzugehen, ob der Glyoxylat-Zyklus bei Wachstum auf Glucose zur Aminosäurebildung benötigt wird, wurden in dem Lysinproduzenten *C. glutamicum* MH20-22B die Gene *aceA* bzw. *aceB* in der gleichen Weise wie im *C. glutamicum*-Wildtyp durch 'Genunterbrechung' inaktiviert. Als MSK1 wurde der Stamm mit inaktiviertem *aceA*-Gen und als MLB1 jener mit zerstörtem *aceB*-Gen bezeichnet. Nach 32-stündiger Fermentation in 10%igem Glucose-MM wurden die produzierten Lysinmengen der *C. glutamicum*-Stämme MH20-22B, MSK1 und MLB1 miteinander verglichen. Die externe Lysinkonzentration des Stammmes MH20-22B lag bei 51 mM, die der beiden Mutanten MSK1 bzw. MLB1 bei jeweils 48 mM. Aus diesem Ergebnis muß der Schluß gezogen werden, daß *C. glutamicum* bei Wachstum auf Glucose den Glyoxylat-Zyklus nicht zur Lysinproduktion benötigt.

3.2. Inaktivierung der offenen Leseraster *orfZ* und *thiX* im Chromosom von *C. glutamicum* und Analyse der Mutanten

Zur Inaktivierung von *orfZ* wurde ein *orfZ*-internes 0,33 kb *Ava*I-*Ecl*XI-Fragment und zur Inaktivierung von *thiX* wurde ein *thiX*-internes 0,20 kb *Taq*I-*Taq*I-Fragment in die *Sca*I-Restriktionsschnittstelle des Vektors pSUP301 ligiert. Die entsprechenden Konstrukte wurden in den *E. coli*-Mobilisatorstamm S17-1 transformiert und durch Konjugation aus diesem nach *C. glutamicum* übertragen. Durch Selektion auf Resistenz gegenüber Kanamycin wurden Mutanten mit inaktiviertem *orfZ*- bzw. *thiX*-Gen erhalten. Diese wurden als EGS1 und JAA1 bezeichnet.

Der im *orfZ*-Gen defekte Stamm EGS1 zeigte im Vergleich zum Wildtyp unverändertes Wachstumsverhalten auf allen getesteten C-Quellen (Glucose, Ribose, Fructose, Maltose, Saccharose, Acetat, Pyruvat, Lactat, Citrat, Succinat, Fumarat, Malat, Gluconat, Glutamat, Pepton, Soyton und Trypton). Darüberhinaus waren die spezifischen ICL- und MSY-Aktivitäten dieses Stammes sowie die Regulation der beiden Enzyme mit der des *C. glutamicum*-Wildtyps vergleichbar. Aus diesen Ergebnissen muß der Schluß gezogen werden, daß *orfZ* keinerlei Bedeutung im Acetat-Stoffwechsel besitzt und damit die genaue Funktion von *orfZ* ungeklärt bleibt.

Die Mutante JAA1 mit inaktiviertem *thiX*-Gen war zwar in der Lage, auf Vollmedium zu wachsen, sie zeigte jedoch kein Wachstum auf Minimalmedium. Durch Supplementations-versuche konnte für die Mutante JAA1 eine Auxotrophie für Thiamin nachgewiesen werden. Obwohl die Thiaminbiosynthese noch nicht vollständig aufgeklärt wurde, ist von *E. coli* bekannt, daß Thiamin aus der Kopplung von 4-Methyl-5(ß-Hydroxyethyl)Thiazol (MHET) mit 4-Amino-5-Hydroxymethyl-2-Methylpyrimidinphosphat (HMP) entsteht (Brown und Williamson, 1987). Beide Substanzen wurden auf ihre Fähigkeit getestet, den Stamm JAA1 zu supplementieren. Während HMP keinen Effekt zeigte, konnte durch Zusatz von MHET zum Glucose-MM das Wachstum von JAA1 wiederhergestellt werden. Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, daß *thiX* für die Biosynthese von MHET notwendig ist. Es bleibt zu klären, ob das *thiX* Genprodukt eine bislang unbekannte Reaktion bei der Synthese von MHET katalysiert oder ob es funktionell einem bereits bekannten Enzym dieses Biosyntheseweges entspricht, aber eine zu diesem abweichende Primärstruktur besitzt.

4. Biochemische Charakterisierung von Isocitrat-Lyase, Malat-Synthase und Isocitrat-Dehydrogenase aus *C. glutamicum*

Das Glyoxylat-Zyklus-Enzym ICL konkurriert mit dem Citrat-Zyklus-Enzym IC-DH um das gemeinsame Substrat Isocitrat. Um für *C. glutamicum* Aussagen über eine Regulation des C-Flusses zwischen beiden Zyklen machen zu können, wurde sowohl die ICL als auch IC-DH aus *C. glutamicum* biochemisch charakterisiert. Darüberhinaus wurde die MSY aus *C. glutamicum* biochemisch untersucht. Bei der Charakterisierung dieses Enzyms wurde der Frage nachgegangen, ob sich die MSY nicht nur hinsichtlich ihrer Größe und Primärstruktur, sondern auch in Bezug auf ihre biochemischen Eigenschaften von den MSYs anderer Organismen unterscheidet.

4.1. Reinigung, Quantifizierung und biochemische Darstellung der Isocitrat-Lyase aus *C. glutamicum*

Aufreinigung der Isocitrat-Lyase aus *C. glutamicum*

Um die ICL aus *C. glutamicum* biochemisch charakterisieren zu können, wurde sie aus Extrakten des Stammes 13032(pEKA1) nach Wachstum unter induzierenden Bedingungen, d. h. auf Acetat-MM, isoliert. Ein typisches Reinigungsschema der ICL aus *C. glutamicum* ist in **Tabelle 8** dargestellt. Mit Serva-Blue gefärbte SDS-PAGE-Gele zeigten, daß das Enzym bis zu apparenter Homogenität gereinigt worden war (**Abbildung 16**). Die Ausbeute an ICL lag nach dem letzten Reinigungsschritt bei 27%. Die ICL konnte bei -20°C drei Wochen ohne Aktivitätsverlust gelagert werden.

Tabelle 8. Schema zur Aufreinigung der Isocitrat-Lyase aus *C. glutamicum* 13032(pEKA1) nach Wachstum in Acetat-MM.

Reinigungs-schritt	Volumen (ml)	Gesamt-protein (mg)	Gesamt-Isocitrat-Lyase-Aktivität (U)	Spezifische Isocitrat-Lyase Aktivität (U/mg)	Aktivitäts-ausbeute (%)	Reinigungs-faktor
Rohextrakt	2,3	30,4	226	7,4	100	1,0
Ultrazentri-fugation	10,0	12,4	127	10,3	56	1,4
MonoQ, pH 6,0	4,0	2,7	76	28,2	34	3,8
MonoQ, pH 8,0	2,0	2,0	60	30	27	4,1

Quantifizierung der Isocitrat-Lyase in Zellextrakten von *C. glutamicum* nach Wachstum auf unterschiedlichen C-Quellen

Durch Verwendung der gereinigten ICL als Standard war es in SDS-PAGE-Experimenten möglich, auch in Zellextrakten die genaue Lage der ICL zu bestimmen. Zur Klärung der Frage, ob unterschiedliche C-Quellen zu sichtbaren Veränderungen des ICL-Gehaltes im Zellextrakt führten, wurden Extrakte des *C. glutamicum*-Wildtyps sowie des *aceA*-überexprimierenden Stammes 13032(pEKA1) einer SDS-PAGE unterzogen. Mittels Densitometrie wurde der Anteil von ICL am Gesamtzellprotein ermittelt. **Abbildung 16** zeigt ein typisches Gel, das zu einer densitometrischen Messung herangezogen wurde. Während in Extrakten des *C. glutamicum*-Wildtyps nach Wachstum in Glucose-MM keine ICL-Proteinbande zu erkennen war, zeigte sich eine sehr deutliche Bande nach Wachstum in Acetat-MM. In Extrakten des Stammes 13032(pEKA1) war nach Wachstum in Acetat-MM eine noch weitaus intensivere ICL-Bande zu erkennen. Mittels Densitometrie wurde der Anteil der ICL am Gesamtprotein bei Wachstum auf Acetat-MM für den *C. glutamicum*-Wildtyp mit 8% und für den Stamm 13032(pEKA1) mit 25% bestimmt. Der circa dreifache

Anstieg an ICL-Protein in dem rekombinanten Stamm korreliert gut mit der ICL-Aktivität, die im Vergleich zum Wildtyp bei Wachstum auf Acetat-MM ebenfalls dreifach erhöht war.

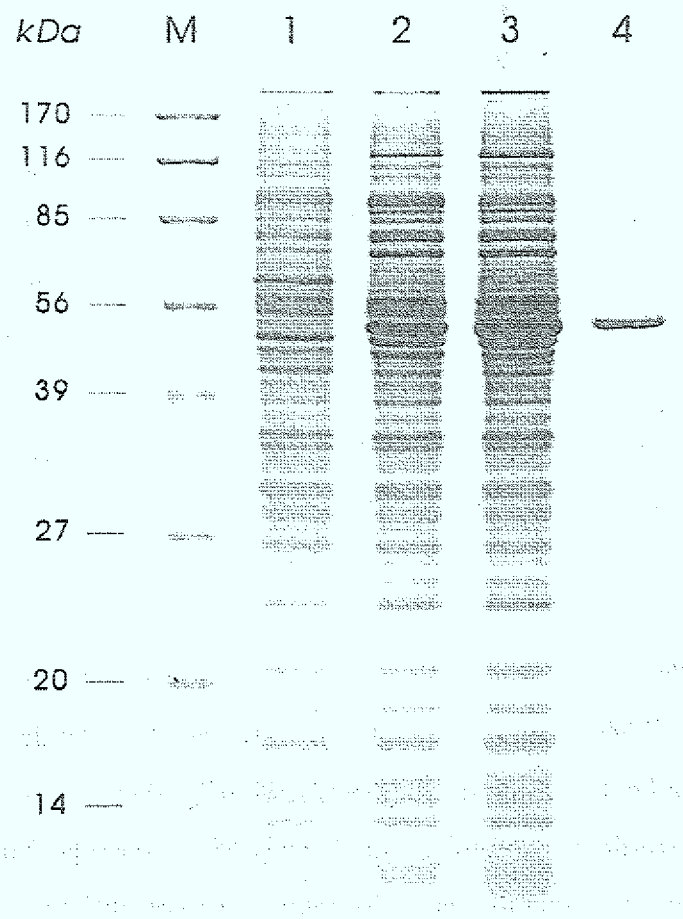


Abbildung 16. SDS-PAGE von gereinigter Isocitrat-Lyase aus *C. glutamicum* sowie von Rohextrakten des *C. glutamicum*-Wildtyps und des Stammes 13032(pEKA1) nach Wachstum in Acetat- bzw. Glucose-MM. Spur M: α_2-Makroglobulin (170 kDa), β-Galactosidase (116 kDa), Fructose-6-phosphat-Kinase (85 kDa), Glutamat-Dehydrogenase (56 kDa), Aldolase (39 kDa), Triosephosphat-Isomerase (27 kDa), Trypsin-Inhibitor (20 kDa) und Lysozym (14 kDa); Spur 1: *C. glutamicum*-Wildtyp nach Wachstum auf Glucose; Spur 2: *C. glutamicum*-Wildtyp nach Wachstum auf Acetat; Spur 3: *C. glutamicum* 13032(pEKA1) nach Wachstum auf Acetat; Spur 4: gereinigte Isocitrat-Lyase aus *C. glutamicum* 13032(pEKA1).

Biochemische Charakterisierung der Isocitrat-Lyase aus *C. glutamicum*

Durch Gelfiltration wurde das native Molekulargewicht der ICL mit 180000 und mittels SDS-PAGE-Analyse das Molekulargewicht der ICL-Untereinheiten mit 48000 bestimmt (**Abbildung 16**). Diese Ergebnisse deuten an, daß die native ICL aus *C. glutamicum* ein Tetramer aus vier identischen Untereinheiten ist. Durch Ansequenzierung des N-Terminus der gereinigten ICL konnte gezeigt werden, daß das Enzym mit der AS-Sequenz S-N-V-G-K-P-R-T-A-Q beginnt. Die erhaltene AS-Sequenz bestätigt den vorhergesagten Translationsstartpunkt von *aceA* bei bp 517 (siehe Kapitel 2.4.). Das Fehlen des Methionins am N-Terminus zeigt, daß es durch Prozessierung abgespalten worden ist. Eine derartige Prozessierung konnte bereits anhand der DNA-Sequenz vorhergesagt werden (Ben-Bassat und Bauer, 1987).

Der Einfluß des pH-Wertes auf die Aktivität der ICL wurde unter Verwendung von 50 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 5,0 - 8,0) und 50 mM MOPS/NaOH-Puffer (pH 7,0 - 9,0) untersucht. Es zeigte sich, daß das Enzym maximale Aktivität in 50 mM MOPS/NaOH bei einem pH von 7,3 aufwies.

Um den Einfluß von divalenten Kationen auf die Aktivität der ICL zu untersuchen, wurden Mg^{2+}, Co^{2+} und Mn^{2+} auf ihre Fähigkeit getestet, die Aktivität der ICL zu beeinflussen. Es zeigte sich, daß bei Fehlen dieser Kationen keine ICL-Aktivität festzustellen war. Maximale ICL-Aktivität wurde in Gegenwart von 15 mM Mg^{2+} erreicht. Mn^{2+} und Co^{2+} konnten Mg^{2+} partiell ersetzen und führten zu Restaktivitäten von 26% bzw. 31%.

Zur Bestimmung des Temperaturoptimums sowie der Temperaturstabilität der ICL aus *C. glutamicum* wurde die Temperatur des Testansatzes diskontinuierlich in 3°C-Schritten von 20°C auf 50°C erhöht. Das Enzym zeigte maximale Aktivität bei 40°C und wurde bei Temperaturen über 44°C rasch inaktiviert.

Um den Reaktionsmechanismus der ICL zu untersuchen, wurden Hemmungsstudien sowohl der Spaltungsreaktion als auch der Kondensationsreaktion der ICL durchgeführt. In **Tabelle 9** sind die Hemmungstypen und -konstanten von Inhibitoren der Spaltungs- bzw. Kondensationsreaktion angegeben. Bei Analyse der Spaltungsreaktion der ICL wurde Succinat als linear nichtkompetitiver Hemmstoff hinsichtlich Isocitrat identifiziert. Glycolat und Oxalat, als Strukturanaloga des Glyoxylats, zeigten linear kompetitive Inhibition in Bezug auf Isocitrat, wohingegen Itaconat und PEP, als Strukturanaloga des Succinats,

Tabelle 9. Kinetische Untersuchungen und Effektorstudien an gereinigter Isocitrat-Lyase aus *C. glutamicum*. Neben den Michaelis-Menten- bzw. Inhibitorkonstanten ist der Hemmungstyp der einzelnen Effektoren dargestellt.

