PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :		(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 95/19442**
C12N 15/60, C12P 13/06, C12N 1/21 // (C12N 1/21, C12R 1:15)	**A1**	(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 20. Juli 1995 (20.07.95)

(21) **Internationales Aktenzeichen:** PCT/DE95/00017

(22) **Internationales Anmeldedatum:** 9. Januar 1995 (09.01.95)

(30) **Prioritätsdaten:**
P 44 00 926.7 14. Januar 1994 (14.01.94) DE

(71) **Anmelder** *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH [DE/DE]; Wilhelm-Johnen-Strasse, D-52425 Jülich (DE).

(72) **Erfinder; und**
(75) **Erfinder/Anmelder** *(nur für US)*: MÖCKEL, Bettina [DE/DE]; Westener Dorfstrasse 35, D-40591 Düsseldorf (DE). EGGELING, Lothar [DE/DE]; Elsenkamp 6, D-52428 Jülich (DE). SAHM, Hermann [DE/DE]; Wendelinusstrasse 71, D-52428 Jülich (DE).

(81) **Bestimmungsstaaten:** JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

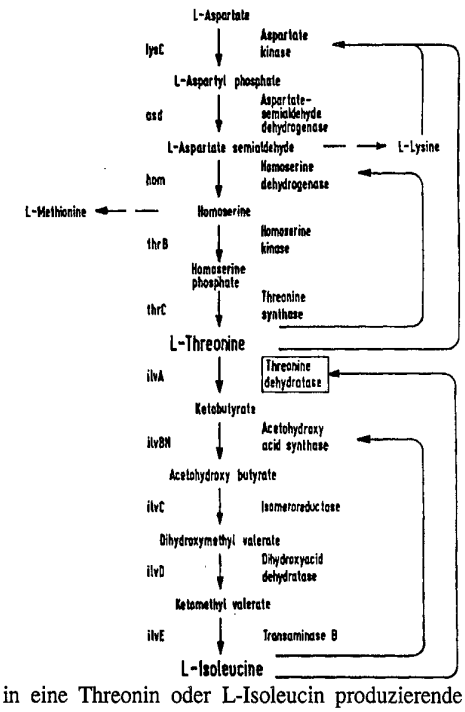
Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) **Title:** PRODUCTION OF L-ISOLEUCINE BY MEANS OF RECOMBINANT MICRO-ORGANISMS WITH DEREGULATED THREONINE DEHYDRATASE

(54) **Bezeichnung:** HERSTELLUNG VON L-ISOLEUCIN MITTELS REKOMBINANTER MIKROORGANISMEN MIT DEREGULIERTER THREONINDEHYDRATASE

(57) **Abstract**

The invention relates to processes for the microbial production of L-isoleucine. To this end, in a gene *in vitro* of a threonine dehydratase, one or more bases in the gene region coding the enzyme's allosteric domains is/are exchanged in such a way that at least one amino acid in the amino acid sequence of the allosteric domains of the enzyme is replaced by another so that the enzyme is no longer inhibited by L-isoleucine feedback. Furthermore, concrete amino acid exchanges in the amino acid sequence of the enzyme are effected in a gene *in vitro* of a threonine dehydratase of *corynebacterium glutamicum* by base exchange both outside and inside and outside the gene region coding the allosteric domains of the enzyme so that, after the transformation of such mutated threonine de hydratase genes into a threonine or L-isoleucine-producing host cell, the latter repeatedly forms L-isoleucine.



(57) **Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von L-Isoleucin. Dazu wird in einem *in vitro* vorliegenden Gen einer Threonindehydratase durch Mutation in dem für die allosterische Domäne des Enzyms kodierenden Genbereich ein oder mehrere Basen so ausgetauscht, daß mindestens eine Aminosäure in der Aminosäuresequenz der allosterischen Domäne des Enzyms durch eine andere so ersetzt wird, daß das Enzym nicht mehr durch L-Isoleucin feed back gehemmt wird. Des weiteren werden in einem *in vitro* vorliegenden Gen einer Threonindehydratase aus Corynebacterium glutamicum durch Basenaustausch sowohl außerhalb als auch innerhalb und ausserhalb des für die allosterische Domäne des Enzyms kodierenden Genbereichs konkrete Aminosäureaustausche in der Aminosäuresequenz des Enzyms vorgenommen, so daß nach Transformation derartmutierter Threonindehydratasegene in eine Threonin oder L-Isoleucin produzierende Wirtszelle diese vermehrt L-Isoleucin bildet.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	**GA**	Gabon	**MR**	Mauretanien
AU	Australien	**GB**	Vereinigtes Königreich	**MW**	Malawi
BB	Barbados	**GE**	Georgien	**NE**	Niger
BE	Belgien	**GN**	Guinea	**NL**	Niederlande
BF	Burkina Faso	**GR**	Griechenland	**NO**	Norwegen
BG	Bulgarien	**HU**	Ungarn	**NZ**	Neuseeland
BJ	Benin	**IE**	Irland	**PL**	Polen
BR	Brasilien	**IT**	Italien	**PT**	Portugal
BY	Belarus	**JP**	Japan	**RO**	Rumänien
CA	Kanada	**KE**	Kenya	**RU**	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	**KG**	Kirgisistan	**SD**	Sudan
CG	Kongo	**KP**	Demokratische Volksrepublik Korea	**SE**	Schweden
CH	Schweiz	**KR**	Republik Korea	**SI**	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	**KZ**	Kasachstan	**SK**	Slowakei
CM	Kamerun	**LI**	Liechtenstein	**SN**	Senegal
CN	China	**LK**	Sri Lanka	**TD**	Tschad
CS	Tschechoslowakei	**LU**	Luxemburg	**TG**	Togo
CZ	Tschechische Republik	**LV**	Lettland	**TJ**	Tadschikistan
DE	Deutschland	**MC**	Monaco	**TT**	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	**MD**	Republik Moldau	**UA**	Ukraine
ES	Spanien	**MG**	Madagaskar	**US**	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	**ML**	Mali	**UZ**	Usbekistan
FR	Frankreich	**MN**	Mongolei	**VN**	Vietnam

B e s c h r e i b u n g

Herstellung von L-Isoleucin mittels rekombinanter Mikroorganismen mit deregulierter Threonindehydratase

Die Erfindung betrifft Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von L-Isoleucin nach den Ansprüchen 1 bis 10, Threonindehydratasegene gemäß den Ansprüchen 11 bis 13, Genstrukturen nach Anspruch 14, Vektoren gemäß den Ansprüchen 15 und 16, sowie transformierte Zellen nach den Ansprüchen 17 bis 23.

Die Aminosäure L-Isoleucin ist für Mensch und Tier essentiell. Sie findet in diätischen Lebensmitteln sowie als Komponente verschiedener Nährgemische medizinischer Zweckbestimmung breite Verwendung. Auch wird L-Isoleucin als Zugabe oder als Reagenz in der pharmazeutischen und chemischen Industrie benutzt.

Für die Gewinnung des L-Isoleucins werden Mikroorganismen eingesetzt, die diese Aminosäure ins Fermentationsmedium ausscheiden. Dabei erfolgt die Bildung des L-Isoleucins nach dem in Figur 1 dargestellten Biosyntheseweg. Wie in Figur 1 ebenfalls demonstriert, gibt es in der Biosynthese des L-Isoleucins Schlüsselenzyme, und zwar die Aspartkinase, Homoserindehydrogenase und Threonindehydratase. Die Aktivität der Aspartkinase und Homoserindehydrogenase wird durch die ebenfalls im Rahmen der Biosynthese des L-Isoleucins gebildeten Aminosäure L-Threonin feed back gehemmt, während das für die L-Isoleucinsynthese

spezifische Schlüsselenzym Threonindehydratase durch das Endprodukt der Biosynthesekette L-Isoleucin feed back gehemmt wird.

Zur Erhöhung der L-Isoleucinbildung wurde in der Vergangenheit immer wieder versucht, Mutanten von L-Isoleucin-Produzenten zu erhalten, die gegenüber dem Wildtypen vermehrt L-Isoleucin bilden.

Zur Gewinnung solcher Mutanten wurden ausschließlich in vivo Mutagenesen durchgeführt, d.h. man ließ ein Mutagen auf das gesamte Genom einwirken. Über die Resistenz gegenüber Aminosäureanaloga wurden solche mutierten Mikroorganismen selektiert, deren oben erwähnte Schlüsselenzyme keiner feed back Hemmung mehr unterlagen.

So wird beispielsweise eine Mutation, die zu Resistenz gegenüber α-Aminobutyrat oder Isoleucinhydroxamat führt, in der US-PS 4 329 427 beschrieben, wonach Mikroorganismen zwar vermehrt L-Isoleucin produzierten, aber unklar blieb, welche Enzyme nicht mehr feed back gehemmt wurden.

In den US-PS 4 442 208 und 4 601 983 wird beschrieben, daß nach in vivo Mutagenese ein - nicht genauer definiertes - DNA-Fragment isoliert werden konnte, das Resistenz gegenüber α-Aminohydroxyvaleriansäure vermittelt. Nach Übertragung dieses Fragments in einen Corynebacterium- bzw. Brevibacterium-Stamm produzierten diese vermehrt L-Isoleucin.

Auch sind Verfahren beschrieben, bei denen durch Übersynthese noch feed back regulierter Schlüsselenzyme vermehrt L-Isoleucin gebildet werden kann (vgl. bei-

spielsweise DE-OS 3 942 947, EP-OS 0 137 348).

Insgesamt haben alle bisher beschriebenen Verfahren zur Erhöhung der L-Isoleucinproduktion gemeinsam, daß Mutationen eher zufällig zu deregulierten Schlüsselenzymen, die keiner feed back Hemmung mehr unterliegen, führten und darüber die Aminosäuresynthese erhöht wurde.

Es ist Aufgabe der Erfindung, Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von L-Isoleucin zu schaffen, durch die durch definierte Mutationen das Schlüsselenzym der L-Isoleucinbiosynthese - die Threonindehydratase - gezielt so verändert wird, daß eine feed back Hemmung durch L-Isoleucin nicht mehr erfolgt.

Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe wird dadurch gelöst, daß in einem in vitro vorliegenden Gen einer Threonindehydratase durch Mutation in dem für die allosterische Domäne des Enzyms kodierenden Genbereich ein oder mehrere Basen so ausgetauscht werden, daß mindestens eine Aminosäure in der Aminosäuresequenz der allosterischen Domäne des Enzyms durch eine andere so ersetzt wird, daß das Enzym nicht mehr durch L-Isoleucin feed back gehemmt wird. "In vitro vorliegendes Gen" bedeutet hier, daß das Threonindehydratasegen vor der Mutagenese kloniert, d.h. also isoliert und in einen Vektor eingebaut wird. Die Durchführung der Mutagenese durch Basenaustausch(e) erfolgt nach bekannter Methode, beispielsweise nach der Methode von Ito et al. (Gene 102 (1991) 67-70). Nach Transformation derart mutierter Threonindehydratasegene in eine Threonin oder L-Isoleucin produzierende Wirtszelle bildet diese vermehrt L-Isoleucin.

