



(19)
 Bundesrepublik Deutschland
 Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 102 31 297 A1** 2004.02.05

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **102 31 297.4**
 (22) Anmeldetag: **10.07.2002**
 (43) Offenlegungstag: **05.02.2004**

(51) Int Cl.7: **C12N 15/53**
C12N 9/02, C12N 1/21, C07H 21/04,
C12N 15/77, C12P 13/06
 // (C12N 1/21,C12R 1:15)C12R 1:13

(71) Anmelder:
Forschungszentrum Jülich GmbH, 52428 Jülich,
DE; Amino GmbH, 38373 Frellstedt, DE

(72) Erfinder:
Peters Wendisch, Petra, Dr., 52428 Jülich, DE;
Netzer, Roman, 52428 Jülich, DE; Eggeling,
Lothar, Dr., 52428 Jülich, DE; Sahn, Hermann,
Prof. Dr., 52428 Jülich, DE; Faurie, Robert, Dr.,
38154 Königslutter, DE; Klaffen, Birgit, Dr., 38108
Braunschweig, DE

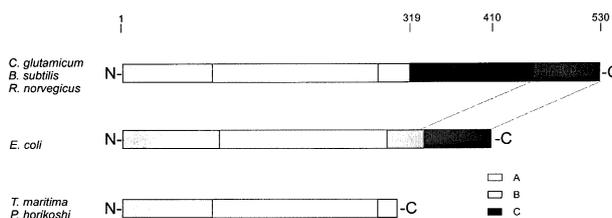
Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Nukleotidsequenzen coryneformer Bakterien codierend für an der Biosynthese von L-Serin beteiligte Proteine sowie Verfahren zur Herstellung von L-Serin**

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Nukleotidsequenzen coryneformer Bakterien, codierend für an der Biosynthese von L-Serin beteiligte Proteine, sowie Verfahren zur Herstellung von L-Serin.

Durch Deletion von mindestens 79 Aminosäuren im C-Terminus der Wild Typ serA Sequenz konnte eine 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase mit einer gegenüber dem Wild Typ verringerten Feedback Inhibition durch L-Serin erzeugt werden.



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft Nukleotidsequenzen coryneformer Bakterien codierend für an der Biosynthese von L-Serin beteiligte Proteine sowie Verfahren zur Herstellung von L-Serin.

[0002] Die Aminosäure L-Serin findet in der Nahrungsmittel-, Futtermittel- und Pharmaindustrie, sowie in der Humanmedizin Anwendung. Darüber hinaus dient sie als Baustein für die Synthese weiterer industriell verwertbarer Produkte, wie z. B. L-Tryptophan aus Indol und L-Serin.

[0003] Es ist bekannt, dass L-Serin durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien hergestellt werden kann. So ist z. B. ein Stamm von *Corynebacterium glycinophilum* in der Lage, L-Serin aus Glycin und Kohlenhydraten zu bilden (Kubota K, Kageyama K, Shiro T und Okumura S (1971) *Journal of General Applications in Microbiology*, 17: 167–168; Kubota K, Kageyama K, Maeyashiki I, Yamada K und Okumura S (1972) *Journal of General Applications in Microbiology* 18: 365). An der Umsetzung von Glycin zu L-Serin ist hier das Enzym L-Serin-Hydroxymethyltransferase beteiligt (Kubota K und Yokozeki K (1989) *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 67(6):387–390). Die verwendeten Stämme weisen darüber hinaus einen verminderten L-Serin-Abbau auf, der auf eine Verringerung der Aktivität des Enzyms L-Serin-Dehydratase zurückzuführen ist (Kubota K, Kageyama K, Shiro T und Okumura S (1971) *Journal of General Applications in Microbiology*, 17: 167–168; Kubota K (1985) *Agricultural Biological Chemistry*, 49: 7–12).

[0004] Weiterhin wird L-Serin fermentativ aus Methanol und Glycin unter Zuhilfenahme methylotropher Bakterien, wie z. B. *Hyphomicrobium* Stämmen, produziert (Izumi Y, Yoshida T, Miyazaki SS, Mitsunaga T, Ohshiro T, Shiamo M, Miyata A und Tanabe T (1993) *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39: 427–432). In beiden Fällen muss die Aminosäure Glycin als Vorstufe für die Bildung der Aminosäure L-Serin eingesetzt werden.

[0005] Ferner sind coryneforme Bakterien bekannt, die L-Serin direkt aus Kohlenhydraten, ohne zusätzliche Beigabe weiterer Vorstufen produzieren können. Diese Stämme, die zu der Gattung *Corynebacterium glutamicum* gehören, weisen sich dadurch aus, dass sie z. B. resistent gegen die L-Serin-Analoga Serin-Hydroxamat und β -Chloroalanin sind und durch ungerichtete Mutagenese erhalten wurden (Yoshida H und Nakayama K (1974) *Nihon-Nogei-Kagakukaishi* 48: 201–208).

[0006] Darüber hinaus sind *Brevibacterium flavum* Stämme bekannt, die durch ungerichtete Mutagenese Defekte im L-Serin-Abbau aufweisen, eine erhöhte Aktivität der durch *serA* kodierten 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase besitzen, und die aus *Escherichia coli* stammenden Gene *serB* und *serC* überexprimieren (EP0931833A2). Das hierbei verwendete deregulierte *serA*-Gen wurde durch ungerichtete Mutagenese gewonnen und unterscheidet sich vom Wild Typ Gen nur durch einen einzigen Basenaustausch. Die Expression dieses Gens beinhaltet den Nachteil, dass es leicht zu einer Revertierung und damit zur Zurückführung in den regulierten Zustand kommen kann.

[0007] Ein Nachteil bisher bekannter 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenasen liegt in ihrer Feedback Inhibition durch L-Serin, wodurch beispielsweise die Produktivität der mikrobiellen Herstellung von L-Serin verringert wird. Die Region, die für diese Regulation durch L-Serin verantwortlich ist, ist der C-Terminus des Proteins. Aus WO 93/12235 ist eine DNA bekannt, die für eine 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase aus *E. coli* codiert, deren C-Terminus zu 25% verändert, komplett deletiert oder in den in einem bestimmten Bereich eine Insertion durchgeführt wurde, so dass eine geringere Inhibition durch L-Serin zu verzeichnen war. Diese 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase wies jedoch nur noch eine geringe Aktivität auf. Eine verbesserte L-Serinproduktion wurde mit der deregulierten 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase nicht nachgewiesen.

[0008] Die Wild Typ *serA* Sequenz ist allgemein bekannt und kann den dem Fachmann bekannten Datenbanken oder dem beigefügten Sequenzprotokoll gemäß SEQ ID No. 6 entnommen werden.

[0009] Es ist daher Aufgabe der Erfindung, Maßnahmen zur Verfügung zu stellen, mit denen die zuvor genannten Nachteile beseitigt werden können und die zu einer verbesserten Produktion von L-Serin oder davon ableitbaren Stoffwechselprodukten wie z. B. Tryptophan führen. Es ist somit Aufgabe der Erfindung Nukleinsäuren, codierend für eine 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase, bereitzustellen, die gegenüber natürlich vorkommenden 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenasen eine verringerte Feedback Inhibition durch L-Serin unter Erhalt der Aktivität aufweist. In diesem Zusammenhang ist es weiterhin Aufgabe der Erfindung eine 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase sowie Mikroorganismen bereitzustellen, die gegenüber natürlich vorkommenden 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenasen bzw. Mikroorganismen mit einer 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase, eine verringerte Feedback Inhibition durch L-Serin unter Erhalt der Aktivität aufweisen. Weiterhin ist es Aufgabe der Erfindung, ein verbessertes Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von L-Serin bereitzustellen.

[0010] Ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 1, 2, 3, 4 oder 5 wird die Aufgabe erfindungsgemäß gelöst, mit den im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 1, 2, 3, 4 oder 5 angegebenen Merkmalen. Weiterhin wird die Aufgabe ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 9 erfindungsgemäß gelöst, mit den im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 9 angegebenen Merkmalen. Die Aufgabe wird außerdem ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 10 erfindungsgemäß gelöst, mit den im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 10 angegebenen Merkmalen. Die Aufgabe wird ebenso ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 11 erfindungsgemäß gelöst, mit den im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 11 angegebenen Merkmalen. Die Aufgabe wird

weiterhin ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 20 erfindungsgemäß gelöst, mit den im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 20 angegebenen Merkmalen. Ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 26 wird die Aufgabe ebenfalls erfindungsgemäß gelöst, durch die im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 26 angegebenen Merkmale. Weiterhin wird die Aufgabe ausgehend vom Oberbegriff des Anspruchs 27 erfindungsgemäß gelöst, durch die im kennzeichnenden Teil des Anspruchs 27 angegebenen Merkmale.

[0011] Mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuren sowie Polypeptiden ist es nunmehr möglich, eine 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase bereitzustellen, die gegenüber natürlich vorkommenden oder gentechnisch nicht veränderten Nucleinsäuren bzw. Enzymen keine bzw. eine verringerte L-Serin Feedback Inhibierung unter Erhalt der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase Aktivität aufweist. Diese Eigenschaft wird im Folgenden unter der Bezeichnung „dereguliert“ zusammengefasst. Weiterhin ist es möglich Mikroorganismen und Verfahren bereitzustellen, mit denen eine L-Serinproduktion mit gegenüber bisher bekannten mikrobiellen Verfahren höheren Ausbeuten möglich ist.

[0012] Vorteilhafte Weiterbildungen sind in den Unteransprüchen angegeben.

[0013] Gegenstand der Erfindung ist die Bereitstellung von Nucleinsäuren codierend für eine deregulierte 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase, im Folgenden mit PGD bezeichnet, enthaltend eine Gensequenz serA gemäß SEQ ID No 1, 2, 3, 4 oder 5 oder ein Allel, Homolog oder Derivat dieser Nucleotidsequenzen oder mit diesen hybridisierende Nucleotidsequenzen. Die Nucleinsäure gemäß SEQ ID No 1, die für eine PGD mit einer Deletion von 197 Aminosäuren im C-Terminus codiert, hat sich als besonders vorteilhaft erwiesen.

[0014] Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuren zeichnen sich dadurch aus, daß sie aus coryneformen Bakterien, bevorzugt der Gattung Corynebacterium oder Brevibacterium besonders bevorzugt aus Corynebacterium glutamicum isoliert werden. Beispiele für in Stammkulturen hinterlegte Wild Typen coryneformer Bakterien sind, Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 sowie Corynebacterium acetoglutamicum ATCC 15806 oder auch Brevibacterium flavum ATCC 14067. Beispiele für zur Herstellung von L-Serin geeignete Mutanten oder Produktionsstämme sind, Organismen aus der Gruppe Arthrobacter, Pseudomonas, Nocardia, Methylobacterium, Hyphomycrobium, Alcaligenes oder Klebsiella. Die vorliegende Erfindung wird durch die Angabe der zuvor genannten Bakterienstämme näher charakterisiert, die jedoch nicht limitierend wirkt.

[0015] Unter einer Nucleinsäure oder einem Nucleinsäurefragment ist erfindungsgemäß ein Polymer aus RNA oder DNA zu verstehen, das einzel- oder doppelsträngig sein kann und optional natürliche, chemisch synthetisierte, modifizierte oder künstliche Nucleotide enthalten kann. Der Begriff DNA-Polymer schließt hierbei auch genomische DNA, cDNA oder Mischungen davon ein.

[0016] Unter Allelen sind erfindungsgemäß funktionell Äquivalente, d. h. im wesentlichen gleichwirkende Nucleotidsequenzen zu verstehen. Funktionell äquivalente Sequenzen sind solche Sequenzen, welche trotz abweichender Nucleotidsequenz, beispielsweise durch die Degenerierung des genetischen Codes bedingt noch die gewünschten Funktionen besitzen. Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z. B. durch chemische Synthese erhaltene und gegebenenfalls an den Kodongebrauch des Wirtsorganismus angepasste Nucleotidsequenzen.

[0017] Unter einem funktionellen Äquivalent versteht man insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ursprünglich isolierten Sequenz, welche weiterhin die gewünschte Funktion zeigen. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen oder Insertionen eines oder mehrerer Nucleotidreste. Inbegriffen sind hier auch sogenannte Sinnmutationen, die auf Proteinebene beispielsweise zum Austausch konservierter Aminosäuren führen können, welche aber zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen und somit funktionsneutral sind. Dies beinhaltet auch Veränderungen der Nucleotidsequenz, die auf Proteinebene den N-Terminus eines Proteins betreffen, ohne jedoch die Funktion des Proteins wesentlich zu beeinträchtigen.

[0018] Durch die vorliegende Erfindung werden auch solche Nucleotidsequenzen umfasst, welche man durch Modifikation der Nucleotidsequenz, resultierend in entsprechenden Derivaten, erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann z. B. die weitere Eingrenzung der darin enthaltenen codierenden Sequenz oder z. B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzym-Schnittstellen sein.

[0019] Außerdem sind künstliche DNA-Sequenzen Gegenstand der vorliegenden Erfindung, solange sie, wie oben beschrieben, die gewünschten Eigenschaften vermitteln. Solche künstlichen DNA-Sequenzen können beispielsweise durch Rückübersetzung von mittels computergestützten Programmen (molecular modelling) erstellten Proteinen oder durch in-vitro-Selektion ermittelt werden. Besonders geeignet sind codierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung einer Polypeptidsequenz gemäß der für den Wirtsorganismus spezifischen Kodon-Nutzung erhalten wurden. Die spezifische Kodon-Nutzung kann ein mit molekulargenetischen Methoden vertrauter Fachmann durch Computerauswertung anderer, bereits bekannter Gene des zu transformierenden Organismus leicht ermitteln.

