



(12) **Offenlegungsschrift**

(21) Aktenzeichen: **10 2012 024 435.5**

(51) Int Cl.: **C12N 15/31 (2006.01)**

(22) Anmeldetag: **14.12.2012**

(43) Offenlegungstag: **10.07.2014**

(71) Anmelder:  
**Forschungszentrum Jülich GmbH, 52428, Jülich, DE**

(56) Ermittelter Stand der Technik:  
**siehe Folgeseiten**

(72) Erfinder:  
**Binder, Stephan, 52249, Eschweiler, DE; Eggeling, Lothar, Dr., 52428, Jülich, DE; Bott, Michael, Prof. Dr., 52428, Jülich, DE**

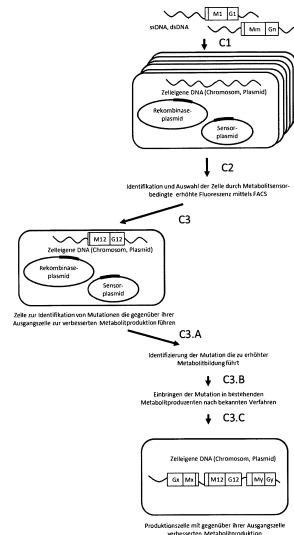
Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Der Inhalt dieser Schrift weicht von den am Anmeldetag eingereichten Unterlagen ab.

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Identifizierung einer Zelle mit gegenüber ihrem Wildtyp erhöhten intrazellulären Konzentration eines bestimmten Metaboliten, wobei die Veränderung der Zelle durch Rekombinierung erreicht wird, sowie ein Verfahren zur Herstellung einer gegenüber ihrem Wildtyp genetisch veränderten Produktionszelle mit optimierter Produktion eines bestimmten Metaboliten, ein Verfahren zur Herstellung dieses Metaboliten, sowie dafür geeignete Nukleinsäuren**

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung einer Zelle mit gegenüber ihrem Wildtyp erhöhten intrazellulären Konzentration eines bestimmten Metaboliten, wobei die Veränderung der Zelle durch Rekombinierung erreicht wird, sowie ein Verfahren zur Herstellung einer gegenüber ihrem Wildtyp genetisch veränderten Produktionszelle mit optimierter Produktion eines bestimmten Metaboliten, ein Verfahren zur Herstellung dieses Metaboliten, sowie dafür geeignete Nukleinsäuren. Erfindungsgemäß wird ein für eine Rekombinase kodierendes Gen, welches zu einem bekannten Rekombinasegen homolog ist, über einen Vektor in eine Zelle transformiert und dieser Zelle eine DNA, welche mindestens ein verändertes Gen G1 bis Gn oder mindestens eine Mutation M1 bis Mn enthält, in die Zelle eingebracht und es wird mittels Metabolitsensoren diejenige Zelle identifiziert, welche die höchste Metabolitproduktion aufweist. Aus dieser Zelle wird die Mutation, welche für die erhöhte Produktion verantwortlich gemacht wird, isoliert, das Gen oder die Mutation entnommen und in einen Produktionsstamm eingebracht, welcher dadurch eine erhöhte Produktion des Metaboliten aufweist.



(56) Ermittelter Stand der Technik:

**WO 2006/ 050 046 A2**

1. **ANASTASSIADIS, K.; [u. a.]: Dre recombinase, like Cre, is a highly efficient site-specific recombinase in E. coli, mammalian cells and mice. 2009. In: Disease Models and Mechanisms, Vol. 2, S. 508-515**

2. **LEVANON, S. S.; [u. a.]: Effect of oxygen on the Escherichia coli ArcA and FNR regulation systems and metabolic responses. 2005. Online veröffentlicht unter: [www:interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com). (Gutachtlich genannt)**

4. **Internet-Recherche am 04.07.2013: [www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotideCorynebacterium\\_aurimucosum\\_ATCC\\_700975\\_complete\\_genome](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotideCorynebacterium_aurimucosum_ATCC_700975_complete_genome) Accession Nummer: CP001601**

5. **Internet-Recherche am 04.07.2013: [www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotideSequenzvergleich](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotideSequenzvergleich) von SEQ ID NO:1 mit CP001601**

6. **Internet-Recherche am 04.07.2013: [www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotideRevision\\_History](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotideRevision_History) für das Protein mit der Accession Nummer YP\_002835493**

7. **Internet-Recherche am 04.07.2013: [www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotideRecT](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotideRecT) mit der Accession Nummer YP\_002835493**

8. **Internet-Recherche am 04.07.2013: [www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotideSequenzvergleich](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotideSequenzvergleich) von SEQ ID NO:2 mit YP\_002835493**

## Beschreibung

**[0001]** Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung einer Zelle mit gegenüber ihrem Wildtyp erhöhten intrazellulären Konzentration eines bestimmten Metaboliten, wobei die Veränderung der Zelle durch Rekombinierung erreicht wird, sowie ein Verfahren zur Herstellung einer gegenüber ihrem Wildtyp genetisch veränderten Produktionszelle mit optimierter Produktion eines bestimmten Metaboliten, ein Verfahren zur Herstellung dieses Metaboliten, sowie dafür geeignete Nukleinsäuren.

**[0002]** Mikroorganismen werden seit Jahrzehnten großtechnisch zur Produktion niedermolekularer Moleküle benutzt. Niedermolekulare Moleküle sind zum Beispiel natürliche bakterielle Metabolite wie Aminosäuren (EP 1070132 B1, WO 2008/006680 A8), Nukleoside und Nukleotide (EP 2097512 C1, CA 2297613 C1), Fettsäuren (WO 2009/071878 C1, WO 2011/064393 C1), Vitamine (EP 0668359 C1), organische Säuren (EP 0450491 C1, EP 0366922 B1) oder Zucker (EP 0861902 C1, US 3642575 A). Durch Bakterien produzierte niedermolekulare Moleküle sind auch solche Moleküle, die durch Expression heterologer Gene, die zum Beispiel aus Pflanzen stammen, gebildet werden. Dies sind pflanzliche Wirkstoffe. Dazu gehören beispielsweise Taxol (WO 1996/032490 C1, WO 1993/021338 C1), Artemisinin (WO 2009/088404 C1), und weitere Moleküle, die zu den Klassen der Isoprenoide, Phenylpropanoide oder Alkaloide gehören (Marienhagen J, Bott M, 2012, J Biotechnol., doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.06.001). Generell können neben Molekülen, oder Vorstufen von Molekülen pflanzlichen Ursprungs auch solche Moleküle mit Mikroorganismen gewonnen werden, die von wirtschaftlichem Interesse sind. Dazu gehören zum Beispiel Hydroxyisobuttersäure zur Herstellung von Methacrylaten (PCT/EP2007/055394), Diamine zur Herstellung von Kunststoffen (JP 2009-284905 A), oder auch Alkohole zur Verwendung als Treibstoff (WO 2011/069105 C2, WO 2008/137406 C1).

**[0003]** Als Mikroorganismen zur Produktion niedermolekularer Moleküle sind Gram-negative Bakterien, Gram-positive Bakterien und Hefen geeignet. Geeignete Bakterien sind beispielsweise zum Genus *Enterobacteria* gehörende *Escherichia species* wie *Escherichia coli*, oder zum Genus *Firmicutes* gehörende *Bacillus species* wie *Bacillus subtilis*, oder zum Genus *Firmicutes* gehörende *Lactococcus species* wie *Lactococcus lactis* oder *Lactobacillus species* wie *Lactobacillus casei*, oder zum Genus *Ascomycetes* gehörende *Saccharomyces species* wie *Saccharomyces cerevisiae*, oder *Yarrowia species* wie *Yarrowia lipolytica*, oder zum Genus *Corynebacterium* gehörende *Corynebacterium species*.

**[0004]** Unter den *Corynebacterien* ist bevorzugt *Corynebacterium efficiens* (DSM44549), *Corynebacterium thermoaminogenes* (FERM BP-1539) und *Corynebacterium ammoniagenes* (ATCC6871), besonders aber *Corynebacterium glutamicum* (ATCC13032). Einige Spezies von *Corynebacterium glutamicum* sind auch unter anderem Namen dem Stand der Technik entsprechend bekannt. So zum Beispiel *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870, *Corynebacterium lilium* DSM20137, *Corynebacterium melassecola* ATCC17965, *Brevibacterium flavum* ATCC14067, *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869, *Brevibacterium divaricatum* ATCC14020, und *Microbacterium ammoniaphilum* ATCC15354.

**[0005]** Um die Bildung und Produktion der niedermolekularen Moleküle zu erreichen, werden eigene Gene des Mikroorganismus, oder homologe Gene oder heterologe Gene der Synthesewege der niedermolekularen Moleküle exprimiert oder verstärkt exprimiert, oder es wird deren mRNA Stabilität erhöht. Dazu können die Gene auf Plasmiden oder Vektoren in die Zelle eingebracht werden, oder sie können auf Episomen vorliegen, oder ins Chromosom integriert werden. Auch können die zelleigenen chromosomal kodierten Gene in ihrer Expression gesteigert werden. Dies wird beispielsweise durch geeignete Mutationen im Chromosom im Bereich des Promoters erreicht. Es können auch andere Mutationen, die zur Produktsteigerung führen, in das Chromosom eingeführt werden, die beispielsweise die mRNA Stabilität beeinflussen, oder die osmotische Stabilität, die Resistenz gegenüber pH Schwankungen, oder auch Gene, deren Funktion nicht bekannt ist, die sich aber günstig auf die Produktbildung auswirken. Auch werden homologe Gene oder heterologe Gene in das Chromosom eingebaut oder sie werden so eingebaut, dass sie im Chromosom in mehrfachen Kopien vorliegen.

**[0006]** Der gezielten Einbau der Mutationen oder Gene in das Genom erfordert die Konstruktion eines Plasmids, das durch *in vitro* Rekombination von DNA Sequenzen unter Nutzung von Restriktionsendonukleasen und DNA Ligasen hergestellt wird. Die gesamte Prozedur, um gezielt chromosomale Mutationen einzuführen, umfasst ferner die nachfolgenden Schritte, um den *in vivo* Austausch zu erreichen, den Test auf erfolgreichen Austausch, und schließlich den Test auf gesteigerte Produktbildung. Dies erfordert eine Vielzahl von Schritten, A1–A8, die in **Fig. 1** (links) schematisch angeführt sind. Diese Methodik wird für viele Bakterien, die zur Produktion kleiner Moleküle benutzt werden, angewandt. Beispiele sind *Corynebacterium glutamicum* (Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kali-

nowski J, Thierbach G, Pühler A. *Gene*. 1994 Jul 22; 145(1): 69–73), oder *Pseudomonas aeruginosa* (Allelic exchange in *Pseudomonas aeruginosa* using novel ColE1-type vectors and a family of cassettes containing a portable oriT and the counter-selectable *Bacillus subtilis* sacB marker. Schweizer HP. *Mol Microbiol*. 1992 May; 6(9): 1195–204), oder *Bacillus subtilis* (Construction of a modular plasmid family for chromosomal integration in *Bacillus subtilis*. Gimpel M, Brantl S. *J Microbiol. Methods*. 2012 Nov; 91(2): 312–7), oder Clostridien (Novel system for efficient isolation of clostridium double-crossover allelic exchange mutants enabling markerless chromosomal gene deletions and DNA integration. Al-Hinai MA, Fast AG, Papoutsakis ET. *Appl. Environ Microbiol*. 2012 Nov; 78(22): 8112–21).

**[0007]** Die gezielte Einführung von Mutationen und Genen in das Chromosom erfordert die in vitro Rekombination von DNA Sequenzen unter Nutzung von Restriktionsendonukleasen und DNA Ligasen zur Herstellung eines Plasmids (**Fig. 1, A1**). Bei den dazu erforderlichen Plasmiden handelt es sich um Plasmide, die im gewünschten Produzenten unter geeigneten Bedingungen nicht replizieren. Nach Einbringen des Plasmids in den Mikroorganismus durch Elektroporation, chemische oder ballistische Transformation (**Fig. 1, A2**), erfolgt Integration in das Chromosom. Auf Integration wird durch Vektor-vermittelte Resistenz selektioniert (**Fig. 1, A3**). Geeignete Plasmide sind beispielsweise pBRH1 (WO2003076452C2) oder pWV01 (US6025190), die in *Azotobacter* beziehungsweise *Bacillus* nach Transformation (**Fig. 1, A2**) durch Erhöhung der Temperatur in der Zelle nicht mehr replizieren können, so dass in resistenten Zellen der Einbau des Vektors in das Chromosom erfolgt. Das Plasmid pK19mobsacB kann von vornherein nicht in *Corynebacterien*, wie *C. glutamicum*, replizieren, so dass in Anwesenheit von Kanamycin nur Klone selektioniert werden, bei denen die Integration des Vektors in das Chromosom durch homologe Rekombination erfolgt (Schäfer et al., *Gene* 145, 69–73 (1994) (**Fig. 1, A3**). Diese nicht-replizierenden Plasmide dienen als Vektor, um Gene im Chromosom gerichtet zu mutieren, Promotersequenzen zu mutieren, Sequenzen zu deletieren, oder Sequenzen auszutauschen, oder neue Gene in das Chromosom einzuführen. Dieses Verfahren ist aufwändig, da die Plasmide einzeln in vitro konstruiert werden müssen. Es ist ferner aufwändig, da über geeignete Selektionsverfahren, wie Selektion auf Antibiotikaresistenz oder die angeführte Temperaturerhöhung, zunächst der Einbau des Plasmids mitsamt der auszutauschenden Sequenzen in das Chromosom bewirkt wird, und in einem nachfolgenden Schritt wieder der Verlust des Plasmids aus dem Chromosom erreicht wird (**Fig. 1, A4**). Durch nachfolgende Tests, üblicherweise PCR Amplifikationen, lässt sich dann erst prüfen, ob die auszutauschenden Sequenzen wie gewünscht tatsächlich im Chromosom verblieben sind (**Fig. 1, A5**). So wird ein einzelner Klon konstruiert, der nachfolgend kultiviert wird (**Fig. 1, A6**), dessen Produkt quantifiziert wird (**Fig. 1, A7**), und so gegebenenfalls ein verbesserter Produzent erhalten wird (**Fig. 1, A8**). Diese Technik der Plasmidkonstruktion und der homologen Rekombination zur Gewinnung von mikrobiellen Produzenten wird vielfach angewandt, wie beispielsweise um Allelaustausche oder Deletionen in *C. glutamicum* oder *E. coli* zu erreichen (US 8,293,514; US 8,257,943; US 8,216,820; WO 2008/006680 A8; EP 2386650 C1).

**[0008]** In jüngster Zeit ist als weitere Methodik der gezielten Genommutation das sogenannte „Rekombineering“ eingeführt. Die Mutationen einzuführen erfordert weit weniger Schritte als der Einbau von Mutationen mit Hilfe von Plasmiden (**Fig. 1, rechts, B1–B2**). Rekombineering nutzt Phagen- oder Prophagengene, die die homologe Rekombination zwischen der chromosomalen DNA und von außen zugeführter DNA bewirkt. Diese DNA wird im einfachsten Falle als kommerziell synthetisierte Einzelstrang-DNA eingesetzt. Auch kann mittels PCR amplifizierte Doppelstrang DNA verwendet werden. Wenn die geeigneten Phagen- oder Prophagengene vorliegen, erfordert diese Methodik nur wenige Schritte. Der Nachteil ist allerdings, dass diese Methodik im Wesentlichen auf Einführung von Mutationen, die Wachstum auf selektivem Medium erlauben, beschränkt ist, wie zum Beispiel die Einführung von Antibiotikaresistenzen, weil andere Mutationen nicht erkannt werden können. Die direkte Anwendung zur schnellen Generierung auf produktbildende Mikroorganismen ist deswegen äußerst beschränkt, und bisher nur für *E. coli* und das Produkt Lycopene beschrieben (Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution. Wang HH, Isaacs FJ, Carr PA, Sun ZZ, Xu G, Forest CR, Church GM. *Nature*. 2009; 460(7257): 894–8). In diesem besonderen Falle konnte aufgrund des gefärbten Lycopenes anhand der Koloniefarbe auf Produktbildung geschlossen werden. Für andere Organismen und andere Produkte, wie beispielsweise Aminosäuren oder andere organische Säuren, ist eine direkte Erkennung gesteigerter Produktbildung bisher nicht möglich. Ein weiterer Nachteil ist es, dass Rekombineering auf *E. coli* und eine sehr begrenzte Zahl weiterer Mikroorganismen beschränkt ist, wie *Salmonella enterica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Lactobacillus*, *Bacillus subtilis* und *Mycobacterium*.