Substrat/Inhibitor	Typ der Hemmung	Michaelis- bzw. Hemmungskonstante
a) Spaltungsreaktion		
threo-D_S(+)-Isocitrat		0,28 mM
Succinat	linear nichtkompetitiv	1,48 mM
Glycolat	linear kompetitiv	0,69 mM
Oxalat	linear kompetitiv	7,10 µM
3-Phosphoglycerat	linear kompetitiv	1,15 mM
6-Phosphogluconat	linear kompetitiv	1,07 mM
Itaconat	linear unkompetitiv	5,05 µM
Phosphoenolpyruvat	linear unkompetitiv	0,46 mM
L-Malat	linear gemischt	1,46 mM
Fructose-1,6-Bisphosphat	linear gemischt	1,27 mM
b) Kondensationsreaktion		
Glyoxylat		0,34 mM
Succinat		0,61 mM
Hemmstoff bezüglich Succinat		
Phosphoenolpyruvat	linear kompetitiv	0,42 mM
Glycolat	linear gemischt	0,23 mM
Hemmstoff gegenüber Glyoxylat		
Phosphoenolpyruvat	linear unkompetitiv	2,30 mM
Glycolat	linear kompetitiv	0,45 mM

zu einer linear unkompetitiven Hemmung führten. In der Kondensationsreaktion war PEP ein linear kompetitiver Inhibitor in Bezug auf Succinat und zeigte linear unkompetitive Hemmung hinsichtlich Glyoxylat. Glycolat wies linear gemischte Inhibition bezüglich Succinat auf und zeigte linear kompetitive Hemmung hinsichtlich Glyoxylat. Aufgrund dieser Ergebnisse kann für die ICL aus *C. glutamicum* der folgende Reaktionsmechanismus vorhergesagt werden: Nach Spaltung des Isocitrats in Glyoxylat und Succinat muß zunächst Succinat das Enzym verlassen, bevor Glyoxylat abdissoziieren kann.

Um zu untersuchen, ob die biochemischen Eigenschaften der ICL eine Feinkontrolle des C-Flusses zwischen Glyoxlylat- und Citrat-Zyklus erlauben, wurde deren Affinität hinsichtlich Isocitrat sowie deren Hemmung durch physiologisch relevante Inhibitoren analysiert. Die Ergebnisse dieser Analyse sind ebenfalls in **Tabelle 9** dargestellt. Die ICL zeigt nur mäßige Affinität hinsichtlich Isocitrat (Km=0,28 mM). Ihre Aktivität wird signifikant durch die Zentralstoffwechselmetabolite 3-Phosphoglycerat, 6-Phosphogluconat, PEP, Fructose-1,6-bisphosphat, Succinat und Malat in ihrer Aktivität gehemmt. Die Ergebnisse lassen vermuten, daß die genannten Metabolite an der Feinregulation der ICL-Aktivität beteiligt sind. Parallel zu den Messungen mit der gereinigten ICL wurden Effektorstudien im Zellextrakt durchgeführt. Auffallend dabei war, daß die gereinigte ICL aus *C. glutamicum* signifikant durch PEP in ihrer Aktivität gehemmt, die ICL im Zellextrakt jedoch nicht durch diesen Metaboliten inhibiert wurde.

4.2. Reinigung, Quantifizierung und biochemische Darstellung der Malat-Synthase aus *C. glutamicum*

Aufreinigung der Malat-Synthase aus *C. glutamicum*

Aus Extrakten des *C. glutamicum*-Stammes 13032(pEKB2) wurde nach Wachstum unter induzierenden Bedingungen die MSY aufgereinigt und biochemisch analysiert. In **Tabelle 10** ist ein typisches Reinigungsschema der MSY aus *C. glutamicum* dargestellt. Mit Serva-Blue gefärbte SDS-PAGE-Gele belegten, daß das Enzym bis zur Homogenität gereinigt worden war (**Abbildung 17**). Die Ausbeute an gereinigter MSY betrug nach dem letzten Reinigungsschritt 28%. Das Enzym konnte bei 4°C drei Wochen ohne nennenswerten Aktivitätsverlust gelagert werden.

Tabelle 10. Schema zur Aufreinigung der Malat-Synthase aus *C. glutamicum* 13032(pEKB2) nach Wachstum in Acetat-MM.

Reinigungs-schritt	Volumen (ml)	Gesamt-protein (mg)	Gesamt-Malat-Synthase-Aktivität (U)	Spezifische Malat-Synthase-Aktivität (U/mg)	Aktivitäts-ausbeute (%)	Reinigungs-faktor
Rohextrakt	2,3	66,7	415,4	6,23	100	1,0
Ultrazentri-fugation	18,0	30,78	408,2	13,26	98	2,1
MonoQ, pH 6,0	3,0	3,93	109,2	27,79	26	4,5
MonoQ, pH 8,0	2,0	3,54	101,4	28,64	24	4,6

Quantifizierung der Malat-Synthase in Zellextrakten von *C. glutamicum*

Da bereits für die Isocitrat-Lyase aus *C. glutamicum* gezeigt worden war, daß deren Anteil am Gesamtzellprotein bei Wachstum auf Acetat drastisch anstieg, war es interessant, auch den Anteil der MSY am Gesamtzellprotein in *C. glutamicum* zu untersuchen. Es wurden dazu Zellextrakte des *C. glutamicum*-Wildtyps sowie des *aceB*-überexprimierenden Stammes 13032(pEKB2) nach Wachstum auf unterschiedlichen C-Quellen durch SDS-PAGE analysiert. Der Anteil der MSY am Gesamtzellprotein wurde durch densitometrische Messungen bestimmt. **Abbildung 17** zeigt ein typischen Gel, welches für eine densitometrische Messung verwendet wurde. Während bei Wachstum des *C. glutamicum*-Wildtyps auf Glucose-MM keine MSY-Proteinbande zu erkennen war, lag in diesem Stamm bei Wachstum auf Acetat-MM der Anteil von MSY am Gesamtzellprotein bei 6%. In dem rekombinanten Stamm 13032(pEKB2) betrug nach Wachstum in Acetat-MM der MSY-Anteil am Gesamtprotein ungefähr 20%. Der circa 3-fache Anstieg an MSY am Gesamtzellprotein des Stammes 13032 (pEKB2) korreliert mit der im Vergleich zum Wildtyp erhöhten MSY-Aktivität (siehe Kapitel 2.7.).

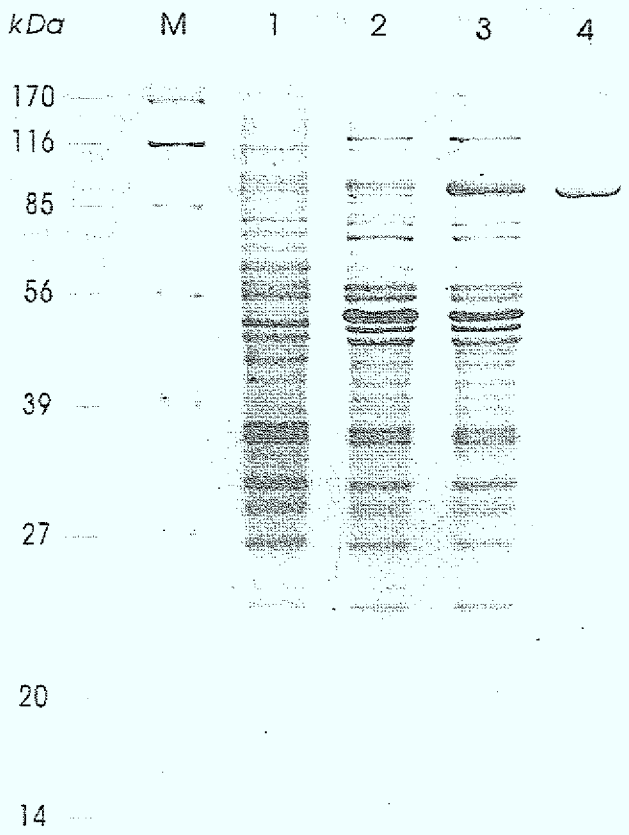


Abbildung 17. SDS-PAGE gereinigter Malat-Synthase aus *C. glutamicum* sowie von Rohextrakten des *C. glutamicum*-Wildtyps und des Stammes 13032(pEKB2) nach Wachstum in Acetat- bzw. Glucose-MM. Spur M: α_2-Makroglobulin (170 kDa), β-Galactosidase (116 kDa), Fructose-6-phosphat-Kinase (85 kDa), Glutamat-Dehydrogenase (56 kDa), Aldolase (39 kDa), Triosephosphat-Isomerase (27 kDa), Trypsin-Inhibitor (20 kDa) und Lysozym (14 kDa); Spur 1: *C. glutamicum*-Wildtyp nach Wachstum auf Glucose-MM; Spur 2: *C. glutamicum*-Wildtyp nach Wachstum auf Acetat-MM; Spur 3: *C. glutamicum* 13032(pEKB2) nach Wachstum auf Acetat-MM; Spur 4: gereinigte Malat-Synthase aus *C. glutamicum* 13032(pEKB2).

Biochemische Charakterisierung der Malat-Synthase aus *C. glutamicum*

Durch Gelfiltration konnte für das native Enzym eine Größe von 80000 ermittelt werden und mittels SDS-PAGE wurde für die MSY-Untereinheiten ein Molekulargewicht von 90000 bestimmt (**Abbildung 17**). Die MSY aus *C. glutamicum* liegt somit in ihrer nativen Form als Monomer vor.

Durch Ansequenzierung des N-Terminus der gereinigten MSY wurde die folgende Sequenz erhalten: T-E-Q-E-L-L-S-A-Q-T. Diese Sequenz bestätigt den anhand der DNA-Sequenz vorhergesagten Translationsstartpunkt bei bp 622 (siehe Kapitel 2.4.). Wie auch in der ICL ist in der MSY das N-terminale Methionin durch Prozessierung abgespalten worden.

Um das pH-Optimum der MSY-Reaktion zu ermitteln, wurde die MSY-Aktivität in 50 mM MES/NaOH (pH 6,0 - 7,5) und 50 mM Tris/HCl (pH 7,0 - 8,5) bestimmt. Es zeigte sich, daß das pH-Optimum der MSY bei 7,6 in 50 mM Tris/HCl Puffer lag.

Zur Bestimmung des Temperaturoptimums der MSY wurde die Temperatur des Tests diskontinuierlich in 3°C Schritten von 20°C auf 50°C erhöht. Die MSY wies maximale Aktivität bei einer Temperatur von 43°C auf.

Um den Einfluß divalenter Kationen auf die Aktivität der MSY zu bestimmen, wurde der MSY-Test in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen an Mg^{2+}, Co^{2+} und Mn^{2+} durchgeführt. Die maximale MSY-Aktivität wurde bei 40 mM Mg^{2+} erreicht. Die Kationen Co^{2+} bzw. Mn^{2+} konnten Mg^{2+} teilweise ersetzen und führten zu einer Restaktivität von 25% bzw. 15%. In Abwesenheit dieser Kationen zeigte die MSY keine Aktivität.

Zur weiteren biochemischen Charakterisierung der MSY wurde ihre Affinität zu den Substraten Acetyl-CoA und Glyoxylat sowie der Einfluß von Effektoren auf die MSY-Aktivität untersucht. Es zeigte sich, daß die MSY zu beiden Substraten hohe Affinität besitzt. Die Michaelis-Konstante für Acetyl-CoA lag bei 11 µM, die für Glyoxylat bei 28 µM. Als kompetitive Inhibitoren hinsichtlich Glyoxylat wurden Oxalat und Glycolat und als kompetitiver Hemmstoff bezüglich Acetyl-CoA wurde ATP identifiziert. Die Inhibitor-Konstante für Oxalat lag bei 0,27 mM, die für Glycolat bei 0,44 mM und die für ATP bei 4,3 mM. Da *C. glutamicum* eine intrazelluläre ATP-Konzentration von 4-5 mM aufweist (Krämer und Lambert, 1990), ist eine Beteiligung von ATP an der Regulation der MSY möglich.

4.3. Charakterisierung der Isocitrat-Dehydrogenase in Zellextrakten von *C. glutamicum*

Um Aussagen bezüglich der Regulation des C-Flusses zwischen Glyoxylat- und Citrat-Zyklus zu treffen, wurde die IC-DH-Aktivität in Zellextrakten des *C. glutamicum*-Wildtyps biochemisch charakterisiert. Es zeigte sich, daß die IC-DH aus *C. glutamicum* hohe Affinität zu ihren Substraten Isocitrat (Ks: 12 µM) und NADP (Ks: 8 µM) besitzt. Durch Effektorstudien der IC-DH in Zellextrakten konnte gezeigt werden (**Tabelle 11**), daß die IC-DH aus *C. glutamicum* durch die Effektoren Glyoxylat, 2-Oxoglutarat bzw. Oxalacetat alleine gar nicht bzw. nur wenig in ihrer Aktivität gehemmt wurde. Ein Gemisch aus 2-Oxoglutarat plus Glyoxylat bzw. Oxalacetat plus Glyoxylat zeigte jedoch einen sehr deutlichen Effekt: Je 1 mM Konzentrationen von Oxalacetat plus Glyoxylat führten zu einer vollständigen Hemmung der IC-DH-Aktivität. Wurden beide Metabolite in Konzentrationen von jeweils 0,1 mM zugesetzt, so erfolgte noch eine 80%ige Hemmung der IC-DH-Aktivität. Eine Hemmung der IC-DH durch derartig niedrige Konzentrationen an Zentralstoffwechselmetaboliten deutet auf eine physiologische Bedeutung bei der Regulation des C-Flusses zwischen Glyoxlylat- und Citrat-Zyklus hin.

Tabelle 11. Effektormessungen an der Isocitrat-Dehydrogenase in Zellextrakten des *C. glutamicum*-Wildtyps nach Wachstum in Glucose-MM.

Effektor der Isocitrat-Dehydrogenase	spezifische Aktivität der Isocitrat-Dehydrogenase (U/mg)	Hemmung der Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivität (%)
kein	1,07	0
1mM Glycolat	1,05	0
1 mM 2-Oxoglutarat	0,92	14
1 mM Oxalacetat	0,91	15
je 1 mM 2-Oxoglutarat/Glyoxylat	0,63	40
je 1 mM Oxalacetat/Glyoxylat	< 0,01	100
je 0,1 mM Oxalacetat/Glyoxylat	0,21	80

5. Untersuchungen zum Acetat-Stoffwechsel und dessen Regulation in *C. glutamicum*

Um ein vollständiges Bild des Acetat-Stoffwechsels in *C. glutamicum* zu erhalten, wurden neben den Schlüsselenzymen des Glyoxylat-Zyklus auch die Acetat-aktivierenden Schritte in diesem Organismus untersucht. Darüberhinaus wurde versucht, den Mechanismus der Regulation des Acetat-Stoffwechsels in *C. glutamicum* sowohl genetisch als auch physiologisch näher zu charakterisieren.

5.1. Nachweis von Acetat-Kinase und Phosphotransacetylase in *C. glutamicum*

Um zu testen, ob *C. glutamicum* das AK/PTA System zur Aktivierung von Acetat benutzt, wurden in Extrakten des *C. glutamicum*-Wildtyps die Aktivitäten von AK und PTA nach Wachstum auf Glucose, Glucose/Acetat bzw. Acetat bestimmt. In **Tabelle 12** sind die bei dieser Messung erhaltenen Aktivitäten von AK und PTA aufgeführt. Es zeigte sich, daß die Aktivität von AK und PTA bei Wachstum auf Acetat ungefähr siebenfach gegenüber der nach Wachstum auf Glucose erhöht war. Auch nach Wachstum auf einem Gemisch beider C-Quellen war die Aktivität von AK bzw. PTA fast vierfach gegenüber der nach Wachstum auf Glucose erhöht. Die vorliegenden Ergebnisse deuten an, daß in *C. glutamicum* Acetat über das AK/PTA System zu Acetyl-CoA aktiviert wird und zeigen, daß die Aktivität aller Schlüsselenzyme des Acetat-Stoffwechsels (AK, PTA, ICL und MSY) durch die C-Quelle des Mediums reguliert wird.