[0020] Unter homologen Sequenzen sind erfindungsgemäß solche zu verstehen, die zu den erfindungsgemäßen Nucleotidsequenzen komplementär sind und/oder mit diesen hybridisieren. Der Begriff hybridisierende Sequenzen schließt erfindungsgemäß substanziiell ähnliche Nucleotidsequenzen aus der Gruppe von DNA oder RNA ein, die unter an sich bekannten stringenten Bedingungen eine spezifische Wechselwirkung (Bin-

ding) mit den zuvor genannten Nukleotidsequenzen eingehen. Hierzu zählen auch kurze Nukleotidsequenzen mit einer Länge von beispielsweise 10 bis 30, bevorzugt 12 bis 15 Nukleotiden. Dies umfaßt erfindungsgemäß u.a. auch sogenannte Primer oder Sonden.

[0021] Erfindungsgemäß sind auch die den codierenden Bereichen (Strukturgenen) vorausgehenden (5'- oder upstream) und/oder nachfolgenden (3'- oder downstream) Sequenzbereiche eingeschlossen. Insbesondere sind hierin Sequenzbereiche mit regulatorischer Funktion inbegriffen. Sie können die Transkription, die RNA-Stabilität oder die RNA Prozessierung sowie die Translation beeinflussen. Beispiele für regulatorische Sequenzen sind u.a. Promotoren, Enhancer, Operatoren, Terminatoren oder Translationsverstärker.

[0022] Gegenstand der Erfindung ist ferner eine Genstruktur enthaltend wenigstens eine der zuvor beschriebenen Nukleotidsequenzen codierend für eine deregulierte PDG sowie mit diesen operativ verknüpfte regulatorische Sequenzen, welche die Expression der codierenden Sequenzen in der Wirtszelle steuern.

[0023] Darüber hinaus betrifft die vorliegende Erfindung einen Vektor enthaltend eine Nukleotidsequenz der zuvor beschriebenen Art codierend für eine deregulierte PDG, mit diesen operativ verknüpfte regulative Nukleotidsequenzen sowie zusätzliche Nukleotidsequenzen zur Selektion transformierter Wirtszellen, für die Replikation innerhalb der Wirtszelle oder zur Integration in das entsprechende Wirtszell-Genom. Ferner kann der erfindungsgemäße Vektor eine Genstruktur der vorgenannten Art enthalten.

[0024] Als Vektoren eignen sich solche, die in coryneformen Bakterien repliziert werden wie z. B. pZ1 (Menkel E, Thierbach G, Eggeling L, Sahm H., 1989, Appl Environ Microbiol 55(3): 684–688), pEKEx2 (Eikmanns et al., Gene 102: 93–98 (1991)), pVWEx oder pXMJ19. Andere Plasmidvektoren können in gleicher Weise verwendet werden. Diese Aufzählung ist für die vorliegende Erfindung jedoch nicht limitierend.

[0025] Unter Ausnutzung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen können entsprechende Sonden oder auch Primer synthetisiert und dazu verwendet werden, beispielsweise mit Hilfe der PCR-Technik analoge Gene aus anderen Mikroorganismen, bevorzugt coryneformen Bakterien zu amplifizieren und isolieren.

[0026] Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit auch eine Sonde zur Identifizierung und/oder Isolierung von Genen codierend für an der Biosynthese von L-Serin beteiligte Proteine, wobei diese Sonde ausgehend von den erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen der zuvor beschriebenen Art hergestellt wird und eine zur Detektion geeignete Markierung enthält. Bei der Sonde kann es sich um einen Teilausschnitt der erfindungsgemäßen Sequenz, beispielsweise aus einem konservierten Bereich handeln, der z. B. eine Länge von 10 bis 30 oder bevorzugt 12 bis 15 Nukleotiden aufweist und unter stringenten Bedingungen spezifisch mit homologen Nukleotidsequenzen hybridisieren kann. Geeignete Markierungen sind aus der Literatur zahlreich bekannt. Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem beispielsweise im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: a practical approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994) oder beispielsweise im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255–260).

[0027] Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner eine deregulierte PGD oder ein Teil davon, kodiert durch eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No 1, 2, 3, 4 oder 5 oder deren Variationen der zuvor beschriebenen Art. Die vorliegende Erfindung betrifft ebenso eine deregulierte PGD mit einer Aminosäuresequenz gemäß der SEQ ID No 7, 8, 9, 10 oder 11 oder einer modifizierten Form dieser Polypeptidsequenzen oder Isoformen davon oder Mischungen daraus. Als besonders geeignet hat sich eine 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No 7 erwiesen.

[0028] Unter Isoformen sind Enzyme mit gleicher oder vergleichbarer Substrat- und Wirkungsspezifität zu verstehen, die jedoch eine unterschiedliche Primärstruktur aufweisen.

[0029] Unter modifizierten Formen sind erfindungsgemäß Enzyme zu verstehen, bei denen Änderungen in der Sequenz, beispielsweise am N-Terminus des Polypeptids oder im Bereich konservierter Aminosäuren vorliegen, ohne jedoch die Funktion des Enzyms zu beeinträchtigen. Diese Veränderungen können in Form von Aminosäureaustauschen nach an sich bekannten Methoden vorgenommen werden.

[0030] Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Polypeptide mit der Funktion einer deregulierten PGD, die in ihrer Aminosäuresequenz derart verändert sind, dass sie gegenüber regulatorisch wirkenden Verbindungen, beispielsweise die sie in ihrer Aktivität regulierenden Stoffwechsel-Endprodukte (L-Serin) desensitiv sind (feedback-desensitiv).

[0031] Die erfindungsgemäßen Polypeptide zeichnen sich dadurch aus, daß sie aus coryneformen Bakterien, bevorzugt der Gattung Corynebacterium oder Brevibacterium, besonders bevorzugt der Art Corynebacterium glutamicum oder Brevibacterium besonders bevorzugt aus Corynebacterium glutamicum stammen. Beispiele für in Stammkulturen hinterlegte Wild Typen coryneformer Bakterien sind Corynebacterium glutamicum ATCC 13032, sowie Corynebacterium acetoglutamicum ATCC 15806 oder auch Brevibacterium flavum ATCC 14067. Beispiele für zur Herstellung von L-Serin geeignete Mutanten oder Produktionsstämme sind Organismen aus der Gruppe Arthrobacter, Pseudomonas, Nocardia, Methylobacterium, Hyphomycrobium, Alcaligenes oder Klebsiella. Die vorliegende Erfindung wird durch die Angabe der zuvor genannten Bakterienstämme näher charakterisiert, die jedoch nicht limitierend wirkt.

[0032] Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner die Übertragung wenigstens einer der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen oder eines Teils davon codierend für eine deregulierte PGD, ein Allel, Homolog oder Derivat davon in ein Wirtssystem. Dies schließt auch die Übertragung eines 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 Elektroporation genannt.

[0033] Als besonders geeignet hat sich ein homologes Wirtssystem erwiesen. Unter einem homologen Wirtssystem sind Mikroorganismen zu verstehen, die alle einer verwandten Familie angehören. Erfindungsgemäß sind hierunter coryneforme Bakterien zu verstehen, in die die erfindungsgemäß aus coryneformen Bakterien isolierten Nukleinsäuren eingebracht werden. Ein aus einer erfolgreich durchgeführten Nukleinsäureübertragung resultierender transformierter Mikroorganismus unterscheidet sich somit von dem entsprechend nicht transformierten Mikroorganismus dadurch, dass er zusätzliche Nukleinsäuren der erfindungsgemäßen Art enthält und entsprechend zur Ausprägung bringen kann. Stellvertretend für ein geeignetes homologes Wirtssystem sei das Bakterium *Corynebacterium glutamicum* und bevorzugt der Stamm ATCC 13032 genannt. Als Kulturmedium ist je nach Anforderungen ein Komplexmedium wie z. B. LB Medium (T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY 1989) oder auch ein Mineralsalzmedium, wie z. B. CGXII-Medium (Keilhauer, C. et al 1993, *J. Bacteriol.*, 175: 5593–5603) 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* oder *Brevibacterium* 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, *Brevibacterium flavum* ATCC 14067, *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869 und *Brevibacterium divaricatum* ATCC 14020 zu nennen.

[0034] Darüber hinaus schließt die vorliegende Erfindung auch Bakterienstämme als Wirtssystem ein, die sich als L-Serin produzierende Mutanten oder 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 13032 Δ panBC und *Brevibacterium ketoglutamicum* ATCC 21222. Ferner sind erfindungsgemäß auch diejenigen Produktionsstämme geeignet, die dem Fachmann aus mikrobiellen Herstellungsverfahren bekannt sind, wie z. B. Enterobakterien, Bacillaceen oder Hefe-Arten. Die vorliegende Erfindung wird durch die ausgewählten Beispiele an Mikroorganismen näher charakterisiert, jedoch nicht limitiert.

[0035] Die vorliegende Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Mikroorganismus enthaltend in replizierbarer Form eine erfindungsgemäße Nukleinsäure der zuvor beschriebenen Art, welche im Vergleich zu dem entsprechend nicht genetisch veränderten Mikroorganismus verstärkt exprimiert wird und/oder deren Kopienzahl erhöht ist.

[0036] Ebenso umfasst die vorliegende Erfindung einen genetisch veränderten Mikroorganismus enthaltend in replizierbarer Form eine Genstruktur oder einen Vektor der zuvor beschriebenen Art.

[0037] Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist darüber hinaus auch ein genetisch veränderter Mikroorganismus enthaltend ein erfindungsgemäßes Polypeptid mit der Funktion einer deregulierten PGD der zuvor beschriebenen Art, welches eine im Vergleich zu dem entsprechend nicht genetisch veränderten Mikroorganismus eine verringerte bzw. keine feedback Inhibierung durch L-Serin unter Erhalt der PGD-Aktivität aufweist. Ein erfindungsgemäß genetisch veränderter Mikroorganismus zeichnet sich ferner dadurch aus, daß er ein coryneformes Bakterium, bevorzugt der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium*, besonders bevorzugt der Spezies *Corynebacterium glutamicum* oder *Brevibacterium flavum* ist.

[0038] Prinzipiell können Gene durch an sich bekannte Methoden, wie beispielsweise die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) mit Hilfe von kurzen, synthetischen Nukleotidsequenzen (Primern) amplifiziert und anschließend isoliert werden. Die Herstellung der verwendeten Primer erfolgt im Allgemeinen anhand bekannter Gensequenzen aufgrund bestehender Homologien in konservierten Bereichen der Gene und/oder unter Berücksichtigung des GC-Gehalts der DNA des zu untersuchenden Mikroorganismus.

[0039] Eine weitere Vorgehensweise zur Isolierung von codierenden Nukleotidsequenzen ist die Komplementation von sogenannten Defekt-Mutanten des zu untersuchenden Organismus, die zumindest phänotypisch einen Funktionsverlust in der Aktivität des zu untersuchenden Gens oder entsprechenden Proteins aufweisen. Unter einer Komplementation ist die Aufhebung des Gendefektes der Mutante und weitgehende Wiederher-

- stellung des ursprünglichen Erscheinungsbildes vor der Mutagenese zu verstehen, die durch die Einbringung funktioneller Gene oder Genfragmente aus dem zu untersuchenden Mikroorganismus erreicht wird.
- [0040] Ein klassisches Mutagenese-Verfahren zur Herstellung von Defektmutanten ist beispielsweise die Behandlung der Bakterienzellen mit Chemikalien wie z. B.
- [0041] N-Methyl-N-Nitro-N-Nitrosoguanidin oder UV-Bestrahlung. Derartige Verfahren zur Mutationsauslösung sind all-gemein bekannt und können unter anderem bei Miller (A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992)) oder im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) nachgelesen werden.
- [0042] Die vorliegende Erfindung betrifft darüber hinaus ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von L-Serin, wobei wenigstens eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, isoliert aus einem coryneformen Bakterium, in einen Wirtsorganismus übertragen und dort exprimiert werden, wobei die Genexpression und/oder die Aktivität des entsprechend kodierten Polypeptids gegenüber dem entsprechend nicht genetisch veränderten Mikroorganismus erhöht ist, dieser genetisch veränderte Mikroorganismus zur mikrobiellen Herstellung von L-Serin eingesetzt wird und das entsprechend gebildete L-Serin aus dem Kulturmedium isoliert wird.
- [0043] 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 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 L-Serin Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der mRNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Weiterhin kann auch die Aktivität des Enzyms selbst erhöht sein oder durch die Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins verstärkt werden. Alternativ kann ferner eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.
- [0044] Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137–146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35–41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (BioRechnology 6, 428–430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93–98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift EPS 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84–87 (1991)), bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126–132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001–1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15–24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191–195 (1998)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60: 512–538 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.
- [0045] Die erfindungsgemäß hergestellten genetisch veränderten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch-Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von L-Serin kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.
- [0046] Das zu verwendende Kulturmedium muss in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlenhydrate wie z. B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z. B. Soja-Öl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Stickstoffquelle können organische stickstoffhaltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muss weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z. B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind.
- [0047] Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzu gegeben oder

in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

[0048] Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z. B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe z. B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten werden Sauerstoff oder sauerstoffhaltige Gasmischungen wie z. B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird so lange fortgesetzt, bis sich ein Maximum an L-Serin gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

[0049] Die Analyse der L-Serin-Bildung kann durch Anionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin Derivatisierung erfolgen so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben, oder sie kann durch reversed Phase HPLC erfolgen so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167–1174) beschrieben.

[0050] Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Serin aus Glucose, Saccharose, Lactose, Mannose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um die zuvor bereits näher beschriebenen Vertreter coryneformer Bakterien handeln. Eine Auswahl an Ergebnissen der Fermentation ist in Tabelle 6 dargestellt. Hierbei zeichnen sich die erfindungsgemäß genetisch veränderten Mikroorganismen durch eine wesentlich verbesserte L-Serin-Produktion gegenüber den entsprechend nicht transformierten Mikroorganismen (Wild Typen) oder den Mikroorganismen aus, die lediglich den Vektor ohne Gen-Insert enthalten. In einer besonderen Ausführungsvariante der vorliegenden Erfindung ist gezeigt, dass die Überexpression des homologen C-terminal verkürzten serA-Gens in *C. glutamicum* ATCC 13032DpanBCpZ1serAΔI97 zu einer wenigstens 40%igen Steigerung der L-Serin Akkumulation im Medium im Vergleich zu den Kontrollstämmen führt (Tab. 6). Durch die gemeinsame Überexpression weiterer Gene, die positiv auf den L-Serinbiosyntheseweg wirken, ist eine noch weitere Steigerung der L-Serin-Produktion zu erwarten.