Prinzipiell kann ein kloniertes bzw. in vitro vorliegendes Threonindehydratasegen aus einem beliebigen Bakterium stammen. Da Corynebacterium glutamicum zu den "klassischen" Aminosäureproduzenten zählt, stammt das Gen vorzugsweise aus diesem Mikroorganismus, insbesondere aus dem Stamm ATCC 13032. Die DNA-Sequenz des Threonindehydratasegens aus diesem Corynebacterium glutamicum - Stamm ist bereits bekannt (vgl. Möckel et al., J. Bacteriol. 174 (1992) 8065-8072). Nach Basenaustausch in dem für die allosterische Domäne des Enzyms kodierenden Genbereich werden beispielsweise die in den Tabellen 1 bis 3 aufgeführten DNA-Sequenzen erhalten. In den Tabellen ist der für die allosterische Domäne des Enzyms kodierende Genbereich unterstrichen und sind die Stellen der Basenaustausche durch zusätzliches Unterstreichen kenntlich gemacht.

Nach Durchführung der Mutagenese werden die in vitro mutierten Gene in ein Plasmid eingebaut, in dem die Expression des Threonindehydratasegens induziert werden kann. Als Plasmide eignen sich beispielsweise pVC 19 oder pKK 223-3 (Amman et al., Gene 25, 167). Nach Einbau der mutierten Gene in ein geeignetes Plasmid werden diese in einen geeigneten Bakterienstamm transformiert.

Um diejenigen Klone zu erhalten, die die Plasmide mit den mutierten Threonindehydratasegenen auch tatsächlich enthalten, können die gewünschten Transformanden nach der üblichen Methode über die Resistenz von Aminosäureanaloga isoliert werden, wobei als Analoga beispielsweise ß-Methylnorleucin, Isoleucinhydroxamat oder Hydroxyisoleucin in Betracht kommen.

Eine einfachere und gezieltere Isolierung wird aber dadurch erreicht, daß die veränderten Threonindehydratasegene in einen Mikroorganismus transformiert werden, dessen Acetohydroxysäuresynthase-Aktivität durch L-Valin hemmbar ist. Als Transformanden eignen sich z.B. Escherichia coli K 12 - Stämme, vorzugsweise die Stämme JM 109 oder DH 5. Die Transformanden werden anschließend auf ein festes Medium gebracht, das L-Isoleucin zur Hemmung der Threonindehydratase und L-Valin zur Hemmung der Verstoffwechslung des Ketobutyrats durch die Acetohydroxysäuresynthase (Umbarger: Escherichia coli and Salmonella typhimurium, 1 (1987) 352-367) enthält. Dem Medium wird vorzugsweise zusätzlich eine Substanz zur Induktion des Threonindehydratasegens sowie L-Threonin als Substrat für die Dehydratase zugegeben. Als Substanz zur Induktion des Threonindehydratasegens wird vorzugsweise IPTG (Isopropyl-ß-D-Thiogalactopyranosid) verwendet, so daß dem veränderten Threonindehydratasegen im Vektor ein IPTG-induzierbarer Promotor vorgeschaltet ist. Solche Klone, die eine deregulierte Threonindehydratase enthalten, setzen das L-Threonin ungehemmt in Ketobutyrat um. Da die weitere Umsetzung des Ketobutyrats durch Acetohydroxysäuresynthase durch das zugegebene L-Valin gehemmt wird, akkumuliert Ketobutyrat, was zur Folge hat, daß die eine deregulierte Threonindehydratase enthaltenden Klone aufgrund der bekannten Toxizität von Ketobutyrat (La Rossa und Schloss, J. Biol. Chem. 259 (1984) 8753-8757) schlechter wachsen. Das schlechtere Wachstum äußert sich in der Bildung kleinerer Kolonien, durchscheinenderer Kolonien oder von Kolonien mit zerklüftetem Kolonieumriß. Diese Kolonien können leicht abgeimpft und deshalb Klone mit deregulierter Dehydratase leicht isoliert werden.

Diese Isolierungsmethode ist selbstverständlich auch bei solchen Transformanden anwendbar, die ein kloniertes Threonindehydratesegen enthalten, welches durch andere Mutationsarten als durch Basenaustausche so verändert worden ist, daß das entsprechende Enzym keiner feed back Hemmung mehr unterliegt.

Eine erfindungsgemäße Alternative zur Lösung der genannten Aufgabe besteht darin, daß in einem in vitro vorliegenden Gen einer Threonindehydratase aus Corynebacterium glutamicum durch Basenaustausch außerhalb des für die allosterische Domäne des Enzyms kodierenden Genbereichs die Aminosäure Alanin in der Position 257 der Aminosäuresequenz des Enzyms durch die Aminosäure Glycin (Tabelle 4) oder die Aminosäure Methionin in der Position 199 der Aminosäuresequenz des Enzyms durch die Aminosäure Valin ersetzt wird (Tabelle 5), wonach nach Transformation derart mutierter Threonindehydratasegene in eine Threonin oder L-Isoleucin produzierende Wirtszelle diese vermehrt L-Isoleucin bildet.

Eine weitere Alternative zur Lösung der Aufgabe besteht darin, daß in einem Threonindehydratasegen aus Corynebacterium glutamicum durch Basenaustausch außerhalb des für die allosterische Domäne des Enzyms kodierenden Genbereichs die Aminosäure Histidin in der Position 278 der Aminosäuresequenz des Enzyms durch die Aminosäure Arginin und innerhalb des für die allosterische Domäne des Enzyms kodierenden Genbereichs die Aminosäure Leucin in der Position 351 der Aminosäuresequenz des Enzyms durch die Aminosäure Serin ersetzt wird (Tabelle 6), wonach nach Transformation eines derart mutierten Threonindehydratasegens in eine Threonin oder L-Isoleucin produzierende Wirtszelle diese ebenfalls vermehrt L-Isoleucin bildet.

Als Wirtszelle für die Transformation eines mutierten Threonindehydratasegens bzw. als Produktionsstamm eignet sich vorzugsweise Corynebacterium glutamicum und insbesondere der hinterlegte DSM-Stamm 8890. Als Transformanden sind beispielsweise die bei der DSM unter den Nummern 8889 und 8891 hinterlegten Stämme erhältlich, welche vermehrt L-Isoleucin ins Fermentationsmedium ausscheiden. Auch ist es nützlich, als Produktionsstämme bzw. Wirtszellen für die Transformation solche zu verwenden, die nicht mehr die noch durch L-Isoleucin regulierte Wildtyp-Threonin-dehydratase synthetisieren, so daß in den Zellen nur noch deregulierte Threonindehydratase die Umsetzung von L-Threonin katalysiert.

Ausführungsbeispiel:

1. Herstellung mutierter Enzyme die keiner feed back Hemmung mehr unterliegen.

1.1 Selektion der gewünschten Enzyme.

Das bekannte Plasmid pBM1/Exo8, das die regulierte Threonindehydratase des Wildtyps von *Corynebacterium glutamicum* codiert (Möckel et al. J Bacteriol 174(1992) 8065-8072), wurde nach bekannten Verfahren (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) isoliert. Es wurde anschließend mit dem Restriktionsenzym *Eco*R1 verdaut und das 1573 Basenpaare große, das Threonindehydratasegen enthaltende Fragment, isoliert. Diese Fragment wurde in die *Eco*R1 Schnittstelle des bekannten Vektors pUC19 (Vieira and Messing, Gene 19 (1976) 259-268) ligiert, und dadurch das Plasmid pBM20 erhalten (Figur 2), in dem nun das Threonindehydratasegen aus *C. glutamicum*, das selbst in *E. coli* nicht exprimiert wird (Cordes et al., Gene 112 (1992) 113-116), in dem Standard-Laborstamm *E. coli* JM109 unter Kontrolle des durch Isopropyl-D-thiogalactopyranosid induzierbaren *lacZ* Promoters des Ursprungsvektors pUC19 vorliegt.

Zur Einführung der ungerichteten Mutationen in die allosterische Domäne der Threonindehydratase wurden in einer getrennten Prozedur auf bekannte Weise zwei DNA-Primer synthetisiert:

5'-Primer: CGCAGCTGACTTCCATGGGGCAAGA

3'-Primer: CCAGTGCCAAGCTTGCATGC

Der 5'-Primer ist homolog zur *Nco*1-Schnittstelle (unterstrichen) im Threonindehydratasegen. Der 3'-Primer ist homolog zur *Hind*III Erkennungsstelle (unterstrichen) der Multiple-Cloning-Site des Ausgangsvektors pUC19.

Mit beiden Primern wurde nun eine Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt (Tindall und Kunkel, Biochemistry 27 (1988) 6008-6013), in der durch die unspezifische Reaktion der *Taq* Polymerase (Leung et al., Technique 1 (1989) 11-15) neue DNA-Fragmente die Mutationen enthalten entstehen. Der Reaktionsansatz enthielt in einem Endvolumen von 100 µl: 20 µl 5'-Primer (25 µg/ml), 20 µl 3'-Primer (25 µg/ml), 1 ng Template (pBM20), 100 µM ATP, 100 µM dNTP Mix, 10 µl Taq 10xPuffer (100 mM Tris, 15 mM $MgCl_2$, 500 mM KCl, Gelatine 1 mg/ml, pH8,3), 0,5 U *Taq* Polymerase (5U/µl), 0,5 mM $MnCl_2$. Als Reaktionsbedingungen wurde ein Time Delay File von 94 °C (3 min), Thermo Cycle File von 94 °C (1 min), 55 °C (2 min), 72 °C (3 min), Soak File 4 °C, Segment Extension 10 sec, mit einer Anzahl von 30 Zyklen eingestellt. Nach der Reaktion, wurden die DNA-Fragmente aufgereinigt (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press), mit *Nco*I und *Hind*III verdaut und mit pBM20 ligiert, aus dem zuvor das entsprechende 743 Basenpaare *Nco*I-*Hind*III-Fragment ausgeschnitten worden war welches für die allosterische Domäne der Wildtyp-Threonindehydratase kodiert.

Mit diesen *in vitro* erzeugten Ligationsprodukten, die auch mutierte Threonindehydratasegene enthielten wurde nun *E. coli* JM109 nach bekanntem Verfahren transformiert (Hanahan, Techniques for Transformation of *E. coli* (1985) DNA cloning, Volume 1, pp 109-136, IRL Press Oxford), und etwa 10 000 Plasmid enthaltende

Klone auf Luria-Bertani Medium (Lennox, Virology 1 (1955) 190-206)), das 50 µg/ml Ampicillin enthielt erhalten.