Tabelle 12. Spezifische Aktivitäten von Acetat-Kinase und Phosphotransacetylase in Zellextrakten des *C. glutamicum*-Wildtyps nach Wachstum auf verschiedenen C-Quellen.

	spezifische Aktivität in U/mg	
C-Quelle	Acetat-Kinase	Phosphotransacetylase
Glucose	0,15	0,38
Glucose/Acetat	0,38	1,10
Acetat	1,03	2,80

5.2. Analyse von *C. glutamicum*-Mutanten mit Defekten im Acetat-Stoffwechsel

Von Acetylphosphat ist bekannt, daß es in *E. coli* vielfältige Funktionen innerhalb von Signaltransduktionsketten einnimmt. So spielt es eine Rolle bei der Chemotaxis sowie bei der Expressionsregulation von Genen des Phosphat- bzw. des Stickstoffhaushaltes (McCleary et *al.*, 1993). Zur Klärung der Frage, ob Defekte in AK bzw. PTA einen Einfluß auf den Stoffwechsel von *C. glutamicum* ausüben, wurden mittels N-Methyl-N′-Nitro-N-Nitroso-Guanidin (NMG)-Mutagenese entsprechende Mutanten von *C. glutamicum* erzeugt. Diese wurden auf Resistenz gegenüber Fluoracetat selektioniert. Fluoracetat ist ein toxisches Analogon des Acetats (Peters, 1957). Es wird in der Zelle durch die ACS bzw. das AK/PTA-System zu Fluoracetyl-CoA aktiviert und durch die Citrat-Synthase unter Bildung von Fluorcitrat in den Citrat-Zyklus geschleust. Fluorcitrat ist ein irreversibler Hemmstoff der Aconitase und führt durch Blockade dieses Enzyms zum Zelltod.

Um zu prüfen, welche Konzentration an Fluoracetat zur vollständigen Wachstumshemmung von *C. glutamicum* führte, wurden mit dem *C. glutamicum*-Wildtyp sowie dem restriktionsdefekten Stamm R127 Wachstumsversuche auf Glucose-MM und unterschiedlichen Fluoracetat-Konzentrationen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, daß *C. glutamicum* R127 und der Wildtyp auf 0,5%igem Glucose-MM durch 0,5% bzw. 1,0% Fluoracetat vollständig in ihrem Wachstum gehemmt wurden.

NMG-mutagenisierte Zellen der *C. glutamicum*-Stämme R127 und des Wildtyps wurden auf Glucose-MM Platten mit 0,5% bzw. 1.0% Fluoracetat ausplattiert. Klone, die Resistenz gegenüber Fluoracetat zeigten, wurden erneut auf diesem Medium ausgestrichen und anschließend auf Glucose-MM bzw. Acetat-MM auf Wachstum getestet. Von insgesamt 60 untersuchen Klonen beider Stämme zeigten 19 des *C. glutamicum*-Wildtyps und 30 des Stammes R127 kein Wachstum auf Acetat. Vom Wildtyp wurden vier und von dem Stamm R127 zwölf Klone einer enzymatischen Charakterisierung nach Wachstum unter induzierten Bedingungen, d. h. auf Glucose plus Acetat, unterzogen.

In **Tabelle 13** ist das Ergebnis dieser Untersuchung dargestellt. Die Analyse der von dem *C. glutamicum*-Wildtyp abgeleiteten Mutanten zeigte, daß der Stamm 13AK einen Defekt in seiner AK und der Stamm 13TA einen Defekt in seiner PTA aufwies. Die zwei Mutanten 13RE1 und 13RE2 besaßen Aktivitäten von AK, PTA, ICL und MSY, wie sie unter nicht induzierten Bedingungen, d. h. bei Wachstum auf Glucose, zu erwarten gewesen wären. Von den zwölf untersuchten Klonen des *C. glutamicum*-Stammes R127 zeigten die drei Mutanten RAK 1 - 3 einen Defekt ihrer AK, die fünf Mutanten RTA 1- 5 besaßen keine funktionsfähige PTA und in den drei Mutanten RKP 1 - 3 waren sowohl AK als auch PTA nicht mehr nachweisbar. Die Mutante REG1 wies Enzymaktivitäten von AK, PTA, ICL und MSY auf, wie sie unter nicht induzierten Bedingungen zu erwarten gewesen wären.

Die Isolierung von Mutanten, die auch unter induzierten Bedingungen nicht mehr in der Lage waren, die Aktivitäten von AK, PTA, ICL und MSY zu erhöhen, läßt vermuten, daß diese in der Regulation der genannten Enzyme einen Defekt besitzen und daß die Aktivität von AK, PTA, ICL und MSY gemeinsam reguliert wird. Da für die ICL- und MSY-Gene eine transkriptionelle Regulation gezeigt werden konnte, darf angenommen werden, daß die Expression der Gene für AK, PTA, ICL und MSY über ein gemeinsames Regulatorprotein reguliert wird. Bei einem Regulatorprotein kann zwischen einem Aktivator und einem Repressor unterschieden werden (Collado-Vides et *al.*, 1991). Ein Aktivator wird benötigt, um die Expression von Genen anzuschalten, während ein Repressor die Expression von Genen verhindert. In den Mutanten 13RE1, 13RE2 und REG1 ist die Aktivität von AK, PTA, ICL und MSY bei Gabe von Acetat nicht erhöht. Dies deutet an, daß in diesen entweder ein Aktivatorprotein funktionslos ist oder daß durch Mutation ein Repressor zu einem ´Superrepressor´ wurde, welcher auch unter dereprimierenden Bedingungen die Expression von Genen verhindert (Miller, 1978). Die Umwandlung eines Repressors zu einem ´Superrepressor´ erfolgt äußerst selten, da nur wenige Veränderungen in dem Protein zu diesem Phänotyp führen. Im Gegensatz dazu sollten Mutationen, die ein Aktivatorprotein funktionslos machen, relativ häufig auftreten. Die Häufigkeit mit der regulationsdefekte Mutanten isoliert wurden (3 von 16) deutet an, daß es sich bei dem Regulatorprotein um einen Aktivator handelt.

Tabelle 13. Spezifische Aktivitäten von Acetat-Kinase, Phosphotransacetylase, Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase in Zellextrakten des *C. glutamicum*-Wildtyps, des restriktionsdefekten *C. glutamicum*-Stammes R127 sowie den von diesen abgeleiteten Fluoracetat-resistenten Stämme nach Wachstum auf Glucose- bzw. Glucose/Acetat-MM.

C. glutamicum-Stamm	spezifische Aktivität in U/mg			
	Acetat-Kinase	Phosphotrans-acetylase	Isocitrat-Lyase	Malat-Synthase
Wachstum auf Glucose:				
Wildtyp	0,15	0,38	0,01	0,04
R127	0,13	0,26	0,01	0,04
Wachstum auf Glucose plus Acetat:				
Wildtyp	0,38	1,10	1,05	0,89
R127	0,36	0,59	0,97	0,78
13AK	**< 0,01**	0,20	0,02	0,05
13TA	0,17	**< 0,04**	0,02	0,04
13RE 1 + 2*	0,20	0,34	0,04	0,06
RAK 1 - 3*	**< 0,02**	0,25	0,03	0,06
RTA 1 - 5*	0,19	**< 0,05**	0,02	0,05
RKP 1 - 3*	**< 0,02**	**< 0,05**	0,02	0,05
REG1	0,18	0,29	0,06	0,08

* Die Enzymaktivitäten stellen Mittelwerte der einzelnen Mutanten dar.

5.3. Physiologische Untersuchungen zur Regulation des Acetat-Stoffwechsels in *C. glutamicum*

Bei Wachstum auf Acetat waren in *C. glutamicum* die Aktivitäten von AK, PTA, ICL und MSY deutlich gegenüber denen bei Wachstum auf Glucose erhöht. Für ICL und MSY aus *C. glutamicum* konnte gezeigt werden, daß deren Aktivitäten auf transkriptioneller Ebene reguliert wurden. Die Isolierung der *C. glutamicum*-Mutanten 13RE1, 13RE2 und REG1, in denen die Regulation der Aktivität von AK, PTA, ICL und MSY gestört waren, ließ vermuten, daß die Gene der genannten Enzyme durch den gleichen Mechanismus reguliert werden.

Im folgenden wurde die Frage untersucht, welcher Metabolit (= Induktor) bei Wachstum auf Acetat gebildet oder dessen Konzentration verändert werden muß, um eine Aktivitätsveränderung von AK, PTA, ICL und MSY zu bewirken. Zu den Untersuchungen wurden *C. glutamicum*-Mutanten mit Defekten in den Schlüsselenzymen des Acetat-Stoffwechsels herangezogen. In Extrakten der Mutanten wurde nach Wachstum in Glucose/Acetat-MM die Aktivität von AK, PTA, ICL und MSY bestimmt. **Tabelle 14** gibt eine Übersicht der dabei gewonnenen Ergebnisse. In Anwesenheit von Acetat kann für die *C. glutamicum*-Mutante 13AK, die einen Defekt in der AK besitzt, eine Erhöhung der zellinternen Acetat-Konzentration erwartet werden. Für die Mutante 13TA, die einen Defekt in der PTA aufweist, kann in Gegenwart von Acetat ein Anstieg des intrazellulären Acetylphosphats angenommen werden. Beide Mutanten waren nicht mehr in der Lage, unter induzierenden Bedingungen die Aktivität der übrigen Enzyme des Acetat-Stoffwechsels zu erhöhen. Dies zeigt, daß weder ein Anstieg der Acetat- noch ein Anstieg der Acetylphosphat-Konzentration zur Erhöhung der Aktivität von AK, PTA, ICL und MSY in *C. glutamicum* führt. Die *C. glutamicum*-Mutanten ASK1 und MSK1, die einen Defekt in der ICL bzw. MSY besaßen, wiesen in Gegenwart von Acetat eine Aktivitätserhöhung der am Acetat-Stoffwechsel beteiligten Enzyme auf. Dieses Ergebnis deutet an, daß bereits vor Eintritt des Kohlenstoffs in den Glyoxylat-Zyklus der gesuchte Induktor gebildet oder dessen Konzentration verändert wurde.

Tabelle 14. Spezifische Aktivitäten von Acetat-Kinase, Phospotransacetylase, Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase in verschiedenen *C. glutamicum*-Stämmen nach Wachstum auf Glucose/Glutamat-, Glucose/Acetat- bzw. Acetat-MM.

C. glutamicum-Stamm	Genotyp	C-Quelle	spezifische Aktivität in U/mg			
			Acetat-Kinase	Phospho-trans-acetylase	Isocitrat-Lyase	Malat-Synthase
Wildtyp		Glucose/ Glutamat	0,25	0,56	0,02	0,04
Wildtyp		Glucose/ Acetat	0,41	1,10	1,05	0,89
Wildtyp		Acetat	1,03	2,80	2,70	2,10
13AK	*ack*⁻	Glucose/ Acetat	< 0,01	0,20	0,02	0,05
13TA	*pta*⁻	Glucose/ Acetat	0,17	< 0,04	0,02	0,04
ASK1	*aceA*⁻	Glucose/ Acetat	0,38	1,00	< 0,001	0,89
ALB1	*aceB*⁻	Glucose/ Acetat	0,34	1,03	1,10	0,02
DD1	*icd*⁻	Glucose/ Glutamat	0,96	2,26	0,76	0,59
NTH	*gltA*⁻	Glucose/ Glutamat	0,98	2,54	1,73	1,17

Um den Induktor weiter einzugrenzen, wurden die im Labor vorhandenen, definierten *C. glutamicum*-Mutanten DD1 und NTH, die einen Defekt in der IC-DH bzw. in der Citrat-Synthase besitzen, verwendet. In Extrakten dieser Stämme wurden die Aktivitäten von AK, PTA, ICL und MSY nach Wachstum unter nicht induzierten Bedingungen, d. h. in Glucose/Glutamat-MM, bestimmt (**Tabelle 14**). Der IC-DH-Defekt der Mutante DD1 sollte

bei Wachstum auf Glucose/Glutamat zu einer Erhöhung der zellinternen Konzentrationen von Isocitrat, Aconitat, Citrat und Acetyl-CoA führen. Die Mutante DD1 zeigte auch unter nicht-induzierten Bedingungen eine starke Erhöhung der Aktivität von AK, PTA, ICL und MSY. Aus diesem Experiment konnte gefolgert werden, daß eine Erhöhung eines oder mehrerer Metabolite zwischen Acetyl-CoA und Isocitrat für die Aktivitätssteigerung der Schlüsselenzyme des Acetat-Stoffwechsels verantwortlich ist.

Zur Unterscheidung, ob Acetyl-CoA oder einer der Citrat-Zyklus-Metabolite Citrat, Aconitat oder Isocitrat der gesuchte Induktor ist, wurde die Citrat-Synthase-negative *C. glutamicum*-Mutante NTH verwendet. Aufgrund ihres Defektes ist in dieser Mutante bei Wachstum auf Glucose/Glutamat eine Erhöhung der zellinternen Acetyl-CoA-Konzentration zu erwarten. Die Aktivität sämtlicher Schlüsselenzyme des Acetat-Stoffwechsels waren in dieser Mutante nach Wachstum unter nicht-induzierten Bedingungun stark erhöht. Von allen getesteten Mutanten waren die Aktivitäten von AK, PTA, ICL und MSY in der Mutante NTH am deutlichsten gesteigert und entsprachen annähernd denen des Wildtyps bei Wachstum auf Acetat. Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, daß die Erhöhung der zellinternen Acetyl-CoA-Konzentration in *C. glutamicum* zur Erhöhung der Aktivitäten von AK, PTA, ICL und MSY führt.

IV. DISKUSSION

Im Jahre 1960 wurde für coryneforme Bakterien erstmalig Wachstum auf Acetat als einziger C-Quelle beschrieben (Shiio, 1960). Bereits kurze Zeit später konnten die Schlüsselenzyme des Acetat-Stoffwechsels Acetat-Kinase (AK), Phosphotransacetylase (PTA), Isocitrat-Lyase (ICL) und Malat-Synthase (MSY) in diesem Organismus enzymatisch nachgewiesen werden (Shiio et *al.*, 1969). Bei Wachstum auf Acetat zeigten Mutanten von *C. glutamicum* ssp. *flavum* eine im Vergleich zu Wachstum auf Glucose gesteigerte Threonin-Produktion (Akashi et *al.*, 1979). Trotz der Bedeutung des Acetat-Stoffwechsels bei der Aminosäure-Produktion von *C. glutamicum* wurden bisher die Schlüsselenzyme des Acetat-Stoffwechsels in diesem Organismus weder molekularbiologisch noch biochemisch näher untersucht. Die vorliegende Arbeit beschreibt die genetische und biochemische Charakterisierung von ICL und MSY aus *C. glutamicum* sowie Untersuchungen zur Regulation des Acetat-Stoffwechsels in diesem Organismus.