[0051] Unter Aminosäure-Produktionsstämmen sind im Sinne der vorliegenden Erfindung *Corynebacterium glutamicum*-Stämme oder homologe Mikroorganismen zu verstehen, die durch klassische und/oder molekulargenetische Methoden derart verändert sind, dass ihr Stoffwechselfluss verstärkt in die Richtung der Biosynthese von Aminosäuren oder deren Abkömmlingen verläuft (metabolic engineering). Beispielsweise sind bei diesen Aminosäure-Produktionsstämmen ein oder mehrere Gene und/oder die korrespondierenden Enzyme, die an entscheidenden und entsprechend komplex regulierten Schlüsselpositionen des Stoffwechselweges (Flaschenhals) stehen in ihrer Regulation verändert oder sogar dereguliert. Die vorliegende Erfindung umfasst hierbei sämtliche bereits bekannte Aminosäure-Produktionsstämmen, bevorzugt der Gattung *Corynebacterium* oder homologer Organismen. Ferner sind erfindungsgemäß auch diejenigen Produktionsstämmen umfasst, die der Fachmann in Analogie zu Erkenntnissen aus anderen Mikroorganismen, beispielsweise Enterobakterien, Bacillaceen oder Hefe-Arten nach gängigen Methoden herstellen kann.

[0052] Die Figuren zeigen beispielhaft verwendete Plasmide sowie einen Vergleich der Primärstruktur der PGD und mittels PCR konstruierter Allele von serA.

[0053] Es zeigt:

[0054] **Fig. 1:** Vergleich der Primärstruktur der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase (PGD) aus verschiedenen Organismen; Skalierung entspricht der Anzahl an Aminosäuren der corynebakteriellen PGD; N = Aminotermi- nus; C = Carboxyterminus; der mit einer hell grauen Fläche markierte Bereich A stellt die Nukleotid-Bindungs- stelle dar; der mit einer dunkel grauen Fläche markierte Bereich B stellt die Substrat-Bindungsstelle dar; der schwarz markierte Bereich C stellt die Inhibitor-Bindungsstelle dar.

[0055] Darüber hinaus gibt es zwei weitere Gruppen von 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenasen, die exemplarisch durch *E. coli* (Tobey K.L. und Grant G.A., 1986, J. Biol. Chem., 261: 12179–12183) bzw. *Thermotoga maritima* (GenBank-Accession-Nummer AE000512) vertreten sind. Hierbei ist das Protein des hyperthermophilen Bakteriums *T. maritima* mit einer Länge von 327 Aminosäuren am kürzesten, während die 3-Phosphoglyce- rat-Dehydrogenase aus *E. coli* mit 410 Aminosäuren eine intermediäre Länge aufweist.

[0056] **Fig. 2:** Übersicht über die mittels PCR konstruierten Allele von serA, die für die deregulierte, C-terminal verkürzte PGD codieren. Gezeigt ist der serA-Genbereich des Wild Typs (oben) und die erfindungsgemäßen Deletionskonstrukte. Die hell, dunkel und schwarz markierten Bereiche entsprechen der Definition wie in **Fig. 1.**

[0057] **Fig. 3:** Plasmidvektor pZ1serA

[0058] **Fig. 4:** Plasmidvektor pZ1serAΔ79

[0059] **Fig. 5:** Plasmidvektor pZ1serAΔ188

[0060] **Fig. 6:** Plasmidvektor pZ1serAΔ197

[0061] **Fig. 7:** Plasmidvektor pZ1serAΔ205

[0062] **Fig. 8:** Plasmidvektor pZ1serAΔ211

Ausführungsbeispiele:

1. Gezielte Deregulation der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase aus *C. glutamicum*a) Computergestützter Aminosäuresequenz-Vergleich der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase aus *Corynebacterium glutamicum* mit 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenasen anderer Organismen

[0063] Es wurde zunächst eine Strategie zur Konstruktion einer deregulierten 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase entwickelt. Es wurde die Sequenz des *serA*-Gens, das für die 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase von *C. glutamicum* kodiert, aus der Patent-Datenbank verwendet (Nakagawa, S., Mizoguchi, H., Ando, S., Hayashi, M., Ochiai, K., Yokoi, H., Tateishi, N., Senoh, A., Ikeda, M. and Ozaki, A. Patent: EP 1108790-A 7064 20-JUN-2001; KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD. (JP); Pompejus, M., Kroeger, B., Schroeder, H., Zelder, O. and Haberhauer, G. Patent: WO 0100843-A 167 04-JAN-2001; BASF AKTIENGESSELLSCHAFT (DE)). Die vom *serA*-Gen (SEQ-ID-No. 12) von *Corynebacterium glutamicum* abgeleitete Polypeptidkette wurde dann mit entsprechenden 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenasen aus der Datenbank (GenBank) verglichen. Es zeigte sich, dass die 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* wie die aus *Mycobacterium tuberculosis* (GenBank-Accession-Nummer AL123456) und einigen anderen Bakterien wie *Bacillus subtilis* (Sorokin, A., Azevedo, V., Zumstein, E., Galleron, N., Ehrlich, S.D. und Serror, P. *Microbiology* 142 (Pt 8), 2005–2016 (1996)) und *Aquifex aeolicus* (GenBank-Accession-Nummer AE000657) mit 530 Aminosäuren ausserordentlich lang ist. Zu dieser Gruppe von Enzymen zählen auch die 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenasen aus Tieren wie Ratte (Achouri Y., Rider M.H., Van Schaftingen E. und Robbi M., 1997, *Biochem. J.*, 323: 365–370) und Mensch (Cho HM, Jun DY, Bae MA, Ahn JD, Kim YH., 2000, *Gene* 245(1): 193–201) sowie Pflanzen (z. B. *Arabidopsis thaliana*; Ho CL, Saito K., 2001, *Amino Acids*. 20(3): 243–59). Die Analyse der Röntgenstruktur des E.

[0064] coli-Enzyms ergab, dass es aus drei funktionellen Domänen besteht: einer Nukleotidbindedomäne (Aminosäure 108 bis 294) für die Bindung von NAD/H, einer zweigeteilten Substratbindedomäne (Aminosäure 7–107 und 295–336), an der das 3-Phosphoglycerat bindet, sowie einer C-terminalen regulatorischen Domäne (Aminosäure 337–410), die für die allosterische Bindung des L-Serin verantwortlich ist (Schulter DJ, Grant GA, Banaszak L.J., 1995, *Nature Struct. Biol.* Vol 2 1: 69–76). Der Aminosäuresequenzvergleich der drei 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase-Typen ergab, dass sie sich im Wesentlichen in der Länge der C-terminalen regulatorischen Domäne unterscheiden (**Abb. 1**).

[0065] Eine Clusteranalyse der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenasen, die aus vollständig sequenzierten Genomen bekannt sind, ergab, dass trotz der Unterschiede im C-Terminus alle diese Proteine zu einer Familie von Orthologen zählen, d. h. sie besitzen einen gemeinsamen evolutiven Ursprung, haben sich aber in den verschiedenen Spezies unterschiedlich entwickelt.

b) Konstruktion von Allelen des *serA*-Gens von *C. glutamicum* mittels PCR die für C-terminal verkürzte 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase Proteine codieren

[0066] Es wurden fünf verschiedene Muteine der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase von *C. glutamicum* erzeugt, die am C-Terminus unterschiedlich lange Deletionen aufwiesen (**Abb. 2**). Die Konstruktion der Deletionsmutanten erfolgte ebenso wie die Isolierung des Wild Typ *serA*-Gens mittels PCR. Hierzu wurde ein PCR-Primer (*serA*-f: 5'-TCTAGAGCCGAGACGTGAATAAAAT-3') erzeugt, der homolog zu einer Region 240 bp vor dem Start-Codon des Gens war, um so den gesamten Promotorbereich zu erfassen. Dieser Primer wurde für alle Konstrukte gleichermaßen verwendet und trägt am 3'-Ende eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym XbaI. Zur Amplifikation des voll-ständigen *serA*-Gens wurde ein zweiter, revers-komplementärer Primer ausgewählt, der 199 bp hinter dem Stop-Codon lag und eine BamHI-Restriktionsschnittstelle trägt (*serA*-r: 5'-GGATCCGACTGGTGAGGGTCAAGTCC-3'). Das erwartete PCR-Produkt hat eine Länge von 2040 bp. Zur Erzeugung der Deletionen wurden revers-komplementäre Primer ausgewählt, die im Genbereich liegen, und alle ebenfalls eine Schnittstelle für BamHI tragen. Der Primer *serA*Δ211-r (5'-GGATCCTTAACCGGAAACGTTTCACAGC3') liegt 956 bp hinter dem Start-Codon, so dass ein 1196 bp langes PCR-Produkt entsteht. Hierdurch werden die letzten 211 Aminosäuren der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase abgeschnitten. Die Deletion liegt etwa im Bereich des vermutlichen Übergangs von Substratbindedomäne regulatorischer Domäne (vergl. **Abb. 1** und **Abb. 2**). Der Primer *serA*Δ205-r (5'-GGATCCTTACTCTTCGCCACGCGACC3') liegt 974 bp hinter dem Start-Codon und das zu erwartende PCR-Produkt hat eine Länge von 1214 bp. Die C-terminale Deletion beträgt in diesem Fall 205 Aminosäuren und das Protein endet hinter der Aminosäure Glutamat an Position 325. Der ungerichtet erzeugte Austausch dieser Aminosäure zu Lysin führt in *C. glutamicum* zu einer Deregulation der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase (EP 0 931 833). Beide Deletionen liegen in einem Bereich, in dem auch die Deletion (Δ209 Aminosäuren) des Proteins aus Ratte erzeugt wurde (Achouri Y., Rider M.H., Van Schaftingen E. und Robbi M., 1997, *Biochem. J.*, 323: 365–370). Die beiden Primer *serA*Δ197-r (5'-GGATCCTTAAGCCAGATCCATCCACACAG3')

und serA Δ 188-r (5'-GGATCCTTACTTGCCAGCAAGAAGACC3') liegen 998 bp bzw. 1025 bp hinter dem ATG und befinden sich stromaufwärts vom Übergang Substratbindedomäne zu regulatorischer Domäne in *E. coli*. Die nach PCR zu erwartenden DNA-Fragmente erzeugen Polypeptidketten die entsprechend um 197 bzw. 188 Aminosäuren kürzer sind als die vollständige 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase. Die kürzeste Deletion wird durch Primer serA Δ 79-r (5'-GGATCCTTAATCCAGGCCACGGCCATT3') erzeugt und schneidet den Bereich von 79 Aminosäuren ab, der die größte Ähnlichkeit zur regulatorischen Domäne von *E. coli* aufweist (**Abb. 2**). Zusätzlich wurde in allen reverskomplementären Primern, die zu einem verkürzten Protein führen sollen hinter der Schnittstelle das Stop-Codon TAA eingefügt.

[0067] Die PCR-Reaktion wurde in 30 Zyklen in Gegenwart von 200 μ M Deoxynukleotid-triphosphaten (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), je 1 μ M des entsprechenden Oligonukleotids, 100 ng chromosomaler DNA von *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, 1/10 Volumen 10-fach Reaktionspuffer und 2,6 Einheiten einer hitzestabilen Taq-/Pwo-DNA-Polymerase-Mischung (Expand High Fidelity PCR System der Firma Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) in einem Thermocycler (PTC-100, MJ Research, Inc., Watertown, USA) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 94°C für 60 Sekunden, 50°C für 90 Sekunden und 72°C für 2 Minuten.

[0068] Nach der PCR-Reaktion wurden die erhaltenen DNA-Fragmente mit dem QIAEXII Gelextraktionskit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aus einem 0,8 %igen Agarose-Gel isoliert, blunt-end mit Hilfe des Sure Clone-Kits (Amersham Pharmacia Biotech) in die SmaI-Schnittstelle des Vektors pUC18 kloniert. Die Plasmide wurden durch Restriktionskartierung auf Richtigkeit überprüft. Diese Klonierung erfolgte in dem *Escherichia coli* Stamm DH5amcr (Grant et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA (1990) 87: 4645–4649).

[0069] Anschließend wurde das serA-Gen und die serA-Deletionskonstrukte in den *E. coli*/C. glutamicum Pendelvektor pZ1 (Menkel E, Thierbach G, Eggeling L, Sahm H., 1989, Appl Environ Microbiol 55(3): 684–688) kloniert. Der Vektor vermittelt eine Kanamycin-Resistenz. Hierzu wurden die Inserts der Deletionskonstrukte jeweils mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI aus dem pUC18-Vektor ausgeschnitten. Die überhängenden DNA-Enden wurden mittels Klenow-Behandlung aufgefüllt und die Fragmente wurden blunt-end in den Scal-geschnittenen Vektor pZ1 ligiert. Das Wild Typ serA-Gen wurde nach EcoRI-Restriktion ebenfalls Klenow behandelt und blunt-end in den Scal-geschnittenen Vektor pZ1 ligiert. Die so erhaltenen Konstrukte wurden pZ1serA (**Abb. 3**), pZ1serA Δ 79 (**Abb. 4**), pZ1serA Δ 188 (**Abb. 5**), pZ1serA Δ 197 (**Abb. 6**), pZ1serA Δ 205 (**Abb. 7**) und pZ1serA Δ 211 (**Abb. 8**) genannt.

