

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
3. Juni 2004 (03.06.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/046366 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12P 1/00**

Michael [DE/DE]; Hermann-Barnikol-Strasse 14, 52428 Jülich (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2003/003826

(22) Internationales Anmeldedatum:
19. November 2003 (19.11.2003)

(74) Gemeinsamer Vertreter: **FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH**; Fachbereich Patente, 52425 Jülich (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): CN, JP, KR, US, ZA.

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

(30) Angaben zur Priorität:
102 54 074.8 19. November 2002 (19.11.2002) DE

Veröffentlicht:

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

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): **NIEBISCH, Axel** [DE/DE]; Artilleriestrasse 43, 52428 Jülich (DE). **BOTT,**

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



WO 2004/046366 A2

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING METABOLITES BY MICROBIAL WAY

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR MIKROBIELLEN HERSTELLUNG VON STOFFWECHSELPRODUKTEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing metabolites by microbial way. The inventive method makes it possible to specifically influence an ATP synthesis, thereby controlling the synthesis of metabolites. Said invention also relates to a *ctaF* gene which codes a cytochrome *aa₃ oxydase* born by *Corinebacterium glutamicum*. The *ctaF* gene codes a protein having a function of fourth sub-unit of cytochrome *aa₃ oxydase*.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Stoffwechselprodukten. Durch das erfindungsgemässe Verfahren ist es nunmehr möglich, die Synthese von ATP gezielt zu beeinflussen und damit auch die Synthese von Stoffwechselprodukten zu steuern. Die Erfindung betrifft ein für Cytochrom *aa₃ Oxidase* kodierendes Gen *ctaF* aus *Corynebacterium glutamicum*. Das *ctaF* Gen kodiert für ein Protein, welches die Funktion einer vierten Untereinheit der Cytochrom *aa₃ Oxidase* aufweist.

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

Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von
Stoffwechselprodukten

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Stoffwechselprodukten.

Corynebacterium glutamicum (*C. glutamicum*), ein gram positives Bodenbakterium mit einem hohen G+C Gehalt
5 (54 mol%), wird für die industrielle Produktion von Aminosäuren, insbesondere zur Produktion von L-Glutamat und L-Lysin eingesetzt. Der Syntheseweg dieser Aminosäuren, der Zentralstoffwechsel, welcher die relevanten Vorstufen bereitstellt sowie der Kohlenstoff-Fluss und
10 der Stickstoff-Fluss dieses Organismus ist intensiv untersucht worden [1].

Die Zusammensetzung und ernergetische Effizienz der Atmungskette bei coryneformen Bakterien wurde in den letzten Jahren sowohl genetisch als auch biochemisch
15 intensiv untersucht.

Atmende Organismen können ATP durch oxidative Phosphorylierung synthetisieren. Dabei werden die bei der Oxidation von Substraten entstehenden Reduktionsäquivalente (H oder Elektronen) in die membranständige Atmungskette
20 eingeschleust und die Elektronen letztendlich auf Sauerstoff oder andere terminale Elektronen-Akzeptoren übertragen. Energieerzeugende und energieverbrauchende Stoffwechselwege sind über ATP und das elektrochemische Protonenpotential bzw. das elektrochemische Natrium-
25 ionen-Potential als universelle zelluläre Energieformen miteinander gekoppelt. Die Synthese von ATP kann entweder über Substratstufenphosphorylierung oder durch

Elektronentransportphosphorylierung erfolgen. Der Aufbau des elektrochemischen Protonenpotentials erfolgt durch die Atmungskette oder die Hydrolyse von ATP durch die membranständige F_0F_1 -ATP-Synthase. Die Komponenten
5 der Atmungskette sind Enzyme, die i.d.R. kovalent oder nicht-kovalent gebundene niedermolekulare Gruppen enthalten, z. B. Flavine (Flavoproteine), Eisen-Schwefel-Zentren (Eisen-Schwefel-Proteine) und Häm-Gruppen (Cytochrome). Ein weiterer essentieller Bestandteil von
10 Atmungsketten sind Chinone, d. h. niedermolekulare, membranständige Elektronen- und Protonenüberträger, wie z. B. Ubichinon und Menachinon.

Die Atmungskette von *C. glutamicum* weist mehrere Dehydrogenasen auf, die für den Elektronentransfer zum
15 Intermembranpool des Menachinon-9 [2] verantwortlich sind sowie mindestens zwei Wege für die Reoxidation des Menachinons aufweist, wobei ein Weg der Reoxidation mit Hilfe der Cytochrom *bd*-Oxidase erfolgt und der zweite Weg mit Hilfe des Cytochrom *bc₁* Komplexes und der Cytochrom *aa₃* Oxidase erfolgt. Letztere spielen eine bedeutende Rolle für das Wachstum der Organismen, da Mutanten mit fehlendem *bc₁*-Komplex oder fehlender Cytochrom *aa₃* Oxidase deutliche Wachstumsdefekte aufweisen
20 [2].

Der Cytochrom *bc₁* Komplex wird durch die Gene *qcrCAB* kodiert [2,3]. Dem *qcrC* Gen vorgeschaltet sind die Gene für die Untereinheit II (*ctaC*) und III (*ctaE*) der Cytochrom *aa₃* Oxidase [2,3], wobei der Cytochrom *bc₁* Komplex und die Cytochrom *aa₃* Oxidase, codiert durch *ctaC-DE*, vermutlich einen Superkomplex bilden [2]. Einzelheiten betreffend die Atmungskette in *C. glutamicum* mit den entsprechenden Genen sind auch der WO 02/22799 A2 zu entnehmen.
30

Das u.a. durch die Reaktionen der Atmungskette gewonnene ATP ist der universelle Überträger chemischer Energie zwischen energieerzeugenden und energieverbrauchenden Reaktionen und bedient so heterogene Prozesse wie die Synthese von Bausteinen und Makromolekülen. Energieerzeugende und energieverbrauchende Stoffwechselwege können u. a. über den Energiehaushalt der Zelle bzw. ihren ATP-Gehalt gesteuert werden und damit über die Funktionen der Atmungskette.

10

Es ist daher Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren zu schaffen, mit dem der Stoffwechsel von Zellen reguliert werden kann.

15 Den Erfindern ist es in überraschender Weise gelungen, das Gen zu identifizieren, das für eine bisher unbekannte vierte Untereinheit der Cytochrom aa_3 -Oxidase codiert. Es ist weiterhin Aufgabe der Erfindung Mikroorganismen bereit zu stellen, deren Stoffwechsel gezielt regulierbar ist.

20

Ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 1 wird die Aufgabe erfindungsgemäß gelöst mit den im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 1 angegebenen Merkmalen. Ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 7 wird die Aufgabe weiterhin erfindungsgemäß gelöst mit den im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 7 angegebenen Merkmalen. Die Aufgabe wird ebenso ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 8 und 9 erfindungsgemäß gelöst mit den im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 8 und 9 angegebenen Merkmalen.

25
30

Durch das Verfahren ist es nunmehr möglich, die Synthese von ATP durch Elektronentransportphosphorylierung sowie den Aufbau des elektrochemischen Protonenpotentials über die Atmungskette gezielt zu beeinflussen und damit eine Steuerung der Synthese von Stoffwechselprodukten zu ermöglichen. So kann beispielsweise die mikrobielle Produktion von Stoffwechselprodukten wie beispielsweise Aminosäuren (L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan, L-Arginin), organischen Säuren (Essigsäure, Citronensäure, Isocitronensäure, Milchsäure, Bernsteinsäure, Fumarsäure, Ketoglutarsäure, Brenztraubensäure, Apfelsäure), Vitaminen, Nukleosiden, Nukleotiden und ein- oder mehrwertiger Alkohole durch Einstellung einer geeigneten Energieladung positiv beeinflusst werden. Weiterhin können die erfindungsgemäßen Polynukleotide als Hybridisierungs sonden zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA sowie zur Isolation von Nukleinsäuren, Polynukleotiden oder Genen verwendet werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Stoffwechselprodukten, dadurch gekennzeichnet, daß man folgende Schritte durchführt:

- a) Fermentation der das gewünschte Stoffwechselprodukt produzierenden Bakterien, in denen man die für die vierte Untereinheit der Cytochrom *aa₃* Oxidase codierende Gensequenz *ctaF* abschwächt oder zusammen mit einem Gen oder mehreren Genen aus der Gruppe *ctaC*, *ctaD*, *ctaE*, *qcrA*, *qcrB*, *qcrC* verstärkt.

- b) Anreicherung des gewünschten Stoffwechselprodukts im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und
- c) Isolieren des entsprechenden Stoffwechselprodukts.

Die Bezeichnung „abgeschwächt“ beinhaltet die Abschwächung der Synthese und der Expression im Vergleich zur natürlichen Synthese bzw. Expression der für die vierte Untereinheit der Cytochrom aa_3 Oxidase codierenden Gensequenz (*ctaF*). Der verwendete Begriff „natürlich“ soll dabei die Eigenschaften umfassen, die genetisch nicht veränderte Mikroorganismen, d.h. Wildtypstämme aufweisen. Weiterhin ist unter der Bezeichnung „abgeschwächt“ die vollständige Deletion der für die vierte Untereinheit der Cytochrom aa_3 Oxidase codierenden Gensequenz *ctaF* zu verstehen.

Durch die „Abschwächung“ der *ctaF* Gensequenz kann keine aktive Cytochrom aa_3 Oxidase gebildet werden. Die Reoxidation des Menachinons über den Weg des Cytochrom bc_1 Komplexes und die Cytochrom aa_3 Oxidase ist damit nicht mehr möglich. Die Reoxidation kann nur noch über den Weg der Cytochrom *bd*-Oxidase erfolgen. Durch diese „Abschwächung“ kann die Funktion der Atmungskette gezielt gesteuert werden und so auch der davon abhängige Stoffwechsel in gewünschter Weise beeinflusst werden.

Unter dem Begriff „verstärkt“ ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Erhöhung der Genexpression eines Gens oder mehrerer Gene aus der Gruppe *ctaC*, *ctaD*, *ctaE*, *ctaF*, *qcrA*, *qcrB*, *qcrC* gegenüber dem entspre-

chend nicht genetisch veränderten Mikroorganismus zu verstehen. Eine besonders vorteilhafte Ausführung des Verfahrens umfaßt dabei die Verstärkung aller Gene der vorgenannten Gruppe.

5

Zur Erzielung einer erhöhten Genexpression (Überexpression) kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden. Ferner kann die Promotor- und/oder Regulationsregion und/oder die Ribosomenbindungsstelle, die
10 sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, entsprechend so verändert werden, daß die Expression mit erhöhter Rate erfolgt. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich die Expression im Verlaufe der fermentativen Herstellung der Stoffwechselprodukte zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der mRNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden
15 mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Weiterhin kann auch die Stabilität der exprimierten Polypeptide selbst erhöht sein oder durch die Verhinderung des Abbaus des Proteins verstärkt werden. Alternativ kann
20 ferner eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. [17], bei Guerrero et al. [18], oder
30 Tsuchiya und Morinaga [19].

Durch die Verstärkung eines Gens oder mehrerer Gene aus der Gruppe *ctaC*, *ctaD*, *ctaE*, *ctaF*, *qcrA*, *qcrB*, *qrcC*

wird eine positive Beeinflussung der Atmungskette, insbesondere der durch das *ctaF* codierten Cytochrom *aa₃* Oxidase erreicht. Diese wird sowohl in ihrer Stabilität als auch in ihrer Wirkungsweise zusammen mit anderen

5 Komponenten der Atmungskette durch die Ausbildung ihrer vierten Untereinheit beeinflusst. So kommt es, wie weiter unten beschrieben, beispielsweise zu deutlichen Wachstumsdefekten, wenn das *ctaF* Gen deletiert wird. Durch die „Verstärkung“ der Gene aus der oben genannten

10 Gruppe kann gezielt die Reoxidation des Menachinons über den Cytochrom *bc₁* Komplex und die Cytochrom *aa₃* Oxidase gefördert werden.