**[0009]** Ein weiteres Problem besteht darin, dass es bisher kein generelles System gibt, um produktbildende Mikroorganismen unmittelbar nach dem Rekombineering in großen Zellpopulationen zu identifizieren und aus solchen Zellpopulationen zu isolieren. Die bisher beim Rekombineering angewandte Methodik der Selektion auf Petrischalen ist, wie erwähnt, auf sehr spezielle Anwendungen limitiert und darüber hinaus in der Zahl der

Rekombinanten, die auf Petrischalen erhalten werden, limitiert, was das Verfahren für das screening großer Rekombinantenbibliotheken ungeeignet macht.

**[0010]** Rekombineering basiert auf der homologen Rekombination, die von Proteinen, die aus Phagen oder Prophagen stammen, vermittelt wird. Zwei homologe Systeme sind für *Escherichia coli* bekannt. Das RecE/RecT des  $\lambda$ -Prophagen und das red-Operon, bestehend aus Red-Gamma, Red-Beta und Red-Alpha vom Bakteriophagen Lambda. Beide Systeme erlauben den Austausch frei wählbarer DNA-Abschnitte zwischen zwei unterschiedlichen DNA-Molekülen. Der Austausch von DNA erfolgt über zwei dem Zielfragment flankierende homologe (ähnliche oder identische) Bereiche mit einer Länge von 30–100 Basenpaaren. Zum Einführen chromosomaler Mutationen wird das DNA-Molekül, das die Mutation trägt, als Einzelstrang kommerziell synthetisiert (**Fig. 1, B1**), und in *E. coli*, der das Protein Red-Beta exprimiert, eingebracht. Aufgrund der Homologie zwischen dem eingebrachten DNA-Molekül und dem Chromosom wird durch das Red-Beta Protein die Rekombination und der Austausch der Sequenzen vermittelt. Auf diese Weise sind Mutationen im galK Gen des Chromosoms von *E. coli* korrigiert worden. Da nur das intakte galK Gen die Galaktoseverwertung erlaubt, werden rekombinante Klone als Kolonien auf Petrischalen durch Wachstum selektioniert (**Fig. 1, B2**) (Rekombineering: in vivo genetic engineering in *E. coli*, *S. enterica*, and beyond. Sawitzke JA, Thomason LC, Costantino N, Bubunenko M, Datta S, Court DL. *Methods Enzymol.* 2007; 421: 171–99). Ebenso können Resistenzgene eingeführt werden, oder entsprechende Mutationen korrigiert werden, so dass wiederum nach erfolgreichem Rekombineering auf Wachstum selektioniert werden kann. Dies ist auch mit Genen durchführbar, die für Resistenz gegenüber Chloramphenicol, Hygromycin, Streptomycin, Ampicillin oder Spectinomycin kodieren (Rekombineering: in vivo genetic engineering in *E. coli*, *S. enterica*, and beyond. Sawitzke JA, Thomason LC, Costantino N, Bubunenko M, Datta S, Court DL. *Methods Enzymol.* 2007; 421: 171–99). Auch andere Gene mit leicht selektierbarem Phänotyp lassen sich so durch Rekombineering in das Chromosom von *E. coli* einbringen oder im Chromosom mutieren. Falls keine Möglichkeit der Selektion besteht, kann dies durch verschiedene Techniken umgangen werden, wie Koselektion oder Koloniehybridisierung (Rekombineering: in vivo genetic engineering in *E. coli*, *S. enterica*, and beyond. Sawitzke JA, Thomason LC, Costantino N, Bubunenko M, Datta S, Court DL. *Methods Enzymol.* 2007; 421: 171–99), oder auch PCR-Analyse von Klonen, was allerdings zusätzliche Schritte erfordert und den Vorteil der schnellen gezielten Mutagenese des Chromosoms durch Rekombineering wieder zunichte macht. Außerdem setzt es eine außerordentlich hohe Rekombinationsfrequenz voraus, da andernfalls hunderte von Klonen einzeln getestet werden müssten. Deswegen ist Rekombineering des Chromosoms ohne klonale Kultivierungen zur Isolation eines verbesserten mikrobiellen Metabolitproduzenten noch nicht generell verwendbar. Ein Sonderfall ist das mikrobielle Produkt Lycopon, das zu auffallend rot gefärbten Kolonien führt. So wurde durch iteratives, mehrfach aufeinanderfolgendes Rekombineering mit *E. coli* und visuelle qualitative Bewertung der Farbintensität von Kolonien auf Petrischalen 20 chromosomale Genorte mutiert, um gesteigerte Lycoponbildung zu erreichen (Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution. Wang HH, Isaacs FJ, Carr PA, Sun ZZ, Xu G, Forest CR, Church GM. *Nature.* 2009; 460(7257): 894–8). Die Einschränkung der Anwendung des Rekombineering zur Entwicklung mikrobieller Produzenten beruht darauf, dass die allermeisten mikrobiell hergestellten niedermolekularen Moleküle keinen Phänotyp besitzen, auf den selektioniert werden kann.

**[0011]** Zum Stand der Technik des Produktnachweises gehören auch Metabolitsensoren – auch bekannt unter der Bezeichnung Nanosensoren – mit denen in einzelnen Bakterien erhöhte Produktbildung nachgewiesen werden kann. Solche Metabolitsensoren nutzen Transkriptionsfaktoren oder RNA Aptamere zur Detektion niedermolekularer Metabolite in Bakterien oder Hefen. Bekannte Metabolitsensoren, die auf Transkriptionsfaktoren beruhen, sind beispielsweise pSenLys, pSenArg, pSenSer, pSenOAS oder pJC1-Irp-brnF-eyfp (WO2011138006; DPA 102012 016 716.4). Der Metabolitsensor umfasst dabei eine für ein Autofluoreszenzprotein kodierende Gensequenz, wobei die Expression des Autofluoreszenzproteins von der intrazellulären Konzentration eines bestimmten Metaboliten abhängig ist. Dabei erfolgt die Kontrolle der Expression der für das Autofluoreszenzprotein kodierenden Gensequenz in Abhängigkeit von der intrazellulären Konzentration des bestimmten Metaboliten auf der Ebene der Transkription. In Abhängigkeit von der intrazellulären Konzentration des jeweiligen Metaboliten wird mithin mehr oder weniger mRNA gebildet, die in den Ribosomen unter Bildung des Autofluoreszenzproteins translatiert werden kann. Der Mikroorganismus, der den Metabolitsensor enthält, kann jeder beliebige Mikroorganismus sein. Beispielhaft können Bakterien, Hefen oder Enterobakterien, wie *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum* oder *Saccharomyces cerevisiae* genannt werden.

**[0012]** Die Nutzung von Metabolitsensoren, um Zellen mit gesteigerter Produktbildung einzusetzen, beruht darauf, dass bei gesteigerter Bildung eines Metaboliten nicht nur vermehrt Metabolit produziert und extrazellulär angehäuft wird, sondern auch eine erhöhte intrazelluläre Konzentration des Metaboliten gegenüber dem Wildtyp vorliegt (A high-throughput approach to identify genomic variants of bacterial metabolite producers at the single-cell level. Binder S, Schendzielorz G, Stähler N, Krumbach K, Hoffmann K, Bott M, Eggeling L.

Genome Biol. 2012 May 28; 13(5): R40; Engineering microbial biofuel tolerance and export using efflux pumps. Dunlop MJ, Dossani ZY, Szmidt HL, Chu HC, Lee TS, Keasling JD, Hadi MZ, Mukhopadhyay A. Mol Syst Biol. 2011 May 10; 7: 487).

**[0013]** Metabolitsensoren sind beschrieben, um in Mutantenbibliotheken von Mikroorganismen Mutanten mit erhöhter Produktbildung zu erkennen, und diese Mutanten mittels Durchflusszytometrie und automatischer Sortiereinrichtung auszusortieren (WO2011138006; DPA 102012 016 716.4). Die Mutantenbibliothek war in diesem Falle mit chemischer ungerichteter Mutagenese des Chromosoms hergestellt worden, beziehungsweise durch Einführung von Mutationen in ein plasmidkodiertes Gen durch fehlerhafte Polymerasekettenreaktion. Die vorliegende Erfindung bezieht sich nicht auf chemische ungerichtete Mutagenese oder Mutagenese durch fehlerhafte Polymerasekettenreaktion.

**[0014]** Der Nachteil der bisherigen Techniken zur Stammentwicklung ist, dass bisher keine Technik zur Verfügung steht, um gezielt Mutationen in ein zelluläres Gen oder das Chromosom einzuführen, und gleichzeitig ohne klonale Kultivierungen (Petrischalen) nach Einführung der Mutation einen verbesserten Metabolitproduzenten direkt als Einzelzelle in Zellsuspensionen zu identifizieren und aus der Zellsuspensionen zu isolieren.

**[0015]** Es ist daher Aufgabe der Erfindung, ein derartiges Verfahren zur beschleunigten Entwicklung mikrobieller Produzenten kleiner Moleküle zur Verfügung zu stellen und die Nachteile des Standes der Technik zu überwinden.

**[0016]** Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch eine Zelle nach Anspruch 1, Verfahren nach den nebengeordneten Ansprüchen 6, 7 und 15, ein Rekombinasegen nach Anspruch 18, eine Rekombinase nach Anspruch 19, sowie Nukleinsäuren nach Anspruch 20.

**[0017]** Vorteilhafte Weiterbildungen der Erfindung sind in den Unteransprüchen angegeben.

**[0018]** Mit der Zelle, den Verfahren, den Rekombinasegenen, der Rekombinase, den identifizierten Genen G1 bis Gn und Mutationen M1–Mm, ist es nunmehr möglich, auf besonders schnellem Weg für die gesteigerte Produktion von Metaboliten Zellen zu schaffen, mit denen eine gegenüber der Ausgangszelle gesteigerte Produktion von Metaboliten möglich ist.

**[0019]** In Folgenden soll die Erfindung in ihrer allgemeinen Form beschrieben werden.

**[0020]** Erfindungsgemäß wird eine gegenüber ihrem Wildtyp genetisch veränderte Zelle, die eine für eine Rekombinase kodierende Gensequenz und zusätzlich einen Metabolitsensor kodierende Gensequenz enthält, zur Verfügung gestellt.

**[0021]** Bei der Zelle handelt es sich vorzugsweise um einen Mikroorganismus, bevorzugt ein Bakterium, insbesondere der Gattung Corynebakterium, Enterobakterium oder der Gattung Escherichia, besonders bevorzugt Corynebacterium glutamicum oder Escherichia coli.

**[0022]** Bei der für eine Rekombinase kodierende Gensequenz kann es sich um eine Sequenz handeln, die eine verbesserte Funktionalität gegenüber einer bekannten Rekombinase in einem gewünschten Mikroorganismus hat. Es handelt sich um eine für eine Rekombinase kodierende Gensequenz, die für ein Protein kodiert, das extrazellulär zugesetzte DNA mit zelleigener DNA rekombiniert. Der Test auf Funktionalität kann durchgeführt werden, wie es in **Fig. 2** schematisch dargestellt ist. Als besonders geeignet hat sich eine Gensequenz nach SEQ. ID. Nr. 1 oder SEQ. ID. Nr. 7 und 9 herausgestellt.

**[0023]** Die für die Rekombinase kodierende Gensequenz kann mittels eines Vektors, beispielsweise eines Plasmids, in die Zelle transformiert und exprimiert werden, wobei die Rekombinase gebildet wird.

**[0024]** Die in dem Verfahren eingesetzte Rekombinase ist dadurch charakterisiert, dass sie extrazellulär zugesetzte DNA mit der zelleigenen DNA rekombiniert. Die Rekombinase kann beispielsweise aus einem größeren Genpool, wie einem Metagenom, stammen, wo mögliche Rekombinasen durch Sequenzvergleiche mit bekannten Rekombinasen identifiziert werden. Durch solche Sequenzvergleiche lassen sich weiterhin mögliche Rekombinasen auch in bereits bestehenden Datenbanken identifizieren. Darüberhinaus können Proteine, denen Rekombinaseaktivität zugesprochen wird, oder von denen eine solche Aktivität vermutet wird, auch durch funktionelle Charakterisierung als Rekombinase erkannt werden. Bevorzugt können Rekombinasen aus Phagen oder Prophagen isoliert werden. So können Rekombinasen aus Prophagen der biotechnologisch rele-

vanten Bakterien *Leuconostoc*, *Clostridien*, *Thiobacillus*, *Alcanivorax*, *Azoarcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Acinetobacter*, *Shewaniella*, oder *Corynebacterium* und jeweils der verwandten Species isoliert und eingesetzt werden. Bevorzugt sind Rekombinasen, die zu der Rekombinase RecT des Prophagen Rac, oder der Rekombinase Bet des Phagen Lambda homolog sind. Besonders bevorzugt ist die Rekombinase RecT aus dem *E. coli* Prophagen Rac, die Rekombinase Bet aus dem *E. coli* Phagen Lambda, und die Rekombinase rCau (cauri\_1962) aus *Corynebacterium aurimucosum*.

**[0025]** Bei der eingesetzten Gensequenz, die für den Metabolitsensor kodiert, handelt es sich um die Sequenz von Vektoren, beispielsweise Plasmiden, die für Proteine kodieren, welche Metabolite, wie Aminosäuren, organische Säuren, Fettsäuren, Vitamine oder pflanzliche Wirkstoffe erkennen und durch Fluoreszenz sichtbar machen. Je stärker die Fluoreszenz ist, desto höher ist die intrazelluläre Metabolikonzentration. Dadurch kann eine Zelle mit gegenüber der genetisch unveränderten Form erhöhter Fluoreszenz und damit erhöhter Produktbildung identifiziert werden.

**[0026]** Die so modifizierte Zelle ist geeignet, von außen zugeführte DNA-Moleküle, die die Mutationen M1 bis Mm oder die mutierten Gene G1–Gn tragen, in ihre zelleigene DNA einzubauen und eine durch den Einbau der DNA bedingte erhöhte Produktion eines bestimmten Metaboliten durch Fluoreszenz kenntlich zu machen. Der Metabolitsensor ist dabei so ausgewählt, dass er auf die Detektion des Metaboliten, der vermehrt gebildet werden soll, anspricht.

**[0027]** Weiterhin umfasst die Erfindung ein Verfahren zum Identifizieren einer Zelle mit gegenüber ihrem Wildtyp erhöhter intrazellulärer Konzentration eines bestimmten Metaboliten in einer Zellsuspension, beinhaltend die Verfahrensschritte:

- i) Bereitstellen einer Zellsuspension beinhaltend Zellen der zuvor beschriebenen Art
- ii) genetisches Verändern der Zellen durch Rekombineering unter Zugabe von DNA, die mindestens ein verändertes Gen G1 bis Gn oder mindestens eine Mutation M1 bis Mm enthält unter Erhalt einer Zellsuspension, in der sich die Zellen hinsichtlich der intrazellulären Konzentration eines bestimmten Metaboliten unterscheiden,
- iii) identifizieren einzelner Zellen, in der Zellsuspension mit erhöhter intrazellulärer Konzentration eines bestimmten Metaboliten durch Fluoreszenzdetektion mittels eines Metabolitsensors.

**[0028]** Als Zellen werden vorzugsweise Mikroorganismen, bevorzugt, Bakterien, insbesondere der Gattung *Corynebacterium*, *Enterobakterien* oder der Gattung *Escherichia*, besonders bevorzugt *Corynebacterium glutamicum*, oder *Escherichia coli* eingesetzt.

**[0029]** Bei dem Rekombeneering handelt es sich um die nach dem Stand der Technik bekannten Methoden und die im speziellen Beschreibungsteil beispielhaft, aber nicht beschränkend, offenbarten Verfahren. Vorzugsweise wird das Rekombinasegen auf einem Plasmid in die Zelle eingeführt. Besonders bevorzugt wird ein Gen für eine Rekombinase nach SEQ. ID1 Nr. 1 in die Zelle eingeführt.

**[0030]** Dazu werden die Zellen vorzugsweise mit Vektoren, besonders bevorzugt Plasmide, nach den Sequenzen SEQ. ID. Nr. 3 bis Nr. 9 transformiert.

**[0031]** Bei den Metaboliten die gegenüber dem Wildtyp in erhöhter intrazellulärer Konzentration auftreten, kann es sich beispielsweise um Aminosäuren, organische Säuren, Fettsäuren, Vitamine oder pflanzliche Wirkstoffe handeln. Es handelt sich dabei um die gewünschten Produkte, deren Produktion verbessert werden sollen.

**[0032]** Bei der Zellsuspension kann es sich um Zellen, die beispielsweise in einer salzhaltigen wässrigen Lösung vorliegen und die gegebenenfalls Nährstoffe enthält, handeln.

