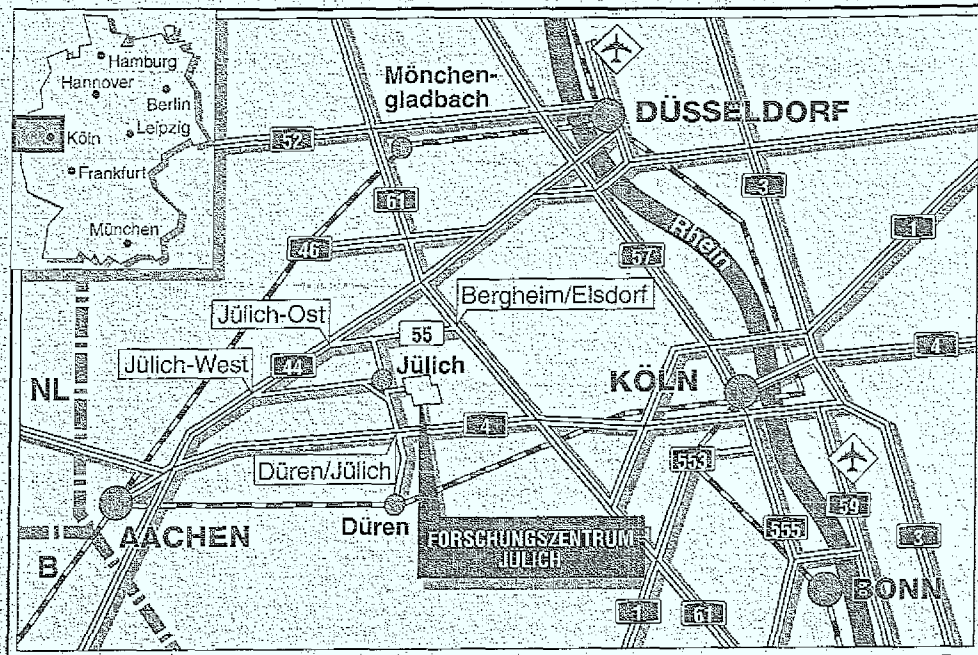


Institut für Biotechnologie

**Anaplerotische Reaktionen in
Corynebacterium glutamicum :**

**Untersuchungen zur Bedeutung der
PEP-Carboxylase und der Pyruvat-
Carboxylase im Zentralstoffwechsel
und bei der Aminosäure-Produktion**

Petra Peters-Wendisch



Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3259

ISSN 0944-2952

Institut für Biotechnologie Jül-3259

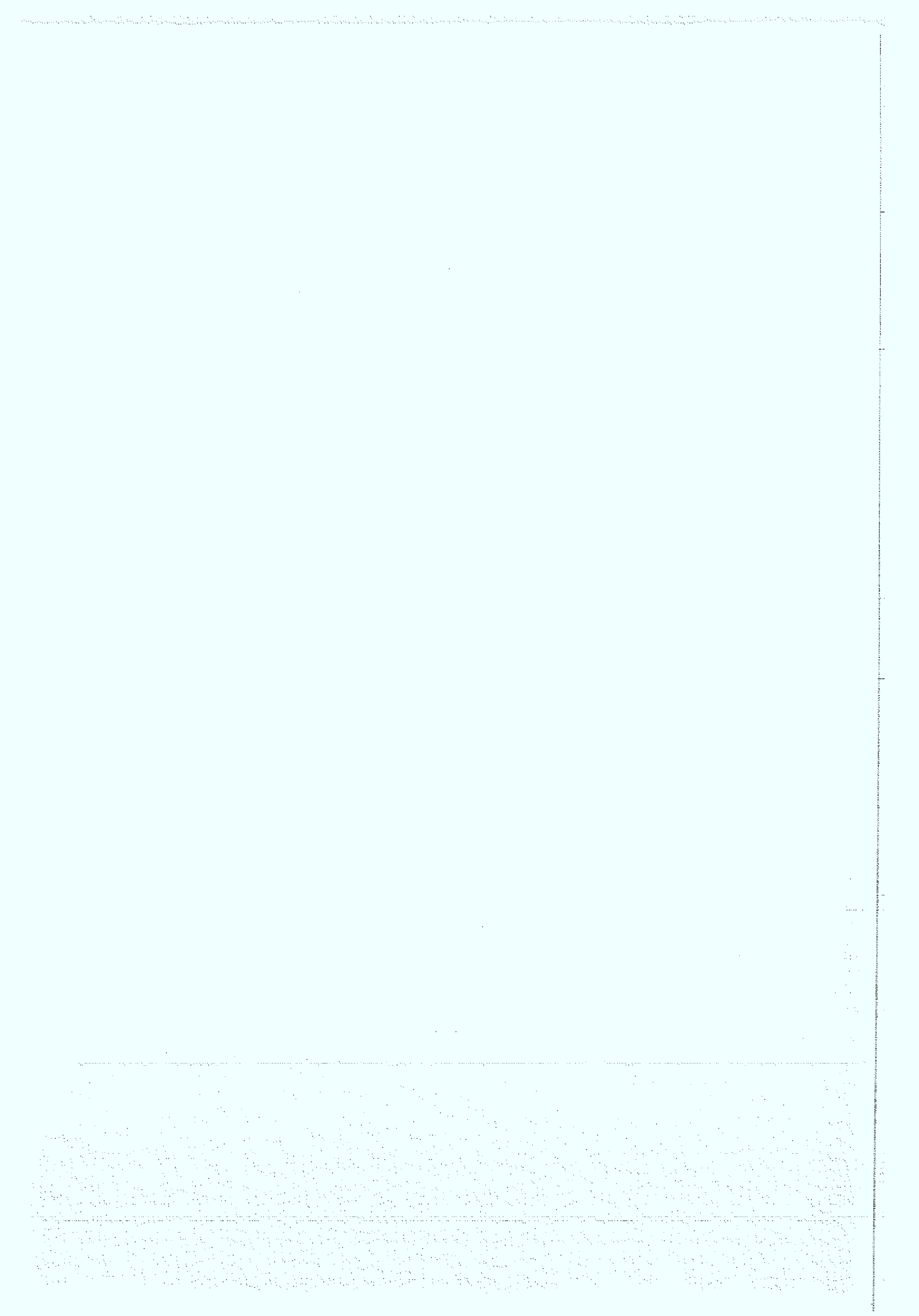
D61 (Diss. Universität Düsseldorf)

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

11
12
13
14
15
16
17
18
19
20



**Anaplerotische Reaktionen in
Corynebacterium glutamicum:**

**Untersuchungen zur Bedeutung der
PEP-Carboxylase und der Pyruvat-
Carboxylase im Zentralstoffwechsel
und bei der Aminosäure-Produktion**

Petra Peters-Wendisch

Handwritten text, possibly a signature or a name, located in the center of the page.

Handwritten text, possibly a date or a reference number, located below the main text.

Vertical handwritten text on the right margin.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	8
1. Bakterienstämme und Plasmide	8
2. Chemikalien	10
3. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen	11
4. Quantitative Bestimmung von Aminosäuren	13
4.1 Siliconöl-Zentrifugation und Aufarbeitung der Zellen	13
4.2 <i>Reversed-Phase</i> -HPLC zur Bestimmung von Aminosäuren	14
4.3 Isolierung, Reinigung und Bestimmung der ¹³ C-Markierungsmuster von Aminosäuren	14
5. Bestimmung von Enzymaktivitäten	15
5.1 Herstellung von Rohextrakten und Proteinbestimmung	15
5.2 Permeabilisierung von <i>C. glutamicum</i> -Zellen	16
5.3 Bestimmung der spezifischen Enzymaktivitäten von PEP-Carboxylase, PEP-Carboxykinase, PEP-Carboxytransphosphorylase, Pyruvat-Carboxylase, Oxalacetat-Decarboxylase, <i>Malat-Enzym</i> , Isocitrat-Lyase und Pyruvat-Kinase ..	16
6. Proteinchemische Methoden	21
6.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	21
6.2 Western Blot-Analyse zum Nachweis biotinhaltiger Proteine	22
6.3 Partielle Aufreinigung und Anequenzierung von Proteinen	23
7. Molekulargenetische Methoden	24
7.1 Isolierung, Reinigung, Restriktion und Modifikation von DNA	24
7.2 Herstellung von Oligonukleotiden und Digoxigenin-markierten DNA-Sonden	26
8. Southern Biot-Analyse und Kolonie-Hybridisierung	27
9. Methoden zur Übertragung von DNA	29
9.1 Transformation und Elektroporation von <i>E. coli</i>	29
9.2 Konjugativer Transfer von Plasmiden von <i>E. coli</i> nach <i>C. glutamicum</i>	30
10. Isolierung eines PCR-Produktes aus <i>C. glutamicum</i> mit Ähnlichkeit zum Pyruvat-Carboxylase Gen	31
11. DNA-Sequenzanalyse	31

III. Ergebnisse	32
1. Nachweis und Charakterisierung der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase von <i>C. glutamicum</i>	32
1.1 Einfluß der Kohlenstoff-Quelle auf die spezifische PEP-Carboxylase-Aktivität	32
1.2 Kinetische Untersuchungen zur PEP-Carboxylase	33
1.3 Untersuchungen zur Regulation der PEP-Carboxylase	34
2. Konstruktion und Charakterisierung definierter PEP-Carboxylase-negativer Mutanten von <i>C. glutamicum</i>	35
2.1 Inaktivierung des Gens für die PEP-Carboxylase in <i>C. glutamicum</i> Wildtyp, MH20-22B und ATCC 21573	35
2.2 Vergleichende Wachstumsexperimente mit den PEP-Carboxylase-negativen Mutanten und den Ausgangsstämmen	37
2.3 Vergleichende Untersuchungen zur Aminosäure-Produktion mit den PEP-Carboxylase-negativen Mutanten und den Ausgangsstämmen	38
3. Konstruktion und Charakterisierung definierter PEP-Carboxylase- / Isocitrat-Lyase-Doppelmutanten von <i>C. glutamicum</i>	40
3.1 Inaktivierung der Gene für die PEP-Carboxylase und die Isocitrat-Lyase in <i>C. glutamicum</i> Wildtyp und MH20-22B	40
3.2 Vergleichende Wachstumsexperimente mit der PEP-Carboxylase- / Isocitrat-Lyase-negativen Doppelmutante und den Ausgangsstämmen	45
3.3 Vergleichende Untersuchungen zur Lysin-Produktion der PEP-Carboxylase- / Isocitrat-Lyase-negativen Doppelmutante und dem Ausgangstamm	47
4. ¹³CO₂-Markierungsexperimente mit dem Wildtyp und der PEP-Carboxylase-negativen Mutante von <i>C. glutamicum</i>	48
5. Nachweis und Charakterisierung von Enzymen in <i>C. glutamicum</i>, die neben der PEP-Carboxylase an den PEP- und Pyruvat-Verzweigungspunkten beteiligt sind	49
5.1 Die PEP-Carboxykinase	50
5.2 Die PEP-Carboxytransphosphorylase	53
5.3 Das <i>Malat-Enzym</i>	53
5.4 Die Oxalacetat-Decarboxylase	55
5.5 Die Pyruvat-Carboxylase	55
6. Nachweis und Charakterisierung der Pyruvat-Carboxylase in permeabilisierten Zellen von <i>C. glutamicum</i>	56
6.1 Entwicklung und Optimierung eines diskontinuierlichen Testsystems	56

6.2	¹³ C-Markierungsexperimente zur Charakterisierung der Pyruvat-carboxylierenden Reaktion in <i>C. glutamicum</i>	62
6.3	Einfluß der Kohlenstoff-Quelle auf die spezifische Pyruvat-Carboxylase-Aktivität	63
6.4	Kinetische Untersuchungen zur Pyruvat-Carboxylase	64
6.5	Untersuchungen zur Regulation der Pyruvat-Carboxylase	65
7.	Einfluß von Biotin auf das Wachstum und die Aminosäure-Produktion von <i>C. glutamicum</i>	67
7.1	Vergleichende Wachstumsexperimente mit dem Wildtyp und der PEP-Carboxylase-negativen Mutante von <i>C. glutamicum</i> unter Biotin-Limitierung .	67
7.2	Vergleichende Untersuchungen zur Produktion von Glutamat, Lysin und Tyrosin unter Biotin-Limitierung	70
8.	Nachweis und Identifizierung von biotinhaltigen Proteinen in <i>C. glutamicum</i>	74
8.1	Nachweis biotinhaltiger Proteine in Rohextrakten	74
8.2	Partielle Aufreinigung und Ansequenzierung der biotinhaltigen Proteine p70 und p125	75
8.3	Vergleichende Untersuchungen zum Auftreten von p125	77
9.	Isolierung und Charakterisierung einer Pyruvat-Carboxylase-negativen Mutante von <i>C. glutamicum</i>	81
10.	Isolierung des Gens für die Pyruvat-Carboxylase aus <i>C. glutamicum</i> ...	83
IV.	Diskussion	90
V.	Zusammenfassung	105
VI.	Literatur	107

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. It emphasizes that every entry should be supported by a valid receipt or invoice. This ensures transparency and allows for easy verification of the data.

Additionally, it is noted that regular audits are essential to identify any discrepancies or errors early on. This proactive approach helps in maintaining the integrity of the financial statements and prevents minor issues from escalating into major problems.

The document also highlights the need for clear communication between all parties involved. Regular meetings and reports should be used to keep everyone informed about the current status and any changes that may affect the business operations.

In conclusion, the success of any business venture depends on the quality of its financial management. By adhering to the principles outlined in this document, businesses can ensure that their financial records are accurate, reliable, and compliant with all relevant regulations.

It is the responsibility of the management to create a strong financial foundation for the organization. This involves not only tracking expenses and revenues but also analyzing the data to make informed decisions that drive the business forward.

Finally, it is important to remember that financial management is an ongoing process. As the business grows and evolves, the financial systems and procedures must be continuously updated to meet the changing needs of the organization.

Abkürzungen

1. Substrate, Produkte und Coenzyme enzymatischer Reaktionen

ATP/ADP/AMP	Adenosin-Tri-/Di-/Monophosphat
CoA	Coenzym A
GTP/GDP	Guanosin-Tri-/Diphosphat
ITP/IDP	Inosin-Tri/Diphosphat
NAD/NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid, oxidiert/reduziert
NADP/NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, oxidiert/reduziert
OAA	Oxalacetat
PEP	Phosphoenolpyruvat

2. Enzyme

GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
ICL	isocitrat-Lyase
ME	NADP ⁺ -abhängige, decarboxylierende Malat-Dehydrogenase (<i>Malat-Enzym</i>)
OAADCx	Oxalacetat-Decarboxylase
PCx	Pyruvat-Carboxylase
PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
PEPctrP	Phosphoenolpyruvat-Carboxytransphosphorylase
PEPCx	Phosphoenolpyruvat-Carboxylase
PK	Pyruvat-Kinase

3. Aminosäuren und Nukleinsäure-Basen

A	Alanin	M	Methionin	A	Adenin
C	Cystein	N	Asparagin	C	Cytosin
D	Asparaginsäure	P	Prolin	G	Guanin
E	Glutaminsäure	Q	Glutamin	T	Thymin
F	Phenylalanin	R	Arginin	DNA	Desoxyribonukleinsäure
G	Glycin	S	Serin	bp	Basenpaare
H	Histidin	T	Threonin		
I	Isoleucin	V	Valin		
K	Lysin	W	Tryptophan		
L	Leucin	Y	Tyrosin		

5. Chemikalien und Puffer

CTAB	NN-Cethyl-N-Trimethyl-Ammoniumbromid
DTNB	Dithionitrobenzoesäure
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
MES	Morpholinoethansulfonsäure
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Sodium Saline Citrat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

6. Maßeinheiten

(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen
Da	Dalton
g	Gramm
h	Stunde
Hz	Hertz
l	Liter
M	Mol
min	Minute
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
U	Einheit der Enzymaktivität ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$)

7. sonstige Abkürzungen

AC	EMBL-Genbank <i>Accession</i> -Nummer
C-/N-Terminus	Carboxy-/Aminotermiales Ende von Peptidketten
FPLC	<i>Fast Performance Liquid Chromatography</i>
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonanz</i> (Kern-Spin-Resonanz)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
ssp.	Subspezies
UV	Ultraviolett

I. Einleitung

Die Gattung *Corynebacterium* umfaßt sowohl pathogene Arten, wie z.B. *C. diphtheriae*, als auch nicht-pathogene, meistens saprophytische Arten. Viele dieser nicht-pathogenen Arten hat sich der Mensch zunutze gemacht, z.B. für die industrielle Produktion von Äpfelsäure (Takata *et al.*, 1979), für die Biotransformation von Steroiden (Constantinides, 1980) und die Käseherstellung (Lee *et al.*, 1985; Teuber *et al.*, 1987). Besondere Bedeutung finden Corynebakterien in der Produktion von Primärmetaboliten, z.B. Nucleotiden und L-Aminosäuren (Kinoshita, 1985; Liebl, 1991). Die wichtigsten Arten der Aminosäure-produzierenden coryneformen Bakterien sind *C. glutamicum* und seine Subspezies *flavum* und *lactofermentum* (Kinoshita, 1985; Liebl, 1991). *C. glutamicum* wurde als *Micrococcus glutamicus* 1957 von Kinoshita und Mitarbeitern erstmals als Gram-positives, Biotin-auxotrophes, Glutamat-produzierendes Eubakterium aus dem Boden isoliert und charakterisiert (Kinoshita *et al.*, 1957). Die Glutamat-Produktion kann durch Biotin-Mangel (Shiio *et al.*, 1962, Gutmann *et al.*, 1992) oder durch Zugabe von Penicillin, Detergenzien oder Lokalanästhetika zum Wachstumsmedium hervorgerufen werden (Takinami *et al.*, 1965; Nunheimer *et al.*, 1970; Hucheng *et al.*, 1984; Lambert *et al.*, 1995). Neben Glutamat, das als Geschmacksverstärker und Würzmittel in der Lebensmittelindustrie Verwendung findet und jährlich mit ca. 450.000 t produziert wird, werden heute mit Hilfe von geeigneten *C. glutamicum*-Mutanten auch essentielle Aminosäuren wie z.B. Isoleucin und vor allem Lysin (280.000 t pro Jahr) produziert (Kleemann *et al.*, 1985). Diese Aminosäuren dienen als Supplemente für die Futtermittelherstellung sowie als Ausgangssubstanzen von Medikamenten (Leuchtenberger, 1984) und als Zusätze von Infusionslösungen (Kleemann *et al.*, 1985).

Aufgrund der industriellen Bedeutung von *C. glutamicum* wurden in den letzten Jahren die Biosynthesewege für Glutamat, Lysin, Threonin und Isoleucin molekulargenetisch und physiologisch eingehend charakterisiert (Eikmanns *et al.*, 1993; Eggeling, 1994; Sahm *et al.*, 1995). Durch Überexpression einzelner Gene, die für Schlüsselenzyme der Aminosäurebiosynthese kodieren, wurde der Kohlenstofffluß gezielt in Richtung der Lysin-, Threonin-, Tyrosin- bzw. Phenylalanin-Biosynthese umgeleitet (Morinaga *et al.*, 1987; Eikmanns *et al.*, 1991a; Cremer *et al.*, 1991; Reinscheid *et al.*, 1994a; Ikeda & Katsumata, 1992;) und somit die Produktion der entsprechenden Aminosäuren erhöht.

Neben den Versuchen zum besseren Verständnis der anabolen Stoffwechselwege wurden zunehmend auch Untersuchungen zum Zentralstoffwechsel durchgeführt. So wurden die Gene für die Glycolyse-Enzyme Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolase (von der Osten *et al.*, 1989), Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, 3-Phosphoglycerat-Kinase, Triosephosphat-Isomerase (Eikmanns, 1992) und Pyruvat-Kinase (Gubler *et al.*,

1994a; Jetten *et al.*, 1994a) sowie für die Tricarbonsäure-Zyklus-Enzyme Citrat-Synthase und Isocitrat-Dehydrogenase (Eikmanns *et al.*, 1994; Eikmanns *et al.*, 1995) isoliert und charakterisiert. Das *lpc*-Gen, das für die liponamidtragende Untereinheit der Pyruvat-Dehydrogenase und der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase kodiert, konnte ebenfalls isoliert werden (Schwinde, 1995). Desweiteren liegen die Gene der Schlüsselenzyme des Glyoxylat-Zyklus, Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase, vor (Reinscheid *et al.*, 1994b/c).

Die Bedeutung des Zentralstoffwechsels für das Wachstum und die Produktion von Aminosäuren liegt in der Energieerzeugung, der Regenerierung von Reduktionsäquivalenten sowie in der Bereitstellung geeigneter Kohlenstoff-Vorstufen für Biosynthesen. Als Kohlenstoff- und Energiequellen kann *C. glutamicum* Kohlenhydrate, aber auch organische Säuren, wie Acetat, Lactat oder Pyruvat, verwerten (Abbildung 1). Als Substrate für die Herstellung von Aminosäuren mit *C. glutamicum* dienen jedoch meistens Glucose oder Saccharose (Kinoshita, 1985). Der Abbau von Glucose kann in *C. glutamicum* über zwei katabole Stoffwechselwege erfolgen, die Glycolyse (Embden-Meyerhof-Parnas-Weg) und den oxidativen Pentosephosphat-Weg (Kinoshita, 1985). Die anschließende Umsetzung des Kohlenstoffs über den Tricarbonsäure-Zyklus dient der Energiegewinnung über die vollständige Oxidation zu CO_2 . Darüberhinaus werden Intermediate des Tricarbonsäure-Zyklus als Vorstufen für den anabolen Baustoffwechsel verwendet. Während des Wachstums und besonders während der Aminosäure-Produktion benötigt der Tricarbonsäure-Zyklus von *C. glutamicum* eine kontinuierliche und effektive Regenerierung von Oxalacetat, um die Intermediate des Tricarbonsäure-Zyklus, die für Biosynthesen abgezogen wurden, wieder aufzufüllen. Diese Funktion übernehmen sogenannte anaplerotische (griech.: auffüllende) Enzyme.

In der Natur sind eine Reihe verschiedener anaplerotischer Reaktionen bekannt (Kornberg, 1966). Bakterien, Pilze und Pflanzen, die Acetat, Fettsäuren oder Ethanol als alleinige Kohlenstoff-Quelle nutzen können, verwenden den Glyoxylat-Zyklus mit den Schlüsselenzymen Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase, um aus zwei Molekülen Acetyl-CoA ein Molekül Malat zu generieren (Kornberg, 1966). Bei Wachstum auf Kohlenhydraten, auf den organischen Säuren Lactat und Pyruvat oder auf Gluconat übernehmen carboxylierende Reaktionen, ausgehend von Phosphoenolpyruvat (PEP) oder Pyruvat die anaplerotische Funktion (Kornberg, 1966).

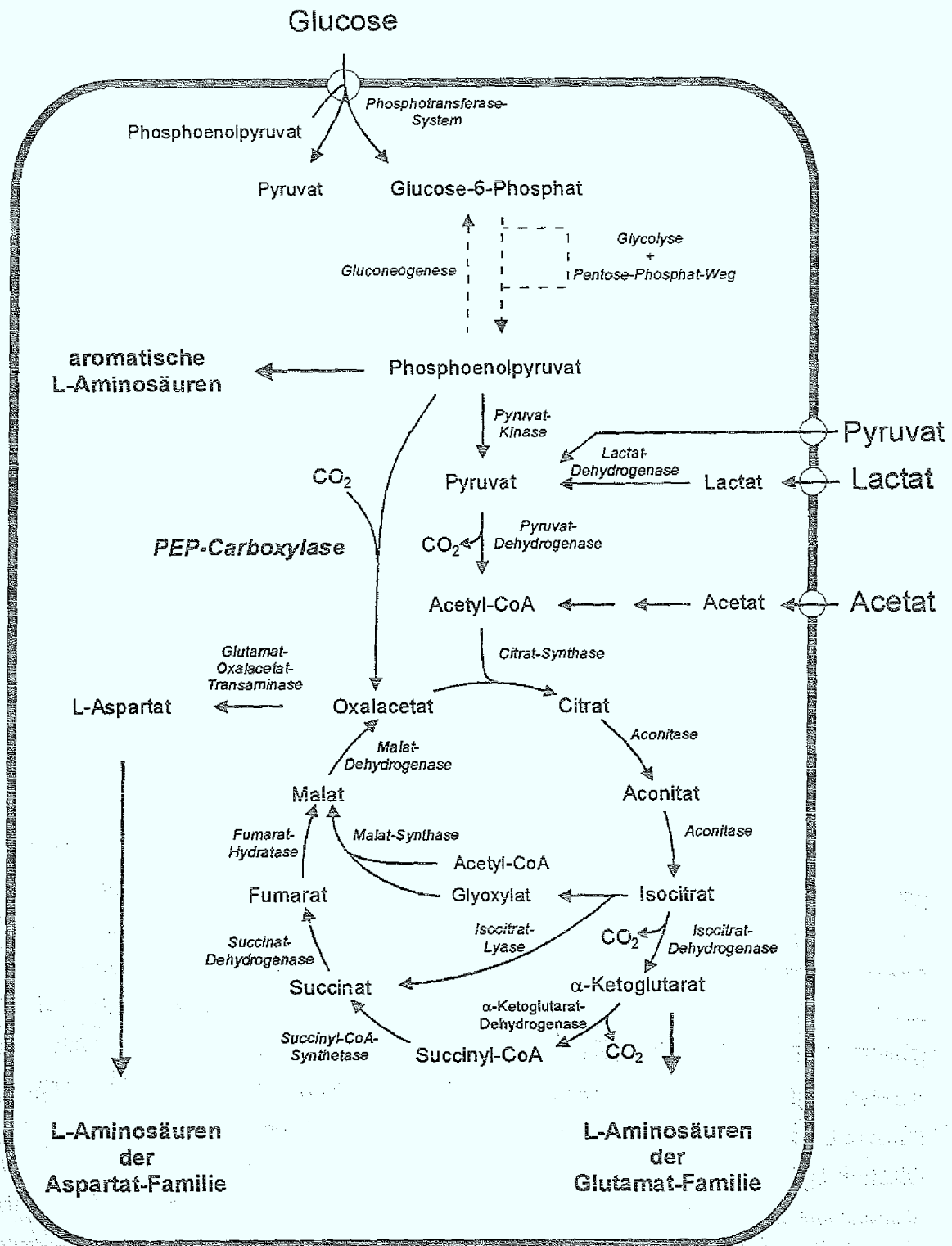
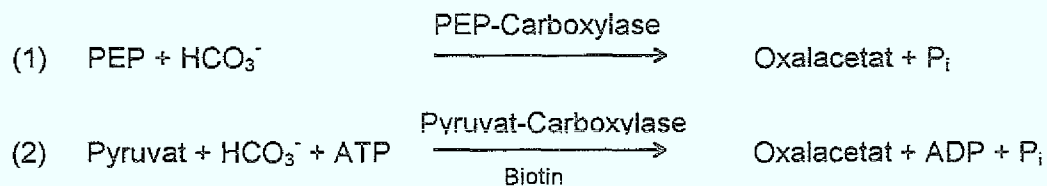


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Zentralstoffwechsels von *C. glutamicum*. Detailliert dargestellt sind der Tricarbonsäure-Zyklus und die anaplerotischen Reaktionen der PEP-Carboxylase und des Glyoxylat-Zyklus.

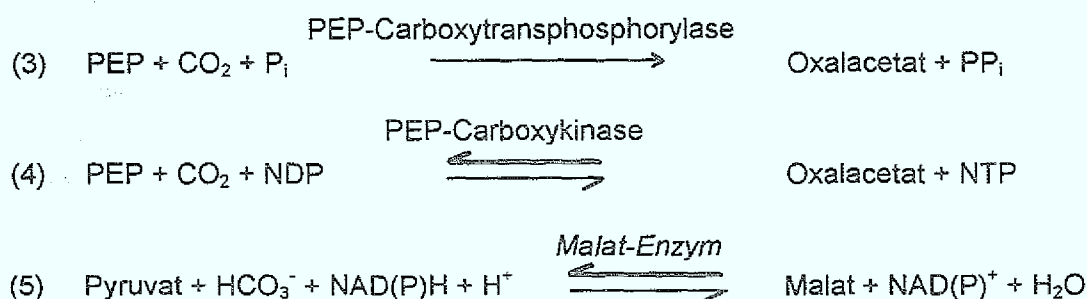
Anaplerotische Carboxylierungsreaktionen werden in vielen Organismen durch die PEP-Carboxylase oder die Pyruvat-Carboxylase katalysiert (Kornberg, 1966).



Die PEP-Carboxylase (EC 4.1.1.31) katalysiert die irreversible Carboxylierung von PEP zu Oxalacetat (Reaktion 1). Einige Bakterien, wie *Escherichia coli* (Theodore & Engelsberg, 1965; Ashworth & Kornberg, 1966), *Azotobacter vinelandii* (Liao & Atkinson, 1971), *Pseudomonas fluorescens* (Higa *et al.*, 1976) und *P. citronellolis* (O'Brien *et al.*, 1977), ebenso wie Cyanobakterien (Owtrim & Coleman, 1986), Streptomyceten (Dekleva & Strohl, 1988) und C₃-Pflanzen (Ting & Osmond, 1973) verfügen über dieses Enzym. Eine Sonderrolle übernehmen Isoenzyme der PEP-Carboxylase bei der speziellen photosynthetischen CO₂-Assimilation der C₄-Pflanzen sowie im diurnalen Säuremetabolismus der Crassulaceen (Ting & Osmond, 1973; Poetsch *et al.*, 1991) und in methylothrophen Bakterien als Bestandteil des Serin-Wegs zur Assimilation von C₁-Körpern (Arps *et al.*, 1993).

Die Pyruvat-Carboxylase (EC 6.4.1.1) ist ein Biotin-Enzym und katalysiert die ATP-abhängige Carboxylierung von Pyruvat zu Oxalacetat (Reaktion 2) (Wood & Utter, 1965; Scrutton & Young, 1972). Das Enzym konnte bei photosynthetisch aktiven Bakterien, wie *Rhodospseudomonas spheroides* (Payne & Morris, 1969) und *Rhodobacter capsulatus* (Willson, 1988; Modak & Kelly, 1995) sowie bei *Arthrobacter globiformis* (Gurr & Jones, 1977) nachgewiesen werden. Auch *Bacillus subtilis* und thermophile *Bacillus*-Arten (Diesterhaft & Freese, 1973; Sundaram, 1973; Cazzulo *et al.*, 1970) verfügen, ebenso wie tierische Organismen (Kornberg, 1966), Hefen (Ruiz-Amil *et al.*, 1965; Wills & Melham, 1985; Hartman & Keen, 1974) und filamentöse Pilze (Osmani *et al.*, 1985) über die Pyruvat-Carboxylase. Während *E. coli* und *B. subtilis* nur PEP-Carboxylase bzw. nur Pyruvat-Carboxylase als anaplerotisches Enzym besitzen (Chao & Liao, 1993; Diesterhaft & Freese, 1973), konnten in *P. citronellolis*, *P. fluorescens*, *A. vinelandii* und *Thiobacillus novellus* beide Enzyme nachgewiesen werden (Taylor *et al.*, 1972; O'Brien *et al.*, 1977; Milrad de Forchetti & Cazzulo, 1976; Higa *et al.*, 1976; Scrutton & Taylor, 1974; Charles & Willer, 1984).

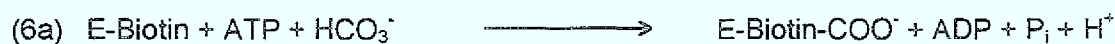
Neben der PEP-Carboxylase und der Pyruvat-Carboxylase gibt es noch andere C₃-carboxylierende Enzyme die anaplerotische Funktionen übernehmen können: die PEP-Carboxytransphosphorylase, die PEP-Carboxykinase oder das *Malat-Enzym*.



Die PEP-Carboxytransphosphorylase (EC 4.1.1.38) carboxyliert PEP zu Oxalacetat (Reaktion 3) unter Bildung von Pyrophosphat (Utter & Kolenbrander, 1972) und wurde bisher nur in Propionsäurebakterien (Siu & Wood, 1962), *Entamoeba histolytica* (Reeves, 1970) und *Acetobacterium woodii* (Eden & Fuchs, 1983) gefunden. PEP-Carboxykinasen sind dagegen ubiquitär verbreitete Enzyme. Sie katalysieren die reversible Carboxylierung von PEP zu Oxalacetat unter Bildung eines Nukleotid-Triphosphats (Reaktion 3), wobei sie entweder ATP- (EC 4.1.1.49), oder GTP/ITP-abhängig (EC 4.1.1.32) sind. ATP-abhängige PEP-Carboxykinasen finden sich bei Protozoen (Urbina, 1987; Linss *et al.*, 1993), *Saccharomyces cerevisiae*, Pflanzen und den meisten Bakterien (Utter & Kolenbrander, 1972). In tierischen Zellen (Utter & Kolenbrander, 1972), aber auch in einigen Bakterien, wie *Arthrobacter globiformis* (Utter & Kolenbrander, 1972) und *Alcaligenes eutrophus* (Schobert & Bowien, 1984) wurden GTP-abhängige PEP-Carboxykinasen nachgewiesen. In den meisten Fällen hat die PEP-Carboxykinase eine rein gluconeogenetische, d.h. decarboxylierende Funktion (Utter & Kolenbrander, 1972; Saz & Lescure, 1967), allerdings wurde sie in einigen Organismen als anaplerotisches Enzym beschrieben, z.B. bei *A. eutrophus* (Schobert & Bowien, 1984), bei *Anaerobiospirillum succiniciproducens* (Podkovyrov & Zeikus, 1993) sowie bei *Ascaris suum* (Rohrer *et al.*, 1986) und *Trypanosoma cruzi* (de Flombaum *et al.*, 1977).

Das *Malat-Enzym* (Malat-Dehydrogenase, NAD(P)⁺-abhängig, decarboxylierend; EC 1.1.1.40) katalysiert die Decarboxylierung von Malat zu Pyruvat unter Bildung von NAD(P)H (Reaktion 5) (Outlaw & Springer, 1983). In *E. coli*, *Pseudomonas putida* und *Neurospora crassa* konnten NADP⁺-abhängige *Malat-Enzyme* nachgewiesen werden (Sanwal *et al.*, 1968; Jacobson *et al.*, 1966; Zink, 1967). Das Enzym hat, ähnlich wie die PEP-Carboxylase im CO₂-Stoffwechsel der C₄-Pflanzen und der Crassulaceen eine wichtige Bedeutung (Wedding, 1989), da es das über die PEP-Carboxylase gebundene CO₂ für die photosynthetische CO₂-Fixierung über die Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase zugänglich macht. Untersuchungen zur Pyruvat-Carboxylierung im Rattenherz ergaben, daß hier wahrscheinlich das NADP⁺-abhängige *Malat-Enzym* für die anaplerotische CO₂-Fixierung verantwortlich ist (Sundqvist *et al.*, 1989).

Carboxylierende Reaktionen spielen nicht nur bei anaplerotischen Reaktionen, sondern auch in anderen Zentralstoffwechselwegen, wie z.B. bei der Fettsäurebiosynthese eine Rolle. Häufig ist Biotin als Coenzym für CO₂-fixierende Reaktionen verantwortlich (Moss & Lane, 1971; Knowles, 1989). Die biotinvermittelte Carboxylierung erfolgt in zwei Schritten. Zunächst wird das enzymgebundene Biotin ATP-abhängig carboxyliert und es entsteht Carboxybiotin (Reaktion 6a). In einem zweiten Schritt erfolgt die Übertragung der aktivierten Carboxylgruppe auf das entsprechende Akzeptormolekül (Reaktion 6b) (Knowles, 1989; Attwood, 1995).



Zu den biotinabhängigen Carboxylasen zählen neben der Pyruvat-Carboxylase die Acetyl-CoA-Carboxylase, das Schlüsselenzym der Fettsäurebiosynthese, und andere Acyl-CoA-Carboxylasen, wie z.B. die Propionyl-CoA-Carboxylase und die Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase (Moss & Lane, 1971). Weitere biotinabhängige Enzyme, deren Funktion nicht in der Fixierung von CO₂, sondern in der Übertragung von Carboxylgruppen oder in der Nutzung der Decarboxylierungsreaktion zur Bildung von Energie liegt, sind die Transcarboxylase von Propionsäurebakterien (Knowles, 1989; Moss & Lane, 1972; Thornton *et al.*, 1993) und die Na⁺-pumpenden, membranständigen Decarboxylasen einiger anaerober Bakterien. Zu den letzteren zählt z.B. die Oxalacetat-Decarboxylase von *Klebsiella pneumoniae* (Dimroth, 1982; Dimroth, 1987).

In *C. glutamicum* und verwandten Biotin-auxotrophen, Glutamat-produzierenden Bakterien wurden anaplerotische Reaktionen aufgrund ihrer zentralen Rolle bei der Synthese von Aminosäuren schon früh untersucht. So konnte 1960 gezeigt werden, daß *C. glutamicum* ssp. *flavum* über C₃-carboxylierende Enzyme ebenso wie über den Glyoxylat-Zyklus (Abbildung 1) verfügt (Shiio *et al.*, 1960). Ozaki und Shiio (1969) wiesen die PEP-Carboxylase in *C. glutamicum* ssp. *flavum* nach, und konnten zeigen, daß es sich um ein allosterisches Enzym handelt, das durch Aspartat inhibiert und durch Acetyl-CoA aktiviert wird (Ozaki & Shiio, 1969; Mori & Shiio, 1985a/b). In einer Mutante von *C. glutamicum* ssp. *flavum* führte die Aufhebung der Feedback-Hemmung der PEP-Carboxylase durch Aspartat in Kombination mit einer reduzierten Citrat-Synthase-Aktivität und einer deregulierten Aspartat-Kinase zu einer Steigerung der Lysin-Produktion um 50 % gegenüber entsprechenden Mutanten, die nur über eine deregulierte Aspartat-Kinase verfügten (Yokota & Shiio, 1988). Mutanten mit fehlender PEP-Carboxylase-Aktivität, die über ungerichtete Mutagenese erzeugt wurden, waren Glutamat-auxotroph, und konnten ohne Supplementierung mit Glutamat auf Glucose

nicht wachsen (Shijo & Ujigawa, 1978; Sano *et al.*, 1988). Dieser Befund deutet an, daß der PEP-Carboxylase in *C. glutamicum* eine entscheidende Bedeutung bei der Aminosäure-Produktion zukommt, und daß sie das einzige anaplerotische Enzym bei Wachstum auf Glucose darstellt (Liebl, 1991). Tosaka *et al.* postulierten 1979, daß *C. glutamicum* ssp. *lactofermentum* neben der PEP-Carboxylase auch eine biotin-abhängige Pyruvat-Carboxylase besitzt. Der Nachweis dieses Enzyms konnte jedoch von einer Reihe anderer Arbeitsgruppen für *C. glutamicum* nicht verifiziert werden (Gubler *et al.*, 1994b; Jetten *et al.*, 1994b; Coccagn-Bousquet & Lindley, 1995).

Aufgrund der offensichtlichen Bedeutung der PEP-Carboxylase für das Wachstum und die Aminosäure-Produktion wurde die PEP-Carboxylase auf molekulargenetischer Ebene untersucht. Es gelang das Gen für die PEP-Carboxylase (*ppc*) aus *C. glutamicum* zu isolieren und zu charakterisieren (Eikmanns *et al.*, 1989; O'Reagan *et al.*, 1989). Das *ppc*-Gen liegt zusammen mit den Genen für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, die 3-Phosphoglycerat-Kinase und die Triosephosphat-Isomerase in einem Gen-Cluster vor und kodiert für ein Protein von 919 Aminosäuren. Die Überexpression des *ppc*-Gens hatte im Wildtyp von *C. glutamicum* keine Auswirkungen auf das Wachstum (Eikmanns *et al.*, 1989), in einem Lysin-Produktionsstamm führte die Überexpression jedoch zu einer 10 bis 20 %igen Erhöhung der Lysin-Ausbeute (Cremer *et al.*, 1991). Das Ergebnis unterstrich die Bedeutung dieses Enzyms für die Aminosäure-Produktion.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war zunächst die Aufklärung der Rolle der PEP-Carboxylase im Zentralstoffwechsel und bei der Aminosäure-Produktion von *C. glutamicum*. Außerdem sollte überprüft werden, ob es in *C. glutamicum* weitere anaplerotische Reaktionen gibt. Hierzu wurden zunächst definierte PEP-Carboxylase-negative Mutanten verschiedener *C. glutamicum*-Stämme konstruiert und bezüglich Wachstum und Aminosäure-Produktion analysiert. Im weiteren wurden physiologische, enzymatische, proteinchemische, NMR-spektroskopische und molekulargenetische Untersuchungen durchgeführt, um der Frage nach zur PEP-Carboxylase alternativen anaplerotischen Enzymen in *C. glutamicum* nachzugehen.

II. Material und Methoden

1. Bakterienstämme und Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten *Escherichia coli*- und *Corynebacterium glutamicum*-Stämme sowie ihre Eigenschaften sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Tabelle 2 zeigt die verwendeten Cosmide und Plasmide.

Tabelle 1: Verwendete Stämme und ihre genetischen Marker

Stamm	relevante Eigenschaften	Herkunft / Referenz
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>supE44, hsdR17, recA1, endA1, lacZα</i> <i>gyrA96, thi-1, relA1</i>	Hanahan, 1985
S17-1	<i>thi-1, endAR1, hsdR17,</i> <i>supE44, pro</i>	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>C. glutamicum</i>		
ATCC 13032	Wildtyp	ATCC ^a
WT-PP	13032 <i>ppc::pEM1ppc_{int}</i>	diese Arbeit
WT-KT	13032 Δ <i>ppc::cat</i>	diese Arbeit
WT-PPW	13032 <i>aceA::pSUP301aceA_{int}Δppc::cat</i>	diese Arbeit
ASK1	13032 <i>aceA::pSUP301aceA_{int}</i>	Reinscheid <i>et al.</i> , 1994b
MH20-22B	AEC-Resistenz, <i>leuD</i>	Schrumpf <i>et al.</i> , 1992
MH20-22B-PP	MH20-22B <i>ppc::pEM1ppc_{int}</i>	diese Arbeit
MH20-22B-KT	MH20-22B Δ <i>ppc::cat</i>	diese Arbeit
MH20-22B-PPW	MH20-22B:: <i>pSUP301aceA_{int}Δppc::cat</i>	diese Arbeit
ATCC 21573	undefinierter Tyrosin-Produzent	ATCC ^a
21573-CK	21573 <i>ppc::pEM1ppc_{int}</i>	diese Arbeit
R127	AS019, <i>res⁻</i>	Liebl & Schein, 1990
SP733	R127, <i>pyc⁻</i>	diese Arbeit
SP078	R127, <i>pyc^{leaky}</i>	diese Arbeit

^a American Type Culture Collection = ATCC

Tabelle 2: Verwendete Cosmide und Plasmide mit ihren Eigenschaften

Vektor	Eigenschaften	Referenz
pUC18	Amp ^R , <i>ori colE1</i>	Vieira & Messing, 1982
pEM1	Km ^R , mobilisierbar (<i>oriT</i>), <i>oriV</i>	Schrumpf <i>et al.</i> , 1991
pK19 <i>mobsacB</i>	Km ^R , <i>sacB</i> , <i>oriT</i> , <i>oriV</i>	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pUC-ppcII	pUC18-Derivat mit dem <i>ppc</i> -Gen aus <i>C. glutamicum</i>	Eikmanns <i>et al.</i> , 1989
pEM-PP	Vektor pEM1 mit dem 0,65 kb <i>XhoI</i> internen <i>ppc</i> -Fragment aus pUC-ppcII	diese Arbeit
pEC5	<i>E. coli</i> / <i>C. glutamicum</i> -Pendelvektor, Km ^R , Cm ^R	Eikmanns <i>et al.</i> , 1991b
pUC-pcat	pUC-ppcIIΔ(<i>ppc_{int}</i>) mit dem <i>cat</i> -Gen aus pEC5	diese Arbeit
pPW2	pK18 <i>mobsacB</i> mit <i>cat</i> flankiert von den 5' - und 3'-Enden von <i>ppc</i>	diese Arbeit
pSUP- <i>aceA_{int}</i>	mobilisierbarer Vektor pSUP301 mit einem internen <i>aceA</i> -Fragment	Reinscheid <i>et al.</i> , 1994b
pGEM-T	pGEM-5Zf(+), <i>EcoRV</i> -geschnitten mit 3'-terminalen Thymidinen	Promega, USA
pEK0	Km ^R , <i>ori pBL1</i> , <i>ori colE1</i>	Eikmanns <i>et al.</i> , 1991b
pHC79-Genbank	pHC79 mit <i>Sau3A</i> -geschnittenen in die <i>BamHI</i> -Stelle klonierte Fragmenten chromosomaler <i>C. glutamicum</i> -DNA	Börmann <i>et al.</i> , 1992

Amp^R = Ampicillin-Resistenz; Km^R = Kanamycin-Resistenz;

Cm^R = Chloramphenicol-Resistenz

2. Chemikalien

Im folgenden werden die verwendeten Chemikalien und Produkte, sowie ihre Bezugsquelle aufgelistet. Die hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck AG, Darmstadt bezogen.

Appligene, Heidelberg: Phenol, wassergesättigt

Biomol Feinchemikalien, Hamburg: 3-N-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)

Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA: Acrylamid/Bisacrylamid

Boehringer, Mannheim: Ampicillin; Avidin; ADP; AMP; ATP; Chloramphenicol; Dithiothreitol; GDP; IDP; ITP; NADH; NADPH; Nonradioactive DNA Labeling and Detection Kit; PCR Core Kit; PCR DIG Probe Synthesis Kit; Restriktionsendonukleasen und andere Enzyme; Streptavidin-alkalische Phosphatase-Konjugat

Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA: Na-[¹³C]Carbonat, 99% an ¹³C angereichert

Difco Laboratories, Detroit, USA: Bacto-Agar; Bacto-Trypton; Brain-Heart-Infusion-Medium; Hefe-Extrakt

Genomed, Bad Oeynhausen: JETSORB Gel Extraction Kit/300

Isotec Inc., A Matheson, USA Company, Miamisburg, USA: [2-¹³C]Pyruvat; [3-¹³C]Pyruvat (jeweils 99 % an ¹³C angereichert)

Millipore, Eschborn: Immobilon-P-Membran (Polyvinylidendifluorid)

Pharmacia LKB, Freiburg: NAP-10 Säulen

Promega, Heidelberg: pGEM-T Vector System I; SoftLink Soft Release Avidin Resin

Schleicher und Schüll, Dassel, Schweiz: Nytran-Nylonfilter N13

Serva Feinbiochemica, Heidelberg: Agarose; Natriumdodecylsulfat (SDS)

Sigma Chemie, München: Ethidiumbromid; Na-Glutamat; Naphtol Blue Black (Amidoschwarz); Na-Pyruvat; Na-Laurylsarkosin; Rinderserum-Albumin (BSA); Molekulargewichtsstandard S7B

3. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

Verwendete Medien:

Komponenten	Komplexmedien		
	2 x TY (Sambroock <i>et al.</i> , 1989)	Luria-Bertani (LB) (Sambroock <i>et al.</i> , 1989)	BHI (Difco ^a)
NaCl	5 g/l	10 g/l	-
Hefeextrakt	10 g/l	5 g/l	-
Trypton	16 g/l	10 g/l	-
Brain Heart Infusion	-	-	37 g/l

^a Difco Laboratories, Detroit, MA, USA

Minimalmedium: (Eikmanns <i>et al.</i> , 1991a)	CgC	5 g/l Ammoniumsulfat; 5 g/l Harnstoff; 5 mg/l KH ₂ PO ₄ ; 5 mg/l K ₂ HPO ₄ ; 0,25 g/l MgSO ₄ ; 0,01 g/l CaCl ₂ 1 ml Spurenelementelösung/l (1 g/l FeSO ₄ ; 1 g/l MnSO ₄ ; 0,1 g/l ZnSO ₄ ; 0,02 g/l CuSO ₄ ; 2 mg/l NiCl; in 100 ml H ₂ O dest. gelöst)	
	42 g/l MOPS;		pH 6,3

Kohlenstoffquellen und Biotin (200 µg/l) wurden nach dem Autoklavieren steril hinzugegeben

Zur Herstellung von festen Nährböden wurden den jeweiligen Medien 18 g/l Agar zugesetzt.

Anzucht von *E. coli* und *C. glutamicum*

Die *E. coli*-Stämme wurden ausschließlich auf den oben aufgeführten Komplexmedien gezüchtet. Falls nötig, wurden Antibiotika in folgenden Konzentrationen zum Medium gegeben: Kanamycin, 50 µg/ml; Ampicillin, 50 µg/ml; Chloramphenicol, 25 µg/ml.

Die Kultivierung der *C. glutamicum*-Stämme erfolgte ebenfalls auf den Komplexmedien 2 xTY und LB. Für die Anzucht der Integrationsmutanten wurde dem Medium 25 µg Kanamycin /ml zugesetzt. Die Selektion der „Genaustausch“-Mutanten erfolgte auf 25 µg Kanamycin und 5 µg Chloramphenicol pro ml, wobei dem Medium zusätzlich 10 % Saccharose zugesetzt wurde. Als Selektionsmedium nach der Konjugation diente BHI-Medium. Zur Regeneration der Zellen nach Elektroporation wurde BHIS-Medium (BHI plus 0,5 M Sorbit) nach Liebl *et al.* (1989) verwendet. Als Standard-Minimalmedium diente CgC-Medium. Als C-Quellen wurde in der Regel 4 % (w/v) Glucose-Monohydrat, 2 % (v/v) D,L-Na-Lactat oder 2 % (w/v) K-Acetat eingesetzt. Für die Anzucht der *C. glutamicum* Stämme unter Biotin-Limitierung wurden die Zellen falls nicht anders beschrieben, in CgC mit 50 µg Biotin /l und der entsprechenden C-Quelle vorgezchtet, am Ende der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und zweimal in TN-Puffer (50 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, pH 6,3) gewaschen. Die Vorkulturen dienten als Inokulum für die Hauptkulturen auf CgC-Medium mit den entsprechenden C-Quellen und verschiedenen Biotin-Konzentrationen (0,5 bis 200 µg/l).