Die erfindungsgemäß hergestellten genetisch veränderten

15 Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Herstellung der Stoffwechselprodukte kultiviert werden.

20 Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel [20] oder im Lehrbuch von Storhas [21] beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedenener Mikroorganismen

25 sind beispielsweise in [22] enthalten.

Unter „produzierenden Bakterien“ sind im Sinne der vorliegenden Erfindung *Corynebacterium glutamicum*-Stämme

30 oder homologe Mikroorganismen zu verstehen, die durch klassische und/oder molekulargenetische Methoden derart verändert sind, daß ihr Stoffwechselfluß verstärkt in die Richtung der Biosynthese der gewünschten Stoffwech-

selprodukte läuft. Beispielsweise sind bei diesen Bakterien ein oder mehrere Gen(e) und/oder die korrespondierenden Enzyme, die an entscheidenden und entsprechend komplex regulierten Schlüsselpositionen des

5 Stoffwechselweges (Flaschenhals) stehen, in ihrer Regulation verändert oder sogar dereguliert. Die vorliegende Erfindung umfaßt hierbei sämtliche bereits bekannten Produktionsstämme, bevorzugt der Gattung *Corynebacterium* oder homologer Organismen.

10

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner die Übertragung eines Gens oder mehrerer Gene aus der Gruppe *ctaC*, *ctaD*, *ctaE*, *ctaF*, *qcrA*, *qcrB*, *qcrC* in ein Wirtssystem. Dies schließt auch die Übertragung eines

15 erfindungsgemäßen Genkonstrukts oder Vektors in ein Wirtssystem ein. Diese Übertragung von DNA in eine Wirtszelle erfolgt nach gentechnischen Methoden. Als bevorzugtes Verfahren sei hier die Transformation und besonders bevorzugt die Übertragung von DNA durch

20 Elektroporation genannt.

Als besonders geeignet haben sich homologe Mikroorganismen erwiesen. Unter homologen Mikroorganismen sind Organismen zu verstehen, die alle einer verwandten Familie angehören. Erfindungsgemäß sind hierunter *Corynebacterianeae* zu verstehen, in die die aus coryneformen Bakterien isolierten Gensequenzen der oben beschriebenen Gruppe eingebracht werden bzw. in denen das *ctaF* Gen abgeschwächt wird. Stellvertretend für einen geeigneten homologen Mikroorganismus sei das Bakterium *Corynebacterium glutamicum* und bevorzugt der Stamm

25 30 ATCC13032 genannt. Als Kulturmedium ist je nach Anforderungen ein Komplexmedium wie z. B. LB Medium oder

auch ein Mineralsalzmedium, wie z. B. CGXII-Medium geeignet. Nach entsprechender Kultivierung kann die Bakteriensuspension geerntet und zur weiteren Untersuchung, beispielsweise zur Transformation oder zur Isolierung von Nukleinsäuren nach gängigen Methoden eingesetzt werden. Diese Vorgehensweise kann analog auch auf andere coryneforme Bakterienstämme angewendet werden. Dabei werden als Wirtssysteme Bakterien der Gattung *Corynebacterium* bevorzugt. Innerhalb der Gattung *Corynebacterium* wird besonders die Art *Corynebacterium glutamicum* und innerhalb der Gattung *Brevibacterium* besonders die Art *Brevibacterium flavum* bevorzugt. Zu den Vertretern dieser Gattungen zählen zum einen Stämme, die in ihren Eigenschaften als Wild Typ charakterisiert sind. Hier sind beispielsweise *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14752, *Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC 15806, *Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC 15806, *Corynebacterium melassecola* ATCC 17965, *Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539, zu nennen.

Darüber hinaus schließt die vorliegende Erfindung auch produzierende Bakterienstämme ein, die sich beispielsweise als Aminosäureproduktionsstämme auszeichnen. Diese können z. B. ausgehend von Wildtypstämmen durch klassische (chemische oder physikalische) oder gentechnische Methoden hergestellt werden. Beispiele für erfindungsgemäß geeignete Stämme sind u. a. *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21586, *Corynebacterium glutamicum* KY 10150, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032ApanBC. Ferner sind erfindungsgemäß auch diejenigen Produktionsstämme geeignet, die dem Fachmann allgemein aus mikrobiellen Herstellungsverfahren bekannt sind. Die vorliegende Erfindung wird durch die ausgewählten Bei-

spiele an Mikroorganismen näher charakterisiert, jedoch nicht limitiert.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, dadurch gekennzeichnet, daß man die für die vierte Untereinheit der Cytochrom aa_3 Oxidase codierende Gensequenz *ctaF* als Hybridisierungs-sonde einsetzt.

10

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Mikroorganismus in dem die für die vierte Untereinheit der Cytochrom aa_3 Oxidase (*ctaF*) codierende Gensequenz abgeschwächt ist.

15

Ebenso umfaßt die vorliegende Erfindung einen Mikroorganismus enthaltend ein Gen oder mehrere Gene aus der Gruppe *ctaC*, *ctaD*, *ctaE*, *ctaF*, *qcrA*, *qcrB*, *qcrC* in replizierbarer Form, welche im Vergleich zum Wild Typ Mikroorganismus verstärkt sind.

20

Vorteilhafte Weiterbildungen sind in den Unteransprüchen angegeben.

Die Figuren zeigen modellhaft die, an der Atmungskette beteiligten Komponenten, mit den zugehörigen Genen sowie experimentelle Ergebnisse der durchgeführten Methoden mit dem *ctaF* Gen:

30 Es zeigt:

FIG. 1. Darstellung der Genomregion von *C. glutamicum* mit der Genregion für den bc_1 Komplex (*qcrABC*) und die

Cytochrom aa_3 Oxidase (*ctaCE*) und dem *ctaF* Gen ohne *ctaD*. Die DNA Regionen, die in den Stämmen 13032 Δ *qcr* und 13032 Δ *ctaF* deletiert wurden, sind ebenso eingezeichnet wie die Fragmente in den Plasmiden pJC1-*qcrB_{St}* und den entsprechenden Derivaten sowie im Plasmid pBM20-QXA.

FIG. 2: SDS-Polyacrylamid Gel Analyse des Cytochrom bc_1 Komplexes und des Cytochrome aa_3 Einzel Komplexes sowie des Superkomplexes aus *C. glutamicum*, aufgereinigt durch Affinitäts Chromatographie mit StrepTactin Sepharose mittels *QcrB_{St}* (Derivat des Cytochrom *b* mit C-terminaler Strep-Tag II) oder *CtaD_{St}* (Derivat der Untereinheit I der Cytochrom aa_3 Oxidase mit einem C-terminalen Strep-Tag II). Die Proteine wurden denaturiert, mit Hilfe eines 8-16% Tris-HCl Gradienten-Gels (Biorad) aufgetrennt und mit Coomassie Blau gefärbt. Spur 1, Cytochrom aa_3 Oxidase (7.2 μ g Protein) aufgereinigt aus Stamm Δ Q-D_{St}; Spur 2, Cytochrome bc_1 - aa_3 Superkomplex aufgereinigt aus Stamm Δ C-D_{St} (4.7 μ g); Spur 3, Cytochrom bc_1 - aa_3 Superkomplex aufgereinigt aus Stamm Δ Q-B_{St} (5.7 μ g); Spur 4, Cytochrome bc_1 Komplex aufgereinigt aus Stamm Δ C-B_{St} (4.3 μ g).

FIG. 3: Absolute Redox-Differenzspektren von reduzierten intakten Zellen von *C. glutamicum* ATCC13032 (Wild Typ), 13032 Δ *ctaD*, und 13032 Δ *ctaF*. Die Zellen wurden vor Aufnahme der Spektren bei Raumtemperatur in 100 mM Tris-HCl Puffer (pH 7.5) resuspendiert, auf eine optische Dichte von 200 bei 600 nm eingestellt und durch Zugabe von Dithionit reduziert. Relevante Unterschiede

der einzelnen Cytochrom-Muster sind durch Pfeile markiert. X = Wellenlänge (nm); Y = Absorption

FIG. 4: Sequenzvergleich des CtaF Proteins mit unterschiedlichen Spezies anderer Actinomyceten. Mutmaßliche Transmembran Helices werden durch Linien und Ziffern markiert. Aminosäuren, die in mindestens 5 Sequenzen identisch sind, werden mit schwarzer Schattierung markiert. Konservierte Aminosäure-Austauschbereiche werden grau schattiert dargestellt. Die Bezeichnungen der Bakterien wurden wie folgt abgekürzt: *Cgl*, *C. glutamicum* (NCgl2114); *Cdi*, *C. diphtheriae* (NC_002935); *Mtu*, *Mycobacterium tuberculosis* (Rv2199c); *Mbo*, *M. bovis* (NC_002945); *Mle*, *M. leprae* (ML0876); *Sco*, *Streptomyces coelicolor* (NP_626410); *Tfu*, *Thermobifida fusca* (Tfus_p_278).

Fig. 5: Sequenzprotokoll

SeQ ID No 1:	CtaC Aminosäuresequenz
20 SeQ ID No 2:	ctaC codierende Nukleotidsequenz
SeQ ID No 3:	CtaD Aminosäuresequenz
SeQ ID No 4:	ctaD codierende Nukleotidsequenz
SeQ ID No 5:	CtaE Aminosäuresequenz
SeQ ID No 6:	ctaE codierende Nukleotidsequenz
25 SeQ ID No 7:	CtaF Aminosäuresequenz
SeQ ID No 8:	ctaF codierende Nukleotidsequenz
SeQ ID No 9:	QcrA Aminosäuresequenz
SeQ ID No 10:	qcrA codierende Nukleotidsequenz

- SeQ ID No 11: QcrB Aminosäuresequenz
- SeQ ID No 12: qcrB codierende Nukleotidsequenz
- SeQ ID No 13: QcrC Aminosäuresequenz
- 5 SeQ ID No 14: qcrC codierende Nukleotidsequenz
- SeQ ID No 15: P20 Aminosäuresequenz
- SeQ ID No 16: p20 codierende Nukleotidsequenz
- SeQ ID No 17: P24 Aminosäuresequenz
- SeQ ID No 18: p24 codierende Nukleotidsequenz
- 10 SeQ ID No 19: P29 Aminosäuresequenz
- SeQ ID No 20: p29 codierende Nukleotidsequenz

Im Folgenden sollen die verwendeten Methoden beschrieben werden.

1. Kultivierung der verwendeten Mikroorganismen

In Tab. 1 und Tab. 2 sind die verwendeten Organismenstämme und Plasmide aufgelistet.

- 20 *Corynebacterium glutamicum* wurde bei 30°C entweder in Luria Bertani (LB) Medium (Sambrook et al. 1989) oder in Brain Heart Infusion (BHI) Medium (Difco Laboratories, Detroit, USA) mit 2% (w/v) Glucose oder in CGXII Minimal Medium mit 4% Glucose als Kohlenstoff- und
- 25 Energiequelle (Keilhauer et al. 1993) kultiviert. Falls erforderlich wurde Kanamycin (25 µg/ml) zugegeben.
- Escherichia coli* (*E. coli*) wurde bei 37°C in LB Medium

kultiviert. Gegebenenfalls wurde Kanamycin (50 µg/ml) oder Ampicillin (100 µg/ml) zugegeben.

Für die Präparation rekombinanter DNA wurde Enzyme der Firma Roche Diagnostics oder New England Biolabs eingesetzt. Die eingesetzten Oligonukleotide wurde von MWG Biotech (Ebersberg) bezogen und sind in Tab. 2 aufgelistet. Klonierungsverfahren wurden nach bekannten Standardverfahren durchgeführt [8].