**[0033]** Bei der genetischen Veränderung der Zelle durch Rekombineering kann DNA als Einzelstrang oder Doppelstrang DNA benutzt werden, sowie synthetische DNA oder auch aus Zellen isolierte DNA. Die DNA kann 50 bp bis 3 Mb umfassen, bevorzugt DNA mit der Länge 50–150 bp. Die DNA kann für Proteine oder Teile von Proteinen des gentechnisch zu verändernden Produzenten kodieren. Auch kann DNA eingesetzt werden, die homolog zu Promoterbereiche oder Bereichen unbekannter Funktion des gentechnisch zu verändernden Produzenten ist. Darüber hinaus kann die DNA auch für Gene oder regulatorische Elemente aus anderen Organismen kodieren, als die des gentechnisch zu verändernden Produzenten.

**[0034]** Neben definierten DNA Molekülen können auch Mischungen von DNA Molekülen eingesetzt werden, was zum Beispiel zur Erzeugung großer genetischer Diversität vorteilhaft ist.

**[0035]** Die Insertion kann dabei in das Chromosom oder in ein Plasmid erfolgen.

**[0036]** Die Methoden Fluoreszenzdetektion mittels eines Metabolitsensors sind dem Fachmann bekannt.

**[0037]** Die Erfindung betrifft in einer Ausgestaltung auch ein Verfahren zur Herstellung einer gegenüber ihrem Wildtyp genetisch veränderten Produktionszelle mit optimierter Produktion eines bestimmten Metaboliten, beinhaltend folgende Schritte:

- i) Bereitstellen einer Zellsuspension beinhaltend Zellen der zuvor beschriebenen Art;
- ii) genetisches Verändern der Zellen durch Rekombineering unter Zugabe von DNA, die mindestens ein verändertes Gen G1 bis Gn oder mindestens eine Mutation M1 bis Mm enthält. Erhalt einer Zellsuspension, in der sich die Zellen hinsichtlich der intrazellulären Konzentration eines bestimmten Metaboliten unterscheiden;
- iii) Identifizieren einzelner Zellen in der Zellsuspension mit erhöhter intrazellulärer Konzentration eines bestimmten Metaboliten durch Fluoreszenzdetektion mittels eines Metabolitsensors;
- iv) Abtrennen der identifizierten Zellen aus der Zellsuspension;
- v) Identifizieren derjenigen genetisch veränderten Gene G1 bis Gn oder derjenigen Mutationen M1 bis Mm in den identifizierten und abgetrennten Zellen, welche für die erhöhte intrazelluläre Konzentration des bestimmten Metaboliten verantwortlich sind;
- vi) Herstellung einer gegenüber ihrem Wildtyp genetisch veränderten Produktionszelle mit optimierter Produktion des bestimmten Metaboliten, deren Genom mindestens eines der Gene G1 bis Gn und/oder mindestens eine Mutation M1 bis Mm umfasst.

**[0038]** Für die Zellen, das Rekombineering, die Metaboliten, die Zellsuspension und die Methoden der Fluoreszenzdetektion, Vektoren, die in die Zelle einzuführende DNA der Schritte i), ii) und iii) gelten dieselben Zusammenhänge, wie für das Verfahren zum Identifizieren einer Zelle mit gegenüber ihrem Wildtyp erhöhter intrazellulärer Konzentration eines bestimmten Metaboliten in einer Zellsuspension.

**[0039]** Das Abtrennen der identifizierten Zellen kann mit bekannten Methoden erfolgen.

**[0040]** Für die Herstellung einer gegenüber dem Wildtyp veränderten Produktionszelle werden die Zellen, die zur Identifizierung der gesteigerten Produktion verwendet wurden und die eine gesteigerte Produktion von Metaboliten durch erhöhte Fluoreszenz anzeigen, isoliert.

**[0041]** In diesen Zellen wird die Mutation M1–Mm und/oder im Gen G1–Gn, oder die Mutationen M1–Mm in den Genen G1–Gn identifiziert. Dies kann durch PCR Amplifikation der Zielgene in den Genen G1 bis Gn und/oder den Mutationsorten M1 bis Mm, mit anschließender Sequenzierung erfolgen. Ebenso kann die Sequenzierung des Genoms erfolgen.

**[0042]** Die identifizierten produktsteigernden Mutationen M1–Mm und/oder Gene G1–Gn werden anschließend in die Produktionszelle übertragen. Dies kann mit dem Fachmann nach dem Stand der Technik bekannten Methoden erfolgen.

**[0043]** Die Bezeichnung G1 bis Gn richtet sich auf mindestens eines der Gene G1, G2, G3 bis Gn, das der Zelle im Rahmen des Rekombeneerings hinzugefügt wurde und das nun für eine besonders gute Steigerung der Produktion des Metaboliten verantwortlich gemacht wird.

**[0044]** Die Bezeichnung M1 bis Mm richtet sich auf Mutationen M1, M2 M3 ... Mm, die in den Genen G1 bis Gn enthalten sind, welche der Zelle bei Verfahrensschritt ii) zugegeben wurde und die nun für eine besonders gute Steigerung der Produktion des Metaboliten verantwortlich gemacht wird.

**[0045]** Diese Gene oder diese Mutationen werden aus der Zelle isoliert und in das Genom der Produktionszelle nach bekannten Verfahren eingebracht. Dabei kann das Gen oder die Mutation, bzw. können die Gene oder die Mutationen in die chromosomale DNA oder ein Plasmid der Produktionszelle eingebracht werden.

**[0046]** Bei diesen Genen oder Mutationen handelt es sich um DNA Abschnitte, die vorzugsweise für Proteine der Schritte eines Biosyntheseweges des gewünschten Metaboliten oder gegebenenfalls eines damit im Zusammenhang stehenden Stoffwechselprozesses kodieren. Auch kann es sich um DNA handeln, mit der die



Promoteraktivität von Genen oder die Stabilität der mRNA von Genen für die Produktbildung förderlicherweise beeinflusst wird.

**[0047]** Insbesondere wurden die Gene nach den Sequenzen SEQ. ID. Nr. 33 bis SEQ. ID. 44 aufgefunden, die geeignet sind, die Produktion von L-Lysin zu steigern.

**[0048]** Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung von Metaboliten, beinhaltend die Verfahrensschritte:

- a) Herstellung einer gegenüber ihrem Wildtyp genetisch veränderten Produktionszelle mit optimierter Produktion eines bestimmten Metaboliten durch ein Verfahren der oben angegebenen Art
- b) Kultivieren der Zelle in einem Kulturmedium beinhaltend Nährstoffe unter Bedingungen, unter denen die Produktionszelle aus den Nährstoffen den bestimmten Metaboliten produziert.

**[0049]** Der auf diese Weise hergestellte Metabolit wird in das Kulturmedium sekretiert und kann aus dem Kulturmedium isoliert werden.

**[0050]** Das zu verwendende Kulturmedium beziehungsweise Fermentationsmedium muss in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Geeignete Kulturmedien sind dem Fachmann bekannt. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch &quot; Manual of Methods for General Bacteriology " der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Die Begriffe Kulturmedium und Fermentationsmedium, beziehungsweise Medium, sind gegenseitig austauschbar.

**[0051]** Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate, wie z. B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Saccharose-haltige Lösungen aus der Zuckerrüben- oder Zuckerrohrverarbeitung, Stärke, Stärkehydrolysat und Cellulose, Öle und Fette, wie zum Beispiel Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren, wie zum Beispiel Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie zum Beispiel Glycerin, Methanol und Ethanol und organische Säuren, wie zum Beispiel Essigsäure oder Milchsäure verwendet werden.

**[0052]** Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige 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.

**[0053]** Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze verwendet werden.

**[0054]** Das Kulturmedium muß weiterhin Salze, beispielsweise in Form von Chloriden oder Sulfaten von Metallen, wie beispielsweise Natrium, Kalium, Magnesium, Calcium und Eisen enthalten, wie zum Beispiel Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wachstumsstoffe wie Aminosäuren beispielsweise Homoserin und Vitamine, beispielsweise Thiamin, Biotin oder Pantothen säure, zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden.

**[0055]** Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

**[0056]** Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak, beziehungsweise Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Der pH-Wert wird im Allgemeinen auf einen Wert von 6,0 bis 8,5, vorzugsweise 6,5 bis 8, eingestellt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel, wie zum Beispiel Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete, selektiv wirkende Stoffe, wie zum Beispiel Antibiotika, hinzugefügt werden. Die Fermentation wird bevorzugt unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Um diese aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff-haltige Gasmischungen, wie zum Beispiel Luft, in die Kultur eingetragen. Die Verwendung von Flüssigkeiten, die mit Wasserstoffperoxid angereichert sind, ist ebenfalls möglich. Gegebenenfalls wird die Fermentation bei Überdruck, beispielsweise bei einem Überdruck von 0,03 bis 0,2 MPa, gefahren. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C, besonders bevorzugt bei 30° bis 37°C. Bei batch-Verfahren wird die Kultivierung bevorzugt solange fortgesetzt, bis sich eine für die Maßnahme der Gewinnung des gewünschten Metaboliten wie z. B. einer Aminosäure, organischen

Säure, eines Vitamins, oder eines pflanzlichen Wirkstoffs, in ausreichender Menge gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 bis 160 Stunden erreicht. Bei kontinuierlichen Verfahren sind längere Kultivierungszeiten möglich. Durch die Tätigkeit der Mikroorganismen kommt es zu einer Anreicherung (Akkumulation) des Metabolits im Fermentationsmedium und/oder in den Zellen der Mikroorganismen.

**[0057]** Beispiele für geeignete Fermentationsmedien finden sich unter anderem in den Patentschriften 5,770, 409, US 5,990,350, US 5,275,940, WO 2007/012078, US 5,827,698, WO 2009/043803, US 5,756,345 oder US 7,138,266.

**[0058]** Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von Metaboliten können beispielsweise Aminosäuren, organische Säuren, Vitamine, Kohlehydrate oder pflanzliche Wirkstoffe besonders effektiv hergestellt werden.

**[0059]** Vorzugsweise werden mit diesem Verfahren L-Aminosäuren, Nukleotide und pflanzliche Wirkstoffe produziert, besonders bevorzugt L-Lysin.

**[0060]** Gegenstand der Erfindung ist auch ein Rekombinasegen nach SEQ. ID. Nr. 1 und deren Allele, mit einer mindestens 70%igen, vorzugsweise 80%igen, besonders bevorzugt 85%igen, und/oder 90%igen Homologie, insbesondere bevorzugt, einer Homologie, die 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, oder 99% beträgt.

**[0061]** Gegenstand der Erfindung ist auch eine Rekombinase nach SEQ. ID. Nr. 2 und deren homologe Proteine, mit einer Homologie von 95%, 96%, 97%, vorzugsweise von 98% oder 99%.

**[0062]** Weiterhin sind Nukleinsäuren nach den Sequenzen der SEQ. ID. Nr. 33 – SEQ. ID. Nr. 44 Bestandteil der Erfindung, die für Gene kodieren, mit denen besonders produktive Produktionsstämme erhalten werden können und die ursprünglich aus der Zelle zur Identifikation von Mutationen stammen.

**[0063]** Im Folgenden wird die Erfindung im speziellen Beschreibungsteil genauer, jedoch nicht beschränkend, ausgeführt.

**[0064]** Einen Beitrag zur Lösung der gestellten Aufgabe leistet ein Verfahren in dem eine Rekombinase identifiziert und genutzt wird. Um Rekombinasen für biotechnologisch relevante Bakterien wie *Leuconostoc*, *Clostridien*, *Thiobacillus*, *Alcanivorax*, *Azoarcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Acinetobacter*, *Shewaniella* und *Corynebacterium species*, insbesondere *Corynebacterium glutamicum* zu identifizieren, werden Genomdatenbanken nach bekannten Verfahren auf Proteine, die homolog zu bekannten Rekombinasen sind, und von denen eine bessere Funktion im gewünschten Organismus erwartet oder erhofft wird, als die der bekannten Rekombinasen, analysiert. Genomdatenbanken sind frei zugänglich. So zum Beispiel die Datenbank des European Molecular Biology Laboratories (EMBL, Heidelberg, Germany and Cambridge, UK), die Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, Md., USA), die Datenbank des Swiss Institute of Bioinformatics (Swissprot, Geneva, Switzerland), oder die Protein Information Resource Database (PIR, Washington, D.C., USA) und die DNA Data Bank of Japan (DDBJ, 1111 Yata, Mishima, 411-8540, Japan).

**[0065]** Die genannten Datenbanken werden genutzt, um nach Proteinen zu suchen, die homolog zu bereits bekannten Rekombinasen sind (**Fig. 2, c1**), wie zum Beispiel *RecT* aus dem Prophagen *Rac* (*Genetic and molecular analyses of the C-terminal region of the recE gene from the Rac prophage of Escherichia coli K-12 reveal the recT gene*. Clark, A. J., Sharma, V., Brenowitz, S., Chu, C. C., Sandler, S., Satin, L., Templin, A., Berger, I., Cohen, A. J. *Bacteriol.* (1993)), *Beta* aus dem Pagen *Lambda* (Hendrix, R. W. (1999). *All the world's a phage*. *Proc Nat Acad Sc USA* 96: 2192–2197), *gp61* aus *Mycobacteriophage Che9c* oder *gp43* aus *Mycobacteriophage Halo* (*Recombineering mycobacteria and their phages*. van Kessel JC, Marinelli LJ, Hatfull GF. *Nat Rev Microbiol.* 2008 Nov; 6(11): 851–857). Die Suche nach den homologen Proteinen erfolgt mit bekannten Algorithmen und Sequenzanalyseprogrammen nach bekannten Verfahren, die öffentlich zugänglich sind, wie zum Beispiel beschrieben bei Staden (*Nucleic Acids Research* 14, 217–232 (1986)), oder Marck (*Nucleic Acids Research* 16, 1829–1836 (1988)) oder unter Nutzung des GCG Programms von Butler (*Methods of Biochemical Analysis* 39, 74–97 (1998)).

**[0066]** Die erfindungsgemäßen Sequenzen umfassen erfindungsgemäß auch solche Sequenzen, die eine Homologie (auf Aminosäureebene) bzw. Identität (auf Nukleinsäureebene, exklusive der natürlichen Degeneration) größer als 70%, vorzugsweise 80%, mehr bevorzugt 85% (in Bezug auf die Nukleinsäuresequenz) bzw. 90% (auch in Bezug auf die Polypeptide), bevorzugt größer als 91%, 92%, 93% oder 94%, mehr bevorzugt größer als 95% oder 96% und besonders bevorzugt größer als 97%, 98% oder 99% (in Bezug auf beide Arten

von Sequenzen) zu einer dieser Sequenzen aufweisen, sofern die Wirkungsweise bzw. Funktion und Zweck einer solchen Sequenz erhalten bleibt. Der Ausdruck "Homologie" (oder Identität) wie hierin verwendet, kann durch die Gleichung  $H(\%) = [1 - V/X] \times 100$  definiert werden, worin H Homologie bedeutet, X die Gesamtzahl an Nukleobasen/Aminosäuren der Vergleichssequenz ist und V die Anzahl an unterschiedlichen Nukleobasen/Aminosäuren der zu betrachtenden Sequenz, bezogen auf die Vergleichssequenz ist. Auf jeden Fall sind mit dem Begriff Nukleinsäuresequenzen, welche für Polypeptide codieren, alle Sequenzen umfasst, die nach Maßgabe der Degeneration des genetischen Codes möglich erscheinen.

**[0067]** Die prozentuale Identität zu den Aminosäuresequenzen, die in dem Sequenzprotokoll angegeben sind, kann mit im Stand der Technik bekannten Verfahren vom Fachmann ohne weiteres ermittelt werden. Ein geeignetes Programm, das erfindungsgemäß eingesetzt werden kann, ist BLASTP (Altschul et al., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25(17) : 3389–3402).