Zur Anzucht von *C. glutamicum* unter Glutamat-Produktionsbedingungen wurden die Zellen in CgC-Minimalmedium unter Biotin-Limitierung mit 10 µg Biotin /l für den Wildtyp und 50 µg Biotin /l für PEP-Carboxylase negative Mutante vorgezchtet und anschließend in ein Medium mit noch geringerer Biotin-Konzentration (1 µg/l für Wildtyp und 10 µg/l für PEP-Carboxylase negative Mutante) überimpft. Das Wachstum des Stammes MH20-22B und seiner definierten Mutanten unter Lysin-Produktionsbedingungen erfolgte in CgC-Medium mit 4 % Glucose. Die Anzucht des Stammes ATCC 21573 und seiner definierten PEP-Carboxylase-negativen Mutante erfolgte ebenfalls in CgC-Medium mit 10 % Glucose, das mit 2 mM Tyrosin und 2 mM Tryptophan supplementiert wurde.

Für das $^{13}\text{HCO}_3^-$ -Markierungsexperiment wurden die *C. glutamicum*-Stämme in LB-Medium vorgezchtet und anschließend in 60 ml CgC-Medium mit 2 % Glucose überimpft. In der exponentiellen Wachstumsphase wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten je 1 g $\text{Na}_2^{13}\text{CO}_3$ zugegeben. Zur Neutralisierung des Mediums wurde mit 1,6 ml 25 % HCl nachtitriert.

Für die Isolierung der Biotin-Proteine p70 und p125 wurde der Wildtyp von *C. glutamicum* auf CgC-Medium mit 2 % D,L-Lactat und 500 µg Biotin/l gezchtet.

Soweit nicht anders beschrieben erfolgte die Kultivierung der *C. glutamicum*-Stämme in 500 ml Erlenmeyerkolben, die 60 ml Medium enthielten und die zur besseren Durchlüftung mit zwei seitlichen Schikanen versehen waren. Die Kulturen wurden bei 120 Umdrehungen pro Minute (rpm) und 30°C inkubiert. Die *E. coli*-Stämme wurden in der Regel in Reagenzgläsern mit 5 ml Medium bei 37°C und 200 rpm gezchtet.

Das Wachstum wurde über die Zeit anhand der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) verfolgt. Die Wachstumsrate μ wurde in h^{-1} angegeben. Für Zellen mit einer OD_{600} von 1 wurde ein Trockengewicht (TG) von 0,3 mg TG/ml Kultur bestimmt.

Bestimmung von Substratverbrauch und Erträgen

Die Glucose-Konzentrationen in Kulturüberständen wurde in einem photometrischen Test durch die Umsetzung der Glucose zu Glucose-6-Phosphat durch die Hexokinase und die anschließende $NADP^+$ -abhängige Überführung von Glucose-6-Phosphat zu Gluconat-6-Phosphat. Die Zunahme an NADPH wurde anhand der Extinktionsänderung bei 340 nm bestimmt (Boehringer Mannheim).

Die Lactat-Konzentration in Kulturüberständen wurde durch die Umsetzung von Lactat zu Pyruvat durch die NAD^+ -abhängige Lactat-Dehydrogenase bestimmt. Um das Lactat quantitativ zu überführen wurde das gebildete Pyruvat in einer gekoppelten Glutamat-Pyruvat-Transaminase-Reaktion unter Bildung von Alanin abgezogen. Die Zunahme von NADH wurde photometrisch bei 340 nm verfolgt (Boehringer Mannheim).

Die Acetat-Konzentration im Medium wurde ebenfalls photometrisch in einem gekoppelten Enzymtest bestimmt. Acetat wurde durch die Reaktion der Acetyl-CoA-Synthetase zu Acetyl-CoA umgesetzt, das anschließend mit Oxalacetat über die Reaktion der Citrat-Synthase zu Citrat weiter reagiert. Das für diese Reaktion benötigte Oxalacetat wurde aus Malat und NAD^+ in Gegenwart von Malat-Dehydrogenase gebildet, und die Zunahme an NADH wurde anhand der Extinktionsänderung bei 340 nm bestimmt (Boehringer Mannheim).

Die Bestimmung der Substrat-Konzentrationen erfolgte anhand von entsprechenden Eichkurven.

Die Wachstumserträge $Y_{X/S}$ wurden angegeben in g Trockengewicht pro g verbrauchtem Substrat und die Produktionserträge $Y_{P/S}$ in g Produkt pro g verbrauchtem Substrat.

4. Quantitative Bestimmung von Aminosäuren

4.1 Silikonöl-Zentrifugation und Aufarbeitung der Zellen

Zur Bestimmung zellinterner Aminosäure-Konzentrationen ist eine schnelle Trennung von Zellen und Medium erforderlich, sowie die sofortige Inaktivierung des Stoffwechsels, um Abbau bzw. Synthese von Metaboliten zu vermeiden. Dazu wurde die Methode der Silikonöl-Zentrifugation verwendet (Klingenberg & Pfaff, 1967). Hierzu wurden in Mikrozentrifugenröhrchen (Beckman Instruments GmbH, München) 65 μ l Silikonöl der Dichte 1,04 g/cm^3 über 30 μ l einer 30%igen Perchlorsäure-Lösung geschichtet. Je nach Zelldichte der zu untersuchenden Kultur wurden verschiedene, definierte Probenvolumen

(OD₆₀₀ <20 = 200 µl; OD₆₀₀ 20-30 = 100 µl; OD₆₀₀ >30 = 50 µl) auf das Silikonöl gegeben und sofort abzentrifugiert (13000 rpm; Mikrofuge E, Beckman Instruments, München). Dabei gelangten die Zellen durch das Silikonöl in die Perchlorsäure und wurden dort inaktiviert. Der Kulturüberstand verblieb aufgrund der geringeren Dichte auf der Silikonöl-Phase und konnte direkt zur Aminosäurebestimmung verwendet werden. Das Zellpellet wurde weiter aufgearbeitet, indem zunächst die Zellen resuspendiert und dann vollständig durch Ultraschall aufgeschlossen wurden. Der erhaltene Zellextrakt wurde durch Zugabe von 5 M KOH / 1 M Triethanolamin neutralisiert und auf Eis inkubiert. Es kommt zu einer Phasenumkehrung, wodurch Zelltrümmer, denaturierte Proteine und präzipitiertes KClO₄ mit dem Silikonöl abzentrifugiert wurden (5 min, 13226 x g, RT). Der Überstand konnte dann zur Bestimmung zellinterner Aminosäurekonzentrationen verwendet werden.

Die Quantifizierung der internen Metabolitkonzentrationen erfolgte unter Zuhilfenahme folgender Parameter:

- ⇒ Zellvolumen biotinlimitierter Zellen: 1,6 µl/mg TG (Börmann-El Kholy, 1994)
- ⇒ Zellvolumen nicht-biotinlimitierter Zellen 2,0 µl/mg TG (Börmann-El Kholy, 1994)

4.2 *Reversed-Phase*-HPLC zur Bestimmung von Aminosäuren

Die quantitative Aminosäurebestimmung in Kulturüberständen, zellinternen Proben sowie in Pyruvat-Carboxylase-Testansätzen erfolgte mittels *Reversed-Phase*-Chromatographie. Verwendet wurde ein HPLC-Anlage der Firma Hewlett-Packard (Waldbronn) vom Typ HP 1090. Die Aminosäuren wurden mit ortho-Phthaldialdehyd über eine automatische Vorsäulenderivatisierung zu stark fluoreszierenden thiosubstituierten Isoindolen umgesetzt (Sternson *et al.*, 1984). Die unterschiedliche Hydrophobizität der Aminosäure-Derivate ermöglichte ihre Auftrennung durch die *reversed-phase*-HPLC (Jones & Gilligan, 1983) in einem geeigneten Laufmittelgradienten (Puffer A: 0,1 M Na-Acetat pH 7,2; Puffer B: Methanol). Vor- und Hauptsäule bestehend aus ODS 5 (C-18 Kieselgel) wurden von der Firma Chromatographieservice, Langerwehe geliefert. Die Detektion der fluoreszierenden Aminosäure-Derivate wurde bei einer Wellenlänge von 243 nm und einer Emissionswellenlänge von 436 nm durchgeführt.

4.3 Isolierung, Reinigung und Bestimmung der ¹³C-Markierungsmuster von Aminosäuren

Threonin, dessen ¹³C-Markierungsmuster aufgeklärt werden sollte, wurde aus Zellen, die in Anwesenheit von Na₂¹³CO₃ gewachsen waren, durch Totalhydrolyse der Zellproteine

isoliert. Aspartat aus Pyruvat-Carboxylase-Testansätzen wurde direkt isoliert. Für die Totalhydrolyse der Zellproteine wurden die Zellen nach der Ernte in 6 N HCl für 12 Stunden bei 105°C inkubiert. Zelltrümmer und sonstige unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (5000 rpm, 20 min, RT) und anschließende Ultrafiltration durch einen Dyna Gard Filter (0,2 µm Ø) der Firma Microgon (Laguna Hills, CA, USA) entfernt. Der Extrakt wurde ebenso wie die Testansätze lyophilisiert und über eine Kationenaustausch-Chromatographie (Ultrapac 11 µ Harz-Säule von Pharmacia (Freiburg)) mit einem FPLC-System der Firma Sykam (Gilching) aufgetrennt. Als Elutionspuffer wurde 0,2 M Triethylamin mit einem pH-Gradienten von 3,2 bis 10,5 verwendet (Sonntag *et al.*, 1993). Die Aminosäuren, die entsprechend ihrer Ionenstärke von der Säule eluierten, wurden in 1 ml Fraktionen gesammelt und anschließend über *Reversed-Phase*-HPLC (s. Kapitel 4.1) analysiert. Die Fraktionen, die Threonin, bzw. Aspartat enthielten, wurden vereinigt, gefriergetrocknet und anschließend für die NMR-Analyse in 0,6 ml D₂O aufgenommen.

Die NMR-Analysen wurden freundlicherweise von Herrn V. Wendisch an unserem Institut durchgeführt. Für die Gewinnung der hochauflösenden ¹H-NMR-Spektren wurde ein AMX-400 WB Spektrometer der Firma Bruker (Karlsruhe) verwendet, mit einer Leistung von 400,13 MHz (Sonntag *et al.*, 1993).

5. Bestimmung von Enzymaktivitäten

5.1 Herstellung von Rohextrakten und Proteinbestimmung

Zur Herstellung von zellfreien Extrakten wurden die *C. glutamicum*-Stämme in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und zweimal in 50 mM Tris/HCl pH 7,0 gewaschen und anschließend in 1 ml des für den entsprechenden Enzymtest optimalen Reaktionspuffers aufgenommen. Der Aufschluß der Zellen erfolgte mit Hilfe eines Ultraschalldesintegrators (Branson Sonifier W-250) bei einer Pulsfrequenz von 20 % und einer Leistung von 30 W für 5 min. Während des gesamten Vorgangs wurden die Zellen im Eis-Wasser-Bad gekühlt. Nach dem Zellaufschluß wurden die Proben 30 min bei 13000 rpm (=13226 x g) und 4°C in einer Sigma 2K15 Zentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde als Rohextrakt für die Enzymaktivitätsbestimmung verwendet.

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen in Rohextrakten wurde mit der Biuret-Methode (Gornall *et al.*, 1949) durchgeführt. Hierzu wurden die Proteine zunächst in 3 M Trichloressigsäure quantitativ gefällt und anschließend in 100 µl H₂O aufgenommen.

5.2 Permeabilisierung von *C. glutamicum*-Zellen

Um Enzymaktivitäten mit permeabilisierten Zellen von *C. glutamicum* zu bestimmen, wurden die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet, zweimal in 50 mM Tris/HCl pH 7,0 gewaschen, anschließend in 100 mM HEPES pH 7,3 mit 20 % Glycerin zu einer OD₆₀₀ von 150 aufgenommen und bei -20°C eingefroren, um Zellwand und Membran für die anschließende Permeabilisierung rigide zu machen. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte nach dem vollständigen Auftauen auf Eis durch Zugabe ad 0,3 % CTAB. Die Zellen waren sofort in diskontinuierlichen Enzymtests einsetzbar.

5.3 Bestimmung der spezifischen Enzymaktivitäten von PEP-Carboxylase, PEP-Carboxykinase, PEP-Carboxytransphosphorylase, Pyruvat-Carboxylase, Oxalacetat-Decarboxylase, *Malat-Enzym*, Isocitrat-Lyase und Pyruvat-Kinase

Phosphoenolpyruvat-Carboxylase:

Die Phosphoenolpyruvat (PEP)-Carboxylase katalysiert die folgende Reaktion:

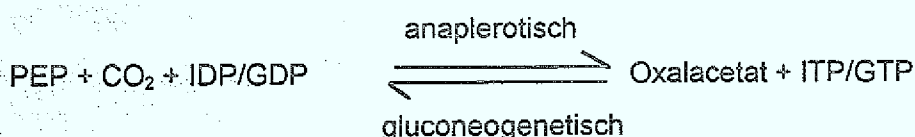


Die Aktivität der PEP-Carboxylase wurde in einem Malat-Dehydrogenase-gekoppelten Test, modifiziert nach Ozaki und Shio (1969) nachgewiesen. Dabei wurde das gebildete Oxalacetat unter Verbrauch von NADH zu Malat umgesetzt. Die Abnahme von NADH wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm verfolgt. Der Extinktionskoeffizient für NADH bei 340 nm beträgt $\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

In einem Volumen von 1 ml wurden 100 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM MgCl₂, 25 mM NaHCO₃, 1 mM DTT, 0,2 mg NADH, 24 U Malat-Dehydrogenase und Rohextrakt (ca. 500 µg Protein) zusammengegeben. Nach Bestimmung einer Blindaktivität, die auf dem Verbrauch von NADH durch die NADH-Oxidase beruhte, wurde die spezifische Reaktion durch Zugabe von 8 mM PEP gestartet. Die spezifische PEPCx-Aktivität wurde aus der Differenz der Extinktionsänderung über die Zeit vor und nach PEP-Zugabe berechnet.

Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase:

Die PEP-Carboxykinase katalysiert die reversible Carboxylierung von PEP zu Oxalacetat:



Die Aktivitätsbestimmung der carboxylierenden Reaktion wurde nach Bentle und Lardy (1976) in einem Malat-Dehydrogenase gekoppelten photometrischen Test durchgeführt und für das corynebakterielle Enzym entsprechend optimiert. Der optimierte Testansatz enthielt 100 mM HEPES pH 7,0, 10 mM MgSO₄, 5 mM MnCl₂, 1 mM DTT, 0,2 mg NADH, 50 mM NaHCO₃, 8 mM PEP, 24 U Malat-Dehydrogenase, sowie Rohextrakt (ca. 500 µg Protein). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 mM IDP gestartet und die Extinktion bei 340 nm photometrisch verfolgt. Als Blindaktivität wurde die Extinktionsänderung über die Zeit vor Zugabe von IDP bestimmt und von der PEP-Carboxykinase-Aktivität abgezogen.

Phosphoenolpyruvat-Carboxytransphosphorylase:

Die PEP-Carboxytransphosphorylase katalysiert die folgende Reaktion:



Die PEP-Carboxytransphosphorylase benötigt anorganisches Phosphat (P_i) zur Umsetzung von PEP zu Oxalacetat. Die Reaktion wurde ebenfalls photometrisch im Malat-Dehydrogenase-gekoppelten Test mit 100 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM MgCl₂, 25 mM NaHCO₃, 1 mM DTT, 0,2 mg NADH, 24 U Malat-Dehydrogenase, 100 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7,0 und Rohextrakt (ca. 500 µg Protein) in einem Volumen von 1 ml bestimmt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 8 mM PEP gestartet und die Abnahme von NADH bei 340 nm photometrisch gemessen. Als Blindaktivität wurde die Extinktionsänderung über die Zeit vor Zugabe von PEP bestimmt.

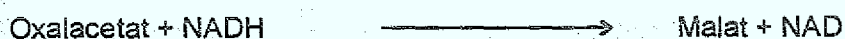
Pyruvat-Carboxylase:

Die Pyruvat-Carboxylase katalysiert die irreversible Carboxylierung von Pyruvat zu Oxalacetat unter Verbrauch von ATP:



In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Tests zur Bestimmung der Pyruvat-Carboxylase-Aktivität verwendet. Allen Tests lag der Nachweis des in der Pyruvat-Carboxylase-Reaktion gebildeten Oxalacetats zugrunde.

a) Malat-Dehydrogenase gekoppelter Test (Payne & Morris, 1969)



Der Test beruhte auf der schon beschriebenen Umsetzung des gebildeten Oxalacetats mit der Malat-Dehydrogenase zu Malat. Die Abnahme von NADH wurde über die Änderung der Extinktion bei 340 nm photometrisch bestimmt. Der Testansatz enthielt in einem Volumen von 1 ml 50 mM Tris/HCl pH 7,2, 10 mM MgCl₂, 15 mM NaHCO₃, 0,2 mg NADH, 3 mM Pyruvat, 12 U Malat-Dehydrogenase und Rohextrakt (50 bis 500 µg Protein). Die Reaktion wurde durch 1,5 mM ATP gestartet.

b) Citrat-Synthase gekoppelter Test (Payne & Morris, 1969)



In diesem Test wird das gebildete Oxalacetat mit Acetyl-CoA über die Citrat-Synthase-Reaktion zu Citrat und Coenzym A umgesetzt. Der Nachweis der Aktivität beruht auf der Detektion des freiwerdenden Coenzym A durch die Umsetzung mit Dithionitrobenzoesäure (DTNB) zu einem thioveresterten CoA-Derivats. Die Gelbfärbung des dabei entstehenden TNB-Dianions kann bei 412 nm photometrisch nachgewiesen werden. Der Extinktionskoeffizient ϵ_{412} des TNB-Ions beträgt $13,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Der Testansatz enthielt 50 mM Tris/HCl pH 7,2, 2 mM EDTA, 1 mM Dithioeritol, 0,2 mM Acetyl-CoA, 5 mM Pyruvat, 0,2 mM DTNB, 10 mM NaHCO₃, 5 U Citrat-Synthase und Rohextrakt (50 bis 500 µg Protein). Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe von 4 mM ATP.

c) Glutamat-Oxalacetat-Transaminase gekoppelter Test
(Fisher & Magasanik, 1984)



Diesem Test liegt die Transaminierung des mit der Pyruvat-Carboxylase gebildeten Oxalacetats zu Aspartat mit Hilfe der Reaktion der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase zugrunde. Es wurde überprüft, ob in einem diskontinuierlichen Testsystem mit der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase aus Schweineherz (Boehringer Mannheim) Oxalacetat quantitativ zu Aspartat umgesetzt werden konnte. Der Testansatz enthielt in einem Volumen von 1 ml 100 mM Tris/HCl pH 7,3, 10 mM MgCl₂, 0,2 mM Pyridoxal-phosphat, 10 mM Pyruvat, 4 mM ATP, 25 mM NaHCO₃ sowie 5 U Glutamat-Oxalacetat-Transaminase und 2 mM Glutamat und die Reaktion wurde durch Zugabe definierter Oxalacetat-Konzentrationen (0 bis 200 µM) gestartet. Jeweils eine Hälfte der Probe wurde nach 10 sec durch Hitzedenaturierung gestoppt und die andere Hälfte 5 min bei 30°C inkubiert und anschließend abgekocht. Das gebildete Aspartat wurde dann über HPLC-Analyse quantifiziert. Die Nachweisgrenze lag bei 5 µM Aspartat. Das eingesetzte

Oxalacetat wurde in linearer Abhängigkeit bis 200 μM quantitativ zu Aspartat umgesetzt. Nach 10 sec war die Reaktion schon vollständig abgelaufen, d.h. die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase war mit den eingesetzten 5 U/ml nicht limitierend. Der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase-Test eignete sich also, um quantitativ gebildetes Oxalacetat nachzuweisen. Im folgenden wurde der diskontinuierliche Test mit permeabilisierten Zellen von *C. glutamicum* verwendet. Hierfür wurden in 1 ml Ansätzen 100 mM Tris/HCl pH 7,3, 10 mM MgCl_2 , 0,2 mM Pyridoxalphosphat, 10 mM Pyruvat, 4 mM ATP, 25 mM NaHCO_3 , 5 U Glutamat-Oxalacetat-Transaminase und 2 mM Glutamat zusammengegeben. Als Kontrollen wurden Proben ohne ATP verwendet. Die Testansätze wurden 1 min bei 30°C vorinkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 30 μl einer permeabilisierten Zellsuspension einer OD_{600} von 150 (ca. 1,5 mg Trockengewicht) oder Rohextrakt gestartet. Nach 1 und 2 min wurden jeweils 500 μl aus den Ansätzen entnommen und bei 95°C für 10 min inkubiert und anschließend in Eiswasser überführt. Zur Entfernung der Zellen bzw. denaturierten Proteine wurden die Proben 25 min bei 13000 rpm (13226 x g) und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand direkt in die HPLC eingesetzt, um die Menge an gebildetem Aspartat zu bestimmen. Die Aktivität der Pyruvat-Carboxylase wurde aus der gebildeten Aspartat-Menge (1 U = μmol Aspartat/min) bestimmt. Die spezifische Aktivität wurde auf das Trockengewicht (TG) (OD_{600} von 1 = 0,3 mg TG/ml) bezogen.

Oxalacetat-Decarboxylase:

Die Oxalacetat-Decarboxylase spaltet Oxalacetat zu Pyruvat und CO_2 , wie es in der folgenden Reaktion dargestellt ist:

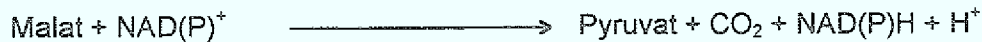


Die Aktivität der Oxalacetat-Decarboxylase wurde in einem diskontinuierlichen Test nach Benziman *et al.* (1978) bestimmt, wobei zunächst Oxalacetat zeitabhängig zu Pyruvat umgesetzt wurde. Nach dem Abstoppen der Reaktion wurde das gebildete Pyruvat mit der Lactat-Dehydrogenase unter Verbrauch von NADH in Lactat überführt. Die Abnahme von NADH wurde photometrisch verfolgt. Der Test wurde folgendermaßen durchgeführt: In einem Volumen von 1 ml wurden 100 mM Tris/HCl pH 7,2 und 10 mM MnSO_4 mit 10 bis 100 μl Rohextrakt (50 bis 500 μg Protein) gemischt und auf 30°C kurz vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 mM Oxalacetat gestartet, bei 30°C inkubiert und nach 3 min bzw. 6 min durch Zugabe von 200 μl 10 %ige Trichloroessigsäure gestoppt. Zur Neutralisation wurden 100 μl 1 M KOH zu pipettiert. Zur Bestimmung der gebildeten Pyruvatmenge wurden 100 μl aus dem Testansatz in einem Endvolumen von 1 ml mit 100 mM Tris/HCl, pH 7,2 und 0,2 mg NADH versetzt und photometrisch die Abnahme von NADH bei 340 nm gemessen. Für den Blindwert,

der ein Maß der spontanen Decarboxylierung von Oxalacetat ist, wurden jeweils Proben ohne Rohextrakt mit bestimmt.

Malat-Enzym:

Das *Malat-Enzym* katalysiert die NAD(P)⁺-abhängige Decarboxylierung von Malat zu Pyruvat:



Zum Nachweis der decarboxylierenden Reaktion des *Malat-Enzyms* wurde direkt Malat-abhängig die Bildung von NAD(P)H photometrisch bei 340 nm gemessen (Sanwal *et al.*, 1968). Hierzu wurden in einem Volumen von 1 ml 100 mM Tris/HCl pH 8,4, 1 mM MnCl₂, 8 mM KCl, 1 mM NADP⁺ (bzw. NAD⁺) und Rohextrakt (50 bis 500 µg Protein) oder angereinigtes Enzym (10 µg Protein) zusammengegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 mM Malat gestartet.

Die carboxylierende Reaktion wurde modifiziert nach Cazzulo *et al.* (1977) in 100 mM MES pH 6,0 versetzt mit 1 mM MnCl₂, 50 mM KHCO₃, 0,2 mM NADPH (bzw. NADH) und Rohextrakt (50 bis 500 µg Protein) oder angereinigtes Enzym (10 µg Protein), in einem Volumen von 1 ml gemessen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 25 mM Pyruvat gestartet, und die Abnahme der Extinktion photometrisch bei 340 nm bestimmt.

Isocitrat-Lyase:

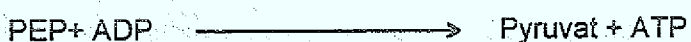
Die Isocitrat-Lyase katalysiert die Hydrolyse von Isocitrat zu Glyoxylat und Succinat:



Das in der Reaktion gebildete Glyoxylat wurde unter Oxidation von NADH mittels einer Nebenreaktion der Lactat-Dehydrogenase (Isoenzym I aus Schweineherz) zu Glycolat reduziert (Warren, 1970). Die Abnahme an NADH wurde wieder photometrisch bei 340 nm bestimmt. In einem Volumen von 1 ml enthielt jeder Testansatz 50 mM MOPS/NaOH pH 7,3, 5 mM Dithiothreitol, 15 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0,2 mg NADH, 18 U Lactat-Dehydrogenase sowie Rohextrakt (500 µg Protein). Durch Zugabe von 5 mM D,L-Isocitrat wurde die Reaktion gestartet.

Pyruvat-Kinase:

Im folgenden ist die Reaktion der Pyruvat-Kinase dargestellt:



Die Aktivität wurde mit einem modifizierten Test nach Bergmeyer (1983) und Ozaki & Shiio (1969) bestimmt (Peters, 1992). Das durch die Pyruvat-Kinase gebildete Pyruvat wurde mit der Lactat-Dehydrogenase zu Lactat reduziert. Dabei wurde ebenfalls NADH zu NAD⁺ umgesetzt, was photometrisch bei 340 nm verfolgt werden konnte. Der Testansatz enthielt 100 mM Triethanolamin pH 7,0, 15 mM MgSO₄, 1 mM ADP, 0,2 mg NADH, 5,5 U Lactat-Dehydrogenase und Rohextrakt (ca. 50 µg Protein). Nach Bestimmung des Blindwerts wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 mM PEP gestartet.

6. Proteinchemische Methoden

6.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Auftrennung von Proteinen entsprach der Methode von Laemmli (1970) für diskontinuierliche vertikale Flachbettgelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen. Für die Trennung von Proteinen in Rohextrakten wurde eine Mighty Small II SE 250 Apparatur mit zwei 8 cm x 7 cm x 1,5 mm (Hoefer, San Francisco, USA) verwendet. Für die Auftrennung von teilweise gereinigten Proteinfraktionen fand eine Sturdier SE 400 Apparatur mit 14 cm x 16 cm x 1,5 mm (Hoefer, San Francisco, USA) Verwendung. Das Trenngel bestand je nach Anwendung aus 7,5 bis 12 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (36,5 : 1), 1,5 M Tris/HCl pH 8,8 und 0,1 % (w/v) SDS. Die Polymerisierung erfolgte durch die Zugabe von 0,05 % (w/v) Ammoniumpersulfat. Als Katalysator wurde TEMED verwendet. Das Sammelgel setzte sich zusammen aus 3,9 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (36,5:1), 0,5 M Tris/HCl pH 6,8 und 0,1 % (w/v) SDS. Die Polymerisierung erfolgte wie für das Trenngel. Die Elektrophorese der kleinen Gele wurden 2 h bei 100 V (ca. 50 mA), die der großen Gele über Nacht bei 8 mA durchgeführt. Als Laufpuffer diente 50 mM Tris pH 8,3, 380 mM Glycin, 0,5 % SDS. Die Anfärbung der Proteine erfolgte mit einer Serva-Blue Färbelösung (0,05 % (w/v) Serva-Blue, 10 % Methanol), die Entfärbung mit 10 % (v/v) Essigsäure. Falls eine Western-Blot-Analyse oder eine Anequenzierung der Proteine folgen sollte, wurden die Gele ohne vorherige Anfärbung weiterbehandelt.

Präparative SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Elektroelution von Proteinen

Zur Isolierung des Biotin-Proteins p125 wurde eine präparative SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierzu wurden die Proteine aus Rohextrakten von *C. glutamicum* über ein 7,5 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend mit 0,3 M CuCl₂ negativ gefärbt (Lee *et al.*, 1987). Diese Färbemethode beruht darauf, daß

sich das CuCl_2 in den Bereichen des Gels, wo sich kein Protein befindet in die Gelmatrix einlagert und zu einer Trübung führt, wohingegen die Protein-Banden klar bleiben. Die Protein-Banden mit Größen zwischen 100 und 180 kDa wurden aus dem Gel ausgeschnitten, und durch Elektroelution aus der Gelmatrix isoliert. Hierzu wurde eine Elektroelutionskammer der Firma Bio-Rad verwendet. Als Elutionspuffer diente 50 mM Tris pH 8,3, 380 mM Glycin, 0,5 % SDS. Die Proteinfraction wurde mit einer Spannung von 200 V auf eine Dialysemembran mit einer Ausschlußgröße von 12000 bis 15000 übertragen. Die so erhaltene Proteinlösung wurde über Zentrifugation in Centricon-100-Gefäßen (Amicon, Danvers, MA, USA) mit einer Ausschlußgröße von 100000 in TDE umgepuffert, um das in der Lösung befindliche SDS zu entfernen. Der verwendete TDE-Puffer enthielt zur Stabilisierung des Proteins 10 % Glycerin und 0,5 % Rinderserumalbumin. Die resultierende Proteinfraction wurde anschließend über die Avidin-Affinitäts-Chromatographie weiterbehandelt.

6.2 Western Blot-Analyse zum Nachweis biotinhaltiger Proteine

Die Proteine Streptavidin und Avidin besitzen eine sehr hohe Affinität zu Biotin, mit einer Bindungskonstante von 10^{-15} . Zum Nachweis von Biotin-Proteinen in Rohextrakten von *C. glutamicum* wurde daher Streptavidin verwendet, das zum Nachweis der Biotin-Protein/Streptavidin-Komplexe an eine alkalische Phosphatase konjugiert war (Haneji & Koide, 1989). Die Proteine aus Rohextrakten von *C. glutamicum* wurden nach der SDS-PAGE durch ElektrobloTTing mit einer Biometra Fast Blot 33 Apparatur auf eine Polyvinylidendifluorid- (PVDF-) Membran übertragen. Als Übertragungspuffer diente 50 mM Tris pH 8,3, 380 mM Glycin, 0,5 % SDS. Die Membran wurde anschließend zur Absättigung mit Protein in 50 mM Tris/HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl; 1,5 % Rinderserumalbumin 1 Stunde inkubiert. Zur Entfernung von nicht gebundenem Protein wurde der Filter dreimal 15 min in Waschpuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20) gewaschen. Die spezifische Markierung der Biotin-Proteine erfolgte 30 min mit 10 μl Streptavidin-alkalische-Phosphatase-Konjugat-Lösung (Boehringer Mannheim) in Waschpuffer mit 0,5 % Rinderserumalbumin. Hierbei bindet Streptavidin spezifisch an den Biotinyl-Rest der nachzuweisenden Proteine (Cronan, 1990). Der Nachweis dieser Bindung erfolgt durch die enzymatische Umsetzung der Substrate Nitroblau-Tetrazolium-Salz (NBT) und 5-Brom-4-Chlor-3-Indoylphosphat (X-Phosphat) durch die alkalische Phosphatase zu unlöslichen Farbkomplexen. Nach dreimaligem Waschen der Membran in Waschpuffer wurde diese kurz in 100 mM Tris/HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl_2 äquilibriert und anschließend mit der Färbelösung (337 $\mu\text{g/ml}$ NBT/175 $\mu\text{g/ml}$ X-Phosphat in 100 mM Tris/HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl_2) im Dunkeln inkubiert, bis die zu detektierenden Banden eine ausreichende Intensität aufwiesen. Die Farbreaktion wurde abgestoppt, indem der Filter 5 min in TE pH 8,0 gewaschen wurde.

6.3 Partielle Aufreinigung und Ansequenzierung von Proteinen

Partielle Aufreinigung des *Malat-Enzyms*

Die Anreinigung des *Malat-Enzyms* (NADP⁺-abhängige, decarboxylierende Malat-Dehydrogenase) wurde in Zusammenarbeit mit Frau B. Riebel und Herrn Dr. W. Hummel am Institut für Enzymtechnologie der Universität Düsseldorf durchgeführt. Da erfahrungsgemäß die *Malat-Enzyme* der Pseudomonaden stark hydrophobe Proteine sind (pers. Mitteilung B. Riebel), wurde für die Reinigung eine Kombination von hydrophober Interaktionschromatographie mit einer Phenylsepharose- und einer Octylsepharose-Säule (Pharmacia) und anschließender Ionenaustauschchromatographie mit einer DEAE-Säule verwendet. Das hydrophobe Säulenmaterial Phenylsepharose bzw. Octylsepharose unterliegt Wechselwirkungen mit allen stark hydrophoben Proteinen, sodaß die hydrophilen Proteine, die ein Großteil des Gesamtproteins ausmachen, im Ausschlußvolumen zu finden sind. Als Puffersystem wurde jeweils 50 mM Triethanolamin pH 7,0 mit 1 mM MgCl₂ und 8 mM KCl verwendet. Bei der Auftrennung über Phenylsepharose wurde ein linearer (NH₄)₂SO₄-Gradient von 1,5 M bis 0 M angelegt. Die höchste *Malat-Enzym*-Aktivität wurde gegen Ende des Gradienten bei niedrigen Salzkonzentrationen eluiert. Für die weitere Auftrennung über Octylsepharose wurde der Gradient bei 1,2 M (NH₄)₂SO₄ gestartet. In diesem Schritt wurde keine Reinigung erzielt, da das *Malat-Enzym* nicht an die Säule gebunden hat. Die darauffolgende Ionenaustauschchromatographie über DEAE-Sepharose erfolgte in einem Puffersystem aus 50 mM Tris/HCl, pH 8,4, 1 mM MgCl₂, 8 mM KCl mit einem linearen Gradient von 1 M NaCl auf 0 M NaCl. Auch in diesem Schritt konnte keine signifikante Anreicherung erhalten werden. Anschließend wurde eine Affinitätschromatographie mit einer NADP-Sepharose-Säule durchgeführt. Als Puffersystem diente 10 mM Kaliumphosphat, pH 7,5, 1 mM MgCl₂, 8 mM KCl. Die Elution erfolgte mit NADP in einem Gradienten von 0 bis 10 mM. Mit diesem Schritt wurde eine 23-fache Reinigung des *Malat-Enzyms* gegenüber Rohextrakt erzielt.

Partielle Aufreinigung der Biotin-Proteine p70 und p125

Die partielle Aufreinigung der corynebakteriellen Biotin-Proteine p70 und p125 über Avidin-Affinitätschromatographie wurde mit dem Soft-Link-Soft-Release Avidin-Harz der Firma Promega (Heidelberg) durchgeführt (Thampy *et al.*, 1988). Vor der Verwendung wurden alle irreversiblen Bindungsstellen gemäß den Angaben des Herstellers mit freiem Biotin abgesättigt. Nach der Denaturierung mit 10 % Essigsäure und anschließender Renaturierung mit 100 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,0 konnte das Harz für die Aufreinigung der Biotin-Proteine verwendet werden. Die Equilibrierung der Säule erfolgte mit 50 mM Tris/HCl pH 7,2, 0,1 mM DTT, 1 mM EDTA (TDE-Puffer). Die Aufreinigung

des Biotin-Proteins p70 erfolgte im Batch-Verfahren nach den Angaben des Herstellers. Die Inkubation des Rohextrakts von *C. glutamicum* wurde 1 Stunde bei 4°C durchgeführt. Anschließend wurde das Avidin-Harz mit TDE-Puffer mit dem 10-fachen des Säulenvolumens (1 ml) gewaschen. Die Elution der Biotin-Proteine erfolgte mit 2 ml TDE-Puffer mit 2 mM Biotin. Das Eluat wurde im Vakuum getrocknet und anschließend in H₂O_{dest.} aufgenommen. Das Biotin-Protein p125 wurde nach präparativer SDS-PAGE über eine Säule mit einem Avidin-Harz-Volumen von 2 ml aufgereinigt. Das aufgrund der vorangegangenen SDS-PAGE denaturierte Biotin-Protein p125 war so fest an das Avidin gebunden, daß es nur durch vollständige Denaturierung mit 10 % Essigsäure wieder abgelöst werden konnte. Das so erhaltene Eluat wurde über Zentrifugation über eine Centricon-100-Membran (Amicon, Danvers, MA, USA) mit einer Ausschlußgröße von 10000 in TDE umgepuffert. Beide Biotin-Proteine wurden anschließend ansequenziert. Zur Wiederverwertung des Avidin-Harzes wurde das Avidin erneut denaturiert und bei pH 7,0 regeneriert. Die Aufbewahrung erfolgte unter 20 % Ethanol und 4°C für mehrere Monate.

N-Terminale Sequenzierung von Proteinen

Zur Ansequenzierung der Biotin-Proteine p70 und p120 wurden diese nach der Auftrennung mittels SDS-PAGE durch Elektroblothing in einer Biometra Fast Blot 33 Apparatur auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (Millipore) übertragen. Die Anfärbung der Proteinbanden erfolgte mit Naphthol-Blue-Black (Amidoschwarz, Sigma). Anschließend wurden die Proteine nach der Methode des Edman-Abbaus (Edman & Begg, 1967) vom N-terminalen Ende in einer Applied Biosystems 477A Sequenzier-Apparatur mit on-line HPLC (Modell 120) ansequenziert.

7. Molekulargenetische Methoden

7.1 Isolierung, Reinigung, Restriktion und Modifikation von DNA

Plasmidpräparationen aus *E. coli*

Zur schnellen Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA wurde eine modifizierte Methode der alkalischen Lyse nach Birnboim (1983) verwendet. Hierzu wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur abzentrifugiert (6000 rpm, 30 sek, RT; Heraeus-Minifuge) und das Zellpellet in 100 µl Lösung A (50 mM Glucose; 25 mM Tris/HCl pH 8,0; 10 mM EDTA pH 8,0) resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 200 µl Lösung B (0,2 N NaOH; 1 % SDS) und 5 min Inkubation auf Eis erfolgte die alkalische Lyse der Zellen. Im dritten Schritt wurden 150 µl Lösung B (5 M Kaliumacetat; 1,8 M Essigsäure)

dem Ansatz zugegeben und weitere 5 min auf Eis inkubiert. Dabei wurde der größte Teil der Proteine und die chromosomale DNA ausgefällt und anschließend abzentrifugiert (13226 x g, 15 min, 4°C). Der Überstand wurde durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion von noch vorhandenem Protein gereinigt. Anschließend erfolgte die Präzipitation der Plasmid-DNA durch Zugabe von 2 Vol. absolutem Ethanol. Das nach Abzentrifugation (13226 x g, 10 min, RT) erhaltene DNA-Pellet wurde zur Entfernung der Salzreste mit 70 % Ethanol gewaschen, in einer Vacuumzentrifuge (Speed Vac Concentrator, Bachofer) getrocknet und anschließend in 50 µl TE pH 7,6 (10 mM Tris/HCl pH 7,6; 1 mM EDTA pH 8,0) resuspendiert.

Um größere und reinere Mengen an Plasmid-DNA zu gewinnen wurde eine modifizierte Methode nach Sambrook *et al.*, (1989) verwendet. Ausgehend von 50 ml einer Übernachtskultur wurden zunächst die Zellen durch alkalische Lyse in den drei oben beschriebenen Schritten aufgebrochen. Nach Präzipitation von Proteinen und chromosomaler DNA wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von 0,5 Vol. Isopropanol gefällt. Das Präzipitat wurde in 2 ml H₂O dest. resuspendiert. Durch Zugabe von 2 ml LiCl₂/50 mM Tris/HCl pH 8,0, anschließender 15 min Inkubation auf Eis und Zentrifugation (5000 rpm, 15 min, 4°C) wurde der größte Teil der RNA entfernt. Danach wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von 2,5 Vol. absolutem Ethanol gefällt und die restliche RNA durch eine RNase A-Behandlung (10 mg/ml RNase A in 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 15 mM NaCl) abgebaut. Die anschließende Aufreinigung und Präzipitation der Plasmid-DNA erfolgte wie oben bereits beschrieben.

Isolierung chromosomaler DNA aus *C. glutamicum*

Die Isolierung chromosomaler DNA von *C. glutamicum* erfolgte durch eine Methode, bei der die Proteine durch vollständiges Aussalzen von der DNA entfernt werden. 5 ml einer Übernachtskultur (2 x TY + 0,5 % Glucose) wurden 5 min bei 5000 rpm abzentrifugiert, das Zellpellet einmal in TE pH 7,6 (10 mM Tris/HCl pH 7,6; 1 mM EDTA pH 8,0) gewaschen, anschließend in 1 ml TE pH 7,6 mit 15 mg Lysozym /ml resuspendiert und 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Durch die Lysozym-Behandlung wurde die Zellwand zerstört und es entstanden Protoplasten. Diese wurden durch Zugabe von 3 ml Lysis-Puffers (10 mM Tris/HCl pH 8,2; 400 mM NaCl; 2 mM EDTA) und 220 µl 10 % (w/v) SDS aufgeschlossen. Um einen Großteil der Proteine zu entfernen wurde der Ansatz über Nacht bei 37°C mit 20 mg/ml Proteinase K inkubiert. Anschließend erfolgte das Aussalzen der restlichen Proteine und der Membranen durch die Zugabe von 1 ml gesättigter NaCl-Lösung (ca. 6 M). Es entstand ein weißer Niederschlag, der durch Zentrifugation (15 min, 5000 rpm, RT) pelletiert wurde. Der klare Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt, und die darin enthaltenen chromosomale DNA durch Zugabe von -20°C kaltem absolutem Ethanol gefällt. Bei vorsichtiger Durchmischung fiel die DNA in der Lösung aus und konnte mit einer Pasteurpipette entnommen werden. Dadurch

blieben noch vorhandene Proteinreste in der Lösung, und es lag die reine chromosomale DNA vor. Diese wurde in 70 % Ethanol gewaschen und an der Pasteurpipette leicht angetrocknet. Im letzten Schritt wurde die DNA dann in 200 bis 500 μ l TE pH 7,6 gelöst und bei 4°C aufbewahrt. Zur längeren Lagerung bei -20°C wurde die DNA erneut gefällt und unter 70 %igem Ethanol belassen.

Rekombination und Analyse von DNA

Zur Analyse von DNA-Restriktionsmustern wurden ca. 100 ng DNA in einem Volumen von 10 μ l für 90 min mit den für das entsprechende Restriktionsenzym vom Hersteller angegebenen Bedingungen (Puffer und Temperatur) geschnitten. Die eingesetzte enzymatische Aktivität betrug 1 U. Bei präparativen Restriktionen wurden 2-3 μ g DNA in 50 μ l Ansätzen mit ca. 20 U enzymatischer Aktivität für 2 Stunden inkubiert. War eine Restriktion mit verschiedenen Enzymen erforderlich, die in unterschiedlichen Puffersystemen ihre optimale Aktivität zeigten, so erfolgte die erste Restriktion mit dem Enzym, das in einem niedrigkonzentrierten Puffer aktiv war. Anschließend wurde der Puffer mit der höheren Salzkonzentration sowie das zweite Enzym zugegeben. Die Auftrennung von restringierten DNA-Fragmenten erfolgte in 0,7 bis 2 %igen (w/v) Agarosegelen (je nach Größe der DNA-Moleküle) durch Gelelektrophorese (Sambrook *et al.*, 1989). Zur Modifikation überhängender 5'-Enden wurden diese mittels Klenow-Polymerase unter Zugabe der entsprechenden freien Desoxynukleotide zu glatten Enden aufgefüllt und überhängende 3'-Enden mit dem gleichen Enzym zu glatten Enden abgebaut (Sambrook *et al.*, 1989). Linearisierte Vektor-DNA wurde mit Phosphatase behandelt, bei der der Phosphat-Rest am 5'-Ende abgespalten wird, um die Rezirkularisierung in einer Ligation zu verhindern. Das Einbringen von DNA-Fragmenten in linearisierte Vektoren erfolgte mit Hilfe der DNA-Ligase des Bakteriophagen T4.

7.2 Herstellung von Oligonukleotiden und Digoxigenin-markierten DNA-Sonden

Oligonukleotide (PCR-Primer)

Die Synthese von Oligonukleotiden erfolgte computergesteuert mit dem GENE ASSEMBLER PLUS (Pharmacia LKB, Freiburg). Nach der Synthese wurden die am 5'-Ende anhängende Schutzgruppe durch Ammoniakbehandlung entfernt und das Oligonukleotid durch Säulenchromatographie (NAP-10, Sephadex G-25) aufgereinigt. Die Konzentration des in H₂O gelösten Oligonukleotids wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt. Eine Extinktion bei 260 nm von 1 in einer Küvette der Schichtdicke 1 cm entspricht einer einzelsträngigen DNA-Menge von 33 μ g/ml (Sambrook *et al.*, 1989).

Random-primed DNA-Markierungsmethode zur Herstellung von Digoxigenin-markierten DNA-Sonden

Die Digoxigenin-Markierung von DNA-Sonden für die Southern-Blot Analyse wurde mit dem DIG DNA Labeling Kit durchgeführt. Hierbei dienen Zufallshexanukleotide als Primer für die Neusynthese von DNA an einem definierten Template (z.B. Plasmid-DNA), wobei mit Hilfe des Klenow-Enzyms DIG-11-dUTP neben den anderen dNTPs eingebaut werden. Zunächst wird die geeignete Template-DNA (ca. 500 ng) durch 10 minütiges Erhitzen denaturiert. Auf Eis werden ein Hexanukleotid-Gemisch, je 100 μM dATP, dCTP, dGTP, 65 μM dTTP, 35 μM DIG-11-dUTP und 2 U Klenow-Enzym hinzugegeben und anschließend übernacht bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 20 mM EDTA pH 8,0 abgestoppt und die markierte DNA durch Ethanol und LiCl_2 gefällt. Die vakuumgetrocknete DNA wird in 50 μl TE-Puffer aufgenommen und kann so für die Hybridisierung verwendet werden.

Digoxigenin-Markierung von DNA-Sonden mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion

Zur Herstellung einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde für die Isolierung des *pyc*-Gens wurde der PCR DIG Probe Synthesis Kit von Boehringer Mannheim verwendet. Bei dieser Methode werden während der Amplifikation eines definierten DNA-Abschnittes DIG-11-dUTP Moleküle eingebaut, sodaß das PCR-Produkt direkt mit Digoxigenin markiert wird. In einen 50 μl PCR-Ansatz wurden folgende Reagenzien eingesetzt: 10 mM Tris/HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl_2 , 200 μM dATP/dCTP/dGTP, 130 μM dTTP, 70 μM DIG-11-dUTP, je 100 pmol PCR-Primer 1 und 2 und 0,5 U Taq-Polymerase. Der Reaktionsansatz wurde mit Mineralöl überschichtet und in einem Thermocycler der Firma Biozym Diagnostik (Oldendorf) auf 80°C vortemperiert. Bei dieser Temperatur wurde die Template-DNA (100 ng) zupipettiert und anschließend die PCR-Zyklen gestartet. Es wurden 30 Zyklen mit einer Annealingtemperatur von 60°C und einer Elongationtemperatur von 72°C durchgeführt. Das erhaltene PCR-Produkt wurde elektrophoretisch aufgetrennt, aus dem Gel isoliert und direkt in die Southern-Blot Hybridisierung eingesetzt.

8. Southern Blot-Analyse und Kolonie-Hybridisierung

Zur Analyse von DNA durch die Southern-Blot-Hybridisierung wurde die zu untersuchende DNA zunächst durch Restriktionsendonukleasen geschnitten und die Spaltprodukte gelelektrophoretisch ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Die in dem Agarosegel befindlichen DNA-Fragmente wurden nach einer Methode von Southern (1975) denaturiert und vakuumunterstützt aus der Gelmatrix auf eine Nylonmembran

transferiert, immobilisiert und gegen eine spezifisch markierte DNA-Sonde hybridisiert. Die DNA-DNA-Hybride konnten dann je nach Stärke der erwarteten Signale durch Anfärbung auf dem Filter direkt, oder im Falle der empfindlichen Chemilumineszenz, durch Exposition auf einem Röntgenfilm nachgewiesen werden.

Übertragung von DNA auf eine Nylonmembran

Nach der Behandlung der zu untersuchenden DNA (2 bis 5 µg) mit Restriktionsendonukleasen wurden die DNA-Fragmente 16 h bei 20 V in einem 0,8 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend erfolgte der Transfer der DNA mittels vacuumunterstützter Diffusion (Gross *et al.*, 1988) mit einem VacuGen-Blotter (Pharmacia LKB, Freiburg) auf eine Nylonmembran (Nytran N13, Schleicher und Schüll, Dassel, Schweiz). Hierzu wurde das Gel nacheinander für jeweils 10 bis 20 min mit den folgenden Lösungen überschichtet: 0,25 M NaOH (Depurinierung), 0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl (Denaturierung) und 1,0 M Tris/HCl pH 5,0; 2,0 M NaCl (Neutralisierung). Die Übertragung der DNA auf den Filter erfolgte innerhalb von 60 min nach Überschichtung des Gels mit 0,3 M Na-Citrat pH 7,0; 3,0 M NaCl (20 x SSC). Die Nylonmembran 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

Für die Hybridisierung der DNA gegen eine spezifische Sonde wurde die Membran zunächst für 6 Stunden in einer Prähybridisierungslösung (0,1 % Na-Lauroylsarcosin, 0,02 % SDS, 1 % Blocking-Reagenz (Boehringer, Mannheim) in 5 x SSC: 75 mM Na-Citrat pH 7,0; 0,75 M NaCl) inkubiert, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 12 Stunden in der Hybridisierungslösung (200 ng frisch denaturierte, digoxigenierte DNA-Sonde in Prähybridisierungslösung). Die Temperatur für Prähybridisierung und Hybridisierung lag, wenn nicht anders vermerkt, bei 68°C. Danach wurde die Membran zunächst zweimal 15 min bei RT in 2 x SSC, 0,1 % SDS und anschließend zweimal 25 min stringent bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur mit 0,1 x SSC, 0,1 % SDS gewaschen.