2. Aufreinigung des Cytochrom *bc₁* Komplexes

Die Aufreinigung des Cytochrom *bc₁* Komplexes, ein QcrB Derivat mit C-terminaler Strep Tag II [6] wurde wie folgt durchgeführt: Das gesamte *ctaE-qcrCAB* Genkluster mit der vermeintlichen Promotorregion wurde mittels PCR (Polymerase Chain Reaction) amplifiziert (Expand High Fidelity PCR System, Roche Diagnostics). Dabei wurde ein reverser Primer mit Codons für StrepTag II (WSHPQFEK) und zwei vorangestellten Alanin Codons eingesetzt. Das daraus erhaltene 5,0-kb Fragment wurde in den *E.coli-C.glutamicum* Shuttle Vektor pJC1 hineinkloniert, wobei die durch Primer induzierten XbaI und SalI Restriktionsschnittstellen verwendet wurden. Das resultierende Plasmid pJC1-qcrB_{St} kodiert für ein QcrB Derivat mit zehn zusätzlichen Resten am C-Terminus (berechnetes Molekulargewicht 61,1 kDa). Zur Aufreinigung des Cytochrom *aa₃* Komplexes wurde in ähnlicher Weise ein CtaD Derivat mit einem C-terminalen StrepTag II hergestellt mit dem Unterschied, daß nur die monocistronischen *ctaD* Gene mit ihrem nativen Promotor mittels PCR amplifiziert wurden. Das resultierende 2,0-kb Fragment wurde über die XbaI Schnittstelle in den Vektor pJC1 hineinkloniert, so daß daraus das pJC1-ctaD_{St} Plasmid

resultierte. Das modifizierte CtaD Protein enthielt zehn zusätzliche Reste am C-Terminus (berechnetes Molekulargewicht 66,3 kDA). Jedes der beiden Plasmide wurde in *C. glutamicum* 13032 Δ ctaD und 13032 Δ qcr mittels
5 Elektroporation [8] eingebracht.

3. Membran-Isolation

10 g Zellmasse (Feuchtgewicht) wurden in 15 ml 100 mM Tris/HCl, pH 7,5 mit 5 mM MgSO₄ und 10 mg/l Lysozyme suspendiert. Nach 45 min Inkubation bei 37°C wurde der
10 Protease Inhibitor Phenylmethansulfonylfluorid (1 mM) zugegeben. Es wurde ein Zellaufschluß durchgeführt, in dem die Suspension 5 mal bei 207 MPa durch eine French-Press (SLM Aminco) geleitet wurde. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 27000 x g für 20 min entfernt.
15 Der Überstand (zellfreier Extrakt) wurde für 90 min bei 150000 x g erneut zentrifugiert. Der Rückstand mit der Cytoplasmamembran wurde in 10 mM Tris/HCl bei pH 7,5 resuspendiert (60-80 mg Protein/ml) und erneut für 90 min bei 150000 x g zentrifugiert. Die Membransubstanz
20 wurde in einem kleinen Volumen des verwendeten Puffers mit 10% (v/v) Glycerin resuspendiert und bei -20°C gelagert.

4. Aufreinigung der Protein Komplexe

Die gewaschene Membransubstanz wurde auf eine Proteinkonzentration von 5 mg/ml in 100 mM Tris-HCl, enthaltend 50 µg/ml Eiweiß Avidin (Sigma), eingestellt. Zur Isolation der Membranproteine wurde eine 10%ige (w/v) wässrige Lösung von n-Dodecyl-β-D-Maltosid (Biomol) zugegeben, so daß sich eine Endkonzentration von 2 g Dodecylmaltosid/ g Protein einstellte. Nach 45 Minuten
30

Inkubation auf Eis unter langsamem Rühren wurde die Probe für 20 min bei 180000 x g ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine StrepTactin Sepharose Säule gegeben mit einem Säulenvolumen von 2 ml (IBA, Göttingen) und mit 100 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,5) und 0,025% (W/v) Dodecylmaltosid equilibriert. Die Säule wurde mit 9 ml eines Puffers aus 100 mM Tris -HCl Puffer (pH 7,5), 100 mM NaCl, 2 mM MgSO₄ und 0,025% (w/v) Dodecylmaltosid gewaschen. Spezifisch gebundene Proteine wurden mit dem selben Puffer und zusätzlich 2,5 mM D-Desthiobiotin (Sigma) und 10% (v/v) Glycerin eluiert.

5. Protein Identifizierung durch Peptid-Massen-Fingerprinting

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten und mit Coomassie Blue gefärbten Proteine wurden nach bekannter Methode [9] durch Peptid-Massen-Fingerprinting nach Verdau mit Trypsin (Promega) oder mit Cyanogen Bomid [10] identifiziert. Peptidmassen Datenbanken wurden eingesetzt, um lokal einen Ausschnitt des 3312 *C. glutamicum* Proteins zu suchen. Diese Datenbank wurde durch die Degussa AG (Frankfurt) zur Verfügung gestellt.

6. Enzym Untersuchung

Die N,N,N',N'-Tetramethyl-*p*-Phenylendiamin (TMPD) Oxidase Aktivität wurde spektrophotometrisch bei 562 nm in Luft gesättigtem 100 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,5), der 200 µM TMPD enthielt, bei 25°C gemessen. Für die Berechnung der Aktivität wurde ein Extinktions Koeffizient von 10,5 mM⁻¹cm⁻¹ eingesetzt [4]. Eine Einheit der Enzymaktivität entspricht der Menge von 1 µmol TMPD welches in einer Minute oxidiert wird.

7. Differenz-Spektroskopie

Dithionit-reduzierte minus Ferricyanid-oxidierte Differenzspektren wurden bei Raumtemperatur mit einem Jasco V560 Spektrophotometer, welches mit einem Silicium-
5 Photodioden- Detektor für trübe Proben ausgestattet war, durchgeführt [11]. Dabei wurde eine Küvette mit einem 5 mm breiten Detektionsfenster eingesetzt. Die Proteinkonzentration wurde mit dem Bicinchoninsäure (BCA) Protein-Assay [14] und Rinderserum-Albumin als
10 Standard durchgeführt. Der Häm-Gehalt wurde aus den Differenz Spektren durch folgende Wellenlängepaare und Absorptionskoeffizienten ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) bestimmt: Häm a, $\Delta\epsilon_{630-600\text{ nm}} = 11,6$ [12]; Häm b, $\Delta\epsilon_{562-577\text{ nm}} = 22$; Häm c $\Delta\epsilon_{552-540\text{ nm}} = 19,1$ [13].

15 Ausführungsbeispiele:

a. Isolation des Cytochrom bc_1 -aa₃ Superkomplexes

Zur Aufreinigung des bc_1 Komplexes und der Cytochrom aa₃ Oxidase wurden Membranen der komplementierten Stämme ΔQ -B_{St} und ΔC -D_{St} isoliert und die nach Solubilisierung mit Dodecylmaltosid erhaltenen Proteine der Affinitätschromatographie mit StrepTactin Sepharose unterzogen. Nach dem Waschen wurden die spezifisch gebundenen Proteine mit Desthiobiotin eluiert und mittels SDS-
20 Page analysiert. Überraschenderweise wiesen die Proteinmuster der beiden Stämme ΔQ -B_{St} (Fig. 2, Spur 3) und ΔC -D_{St} (Fig. 2, Spur 2) eine hohe Ähnlichkeit auf mit 8 Proteinbanden und scheinbar identischem Molekulargewicht. Die in Fig. 2 bis auf das 17-kDA-Protein (P17) dargestellte Identität der Proteine wurde mit Hilfe des
30 Peptid-Mass-Fingerprinting wie oben beschrieben und ei-

ner MALDI (matrix-assisted laser desorption ionization)-TOF (time of flight) Massenspektrometrie nachgewiesen. Für die Proteinbanden mit einem Molekulargewicht von 52 kDa bzw. 29 kDa wurde nachgewiesen, daß sie aus jeweils zwei unterschiedlichen Proteinen bestehen. Insgesamt konnten 10 Proteine nachgewiesen werden. Neben den bereits bekannten Untereinheiten des bc_1 Komplexes (QcrA, QcrB, QcrC) bzw. der Cytochrom aa_3 Oxidase (CtaC, CtaD, CtaE) wurden 4 weitere Proteine mit einem Molekulargewicht von 29 kDa (P 29), 24 kDa (P24), 20 kDa (P20) und 19 kDa (P19) nachgewiesen. Diese können jeweils den Proteinen NCgl2611 (Cgl2664), NCgl2177 (Cgl2226), NCgl1970 (Cgl2017) und NCgl2114 (Cgl2194) zugeordnet werden. Diese NCgl-Nummern entsprechen der Nomenklatur der öffentlich zugänglichen NCBI (National Center for Biotechnology Information) bzw. die in den Klammern verwendeten Nummern der Nomenklatur der DDBJ (DNA Data Bank of Japan) Datenbanken. Der Fachmann weiß, daß das komplette Genom von *C. glutamicum* aus allgemein zugänglichen Datenbanken identifizierbar ist (wie z. B. NCBI) und durch Techniken der Genklonierung, z. B. unter Einsatz der Polymerasekettenreaktion (PCR) klonierbar ist.

25 **b. Aufreinigung der Cytochrom aa_3 Oxidase als Einzelkomplex**

Um die Cytochrom aa_3 Oxidase als Einzelkomplex und nicht als Superkomplex zusammen mit dem bc_1 Komplex aufzureinigen, wurde das Plasmid pJC1-ctaD_{st} in *C. glutamicum* 13032 Δ qcr transferiert. Der daraus resultierende Δ Q-D_{st}-Stamm wies infolge der fehlenden Qcr Gene dieselben Wachstumsdefekte wie der 13032 Δ qcr Stamm auf

und bildete sowohl Wild-Typ CtaD als auch Strep-Tagged CtaD. Das Eluat der StrepTactin Affinitätschromatographie enthielt vier Proteine (Fig.2, Spur 1), die als CtaD, CtaC, CtaE und P19 identifiziert wurden. Es wurde eine TMPD Oxidaseaktivität der isolierten Cytochrom aa_3 Oxidase von 0,34 U/mg ermittelt sowie ein Turn-Over Wert von 1,1 TMPD oxidiert/ aa_3 s^{-1} . In Folge des fehlenden Cytochrom c_1 wurde eine 10-fach geringere Oxidaseaktivität gegenüber der Aktivität des Superkomplexes ermittelt.

c. Beweis der vierten Untereinheit der Cytochrom aa_3 Oxidase

Um die Bedeutung der Proteine P29, P24, P20 und P19 für die Atmungskette und die Bildung des bc_1 - aa_3 -Superkomplexes nachzuweisen, wurden die entsprechenden Gene aus dem Chromosom von *C. glutamicum* deletiert. Die daraus entstandenen Stämme wurden mit $\Delta C2611$, $\Delta C2177$, $\Delta C1970$ und $\Delta C2114$ bezeichnet. Die ersten drei Stämme wiesen keine deutlichen Unterschiede im Wachstumsverhalten oder in der Bildung des a-, b-, und c-Typ Cytochroms auf. Offenbar sind die Proteine P29, P24, und P20 nicht essentiell für die Bildung und die Aktivität des bc_1 - aa_3 -Abzweigs der Atmungskette bzw. die Funktion und die Interaktion des bc_1 - aa_3 Superkomplexes.