**[0068]** Die im Sequenzprotokoll angegebenen Sequenzen umfassen erfindungsgemäß auch Nukleinsäuresequenzen, die mit den angegebenen hybridisieren. Anleitungen zur Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (*International Journal of Systematic Bacteriology* 41: 255–260 (1991)). Die Hybridisierung findet unter stringenten Bedingungen statt, das heißt, es werden nur Hybride gebildet, bei denen Sonden, beispielsweise die zum Gen komplementäre Nukleotidsequenz, und Zielsequenz, d. h. die mit der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70% identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschriffe durch Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die Hybridisierungsreaktion wird im Allgemeinen bei relativ niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschriffen durchgeführt (Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996). Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein Puffer entsprechend 5×SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50°C–68°C eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70% Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride sind weniger stabil und werden durch Waschen unter stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise durch Senken der Salzkonzentration auf 2×SSC und gegebenenfalls nachfolgend 0,5×SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine Temperatur von ca. 50°C–68°C, ca. 52°C–68°C, ca. 54°C–68°C, ca. 56°C–68°C, ca. 58°C–68°C, ca. 60°C–68°C, ca. 62°C–68°C, ca. 64°C–68°C, ca. 66°C–68°C eingestellt wird. Vorzugsweise werden die Waschschriffe bei Temperaturen von ca. 62°C–68°C, bevorzugt von 64°C–68°C oder ca. 66°C–68°C, besonders bevorzugt von ca. 66°C–68°C durchgeführt. Es ist gegebenenfalls möglich, die Salzkonzentration bis auf eine Konzentration entsprechend 0,2×SSC oder 0,1×SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1–2°C von 50°C bis 68°C können Polynukleotidfragmente, die für Aminosäuresequenzen kodieren, isoliert werden, die beispielsweise mindestens 70% oder mindestens 80% oder mindestens 90% bis 95% oder mindestens 96% bis 98% oder mindestens 99% Identität zur Sequenz der eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt erhältlich (z. B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No. 1603558).

**[0069]** Die so ermittelte neue DNA Sequenz aus *Corynebacterium aurimucosum*, die das Rekombinasegen recT enthält (SEQ ID No. 1) und für die funktionelle Rekombinase rCau kodiert (SEQ ID No. 2), ist Bestandteil der vorliegenden Erfindung.

**[0070]** Identifizierte Rekombinasen werden in einen Vektor, beispielsweise ein Plasmid, kloniert, der die induzierbare Expression des Rekombinasegens im Wirt, in dem die Rekombination durchgeführt werden soll, erlaubt (Fig. 2, c2.1). Expressionsvektoren sind Stand der Technik. So kann beispielsweise für *Leuconostoc* oder *Lactobacillus* der Vektor pC642 benutzt werden (Construction of theta-type shuttle vector for *Leuconostoc* and other lactic acid bacteria using pC642 isolated from kimchi. Eom HJ, Moon JS, Cho SK, Kim JH, Han NS. *Plasmid.* 2012 Jan; 67(1): 35–43), für Clostridien ptHydA (Girbal L, von Abendroth G, Winkler M, Benton PM, Meynial-Salles I, Croux C, Peters JW, Happe T, Soucaille P (2005) Homologous and heterologous overexpression in *Clostridium acetobutylicum* and characterization of purified clostridial and algal Fe-only hydrogenases with high specific activities. *Appl. Environ Microbiol.* 71: 2777–2781) für *Thiobacillus* pTF-FC2 (Plasmid evolution and interaction between the Plasmid addiction stability systems of two related broad-host-range IncQ-like plasmids. Deane SM, Rawlings DE. *J Bacteriol.* 2004 Apr; 186(7): 2123–33.), für *Alcanivorax* pRED (Appl Microbiol Biotechnol, 2006 Jul; 71(4): 455–62. Functional expression system for cytochrome P450 genes using the reductase domain of self-sufficient P450RhF from *Rhodococcus* sp. NCIMB 9784. Nodate M, Kubota M, Misawa N.), für *Bacillus* pMG (Construction of a modular Plasmid family for chromosomal integration

in *Bacillus subtilis*. Gimpel M, Brantl S. *J Microbiol Methods*. 2012; 91(2): 312–7), für *Pseudomonas* pWWO (Increasing Signal Specificity of the TOL Network of *Pseudomonas putida* mt-2 by Rewiring the Connectivity of the Master Regulator XylR. de Las Heras A, Fraile S, de Lorenzo V. *PLoS Genet*. 2012 Oct; 8(10): e1002963), für *Pantoea* pAGA (Characterization of a small cryptic plasmid from endophytic *Pantoea agglomerans* and its use in the construction of an expression vector. de Lima Procopio RE, Araújo WL, Andreote FD, Azevedo JL. *Genet Mol Biol*. 2011 Jan; 34(1): 103–9), für *Acinetobacter* pRIO-5 (Complete sequence of broad-host-range plasmid pRIO-5 harboring the extended-spectrum- $\beta$ -lactamase gene blaBES. Bonnin RA, Poirel L, Sampaio JL, Nordmann P. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Feb; 56(2): 1116–9), für *Shewanella* pBBR1-MCS (*Shewanella oneidensis*: a new and efficient system for expression and maturation of heterologous [Fe-Fe] hydrogenase from *Chlamydomonas reinhardtii*. Sybirna K, Antoine T, Lindberg P, Fourmond V, Rousset M, Méjean V, Bottin H. *BMC Biotechnol*. 2008 Sep 18; 8: 73), oder für *Corynebacterium* species, insbesondere *C. glutamicum* pZ1 (Menkel et al., *Applied and Environmental Microbiology* (1989) 64: 549–554) oder pCLTON (A tetracycline inducible expression vector for *Corynebacterium glutamicum* allowing tightly regulable gene expression. Lausberg F, Chattopadhyay AR, Heyer A, Eggeling L, Freudl R. *Plasmid*. 2012 68(2): 142–7). Ein Übersichtsartikel zu Expressionsplasmiden in *Corynebacterium glutamicum* ist durch Tauch et al. (*Journal of Biotechnology* 104, 27–40 (2003)) geschrieben.

**[0071]** Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vektoren handelt es sich um die Vektoren pCLTON2-bet (SEQ ID No. 3), pCLTON2-recT (SEQ ID No. 4), pCLTON2-gp43 (SEQ ID No. 5), pCLTON2-gp61 (SEQ ID No. 6), pCLTON2-rCau (SEQ ID No. 7), pEKEx3-recT (SEQ ID No. 8), pEKEx3-bet (SEQ ID No. 9).

**[0072]** Die so hergestellten Vektoren werden auf Aktivität der Rekombinase im jeweiligen Wirt getestet (**Fig. 2, c2**). Der Aktivitätstest umfasst die Herstellung eines Teststamms des Wirts bei dem durch Rekombineering ein einfach zu prüfender Phänotyp hergestellt werden soll (**Fig. 2, c2.1**). Die weiteren Schritte beinhalten die Transformation des Teststamms (**Fig. 2, c2.2**), Induktion der Expression des Rekombinasegens (**Fig. 2, c2.3**), Herstellung kompetenter Zellen zur Aufnahme von linearer DNA (**Fig. 2, c2.4**), Transformation der kompetenten Zellen mit linearer DNA (**Fig. 2, c2.5**), und Test auf Herstellung des Phänotyps (**Fig. 2, c2.6**). Lässt sich der erwartete Phänotyp herstellen, so ist Rekombineering erfolgt. Die einzelnen Schritte, c2.1–c2.6, sind dem Fachmann bekannt. So wird in den Teststamm als einfach zu prüfender Phänotyp (**Fig. 2, c2.1**) beispielsweise ein defektes Antibiotikaresistenzgen in das Chromosom eingebaut, dessen Funktion durch erfolgreiches Rekombineering wiederhergestellt wird. Als Antibiotikaresistenzgene stehen Gene, die Resistenz gegenüber Kanamycin, Chloramphenicol, Hygromycin, Streptomycin, Ampicillin oder Spectinomycin verleihen, zur Verfügung. Auch können Gene verwendet werden, die Wachstum auf einem bestimmten Substrat als Selektionsmarker erlauben, wie beispielsweise das für Galaktokinase kodierende galK Gen. Die Transformation des Teststamms mit dem Rekombinase exprimierenden Testplasmid (**Fig. 2, c2.2**) erfolgt nach bekannten Verfahren, wie zum Beispiel Elektroporation, chemischer Transformation oder ballistischer Transformation. Zur Induktion des Rekombinasegens (**Fig. 2, c2.3**) im Expressionsvektor wird der durch den Vektor vorgegebene Induktor dem Medium zugegeben. Diese Vorgehensweise ist dem Fachmann bekannt, und es handelt sich bei dem Induktor beispielsweise um Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid, Anhydrotetracyclin, Sakacin, oder Acetamid. Die weiteren Schritte, wie die Herstellung kompetenter Zellen (**Fig. 2, c2.4**), die Transformation der Zellen (**Fig. 2, c2.5**) sowie Test auf Herstellung des Phänotyps durch Ausplattieren auf Petrischalen (**Fig. 2, c2.6**), sind mikrobiologische Standardverfahren und ebenfalls dem Fachmann bekannt.

**[0073]** Wird der gewünschte Phänotyp nach dem beschriebenen Verfahren hergestellt, erfolgt anschließend vorzugsweise die Optimierung des Rekombineerings (**Fig. 2, c3**). Dieses umfasst die Variation der Induktionszeit im Bereich von dreißig Minuten bis sechs Stunden, die Variation der zum Rekombineering eingesetzten DNA, und die Variation der Regenerations- und Segregationszeit sowie gegebenenfalls weiterer Parameter, die dem Fachmann bekannt sind.

**[0074]** Bei der zum Rekombineering eingesetzten DNA handelt es sich um Einzelstrang DANN, die durch kommerzielle Anbieter synthetisiert wird, und bis zu 300 Basenpaare lang sein kann. Dabei liegt im Zentrum der DNA die gewünschte in das Chromosom einzuführende Mutation vor, und flankierend dazu enthält die DNA Sequenzen, die zur chromosomalen Sequenz des Wirts homolog sind (US 7,144,734). Die Optimierung beinhaltet den Test von DNA unterschiedlicher Länge. Als DNA wird DNA der Länge von 20–300 Basenpaaren, bevorzugt 100 Basenpaare, eingesetzt. Die Optimierung beinhaltet den Test von DNA in unterschiedlicher Menge, wobei 0,2–30 Mikrogramm zur Transformation, bevorzugt 10 Mikrogramm, eingesetzt werden. Die Optimierung beinhaltet ferner den Test von DANN, die entweder zum Sinnstrang oder zum Gegenstrang homolog ist, wobei bevorzugt die zum Gegenstrang homologe DNA eingesetzt wird (US 7,674,621). Die einzelnen Optimierungsschritte sind dem Fachmann bekannt, und beispielsweise für *E. coli* (Rekombineering: in vivo

genetic engineering in *E. coli*, *S. enterica*, and beyond. Sawitzke JA, Thomason LC, Costantino N, Bubunenko M, Datta S, Court DL. *Methods Enzymol.* 2007; 421: 171–99), *Bacillus subtilis* (*Bacillus subtilis* genome editing using ssDNA with short homology regions. Wang Y, Weng J, Waseem R, Yin X, Zhang R, Shen Q. *Nucleic Acids Res.* 2012 Jul; 40(12): e91), oder *Lactococcus* (High efficiency Rekombinierung in lactic acid bacteria. van Pijkeren JP, Britton RA. *Nucleic Acids Res.* 2012, 40(10): e76) beschrieben.

**[0075]** Zur Durchführung des Rekombinierens zur Gewinnung eines mikrobiellen Produzenten (**Fig. 2**, C1–C4), wird der zu mutierende Genort im Chromosom ausgewählt. Dies können bekannte Gene, Gene unbekannter Funktion oder intergenische Bereiche sein. Bei Produzenten sind es beispielsweise Gene oder Promoterbereiche von Genen, die am Anabolismus oder Katabolismus oder an Regulationsprozessen beteiligt sind, oder solche, die die Halbwertszeit von mRNA oder Proteinen beeinflussen.

**[0076]** Die zur Rekombination benutzte DNA wird synthetisiert oder durch PCR Amplifikation hergestellt. Sie ist 30–3000 Basenpaare lang, und hat die Organisationsstruktur A-B-C. Dabei ist B die im Zentrum liegende gewünschte Mutation. Dies kann bei einer Insertion eine Sequenz von 1–3000 Basenpaaren sein, bevorzugt eine von 1–1000, weiter bevorzugt eine von 1–100, besonders bevorzugt eine von 1. Die Sequenzen A und C sind homolog zu chromosomalen Sequenzen. Sie sind in der synthetisierten DNA jeweils 20–100 Basenpaare lang. Bei einer im Chromosom gewünschten Deletion ist B Null Basenpaare lang, und A und C sind homolog zu Sequenzen im Chromosom, die direkt benachbart zum zu deletierenden Bereich sind. Die Sequenzen A und C sind in der synthetisierten DNA 20–100 Basenpaare lang. Die Deletion im Chromosom kann 1 Basenpaar oder bis zu 10 kb betragen. Zum Austausch von Basen im Chromosom stellt B den auszutauschenden Bereich dar, der 1–50 Basenpaare umfassen kann. Die Sequenzen A und C sind homolog zu chromosomalen Sequenzen, die benachbart zum auszutauschenden Bereich liegen. Sie sind in der synthetisierten DNA 20–100 Basenpaare lang. DNA Synthesen führt beispielsweise Genescript (GenScript USA Inc., 860 Centennial Ave., Piscataway, NJ 08854, USA), oder Eurofins (Eurofins MWG Operon, Anzingerstr. 7a, 85560 Ebersberg, Germany), oder DNA 2.0 (DNC2.0 Headquarters, 1140 O'Brien Drive, Suite A, Menlo Park, CA 94025, USA) durch.

**[0077]** Die synthetisierte oder durch PCR Amplifikation hergestellte DNA wird durch Transformation, in den Mikroorganismus, der die Rekombinase exprimiert und der einen Metabolitsensor enthält, eingebracht (**Fig. 3**, C1). Solche Metabolitsensoren enthaltende Mikroorganismen sind beschrieben (WO2011138006, DPA 102012 016 716.4, DPA 10 2012 017 026.2). Die zur Transformation und Rekombination benutzte DNA ist wie zuvor beschrieben eine definierte DNA Sequenz.

**[0078]** Zur Transformation und Rekombination können aber auch definierte Mischungen verschiedener DNA Sequenzen eingesetzt werden. Diese Mischungen werden bevorzugt beim Austausch von Basen im Chromosom im Bereich „B“ eingesetzt, wo „B“ bei der Organisationsstruktur A-B-C der DNA Sequenz den auszutauschenden Bereich darstellt. So können beispielsweise in einem Gen gleichzeitig in einer Population von Mikroorganismen verschiedene Aminosäuren an einer Position im Polypeptid ausgetauscht werden. Es können auch gleichzeitig verschiedene Aminosäuren an verschiedenen Positionen im Polypeptid ausgetauscht werden. Es können auch gleichzeitig in einem Promotorbereich verschiedene Nukleotide ausgetauscht werden. Die entsprechenden DNA Mischungen können selbst hergestellt werden durch Mischen einzelner definierter DNA Sequenzen, oder bereits beim Hersteller als Mischungen synthetisiert werden, wodurch bis zu mehrere Tausend verschiedener DNA Moleküle in einem Ansatz vorliegen, die auch in einem Ansatz dann zur Transformation und Rekombination (**Fig. 3**, C1) benutzt werden. Solche DNA Mischungen mit verschiedensten Sequenzen können kommerziell bezogen werden. So werden beispielsweise „Combinatorial Libraries“ oder „Controlled Randomized Libraries“ oder „Truncated libraries“ von Life Technologies GmbH, Frankfurter Straße 1298, 64293 Darmstadt angeboten, die direkt zum Rekombinieren eingesetzt werden können.

**[0079]** Zur Transformation und Rekombination können ferner auch undefinierte DNA Sequenzen eingesetzt werden. Beispielsweise genomische DNA aus existierenden Produzenten. Auf diese Weise können DNA Abschnitte und/oder Mutationen und/oder Gene identifiziert werden die förderlich für die Produktbildung sind.

**[0080]** Im Anschluss an die Transformation der Rekombinase- und Nanosensor-enthaltenden Mikroorganismen erfolgt Regeneration in einem Komplexmedium, wie es dem Fachmann bekannt ist und beispielsweise für *E. coli* (Hanahan, D. *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids.* *J Mol Biol.* 1983; 166(4): 557–80), oder *Corynebacterium* (Tauch A, Kirchner O, Löffler B, Götter S, Pühler A, Kalinowski J. *Efficient electrotransformation of corynebacterium diphtheriae with a mini-replicon derived from the Corynebacterium glutamicum plasmid pGC1.* *Curr Microbiol.* 2002; 45(5): 362–7) beschrieben ist. Nach der Regeneration werden die Zellen gegebenenfalls zur Segregation in ein Minimalmedium überführt, worauf entsprechend des erfindungsgemäßen Verfahrens direkt die Produktanalyse in Einzelzellen durch Durchflusszytometrie und Selektion der

Produzenten erfolgt (**Fig. 3, C2**). Die selektierten Einzelzellen werden auf Medium in Petrischalen abgelegt, oder auch unmittelbar in Mikrotiterplatten mit Flüssigmedium zur weiteren Kultivierung abgelegt. Einzelheiten zur Analyse von Zellsuspensionen mittels Durchflusszytometrie können beispielsweise Sack U, Tarnok A, Rothe G (Hrsg): Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie, Basel, Karger, 2007, Seiten 27–70, entnommen werden. Geeignete Durchflusszytometer, die bis zu 100000 Zellen pro Sekunde analysieren und eine Sortiermöglichkeit besitzen, sind beispielsweise das Gerät Aria-III (BD Biosciences, 2350 Qume Drive, San Jose, California, USA, 95131, 877.232.8995) oder das Gerät MoFlo-XDP (Beckman Coulter GmbH, Europark Fichtenhain B 13, 47807 Krefeld, Germany).