2. Überexpression des Wild Typ serA-Gens sowie der verkürzten serA-Allele in *C. glutamicum*

[0070] Die Plasmide pZ1serA, pZ1serA Δ 79, pZ1serA Δ 188 pZ1serA Δ 197 pZ1serA Δ 205 und pZ1serA Δ 211 wurden durch Elektroporation einzeln in *C. glutamicum* eingebracht. Als Kontrolle wurde das Leerplasmid pZ1 ebenfalls nach *C. glutamicum* ATCC 13032 elektroporiert. Die so erhaltenen Stämme 13032pZ1, 13032pZ1serA, 13032pZ1serA Δ 79, 13032pZ1serA Δ 188, 13032pZ1serA Δ 197, 13032pZ1serA Δ 205 und 13032pZ1serA Δ 211 wurden dann auf Überexpression der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase mittels 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase-Enzymtest analysiert. Hierzu wurden die sechs Stämme in Komplexmedium (CgIII = 2,5 g NaCl, 10 g Bacto-Peptone, 10 g Bacto-Yeast Extract, pH 7,4 mit 2 % Glukose) gezüchtet, und das Minimalmedium CGXII jeweils aus den Vorkulturen getrennt beimpft. Das Medium war identisch mit dem bei Keilhauer et al. beschriebenen Medium CGXII (Journal of Bacteriology (1993) 175: 5593–5603), enthielt aber zusätzlich 25 μ g/mL Kanamycin. Die Zusammensetzung des von Keilhauer et al. beschriebenen Mediums ist in Tabelle 1 dargestellt.

[0071]

Tabelle 1: Zusammensetzung des Mediums CGXII

Komponente	Konzentration
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	20 g/L
Harnstoff	5 g/L
KH_2PO_4	1 g/L
K_2HPO_4	1 g/L
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,25 g/L
3-Morpholinopropansulfonsäure	42 g/L
CaCl_2	10 mg/L
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	10 mg/L
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	10 mg/L
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1 mg/L
CuSO_4	0,2 mg/L
$\text{NiCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,02 mg/L
Biotin	0,2 mg/L
Glukose	40 g/L
Protokatechusäure	30 mg/L

Die Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase bei OD_{600} von 5 bis 8 geerntet und zweimal in 100 mM Tris-HCl, pH 7,5 gewaschen. Die Zellpellets wurden anschliessend bis zum Aufschluss bei -20°C eingefroren. Die eingefrorenen Zellpellets wurden dann auf Eis aufgetaut und mit 2 ml kaltem 100 mM Tris-HCl pH 7,5/10 Glycerin resuspendiert und in einem Brenson Sonifier 10 min aufgeschlossen. Anschließend wurden die Zelltrümmer mittels Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C in einer Sigma -202 MK Zentrifuge abgetrennt. Die so erhaltenen Überstände wurden als Rohextrakte zunächst über eine PD-10 Säule nach Angaben des Herstellers (Amersham Pharmacia Biotech) entsalzt und dann sofort in die Enzymmessung eingesetzt. Der Enzymtest beruht auf dem photometrischen Nachweis der Bildung von NADH in der Reaktion 3-Phosphoglycerat und NAD zu Phosphohydroxypyruvat zu NADH. Der Testansatz ist in Tabelle 2 dargestellt:

[0072]

Tabelle 2: Komponenten des Testansatzes zur Bestimmung der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase Aktivität

	Stammlösung	Endkonzentration
Tris-HCl; pH 8.8	500 mM	100 mM
Dithiothreitol	100 mM	1 mM
EDTA	500 mM	5 mM
Hydrazin	250 mM	10 mM
NAD	20 mg/ml	2 mg/ml
RE	ca. 2 mg/ml	ca. 200 μg Protein
3-Phosphoglycerat	150 mM	15 mM

Mit diesem Testansatz konnte für die 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase des Wild Typs eine spezifische Aktivität von ca. 150 mU/mg Protein bestimmt werden. Es zeigte sich, dass die Überexpression des vollständigen

serA-Gens eine etwa 16-fache Steigerung der spezifischen 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase-Aktivität ergibt. Das Konstrukt serA Δ 197 ermöglichte eine 10-fache Überexpression gegenüber dem Wild Typ-Protein. Die Konstrukte serA Δ 188 und serA Δ 205 lassen sich 3 bis 3,4-fach überexprimieren, wohingegen für die Konstrukte serA Δ 205 und serA Δ 79 nur eine 1,2 bis 1,5-fache Überexpression möglich war. Damit ist gezeigt, dass das durch Deletion der C-terminalen 197 Aminosäuren der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase von *C. glutamicum* erzeugte Mutein SerA Δ 197 funktionell ist, und mehr als 60 % der Wild Typ Aktivität aufweist. [0073] In Tabelle 3 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

Tabelle 3: Überexpression des serA-Gens sowie der C-terminal verkürzten serA-Allele.

Stämme	spez. PGD-Aktivität [U/mg Protein]	Faktor der Überexpression
13032pZ1	130	1.0
13032pZ1serA	2140	16.5
13032pZ1serA Δ 79	190	1.5
13032pZ1serA Δ 188	440	3.4
13032pZ1serA Δ 197	1320	10.0
13032pZ1serA Δ 205	390	3.0
13032pZ1serA Δ 211	150	1.2

* Die 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase-Aktivität im Stamm 13032pZ1 wurde auf 1,0 normiert

3. Untersuchungen zur Inhibition der Wild Typ 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* und des C-terminal verkürzten Muteins SerA Δ 197 durch L-Serin

[0074] Im Folgenden wurde getestet, ob das um den C-Terminus verkürzte Mutein SerA Δ 197 nicht mehr durch L-Serin gehemmt werden kann. Dazu wurde zunächst die Hemmbarkeit der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase des Wild Typs in zellfreien Extrakten von *C. glutamicum* durch L-Serin anhand des oben beschriebenen Enzymtests untersucht. Hierzu wurden dem Testansatz zusätzlich 1, 5 und 10 mM L-Serin zugesetzt und 5 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von 15 mM 3-Phosphoglycerat gestartet. Die Inkubation war notwendig um eine Hemmung nachweisen zu können (Tab. 4). Diese Zeitabhängigkeit der L-Serin-Hemmung, die mehrere Minuten Inkubation benötigt, bevor ein konstanter Level der Inhibition erreicht wird, wurde auch schon für andere 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenasen, z. B. für das aufgereinigte Enzym von *B. subtilis* beschrieben (Saski R. und Pitzer L., 1975, Eur. J. Biochem., 51: 415–427).

[0075]

Tabelle 4: Inhibition der Wild Typ 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase von *C. glutamicum* durch L-Serin

L-Serin [mM]	relative 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase Aktivität [%]	
	ohne Inkubation	5-minütige Inkuba- tion bei 30°C
0	100*	100*
1	106	96
5	112	82
10	104	56

* Die Aktivität der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase ohne Zusatz von L-Serin wurde auf 100% gesetzt.

Auf diesem Ergebnis aufbauend wurde die L-Serin-Inhibition der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase in den Stämmen 13032pZ1serA und 13032pZ1serAΔ197 untersucht. Es zeigte sich, dass tatsächlich das C-terminal verkürzte 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase-Mutein nicht mehr signifikant durch L-Serin gehemmt werden kann (Tab. 5).

[0076]

Tabelle 5: Inhibition der überexprimierten 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase durch L-Serin in den Stämmen 13032pZ1serA und 13032pZ1serAΔ197

L-Serin [mM]	relative 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase Aktivität [%] **	
	13032pZ1serA	13032pZ1serAΔ197
0	100*	100*
10	34	95

* Die Aktivität der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase ohne Zusatz von L-Serin wurde auf 100% gesetzt

** Bestimmung der Aktivität nach 5-minütiger Inkubation bei 30°C mit und ohne L-Serin

Damit ist es gelungen, durch Deletion des C-Terminus der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase von *C. glutamicum* gezielt ein dereguliertes 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase-Mutein zu generieren.

[0077] 4. Gesteigerte Akkumulation von L-Serin durch Überexpression des Gens für die deregulierte 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase (serAΔ197) Zur Analyse der L-Serinausscheidung des Stammes mit deregulierter 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase wurden die Plasmide pZ1, pZ1serA und pZ1serAΔ197 in den Stamm *Corynebacterium glutamicum* 13032ΔpanBC transformiert (E. Radmacher, A. Vaitsikova, U. Burger, K. Krumbach, H. Sahm, L. Eggeling, 2002, Appl. Environ. Microbiol. (Publikation in Vorbereitung)). Dieser Stamm ist durch die Deletion der Pantothenat-Biosynthese Gene panB und panC Pantothenat-auxotroph, und zeichnet sich dadurch aus, dass er unter Pantothenat-Limitation aufgrund einer verstärkten Akkumulation von Pyruvat ca. 50 mM Alanin und 8 mM Valin ausscheidet. Darüberhinaus bildet der Stamm ca. 100 μM L-Serin und eignet sich somit als Ausgangsstamm für die Konstruktion eines L-Serinproduzenten. Der Stamm mit dem Plasmid pZ1serA transformierte Stamm 13032ΔpanBCpZ1serA wurde gemäß Budapester Vertrag am 11.04.2002 bei der DSMZ unter der DSM Nr. 14922 hinterlegt.

[0078] Zur Untersuchung der L-Serinausscheidung wurden die drei Stämme in Komplexmedium (CgIII mit 2% Glukose und mit 50 μg/l Kanamycin) gezüchtet, und das Fermentationsmedium CGXII (J Bacteriol (1993) 175: 5595–5603) jeweils aus den Vorkulturen beimpft. Das Medium enthielt zusätzlich 50 μg/l Kanamycin und 1 μM

Pantothenat. Es wurden zwei unabhängige Fermentationen durchgeführt. Nach Kultivierung für 24 bzw. 35 Stunden bei 30°C auf dem Rotationsschüttler bei 120 Upm wurde die in das Medium akkumulierte L-Serinmenge bestimmt. Die Bestimmung der Aminosäurekonzentration erfolgte mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (J Chromat (1983) 266: 471–482). Das Ergebnis der Fermentation ist in Tabelle 6 dargestellt, und es zeigt sich, daß schon die Überexpression des Wiltyp *serA*-Gens eine ca. 10%ige Steigerung der L-Serin-Akkumulation im Medium hervorruft. Die Überexpression der deregulierten 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase erzielt dagegen sogar eine Steigerung von bis zu 40% im Vergleich zum Kontrollstamm der nur das Leerplasmid trägt. Somit stellt die Nutzung des konstruierten und beschriebenen Gens für das deregulierte L-Serin-Biosynthese Enzym 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase ein Verfahren dar, um die L-Serinbildung entscheidend zu verbessern.

[0079] Tabelle 6: Akkumulation von L-Serin im Kulturüberstand von *Corynebacterium glutamicum* 13032 Δ panBC nach Expression der Gene *serA* bzw. *serA* Δ 197

Stamm	t [h]	TG [mg/ml]	L- Serin [μ M]	L- Serin/TG [mg/g]
13032DpanBCpZ1	24	18,3	164	0,9
13032DpanBCpZ1 <i>serA</i>	24	14,7	163	1,2
13032DpanBCpZ1 <i>serA</i> Δ 197	24	16,5	199	1,3

* TG = Zelltrockengewicht

SEQUENZPROTOKOLL

[0080]

<110> Forschungszentrum Jülich GmbH

<120> Nukleotidsequenzen coryneformer Bakterien kodierend für
an der Biosynthese von L-Serin beteiligte Proteine
sowie Verfahren zur Herstellung von L-Serin

<130> 1.2002

<140>

<141>

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1253

<212> DNA

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 1

```
tctagagccg gagacgtgaa taaaattcgc agctcattcc atcagcgtaa acgcagcttt 60
ttgcatgggtg agacaccttt gggggtaaat ctcacagcat gaatctctgg gttagatgac 120
tttctgggtg ggggaggggtt tagaatgttt ctagtcgcac gccaaaaccg ggcgtggaca 180
cgtctgcagc cgacgcggtc gtgcctggtg tagacggaca ttcctagttt ttccaggagt 240
aacttgtagag ccagaatggc cgtccggtag tcctcatcgc cgataagctt gcgcagtcca 300
ctgttgacgc gcttgagat gcagtagaag tccggtgggt tgacggacct aaccgcccag 360
aactgcttga tgcagttaag gaagcggacg cactgctcgt gcgttctgct accactgtcg 420
atgctgaagt catcgccgct gcccctaact tgaagatcgt cggtcgtgcc ggcgtgggct 480
tggacaacgt tgacatccct gctgccactg aagctggcgt catggttgct aacgcaccga 540
cctctaatat tcactccgct tgtgagcagc caatttcttt gctgctgtct actgctcgcc 600
agatccctgc tgctgatgcg acgctgcgtg agggcgagtg gaagcggctc tctttcaacg 660
gtgtggaaat tttcgaaaaa actgtcggta tcgtcggttt tggccacatt ggtcagttgt 720
ttgctcagcg tcttgctgcg tttgagacca ccattggtgc ttacgatcct tacgctaacc 780
ctgctcgtgc ggctcagctg aacgttgagt tggttgagtt ggatgagctg atgagccggt 840
ctgactttgt caccattcac cttcctaaga ccaaggaaac tgcctggcatg tttgatgcgc 900
agctccttgc taagtccaag aagggccaga tcatcatcaa cgctgctcgt ggtggccttg 960
ttgatgagca ggctttggct gatgcgattg agtccggcca cattcgtggc gctgggtttcg 1020
atgtgtactc caccgagcct tgcactgatt ctctttgtt caagttgcct caggttggtg 1080
tgactcctca cttgggtgct tctactgaag aggctcagga tcgtgctgggt actgacggtg 1140
ctgattctgt gctcaaggcg ctggctggcg agttcgtggc ggatgctgtg aacgtttccg 1200
gtggctcgcgt gggcgaagag gttgctgtgt ggatggatct ggcttaagga tcc 1253
```