Um nun die Klone zu identifizieren die für eine nicht mehr feed back hemmbare Threonindehydratase kodieren wurde Luria-Bertani Medium hergestellt, das zusätzlich 40 mM L-Threonin als Substrat der Threonindehydratase enthielt, sowie 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid zur Induktion der *lacZ* bedingten Expression des Threonindehydratasegens. Wie bekannt, enthält das Luria Bertani Medium bereits ausreichend L-Valin zur Hemmung der Acetohydroxysäresynthaseaktivität in *E.coli* (Umbarger, Biosynthesis of branched-chain amino acids (1987) Escherichia coli and Salmonella typhimurium Vol 1, pp 352-367, American Society for Microbiology, Washington DC) um somit in dem hier beschriebenen Verfahren eine möglichst hohe Akkumulation von α-Ketobutyrat zu erreichen. Neben dem Luria-Bertani Medium, das Threonin und Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid enthielt, wurde zur Kontrolle das gleiche Medium ohne Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid hergestellt, wo also keine Induktion der Threonindehydratase erfolgt. Anschließend wurden die Klone von *E. coli* JM109 die die zu prüfenden pBM20 Derivate enthielten auf diese Platten in konventioneller Weise gestempelt und 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach konnten auf dem Medium welches Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid enhielt 60 abnorm wachsende Kolonien identifiziert werden, die sich durch geringeres Wachstum, oder blassere Kolonie, oder zerklüfteten Kolonierand auszeichneten, aber auf dem Kontrollmedium ohne Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid normal wuchsen. Diese Klone wurden einzeln einem identischen Nachtest unterzogen, und schließlich 6 der Klone mit ausgeprägtester Wachstumsverzögerung einem biochemischen Test

zur Charakterisierung der Regulation der sie enthaltenden Threonindehydratasen unterzogen.

1.2 Charakterisierung der Hemmung der Enzyme.

Sechs der so erhaltenen rekombinanten Klone von *E. coli* JM109 wurden in 100 ml LB Flüssigmedium, das zusätzlich 50 µg Ampicillin/ml enthielt beimpft, und bei 37 °C inkubiert. Die optische Dichte (OD_{600nm}) wurde verfolgt, und bei Erreichen der OD von 0,5, Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid in einer Endkonzentration von 0,5 mM zugegeben. Nach Inkubation für eine weitere Stunde bei 37 °C wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, einmal mit Puffer pH 7,0 (0,1 M Kaliumphosphat, 0.5 mM L-Isoleucin, 0,2 mM Pyridoxalphosphat) gewaschen, in 1 ml des gleichen Puffers aufgenommen, und durch Ultraschallbehandlung im Branson-Sonifier W250 (3 Minuten, gepulst mit einem Intervall von 20%, Leistungs-output von 2) desintegriert. Zur Abtrennung der Zelltrümmer wurde das Homogenat 10 Minuten bei 13000 UpM und 4 °C in einer Sigma Kühlzentrifuge zentrifugiert, und danach der resultierende klare Überstand (Rohextrakt) im Enzymtest zur Bestimmung der Threonindehydrataseaktivität und -regulation benutzt.

Der Enzymtest enthielt in einem Endvolumen von 0,8 ml, 0,1 M Kaliumphosphat (pH 8,2), 1 mM Pyridoxalphosphat, 40 mM L-Threonin, und Rohextrakt. Der Ansatz wurde bei 30 °C inkubiert und 200 µl Proben nach 0 und 30 Minuten entnommen. Die Threonindehydratasereaktion wurde jeweils durch Zugabe von 1 ml Reagenz beendet. Dies bestand aus 1 g Semicarbazid plus 0,9 g

Natriumcetat in 100 ml Wasser. Nach 15 minütiger Inkubation bei 30 °C wurde 3 ml Wasser dazugegeben, und die Extinktion bei 254 nm im Zeiss Spektralphotomer PM6 bstimmt. Kontrollen und Eichwerte mit 0 bis 1,5 µmol Ketobutyrat wurden identisch behandelt, und aus einer Eichkurve die tatsächlich im Enzymtest gebildete durch die Threonindehydratase gebildete Ketobutyratmenge ermittelt. Parallel wurden identische Ansätze durchgeführt, die zur Prüfung auf Hemmung der Threonindehydratase 5 mM L-Isoleucin enthielten. Unabhängig von dieser Bestimmung wurde wie beschrieben (Bradford, Anal Biochem 72 (1976) 248-254) der Proteingehalt der Rohextrakte bestimmt. Die erhaltenen spezifischen Aktivitäten und der Grad der Hemmung sind aus Tabelle 7 ersichtlich.

Tabelle 7: Charakterisierung mutierter Threonindehydratasen und deren Hemmbarkeit durch L-Isoleucin.

Klon	sp.A. Threonindehydratase (µmol/min mg Protein)	
	- Ile	+ 5 mM Ile
Wildtyp	1,561	0,240
38	1,771	1,907
16	0,412	0,251
31	1,932	0,590
50	0,220	0,132
54	0,28	0,136
14	1,708	1,989

Es ist direkt ersichtlich, daß die mutierten Enzyme 38 und 14 ohne jede allosterische Hemmung durch L-Isoleucin sind. Das Enzym der Mutante 31 weist in Anwesenheit von L-Isoleucin noch 30 % Restaktivität auf, wogegen das Enzym des Wildtyps unter diesen Bedingungen nur noch 15 % Restaktivität hat.

1.3 Charakterisierung des Mutationsortes der Enzyme.

Zur Bestimmung der Mutationen in den hergestellten Enzymen wurden die für Threonindehydratase kodierenden Plasmide aus den *E. coli* JM109 Klonen nach Standardverfahren isoliert. Die Sequenzierung der mutierten Region des Threonindehydratasegens erfolgte mit Hilfe der Didesoxynukleotid-Terminationsmethode nach Sanger et al. (Sanger et l., Proceedings of the National Academy of Sciences,

USA (1977) 5463-5467). Als Primer wurden Fluoreszein markierte sequenzspezifische Nukleotide nach der entsprechenden Firmenvorschrift von Pharmacia synthetisiert (Pharmacia, Uppsala, Schweden). Diese Primer wurden mittels Hochdruckflüssigchromatografie mit einem Gradienten von 5 - 30 % Acetonitril in 100 mM Triethylaminacetat pH 7,0 und der Pharmacia SuperPac^{R} Pep-S, 5 µm gereinigt. Die Primer wurden in einer Standard-Sequenzierungsreaktion eingesetzt und während der Elektrophorese die Reaktionsprodukte durch Fluoreszdetektion auf dem A.L.F. Sequencer (Pharmacia, Uppsala, Sweden) und automatisch detektiert und die resultierende Sequenz aufgezeichnet.

Für die Sequenzierung verwendete Primer. Die Position der Basen bezieht sich auf die Sequenz in Fig. 3 in Möckel et al. J Bacteriol 174 (1992) 8065-8072.

Base 957-958: 5'Fluoreszein-d(GGTCAGGGCACCGTGGCTGCTG)-3`
Base 1172-1191: 5'Fluoreszein-d(GGAGACTGTTGATCCCTTTG)-3`
Base 1381-1400: 5'Fluoreszein-d(CCTTTGCACCTGGTTCTGTC)-3`
Base 1586-1607: 5'Fluoreszein-d(CCTCAAGCGCAACAACCGTGAG)-3`

Die dadurch festgestellte Sequenz der einzelnen Threonindehydratasegene wurde mit der bekannten des Wildtypgens (Möckel et al. J Bacteriol 174(1992) 8065-8072) verglichen. Die einzelnen Basenaustausche der biochemisch charakterisierten Threonindehydratasegene sind in Tabelle 8 wiedergegeben. Die veränderten Codons wurden in die entsprechenden Aminosäuren anhand des universellen genetischen Codes übersetzt und die somit

festgestellten Aminosäureaustausche, die zu veränderter Regulation der Threonindehydrase führen, ebenfalls in Tabelle 8 aufgeführt. Es wurden Mutationen mit dereguliertem Phänotyp über den gesamten Bereich, der zur Mutation eingesetzt wurde, erhalten. In Mutante 14 liegt eine Doppelmutation vor, was zeigt, daß auch mehrere Aminosäureaustausche in einem Enzym zum gewünschten deregulierten Phänotyp führen können.

Tabelle 8: Genetische Charakterisierung der Threonindehydratasen mit veränderter allosterischer Regulation.

Mutante	Nukleotidauschtausch			Aminosäureaustausch		
	Position	Wildtyp	Mutante	Position	Wildtyp	Mutante
38	1398	GTC	GCC	323	Val	Ala
16	1559	GAT	GGT	377	Asp	Gly
31	1579	TTT	TGT	383	Phe	Cys
50	1200	GCA	GGA	257	Ala	Gly
54	1026	ATG	GTG	199	Met	Val
14	1264	CAC	CGC	278	His	Arg
+	1483	TTG	TCG	351	Leu	Ser

2. Bestimmung der Isoleucinausscheidung durch deregulierte Enzyme.

Die gewonnenen Allele wurden in *E. coli/C. glutamicum* shuttle Vektoren umkloniert um sie so in einem Threoninproduzenten von *C. glutamicum* exprimieren zu können.

Dazu wurde zunächst der *E. coli/C. glutamicum* shuttle Vektor pKW0 nach bekannten Klonierungsverfahren (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) hergestellt. Der resultierende Vektor ist in Figur 3 dargestellt. Er ist 9.5 kb groß, und enthält (i) das *C. glutamicum* Replicon pGA2 (Sonnen, Molekulargenetische Charakterisierung von Phagen-Wirt-Beziehungen bei coryneformen Aminosäure-Produzenten, Dissertation, Technische Hochschule Darmstadt, 1991), das zu nur niedriger Kopienzahl in *C. glutamicum* führt, (ii) das *E. coli* Replikon aus pOU71 (Larsen et al., Gene 28 (1984) 45-54), das zu einer Kopie/Zelle bei 30 °C führt, aber bis zu 1000 Kopien/Zelle bei 42 °C, (iii) der Tetracyclinresistenz aus pHY163 (Ishiwa and Shibahara, Jpn J Genet 60 (1985) 485-498)), und (iv) der cos-site aus pBTI-1 (Boehringer, Mannheim). Die *ilvA* Allele 14, 16 und 18, sowie das Wildtypallel wurden aus den unter 1.1 hergestellten pBM20 Derivaten als *Eco*RI-Fragmente isoliert, und mit dem *Eco*RI restringierten Vektor pKW0 ligiert, um pKW0*ilvA*, pKW0*ilvA*14, pKW0*ilvA*16, und pKW0*ilvA*38 zu ergeben. Mit diese Plasmiden wurde mittels Elektroporation (Liebl et al., FEMS Microbiol Lett 65 (1985) 299-304) der Threoninproduzent MH20-22B::pSUR5-DR1 (Reinscheid et al., Appl Env Microbiol (1994), in press) transformiert. MH20-22B ist bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen unter der Nummer DSM 6870 hinterlegt, sowie MH20-22B::pSUR5-DR1 (DSM 8890) und MH20-22B::pSUR5-DR1 pKW0*ilvA*16 (DSM

8889). Diese Stämme wurden in dem Minimalmedium CGXII wie beschrieben kultiviert (Keilhauer et al., J Bacteriol 175 (1993) 5595-5603), und nach 72 stündiger Inkubation die im Kulturmedium akkumulierten Aminosäuren bestimmt. Aus der Tabelle 9 geht die eindeutige Steigerung der L-Isoleucinbildung durch die Mutantenallele hervor.