Im Gegensatz dazu führte die Deletion des Gens NCgl2114, welches für das P19 Protein codiert, zum Phänotyp des 13032 Δ CtaD Stammes. So war das Wachstum deutlich beeinträchtigt, Cytochrom a war nahezu nicht im Spektrum der Dithionit-reduzierten Zellen vorhanden und der Gehalt an Cytochrom war deutlich geringer als im

Wild Typ (Fig.3). Das P19 Protein ist daher essentiell für die Bildung einer aktiven Cytochrom aa_3 Oxidase. Das Protein P19 wurde nur bei der Aufreinigung des Superkomplexes oder der isolierten Cytochrom aa_3 Oxidase
5 nachgewiesen, nicht jedoch bei der Aufreinigung des isolierten bc_1 Komplexes (Fig.2). Das Protein P19 wird auf Grund der Interaktion mit den Untereinheiten der Cytochrom aa_3 Oxidase mit aufgereinigt und kann daher zur bisher noch nicht bekannten vierten Untereinheit
10 der Cytochrom aa_3 Oxidase aus *C. glutamicum* gezählt werden.

Das Protein P19 besteht aus 143 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 15,5 kDA. Es weist drei hydrophobe
15 Regionen auf, und zwar im Bereich der Aminosäuren 7-27, 40-60, sowie 97-130, wodurch drei oder vier Transmembranhelices gebildet werden. Die erste Transmembranhelix dient vermutlich als Teil eines Signalpeptids. Der in Fig. 4 dargestellte Sequenzvergleich zeigt, daß
20 das für das P19 Protein codierende Gen *ctaF* mit korrespondierenden Genen aus der Gruppe der Actinomycetales Homologien aufweist: *C. diphtheriae* 68% Identität; *Mycobakterien* 38-39% Identität; *S. coelicolor* 39% Identität und *Thermobifida fusca* 33% Identität. Bei all die-
25 sen Organismen sind die korrespondierenden Gene den Genclustern des *ctaC* oder des *ctaD* nachgeschaltet. Im Fall von *S. coelicolor* und *T. fusca* werden diese korrespondierenden Gene zusammen transkribiert. Daraus kann geschlossen werden, daß die mit dem P19 Protein
30 homologen Sequenzen die vierte Untereinheit der Cytochrom aa_3 Oxidase in Actinomyceten repräsentieren.

Tab. 1: Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

Stamm/Plasmid	Relevante Charakteristik	Quelle
ATCC13032	Wild Typ, Biotin-auxotroph	[7]
13032 Δ <i>ctaD</i>	In-frame Deletion der <i>ctaD</i> Gene, codierend für Untereinheit I der Cytochrom <i>aa₃</i> Oxidase	[2]
13032 Δ <i>qcr</i>	Deletion der <i>qcrCAB</i> Gene codierend, für die drei Untereinheiten des <i>bc₁</i> Komplexes	[2]
Δ C-D _{St}	13032 Δ <i>ctaD</i> mit pJC1- <i>ctaD</i> _{St}	Diese Arbeit
Δ C-B _{St}	13032 Δ <i>ctaD</i> mit pJC1- <i>qcrB</i> _{St}	Diese Arbeit
Δ Q-B _{St}	13032 Δ <i>qcr</i> mit pJC1- <i>qcrB</i> _{St}	Diese Arbeit
Δ Q-D _{St}	13032 Δ <i>qcr</i> mit pJC1- <i>ctaD</i> _{St}	Diese Arbeit
Δ Q-B _{St} -C67S	13032 Δ <i>qcr</i> mit pJC1- <i>qcrB</i> _{St} -C67S	Diese Arbeit
Δ Q-B _{St} -C177S	13032 Δ <i>qcr</i> mit pJC1- <i>qcrB</i> _{St} -C177S	Diese Arbeit
Δ Cg1970	In-frame Deletion des Gens NCg11941	Diese Arbeit
Δ Cg2114= Δ <i>ctaF</i>	In-frame Deletion des Gens NCg12114	Diese Arbeit
Δ Cg2177	In-frame Deletion des Gens NCg12145	Diese Arbeit
Δ Cg2611	In-frame Deletion des Gens NCg12574	Diese Arbeit

<u>Plasmide</u>		
pJC1	Kan ^R ; <i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> Shuttle Vektor	[16]
pJC1- <i>ctaD</i> _{St}	Kan ^R ; Expressions Plasmid für Strep-tagged CtaD; <i>ctaD</i> exprimiert durch eigenen nativen Promotor und 10 zusätzlichen Codons am 3'-Ende (AAWSHPQFEK)	Diese Arbeit
pJC1- <i>qcrB</i> _{St}	Kan ^R ; Expressionsplasmid für Strep-Tagged QcrB; <i>ctaE-qcrCAB</i> exprimiert mit eigenem nativen Promoter; <i>qcrB</i> mit 10 zusätzlichen Codons am 3'-Ende (AAWSHPQFEK)	Diese Arbeit
pBM20-QXA	Amp ^R ; pUC-BM20 Derivat mit 2.0-kb <i>XbaI</i> - <i>ApaI</i> Fragment aus pJC1- <i>qcrB</i> _{St} ; verwendet für Site-directed Mutagenese	Diese Arbeit

Tab. 2: Verwendete Oligonucleotide

Primer	Sequenz (5'→3')
Primer für die Konstruktion von pJC1- <i>ctaD_{st}</i> and pJC1- <i>qcrB_{st}</i>	
<i>ctaD_{st}</i> -for	ACTTCTAGATGACTGAACCTGGCAGCGACC
<i>ctaD_{st}</i> -rev	TGATCTAGATTACTTCTCGAACTGTGGGTGGGACCAAGCTGCGCG GCTGGAGTCAGATGCAAG
<i>qcrB_{st}</i> -for	ACTTCTAGATAGGGTTGAGCATTTTGTC
<i>qcrB_{st}</i> -rev	AGTGTCTGACTTACTTCTCGAACTGTGGGTGGGACCAAGCTGCGTT CTTGCCCTCATTCTTGTC
Primer für die Konstruktion von Deletionsmutanten	
ΔCg1970-1	GACTCTAGAATCTTCGAGCATCGGTTCC
ΔCg1970-2	CCCATCCACTAAACTTAAACACGTGTGGGAGGAACCAGCCAC
ΔCg1970-3	TGTTTAAGTTTAGTGGATGGGCTGCGTGCTGCAGATTCTGCG
ΔCg1970-4	GATGTCGACGTTGTTGATGCCAGGCACTG
ΔCg2114-1	GACTCTAGATAACCCAATTCACGGCAACTC
ΔCg2114-2	CCCATCCACTAAACTTAAACAGTACATGAGTTTTGCTGAAGACTTC
ΔCg2114-3	TGTTTAAGTTTAGTGGATGGGCTCAACCTTCAGTACGGCGTGC
ΔCg2114-4	GATGTCGACCTTCCGGGAACTTTTCGTA
ΔCg2177-1	GACTCTAGAGGATTCCCGTGCGGCTGGTCT
ΔCg2177-2	CCCATCCACTAAACTTAAACATTTACACCCGAGACTACGTACCA
ΔCg2177-3	TGTTTAAGTTTAGTGGATGGGCCATTTCGGTCCGGGATACCGC
ΔCg2177-4	GATGTCGACGGTTCTAACGATTTTCGCCGTC
ΔCg2611-1	GACTCTAGATAGCCAACGCTTCGCCCCAAGTCATG
ΔCg2611-2	CCCATCCACTAAACTTAAACACTTCACGGATTTCGTCTCCATTGG
ΔCg2611-3	TGTTTAAGTTTAGTGGATGGGGAGGTGCGCGGAGACACTGCAG
ΔCg2611-4	GTCGTCGACAGCTGCGGTGCGCTCAGCG

TAB. 3: Aufreinigung des Cytochrom bc_1 - aa_3 -Superkomplexes aus Membranen von *C. glutamicum* ΔQ -B_{St}und ΔC -D_{St}

Die Chinol Oxidase Aktivität wurde mittels DMNH₂ (2,3-Dimethyl-1,4-Naphtoquinone in reduzierter Form) als Substrat durch Messung der Sauerstoffaufnahme mittels einer Clark-Sauerstoffelektrode bestimmt. Eine Einheit (U) entspricht 1 μ mol O₂-Aufnahme pro Minute. Die Turn-over Nummer (TN) wurden berechnet als Elektronentransfer pro Cytochrom aa_3 pro Sekunde. Die in den Klammern angegebenen Werte wurde berechnet als Elektronentransfer pro Cytochrom b pro Sekunde. N.d. = nicht bestimmt

Aufreinigungsschritt	Protein	Chinol Oxidase Aktivität			
	mg	U	U/mg	TN (s ⁻¹)	Ausbeute (%)
Membranen aus Stamm ΔQ -B _{St}	44.7	32.3	0.72	n.d.	100
Dodecylmaltosid Extrakt	15.3	14.5	0.95	314	45
StrepTactin Sepharose Eluat	0.64	1.7	2.70	220	5.4
Membranen aus Stamm ΔC -D _{St}	42.3	33.5	0.79	n.d.	100
Dodecylmaltosid Extrakt	17.9	15.2	0.85	365	45
StrepTactin Sepharose Eluat	0.50	1.5	2.96	93 (152)	4.4

Literatur

1. Eggeling, L., and Sahm, H. (1999) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 146-153
- 5 2. Niebisch, A., and Bott, M. (2001) *Arch. Microbiol.* **175**, 282-294
3. Sone, N., Nagata, K., Kojima, H., Tajima, J., Kodera, Y., Kanamaru, T., Noguchi, S., and Sakamoto, J. (2001) *Biochim. Biophys. Acta* **1503**, 279-290
- 10 4. Sakamoto, J., Shibata, T., Mine, T., Miyahara, R., Torigoe, T., Noguchi, S., Matsushita, K., and Sone, N. (2001) *Microbiology* **147**, 2865-2871
5. Molenaar, D., van der Rest, M. E., and Petrovic, S. (1998) *Eur. J. Biochem.* **254**, 395-403
- 15 6. Skerra, A., and Schmidt, T. G. M. (2000) *Methods Enzymol.* **326**, 271-304
7. Abe, S., Takayama, K., and Kinoshita, S. (1967) *J. Gen. Appl. Microbiol.* **13**, 279-301
8. van der Rest, M. E., Lange, C., and Molenaar, D. (1999) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 541-545
- 20 9. Schaffer, S., Weil, B., Nguyen, V. D., Dongmann, G., Günther, K., Nickolaus, M., Hermann, T., and Bott, M. (2001) *Electrophoresis* **22**, 4404-4422
10. Montfort, B. A., Canas, B., Durkens, R., Godovac-Zimmermann, J., and Robillard, G. T. (2002) *J. Mass Spectrom.* **37**, 322-330
- 25 11. Castiglioni, E., Grilli, E., and Sanguinetti, S. (1997) *Rev. Sci. Instrum.* **68**, 4288-4289
12. Sone, N., and Yanagita, Y. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* **682**, 216-226
- 30 13. Chance, B. (1957) *Methods Enzymol.* **4**, 273-329
14. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fu-

- jimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and
Klenk, D. C. (1985) *Anal. Biochem.* **150**, 76-85
15. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685
16. Cremer, J., Eggeling, L., and Sahm, H. (1990) *Mol.*
5 *Gen. Genet.* **220**, 478-480
17. *Bio/Technology* 5, 137-146 (1987)
18. *Gene* 138, 35-41 (1994)
19. *BioRechnology* 6, 428-430 (1988)
20. *Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfah-*
10 *renstechnik* (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)
21. *Bioreaktoren und periphere Einrichtungen*; Vieweg
Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)
22. *Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriolo-*
15 *gy"* der American Society for Bacteriology; Washing-
ton D.C., USA, 1981 2

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur Herstellung von Stoffwechselprodukten,
dadurch gekennzeichnet,
5 daß man folgende Schritte durchführt:
- d) Fermentation der das gewünschte Stoffwechselpro-
dukt produzierenden Bakterien, in denen man die
für die vierte Untereinheit der Cytochrom *aa₃* O-
xidase codierende Gensequenz *ctaF* abschwächt o-
10 der zusammen mit einem Gen oder mehreren Genen
aus der Gruppe *ctaC*, *ctaD*, *ctaE*, *qcrA*, *qcrB*,
qcrC verstärkt.
- e) Anreicherung des gewünschten Stoffwechselpro-
dukts im Medium oder in den Zellen der Bakteri-
15 en, und
- f) Isolieren des entsprechenden Stoffwechselpro-
dukts.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
20 daß das Stoffwechselprodukt eine Aminosäure ausge-
wählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin,
L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein,
L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin,
L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin,
25 L-Tryptophan und L-Arginin ist.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Stoffwechselprodukt eine organische Säure
vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe Essigsäure,
30 Citronensäure, Isocitronensäure, Milchsäure, Bern-

steinsäure, Fumarsäure, Ketoglutarsäure, Brenztraubensäure und Äpfelsäure ist.