<210> 2

<211> 1607

DE 102 31 297 A1 2004.02.05

<212> DNA

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 2

```

tctagagccg gagacgtgaa taaaattcgc agctcattcc atcagcgtaa acgcagcttt 60
ttgcatgggtg agacaccttt gggggtaaat ctcacagcat gaatctctgg gttagatgac 120
tttctgggtg ggggagggtt tagaatgttt ctagtcgcac gccaaaaccc ggcgtggaca 180
cgtctgcagc cgacgcggtc gtgcctgttg tagacggaca ttcttagttt ttccaggagt 240
aacttgtgag ccagaatggc cgtccggtag tcctcatcgc cgataagctt gcgcagtcca 300
ctggtgacgc gcttggagat gcagtagaag tccggtgggt tgacggacct aaccgcccag 360
aactgcttga tgcagttaag gaagcggacg cactgctcgt gcgttctgct accactgtcg 420
atgctgaagt catcgccgct gcccctaact tgaagatcgt cggtcgtgcc ggcgtgggct 480
tggacaacgt tgacatccct gctgccactg aagctggcgt catggttgct aacgcaccga 540
cctctaatat tcaactccgt tgtgagcacg caatttcttt gctgctgtct actgctcgcc 600
agatccctgc tgctgatgcg acgctgcgtg agggcgagtg gaagcggctt tctttcaacg 660
gtgtggaaat tttcggaaaa actgtcggta tcgtcggttt tggccacatt ggtcagttgt 720
ttgctcagcg tcttgctgcg tttgagacca ccattgttgc ttacgatcct tacgctaacc 780
ctgctcgtgc ggctcagctg aacgttgagt tggttgagtt ggatgagctg atgagccggt 840
ctgactttgt caccattcac cttcctaaga ccaaggaaac tgctggcatg tttgatgcbc 900
agtccttgc taagtccaag aagggccaga tcatcatcaa cgctgctcgt ggtggccttg 960
ttgatgagca ggctttggct gatgcgattg agtccggtca cattcgtggc gctggtttcg 1020
atgtgtactc caccgagcct tgcactgatt ctctttgtt caagttgcct caggttgttg 1080
tgactcctca cttgggtgct tctactgaag aggctcagga tcgtgcggtt actgacgttg 1140
ctgattctgt gctcaaggcg ctggctggcg agttcgtggc ggatgctgtg aacgtttccg 1200
gtggtcgctg gggcgaagag gttgctgtgt ggatggatct ggctcgcaag cttggtcttc 1260
ttgctggcaa gcttgtcgac gccgcccag tctccattga ggttgaggct cgaggcgagc 1320
tttcttccga gcaggtcgat gcacttgggt tgtccgctgt tcgtggtttg ttctccggaa 1380
ttatcgaaga gtccgttact ttcgtcaacg ctctcgcatt tgctgaagag cgtggcctgg 1440
acatctccgt gaagaccaac tctgagtctg ttactcaccg ttccgtcctg cagggtcaagg 1500
tcattactgg cagcggcgcg agcgcaactg ttgttgggtc cctgactggt cttgagcgcg 1560
ttgagaagat caccgcacat aatggccgtg gcctggatta aggatcc 1607

```

<210> 3

<211> 1280

<212> DNA

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 3

```

tctagagccg gagacgtgaa taaaattcgc agctcattcc atcagcgtaa acgcagcttt 60
ttgcatgggtg agacaccttt gggggtaaat ctcacagcat gaatctctgg gttagatgac 120
tttctgggtg ggggagggtt tagaatgttt ctagtcgcac gccaaaaccc ggcgtggaca 180
cgtctgcagc cgacgcggtc gtgcctgttg tagacggaca ttcttagttt ttccaggagt 240
aacttgtgag ccagaatggc cgtccggtag tcctcatcgc cgataagctt gcgcagtcca 300
ctggtgacgc gcttggagat gcagtagaag tccggtgggt tgacggacct aaccgcccag 360
aactgcttga tgcagttaag gaagcggacg cactgctcgt gcgttctgct accactgtcg 420
atgctgaagt catcgccgct gcccctaact tgaagatcgt cggtcgtgcc ggcgtgggct 480
tggacaacgt tgacatccct gctgccactg aagctggcgt catggttgct aacgcaccga 540

```

DE 102 31 297 A1 2004.02.05

cctctaatat tcaactccgct tgtgagcacg caatttcttt gctgctgtct actgctcgcc 600
 agatccctgc tgctgatgcg acgctgcgtg agggcgagtg gaagcggctct tctttcaacg 660
 gtgtggaaaat tttcggaaaa actgtcggta tcgtcggttt tggccacatt ggtcagttgt 720
 ttgctcagcg tcttgctgcg tttgagacca ccattgttgc ttacgatcct tacgctaacc 780
 ctgctcgtgc ggctcagctg aacgttgagt tggttgagtt ggatgagctg atgagccggt 840
 ctgactttgt caccattcac cttcctaaga ccaaggaaac tgctggcatg tttgatgcgc 900
 agctccttgc taagtccaag aagggccaga tcatcatcaa cgctgctcgt ggtggccttg 960
 ttgatgagca ggctttggct gatgcgattg agtccggta cttcgtggc gctggtttcg 1020
 atgtgtactc caccgagcct tgcactgatt ctctttgtt caagttgcct caggttgttg 1080
 tgactcctca cttgggtgct tctactgaag aggctcagga tcgtgcgggt actgacgttg 1140
 ctgattctgt gctcaaggcg ctggctggcg agttcgtggc ggatgctgtg aacgtttccg 1200
 gtggtcgcgt gggcgaagag gttgctgtgt ggatggatct ggctcgcaag cttggtcttc 1260
 ttgctggcaa gtaaggatcc 1280

<210> 4

<211> 1229

<212> DNA

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 4

tctagagccg gagacgtgaa taaaattcgc agctcattcc atcagcgtaa acgcagcttt 60
 ttgcatggtg agacaccttt gggggtaa atctcacagcat gaatctctgg gttagatgac 120
 tttctgggtg ggggaggggt tagaatgtt ctatgctgcac gccaaaacc ggcgtggaca 180
 cgtctgcagc cgacgcggtc gtgcctgttg tagacggaca ttcctagttt ttccaggagt 240
 aacttgtgag ccagaatggc cgtccggtag tctcatcgc cgataagctt gcgcagtcca 300
 ctggtgacgc gcttgagat gcagtagaag tccgttgggt tgacggacct aaccgcccag 360
 aactgcttga tgacagtaag gaagcggacg cactgctcgt gcgttctgct accactgtcg 420
 atgctgaagt catcgccgct gcccttaact tgaagatcgt cggtcgtgcc ggcgtgggct 480
 tggacaacgt tgacatccct gctgccactg aagctggcgt catggttgct aacgcaccga 540
 cctctaatat tcaactccgct tgtgagcacg caatttcttt gctgctgtct actgctcgcc 600
 agatccctgc tgctgatgcg acgctgcgtg agggcgagtg gaagcggctct tctttcaacg 660
 gtgtggaaaat tttcggaaaa actgtcggta tcgtcggttt tggccacatt ggtcagttgt 720
 ttgctcagcg tcttgctgcg tttgagacca ccattgttgc ttacgatcct tacgctaacc 780
 ctgctcgtgc ggctcagctg aacgttgagt tggttgagtt ggatgagctg atgagccggt 840
 ctgactttgt caccattcac cttcctaaga ccaaggaaac tgctggcatg tttgatgcgc 900
 agctccttgc taagtccaag aagggccaga tcatcatcaa cgctgctcgt ggtggccttg 960
 ttgatgagca ggctttggct gatgcgattg agtccggta cttcgtggc gctggtttcg 1020
 atgtgtactc caccgagcct tgcactgatt ctctttgtt caagttgcct caggttgttg 1080
 tgactcctca cttgggtgct tctactgaag aggctcagga tcgtgcgggt actgacgttg 1140
 ctgattctgt gctcaaggcg ctggctggcg agttcgtggc ggatgctgtg aacgtttccg 1200
 gtggtcgcgt gggcgaagag taaggatcc 1229

<210> 5

<211> 1211

<212> DNA

<213> *Corynebacterium glutamicum*

DE 102 31 297 A1 2004.02.05

<400> 5

```

tctagagccg gagacgtgaa taaaattcgc agctcattcc atcagcgtaa acgcagcttt 60
ttgcatgggtg agacaccttt gggggtaaat ctcacagcat gaatctctgg gttagatgac 120
tttctgggtg ggggaggggtt tagaatgttt ctatgctcac gccaaaaccc ggcgtggaca 180
cgtctgcagc cgacgcggtc gtgcctggtg tagacggaca ttcttagttt ttccaggagt 240
aacttgtgag ccagaatggc cgtccggtag tcctcatcgc cgataagctt gcgcagtcca 300
ctggtgacgc gcttgagat gcagtagaag tccgttgggt tgacggacct aaccgcccag 360
aactgcttga tgcagttaag gaagcggacg cactgctcgt gcgttctgct accactgtcg 420
atgctgaagt catcgccgct gcccctaact tgaagatcgt cggtcgtgcc ggcgtgggct 480
tggacaacgt tgacatccct gctgccactg aagctggcgt catggttgct aacgcaccga 540
cctctaatat tcaactccgt tgtgagcacg caatttcttt gctgctgtct actgctcgcc 600
agatccctgc tgctgatgcg acgctgcgtg agggcgagt gaagcggctc tctttcaacg 660
gtgtggaaat tttcgaaaaa actgtcggta tcgtcggttt tggccacatt ggtcagttgt 720
ttgctcagcg tcttgctgcg tttgagacca ccattggtgc ttacgatcct tacgctaacc 780
ctgctcgtgc ggctcagctg aacgttgagt tggttgagtt ggatgagctg atgagccgtt 840
ctgactttgt caccattcac cttcctaaga ccaaggaaac tgctggcatg tttgatgcgc 900
agtccttgc taagtccaag aagggccaga tcatcatcaa cgctgctcgt ggtggccttg 960
ttgatgagca ggctttggct gatgcgattg agtccggta cattcgtggc gctggtttcg 1020
atgtgtactc caccgagcct tgcactgatt ctctttggt caagttgcct caggttggtg 1080
tgactcctca cttgggtgct tctactgaag aggctcagga tcgtgctggg actgacgttg 1140
ctgattctgt gctcaaggcg ctggctggcg agttcgtggc ggatgctgtg aacgtttccg 1200
gttaaggatc c

```

<210> 6

<211> 2043

<212> DNA

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 6

```

tctagagccg gagacgtgaa taaaattcgc agctcattcc atcagcgtaa acgcagcttt 60
ttgcatgggtg agacaccttt gggggtaaat ctcacagcat gaatctctgg gttagatgac 120
tttctgggtg ggggaggggtt tagaatgttt ctatgctcac gccaaaaccc ggcgtggaca 180
cgtctgcagc cgacgcggtc gtgcctggtg tagacggaca ttcttagttt ttccaggagt 240
aacttgtgag ccagaatggc cgtccggtag tcctcatcgc cgataagctt gcgcagtcca 300
ctggtgacgc gcttgagat gcagtagaag tccgttgggt tgacggacct aaccgcccag 360
aactgcttga tgcagttaag gaagcggacg cactgctcgt gcgttctgct accactgtcg 420
atgctgaagt catcgccgct gcccctaact tgaagatcgt cggtcgtgcc ggcgtgggct 480
tggacaacgt tgacatccct gctgccactg aagctggcgt catggttgct aacgcaccga 540
cctctaatat tcaactccgt tgtgagcacg caatttcttt gctgctgtct actgctcgcc 600
agatccctgc tgctgatgcg acgctgcgtg agggcgagt gaagcggctc tctttcaacg 660
gtgtggaaat tttcgaaaaa actgtcggta tcgtcggttt tggccacatt ggtcagttgt 720
ttgctcagcg tcttgctgcg tttgagacca ccattggtgc ttacgatcct tacgctaacc 780
ctgctcgtgc ggctcagctg aacgttgagt tggttgagtt ggatgagctg atgagccgtt 840
ctgactttgt caccattcac cttcctaaga ccaaggaaac tgctggcatg tttgatgcgc 900
agtccttgc taagtccaag aagggccaga tcatcatcaa cgctgctcgt ggtggccttg 960
ttgatgagca ggctttggct gatgcgattg agtccggta cattcgtggc gctggtttcg 1020

```

DE 102 31 297 A1 2004.02.05

```

atgtgtactc caccgagcct tgcactgatt ctcccttggc caagttgcct caggttggtg 1080
tgactcctca ctggggtgct tctactgaag aggctcagga tcgtgcgggg actgacggtg 1140
ctgattctgt gctcaaggcg ctggctggcg agttcgtggc ggatgctgtg aacgtttccg 1200
gtggctcgcg gggcgaagag gttgctgtgt ggatggatct ggctcgcaag cttgggtcttc 1260
ttgctggcaa gcttgctgac gccgccccag tctccattga ggttgaggct cgagggcgagc 1320
tttcttccga gcaggctgat gcaacttggtt tgtccgctgt tcgtgggttg ttctccggaa 1380
ttatcgaaga gtccgttact ttcgtcaacg ctctcgcgat tgctgaagag cgtggcctgg 1440
acatctccgt gaagaccaac tctgagtctg ttactcaccg ttccgtcctg caggtcaagg 1500
tcattactgg cagcggcgcg agcgcgaactg ttgttgggtg cctgactggt cttgagcgcg 1560
ttgagaagat caccgcctc aatggccgtg gcctggatct gcgcgcagag ggtctgaacc 1620
tcttcttgca gtacactgac gctcctgggt cactgggtac cgttgggtacc aagctgggtg 1680
ctgctggcat caacatcgag gctgctgctg tgactcaggc tgagaagggt gacggcgctg 1740
tcctgatcct gcgtggttag tccgctgtct ctgaagagct ggaagctgaa atcaacgctg 1800
agttgggtgc tacttcttc caggttgatc ttgactaatt agagatccat ttgcttgaac 1860
cgccttccca tctttgaatt cattcaagggt ggtaaggcgg ttttcgctct tttataacag 1920
ttttaaagggt agatttggga gagaagattt cccttaagaa aggttcttaa caaccatgcc 1980
gcctgcgacg ctgttcaatg ttttgacttc agctggactt gaccctcacc agtctaagga 2040
tcc                                                                                   2043