Versuche, das *aceA*-Gen aus *C. glutamicum* durch heterologe Komplementation einer ICL-defekten *E. coli*-Mutante zu isolieren, verliefen ergebnislos. Durch Komplementation einer MSY-defekten *E. coli*-Mutante konnte jedoch das *aceB*-Gen sowie das daneben befindliche *aceA*-Gen aus *C. glutamicum* isoliert werden. In rekombinanten *E. coli*-Stämmen, die die Gene *aceA* und *aceB* auf Cosmid bzw. Plasmid enthielten, wurde keine erhöhte ICL-, allerdings eine erhöhte MSY-Aktivität festgestellt. Dies deutet an, daß im Gegensatz zum *aceB*-Gen das *aceA*-Gen aus *C. glutamicum* in *E. coli* nicht exprimiert wird und erklärt, warum dieses Gen nicht durch Komplementation der ICL-defekten *E. coli*-Mutante erhalten wurde. Obwohl zahlreiche Gene aus *C. glutamicum* durch heterologe Komplementation geeigneter *E. coli*-Mutanten isoliert wurden (Martin, 1989), gibt es auch corynebakterielle Gene, deren Promotoren in *E. coli* nicht als solche erkannt werden. So konnte für die Aminosäure-Biosynthesegene *lysA* und *hom* sowie für das Citrat-Synthase-Gen *gltA* nachgewiesen werden, daß sie in *E. coli* nicht exprimiert werden (Mateos et *al.*, 1988; Yeh et *al.*, 1988; persönliche Mitteilung B. Eikmanns). Durch Subklonierungsexperimente wurde in der vorliegenden Arbeit ein *aceB*-tragendes 3,8 kb *Bst*EII-*Asp*700-Fragment isoliert, welches den MSY-Defekt der *E. coli*-Mutante DV21AO5 komplementierte, in *C. glutamicum* jedoch zu keiner erhöhten MSY Aktivität führte. Dies läßt vermuten, daß dem 3,8 kb *Bst*EII-*Asp*700-Fragment der corynebakterielle *aceB*-

Promotor fehlt, daß es aber eine Sequenz vor dem *aceB*-Gen geben muß, die in *E. coli* als Promotor fungiert. Durch Analyse des DNA-Bereiches vor dem *aceB*-Strukturgen konnte in einem Abstand von 131 bp vor dem *aceB*-Gen eine Sequenz identifiziert werden, die Ähnlichkeit zu der Konsensussequenz eines *E. coli*-Promotors aufweist (Harley und Reynolds, 1987). Diese vor dem *aceB*-Gen identifizierte Sequenz setzt sich aus einer potentiellen -35 Region der Sequenz 'TTGAAA', einem Spacer von 19 bp Länge und einer potentiellen -10 Region der Sequenz 'TAGATT' zusammen. Es besteht daher die Möglichkeit, daß in *E. coli* weder der corynebakterielle *aceA*- noch der *aceB*-Promotor erkannt und die Expression von *aceB* durch einen artifiziellen *E. coli*-Promotor hervorgerufen wurde. Diese Annahme wird durch die Tatsache unterstützt, daß die Expression der Gene *aceA* und *aceB* in *C. glutamicum* auf transkriptioneller Ebene reguliert wird, und regulierte Promotoren häufig auf die Anwesenheit des Regulatorproteins angewiesen sind, um funktionell zu sein (Makino et *al.*, 1988).

Während in Eukaryoten bereits zahlreiche ICL- bzw. MSY-Gene sequenziert wurden (Gainey et *al.*, 1992; Barth und Scheubler, 1993; Sandemann et *al.*, 1991; Fernandez et *al.*, 1992; 1993b), liegen nur wenige Daten zu den entsprechenden Genen aus Prokaryoten vor. In *S. typhimurium* wurde die Organisation der Gene *aceA* und *aceB* durch Insertionsmutagenese charakterisiert (Wilson et *al.*, 1987). *E. coli* war bislang der einzige prokaryotische Organismus, in dem die Gene *aceA* und *aceB* sequenziert worden waren (Matsuoka und McFadden, 1988; Byrne et *al.*, 1988). Neben den entsprechenden Sequenzen aus *E. coli* stellen die Gene *aceA* und *aceB* aus *C. glutamicum* somit die einzigen bekannten ICL- bzw. MSY-kodierenden Sequenzen aus Prokaryoten dar. Die Sequenzierung der Gene *aceA* und *aceB* aus *C. glutamicum* ergab, daß diese nebeneinander auf dem Genom vorliegen und in antiparalleler Richtung transkribiert werden. Northern-Blot-Analysen zeigten, daß beide Gene in *C. glutamicum* monocistronisch organisiert sind. Dies steht im Gegensatz zu Befunden bei *E. coli* und *S. typhimurium*, in denen die Gene *aceA*, *aceB* und *aceK* ein Operon bilden (LaPorte et *al.*, 1985; Maloy et *al.*, 1982; Wilson et *al.*, 1987). Durch Northern-Blot-Analyse wurde für die Gene *aceA* und *aceB* aus *C. glutamicum* bei Wachstum auf Acetat eine 50 - 200-fach gesteigerte Transkription nachgewiesen. Auch für *E. coli*, *S. cerevisiae* und *A. nidulans* konnte bei Wachstum auf Acetat eine signifikante Erhöhung der Transkription des ICL- bzw. MSY-Gens gezeigt werden (Hartig et *al.*, 1992; Sandemann und Hynes, 1989; Maloy und Nunn, 1982). Da in *C. glutamicum* die Gene *aceA*

und *aceB* einen Abstand von nur 597 bp zueinander besitzen, kann angenommen werden, daß in dem gemeinsamen Bereich zwischen beiden Genen deren Promotoren sowie die für die Regulation der Expression verantwortlichen Strukturen lokalisiert sind. Die Vermutung liegt nahe, daß in *C. glutamicum* die Gene *aceA* und *aceB* über den gleichen Mechanismus und möglicherweise auch die gleichen DNA-Bereiche in ihrer Expression reguliert werden. Neben der gemeinsamen Regulation von *aceA* und *aceB* bietet die Organisation beider Gene auch die Möglichkeit zu einer unabhängigen Regulation der Expression. In *E. coli* wurde eine derartige differentielle Regulation z. B. bei der Expression der Gene *merR* und *merTPAD* nachgewiesen, die für die Resistenz von *E. coli* gegenüber Quecksilber verantwortlich sind (O'Halloran et *al.*, 1989) und eine den *C. glutamicum*-Genen *aceA* und *aceB* vergleichbare Organisation aufweisen. In *E. coli* reprimiert das Genprodukt von *merR* in Abwesenheit von Quecksilber die Expression aller Gene des *mer*-Regulons einschließlich seiner eigenen. Während das *merR*-Genprodukt in Gegenwart von Quecksilber weiterhin seine eigene Synthese reprimiert, aktiviert es die Transkription der in die andere Richtung transkribierten Gene *merTPAD*. Differentielle Expression von *aceA* oder *aceB* in *C. glutamicum* setzt Wachstumsbedingungen voraus, in denen entweder nur ICL oder nur MSY benötigt werden. Von *E. coli* ist bekannt, daß zum Wachstum auf Glycolat bzw. Glyoxylat nur die MSY, nicht aber die ICL benötigt wird (Vanderwinkel und Vlieghere, 1968). Gleiches ist von *S. cerevisiae* bei Wachstum auf Allantoin beschrieben worden (Yoo et *al.*, 1985). In *Methylosinus* und *Methylocystis* wird Formaldehyd über den Serin-Isocitrat Weg verstoffwechselt, in welchem ICL, aber keine MSY benötigt wird (Higgins et *al.*, 1981). Diese Beispiele zeigen, daß Wachstumsbedingungen existieren, unter welchen eine differentielle Expression von *aceA* und *aceB* sinnvoll ist. *C. glutamicum* kann jedoch weder auf Glyoxylat noch auf Glycolat wachsen (eigene Ergebnisse), und zudem ist dieser Organismus nicht zu methylotrophem Wachstum fähig (Liebl, 1991). Es können somit zum jetzigen Zeitpunkt keine Bedingungen angegeben werden, in denen eine differentielle Expression von *aceA* und *aceB* für *C. glutamicum* von Vorteil wäre.

Der Sequenzvergleich der ICL aus *C. glutamicum* mit den entsprechenden Enzymen aus *E. coli*, *C. tropicalis*, *N. crassa* und *B. napus* zeigte einen hohen Grad an Ähnlichkeit zwischen den Enzymen. Es konnten insgesamt vier Bereiche innerhalb der verglichenen ICL-Sequenzen identifiziert werden, in denen die Enzyme eine besonders hohe Identität zueinander aufweisen. Für das *E. coli*-Enzym konnte innerhalb der ersten konservierten

Domäne $Lysin_{193}$ und $Cystein_{195}$ sowie in der dritten Domäne $Serin_{319}$ und $Serin_{321}$ als essentiell für die Katalyse nachgewiesen werden (Diehl und McFadden, 1993; Ko et *al.*, 1992; Nimmo et *al.*, 1989). In Übereinstimmung zu diesen Befunden trägt die ICL aus *C. glutamicum* identische Aminosäuren an den entsprechenden Stellen, was für die Bedeutung dieser Aminosäuren bei der Katalyse spricht.

Anhand der DNA-Sequenz des *aceA*-Gens konnte für das ICL-Polypeptid ein Molekulargewicht von 47228 vorhergesagt werden. Diese Größe wurde durch SDS-PAGE-Analyse mit gereinigter ICL aus *C. glutamicum* bestätigt. Während eukaryotische ICLs ein Molekulargewicht von circa 65000 aufweisen (Vanni et *al.*, 1990), scheint das der prokaryotischen ICLs variabler zu sein. Für die ICL von *E. coli* und die eines thermophilen *Bacillus* wurde ein Molekulargewicht von ungefähr 48000 angegeben (Chell et *al.*, 1978; Robertson und Reeves, 1987), wohingegen die ICLs von *Acinetobacter calcoaceticus* und einer *Rhodopseudomonas* Species ein Molekulargewicht von etwa 63000 aufweisen (Hoyt et *al.*, 1991; Tahama et *al.*, 1990). Der Sequenzvergleich der abgeleiteten ICL-Sequenzen von *C. glutamicum* und *E. coli* mit denen eukaryotischer Organismen zeigte bei den prokaryotischen Enzymen eine Lücke gleicher Lage und Ausdehnung. Diese ist hauptsächlich für die geringere Größe der ICLs von *C. glutamicum* und *E. coli* verantwortlich und stellt offensichtlich eine gemeinsame Eigenschaft der kleinen prokaryotischen ICLs dar. Da in Eukaryoten die ICL im Cytoplasma synthetisiert wird und in die Glyoxysomen transportiert werden muß, wurde angenommen, daß der zusätzliche Bereich innerhalb der eukaryotischen ICLs Signale für den Transport in die Glyoxysomen enthalten könnte (Gainey et *al.*, 1992; Vanni et *al.*, 1990). In einem *in vitro* System konnte allerdings gezeigt werden, daß die N-terminalen 168 AS der ICL von *Ricinus* für einen Transport des verkürzten Enzyms in Sonnenblumen-Glyoxysomen ausreichten (Behari und Baker, 1993). Diesem Bereich der ICL fehlt die Region, die für die spezifischen Signale zum Transport in die Glyoxysomen angenommen worden war. Von den Autoren wurde daher vermutet, daß der N-Terminus der ICL für den Transport des Enyzms in die Glyoxysomen verantwortlich ist (Behari und Baker, 1993). In der vorliegenden Arbeit konnte durch Vergleich der N-terminalen Bereiche verschiedener ICLs gezeigt werden, daß die beiden prokaryotischen Enzyme im Bereich ihres N-Terminus eine Lücke von 13 AS besitzen, in der die eukaryotischen Enzyme eine Anhäufung geladener AS aufweisen. Darüberhinaus zeigte die Analyse aller ICL-Sequenzen, daß die eukaryotischen ICLs an ihrem N-Terminus

ein gemeinsames Motiv aus drei Aminosäuren besitzen (M-A-K), welches in den beiden prokaryotischen Enzymen fehlt. Weitere Arbeiten werden zeigen müssen, ob der zusätzliche Bereich innerhalb der eukaryotischen ICLs oder das Aminosäure-Motiv 'M-A-K' tatsächlich bei der Translokation der eukaryotischen ICLs in die Glyoxysomen eine Rolle spielt.

Anhand der Sequenz des *aceB*-Gens aus *C. glutamicum* konnte für das abgeleitete MSY-Polypeptid eine Länge von 739 Aminosäuren vorhergesagt und durch Ansequenzierung des N-Terminus der gereinigten MSY der vorhergesagte Translationsstartpunkt bestätigt werden. Bisher bekannte MSYs weisen Größen zwischen 533 und 568 Aminosäuren auf (Hikida et *al.*, 1991; Fernandez et *al.*, 1993b), so daß die MSY aus *C. glutamicum* um mindestens 170 Aminosäuren länger als alle bisher bekannten MSYs ist. In einem Sequenzvergleich der MSY aus *C. glutamicum* mit den entsprechenden Enzymen von *E. coli*, *S. cerevisiae*, *N. crassa* und *B. napus* wies das corynebakterielle Enzym nur 5% Identität zu den anderen MSYs auf, obwohl diese mit 29% Identität zueinander deutlich konserviert sind. Durch Vergleich der MSY aus *C. glutamicum* mit den entsprechenden Enzymen anderer Organismen konnte gefolgert werden, daß die MSY aus *C. glutamicum* an ihrem N-Terminus einen zusätzlichen Bereich von 170 Aminosäuren besitzt. Da dieser Bereich anderen MSYs fehlt, ist es unwahrscheinlich, daß er für die Katalyse des Enzyms essentiell ist. Vielmehr könnte dieser Bereich strukturelle Funktionen besitzen oder als regulatorische Domäne für einen bisher nicht identifierten Effektor dienen. Neben der Größe weicht auch die Primärstruktur der MSY aus *C. glutamicum* von den MSYs anderer Organismen ab. Um die abweichende Primärstruktur der MSY aus *C. glutamicum* zu erklären, könnte vermutet werden, daß dieses Enzym zu anderen MSYs nicht homolog ist und sich somit von einem anderen Vorläufermolekül ableitet. Eine attraktivere Erklärungsmöglichkeit ist die Annahme, daß die MSY aus *C. glutamicum* zu anderen MSYs homolog ist, daß aber aufgrund der Verlängerung des N-Terminus die MSY aus *C. glutamicum* ihren C-terminalen Bereich signifikant verändern mußte, um ihre biochemischen Eigenschaften beizubehalten. Diese Hypothese bietet die Möglichkeit, die MSY aus *C. glutamicum* für funktionelle Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus von MSYs zu verwenden. Da die corynebakterielle MSY nur wenige konservierte Aminosäuren zu anderen MSYs aufweist, kann vermutet werden, daß diese essentielle strukturelle und/oder katalytische Funktionen besitzen. Durch ortsspezifische Mutagenese des *aceB*-Gens aus *C.*

glutamicum könnten diese Bereiche auf ihre Bedeutung für Aktivität und Affinität der MSY aus *C. glutamicum* untersucht werden. In diesem Zusammenhang ist von Bedeutung, daß MSY und Citrat-Synthase ähnliche Reaktionen katalysieren, nämlich die Kondensation von Acetyl-CoA mit einer 2-Oxosäure. Die Citrat-Synthase aus Schweineherz konnte bereits kristallisiert und ihre dreidimensionale Struktur aufgeklärt werden. Sowohl durch Röntgenstrukturanalyse als auch durch ortsspezifische Mutagenese wurden in der Citrat-Synthase His_{274} und Asp_{375} als für die Katalyse essentiell identifiziert (Alter et *al.*, 1990; Wiegand und Remington, 1986). Es ist auffällig, daß im C-terminalen Bereich aller MSYs, auch dem von *C. glutamicum*, ein hoch-konserviertes Histidin in einem Abstand von circa 80 Aminosäuren zu einem hoch-konservierten Aspartat lokalisiert ist (in der MSY aus *C. glutamicum* His_{564} und Asp_{647}). Ob diese beiden Aminosäuren bei die Katalyse der MSY aus *C. glutamicum* eine Rolle spielen, müssen weitere Versuche zeigen.