Tabelle 9: Einfluß der Expression der Allele der Mutanten 38, 14 und 16 auf die Aminosäureproduktion mit *C. glutamicum*.

Stamm	Thr	Lys	Ile
		(mM)	
MH20-22B	0	76	1
MH20-22B::pSUR5-DR1	36	26	16
MH20-22B::pSUR5-DR1 pKW0*ilvA*	14	26	40
MH20-22B::pSUR5-DR1 pKW0*ilvA*14	0	24	55
MH20-22B::pSUR5-DR1 pKW0*ilvA*16	0	22	50
MH20-22B::pSUR5-DR1 pKW0*ilvA*38	0	20	53

In einem weiteren Experiment wurde das Wildtypallel und das der Mutante 38 in den high copy Pendelvektor pECM3 (A. Schäfer, Diplomarbeit, 1991, Universität Bielefeld) integriert. Die Fragmente wurden wiederum aus den unter 1.1 hergestellten pBM20 Derivaten als *Eco*RI-Fragmente isoliert, und mit dem *Eco*RI restringierten Vektor ligiert, um pECM3*ilvA* und pECM3*ilvA*38 zu ergeben. Mit diese Plasmiden wurde mittels Elektroporation (Liebl et al., FEMS Microbiol Lett 65 (1985) 299-304) der

Threoninproduzent MH20-22B::pSUR5-DR1 (Reinscheid et al., Appl Env Microbiol (1994), in press) transformiert. MH20-22B ist bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen unter der Nummer DSM 6870 hinterlegt, sowie MH20-22B::pSUR5-DR1 (DSM 8890) und MH20-22B::pSUR5-DR1 pECM3*ilvA*38 (DSM 8891). Diese Stämme wurden in dem MH20-22B-Minimalmedium (Schrumpf et al. Appl Microbiol Biotechnol 37 (1992) 566-571) wie beschrieben kultiviert, und nach 72 stündiger Inkubation die im Kulturmedium akkumulierten Aminosäuren bestimmt. Aus der Tabelle 10 geht wiederum die eindeutige Steigerung der L-Isoleucinbildung durch das jeweilige Mutantenallel hervor.

Tabelle 10: Einfluß der Expression des Allels der Mutante 38, auf die Aminosäureproduktion mit *C. glutamicum*.

Stamm	Thr	Lys	Ile
	(mM)		
MH20-22B	0	158	2
MH20-22B::pSUR5-DR1	53	61	29
MH20-22B::pSUR5-DR1 pECM3*ilvA*	0	55	88
MH20-22B::pSUR5-DR1 pECM3*ilvA*38	0	59	125