**[0081]** Im Anschluss an die Produzentenisolation (**Fig. 3, C3**) erfolgt die Verifizierung der Produktbildungseigenschaften in Schüttelkolben oder Mikrotiterplatten. Der besonders geeignete Produzent wird ausgewählt. Er produziert mehr von dem mikrobiell hergestelltem Produkt als der Ausgangsstamm der in Schritt C1 (**Fig. 3**) zum DNA Transfer eingesetzt wurde. Durch Sequenzierung des Genoms in Bereichen, die durch die im Schritt C1 zugesetzte DNA definiert sind, oder auch des gesamten Chromosoms, oder auch von plasmidkodierter DNA, kann die erfolgte produktsteigernde Mutation identifiziert werden (**Fig. 3, C3.A**). Die entsprechenden Mutationen M1 bis Mm und/oder Gene G1 bis Gn werden gegebenenfalls nach bekannten Verfahren in andere Produzentenstämme transferiert (**Fig. 3, C3.B**), um so einen bereits bestehenden Metabolitproduzenten weiter zu verbessern (**Fig. 3, C3.C**).

**[0082]** Die Erfindung wird nun anhand von Figuren und nicht limitierenden Beispielen näher erläutert.

**[0083]** **Fig. 1:** (links) Die Figur zeigt zum Verständnis der Erfindung eine Darstellung des Ablaufs des Verfahrens nach dem Stand der Technik, nämlich das Prinzip der Herstellung einer chromosomalen Mutation durch die Schritte A1–A8, ausgehend von der Konstruktion eines spezifischen Plasmides (A1) über zwei Selektionsschritte auf Petrischalen (A3–A4), und klonale Kultivierung (A6) bis zum Test auf verbesserte Produktion (A7–A8), sowie (rechts) das Prinzip der Herstellung einer chromosomalen Mutation durch Rekombineering, ausgehend von synthetischer DNA (B1) und Selektion resistenter Klone auf Petrischalen oder gefärbter Klone auf Petrischalen (B2).

**[0084]** **Fig. 2:** Die Figur zeigt die erfindungsgemäße Entwicklung des Rekombineerings für einen für die biotechnologische Produktion niedermolekularer Moleküle relevanten Mikroorganismus. Durch Sequenzanalysen werden Rekombinasen identifiziert (c1), die in geeignete Expressionsvektoren eingebaut werden (c2.1). Nach Schritten, die im Wirt hohe Rekombinaseexpression bewirken und den Wirt zur DNA Aufnahme befähigen (c2.2–c2.4), wird die DNA als Einzelstrang oder Doppelstrang DNA zugegeben (c2.5) und auf einen geeigneten Phänotyp des Teststamms selektioniert (c2.6). Abschließend erfolgt im gesamten Test auf Rekombineering (c2) noch dessen Optimierung (c3).

**[0085]** **Fig. 3:** Das erfindungsgemäße Rekombineering gekoppelt mit zytometrischer Produktanalyse durch Metabolitsensoren zur Isolation mikrobieller Metabolitproduzenten und der weiteren Nutzung so identifizierter Mutationen zur Verbesserung bereits bestehender Metabolitproduzenten. DNA wird zu den Zellen zugegeben (C1), die Rekombinase exprimieren und das Sensorplasmid mit dem Metabolitsensor enthalten. In den Zellen erfolgt durch Rekombinase ein Einbau der zugegebenen DNA mit den mutierten Genen G1–Gn mit den Mutationen M1–Mm. Zellen mit erhöhter Produktbildung und damit erhöhter Fluoreszenz werden mittels Hochdurchsatzdurchflusszytometrie und Selektion (FACS) isoliert (C2), und liefert so eine Zelle zur Identifikation der Mutationen, die zu verbesserter Metabolitbildung führt (C3). Gegebenenfalls stellt diese Zelle auch bereits einen verbesserten Metabolitproduzenten dar. Mit bekannten Verfahren wird das Genom oder Plasmid der aus dem Schritt C3 resultierenden Zelle zur Identifikation der Mutationen M1–Mm in den Genen G1–Gn sequenziert (C3.A), um diese nach bekannten Verfahren (C3.B) in bereits bestehende Metabolitproduzenten zu deren weiterer Verbesserung einzuführen (C3.C).

#### Beispiel 1: Identifizierung einer Rekombinase

**[0086]** Mit der unter der Zugangsnummer CAD61789.1 in der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, Md., USA) hinterlegten Sequenz von RecT aus dem Prophagen Rac von *Escherichia coli* wurde eine Homologiesuche mit dem Programm Blast, BLAST 2.2.27+ durchgeführt (Wheeler, David; Bhagwat, Medha (2007). "Chapter 9, BLAST QuickStart". In Bergman, Nicholas H. Comparative Genomics Volumes 1 and 2. Methods in Molecular Biology. 395–396. Totowa, NJ: Humana Press). Die Homologiesuche erfolgte gegenüber allen Proteinen, die in den Genomen der folgenden Corynebakterien species kodiert sind: *C. accolens*, *C. ammoniagenes*, *C. amycolatum*, *C. aurimucosum*, *C. bovis*, *C. diphtheriae*, *C. efficiens*, *C. genitalium*, *C. glucuronolyticum*, *C. glutamicum*, *C. jeikeium*, *C. kroppenstedtii*, *C. lipophiloflavum*,

*C. matruchotii*, *C. nuruki*, *C. pseudogenitalium*, *C. pseudotuberculosis*, *C. resistens*, *C. striatum*, *C. tuberculostearicum*, *C. ulcerans*, *C. urealyticum* und *C. variabile*.

**[0087]** Als Ergebnis wurde die Sequenz *cauri\_1962* erhalten, die für ein Protein mit einer Länge von 272 Aminosäuren kodiert, wovon 41% identisch und 61% ähnlich zu der Sequenz von RecT sind. Die so ermittelte DNA Sequenz aus *C. aurimucosum*, die das Rekombinasegen *recT* enthält, ist als SEQ ID No. 1 angegeben und die Proteinsequenz als SEQ ID No. 2.

#### Beispiel 2: Klonierung von Rekombinasen

**[0088]** Die Klonierung von Rekombinasen erfolgte im Expressionsvektor pCLTON2 (A tetracycline inducible expression vector for *Corynebacterium glutamicum* allowing tightly regulable gene expression. Lausberg F, Chattopadhyay AR, Heyer A, Eggeling L, Freudl R. *Plasmid*. 2012 68(2): 142–7), sowie im Vektor pEKEx3 (The E2 domain of OdhA of *Corynebacterium glutamicum* has succinyltransferase activity dependent on lipoyl residues of the acetyltransferase AceF. Hoffelder M, Raasch K, van Ooyen J, Eggeling L. *J Bacteriol*. 2010; 192(19): 5203–11).

#### Beispiel 2a: Herstellung von pCLTON2-bet

**[0089]** Zur Klonierung von Bet wurde der Vektor pSIM8 (Rekombineering: in vivo genetic engineering in *E. coli*, *S. enterica*, and beyond. Sawitzke JA, Thomason LC, Costantino N, Bubunenko M, Datta S, Court DL. *Methods Enzymol*. 2007; 421: 171–99) mit dem QIAGEN Plasmid Plus Maxi Kit (Best. Nr. 12963) aus *E. coli* isoliert. Dieses Plasmid diente als Template zur PCR Amplifikation mit den Primerpaaren bet-F und bet-R.

bet-F                            aaggagatatagatATGAGTACTGCACTCGCAAC

bet-R                            TCATGCTGCCACCTTCTGCTC

**[0090]** Das resultierende Fragment von 0,8 kb wurde über Gelisolation mit dem Minielute Extraktions Kit (Best. Nr. 28704) von Quiagen isoliert, mit dem Klenow Fragment aufgefüllt, und anschließend mit T4 Polynukleotidkinase von Fermentas (Best. Nr. EK0031 phosphoryliert. Der Vektor pCLTON2 (A tetracycline inducible expression vector for *Corynebacterium glutamicum* allowing tightly regulable gene expression. Lausberg F, Chattopadhyay AR, Heyer A, Eggeling L, Freudl R. *Plasmid*. 2012 68(2): 142–7) wurde Smal geschnitten und mit Shrimp Alkaline Phosphatase von Fermentas (Best. Nr. EF0511) dephosphoryliert. Das Fragment und der Vektor wurden mit dem Rapid DNA Ligation Kit von Roche (Best. Nr. 11 635 379 001) ligiert, und es wurde *E. coli* DH5 damit transformiert. Transformierte Zellen wurden auf 100 ng/mL Spektinomycin enthaltendes Komplexmedium ausplattiert.

**[0091]** Zum Test auf gewünschte Ligationsprodukte wurde eine Kolonie-PCR mit den Primerpaaren Pcl\_fw und Pcl\_rv-pEKEx2\_fw durchgeführt.

Pcl\_fw                            GTAACTATTGCCGATGATAAGC

Pcl\_rv-pEKEx2\_fw    CGGCGTTTCACTTCTGAGTTCGGC

**[0092]** Aus einem Klon, der ein PCR Produkt der Größe 1,17 kb ergab, wurde im größeren Maßstab Plasmid mit dem QIAGEN Plasmid Plus Maxi Kit (Best. Nr. 12963) präpariert. Das Plasmid wurde als pCLTON2-bet bezeichnet, dessen Sequenz als SEQ ID No. 3 bezeichnet wurde.

#### Beispiel 2b: Herstellung von pCLTON2-recT

**[0093]** Zur Klonierung von *recT* wurde der Vektor pRAC3 (Roles of RecJ, RecO, and RecR in RecET-mediated illegitimate recombination in *Escherichia coli*. Shiraishi K, Hanada K, Iwakura Y, Ikeda H, *J Bacteriol*. 2002 Sep; 184(17): 4715–21) mit dem QIAGEN Plasmid Plus Maxi Kit (Best. Nr. 12963) aus *E. coli* isoliert. Dieses Plasmid diente als Template zur PCR Amplifikation mit den Primerpaaren *recT*-F und *recT*-R.

*recT*-F                            aaggagatatagatATGACTAAGCAACCACCAATC

*recT*-R                            CGGTTATTCTCTGAATTATCG

**[0094]** Das resultierende Fragment von 0,8 kb wurde in Beispiel 2a beschrieben isoliert, mit pCLTON2 ligiert, und E. coli DH5 damit transformiert. Transformierte Zellen wurden auf 100 ng/mL Spektinomycin enthaltendes Komplexmedium ausplattiert.

**[0095]** Der Test auf gewünschte Ligationsprodukte wurde eine Kolonie-PCR wie in Beispiel 2a beschrieben durchgeführt. Aus einem Klon der ein PCR Produkt der Größe 1,194 kb ergab, wurde im größeren Maßstab Plasmid präpariert. Das Plasmid wurde als pCLTON2-recT bezeichnet, dessen Sequenz als SEQ ID No. 4 bezeichnet wurde.

#### Beispiel 2c: Herstellung von pCLTON2-gp43

**[0096]** Zur Klonierung von gp43 wurde das Gen bei Eurofins-MWG-Operon (Anzingerstr. 7a, 85560 Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Die Sequenz des synthetisierten Fragments ist als SEQ ID No. 10 angeführt. Das Fragment wurde als 1407 bp Fragment mit den Restriktionsenzymen BglIII und EcoRI präpariert, mit dem Klenow Fragment behandelt, und anschließend mit T4 Polynukleotidkinase von Fermentas (Best. Nr. EK0031) phosphoryliert. Das Fragment wurde in Beispiel 2a beschrieben isoliert, mit pCLTON2 ligiert, und E. coli DH5 damit transformiert. Transformierte Zellen wurden auf 100 ng/mL Spektinomycin enthaltendes Komplexmedium ausplattiert.

**[0097]** Zum Test auf gewünschte Ligationsprodukte wurde eine Kolonie-PCR wie in Beispiel 2a beschrieben durchgeführt. Aus einem Klon, der ein PCR Produkt der Größe 1,79 kb ergab, wurde im größeren Maßstab Plasmid präpariert. Das Plasmid wurde als pCLTON2-gp43 bezeichnet, dessen Sequenz als SEQ ID No. 5 bezeichnet wurde.

#### Beispiel 2d: Herstellung von pCLTON2-gp61

**[0098]** Zur Klonierung von gp61 wurde das Gen bei Eurofins-MWG-Operon (Anzingerstr. 7a, 85560 Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Die Sequenz des synthetisierten Fragments ist als SEQ ID No. 11 angeführt. Das Fragment wurde als 1082 bp mit den Restriktionsenzymen BglIII und MunI präpariert, mit dem Klenow Fragment behandelt, und anschließend mit T4 Polynukleotidkinase von Fermentas (Best. Nr. EK0031) phosphoryliert. Es wurde in Beispiel 2a beschrieben isoliert, mit pCLTON2 ligiert, und E. coli DH5 damit transformiert. Transformierte Zellen wurden auf 100 ng/mL Spektinomycin enthaltendes Komplexmedium ausplattiert.

**[0099]** Zum Test auf gewünschte Ligationsprodukte wurde eine Kolonie-PCR wie in Beispiel 2a beschrieben durchgeführt. Aus einem Klon, der ein PCR Produkt der Größe 1,45 kb ergab, wurde im größeren Maßstab Plasmid präpariert. Das Plasmid wurde als pCLTON2-gp61 bezeichnet, dessen Sequenz als SEQ ID No. 6 bezeichnet wurde.

#### Beispiel 2e: Herstellung von pCLTON2-rCau

**[0100]** Zur Klonierung von rCau (cauri\_1962) wurde das Gen bei Eurofins-MWG-Operon (Anzingerstr. 7a, 85560 Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Die Sequenz des synthetisierten Fragments ist als SEQ ID No. 1 angeführt. Das Fragment wurde als 839 bp mit den Restriktionsenzymen BglIII und MunI präpariert, mit dem Klenow Fragment behandelt, und anschließend mit T4 Polynukleotidkinase von Fermentas (Best. Nr. EK 0031) phosphoryliert. Es wurde wie in Beispiel 2a beschrieben isoliert, mit pCLTON2 ligiert, und E. coli DH5 damit transformiert. Transformierte Zellen wurden auf 100 ng/mL Spektinomycin enthaltendes Komplexmedium ausplattiert.

**[0101]** Zum Test auf gewünschte Ligationsprodukte wurde eine Kolonie-PCR wie in Beispiel 2a beschrieben durchgeführt. Aus einem Klon, der ein PCR Produkt der Größe 1,22 kb ergab, wurde im größeren Maßstab Plasmid präpariert. Das Plasmid wurde als pCLTON2-rCau bezeichnet, dessen Sequenz als SEQ ID No. 7 bezeichnet wurde.

#### Beispiel 2f: Herstellung von pEKEx3-recT

**[0102]** Zur Klonierung von recT in pEKEx3 wurde als Template zur PCR Amplifikation pCLTON2-recT aus Beispiel 2b eingesetzt. Das Gen wurde mit den Primerpaaren BglIII-RBS-RecT-F und EcoRI-RecT-R amplifiziert.



BgIII-RBS-RecT-F gcgatctaaggagatatacatATGACTAAGCAACCACCAATCG  
 EcoRI-RecT-R gcggaattccaggCTGAATTATTCCTC

**[0103]** Das resultierende Fragment von 0,84 kb wurde über Gelisolierung mit dem Miniolute Extraktions KIT (Best. Nr. 28704) von Quiagen isoliert, mit dem Klenow Fragment behandelt, und anschließend mit T4 Polynukleotidkinase von Fermentas (Best. Nr. EK003) phosphoryliert. Der Vektor pEKEx3 wurde mit EcoRI und BamHI geschnitten, und das resultierende Fragment von 8298 bp mit Shrimp Alkaline Phosphatase von Fermentas (Best. Nr. EF0511) dephosphoryliert. Das Fragment und der Vektor wurden mit dem Rapid DNA Ligation Kit von Roche (Best. Nr. 11 635 379 001) ligiert, und es wurde E. coli DH5 damit transformiert. Transformierte Zellen wurden auf 100 ng/mL Spektinomycin enthaltendes Komplexmedium ausplattiert.