In zahlreichen Organismen konnten Isoenzyme von ICL und MSY nachgewiesen werden. So wurden Isoenzyme der ICL in *Yersinia pestis* (Hillier und Charnetzky, 1981), in einer *Pseudomonas* Species (Bellion und Woodson, 1975), in *N. crassa* (Gainey et *al.*, 1991), in *Chlorella vulgaris* (Harrop und Kornberg, 1966) und in *B. napus* (Zhang et *al.*, 1993) gefunden. Wachstumsexperimente mit dem *aceA*-defekten *C. glutamicum*-Stamm ASK1 zeigten, daß dieser Stamm nicht mehr in der Lage ist, auf Acetat als einziger C-Quelle zu wachsen. Dieses Ergebnis läßt den Schluß zu, daß *C. glutamicum* ein intaktes *aceA*-Gen für das Wachstum auf Acetat benötigt. Da in dem Stamm ASK1 auch keine ICL-Aktivität nachweisbar war, kann vermutet werden, daß *C. glutamicum* keine ICL-Isoenzyme besitzt. Von *Y. pestis* ist bekannt, daß die Hemmung der ICL durch Itaconat zu einer verminderten Wachstumsrate auf Xylose führt. Darüberhinaus zeigten *Yarrowia lipolytica*-Mutanten mit inaktiviertem ICL-Gens ein verlangsamtes Wachstum auf Glucose im Vergleich zum Wildtyp. Für beide Organismen wurde spekuliert, daß diese ihre ICL-Aktivität bei Wachstum auf Kohlenhydraten benötigen, um von Glyoxylat ausgehend Glycin über Serin zu synthetisieren (Hillier und Charnetzky, 1981; Barth und Scheuber, 1993). Die Ergebnisse könnten auch bedeuten, daß in diesen Organismen die ICL benötigt wird um die PEP-Carboxylase in ihrer anaplerotischen Funktion zu unterstützen. Das Wachstumsverhalten der *C. glutamicum*-Mutante ASK1 auf Glucose war nicht von dem des *C. glutamicum*-Wildtyps zu unterscheiden. Dies zeigt, daß in *C. glutamicum* die ICL bei Wachstum auf Glucose

weder zur Glycin-Biosynthese noch als akzessorisches Enzym für die PEP-Carboxylase benötigt wird.

Isoenzyme der MSY wurden bisher bei *E. coli* (Vanderwinkel und De Vlieghere, 1968), *S. cerevisiae* (Hartig et *al.*, 1992) und *C. tropicalis* (Hikida et *al.*, 1991) nachgewiesen. Die Inaktivierung von zwei MSY-kodierenden Genen (*DAL7* und *MLS*1) in *S. cerevisiae* zeigte keinen Effekt auf das Wachstum dieses Organismus auf Ethanol (Hartig et *al.*, 1992). Es wurde daher spekuliert, daß *S. cerevisiae* mindestens drei MSY-kodierende Gene besitzt. In *E. coli* existieren zwei MSY-Isoenzyme, die durch die Gene *aceB* bzw. *glc* kodiert werden (Vanderwinkel und De Vlieghere, 1968). Bei Wachstum auf Glycolat bzw. auf Glyoxylat wird in *E. coli* ausschließlich die durch das *glc*-Gen kodierte Isoform gebildet, wohingegen bei Wachstum auf Acetat beide Isoenzyme in annähernd gleicher Menge synthetisiert werden (Vanderwinkel und De Vlieghere, 1968). Aus diesem Grund zeigen *E. coli*-Mutanten mit einem Defekt im *aceB*-oder im *glc*-Gen keine Beeinträchtigung ihres Wachstums auf Acetat. Lediglich *aceB-glc* Doppelmutanten von *E. coli* sind nicht mehr in der Lage, auf Acetat als einziger C-Quelle zu wachsen. Die *C. glutamicum*-Mutante ALB1 mit inaktiviertem *aceB*-Gen im Chromosom zeigte kein Wachstum auf Acetat und besaß keine nachweisbare MSY-Aktivität. Dieses Ergebnis belegt, daß *C. glutamicum* ein funktionelles *aceB*-Gen für das Wachstum auf Acetat benötigt und deutet an, daß in *C. glutamicum* keine MSY-Isoenzyme existieren.

Während biochemische Daten zu zahlreichen ICLs aus Eukaryoten vorliegen, ist nur wenig über die entsprechenden Enzyme in Prokaryoten bekannt (Vanni et *al.*, 1990). Die biochemische Charakterisierung der gereinigten ICL aus *C. glutamicum* zeigte, daß das native Enzym ein Tetramer aus identischen Untereinheiten ist. Dies wurde auch bei den ICLs aus *E. coli* (Robertson und Reeves, 1987), *P. indigofera* (McFadden et *al.*, 1968), *Saccharomycopsis lipolytica* (Matsuoka et *al.*, 1984) und *N. crassa* (Johanson et *al.*, 1974) gefunden. Die corynebakterielle ICL benötigte für ihre Aktivität die Anwesenheit von Mg^{2+}, Co^{2+} oder Mn^{2+} und gleicht in ihrer Metallabhängigkeit den ICLs von *E. coli* (Hoyt et *al.*, 1988), *A. calcoaceticus* (Hoyt et *al.*, 1991) und *P. indigofera* (Shiio et *al.*, 1965). Kinetische Untersuchungen der ICL aus *C. glutamicum* zeigten, daß das Enzym Isocitrat nach einem geordneten Uni-Bi-Mechanismus umsetzt. Obwohl für die ICL von *Ricinus*

communis ein 'random' Uni-Bi Mechanismus beschrieben wurde (Malhotra und Srivastava, 1982), weist die überwiegende Mehrheit aller ICLs einen geordneten Uni-Bi-Reaktionsmechanismus auf (Vanni et *al.*, 1990). Effektorstudien mit der gereinigten ICL aus *C. glutamicum* zeigten, daß das Enzym durch zahlreiche Inhibitoren in seiner Aktivität gehemmt wird. Während die stärksten Inhibitoren Oxalat und Itaconat wahrscheinlich keine physiologische Bedeutung besitzen, wurde die ICL auch durch 3-Phosphoglycerat, 6-Phosphogluconat, PEP, Fructose-1,6-Bisphosphat, Succinat und Malat in ihrer Aktivität gehemmt. Bei *E. coli* werden die intrazellulären Konzentrationen an PEP und 3-Phosphoglycerat mit 0,22 mM bzw. 2,5 mM angegeben (LaPorte et *al.* 1983; MacKintosh und Nimmo, 1988). Unter der Annahme, daß diese Metabolite in *C. glutamicum* ähnliche intrazelluläre Konzentrationen aufweisen, würde 3-Phosphoglycerat die Michaelis-Konstante der ICL in *C. glutamicum* von 0,28 mM auf 0,89 mM erhöhen und somit von physiologischer Bedeutung sein. Während die gereinigte ICL durch geringe Mengen an PEP in ihrer Aktivität signifikant gehemmt wurde (Ki: 0,46 mM), war in Zellextrakten von *C. glutamicum* keine Hemmung der ICL durch PEP zu beobachten. Für partiell gereinigte ICL aus *C. glutamicum* ssp. *flavum* wurde beschrieben, daß 1 mM PEP keinen Einfluß auf die Enzymaktivität ausübt (Ozaki und Shiio, 1968). Die unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich durch die verschiedenen Reinheitsgrade der ICL erklären. Es kann vermutet werden, daß PEP in Zellextrakten und in der nur partiell gereinigten Präparation metabolisiert wurde und daher in diesen Präparationen keine Hemmung der ICL durch PEP zu beobachten war.

Die biochemische Charakterisierung der MSY aus *C. glutamicum* zeigte, daß das Enzym in nativer Form als Monomer vorliegt, wie es auch für die Enzyme von *E. coli* und einem thermophilen *Bacillus* beschrieben wurde (Falmagne und Wiame, 1973; Chell und Sundaram, 1978). Im Gegensatz dazu stellen eukaryotische MSY in ihrer nativen Form Tetra-, Okta-, bzw. Dekamere dar (Cioni et *al.*, 1980; Okada et *al.*, 1986). Die corynebakterielle MSY zeigte hohe Affinitäten hinsichtlich ihrer Substrate Glyoxylat und Acetyl-CoA, wie sie auch bei den entsprechenden Enzymen von *E. coli* und einem thermophilen *Bacillus* gefunden wurden (Chell und Sundaram, 1978). Effektorstudien der MSY aus *C. glutamicum* zeigten, daß das Enyzm durch Oxalat, Glycolat und ATP in seiner Aktvität gehemmt wurde. Eine Hemmung durch diese drei Substanzen wurde bereits für die MSYs von *Zea mays* und *Ricinus communis* beschrieben (Sevettaz et *al.*, 1973; Bowden

und Lord, 1978). Die Ergebnisse deuten an, daß die MSY aus *C. glutamicum* trotz ihrer abweichenden Größe und Primärstruktur biochemisch den entsprechenden Enzymen aus anderen Organismen ähnelt.

Für die Schlüsselenzyme des Acetat-Stoffwechsels in *C. glutamicum*, AK, PTA, ICL und MSY, konnte gezeigt werden, daß deren spezifische Aktivitäten durch die C-Quelle des Mediums reguliert wird. Während bei Wachstum auf Glucose-MM nur geringe enzymatische Aktivitäten dieser Enzyme nachzuweisen waren, war deren Aktivität auf Acetat-MM signifikant erhöht. Lediglich für *A. nidulans* konnte bisher die gemeinsame Regulation aller am Acetat-Stoffwechsel beteiligten Enzyme gezeigt werden (Armitt et *al.*, 1976). In *E. coli* werden AK und PTA konstitutiv gebildet (Brown et *al.*, 1977), und nur die Aktivitäten von ICL und MSY unterliegen einer Regulation (Vanderwinkel und De Vlieghere, 1968). Die Tatsache, daß in *C. glutamicum* die Aktivitäten von AK, PTA, ICL und MSY koordiniert reguliert werden, läßt einen gemeinsamen Mechanimus der Regulation vermuten. Durch Northern-Blot-Analyse konnte für die Gene *aceA* und *aceB* aus *C. glutamicum* eine transkriptionelle Regulation nachgewiesen werden. Es darf daher vermutet werden, daß auch die Gene für AK und PTA auf transkriptioneller Ebene in ihrer Expression reguliert werden. In *E. coli* wird die Expression des *ace*-Operons durch die Genprodukte von *iclR* und *fadR* additiv reprimiert (Brice und Kornberg, 1968; Maloy et *al.*, 1981; 1982), wohingegen in *A. nidulans* ein durch das *facB*-Gen kodiertes Aktivatorprotein die Expression der Gene für ACS, ICL, MSY und Acetamidase aktiviert (Hynes, 1977). Durch Amplifikation eines mutierten Acetamidase-Gens (*amdI9*), in dessen Promotorbereich das *facB*-Genprodukt besonders effektiv gebunden wird, konnte dieses in *A. nidulans* austitriert und somit die Regulation der Expression der Gene für ACS, ICL und MSY verändert werden (Kelly und Hynes, 1987; Hynes et *al.*, 1988). In *C. glutamicum* konnte durch Überexpression des intergenischen Bereiches zwischen *aceA* und *aceB* kein am Acetat-Stoffwechsel beteiligtes Regulatorprotein austitriert werden. Durch Selektion auf Resistenz gegenüber Fluoracetat wurden jedoch drei *C. glutamicum*-Mutanten erhalten, bei denen in Anwesenheit von Acetat keine Erhöhung der Aktivität von AK, PTA, ICL und MSY beobachtet wurde. Es kann daher vermutet werden, daß in diesen Mutanten ein zur Aktivierung der Gene *ack*, *pta*, *aceA* und *aceB* benötigtes Protein fehlt bzw. funktionslos ist. Bereits bei *A. nidulans* konnten nach dem gleichen Selektionsschema Mutanten mit fehlender Aktivierung der Gene für ACS, ICL,

MSY und Acetamidase isoliert werden (Apirion, 1965; Katz und Hynes, 1989). Diese wiesen einen Defekt in dem für das Aktivatorprotein kodierenden *facB*-Gen auf.

Unter Einbeziehung der in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse kann ein Modell zur Regulation des Acetat-Stoffwechsels in *C. glutamicum* entworfen werden, das in **Abbildung 18** dargestellt ist. Das Modell basiert auf der Annahme, daß bei Wachstum von *C. glutamicum* auf Glucose die Aktivität der Pyruvat-Dehydrogenase einer strikten Kontrolle unterliegt und damit der Acetyl-CoA-Pool der Zelle niedrig ist. Für eine strikte Kontrolle der Pyruvat-Dehydrogenase spricht die Beobachtung, daß bei Wachstum von *C. glutamicum* auf Lactat große Mengen an Pyruvat in das Medium ausgeschieden werden (Cocaign et *al.*, 1993). Darüberhinaus wurde in der vorliegenden Arbeit bei Wachstum von *C. glutamicum* auf Lactat- bzw. Pyruvat-MM keine signifikante Erhöhung der Enzymaktivitäten von ICL und MSY beobachtet. In Säugetieren wird die Pyruvat-Dehydrogenase durch GTP, Acetyl-CoA und NADH sowie durch reversible Phosphorylierung in ihrer Aktivität reguliert (Reed et *al.*, 1985). Bei *E. coli* wird die Pyruvat-Dehydrogenase darüberhinaus auf genetischer Ebene durch das *pdhR*-Genprodukt reguliert (Quall et *al.*, 1994). Da in *C. glutamicum* die Pyruvat-Dehydrogenase bislang nicht näher untersucht wurde, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht gesagt werden, ob deren Regulation auf genetischer und/oder auf enzymatischer Ebene erfolgt.

Am Verzweigungspunkt zwischen Glyoxylat-Zyklus und Citrat-Zyklus konkurrieren ICL und IC-DH um das gemeinsame Substrat Isocitrat. Unter nicht-induzierten Bedingungen fließt der Kohlenstoff in *C. glutamicum* wahrscheinlich ausschließlich in den Citrat-Zyklus, da die IC-DH sowohl größere Affinität bezüglich Isocitrat (Km: 0,01 mM) als auch eine größere spezifische Aktivität (1,0 U/mg) gegenüber der ICL besitzt (Km: 0,28 mM; V: 0,01 U/mg). Auch die IC-DH von *E. coli* weist eine weitaus höhere Affinität zu Isocitrat auf als die ICL (LaPorte und Ikeda, 1991). Wird dem Medium Acetat zugesetzt, so können in *C. glutamicum* bereits durch die Grundaktivitäten von AK (0,2 U/mg) und PTA (0,35 U/mg) große Mengen an Acetyl-CoA gebildet und somit die zellinterne Acetyl-CoA-Konzentration erhöht werden. Ein Anstieg der Acetyl-CoA-Konzentration sollte dann, vermittelt über ein Aktivatorprotein, zur Induktion der Expression von *aceA*, *aceB*, *ack* und *pta* führen. Bereits für *N. salmonicolor* und *Y. lipolytica* wurde Acetyl-CoA als Induktor für die Synthese von ICL und MSY diskutiert (Sariaslani et *al.*, 1975; Kujau et *al.*, 1992).