Tabelle 1

Mutante 38

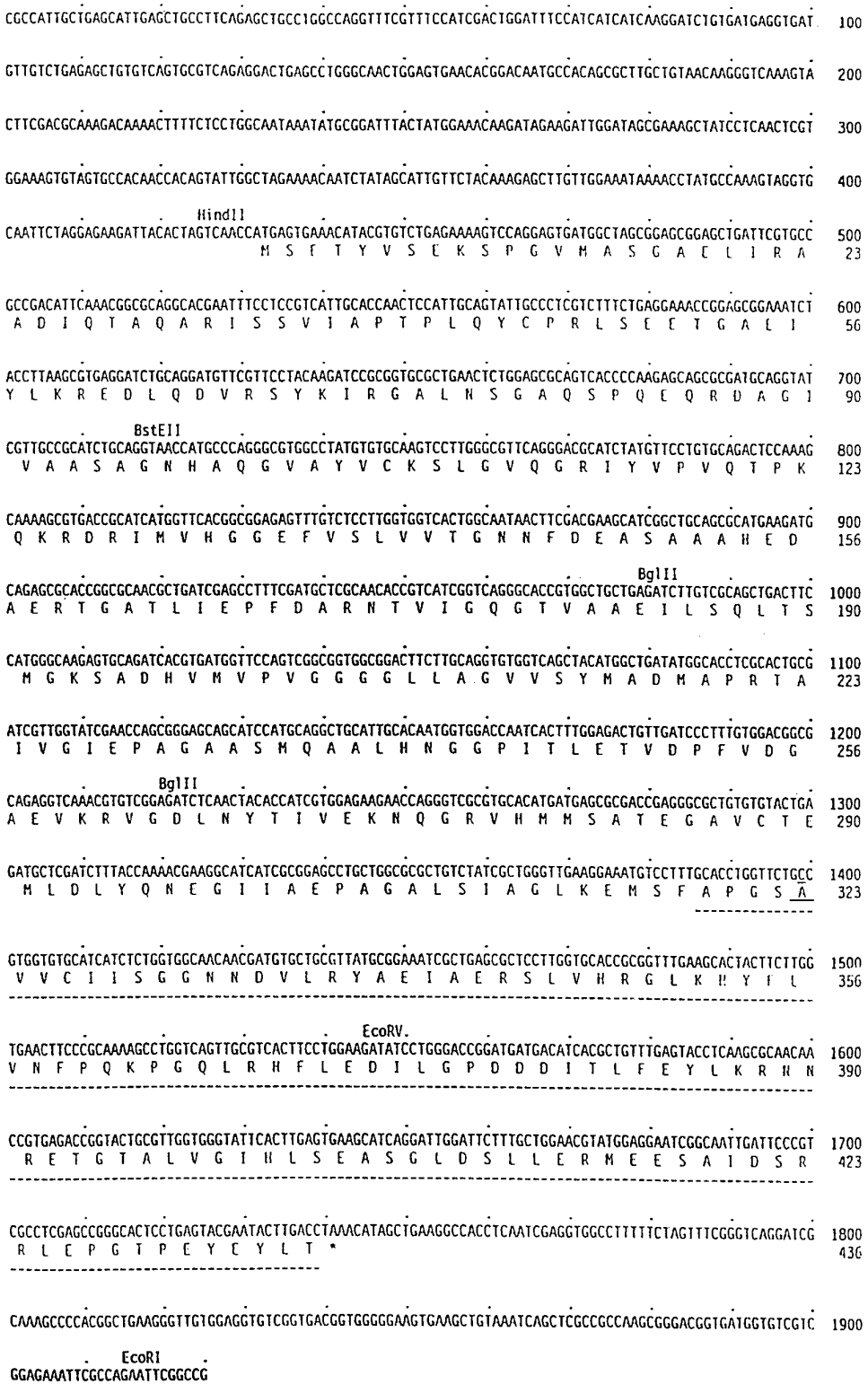


Tabelle 2

Mutante 16

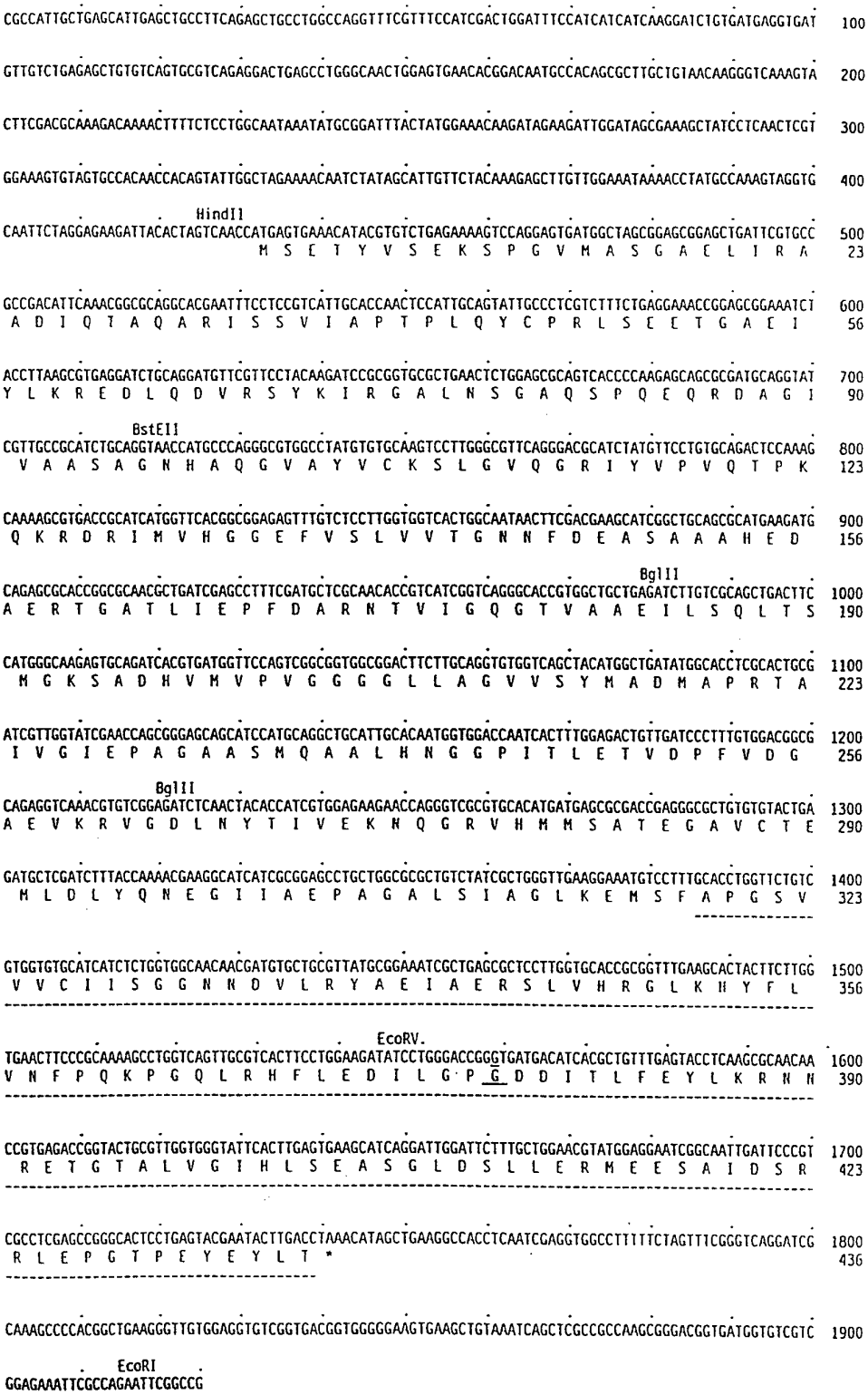


Tabelle 3

Mutante 31

```
CGCCATTGCTGAGCATTGAGCTGCCTTCAGAGCTGCCTGGCCAGGTTTCGTTTCCATCGACTGGATTTCCATCATCATCAAGGATCTGTGATGAGGTGAT  100

GTTGTCTGAGAGCTGTGTCAGTGCGTCAGAGGACTGAGCCTGGGCAACTGGAGTGAACACGGACAATGCCACAGCGCTTGCTGTAACAAGGGTCAAAGTA  200

CTTCGACGCAAAGACAAAACTTTTCTCCTGGCAATAAATATGCGGATTTACTATGGAAACAAGATAGAAGATTGGATAGCGAAAGCTATCCTCAACTCGT  300

GGAAAGTGTAGTGCCACAACCACAGTATTGGCTAGAAAACAATCTATAGCATTGTTCTACAAAGAGCTTGTTGGAAATAAAACCTATGCCAAAGTAGGTG  400

                HindII
CAATTCTAGGAGAAGATTACACTAGTCAACCATGAGTGAAACATACGTGTCTGAGAAAAGTCCAGGAGTGATGGCTAGCGGAGCGGAGCTGATTCGTGCC  500
                                M  S  E  T  Y  V  S  E  K  S  P  G  V  M  A  S  G  A  E  L  I  R  A   23

GCCGACATTCAAACGGCGCAGGCACGAATTTCCTCCGTCATTGCACCAACTCCATTGCAGTATTGCCCTCGTCTTTCTGAGGAAACCGGAGCGGAAATCT  600
 A  D  I  Q  T  A  Q  A  R  I  S  S  V  I  A  P  T  P  L  Q  Y  C  P  R  L  S  E  E  T  G  A  E  I    56

ACCTTAAGCGTGAGGATCTGCAGGATGTTCGTTCCTACAAGATCCGCGGTGCGCTGAACTCTGGAGCGCAGTCACCCCAAGAGCAGCGCGATGCAGGTAT  700
 Y  L  K  R  E  D  L  Q  D  V  R  S  Y  K  I  R  G  A  L  N  S  G  A  Q  S  P  Q  E  Q  R  D  A  G  I   90

          BstEII
CGTTGCCGCATCTGCAGGTAACCATGCCCAGGGCGTGGCCTATGTGTGCAAGTCCTTGGGCGTTCAGGGACGCATCTATGTTCCTGTGCAGACTCCAAAG  800
  V  A  A  S  A  G  N  H  A  Q  G  V  A  Y  V  C  K  S  L  G  V  Q  G  R  I  Y  V  P  V  Q  T  P  K   123

CAAAAGCGTGACCGCATCATGGTTCACGGCGGAGAGTTTGTCTCCTTGGTGGTCACTGGCAATAACTTCGACGAAGCATCGGCTGCAGCGCATGAAGATG  900
 Q  K  R  D  R  I  M  V  H  G  G  E  F  V  S  L  V  V  T  G  N  N  F  D  E  A  S  A  A  A  H  E  D   156

                                                                    BglII
CAGAGCGCACCGGCGCAACGCTGATCGAGCCTTTCGATGCTCGCAACACCGTCATCGGTCAGGGCACCGTGGCTGCTGAGATCTTGTCGCAGCTGACTTC 1000
 A  E  R  T  G  A  T  L  I  E  P  F  D  A  R  N  T  V  I  G  Q  G  T  V  A  A  E  I  L  S  Q  L  T  S  190

CATGGGCAAGAGTGCAGATCACGTGATGGTTCCAGTCGGCGGTGGCGGACTTCTTGCAGGTGTGGTCAGCTACATGGCTGATATGGCACCTCGCACTGCG 1100
  M  G  K  S  A  D  H  V  M  V  P  V  G  G  G  G  L  L  A  G  V  V  S  Y  M  A  D  M  A  P  R  T  A   223

ATCGTTGGTATCGAACCAGCGGGAGCAGCATCCATGCAGGCTGCATTGCACAATGGTGGACCAATCACTTTGGAGACTGTTGATCCCTTTGTGGACGGCG 1200
 I  V  G  I  E  P  A  G  A  A  S  M  Q  A  A  L  H  N  G  G  P  I  T  L  E  T  V  D  P  F  V  D  G   256

          BglII
CAGAGGTCAAACGTGTCGGAGATCTCAACTACACCATCGTGGAGAAGAACCAGGGTCGCGTGCACATGATGAGCGCGACCGAGGGCGCTGTGTGTACTGA 1300
 A  E  V  K  R  V  G  D  L  N  Y  T  I  V  E  K  N  Q  G  R  V  H  M  M  S  A  T  E  G  A  V  C  T  E  290

GATGCTCGATCTTTACCAAAACGAAGGCATCATCGCGGAGCCTGCTGGCGCGCTGTCTATCGCTGGGTTGAAGGAAATGTCCTTTGCACCTGGTTCTGTC 1400
  M  L  D  L  Y  Q  N  E  G  I  I  A  E  P  A  G  A  L  S  I  A  G  L  K  E  M  S  F  A  P  G  S  V   323
                                                                                                  ----------

GTGGTGTGCATCATCTCTGGTGGCAACAACGATGTGCTGCGTTATGCGGAAATCGCTGAGCGCTCCTTGGTGCACCGCGGTTTGAAGCACTACTTCTTGG 1500
 V  V  C  I  I  S  G  G  N  N  D  V  L  R  Y  A  E  I  A  E  R  S  L  V  H  R  G  L  K  H  Y  F  L   356
-------------------------------------------------------------------------------------------------------

                                EcoRV.
TGAACTTCCCGCAAAAGCCTGGTCAGTTGCGTCACTTCCTGGAAGATATCCTGGGACCGGATGATGACATCACGCTGTGTGAGTACCTCAAGCGCAACAA 1600
 V  N  F  P  Q  K  P  G  Q  L  R  H  F  L  E  D  I  L  G  P  D  D  D  I  T  L  C  E  Y  L  K  R  N  N  390
-------------------------------------------------------------------------------------------------------

CCGTGAGACCGGTACTGCGTTGGTGGGTATTCACTTGAGTGAAGCATCAGGATTGGATTCTTTGCTGGAACGTATGGAGGAATCGGCAATTGATTCCCGT 1700
  R  E  T  G  T  A  L  V  G  I  H  L  S  E  A  S  G  L  D  S  L  L  E  R  M  E  E  S  A  I  D  S  R   423
-------------------------------------------------------------------------------------------------------

CGCCTCGAGCCGGGCACTCCTGAGTACGAATACTTGACCTAAACATAGCTGAAGGCCACCTCAATCGAGGTGGCCTTTTTCTAGTTTCGGGTCAGGATCG 1800
 R  L  E  P  G  T  P  E  Y  E  Y  L  T  *                                                             436
-------------------------------------

CAAAGCCCCACGGCTGAAGGGTTGTGGAGGTGTCGGTGACGGTGGGGGAAGTGAAGCTGTAAATCAGCTCGCCGCCAAGCGGGACGGTGATGGTGTCGTC 1900

          EcoRI
GGAGAAATTCGCCAGAATTCGGCCG
```