```

<210> 7

<211> 333

<212> PRT

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 7

```

Met Ser Gln Asn Gly Arg Pro Val Val Leu Ile Ala Asp Lys Leu Ala
  1             5             10             15

Gln Ser Thr Val Asp Ala Leu Gly Asp Ala Val Glu Val Arg Trp Val
          20             25             30

Asp Gly Pro Asn Arg Pro Glu Leu Leu Asp Ala Val Lys Glu Ala Asp
          35             40             45

Ala Leu Leu Val Arg Ser Ala Thr Thr Val Asp Ala Glu Val Ile Ala
          50             55             60

Ala Ala Pro Asn Leu Lys Ile Val Gly Arg Ala Gly Val Gly Leu Asp
          65             70             75             80

Asn Val Asp Ile Pro Ala Ala Thr Glu Ala Gly Val Met Val Ala Asn
          85             90             95

Ala Pro Thr Ser Asn Ile His Ser Ala Cys Glu His Ala Ile Ser Leu
          100            105            110

Leu Leu Ser Thr Ala Arg Gln Ile Pro Ala Ala Asp Ala Thr Leu Arg

```

DE 102 31 297 A1 2004.02.05

115	120	125
Glu Gly Glu Trp Lys Arg Ser Ser Phe Asn Gly Val Glu Ile Phe Gly		
130	135	140
Lys Thr Val Gly Ile Val Gly Phe Gly His Ile Gly Gln Leu Phe Ala		
145	150	155
Gln Arg Leu Ala Ala Phe Glu Thr Thr Ile Val Ala Tyr Asp Pro Tyr		
	165	170
		175
Ala Asn Pro Ala Arg Ala Ala Gln Leu Asn Val Glu Leu Val Glu Leu		
	180	185
		190
Asp Glu Leu Met Ser Arg Ser Asp Phe Val Thr Ile His Leu Pro Lys		
	195	200
		205
Thr Lys Glu Thr Ala Gly Met Phe Asp Ala Gln Leu Leu Ala Lys Ser		
	210	215
		220
Lys Lys Gly Gln Ile Ile Ile Asn Ala Ala Arg Gly Gly Leu Val Asp		
	225	230
		235
		240
Glu Gln Ala Leu Ala Asp Ala Ile Glu Ser Gly His Ile Arg Gly Ala		
	245	250
		255
Gly Phe Asp Val Tyr Ser Thr Glu Pro Cys Thr Asp Ser Pro Leu Phe		
	260	265
		270
Lys Leu Pro Gln Val Val Val Thr Pro His Leu Gly Ala Ser Thr Glu		
	275	280
		285
Glu Ala Gln Asp Arg Ala Gly Thr Asp Val Ala Asp Ser Val Leu Lys		
	290	295
		300
Ala Leu Ala Gly Glu Phe Val Ala Asp Ala Val Asn Val Ser Gly Gly		
	305	310
		315
		320
Arg Val Gly Glu Glu Val Ala Val Trp Met Asp Leu Ala		
	325	330

<210> 8

<211> 451

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

DE 102 31 297 A1 2004.02.05

<400> 8

Met Ser Gln Asn Gly Arg Pro Val Val Leu Ile Ala Asp Lys Leu Ala
 1 5 10 15

Gln Ser Thr Val Asp Ala Leu Gly Asp Ala Val Glu Val Arg Trp Val
 20 25 30

Asp Gly Pro Asn Arg Pro Glu Leu Leu Asp Ala Val Lys Glu Ala Asp
 35 40 45

Ala Leu Leu Val Arg Ser Ala Thr Thr Val Asp Ala Glu Val Ile Ala
 50 55 60

Ala Ala Pro Asn Leu Lys Ile Val Gly Arg Ala Gly Val Gly Leu Asp
 65 70 75 80

Asn Val Asp Ile Pro Ala Ala Thr Glu Ala Gly Val Met Val Ala Asn
 85 90 95

Ala Pro Thr Ser Asn Ile His Ser Ala Cys Glu His Ala Ile Ser Leu
 100 105 110

Leu Leu Ser Thr Ala Arg Gln Ile Pro Ala Ala Asp Ala Thr Leu Arg
 115 120 125

Glu Gly Glu Trp Lys Arg Ser Ser Phe Asn Gly Val Glu Ile Phe Gly
 130 135 140

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

Gln Arg Leu Ala Ala Phe Glu Thr Thr Ile Val Ala Tyr Asp Pro Tyr
 165 170 175

Ala Asn Pro Ala Arg Ala Ala Gln Leu Asn Val Glu Leu Val Glu Leu
 180 185 190

Asp Glu Leu Met Ser Arg Ser Asp Phe Val Thr Ile His Leu Pro Lys
 195 200 205

Thr Lys Glu Thr Ala Gly Met Phe Asp Ala Gln Leu Leu Ala Lys Ser
 210 215 220

Lys Lys Gly Gln Ile Ile Ile Asn Ala Ala Arg Gly Gly Leu Val Asp
 225 230 235 240

Glu Gln Ala Leu Ala Asp Ala Ile Glu Ser Gly His Ile Arg Gly Ala
 245 250 255

DE 102 31 297 A1 2004.02.05

Gly Phe Asp Val Tyr Ser Thr Glu Pro Cys Thr Asp Ser Pro Leu Phe
 260 265 270

Lys Leu Pro Gln Val Val Val Thr Pro His Leu Gly Ala Ser Thr Glu
 275 280 285

Glu Ala Gln Asp Arg Ala Gly Thr Asp Val Ala Asp Ser Val Leu Lys
 290 295 300

Ala Leu Ala Gly Glu Phe Val Ala Asp Ala Val Asn Val Ser Gly Gly
 305 310 315 320

Arg Val Gly Glu Glu Val Ala Val Trp Met Asp Leu Ala Arg Lys Leu
 325 330 335

Gly Leu Leu Ala Gly Lys Leu Val Asp Ala Ala Pro Val Ser Ile Glu
 340 345 350

Val Glu Ala Arg Gly Glu Leu Ser Ser Glu Gln Val Asp Ala Leu Gly
 355 360 365

Leu Ser Ala Val Arg Gly Leu Phe Ser Gly Ile Ile Glu Glu Ser Val
 370 375 380

Thr Phe Val Asn Ala Pro Arg Ile Ala Glu Glu Arg Gly Leu Asp Ile
 385 390 395 400

Ser Val Lys Thr Asn Ser Glu Ser Val Thr His Arg Ser Val Leu Gln
 405 410 415

Val Lys Val Ile Thr Gly Ser Gly Ala Ser Ala Thr Val Val Gly Ala
 420 425 430

Leu Thr Gly Leu Glu Arg Val Glu Lys Ile Thr Arg Ile Asn Gly Arg
 435 440 445

Gly Leu Asp
 450

<210> 9

<211> 342

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 9

DE 102 31 297 A1 2004.02.05

Met Ser Gln Asn Gly Arg Pro Val Val Leu Ile Ala Asp Lys Leu Ala
 1 5 10 15
 Gln Ser Thr Val Asp Ala Leu Gly Asp Ala Val Glu Val Arg Trp Val
 20 25 30
 Asp Gly Pro Asn Arg Pro Glu Leu Leu Asp Ala Val Lys Glu Ala Asp
 35 40 45
 Ala Leu Leu Val Arg Ser Ala Thr Thr Val Asp Ala Glu Val Ile Ala
 50 55 60
 Ala Ala Pro Asn Leu Lys Ile Val Gly Arg Ala Gly Val Gly Leu Asp
 65 70 75 80
 Asn Val Asp Ile Pro Ala Ala Thr Glu Ala Gly Val Met Val Ala Asn
 85 90 95
 Ala Pro Thr Ser Asn Ile His Ser Ala Cys Glu His Ala Ile Ser Leu
 100 105 110
 Leu Leu Ser Thr Ala Arg Gln Ile Pro Ala Ala Asp Ala Thr Leu Arg
 115 120 125
 Glu Gly Glu Trp Lys Arg Ser Ser Phe Asn Gly Val Glu Ile Phe Gly
 130 135 140
 Lys Thr Val Gly Ile Val Gly Phe Gly His Ile Gly Gln Leu Phe Ala
 145 150 155 160
 Gln Arg Leu Ala Ala Phe Glu Thr Thr Ile Val Ala Tyr Asp Pro Tyr
 165 170 175
 Ala Asn Pro Ala Arg Ala Ala Gln Leu Asn Val Glu Leu Val Glu Leu
 180 185 190
 Asp Glu Leu Met Ser Arg Ser Asp Phe Val Thr Ile His Leu Pro Lys
 195 200 205
 Thr Lys Glu Thr Ala Gly Met Phe Asp Ala Gln Leu Leu Ala Lys Ser
 210 215 220
 Lys Lys Gly Gln Ile Ile Ile Asn Ala Ala Arg Gly Gly Leu Val Asp
 225 230 235 240
 Glu Gln Ala Leu Ala Asp Ala Ile Glu Ser Gly His Ile Arg Gly Ala
 245 250 255

DE 102 31 297 A1 2004.02.05

Gly Phe Asp Val Tyr Ser Thr Glu Pro Cys Thr Asp Ser Pro Leu Phe
 260 265 270

Lys Leu Pro Gln Val Val Val Thr Pro His Leu Gly Ala Ser Thr Glu
 275 280 285

Glu Ala Gln Asp Arg Ala Gly Thr Asp Val Ala Asp Ser Val Leu Lys
 290 295 300

Ala Leu Ala Gly Glu Phe Val Ala Asp Ala Val Asn Val Ser Gly Gly
 305 310 315 320

Arg Val Gly Glu Glu Val Ala Val Trp Met Asp Leu Ala Arg Lys Leu
 325 330 335

Gly Leu Leu Ala Gly Lys
 340

<210> 10
 <211> 325
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 10
 Met Ser Gln Asn Gly Arg Pro Val Val Leu Ile Ala Asp Lys Leu Ala
 1 5 10 15

Gln Ser Thr Val Asp Ala Leu Gly Asp Ala Val Glu Val Arg Trp Val
 20 25 30

Asp Gly Pro Asn Arg Pro Glu Leu Leu Asp Ala Val Lys Glu Ala Asp
 35 40 45

Ala Leu Leu Val Arg Ser Ala Thr Thr Val Asp Ala Glu Val Ile Ala
 50 55 60

Ala Ala Pro Asn Leu Lys Ile Val Gly Arg Ala Gly Val Gly Leu Asp
 65 70 75 80

Asn Val Asp Ile Pro Ala Ala Thr Glu Ala Gly Val Met Val Ala Asn
 85 90 95

Ala Pro Thr Ser Asn Ile His Ser Ala Cys Glu His Ala Ile Ser Leu
 100 105 110

Leu Leu Ser Thr Ala Arg Gln Ile Pro Ala Ala Asp Ala Thr Leu Arg

DE 102 31 297 A1 2004.02.05

115	120	125
Glu Gly Glu Trp Lys Arg Ser Ser Phe Asn Gly Val Glu Ile Phe Gly		
130	135	140
Lys Thr Val Gly Ile Val Gly Phe Gly His Ile Gly Gln Leu Phe Ala		
145	150	155
Gln Arg Leu Ala Ala Phe Glu Thr Thr Ile Val Ala Tyr Asp Pro Tyr		
165	170	175
Ala Asn Pro Ala Arg Ala Ala Gln Leu Asn Val Glu Leu Val Glu Leu		
180	185	190
Asp Glu Leu Met Ser Arg Ser Asp Phe Val Thr Ile His Leu Pro Lys		
195	200	205
Thr Lys Glu Thr Ala Gly Met Phe Asp Ala Gln Leu Leu Ala Lys Ser		
210	215	220
Lys Lys Gly Gln Ile Ile Ile Asn Ala Ala Arg Gly Gly Leu Val Asp		
225	230	235
Glu Gln Ala Leu Ala Asp Ala Ile Glu Ser Gly His Ile Arg Gly Ala		
245	250	255
Gly Phe Asp Val Tyr Ser Thr Glu Pro Cys Thr Asp Ser Pro Leu Phe		
260	265	270
Lys Leu Pro Gln Val Val Val Thr Pro His Leu Gly Ala Ser Thr Glu		
275	280	285
Glu Ala Gln Asp Arg Ala Gly Thr Asp Val Ala Asp Ser Val Leu Lys		
290	295	300
Ala Leu Ala Gly Glu Phe Val Ala Asp Ala Val Asn Val Ser Gly Gly		
305	310	315
Arg Val Gly Glu Glu		
325		

<210> 11

<211> 319

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

DE 102 31 297 A1 2004.02.05

<400> 11

Met Ser Gln Asn Gly Arg Pro Val Val Leu Ile Ala Asp Lys Leu Ala
 1 5 10 15

Gln Ser Thr Val Asp Ala Leu Gly Asp Ala Val Glu Val Arg Trp Val
 20 25 30

Asp Gly Pro Asn Arg Pro Glu Leu Leu Asp Ala Val Lys Glu Ala Asp
 35 40 45

Ala Leu Leu Val Arg Ser Ala Thr Thr Val Asp Ala Glu Val Ile Ala
 50 55 60

Ala Ala Pro Asn Leu Lys Ile Val Gly Arg Ala Gly Val Gly Leu Asp
 65 70 75 80

Asn Val Asp Ile Pro Ala Ala Thr Glu Ala Gly Val Met Val Ala Asn
 85 90 95

Ala Pro Thr Ser Asn Ile His Ser Ala Cys Glu His Ala Ile Ser Leu
 100 105 110

Leu Leu Ser Thr Ala Arg Gln Ile Pro Ala Ala Asp Ala Thr Leu Arg
 115 120 125

Glu Gly Glu Trp Lys Arg Ser Ser Phe Asn Gly Val Glu Ile Phe Gly
 130 135 140

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

Gln Arg Leu Ala Ala Phe Glu Thr Thr Ile Val Ala Tyr Asp Pro Tyr
 165 170 175

Ala Asn Pro Ala Arg Ala Ala Gln Leu Asn Val Glu Leu Val Glu Leu
 180 185 190

Asp Glu Leu Met Ser Arg Ser Asp Phe Val Thr Ile His Leu Pro Lys
 195 200 205

Thr Lys Glu Thr Ala Gly Met Phe Asp Ala Gln Leu Leu Ala Lys Ser
 210 215 220

Lys Lys Gly Gln Ile Ile Ile Asn Ala Ala Arg Gly Gly Leu Val Asp
 225 230 235 240

Glu Gln Ala Leu Ala Asp Ala Ile Glu Ser Gly His Ile Arg Gly Ala
 245 250 255

DE 102 31 297 A1 2004.02.05

Gly Phe Asp Val Tyr Ser Thr Glu Pro Cys Thr Asp Ser Pro Leu Phe
 260 265 270

Lys Leu Pro Gln Val Val Val Thr Pro His Leu Gly Ala Ser Thr Glu
 275 280 285

Glu Ala Gln Asp Arg Ala Gly Thr Asp Val Ala Asp Ser Val Leu Lys
 290 295 300

Ala Leu Ala Gly Glu Phe Val Ala Asp Ala Val Asn Val Ser Gly
 305 310 315

<210> 12
 <211> 530
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 12
 Met Ser Gln Asn Gly Arg Pro Val Val Leu Ile Ala Asp Lys Leu Ala
 1 5 10 15