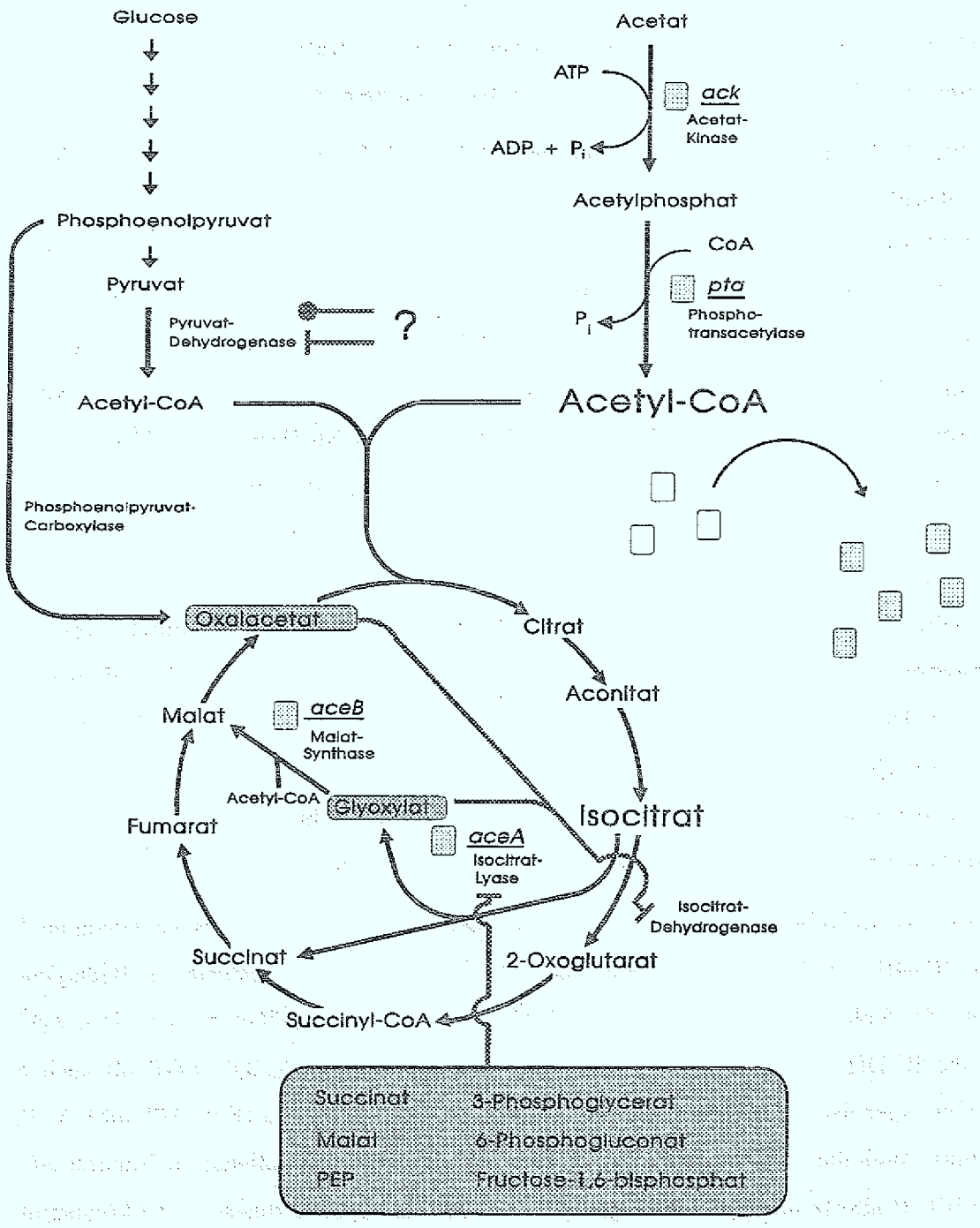


Abbildung 18. Modell zur Regulation des Kohlenstoffflusses bei Wachstum von *C. glutamicum* auf Glucose- bzw. Acetat-MM. Leere Kästchen stellen das Aktivatorprotein in seiner inaktiven, ausgefüllte Kästchen in seiner aktiven Form dar; ├– Hemmung des Enzyms durch den entsprechenden Effektor; ●– Hemmung der Synthese eines Enzyms durch den ensprechenden Effektor; ?: unbekannter Effektor; Abkürzungen: *ack*, *pta*, *aceA*, *aceB*: Gene für Acetat-Kinase, Phosphotransacetylase, Isocitrat-Lyase bzw. Malat-Synthase.

In *C. glutamicum* kann unter induzierten Bedingungen durch die gesteigerte Aktivität von AK (1,0 U/mg) und PTA (3,5 U/mg) vermehrt Acetat zu Acetyl-CoA aktiviert werden. Eine weitere Erhöhung der zellinternen Acetyl-CoA-Konzentration gewährleistet wahrscheinlich die Aufrechterhaltung der Induktion. Neben den Aktivitäten von AK und PTA steigen in *C. glutamicum* auch die spezifischen Aktivitäten von ICL und MSY drastisch an (ICL: 2,8 U/mg; MSY: 2,1 U/mg). Trotz der geringen Affinität der ICL zu Isocitrat sollten durch deren hohe Aktivität geringe Mengen an Glyoxylat gebildet werden können, welche zusammen mit Oxalacetat die Aktivität der IC-DH hemmen. Eine Hemmung der IC-DH durch ein Gemisch aus Oxalacetat und Glyoxylat wurde bereits für *E. coli*, *B. subtilis* und *C. glutamicum* ssp. *flavum* beschrieben (Shiio und Ozaki, 1968). Eine Hemmung der IC-DH würde in *C. glutamicum* zu einem Anstieg der intrazellulären Isocitrat-Konzentration und somit zu einem vermehrten Kohlenstofffluß in den Glyoxylat-Zyklus führen. Aufgrund der hohen Affinität der MSY aus *C. glutamicum* für Glyoxylat (Km: 0,03 mM) und deren hoher Aktivität unter induzierten Bedingungen (2,1 U/mg) sollte allerdings die zellinterne Glyoxylat-Konzentration niedrig gehalten werden, so daß keine vollständige Hemmung der IC-DH erfolgt. Auf der Stufe der ICL kann in *C. glutamicum* die Feinkontrolle des Kohlenstoffflusses zwischen Glyoxylat- und Citrat-Zyklus ablaufen. Wird durch die anaplerotische Reaktion des Glyoxylat-Zyklus genügend an Succinat, Malat, PEP, 3-Phosphoglycerat, 6-Phosphogluconat bzw. Fructose-1,6-bisphosphat gebildet, so sollten diese Metabolite ihrerseits die Aktivität der ICL hemmen und somit den Kohlenstofffluß zurück in Richtung des Citrat-Zyklus zwingen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war die physiologische und genetische Charakterisierung des Acetat-Stoffwechsels in *C. glutamicum*.

In *C. glutamicum* wurden die an der Aktivierung des Acetats beteiligten Enzyme Acetat-Kinase und Phosphotransacetylase sowie die Glyoxylat-Zyklus-Schlüsselenzyme Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase enzymatisch nachgewiesen. Bei Wachstum auf Acetat waren die spezifischen Aktivitäten von Acetat-Kinase und Phosphotransacetylase 7-fach, die von Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase 50- bis 200-fach höher als bei Wachstum auf Glucose. Dies zeigt, daß in *C. glutamicum* die Schlüsselenzyme des Acetat-Stoffwechsels durch die Kohlenstoffquelle des Mediums reguliert werden.

Durch heterologe Komplementation einer *E. coli*-Mutante wurden die Gene für Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase aus *C. glutamicum* isoliert. Das Isocitrat-Lyase-Strukturgen besteht aus 1296 Basenpaaren, das Malat-Synthase-Gen aus 2217 Basenpaaren. Beide Gene liegen im Chromosom von *C. glutamicum* nebeneinander vor, sind durch 597 Basenpaare voneinander getrennt und werden in divergenter Richtung transkribiert. In Northern-Blot-Experimenten wurde für das Transkript des Isocitrat-Lyase-Gens eine Größe von 1,5 kb, für das des Malat-Synthase-Gens eine Größe von 2,75 kb nachgewiesen. Aus diesem Ergebnis kann der Schluß gezogen werden, daß in *C. glutamicum* die Gene für Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase monocistronisch organisiert sind. Weitere Untersuchungen auf Transkriptionsebene ergaben für beide Gene eine 50- bzw. 200-fach gesteigerte Transkription bei Wachstum auf Acetat im Vergleich zu Wachstum auf Glucose. Das zeigt, daß Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase in *C. glutamicum* auf transkriptioneller Ebene reguliert werden.

Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase aus *C. glutamicum* wurden bis zur Homogenität gereinigt. Die biochemische Charakterisierung der Isocitrat-Lyase ergab, daß das Enzym geringe Affinität zu seinem Substrat Isocitrat besitzt (Km: 0,28 mM). Die Metabolite 3-Phosphoglycerat, 6-Phosphogluconat, Phosphoenolpyruvat, Fructose-1,6-bisphosphat, Succinat und Glyoxylat hemmten die Aktivität der Isocitrat-Lyase und zeigten Inhibitor-Konstanten zwischen 0,46 mM und 1,48 mM. Die Malat-Synthase aus *C. glutamiucm* wies

hohe Affinität zu ihren Substraten Glyoxylat (Km: 28 µM) und Acetyl-CoA (Km: 11 µM) auf und wurde lediglich durch ATP als physiologisch relevantem Effektor in ihrer Aktivität gehemmt (Ki: 4,3 mM). Zusätzlich zu Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase wurde in Zellextrakten von *C. glutamicum* die Isocitrat-Dehydrogenase biochemisch charakterisiert. Die Isocitrat-Dehydrogenase zeigte hohe Affinität sowohl für Isocitrat (Ks: 12 µM) als auch für NADP (Ks: 8 µM) und wurde durch jeweils 0,1 mM Glyoxylat plus Oxalacetat zu 80% in ihrer Aktivität gehemmt.

Durch gezielte Mutagenese wurden *C. glutamicum*-Mutanten mit Defekt in Isocitrat-Lyase bzw. Malat-Synthase und durch ungerichtete Mutagenese Mutanten mit Defekt in Acetat-Kinase und/oder Phosphotransacetylase erzeugt. Sämtliche Mutanten waren nicht mehr in der Lage, auf Acetat als alleiniger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Daraus kann geschlossen werden, daß die Enzyme Acetat-Kinase, Phosphotransacetylase, Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase für das Wachstum von *C. glutamicum* auf Acetat essentiell sind. Durch Analyse des Induktionsverhaltens dieser Mutanten sowie unter Einbeziehung definierter *C. glutamicum*-Mutanten mit Defekten in Isocitrat-Dehydrogenase bzw. Citrat-Synthase konnte gefolgert werden, daß eine Erhöhung der intrazellulären Acetyl-CoA-Konzentration die Ursache für die Aktivitätszunahme von Acetat-Kinase, Phosphotransacetylase, Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase bei Wachstum von *C. glutamicum* auf Acetat ist.

Anhand der gewonnenen Daten wurde ein Modell zur Regulation des Acetat-Stoffwechsels in *C. glutamicum* entworfen. In diesem Modell wird bei Wachstum von *C. glutamicum* auf Acetat mit Hilfe der Enzyme Acetat-Kinase und Phosphotransacetylase die zellinterne Acetyl-CoA-Konzentration erhöht und dadurch die Expression der Gene für Acetat-Kinase, Phosphotransacetylase, Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase gesteigert. Gleichzeitig hemmt das durch die Isocitrat-Lyase gebildete Glyoxylat zusammen mit Oxalacetat die Isocitrat-Dehydrogenase und führt somit zu einem Anstieg der intrazellulären Isocitrat-Konzentration. Dies hat einen verstärkten Kohlenstofffluß in den Glyoxylat-Zyklus zur Folge. Die Hemmung der Isocitrat-Lyase durch die Metabolite 3-Phosphoglycerat, 6-Phosphogluconat, Phosphoenolpyruvat, Fructose-1,6-bisphosphat, Succinat und Glyoxylat erlaubt die Feinkontrolle des C-Flusses zwischen Glyoxylat- und Citrat-Zyklus.

VI. LITERATUR

Akashi, K., H. Shibai und Y. Hirose. 1979. Comparison between acetic acid and glucose as a substrate in threonine fermentation. Acric. Biol. Chem. **43:** 1563-1566.

Alter, G. M., J. P. Casazza, W. Zhi, P.Nemeth, P. Srere und C. T. Evans. 1990. Mutation of essential catalytic residues in pig heart citrate synthase. Biochemistry. **29:** 7557-7563.

Alwine,J. C., D. J. Kemp und G. R. Stark. 1977.Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **74:** 5350-5354.

Apirion, D. 1965. The two-way selection of mutants and revertants in respect of acetate utilization and resistance to fluoroacetate in *Aspergillus nidulans*. Genet. Res. **6:** 317-329.

Armitt, S., W. McCullough und C. F. Roberts. 1976. Analysis of acetate non-utilizing (*acu*) mutants in *Aspergillus nidulans*. J. Gen. Microbiol. **92:** 263-282.

Atomi, H., M. Ueda, M. Hikida, T. Hishida, Y. Teranishi und A. Tanaka. 1990. Peroxisomal isocitrate lyase of the n-alkane-assimilating yeast *Candida tropicalis*: gene analysis and characterization. J. Biochem. **107:** 262-266.

Barth, G. und T. Scheuber. 1993. Cloning of the isocitrate lyase gene (*ICL1*) from *Yarrowia lipolytica* and characterization of the deduced protein. Mol. Gen. Genet. **241:** 422-430.

Beeching, J. R. und D. H. Northcote. 1987. Nucleic acid (cDNA) and amino acid sequences of isocitrate lyase from castor bean. Plant Mol. Biol. **8:**471-475.

Behari, R. und A. Baker. 1993. The carboxy terminus of isocitrate lyase is not essential for import into glyoxysomes in an *in vitro* system. J. Biol. Chem. **268:** 7315-7322.

Bellion, E. und J. Woodson. 1975. Two distinct isocitrate lyases from a *Pseudomonas* species. J. Bacteriol. **122:** 557-564.

Ben-Bassat, A. und K. Bauer.1987. Amino-terminal processing of proteins. Nature (London) **326:** 315.

Birnboim, H. C. 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. Meth. Enzymol. **100:** 243-255.

Börmann, E. R., B. J. Eikmanns und H. Sahm. 1992. Molecular analysis of the *Corynebacterium glutamicum gdh* gene encoding glutamate dehydrogenase. Mol. Microbiol. **6:** 317-326.

Börmann-El Kohly, E. R., B. J. Eikmanns, M. Gutmann und H. Sahm. 1993. Glutamate dehydrogenase is not essential for glutamate formation by *Corynebacterium glutamicum*. Appl. Environm. Microbiol. **59:** 2329-2331.

Bowden, L. und J. M. Lord. 1978. Purification and comparative properties of microsomal and glyoxysomal malate synthase from castor bean endosperm. Pl. Physiol. **61:** 259-265.

Brice, C. B. und H. L. Kornberg. 1968. Genetic control of isocitrate lyase activity in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **46:** 2185-2186.

Brown, T. D. K., M. C. Jones-Mortimer und H. L. Kornberg. 1977. The enzymatic interconversion of acetate and acetyl-coenzyme A in *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol. **102:** 327-336.

Brown, G. M. und J. M. Williamson. 1987. Biosynthesis of folic acid, riboflavin, thiamine, and pantothenic acid, pp. 521-538. *In Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. Vol.1. Eds. F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H. E. Umbarger. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Byrne, C., H. W. Stokes und K. A. Ward. 1988. Nucleotide sequence of the *aceB* gene encoding malate synthase A in *Escherichia coli*. Nucleic Acids Res. **16:** 9342.

Campbell J. J. R. R. A. Smith und B. A. Eagles. 1953. A deviation from the conventional tricarboxylic acid cycle in *Pseudomonas aeruginosa*. Bhochim. Biophys. Acta **11:** 594.

Capaldi, R. A. und G. Vanderkooi. 1972. The low polarity of many membrane proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **69:** 930-932.

Caruthers, M. H., A. D. Barone, S. L. Beaucage, D. R. Dodds, E. F. Fisher, L.J. McBride, M. Matteucie, Z. Staninsky und J. Y. Tang. 1985. Chemical synthesis of deoxyoligonucleotides by the phosphoramidite method. Science **230:** 281.

Chang, A. C. Y. und S. N. Cohen. 1978. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. J. Bacteriol. **134:** 1141-1156.

Chell, R. M. und T. K. Sundaram. 1975. Isolation and characterization of isocitrate lyase and malate synthase from *Bacillus stearothermophilus*. Biochem. Soc. Trans. **3:** 303-306.

Chell, R. M. und T. K. Sundaram. 1978. Structural basis of the thermostability of monomeric malate synthase from a thermophilic *Bacillus*. J. Bacteriol. **135:** 334-343.

Chell, R. M., T. K. Sundaram und A. E. Wilkinson. 1978. Isolation and characterization of isocitrate lyase from a thermophilic *Bacillus* sp.. Biochem. J. **173:** 165-177.