Nachweis von DNA-DNA-Hybriden

Die Detektion der Hybridisierungsbanden erfolgte mit Hilfe des „DIG DNA Labeling and Detection Kit“ (Boehringer Mannheim), unter Verwendung eines DIG-Antikörper-alkalische-Phosphatase-Konjugats. Hierbei wurde einerseits die enzymatische Umsetzung von X-Phosphat und NBT zu einem Farbstoff, und andererseits die enzymatische Spaltung des Chemilumineszenzsubstrates AMPPD zu einer lichtemittierenden Substanz genutzt. Für die direkte Färbemethode wurde die Membran 1 min in 100 mM Tris/HCl pH 7,6, 150 mM NaCl (Puffer 1) gewaschen und anschließend

30 min bei RT mit 0,5% Blockierungsreagenz, gelöst in Puffer 1, inkubiert. Der Filter wurde kurz in Puffer 1 gewaschen und dann bei RT für 30 min mit einer Antikörper-Konjugat-Lösung (150 mU DIG-Antikörper-alkalische-Phosphatase-Konjugat in 25 ml Puffer 1) inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen mit Puffer 1 entfernt. Anschließend wurde die Membran 2 min in 100 mM Tris/HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂ (Puffer 3) equilibriert und danach mit 10 ml Färbelösung (337 µg/ml NBT/175 µg/ml X-Phosphat in Puffer 3) im Dunkeln inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch Waschen in TE pH 8,0 abgestoppt.

Kolonie-Hybridisierung

Zum direkten Nachweis von transformierten *E. coli*-Klonen, die das *pyc*-Gen auf einem Cosmid tragen, wurde der mit einer *C. glutamicum*-Genbank transformierte *E. coli* Stamm DH5α zu ca. 300 Kolonien pro Agarplatte ausplattiert (insgesamt 5000 Kolonien). Anschließend wurden die Kolonien auf Nylon-Filter übertragen und diese zur alkalischen Lyse der Zellen und Denaturierung der DNA auf mit 0,5 M NaOH und 1,5 M NaCl getränktem Whatmann-Papier 5 min inkubiert. Die anschließende Neutralisierung erfolgte 5 min auf mit 1 M Tris/HCl pH 7,5 und 1,5 M NaCl getränktem Whatmann-Papier. Nach 5 min Inkubation der Filter in 2 x SSC wurde die freigesetzte DNA durch 3 minütige UV-Bestrahlung bei 366 nm auf dem Filter fixiert. Anschließend wurden die restlichen Zelltrümmer durch Schütteln in 3 x SSC, 0,1 % SDS bei 50°C entfernt. Die Filter wurden in dieser Form für die Hybridisierung mit einer spezifischen *pyc*-Sonde, wie für die Southern-Blot-Analyse beschrieben, verwendet.

9. Methoden zur Übertragung von DNA

9.1 Transformation und Elektroporation von *E. coli*

Zur Herstellung von *E. coli*-Zellen, die für die DNA-Aufnahme nach Hitzeeinwirkung kompetent waren, wurde eine modifizierte Methode nach Sambrook *et al.* (1989) 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 CaCl₂ / 20 mM MgSO₄ resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und das Pellet in 4 ml 70 mM CaCl₂ / 20 mM MgSO₄ resuspendiert. Aliquots wurden mit 20 % Glycerin versetzt und bei -70°C gelagert.

Für die Transformation wurden je 100 µl kompetente Zellen mit der entsprechenden Plasmid-DNA versetzt (ca. 1 µg DNA). Nach 30 minütiger Inkubation im Eisbad erfolgte bei 42°C für 60 sec der Hitzeschock, währenddessen die Plasmid-DNA von den Zellen aufgenommen wurde. Die Regeneration der Zellen und die Ausprägung der Antibiotika-

Resistenz fand in je 500 μ l 2xTY-Medium für 45 min bei 37°C statt. Zur Selektion wurden die Zellen auf LB-Agarplatten mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert.

Für die Elektroporation von *E. coli* wurden die Zellen nach einer modifizierten Methode von Sambrook *et al.* (1989) kompetent gemacht. Hierzu wurden die Zellen in 400 ml 2 x TY-Medium bis zu einer optischen Dichte von 0,5 gezüchtet, bei 6000 rpm abzentrifugiert und anschließend dreimal in eiskalter 10 %iger Glycerin-Lösung gewaschen. Dabei wurde das Volumen der Glycerin-Lösung von 370 ml über 200 ml auf 20 ml reduziert. Anschließend wurde das Zellpellet in 500 μ l 10 % Glycerin aufgenommen und in Aliquots bei -70°C eingefroren, oder direkt zur Elektroporation verwendet. Die Elektroporation erfolgte mit einem *Gene-Pulser* der Firma Bio-Rad: 30 μ l kompetente Zellen und 1 μ l gereinigte Cosmid-DNA (ca. 1 μ g) wurde auf Eis zusammengegeben und anschließend in eine eiskalte Elektroporationsküvette überführt. Der Transfer der DNA erfolgte durch Anlegung einer Spannung von 2,5 kV (Widerstand: 200 Ω ; Kapazität: 25 μ F). Die Zellen wurden in 1 ml BHI-Medium für 50 min bei 37°C regeneriert und anschließend in geeigneten Verdünnungen auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert.

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

Die Konjugation zwischen dem *E. coli*-Donorstamm S17-1 und den jeweiligen *C. glutamicum* Stämmen wurde nach einer Methode von Schäfer *et al.* (1990) durchgeführt. Der *C. glutamicum*-Rezipientenstamm wurde über Nacht in 70 ml 2 x TY-Medium gezüchtet. Die Ernte erfolgte bei einer OD₆₀₀ zwischen 4,5 und 5,5. Um den Rezipienten für die Konjugation kompetent zu machen, wurde 10 ml der Kultur 9 min bei 48,5°C inkubiert und anschließend bei RT belassen. Der *E. coli*-Donorstamm S17-1 wurde in 5 ml 2 x TY-Medium bis zu einer optischen Dichte von 1 gezüchtet und anschließend auf Eis gehalten. Für die Konjugation wurden 1 ml Donorkultur mit 3 ml Rezipientenkultur vermischt, die Zellen wurden pelletiert und anschließend auf einen sterilen Nitrocellulosefilter (auf einer LB-Agarplatte liegend) übertragen. Der Ansatz wurde 20 h bei 30°C inkubiert. Nach erfolgter Übertragung der Plasmid-DNA wurden die Zellen mit 600 μ l BHI-Medium von dem Filter abgespült und jeweils 300 μ l auf BHI-Agarplatten mit 50 μ g Nalidixinsäure /ml und 25 μ g Kanamycin /ml ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 30°C.

10. Isolierung eines PCR-Produktes aus *C. glutamicum* mit Ähnlichkeit zum Pyruvat-Carboxylase Gen

Ausgehend von konservierten Bereichen aller bis dahin bekannten Pyruvat-Carboxylase- (*pyc*-) Genen, von *Saccharomyces cerevisiae* (Lim *et al.*, 1988; Brewster *et al.*, 1994), Mensch (Wexler *et al.*, 1994; MacKay *et al.*, 1994), Maus (Zhang *et al.*, 1993), *Aedes aegyptis* (EMBL-Genbank: Accession Nr. L36530), sowie von *Mycobacterium tuberculosis* (EMBL-Genbank: Accession Nr. U00024), wurden PCR-Primer synthetisiert. Die Primer entsprachen den Basen 810 bis 831 und 1015 bis 1037 des *pyc*-Gens von *M. tuberculosis*. Mit diesen Primern konnte ein PCR-Fragment aus chromosomaler DNA von *C. glutamicum* amplifiziert werden, daß mit 200 bp ungefähr der Größe entsprach, die für *pyc*-Gene erwartet wurde. Das PCR-Produkt wurde sequenziert, und ein Sequenzvergleich ergab, das das Fragment 75 bis 85 % Ähnlichkeit auf Aminosäureebene zu allen bekannten Pyruvat-Carboxylasen aufwies. Diese Arbeiten wurden freundlicherweise von Herrn Dr. J. Kalinowski an der Universität Bielefeld durchgeführt, und das Fragment wurde uns für die Isolierung des gesamten *pyc*-Gens aus *C. glutamicum* zur Verfügung gestellt.

11. DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzierung des 1,4 kb *EcoRI*-Fragmentes, das einen internen Abschnitt des corynebakteriellen *pyc*-Gens trug, erfolgte doppelsträngig nach der Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* (1977). Die Sequenzierung wurde von der Firma Medigene (München) mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs mit einer automatischen DNA-Sequenzierapparatur (Applied Biosystems) durchgeführt.

III. Ergebnisse

1. Nachweis und Charakterisierung der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase von *C. glutamicum*

Die Phosphoenolpyruvat- (PEP-) Carboxylase galt in *C. glutamicum* zu Beginn der Arbeit als das einzige anaplerotische Enzym bei Wachstum auf Glucose (Ozaki & Shii, 1969; Shii & Ujigawa, 1978; Yokota & Shii, 1988; Mori & Shii, 1985a; Mori & Shii, 1985b; O'Regan *et al.*, 1989; Eikmanns *et al.*, 1989). Mit dem Ziel, die Bedeutung der PEP-Carboxylase im Stoffwechsel und bei der Aminosäure-Produktion von *C. glutamicum* aufzuklären, wurden die Eigenschaften des Enzyms zunächst in Rohextrakten dieses Stammes nach Wachstum auf verschiedenen Medien charakterisiert. Weiterhin wurde untersucht, welcher Regulation die Aktivität der PEP-Carboxylase unterliegt.

1.1 Einfluß der Kohlenstoff-Quelle auf die spezifische PEP-Carboxylase Aktivität

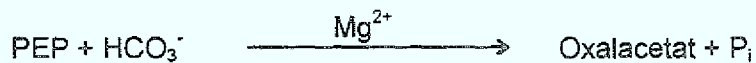
Der Wildtyp-Stamm *C. glutamicum* ATCC 13032 (WT) wurde auf Komplexmedium und auf Minimalmedium mit den Kohlenstoff (C)-Quellen Glucose, Lactat oder Acetat gezüchtet und in Rohextrakten von exponentiell wachsenden Zellen wurde die PEP-Carboxylase-Aktivität bestimmt (Tabelle 3). Sowohl auf Komplexmedium als auch auf Minimalmedium mit Lactat oder Acetat wurde eine spezifische PEP-Carboxylase Aktivität von ungefähr 60 mU/mg Protein erhalten. Bei Wachstum auf Glucose war die spezifische Aktivität dagegen mit 160 mU/mg Protein fast dreimal höher.

Tabelle 3: Spezifische PEP-Carboxylase Aktivität im *C. glutamicum* Wildtyp nach Wachstum in Komplexmedium (LB) und CgC-Minimalmedium mit verschiedenen C-Quellen

Medium	C-Quelle	spezifische PEP-Carboxylase Aktivität
		[mU/mg Protein]
LB		72
CgC	4 % (w/v) D-Glucose	160
	2 % (v/v) D,L-Lactat	62
	2 % (w/v) Acetat	54

1.2 Kinetische Untersuchungen zur PEP-Carboxylase

Die PEP-Carboxylase katalysiert die irreversible Carboxylierung von PEP zu Oxalacetat. Die benötigte freie Reaktionsenthalpie ($\Delta G^0 = -27,2 \text{ kJ/mol}$) wird durch das hohe Phosphatgruppenübertragungspotential des Substrates PEP zur Verfügung gestellt. Die Reaktion kann daher als irreversibel angesehen und folgendermaßen dargestellt werden:



Es wurde untersucht, welche kinetischen Eigenschaften die PEP-Carboxylase in Bezug auf das Substrat PEP hat. Zur Bestimmung der Affinität zum Substrat PEP wurde eine Kinetik mit Konzentrationen von 0 bis 20 mM PEP bei konstanter HCO_3^- -Konzentration (25 mM) erstellt. **Abbildung 2** zeigt, daß die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der PEP-Carboxylase von der PEP-Konzentration einen sigmoiden Kurvenverlauf ergab. Das bedeutet, daß die PEP-Carboxylase von *C. glutamicum* positiv kooperativ für das Substrat PEP ist. Aus der sogenannten Hill-Auftragung (**Abbildung 2 B**), konnte der $K_{0,5}$ -Wert für PEP mit 3 mM ermittelt werden. Der Hill-Koeffizient n , der den Grad der Kooperativität angibt wurde mit 1,6 aus der Steigung der Geraden in **Abbildung 2 B** bestimmt. Da der Hill-Koeffizient größer als 1 ist, verfügt die PEP-Carboxylase also wahrscheinlich über mehr als ein Bindungszentrum für PEP.

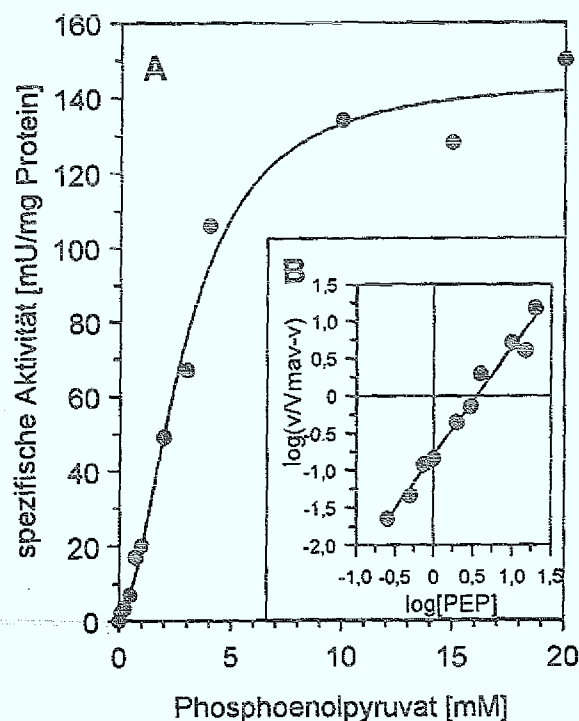


Abbildung 2: Abhängigkeit der PEP-Carboxylase-Aktivität von der Konzentration des Substrats PEP (A). Auftragung der Daten im Hill-Plot (B), mit v = Reaktionsgeschwindigkeit und v_{\max} = maximale Reaktionsgeschwindigkeit.

1.3 Untersuchungen zur Regulation der PEP-Carboxylase

Neben der Abhängigkeit der PEP-Carboxylase vom Substrat PEP wurde der Einfluß der Metabolite Acetyl-CoA und Aspartat auf die spezifische Enzymaktivität der PEP-Carboxylase von *C. glutamicum* untersucht. Hierzu wurden Kinetiken in Abhängigkeit unterschiedlicher PEP-Konzentrationen in Anwesenheit von 1 mM Acetyl-CoA bzw. 0,5 mM Aspartat erstellt. Als Kontrolle wurde die Abhängigkeit von PEP ohne Effektor gemessen. Das Ergebnis ist in **Abbildung 3** zu sehen. Die Zugabe von 0,5 mM Aspartat hemmte die Aktivität der PEP-Carboxylase um nahezu 80 %. Die Zugabe von 1 mM Acetyl-CoA führte zu einer Aktivierung der PEP-Carboxylase Aktivität um ca. 60 %, von $V_{\max} = 160$ mU/mg Protein auf $V_{\max} = 280$ mU/mg Protein. Außerdem wurde die Kooperativität bezüglich des Substrates PEP in Anwesenheit von Acetyl-CoA fast vollständig aufgehoben. Das spiegelte sich in einer dreifachen Verringerung des $K_{0,5}$ -Wertes für PEP auf 0,8 mM und einem um 50 % erniedrigten Hill-Koeffizienten von $n = 0,85$ wieder.

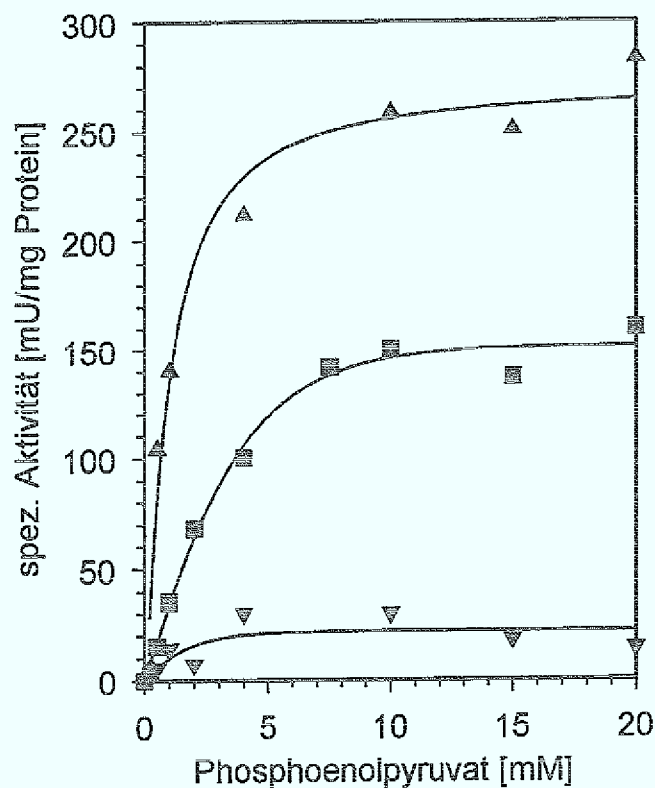


Abbildung 3: Abhängigkeit der PEP-Carboxylase-Aktivität von der Konzentration des Substrats PEP in Anwesenheit von 1 mM Acetyl-CoA (▲), 0,5 mM Aspartat (▼) oder ohne Effektor (■).

Die Ergebnisse zeigen, daß die PEP-Carboxylase von *C. glutamicum* ein kooperatives Bindungsverhalten zum Substrat PEP aufweist und durch den Inhibitor Aspartat und den Aktivator Acetyl-CoA allosterisch reguliert wird.

2. Konstruktion und Charakterisierung definierter PEP-Carboxylase-negativer Mutanten von *C. glutamicum*

Durch gezielte Inaktivierung des Gens für die PEP-Carboxylase (*ppc*) sollte geklärt werden, welche Rolle der PEP-Carboxylase beim Wachstum und bei der Aminosäure-Produktion zukommt. Hierzu wurden definierte PEP-Carboxylase negative Mutanten des *C. glutamicum* Wildtyp-Stammes sowie des Lysin-Produktionsstammes MH20-22B und des Tyrosin-Produktionsstammes ATCC 21573 hergestellt und charakterisiert.

2.1 Inaktivierung des Gens für die PEP-Carboxylase in *C. glutamicum* Wildtyp, MH20-22B und ATCC 21573

Die gezielte Mutagenese des *ppc*-Gens beruhte auf der Integration eines Vektors in den chromosomalen Genort des *ppc*-Gens von *C. glutamicum*. Für die Konstruktion des Vektors wurde ein 0,65 kb *ppc*-internes *Xho*I-Fragment aus dem Vektor pUC-*ppc*II isoliert und in die *Sal*I-Restriktionsschnittstelle des mobilisierbaren, in *C. glutamicum* nicht replizierenden Vektors pEM1 ligiert. Der resultierende Vektor pEM-PP (Abbildung 4) wurde über Konjugation von *E. coli* S17-1(pEM-PP) in die *C. glutamicum*-Stämme WT, MH20-22B und ATCC 21573 übertragen. Es wurde auf Kanamycin- und Nalidixinsäure-Resistenz selektioniert. Der verwendete *E. coli*-Stamm ist Nalidixinsäure-sensitiv und kann daher auf Nalidixinsäure-haltigem Medium nicht wachsen. Der Vektor pEM1 trägt das Gen für die Kanamycin-Resistenz. Da er in *C. glutamicum* nicht repliziert wird, können nur solche Zellen auf Kanamycin überleben, die den Vektor über homologe Rekombination ins Genom integriert haben (Abbildung 4). Von allen Stämmen wurden mehrere Nalidixinsäure- und Kanamycin-resistente Transkonjuganten erhalten.

Zum Beweis, daß die Integration tatsächlich im kodierenden Bereich des *ppc*-Gens stattgefunden hat, wurde jeweils eine Nalidixinsäure- und Kanamycin-resistente Transkonjugante (WT-PP, MH20-22B-PP und 21573-CK) durch Southern-Blot-Hybridisierung getestet. Dafür wurde ein Gen-Fragment (2,45 kb *Bam*HI/*Sal*I-Fragment) aus dem Vektor pUC-*ppc*II isoliert, mit Digoxigenin-dUTP markiert und als *ppc*-spezifische Sonde verwendet. Chromosomale DNA von den Ausgangsstämmen *C. glutamicum* WT, MH20-22B und ATCC 21573 sowie von den jeweiligen Transkonjuganten wurde mit dem Restriktionsenzym *Sal*I geschnitten, gelelektrophoretisch im Agarose-Gel aufgetrennt, anschließend auf eine Nylon-Membran übertragen und mit der *ppc*-Sonde hybridisiert. Die Ergebnisse der Southern Blot-Analysen sind in Abbildung 5 dargestellt. Die Hybridisierung der *ppc*-Sonde mit der *Sal*I-restringierten chromosomalen DNA vom Wildtyp (Spur 1), vom Stamm MH20-22B (Spur 3) und vom Stamm ATCC 21573 (Spur 5) ergab Signale bei 3,4 kb. Das entsprach der Größe des genomischen *ppc*-Genorts (O'Regan *et al.*, 1989). Dagegen hybridisierte die

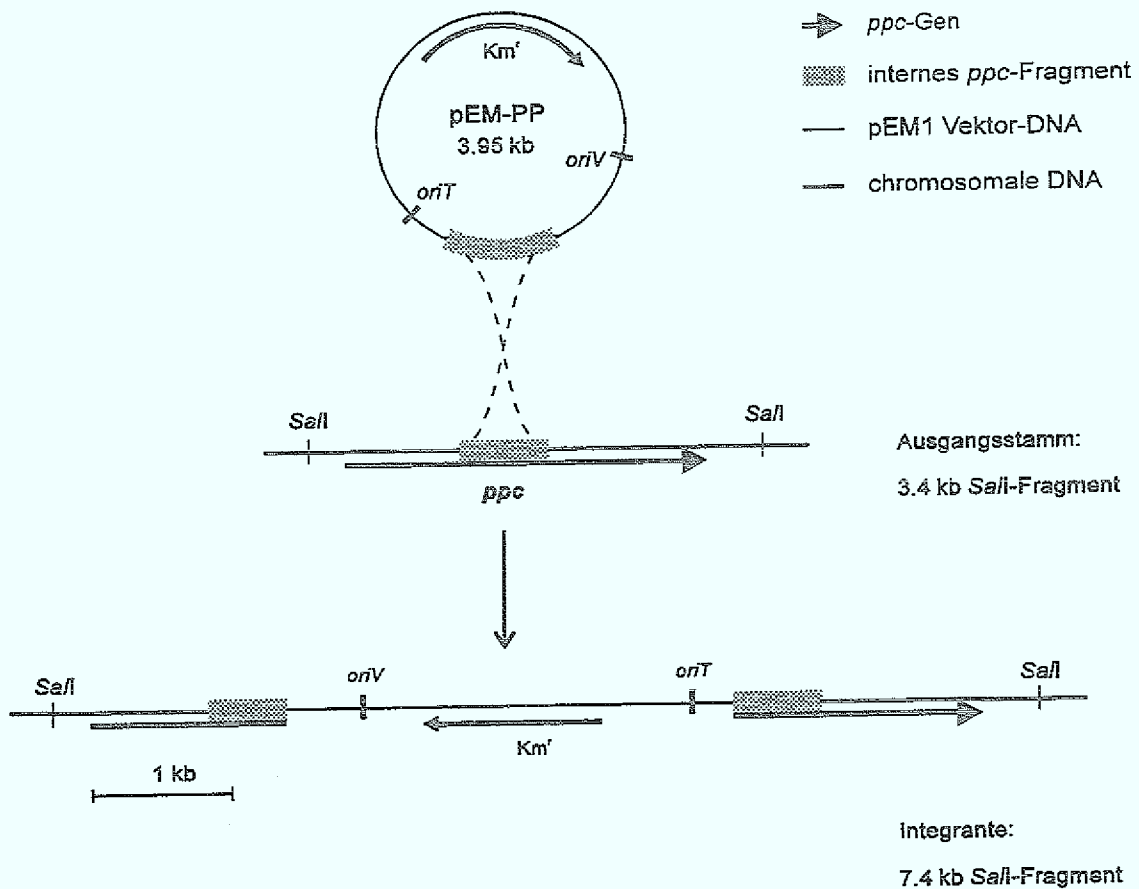


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Konstruktion der PEP-Carboxylase-negativen Mutanten durch Integrationsmutagenese mit dem Vektor pEM-PP.

ppc-Sonde mit einem 7,4 kb *SalI*-Fragment der chromosomalen DNA der Mutanten WT-PP (Spur 2), MH20-22B-PP (Spur 4) und 21573-CK (Spur 6). Der zur Integration verwendete 4 kb große Vektor pEM-PP verfügt über keine *SalI*-Schnittstelle, daher wurde in den Transkonjuganten ein 7,4 kb Signal (3,4 kb plus 4 kb) erwartet. Damit war gezeigt, daß der chromosomale Genort des *ppc*-Gens in den Mutanten WT-PP, MH20-22B-PP und 21573-CK definiert zerstört war.

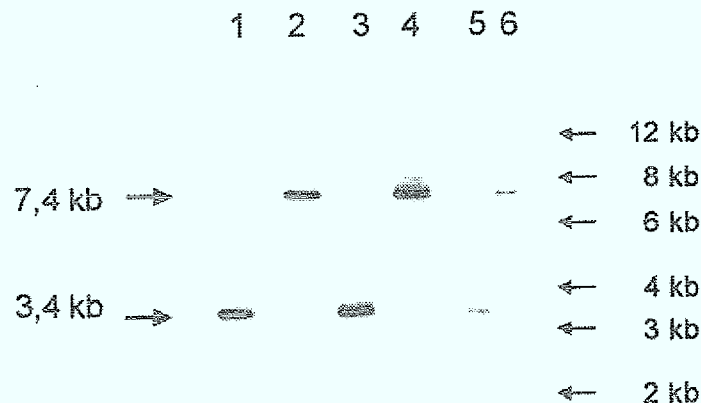


Abbildung 5: Southern Blot-Analyse chromosomaler DNA von *C. glutamicum* Wildtyp (Spur 1), MH20-22B (Spur 3) und ATCC 21573 (Spur 5) sowie der hiervon abgeleiteten Transkonjuganten WT-PP (Spur 2), MH20-22B-PP (Spur 4) und 21573-CK (Spur 6) nach Restriktion mit *Safl* und Hybridisierung gegen eine *ppc*-spezifische DNA-Sonde.

Um zu untersuchen, ob die gengerichtete Mutagenese zum Verlust der PEP-Carboxylase-Aktivität führte, wurden die Transkonjuganten und ihre Ausgangsstämme auf PEP-Carboxylase-Aktivität analysiert. Während die Ausgangsstämme nach Wachstum auf Komplexmedium spezifische PEP-Carboxylase Aktivitäten von 55 mU/mg Protein (Wildtyp), 100 mU/mg Protein (MH20-22B) und 24 mU/mg Protein (ATCC 21573) aufwiesen, konnte in allen Integrationsmutanten keine PEP-Carboxylase Aktivität (< 3 mU/mg Protein) nachgewiesen werden. Es konnten also definierte PEP-Carboxylase negative Mutanten konstruiert werden, die, abgesehen vom *ppc*-Genort, isogen zu den entsprechenden Ausgangsstämmen waren.

2.2 Vergleichende Wachstumsexperimente mit den PEP-Carboxylase-negativen Mutanten und den Ausgangsstämmen

Zunächst wurde untersucht, ob der Verlust der PEP-Carboxylase einen Einfluß auf das Wachstum der drei *C. glutamicum*-Stämme hatte. Dazu wurden die Ausgangsstämme und die Mutanten in Minimalmedium mit Glucose gezüchtet und die Wachstumsrate (μ) sowie der Zellertrag (Y) bestimmt. Wie in Tabelle 4 dargestellt, wiesen alle PEP-Carboxylase-negativen Mutanten auf Glucose das gleiche Wachstumsverhalten wie ihre

entsprechenden Ausgangsstämme auf. Der Tyrosin-Produktionsstamm 21573 und seine Mutante wuchsen etwas langsamer. Für den Wildtyp und die von ihm abgeleitete PEP-Carboxylase-negative Mutante konnte gezeigt werden, daß sie auch auf den C-Quellen Acetat bzw. Lactat nahezu gleich wuchsen. Der Verlust der PEP-Carboxylase hatte also auf allen getesteten Medien keinen Einfluß auf das Wachstum. Somit konnte gezeigt werden, daß die PEP-Carboxylase für das Wachstum von *C. glutamicum* nicht essentiell ist.

Tabelle 4: Charakterisierung des Wachstums der PEPCx-negativen Mutanten WT-PP und MH20-22B-PP im Vergleich zu den Ausgangsstämmen. μ [h^{-1}] = Wachstumsrate, Y [g TG/g Substrat] = Zellertrag.

Stamm	Glucose 4 % (w/v)		Acetat 2 % (w/v)		Lactat 2 % (v/v)	
	μ [h^{-1}]	Y [g _{TG} /g]	μ [h^{-1}]	Y [g _{TG} /g]	μ [h^{-1}]	Y [g _{TG} /g]
WT	0,27	0,32	0,22	0,29	0,21	0,18
WT-PP	0,28	0,30	0,20	0,25	0,22	0,17
MH20-22B	0,24	0,19	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
MH20-22B-PP	0,23	0,19	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
21573	0,20	0,25	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
21573-CK	0,20	0,23	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

n.b. nicht bestimmt; TG = Trockengewicht

2.3 Vergleichende Untersuchungen zur Aminosäure-Produktion der PEP-Carboxylase-negativen Mutanten und den Ausgangsstämmen

Neben der Bedeutung der PEP-Carboxylase für das Wachstum wurde auch die Bedeutung des Verlusts der PEP-Carboxylase für die Lysin- bzw. Tyrosin-Produktion der *C. glutamicum* Mutanten MH20-22B-PP und 21573-CK untersucht.

Die Stämme MH20-22B und MH20-22B-PP wurden auf Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose in Batch-Fermentationen gezüchtet, das Wachstum verfolgt, und zu zwei verschiedenen Zeitpunkten die in das Medium sezernierte Lysin-Menge bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 6 dargestellt. Beide Stämme produzierten ungefähr gleiche Mengen an Lysin (ca. 30 mM). Das Ergebnis zeigt, daß die PEP-Carboxylase auch für die Lysin-Produktion nicht essentiell ist.

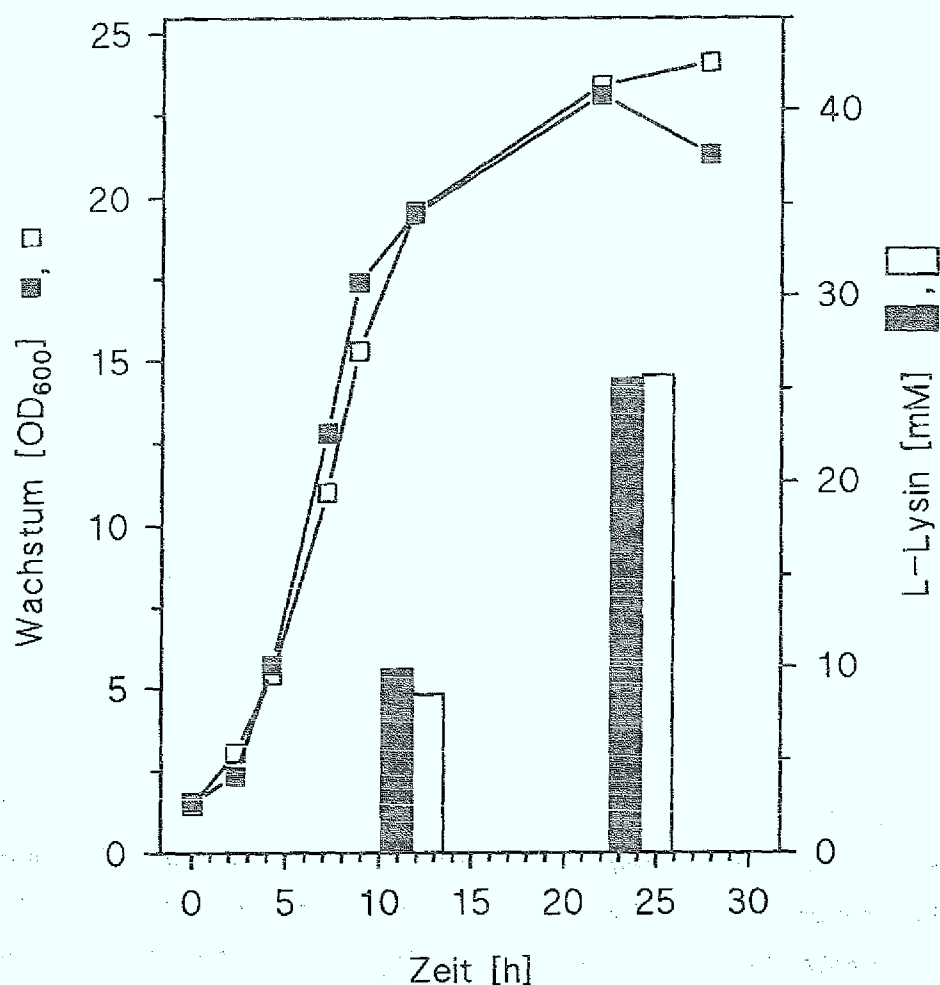


Abbildung 6: Wachstum und Lysin-Produktion von *C. glutamicum* MH20-22B (■/geschlossene Säulen) und der von diesem Stamm abgeleiteten PEP-Carboxylase-negativen Mutante MH20-22B-PP (□/offene Säulen) in Glucose-Minimalmedium.

Mit den Stämmen ATCC 21573 und 21573-CK wurden Batch-Fermentationen in Minimalmedium mit 10 % (w/v) Glucose durchgeführt und die Tyrosin-Ausbeute nach 48 Stunden bestimmt. Das Ergebnis ist in Tabelle 5 zusammengefasst. Beide Stämme produzierten Tyrosin mit vergleichbaren Ausbeuten, d.h. das Ausschalten der PEP-Carboxylase hatte keinen signifikanten Effekt auf die Tyrosin-Produktion.

Tabelle 5: Tyrosin-Produktion der PEP-Carboxylase-negativen Mutante 21573-CK im Vergleich zu ihrem Ausgangsstamm 21573 nach 48 stündiger Fermentation in der Batchkultur mit 10 % (w/v) Glucose als C-Quelle.

Stamm	OD ₆₀₀	Tyrosin [mM]	Ausbeute [g _{Tyr} /g _{TG}]
21573	51	4	0,047
21573-CK	40	2,8	0,041

TG = Trockengewicht

3. Konstruktion und Charakterisierung definierter PEP-Carboxylase- / Isocitrat-Lyase-Doppelmutanten von *C. glutamicum*

Die in Kapitel 2 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß *C. glutamicum* über eine zur PEP-Carboxylase alternative anaplerotische Reaktion verfügen muß. Der Glyoxylat-Zyklus stellt in *C. glutamicum* die essentielle anaplerotische Sequenz bei Wachstum auf Acetat dar (Reinscheid *et al.*, 1994a/b). Bei Wachstum auf Glucose sind die Aktivitäten der Schlüsselenzyme Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase zwar drastisch erniedrigt, aber mit 20 bis 30 mU/mg Protein deutlich nachweisbar. Zudem wurden *Arthrobacter*-Stämme, die ebenfalls zu den coryneformen Bakterien zählen, mit defekter PEP-Carboxylase beschrieben, die den Glyoxylat-Zyklus als einzige anaplerotische Sequenz bei Wachstum auf Glucose verwenden (Krulwich & Pellicione, 1979). Um zu testen, ob der Glyoxylat-Zyklus die zur PEP-Carboxylase alternative anaplerotische Reaktion darstellt, wurden im folgenden, ausgehend von den *C. glutamicum*-Stämmen WT und MH20-22B Mutanten konstruiert, in denen sowohl das Gen für die PEP-Carboxylase, als auch das Gen für die Isocitrat-Lyase (*aceA*)(Reinscheid *et al.*, 1994b) durch gezielte Mutagenese definiert zerstört sind.

3.1 Inaktivierung der Gene für die PEP-Carboxylase und die Isocitrat-Lyase in *C. glutamicum* Wildtyp und MH20-22B

Durch eine Genaustausch-Mutagenese wurde das intakte chromosomale *ppc*-Gen durch ein definiert inaktiviertes *ppc*-Gen ersetzt. Bei dieser Methode der gezielten Mutagenese bleiben keine Vektoranteile im Chromosom zurück, die eine weitere Integration aufgrund homologer Bereiche in den Vektorabschnitten erschweren würden

(Schwarzer & Pühler, 1991). Das *aceA*-Gen konnte daher in einem zweiten Schritt durch eine Vektorintegration in den *aceA*-Genort zerstört werden.

Für die Konstruktion des Vektors, der für den Genaustausch des intakten *ppc*-Gens mit einem inaktivierten *ppc*-Gen verwendet wurde (Abbildung 7), wurde zunächst ein 1,0 kb *Avall*- / *Klenow*-Fragment des *ppc*-Gens im Vektor pUC-ppcII deletiert und durch ein 1,7 kb *Bam*HI- / *Eco*RI- / *Klenow*-Fragment aus dem Vektor pEC5 ersetzt. Das 1,7 kb-Fragment trug das Gen für die Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (*cat*). Die das *cat*-Gen flankierenden Bereiche im resultierenden Vektor pPW1 trugen das 5'-Ende (*ppc'*) und das 3'-Ende (*ppc''*) des *ppc*-Gens. Aus dem Vektor pPW1 wurde das *cat*-Gen mit diesen flankierenden Bereichen als 4,0 kb *Sa*II-Fragment isoliert und in die *Sa*II-Schnittstelle des mobilisierbaren *E. coli*-Vektors pK19*mobsacB* (Schäfer *et al.*, 1994) ligiert.

Der resultierende Vektor pPW2 ist nicht-replikativ in *C. glutamicum* und trägt neben dem Kanamycin-Resistenzgen auch das *sacB*-Gen, das für die Levan-Sucrase aus *B. subtilis* kodiert. Die Expression des *sacB*-Gens, die durch Saccharose induziert wird, verursacht eine Saccharose-Sensitivität, da das entstehende Produkt Levan für *C. glutamicum* toxisch ist (Jäger *et al.*, 1992). In einem ersten Schritt wurde der Vektor pPW2, der das durch das *cat*-Gen unterbrochene *ppc*-Gen enthielt, über Konjugation von *E. coli* S17-1 nach *C. glutamicum* WT bzw. MH20-22B in den *ppc*-Genort integriert. Die Selektion der Transkonjuganten erfolgte auf Kanamycin-, Nalidixinsäure- und Chloramphenicol-haltigem Medium. Es zeigte sich, daß der Stamm MH20-22B wesentlich empfindlicher auf die Anwesenheit von Chloramphenicol reagierte, so daß bei diesem Stamm auf die Selektion auf Chloramphenicol-Resistenz verzichtet wurde. Die Integration des Vektors in das chromosomale *ppc*-Gen unterlag dem gleichen Prinzip homologer Rekombination wie in Kapitel 2.1 beschrieben. Es wurden für beide Stämme mehrere Transkonjuganten erhalten. Zur Selektion auf ein Doppel-Crossover-Ereignis, d.h. auf den Verlust des Vektoranteils mit dem Kanamycin-Resistenzgen (Abbildung 8), wurde jeweils eine Transkonjugante vom Wildtyp und vom Stamm MH20-22B in Komplexmedium ohne Antibiotikum 15 Generationen gezüchtet und anschließend auf Komplexmedium mit 10 % Saccharose und im Falle der Transkonjugante vom Wildtyp mit 5 µg/l Chloramphenicol ausplattiert. Nur wenn der Vektoranteil mit dem Kanamycin-Resistenzgen und dem *sacB*-Gen wieder aus dem Chromosom herausrekombiniert ist, kann ein solcher Stamm auf Saccharose wachsen, jedoch nicht mehr in Anwesenheit von Kanamycin. Auf diesen Phänotyp wurde anschließend getestet. Die zusätzliche Selektion der Wildtyp-Transkonjuganten auf Chloramphenicol-Resistenz erhöhte den Anteil an Transkonjuganten, bei denen der Vektor richtig, das heißt unter Zurücklassung des inaktivierten *ppc*-Gens mit der *cat*-Kassette herausrekombinierte.

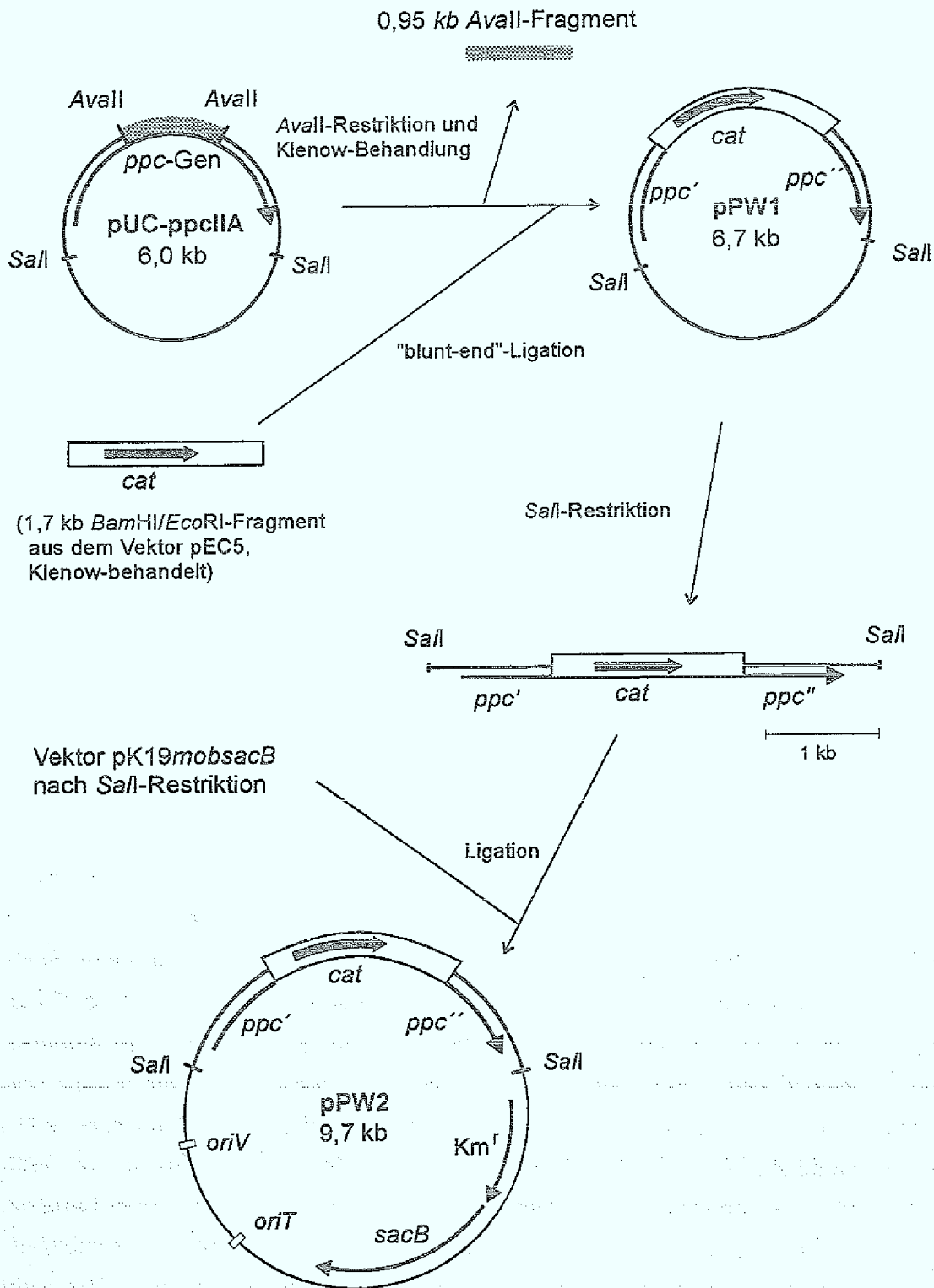


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Konstruktion des Vektors pPW2 für den Genaustausch des intakten chromosomalen *ppc*-Gens mit einem durch Deletion und Insertion des *cat*-Gens inaktivierten *ppc*-Gens. *ppc'* = 5'-Ende des *ppc*-Gens; *ppc''* = 3'-Ende des *ppc*-Gens.

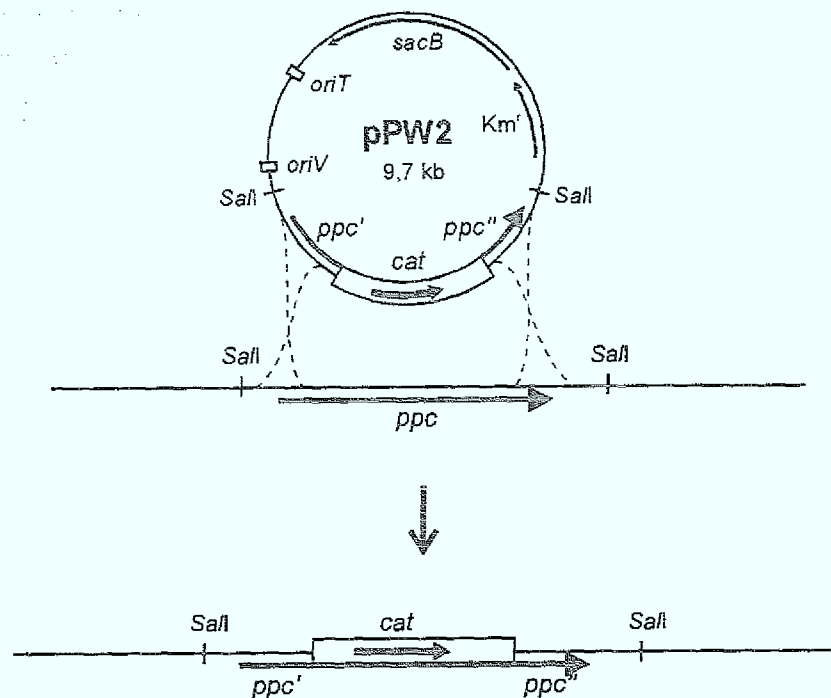


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Genaustausch-Mutagenese zur Herstellung einer PEP-Carboxylase-negativen Mutante von *C. glutamicum*. Durch das Ereignis eines Doppel-Crossover wird das genomische *ppc*-Gen durch ein defektes *ppc*-Gen ersetzt.

Es wurden die Kanamycin-sensitiven und Saccharose-resistenten Stämme WT-KT und MH20-22B-KT erhalten. Sowohl der Stamm WT-KT als auch der Stamm MH20-22B-KT zeigten wie erwartet keine nachweisbare PEP-Carboxylase Aktivität (Tabelle 6).

Die anschließende Inaktivierung des *aceA*-Gens erfolgte nach dem Prinzip der Vektor-Integration. Dabei wurde der Vektor pSUP*aceA* (Reinscheid *et al.*, 1994b) als Integrationsvektor verwendet. Nach der Konjugation des Vektors in die Stämme WT-KT und MH20-22B-KT wurden mehrere Kanamycin-resistente Transkonjuganten erhalten. Je eine Transkonjugante, WT-PPW bzw. MH20-22B-PPW, wurde für die weiteren Untersuchungen verwendet.

Zunächst wurde mit Southern-Blot-Hybridisierung überprüft, ob die Mutanten tatsächlich sowohl das *ppc*-Gen als auch das *aceA*-Gen definiert zerstört hatten. Zur Hybridisierung gegen den *ppc*-Genort wurde das in Kapitel 2.1 bereits beschriebene 2,45 kb *Bam*HI/*Sal*I-Fragment als Sonde verwendet. Die Hybridisierung gegen den *aceA*-Genort erfolgte mit einer das *aceA*-Gen tragenden 1,5 kb *Bgl*II/*Bfr*I Sonde (Reinscheid, 1994). Das Ergebnis der Southern-Blot-Analyse ist in Abbildung 9 dargestellt. Die Hybridi-

sierung der *ppc*-Sonde mit *SaII*-restringierter chromosomaler DNA der beiden Mutanten WT-PPW (Spur 2) und MH20-22B-PPW (Spur 4) ergab Signale der Größe 4,1 kb. Die beiden Ausgangsstämme WT (Spur 1) und MH20-22B (Spur 3) zeigten erwartungsgemäß Signale der Größe 3,4 kb (s. auch Kapitel 2.1). Das 4,1 kb große *SaII*-Fragment der Mutanten setzt sich aus dem um 1 kb deletierten 3,4 kb großen Original-Fragment und der 1,7 kb *cat*-Kassette zusammen (Abbildung 9 A). Die Hybridisierung der *aceA*-spezifischen Sonde mit *BglII*-restringierter chromosomaler DNA zeigte in den Stämmen WT (Spur 1) und MH20-22B (Spur 3) Signale bei 3,4 kb. Das entsprach dem intakten Genort des *aceA*-Gens (Reinscheid *et al.*, 1994a). Dagegen hybridisierte die *aceA*-Sonde mit einem 9,1 kb *BglII*-Fragment der chromosomalen DNA der Mutanten WT-PPW (Spur 2) und MH20-22B-PPW (Spur 4). Das 9,1 kb-Fragment setzte sich aus dem 5,7 kb großen Vektor pSUP*aceA*, der keinen *BglII*-Schnitt trägt, und dem ursprünglichen chromosomalen 3,4 kb *BglII*-Fragment zusammen (Abbildung 9 B). Damit war gezeigt, daß in den Stämmen WT-PPW und MH20-22B-PPW sowohl der Genort des *ppc*-Gens als auch der Genort des *aceA*-Gens zerstört war.

Im folgenden wurde auf enzymatischer Ebene untersucht, ob mit der Zerstörung der Genorte von *ppc* und *aceA*, auch die Aktivitäten von PEP-Carboxylase und Isocitrat-Lyase zerstört waren. Dafür wurden die spezifischen Aktivitäten beider Enzyme in den Doppelmutanten im Vergleich zu ihren Ausgangsstämmen untersucht. Tabelle 6 zeigt das Ergebnis. In den Doppelmutanten WT-PPW und MH20-22B-PPW ließen sich weder PEP-Carboxylase- noch Isocitrat-Lyase-Aktivität nachweisen.