ERSATZBLATT

Tabelle 4

Mutante 50

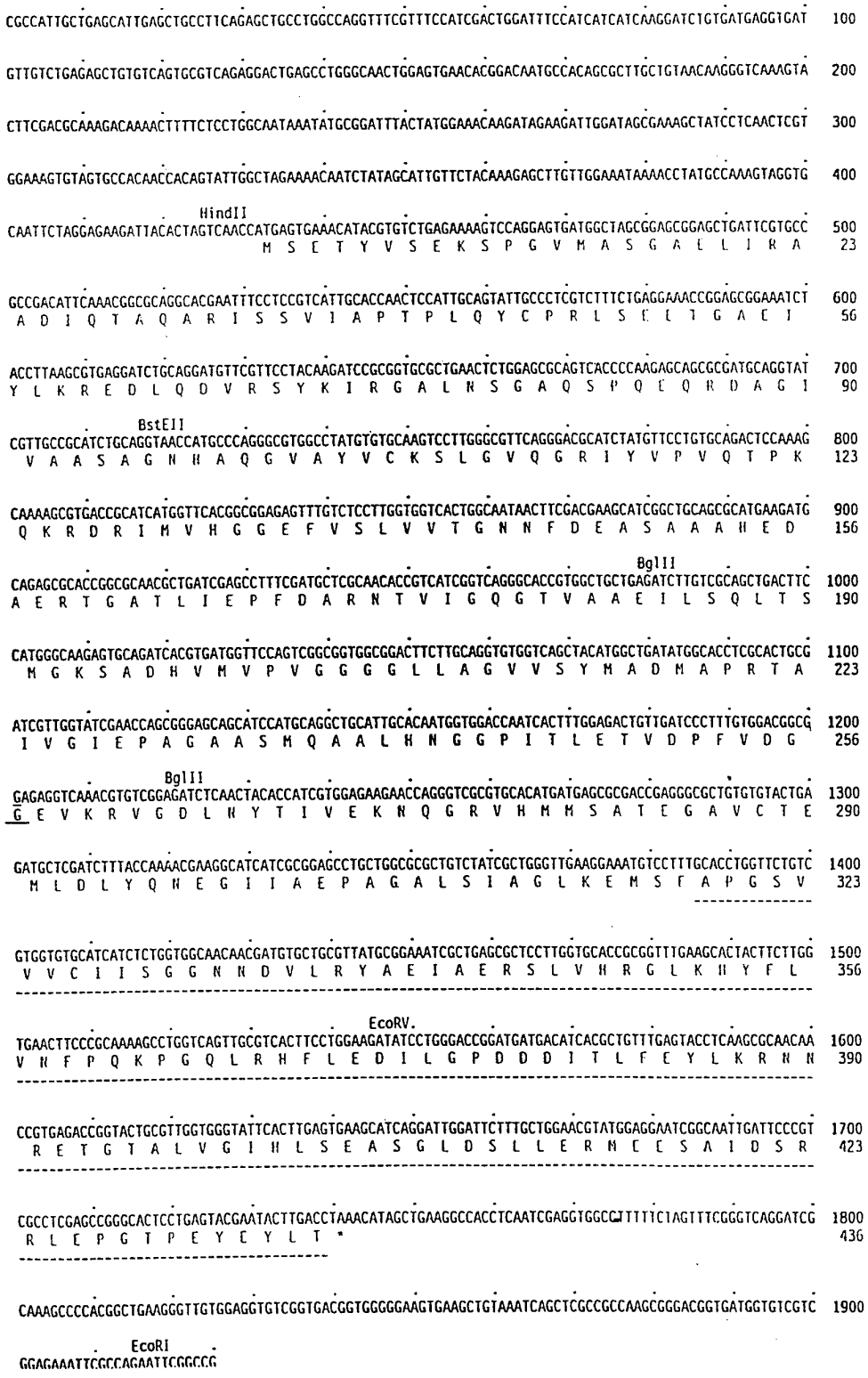


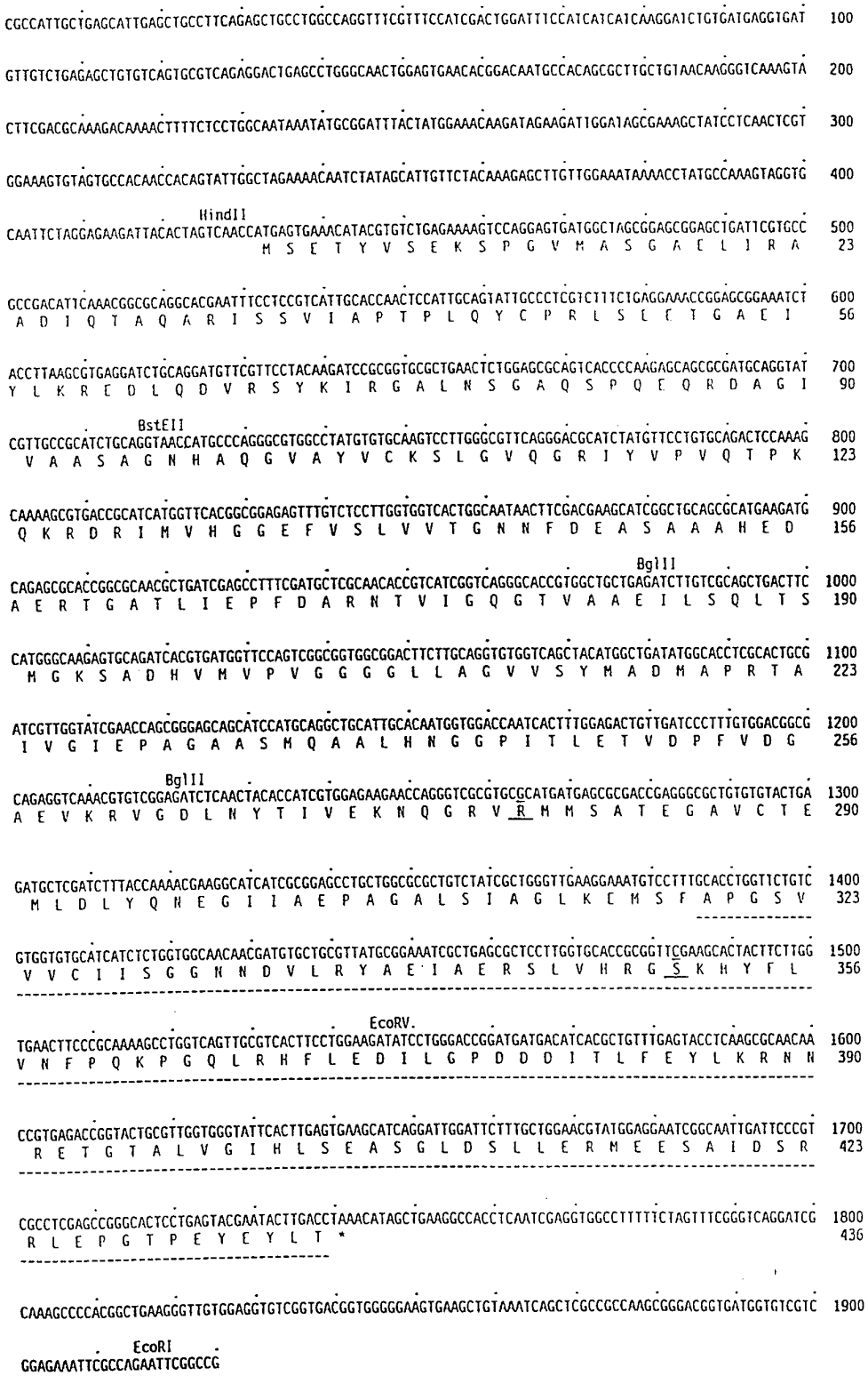
Tabelle 5

Mutante 54

```
CGCCATTGCTGAGCATTGAGCTGCCTTCAGAGCTGCCTGGCCAGGTTTCGTTTCCATCGACTGGATTTCCATCATCATCAAGGATCTGTGATGAGGTGAT  100

GTTGTCTGAGAGCTGTGTCAGTGCGTCAGAGGACTGAGCCTGGGCAACTGGAGTGAACACGGACAATGCCACAGCGCTTGCTGTAACAAGGGTCAAAGTA  200

CTTCGACGCAAAGACAAAACTTTTCTCCTGGCAATAAATATGCGGATTTACTATGGAAACAAGATAGAAGATTGGATAGCGAAAGCTATCCTCAACTCGT  300

GGAAAGTGTAGTGCCACAACCACAGTATTGGCTAGAAAACAATCTATAGCATTGTTCTACAAAGAGCTTGTTGGAAATAAAACCTATGCCAAAGTAGGTG  400

                    HindII
CAATTCTAGGAGAAGATTACACTAGTCAACCATGAGTGAAACATACGTGTCTGAGAAAAGTCCAGGAGTGATGGCTAGCGGAGCGGAGCTGATTCGTGCC  500
                              M  S  E  T  Y  V  S  E  K  S  P  G  V  M  A  S  G  A  E  L  I  R  A   23

GCCGACATTCAAACGGCGCAGGCACGAATTTCCTCCGTCATTGCACCAACTCCATTGCAGTATTGCCCTCGTCTTTCTGAGGAAACCGGAGCGGAAACT  600
 A  D  I  Q  T  A  Q  A  R  I  S  S  V  I  A  P  T  P  L  Q  Y  C  P  R  L  S  E  E  T  G  A  E  T     56

ACCTTAAGCGTGAGGATCTGCAGGATGTTCGTTCCTACAAGATCCGCGGTGCGCTGAACTCTGGAGCGCAGTCACCCCAAGAGCAGCGCGATGCAGGTAT  700
 Y  L  K  R  E  D  L  Q  D  V  R  S  Y  K  I  R  G  A  L  N  S  G  A  Q  S  P  Q  E  Q  R  D  A  G  I   90

              BstEII
CGTTGCCGCATCTGCAGGTAACCATGCCCAGGGCGTGGCCTATGTGTGCAAGTCCTTGGGCGTTCAGGGACGCATCTATGTTCCTGTGCAGACTCCAAAG  800
  V  A  A  S  A  G  N  H  A  Q  G  V  A  Y  V  C  K  S  L  G  V  Q  G  R  I  Y  V  P  V  Q  T  P  K   123

CAAAAGCGTGACCGCATCATGGTTCACGGCGGAGAGTTTGTCTCCTTGGTGGTCACTGGCAATAACTTCGACGAAGCATCGGCTGCAGCGCATGAAGATG  900
 Q  K  R  D  R  I  M  V  H  G  G  E  F  V  S  L  V  V  T  G  N  N  F  D  E  A  S  A  A  A  H  E  D   156

                                                                                    BglII
CAGAGCGCACCGGCGCAACGCTGATCGAGCCTTTCGATGCTCGCAACACCGTCATCGGTCAGGGCACCGTGGCTGCTGAGATCTTGTCGCAGCTGACTTC 1000
 A  E  R  T  G  A  T  L  I  E  P  F  D  A  R  N  T  V  I  G  Q  G  T  V  A  A  E  I  L  S  Q  L  T  S  190

CATGGGCAAGAGTGCAGATCACGTGGTGGTTCCAGTCGGCGGTGGCGGACTTCTTGCAGGTGTGGTCAGCTACATGGCTGATATGGCACCTCGCACTGCG 1100
 M  G  K  S  A  D  H  V  V  V  P  V  G  G  G  G  L  L  A  G  V  V  S  Y  M  A  D  M  A  P  R  T  A  223

ATCGTTGGTATCGAACCAGCGGGAGCAGCATCCATGCAGGCTGCATTGCACAATGGTGGACCAATCACTTTGGAGACTGTTGATCCCTTTGTGGACGGCG 1200
 I  V  G  I  E  P  A  G  A  A  S  M  Q  A  A  L  H  N  G  G  P  I  T  L  E  T  V  D  P  F  V  D  G  256

          BglII
CAGAGGTCAAACGTGTCGGAGATCTCAACTACACCATCGTGGAGAAGAACCAGGGTCGCGTGCACATGATGAGCGCGACCGAGGGCGCTGTGTGTACTGA 1300
 A  E  V  K  R  V  G  D  L  N  Y  T  I  V  E  K  N  Q  G  R  V  H  M  M  S  A  T  E  G  A  V  C  T  E  290

GATGCTCGATCTTTACCAAAACGAAGGCATCATCGCGGAGCCTGCTGGCGCGCTGTCTATCGCTGGGTTGAAGGAAATGTCCTTTGCACCTGGTTCTGTC 1400
 M  L  D  L  Y  Q  N  E  G  I  I  A  E  P  A  G  A  L  S  I  A  G  L  K  E  M  S  F  A  P  G  S  V  323
                                                                                  ----------

GTGGTGTGCATCATCTCTGGTGGCAACAACGATGTGCTGCGTTATGCGGAAATCGCTGAGCGCTCCTTGGTGCACCGCGGTTTGAAGCACTACTTCTTGG 1500
 V  V  C  I  I  S  G  G  N  N  D  V  L  R  Y  A  E  I  A  E  R  S  L  V  H  R  G  L  K  H  Y  F  L  356
-------------------------------------------------------------------------------------------------

                                  EcoRV.
TGAACTTCCCGCAAAAGCCTGGTCAGTTGCGTCACTTCCTGGAAGATATCCTGGGACCGGATGATGACATCACGCTGTTTGAGTACCTCAAGCGCAACAA 1600
 V  N  F  P  Q  K  P  G  Q  L  R  H  F  L  E  D  I  L  G  P  D  D  D  I  T  L  F  E  Y  L  K  R  N  N  390
-------------------------------------------------------------------------------------------------

CCGTGAGACCGGTACTGCGTTGGTGGGTATTCACTTGAGTGAAGCATCAGGATTGGATTCTTTGCTGGAACGTATGGAGGAATCGGCAATTGATTCCCGT 1700
  R  E  T  G  T  A  L  V  G  I  H  L  S  E  A  S  G  L  D  S  L  L  E  R  M  E  E  S  A  I  D  S  R  423
-------------------------------------------------------------------------------------------------

CGCCTCGAGCCGGGCACTCCTGAGTACGAATACTTGACCTAAACATAGCTGAAGGCCACCTCAATCGAGGTGGCCTTTTTCTAGTTTCGGGTCAGGATCG 1800
 R  L  E  P  G  T  P  E  Y  E  Y  L  T  *                                                            436
-----------------------------------

CAAAGCCCCACGGCTGAAGGGTTGTGGAGGTGTCGGTGACGGTGGGGGAAGTGAAGCTGTAAATCAGCTCGCCGCCAAGCGGGACGGTGATGGTGTCGTC 1900

          EcoRI
GGAGAAATTCGCCAGAATTCGGCCG
```

Tabelle 6

Mutante 14



P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von L-Isoleucin, bei dem in einem in vitro vorliegenden Gen einer - an der mikrobiellen Synthese des L-Isoleucins als Schlüsselenzym beteiligten - Threonindehydratase durch Mutation in dem für die allosterische Domäne des Enzyms kodierenden Genbereich ein oder mehrere Basen so ausgetauscht werden, daß mindestens eine Aminosäure in der Aminosäuresequenz der allosterischen Domäne des Enzyms durch eine andere so ersetzt wird, daß das Enzym nicht mehr durch L-Isoleucin feed back gehemmt wird, wonach nach Transformation derart mutierter Threonindehydratasegene in eine Threonin oder L-Isoleucin produzierende Wirtszelle diese vermehrt L-Isoleucin bildet.