Cioni, M., G. Pinzauti und P. Vanni. 1981. Comparative biochemistry of the glyoxylate cycle. Comp. Biochem. Physiol. **70B:** 1-26.

Cocaign, M., C. Monnet und N. D. Lindley. 1993. Batch kinetics of *Corynebacterium glutamicum* during growth on various carbon substrates: use of substrate mixtures to localise metabolic bottlenecks. Appl. Microbiol. Biotechnol. **40:** 526-530.

Collado-Vides, J., B. Magasanik und J. D. Gralla. 1991. Control site location and transcriptional regulation in *Escherichia coli*. Microbiol. Rev. **55:** 371-394.

Comai, L., R. A. Dietrich, D. J. Maslyar, C. S. Baden und J. J. Harada. 1989. Coordinate expression of transcripitonally regulated isocitrate lyase and malate synthase genes in *Brassica napus* L. Plant Cell **1:** 293-300

Cremer, J. 1989. Die Lysinbiosynthesesequenz in *Corynebacterium glutamicum*: Regulation, Klonierung und Bildung von Lysin durch Genamplifikation. Dissertation, Heinrich Heine Universität Düsseldorf.

Cremer, J., L. Eggeling und H. Sahm. 1991. Control of the lysine biosynthesis sequence in *Corynebacterium glutamicum* as analyzed by overexpression of the individual corresponding genes. Appl. Environ. Microbiol. **57:** 1746-1752.

Davis, W. L. und D. B. P. Goodman. 1992. Evidence for the glyoxylate cycle in human liver. Anat. Rec. **234:** 461-468.

Deguchi, Y., I. Yamato und Y. Anraku. 1990. Nucleotide sequence of *gltS*, the Na^+/glutamate symport carrier gene of *Escherichia coli B*. J. Biol. Chem. **265:** 21704-21708.

Diehl, P. und B. A. McFadden. 1993. Site-directed mutagenesis of lysine 193 in *Escherichia coli* isocitrate lyase by use of unique restriction enzyme site elimination. J. Bacteriol. **175:** 2263-2270.

Dixon, G. H. und H. L. Kornberg. 1959. Assay methods for key enzymes of the glyoxylate cycle. Biochem. J. **72:** 3P.

Dixon, G. H., H. L. Kornberg und P. Lund. 1960. Purification and properties of malate synthetase. Biochim. Biophys. Acta **41:**217-233.

Edlin, J. D. und T. K. Sundaram. 1989. Regulation of isocitrate dehydrogenase by phosphorylation in *Escherichia coli* K-12 and a simple method for determining the amount of inactive phosphoenzyme. J. Bacteriol. **171:** 2634-2638.

Eikmanns, B. J., M. T. Follettie, M. U. Griot und A. J. Sinskey. 1989. The phosphoenolpyruvate carboxylase gene of *Corynebacterium glutamicum*: Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression. Mol. Gen. Gent. **218:** 330-339.

Eikmanns, B. J., M. Metzger, D. Reinscheid, M. Kircher und H. Sahm. 1991a. Amplification of three threonine biosynthesis genes in *Corynebacterium glutamicum* and its influence on carbon flux in different strains. Appl. Microbiol. Biotechnol. **34:** 617-622.

Eikmanns, B. J., M. Kircher und D. J. Reinscheid. 1991b. Discrimination of *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum* and *Brevibacterium lactofermentum* by restriction pattern analysis of DNA adjacent to the *hom* gene. FEMS Microbiol. Lett. **82:** 203-208.

Eikmanns, B. J., E. Kleinertz, W. Liebl und H. Sahm. 1991c. A family of *Corynebacterium glutamicum/Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression and promoter probing. Gene **102:** 93-98.

Eikmanns, B. J. 1992. Identification, sequence analysis, and expression of a *Corynebacterium glutamicum* gene cluster encoding the three glycolytic enzymes glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase, 3- phosphoglycerate kinase, and triosephosphate isomerase. J. Bacteriol. **174:** 6076-6086.

Falmagne, P. und J. M. Wiame. 1973. Purification et caractérisation partielle des deux malate synthases d'Escherichia coli. Eur. J. Biochem. **37:** 415-424.

Fernandez, E., F. Moreno und R. Rodicio. 1992. The *ICL*1 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. Eur. J. Biochem.**204:** 983-990.

Fernandez, E., M. Fernandez, F. Moreno und R. Rodicio. 1993a. Transcriptional regulation of the isocitrate lyase encoding gene in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett. **333:** 238-242.

Fernandez, E., M. Fernandez und R. Rodicio. 1993b. Two structural genes are encoding malate synthase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett. **320:** 271-275.

Ferry, J. G. 1992. Methane from acetate. J. Bacteriol. **174:** 5489-5495.

Frimmer, M. und K. Ziegler. 1988. The transport of bile acids in liver cells. Biochim. Biophys. Acta **947:** 75-99.

Gainey, L. D. S., K. Kölble und I. F. Connerton. 1991. Isolation and expression of the acetate-inducible isocitrate lyase gene (*acu-3*) from *Neurospora crassa*: evidence for a second constitutive enzyme. Mol. Gen. Genet. **229:** 253-260.

Gainey. L D. S., I. F. Connerton, E. H. Lewis, G. Turner und D. J. Ballance. 1992. Characterization of the glyoxysomal isocitrate lyase genes of *Aspergillus nidulans* (*acuD*) and *Neurospora crassa* (*acu3*). Curr. Genet. **21:** 43-47.

Garnak, M. und H. C. Reeves. 1979. Phosphorylation of isocitrate dehydrogenase of *Escherichia coli*. Science **203:** 1111-1112.

Gornall, A.G., C.J. Bardawill und M. M. David. 1949. Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. J. Biol. Chem. **177:** 751-766.

Gottschalk, G. 1985. Bacterial fermentations. pp. 208-282. *In* Bacterial metabolism. Ed. G. Gottschalk. Springer Verlag, Heidelberg, New York.

Graham, I. A., L. M. Smith, J. W. S. Brown, C. J. Leaver und S. M. Smith. 1989. The malate synthase gene of cucumber. Plant Mol. Biol. **13:** 673-684.

Gross, D. S., K. W. Collins, E. M. hernandez und W. T. Garrad. 1988.Vakuum blotting: a simple method for transferring DNA from sequencing gels to nylon membranes. Gene **74:** 347-356.

Grundy, F. J., D. A. Waters, T. Y. Takova und T. M. Henkin. 1993. Identification of genes involved in utilization of acetate and acetoin in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. **10:** 279-271.

Grundy, F. J., D. A. Waters, S. H. G. Allen und T. M. Henkin. 1994. Regulation of the *Bacillus subtilis* acetate kinase gene by CcpA. J. Bacteriol. **175:** 7348-7355.

Hagenbuch, B., B. Stieger, M. Foguet, H. Lübbert und P. J. Meier. 1991. Functional expression cloning and characterization of the hepatocyte Na^+/bile acid cotransport system. Proc. Natl. Acad. Sci. **88:** 10629-10633.

Han, K., J. A. C. Archer und A. J. Sinskey. 1990. The molecular structure of the *Corynebacterium glutamicum* threonine synthase gene. Mol. Microbiol. **4:** 1693-1702.

Hanahan, D. 1985. Techniques for transformation of *E. coli*. pp. 109-135. *In* DNA cloning. A practical approach. Vol. 1. Ed. D. M. Glover. IRL Press.

Harley, C. B. und R. P. Reynolds. 1987. Analysis of *E. coli* promoter sequences. Nucl. Acids Res. **15:** 2343-2361.

Harrop, L. C. und H. L. Kornberg. 1966. Role of isocitrate lyase in the metabolism of algae. Proc. R. Soc. (London) **166:** 11-29.

Hartig, A., M. M. Simon, T. Schuster, J. R. Daugherty, Hyang Sook Yoo und T. G. Cooper. 1992. Differentially regulated malate synthase genes participate in carbon and nitrogen metabolism of *S. cerevisiae*. Nucleic Acids Res. **20:** 5677-5686.

Haynes, J. A. und M. L. Britz. 1989. Electrotransformation of *Brevibacterium lactofermentum* and *Corynebacterium glutamicum*: growth in tween 80 increases transformation efficiencies. FEMS Microbiol. Lett. **61:** 329-334.

Higgins, I. J., D. J. Best, R. C. Hammond und D. Scott. 1981. Methane-oxidizing microorganisms. Microbiol. Rev. **45:** 556-590.

Hikida, M., H. Atomi, Y. Fukuda, A. Aoki, T. Hishida, Y. Teranishi, M. Ueda und A. Tanaka. 1991. Presence of two transcribed malate syntase genes in an *n*-alkane-utilizing yeast, *Candida tropicalis*. J. Biochem. **110:** 909-914.

Hillier, S. und W. T. Charnetzky. 1981. Glyoxylate bypass enyzmes in *Yersinia* species and multiple forms of isocitrate lyase in *Yersinia pestis*. J. Bacteriol. **145:** 452-458.

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

Hoyt, J. C., E. F. Robertson, K. A. Berlyn und H. C. Reeves. 1988. *Escherichia coli* isocitrate lyase: properties and comparisons. Biochim. Biophys. Acta. **966:** 30-35.

Hoyt, J. C., K. E. Johnson und H. C. Reeves. 1991. Purification and characterization of *Acinetobacter calcoaceticus* isocitrate lyase. J. Bacteriol. **173:** 6844-6848.

Hynes, M. J. 1977. Induction of the acetamidase of *Aspergillus nidulans* by acetate metabolism. J. Bacteriol. **131:** 770-775.

Hynes, M. J., C. M. Corrick, J. M. Kelly und T. G. Littlejohn. 1988. Identification of the sites of action for regulatory genes controlling the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans*. Mol. Cell. Biol. **8:** 2589-2596.

Ikeda, M. und R. Katsumata. 1992. Metabolic engineering to produce tyrosine or phenylalanine in a tryptophan-producing *Corynebacterium glutamicum* strain. Appl. Environ. Microbiol. **58:** 781-785.

Ifto, H., K. Sato, K. Matsui, K. Sano, H. Enei und Y. Hirose. 1990. Molecular b4eeding of a *Brevibacterium lactofermentum* L-phenylalanine producer using a cloned prephenate dehydatase gene. Appl. Microbiol. Biotechnol. **33:** 190-195.

Iuchi, S. und E. C. C. Lin. 1988. *arcA* (*dye*), a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in aerobic pathways. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **85:** 1888-1892.

Iuchi, S., D. C. Cameron und E. C. C. Lin. 1989. A second global regulator gene (*arcB*) mediating repression of enzymes in aerobic pathways of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **171:** 868-873.

Johanson, R. A., J. M. Hill und B. A. McFadden. 1974. Isocitrate lyase from *Neurospora crassa*. II. Composition, quaternary structure, C-terminus, and active-site modification. Biochim. Biophys. Acta. **364:** 341-352.

Jones, B. M. und J. P. Gilligan. 1983. *o*-Phaldialdehyde precolumn derivatization and reversed-phase-high-performance liquid chromatography of polypeptide hydrolysates and physiological fluids. J. Chromat. **266:** 471-482.

Kase, H. und K. Nakayama. 1972. Production of L-threonine by analog-resistant mutants. Agric. Biol. Chem. **36:** 1611-1621.

Katz, M. E. und M. J. Hynes. 1989. Isolation and analysis of the acetate regulatory gene *facB* from *Aspergillus nidulans*. Mol. Cell Biol. **9:** 5696-5701.

Keddie, R. M. und G. L. Cure. 1977. The cell wall composition and distribution of free mycolic acids in named strains of coryneform bacteria and in isolates from various natural sources. J. Appl. Bacteriol. **42:** 229-252.

Kelly, J. M. und M. J. Hynes. 1987. Multiple copies of the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans* cause titration of *trans*-acting regulatory proteins. Curr. Genet. **11:** 21-31.

Kinoshita, S., L. Udaka und M. Shimono. 1957. Studies of the amino acid fermentation. I. Produktion of L-glutamic acid by various microorganisms. J. Gen. Appl. Microbiol. **3:** 193-205.

Kinoshita, S. 1985. Glutamic acid bacteria. pp. 263-304. *In* Biology of industrial microorganisms. Eds. A. L. Demain und N. A. Solomon. The Benjamin/Cummings Publishing Company, London.

Kleemann, A., W. Leuchtenberger, B. Hoppe und H. Tanner. 1985. Amino acids. pp. 57-97. *In* Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry. VHC Verlagsgesellschaft, Weinheim.

Ko, Y. H., C. R. Cremo und B. A. McFadden. 1992. Vanadate-dependent photomodification of serine 319 and 321 in the active site of isocitrate lyase from *E. coli*. J. Biol. Chem. **267:** 91-95.

Kornberg, H. L. 1966a. The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*. Biochem. J. **99:** 1-11.

Kornberg, H. L. 1966b. Anaplerotic sequences and their role in metabolism. Essays in Biochem. **II:** 1-31.

Krämer, R. und C. Lambert. 1990. Uptake of glutamate in *Corynebacterium glutamicum*. 2. Evidence for a primary active transport. Eur. J. Biochem. **194:** 937-944.

Kujau, M., H. Weber und G. Barth. 1992. Characterization of mutants of the yeast *Yarrowia lipolytica* defective in acetyl-coenzyme A synthetase. Yeast. **8:** 193-203.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London) **227:** 680-685.

LaPorte, D. C. und D. E. Koshland, Jr. 1983. A protein with kinase and phosphatase activities involved in the regulation of the of the tricarboxylic acid cycle. Nature. **300:** 458-460.

LaPorte, D. C., P. E. Thorsness und D. E. Koshland, Jr. 1985. Compensatory phosphorylation of isocitrate dehydrogenase, a mechanism for adaptation to the intracellular environment. J. Biol. Chem. **260:** 10563-10568.

LaPorte, D. C. und T. P. Ikeda. 1991. The isocitrate dehydrogenase phosphorylation cycle: enzymology and regulation. Adv. Prot. Phosphatases **6:** 347-374.

Leuchtenberger, W. 1984. Enzymatische und mikrobielle Herstellung von L-Aminosäuren. Chemie in Labor und Betrieb. **35:** 278-283.

Liebl, W., A. Bayerl, B. Schein, U. Stillner und K. H. Schleifer. 1989. High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells. FEMS Microbiol. Lett. **65:** 299-304.

Liebl, W. 1991. The genus *Corynebacterium*-nonmedical. pp. 1157-1171. *In* The prokaryotes. Vol. II. Eds. A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder und K.-H. Schleifer. Springer-Verlag, New York.

Liebl, W., M. Ehrmann, W. Ludwig und K. H. Schleifer. 1991. Transfer of *Brevibacterium divaricatum* DSM 20297, *Brevibacterium flavum* DSM 20411, *Brevibacterium lactofermentum* DSM 20412 and DSM 1412, and *Corynebactium lilium* DSM 20137 to *Corynebacterium glutamicum* and their distinction by rRNA gene restriction patterns. Int. J. Syst. Bacteriol. **41:** 255-260.

Lindroth, P. und K. Mopper. 1979. High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by procolumn fluorescence derivatization with *o*-pthaldialdehyde. Anal. Chem. **51:** 1167-1174.

MacKintosh, C. und H. G. Nimmo. 1988. Purification and regulatory properties of isocitrate lyase from *Escherichia coli* ML308. Biochem. J. **250:** 25-31.

Makino, K., H. Shinagawa, M. Amemura, S. Kimura und A. Nakata. 1988. Regulation of the phosphate regulon of *Escherichia coli*. Activation of *pstS* transcription by PhoB protein *in vitro*. J. Mol. Biol. **203:** 85-95.

Malhotra, O. P. und P. K. Srivastava. 1982. Isolation and characterization of isocitrate lyase of castor endosperm. Arch. Biochem. Biophys. **214:** 164-171.