Gln Ser Thr Val Asp Ala Leu Gly Asp Ala Val Glu Val Arg Trp Val
 20 25 30

Asp Gly Pro Asn Arg Pro Glu Leu Leu Asp Ala Val Lys Glu Ala Asp
 35 40 45

Ala Leu Leu Val Arg Ser Ala Thr Thr Val Asp Ala Glu Val Ile Ala
 50 55 60

Ala Ala Pro Asn Leu Lys Ile Val Gly Arg Ala Gly Val Gly Leu Asp
 65 70 75 80

Asn Val Asp Ile Pro Ala Ala Thr Glu Ala Gly Val Met Val Ala Asn
 85 90 95

Ala Pro Thr Ser Asn Ile His Ser Ala Cys Glu His Ala Ile Ser Leu
 100 105 110

Leu Leu Ser Thr Ala Arg Gln Ile Pro Ala Ala Asp Ala Thr Leu Arg
 115 120 125

Glu Gly Glu Trp Lys Arg Ser Ser Phe Asn Gly Val Glu Ile Phe Gly
 130 135 140

DE 102 31 297 A1 2004.02.05

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

Gln Arg Leu Ala Ala Phe Glu Thr Thr Ile Val Ala Tyr Asp Pro Tyr
165 170 175

Ala Asn Pro Ala Arg Ala Ala Gln Leu Asn Val Glu Leu Val Glu Leu
180 185 190

Asp Glu Leu Met Ser Arg Ser Asp Phe Val Thr Ile His Leu Pro Lys
195 200 205

Thr Lys Glu Thr Ala Gly Met Phe Asp Ala Gln Leu Leu Ala Lys Ser
210 215 220

Lys Lys Gly Gln Ile Ile Ile Asn Ala Ala Arg Gly Gly Leu Val Asp
225 230 235 240

Glu Gln Ala Leu Ala Asp Ala Ile Glu Ser Gly His Ile Arg Gly Ala
245 250 255

Gly Phe Asp Val Tyr Ser Thr Glu Pro Cys Thr Asp Ser Pro Leu Phe
260 265 270

Lys Leu Pro Gln Val Val Val Thr Pro His Leu Gly Ala Ser Thr Glu
275 280 285

Glu Ala Gln Asp Arg Ala Gly Thr Asp Val Ala Asp Ser Val Leu Lys
290 295 300

Ala Leu Ala Gly Glu Phe Val Ala Asp Ala Val Asn Val Ser Gly Gly
305 310 315 320

Arg Val Gly Glu Glu Val Ala Val Trp Met Asp Leu Ala Arg Lys Leu
325 330 335

Gly Leu Leu Ala Gly Lys Leu Val Asp Ala Ala Pro Val Ser Ile Glu
340 345 350

Val Glu Ala Arg Gly Glu Leu Ser Ser Glu Gln Val Asp Ala Leu Gly
355 360 365

Leu Ser Ala Val Arg Gly Leu Phe Ser Gly Ile Ile Glu Glu Ser Val
370 375 380

Thr Phe Val Asn Ala Pro Arg Ile Ala Glu Glu Arg Gly Leu Asp Ile
385 390 395 400

Ser Val Lys Thr Asn Ser Glu Ser Val Thr His Arg Ser Val Leu Gln
405 410 415

Val Lys Val Ile Thr Gly Ser Gly Ala Ser Ala Thr Val Val Gly Ala
420 425 430

Leu Thr Gly Leu Glu Arg Val Glu Lys Ile Thr Arg Ile Asn Gly Arg
435 440 445

Gly Leu Asp Leu Arg Ala Glu Gly Leu Asn Leu Phe Leu Gln Tyr Thr
450 455 460

Asp Ala Pro Gly Ala Leu Gly Thr Val Gly Thr Lys Leu Gly Ala Ala
465 470 475 480

Gly Ile Asn Ile Glu Ala Ala Ala Leu Thr Gln Ala Glu Lys Gly Asp
485 490 495

Gly Ala Val Leu Ile Leu Arg Val Glu Ser Ala Val Ser Glu Glu Leu
500 505 510

Glu Ala Glu Ile Asn Ala Glu Leu Gly Ala Thr Ser Phe Gln Val Asp
515 520 525

Leu Asp
530

Patentansprüche

1. Nukleinsäuren codierend für eine deregulierte 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase enthaltend ein Gen serA gemäß SEQ ID No 1 oder ein Allel, Homolog oder Derivat dieser Nukleotidsequenz oder mit dieser hybridisierende Nukleotidsequenzen.
2. Nukleinsäuren codierend für eine deregulierte 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase enthaltend ein Gen serA gemäß SEQ ID No 2 oder ein Allel, Homolog oder Derivat dieser Nukleotidsequenz oder mit dieser hybridisierende Nukleotidsequenzen.
3. Nukleinsäuren codierend für eine deregulierte 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase enthaltend ein Gen serA gemäß SEQ ID No 3 oder ein Allel, Homolog oder Derivat dieser Nukleotidsequenz oder mit dieser hybridisierende Nukleotidsequenzen.
4. Nukleinsäuren codierend für eine deregulierte 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase enthaltend ein Gen serA gemäß SEQ ID No 4 oder ein Allel, Homolog oder Derivat dieser Nukleotidsequenz oder mit dieser hybridisierende Nukleotidsequenzen.
5. Nukleinsäuren codierend für eine deregulierte 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase enthaltend ein Gen serA gemäß SEQ ID No 5 oder ein Allel, Homolog oder Derivat dieser Nukleotidsequenz oder mit dieser hybridisierende Nukleotidsequenzen.
6. Nukleinsäuren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass sie aus coryneformen Bakterien isoliert werden.
7. Nukleinsäuren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass sie aus Corynebacterium oder Brevibacterium isoliert werden.

8. Nukleinsäuren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass sie aus *Corynebacterium glutamicum* oder *Brevibacterium flavum* isoliert werden.
9. Genstruktur enthaltend wenigstens eine Nukleotidsequenz gemäß den Ansprüchen 1 bis 8 sowie mit diesen operativ verknüpfte regulatorische Sequenzen.
10. Vektor enthaltend wenigstens eine Nukleotidsequenz gemäß Anspruch 1 bis 8 oder eine Genstruktur gemäß Anspruch 9 sowie zusätzliche Nukleotidsequenzen zur Selektion, zur Replikation in der Wirtszelle oder zur Integration in das Wirtszell-Genom.
11. Deregulierte 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase oder ein Teil davon, codiert durch eine Nukleinsäuresequenz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8.
12. Deregulierte 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase nach Anspruch 11, mit einer Aminosäuresequenz, gemäß SEQ ID No 7 oder einer modifizierten Form dieser Polypeptidsequenzen oder Isoformen davon.
13. Deregulierte 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase nach Anspruch 11, mit einer Aminosäuresequenz, gemäß SEQ ID No 8 oder einer modifizierten Form dieser Polypeptidsequenz oder Isoform davon.
14. Deregulierte 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase nach Anspruch 11, mit einer Aminosäuresequenz, gemäß SEQ ID No 9 oder einer modifizierten Form dieser Polypeptidsequenz oder Isoform davon.
15. Deregulierte 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase nach Anspruch 11, mit einer Aminosäuresequenz, gemäß SEQ ID No 10 oder einer modifizierten Form dieser Polypeptidsequenz oder Isoform davon.
16. Deregulierte 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase nach Anspruch 11, mit einer Aminosäuresequenz, gemäß SEQ ID No 11 oder einer modifizierten Form dieser Polypeptidsequenz oder Isoform davon.
17. Polypeptide nach einem der Ansprüche 11 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus coryneformen Bakterien stammen.
18. Polypeptide nach einem der Ansprüche 11 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* stammen.
19. Polypeptide nach einem der Ansprüche 11 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus *Corynebacterium glutamicum* oder *Brevibacterium flavum* stammen.
20. Mikroorganismus enthaltend wenigstens eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 bis 8 in replizierbarer Form, welche im Vergleich zum Wild Typ Mikroorganismus verstärkt exprimiert wird und/oder deren Kopienzahl erhöht ist.
21. Mikroorganismus gemäß Anspruch 20 enthaltend in replizierbarer Form eine Genstruktur gemäß Anspruch 9 oder einen Vektor gemäß Anspruch 10.
22. Mikroorganismus gemäß einem der Ansprüche 20 bis 21 enthaltend wenigstens ein Polypeptid gemäß Anspruch 11 bis 19, welcher eine im Vergleich zu dem entsprechenden Wild Typ Stamm aktive deregulierte 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase aufweist.
23. Mikroorganismus gemäß einem der Ansprüche 20 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass er ein coryneformes Bakterium ist.
24. Mikroorganismus gemäß einem der Ansprüche 20 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass er zur Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* gehört.
25. Mikroorganismus gemäß einem der Ansprüche 20 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass er zu *Corynebacterium glutamicum* oder *Brevibacterium flavum* gehört.
26. Sonde zur Identifizierung und /oder Isolierung von Genen codierend für an der Biosynthese von L-Serin beteiligten Proteinen, dadurch gekennzeichnet, dass sie ausgehend von Nukleinsäuren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 hergestellt wird und eine zur Detektion geeignete Markierung enthält.

27. Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von L-Serin, dadurch gekennzeichnet, daß

- a) wenigstens eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 isoliert aus einem coryneformen Bakterium in einen Mikroorganismus übertragen wird und dort exprimiert wird, wobei die Genexpression und/oder die Aktivität des entsprechend codierten Polypeptids gegenüber dem entsprechend nicht genetisch veränderten Mikroorganismus erhöht ist,
- b) dieser genetisch veränderte Mikroorganismus aus Schritt b) zur mikrobiellen Herstellung eingesetzt wird und
- c) das entsprechend gebildete L-Serin aus dem Kulturmedium isoliert wird.