4. Verfahren gemäß Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
5 daß das Stoffwechselprodukt ein Vitamin ist.
5. Verfahren gemäß Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Stoffwechselprodukt ein Nukleosid oder Nukleotid ist.
- 10 6. Verfahren gemäß Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Stoffwechselprodukt ein ein- oder mehrwertiger Alkohol ist.
- 15 7. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um
Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die für die vierte Untereinheit der Cytochrom
aa₃ Oxidase codierende Gensequenz *ctaF* einsetzt.
- 20 8. Mikroorganismus in dem die für die vierte Untereinheit der Cytochrom aa₃ Oxidase codierende Gensequenz (*ctaF*) abgeschwächt ist.
9. Mikroorganismus enthaltend ein oder mehrere Gene aus der Gruppe *ctaC*, *ctaD*, *ctaE*, *ctaF*, *qcrA*, *qcrB*, *qcrC*
25 in replizierbarer Form, welche im Vergleich zum Wild Typ Mikroorganismus verstärkt sind.

1/4

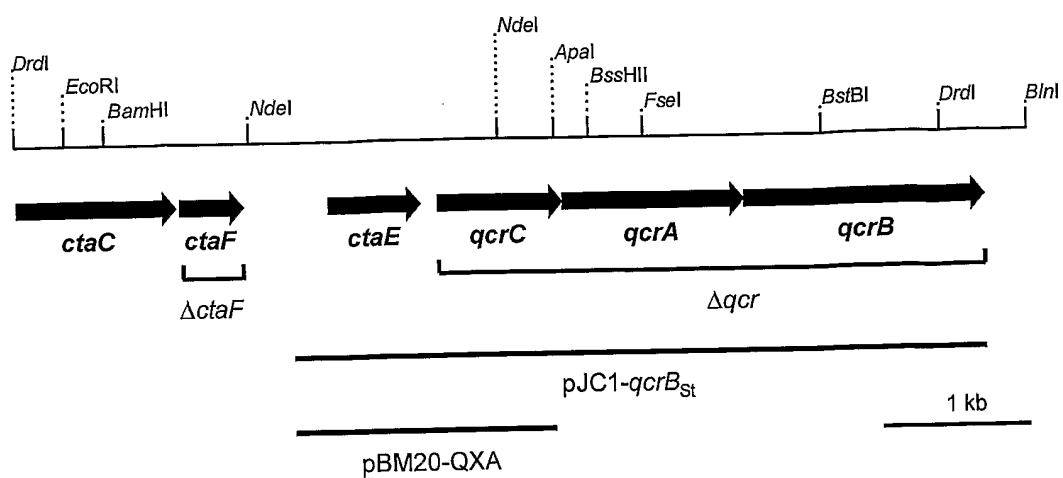


Fig. 1

2/4

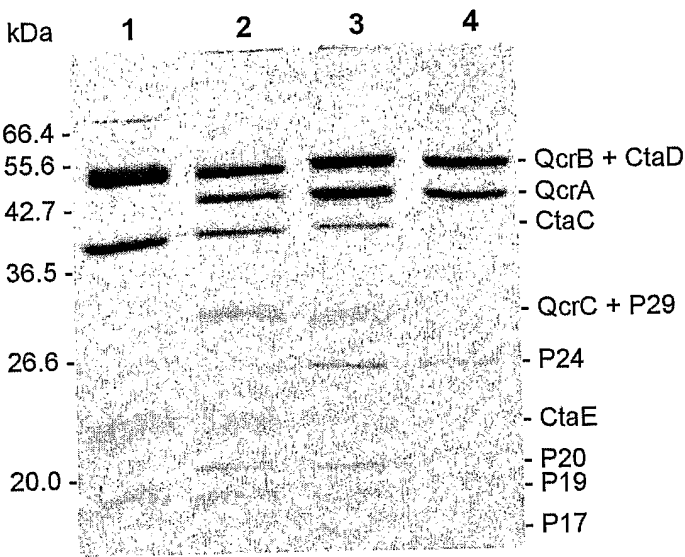


Fig. 2

3/4

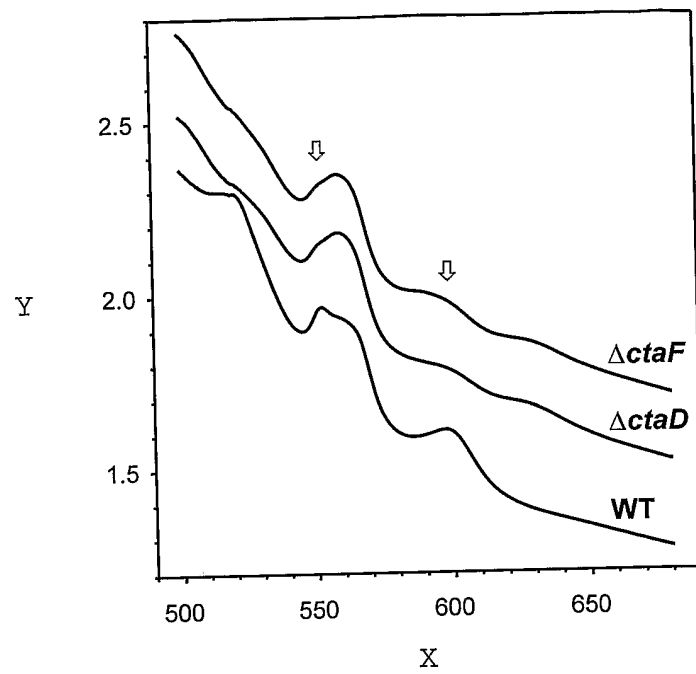


Fig. 3

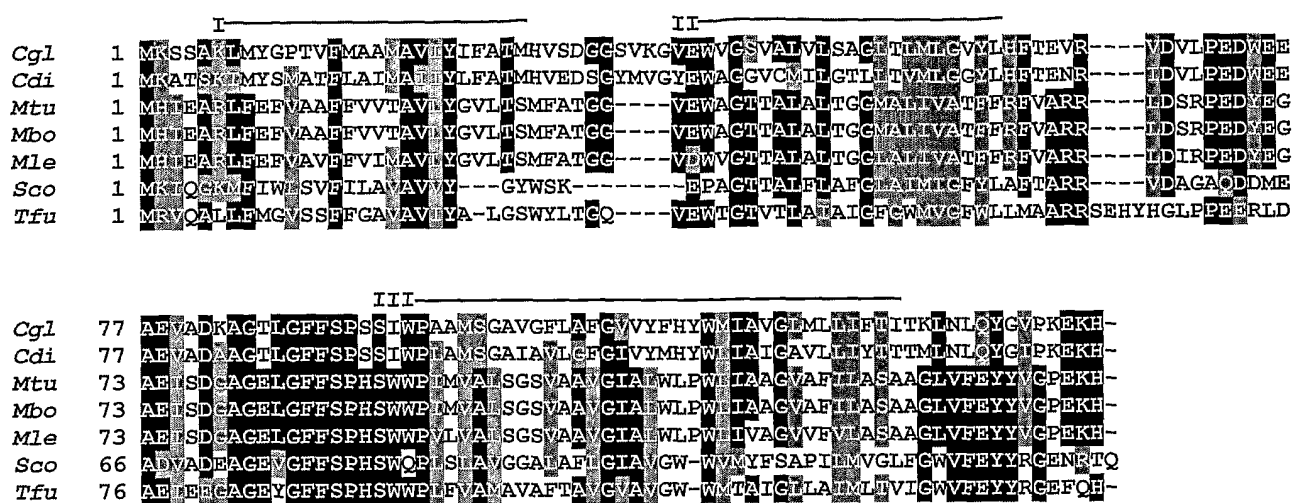


Fig. 4

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Forschungszentrum Jülich GmbH

<120> Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von
Stoffwechselprodukten

<130> 1.2006

<140> 10254074.8-42

<141> 2002-11-19

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 359

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 1

Met	Asn	Lys	Arg	Gly	Lys	Arg	Lys	Ala	Gly	Gly	Val	Gly	Gly	Gly	Ala
1				5					10					15	

Met	Ala	Gly	Cys	Val	Ala	Gly	Gly	Val	Gly	Asp	Arg	Met	Gly	Trp	Asp
			20					25						30	

Gly	Thr	Ala	Val	Ala	Met	Gly	Asn	Trp	Ser	Trp	Val	Trp	Val	Ala	Ala
			35					40						45	

Cys	Gly	Met	Trp	Gly	Thr	Ala	Ala	Trp	Gly	Ala	Lys	Arg	Ala	Lys	Arg
		50					55					60			

Gly	Gly	Lys	Tyr	Asn	Val	Val	Thr	Val	Val	Met	Val	Thr	Val	Thr	Asp
	65					70				75					80

Lys	Val	Thr	Ala	Asp	Lys	Asn	Val	Thr	Val	Asp	Val	Thr	Ala	Tyr	Trp
				85						90					95

Asn	Trp	Lys	Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser	Ala	Gly	Gly	Asp	Tyr	Gly	Ser
			100						105					110	

Asp	Arg	Ala	Ala	Ala	Ala	Ser	Lys	Lys	Asp	Ser	Gly	Asp	Asn	His	Gly
			115						120					125	

Asn	Ser	Lys	Ser	Asp	Val	Ser	Tyr	Asn	Arg	Thr	Gly	Thr	Thr	Asp	Val
					130				135					140	

Met Val Val Asn Thr Asn Ala Ser Ala Asp Val Ala His Ser Trp Val
 145 150 155 160

Lys Arg Asp Ala Tyr Ala His Ala Asn Lys Ser Arg Val Thr Gly Ala
 165 170 175

Val Gly Arg Cys Ala Met Cys Gly Thr Tyr His Ala Met Met Asn Arg
 180 185 190

Val Val Asp Arg Asp Ser Ala Val Tyr Ser Arg Asp Ser Asn Asp Ala
 195 200 205

Thr Asn Ala Ala His Gly Ala Tyr Ala Thr Ser Thr Ser Val Ser Asp
 210 215 220

Arg Thr Ala Thr Arg Asp Gly Asn Thr Ser Asn Ala
 225 230 235

<210> 2

<211> 1080

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 2

gtggaacagc aaaataagcg tggtttaaag cgcaaggccc tgcttggcgg tgtcttgggc 60
 ttaggtggcc tcgccatggc aggctgtgaa gtcgcccctc ctggcggtgt gcttggagat 120
 ttctacgta tgggttggcc tgatggcatt acccctgaag cagtggccat gggtaacttc 180
 tggtcatggg tctgggttgc tgctgtcatc atcggcatca tcatgtgggg tctattcctc 240
 accgccatct ttgcctgggg cgcaaagagg gctgaaaagc gcggcgaggg tgaattccct 300
 aagcagctcc agtacaacgt tccacttgag ctcggttctga cgatcggtcc gatcatcatt 360
 gttatggtgc tgttcttctt caccgttcaa actcaggaca aggtcaccgc tctggataag 420
 aaccagagg ttaccgtgga cgtcaccgct taccagtgga actggaagtt cggatactcc 480
 gaaattgatg gctcactggc acctggtgga caggattacc aaggaagcga cccggagcgt 540
 caggcagctg ccgaggcttc caagaaggat ccttctggag ataaccaat tcacggcaac 600
 tcaaagtctg acgtttctta ccttgagttc aaccgaattg aaaccctcgg aaccactgat 660
 gaaatcccag tgatgggttct tcctgtgaac accccaatcg agttcaacct cgcactctgt 720
 gacgttgcac actccttctg gggtccagag ttctctttca agcgagatgc ttacgcacac 780
 cctgaggcaa acaagtccca gcgtgtcttc cagattgaag agatcactga ggaaggcgca 840
 ttcgttggtc gctgtgcaga aatgtgcggg acttaccacg caatgatgaa cttcgagctt 900
 cgtgtcgtcg atcgcgattc cttcgtgtg tacatcagct tccgtgactc caaccagac 960
 gcaaccaacg ctcaggcact tgagcacatt ggtcaagctc cttacgctac ttccactagc 1020
 ccattcgttt ccgatcgcac cgcaaccgcg gacggcgaaa aactcagag caacgcttaa 1080