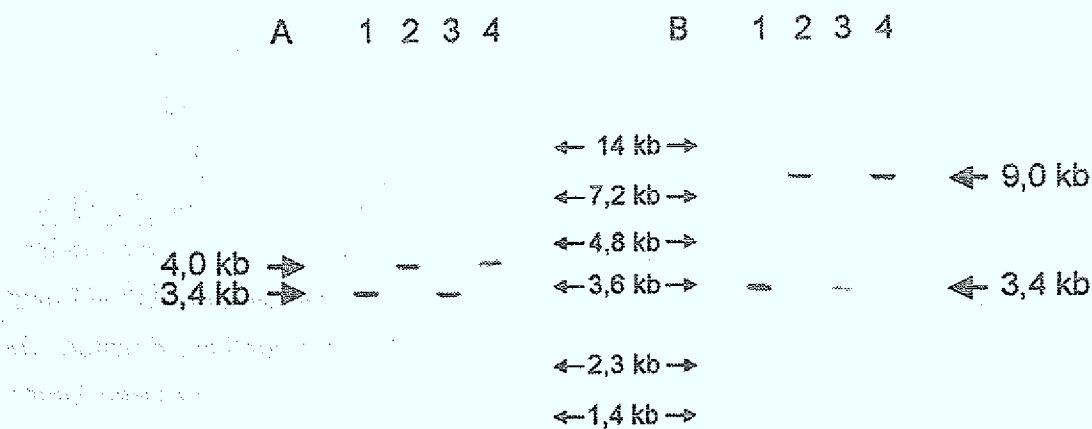


Abbildung 9: Southern Blot-Analyse chromosomaler DNA von *C. glutamicum* Wildtyp (Spur 1) und MH20-22B (Spur 3) sowie der hiervon abgeleiteten Mutanten WT-PPW (Spur 2) und MH20-22B-PPW (Spur 4) nach Restriktion mit *SaII* und Hybridisierung gegen eine *ppc*-spezifische DNA-Sonde (A) bzw. nach Restriktion mit *BglII* und Hybridisierung gegen eine *aceA*-spezifische DNA-Sonde (B).

Tabelle 6: Spezifische Aktivitäten der PEP-Carboxylase und der Isocitrat-Lyase in Rohextrakten der Deletionsmutanten WT-KT und MH20-22B-KT sowie der PEP-Carboxylase- / Isocitrat-Lyase-Doppelmutanten WT-PPW und MH20-22B-PPW im Vergleich zu ihren Ausgangsstämmen nach Wachstum auf Glucose.

Stamm	spezifische Aktivität [mU/mg Protein]	
	PEP-Carboxylase	Isocitrat-Lyase
WT	150	28
WT-KT	< 3	n.b.
WT-PPW	< 3	< 3
MH20-22B	170	30
MH20-22B-KT	< 3	n.b.
MH20-22B-PPW	< 3	< 3

n.b. = nicht bestimmt

3.2 Vergleichende Wachstumsexperimente mit der PEP-Carboxylase- / Isocitrat-Lyase-negativen Doppelmutante und den Ausgangsstämmen

Das Wachstum der PEP-Carboxylase- / Isocitrat-Lyase-Doppelmutante WT-PPW wurde im Vergleich zum Ausgangsstamm WT sowie der PEP-Carboxylase-negativen Mutante WT-PP und der Isocitrat-Lyase-negativen Mutante ASK1 (Reinscheid *et al.*, 1994b) auf verschiedenen Medien getestet. Wie in **Abbildung 10** zu sehen ist, wuchs die Doppelmutante genauso gut wie der Wildtyp und die entsprechenden PEP-Carboxylase- und Isocitrat-Lyase-Einfachmutanten auf 4 % Glucose (**Abbildung 10 A**). Auch auf 2 % D,L-Lactat (**Abbildung 10 B**) gab es keinen signifikanten Unterschied im Wachstumsverhalten zwischen den Stämmen. Auf 2 % Acetat wuchsen die Mutante ASK1 und die Doppelmutante WT-PPW nicht, wohingegen der Wildtyp und die PEP-Carboxylase-negative Mutante WT-PP normales Wachstum zeigten (**Abbildung 10 C**). Diese Ergebnisse bestätigen, daß die Isocitrat-Lyase für das Wachstum auf Acetat essentiell ist (Reinscheid *et al.*, 1994b). Außerdem zeigen diese Experimente eindeutig, daß selbst in Abwesenheit des Glyoxylat-Zyklus die PEP-Carboxylase bei Wachstum auf Glucose nicht essentiell ist.

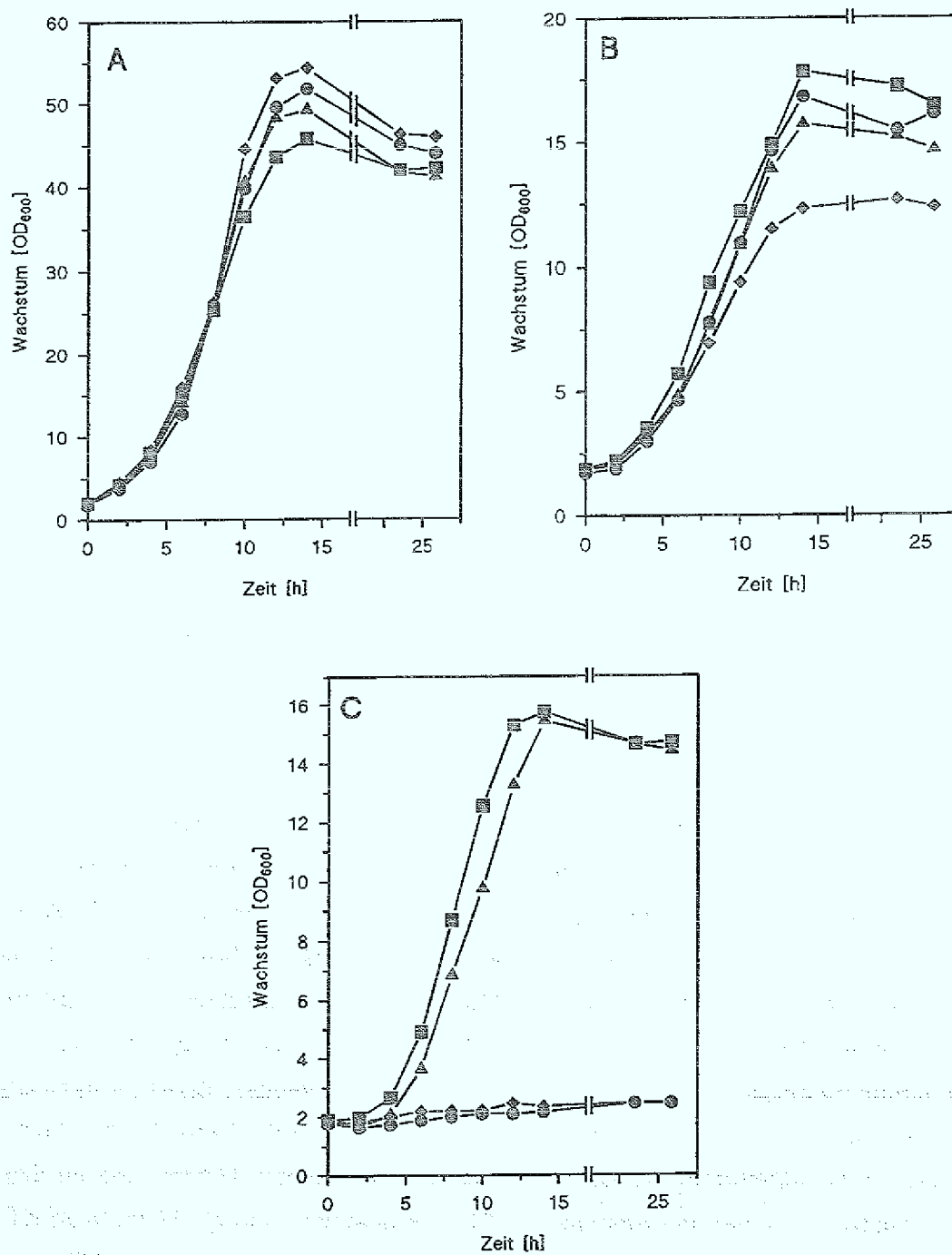


Abbildung 10: Wachstum der Stämme WT (■), WT-PPW (●), WT-PP (▲) und ASK1 (◆) auf Minimalmedium mit Glucose (A), Lactat (B) oder Acetat (C) als C-Quelle.

3.3 Vergleichende Untersuchungen zur Lysin-Produktion der PEP-Carboxylase- / Isocitrat-Lyase-negativen Doppelmutante und dem Ausgangsstamm

Im folgenden wurde untersucht, welche Auswirkungen das Fehlen der PEP-Carboxylase und des Glyoxylat-Zyklus auf das Wachstum und die Lysin-Produktion im Stamm MH20-22B-PPW hat. Die PEP-Carboxylase- / Isocitrat-Lyase-negative Doppelmutante MH20-22B-PPW und der Ausgangsstamm MH20-22B und wurden hierzu in Minimalmedium mit 4 % (w/v) Glucose in einer Batch-Fermentation kultiviert. Es zeigte sich auch hier, daß die Doppelmutante fast genauso wuchs wie der Ausgangsstamm (Abbildung 11). Zu bestimmten Zeitpunkten im Verlauf des Wachstums wurden Proben entnommen und die Lysin-Konzentration in den Kulturüberständen mittels HPLC bestimmt. Abbildung 11 zeigt, daß auch die Lysin-Produktion durch den Verlust der beiden anaplerotischen Sequenzen PEP-Carboxylase und Glyoxylat-Zyklus nicht beeinträchtigt ist. *C. glutamicum* besitzt also mindestens noch eine weitere Reaktion, die Tricarbonsäurezyklus-Intermediate für die Lysin-Produktion bei Wachstum auf Glucose zur Verfügung stellen kann.

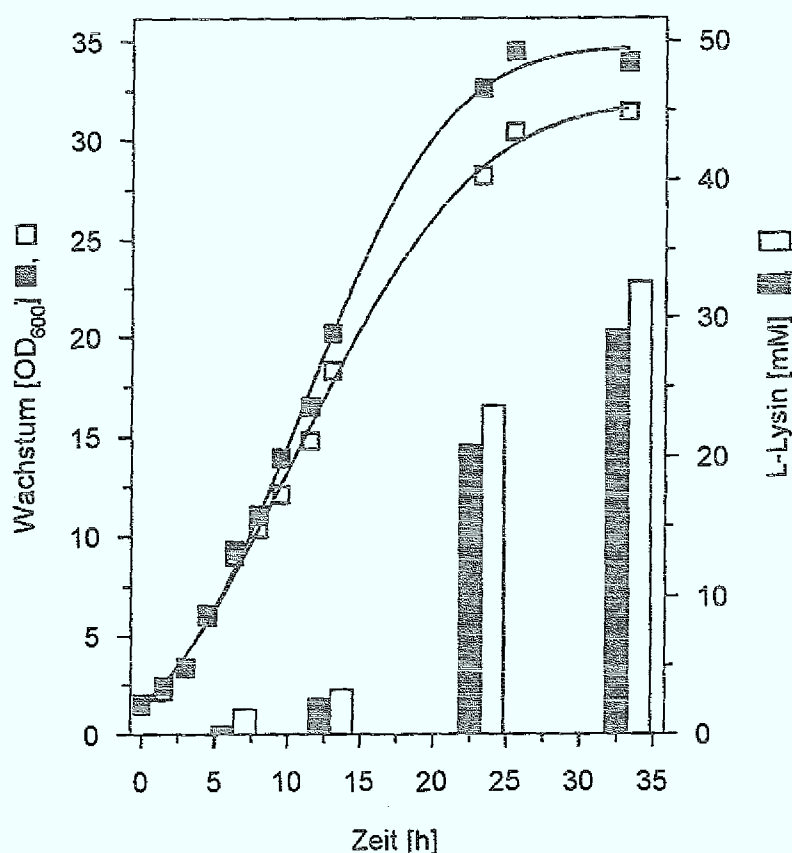


Abbildung 11: Wachstum und Lysin-Produktion der *C. glutamicum* Stämme MH20-22B (■/geschlossene Säulen) und MH20-22B-PPW (□/offene Säulen) auf Glucose-Minimalmedium.

4. $^{13}\text{CO}_2$ -Markierungsexperimente mit dem Wildtyp und der PEP-Carboxylase-negativen Mutante von *C. glutamicum*

Da aufgrund der bisherigen Ergebnisse der Glyoxylat-Zyklus als zur PEP-Carboxylase alternative Sequenz ausgeschlossen werden konnte, wurde untersucht, ob es sich bei der gesuchten anaplerotischen Reaktion um eine Carboxylierungsreaktion ausgehend von PEP oder Pyruvat handeln könnte. Hierzu wurden *in vivo*- $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$ -Markierungsexperimente mit den *C. glutamicum*-Stämmen WT und WT-PP bei Wachstum auf Glucose durchgeführt. Wenn die Zellen das angebotene ^{13}C -markierte HCO_3^- aufnehmen und über eine PEP- oder Pyruvat-carboxylierende Reaktion in den Stoffwechsel einbauen, so entsteht Oxalacetat, das in Position C-4 ^{13}C -markiert sein sollte (Abbildung 12). Das Kohlenstoffgerüst von Oxalacetat spiegelt sich im Kohlenstoffgerüst von Threonin wieder (Eikmanns *et al.*, 1993), d. h. eine Markierung in C-4 von Oxalacetat findet sich dann auch im C-4 von Threonin. Die Aminosäure Threonin ließ sich aus Zellhydrolysaten isolieren und konnte für die NMR-Analyse zugänglich gemacht werden.

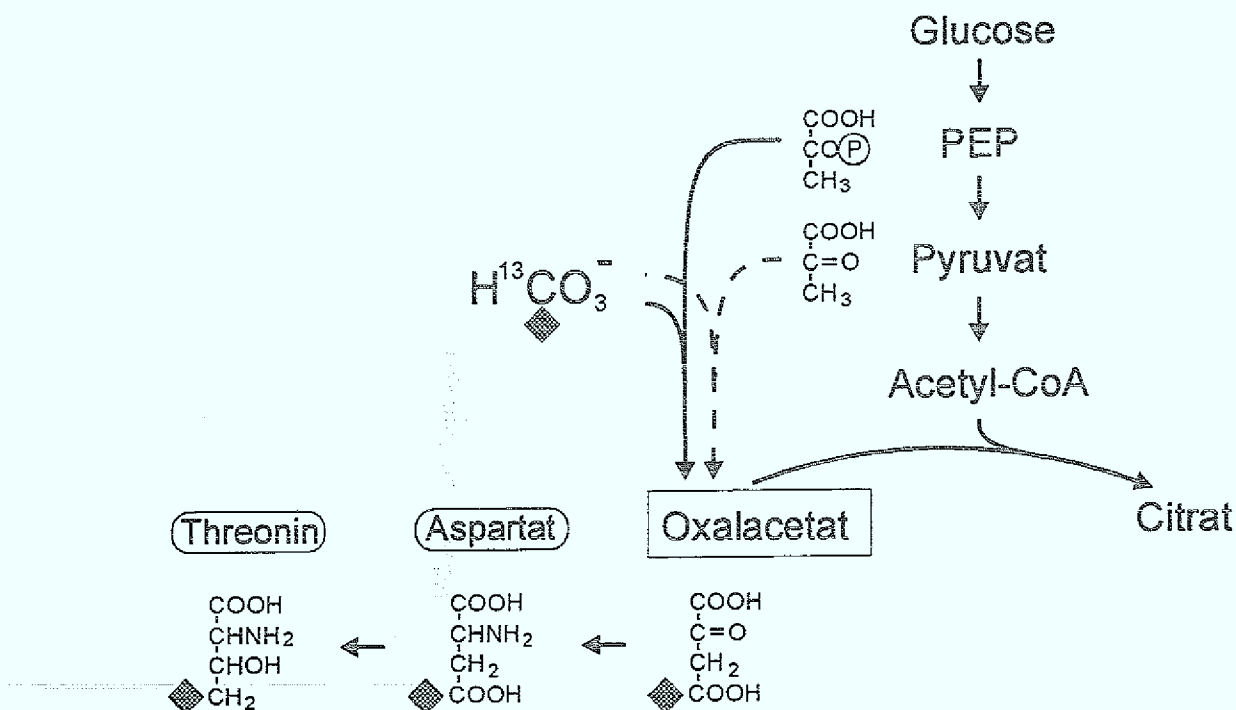


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Markierungsmuster der Intermediate an den Stoffwechsel-Verzweigungspunkten von PEP und Pyruvat nach Wachstum auf Glucose in Anwesenheit von ^{13}C -markiertem Bicarbonat.

Die Stämme *C. glutamicum* WT und WT-PP wurden auf Glucose-Minimalmedium in Anwesenheit von $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$ gezüchtet. Nach der Ernte der Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase und Hydrolyse des Zellproteins wurde das Threonin über FPLC isoliert und in die hochauflösende ^1H -NMR-Analyse (Sonntag *et al.*, 1993) eingesetzt. Es wurden ^1H -NMR-Spektren mit und ohne ^{13}C -Entkopplung aufgenommen und die Markierung für die C-Atome C-2, C-3 und C-4 bestimmt.

Die ^{13}C -Anreicherungen in den einzelnen C-Atomen des Threonins, das aus den Stämmen WT und WT-PP nach Wachstum in Gegenwart von $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$ isoliert und analysiert wurde, ist in **Tabelle 7** dargestellt. Während die C-2- und C-3-Atome die natürliche Häufigkeit von 1,1 % ^{13}C aufwiesen, zeigte das C-4-Atom in beiden getesteten Stämmen eine hohe und nahezu gleiche ^{13}C -Anreicherung von ca. 37 %. Dieser Befund zeigt, daß selbst in Abwesenheit der PEP-Carboxylase im Stamm WT-PP PEP oder Pyruvat mit einer Rate, die mit der des Wildtyps vergleichbar ist, carboxyliert wird. Das bedeutet, daß das zur PEP-Carboxylase alternative anaplerotische Enzym eine C₃-Carboxylierung katalysiert.

Tabelle 7: ^{13}C -Anreicherungen in den C-Atomen von Threonin aus Zellhydrolysaten der Stämme WT und WT-PP nach Wachstum auf Minimalmedium mit Glucose in Anwesenheit von $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$.

Stamm	^{13}C -Anreicherung (%) in Threonin ^a		
	C-2	C-3	C-4
WT	1,1	1,1	37,4
WT-PP	1,1	1,1	36,4

^a Die Werte sind aus zwei unabhängigen Messungen mit einem absoluten Fehler von < 0,2 % ermittelt.

5. Nachweis und Charakterisierung von Enzymen in *C. glutamicum*, die neben der PEP-Carboxylase an den PEP- und Pyruvat-Verzweigungspunkten beteiligt sind

Durch die ^{13}C -Markierungsexperimente konnte gezeigt werden, daß die zur PEP-Carboxylase alternative anaplerotische Reaktion eine Carboxylierung von PEP oder Pyruvat darstellt. Es wurde daher untersucht, über welche PEP- bzw. Pyruvat-carboxylierenden Enzyme *C. glutamicum* neben der PEP-Carboxylase verfügt. Die spezifischen Aktivitäten der PEP-Carboxykinase, der PEP-Carboxytransphosphorylase,

der NADP-abhängigen, decarboxylierenden Malat-Dehydrogenase (*Malat-Enzym*), der Oxalacetat-Decarboxylase und der Pyruvat-Carboxylase wurden in Rohextrakten von *C. glutamicum* untersucht.

5.1 Die PEP-Carboxykinase

Die PEP-Carboxykinase katalysiert die reversible Carboxylierung von PEP zu Oxalacetat unter Bildung von NTP aus NDP (Chang *et al.*, 1966)(Reaktion 1).



Der Nachweis der PEP-Carboxykinase in *C. glutamicum* wurde zunächst mit der Mutante WT-PP durchgeführt, da hier keine Störaktivität durch die PEP-Carboxylase zu erwarten war.

Ausgehend von einem Malat-Dehydrogenase gekoppelten Test konnte mit IDP und GDP eine spezifische PEP-Carboxykinase-Aktivität von ca. 40 mU/mg Protein im Rohextrakt von *C. glutamicum* nachgewiesen werden. Mit ADP konnte dagegen keine Aktivität gemessen werden. Die Zugabe von 1 mM ADP führte sogar zu einer 50 %igen Hemmung der IDP-abhängigen Reaktion. Im folgenden wurde der PEP-Carboxykinase-Enzymtest optimiert und anschließend die spezifische Aktivität genauer charakterisiert. Der optimale pH-Bereich konnte in HEPES-Puffer zwischen 6,5 und 7,0 ermittelt werden. Die PEP-Carboxykinase war strikt Mn^{2+} -abhängig und die Aktivität konnte um 30 % auf ca. 60 mU/mg Protein gesteigert werden, wenn der Testansatz zusätzlich 10 mM MgSO_4 enthielt. Die Begasung der eingesetzten NaHCO_3 -Lösung mit CO_2 führte zu einer Steigerung der Aktivität um weitere 30 %, was auf die Verwendung von CO_2 anstatt von HCO_3^- als Substrat hindeutet (Walsh, 1979). Mit dem so optimierten Test (Tabelle 8) konnte nun eine spezifische PEP-Carboxykinase-Aktivität von ca. 85 mU/mg Protein in Rohextrakten von *C. glutamicum* WT-PP nachgewiesen werden.

Weiterhin wurde untersucht, ob sich die PEP-Carboxykinase-Aktivität auch im Rohextrakt von *C. glutamicum* Wildtyp nachweisen ließ. Dafür wurde zunächst die PEP-Carboxylase Aktivität bestimmt. Nach Zugabe von IDP konnte eine Steigerung dieser Aktivität gemessen werden. Die Differenz der PEP-Carboxylase Aktivität und der IDP-abhängigen Aktivität ergab ca. 70 mU/mg Protein. Das entspricht nahezu der spezifischen PEP-Carboxykinase-Aktivität, die in der Mutante WT-PP ermittelt wurde. Da die PEP-Carboxylase durch Aspartat stark gehemmt wurde, wurde das gleiche Experiment unter Zugabe von 5 mM Aspartat durchgeführt. Ohne IDP konnte nun keine Aktivität gemessen werden, während nach Zugabe von IDP die spezifische Aktivität wieder 70 mU/mg Protein betrug. Darüberhinaus wurde die PEP-Carboxykinase in der PEP-Carboxylase- / Isocitrat-Lyase-Doppelmutante WT-PPW untersucht. Es konnte eine spezifische PEP-Carboxykinase Aktivität von 80 mU/mg Protein nachgewiesen werden.

Tabelle 8: Optimierte Zusammensetzung des Enzymtests zur Bestimmung der spezifischen PEP-Carboxykinase-Aktivität im Rohextrakt von *C. glutamicum*.

Testkomponenten:	Konzentrationen im Test:
HEPES	100 mM, pH 7,0
MgSO ₄	10 mM
MnCl ₂	5 mM
DTT	1 mM
NADH	0,2 mg/ml
NaHCO ₃ (CO ₂ -begast)	50 mM
PEP	8 mM
IDP	2 mM
MDH	24 U

Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefaßt und zeigen, daß *C. glutamicum* eine PEP-Carboxykinase besitzt, die *in vitro* eine Carboxylierung von PEP zu Oxalacetat durchführen kann.

Neben der Reaktion in Richtung Oxalacetat wurde auch die Rückreaktion, d.h. die Umsetzung von Oxalacetat zu PEP in den Stämmen WT, WT-PP und WT-PPW nach Wachstum auf Glucose gemessen. Die spezifische Aktivität war in allen Stämmen mit 1,0 bis 1,6 U/mg Protein 15 bis 20 mal höher als diejenige in Richtung Oxalacetat-Bildung.

Tabelle 9: Spezifische Aktivitäten der PEP-Carboxykinase in der carboxylierenden und der decarboxylierenden Richtung in Rohextrakten von *C. glutamicum* Wildtyp und WT-PP und WT-PPW nach Wachstum auf Glucose-Minimalmedium.

Stamm	spezifische PEP-Carboxykinase Aktivität [U/mg Protein]	
	Reaktionsrichtung:	
	PEP + CO ₂ → Oxalacetat	Oxalacetat → PEP + CO ₂
WT	0,070	1,0
WT-PP	0,085	1,4
WT-PPW	0,080	1,6

Im folgenden wurde die Oxalacetat-bildende Reaktion der PEP-Carboxykinase näher charakterisiert. Dazu wurden die Abhängigkeiten der spezifischen Aktivität von den Substraten PEP, IDP, GDP und NaHCO_3 bestimmt. Die K_m -Werte für die einzelnen Substrate sind in Tabelle 10 A dargestellt. Die Abhängigkeiten der spezifischen PEP-Carboxykinase-Aktivität von den entsprechenden Substraten verhielten sich gemäß einer Michaelis-Menten Kinetik. Wie oben schon erwähnt inhibiert die Zugabe von 1 mM ADP die PEP-Carboxykinase Aktivität um 50 %. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß ATP ebenfalls einen Inhibitor mit einem K_i -Wert von 7,6 mM darstellt (Tabelle 10 A).

Um Hinweise auf eine eventuell vorhandene genetische Regulation der PEP-Carboxykinase zu erhalten, wurde die spezifische Aktivität nach Wachstum auf Glucose, Lactat und Acetat untersucht (Tabelle 10 B). Es zeigte sich, daß die spezifische Aktivität mit 60 bis 90 mU/mg Protein auf den drei getesteten C-Quellen annähernd gleich war. Auch die decarboxylierende Aktivität der PEP-Carboxykinase war auf Glucose, Lactat und Acetat mit 1,0 bis 1,2 mU/mg Protein nicht signifikant unterschiedlich.

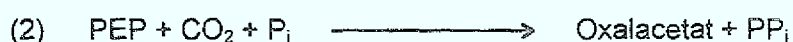
Durch die Hemmung der Oxalacetat-bildenden Reaktion der PEP-Carboxykinase durch ADP und ATP, die zellintern mit Konzentrationen von 2 bis 10 mM vorliegen (Liebl, 1991; Gutmann, 1993), ist es unwahrscheinlich, daß dieses Enzym *in vivo* anaplerotisch aktiv ist.

Tabelle 10: Kinetische Eigenschaften der PEP-Carboxykinase (A) und Abhängigkeit der spezifischen PEP-Carboxykinase-Aktivität in *C. glutamicum* von der C-Quelle (B).

A.		<u>K_m-Werte:</u>
Substrat:	PEP	0,15 mM
	IDP	0,50 mM
	GDP	0,05 mM
	CO_2	30 mM
Inhibitor:	ADP	$K_i = 1,0$ mM
	ATP	$K_i = 7,6$ mM
B.		<u>spezifische Aktivität:</u>
C-Quelle:	Glucose	70 mU/mg Protein
	Lactat	60 mU/mg Protein
	Acetat	86 mU/mg Protein

5.2 Die PEP-Carboxytransphosphorylase

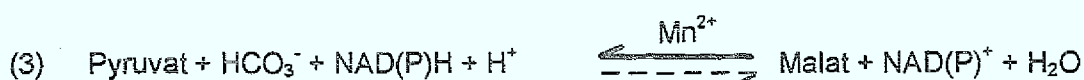
Als weitere zur PEP-Carboxylase alternative anaplerotische Reaktion kam die bisher nur bei Propionsäurebakterien und einer Amöbe nachgewiesene PEP-Carboxytransphosphorylase in Frage (Siu & Wood, 1962; Reeves, 1970). Die von diesem Enzym katalysierte Carboxylierungsreaktion unterscheidet sich von der der PEP-Carboxykinase durch die Übertragung der Phosphatgruppe von PEP auf anorganisches Phosphat unter Bildung von Pyrophosphat (PP_i)(Reaktion 2). Es wurde versucht, diese Aktivität in *C. glutamicum* WT und der definierten PEP-Carboxylase negativen Mutante WT-PP nachzuweisen.



In Rohextrakten vom Wildtyp konnte durch Zugabe von anorganischem Phosphat keine Steigerung der Aktivität über die PEP-Carboxylase-Aktivität hinaus gemessen werden. Auch in Rohextrakten des Stammes WT-PP, der über keine PEP-Carboxylase mehr verfügt, konnte keine Phosphat-abhängige Carboxylierung von PEP zu Oxalacetat nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dieser Befund legte den Schluß nahe, daß *C. glutamicum* nicht über eine PEP-Carboxytransphosphorylase verfügt.

5.3 Das Malat-Enzym

Ein weiteres Enzym, das eine Carboxylierung von Pyruvat unter Bildung von Malat durchführen könnte, ist die NAD(P)⁺-abhängige, decarboxylierende Malat-Dehydrogenase, das sogenannte *Malat-Enzym* (Reaktion 3)(Sundqvist *et al.*, 1989; London & Meyer, 1969).



Es wurde versucht, das *Malat-Enzym* in der Hin- und Rückrichtung, sowohl mit NADP(H) als auch mit NAD(H) als Reduktionsäquivalenten in Rohextrakt von *C. glutamicum* WT nach Wachstum auf Glucose nachzuweisen. Das Ergebnis (Tabelle 11) zeigt, daß mit Malat und NADP⁺ als Substraten eine spezifische Aktivität von 130 mU/mg Protein nachgewiesen werden konnte. Mit NAD⁺ konnte keine Aktivität nachgewiesen werden. Ebenso konnte keine Malat-bildende, d.h. carboxylierende Reaktion nachgewiesen werden. Über eine Kombination aus hydrophober Interaktionschromatographie, Ionenaustauschchromatographie und Affinitätschromatographie wurde das *Malat-Enzym* von *C. glutamicum*, ausgehend von 2,5 g Zellfeuchtmasse mit einer Proteinkonzentration von 12,4 mg/ml aus Rohextrakt 23-fach angereinigt. Die Reinigungsschritte sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 11: Spezifische Aktivitäten des *Malat-Enzyms* in der carboxylierenden und der decarboxylierenden Richtung in Rohextrakten von *C. glutamicum* WT nach Wachstum auf Glucose-Minimalmedium.

Reaktionstyp:		spezifische <i>Malat-Enzym</i> Aktivität [U/mg Protein]	
		Rohextrakt	angereicherte Fraktion
carboxylierend	NADH-abhängig	< 0,003	n.b.
	NADPH-abhängig	< 0,003	< 0,003
decarboxylierend	NAD ⁺ -abhängig	< 0,003	< 0,003
	NADP ⁺ -abhängig	0,13	3,1

n.b. = nicht bestimmt

Die mit *Malat-Enzym*-Aktivität angereicherte Fraktion wurde dann ebenfalls auf *Malat*-decarboxylierende und *Pyruvat*-carboxylierende Reaktionen untersucht (Tabelle 11). Es konnte erneut nur unter Umsatz von NADP⁺ in der decarboxylierenden, d.h. *Pyruvat*-bildenden Richtung eine Aktivität gemessen werden. Das *Malat-Enzym* von *C. glutamicum* ist also strikt NADP⁺-abhängig und katalysiert in dem verwendeten Testsystem keine Carboxylierung von *Pyruvat* zu *Malat*.

Tabelle 12: Isolierung des *Malat-Enzyms* aus Rohextrakt von *C. glutamicum* nach Wachstum auf Glucose (mit freundlicher Genehmigung von B. Riebel).

Reinigungsschritt	Aktivität [U/ml]	Protein [mg/ml]	spez. Aktivität [mU/mg Protein]	Ausbeute %	Reinigungs- Faktor
Rohextrakt	1,7	12,4	137	100	1
Phenylsepharose	0,9	1,5	596	41	4,3
Octylsepharose	0,4	1,1	370	19	2,7
DEAE	0,16	1,1	142	4	1
NADP-Sepharose	0,22	0,07	3143	2	23

Zur näheren Charakterisierung des *Malat-Enzyms* aus *C. glutamicum* wurde die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität im Rohextrakt von der *Malat*-Konzentration untersucht. Der $K_{0,5}$ -Wert für *Malat* betrug 5,7 mM, der Hill-Koeffizient von 1,5 ergab sich aus

der entsprechenden Hill-Auftragung (nicht gezeigt) und V_{\max} lag bei 140 mU/mg Protein. Damit erwies sich Malat als homotroper, allosterischer Effektor der *Malat-Enzym*-Aktivität.

Es wurde untersucht, wie sich die spezifische Aktivität des *Malat-Enzyms* in *C. glutamicum* nach Wachstum auf Acetat-Minimalmedium verhielt. In Rohextrakten vom Wildtyp, gezüchtet auf Acetat konnte, im Gegensatz zu Glucose-gezüchteten Zellen keine *Malat-Enzym* Aktivität nachgewiesen werden (< 3 mU/mg Protein).

Die Befunde zeigen, daß das *Malat-Enzym* von *C. glutamicum* sowohl allosterisch, aufgrund des kooperativen Bindungsverhalten zum Substrat Malat, als auch in Abhängigkeit von der C-Quelle reguliert wird, und daß es kein anaplerotisches Enzym darstellt.

5.4 Die Oxalacetat-Decarboxylase

Die Oxalacetat-Decarboxylase katalysiert die Decarboxylierung von Oxalacetat zu Pyruvat (Reaktion 4).



Für den Nachweis des Enzyms wurden Rohextrakte von *C. glutamicum* Wildtyp und WT-PP nach Wachstum auf Glucose verwendet. Es zeigte sich, daß der Wildtyp eine spezifische Oxalacetat-Decarboxylase Aktivität von 0,4 U/mg Protein und die Mutante WT-PP von 0,33 U/mg Protein in der Pyruvat-bildenden Reaktionsrichtung aufwies. Eine Oxalacetat-bildende und damit anaplerotisch aktive Reaktion, konnte mit dem verwendeten Testsystem nicht nachgewiesen werden.

5.5 Die Pyruvat-Carboxylase

Die Pyruvat-Carboxylase katalysiert die Carboxylierung von Pyruvat zu Oxalacetat unter Verbrauch von ATP (Scrutton & Young, 1972)(Reaktion 5).



Für den Nachweis der Pyruvat-Carboxylase in Rohextrakten von *C. glutamicum* wurden zunächst zwei verschiedene Enzymtests verwendet. Der Malat-Dehydrogenase-gekoppelte Ansatz beruht darauf, daß aus Pyruvat gebildetes Oxalacetat unter Verbrauch von NADH stöchiometrisch zu Malat umgesetzt wird. Mit diesem Test konnte eine Pyruvat-abhängige Aktivität von 50 mU/mg Protein nachgewiesen werden, die jedoch nicht ATP-abhängig war. Wahrscheinlich handelte es sich bei der gemessenen Aktivität um die Rückreaktion der corynebakteriellen Lactat-Dehydrogenase, die Pyruvat unter Verbrauch von NADH zu Lactat umsetzt (Milrad de Forchetti & Cazzulo, 1976). Dieser Test eignete sich daher nicht zur Messung der Pyruvat-Carboxylase-Aktivität in Rohextrakten.

Der Citrat-Synthase gekoppelte Test beruhte auf der Umsetzung des in der Pyruvat-Carboxylase Reaktion gebildeten Oxalacetats zu Citrat. Es zeigte sich, daß eine Pyruvat- und Acetyl-CoA-abhängige Aktivität von ca. 50 mU/mg Protein gemessen wurde, die jedoch nicht ATP-, NaHCO_3 - und Citrat-Synthase-abhängig war. Damit war ausgeschlossen, daß es sich um die Pyruvat-Carboxylase Aktivität handelte. Eine mögliche Erklärung für die Aktivität ist die Umsetzung des Pyruvats zu Diacetyl, bei dem ebenfalls Acetyl-CoA in Coenzym A überführt wird (Gottschalk, 1986). Diese Aktivität wurde bisher für *C. glutamicum* nicht beschrieben. Als Kontrollen wurden gereinigte Pyruvat-Carboxylase aus Rinderleber (Sigma) sowie Rohextrakt von *B. subtilis* DB104 verwendet. In beiden Fällen konnte die Pyruvat-Carboxylase mit spezifischen Aktivitäten von 1100 bzw. 7 mU/mg Protein nachgewiesen werden.

6. Nachweis und Charakterisierung der Pyruvat-Carboxylase in permeabilisierten Zellen von *C. glutamicum*

In Rohextrakten von *C. glutamicum* konnten drei Enzymaktivitäten die Oxalacetat oder Malat zu PEP oder Pyruvat umsetzen nachgewiesen werden, die keine anaplerotische Funktion aufwiesen: PEP-Carboxykinase, *Malat-Enzym* und Oxalacetat-Decarboxylase. Aufgrund der Wachstumsexperimente mit den PEP-Carboxylase-negativen Mutanten sowie aus den ^{13}C -Markierungsexperimenten mußte jedoch eine PEP- oder Pyruvat-carboxylierende Reaktion gefordert werden. Unter der Annahme, daß die Pyruvat-Carboxylase-Aktivität in Rohextrakten instabil ist, wurde versucht, die Pyruvat-Carboxylase in permeabilisierten Zellen von *C. glutamicum* nachzuweisen und anschließend zu charakterisieren.

6.1 Entwicklung und Optimierung eines diskontinuierlichen Testsystems

Zur Bestimmung der Pyruvat-Carboxylase-Aktivität in permeabilisierten Zellen mußten zwei Voraussetzungen erfüllt werden. 1. Der Test mußte diskontinuierlich ablaufen, da die verwendeten Zellsuspensionen eine starke Trübung des Ansatzes verursachten und damit eine kontinuierliche photometrische Messung nicht möglich war. 2. Oxalacetat mußte als instabiles Produkt der Pyruvat-Carboxylase-Reaktion sofort zu einem stabilen und leicht nachzuweisenden Metaboliten umgesetzt werden. Fisher & Magasanik (1984) haben für die Pyruvat-Carboxylase aus *B. subtilis* einen Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) gekoppelten Test beschrieben, der darauf beruhte, daß das gebildete Oxalacetat mit Glutamat als Aminogruppen-Donor zu Aspartat transaminiert wurde.

Aspartat ist hitzestabil und über HPLC empfindlich nachzuweisen (Abbildung 13). Es konnte gezeigt werden, daß mit dem Test quantitativ und linear bis 200 μM Oxalacetat zu Aspartat umgesetzt werden kann (s. Material und Methoden). Mit diesem Testsystem konnten tatsächlich spezifische Pyruvat-Carboxylase-Aktivitäten von 15 bis 50 mU/mg Trockengewicht (TG) in Cetyltrimethyl-Ammoniumbromid- (CTAB-) behandelten Zellen von *C. glutamicum* gemessen werden. Der Test wurde im folgenden optimiert und die Pyruvat-Carboxylase-Aktivität charakterisiert.

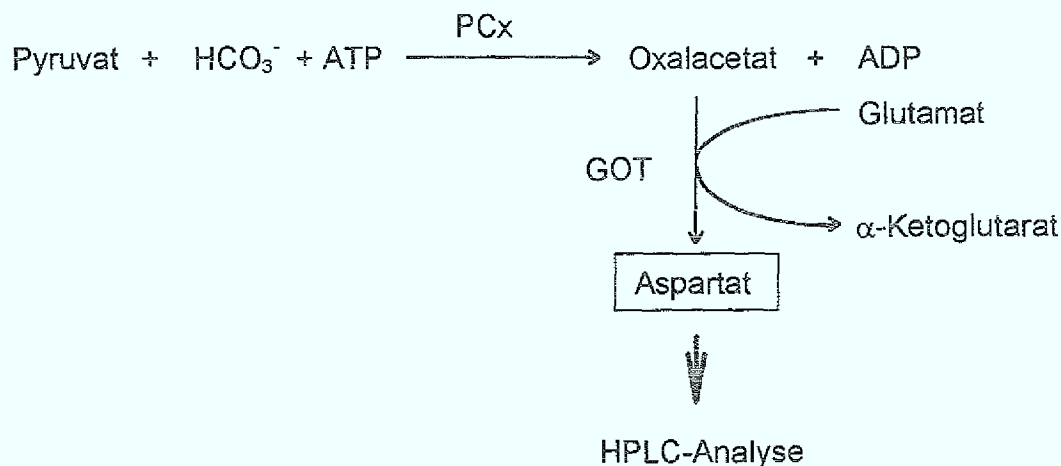


Abbildung 13: Prinzip des Tests zum Nachweis von Pyruvat-Carboxylase- (PCx-) Aktivität in permeabilisierten Zellen von *C. glutamicum* mit der Kopplung an die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase- (GOT-) Reaktion.

Abhängigkeit der Pyruvat-carboxylierenden Reaktion von der Cetyltrimethyl-Ammoniumbromid-Konzentration. Da für Pyruvat-Carboxylasen aus anderen Organismen die höchste spezifische Aktivität bei Wachstum auf Lactat oder Pyruvat beschrieben war (Scrutton & Taylor, 1974; Payne & Morris, 1969; Young *et al.*, 1969), wurden für die Untersuchungen zunächst *C. glutamicum* Zellen nach Wachstum auf Lactat-Minimalmedium verwendet. Zur Permeabilisierung der *C. glutamicum* Zellen wurde das kationische Detergenz Cetyltrimethyl-Ammoniumbromid (CTAB) verwendet, das sich in die Lipiddoppelschicht der Cytoplasma-Membran von Gram-positiven Bakterien einlagert (Petrocci, 1983). Durch die Zugabe von CTAB zu Zellsuspensionen werden die Zellmembranen daher perforiert (Wölfel *et al.*, 1985) und damit permeabel für alle niedermolekularen Metabolite. Hochmolekulare Zellbestandteile, wie z.B. Proteine, können die Membranbarriere nicht passieren. Permeabilisierte Zellen werden häufig für *in situ*-Enzymaktivitätsbestimmungen verwendet (Wixom *et al.*, 1971; Bañuelos & Gancedo, 1978). Zur Ermittlung der CTAB-Konzentration, bei der die Pyruvat-Carboxylase optimal aktiv ist, wurden Zellsuspensionen von *C. glutamicum* ($\text{OD}_{600} = 150$) mit 0,2 % bis 0,8 %

CTAB permeabilisiert und sofort für die Aktivitätsbestimmung der Pyruvat-Carboxylase im diskontinuierlichen Test eingesetzt. Als Kontrolle wurden Zellen ohne CTAB in den Test eingesetzt. Das Ergebnis ist in **Abbildung 14** dargestellt. Die spezifische Aktivität ergab in Abhängigkeit von der CTAB-Konzentration eine Optimumskurve, deren Maximum bei 0,3 % CTAB lag. Unterhalb von 0,1 % und oberhalb von 0,6 % CTAB konnte nahezu keine Aktivität beobachtet werden. Daher wurden für alle folgenden Messungen Zellsuspensionen von *C. glutamicum* mit einer optischen Dichte von 150 durch 0,3 % CTAB permeabilisiert.

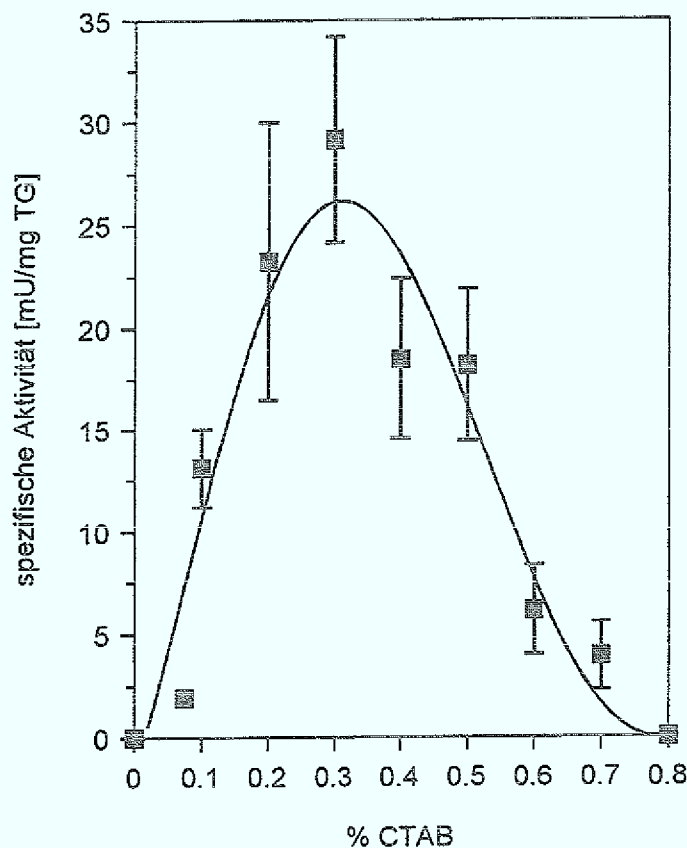


Abbildung 14: Abhängigkeit der Pyruvat-Carboxylase-Aktivität in permeabilisierten Zellen von *C. glutamicum* von der CTAB-Konzentration.

Um zu untersuchen, ob die gewählte CTAB-Konzentration zur Lyse der Zellen führt, wurden Zellen mit 0,2 %, 0,4 %, 0,6 %, 0,8 % bzw. ohne CTAB inkubiert und unter dem Mikroskop bei 1000-facher Vergrößerung analysiert. Wie **Abbildung 15** zeigt, treten bei CTAB-Konzentrationen von 0,2 bis 0,4 %, also in dem Bereich, der für die Permeabilisierung der *C. glutamicum*-Zellen verwendet wurde, keine erkennbaren morphologischen Veränderungen auf.

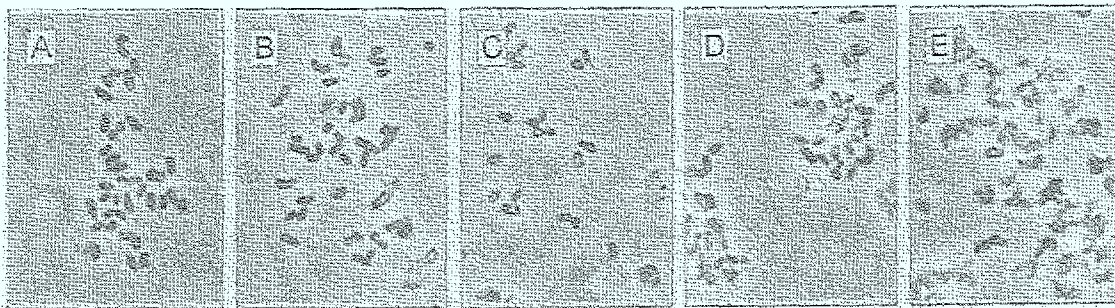


Abbildung 15: Mikroskopische Analyse von *C. glutamicum*-Zellen nach CTAB-Behandlung. (A) Kontrolle ohne CTAB; (B) 0,2 % CTAB; (C) 0,4 % CTAB; (D) 0,6 % CTAB; (E) 0,8 % CTAB (1000-fache Vergrößerung im Phasenkontrast-Mikroskop).

Abhängigkeit der Pyruvat-Carboxylase-Aktivität von der Zellmenge, der Reaktionszeit sowie von Puffer und pH-Wert. Die Abhängigkeit der Pyruvat-Carboxylase-Aktivität von der eingesetzten Zellmenge zwischen 0 und 2 mg Trockengewicht pro Testansatz wurde untersucht (Abbildung 16). Es konnte eine eindeutige lineare Abhängigkeit des gebildeten Aspartats pro min von der Trockenmasse (TG) gezeigt werden. Die folgenden Tests wurden mit einer Zellmenge von jeweils 1 bis 1,2 mg Trockengewicht durchgeführt.

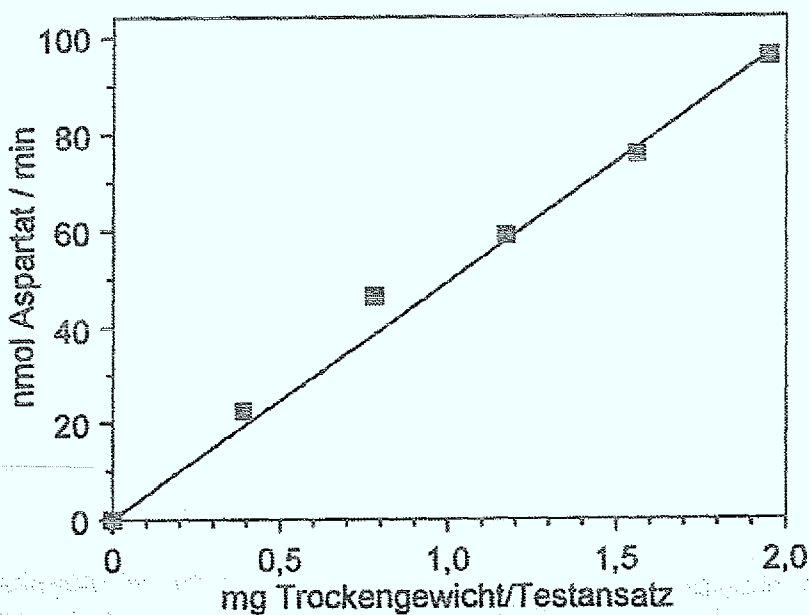


Abbildung 16: Abhängigkeit der Aspartat-Bildung des Pyruvat-Carboxylase-Tests von der eingesetzten Menge permeabilisierter Zellen.

Darüberhinaus wurde die zeitliche Stabilität der Aktivität untersucht. In einem Bereich von 1 bis 4 min war die spezifische Aktivität konstant bei 100 %. Nach 10 min konnte nur noch 70 % Aktivität und nach 20 min 40 % Aktivität erhalten werden. Das zeigt, daß die Pyruvat-Carboxylase schon in permeabilisierten Zellen relativ schnell inaktiviert wurde, sobald es zu einer Verdünnung kommt. Der Aktivitätsverlust kann allerdings auch durch eine Produktinhibition verursacht werden. Aus diesem Grund wurden bei den weiteren Untersuchungen Reaktionszeiten von 1 und 2 min gewählt.

Zur Ermittlung des optimalen Puffers und pH-Wertes wurden neben 100 mM Tris/HCl die Puffer MES/NaOH, MOPS/NaOH, HEPES/NaOH (je 100 mM) verwendet. Die pH-Werte wurde der jeweiligen Pufferkapazitäten entsprechend eingestellt, sodaß der pH-Bereich insgesamt zwischen pH 5,0 und pH 9,0 lag. Wie in **Abbildung 17** dargestellt, lag der optimale pH-Bereich der Reaktion zwischen pH 7,0 und pH 7,5 unabhängig vom gewählten Puffer. Daher wurde für alle folgenden Messungen 100 mM Tris/HCl pH 7,3 verwendet.