**[0104]** Zum Test auf gewünschte Ligationsprodukte wurde eine Kolonie-PCR mit den Primerpaaren col-pEKEx3-F und col-pEKEx3-R durchgeführt.

col-pEKEx3-F CGCCGACATCATAACGGTTCTG  
 col-pEKEx3-R TTATCAGACCGCTTCTGCGTTC

**[0105]** Aus einem Klon, der ein PCR Produkt der Größe 1,71 kb ergab, wurde im größeren Maßstab Plasmid mit dem QIAGEN Plasmid Plus Maxi Kit (Best. Nr. 12963) präpariert. Das Plasmid wurde als pEKEx3-recT bezeichnet, dessen Sequenz als SEQ ID No. 8 bezeichnet wurde.

#### Beispiel 2g: Herstellung von pEKEx3-bet

**[0106]** Zur Klonierung der Rekombinase Bet wurde als Template zur PCR Amplifikation pCLTON2-rCau aus Beispiel 2e eingesetzt. Das Gen wurde mit den Primerpaaren BgIII-RBS-bet-F und EcoRI-bet-R amplifiziert.

BgIII-RBS-bet-F cggcagatctaaggagatatacatATGAGTACTGCACTCGCAAC  
 EcoRI-bet-R gcggaattCATGCTGCCACCTTCTGC

**[0107]** Das resultierende Fragment von 0,81 kb wurde über Gelisolierung mit dem Miniolute Extraktions Kit (Best. Nr. 28704) von Quiagen isoliert, mit dem Klenow Fragment behandelt, und anschließend mit T4 Polynukleotidkinase von Fermentas (Best. Nr. EK0031) phosphoryliert. Der Vektor pEKEx3 wurde mit EcoRI und BamHI geschnitten, und das resultierende Fragment von 8298 bp mit Shrimp Alkaline Phosphatase von Fermentas (Best. Nr. EF0511) dephosphoryliert. Das Fragment und der Vektor wurden mit dem Rapid DNA Ligation Kit von Roche (Best. Nr. 11 635 379 001) ligiert, und es wurde E. coli DH5 damit transformiert. Transformierte Zellen wurden auf 100 ng/mL Spektinomycin enthaltendes Komplexmedium ausplattiert.

**[0108]** Zum Test auf gewünschte Ligationsprodukte wurde wie in Beispiel 2e eine Kolonie-PCR mit den Primerpaaren col-pEKEx3-F und col-pEKEx3-r durchgeführt. Aus einem Klon, der ein PCR Produkt der Größe 1,08 kb ergab, wurde im größeren Maßstab Plasmid mit dem QIAGEN Plasmid Plus Maxi Kit (Best. Nr. 12963) präpariert. Das Plasmid wurde als pE-KEx3-bet bezeichnet, dessen Sequenz als SEQ ID No. 9 bezeichnet wurde.

#### Beispiel 3: Herstellung eines Teststammes

**[0109]** Um eine nicht funktionale Kopie eines Kanamycinresistenz-verleihenden Gens in das Chromosom von *C. glutamicum* ATCC13032 einzubauen, wurde zunächst mit den Primerpaaren Scal-KanR-F/Kan(-)-L-R und Muni-R-R/Kan(-)-R-F zwei zu fusionierende PCR-Fragmente mit dem Vektor pJC1 (Cremer J, Treptow C, Eggeling L, Sahn H. Regulation of enzymes of lysine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. J Gen Microbiol. 1988; 134(12): 3221–9) als template hergestellt.

Scal-KanR-F CGAGTACTACAAACGCGGCCATAAC  
 Kan(-)-L-R GTCGGAAGAGGCATAGAATTCCGTCAGCCAGTTTAG  
 Kan(-)-R-F GCTGACGGAATTCTATGCCTCTTCCGACCATC  
 Muni-R-R ATACAATTGAACAAAGCCGCGTCC

**[0110]** Beide resultierenden PCR-Fragmente wurden mit dem Miniolute Extraktions Kit (Best. Nr. 28704) von Quiagen aufgereinigt und in einer Fusions-PCR mit den Primerpaaren Scal-KanR-F/MunI-R-R zum defekten Kanamycinresistenzgen fusioniert. Dies enthält in Position 234 als zusätzliches Nukleotid ein Cytosin, wodurch ein frame-shift vorliegt und das Gen nicht vollständig abgelesen wird. Das entstandene Produkt wurde mit Scal und MunI restringiert und anschließend in den EcoRI und Scal geschnittenen pK18mobsacB-lysOP7 (Acetohydroxyacid synthase, a novel target for improvement of L-lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. Blombach B, Hans S, Bathe B, Eikmanns BJ. *Appl Environ Microbiol.* 2009 Jan; 75(2): 419–427) kloniert. In diesem Vektor ist das defekte Kanamycinresistenzgen von zwei nicht-codierenden Bereichen des *C. glutamicum* Genoms flankiert, über welche die homologe Integration in das Genom erfolgt. Anschließend wurde die gesamte Kasette in das *C. glutamicum* Genom zwischen Position 1.045.503 bis 1.045.596 nach bekannten Verfahren über zweifach positive Selektion integriert (Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A *Gene.* 1994 Jul 22; 145(1): 69–73). Die korrekte Integration des defekten Kanamycinresistenzgens in das Chromosom wurde mit den Primerpaaren colNCR-L2 und colNCR-R2 überprüft. Die Größe des PCR-Fragments betrug 3937 bp.

colNCR-L2: CATTGGTCACCTTTGGCGTGTGG

colNCR-R2: AATCAATGAGCGCCGTGAAGAAGG

#### Beispiel 4: Test auf Rekombinaseaktivität

**[0111]** Die Transformation des Teststammes erfolgte wie bei Tauch et al. für *Corynebacterium diphtheriae* and *C. glutamicum* beschrieben (Efficient electrotransformation of *Corynebacterium diphtheriae* with a mini-replicon derived from the *Corynebacterium glutamicum* plasmid pGC1. Tauch A, Kirchner O, Löffler B, Götter S, Pühler A, Kalinowski J. *Curr Microbiol.* 2002 Nov; 45(5): 362–367). Der Stamm wurde kompetent gemacht und jeweils 0.5 Mikrogramm des für die Rekombinase kodierenden Vektors zur Elektroporation eingesetzt. Spektinomycinresistente Klone wurden auf dem Komplexmedium Brain-Heart-Infusion-Sorbitol, BHIS, (High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells. Liebl W, Bayerl A, Schein B, Stillner U, Schleifer KH. *FEMS Microbiol Lett.* 1989 Dec; 53(3): 299–303), das 100 Mikrogramm Spektinomycin (BHIS-Spec100) enthielt, selektiert.

**[0112]** Jeweils ein Klon des Teststammes, der den Vektor pCLTON2-bet, pCLTON2-recT, pCLTON2-gp43, pCLTON2-gp61, pCLTON2-rCau, pEKEx3-recT, bzw. pEKEx3-bet enthielt, wurde in 50 ml BHIS-Spec100 angeimpft und über Nacht bei 130 rpm und 30°C im Erlenmeyerkolben kultiviert. Am nächsten Morgen wurden 500 ml BHIS-Spec100 + IPTG (0,5 mM bei Verwendung von pEKEx3-recT, pEKEx3-bet) oder Tetrazyklin (250 ng/ml bei Verwendung von pCLTON2-bet, pCLTON2-recT, pCLTON2-gp43, pCLTON2-gp61, pCLTON2-rCau) mit 10 ml aus dem über Nacht inkubierten Medium angeimpft und für 4 bis 6 h bis zum Erreichen einer CD von 1,5 bis 2 kultiviert. Anschließend wurde die Kultur für 30 min auf Eis gekühlt, zweimal mit 50 ml 10% Glycerin, 1 mM Tris pH 8 und anschließend zweimal mit 10% Glycerin gewaschen. Das Zellpellet wurde im Rücklauf und zusätzlichen 1 ml Glycerin 10% resuspendiert, zu je 150 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum Gebrauch bei –75°C gelagert. Zum Gebrauch wurden die Zellen innerhalb von 20 min schonend auf Eis aufgetaut, und mit 1 µg DNA gemischt.

**[0113]** Als DNA wurde das oligo Kan100\*, mit der Sequenz ATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTT-GATGGTCCGAAGAGGCATAAATTCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGC eingesetzt. Diese DNA wurde bei Eurofins-MWG-Operon (Anzingerstr. 7a, 85560 Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

**[0114]** Die Suspension aus Zellen und 1 Mikrogramm DNA wurde in Elektroporationsküvetten übertragen und mit 800 µl eiskaltem 10% Glycerin vorsichtig überschichtet und anschließend elektroporiert. Zur Regeneration wurden die Zellen sofort in 4 ml auf 46°C vortemperiertes BHIS überführt und für 6 min bei 46°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine 1 bis 6 stündige Kultivierung bei 30°C und 170 rpm im 15 ml Falcon. Danach wurden die Zellen auf BHIS, das 50 Mikrogramm pro Milliliter Kanamycin enthielt, übertragen. Das Ergebnis ist in Tabelle 1 dargestellt. Es zeigt sich, dass pro Ansatz maximal 57 Zellen spontan Kanamycin resistent sind, die höchste Rekombinationsfrequenz von 20054 Klonen wurde mit pEKEx3-recT erhalten, und abnehmende Rekombinaseaktivität mit pCLTON2-recT, pEKEx3-bet, pCLTON2-rCau, und pCLTON2-gp61. Die Rekombinaseaktivität mit pCLTON2-gp43 liegt kaum über dem Hintergrund, und pCLTON2-bet ist nicht aktiv.

## Beispiel 5: Optimierung der Rekombinaseaktivität

**[0115]** Der Teststamm mit pEKEx3-recT wurde in 50 ml BHIS-Spec100 angeimpft und über Nacht bei 130 rpm und 30°C im Erlenmeyerkolben kultiviert. Am nächsten Morgen wurden 500 ml BHIS-Spec100 + 0,5 mM IPTG mit 10 ml aus dem über Nacht inkubierten Medium angeimpft und 0, 1, oder 4 Stunden kultiviert. Der Teststamm mit pCLTON2-recT wurde in 50 ml BHIS-Spec100 angeimpft und über Nacht bei 130 rpm und 30°C im Erlenmeyerkolben kultiviert. Am nächsten Morgen wurden 500 ml BHIS-Spec100 + 250 Nanogramm Tetracyclin mit 10 ml aus dem über Nacht inkubierten Medium angeimpft und 0, 1, oder 4 Stunden kultiviert. Anschließend wurde die Kultur für 30 min auf Eis gekühlt, zweimal mit 50 ml 10% Glycerin, 1 mM Tris pH 8 und anschließend zweimal mit 10% Glycerin gewaschen. Das Zellpellet wurde im Rücklauf und zusätzlichen 1 ml Glycerin 10% resuspendiert, zu je 150 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum Gebrauch bei -75°C gelagert. Zum Gebrauch wurden die Zellen innerhalb von 20 min schonend auf Eis aufgetaut, und mit 1 Mikrogramm DNA gemischt.

**[0116]** Die Elektroporation und Regeneration erfolgte wie in Beispiel 4 beschrieben. Tabelle 2 zeigt, dass nach 4 Stunden Induktion bei Nutzung der Rekombinase recT im Vektor pEKEx3-recT maximale Rekombinationsfrequenz vorliegt.

**[0117]** Zur weiteren Optimierung wurden Zellen des Teststamm mit pEKEx3-recT wie zuvor benutzt, aber steigende Mengen an DNA zugesetzt. Tabelle 3 zeigt, dass bei Nutzung der Rekombinase recT im Vektor pEKEx3-recT bei einer Konzentration von 10 Mikrogramm DNA maximale Rekombinationsfrequenz vorliegt.

Beispiel 6: Gewinnung eines Lysinproduzenten durch Rekombinierung im lysC Gen mit einem DNA Molekül

**[0118]** Zur direkten Isolation eines vermehrt Lysin produzierenden Stammes, ausgehend von einem Ausgangsstamm, wurde *C. glutamicum* ATCC13032 mit dem Nanosensor pSenLys transformiert. Der Nanosensor pSenLys ist in WO2011138006 beschrieben. Zellen des resultierenden Stammes wurden mit pEKEx3-recT transformiert und die Rekombinase wurde induziert, wie im Beispiel 4 beschrieben. Die DNA lysC-100\* wurde synthetisiert bei Eurofins-MWG-Operon (Anzingerstr. 7a, 85560 Ebersberg, Deutschland). Sie ist als SEQ ID No. 32 hinterlegt.

lysC-100\*:

TCTTCAAGATCTCCATCGCGCGGGCGGCCGTCGGAACGAGGGCAGGTGAAGATGATATC  
GGTGGTGCCGTCTTCTACAGAAGAGACGTTCTGCAGAACCAT

**[0119]** 10 Mikrogramm der DNA lysC-100\* wurden durch Elektroporation, wie in Beispiel 4 beschrieben, in den Stamm transferiert (**Fig. 1, C1**). Anschließend erfolgte Regeneration des Stammes für 4 Stunden in BHIS 100 Mikrogramm pro Milliliter Spektinomycin. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und in 700 Mikroliter CGXII-Glukose resuspendiert. Dieses Minimalmedium ist bei Keilhauer et al. beschrieben (Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the ilvB-ilvN-ilvC operon. Keilhauer C, Eggeling L, Sahn H. J Bacteriol. 1993 Sep; 175(17): 5595–603). Die Zellen wurden bis zum Erreichen der stationären Phase für 40 Stunden bei 30 Grad Celsius inkubiert. Danach wurde 1:10 in neues CGXII-Glukose Medium überimpft, 4 Stunden inkubiert, und die Zellsuspension der zytometrischen Produktanalyse und Selektion von Einzelzellen zugeführt (**Fig. 2, C2**).

**[0120]** Zur durchflusszytometrischen Analyse und Sortierung der Zellen mit hoher Fluoreszenz wurde die Zellsuspension in CGXII-Glukose Medium auf eine optische Dichte unter 0,1 eingestellt, und unmittelbar dem ARIA II high-speed cell sorter (Becton Dickinson GmbH, Tullastr. 8–12, 69126 Heidelberg) zugeführt. Die Analyse erfolgte mit den Anregungswellenlängen von 488 und 633 nm und die Detektion bei den Emissionswellenlängen von 530 ± 15 nm und 660 ± 10 nm bei einem Probedruck von 70 psi. Die Daten wurden mit der zum Gerät gehörenden Software-Version BD DIVA 6.1.3 analysiert. Das elektronische gating wurde anhand des forward und backward scatters eingestellt, um nicht-bakterielle Partikel auszuschließen. Um EYFP-positive Zellen zu sortieren, wurde die nächste Stufe des elektronischen gatings gewählt, um nicht-fluoreszierende Zellen auszuschließen. Auf diese Weise wurden 51 fluoreszierende Zellen auf Petrischalen, die BHIS Medium enthielten, aussortiert.

**[0121]** Die Petrischale wurde 30 Stunden bei 30 Grad Celsius inkubiert, und anschließend wurde mit je einem Klon eines der 46 Reaktionsgefäße der Mikrotiterplatte Flowerplate (48-well) des BioLector Kultivierungssystems beimpft (m2plabs GmbH, Aachen, Germany). Jedes Reaktionsgefäß enthielt 0,7 Mikroliter CGXII-Gluko-

se. Eines der Reaktionsgefäße wurde mit einer Negativkontrolle, und eines mit einer Positivkontrolle beimpft. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte bei 30°C, 1200 UpM, Schüttelradius 3 mm 2 Tage inkubiert. In dem BioLector Kultivierungssystem wurde online das Wachstum als Streulicht bei 620 nm aufgezeichnet, sowie die Fluoreszenz der Kultur bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm kontinuierlich aufgezeichnet.

**[0122]** Nach 2 Tagen wurde die spezifische Fluoreszenz der Kulturen aus den aufgezeichneten Daten ermittelt. Sie war in 33 klonalen Kulturen mindestens vierfach gegenüber der Negativkontrolle erhöht. Von 12 dieser Kulturen wurde die *lysC* Sequenz im Genom bestimmt. In allen Fällen war das Cytosin in Position 932 des Gens gegen ein Thymin ausgetauscht. Die Sequenz entsprach somit dem Sequenzbereich der auf dem synthetisierten oligo *lysC-100\** vorlag und zur Lysinbildung bei *C. glutamicum* führt (Binder et al. Genome Biology 2012, 13: R40).