Maloy, S. R. und W. D. Nunn. 1981. Role of gene *fadR* in *Escherichia coli* acetate metabolism. J. Bacteriol. **148:** 83-90.

Maloy, S. R. und W. D. Nunn. 1982. Genetic regulation of the glyoxylate shunt in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. **149:** 173-180.

Martin, J. F. 1989. Molecular genetics of amino acid-producing corynebacteria. pp. 25-59. *In* Society for general microbiology symposium. Eds. S. Baumberg, I. Hunter und M. Rhodes. Cambridge University Press, Cambridge, Großbritrannien.

Mateos, L. M. und J. F. Martin. 1988. Cloning, charcterization and sequentiation of the threonine operon in *Brevibacterium lactofermentum*. Abstracts of the 8th International Biotechnology Symposium, Paris. 304.

Matsuoka, M., T. Himeno und S. Aiba. 1984. Characterization of *Saccharomycopsis lipolytica* mutants that express temperature-sensitive synthesis of isocitrate lyase. J. Bacteriol. **157:** 899-908.

Matsuoka, M. und B. A. McFadden. 1988. Isolation, hyperexpression, and sequencing of the *aceA* gene encoding isocitrate lyase in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **170:** 4528-4536.

McFadden, B. A., G. R. Rao, A. L. Cohen und T. E. Roche. 1968. Isocitrate lyase from *Pseudomonas indigofera*. V. Subunits and terminal residues and the relation to catalytic activity. Biochemistry 7: 33574-3582.

Meade, H. M., S. R. Song, G. V. Ruvkun, S. E.Brown und F. M. Ausubel. 1982. Physical and genetic characterisation of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon *Tn* mutagenesis. J. Bacteriol. **149:** 114-122.

Miller, H. H. 1978. Transcriptional control. *In* The Operon. pp. 31-88. Eds. J. Miller und W. S. Reznikoff. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Morinaga, Y., H. Takagi, M. Ishida, K. Miwa, T. Sato, S. Nakamori und K. Sano. 1987. Threonine production by coexistence of cloned genes encoding homoserine dehydrogenase and homoserine kinase in *Brevibacterium lactofermentum*. Agric. Biol. Chem. **51:** 93-100.

Nachlas, M. M., M. B. Davidson, J. D. Goldberg und A. M. Seligman. 1963. Colorimetric method for the measurement of isocitric dehydrogenase activity. J. Lab. Clin. Med. **62:** 148-158.

Nakayama, K. 1972. Microorganisms in amino acid fermentation. pp. 433-438. *In* Fermentation technology today. Ed. G. Terui. Sociey of fermentation technology, Osaka, Japan.

Negre, D., J. C. Cortay, I. G. Old, A. Galinier, C. Richaud, I. S. Girons und A. J. Cozzone. 1991. Overproduction and characterization of the *iclR* gene product of *Escherichia coli* K-12 and comparison with that of *Salmonella typhimurium*. Gene. **97:** 29-37.

Nimmo, H. G., F. Douglas, C. Kleanthous, D. G. Campbell und C. MacKintosh. 1989. Identification of a cystein residue at the active site of *Escherichia coli* isocitrate lyase. Biochem. J. **261:** 431-435.

Okada, H., M. Ueda, M. Uchida und A. Tanaka. 1987. Isocitrate lyase and malate synthase of *Candida tropicalis* grown on different carbon sources. Agric. Biol. Chem. **51:** 869-875.

O'Halloran, T. V., B. Frantz, M. K. Shin, D. M. Ralston und J. G. Wright. 1989. The merR heavy metal receptor mediates positive activation in a topological transcription complex. Cell. **56:** 119-129.

Ozaki, H. und I. Shiio. 1968. Regulation of the TCA and glyoxylate cycles in *Brevibacterium flavum*. J. Biochem. **64:** 355-363.

Ozaki, H., H. C. Reeves, S. O'Neil und P. D. J. Weitzman. 1983. Modulation of isocitrate dehydrogenase activity in *Acinetobacter calcoaceticus* by acetate. FEBS Lett. **163:** 265-268.

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

Peters, R. A. 1957. Mechanism of the toxicity of the active constituent of *Dichapetalam cymosum* and related compounds. Adv. Enzymol. **18:** 113-159.

Peters-Wendisch, P. G., B. J. Eikmanns, G. Thierbach, B. Bachmann und H. Sahm. 1993. Phosphoenolpyruvate carboxylase in *Corynebacterium glutamicum* is dispensable for growth and lysine production. FEMS Microbiol. Lett. **112:** 269-274.

Quail, M. A., D. J. Haydon und J. R. Guest. 1994. The *pdhR-aceEF-lpd* operon of *Escherichia coli* expresses the pyruvate dehydrogenase complex. Mol. Microbiol. **12:** 95-104.

Rao, M. J. K. und P. Argos. 1986. A conformational preference parameter to predict helices in integral membrane proteins. Biochim. Biophys. Acta **869:** 197-214.

Reed, L. J., Z. Damuni und M. L. Merryfield. 1985. Regulation of mammalian pyruvate and branched-chain α-keto acid dehydrogenase complexes by phosphorylation-dephosphorylation. Curr. Top. Cell Regul. **27:** 41-49.

Reeves, H. C., S. O'Neil und P. D. J. Weitzman. 1983. Modulation of isocitrate dehydrogenase activity in *Acinetobacter calcoaceticus* by acetate. FEBS Lett. **163:** 265-268.

Reinscheid, D. J., W. Kronemeyer, L. Eggeling, B. J. Eikmanns und H. Sahm. 1994. Stable expression of *hom-1-thrB* in *Corynebacterium glutamicum* and its effect on the carbon flux to threonine and related amino acids. Appl. Environ. Microbiol. **60:** 126-132.

Rieul, C., F. Bleicher, B. Duclos, J.C. Cortay und A. J. Cozzone. 1988. Nucleotide sequence of the *aceA* gene coding for isocitrate lyase in *Escherichia coli*. Nucleic Acids Res. **16:** 5689.

Robertson, E. F. und H. C. Reeves. 1987. Purification and characterization of isocitrate lyase from *Escherichia coli*. Curr. Microbiol. **14:** 347-350.

Robertson, E. F., H. C. Hoyt und H. C. Reeves. 1988. Evidence of histidine phosphorylation in isocitrate lyase from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **263:** 2477-2488.

Salzmann, M. und D. Schomburg. 1990. Acetate-CoA ligase. pp. 1-5. *In* Enzyme Handbook 2. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.

Sambrook, J., E. F. Fritsch und J. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sandemann, R. A. und M. J. Hynes. 1989. Isolation of the *facA* (acetyl-Coenzyme A synthetase) and *acuE* (malate synthase) genes of *Aspergillus nidulans*. Mol. Gen. Genet. **218:** 87-92.

Sandemann, R. A., M. J. Hynes, J. R. S. Fincham und I. F. Connerton. 1991. Molecular organisation of the malate synthase genes of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. Mol. Gen. Genet. **228:** 445-452.

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

Sariaslani, F. S., A. W. Westwood und I. J. Higgins. 1975. Control of isocitrate lyase in *Nocardia salmonicolor*. J. Gen. Microbiol. **91:** 315-324.

Schäfer, A., J. Kalinowski, R. Simon, A. H. Seep-Feldhaus und A. Pühler. 1990. High-frequency conjugal plasmid transfer from gram-negative *E. coli* to various gram-positive coryneform bacteria. J. Bacteriol. **172:** 1663-1666.

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

Schrumpf, B., L. Eggeling und H. Sahm. 1992. Isolation and prominent characteristics of an L-lysine hyperproducing strain of *Corynebacterium glutamicum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **37:** 566-571.

Schwarzer, A. und A. Pühler. 1991. Manipulation of *Corynebacterium glutamicum* by gene disruption and replacement. Bio/Technology **9:** 84-87.

Schwinde, J. W., N. Thum-Schmitz, B. J. Eikmanns und H. Sahm. 1993. Transcriptional analysis of the *gap-pgk-tpi-ppc* gene cluster of *Corynebacterium glutamicum*. J. Bacteriol. **175:** 3905-3908.

Scrutton, M. C. und M. R. Young. 1972. Pyruvate carboxylase. *In* The Enzymes. Ed. P. D. Boyer. 3. Auflage. Academic Press, New York und London.

Segel, I. H. 1975. Enzyme kinetics. Wiley Interscience, New York.

Servettaz, O. M. Fillippini und C. P. Longo. 1973. Purification and porperties of malate synthetase from maize scutella. Pl. Sci. Lett. **1:** 71-80.

Sheu, C. W., W. N. Konings und E. Freese. 1972. Effects of acetate and other short-chain fatty acids on shugar and amino acid uptake of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **111:** 525-530.

Shiio, I. 1960. Bacterial formation of glutamic acid from acetic acid. I. Glutamate formation and its related enzymes in *Brevibacterium flavum*, No. 2247. J. Biochem. **47:** 273-282.

Shiio, I., T. Shiio und B. A. McFadden. 1965. Isocitrate lyase from *Pseudomonas indigofera*. II. Activation, inhibition and stabilization. Biochim. Biophys. Acta. **96:** 122-132.

Shiio, I. und H. Ozaki. 1968. Concerted inhibition of isocitrate dehydrogenase by glyoxylate plus oxalacetate. J. Biochem. **64:** 45-53.

Shiio, I. 1968. Regulation of the TCA and glyolylate cycles in *Brevibacterium flavum*. I. Inhibition of isocitrate lyase and isocitrate dehydrogenase by organic acids related to the TCA and glyoxylate cycles. J. Biochem. **64:** 355-363.

Shiio, I., H. Momose und A. Oyama. 1969. Genetic and biochemical studies on bacterial formation of L-glutamate. (I) Relationship between isocitrate lyase, acetate kinase, and phosphate acetyltransferase levels and glutamate production in *Brevibacterium flavum*. J. Gen. Appl. Microbiol. **15:** 27-40.

Shiio, I., S. Sugimoto, H. Yoshino und K. Kawamura. 1989. Isolation and properties of threonine-producing mutants with both dihydrodipicolinate synthase defect and feedback-resistant homoserine dehydrogenase from *Brevibacterium flavum*. Agric. Biol. Chem. **54:** 1505-1511.

Simons, R. W., K. T. Huges und W. D. Nunn. 1980. Regulation of fatty acid degradation in *Escherichia coli*: dominance studies with strains merodiploid in gene *fadR*. J. Bacteriol. **142:** 726-730.

Simon, R., U. Priefer und A. Pühler. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. Bio/Technology **1:** 784-791.

Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. **98:** 503-511.

Tahama, H., H. Shinoyama, A. Ando und T. Fujii. 1990. Purification and characterization of isocitrate lyase from *Rhodopseudomonas* sp. No. 7. Agric. Biol. Chem. **54:** 3177-3183.

Van Dyk, T. K. und R. A. LaRossa. 1987. Involvement of *ack-pta* operon products in α-ketobutyrate metabolism by *Salmonella typhimurium*. Mol. Gen. Genet. **207:** 435-440.

Vanderwinkel, E., P. Liard, F. Ramos und J. M. Wiame. 1963. Genetic control of the regulation of isocitrase and malate synthase in *Escherichia coli* K 12. Biochem. Biophys. Res. Comm. **12:** 157-162.

Vanderwinkel, E. und M. De Vlieghere. 1968. Physiologie et génétique de l'isocitrase et des malate synthase chez *Escherichia coli*. European J. Biochem. **5:** 81-90.

Vanni, P., E. Giachetti, G. Pinzauti und B. A. McFadden. 1990. Comparative structure, function and regulation of isocitrate lyase, an important assimilatory enzyme. Comp. Biochem. Physiol. **95B:** 431-458.

Vieira, J. und J. Messing. 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertions mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene **19:** 259-268.

Vinopal, R. T. und D. G. Fraenkel. 1974. Phenotypic suppression of phosphofructokinase mutations in *Escherichia coli* by constitutive expression of the glyoxylate shunt. J. Bacteriol. **118:** 1090-1100.

von der Osten, C. H., C. F. Barbas, C. H. Wong und A. J. Sinskey. 1989. Molecular cloning, nucleotide sequence and fine structural analysis of the *Corynebacterium glutamicum fda* gene: structural comparison of fructose-1,6-bisphosphate aldolase to class I and II aldolases. Mol. Microbiol. **3:** 1625-1637.

Walsh K. und D. E. Koshland, Jr. 1985. Branch point control by the phosphorylation state of isocitrate dehydrogenase. J. Biol. Chem. **260:** 8430-8437.

Warren, W. A. 1970. Catalysis of both oxidation and reduction of glyoxylate by pig heart lactate dehydrogenase isoenzyme 1. J. Biol. Chem. **245:** 1675-1681.

Wiegand, G. und S. J. Remington. 1986. Citrate Synthase: Structure, control, and mechanism. Ann. Rev. Biophys. Chem. **15:** 97-117.

Wilson, R. B. und S. R. Maloy. 1987. Isolation and characterization of *Salmonella typhimurium* glyoxylate shunt mutants. J. Bacteriol. **169:** 3029-3034.

Wohlleben, W., G. Muth und J. Kalinowski. 1993. Genetic engineering of Gram positive bacteria. pp. 457-505. *In* Biotechnology, Vol. 2. Eds. H.-J. Rehm, und G. Reed. VHC Verlangsgesellschaft, Weinheim.

Wong, D. T. O. und S. J. Ajl. 1955. Isocitrate in *Escherichia coli*. Nature (London) **176:** 970-971.

Yeh, P., A. M. Sicard und A. J. Sinskey. 1988. General organization of the genes specifically involved in the diaminipimelate-lysine biosynthetic pathway of *Corynebacterium glutamicum*. Mol. Gen. Genet. **212:** 105-111.3

Yoo, H. S., F. S. Genbauffe und T. G. Cooper. 1985. Identification of the ureidoglycolate hydrolase gene in the *DAL* gene cluster of *Sacharomyces cerevisiae*. Mol. Cell Biol. **5:** 2279-2288.

Zhang, J. Z., M. Gomez-Pedrozo, C. S. Baden und J. J. Harada. 1993. Two classes of isocitrate lyase genes are expressed during late embryogeny and postgermination in *Brassica napus* L. Mol. Gen. Genet. **238:** 177-184.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie 1 des Forschungszentrums Jülich angefertigt. Herrn Professor Sahm danke ich für die Überlassung des Themas, für sein Interesse am Fortgang der Arbeit und für seine Unterstützung zur Teilnahme an wissenschaftlich anregenden Tagungen.

Herrn Professor von Ciriacy-Wantrup danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Herrn Professor Krämer danke ich für seine Bereitschaft, mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen und für seine freundliche Unterstützung in meinem weiteren beruflichen Werdegang.

Ganz herzlich möchte ich mich an dieser Stelle bei Doktor Bernhard Eikmanns bedanken. Durch seine überaus großzügige Hilfsbereitschaft, seine schier unendliche Geduld und seine Gabe, den Beruf zu einer Berufung werden zu lassen, wurde mir eine aufregende, abwechslungsreiche Zeit beschert, die leider viel zu schnell endete.

Eva Kleinertz und Nathalie Thum-Schmitz möchte ich für eine ausgelassene Zeit im Labor und in der Freizeit danken.

Elke-Börmann-El Kholy, Petra Peters-Wendisch, Doris Rittmann, Ulrike Zahnow, Peter Stahmann, Jörg Schwinde und Volker Wendisch möchte ich für den freundlichen Umgang und die nette Atmosphäre im Labor danken.

Ralf Klasen gilt mein Dank für seine engagierte Einweisung in proteinchemische Methoden.

Allen Institutsangehörigen sei an dieser Stelle für die freundliche Aufnahme und die ständige Hilfsbereitschaft gedankt.

FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH

KFA

Jül-2967
September 1994
ISSN 0944-2952