<210> 3

<211> 584

<212> PRT

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 3

Met Thr Ala Val Ala Pro Arg Val Asp Gly His Val Ala Pro Gln Arg
 1 5 10 15

Pro Glu Pro Thr Gly His Ala Arg Lys Gly Ser Lys Ala Trp Leu Met
 20 25 30

Met Thr Thr Thr Asp His Lys Gln Leu Gly Ile Met Tyr Ile Ile Met
 35 40 45

Ser Phe Ser Phe Phe Phe Leu Gly Gly Leu Met Ala Leu Leu Ile Arg
 50 55 60

Ala Glu Leu Phe Thr Pro Gly Leu Gln Phe Leu Ser Asn Glu Gln Phe
 65 70 75 80

Asn Gln Leu Phe Thr Met His Gly Thr Val Met Leu Leu Leu Tyr Gly
 85 90 95

Thr Pro Ile Val Trp Gly Phe Ala Asn Tyr Val Leu Pro Leu Gln Ile
 100 105 110

Gly Ala Pro Asp Val Ala Phe Pro Arg Leu Asn Ala Phe Gly Phe Trp
 115 120 125

Ile Thr Thr Val Gly Gly Val Ala Met Leu Thr Gly Phe Leu Thr Pro
 130 135 140

Gly Gly Ala Ala Asp Phe Gly Trp Thr Met Tyr Ser Pro Leu Ser Asp
 145 150 155 160

Ala Ile His Ser Pro Gly Leu Gly Ser Asp Met Trp Ile Val Gly Val
 165 170 175

Gly Ala Thr Gly Ile Gly Ser Val Ala Ser Ala Ile Asn Met Leu Thr
 180 185 190

Thr Ile Leu Cys Leu Arg Ala Pro Gly Met Thr Met Phe Arg Met Pro
 195 200 205

Ile Phe Thr Trp Asn Ile Phe Val Val Ser Val Leu Ala Leu Leu Ile
 210 215 220

Phe Pro Leu Leu Leu Ala Ala Ala Leu Gly Val Leu Tyr Asp Arg Lys

225	230	235	240
Leu Gly Gly His Leu Tyr Asp Pro Ala Asn Gly Gly Ser Leu Leu Trp			
245	250	255	
Gln His Leu Phe Trp Phe Phe Gly His Pro Glu Val Tyr Val Leu Ala			
260	265	270	
Leu Pro Phe Phe Gly Ile Val Ser Glu Ile Ile Pro Val Phe Ser Arg			
275	280	285	
Lys Pro Met Phe Gly Tyr Val Gly Leu Ile Phe Ala Thr Leu Ser Ile			
290	295	300	
Gly Ala Leu Ser Met Ala Val Trp Ala His His Met Phe Val Thr Gly			
305	310	315	320
Ala Val Leu Leu Pro Phe Phe Ser Phe Met Thr Phe Leu Ile Ser Val			
325	330	335	
Pro Thr Gly Val Lys Phe Phe Asn Trp Val Gly Thr Met Trp Lys Gly			
340	345	350	
His Ile Thr Trp Glu Thr Pro Met Ile Trp Ser Val Gly Phe Met Ala			
355	360	365	
Thr Phe Leu Phe Gly Gly Leu Thr Gly Ile Met Leu Ala Ser Pro Pro			
370	375	380	
Leu Asp Phe His Leu Ala Asp Ser Tyr Phe Leu Ile Ala His Phe His			
385	390	395	400
Tyr Thr Leu Phe Gly Thr Val Val Phe Ala Ser Cys Ala Gly Val Tyr			
405	410	415	
Phe Trp Phe Pro Lys Met Thr Gly Arg Met Met Asp Glu Arg Leu Gly			
420	425	430	
Lys Ile His Phe Trp Leu Thr Phe Val Gly Phe His Gly Thr Phe Leu			
435	440	445	
Ile Gln His Trp Val Gly Asn Met Gly Met Pro Arg Arg Tyr Ala Asp			
450	455	460	
Tyr Leu Asp Ser Asp Gly Phe Thr Ile Tyr Asn Gln Ile Ser Thr Val			
465	470	475	480
Phe Ser Phe Leu Leu Gly Leu Ser Val Ile Pro Phe Ile Trp Asn Val			

485 490 495
 Phe Lys Ser Trp Arg Tyr Gly Glu Leu Val Thr Val Asp Asp Pro Trp
 500 505 510
 Gly Tyr Gly Asn Ser Leu Glu Trp Ala Thr Ser Cys Pro Pro Pro Arg
 515 520 525
 His Asn Phe Ala Ser Leu Pro Arg Ile Arg Ser Glu Arg Pro Ala Phe
 530 535 540
 Glu Leu His Tyr Pro His Met Ile Glu Arg Met Arg Ala Glu Ala His
 545 550 555 560
 Thr Gly His His Asp Asp Ile Asn Ala Pro Glu Leu Gly Thr Ala Pro
 565 570 575
 Ala Leu Ala Ser Asp Ser Ser Arg
 580

<210> 4

<211> 1755

<212> DNA

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 4

atgaccgctg tggcgcctag ggtcgacggg cacgtcgccc ctcagaggcc cgagccgaca 60
 ggccatgcac gcaagggcag caaagcatgg ttaatgatga ccaccaccga ccacaagcag 120
 ctgggcatta tgtacatcat tatgtccttc agcttccttc tcctcggtgg cttgatggcc 180
 ctgcttatcc gagcggagct tttcaccctt ggtctgcagt tcctgtctaa tgagcagttc 240
 aaccagctgt tcaccatgca cggaactgtc atgctgctgc tgtacggaac tccaattggt 300
 tgggggttttg ctaactacgt cctgccactt cagatcggtg cgcttgacgt agctttccca 360
 cgtttgaatg ctttcggctt ctggatcacc accgtcggtg gtgtcgcgat gctgaccggc 420
 ttctgacccc cgggtggtgc tgccgacttc gggtggacca tgtactcccc actgtctgac 480
 gcaattcact cccaggcctt tggctctgac atgtggattg tcggtgtcgg tgcaactggt 540
 attggctccg ttgcttccgc aattaacatg ctcaccacca tcctctgcct ccgcgcacct 600
 ggtatgacca tgttccgtat gcctattttc acctggaata tcttcgttgt ttccgttctt 660
 gctctgctga tcttccaact gctgctcgtt gctgcactgg gtgttctgta tgaccgcaag 720
 cttggtggac acctgtacga tccagctaac ggcggtctcc tcctgtggca gcacctgttc 780
 tggttcttcg gacaccctga ggtttacgtt ctggcgctgc cgttcttcgg cattgtttct 840
 gagatcattc ctgtgttctc ccgtaagcca atgttcggtt acgtcggcct gatcttcgca 900
 accttgtcca ttggtgcact gtccatggct gtgtgggctc accacatgtt cgttactggc 960
 gcagttttgc ttccgttctt ctcttcatg acgttctga tttcggttcc taccggcgtt 1020
 aagttcttca actgggttgg aaccatgtgg aagggtcaca tcacttggga aacccaatg 1080
 atctggtctg ttggcttcat ggctaccttc ctcttcggtg gtctgaccgg cattatgctg 1140
 gcgccccac cactggactt ccacttggct gactcctact tcctgatcgc gcacttccac 1200

tacaccctct tcggtaccgt ggtgttcgca tcgtgtgcag gcgtttactt ctggttccc 1260
aagatgactg gccgcatgat ggacgagcgt cttggcaaga tccacttctg gttgaccttc 1320
gtcggtttcc acggaacctt cctcatccag cactgggtgg gcaacatggg tatgccacgt 1380
cgttacgctg actacctgga ttctgatggt ttcaccatct acaaccagat ctccaccgtg 1440
ttctccttcc tgcttggcct gtctgtcatt ccattcatct ggaacgtctt caagtccctgg 1500
cgctacgggtg agctcgttac cgttgatgat ccttgggggtt acggcaactc cctggagtgg 1560
gcaacctcct gccctcctcc tcgccacaac ttcgcacacct tgccctcgat ccgctccgag 1620
cgccctgcgt tcgagctgca ctaccgcac atgattgaac gcatgcgcgc agaggcacac 1680
actggacatc acgatgatat taatgctcca gaattgggta ccgcccagc ccttgcacat 1740
gactccagcc gctaa 1755

<210> 5

<211> 205

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 5

Met Thr Ser Ala Val Gly Asn Thr Gly Met Ala Ala Pro Gln Arg Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Asn Arg Pro Asn Met Val Ser Val Gly Thr Ile Val Phe
20 25 30

Leu Ser Gln Glu Leu Met Phe Phe Ala Gly Leu Phe Ala Met Tyr Phe
35 40 45

Val Ser Arg Ala Asn Gly Leu Ala Asn Gly Ser Trp Gly Glu Gln Thr
50 55 60

Asp His Leu Asn Val Pro Tyr Ala Leu Leu Ile Thr Val Ile Leu Val
65 70 75 80

Ser Ser Ser Val Thr Cys Gln Phe Gly Val Phe Ala Ala Glu Arg Gly
85 90 95

Asp Val Tyr Gly Leu Arg Lys Trp Phe Leu Val Thr Ile Ile Leu Gly
100 105 110

Ser Ile Phe Val Ile Gly Gln Gly Tyr Glu Tyr Ile Thr Leu Val Gly
115 120 125

His Gly Leu Thr Ile Gln Ser Ser Val Tyr Gly Ser Ala Phe Phe Ile
130 135 140

Thr Thr Gly Phe His Ala Leu His Val Ile Ala Gly Val Met Ala Phe
145 150 155 160

Val Val Val Leu Met Arg Ile His Lys Ser Lys Phe Thr Pro Ala Gln
 165 170 175

Ala Thr Ala Ala Met Val Val Ser Tyr Tyr Trp His Phe Val Asp Val
 180 185 190

Val Trp Ile Gly Leu Phe Ile Thr Ile Tyr Phe Ile Gln
 195 200 205

<210> 6

<211> 618

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 6

gtgacgagcg cagttggaaa tacaggtatg gcagcaccac aacgtgttgc ggcactgaac 60
 cgtccgaata tggtcagtggt cggcaccatt gtgttcctgt ctcaggaatt aatgttcttc 120
 gccgggctat tcgcgatgta cttcgtgtcc cgtgcgaacg gactggcaaa tggatcatgg 180
 ggagagcaga cagatcacct caacgtgcc tgcgactgt tgattacggt cattctgggtg 240
 tcttcctcag tgacttgcca gttcggagtt tttgcggctg aaaggggtga cgtttacggc 300
 ctccgcaagt ggttcttggt cagcattatc ctccgatcaa tcttcgtgat cggacagggc 360
 tacgagtaca tcaactctcg aggtcacgga cttacaatcc agagcagtggt ctacggatcg 420
 gcattcttta ttacaaccgg ttccacgca ctgcacgtga tcgcgggtgt tatggccttc 480
 gttgtgggtt ttatgagaat ccataagtcg aagttcactc cggcacaggc aaccgcagca 540
 atggttgtgt cttattactg gcacttcggt gacgtgggtc ggatcggcct cttcatcact 600
 atttacttca ttcagtag 618