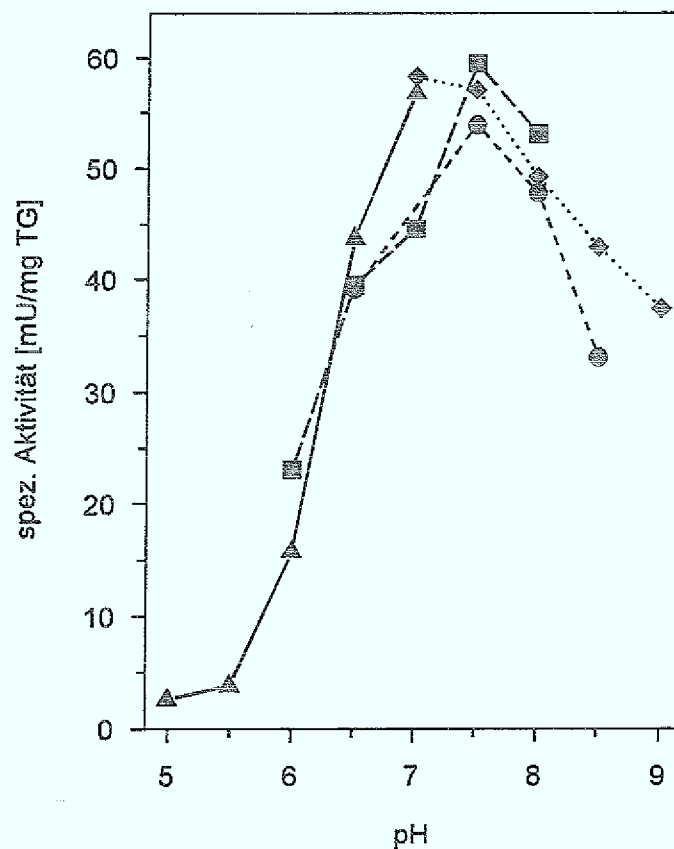


Abbildung 17: Abhängigkeit der Pyruvat-Carboxylase-Aktivität in permeabilisierten Zellen von *C. glutamicum* vom pH-Wert. Es wurden folgende Puffer verwendet: (▲) MES; (■) MOPS; (●) HEPES; (◆) Tris/HCl.

Optimierter Pyruvat-Carboxylase Test in Abhängigkeit von den Testkomponenten. Der Pyruvat-Carboxylase-Test wurde unter Auslassung einzelner Testkomponenten durchgeführt. Tabelle 15 zeigt, daß für die Enzymaktivität ATP, Pyruvat und Mg^{2+} strikt benötigt wurde. Die Restaktivitäten, die ohne HCO_3^- , ohne Glutamat-Oxalacetat-Transaminase bzw. ohne Glutamat gemessen werden konnten, sind wahrscheinlich auf endogene Mengen an HCO_3^- in den Lösungen bzw. auf die Aktivität der *C. glutamicum* eigenen Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (Jetten *et al.*, 1994b) und auf zellinternes Glutamat (ca. 400 μM nachweisbar über HPLC) zurückzuführen.

Mit allen in diesem Kapitel beschriebenen Experimenten wurde ein Pyruvat-Carboxylase Testsystem für permeabilisierte Zellen von *C. glutamicum* etabliert und optimiert. In Tabelle 15 sind die optimierten Testbedingungen zusammengefaßt.

Tabelle 15: Abhängigkeiten der Pyruvat-Carboxylase in permeabilisierten Zellen von *C. glutamicum* von den Testkomponenten und optimierte Zusammensetzung des Testansatzes

Testansatz	Konzentrationen im Test	Aktivität %	spezifische Aktivität [nmol Asp/min mg TG]
komplett: Tris/HCl, pH 7,3	100 mM		
MgCl ₂	10,0 mM		
Pyridoxalphosphat	0,2 mM		
Glutamat	2,0 mM		
Pyruvat	10,0 mM		
ATP	4,0 mM		
NaHCO ₃	25,0 mM		
GOT (aus Schweineherz)	5 U/ml	100	45,0
ohne ATP		< 1	< 0,4
ohne Pyruvat		< 1	< 0,4
ohne Mg^{2+}		< 1	< 0,4
ohne HCO_3^-		17	7,7
ohne GOT		20	9,0
ohne Glutamat		5	2,3

Es wurde auch versucht, die Pyruvat-Carboxylase Aktivität mit dem für permeabilisierte Zellen optimierten Enzymtest in Rohextrakten von *C. glutamicum* nachzuweisen. Hierzu wurden die Zellen nach Wachstum auf Lactat aufgeschlossen und die erhaltenen Rohextrakte in den oben beschriebenen Test eingesetzt. Es zeigte sich, daß die gemessene

Pyruvat-Carboxylase-Aktivität von ca. 40 mU/mg Protein nur über einen Zeitraum von 30 sec stabil war. Nach 2 min Reaktionszeit konnte nur noch 10 % der Ausgangsaktivität gemessen werden. Da in den photometrischen Tests zur Bestimmung der Pyruvat-Carboxylase-Aktivität (s. Kapitel 5.4) die Blindaktivität ohne Substrat über einen Zeitraum von 1 min verfolgt wurde, war bei der eigentlichen Messung die Aktivität schon nicht mehr zu bestimmen. Vermutlich geht dieser Aktivitätsverlust auf eine große Instabilität des Proteins im Rohextrakt zurück.

6.2 ^{13}C -Markierungsexperimente zur Charakterisierung der Pyruvat-carboxylierenden Reaktion in *C. glutamicum*

Mit ^{13}C -Markierungsexperimenten und anschließender NMR-Analyse wurde untersucht, ob das in dem Pyruvat-Carboxylase-Test gebildete Aspartat über eine direkte Carboxylierung der C_3 -Position des Pyruvats entsteht. Wenn die Reaktion wie in **Abbildung 18** dargestellt verläuft, d.h. wenn zunächst Pyruvat unter Bildung von Oxalacetat carboxyliert und anschließend das Oxalacetat über die Reaktion der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase zu Aspartat umgesetzt wird, leiten sich die Kohlenstoff-Atome C-1 bis C-3 des Aspartats direkt aus den C-Atomen des Pyruvats ab. Das C-4-Atom des Aspartats spiegelt dagegen das eingebaute Bicarbonat wider.

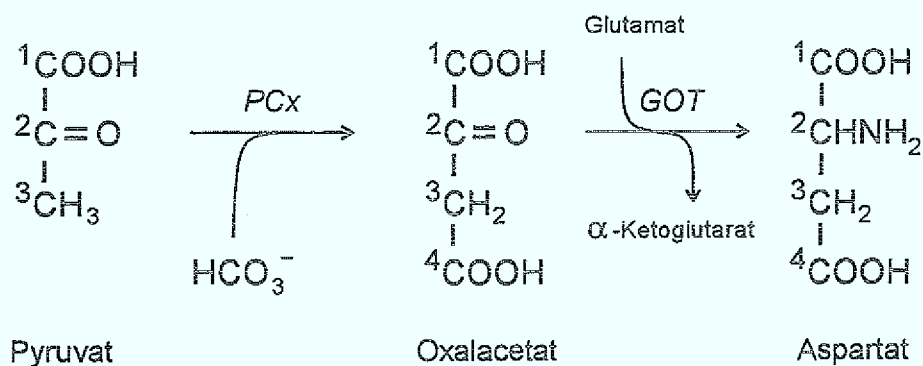


Abbildung 18: Umsetzung von Pyruvat und HCO_3^- durch die Pyruvat-Carboxylase (PCx) zu Oxalacetat und anschließende Transaminierung des Oxalacetat zu Aspartat durch die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT). Die Wege der Kohlenstoff-Atome sind durch entsprechende Markierungen dargestellt.

Es wurden Pyruvat-Carboxylase-Tests mit permeabilisierten Zellen von *C. glutamicum* und verschiedenen markierten Substraten, $[2-^{13}\text{C}]$ Pyruvat, $[3-^{13}\text{C}]$ Pyruvat bzw. $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$, durchgeführt. Das gebildete Aspartat wurde aus den Testansätzen isoliert und das

Markierungsmuster der C-Atome über $^1\text{H-NMR}$ -Analyse bestimmt. Das Ergebnis ist in Tabelle 16 zusammengefaßt. Unter Verwendung von $[2-^{13}\text{C}]$ Pyruvat als Substrat konnte ausschließlich eine ^{13}C -Anreicherung im C-2 des Aspartats gemessen werden. Entsprechend wurde mit $[3-^{13}\text{C}]$ Pyruvat nur eine Anreicherung in C-3, und mit $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$ nur eine quantitative Anreicherung in C-4 des Aspartats ermittelt. Damit ist der ATP- und Mg^{2+} -abhängige Carboxylgruppen-Transfer auf die Methylgruppe des Pyruvat eindeutig als Pyruvat-Carboxylase-Reaktion des Typs EC 6.4.1.1 (Pyruvat:Kohlendioxyd Ligase (ADP-bildend)) nachgewiesen.

Tabelle 16: Anreicherung an ^{13}C in den Kohlenstoff-Atomen C-2, C-3 und C-4 von Aspartat, das durch Umsetzung von verschiedenen markierten Substraten, $[2-^{13}\text{C}]$ Pyruvat, $[3-^{13}\text{C}]$ Pyruvat bzw. $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$, im Pyruvat-Carboxylase-Test mit permeabilisierten Zellen von *C. glutamicum* gewonnen wurde.

Testansatz mit		^{13}C -Anreicherung (%) in den Aspartat-Kohlenstoffatomen ^a		
		C-2	C-3	C-4
HCO_3^- (unmarkiert)	$[2-^{13}\text{C}]$ Pyruvat (70 %)	70	1,1	1,1
HCO_3^- (unmarkiert)	$[3-^{13}\text{C}]$ Pyruvat (70 %)	1,1	68	1,1
$\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$ (99,9 %)	Pyruvat (unmarkiert)	1,1	1,1	98

^a Fehler ± 1 %

6.3 Einfluß der Kohlenstoff-Quelle auf die spezifische Pyruvat-Carboxylase-Aktivität

Die bisherigen Untersuchungen wurden mit *C. glutamicum*-Zellen durchgeführt, die auf Minimalmedium mit Lactat gezüchtet waren. Im folgenden wurde die Pyruvat-Carboxylase-Aktivität vergleichend nach Wachstum auf Glucose, Lactat und Acetat bestimmt (Tabelle 17). Es zeigte sich, daß die Pyruvat-Carboxylase-Aktivität in Zellen, die mit Lactat als C-Quelle gezüchtet wurden mit 45 mU/mg Tg am höchsten war. Bei Wachstum auf Glucose und Acetat war die spezifische Aktivität ca. 70 % bzw. 50 % niedriger.

Neben dem Wildtyp von *C. glutamicum* wurde auch die PEP-Carboxylase-negative Mutante WT-PP auf ihre Pyruvat-Carboxylase Aktivität in permeabilisierten Zellen untersucht. Es zeigte sich, daß die spezifische Pyruvat-Carboxylase-Aktivität der Mutante nach Wachstum auf Lactat und nach Wachstum auf Glucose ungefähr gleich hoch war wie die des Wildtyps auf den entsprechenden Medien (Tabelle 17).

Tabelle 17: Spezifische Aktivität der Pyruvat-Carboxylase in permeabilisierten Zellen von *C. glutamicum* Wildtyp und der PEP-Carboxylase-negativen Mutante WT-PP nach Wachstum in Minimalmedium mit Glucose, Lactat und Acetat.

C-Quelle	spezifische Aktivität* [mU/mg TG]	
	Wildtyp	WT-PP
2 % (v/v) Lactat	46 ± 10	41 ± 9
4 % (w/v) Glucose	16 ± 4	13 ± 5
2 % (w/v) Acetat	23 ± 4	n.b.

* Werte aus mindestens zwei unabhängigen Messungen; n.b. = nicht bestimmt

6.4 Kinetische Untersuchungen zur Pyruvat-Carboxylase

Zur Charakterisierung der Pyruvat-Carboxylase-Aktivität in permeabilisierten Zellen von *C. glutamicum* wurden Lactat-gezüchtete Zellen verwendet, da hier die spezifische Aktivität am höchsten war. Zur Bestimmung der Affinität der Pyruvat-Carboxylase-Aktivität bezüglich des Substrates Pyruvat wurde eine Kinetik mit Pyruvat-Konzentrationen von 0 bis 20 mM erstellt. Die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität vom Substrat Pyruvat entsprach einer Michaelis-Menten-Kinetik (Abbildung 19 A). Der aus der Lineweaver-Burk Auftragung (Abbildung 19 B) ermittelte K_m -Wert betrug 1,3 mM und V_{max} betrug 55 mU/mg TG. Bei der Bestimmung der kinetischen Parameter der Pyruvat-Carboxylase-Aktivität für das Substrat ATP konnte ein K_m -Wert von 0,2 mM und ein V_{max} -Wert von 50 mU/mg TG ermittelt werden.

6.5 Untersuchungen zur Regulation der Pyruvat-Carboxylase

Die meisten Pyruvat-Carboxylasen werden durch Aspartat inhibiert und durch Acetyl-CoA aktiviert (Attwood, 1995; Cazzulo & Stoppani, 1968). Weiterhin kann die Energieladung, in Form einer Inaktivierung durch ADP und AMP einen Einfluß auf die Aktivität ausüben (Miller & Atkinson, 1972). Auch α -Ketoglutarat (Modak & Kelly, 1995) wurde als Inhibitor der Pyruvat-Carboxylase beschrieben. Im folgenden wurden diese Effektoren bezüglich ihres Einflusses auf die Pyruvat-Carboxylase-Aktivität in permeabilisierten Zellen von *C. glutamicum* untersucht.

Da Aspartat das Endprodukt des verwendeten Pyruvat-Carboxylase-Tests darstellte, konnte es nur bis 300 μ M in die Hemmstudien eingesetzt werden, da darüberhinaus keine Unterscheidung zwischen eingesetzter Aspartat-Menge und der im Pyruvat-Carb-

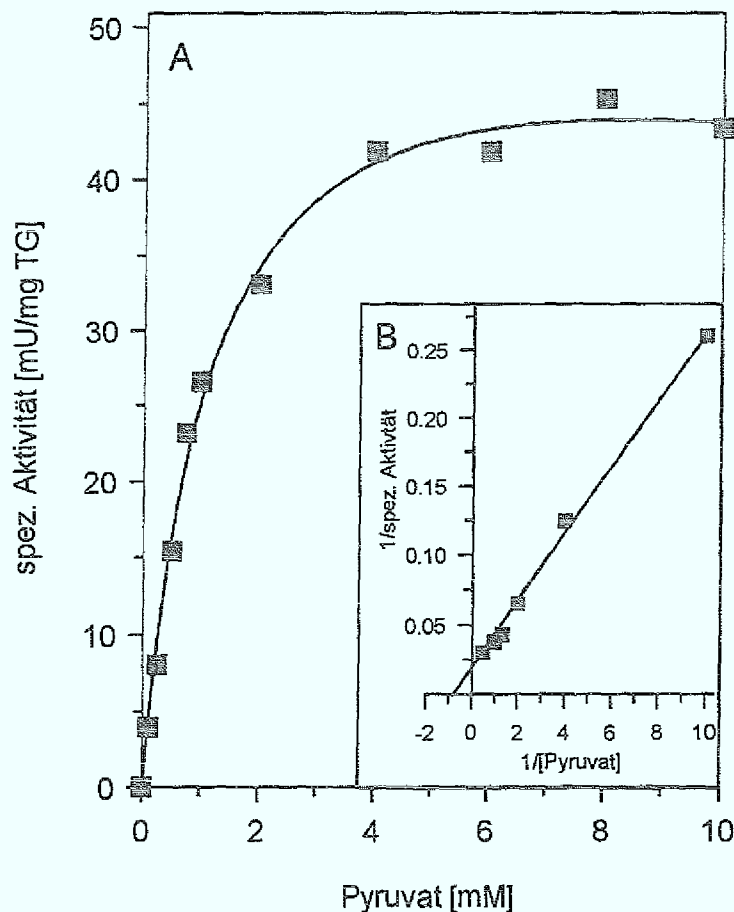


Abbildung 19: Abhängigkeit der Pyruvat-Carboxylase vom Substrat Pyruvat. (A) Michaelis-Menten-Darstellung. (B) Lineweaver-Burk-Darstellung.

oxylase gebildeten Aspartat-Menge möglich war. Bis zu einer Konzentration von 300 μM konnte jedoch kein Einfluß durch Aspartat auf die spezifische Aktivität gemessen werden (Tabelle 18). Auch α -Ketoglutarat ist ein Bestandteil des Testsystems, da es das zweite Produkt der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase-Hilfsreaktion ist. Die Zugabe von 10 mM α -Ketoglutarat zu einem Testansatz, bei dem die Reaktion durch Oxalacetat gestartet wurde, hatte zur Folge, daß keine Glutamat-Oxalacetat-Transaminase-Aktivität in Richtung Aspartat-Bildung nachzuweisen war. Die Zugabe von 1 mM α -Ketoglutarat reduzierte die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase-Aktivität um 50 %. Dadurch eignete sich auch dieser potentielle Inhibitor nicht für Effektorstudien in dem verwendeten Testsystem. Dagegen konnten AMP, ADP und ITP als Inhibitoren der Pyruvat-Carboxylase identifiziert werden. Die aus den entsprechenden Auftragungen nach Dixon (1/spezifische Aktivität gegen Inhibitor-Konzentration; Abbildung 20) ermittelten K_i -Werte sind in Tabelle 18 zusammengefaßt. Während ITP einen relativ unphysiologischen K_i -Wert von 15 mM aufwies, lagen die K_i -Werte von ADP mit 2,6 mM und AMP mit 0,76 mM bei physiologisch relevanten Konzentrationen.

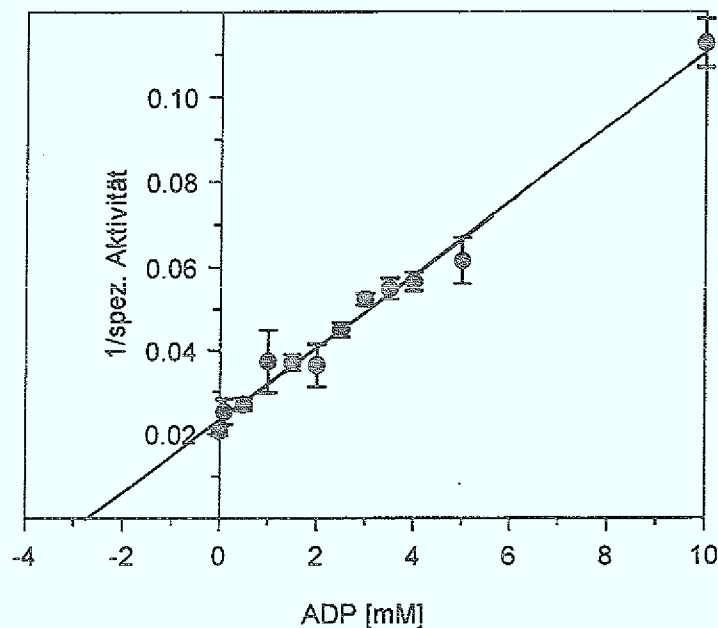


Abbildung 20: Bestimmung des K_i -Werts der Pyruvat-Carboxylase für den Effektor ADP aus einer Auftragung nach Dixon. Der K_i -Wert wird durch den Schnittpunkt mit der X-Achse bestimmt.

Da Acetyl-CoA bei vielen Pyruvat-Carboxylasen als Aktivator fungiert, wurde der Einfluß verschiedener Konzentrationen dieses Metaboliten ebenfalls getestet. Es zeigte sich, daß die Zugabe von 0,5 mM Acetyl-CoA eine 80 %ige Hemmung der Pyruvat-Carboxylase hervorruft. Der K_i -Wert betrug 110 μ M (Tabelle 18). Dieser Befund zeigt, daß Acetyl-CoA ein Inhibitor der Pyruvat-Carboxylase ist und liefert eine mögliche Erklärung dafür, warum die Aktivität in Rohextrakten mit dem Citrat-Synthase gekoppelten Test, in den Acetyl-CoA-Konzentrationen von 100 bis 200 μ M eingesetzt wurden, nicht gemessen werden konnte.

Tabelle 18: Einfluß verschiedener Metabolite auf die spezifische Pyruvat-Carboxylase-Aktivität in permeabilisierten Zellen von *C. glutamicum*

Metabolit	Einfluß	K_i -Werte
Aspartat	< 300 μ M ohne Einfluß	
	> 300 μ M nicht bestimmbar	
α -Ketoglutarat	nicht bestimmbar	
AMP	Hemmung	0,76 mM
ADP	Hemmung	2,6 mM
ITP	Hemmung	15,0 mM
Acetyl-CoA	Hemmung	0,11 mM

7. Einfluß von Biotin auf das Wachstum und die Aminosäure-Produktion von *C. glutamicum*

Alle bisher beschriebenen Pyruvat-Carboxylasen sind biotinabhängige Proteine, d.h. sie verfügen über ein kovalent gebundenes Biotin-Molekül, das als Coenzym für die Aktivierung des Hydrogencarbonat-Ions mittels ATP verantwortlich ist. Der klassische Nachweis von Biotin-Enzymen erfolgt über die Bindung von Avidin, einem Protein, das eine hohe Affinität zu Biotin hat. Diese Bindung führt in der Regel zu einer Inaktivierung des Enzyms (Moss & Lane, 1971). Da Avidin die Membranbarriere permeabilisierter Zellen nicht passieren kann, konnte im Enzymtest nicht getestet werden, ob die Pyruvat-Carboxylase-Aktivität von *C. glutamicum* ebenfalls durch Avidin inhibiert wird, und damit biotinabhängig ist. Im folgenden wurden Wachstumsexperimente unter Biotin-Limitierung mit dem Wildtyp und der PEP-Carboxylase-negativen Mutante WT-PP durchgeführt, um zu untersuchen, ob der Verlust der PEP-Carboxylase zu einer veränderten Biotin-Bedürftigkeit führt. Darüberhinaus wurde getestet, welchen Einfluß die Biotin-Konzentration im Medium auf die Produktion der Aminosäuren Lysin, Tyrosin und Glutamat in *C. glutamicum* hat.

7.1 Vergleichende Wachstumsexperimente mit dem Wildtyp und der PEP-Carboxylase-negativen Mutante von *C. glutamicum* unter Biotin-Limitierung

C. glutamicum ist Biotin-auxotroph, d.h. das Nährmedium muß mit Biotin supplementiert werden. Wenn die PEP-Carboxylase-negative Mutante WT-PP auf eine biotinabhängige Pyruvat-Carboxylase als anaplerotisches Enzym angewiesen ist, sollte sich unter Biotin-limitierung ein Unterschied in ihrem Wachstumsverhalten im Vergleich zum Wildtyp zeigen. Um das zu untersuchen, wurden die *C. glutamicum* Stämme WT und WT-PP in Minimalmedium mit Glucose (4 %; w/v), Lactat (2 %; v/v) bzw. Acetat (2 %; w/v) und verschiedenen Biotin-Konzentrationen von 0 bis 100 µg/l gezüchtet und das Wachstum wurde anhand der optischen Dichte verfolgt (Abbildung 21 A bis F). Bei Wachstum auf Glucose zeigte sich, daß die Mutante WT-PP durch Biotin-Mangel wesentlich stärker wachstumslimitiert war als der Wildtyp (Abbildung 21 A, B). Während der Wildtyp ohne Biotin noch ungefähr bis zur Hälfte der unter Biotin-Überschuß erreichten optischen Dichte wuchs, zeigte die Mutante WT-PP ohne Biotin überhaupt kein Wachstum mehr. Das Wachstum der PEP-Carboxylase-negativen Mutante korrelierte jedoch direkt mit der zugegebenen Biotin-Konzentration, d.h. je mehr Biotin im Medium war umso besser wuchs der Stamm. Mit der höchsten Biotin-Konzentration wuchsen Wildtyp und Mutante nahezu gleich. Bei Wachstum auf Lactat war der Wildtyp stärker biotinbedürftig als bei Wachstum auf Glucose. Das zeigte sich darin, daß der Wildtyp mit 5 bis 10 µg Biotin/l

nur ca. zweidrittel der maximalen optischen Dichte erreichte, während bei Wachstum auf Glucose unter diesen Bedingungen keine signifikante Wachstumseinschränkung beobachtet wurde. Die Mutante zeigte eine ähnliche Biotin-Bedürftigkeit wie bei Wachstum auf Glucose, d.h. auch hier ist das Wachstum direkt abhängig von der Biotin-Konzentration (Abbildung 21 C, D). Wurden die Stämme auf Acetat gezüchtet zeigten Wildtyp und Mutante gleiche, sehr geringe Biotin-Bedürftigkeit (Abbildung 21 E, F).

Der Befund, daß der Verlust der PEP-Carboxylase im Stamm WT-PP zu einer erhöhten Biotin-Bedürftigkeit bei Wachstum auf Glucose führte, legte den Schluß nahe, daß die Pyruvat-Carboxylase, die hier wahrscheinlich die anaplerotische Funktion übernimmt, tatsächlich ein biotinabhängiges Enzym ist. Darüberhinaus deutete das Wachstumsverhalten des Wildtyps auf Lactat unter Biotin-Limitierung darauf hin, daß die Pyruvat-Carboxylase auf Lactat stärker benötigt wird als auf Glucose. Bei Wachstum auf Acetat scheinen jedoch weder die PEP-Carboxylase noch die Pyruvat-Carboxylase als anaplerotische Sequenz notwendig zu sein. Dieses Ergebnis paßt zu dem Befund von Reinscheid *et al.* (1994b/c), die zeigen konnten, daß bei Wachstum auf Acetat der Glyoxylat-Zyklus für die Oxalacetat-Synthese in *C. glutamicum* essentiell ist.

Um die Bedeutung der Pyruvat-Carboxylase bei Wachstum auf Lactat weiter zu untersuchen, wurden der Wildtyp und die PEP-Carboxylase negative Mutante WT-PP in Minimalmedium mit 2 % Lactat und Biotin-Überschuß (200 µg Biotin/l), sowie Biotin-Mangel (2 µg Biotin/l) mit und ohne Fumarat-Supplementation (35 mM) gezüchtet (Abbildung 22 A, B). Durch die Zugabe von Fumarat als Intermediat des Tricarbonsäure-Zyklus sollte das Fehlen der anaplerotischen Reaktion aufgehoben werden. Als Kontrolle wurden die Stämme auf Fumarat in Abwesenheit von Lactat unter Biotin-Überschuß gezüchtet. Es zeigte sich, daß die Stämme auf Fumarat als einziger C-Quelle nicht wuchsen. Auf Lactat unter Biotin-Überschuß wuchsen Wildtyp und Mutante gleich gut mit Wachstumsraten von ca. $0,19 \text{ h}^{-1}$, ohne Biotin jedoch deutlich schlechter. Hier erreichten beide Stämme nur ca. die Hälfte der maximalen optischen Dichte und das Wachstum war mit Wachstumsraten von $0,12 \text{ h}^{-1}$ deutlich verlangsamt gegenüber Biotin-Überschuß. Wurde das biotinlimitierte Medium durch Fumarat supplementiert, wuchsen Wildtyp und Mutante wieder mit gleicher Wachstumsrate und zu gleichen optischen Dichten in der stationären Phase wie unter Biotin-Überschuß. Das Ergebnis bestärkt die Vermutung, daß die biotinabhängige Wachstumslimitierung auf Lactat auf den Verlust der anaplerotischen Reaktion zurückzuführen ist, und daß die biotinabhängige Pyruvat-Carboxylase in *C. glutamicum* für die Auffüllung des Tricarbonsäure-Zyklus bei Wachstum auf Lactat eine entscheidende Rolle spielt.

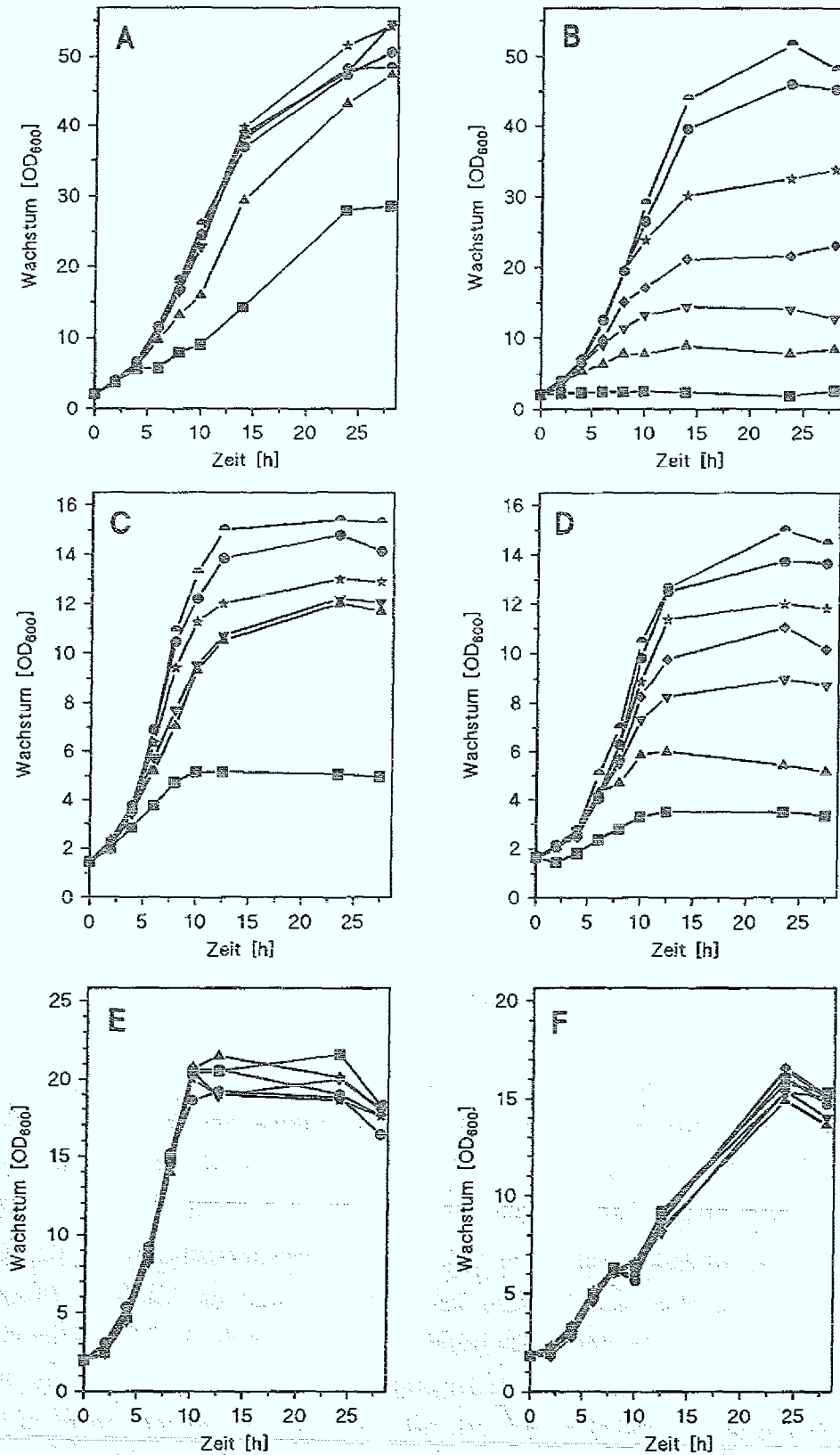


Abbildung 21: Wachstum des *C. glutamicum* Wildtyps auf Minimalmedium mit Glucose (A), Lactat (C) oder Acetat (E) im Vergleich zum Wachstum der PEP-Carboxylase-negativen Mutante WT-PP auf Minimalmedium mit Glucose (B), Lactat (D) oder Acetat (F) unter verschiedenen Biotin-Konzentrationen: 100 µg Biotin/l (●); 50 µg Biotin/l (⊙); 25 µg Biotin/l (☆); 15 µg Biotin/l (◆); 10 µg Biotin/l (▽); 5 µg Biotin/l (▲) und ohne Biotin (■).

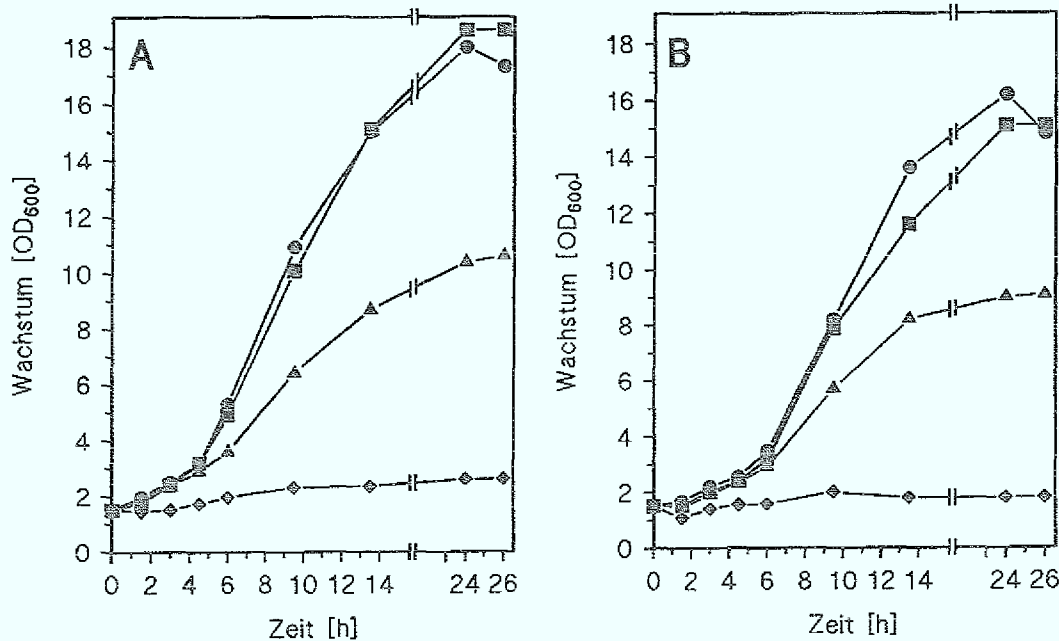


Abbildung 22: Wachstum des *C. glutamicum* Wildtyps (A) und der PEP-Carboxylase-negativen Mutante WT-PP (B) auf Lactat unter Biotinlimitierung mit 35 mM Fumarat (●), unter Biotinlimitierung ohne Fumarat (▲), unter Biotinüberschuß (■) und auf Fumarat als alleiniger C-Quelle (◆).

7.2 Vergleichende Untersuchungen zur Produktion von Glutamat, Lysin und Tyrosin unter Biotin-Limitierung

Glutamat-Produktion unter Biotinlimitierung. Da die PEP-Carboxylase-negative Mutante WT-PP bei Wachstum auf Glucose wesentlich stärker biotinbedürftig war als der Wildtyp, wurde untersucht, ob es Unterschiede in der Glutamat-Sekretion der beiden Stämme gibt. Dafür wurden sie auf Minimalmedium mit 4 % Glucose, 2 % Lactat oder 2 % Acetat unter Biotin-Mangel (ohne Biotin) und Biotin-Überschuß (100 µg Biotin/l) gezüchtet. Bei Wachstum auf Glucose bzw. Lactat wurde die Glutamat-Produktion zusätzlich mit 10 µg Biotin/l getestet. Da weder der Wildtyp noch die Mutante bei Wachstum auf Acetat unter den gewählten Bedingungen wachstumslimitiert waren (s. Kapitel 7.1), wurden die entsprechenden Kulturen mit 0 und 100 µg Biotin/l nochmal in das gleiche Medium mit 2 % Acetat und 0 bzw. 100 µg Biotin/l überimpft, sodaß sie schließlich auch mit der für die Glutamat-Produktion notwendigen Limitation wuchsen. Nach 30 bis 40 Stunden Wachstum wurde in allen Kulturen die Glutamat-Menge im Medium bestimmt. Das Ergebnis ist in Tabelle 19 zusammengefaßt.

Tabelle 19: Glutamat-Produktion der Stämme WT und WT-PP nach Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen und verschiedenen Biotin-Konzentrationen

C-Quelle	Stamm	Biotin [$\mu\text{g/l}$]	optische Dichte [OD_{600}]	Glutamat _{extern} [mM]
Glucose	WT	0	27,5	45,5
		10	54,3	0,8
		100	48,6	0,1
	WT-PP	0	2,8	0,1
		10	12,5	0,2
		100	54,9	0,1
Acetat	WT	0	6,5	19,3
		100	17,7	< 0,1
	WT-PP	0	9,3	24,5
		100	16,3	0,3
Lactat	WT	0	5,0	< 0,1
		10	12,5	< 0,1
		100	15,3	< 0,1
	WT-PP	0	3,4	< 0,1
		10	8,7	< 0,1
		100	14,5	< 0,1

Es zeigte sich, daß die Mutante WT-PP bei Wachstum auf Glucose unabhängig von der Biotin-Konzentration kein Glutamat sezernierte, während der Wildtyp unter Biotin-Limitierung ca. 45 mM Glutamat ins Medium ausschied. Bei Wachstum auf Acetat sezernierten Wildtyp und Mutante mit ca. 20 mM dagegen gleich viel Glutamat ins Medium. Bei Wachstum auf Lactat schieden jedoch weder die Mutante noch der Wildtyp Glutamat in den Kulturüberstand aus. Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, daß die PEP-Carboxylase für die Glutamat-Produktion unter Biotin-Mangel benötigt wird, da die biotinabhängige Pyruvat-Carboxylase nicht aktiv ist.

Im folgenden wurden die zellinternen Glutamat-Konzentrationen in der PEP-Carboxylase-negativen Mutante WT-PP und im Wildtyp unter Biotin-Limitierung bei Wachstum auf Glucose bestimmt. Als Kontrolle wurde die PEP-Carboxylase- / Isocitrat-Lyase-negative Doppelmutante WT-PPW und die Isocitrat-Lyase-negative Mutante ASK1 verwendet. Die Stämme wurden auf Glucose-Minimalmedium mit 10 μg Biotin/l gezüchtet und die interne Glutamat-Konzentration im Verlauf des Wachstums bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 23 dargestellt.

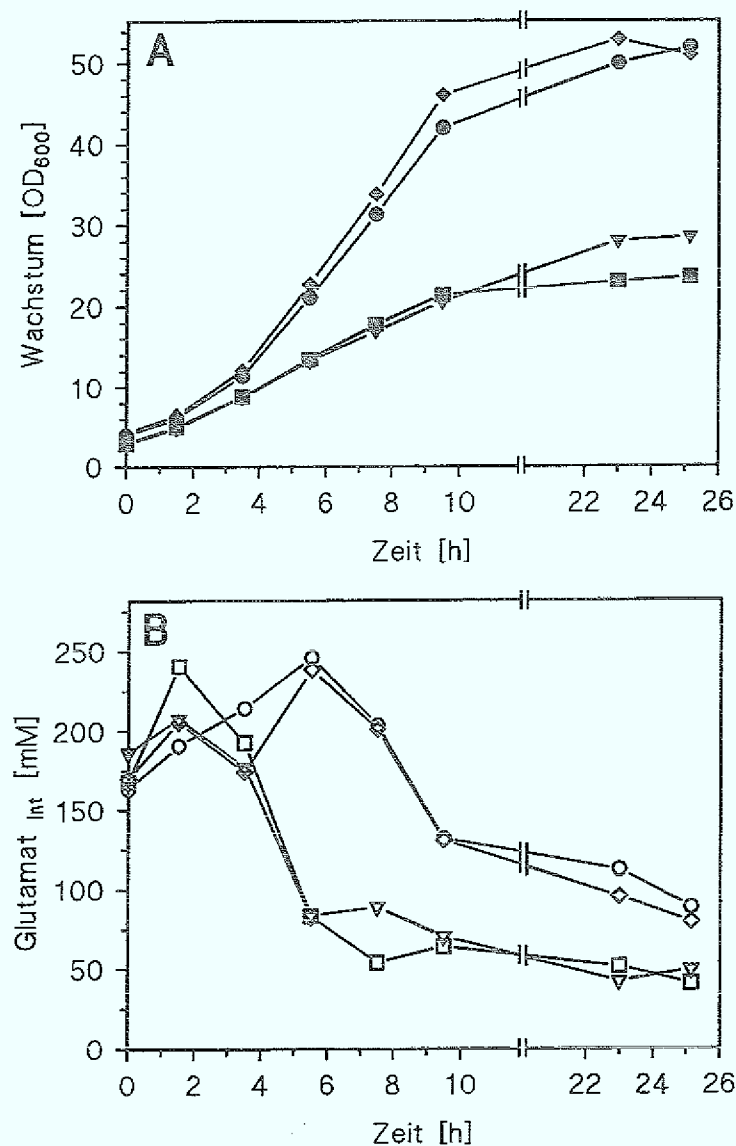


Abbildung 23: Vergleich des Wachstums (A) und der internen Glutamat-Konzentrationen (B) des *C. glutamicum* Wildtyps (●/○), der PEP-Carboxylase negativen Mutante WT-PP (■/□), der PEP-Carboxylase- / Isocitrat-Lyase-negative Doppelmutante WT-PPW (▼/▽) und der Isocitrat-Lyase-negativen Mutante ASK1 (◆/◇) auf Glucose-Minimalmedium unter Biotin-Limitierung (10 µg Biotin/l).

Die PEP-Carboxylase-negative Mutante WT-PP und die PEP-Carboxylase- / Isocitrat-Lyase-negative Doppelmutante WT-PPW wuchsen deutlich schlechter als der Wildtyp und die Isocitrat-Lyase-negative Mutante ASK1. Der alleinige Verlust der Isocitrat-Lyase in der Mutante ASK1 führte zu keinem gesteigerten Bedarf an Biotin. Die maximale interne Glutamat-Konzentration war in allen Stämmen mit 200 bis 250 mM nahezu gleich hoch. Im Wildtyp und der Mutante ASK1 war dieser Wert in der Mitte des exponentiellen Wachstums erreicht und die Konzentration sank am Ende des exponentiellen

Wachstums auf ca. 100 mM ab. In den Mutanten mit fehlender PEP-Carboxylase fiel der Glutamat-Spiegel deutlich früher ab und sank in beiden Stämmen auf einen fast 50 % niedrigeren Wert als im Wildtyp und in der Mutante mit fehlender Isocitrat-Lyase. Da die Wachstumslimitierung der Mutanten WT-PP und WT-PPW wahrscheinlich auf die, durch Biotin-Mangel reduzierte Pyruvat-Carboxylase-Aktivität zurückzuführen ist, kann aus diesen Experimenten geschlossen werden, daß die Pyruvat-Carboxylase als anaplerotisches Enzym bei Verlust der PEP-Carboxylase am Aufbau des intrazellulären Glutamat-Pools beteiligt ist.

Lysin- bzw. Tyrosin-Produktion unter Biotinlimitierung. Nachdem gezeigt wurde, daß biotinlimitiertes Wachstum in der PEP-Carboxylase-negativen Mutante zu einer Verminderung der Glutamat-Produktion führte, wurde untersucht, ob sich auch ein Einfluß von Biotin auf die Lysin- und Tyrosin-Produktion zeigen ließ. Während Lysin ein indirektes Produkt der anaplerotischen Reaktion ist, stellt die Bildung von aromatischen Aminosäuren eine Konkurrenz-Reaktion zur Anaplerotik ausgehend von PEP oder Pyruvat dar, da das Schlüsselenzym der Biosynthese aromatischer Aminosäuren, die 3-Desoxy- α -Arabinoheptonat-7-Phosphat-Synthase, neben Erythrose-4-Phosphat auch PEP als Substrat hat (vergl. Abbildung 1). Der Lysin-Produktionsstamm MH20-22B und der Tyrosin-Produktionsstamm ATCC 21573, die beide PEP-Carboxylase-Aktivität aufwiesen, wurden daher in Bezug auf ihre Fähigkeit unter Biotin-Limitierung Lysin bzw. Tyrosin zu produzieren untersucht. Die Stämme wurden in Minimalmedium mit Glucose unter Biotin-Mangel und Biotin-Überschuß gezüchtet und die ausgeschiedenen Lysin- bzw. Tyrosin-Konzentrationen in der stationären Wachstumsphase bestimmt. Im Fall des Stammes MH20-22B wurden zusätzlich die internen Lysin-Konzentrationen ermittelt (Tabelle 20). Sowohl extern als auch intern bildete der Stamm MH20-22B unter Biotin-Mangel 60 bis 80 % weniger Lysin als unter Biotin-Überschuß, obwohl das Wachstum nicht signifikant beeinträchtigt war (Tabelle 20) und unter diesen Bedingungen kein Glutamat produziert wurde. Der Stamm ATCC 21573 verhielt sich bezüglich seiner Tyrosin-Produktion genau umgekehrt. Unter Biotin-Mangel produzierte er fast viermal mehr Tyrosin als unter Biotin-Überschuß (Tabelle 20). Unter der Annahme, daß der Biotin-Mangel zu einer Reduktion der Pyruvat-Carboxylase-Aktivität in den Zellen führte, legt das Ergebnis den Schluß nahe, daß die Pyruvat-Carboxylase tatsächlich einen starken Einfluß auf die Produktion von Aminosäuren in *C. glutamicum* hat, d.h. einerseits führt die Verminderung der Pyruvat-Carboxylase-Aktivität zu einer verminderten Lysin-Biosynthese und andererseits steht nun trotz Vorhandensein der PEP-Carboxylase genügend PEP für eine erhöhte Tyrosin-Produktion zur Verfügung.

Tabelle 20: Extrazelluläre und intrazelluläre Aminosäure-Konzentrationen der Produktionsstämme MH20-22B und ATCC 21573 nach Wachstum auf Glucose unter Biotin-Limitierung und Biotin-Überschuß.

Stamm	Glc %	Biotin [µg/l]	optische Dichte [OD ₆₀₀]	Lysin [mM]		Tyrosin [mM]
				intern	extern	extern
MH20-22B	10	200	38	80	100	n.b.
		1	30	15	40	n.b.
ATCC 21573	4	200	33	n.b.	n.b.	1,8
		2	29	n.b.	n.b.	8,0

n.b. = nicht bestimmt

8. Nachweis und Identifizierung von biotinhaltigen Proteinen in *C. glutamicum*

8.1 Nachweis biotinhaltiger Proteine in Rohextrakten

Die bisherigen Experimente legten den Schluß nahe, daß es in *C. glutamicum* eine biotinabhängige Pyruvat-Carboxylase gibt. Deshalb wurde untersucht, ob in Rohextrakten von *C. glutamicum* Pyruvat-Carboxylase als Protein mit kovalent gebundenem Biotin als Coenzym nachweisbar ist. Die biotinhaltigen Proteine aus Rohextrakten vom Wildtyp und der PEP-Carboxylase-negativen Mutante WT-PP wurden nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Immobilisierung auf einer Membran durch die Bindung von Streptavidin gekoppelt an alkalische-Phosphatase spezifisch detektiert. Wie in **Abbildung 24** dargestellt, konnten sowohl im Wildtyp als auch in der PEP-Carboxylase-negativen Mutanten zwei Proteine mit Größen von ca. 70 kDa und ca. 120 bis 130 kDa nachgewiesen werden, die spezifisch mit Streptavidin interagieren.

C. glutamicum verfügt also über zwei biotinhaltige Proteine, die entsprechend ihrer Größe p70 und p125 genannt wurden. Im relativen Vergleich der Bandenintensitäten erschien mehr p70 als p125 im Rohextrakt vorhanden zu sein.

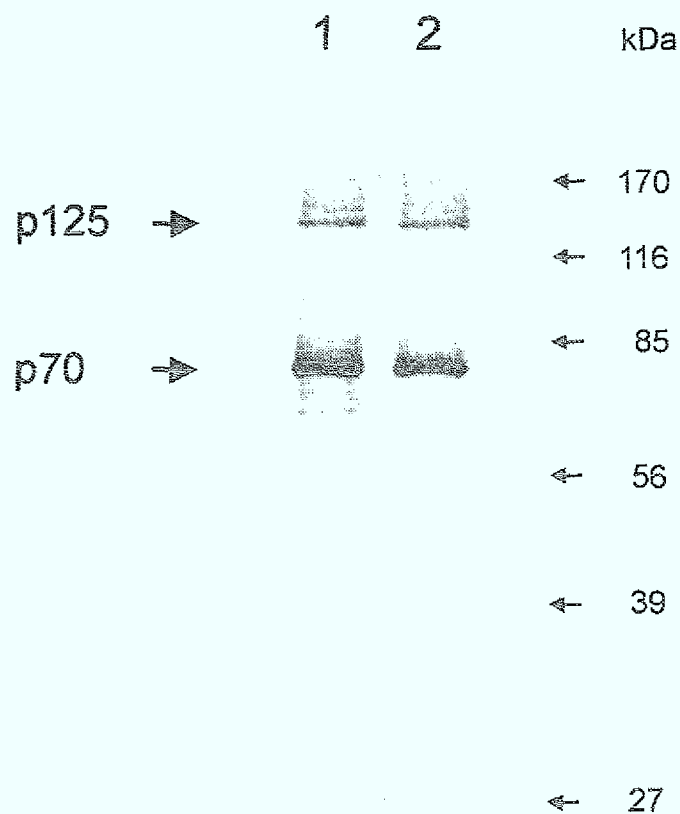


Abbildung 24: Western-Blot Analyse zum Nachweis von biotinhaltigen Proteinen in Rohextrakten von *C. glutamicum* WT (Spur 1) und WT-PP (Spur 2) durch Detektion mit Streptavidin-alkalische Phosphatase-Konjugat.

8.2 Partielle Aufreinigung und Ansequenzierung der biotinhaltigen Proteine

p70 und p125

Die beiden biotinhaltigen Proteine p70 und p125 wurden partiell gereinigt und ansequenziert, um die N-terminale Aminosäuresequenz zu ermitteln. Für die spezifische Aufreinigung wurden Avidin-Affinitätschromatographien durchgeführt. Rohextrakt von auf Lactat gezüchteten Zellen von *C. glutamicum* Wildtyp (ca. 20 mg Protein) wurde mit an ein Trägermaterial immobilisiertem monomerem Avidin inkubiert und die biotinhaltigen Proteine anschließend eluiert. Ein Aliquot des Eluats wurde für eine Western-Blot-Analyse verwendet (Abbildung 25).