Beispiel 7: Gewinnung eines Lysinproduzenten durch Rekombineering  
im *murE* Gen mit mehreren DNA Molekülen gleichzeitig

**[0123]** Zur direkten Isolation eines vermehrt Lysin produzierenden Stammes, ausgehend von einem Ausgangsstamm durch *murE* Mutationen, wurde der in Beispiel 6 beschriebene Ausgangsstamm *C. glutamicum* ATCC13032 mit *pSenLys* und *pKEEx3-recT* benutzt. Die einzelnen *murE* DNA oligos wurden durch Eurofins-MWG-Operon (Anzingerstr. 7a, 85560 Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Es wurden folgende *murE* Sequenzen benutzt: *murEG81amb\**, SEQ ID No. 12; *murEG81A\**, SEQ ID No. 13; *murEG81C\**, SEQ ID No. 14; *murEG81D\**, SEQ ID No. 15; *murEG81E\**, SEQ ID No. 16; *murEG81F\**, SEQ ID No. 17; *murEG81H\**, SEQ ID No. 18; *murEG81I\**, SEQ ID No. 19; *murEG81K\**, SEQ ID No. 20; *murEG81L\**, SEQ ID No. 21; *murEG81M\**, SEQ ID No. 22; *murEG81N\**, SEQ ID No. 23; *murEG81P\**, SEQ ID No. 24; *murEG81Q\**, SEQ ID No. 25; *murEG81R\**, SEQ ID No. 26; *murEG81S\**, SEQ ID No. 27; *murEG81T\**, SEQ ID No. 28; *murEG81V\**, SEQ ID No. 29; *murEG81W\**, SEQ ID No. 30; *murEG81Y\**, SEQ ID No. 31.

**[0124]** Je 1 Mikrogramm dieser DNA oligos wurde entnommen, und die resultierenden 20 Mikrogramm mit einem Aliquot Zellen vermischt und durch Elektroporation wie in Beispiel 4 beschrieben in den Stamm transferiert (**Fig. 2, C1**). Anschließend erfolgte Regeneration der Zellen mit den anschließenden Kultivierungen und der durchflusszytometrischen Analyse und Sortierung der Zellen (**Fig. 2, C2**) wie in Beispiel 5 beschrieben.

**[0125]** Auf diese Weise wurden 62 fluoreszierende Zellen auf Petrischalen, die BHIS Medium enthielten, ausgesortiert. Die Petrischale wurde 30 Stunden bei 30 Grad Celsius inkubiert, und anschließend wurde mit je einem Klon eines der 46 Reaktionsgefäße der Mikrotiterplatte Flowerplate (48-well) des BioLector Kultivierungssystems beimpft (m2plabs GmbH, Aachen, Germany). Jedes Reaktionsgefäß enthielt 0,7 Mikroliter CGXII-Glukose. Eines der Reaktionsgefäße wurde mit einer Negativkontrolle, und eines mit einer Positivkontrolle beimpft. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte bei 30°C, 1200 UpM, Schüttelradius 3 mm 2 Tage inkubiert. In dem BioLector Kultivierungssystem wurde online das Wachstum als Streulicht bei 620 nm aufgezeichnet, sowie die Fluoreszenz der Kultur bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm kontinuierlich aufgezeichnet.

**[0126]** Nach 2 Tagen wurde die spezifische Fluoreszenz der Kulturen aus den aufgezeichneten Daten ermittelt. Sie war in 33 klonalen Kulturen mindestens zwölffach gegenüber der Negativkontrolle erhöht. Von 21 Kulturen erfolgte zur Verifizierung der Produktbildung (**Fig. 2, C3**) noch eine L-Lysinbestimmung im Medium. Die Lysinbestimmung erfolgte als o-Phthaldialdehyd Derivat mittels Hochdruckflüssigchromatografie mit einem uHPLC 1290 Infinity system (Agilent) auf einer Zorbax Eclipse AAA C18 3.5 micron 4.6 × 75 mm Reversed Phase Säule und einem Fluoreszenzdetektor. Als Eluent wurde ein Gradient aus 0.01 M Na-Borat pH 8.2 mit steigender Methanolkonzentration benutzt und Detektion der fluoreszierenden Isoindolderivate erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 230 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm. Es wurden die in Tabelle 4 gezeigten L-Lysinwerte bestimmt, die gegenüber dem Ausgangsstamm eine Verbesserung der L-Lysinbildung zeigen.

**[0127]** Von diesen 21 Klonen wurde die *murE* Sequenz im Genom bestimmt. Die Sequenzierung erfolgte nach PCR Amplifikation bei dem Unternehmen Eurofins-MWG-Operon (Anzingerstr. 7a, 85560 Ebersberg, Deutschland). Die erhaltenen Mutationen sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Es zeigt sich, dass auf diese Weise 10 verschiedene *murE* Mutationen ausgehend von Ausgangsstamm erhalten wurden, von denen neun zu einer erhöhten Lysinbildung gegenüber dem Ausgangsstamm führten. Die Sequenzen der erhaltenen *murE* Allele sind SEQ ID No. 33, *murEG81W*; SEQ ID No. 34, *murEG81Y*; SEQ ID No. 35, *murEG81N*; SEQ ID No. 36, *murEG81C*; SEQ ID No. 37, *murEG81S*; SEQ ID No. 38, *murEG81F*; SEQ ID No. 39, *murEG81V*; SEQ

ID No. 40, murEG81L; SEQ ID No. 41, murEG81H; SEQ ID No. 42, murEG81I; SEQ ID No. 43, murEG81T; und SEQ ID No. 44, murEG81R.

Tabelle 1. Vergleich von Rekombinaseaktivitäten in *Corynebacterium glutamicum*

Vektor	cfu <sup>a</sup> (rec)	cfu (spont)
pCLTON2-bet	8	0
pCLTON2-recT	12513	31
pCLTON2-gp43	97	57
pCLTON2-gp61	306	1
pCLTON2-rCau	2475	7
pEKEx3-recT	20054	44
pEKEx3-bet	6491	12

<sup>a</sup> cfu (rec) gibt die Anzahl Kanamycin resistenter Klone die durch Rekombineering mit dem Kan\* oligo entstanden sind, an; cfu (spont) ist die Anzahl spontan Kanamycin resistenter Klone die aus einem Kontrollansatz, der Wasser anstelle des Kan\* oligos enthielt, hervorgegangen sind. Es ist deutlich zu erkennen, dass mit der Rekombinase recT in pEKEx3-recT oder auch pCLTON2-recT hohe Rekombinationseffizienz erreicht wird. Auch mit der Rekombinase rCau aus *Corynebacterium aurimucosum* wird sehr hohe Rekombinationseffizienz erreicht, die deutlich über derjenigen spontan resistenter Klone liegt.

Tabelle 2. Vergleich von Rekombinaseaktivitäten nach unterschiedlicher Induktionszeit

Vektor	Induktionszeit (h)	cfu <sup>a</sup> (rec)	cfu (spont)
pCLTON2-recT	0	101	2
pCLTON2-recT	1	816	1
pCLTON2-recT	4	8831	6
pEKEx3-recT	0	1238	6
pEKEx3-recT	1	53460	7
pEKEx3-recT	4	33165	7

<sup>a</sup> cfu (rec) und cfu (spont) wie in Tabelle 1. Der Einfluss der Induktionszeit zur Expression der Rekombinase auf Rekombinationseffizienz ist deutlich zu erkennen.

Tabelle 3. Vergleich von Rekombinaseaktivitäten bei Einsatz unterschiedlicher DNA Menge

Vektor	Menge (µg)	cfu (rec)
pEKEx3-recT	0	13
pEKEx3-recT	0,05	1139
pEKEx3-recT	0,1	2673
pEKEx3-recT	0,5	25080
pEKEx3-recT	1	15840
pEKEx3-recT	5	301950
pEKEx3-recT	10	950400
pEKEx3-recT	25	940500
pEKEx3-recT	50	871200
pEKEx3-recT	100	831600

<sup>a</sup> cfu (rec) und cfu (spont) wie in Tabelle 1. Es ist deutlich zu erkennen, wie die zum Rekombineeringansatz zugegebene DNA Menge die Rekombineeringfrequenz erhöht. Bei etwa 10 Mikrogramm DNA ist die maximale Rekombineeringfrequenz erreicht.

Tabelle 4. Ergebnis der Sequenzierung von murE Allelen in Klonen, die durch Rekombineering und direkte zytometrische Produktanalyse durch den Nanosensor (Fig. 3) und nach Verifizierung (Fig. 3, C3.B) erhalten wurden, sowie deren Lysinbildung und Fluoreszenz in Kulturen.

Stamm	murE Codon 241–243	MurE Aminosäure 81	Fluoreszenz (AU)	Lysin (mM)
Ausgangsstamm	GGA	(G) Glycin	0,07	0
1.4	TGG	(W) Tryptophan	1,80	11
1.6	TAC	(Y) Tyrosin	1,17	9
1.7	AAC	(N) Asparagin	0,73	5
1.24	TTC	(F) Phenylalanin	1,36	8
1.25	TGC	(C) Cystein	1,08	7
1.34	CTG	(L) Leucin	1,83	12
11.1	CAC	(H) Histidin	0,46	1
11.4	GTG	(V) Valin	1,47	9
11.5	ACC	(T) Threonin	0,47	1
11.24	ATC	(I) Isoleucin	1,85	10
11.23	CGC	(R) Arginin	2,05	10

Sequenzen gemäß Sequenzprotokoll:

SEQ ID	Name
SEQ ID No. 1	Rekombinasegen
SEQ ID No. 2	Rekombinase
SEQ ID No. 3	pCLTON2-bet
SEQ ID No. 4	pCLTON2-recT
SEQ ID No. 5	pCLTON2-gp43
SEQ ID No. 6	pCLTON2-gp61
SEQ ID No. 7	pCLTON2-rCau
SEQ ID No. 8	pEKEx3-recT
SEQ ID No. 9	pEKEx3-bet
SEQ ID No. 10	gp43 adaptiert
SEQ ID No. 11	gp61 adaptiert
SEQ ID No. 12	murEG81amb*
SEQ ID No. 13	murEG81A*
SEQ ID No. 14	murEG81C*
SEQ ID No. 15	murEG81D*
SEQ ID No. 16	murEG81E*
SEQ ID No. 17	murEG81F*
SEQ ID No. 18	murEG81H*
SEQ ID No. 19	murEG81I*

SEQ ID No. 20	murEG81K*
SEQ ID No. 21	murEG81L*
SEQ ID No. 22	murEG81M*
SEQ ID No. 23	murEG81N*
SEQ ID No. 24	murEG81P*
SEQ ID No. 25	murEG81Q*
SEQ ID No. 26	murEG81R*
SEQ ID No. 27	murEG81S*
SEQ ID No. 28	murEG81T*
SEQ ID No. 29	murEG81V*
SEQ ID No. 30	murEG81W*
SEQ ID No. 31	murEG81Y*
SEQ ID No. 32	lysC-100*
SEQ ID No. 33	murEG81W
SEQ ID No. 34	murEG81Y
SEQ ID No. 35	murEG81N
SEQ ID No. 36	murEG81C
SEQ ID No. 37	murEG81S
SEQ ID No. 38	murEG81F
SEQ ID No. 39	murEG81V
SEQ ID No. 40	murEG81L
SEQ ID No. 41	murEG81H
SEQ ID No. 42	murEG81I
SEQ ID No. 43	murEG81T
SEQ ID No. 44	murEG81R

**Es folgt ein Sequenzprotokoll nach WIPO St. 25. Dieses kann von der amtlichen Veröffentlichungsplattform des DPMA heruntergeladen werden.**

**ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG**

*Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.*

**Zitierte Patentliteratur**

- EP 1070132 B1 [0002]
- WO 2008/006680 A8 [0002, 0007]
- CA 2097512 C1 [0002]
- CA 2297613 C1 [0002]
- WO 2009/071878 C1 [0002]
- WO 2011/064393 C1 [0002]
- EP 0668359 C1 [0002]
- EP 0450491 C1 [0002]
- EP 0366922 B1 [0002]
- EP 086190201 [0002]
- US 3642575 A [0002]
- WO 1996/032490 C1 [0002]
- WO 1993/021338 C1 [0002]
- WO 2009/088404 C1 [0002]
- EP 2007/055394 [0002]
- JP 2009-284905 A [0002]
- WO 2011/069105 C2 [0002]
- WO 2008/137406 C1 [0002]
- WO 2003076452 C2 [0007]
- US 6025190 [0007]
- US 8293514 [0007]
- US 8257943 [0007]
- US 8216820 [0007]
- EP 2386650 C1 [0007]
- WO 2011138006 [0011, 0013, 0077, 0118]
- US 5990350 [0057]
- US 5275940 [0057]
- WO 2007/012078 [0057]
- US 5827698 [0057]
- WO 2009/043803 [0057]
- US 5756345 [0057]
- US 7138266 [0057]
- US 7144734 [0074]
- US 7674621 [0074]

**Zitierte Nicht-Patentliteratur**

- Marienhagen J, Bott M, 2012, J Biotechnol., doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.06.001 [0002]
- Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the Escherichia coli plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of Corynebacterium glutamicum. Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A. Gene. 1994 Jul 22; 145(1): 69–73 [0006]
- Allelic exchange in Pseudomonas aeruginosa using novel ColE1-type vectors and a family of cassettes containing a portable oriT and the counter-selectable Bacillus subtilis sacB marker. Schweizer HP. Mol Microbiol. 1992 May; 6(9): 1195–204 [0006]
- Construction of a modular plasmid family for chromosomal integration in Bacillus subtilis. Gimpel M, Brantl S. J Microbiol. Methods. 2012 Nov; 91(2): 312–7 [0006]
- Novel system for efficient isolation of clostridium double-crossover allelic exchange mutants enabling markerless chromosomal gene deletions and DNA integration. Al-Hinai MA, Fast AG, Papoutsakis ET. Appl. Environ Microbiol. 2012 Nov; 78(22): 8112–21 [0006]
- Schäfer et al., Gene 145, 69–73 (1994) [0007]
- Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution. Wang HH, Isaacs FJ, Carr PA, Sun ZZ, Xu G, Forest CR, Church GM. Nature. 2009; 460(7257): 894–8 [0008]
- Rekombineering: in vivo genetic engineering in E. coli, S. enterica, and beyond. Sawitzke JA, Thomason LC, Costantino N, Bubunenko M, Datta S, Court DL. Methods Enzymol. 2007; 421: 171–99 [0010]
- Rekombineering: in vivo genetic engineering in E. coli, S. enterica, and beyond. Sawitzke JA, Thomason LC, Costantino N, Bubunenko M, Datta S, Court DL. Methods Enzymol. 2007; 421: 171–99 [0010]
- Rekombineering: in vivo genetic engineering in E. coli, S. enterica, and beyond. Sawitzke JA, Thomason LC, Costantino N, Bubunenko M, Datta S, Court DL. Methods Enzymol. 2007; 421: 171–99 [0010]
- Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution. Wang HH, Isaacs FJ, Carr PA, Sun ZZ, Xu G, Forest CR, Church GM. Nature. 2009; 460(7257): 894–8 [0010]
- A high-throughput approach to identify genomic variants of bacterial metabolite producers at the single-cell level. Binder S, Schendzielorz G, Stähler N, Krumbach K, Hoffmann K, Bott M, Eggeling L. Genome Biol. 2012 May 28; 13(5): R40 [0012]
- Engineering microbial biofuel tolerance and export using efflux pumps. Dunlop MJ, Dossani ZY, Szmidski HL, Chu HC, Lee TS, Keasling JD, Hadi MZ, Mukhopadhyay A. Mol Syst Biol. 2011 May 10; 7: 487 [0012]