<210> 7

<211> 143

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 7

Met Lys Ser Ser Ala Lys Leu Met Tyr Gly Pro Thr Val Phe Met Ala
 1 5 10 15

Ala Met Ala Val Ile Tyr Ile Phe Ala Thr Met His Val Ser Asp Gly
 20 25 30

Gly Ser Val Lys Gly Val Glu Trp Val Gly Ser Val Ala Leu Val Leu
 35 40 45

Ser Ala Gly Leu Thr Leu Met Leu Gly Val Tyr Leu His Phe Thr Glu
 50 55 60

Val Arg Val Asp Val Leu Pro Glu Asp Trp Glu Glu Ala Glu Val Ala
65 70 75 80

Asp Lys Ala Gly Thr Leu Gly Phe Phe Ser Pro Ser Ser Ile Trp Pro
85 90 95

Ala Ala Met Ser Gly Ala Val Gly Phe Leu Ala Phe Gly Val Val Tyr
100 105 110

Phe His Tyr Trp Met Ile Ala Val Gly Leu Met Leu Leu Ile Phe Thr
115 120 125

Ile Thr Lys Leu Asn Leu Gln Tyr Gly Val Pro Lys Glu Lys His
130 135 140

<210> 8

<211> 432

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 8

atgaagtctt cagcaaaact catgtacggc ccgaccgtat tcatggccgc aatggctgtc 60
atctacatct tcgcaacaat gcacgttagt gatggcggca gcgttaaagg tgttgagtgg 120
gtcggttctg tggccctggc cctgtcagca ggtctgacgc ttatgctcgg tgtctacctt 180
cacttcactg aagtccgcgt agatgttctt ccagaggact gggaagaggc tgaggttgcc 240
gacaaggcag gaaccctcgg gttcttcagc ccaagctcca tttggccggc agctatgtcc 300
ggtgcggttg gattccttgc attcggcgtt gtgtacttcc actactggat gatcgagtt 360
ggtctgatgc tctgatctt cactgatcacc aagctcaacc ttcagtacgg cgtgccaaaa 420
gaaaagcact ag 432

<210> 9

<211> 408

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 9

Met Ser Asn Asn Asn Asp Lys Gln Tyr Thr Thr Gln Glu Leu Asn Ala
1 5 10 15

Met Ser Asn Glu Asp Leu Ala Arg Leu Gly Thr Glu Leu Asp Asp Val
20 25 30

Thr Ile Ala Tyr Arg Lys Glu Arg Phe Pro Ile Ala Asn Asp Pro Ala
35 40 45

Glu Lys Arg Ala Ala Arg Ala Val Thr Phe Trp Leu Val Leu Gly Ile
 50 55 60

Ile Gly Gly Leu Gly Phe Leu Ala Thr Tyr Ile Phe Trp Pro Trp Glu
 65 70 75 80

Tyr Lys Ala His Gly Asp Glu Gly Leu Leu Ala Tyr Thr Leu Tyr Thr
 85 90 95

Pro Met Leu Gly Ile Thr Ser Gly Leu Cys Ile Leu Ser Leu Gly Phe
 100 105 110

Ala Val Val Leu Tyr Val Lys Lys Phe Ile Pro Glu Glu Ile Ala Val
 115 120 125

Gln Arg Arg His Asp Gly Pro Ser Glu Glu Val Asp Arg Arg Thr Ile
 130 135 140

Val Ala Leu Leu Asn Asp Ser Trp Gln Thr Ser Thr Leu Gly Arg Arg
 145 150 155 160

Lys Leu Ile Met Gly Leu Ala Gly Gly Gly Ala Val Leu Ala Gly Leu
 165 170 175

Thr Ile Ile Ala Pro Met Gly Gly Met Ile Lys Asn Pro Trp Asn Pro
 180 185 190

Lys Glu Gly Pro Met Asp Val Gln Gly Asp Gly Thr Leu Trp Thr Ser
 195 200 205

Gly Trp Thr Leu Val Glu Asn Asp Val Lys Val Tyr Leu Gly Arg Asp
 210 215 220

Thr Ala Ala Ile Ala Glu Ser His Thr Asp Ala Thr Gly Glu His Trp
 225 230 235 240

Ser Thr Thr Gly Val Ser Arg Leu Val Arg Met Arg Pro Glu Asp Leu
 245 250 255

Ala Ala Ala Ser Met Glu Thr Val Phe Pro Leu Pro Ala Glu Met Val
 260 265 270

Asn Asp Gly Ala Glu Tyr Asp Pro Ala Lys Asp Val Tyr Glu His Gln
 275 280 285

Met His Ser Val His Gly Pro Arg Asn Ala Val Met Leu Ile Arg Leu
 290 295 300

Arg Thr Ala Asp Ala Glu Lys Val Ile Glu Arg Glu Gly Gln Glu Ser
305 310 315 320

Phe His Tyr Gly Asp Tyr Tyr Ala Tyr Ser Lys Ile Cys Thr His Ile
325 330 335

Gly Cys Pro Thr Ser Leu Tyr Glu Ala Gln Thr Asn Arg Ile Leu Cys
340 345 350

Pro Cys His Gln Ser Gln Phe Asp Ala Leu His Tyr Gly Lys Pro Val
355 360 365

Phe Gly Pro Ala Ala Arg Ala Leu Pro Gln Leu Pro Ile Thr Val Asp
370 375 380

Glu Glu Gly Tyr Leu Ile Ala Ala Gly Asn Phe Ile Glu Pro Leu Gly
385 390 395 400

Pro Ala Phe Trp Glu Arg Lys Ser
405

<210> 10

<211> 1227

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 10

atgagtaaca acaacgacaa acagtacaca acccaagaac tcaacgcgat gagcaatgag 60
gatcttgac gacttggtac agagctggac gacgttacca ttgcataccg caaggaacgt 120
ttcccaatcg ctaatgaccc agctgagaag cgegctgcac gtgcagttac tttctggcta 180
gtcctcggca tcattggtgg acttggttgc ctggctacct acattttctg gccttgggag 240
tacaaggcac acggagatga aggtctcctg gcgtacacct tgtacacccc aatgctgggt 300
attacttccg gtctttgcat cctgtccctg ggatttgcag ttgtccttta tgtcaagaag 360
ttcattccag aggaaatcgc agtacagcgt cgccacgacg gtccttctga agaagttgac 420
cgccgcacca tcgttgcaact tctcaatgac tcttggcaga cctctactct tggctcgtcg 480
aagctgatca tgggacttgc aggtggcgga gcagtactgg ccggcctgac catcatcgct 540
ccaatgggag gtatgatcaa gaacccttgg aatcctaagg aaggcccaat ggacgttcag 600
ggtgacggca ccctgtggac ttccgggttg actctcgttg agaacgacgt caaggtttac 660
ctcgcccgag acactgcagc aattgctggag tccacacccg atgcaaccgg tgagcactgg 720
tcaaccactg gtgtttcccg cctgggtcgt atgcgcccag aagatctggc agcagcatcc 780
atggaaactg tcttcccact tccagctgaa atggtgaacg acggtgctga atacgatcct 840
gcgaaggacg tctacgagca ccaaatgcac tcggtgcacg gccacgcaa cgcagttatg 900
ttgatccgtc tccgtaccgc tgacgctgaa aaggttatcg aacgcgaagg ccaggagtcc 960
ttccactacg gtgactacta cgcttactcc aagatttgta cacacattgg ttgccaacc 1020
tactgtacg aggtcagac caatcgtatt ctgtgcccat gtcaccagtc gcagtttgac 1080
gcattgcact acggaaagcc agtctttgga cctgctgccc gtgcactgcc acagctgcca 1140

attaccgttg atgaagaggg ctacctcatc gccgctggta acttcattga gccactcggc 1200
 cctgcattct gggagcgtaa gtcattga 1227

<210> 11

<211> 539

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 11

Met Ser Leu Ala Thr Val Gly Asn Asn Leu Asp Ser Arg Tyr Thr Met
 1 5 10 15

Ala Ser Gly Ile Arg Arg Gln Ile Asn Lys Val Phe Pro Thr His Trp
 20 25 30

Ser Phe Met Leu Gly Glu Ile Ala Leu Tyr Ser Phe Ile Val Leu Leu
 35 40 45

Leu Thr Gly Val Tyr Leu Thr Leu Phe Phe Asp Pro Ser Ile Thr Lys
 50 55 60

Val Ile Tyr Asp Gly Gly Tyr Leu Pro Leu Asn Gly Val Glu Met Ser
 65 70 75 80

Arg Ala Tyr Ala Thr Ala Leu Asp Ile Ser Phe Glu Val Arg Gly Gly
 85 90 95

Leu Phe Ile Arg Gln Met His His Trp Ala Ala Leu Leu Phe Val Val
 100 105 110

Ser Met Leu Val His Met Leu Arg Ile Phe Phe Thr Gly Ala Phe Arg
 115 120 125

Arg Pro Arg Glu Ala Asn Trp Ile Ile Gly Val Val Leu Ile Ile Leu
 130 135 140

Gly Met Ala Glu Gly Phe Met Gly Tyr Ser Leu Pro Asp Asp Leu Leu
 145 150 155 160

Ser Gly Val Gly Leu Arg Ile Met Ser Ala Ile Ile Val Gly Leu Pro
 165 170 175

Ile Ile Gly Thr Trp Met His Trp Leu Ile Phe Gly Gly Asp Phe Pro
 180 185 190

Ser Asp Leu Met Leu Asp Arg Phe Tyr Ile Ala His Val Leu Ile Ile
 195 200 205

Pro Ala Ile Leu Leu Gly Leu Ile Ala Ala His Leu Ala Leu Val Trp
 210 215 220
 Tyr Gln Lys His Thr Gln Phe Pro Gly Ala Gly Arg Thr Glu Asn Asn
 225 230 235 240
 Val Ile Gly Ile Arg Ile Met Pro Leu Phe Ala Val Lys Ala Val Ala
 245 250 255
 Phe Gly Leu Ile Val Phe Gly Phe Leu Ala Leu Leu Ala Gly Val Thr
 260 265 270
 Thr Ile Asn Ala Ile Trp Asn Leu Gly Pro Tyr Asn Pro Ser Gln Val
 275 280 285
 Ser Ala Gly Ser Gln Pro Asp Val Tyr Met Leu Trp Thr Asp Gly Ala
 290 295 300
 Ala Arg Val Met Pro Ala Trp Glu Leu Tyr Leu Gly Asn Tyr Thr Ile
 305 310 315 320
 Pro Ala Val Phe Trp Val Ala Val Met Leu Gly Ile Leu Val Val Leu
 325 330 335
 Leu Val Thr Tyr Pro Phe Ile Glu Arg Lys Phe Thr Gly Asp Asp Ala
 340 345 350
 His His Asn Leu Leu Gln Arg Pro Arg Asp Val Pro Val Arg Thr Ser
 355 360 365
 Leu Gly Val Met Ala Leu Val Phe Tyr Ile Leu Leu Thr Val Ser Gly
 370 375 380
 Gly Asn Asp Val Tyr Ala Met Gln Phe His Val Ser Leu Asn Ala Met
 385 390 395 400
 Thr Trp Ile Gly Arg Ile Gly Leu Ile Val Gly Pro Ala Ile Ala Tyr
 405 410 415
 Phe Ile Thr Tyr Arg Leu Cys Ile Gly Leu Gln Arg Ser Asp Arg Glu
 420 425 430
 Val Leu Glu His Gly Ile Glu Thr Gly Ile Ile Lys Gln Met Pro Asn
 435 440 445
 Gly Ala Phe Ile Glu Val His Gln Pro Leu Gly Pro Val Asp Asp His
 450 455 460