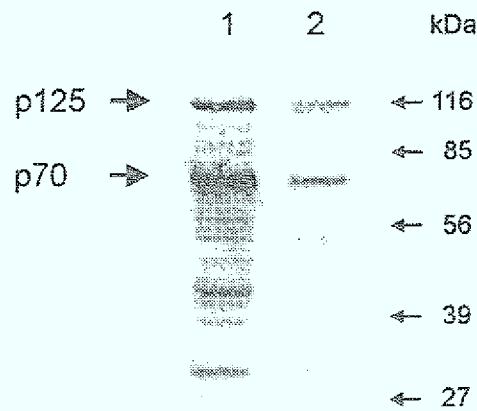


Abbildung 25: Western-Blot-Analyse biotinhaltiger Proteine nach Avidin-Affinitätschromatographie. Rohextrakt (Spur 1); Aliquot der Protein-Fraktion nach Chromatographie (Spur 2).

Es zeigte sich, daß beide biotinhaltigen Proteine in der eluierten Fraktion mit geringer Ausbeute vorhanden waren. Die N-terminalen Aminosäuren der Proteine wurden über Edman-Abbau bestimmt (Edman & Begg, 1967). Die Menge an p125 reichte für die Sequenzierung nicht aus, jedoch ließen sich von p70 die ersten fünfzehn Aminosäuren ermitteln. Das Ergebnis ist in **Abbildung 26 A** dargestellt. Ein Vergleich mit der Protein-Datenbank (SWISSPIR) ergab, daß diese Sequenz 91 % ähnliche Aminosäuren zum N-Terminus des Biotin-Carboxyl-Carrier-Proteins, d.h. der biotinylierten Untereinheit einer Acyl-CoA-Carboxylase aus *Mycobacterium leprae* aufwies (**Abbildung 26 B**), die im SDS-PAGE wie p70 ca. 65 bis 70 kDa groß ist (Norman *et al.*, 1994). Darüberhinaus zeigte die Sequenz 78 % ähnliche Aminosäuren zum N-Terminus der Pyruvat-Carboxylase aus Maus (**Abbildung 26 C**). Dieses Protein ist mit 130 kDa im denaturierten Zustand jedoch wesentlich größer (Zhang *et al.*, 1993). Aufgrund der Sequenzähnlichkeit und der übereinstimmenden Proteingrößen lag der Schluß nahe, daß es sich bei p70 um die biotinylierte Untereinheit der Acyl-CoA-Carboxylase von *C. glutamicum* handelt.

(A) SVETRKITKVLVANR
 (B) VASHASSRIAKVLVANRGEIAVRVI...
 (C) MFDTVLVANRGEIAVRVI...
 (D) MLDKIVIANRGEIALRIL...
 (E) VFSKVLVANRGEIAIRAF...
 (F) MSSSKLAGLRDNFCLLGEKNKILVANRGEIPIRIF...
 (G) MLKFQTVRGGLRLLGVRRSSAPVASPNVRRLEYKPIKKVMVANRGEIAIRVF...

Abbildung 26: N-terminale Sequenz des biotinhaltigen Proteins p70 (A) im Vergleich zu den N-Termini anderer biotinhaltigen Proteine: (B) biotinylierte Untereinheit der Acyl-CoA-Carboxylase aus *M. leprae*; (C) biotinylierte Untereinheit der Acyl-CoA-Carboxylase aus *M. tuber-culosis*; (D) Biotin-Carboxyl-Carrier-Protein aus *E. coli*; (E) Pyruvat-Carboxylase aus *M. tuberculosis*; (F) Pyruvat-Carboxylase 2 aus *Saccharomyces cerevisiae*; (G) Pyruvat-Carboxylase aus Maus.

Im folgenden wurde p125 aus Rohextrakten mit einem Gesamtproteingehalt von 80 mg zunächst über präparative SDS-PAGE von p70 getrennt. Die Proteine die größer als 100 kDa waren, wurden aus dem Gel isoliert und über Avidin-Affinitätschromatographie weiterbehandelt (s. Material und Methoden). Die Hälfte des erhaltenen Eluats wurde über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Durch Anfärbung mit Amidoschwarz ließ sich eine Proteinbande bei 120 bis 130 kDa nachweisen. Allerdings zeigte sich, daß p125 im Gegensatz zu p70 nur mit sehr geringer Effizienz über Avidin-Affinitätschromatographie aufzureinigen war. Trotzdem wurde mit insgesamt drei verschiedenen Ansätzen versucht, den N-Terminus des Proteins anzusequenzieren. Die Sequenzierung war nur mit einer Probe möglich und ergab zehn N-terminale Aminosäuren: - T E S K N L F N A E -. Das Ergebnis ist jedoch aufgrund der geringen Ausbeute und der ineffektiven Sequenzierung vorsichtig zu interpretieren. Darüberhinaus ergab ein Sequenzvergleich des Peptids mit bekannten biotinhaltigen Proteinen keine signifikante Ähnlichkeit zu anderen biotinhaltigen Proteinen.

8.3 Vergleichende Untersuchungen zum Auftreten von p125

Es wurde weiterhin der Frage nachgegangen, ob die beobachtete Wachstums-limitierung bei geringen Biotin-Konzentrationen (vergl. Kapitel 7.1) mit einer Abnahme eines der beiden biotinhaltigen Proteine in den Zellen einhergeht. Das Experiment sollte Hinweise darauf geben, welches der beiden biotinhaltigen Proteine für die mit der anaplerotischen Funktion verknüpfte, biotinabhängige Wachstums-limitierung verantwort-

lich sein könnte, und damit der Pyruvat-Carboxylase von *C. glutamicum* zuzuordnen ist. Hierzu wurde der *C. glutamicum*-Wildtyp auf Minimalmedium mit Glucose, Lactat oder Acetat unter Biotin-Mangel (5 µg Biotin/l) und unter Biotin-Überschuß (100 µg Biotin/l) gezüchtet. In der exponentiellen Wachstumsphase wurden die Zellen geerntet und Rohextrakte hergestellt. Nach Größenfraktionierung der Proteine über SDS-PAGE, und anschließender Immobilisierung auf einer PVDF-Membran wurden die biotinabhängigen Proteine detektiert (Abbildung 27).

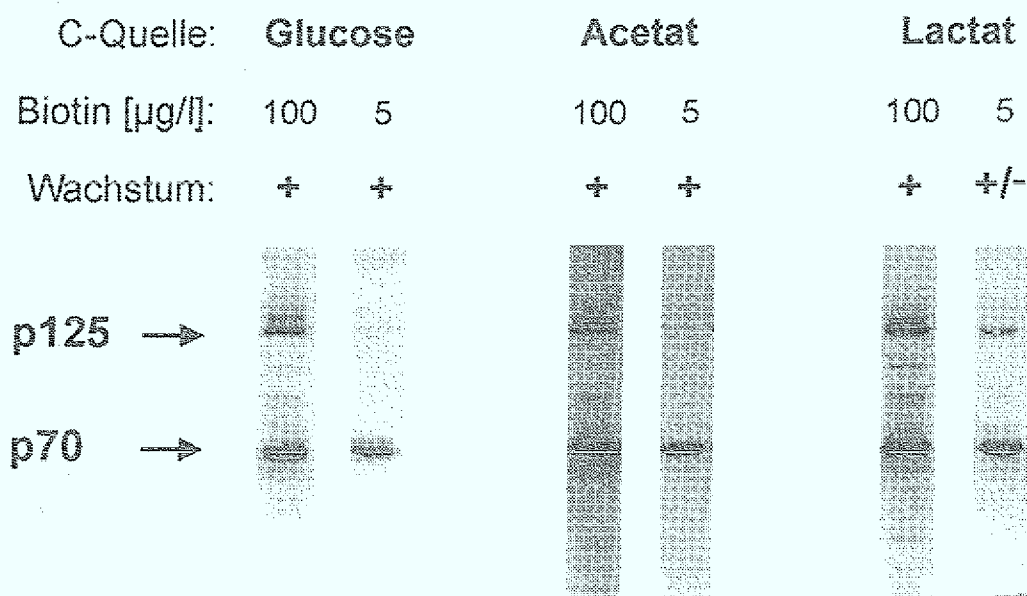


Abbildung 27: Western-Blot-Analyse zum Nachweis von biotinhaltigen Proteinen in Rohextrakten von *C. glutamicum* nach Wachstum auf Glucose, Acetat oder Lactat unter Biotin-Überschuß (100 µg Biotin/l) und Biotin-Mangel (5 µg Biotin/l).

Es zeigte sich, daß unter allen Wachstumsbedingungen p70 mit nahezu konstanter Menge vorhanden war, während das Auftreten von p125 stark von der Biotin-Konzentration im Medium abhing. Bei Wachstum auf Glucose oder Acetat mit 5 µg Biotin/l war kein p125 nachzuweisen, wohingegen auf Lactat trotz vermindertem Wachstum p125 noch vorhanden war. Aus diesem Experiment wurde der Schluß gezogen, daß das Biotin enthaltende Protein p125 für die in der anaplerotischen Funktion begründeten biotinabhängigen Wachstumslimitierung der PEP-Carboxylase-negativen Mutante auf Glucose und Lactat und des Wildtyps auf Lactat verantwortlich ist. Damit stellt p125 wahrscheinlich die Pyruvat-Carboxylase von *C. glutamicum* dar. Passend dazu, daß die

spezifische Aktivität der Pyruvat-Carboxylase bei Wachstum auf Lactat höher war als bei Wachstum auf Glucose oder Acetat, scheint darüberhinaus mehr Pyruvat-Carboxylase-Protein bei Wachstum auf Lactat als bei Wachstum auf den anderen C-Quellen gebildet zu werden.

Nachdem gezeigt werden konnte, daß eine Korrelation zwischen der biotinabhängigen Wachstumslimitierung und der Abnahme des biotinhaltigen Proteins p125 bestand, wurde untersucht, ob die spezifische Pyruvat-Carboxylase Aktivität ebenfalls mit dem Auftreten von p125 korreliert. Der Wildtyp von *C. glutamicum* wurde in Minimalmedium mit Lactat oder Glucose als C-Quelle, sowie Biotin-Überschuß (200 µg Biotin/l) und Biotin-Mangel (2 µg Biotin/l) gezüchtet. Einerseits wurde im Verlauf des Wachstums die spezifische Pyruvat-Carboxylase-Aktivität und andererseits zu vier verschiedenen Zeitpunkten die relative Menge von p125 durch Western-Blot Analyse bestimmt. Das Ergebnis ist in **Abbildung 28** dargestellt. Erwartungsgemäß war das Wachstum auf Lactat (**Abbildung 28 A**) unter Biotin-Mangel deutlich schlechter als auf biotinlimitiertem Glucose-Medium (**Abbildung 28 B**). Auf beiden C-Quellen zeigte sich, daß immer dann, wenn Biotin im Überschuß angeboten wurde, sowohl Pyruvat-Carboxylase-Aktivität als auch das Protein p125 nachgewiesen werden konnte. Unter Biotin-Mangel war die spezifische Pyruvat-Carboxylase-Aktivität auf Lactat und auf Glucose drastisch reduziert und p125 war kaum noch nachzuweisen. Ein ähnliches Ergebnis konnte auch bei Wachstum auf Acetat erhalten werden (Daten nicht gezeigt).

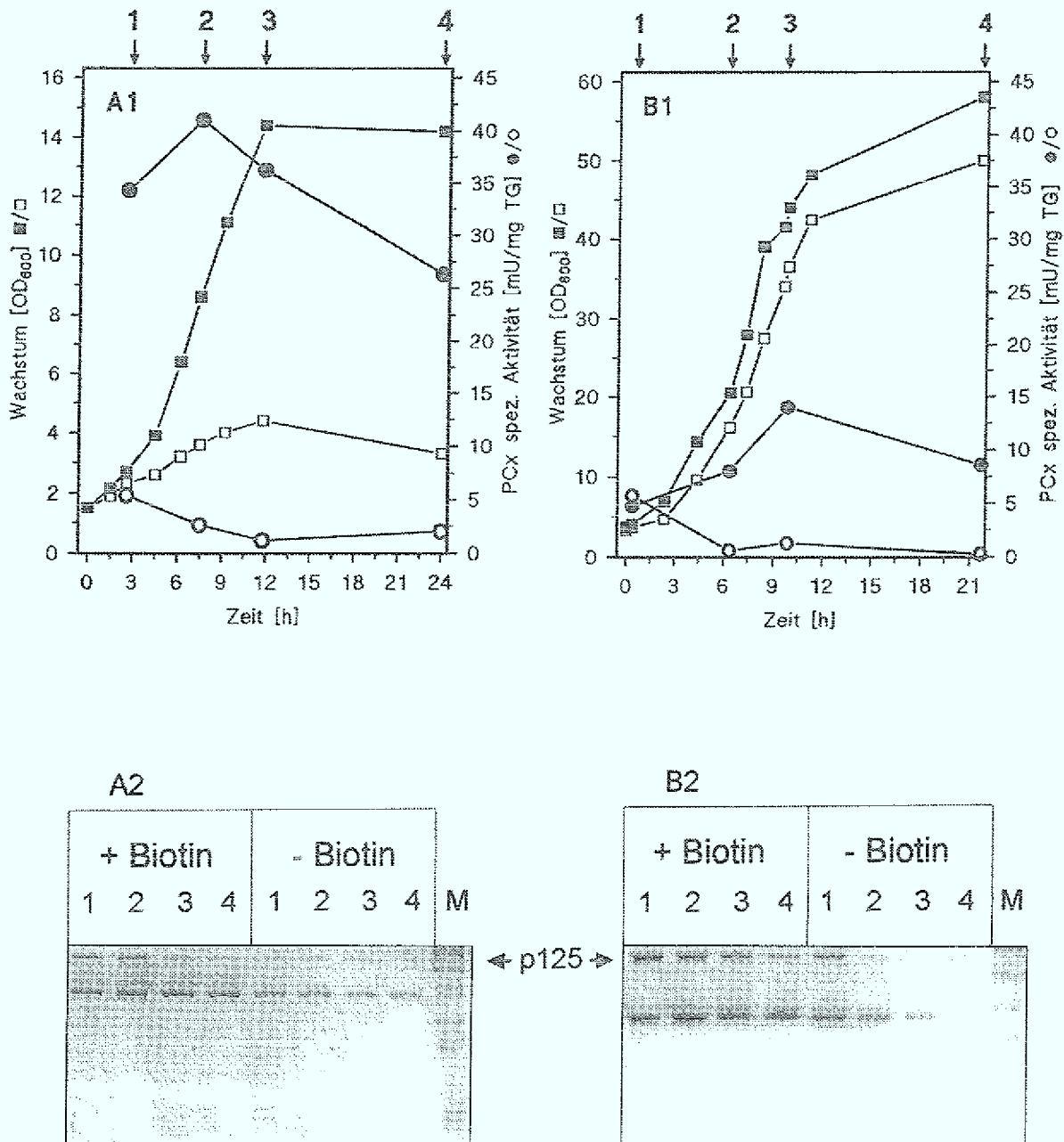


Abbildung 28: Bestimmung der spezifischen Aktivität der Pyruvat-Carboxylase und Quantifizierung von p125 in *C. glutamicum*, im Verlauf des Wachstum unter Biotin-Überschuß (200 µg/l; ■/●) und Biotin-Mangel (2 µg/l; □/○) auf Lactat (A1 und A2) und auf Glucose (B1 und B2). Die Proben für die Enzym-Bestimmung und die Western-Blot-Analyse wurden zu den in A1 und B1 angegebenen vier Zeitpunkten im Wachstum entnommen. M = Molekulargewichtsstandard.

9. Isolierung und Charakterisierung einer Pyruvat-Carboxylase-negativen Mutante von *C. glutamicum*

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, daß *C. glutamicum* über eine Pyruvat-Carboxylase verfügt. Wenn das Enzym für das Wachstum auf Lactat tatsächlich benötigt wird, sollte eine Pyruvat-Carboxylase-negative Mutante nicht mehr auf dieser C-Quelle wachsen. Dagegen dürfte das Wachstum einer solchen Mutante auf Glucose oder Acetat als C-Quellen nicht beeinträchtigt sein. Allerdings könnte dieser Phänotyp nicht nur durch das Ausschalten der Pyruvat-Carboxylase, sondern auch durch einen Verlust der Lactat-Dehydrogenase hervorgerufen werden. Um auszuschließen, daß solche Mutanten isoliert werden, wurde zunächst das Wachstum von *C. glutamicum* auf Pyruvat als C-Quelle unter Biotinlimitierung untersucht. Da Lactat über Pyruvat in den Stoffwechsel eingeschleust wird, war zu erwarten, daß die Pyruvat-Carboxylase auch für das Wachstum auf Pyruvat benötigt wird. Es zeigte sich, daß die getesteten Stämme Wildtyp und R127 genau wie auf Lactat unter Biotin-Mangel deutlich schlechter wuchsen als unter Biotin-Überschuß (Daten nicht gezeigt). Daher wurde bei der Suche nach einer Pyruvat-Carboxylase-negativen Mutante von *C. glutamicum* auf den Phänotyp Wachstum bzw. Nicht-Wachstum auf Pyruvat selektioniert.

Als Ausgangsstamm für die Isolierung einer Pyruvat-Carboxylase-negativen Mutante wurde der restriktionsnegative *C. glutamicum* Stamm R127 (Liebl & Schein, 1990) verwendet. Ausgehend von einer mit N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin (NNG) mutagenisierten Kultur (Vrljic *et al.*, 1995) wurden 40000 Kolonien über Replikaplattierung von Vollmedium auf Minimalmedium mit Pyruvat als C-Quelle übertragen. Es konnten zunächst 1100 Kolonien erhalten werden, die nicht auf Pyruvat-Medium wuchsen. Davon zeigten 15 Kolonien Wachstum auf Glucose oder Acetat, jedoch kein Wachstum auf Lactat bzw. Pyruvat. Diese 15 Stämme, wurden auf ihre Pyruvat-Carboxylase-Aktivität untersucht. 13 Mutanten zeigten 50 bis 100 % Pyruvat-Carboxylase Aktivität im Vergleich zum Ausgangsstamm R127. Es handelt sich möglicherweise um Mutanten mit einem Defekt im Pyruvat/Lactat-Aufnahmesystem, über das in *C. glutamicum* nichts bekannt ist. Es konnten zwei Mutanten isoliert werden, die keine bzw. um 90 % reduzierte Pyruvat-Carboxylase-Aktivität im Vergleich zum Ausgangsstamme R127 zeigten (Tabelle 21). Diese Mutanten, SP733 (< 1 mU/mg Protein) und SP078 (2 mU/mg Protein), wurden näher charakterisiert. Die spezifischen Aktivitäten anderer am PEP- bzw. Pyruvat-Verzweigungspunkt beteiligter Enzyme, der PEP-Carboxylase, der PEP-Carboxykinase und der Pyruvat-Kinase, unterschieden sich nicht signifikant von der des Ausgangsstammes R127 (Tabelle 21). Damit war gezeigt, daß der Phänotyp der Mutanten nicht auf einen Defekt in diesen Reaktionen zurückzuführen ist.

Tabelle 21: Spezifische Aktivitäten der Pyruvat-Carboxylase (PCx), PEP-Carboxylase (PEPCx), PEP-Carboxykinase (PEPCK) und Pyruvat-Kinase (PK) in den Stämmen *C. glutamicum* R127, SP733 und SP078 nach Wachstum auf Glucose-Minimalmedium

Stamm	spezifische Aktivität [mU/mg Protein]			
	PCx	PEPCx	PEPCK	PK
R127	20	211	165	402
SP733	< 1	256	159	319
SP078	2	262	228	556

Zur weiteren Überprüfung des Phänotyps der Mutanten SP733 und SP078 wurden diese im Vergleich zum R127 in Flüssigmedium mit verschiedenen C-Quellen untersucht. Es zeigte sich, daß die Mutanten sowohl auf Glucose als auch auf Acetat wie der Ausgangsstamm wuchsen. Auf Pyruvat oder auf Lactat als C-Quelle konnten beide Mutanten wie erwartet nicht wachsen (Abbildung 29 A). Es war jedoch möglich, die Wachstumslimitierung auf Lactat durch Supplementation von 35 mM Fumarat nahezu aufzuheben. Die Mutanten wuchsen in Anwesenheit von Fumarat auf Lactat wieder genauso schnell wie der Ausgangsstamm R127, erzielten jedoch nicht die gleiche optische Dichte in der stationären Wachstumsphase (Abbildung 29 B). Das deutet daraufhin, daß der beobachtete Phänotyp tatsächlich auf eine mangelnde anaplerotische Reaktion, und damit auf einen Defekt in der Pyruvat-Carboxylase zurückzuführen ist.

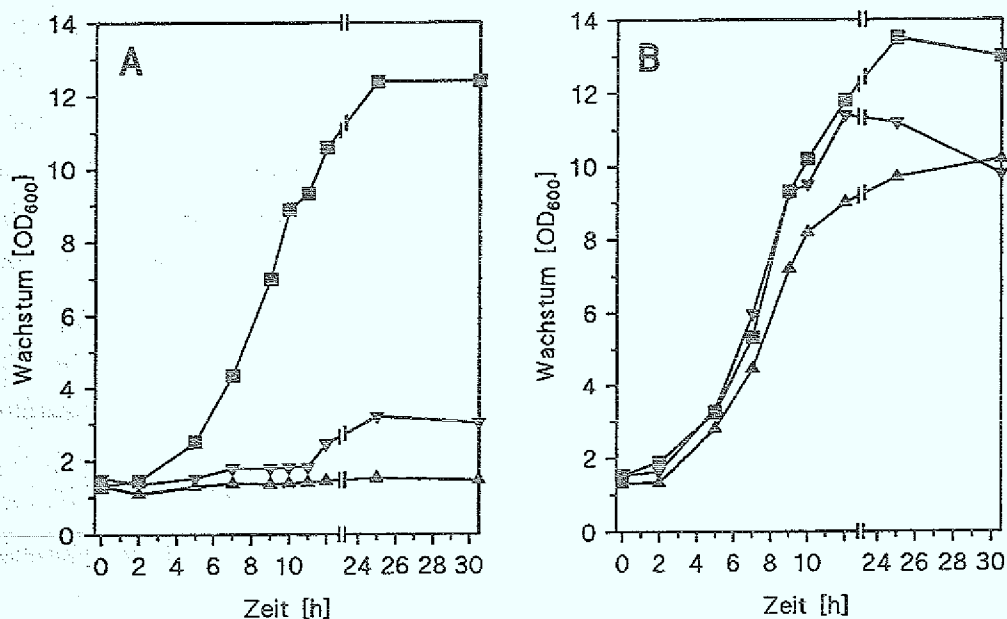


Abbildung 29: Wachstum der *C. glutamicum*-Stämme R127 (■), SP733 (▲) und SP078 (▼) auf Lactat-Minimalmedium allein (A) und bei Supplementation mit 35 mM Fumarat (B).

Es konnten somit zwei Pyruvat-Carboxylase negative Mutanten des *C. glutamicum* Stammes R127 isoliert werden, die nicht in der Lage waren auf Lactat oder Pyruvat als einziger C-Quelle zu wachsen, deren Wachstum aber durch die Supplementation von Fumarat wieder hergestellt werden konnte. Damit wurde der Befund bestätigt, daß die Pyruvat-Carboxylase von *C. glutamicum* eine wichtige Bedeutung als anaplerotische Reaktion bei Wachstum auf Lactat hat.

Es wurde eine Western-Blot-Analyse mit Rohextrakten der Pyruvat-Carboxylase-negativen Mutanten SP733 und SP078 sowie des Ausgangsstamms R127 mit Detektion der biotinhaltigen Proteine p125 und p70 durchgeführt. Die Mutante SP733, die über keine nachweisbare Pyruvat-Carboxylase-Aktivität verfügte, wies eine deutlich geringere Menge an p125 auf, als die beiden anderen Stämme (Abbildung 30). Der Gehalt an p70 war in allen Fällen vergleichbar. Das Ergebnis deutet daraufhin, daß der vollständige Funktionsverlust der Pyruvat-Carboxylase in der Mutante SP733 zu einem verstärkten Abbau des Proteins führt. Darüberhinaus kann p125 nun tatsächlich der Pyruvat-Carboxylase zugeordnet werden.

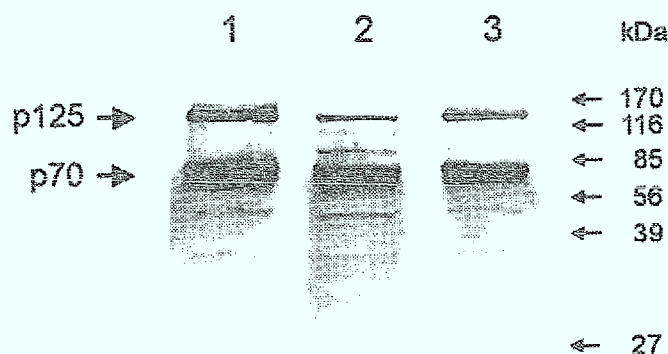


Abbildung 30: Western-Blot Analyse zum Nachweis von biotinylierten Proteinen in Rohextrakten von *C. glutamicum* R127 (Spur 1), SP733 (Spur 2) und SP078 (Spur 3) durch Detektion mit Streptavidin-alkalische Phosphatase-Konjugat.

10. Isolierung des Gens für die Pyruvat-Carboxylase aus *C. glutamicum*

Ausgehend von einem DNA-Fragment aus *C. glutamicum*, das hohe Sequenzähnlichkeit zu bekannten Pyruvat-Carboxylasen aufwies (s. Material und Methoden), wurden folgende homologe Oligonukleotide hergestellt:

pyc1 5' - CGTCTTCATCGAAATGAAC - 3'
 pyc2 5' - ACGGTGGTGATCCGGCACT - 3'

Diese Oligonukleotide wurden als PCR-Primer zur Isolierung einer Sonde für das Gen der Pyruvat-Carboxylase (*pyc*) aus *C. glutamicum* verwendet. Die Primer wurden in eine PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA von *C. glutamicum* und Digoxigenin-markierten Nucleotiden eingesetzt. Mit diesem Ansatz konnte ein Digoxigenin-markiertes Fragment amplifiziert werden, das der erwarteten Größe von ca. 200 bp entspricht. Die so hergestellte *pyc*-Sonde wurde dann eingesetzt, um über Southern-Blot-Hybridisierung ein DNA-Fragment in der chromosomalen DNA von *C. glutamicum* zu identifizieren, auf dem das *pyc*-Gen lokalisiert ist. Hierzu wurde chromosomale DNA von *C. glutamicum* WT mit den Restriktionsenzymen *Hind*III, *Sph*I, *Sal*I, *Dra*I, *Eco*RI und *Bam*HI geschnitten, die erhaltenen DNA-Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf einer Nylon-Membran immobilisiert. Anschließend wurde die chromosomale DNA gegen die *pyc*-Sonde hybridisiert. In Abbildung 31 ist das Ergebnis der Southern-Blot-Analyse dargestellt. Es konnten folgende hybridisierende Fragmente nachgewiesen werden: ein 17 kb *Hind*III-Fragment (Spur 1), ein 11 kb *Sph*I-Fragment (Spur 6), ein 7 kb *Sal*I-Fragment (Spur 4), ein 5 kb *Dra*I-Fragment (Spur 5), ein 1,4 kb *Eco*RI-Fragment (Spur 3) und ein 1,0 kb *Bam*HI-Fragment (Spur 2). In allen Fällen handelte es sich um einzelne distinkte Banden.

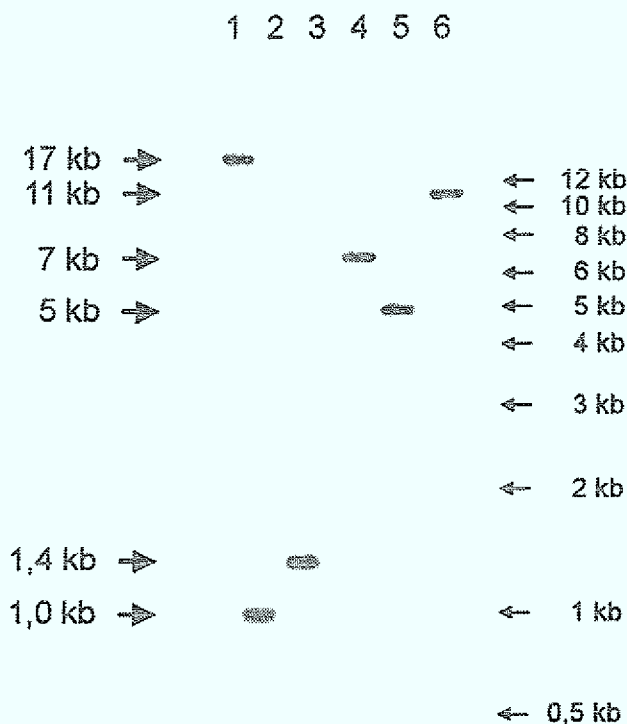


Abbildung 31: Southern-Blot Analyse von chromosomaler DNA aus *C. glutamicum* Wildtyp nach Restriktion mit *Hind*III (Spur 1), *Bam*HI (Spur 2), *Eco*RI (Spur 3), *Sal*I (Spur 4), *Dra*I (Spur 5) und *Sph*I (Spur 6) geschnitten. Die Hybridisierung erfolgte bei 60°C mit einer Digoxigenin-markierten Sonde eines über PCR aus *C. glutamicum* isolierten *pyc*-Fragmentes.

Das 17 kb *Hind*III-Fragment wurde isoliert und subkloniert. Dazu wurde eine Cosmid-Genbank aus chromosomaler DNA von *C. glutamicum* im Cosmid pH79 verwendet, die das Genom von *C. glutamicum* zu 99 % repräsentiert (Börmann *et al.*, 1992). Der *E. coli*-Stamm DH5 α wurde mit dieser Genbank transformiert und anschließend wurden die erhaltenen Transformanten über Kolonie-Hybridisierung weiter analysiert. Als Sonde für die Hybridisierung wurde wieder die *pyc*-Sonde verwendet. Es wurden 3 Transformanten identifiziert, die gegen die *pyc*-Sonde hybridisierten. Aus diesen Transformanten wurde die Cosmid-DNA isoliert und anschließend über Restriktion und Southern-Blot Analyse auf das Vorhandensein des *Hind*III-Fragments getestet. Das Cosmid pH79-10, das ein 40 kb Insert enthielt, trug das 17 kb *Hind*III-Fragment vollständig (Abbildung 32) und wurde weiter analysiert. Es zeigte sich, daß auch nach Restriktion mit den Endonukleasen *Sa*I und *Eco*RI die gleichen hybridisierenden Fragmente wie in der chromosomalen DNA, d.h. ein 7 kb *Sa*I- und ein 1,4 kb *Eco*RI-Fragment erhalten wurden (Abbildung 32).

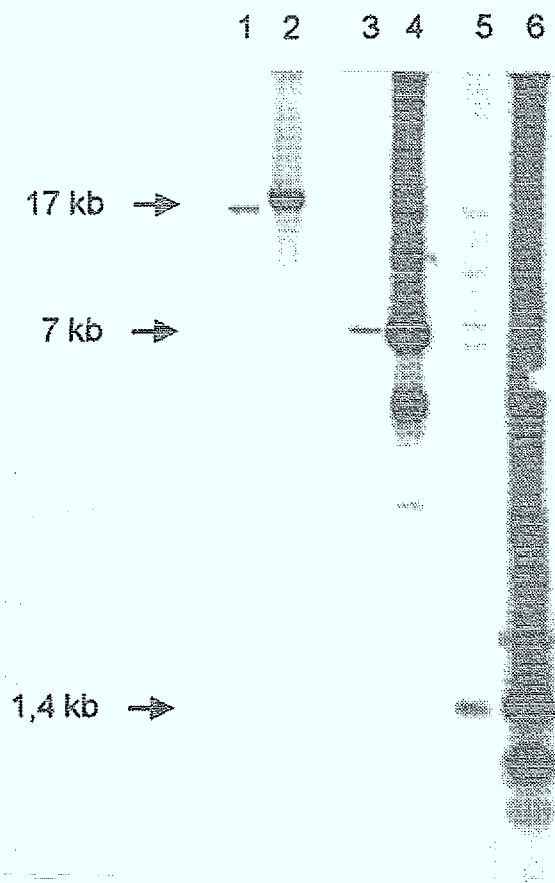


Abbildung 32: Southern-Blot-Analyse von chromosomaler DNA aus *C. glutamicum* (Spur 1,3 und 5) im Vergleich zum Cosmid pH79-10 (Spur 2,4 und 6) nach Restriktion mit *Hind*III (Spur 1 und 2), *Sa*I (Spur 3 und 4) und *Eco*RI (Spur 5 und 6). Die Hybridisierung erfolgte bei 60°C mit einer Digoxigenin-markierten Sonde eines über PCR aus *C. glutamicum* isolierten *pyc*-Fragmentes.

Das 17 kb *Hind*III-Fragment wurde aus dem Cosmid isoliert und in den *E. coli*-Vektor pUC18 ligiert. In weiteren Subklonierungsschritten wurde aus dem resultierenden Vektor pUC-CP17 das 1,4 kb *Eco*RI-Fragment isoliert, in den Vektor pUC18 kloniert und anschließend nach Sanger *et al.* (1977) sequenziert. Es wurde eine Nukleotid-Sequenz von 1353 bp erhalten, die ein durchgehendes offenes Leseraster zeigte. Die davon abgeleitete Proteinsequenz ergab 451 Aminosäuren (Abbildung 33).

	10	20	30	40	50	60
1	GAATTCTTGGTCGATGAAAAGGGCAACCACGTCTTCATCGAAATGAACCCACGTATCCAG					
	E F L V D E K G N H V F I E M N P R I Q					
61	GTTGAGCACACCGTGACTGAAGAAGTCACCGAGGTGGACCTGGTGAAGGCGCAGATGCGC					
	V E H T V T E E V T E V D L V K A Q M R					
121	TTGGCTGCTGGTGCAACCTTGAAGGAATTGGGTCTGACCCAAGATAAGATCAAGACCCAC					
	L A A G A T L K E L G L T Q D K I K T H					
181	GGTGCAGCACTGCAGTGCCGCATCACCACGGAAGATCCAAACAACGGCTTCCGCCCAGAT					
	G A A L Q C R I T T E D P N N G F R P D					
241	ACCGGAACTATCACCGCGTACCGCTCACCAGGCGGAGCTGGCGTTTCGTCTTGACGGTGCA					
	T G T I T A Y R S P G G A G V R L D G A					
301	GCTCAGCTCGGTGGCGAAATCACCGCACACTTGGACTCCATGCTGGTGAAGATGACCTGC					
	A Q L G G E I T A H F D S M L V K M T C					
361	CGTGGTCCGACTTTGAAACTGCTGTTGCTCGTGCACAGCGCGGCTGGCTGAGTTCACC					
	R G S D F E T A V A R A Q R A L A E F T					
421	GTGTCTGGTGTGCAACCAACATTGGTTTCTTGCCTGCGTTGCTGCGGGAAGAGGACTTC					
	V S G V A T N I G F L R A L L R E E D F					
481	ACTTCCAAGCGCATCGCCACCGGATTCAATGCGGATCACCCGCACCTCCTTCAGGCTCCA					
	T S K R I A T G F I A D H P H L L Q A P					
541	CCTGCTGATGATGAGCAGGGACGCATCCTGGATTACTTGGCAGATGTCACCGTGAACAAG					
	P A D D E Q G R I L D Y L A D V T V N K					
601	CCTCATGGTGTGCGTCCAAAGGATGTTGCAGCTCCTATCGATAAGCTGCCTAACATCAAG					
	P H G V R P K D V A A P I D K L P N I K					
661	GATCTGCCACTGCCACGCGGTTCCCGTGACCGCCTGAAGCAGCTTGGCCCAGCCGCGTTT					
	D L P L P R G S R D R L K Q L G P A A F					
721	GCTCGTGATCTCCGTGAGCAGGACGCACTGGCAGTTACTGATAACCACCTTCCGCGATGCA					
	A R D L R E Q D A L A V T D T T F R D A					
781	CACCAGTCTTTGCTTGGACCCGAGTCCGCTCATTGCACTGAAGCCTGCGGCAGAGGCC					
	H Q S L L A T R V R S F A L K P A A E A					
841	GTCGCAAAGCTGACTCCTGAGCTTTTGTCCGTGGAGGCCTGGGGCGGCGGACCTACGAT					
	V A K L T P E L L S V E A W G G A T Y D					
901	GTGGCGATGCGTTTCTCTTTGAGGATCCGTGGGACAGGCTCGACGAGCTGCGCGAGGCG					
	V A M R F L F E D P W D R L D E L R E A					
961	ATGCCGAATGTAAACATTAGATGCTGCTTCGCGGCCGCAACACCGTGGGATACACCCCG					
	M P N V N I Q M L L R G R N T V G Y T P					
1021	TACCCAGACTCCGTCTGCCGCGCGTTTGTAAAGGAAGCTGCCAGCTCCGGCGTGGACATC					
	Y P D S V C R A F V K E A A S S G V D I					

```

1081  TTCCGCATCTTCGACGCGCTTAACGACGCTCTCCAGATGCGTCCAGCAATCGACGCAGTC
      F R I F D A L N D V S Q M R P A I D A V
1141  CTGGAGACCAACACCGCGGTAGCCGAGGTGGCTATGGCTTATTCTGGTGATCTCTCTGAT
      L E T N T A V A E V A M A Y S G D L S D
1201  CCAAATGAAAAGCTCTACACCCTGGATTACTACCTAAAGATGGCAGAGGAGATCGTCAAG
      P N E K L Y T L D Y Y L K M A E E I V K
1261  TCTGGCGCTCACATCTTGGCCATTAAGGATATGGCTGGTCTGCTTCGCCCCAGCTGCGGTA
      S G A H I L A I K D M A G L L R P A A V
1321  ACCAAGCTGGTCACCGCACTGCGCCGTGAATTC
      T K L V T A L R R E F -

```

Abbildung 33: Nukleotid-Sequenz und die davon abgeleitete Aminosäure-Sequenz des 1,4 kb *EcoRI*-Fragments aus *C. glutamicum* das in der Southern-Blot-Analyse mit einer *pyc*-spezifischen DNA-Sonde hybridisierte.

Ein computergestützter Sequenzvergleich mit Protein-Datenbanken (SWISSPIR; Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources) ergab hohe Ähnlichkeiten zu biotinhaltigen Proteinen. Die größte Übereinstimmung ergab sich zu den Pyruvat-Carboxylasen aus *M. tuberculosis* mit 74 % ähnlichen und 60 % identischen Aminosäuren (EMBL-Genbank-Accession Nr. (AC) U00024), aus Maus (AC L09192), Ratte (AC U32314) und Mensch (AC U04641) mit jeweils 68 % ähnlichen und 52 % identischen Aminosäuren, sowie aus *Aedes aegyptis* mit 67 % ähnlichen und 48 % identischen Aminosäuren (AC L36530). Zu den beiden Isoenzymen der Pyruvat-Carboxylase aus *S. cerevisiae* wurden 67 % ähnliche Aminosäuren gefunden, wobei PYC1 (AC P11154) 51 % und PYC2 (AC X59890) 50 % identische Aminosäuren zu dem Proteinfragment aus *C. glutamicum* aufwiesen. Darüber hinaus konnten in Teilbereichen des Proteinfragments auch Ähnlichkeiten zur α -Untereinheit der biotinabhängigen Oxalacetat-Decarboxylase aus *Klebsiella pneumoniae* (AC P13187) sowie zu Biotin-Carboxylase-Untereinheiten verschiedener Acyl-CoA-Carboxylasen gefunden werden. In **Abbildung 34** ist exemplarisch ein Sequenzvergleich der von dem *EcoRI*-Fragment abgeleiteten Peptidsequenz mit den Aminosäure-Sequenzen der Pyruvat-Carboxylasen von *M. tuberculosis* und *S. cerevisiae* (PYC2) dargestellt. Das corynebakterielle Polypeptid zeigt hohe Ähnlichkeit zum mittleren Abschnitt der Pyruvat-Carboxylasen. Es beginnt bei den Aminosäuren 275 bzw. 294 und endet bei den Aminosäuren 705 bzw. 758 der Pyruvat-Carboxylasen von *M. tuberculosis* und *S. cerevisiae*. Dieser Abschnitt des Proteins beinhaltet sowohl einen Teil der ATP-Bindedomäne als auch einen Teil der Pyruvat-Bindedomäne (Lim *et al.*, 1988). Dazwischen befindet sich in allen drei Sequenzen ein Bereich, der den Domänenübergang anzeigt. Die hohe Sequenzähnlichkeit zu allen bekannten Pyruvat-Carboxylasen, insbesondere zu der für das Substrat Pyruvat spezifischen Bindedomäne führte,

	10	20	30	40	50	60	70	80	
845	EEIEEAYAGADRVLGKLNK	PTPTSKVVGDLALALVGAGVSADE	FASDEARFGI	PESVLGFLRGELGDP	PGGWPEPLRTA				Mt
878	WAETKREYKERNYILGDLK	PTPTSKVVGDLAQFMVSNKLT	SDDIRRLANSLDFPDSVMD	FFEGLIGQPYGGFPEPLRSD					Sc
.....									
925	ALAGRGAARPTAQLAADDEIAL	SSVGAQRQATLNRL-----	LFPSPTKEFNEHREAYG	DTSQLSANQFFYGLRQGE					Mt
958	VLRNKRRRKLTCRPGLELE	PFDFLEKIREDLQNRFGDI	DECDVASNNMYPRVYED	FQKIRETYGDL SVLPTKN	FLAPAE PDE				Sc
.....									
996	EHRVKLERGVVELLIGLEA	ISEPDER-GMRTVMCTLNG	QLRPVLRDRSIASAVPAA	EKA DRGNPGHIAAP	EAG-VVT	GV			Mt
1038	EFEVTIEQGKTLIIKLOAV	CDLNKKTGQREVV FELNG	ELRKIRVADKSNIQSVAK	PKADVHDTHQIGAPMAG	VII	EVKV			Sc
.....									
1075	CVGERVGAGQTIATIEAMK	MEAPITAPVAGTVERVAV	SDTAEWRAETCWWW*-----						Mt
1118	HKGSLVKKGESIAVLSAMK	MEMVSSPADGQVKDVF	IRDGESVDASDLLVLEE	ETLPPSPKKVIFTR*					Sc
.....									

Abbildung 34: Aminosäure-Sequenzvergleich des aus einem 1,4 kb großen *EcoRI*-Fragments abgeleiteten Polypeptids aus *C. glutamicum* (Cg) mit den Pyruvat-Carboxylasen aus *M. tuberculosis* (Mt) und *S. cerevisiae* PYC2 (Sc). Die in allen drei Sequenzen identischen Aminosäuren sind fett dargestellt und mit einem Stern (*) gekennzeichnet, ähnliche Aminosäuren sind mit einem Punkt (.) gekennzeichnet. Die Pfeile geben die zur Isolierung verwendeten PCR-Primer pyc1 und pyc2 an. Die Schattierungen markieren die für die Pyruvat-Carboxylase aus *S. cerevisiae* beschriebenen ATP- und Pyruvat-Binde-domänen (Lim *et al.*, 1988).

IV. Diskussion

Anaplerotische Reaktionen sind von essentieller Bedeutung für alle lebenden Zellen. Sie füllen den Tricarbonsäure-Zyklus mit Intermediaten, die für Biosynthesen der Zellbausteine, z.B. der Aminosäuren abgezogen werden, wieder auf und sorgen damit für eine Aufrechterhaltung des Zyklus (Kornberg, 1966). Es wurde lange Zeit angenommen, daß das Aminosäure-produzierende Bakterium *C. glutamicum* nur über die PEP-Carboxylase als anaplerotisches Enzym bei Wachstum auf Glucose verfügt. In der vorliegenden Arbeit konnte bewiesen werden, daß die PEP-Carboxylase in *C. glutamicum* nicht das einzige C₃-carboxylierende anaplerotische Enzym ist. Anhand von physiologischen Untersuchungen mit definierten PEP-Carboxylase-negativen Mutanten von *C. glutamicum* wurde gezeigt, daß der Organismus über mindestens eine weitere anaplerotische Reaktion bei Wachstum auf Glucose verfügen muß. Die Markierungsexperimente mit H¹³CO₃⁻ ergaben dann, daß die Mutante mit der gleichen Rate CO₂ in Oxalacetat fixierte wie der Wildtyp. Das Ergebnis beweist, daß in *C. glutamicum* zusätzlich zur PEP-Carboxylase ein weiteres PEP- oder Pyruvat-carboxylierendes Enzym vorhanden und *in vivo* aktiv ist. Die Pyruvat-Carboxylase konnte eindeutig als dieses alternative anaplerotische Enzym in *C. glutamicum* nachgewiesen und charakterisiert werden. Außerdem wurden mit der PEP-Carboxykinase, dem *Malat-Enzym* und der Oxalacetat-Decarboxylase drei potentiell gluconeogenetisch aktive Enzyme in *C. glutamicum* nachgewiesen.

Mit der PEP-Carboxylase und der Pyruvat-Carboxylase besitzt *C. glutamicum* also zwei redundante anaplerotische Enzyme. Damit unterscheidet sich der Organismus von *E. coli*, das nur über die PEP-Carboxylase verfügt (Chao & Liao, 1993) und von *B. subtilis* (Diesterhaft & Freese, 1973) und *B. stearothermophilus* (Sundaram, 1973), die jeweils nur die Pyruvat-Carboxylase als anaplerotisches Enzym besitzen. In *E. coli* wurde die PEP-Carboxylase gezielt durch gengerichtete Mutagenese ausgeschaltet und eine solche Mutante konnte auf Glucose ohne Supplementation mit Succinat nicht wachsen (Chao & Liao, 1993). Das zeigt, daß die PEP-Carboxylase in *E. coli* im Gegensatz zu *C. glutamicum* für das Wachstum auf Glucose essentiell ist. Durch ungerichtete Mutagenese erhaltene Pyruvat-Carboxylase-negative Mutanten von *B. subtilis* und *B. stearothermophilus* zeigten ebenfalls nur Wachstum auf Glucose unter Supplementation mit Intermediaten des Tricarbonsäure-Zyklus (Diesterhaft & Freese, 1973; Sundaram, 1973). Das zeigt, daß in diesen Organismen die Pyruvat-Carboxylase als einziges anaplerotisches Enzym für die Verstoffwechselung von Glucose zur Verfügung steht. Bei *P. citronellolis*, *P. fluorescens*, *A. vinelandii* und *T. novellus* konnten genau wie bei *C. glutamicum* sowohl PEP-Carboxylase als auch Pyruvat-Carboxylase nachgewiesen werden (O'Brien *et al.*, 1976; Millrad de Forchetti *et al.*, 1976; Scrutton & Taylor,

1974; Liao & Atkinson, 1971; Charles & Willer, 1984). Bisher wurden jedoch keine detaillierten Untersuchungen zur Bedeutung des gleichzeitigen Vorkommens von PEP-Carboxylase und Pyruvat-Carboxylase in einem Organismus durchgeführt, sodaß unklar ist, welche Rolle dem einen und/oder anderen Enzym bei der anaplerotischen Funktion zukommt.

Enzyme der Stoffwechsel-Verzweigungspunkte PEP, Pyruvat und Oxalacetat in *C. glutamicum*

Die PEP-Carboxylase: Die Untersuchungen zu den kinetischen Eigenschaften der PEP-Carboxylase von *C. glutamicum* ergaben, daß sie mit dem für allosterische Enzyme typischen kooperativen Bindungsverhalten (Monod *et al.*, 1965) zum Substrat PEP, mit einem Hill-Koeffizienten von 1,6 und einer halbmaximalen Substratkonstante ($K_{0,5}$) von 3 mM PEP, ähnliche Charakteristika aufweist, wie das gereinigte Enzym aus *C. glutamicum* ssp. *flavum* (Ozaki & Shio, 1969; Mori & Shio, 1985a). Acetyl-CoA fungiert, wie auch bei der PEP-Carboxylase von *A. vinelandii* (Liao & Atkinson, 1971) und *Nitrosomonas europaea* (Takahashi *et al.*, 1993) als allosterischer Aktivator, denn die Zugabe dieses Effektors bewirkte eine Aufhebung der Kooperativität zum Substrat PEP. Aspartat wirkt mit einer Inhibitionskonstante von $< 0,5$ mM als Hemmstoff der corynebakteriellen PEP-Carboxylase. Das wurde ebenfalls bei den PEP-Carboxylasen von *E. coli* (Teraoka *et al.*, 1972; Teraoka *et al.*, 1974), *Streptomyces* C5 (Dekleva & Strohl, 1988), *P. fluorescens* (Higa *et al.*, 1976), *P. citronellolis* (O'Brien *et al.*, 1977) und *A. vinelandii* (Liao & Atkinson, 1971) nachgewiesen. Die Hemmung der PEP-Carboxylase von *C. glutamicum* durch Aspartat entspricht einer typischen *Feedback*-Regulation, da Aspartat direkt aus Oxalacetat, dem Produkt der anaplerotischen Reaktion, entsteht. Dagegen stellt Acetyl-CoA ein aktiviertes Zwischenprodukt der katabolen Verstoffwechslung von C-Quellen dar, das, wenn es sich anstaut, einen vermehrten anaplerotischen Bedarf signalisiert. Es ist daher verständlich, daß bei hohen Acetyl-CoA-Konzentrationen die anaplerotische Reaktion aktiviert wird. Andererseits deutet ein Anstau an Aspartat daraufhin, daß genügend Aminosäuren für die Synthese von Biomasse vorhanden sind, und somit keine weiteren Intermediate aus dem Tricarbonsäure-Zyklus abgezogen werden müssen. Es ist also sinnvoll, die anaplerotische Reaktion zu inhibieren. Diese Regulation entspricht dem klassischen Prinzip der Regulation einer anaplerotischen Reaktion nach Kornberg (1966).