2. Verfahren nach Anspruch 1, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß das für die Mutagenese in vitro vorliegende Threonindehydratasegen aus Corynebacterium glutamicum stammt.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , daß zur Isolierung von Klonen mit deregulierter, d.h. keiner feed back Hemmung durch L-Isoleucin unterliegender Threonindehydratase die durch Mutation veränderten Threonindehydratasegene in einen Mikroorganismus transformiert werden, dessen Acetohydroxysäuresynthase-Aktivität durch

L-Valin hemmbar ist, wonach nach Wachstum der Transformanden auf L-Isoleucin und L-Valin enthaltendem festen Medium die eine deregulierte Threonindehydratase enthaltenden Klone durch Abimpfen von Kolonien mit durch Akkumulation von Ketobutyrat bewirkter, veränderter Morphologie erhalten werden.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Medium zusätzlich eine Substanz zur Induktion des Threonindehydratasegens enthält.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Substanz zur Induktion des Threonindehydratasegens IPTG ist.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Medium zusätzlich L-Threonin als Substrat für die Threonindehydratase enthält.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die durch Mutation veränderten Threonindehydratasegene nach Escherichia coli K 12 transformiert werden.

8. Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von L-Isoleucin, bei dem in einem in vitro vorliegenden Gen einer - an der mikrobiellen Synthese des L-Isoleucins als Schlüsselenzym beteiligten -

Threonindehydratase aus Corynebacterium glutamicum durch Basenaustausch außerhalb des für die allosterische Domäne des Enzyms kodierenden Genbereichs die Aminosäure Alanin in der Position 257 der Aminosäuresequenz des Enzyms durch die Aminosäure Glycin (Tabelle 4) oder die Aminosäure Methionin in der Position 199 der Aminosäuresequenz des Enzyms durch die Aminosäure Valin ersetzt wird (Tabelle 5), wonach nach Transformation derart mutierter Threonindehydratasegene in eine Threonin oder L-Isoleucin produzierende Wirtszelle diese vermehrt L-Isoleucin bildet.

9. Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von L-Isoleucin, bei dem in einem in vitro vorliegenden Gen einer - an der mikrobiellen Synthese des L-Isoleucins als Schlüsselenzym beteiligten - Threonindehydratase aus Corynebacterium glutamicum durch Basenaustausch außerhalb des für die allosterische Domäne des Enzyms kodierenden Genbereichs die Aminosäure Histidin in der Position 278 der Aminosäuresequenz des Enzyms durch die Aminosäure Arginin und innerhalb des für die allosterische Domäne des Enzyms kodierenden Genbereichs die Aminosäure Leucin in der Position 351 der Aminosäuresequenz des Enzyms durch die Aminosäure Serin ersetzt wird (Tabelle 6), wonach nach Transformation eines derart mutierten Threonindehydratasegens in eine Threonin oder L-Isoleucin produzierende Wirtszelle diese vermehrt L-Isoleucin bildet.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Wirtszelle für die Transformation eines mutierten Threonindehydratasegens Corynebacterium glutamicum ist.

11. Threonindehydratasegen mit einem durch ein oder mehrere Basenaustausche beliebig veränderten, für die allosterische Domäne der Threonindehydratase kodierenden Genbereich.

12. Threonindehydratasegen nach Anspruch 11 mit der DNA-Sequenz gemäß einer der Tabellen 1 bis 3, wobei die Tabellen 1 bis 3 Bestandteile dieses Anspruches sind.

13. Threonindehydratasegen mit der DNA-Sequenz gemäß einer der Tabellen 4 bis 6, wobei die Tabellen 4 bis 6 Bestandteile dieses Anspruches sind.

14. Genstruktur, enthaltend ein Gen nach einem der Ansprüche 11 bis 13.

15. Vektor, enthaltend eine Genstruktur nach Anspruch 14.

16. Vektor nach Anspruch 15 mit einem dem Gen vorgeschalteten, durch IPTG induzierbaren Promotor.

17. Transformierte Zelle, enthaltend eine Genstruktur nach Anspruch 14.

18. Transformierte Zelle, enthaltend einen Vektor nach Anspruch 15.

19. Transformierte Zelle, enthaltend einen Vektor nach Anspruch 16.

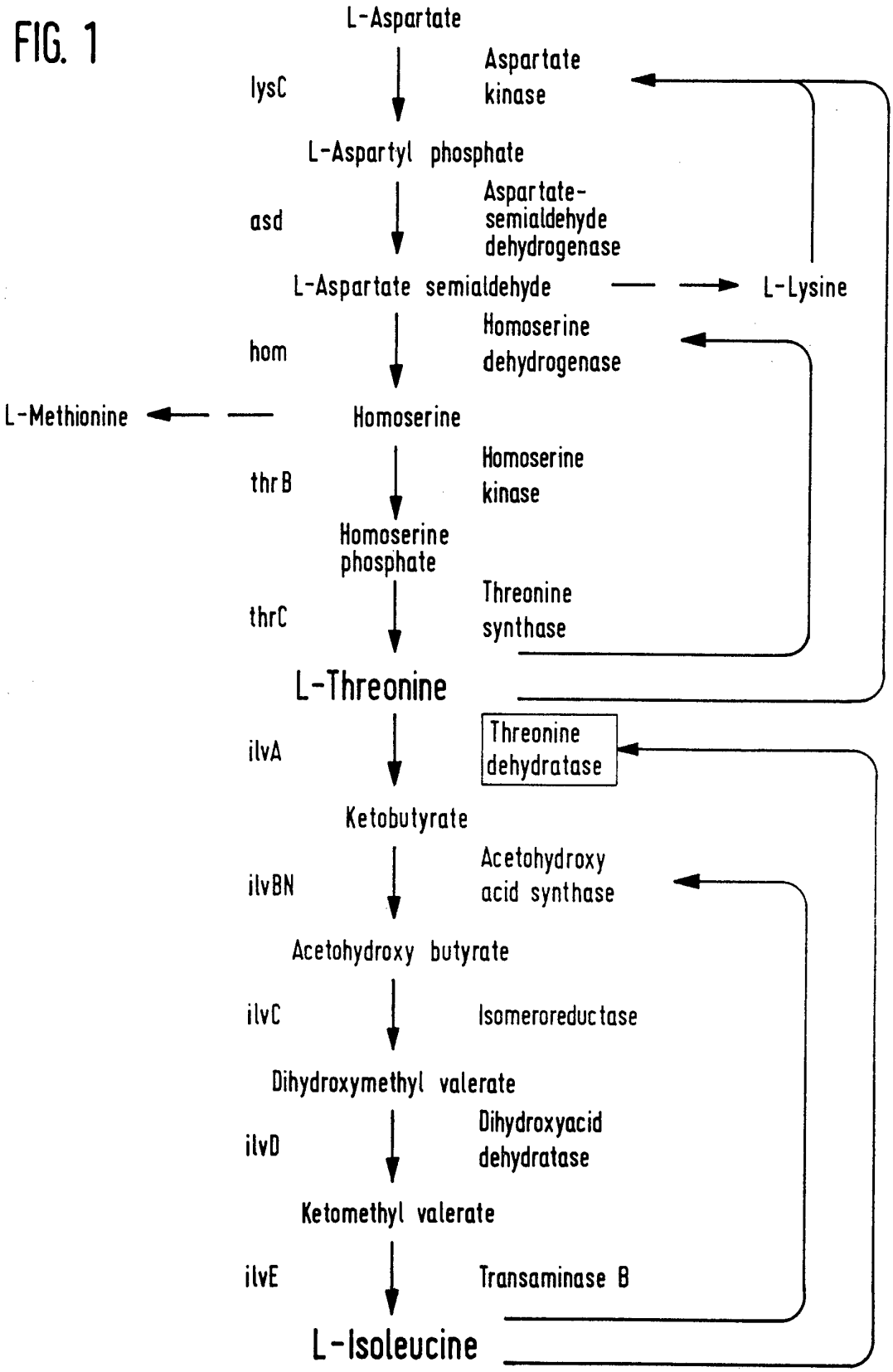
20. Transformierte Zelle nach Anspruch 18 oder 19 mit durch L-Valin hemmbarer Acetohydroxysäuresynthase-Aktivität.

21. Transformierte Zelle nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß sie Escherichia coli K 12 ist.

22. Transformierte Zelle nach Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, daß sie Corynebacterium glutamicum ist.

23. Transformierte Zelle nach Anspruch 17, 18 oder 22 dadurch gekennzeichnet, daß sie nicht mehr die Wildtyp-Threonindehydratase synthetisiert.