Gly His Pro Ile Pro Leu Pro Tyr Ala Gly Ala Ala Val Pro Lys Gln
465 470 475 480

Met Asn Gln Leu Gly Tyr Ala Glu Val Glu Thr Arg Gly Gly Phe Phe
485 490 495

Gly Pro Asp Pro Glu Asp Ile Arg Ala Lys Ala Lys Glu Ile Glu His
500 505 510

Ala Asn His Ile Glu Glu Ala Asn Thr Leu Arg Ala Leu Asn Glu Ala
515 520 525

Asn Ile Glu Arg Asp Lys Asn Glu Gly Lys Asn
530 535

<210> 12

<211> 1620

<212> DNA

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 12

atgagtctag ctaccgtggg aaacaatctt gattcccggt acaccatggc gtcgggtatc 60
cgtcgccaga tcaacaagggt cttcccaact cactgggtcct tcatgctcgg cgagattgcg 120
ctttacagct tcatcgtctt gctgctgact ggtgtctacc tgacctgtt cttcgaccca 180
tcaatcacca aggtcattta tgacggcggc tacctccac tgaacgggtgt ggagatgtcc 240
cgtgcatacg caactgcgtt ggataatttc ttcgaggttc gcgggtggtct gttcatccgc 300
cagatgcacc actgggcagc cctgctgttc gttgtatcca tgctggttca catgctccgt 360
attttcttca ccgggtgcgtt ccgtcgccca cgtgaagcaa actggatcat cgggtgttgtt 420
ctgatcatcc tgggtatggc tgaaggcttc atgggttact ccctgcctga tgacctgtc 480
tctgggtgtt gtcttcgaat catgtccgcc atcatcggtg gtcttccgat cataggtacc 540
tggatgcact ggctgatctt cgggtggagac ttcccatccg atctgatgct ggaccgcttc 600
tacatcgcac acgttctaata catcccagct atcctgcttg gcttgatcgc agctcacctg 660
gcacttggtt ggtaccagaa gcacaccagc ttcccaggcg ctggccgcac tgagaacaac 720
gtgatcggtg tccgaatcat gcctctgttc gcagttaagg ctggtgcttt cggcctcatc 780
gtcttcgggt tccctgcact gcttgctggt gtcaccacca ttaacgcaat ttggaatctt 840
ggaccgtaca acccttcaca ggtgtctgct ggttccagc ctgacgttta catgctgtgg 900
acagatggtg ctgctcgtgt catgccggca tgggagctct acctcggtaa ctacactatt 960
ccagcagtct tctgggttgc tgtgatgctg ggtatcctcg tggttctgct tgtgacttac 1020
ccattcattg agcgtaaagt caccggcgac gatgcacacc acaacttgct gcagcgtcct 1080
cgcgatgttc cagtccgcac ctcaactcgt gtcattggcg ttgtcttcta catcctgctt 1140
accgtttctg gtggtaacga tgtttacgca atgcagttcc atgtttcact gaacgcgatg 1200
acctggatcg gtcgtatcgg cctcatcggt ggaccagcta ttgcatactt catcacttac 1260
cgactgtgca tcggcttgca gcgctctgac cgcgaggtcc tggagcacgg catcgagacc 1320
ggtatcatca agcagatgcc aaatggtgcc ttcattgaag ttcaccagcc acttggccca 1380
gttgatgacc atgggtcacc aatcccactg ccatacgctg gcgctgcggt tccaaagcag 1440

atgaaccagc ttggttacgc tgaggttgaa acccgcggtg gattcttcgg acctgatcca 1500
 gaagacatcc gtgcgaaggc taaggaaatt gagcacgcaa accacattga ggaagcgaac 1560
 actcttcgtg cactcaacga ggcaaacatt gagcgtgaca agaattgaggg caagaactag 1620

<210> 13

<211> 283

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 13

Met Ala Lys Pro Ser Ala Lys Lys Val Lys Asn Arg Arg Lys Val Arg
 1 5 10 15

Arg Thr Val Ala Gly Ala Leu Ala Leu Thr Ile Gly Leu Ser Gly Ala
 20 25 30

Gly Ile Leu Ala Thr Ala Ile Thr Pro Asp Ala Gln Val Ala Thr Ala
 35 40 45

Gln Arg Asp Asp Gln Ala Leu Ile Ser Glu Gly Lys Asp Leu Tyr Asp
 50 55 60

Val Ala Cys Ile Thr Cys His Gly Val Asn Leu Gln Gly Val Glu Asp
 65 70 75 80

Arg Gly Pro Ser Leu Val Gly Val Gly Glu Gly Ala Val Tyr Phe Gln
 85 90 95

Val His Ser Gly Arg Met Pro Ile Leu Arg Asn Glu Ala Gln Ala Glu
 100 105 110

Arg Lys Ala Pro Arg Tyr Thr Glu Ala Gln Thr Leu Ala Ile Ala Ala
 115 120 125

Tyr Val Ala Ala Asn Gly Gly Gly Pro Gly Leu Val Tyr Asn Glu Asp
 130 135 140

Gly Thr Leu Ala Met Glu Glu Leu Arg Gly Glu Asn Tyr Asp Gly Gln
 145 150 155 160

Ile Thr Ser Ala Asp Val Ala Arg Gly Gly Asp Leu Phe Arg Leu Asn
 165 170 175

Cys Ala Ser Cys His Asn Phe Thr Gly Arg Gly Gly Ala Leu Ser Ser
 180 185 190

Gly Lys Tyr Ala Pro Asn Leu Asp Ala Ala Asn Glu Gln Glu Ile Tyr

<400> 15

Met Thr Thr Met Arg Glu Val Ser Thr Asp Leu Asn Ile Leu Ile Val
 1 5 10 15

Pro Ser Glu Trp Glu Lys Val Leu Glu Asn Leu Pro Ala Thr Leu Ser
 20 25 30

Glu Ser Gly Phe Val Ala Ser Glu Ile His Ser Gln Ile Val Asp Leu
 35 40 45

Thr Cys Glu Pro Asp Asn Met Leu Val Thr Gln Phe Ser Gln Leu Glu
 50 55 60

Gly His Pro Pro Ile Val Glu Val Leu His Arg Leu Val Ile Asn Gly
 65 70 75 80

Ser Ser Asp Leu Glu Leu Lys Asp Leu Thr Lys Lys Val Val Gly Ala
 85 90 95

Leu Pro Gln Gly Thr Tyr Trp Tyr Gly Thr Ser Leu Glu Gly Ala Thr
 100 105 110

Glu Pro Gly Val Asn Ala Ser Cys Ala Trp Gln His Arg Gly
 115 120 125

<210> 16

<211> 381

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 16

atgaccacca tgcgagaagt ttcaaccgac ctcaacatcc tcatcgctccc cagcgaatgg 60
 gaaaaagtac tagaaaacct accagcgaca ttgagtgagt ccggattcgt agcctctgaa 120
 atccactccc agatcgctga cctcacctgc gaacccgaca acatgcttgt caccagttc 180
 tcccagctag agggccaccc accaattgtg gaagtgtccc accgcctagt aattaacggc 240
 tcctccgacc tggagcttaa agacctcacc aaaaagggtgg tgggggctgt gcctcagggg 300
 acctactggt atggaacttc ccttgaagggt gcgaccgaac ctggcggttaa cgcctcatgc 360
 gcgtggcagc atcgggggcta g 381

<210> 17

<211> 142

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 17

Met Thr Asn Asn Ala Leu Thr Val Pro Thr Arg Thr Arg His Gln Ala

```
<210> 18
<211> 429
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum 'r'
```

<400>	18						
atgacgaaca	atgcattaac	cgtgcccaacc	cggacccgtc	atcaggcgga	tttgctcacg	60	
gcagacttct	gggaagacat	ggggttgccc	caactgaaaa	ctaccatcga	agaatccatc	120	
gacgatgtag	ccctcccaat	gcataaccgct	gttctagaaa	tcagcggaat	gccaaaggaa	180	
ctgcgtcaga	ccgtggaatc	cgcaatgggt	gtgtgtattc	cgagtccttc	ggagctgtcc	240	
ggctccaaca	gggacccgct	caccgcacga	tggttcactg	catggcgccg	tgacccattc	300	
gaacttggcc	tactgagtg	tcgagaggtg	atcaccggaa	ctccacgcga	actcgacaaa	360	
cttcgaggag	tgctggaatc	tctggctgat	gaataccggt	ttgaagtga	gctgcgaatc	420	
gttgactag						429	

```
<210> 19
<211> 203
<212> PRT
<213> Corynebacterium glutamicum
```

<400> 19

Met Asn Ile Thr Trp Leu Ile Leu Ala Gly Val Leu Ala Ile Ile Ala
 1 5 10 15

Val Val Phe Phe Tyr Leu Ser Ala Gln Lys Lys Lys Ser Glu Pro Gln
 20 25 30

Pro Pro Arg Gln Arg Gln Asp Pro Leu Lys Phe Ala Asp Gly Ser Asp
 35 40 45

Thr Phe Asn Ala Arg Ile Leu Gly Pro Gly Ala Ile Ile Ser Arg Gly
 50 55 60

Gly Val Asp Tyr Val Cys Arg Gly Ala Ile Gln Phe Arg Gln Gly Gln
 65 70 75 80

Tyr Ile Trp His Glu Tyr Leu Leu Asp Gly Gly Lys Gly Ser Glu Tyr
 85 90 95

Leu Ser Val Glu Tyr Asp Glu Gly Gln Leu Asn Leu Gly Trp Trp Ile
 100 105 110

Thr Arg Pro Asp Leu Ala Gln Gln Pro Ala His Asp Val Thr Val Glu
 115 120 125

Gly Val Arg Tyr Arg Lys Thr Glu Ser Gly Val Gly Thr Phe Thr Ser
 130 135 140

Glu Gly Thr Thr Gly Val Ala Asp Gln Gly Glu Phe Glu Tyr Trp Asp
 145 150 155 160

Leu Ala Glu Val Gly Gly Asn Arg Leu Leu Ser Phe Glu Arg Tyr Gly
 165 170 175

Lys Asp Ser Pro Phe Glu Val Ser Leu Gly Trp Thr Val Leu Pro Gly
 180 185 190

Glu Leu Thr Val Tyr Pro Ala Pro Glu Ala Ser
 195 200

<210> 20

<211> 612

<212> DNA

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 20

```
atgaatatca cgtggccttat cctggccggt gttttagcca tcatcgctgt cgtgttcttt 60
tatctttcag cacagaagaa aaagagcgaa ccgcagcctc ctcgtcagcg tcaagatcct 120
ctgaaatttg ccgacggatc cgacactttt aatgcccgca ttttgggtcc tggagcaatt 180
atctcccgcg gtggcggtgga ttatgtctgc cgcggagcca tccagttccg tcaaggccaa 240
tacatttggc acgagtatct actcgacggt ggcaaaggca gtgagtacct gagcgtggaa 300
tacgatgagg gccaaactcaa cctcggatgg tggattaccg gccctgacct ggcacaacag 360
ccgcacatg atgtcacctg ggagggcggt cgctaccgta aaaccgaatc tggcgtgggc 420
accttcacct ccgaaggcac caccggcgtg gctgatcaag gtgaatttga atactgggat 480
ctcgccgaag ttggcggaaa cagggtgctc agttttgaac gctacggcaa agacagtcca 540
tttgaagtat cgctcgggtg gacggtgctg cccggcgaac tcaccgttta cccagcacca 600
gaggcctcat ga 612
```