Die PEP-Carboxylase von *C. glutamicum* zeigte, ähnlich wie das Enzym von *E. coli* (Teraoka *et al.*, 1970) die höchste spezifische Aktivität bei Wachstum auf Glucose. In Northern-Blot-Analysen zur Identifizierung des Transkripts des PEP-Carboxylase-Gens (*ppc*) konnte jedoch gezeigt werden, daß trotz der erhöhten Aktivität der PEP-Carboxylase bei

Wachstum auf Minimalmedium mit Glucose gegenüber Vollmedium nicht mehr *ppc*-spezifisches Transkript vorhanden ist (Schwinde *et al.*, 1993). Dieser Befund macht es unwahrscheinlich, daß die Regulation auf transkriptioneller Ebene stattfindet. Ob die Regulation der PEP-Carboxylase nun auf Translationsebene oder auf der Ebene einer posttranslationalen Modifikation des Proteins beruht, ist nicht geklärt. In diesem Zusammenhang ist jedoch interessant, daß PEP-Carboxylasen der C₄- und CAM-Pflanzen posttranslational durch reversible Phosphorylierung reguliert werden (Nimmo, 1993; Jiao & Chollet, 1991).

Die Pyruvat-Carboxylase: Seit Tosaka *et al.* (1979) das Vorhandensein einer Pyruvat-Carboxylase in *C. glutamicum* ssp. *lactofermentum* postulierten, haben eine Reihe von Autoren erfolglos versucht, das Enzym in Rohextrakten von *C. glutamicum* nachzuweisen (Gubler *et al.*, 1994b; Jetten *et al.*, 1994b; Cocaign-Bousquet & Lindley, 1995; Jetten & Sinskey, 1995a). Auch im Rahmen dieser Arbeit gelang es nicht, Pyruvat-Carboxylase im Rohextrakt von *C. glutamicum* nachzuweisen. Da die Möglichkeit bestand, daß das Enzym sehr labil ist und in Rohextrakten durch die Ultraschall-Behandlung inaktiviert wird, wurde ein Test etabliert und optimiert, um die Pyruvat-Carboxylase *in situ*, d.h. in permeabilisierten Zellen von *C. glutamicum*, zu messen. Bei anderen Organismen konnte gezeigt werden, daß Pyruvat-Carboxylasen sehr instabil sein können. Die gereinigte Pyruvat-Carboxylase von *A. niger* ist z.B. kälteempfindlich und verliert nach zwei Stunden im Eisbad ca. 70 % der Aktivität (Feir & Suzuki, 1969). Auch in Rohextrakten von *A. globiformis* war die Pyruvat-Carboxylase-Aktivität bei 0°C wesentlich instabiler als bei Raumtemperatur (Gurr & Jones, 1977). Außerdem gibt es Fälle, in denen die Aktivität eines Enzyms in permeabilisierten Zellen wesentlich höher ist als in zellfreien Extrakten, wie es z.B. für die Alkohol-Dehydrogenase von Hefe gezeigt werden konnte (Gowda *et al.*, 1988).

Mit dem in dieser Arbeit entwickelten Testsystem für permeabilisierte Zellen gelang es erstmals Pyruvat-Carboxylase reproduzierbar in *C. glutamicum* nachzuweisen. Die spezifische Aktivität betrug zwischen 15 und 50 mU/mg TG. Unter der Annahme, daß ca. 50 % der Trockenmasse von *C. glutamicum* aus Protein besteht (Marx *et al.*, 1995), würde das einer spezifischen Aktivität von 30 bis 100 mU/mg Protein entsprechen. Diese Aktivitäten sind mit denen der Pyruvat-Carboxylase von *Rhizobium etli* mit 30 bis 50 mU/mg Protein vergleichbar (Encarnación *et al.*, 1995) und liegen etwas höher als in *B. subtilis* mit 11 bis 20 mU/mg Protein (Fisher & Magasanik, 1984; Diesterhaft & Freese, 1973).

Die Pyruvat-Carboxylase von *C. glutamicum* ist strikt abhängig von Mg²⁺-Ionen, wie es für die entsprechenden Enzyme aus *P. fluorescens*, *A. vinelandii*, *B. stearothermophilus*, *R. capsulatus* und Hefe beschrieben wurde (Milrad de Forchetti & Cazzulo, 1976; Scrutton & Taylor, 1974; Cazzulo *et al.*, 1970; Modak & Kelly, 1995; Cazzulo & Stoppani, 1969). Die Pyruvat-Carboxylasen der Vertebraten bevorzugen dagegen Mn²⁺-Ionen (Attwood, 1995).

Der K_m -Wert der Pyruvat-Carboxylase aus *C. glutamicum* für das Substrat Pyruvat betrug 1,3 mM und kommt damit den K_m -Werten der entsprechenden Enzyme von *A. globiformis* und Hefe, mit 1,9 mM bzw. 0,8 mM Pyruvat am nächsten (Gurr & Jones, 1977; Ruiz-Amil *et al.*, 1965). Der K_m -Wert für ATP ist mit 0,2 mM mit denen der meisten anderen Pyruvat-Carboxylasen zu vergleichen, die zwischen 0,05 und 0,4 mM liegen (Milrad de Forchetti & Cazzulo, 1976; Scrutton & Taylor, 1974; Cazzulo *et al.*, 1970; Charles & Willer, 1984; Modak & Kelly, 1995; Osmani *et al.*, 1981; Feir & Suzuki, 1969; Keech & Utter, 1963).

Die Pyruvat-Carboxylase von *C. glutamicum* wird durch ADP und AMP gehemmt, wobei AMP mit einem K_i -Wert von ca. 0,8 mM wesentlich effektiver hemmt als ADP mit einem K_i -Wert von 2,6 mM. Ein analoger Einfluß von ADP und AMP konnte auch für die Pyruvat-Carboxylasen von *R. capsulatus* (Modak & Kelly, 1995), *P. fluorescens* (Milrad de Forchetti & Cazzulo, 1976), *B. stearothermophilus* (Scrutton & Taylor, 1974), *S. cerevisiae* (Cazzulo & Stoppani, 1969) und aus der Schweineleber (Warren & Tripton, 1974) gezeigt werden. Damit wird die Aktivität der Pyruvat-Carboxylase durch eine niedrige Energieladung (Atkinson, 1977) der Zelle gehemmt.

Ein wesentlicher Unterschied der Pyruvat-Carboxylase von *C. glutamicum* zu anderen bekannten Pyruvat-Carboxylasen ist die Hemmung durch Acetyl-CoA. Pyruvat-Carboxylasen können aufgrund des Einflusses von Acetyl-CoA auf die Aktivität in drei Klassen unterteilt werden (Scrutton & Young, 1972): (1) strikt Acetyl-CoA-abhängige Pyruvat-Carboxylasen (Modak & Kelly, 1995; Scrutton & Young, 1972), (2) Pyruvat-Carboxylasen, deren Grundaktivität durch Acetyl-CoA gesteigert werden kann (Scrutton & Young, 1972) und (3) Pyruvat-Carboxylasen, auf die Acetyl-CoA keinen Einfluß hat (Feir & Suzuki, 1969; Milrad de Forchetti & Cazzulo, 1976; Scrutton & Taylor, 1974). Es konnte bisher jedoch für keine Pyruvat-Carboxylase gezeigt werden, daß Acetyl-CoA das Enzym hemmt. Interessanterweise werden in den meisten Organismen, in denen PEP-Carboxylase und Pyruvat-Carboxylase gemeinsam vorkommen, die PEP-Carboxylasen klassisch durch Acetyl-CoA aktiviert, die Pyruvat-Carboxylasen jedoch durch Acetyl-CoA nicht beeinflusst (Higa *et al.*, 1976; O'Brien *et al.*, 1976; Milrad de Forchetti *et al.*, 1976; Scrutton & Taylor, 1974; Liao & Atkinson, 1971). Die möglichen Einflüsse von Aspartat oder α -Ketoglutarat auf die Pyruvat-Carboxylase von *C. glutamicum*, wie sie für *R. capsulatus* (Modak & Kelly, 1995), *A. globiformis* (Gurr & Jones, 1977) und *S. cerevisiae* (Cazzulo & Stoppani, 1968) beschrieben wurden, konnten in dieser Arbeit nicht bestimmt werden, da beide Metabolite nicht als Effektoren in den hier verwendeten Test eingesetzt werden konnten.

Die Pyruvat-Carboxylase von *C. glutamicum* ist wie alle bisher bekannten Pyruvat-Carboxylasen ein Biotin enthaltendes Enzym. Da *C. glutamicum* Biotin-auxotroph ist (Kinoshita *et al.*, 1957), ist es wahrscheinlich, daß der Organismus über biotinabhängige

Proteine verfügt. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, daß *C. glutamicum* zwei Proteine besitzt, die über Biotin als kovalent gebundenes Coenzym verfügen. Sie weisen im denaturierten Zustand Größen von ca. 70 kDa (p70) und ca. 120 bis 130 kDa (p125) auf. Darüberhinaus konnten gute Hinweise dafür gefunden werden, daß es sich bei p125 um die Pyruvat-Carboxylase handelt. Einerseits entspricht die Größe des Proteins mit 120 bis 130 kDa der Größe der Untereinheiten der meisten Pyruvat-Carboxylasen, die als Homotetramere aus Untereinheiten von 110 bis 140 kDa vorliegen und sowohl in Eukaryoten als auch in Prokaryoten gefunden werden (Barden *et al.*, 1975; Zhang *et al.*, 1993; MacKay *et al.*, 1994; Lim *et al.*, 1988; Osmani *et al.*, 1984; Libor *et al.*, 1975; Libor *et al.*, 1979; Samols *et al.*, 1988; Toh *et al.*, 1993). Ausnahmen bilden allerdings die Pyruvat-Carboxylasen von *P. citronellolis* und *A. vinelandii*, die als Heterodimere aktiv sind (Taylor *et al.*, 1972; Goss *et al.*, 1981; Fuchs *et al.*, 1988; Scrutton & Taylor, 1974) und aus einer biotinhaltigen Untereinheit von 65 kDa und einer nicht-biotinhaltigen Untereinheit von 55 kDa bestehen (Goss *et al.*, 1981). Desweiteren weisen folgende Befunde darauf hin, daß es sich bei p125 von *C. glutamicum* um die Pyruvat-Carboxylase handelt: Der Gehalt an p125 in Rohextrakten von *C. glutamicum*-Zellen, die unter Biotin-Mangel kultiviert wurden, nahm im Verlauf des Wachstums viel eher ab als der Gehalt an p70 und zusätzlich konnte unter diesen Wachstumsbedingungen keine signifikante Pyruvat-Carboxylase-Aktivität mehr nachgewiesen werden. Weiterhin wies die Pyruvat-Carboxylase-negative *C. glutamicum* Mutante SP733 eine deutlich verringerte Menge an p125 im Rohextrakt gegenüber dem Wildtyp auf, wohingegen der Gehalt an p70 vergleichbar war. Außerdem zeigte das sequenzierte DNA-Fragment, das aus *C. glutamicum* isoliert werden konnte, große Ähnlichkeit zu bekannten *pyc*-Genen. Diese *pyc*-Gene kodieren alle für Proteine, die ca. 130 kDa groß sind (Lim *et al.*, 1988; Brewster *et al.*, 1994; Wexler *et al.*, 1994; MacKay *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1993).

Ein Randaspekt der vorliegenden Arbeit lag in der Identifizierung des biotinhaltigen Proteins p70. Die fünfzehn N-terminalen Aminosäuren von p70 zeigten die größte Übereinstimmung zu dem N-terminalen Bereich der Acyl-CoA-Carboxylase von *M. leprae* (Norman *et al.*, 1994) mit 91 % Ähnlichkeit und 66 % Identität. Das Protein wurde in Zusammenarbeit mit W. Jäger (Universität Bielefeld) weiter analysiert und Jäger *et al.* (1996) gelang die Isolierung des Gens für p70 aus *C. glutamicum*. Das gesamte Protein, das von einem offenen Leseraster mit 1773 bp abgeleitet wurde, zeigte über 70 % Identität zu der biotintragenden Untereinheit der Acyl-CoA-Carboxylase von *M. leprae*. Sequenzvergleiche mit anderen Biotin enthaltenden Proteinen ergaben, daß das corynebakterielle und das mycobakterielle Protein die größte Ähnlichkeit zu Acetyl-CoA-Carboxylasen aufweisen (Norman *et al.*, 1994; Jäger *et al.*, 1996; Li & Cronan, 1992). Es kann daher davon ausgegangen werden, daß p70 tatsächlich der biotintragenden Untereinheit der Acetyl-CoA-Carboxylase entspricht.

Die PEP-Carboxykinase: Die PEP-Carboxykinase von *C. glutamicum* kann *in vitro* die Carboxylierung von PEP zu Oxalacetat unter Verwendung von IDP bzw. GDP katalysieren und kam damit zunächst als zur PEP-Carboxylase alternatives anaplerotisches Enzym in Frage. Die Abhängigkeit von IDP/GDP unterscheidet die corynebakterielle PEP-Carboxykinase von den ADP-abhängigen PEP-Carboxykinasen aus *E. coli* und den meisten anderen Prokaryoten (Medina *et al.*, 1990; Utter & Kolenbrander, 1972). Für *Alcaligenes eutrophus* wurde ebenfalls eine GDP-abhängige PEP-Carboxykinase beschrieben, die sowohl eine gluconeogenetische, als auch eine anaplerotische Funktion hat (Schobert & Bowien, 1984). Die Affinität der PEP-Carboxykinase zu IDP in Rohextrakten von *C. glutamicum* war mit einem K_m -Wert von 0,5 mM um Faktor 10 niedriger als zu GDP (K_m -Wert = 0,05 mM). Ähnliches konnte auch für die PEP-Carboxykinase von *Ascaris suum* gezeigt werden (Rohrer *et al.*, 1986). Gleichzeitig zu den hier vorgestellten Arbeiten konnten Jetten und Sinskey (1993) die PEP-Carboxykinase aus *C. glutamicum* aufreinigen und charakterisieren. Der K_m -Wert der gereinigten PEP-Carboxykinase aus *C. glutamicum* für IDP lag ebenfalls bei 0,5 mM, doch konnte für die gereinigte PEP-Carboxykinase keine Aktivität mit GDP als Substrat gefunden werden (Jetten & Sinskey, 1993). Die im Rohextrakt ermittelten K_m -Werte für PEP und HCO_3^- lagen bei 0,15 mM bzw. 30 mM, und entsprachen in der Größenordnung denen des gereinigten Enzyms von 0,7 mM bzw. 12 mM (Jetten & Sinskey, 1993). Die weitere Charakterisierung ergab, daß die PEP-Carboxykinase aus *C. glutamicum*, wie die aus anderen Organismen, strikt von Mn^{2+} -Ionen abhängig ist (Urbina, 1987; Rohrer *et al.*, 1986; Hebda & Nowak, 1982). Die Aktivität konnte durch Zugabe von Mg^{2+} -Ionen gesteigert werden, wie es auch bei der PEP-Carboxykinase von *Anaerobiospirillum succiniciproducens* gefunden wurde (Podkovyrov & Zeikus, 1993).

Ein wichtiger Befund ist, daß die PEP-Carboxykinase durch ADP und ATP gehemmt wurde. 1 mM ADP hemmte das Enzym im Rohextrakt zu 50 %. Der K_i -Wert für ATP lag im Rohextrakt bei 7,6 mM wohingegen das gereinigte Enzym schon durch 100 μM ATP zu 60 % gehemmt wurde (Jetten & Sinskey, 1993). Die Diskrepanz zwischen diesen beiden Ergebnissen könnte durch das Vorhandensein eines Aktivators der PEP-Carboxykinase im Rohextrakt, der bisher nicht identifiziert wurde, erklärt werden. Ein ähnlicher Effekt konnte auch bei kinetischen Untersuchungen zur Isocitrat-Lyase von *C. glutamicum* beobachtet werden. Hier hemmte PEP die gereinigte Isocitrat-Lyase signifikant, obwohl im Rohextrakt kein Einfluß dieses Metaboliten gemessen werden konnte (Reinscheid, 1994; Reinscheid *et al.*, 1994b; Ozaki & Shiiio, 1968). Aufgrund der Hemmung der PEP-Carboxykinase durch ATP ist es unwahrscheinlich, daß die PEP-Carboxykinase bei physiologischen ATP-Konzentrationen von 2 bis 10 mM in *C. glutamicum* (Liebl, 1991; Gutmann, 1993) tatsächlich anaplerotisch aktiv ist. Der zusätzliche Befund, daß die decarboxylierende Reaktion der PEP-Carboxykinase mehr als zehnmal

aktiver ist als die carboxylierende Richtung bestärkt die These, daß es sich bei der PEP-Carboxykinase von *C. glutamicum* um ein gluconeogenetisches Enzym handelt (Jetten & Sinskey, 1993; Gubler *et al.*, 1994b; Jetten & Sinskey, 1995b).

Das Malat-Enzym: In *C. glutamicum* wurde eine NADP⁺-abhängige, decarboxylierende Malat-Dehydrogenase (*Malat-Enzym*) nachgewiesen, die irreversibel Malat zu Pyruvat umsetzt. Eine Malat-bildende Aktivität konnte selbst am partiell gereinigten Enzym mit einem drastischen Überschuß der Substrate Pyruvat (20 mM) und Bicarbonat (100 mM) nur mit 2 % der decarboxylierenden Aktivität gemessen werden. Damit verhält sich das Enzym ähnlich wie das *Malat-Enzym* von *T. cruzi*, daß in der carboxylierenden Reaktion nur ca. 2,5 % der decarboxylierenden Aktivität aufwies und als nicht-carboxylierendes Enzym beschrieben wurde (Cazzulo *et al.*, 1977).

Das *Malat-Enzym* von *C. glutamicum* ist, genau wie die entsprechenden Enzyme von *E. coli* (Sanwal *et al.*, 1968) und *Neurospora crassa* (Zink, 1967) strikt NADP⁺-abhängig und gehört damit zum *Malat-Enzym*-Typ EC 1.1.1.40 (Outlaw & Springer, 1983). Darüberhinaus weist das *Malat-Enzym* von *C. glutamicum* ein kooperatives Bindungsverhalten zum Substrat Malat auf, was auf eine allosterische Regulation des Enzyms hindeutet. Ähnliches wurde auch für das *Malat-Enzym* von *E. coli* beschrieben, das allerdings erst in Anwesenheit des Inhibitors Acetyl-CoA eine sigmoide Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Malat-Konzentration aufwies (Sanwal *et al.*, 1968). Bei Wachstum auf Acetat konnte in Rohextrakten von *C. glutamicum* keine *Malat-Enzym*-Aktivität nachgewiesen werden, was den Schluß nahe legt, daß die Funktion des Enzyms, zumindest bei Wachstum auf Acetat, wahrscheinlich nicht in der Gluconeogenese liegt. Ähnliches konnte auch für die *Malat-Enzyme* von *N. crassa* (Zink, 1967) und *P. putida* (Jacobson *et al.*, 1966) gezeigt werden. Die Funktion des *Malat-Enzyms* von *C. glutamicum* könnte darin liegen, in Kombination mit der Pyruvat-Carboxylase und der Malat-Dehydrogenase aus NADH, das in der Umsetzung von Oxalacetat zu Malat verbraucht wird, anabol verwertbares NADPH zu bilden. Die Regenerierung des Oxalacetats kann dann direkt über die Pyruvat-Carboxylase-Reaktion unter Verbrauch von ATP erfolgen (Abbildung 35). Dieser Zyklus erscheint sinnvoll unter dem Aspekt, daß *C. glutamicum* vermutlich keine Transhydrogenase-Aktivität besitzt, die die Bildung von NADPH aus NADH direkt katalysiert (D. Molenaar, pers. Mitteilung; Coccagn-Bousquet & Lindley, 1995).

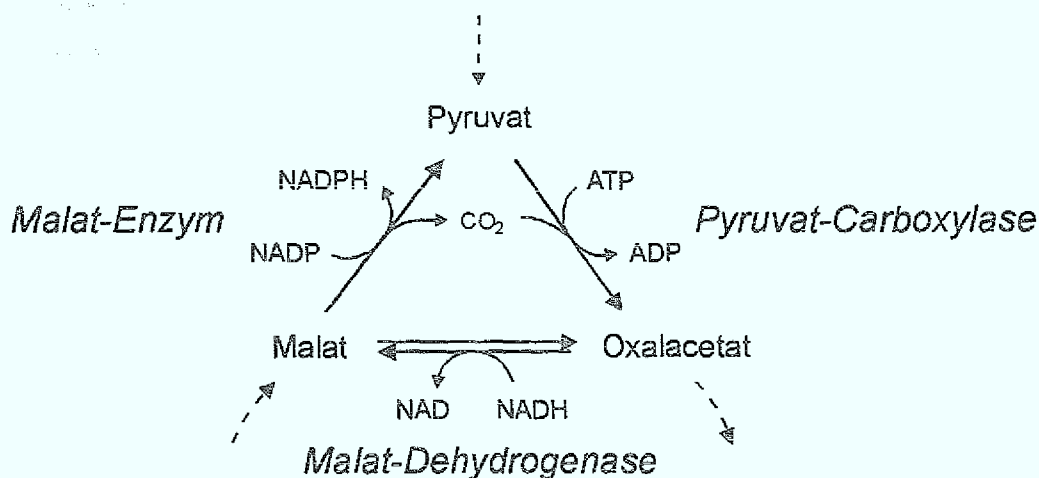


Abbildung 35: Möglicher Reaktionsverlauf zur Regenerierung von NADPH aus NADH und ATP über die Reaktionen der Pyruvat-Carboxylase, der Malat-Dehydrogenase und des *Malat-Enzyms* in *C. glutamicum*.

Die Oxalacetat-Decarboxylase: Auch die in dieser Arbeit nachgewiesene Oxalacetat-Decarboxylase konnte nur in der decarboxylierenden Richtung gemessen werden. Gleichzeitig zu den Untersuchungen im Rohextrakt gelang Jetten und Sinskey (1995a) die Aufreinigung der Oxalacetat-Decarboxylase aus *C. glutamicum*, und sie konnten ebenfalls zeigen, daß das Enzym nur die Bildung von Pyruvat aus Oxalacetat katalysieren kann. Damit war nachgewiesen, daß *C. glutamicum* über eine irreversible Oxalacetat-Decarboxylase verfügt, wie es auch für die Oxalacetat-Decarboxylase der Hühnerleber gezeigt wurde (Utter & Kurahashi, 1955). Damit stellt das Enzym wie die PEP-Carboxykinase und das *Malat-Enzym* kein anaplerotisches Enzym dar. Da aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit davon ausgegangen werden kann, daß *C. glutamicum* nicht über eine PEP-Synthetase-Reaktion verfügt, ist es unwahrscheinlich, daß die Oxalacetat-Decarboxylase eine Rolle bei der Gluconeogenese spielt. Das Vorhandensein einer PEP-Synthetase wurde zwar für *C. glutamicum* vorgeschlagen (Jetten *et al.*, 1994b), jedoch deutet der Befund, daß die Pyruvat-Carboxylase-negative Mutante SP733 nicht in der Lage war auf Lactat oder Pyruvat als C-Quelle zu wachsen, darauf hin, daß das Enzym in *C. glutamicum* nicht aktiv, oder nicht vorhanden ist. Da der gleiche Wachstumseffekt auch durch Biotin-Mangel im Wildtyp erzeugt werden kann, ist es unwahrscheinlich, daß in der Pyruvat-Carboxylase-negativen Mutante auch ein Defekt in der PEP-Synthetase vorliegt. Die Funktion der Oxalacetat-Decarboxylase ist demnach unklar. Das Enzym wird im Gegensatz zu allen anderen Oxalacetat-Decarboxylasen

nicht durch Acetyl-CoA, sondern durch Coenzym A und ADP inhibiert (Jetten & Sinskey, 1995a/b). Das Enzym könnte die kürzlich in *C. glutamicum* anhand von ^{13}C -Markierungsexperimenten und Kohlenstofffluß-Analysen unter normalen Wachstumsbedingungen auf Glucose nachgewiesenen *futile cycles* am PEP- und Pyruvat-Verzweigungspunkt erklären (V. Wendisch, A. Marx, pers. Mitteilungen). Daher erscheint es sinnvoll, daß die Oxalacetat-Decarboxylase durch Metabolite wie Coenzym A und ADP gehemmt wird, um die Bildung von Pyruvat, und damit den Verlust von C_4 -Metaboliten unter Energiemangel zu verhindern.

Die Bedeutung der PEP-Carboxylase von *C. glutamicum* für das Wachstum und die Aminosäure-Produktion

Die Charakterisierung des Wachstums der definierten PEP-Carboxylase-negativen Mutanten von *C. glutamicum* ergab, daß sie genauso gut wie die Ausgangsstämme auf Glucose, Lactat oder Acetat als C-Quelle wuchsen. Identisch verhielt sich auch eine definierte PEP-Carboxylase- / Isocitrat-Lyase-Doppelmutante von *C. glutamicum*. Diese Ergebnisse zeigen erstmals eindeutig, daß die PEP-Carboxylase von *C. glutamicum* nicht essentiell für das Wachstum ist. Mit dem $^{13}\text{CO}_2$ -Markierungsexperiment konnte gezeigt werden, daß auch ohne PEP-Carboxylase Carboxylierung von PEP oder Pyruvat wie im Wildtyp stattfindet, und daß somit die Pyruvat-Carboxylase die anaplerotische Funktion voll ersetzen kann. Damit verhalten sich die hier konstruierten PEP-Carboxylase-negativen Mutanten von *C. glutamicum* anders als die von Shii & Ujigawa (1978) beschriebenen PEP-Carboxylase-negativen Mutanten von *C. glutamicum* ssp. *flavum*. Diese wurden nach ungerichteter Mutagenese isoliert und zeichneten sich dadurch aus, daß sie Glutamat-auxotroph waren. Solche ungerichtet hergestellten Mutanten durchlaufen häufig viele Mutageneseschritte (Shii & Ujigawa, 1978; Yokota & Shii, 1988; Katsumata & Kino, 1989; Tosaka *et al.*, 1979), was eine Reihe nicht vorhersehbarer Defekte zur Folge haben kann. So zeigte sich nach gezielter Mutagenese des Gens für die Glutamat-Dehydrogenase aus *C. glutamicum*, daß das Enzym nicht essentiell für das Wachstum ist (Börmann-Ei Kholý *et al.*, 1993), obwohl vorher Mutanten beschrieben waren, die mit einer defekten Glutamat-Dehydrogenase nicht mehr ohne Supplementation mit Glutamat wachsen konnten (Shii & Ujigawa, 1978). Es liegt daher der Schluß nahe, daß in den durch ungerichtete Mutagenese erzeugten PEP-Carboxylase-negativen Mutanten (Shii & Ujigawa, 1978) wahrscheinlich weitere, nicht charakterisierte Defekte vorlagen, die die falschen Schlußfolgerungen in Bezug auf die Bedeutung der PEP-Carboxylase erklären können.

C. glutamicum ist besonders bei der Produktion von Aminosäuren, die sich aus Vorstufen des Tricarbonsäure-Zyklus ableiten, auf die Aktivität anaplerotischer Enzyme angewiesen. Obwohl in früheren Untersuchungen gezeigt wurde, daß die Lysin-

Produktion durch eine deregulierte PEP-Carboxylase-Aktivität in einer Lysin-überproduzierenden Mutante von *C. glutamicum* ssp. *flavum* gesteigert werden konnte (Yokota & Shii, 1988), führte aber die fast 20-fache Überexpression des *ppc*-Gens im Lysin-Produktionsstamm MH20-22B nur zu einer ca. 20 %-igen Erhöhung der Lysin-Ausbeute (Cremer *et al.*, 1991). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß das Fehlen der PEP-Carboxylase keinen Einfluß auf die Bildung von Lysin hatte. Dieses Ergebnis konnte später von Gubler *et al.* (1994a) für einen weiteren Lysin-Produktionsstamm von *C. glutamicum* bestätigt werden. Es zeigt sich also, daß die Steigerung der anaplerotischen PEP-Carboxylase zu einer Produktionssteigerung führen kann, jedoch stellt möglicherweise die *Feedback*-Regulation der PEP-Carboxylase durch Aspartat eine Limitation dar, da nicht im gleichen Maß Lysin überproduziert, wie das *ppc*-Gen überexprimiert wurde. Der Verlust der PEP-Carboxylase kann dagegen wahrscheinlich durch die Pyruvat-Carboxylase voll kompensiert werden. Andererseits läßt die Inhibition der PEP-Carboxylase von *C. glutamicum* durch Aspartat vermuten, daß dem Enzym dennoch eine Bedeutung für die Bereitstellung von Vorstufen für die Synthese der Aminosäuren der Aspartat-Familie, Lysin, Threonin, Isoleucin und Methionin, die für das Wachstum benötigt werden, zukommt. Darüberhinaus zeigte sich bei den Versuchen zur Glutamat-Produktion mit der PEP-Carboxylase-negativen Mutante, daß diese bei Wachstum auf Glucose unter Biotin-Limitierung kein Glutamat sezerniert und vor allem intern deutlich weniger Glutamat akkumuliert als der Wildtyp. Das deutet daraufhin, daß die PEP-Carboxylase wahrscheinlich das anaplerotische Enzym in *C. glutamicum* darstellt, das für die Glutamat-Synthese mit biotinlimitierten Zellen verantwortlich ist. Diese Hypothese wird in Zukunft anhand von definierten Pyruvat-Carboxylase-negativen Mutanten sowie Pyruvat-Carboxylase- / PEP-Carboxylase-negativen Doppelmutanten überprüft.

Die Bedeutung der Pyruvat-Carboxylase von *C. glutamicum* für das Wachstum und die Aminosäure-Produktion

Die Analyse der spezifischen Aktivität der Pyruvat-Carboxylase, Wachstumsexperimente mit der PEP-Carboxylase-negativen Mutante unter Biotin-Mangel sowie Untersuchungen zu Pyruvat-Carboxylase-negativen Mutanten von *C. glutamicum* ergaben, daß die Pyruvat-Carboxylase von *C. glutamicum* eine besondere Bedeutung bei Wachstum auf Lactat hat. So war die spezifische Aktivität der Pyruvat-Carboxylase von *C. glutamicum* bei Wachstum auf Lactat mit 40 bis 50 mU/mg TG zwei- bis dreimal höher als bei Wachstum auf Glucose oder Acetat. Ähnliches wurde auch für die Pyruvat-Carboxylase von *A. vinelandii* (Scrutton & Taylor, 1974), *Rhodopseudomonas spheroides* (Payne & Morris, 1969), *R. capsulatus* (Willson, 1988) und *S. cerevisiae* (Young *et al.*, 1969) gezeigt. Der Einfluß der C-Quelle Lactat auf die spezifische Aktivität der Pyruvat-Carboxylase von *C. glutamicum* deutet daraufhin, daß das Enzym auf genetischer Ebene regu-

liert wird. Eine Regulation der Genexpression durch die C-Quelle findet z.B. in *S. cerevisiae* bei beiden Genen der Pyruvat-Carboxylase-Isoenzyme PYC1 und PYC2 statt (Brewster *et al.*, 1994). In *P. citronellolis* konnte gezeigt werden, daß in Abhängigkeit von der C-Quelle die Protein-Menge des Enzyms variiert (Taylor *et al.*, 1975). Darüberhinaus war die Pyruvat-Carboxylase von *C. glutamicum* unter Biotin-Mangel, mit weniger als 5 mU/mg TG sowohl auf Lactat und Glucose als auch auf Acetat kaum noch aktiv. Ähnliches wurde auch für die Pyruvat-Carboxylase der Biotin-auxotrophen Bakterien *B. coagulans* (Cazzulo *et al.*, 1969) und *B. stearothermophilus* (Sundaram, 1973) bei Wachstum auf Glucose oder Acetat mit und ohne Biotin gefunden. Bei den thermophilen Bacillus-Arten *B. coagulans* und *B. stearothermophilus* wird die Pyruvat-Carboxylase als inaktives Apoenzym gebildet und, sobald Biotin vorhanden ist, wird das Enzym durch die Biotin-Holocarboxylase-Synthetase an einem konservierten Lysin-Rest zum aktiven Holoenzym biotinyliert (Cazzulo *et al.*, 1969; Cazzulo *et al.*, 1971; Dakshinamurti & Chauhan, 1988). Analog könnte die Pyruvat-Carboxylase von *C. glutamicum*, wie für *B. coagulans* und *B. stearothermophilus* beschrieben (Cazzulo *et al.*, 1969; Cazzulo *et al.*, 1971), als inaktives Apoenzym gebildet und durch Biotinylierung in die aktive Form überführt werden. Diese Regulation auf posttranslationaler Ebene sollte unabhängig von der Regulation durch die C-Quelle sein, da die Aktivitätserhöhung bei Anwesenheit von Biotin auf allen getesteten Medien zu beobachten war.

Neben der erhöhten spezifischen Aktivität der Pyruvat-Carboxylase von *C. glutamicum* bei Wachstum auf Lactat konnte gezeigt werden, daß unter Biotin-Mangel, wenn die Pyruvat-Carboxylase nicht aktiv war, das Wachstum auf Lactat drastisch eingeschränkt war. Das deutet stark darauf hin, daß die biotinabhängige Pyruvat-Carboxylase für das Wachstum auf dieser C-Quelle benötigt wird, zumal durch die Zugabe von Fumarat, einem Intermediat des Tricarbonsäure-Zyklus, und damit einem indirekten Produkt der anaplerotischen Reaktion, die Wachstumslimitierung auf Lactat wieder aufgehoben werden konnte. Dies konnte für *B. stearothermophilus*, der über Pyruvat-Carboxylase als einziges anaplerotisches Enzym verfügt und ebenfalls Biotin-auxotroph ist, unter ähnlichen Wachstumsbedingungen gezeigt werden (Sundaram, 1973). Die Pyruvat-Carboxylase-negativen Mutanten von *C. glutamicum*, die trotz Biotin-Überschuß nicht mehr in der Lage waren, auf Lactat oder Pyruvat als C-Quelle zu wachsen, konnten ebenfalls durch die Zugabe von Fumarat wieder wachsen. Ein vergleichbarer Phänotyp wurde für Pyruvat-Carboxylase-negative Mutanten von *B. stearothermophilus* (Sundaram, 1973), *R. capsulatus* (Willson, 1988) und *R. spheroides* (Payne & Morris, 1969) beschrieben. Damit ist die Pyruvat-Carboxylase eindeutig als anaplerotisches Enzym in *C. glutamicum* aktiv.

Es zeigte sich ein deutlicher Einfluß der Pyruvat-Carboxylase auf die Überproduktion von Lysin mit *C. glutamicum*. Sobald die Pyruvat-Carboxylase durch Biotin-Mangel in

ihrer Aktivität limitiert war, wurde weniger Lysin produziert als unter Biotin-Überschuß. Diese Biotin-Limitierung führte jedoch noch nicht zu einer Sezernierung von Glutamat, was eventuell die verringerte Lysin-Produktion erklären könnte. Damit zeigt das Ergebnis, daß der Pyruvat-Carboxylase von *C. glutamicum* neben ihrer Bedeutung für die Anaplerotik bei Wachstum auf Lactat, auch eine prominente Rolle bei der Bereitstellung von Oxalacetat für die Überproduktion von Aminosäuren zukommt. Dieses Ergebnis wird durch den Befund bestätigt, daß eine definierte Pyruvat-Kinase-negative Mutante deutlich weniger Lysin produziert als der Ausgangstamm (Gubler *et al.*, 1994a). Eine solche Mutante kann zwar auf Glucose wachsen, da sie Pyruvat über das Phosphotransferase-System aus PEP synthetisieren kann (Malin & Bourd, 1991), doch reicht die Menge vermutlich nicht mehr für eine Überproduktion von Lysin aus.

Kontrolle der anaplerotischen Reaktionen von *C. glutamicum* bei Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoff-Quellen

Mit der vorliegenden Arbeit konnten neue Erkenntnisse über anaplerotische Reaktionen in *C. glutamicum* gewonnen werden. Damit stellen sich die zentralen Stoffwechsel-Verzweigungspunkte der Intermediate PEP, Pyruvat und Oxalacetat erheblich komplexer dar, als bis vor kurzem angenommen (Abbildung 36).

Neben den zwei anaplerotischen Enzymen PEP-Carboxylase und Pyruvat-Carboxylase, die bei Wachstum auf Glucose für die Nettosynthese von Oxalacetat aus C_3 -Vorstufen zur Verfügung stehen, stellt der Glyoxylat-Zyklus eine weitere anaplerotisch aktive Sequenz in *C. glutamicum* dar, der in einigen *Arthrobacter*-Stämmen als einziger anaplerotischer Weg bei Wachstum auf Glucose beschrieben ist (Krulwich & Pelliccione, 1979) und der als zusätzlicher anaplerotischer Weg in *C. glutamicum* diskutiert wird (Jetten *et al.*, 1994b; de Hollander, 1994; Jetten & Sinskey, 1995b). In der vorliegenden Arbeit konnte der Glyoxylat-Zyklus jedoch als anaplerotische Sequenz bei Wachstum auf Glucose ausgeschlossen werden.

Die PEP-Carboxylase und die Pyruvat-Carboxylase werden durch einige interne Metabolite reguliert: Während Aspartat die PEP-Carboxylase allosterisch inhibiert, reguliert die Energieladung die Pyruvat-Carboxylase in Form einer Inhibition durch die Metabolite AMP und ADP. Acetyl-CoA reguliert darüberhinaus beide Enzyme gegenläufig, d.h. einerseits aktiviert es die PEP-Carboxylase und andererseits inhibiert es die Pyruvat-Carboxylase. Kürzlich wurde Acetyl-CoA als Regulator des Acetat-Stoffwechsels identifiziert (Spies, 1996; Reinscheid, 1994). Hier zeigte sich, daß die Acetyl-CoA-Konzentration in der Zelle von der C-Quelle abhängig ist. Hohe Acetyl-CoA-Konzentrationen korrelierten mit hohen Aktivitäten der Enzyme des Acetat-Stoffwechsels, d.h. auch der Glyoxylat-Zyklus-Enzyme. Bei Wachstum auf Glucose ist die Acetyl-CoA-Konzentration

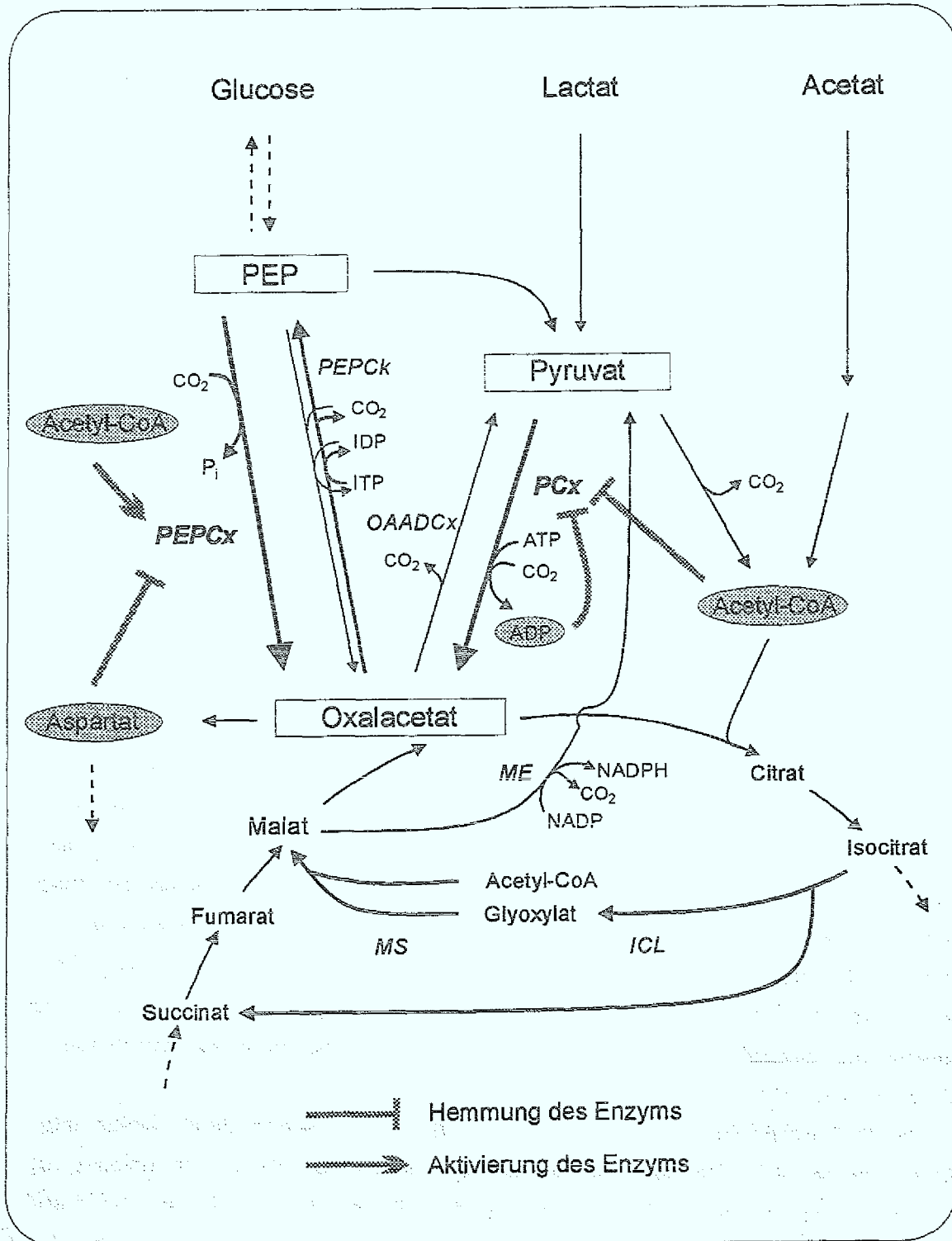


Abbildung 36: Schematische Darstellung der Stoffwechsel-Verzweigungspunkte der zentralen Intermediate PEP, Pyruvat und Oxalacetat in *C. glutamicum* und Kontrolle des Kohlenstoffflusses über die anaplerotischen Stoffwechselwege PEP-Carboxylase (PEPCx) und Pyruvat-Carboxylase (PCx) bei Wachstum auf Glucose, Lactat bzw. Acetat. Weitere Abkürzungen: PEPck, PEP-Carboxykinase; OAADCx, Oxalacetat-Decarboxylase; ME, Malat-Enzym; ICL, Isocitrat-Lyase; MS, Malat-Synthase.

mit ca. 20 μM ungefähr 5 bis 10 mal niedriger als bei Wachstum auf Acetat mit 100 bis 150 μM (Spies, 1996). Damit scheint es sich bei Acetyl-CoA um einen zentralen Metaboliten für die Regulation aller anaplerotischen Reaktionen in *C. glutamicum* zu handeln.

Bei Wachstum auf Acetat ist der Acetyl-CoA-Spiegel hoch, sodaß vermutlich aufgrund des niedrigen K_i -Werts für Acetyl-CoA von 110 μM die Pyruvat-Carboxylase zum Teil inaktiv ist. Durch die starke Aktivität des Glyoxylat-Zyklus in Anwesenheit von Acetat, die ebenfalls auf die hohe Acetyl-CoA-Konzentration zurückgeführt wird (Reinscheid *et al.*, 1994b/c; Spies, 1996), ist darüberhinaus vermutlich der Spiegel an Aspartat, das direkt aus Oxalacetat, dem Produkt der anaplerotischen Reaktion entsteht, hoch. Das hat zur Folge, daß die PEP-Carboxylase aufgrund der Hemmung durch Aspartat wahrscheinlich ebenfalls inaktiv ist. Für diese These spricht das kürzlich erhaltene Ergebnis aus ^{13}C -Markierungsexperimenten, daß in Anwesenheit von Acetat im Medium keine C_3 -Carboxylierung in *C. glutamicum* stattfindet (V. Wendisch, pers. Mitteilung).

Bei Wachstum auf Glucose findet jedoch eine effektive C_3 -Carboxylierung statt. Die Pyruvat-Carboxylase wird aufgrund des niedrigen Acetyl-CoA-Spiegels (Spies, 1996) nicht inhibiert sein. Dadurch wird genügend Aspartat gebildet, um die PEP-Carboxylase effektiv zu hemmen. Der niedrige Acetyl-CoA-Spiegel reicht vermutlich nicht aus, um diese Hemmung zu kompensieren. Damit ist die Pyruvat-Carboxylase auf Glucose vermutlich das aktive anaplerotische Enzym. Diese Aussage wird bestärkt, durch den Befund, daß die C_3 -Carboxylierung in einem Stamm ohne PEP-Carboxylase mit gleicher Rate erfolgt wie im Wildtyp von *C. glutamicum*. Da bei der Aufnahme von Glucose durch das Phosphotransferase-System PEP zu Pyruvat umgesetzt wird, und diese Reaktion mit der PEP-Carboxylase konkurriert, erscheint es sinnvoll, daß bei Wachstum auf Glucose die anaplerotische Funktion von der Pyruvat-Carboxylase übernommen wird. Die Regulation der Pyruvat-Carboxylase durch die Energieladung, d.h. die Hemmung durch ADP, dem Produkt der Pyruvat-Carboxylase-Reaktion, ermöglicht der Zelle darüberhinaus, direkt auf die Energie-Situation mit einer gesteigerten oder erniedrigten anaplerotischen Aktivität zu reagieren.

Bei Wachstum auf Lactat ist die Pyruvat-Carboxylase das einzig aktive anaplerotische Enzym, wie durch Wachstumsexperimente unter Biotin-Mangel sowie mit einer Pyruvat-Carboxylase-negativen Mutante gezeigt werden konnte. Das deutet an, daß auf Lactat die anaplerotische Reaktion nicht von der PEP-Carboxylase katalysiert werden kann, da *C. glutamicum* Pyruvat wahrscheinlich nicht direkt in PEP umwandeln kann. Für die besondere Rolle der Pyruvat-Carboxylase spricht auch die erhöhte spezifische Aktivität auf Lactat. Es ist wahrscheinlich, daß die Pyruvat-Carboxylase bei Wachstum auf Lactat nicht durch Acetyl-CoA gehemmt wird. Es kann angenommen werden, daß die Acetyl-CoA-Konzentration bei Wachstum auf Lactat niedrig ist, weil die Pyruvat-Dehydrogenase, die Pyruvat zu Acetyl-CoA umsetzt und niedrige spezifische Aktivitäten

in *C. glutamicum* aufweist (Schwinde, 1995), als limitierender Schritt beim Eintritt von Kohlenstoff in den Tricarbonsäure-Zyklus diskutiert wird (Cocaign *et al.*, 1993).

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, daß die PEP-Carboxylase für das Wachstum auf Glucose nicht essentiell ist. Zwar wird die PEP-Carboxylase nach Kornbergs (1966) klassischem Regulationsmodell für anaplerotische Enzyme kontrolliert und ist mit relativ hohen spezifischen Aktivitäten vorhanden, doch scheint die Pyruvat-Carboxylase bei Wachstum auf Glucose eine vorrangige Bedeutung zu haben. Darüberhinaus ist die Pyruvat-Carboxylase für das Wachstum auf Lactat essentiell. In Zukunft wird das Gen der Pyruvat-Carboxylase zur Konstruktion von Pyruvat-Carboxylase-negativen Mutanten und Doppelmutanten, die sowohl Pyruvat-Carboxylase- als auch PEP-Carboxylase-defekt sind, genutzt, um weitere Hinweise auf die Bedeutung der einzelnen Enzyme bei Wachstum auf Glucose und für die Aminosäure-Produktion zu erhalten. Zusätzlich werden weitere ^{13}C -Markierungsexperimente Aufschluß darüber geben, welches der beiden anaplerotischen Enzyme tatsächlich unter welchen Bedingungen *in vivo* aktiv ist.

V. Zusammenfassung

Anaplerotische Reaktionen dienen dazu, während des Wachstums und der Aminosäure-Produktion den Tricarbonsäure-Zyklus kontinuierlich mit Oxalacetat aufzufüllen. Diese Funktion wird bei Wachstum auf Kohlenhydraten durch Carboxylierung von PEP oder Pyruvat zu Oxalacetat übernommen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung anaplerotischer C₃-carboxylierender Enzyme in *C. glutamicum* und die Aufklärung der Rolle dieser Enzyme für das Wachstum und die Aminosäure-Produktion.

1. Eine definierte PEP-Carboxylase-negative Mutante von *C. glutamicum* zeigte auf Minimalmedium mit Glucose das gleiche Wachstum wie der Wildtyp, und eine entsprechende Mutante des Lysin-Produktionsstamms MH20-22B produzierte gleich viel Lysin wie der Ausgangsstamm. Das Ergebnis zeigt, daß die PEP-Carboxylase für das Wachstum und die Aminosäure-Produktion von *C. glutamicum* nicht essentiell ist. Damit war nachgewiesen, daß *C. glutamicum* über eine weitere anaplerotische Sequenz verfügt, die die PEP-Carboxylase ersetzen kann.

2. Durch die physiologische Charakterisierung definierter PEP-Carboxylase- / Isocitrat-Lyase-Doppelmutanten konnte der Glyoxylat-Zyklus als alternative anaplerotische Sequenz bei Wachstum auf Glucose oder Lactat ausgeschlossen werden. H¹³CO₃⁻-Markierungsexperimente ergaben, daß die PEP-Carboxylase-negative Mutante wie der Wildtyp eine Carboxylierung von PEP oder Pyruvat katalysiert. Das zeigt, daß das zur PEP-Carboxylase alternative Enzym eine C₃-Carboxylierung katalysiert.

3. In *C. glutamicum* konnte eine IDP/GDP-abhängige PEP-Carboxykinase nachgewiesen werden, die *in vitro* sowohl die Carboxylierung von PEP zu Oxalacetat mit einer spezifischen Aktivität von ca. 80 mU/mg Protein als auch die Decarboxylierung von Oxalacetat zu PEP mit einer spezifischen Aktivität von ca. 1 U/mg Protein katalysiert. Die 10-fach niedrigere carboxylierende Aktivität und die Hemmung der PEP-Carboxykinase in der anaplerotischen Richtung durch ATP und ADP deuten an, daß die PEP-Carboxykinase *in vivo* eine gluconeogenetische Funktion hat. Neben der PEP-Carboxykinase konnten in *C. glutamicum* auch das *Malat-Enzym* und die Oxalacetat-Decarboxylase nachgewiesen und als anaplerotisch aktive Enzyme ausgeschlossen werden.