FIG. 1



ERSATZBLATT

FIG. 2

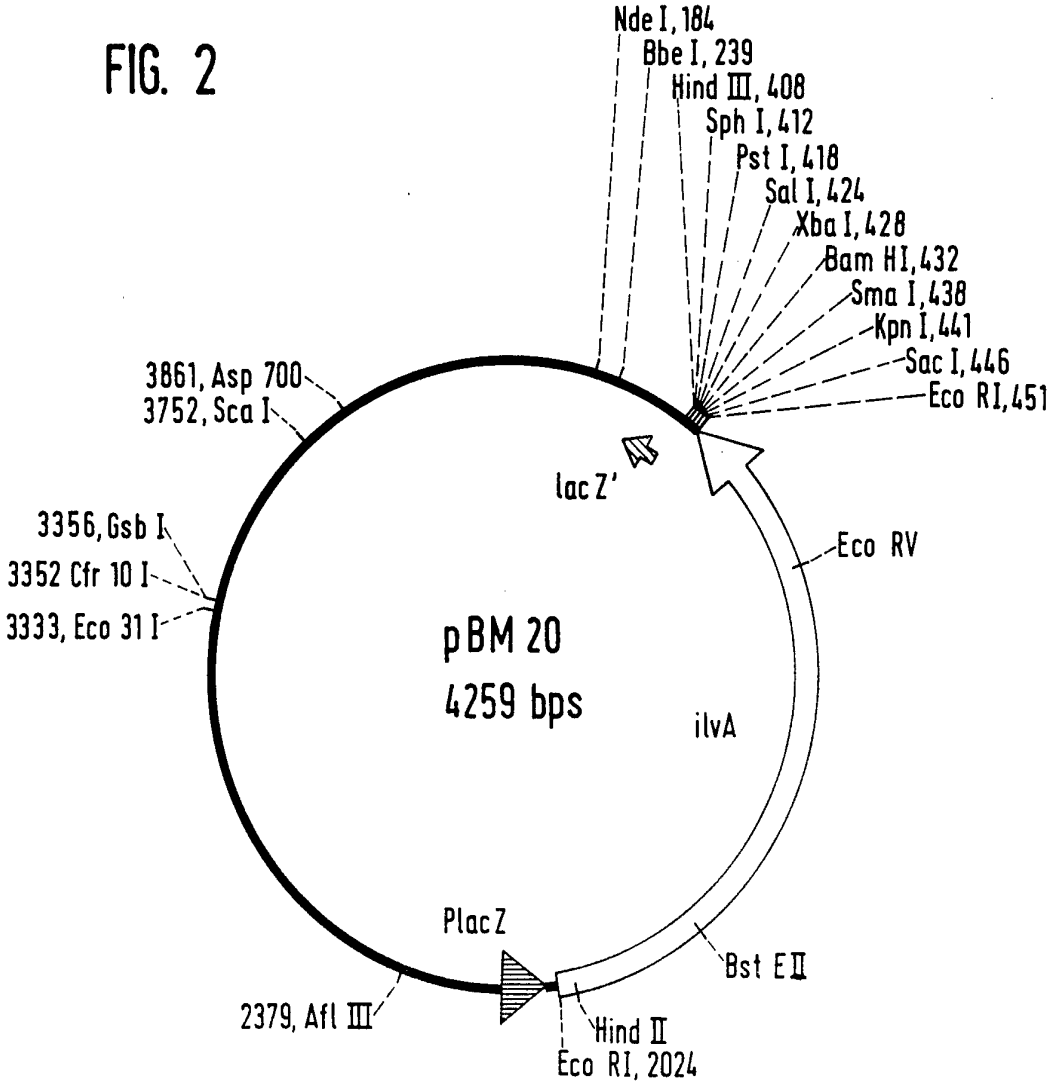
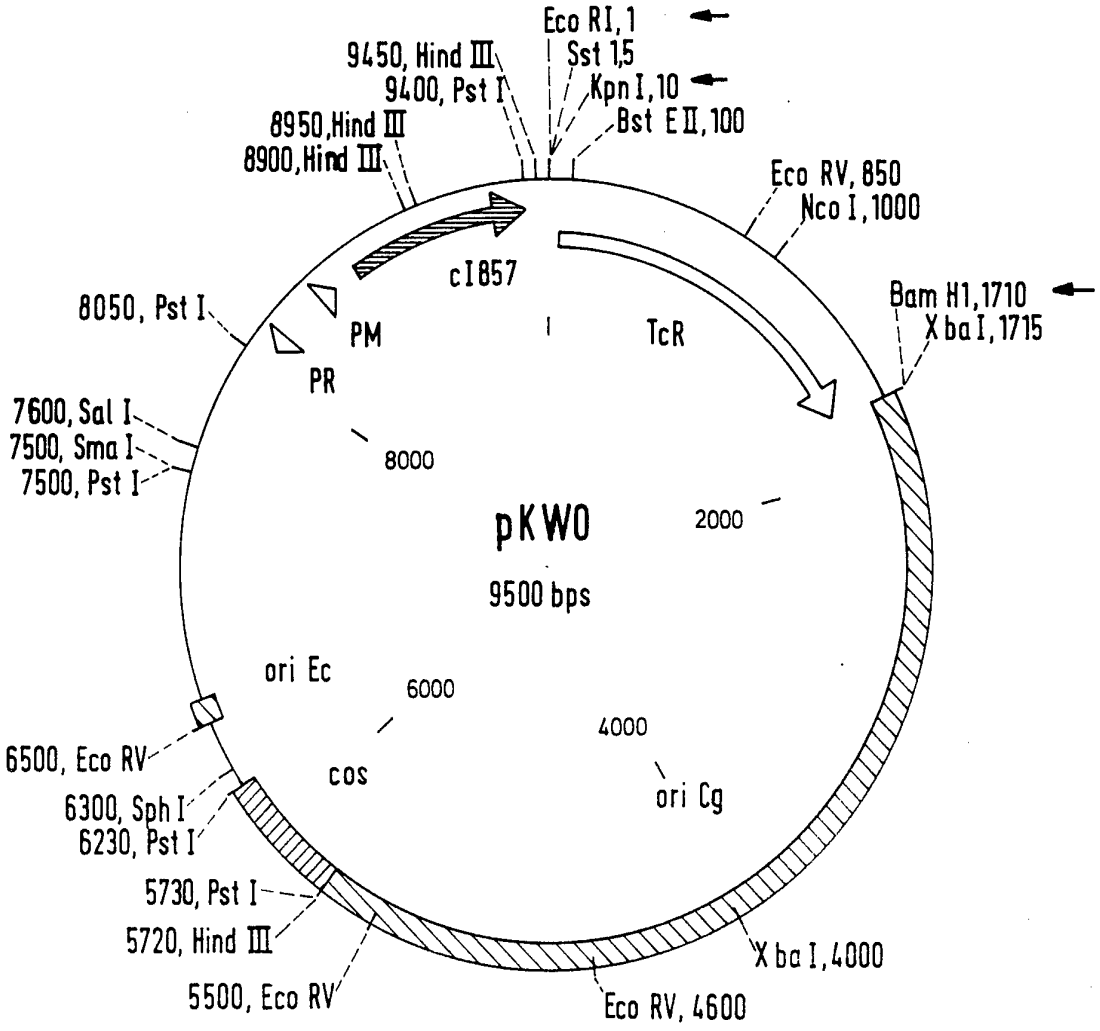

Nde I, 184
Bbe I, 239
Hind III, 408
Sph I, 412
Pst I, 418
Sal I, 424
Xba I, 428
Bam HI, 432
Sma I, 438
Kpn I, 441
Sac I, 446
Eco RI, 451
3861, Asp 700
3752, Sca I
lac Z'
Eco RV
3356, Gsb I
3352 Cfr 10 I
3333, Eco 31 I
pBM 20
4259 bps
ilvA
Plac Z
Bst EII
2379, Afl III
Hind II
Eco RI, 2024

FIG. 3


Eco RI, 1
Sst 1,5
Kpn I, 10
Bst E II, 100
9450, Hind III
9400, Pst I
8950, Hind III
8900, Hind III
Eco RV, 850
Nco I, 1000
cI857
Bam H1, 1710
X ba I, 1715
8050, Pst I
PM
PR
TcR
7600, Sal I
7500, Sma I
7500, Pst I
8000
2000
pKWO
9500 bps
ori Ec
6000
4000
cos
ori Cg
6500, Eco RV
6300, Sph I
6230, Pst I
5730, Pst I
5720, Hind III
5500, Eco RV
X ba I, 4000
Eco RV, 4600

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internatio \pplication No
PCT/DE 95/00017

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/60 C12P13/06 C12N1/21 //(C12N1/21,C12R1:15)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12P C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,87 02984 (AMERICAN BIOGENETICS CORP) 21 May 1987 see claims; example 1 ---	1,11,14, 15,18
X	EP,A,0 436 886 (KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH) 17 July 1991 see the whole document & DE,A,39 42 947 cited in the application --- -/--	1-3,10, 11,14, 15, 17-20, 22,23

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
4 May 1995	24.05.95

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Delanghe, L

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internatio Application No
PCT/DE 95/00017

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 108, no. 17, 25 April 1988 Columbus, Ohio, US; abstract no. 144395, GAVRILOVA, O. F. ET AL 'Genetic mapping of the ilv7434 mutation in Escherichia coli that causes resistance of threonine deaminase to feed - back inhibition by isoleucine' see abstract & GENETIKA (MOSCOW) (1988), 24(1), 13-22 CODEN: GNKAA5;ISSN: 0016-6758, ---	1,11,14, 15,18
P,X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 121, no. 17, 24 October 1994 Columbus, Ohio, US; abstract no. 199457, MOECKEL, BETTINA ET AL 'Threonine dehydratases of Corynebacterium glutamicum with altered allosteric control: their generation and biochemical and structural analysis' see abstract & MOL. MICROBIOL. (1994), 13(5), 833-42 CODEN: MOMIEE;ISSN: 0950-382X, -----	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internatio Application No
PCT/DE 95/00017

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-8702984	21-05-87	AU-A- 6737287	02-06-87
		EP-A- 0245497	19-11-87
		JP-T- 63501687	14-07-88
EP-A-0436886	17-07-91	DE-A- 3942947	27-06-91
		DE-D- 59005821	30-06-94

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internatior Aktenzeichen
PCT/DE 95/00017

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N15/60 C12P13/06 C12N1/21 //(C12N1/21,C12R1:15)

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C12P C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO,A,87 02984 (AMERICAN BIOGENETICS CORP) 21.Mai 1987 siehe Ansprüche; Beispiel 1 ---	1,11,14, 15,18
X	EP,A,0 436 886 (KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH) 17.Juli 1991 siehe das ganze Dokument & DE,A,39 42 947 in der Anmeldung erwähnt --- -/--	1-3,10, 11,14, 15, 17-20, 22,23

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zumVerständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
4.Mai 1995	24. 05. 95

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+ 31-70) 340-3016	Delanghe, L

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 108, no. 17, 25.April 1988 Columbus, Ohio, US; abstract no. 144395, GAVRILOVA, O. F. ET AL 'Genetic mapping of the ilv7434 mutation in Escherichia coli that causes resistance of threonine deaminase to feed - back inhibition by isoleucine' siehe Zusammenfassung & GENETIKA (MOSCOW) (1988), 24(1), 13-22 CODEN: GNKAA5;ISSN: 0016-6758, ---	1,11,14, 15,18
P,X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 121, no. 17, 24.Oktober 1994 Columbus, Ohio, US; abstract no. 199457, MOECKEL, BETTINA ET AL 'Threonine dehydratases of Corynebacterium glutamicum with altered allosteric control: their generation and biochemical and structural analysis' siehe Zusammenfassung & MOL. MICROBIOL. (1994), 13(5), 833-42 CODEN: MOMIEE;ISSN: 0950-382X, -----	1-23

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internatic ; Aktenzeichen
PCT/DE 95/00017

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO-A-8702984	21-05-87	AU-A-	6737287	02-06-87
		EP-A-	0245497	19-11-87
		JP-T-	63501687	14-07-88
EP-A-0436886	17-07-91	DE-A-	3942947	27-06-91
		DE-D-	59005821	30-06-94