Es folgen 8 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

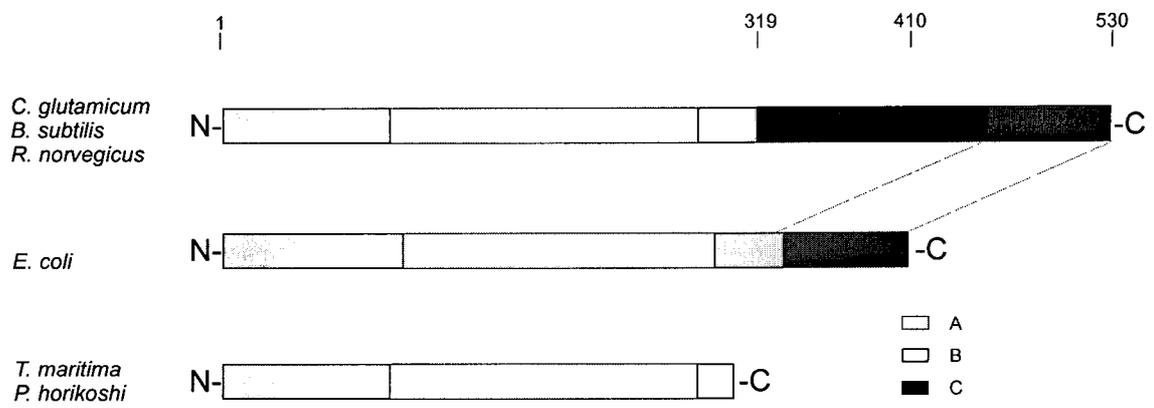


Fig. 1

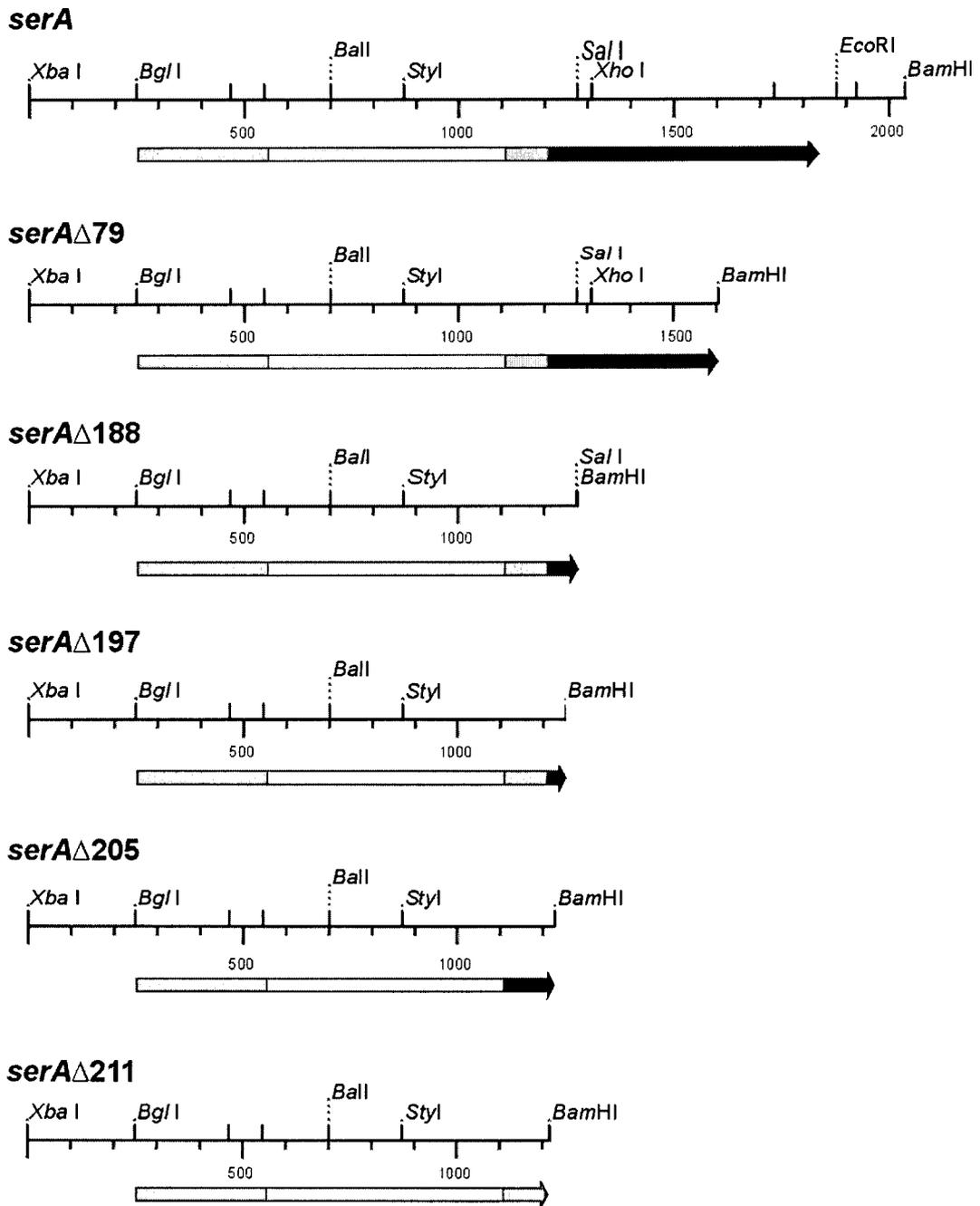


Fig. 2

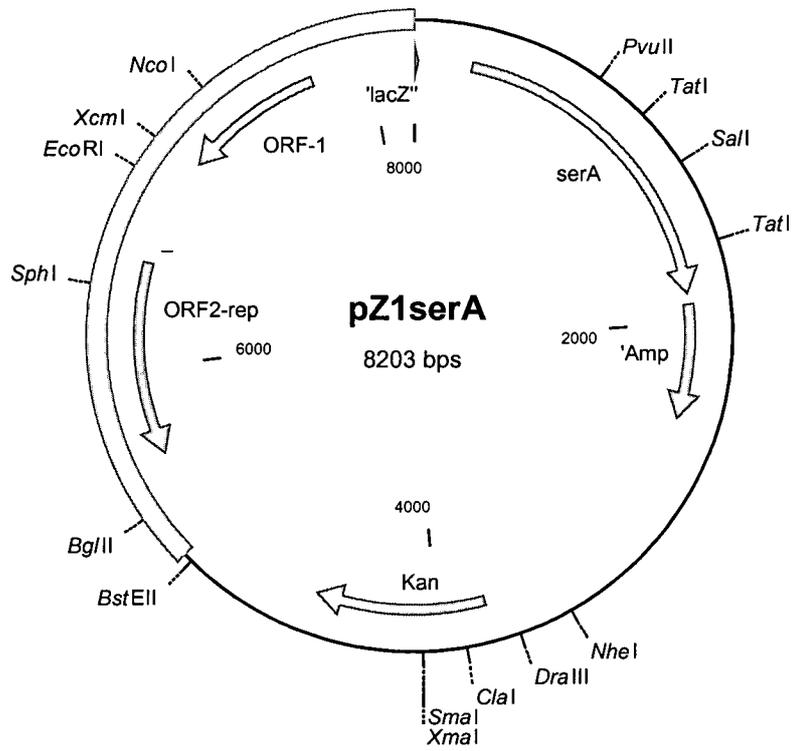


Fig. 3

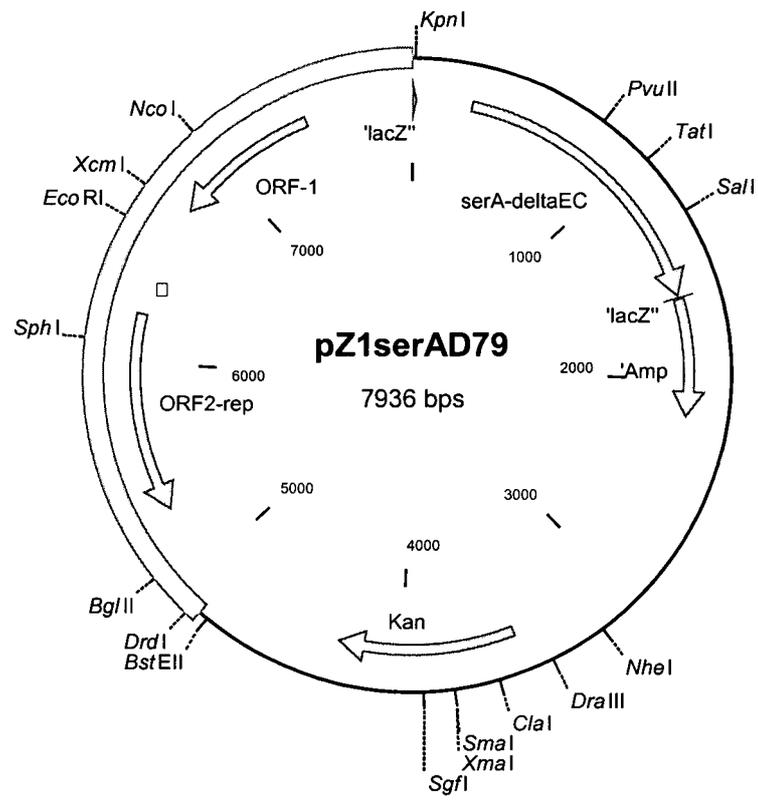


Fig. 4

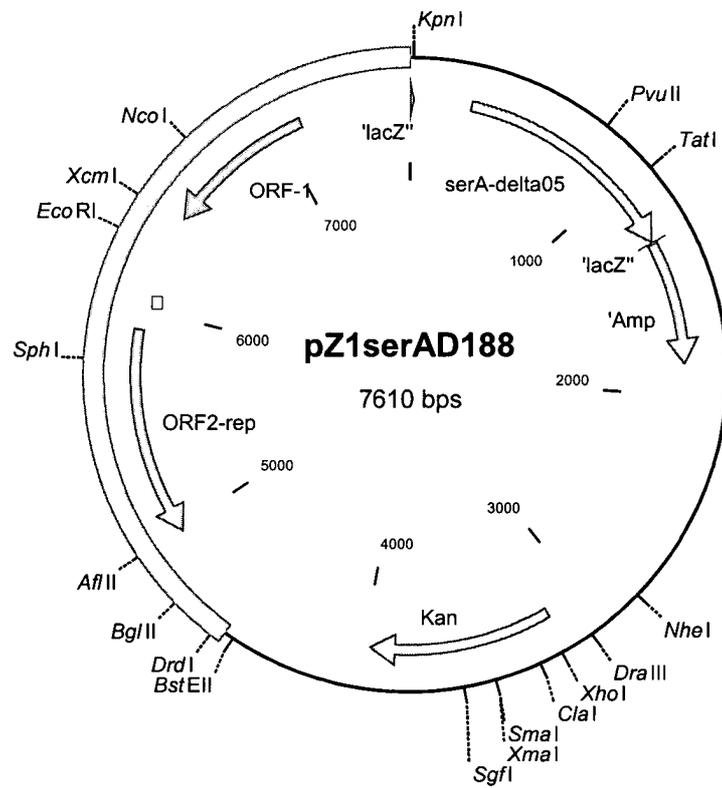


Fig. 5

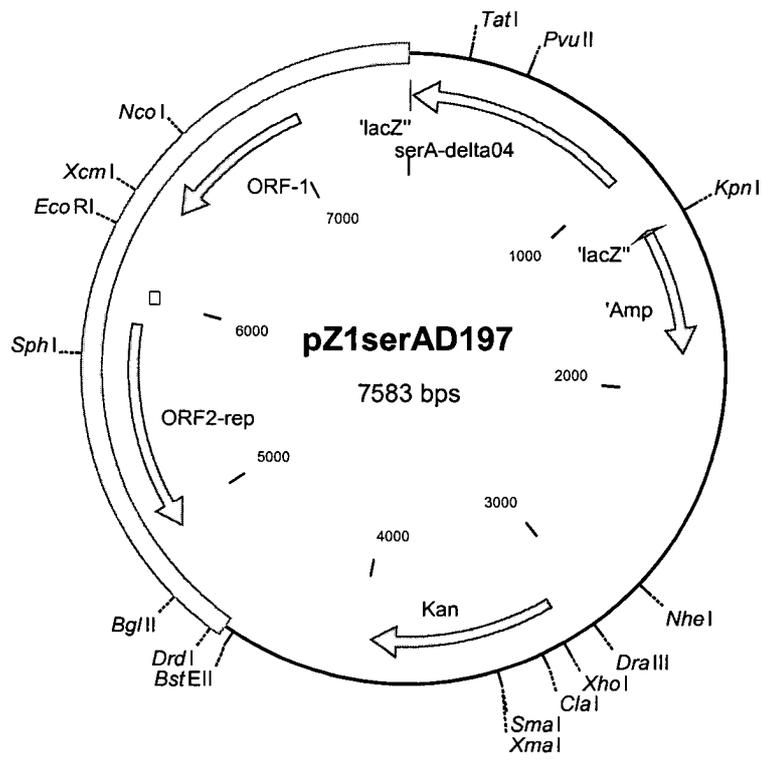


Fig. 6

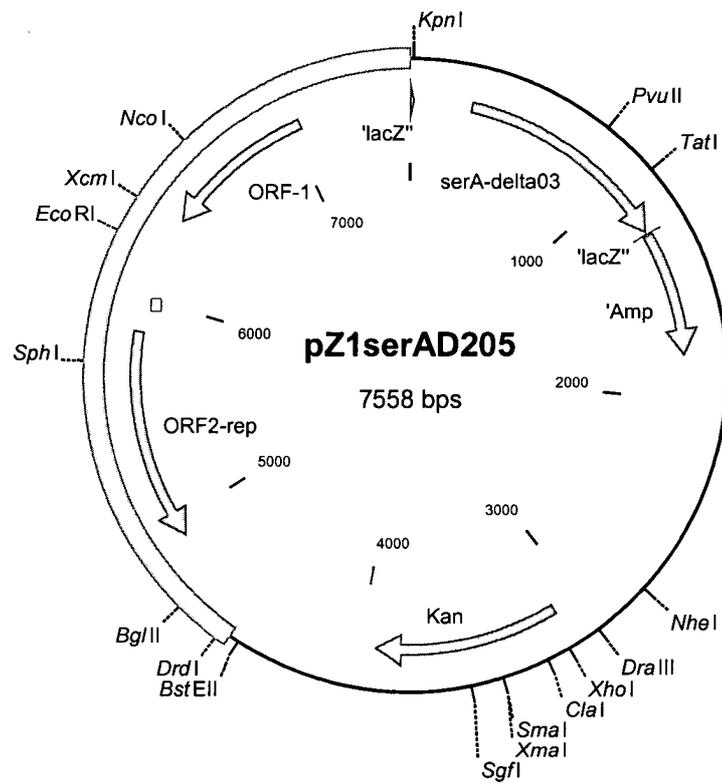


Fig. 7

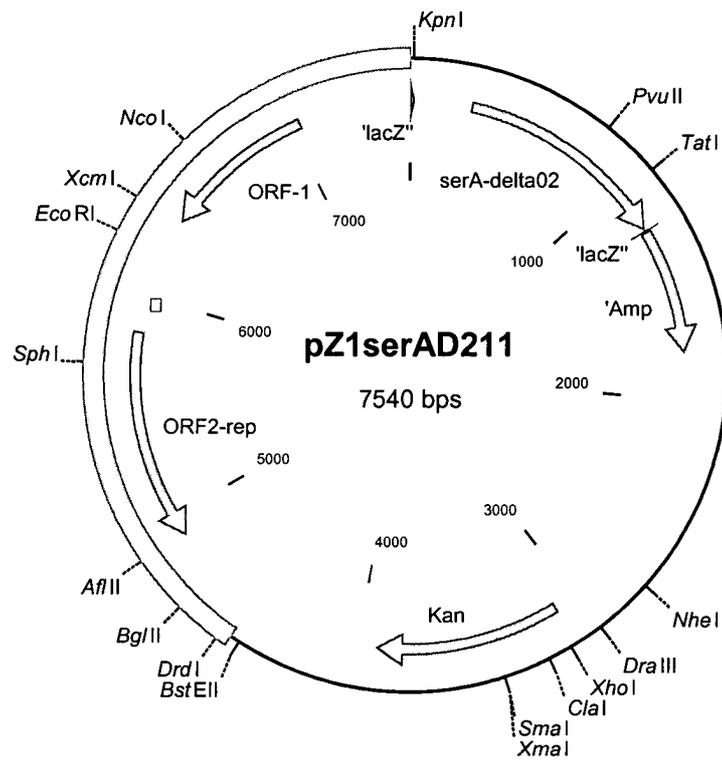


Fig. 8