4. In permeabilisierten Zellen von *C. glutamicum* konnte die Pyruvat-Carboxylase mit spezifischen Aktivitäten von ca. 15 mU/mg TG bei Wachstum auf Glucose und ca. 50 mU/mg TG bei Wachstum auf Lactat nachgewiesen werden. Das Enzym wird sowohl durch ADP (K_i = 2,6 mM) und AMP (K_i = 0,76 mM) als auch durch Acetyl-CoA (K_i = 0,11 mM) inhibiert. Mit der Pyruvat-Carboxylase verfügt *C. glutamicum* über ein zur PEP-Carboxylase alternatives anaplerotisches Enzym.

5. Die Pyruvat-Carboxylase von *C. glutamicum* ist bei Wachstum auf Lactat essentiell. Das ergaben Untersuchungen zum Wachstum von *C. glutamicum* unter Biotinmangelbedingungen und zu einer durch ungerichtete Mutagenese erhaltenen Pyruvat-Carboxylase-negativen Mutante von *C. glutamicum*. Die Wachstumslimitierung konnte durch Supplementation mit Fumarat aufgehoben werden, was auf eine anaplerotische Funktion der Pyruvat-Carboxylase hinweist.

6. Die Pyruvat-Carboxylase von *C. glutamicum* ist ein Biotin-Enzym, das in der denaturierten Form eine Größe von 120 bis 130 kDa aufweist. Es gelang, ein 17 kb *Hind*III-DNA-Fragment aus *C. glutamicum* zu isolieren, das das Gen für die Pyruvat-Carboxylase (*pyc*) trägt. Die Sequenzierung eines Teils des *pyc*-Gens ergab, daß das aus der Sequenz abgeleitete Polypeptid von 451 Aminosäuren im Vergleich zu anderen Pyruvat-Carboxylasen bis zu 60 % identische Aminosäuren aufweist.

VI. Literatur

- Arps P.J., Fulton G.F., Minnich E.C. & Lidstrom M.E. (1993). Genetics of Serine Pathway Enzymes in *Methylobacterium extorquens* AM1: Phosphoenolpyruvate Carboxylase and Methyl Coenzyme A Lyase. *J. Bacteriol.* 175: 3776-3783.
- Ashworth J.M. & Kornberg H.L. (1966). The anaplerotic fixation of carbon dioxide by *Escherichia coli*. *Proc. Roy. Soc. (London) B.* 165: 179-188.
- Atkinson D.E. (1977). Cell Energy Metabolism and its Regulation. *Academic Press Inc.* N.Y.
- Attwood P.V. (1995). The Structure and the Mechanism of Action of Pyruvate Carboxylase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 27: 231-249.
- Bañuelos M. & Gancedo C. (1978). In situ Study of the Glycolytic Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. microbiol.* 117: 197-201.
- Barden R.E., Taylor B.L., Isohashi F., Frey W.H. II, Zander G., Lee J.C. & Utter M.F. (1975). Structural properties of pyruvate carboxylases from chicken liver and other sources. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72: 4308-4312.
- Bentle L.A. & Lardy H.A. (1976). Interactions of anions and divalent metal ions with phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J. Biol. Chem.* 251: 2916-2921.
- Benziman M., Russo A., Hochman S. & Weinhouse H. (1978). Purification and Regulatory Properties of the Oxaloacetate Decarboxylase of *Acetobacter xylinum*. *J. Bacteriol.* 134: 1-9.
- Bergmeyer H.U. (1983). Pyruvate kinase from rabbit muscle. In: *Methods of Enzymatic Analysis. II.* Bergmeyer H.U., Bergmeyer J. & Graßl M. (Ed.). Verlag Chemie Weinheim p. 303-304.
- Birnboim H.C. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid-DNA. *Meth. Enzymol.* 100: 243-255
- Börmann E.R., Eikmanns B.J. & Sahm H. (1992). Molecular analysis of the *Corynebacterium glutamicum* *gdh* gene encoding glutamate dehydrogenase. *Mol. Microbiol.* 6: 317-326.
- Börmann-Ei Kholly E.R., Eikmanns B.J., Gutmann M. & Sahm H. (1993). Glutamate Dehydrogenase Is Not Essential for Glutamate Formation by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Env. Microbiol.* 59: 2329-2331.
- Brewster N.K., Val D.L., Walker M.E. & Wallace J.C. (1994). Regulation of Pyruvate Carboxylase Isozyme (*PYC1*, *PYC2*) Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae* during Fermentative and Nonfermentative Growth. *Arch. Biochem. Biophys.* 311: 62-71
- Cazzulo J.J. & Stoppani. A.O.M. (1968). The Regulation of Yeast Pyruvate Carboxylase by Acetyl-Coenzyme A and L-Aspartate. *Arch. Biochem. Biophys.* 127: 563-567.

- Cazzulo J.J. & Stoppani A.O.M. (1969). Effects of Magnesium, Manganese and Adenosine Triphosphate Ions on Pyruvate Carboxylase from Baker's Yeast. *Biochem. J.* 112: 747-754.
- Cazzulo J.J., Sundaram T.K. & Kornberg H.L. (1969). Regulation of Pyruvate Carboxylase Formation from the Apo-enzyme and Biotin in a Thermophilic Bacillus. *Nature* 223: 1137-1138.
- Cazzulo J.J., Sundaram T.K. & Kornberg H.L. (1970). Properties and regulation of pyruvate carboxylase from *Bacillus stearothermophilus*. *Proc. Roy. Soc. London B.* 16: 1-19.
- Cazzulo J.J., Sundaram T.K., Dilks S.N. & Kornberg H.L. (1971). Synthesis of Pyruvate Carboxylase from its Apoenzyme and (+)-Biotin in *Bacillus stearothermophilus*. *Biochem. J.* 122: 653-661.
- Cazzulo J.J., Juan S.M. & Segura E.L. (1977). The Malic Enzyme from *Trypanosoma cruzi*. *J. Gen. Microbiol.* 99: 237-241.
- Chang H.-C., Maruyama H., Miller R.S., Lane M.D. (1966). The Enzymatic Carboxylation of Phosphoenolpyruvate III. Investigation of the Kinetics and Mechanism of the Mitochondrial Phosphoenolpyruvate Carboxykinase catalysed Reaction. *J. Biol. Chem.* 241: 2421-2430
- Chao Y.-P. & Liao J.C. (1993). Alteration of Growth Yield by Overexpression of Phosphoenolpyruvate Carboxylase and Phosphoenolpyruvate Carboxykinase in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 4261-4265.
- Charles A.M. & Willer D.W. (1984). Pyruvate Carboxylase from *Thiobacillus novellus*: properties and possible functions. *Can. J. Microbiol.* 30: 532-539.
- Cocaign M., Monnet C. & Lindley N.D. (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.
- Cocaign-Bousquet M. & Lindley N.D. (1995). Pyruvate overflow and carbon flux within the central metabolic pathways of *Corynebacterium glutamicum* during growth on lactate. *Enz. Microbial Technol.* 17: 260-267.
- Constantinides A. (1980). Steroid transformation at high substrate concentrations using immobilized *Corynebacterium simplex* cells. *Biotechnol. Bioeng.* 22: 119-136.
- Cremer J., Eggeling, L. & Sahm H. (1991). Control of the lysine biosynthesis sequence in *Corynebacterium glutamicum* as analysed by overexpression of the individual corresponding genes. *Appl. Env. Microbiol.* 57: 1746-1752.
- Cronan Jr., J.E. (1990). Biotination of Proteins *in vivo*. A Post-Translational Modification to Label, Purify, and Study Proteins. *J. Biol. Chem.* 165: 10327-10333.
- Dakshinamurti K. & Chauhan J. (1988). Regulation of Biotin Enzymes. *Ann. Rev. Nutr.* 8: 211-233.

- de Flombaum M.A.C., Cannata J.J.B., Cazzulo J.J. & Segura E.L. (1977). CO₂-fixing enzymes in *Trypanosoma cruzi*. *J. Physiol.* 58B: 67-69.
- de Hollander J.A. (1994). Potential metabolic limitations in lysine production by *Corynebacterium glutamicum* as revealed by metabolic network analysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42: 508-515.
- Dekleva M.L. & Strohl W.R. (1988). Activity of phosphoenolpyruvate carboxylase of an anthracycline-producing streptomycete. *Can. J. Microbiol.* 34: 1241-1246.
- Diesterhaft M.D. & Freese E. (1973). Role of Pyruvate Carboxylase, Phosphoenolpyruvate Carboxykinase, and Malic Enzyme during Growth and Sporulation of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 248: 6062-6070.
- Dimroth P. (1982). The Generation of an Electrochemical Gradient of Sodium Ions upon Decarboxylation of Oxaloacetate by Membrane-Bound and Na⁺-Activated Oxaloacetate Decarboxylase from *Klebsiella aerogenes*. *Eur. J. Biochem.* 121: 443-449.
- Dimroth P. (1987). Sodium Ion Transport Decarboxylases and Other Aspects of Sodium Ion Cycling in Bacteria. *Microbiol. Rev.* 51: 320-340.
- Eden G. & Fuchs G. (1983). Autotrophic CO₂ fixation in *Acetobacterium woodii* II. Demonstration of enzymes involved. *Arch. Microbiol.* 135: 68-73.
- Edman P. & Begg G. (1967). A Protein Sequenator. *Eur. J. Biochem.* 1: 80-91.
- Eggeling, L. (1994). Biology of L-lysine overproduction by *Corynebacterium glutamicum*. *Amino Acids.* 6: 261-272.
- Eikmanns B.J., Foillettie M.T., Griot M.U. & Sinskey A.J. (1989). The phosphoenolpyruvate carboxylase gene of *Corynebacterium glutamicum*: Molecular cloning, nucleotide sequence and expression. *Mol. Gen. Genet.* 218: 330-339.
- Eikmanns B.J., Metzger M., Reinscheid D.J., Sahm H. (1991a). Amplification of three threonine biosynthesis genes in *Corynebacterium glutamicum* and its influence on carbon flux in different strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34: 617-622.
- Eikmanns B.J., Kleinertz E., Liebl W. & Sahm H. (1991b). A family of *Corynebacterium glutamicum* / *Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing. *Gene* 102: 93-98.
- Eikmanns B.J. (1992). Identification, Sequence Analysis, and Expression of a *Corynebacterium glutamicum* Gene Cluster Encoding the Three Glycolytic Enzymes Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase, 3-Phosphoglycerate Kinase, and Triosephosphat-Isomerase. *J. Bacteriol.* 174: 6076-6086.
- Eikmanns B.J., Eggeling L. & Sahm H. (1993). Molecular aspects of lysine, threonine, and isoleucine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *Antonie van Leeuwenhoek* 64: 145-163.

- Eikmanns B.J., Thum-Schmitz N., Eggeling L., Lüttke K.-U. & Sahm H. (1994). Nucleotide sequence, expression and transcriptional analysis of the *Corynebacterium glutamicum gltA* gene encoding citrate synthase. *Microbiol.* 140: 1817-1828.
- Eikmanns B.J., Rittmann D. & Sahm H. (1995). Cloning, Sequence Analysis, Expression, and Inactivation of the *Corynebacterium glutamicum icd* Gene Encoding Isocitrate Dehydrogenase and Biochemical Characterization of the Enzyme. *J. Bacteriol.* 177: 774-782.
- Encarnación S., Dunn M., Willms K. & Mora J. (1995). Fermentative and Aerobic Metabolism in *Rhizobium etli*. *J. Bacteriol.* 177: 3058-3066.
- Feir H.A. & Suzuki I. (1969). Pyruvate Carboxylase of *Aspergillus niger*. Kinetic study of a biotin-containing carboxylase. *Can. J. Biochem.* 47: 697-710.
- Fisher S.H. & Magasanik B. (1984). Synthesis of Oxaloacetate in *Bacillus subtilis* Mutants Lacking the 2-Ketoglutarate Dehydrogenase Enzymatic Complex. *J. Bacteriol.* 158: 55-62.
- Fuchs J., Johannssen W., Rohde M. & Mayer F. (1988). Pyruvate carboxylase from *Pseudomonas citronellolis*: shape of the enzyme, and localization of its prosthetic biotin group by electron microscopic affinity labeling. *FEBS Lett.* 231: 102-106.
- Gornall A.G., Bardawill C.J. & David M.M. (1949). Determination of Serum Proteins by Means of the Biuret Reaction. *J. Biol. Chem.* 177: 751-766.
- Goss J.A., Cohen N.D. & Utter M.F. (1981). Characterisation of the Subunit Structure of Pyruvate Carboxylase from *Pseudomonas citronellolis*. *J. Biol. Chem.* 256: 11819-11825.
- Gottschalk G. (1986). Bacterial Metabolism. 2. Ed. Springer-Verlag, N.Y. Berlin Heidelberg Tokyo. pp. 220-222.
- Gowda L.R., Joshi M.S. & Bhat S.G. (1989). *In Situ* Assay of Intracellular Enzymes of Yeast (*Kluyveromyces fragilis*) by Digitonin Permeabilization of Cell Membrane. *Anal. Biochem.* 175: 531-536.
- Gross D.S., Collins K.W., Hernandez E.M. & Garrad W.T. (1988). Vakuum blotting: a simple method for transferring DNA from sequencing gels to nylon membranes. *Gene* 74: 347-356.
- Gubler M., Jetten M. Lee S.H. & Sinskey A.J. (1994a). Cloning of the Pyruvate Kinase Gene (*pyk*) of *Corynebacterium glutamicum* and Site-Specific Inactivation of *pyk* in a Lysine-Producing *Corynebacterium lactofermentum* Strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2494-2500.
- Gubler M, Park S.M., Jetten M. Stephanopoulos G. & Sinskey A.J. (1994b). Effects of phosphoenol pyruvate carboxylase deficiency on metabolism and lysine production in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40: 857-863.

- Gurr J.A. & Jones K.M. (1977). Purification and Characterisation of Pyruvate Carboxylase from *Arthrobacter globiformis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 179: 444-455.
- Gutmann M., Hoischen C. & Krämer R. (1992). Carrier-mediated glutamate secretion by *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1112: 115-123.
- Gutmann M. (1993). Glutamat-Sekretion bei *Corynebacterium glutamicum*: Mechanismus und physiologische Bedeutung des Carrier-vermittelten Transports. Dissertation der Universität Düsseldorf. *Berichte des Forschungszentrums Jülich*: 2836.
- Hanahan D. (1985). Techniques for Transformation of *E. coli*. pp. 109-135. In: DNA cloning. A practical approach. Vol. I Glover D.M. (Ed.). IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA.
- Haneji T. & Koide S.S. (1989). Transblot Identification of Biotin-Containing Proteins in Rat Liver. *Anal. Biochem.* 177: 57-61.
- Hartman R.E. & Keen N.T. (1974). The Pyruvate Carboxylase of *Verticillium albo-atrum*. *J. Gen. Microbiol.* 81: 15-19.
- Hebda C.A. & Nowak T. (1982). The purification, characterisation, and activation of phosphoenolpyruvate carboxykinase from chicken liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 257: 5503-5514.
- Higa A.I., Milrad de Forchetti S.R. & Cazzulo J.J. (1976). CO₂-fixing Enzymes in *Pseudomonas fluorescens*. *J. Gen. Microbiol.* 93: 69-74.
- Huchenoq A., Marquet M., Welby W., Montrozier H., Goma G. & Lanéelle G. (1984). Glutamate excretion triggering mechanism: a reinvestigation of the surfactant-induced modification of cell lipids. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* 135 B: 53-67.
- Ikeda M. & Katsumata R. (1992). Metabolic Engineering To Produce Tyrosine or Phenylalanine in a Tryptophan-Producing *Corynebacterium glutamicum* Strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 781-785.
- Jacobson L.A., Bartholomaeus R.C. & Gunsalus I.C. (1966). Repression of malic enzyme by acetate in *Pseudomonas*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 24: 955-960.
- Jäger W., Schäfer A., Pühler A., Labes G. & Wohlleben W. (1992). Expression of the *Bacillus subtilis* *sacB* Gene Leads to Sucrose Sensitivity in the Gram-Positive Bacterium *Corynebacterium glutamicum* but not in *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* 174: 5462-5465.
- Jäger W., Peters-Wendisch P.G., Kalinowski J. & Pühler A. (1996). A *Corynebacterium glutamicum* gene encoding a two-domain protein similar to biotin carboxylases and biotin-carboxyl-carrier proteins. *Arch. Microbiol.* (im Druck).
- Jetten M.S.M. & Sinskey A.J. (1993). Characterisation of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Letters* 111: 183-188.
- Jetten M.S.M., Gubler M.E., Lee S.H. & Sinskey A.J. (1994a). Structural and Functional Analysis of Pyruvate kinase from *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2501-2507.

- Jetten M.S.M., Pitoc G.A. Follettie M.T. & Sinskey A.J. (1994b). Regulation of phospho(enol)-pyruvate- and oxaloacetate-converting enzymes in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41: 47-52.
- Jetten M.S.M. & Sinskey A.J. (1995a). Purification and properties of oxaloacetate decarboxylase from *Corynebacterium glutamicum*. *Antonie van Leeuwenhoek* 67: 221-227.
- Jetten M.S.M. & Sinskey A.J. (1995b). Recent Advances in the Physiology and Genetics of Amino Acid-Producing Bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* 15: 73-103.
- Jiao J. & Chollet R. (1991). Posttranslational Regulation of Phosphoenolpyruvate Carboxylase in C₄ and Crassulacean Acid Metabolism Plants. *Plant Physiol.* 95: 981-985.
- Jones B.M. & Gilligan J.P. (1983). O-Phthaldialdehyd precolumn derivatization and reversed-phase-high-performance liquid chromatography of polypeptide hydrolysates and physiological fluids. *J. Chromatography* 266: 471-482.
- Katsumata R. & Kino K. (1989). Process for producing amino acids. *European Patent Application* No. 89103578.4. EP 0 331 145 A2.
- Keech D.B. & Utter M.F. (1963). Pyruvate Carboxylase. II. Properties. *J. Biol. Chem.* 238: 2609-2614.
- Kinoshita S., Udaka S. & Shimono M. (1957). Studies of the amino acid fermentation. I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 3: 193-205.
- Kinoshita S. (1985). Glutamic acid bacteria. In: *Biology of industrial microorganisms*. Demain A.L. & Solomon N.A. (Ed.). The Benjamin/Cummings Publishing Company, London p. 115-142.
- Kleemann A., Leuchtenberger W., Hoppe B. & Tanner H. (1985). Amino acids. In: *Ullmann's Encyclopedia of industrial chemistry*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim. Vol. A2: 57-97.
- Klingenberg M. & Pfaff E. (1967). Means of terminating reactions. *Methods in Enzymology*. Vol. 10: 680-684.
- Knowles J.R. (1989). The Mechanism of Biotin-Dependent Enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 195-221.
- Kornberg H.L. (1966). Anaplerotic Sequences and their Role in Metabolism. In: *Essays in Biochemistry*. Vol 2, pp. 1-31. Campbell P.N. & Greville G.D. (Ed.). Academic Press, N.Y.
- Krulwich T.A. & Pellicione N.J. (1979). Catabolic pathways of coryneforms, nocardias and mycobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 33: 95-111.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lambert C., Erdmann A., Eikmanns M. & Krämer R. (1995). Triggering Glutamate Excretion in *Corynebacterium glutamicum* by Modulating the Membrane State with Local Anesthetics and Osmotic Gradients. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4334-4342.

- Lee C., Levin A. & Branton D. (1987). Copper Staining: A Five-Minute Protein Stain for Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels. *Anal. Biochem.* 166: 308-312.
- Lee C.W., Lucas S. & Desmoazeaud M.J. (1985). Phenylalanine and tyrosine catabolism in some cheese coryneform bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 26: 201-205.
- Leuchtenberger W. (1984). Enzymatische und mikrobielle Herstellung von L-Aminosäuren. *Chemie in Labor und Betrieb.* 35: 278-283.
- Li S.-J. & Cronan Jr. J.E. (1992). The Gene Encoding the Biotin Carboxylase Subunit of *Escherichia coli* Acetyl-CoA-Carboxylase. *J. Biol. Chem.* 267: 855-863.
- Liao C.-L. & Atkinson D.E. (1971). Regulation at the Phosphoenolpyruvate Branchpoint in *Azotobacter vinelandii*: Phosphoenolpyruvate Carboxylase. *J. Bacteriol.* 106: 31-36.
- Libor S., Warwick R. & Sundaram T.K. (1975). Pyruvate Carboxylase from *Bacillus stearothermophilus*: Molecular Size, Biotin Content and Subunit Constitution. *Biochem. Soc. Trans.* 554th Meeting, London. pp.309-311.
- Libor S., Sundaram T.K., Warwick R., Chapman J.A. & Grundy S.M.W. (1979). Pyruvate Carboxylase from a Thermophilic *Bacillus*: Some Molecular Characteristics. *Biochemistry.* 18: 3642-3653.
- Liebl W., Klamer R. & Schleifer K.-H. (1989). Requirement of chelating compounds for growth of *Corynebacterium glutamicum* in synthetic media. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 205-210.
- Liebl W. & Schein B. (1990). Isolation of restriction deficient mutants of *Corynebacterium glutamicum*. DECHEMA Biotechnology Conferences 4. VCH Verlagsgesellschaft. p.323-327.
- Liebl W. (1991). The Genus *Corynebacterium* - Nonmedical. In: *The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications.* 2nd Ed. pp. 1157-1171. Balows A., Trüper H.G., Dworkin M, Harder W. & Schleifer K.-H. (Eds.). Springer Verlag, Heidelberg.
- Lim F., Morris C.P., Occhiodoro F. & Wallace J.C. (1988). Sequence and Domain Structure of Yeast Pyruvate Carboxylase. *J. Biol. Chem.* 263: 11493-11497.
- Linss J., Goldenberg S., Urbina J.A. & Amzel L.M. (1993). Cloning and characterisation of the gene encoding ATP-dependent phosphoenolpyruvate carboxykinase in *Trypanosoma cruzi*: comparison of primary and predicted secondary structure with host GTP-dependent enzyme. *Gene.* 136: 69-77.
- London J. & Meyer E.Y. (1969). Malate Utilisation by Group D *Streptococcus*: Physiological Properties and Purification of an Inducible Malic Enzyme. *J. Bacteriol.* 98: 705-711.
- MacKay N., Rigat B., Douglas C., Chen H.S. & Robinson B.H. (1994). cDNA cloning of human kidney pyruvate carboxylase. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 202: 1009-1014.

- Malin G.M. & Bourd G.I. (1991). Phosphotransferase-dependent glucose transport in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Appl. Bacteriol.* 71: 517-523.
- Marx A., de Graaf A.A., Wiechert W., Eggeling L. & Sahm H. (1996). Determination of the Fluxes in the Central Metabolism of *Corynebacterium glutamicum* by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Combined with Metabolite Balancing. *Biotech. Bioeng.* 49: 111-129.
- Medina V., Pontarollo R., Glaeske D., Tabel H. & Goldie H. (1990). Sequence of the *pckA* gene of *Escherichia coli* K-12: relevance to genetic and allosteric regulation and homology of *E. coli* phosphoenol pyruvate carboxykinase with the enzymes from *Trypanosoma brucei* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 172: 7151-7156.
- Miller A.L. & Atkinson D.E. (1972). Response of Yeast Pyruvate Carboxylase to the Adenylate Energy Charge and Other Regulatory Parameters. *Arch. Biochem. Biophys.* 152: 531-538.
- Milrad de Forchetti S.R. & Cazzulo J.J. (1976). Some Properties of the Pyruvate Carboxylase from *Pseudomonas fluorescens*. *J. Gen. Microbiol.* 93: 75-81.
- Modak H.V. & Kelly D.J. (1995). Acetyl-CoA-dependent pyruvate carboxylase from the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*: rapid and efficient purification using dye-ligand affinity chromatography. *Microbiol.* 141: 2619-2628.
- Monod J., Wyman J. & Changeux J.-P. (1965). On the nature of allosteric transition: a plausible model. *J. Mol. Biol.* 12: 88-118.
- Mori M. & Shiiro I. (1985a). Purification and Some Properties of Phosphoenolpyruvate Carboxylase from *Brevibacterium flavum* and Its Aspartate-Overproducing Mutant. *J. Biochem.* 97: 1119-1128.
- Mori M. & Shiiro I. (1985b). Synergistic Inhibition of Phosphoenolpyruvate-Carboxylase by Aspartate and 2-Oxoglutarate in *Brevibacterium flavum*. *J. Biochem.* 98: 1621-1630.
- Morinaga Y., Takagi H., Ishida M., Miwa K., Sato T., Nakamori S. & Sano K. (1987). Threonine Production by coexistence of cloned genes encoding homoserine dehydrogenase and homoserine kinase in *Brevibacterium lactofermentum*. *Agric. Biol. Chem.* 51: 93-100.
- Moss J. & Lane M.D. (1971). The Biotin-Dependent Enzymes. In: *Advances in Enzymology And Related Areas of Molecular Biology*. Meister A. (Ed.). Vol. 35. Interscience Publishers, N.Y. pp. 322-363.
- Nimmo H.G. (1993). The regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase by reversible phosphorylation. *Soc. Exp. Biol. Sem. Ser.* 53: *Post-translational modifications in plants*. Battey N.H., Dickinson H.G. & Hetherington A.M. (Ed.). Cambridge University Press, pp. 161-170.

- Norman E., DeSmet K.A.L., Stoker N.G., Ratledge C., Wheeler P.R. & Dale J.W. (1994). Lipid Synthesis in Mycobacteria: Characterisation of the Biotin Carboxyl Carrier Protein Genes from *Mycobacterium leprae* and *M. tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 176: 2525-2531.
- Nunheimer T.D., Birnbaum J., Ihnen E.D. & Demain A.L. (1970). Product inhibition of the fermentative formation of glutamic acid. *Appl. Microbiol.* 20: 215-217.
- O'Brien R.W., Chuang D.T., Taylor B.L. & Utter M.F. (1977). Novel Enzymic Machinery for the Metabolism of Oxalacetate, Phosphoenolpyruvate, and pyruvate in *Pseudomonas citronellolis*. *J. Biol. Chem.* 252: 1257-1263.
- O'Regan M., Thierbach G., Bachmann B., Villeval D., Lepage P., Viret J.-F. & Lemoine Y. (1989). Cloning and nucleotide sequence of the phosphoenolpyruvate carboxylase-coding gene of *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032. *Gene.* 77: 237-251.
- Osmani S.A., Marston F.A.O., Seimes I.P., Chapman A. G. & Scrutton M.C (1981). Pyruvate Carboxylase from *Aspergillus nidulans*. Regulatory Properties. *Eur. J. Biochem.* 118: 271-278.
- Osmani S.A., Mayer F., Marston F.A.O., Seimes I.P. & Scrutton M.C. (1984). Pyruvate carboxylase from *Aspergillus nidulans*. Effects of regulatory modifiers on the structure of the enzyme. *Eur. J. Biochem.* 139: 509-518.
- Osmani S.A., Scrutton M.C. & Mayer F. (1985). The structure and regulation of fungal pyruvate carboxylases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 447: 56-71.
- Outlaw Jr. W.H. & Springer S.A. (1983). 'Malic' Enzyme. In: Methods of Enzymatic Analysis Vol. 3. Bergmeyer H.U. (Ed.), Verlag Chemie Weinheim. pp. 176-183.
- Owtrim G.W. & Coleman B. (1986). Purification and Characterization of Phosphoenolpyruvate Carboxylase from a Cyanobacterium. *J. Bacteriol.* 168: 207-212.
- Ozaki H. & Shio I. (1968). Regulation of the TCA and glyoxylate cycles in *Brevibacterium flavum*. *J. Biochem.* 64: 355-363.
- Ozaki H. & Shio I. (1969). Regulation of the TCA and Glyoxylate Cycles in *Brevibacterium flavum*. II. Regulation of Phosphoenolpyruvate Carboxylase and Pyruvate Kinase. *J. Biochem.* 66: 297-311.
- Payne J. & Morris J.G. (1969). Pyruvate Carboxylase in *Rhodospseudomonas spheroides*. *J. Gen. Microbiol.* 59: 97-101.
- Peters P. (1992). Untersuchungen zur Pyruvat-Kinase aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. Diplomarbeit am Institut für Genetik der Universität zu Köln.
- Petrocci A.N. (1983). Surface active agents: quaternary ammonium compounds. In: *Sterilisation, Desinfection and Preservation*. Block S.S. (Ed.) Philadelphia, PA. Lea & Febiger. p. 309-329.

- Podkovyrov S.M. & Zeikus J.G. (1993). Purification and characterisation of phosphoenolpyruvate carboxykinase, a catabolic CO₂-fixing enzyme, from *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *J. Gen. Microbiol.* 139: 223-228.
- Poetsch W., Hermans J. & Westhoff P. (1991). Multiple cDNAs of phosphoenolpyruvate carboxylase in the C₄ dicot *Flaveria trinervia*. *FEBS Lett.* 292: 133-136.
- Reeves R.E. (1970). Phosphopyruvate carboxylase from *Entamoeba histolytica*. *Biochem. Biophys. Acta* 220: 346-349.
- Reinscheid D.J. (1994). Physiologische und genetische Untersuchungen des Acetat-Stoffwechsels in *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation der Universität Düsseldorf. *Berichte des Forschungszentrums Jülich*: 2967.
- Reinscheid D.J., Kronemeyer W., Eggeling L., Eikmanns B.J. & Sahm H. (1994a). 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.
- Reinscheid D.J., Eikmanns B.J. & Sahm H. (1994b). Characterization of the isocitrate lyase gene from *Corynebacterium glutamicum* and biochemical analysis of the enzyme. *J. Bacteriol.* 176: 3474-3483.
- Reinscheid D.J., Eikmanns B.J. & Sahm H. (1994c). Malate synthase from *Corynebacterium glutamicum*: sequence analysis of the gene and biochemical characterization of the enzyme. *Microbiology.* 140: 3099-3108.
- Rohrer S.P., Saz H.J. & Nowak T. (1986). Purification and Characterisation of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase from Parasitic Helminth *Ascaris suum*. *J. Biol. Chem.* 261: 13049-13055.
- Ruiz-Amil M., deTorronegui G., Palacián E., Catalina L. & Losada M. (1965). Properties and Functions of Yeast Pyruvate Carboxylase. *J. Biol. Chem.* 240: 3485-3492.
- Sahm H., Eggeling L., Eikmanns B.J. & Krämer R. (1995). Metabolic design in amino acid producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Rev.* 16: 243-252.
- Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Samols D., Thornton C.G., Murtif V.L., Kumar G.K., Haase C. & Wood H.G. (1988). Evolutionary Conservation among Biotin Enzymes. *J. Biol. Chem.* 263: 6461-6464.
- Sanger F., Nicklen S. & Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- Sano K., Ito K., Miwa K. & Nakamori S. (1987). Amplification of the phosphoenol pyruvate Carboxylase Gene of *Brevibacterium lactofermentum* to improve amino acid production. *Agric. Biol. Chem.* 51: 597-599.

- Sanwal B.D., Wright J.A. & Smando R. (1968). Allosteric control of the activity of malic enzyme in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 31: 623-627.
- Saz H.J. & Lescure O.L. (1967). Gluconeogenesis, fructose-1,6-diphosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase activities of *Ascaris lumbricoides* adult muscle and larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* 22: 15-29.
- Schäfer A., Kalinowski J., Simon R., Seep-Feldhaus A.H. & Pühler A. (1990). High frequency conjugal plasmid transfer from gram-negative *Escherichia coli* to various gram-positive coryneform bacteria. *J. Bacteriol.* 172: 1663-1666.
- Schäfer A., Tauch A., Jäger W., Kalinowski J., Thierbach G. & Pühler A. (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145: 69-73.
- Schobert P. & Bowien B. (1984). Unusual C₃ and C₄ Metabolism in the Chemoautotroph *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* 159: 167-172.
- Schrumpf B., Schwarzer A., Kalinowski J., Pühler A., Eggeling L. & Sahm H. (1991). A functionally split pathway for lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 173: 4510-4516.
- Schrumpf B., Eggeling L. & Sahm H. (1992). Isolation and prominent characteristics of a L-lysine hyperproducing strain of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37: 566-571.
- Schwarzer A. & Pühler A. (1991). Manipulation of *Corynebacterium glutamicum* by gene disruption and replacement. *Biotechnol.* 9: 84-87.
- Schwinde J.W., Thum-Schmitz N., Eikmanns B.J. & Sahm H. (1993). Transcriptional Analysis of the *gap-pgk-tpi-ppc* Gene Cluster of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 175: 3905-3908.
- Schwinde J. (1995). Untersuchungen zur Aktivität der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase von *Corynebacterium glutamicum* und Charakterisierung des Gens für die Dihydro-liponamid-Dehydrogenase-Untereinheit. Dissertation der Universität Düsseldorf. *Berichte des Forschungszentrums Jülich*: 3115.
- Scrutton M.C. & Young M.R. (1972). Pyruvate Carboxylase. In: Boyer, P.D. (Ed.) *The Enzymes* Vol. 6, pp. 1-35. Academic Press, N.Y.
- Scrutton M.C. & Taylor B.L. (1974). Isolation and Characterisation of Pyruvate Carboxylase from *Azotobacter vinelandii* OP. *Arch. Biochem. Biophys.* 164: 641-654.
- Shiio I., Otsuka S. & Tsunoda T. (1960). Glutamic acid formation from Glucose. IV. Carbon dioxide fixation and glutamate formation in *Brevibacterium flavum* no. 2247. *J. Biochem.* 48: 110-120.

- Shiio I., Otsuka S.I. & Takahashi M. (1962). Effect of biotin on the bacterial formation of glutamic acid. I. Glutamate formation and cellular permeability of amino acids. *J. Biochem.* 51: 56-62.
- Shiio I. & Ujigawa K. (1978). Enzymes of the Glutamate and Aspartate Synthetic Pathways in a Glutamate-Producing Bacterium, *Brevibacterium flavum*. *J. Biochem.* 84: 647-657.
- Simon R., Prierer U. & Pühler A. (1983). A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Bio/Technology* 1: 784-791.
- Siu P.M. & Wood H.G. (1962). Phosphoenolpyruvic carboxytransphosphorylase, a CO₂ fixation enzyme from propionic acid bacteria. *J. Biol. Chem.* 237: 3044-3051.
- Spies M. (1996). Nachweis und Quantifizierung von CoA und CoA-Derivaten und Untersuchungen zur Rolle von Acetyl-CoA bei der Regulation des Acetat-Stoffwechsels in *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit, FH Jülich.
- Sonntag K., Eggeling L., De Graaf A. & Sahm H. (1993). Flux partitioning in the split pathway of lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. Quantification by ¹³C- and ¹H-NMR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* 213: 1325-1331.
- Southern E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Sternson L.A., Stobaugh J.F. & Repta A.J. (1984). Rational design and evaluation of improved o-phthalaldehyd-like fluorogenic reagents. *Anal. Biochem.* 144: 233-246.
- Sundaram T.K. (1973). Physiological Role of Pyruvate Carboxylase in a Thermophilic Bacillus. *J. Bacteriol.* 113: 549-557.
- Sundqvist K.E., Hiltunen J.K. & Hassinen I.E. (1989). Pyruvate Carboxylation in the rat heart. Role of biotin-dependent enzymes. *Biochem. J.* 257: 913-916.
- Takahashi R., Ohmori T., Watanabe K. & Tokuyama T. (1993). Phosphoenolpyruvate Carboxylase of an Ammonia-Oxidizing Chemoautotrophic Bacterium, *Nitrosomonas europaea* ATCC 25978. *J. Ferment. Bioeng.* 76: 232-234.
- Takata J., Yamamoto K., Tosa T. & Chibata J. (1979). Screening of microorganisms having high fumarase activity and their immobilization with carrageenan. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotech.* 7: 161-172.
- Takinami K., Yoshii H., Tsurii H. & Okada H. (1965). Biochemical effects of fatty acid and its derivatives on glutamic acid fermentation. Part III. Biotin tween 60 relationship in the accumulation of L-glutamic acid and the growth of *Brevibacterium lactofermentum*. *Agric. Biol. Chem.* 29: 351-359.
- Taylor B.L., Barden R.L. & Utter M.F. (1972). Identification of the Reacting Form of Pyruvate Carboxylase. *J. Biol. Chem.* 247: 7383-7390.

- Taylor B.L., Routman S. & Utter M.F. (1975). The control of the Synthesis of Pyruvate Carboxylase in *Pseudomonas citronellolis*. *J. Biol. Chem.* 250: 2376-2382.
- Teraoka H., Nishikido T., Izui K. & Katsuki H. (1970). Control of the Synthesis of Phosphoenolpyruvate Carboxylase and Phosphoenolpyruvate Carboxykinase in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* 67: 567-575.
- Teraoka H., Izui K. & Katsuki H. (1972). Phosphoenolpyruvate Carboxylase of *Escherichia coli*: Alteration of Allosteric Properties by Photooxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 152: 821-827.
- Teraoka H., Izui K. & Katsuki H. (1974). Phosphoenolpyruvate Carboxylase of *Escherichia coli*. Multiple Conformational States Elicited by Allosteric Effectors. *Biochem.* 13: 5121-5128.
- Teuber M., Geis A., Kursch U., Lembke J. & Moebus O. (1987). Biotechnologische Verfahren zur Herstellung von Lebensmitteln und Futtermitteln. In: Handbuch der Biotechnologie. Praeve P., Faust U. Sittig W. & Sukatsch D.A. (Ed.) Oldenburg Verlag, München. pp. 269-313.
- Thampy K.G., Huang W.-Y. & Wakil S.J. (1988). A Rapid Purification Method for Rat Liver Pyruvate Carboxylase and Amino Acid Sequence Analyses of NH₂-Terminal and Biotin Peptides. *Arch. Biochem. Biophys.* 266: 270-276.
- Theodore T.S. & Englesberg E. (1965). Mutant of *Salmonella typhimurium* deficient in the carbon dioxide-fixation enzyme phosphoenolpyruvic carboxylase. *J. Bacteriol.* 88: 946-955.
- Thornton C.G., Kumar G.K., Haase F.C., Phillips N.F.B., Woo S.B., Park V.M., Magner W.J., Shenoy B.C., Wood H.G. & Samois D. (1993). Primary Structure of the Monomer of the 12S Subunit of Transcarboxylase as Deduced from DNA and Characterisation of the Product Expressed in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175: 5301-5308.
- Ting I.P. & Osmond C.B. (1973). Multiple forms of Plant Phosphoenolpyruvate Carboxylase Associated with Different Metabolic Pathways. *Plant. Physiol.* 51: 448-453.
- Toh H., Kondo H. & Tanabe T. (1993). Molecular evolution of biotin-dependent carboxylases. *Eur. J. Biochem.* 215: 687-696.
- Urbina J.A. (1987). The Phosphoenolpyruvate Carboxykinase of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* Epimastigotes: Molecular, Kinetic, and Regulatory Properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 258: 186-195.
- Utter M.F. & Kurahashi K. (1955). Mechanism of action of oxaloacetic carboxylase. In: *Methods in Enzymology* 1. p. 758-763

- Utter M.F. & Kolenbrander H.M. (1972). Formation of Oxaloacetate by CO₂ Fixation on Phosphoenolpyruvate. In: *The Enzymes* Vol. 6, pp. 117-168. Boyer, P.D. (Ed.) Academic Press, N.Y.
- Vieira J. & Messing J. (1982). The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19: 259-268.
- von der Osten C.H., Barbas C.F., Wong C.-H. & Sinskey A.J. (1989). Molecular cloning, nucleotide sequence and fine structural analysis of the *Corynebacterium glutamicum fda* gene: structural comparison of *C. glutamicum* fructose-1,6-bisphosphate aldolase to class I and class II aldolases. *Mol Microbiol.* 3: 1625-1637.
- Vrijic M., Kronemeyer W., Eggeling L. & Sahm H. (1995). Unbalance of L-lysine flux in *Corynebacterium glutamicum* and its use for the isolation of excretion-defective mutants. *J. Bacteriol.* 177: 4021-4027.
- Walsh C. (1979). Enzymatic Carboxylations. In: *Enzymatic Reaction Mechanisms*. Bartlett A. C. & McCombs L.W. (Eds.) *Library of Congress Cataloging in Publication Data*. W.H. Freeman and Company. pp. 703-736.
- Warren G.B. & Tripton K.F. (1974). Pig liver pyruvate carboxylase. The reaction pathway for the carboxylation of pyruvate. *Biochem. J.* 139: 311-320.
- 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.
- Wedding R.T. (1989). Malic Enzymes of Higher Plants. Characteristics, Regulation, and Physiological Function. *Plant Physiol.* 90: 367-371.
- Wexler I.D., Du Y., Lisgaris M.V., Mandal S.K., Freytag S.O., Yang B.-S., Liu T.-C., Kwon M., Patel M.S. & Kerr D.S. (1994). Primary amino acid sequence and structure of human pyruvate carboxylase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1227: 46-52.
- Wills C. & Melham T. (1985). Pyruvate Carboxylase Deficiency in Yeast: A Mutant Affecting the Interaction between the Glyoxylate and Krebs Cycles. *Arch. Biochem. Biophys.* 236: 782-791.
- Willson J.C. (1988). Pyruvate and Acetate Metabolism in the Photosynthetic Bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *J. Gen. Microbiol.* 134: 2429-2439.
- Wixom R.L., Garrett J.L. & Fetzek J.P. (1971). A Rapid Determination of Dihydroacid Dehydratase Activity in Microbial Cell Suspensions. *Anal. Biochem.* 42: 262-274.
- Wölfel L., Mach F. & Chattopadhyay S.P. (1985). Cooperative cytosolic studies on the effect of cetyltrimethylammonium bromide on bacterial cells. *Zbl. Mikrobiol.* 140: 631-639
- Wood H.G. & Utter M.F. (1965). The Role of CO₂ Fixation in Metabolism. In: *Essays in Biochemistry*. Vol 1, pp. 1-27. Campbell P.N. & Greville G.D. (Ed.). Academic Press, N.Y.

- Yokota A. & Shiio I. (1988). Effects of reduced Citrate Synthase Activity and Feedback-resistant Phosphoenolpyruvate Carboxylase on Lysine Productivities of *Brevibacterium flavum* Mutants. *Agric. Biol. Chem.* 52: 455-463.
- Young M.R., Tolbert B. & Utter M.F. (1969). Pyruvate Carboxylase from *Saccharomyces cerevisiae*. In: Lowenstein J.M. (Ed.) *Methods in Enzymology*, Vol. 13, pp. 250-258.
- Zhang J., Xia W.-L., Brew K. & Ahmad F. (1993). Adipose pyruvate carboxylase: Amino acid sequence deduced from cDNA sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 1766-1770.
- Zink M.W. (1967). Regulation of the „malic“ enzyme in *Neurospora crassa*. *Can. J. Microbiol.* 13: 1211-1221.

Anhang

Teile der vorliegenden Arbeit sind in folgenden Artikeln veröffentlicht worden:

- Peters-Wendisch P.G., Eikmanns B.J., Thierbach G., Bachmann B. & Sahm H. (1993). Phosphoenolpyruvate carboxylase in *Corynebacterium glutamicum* is dispensable for growth and lysine production. *FEMS Microbiol. Lett.* 112: 269-274.
- Peters-Wendisch P.G., Wendisch V.F., de Graaf A.A., Eikmanns B.J. & Sahm H. (1996). C₃-Carboxylation as an anaplerotic reaction in phosphoenolpyruvate carboxylase-deficient *Corynebacterium glutamicum*. *Arch. Microbiol.* 165: 387-396.
- Jäger W., Peters-Wendisch P.G., Kalinowski J. & Pühler A. (1996). A *Corynebacterium glutamicum* gene encoding a two-domain protein similar to biotin carboxylases and biotin-carboxyl-carrier proteins. *Arch. Microbiol.* (im Druck).

Handwritten text at the top of the page, possibly a header or title, which is mostly illegible due to fading.

Handwritten text in the upper middle section of the page, appearing as several lines of cursive script.

Handwritten text in the middle section of the page, continuing the cursive script.

Handwritten text in the lower middle section of the page, showing more lines of cursive handwriting.

Handwritten text at the bottom of the page, including what appears to be a signature or a concluding line.

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

Herrn Prof. Dr. Hermann Sahn danke ich für die Überlassung des Themas, sein Interesse und seine, den Fortgang der Arbeit voranbringenden Anregungen.

Herrn P.D. Dr. Jürgen Heinisch danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Bernd Eikmanns, der durch seine fortwährende Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, seine unendliche Geduld, kleinere und größere Ausbrüche zu ertragen und seinen steten Glauben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Dr. Lothar Eggeling, Dr. Peter Stahmann, Dr. Karl-Ludwig Schimz, Prof. Dr. Reinhard Krämer und Marina Vrljic danke ich für anregende Diskussionen.

Dr. Wolfgang Jäger danke ich für die gute Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Acetyl-CoA-Carboxylase, Dr. Jörn Kalinowski danke ich für die Überlassung des *pyc*-PCR-Fragmentes und Bettina Riebel und P.D. Dr. Werner Hummel danke ich für die partielle Aufreinigung des *Malat-Enzyms*.

Caroline Kreutzer, Susanne Paul, Tobias Polifke, Dr. Dieter Reinscheid, Doris Rittmann, Dr. Mirek Patek, Dr. Jörg Schwinde, Dr. Elke Börmann-Ei Kholy, Marion Spies und Natalie Thum-Schmitz danke ich für Rat und Tat sowie den freundschaftlichen Umgang in Labor und in der Freizeit, was den Fortgang der Arbeit kontinuierlich vorangetrieben hat.

Allen Angehörigen des Institutes möchte ich herzlich für die freundliche Aufnahme und die immer gewährte Unterstützung und Hilfsbereitschaft danken.

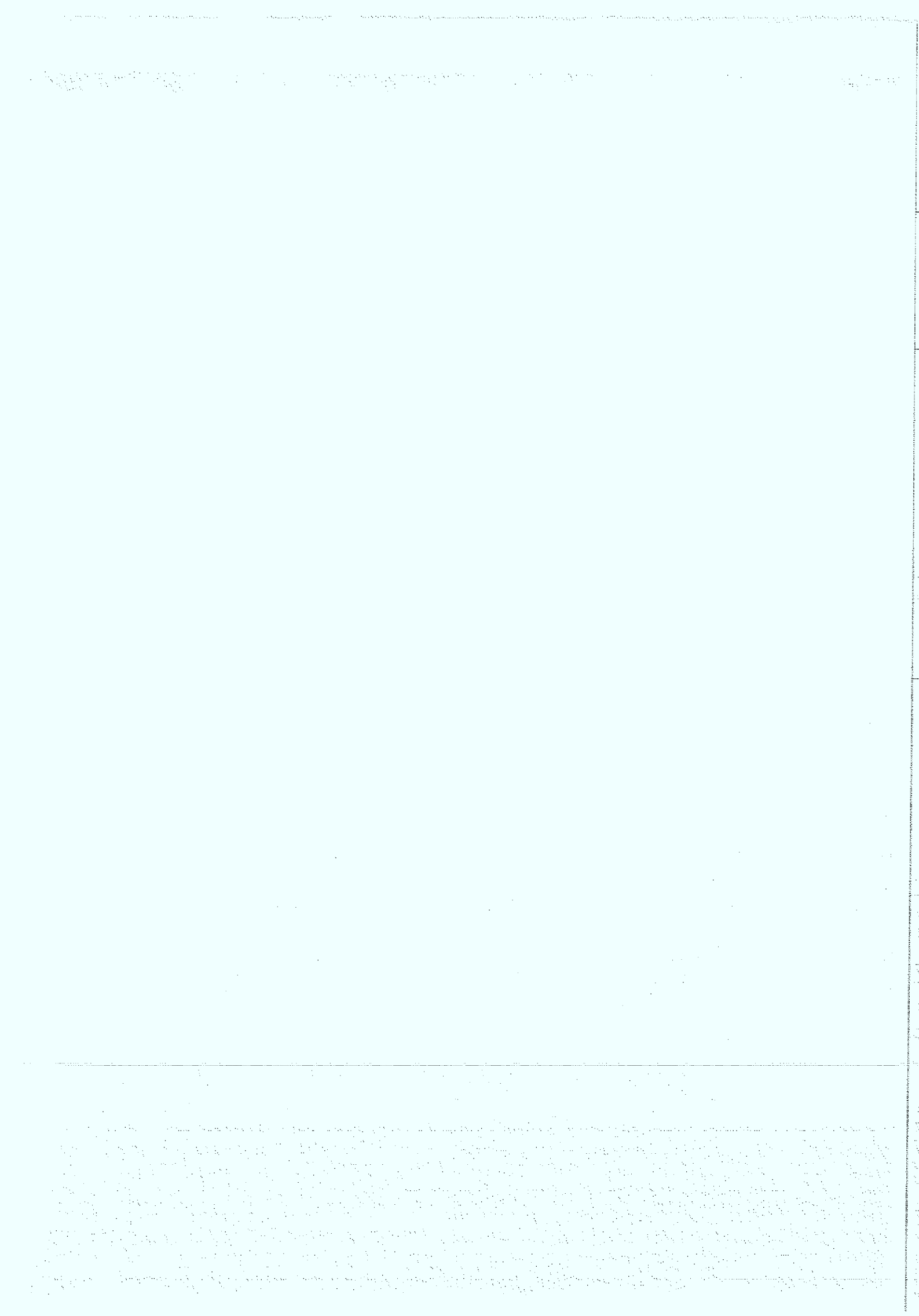
Volker Wendisch danke ich dafür, daß er mir mit viel Geduld und Hilfe zur Seite stand, auch wenn es nicht immer leicht war.

Handwritten text, mostly illegible due to extreme fading and bleed-through from the reverse side of the page. Some faint words like "The" and "and" are visible.

Handwritten text, mostly illegible due to extreme fading and bleed-through from the reverse side of the page. Some faint words like "The" and "and" are visible.

Handwritten text, mostly illegible due to extreme fading and bleed-through from the reverse side of the page. Some faint words like "The" and "and" are visible.

Handwritten text, mostly illegible due to extreme fading and bleed-through from the reverse side of the page. Some faint words like "The" and "and" are visible.



Jül-3259
August 1996
ISSN 0944-2952