- Handbuch & Idquot; Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) [0050]
- Genetic and molecular analyses of the C-terminal region of the recE gene from the Rac prophage of Escherichia coli K-12 reveal the recT gene. Clark, A. J., Sharma, V., Brenowitz, S., Chu, C. C., Sandler, S., Satin, L., Templin, A., Berger, I., Cohen, A. J. Bacteriol. (1993) [0065]
- Hendrix, R. W. (1999). All the world's a phage. Proc Nat Acad Sc USA 96: 2192–2197 [0065]
- Rekombineering mycobacteria and their phages. van Kessel JC, Marinelli LJ, Hatfull GF. Nat Rev Microbiol. 2008 Nov; 6(11): 851–857 [0065]
- Nucleic Acids Research 14, 217–232 (1986) [0065]
- Nucleic Acids Research 16, 1829–1836 (1988) oder unter Nutzung des GCG Programms von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74–97 (1998) [0065]
- Altschul et al.. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25 (17): 3389–3402 [0067]
- Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology 41: 255–260 (1991)) [0068]
- Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996 [0068]
- The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland, 1995 [0068]
- DIG Easy Hyb von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No. 1603558 [0068]
- Construction of theta-type shuttle vector for Leuconostoc and other lactic acid bacteria using pC642 isolated from kimchi. Eom HJ, Moon JS, Cho SK, Kim JH, Han NS. Plasmid. 2012 Jan; 67(1): 35–43 [0070]
- Girbal L, von Abendroth G, Winkler M, Benton PM, Meynial-Salles I, Croux C, Peters JW, Happe T, Soucaille P (2005) Homologous and heterologous over-expression in Clostridium acetobutylicum and characterization of purified clostridial and algal Fe-only hydrogenases with high specific activities. Appl. Environ Microbiol. 71: 2777–2781 [0070]
- Plasmid evolution and interaction between the Plasmid addiction stability systems of two related broad-host-range IncQ-like plasmids. Deane SM, Rawlings DE. J Bacteriol. 2004 Apr; 186(7): 2123–33 [0070]
- Appl Microbiol Biotechnol, 2006 Jul; 71(4): 455–62. Functional expression system for cytochrome P450 genes using the reductase domain of self-sufficient P450RhF from Rhodococcus sp. NCIMB 9784. Nodate M, Kubota M, Misawa N. [0070]
- Construction of a modular Plasmid family for chromosomal integration in Bacillus subtilis. Gimpel M, Brantl S. J Microbiol Methods. 2012; 91(2): 312–7 [0070]
- Increasing Signal Specificity of the TOL Network of Pseudomonas putida mt-2 by Rewiring the Connectivity of the Master Regulator XylR. de Las Heras A, Fraile S, de Lorenzo V. PLoS Genet. 2012 Oct; 8(10): e1002963 [0070]
- Characterization of a small cryptic plasmid from endophytic Pantoea agglomerans and its use in the construction of an expression vector. de Lima Procopio RE, Araújo WL, Andreote FD, Azevedo JL. Genet Mol Biol. 2011 Jan; 34(1): 103–9 [0070]
- Complete sequence of broad-host-range plasmid pRIO-5 harboring the extended-spectrum- $\beta$ -lactamase gene blaBES. Bonnin RA, Poirel L, Sampaio JL, Nordmann P. Antimicrob Agents Chemother. 2012 Feb; 56(2): 1116–9 [0070]
- Shewanella oneidensis: a new and efficient system for expression and maturation of heterologous [Fe-Fe] hydrogenase from Chlamydomonas reinhardtii. Sybirna K, Antoine T, Lindberg P, Fourmond V, Rousset M, Méjean V, Bottin H. BMC Biotechnol. 2008 Sep 18; 8: 73 [0070]
- Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549–554 [0070]
- A tetracycline inducible expression vector for Corynebacterium glutamicum allowing tightly regulable gene expression. Lausberg F, Chattopadhyay AR, Heyer A, Eggeling L, Freudl R. Plasmid. 2012 68(2): 142–7 [0070]
- Tauch et al. (Journal of Biotechnology 104, 27–40 (2003)) [0070]
- Rekombineering: in vivo genetic engineering in E. coli, S. enterica, and beyond. Sawitzke JA, Thomason LC, Costantino N, Bubunenko M, Datta S, Court DL. Methods Enzymol. 2007; 421: 171–99 [0074]
- Bacillus subtilis genome editing using ssDNA with short homology regions. Wang Y, Weng J, Waseem R, Yin X, Zhang R, Shen Q. Nucleic Acids Res. 2012 Jul; 40(12): e91 [0074]
- High efficiency Rekombineering in lactic acid bacteria. van Pijkeren JP, Britton RA. Nucleic Acids Res. 2012, 40(10): e76 [0074]
- Hanahan, D. Studies an transformation of Escherichia coli with plasmids. J Mol Biol. 1983; 166(4): 557–80 [0080]
- Tauch A, Kirchner O, Löffler B, Götter S, Pühler A, Kalinowski J. Efficient electrotransformation of corynebacterium diphtheriae with a mini-replicon derived from the Corynebacte-

- rium glutamicum plasmid pGC1. *Curr Microbiol.* 2002; 45(5): 362–7 [0080]
- Sack U, Tarnok A, Rothe G (Hrsg): *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*, Basel, Karger, 2007, Seiten 27–70 [0080]
- Wheeler, David; Bhagwat, Medha (2007). "Chapter 9, BLAST QuickStart". In Bergman, Nicholas H. *Comparative Genomics Volumes 1 and 2. Methods in Molecular Biology*. 395–396. Totowa, NJ: Humana Press [0086]
- A tetracycline inducible expression vector for *Corynebacterium glutamicum* allowing tightly regulable gene expression. Lausberg F, Chattopadhyay AR, Heyer A, Eggeling L, Freudl R. *Plasmid*. 2012 68(2): 142–7 [0088]
- The E2 domain of OdhA of *Corynebacterium glutamicum* has succinyltransferase activity dependent on lipoyl residues of the acetyltransferase AceF. Hoffelder M, Raasch K, van Ooyen J, Eggeling L. *J Bacteriol.* 2010; 192(19): 5203–11 [0088]
- Rekombineering: in vivo genetic engineering in *E. coli*, *S. enterica*, and beyond. Sawitzke JA, Thomason LC, Costantino N, Bubunenko M, Datta S, Court DL. *Methods Enzymol.* 2007; 421: 171–99 [0089]
- A tetracycline inducible expression vector for *Corynebacterium glutamicum* allowing tightly regulable gene expression. Lausberg F, Chattopadhyay AR, Heyer A, Eggeling L, Freudl R. *Plasmid*. 2012 68(2): 142–7 [0090]
- Roles of RecJ, RecO, and RecR in RecET-mediated illegitimate recombination in *Escherichia coli*. Shiraishi K, Hanada K, Iwakura Y, Ikeda H. *J Bacteriol.* 2002 Sep; 184(17): 4715–21 [0093]
- Cremer J, Treptow C, Eggeling L, Sahm H. Regulation of enzymes of lysine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *J Gen Microbiol.* 1988; 134(12): 3221–9 [0109]
- Acetohydroxyacid synthase, a novel target for improvement of L-lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. Blombach B, Hans S, Bathe B, Eikmanns BJ. *Appl Environ Microbiol.* 2009 Jan; 75(2): 419–427 [0110]
- Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A. *Gene*. 1994 Jul 22; 145(1): 69–73 [0110]
- Efficient electrotransformation of *Corynebacterium diphtheriae* with a mini-replicon derived from the *Corynebacterium glutamicum* plasmid pGC1. Tauch A, Kirchner O, Löffler B, Götter S, Pühler A, Kalinowski J. *Curr Microbiol.* 2002 Nov; 45(5): 362–367 [0111]
- High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells. Liebl W, Bayerl A, Schein B, Stillner U, Schleifer KH. *FEBS Microbiol Lett.* 1989 Dec; 53(3): 299–303 [0111]
- Keilhauer et al. beschrieben (Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon. Keilhauer C, Eggeling L, Sahm H. *J Bacteriol.* 1993 Sep; 175(17): 5595–603 [0119]
- Binder et al. *Genome Biology* 2012, 13: R40 [0122]

### Patentansprüche

1. Eine gegenüber ihrem Wildtyp genetisch veränderte Zelle, die eine für eine nicht im Wildtyp vorhandene Rekombinase kodierende Gensequenz und zusätzlich eine für einen Metabolitsensor kodierende Gensequenz umfasst.

2. Zelle nach Anspruch 1 **dadurch gekennzeichnet**, dass die für einen Metabolitsensor kodierende Gensequenz eine Sequenz ist, die für ein Protein kodiert, das eine Aminosäure, organische Säure, Fettsäure, Vitamin oder einen pflanzlichen Wirkstoff erkennt.

3. Zelle nach einem der Ansprüche 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass die für eine Rekombinase kodierende Gensequenz eine Sequenz ist, die für ein Protein kodiert, das extrazellulär zugesetzte DNA mit zelleigener DNA rekombiniert.

4. Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass die für eine Rekombinase kodierende Gensequenz eine DNA nach SEQ. ID. Nr. 1 ist.

5. Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Zelle eine Zelle der Gattung Corynebacterium, Enterobakterium oder Escherichia ist.

6. Verfahren zum Identifizieren einer Zelle mit gegenüber ihrem Wildtyp erhöhter intrazellulärer Konzentration eines bestimmten Metaboliten in einer Zellsuspension, beinhaltend die Verfahrensschritte:

i) Bereitstellen einer Zellsuspension beinhaltend Zellen nach einem der Ansprüche 1 bis 4;

ii) genetisches Verändern der Zellen gemäß Schritt i) durch Rekombineering unter Zugabe von DNA, die mindestens ein verändertes Gen G1 bis Gn oder mindestens eine Mutation M1 bis Mm enthält, unter Erhalt einer Zellsuspension, in der sich die Zellen hinsichtlich der intrazellulären Konzentration eines bestimmten Metaboliten unterscheiden;

iii) Identifizieren einzelner Zellen in der Zellsuspension mit erhöhter intrazellulärer Konzentration eines bestimmten Metaboliten durch Fluoreszenzdetektion mittels eines Metabolitsensors.

7. Verfahren zur Herstellung einer gegenüber ihrem Wildtyp genetisch veränderten Zelle mit optimierter Produktion eines bestimmten Metaboliten, beinhaltend folgende Schritte:

i) Bereitstellen einer Zellsuspension beinhaltend Zellen nach einem der Ansprüche 1 bis 4;

ii) genetisches Verändern der Zellen gemäß Schritt i) durch Rekombineering unter Zugabe von DNA, die mindestens ein verändertes Gen G1 bis Gn oder mindestens eine Mutation M1 bis Mm enthält, unter Erhalt einer Zellsuspension, in der sich die Zellen hinsichtlich der intrazellulären Konzentration eines bestimmten Metaboliten unterscheiden;

iii) Identifizieren einzelner Zellen in der Zellsuspension mit erhöhter intrazellulärer Konzentration eines bestimmten Metaboliten durch Fluoreszenzdetektion mittels eines Metabolitsensors;

iv) Abtrennen der identifizierten Zellen aus der Zellsuspension;

v) Identifizieren mindestens eines genetisch veränderten Gens G1 bis Gn oder mindestens einer Mutation M1 bis Mm in den identifizierten und abgetrennten Zellen, welche für die erhöhte intrazelluläre Konzentration des bestimmten Metaboliten verantwortlich sind;

vi) Herstellung einer gegenüber ihrem Wildtyp genetisch veränderten Produktionszelle mit optimierter Produktion des bestimmten Metaboliten, dessen Genom mindestens eines der Gene G1 bis Gm und/oder mindestens eine Mutation M1 bis Mm umfasst.

8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Identifizierung gemäß Schritt iii) durch einen Metabolitsensor für Aminosäuren, organische Säuren, Fettsäuren, Vitamine, Kohlehydrate, oder pflanzliche Wirkstoffe erfolgt.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass die genetische Veränderung der Zelle gemäß Schritt ii) durch eine Rekombinase erfolgt, die eine oder mehrere in die Zelle eingebrachte DNA-Moleküle, die das veränderte Gen oder die veränderten Gene G1 bis Gn und/oder die Mutation oder die Mutationen M1 bis Mm enthält, in die zelleigene DNA einbaut, die als Chromosom oder Plasmid vorliegt.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Zelle zur Identifikation mit gegenüber ihrem Wildtyp erhöhter intrazellulärer Konzentration eines bestimmten Metaboliten nach den Ansprüchen 1 bis 4 mit einem Rekombinasegen transformiert wird, das in einem Vektor vorliegt.

11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10 **dadurch gekennzeichnet**, dass als Rekombinasegen ein Gen nach SEQ. ID. Nr. 1 eingesetzt wird.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 11, **dadurch gekennzeichnet**, dass Vektoren nach den SEQ. ID. Nr. 3 bis 9 eingesetzt werden.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass DNA für mindestens ein verändertes Gen G1 bis Gn und/oder mindestens eine Mutation M1 bis Mm eingesetzt wird, die für einen der Schritte aus dem Biosyntheseweg des Metaboliten kodieren.
14. Verfahren nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet**, dass die veränderten Gene mindestens eine Komponente aus der Gruppe der Sequenzen nach SEQ. ID No 33 bis 44 sind.
15. Verfahren zur Herstellung von Metaboliten, beinhaltend die Verfahrensschritte:  
a) Herstellung einer gegenüber ihrem Wildtyp genetisch veränderten Zelle mit optimierter Produktion eines bestimmten Metaboliten durch ein Verfahren nach den Ansprüchen 7 bis 14,  
b) Kultivieren der Zelle in einem Kulturmedium, beinhaltend Nährstoffe unter Bedingungen, unter denen die Zelle aus den Nährstoffen den bestimmten Metaboliten produziert.
16. Verfahren nach Anspruch 15, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Metabolit eine Komponente aus der Gruppe Aminosäuren, organische Säuren, Fettsäuren, Vitamine, Kohlehydrate, oder pflanzliche Wirkstoffe ist.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 oder 16, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Metabolit die Aminosäure L-Lysin ist.
18. Rekombinasegen mit einer 70%–100%igen Homologie zu der DNA nach SEQ. ID. Nr 1.
19. Rekombinase einer 80–100%igen Homologie zu dem Protein nach SEQ. ID. Nr. 2.
20. Nukleinsäuren nach SEQ. ID. Nr. 33–44.

Es folgen 3 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

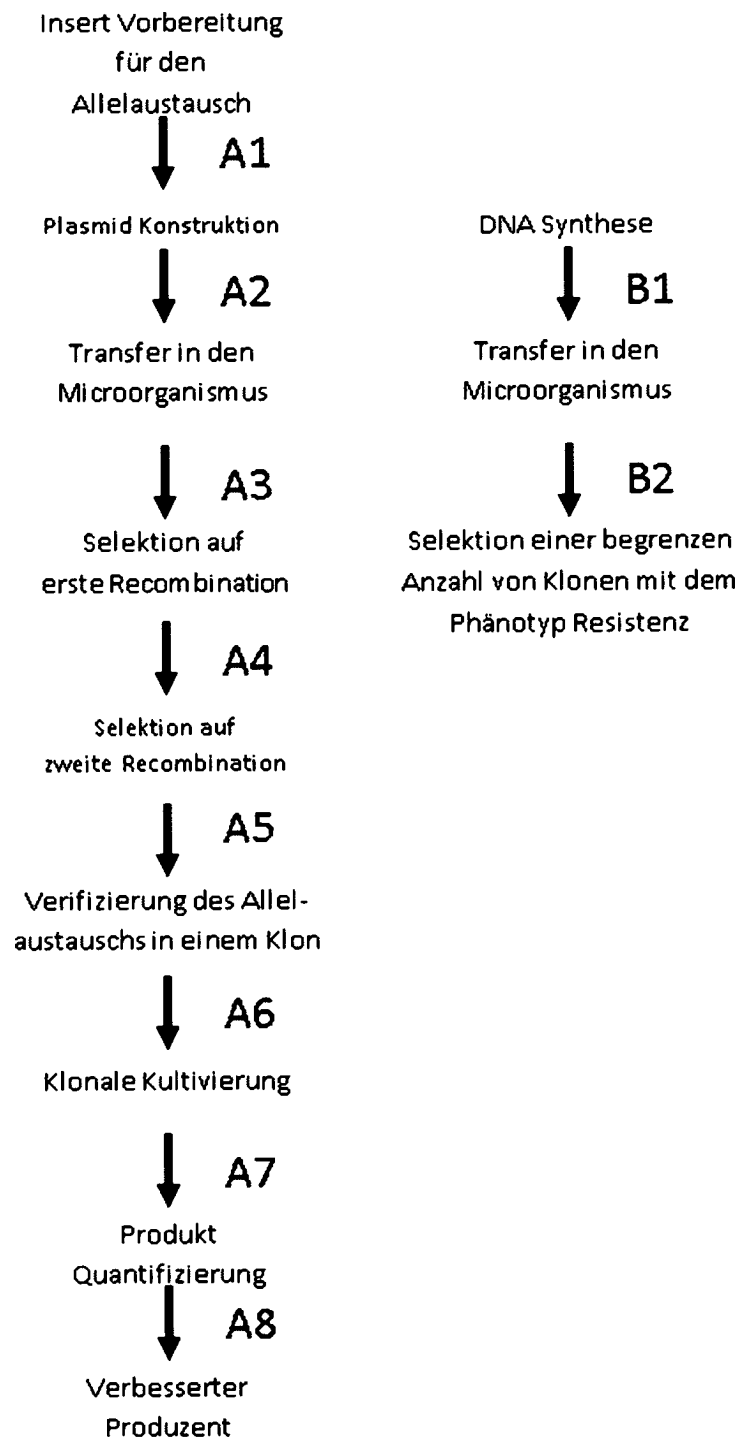


Fig. 1

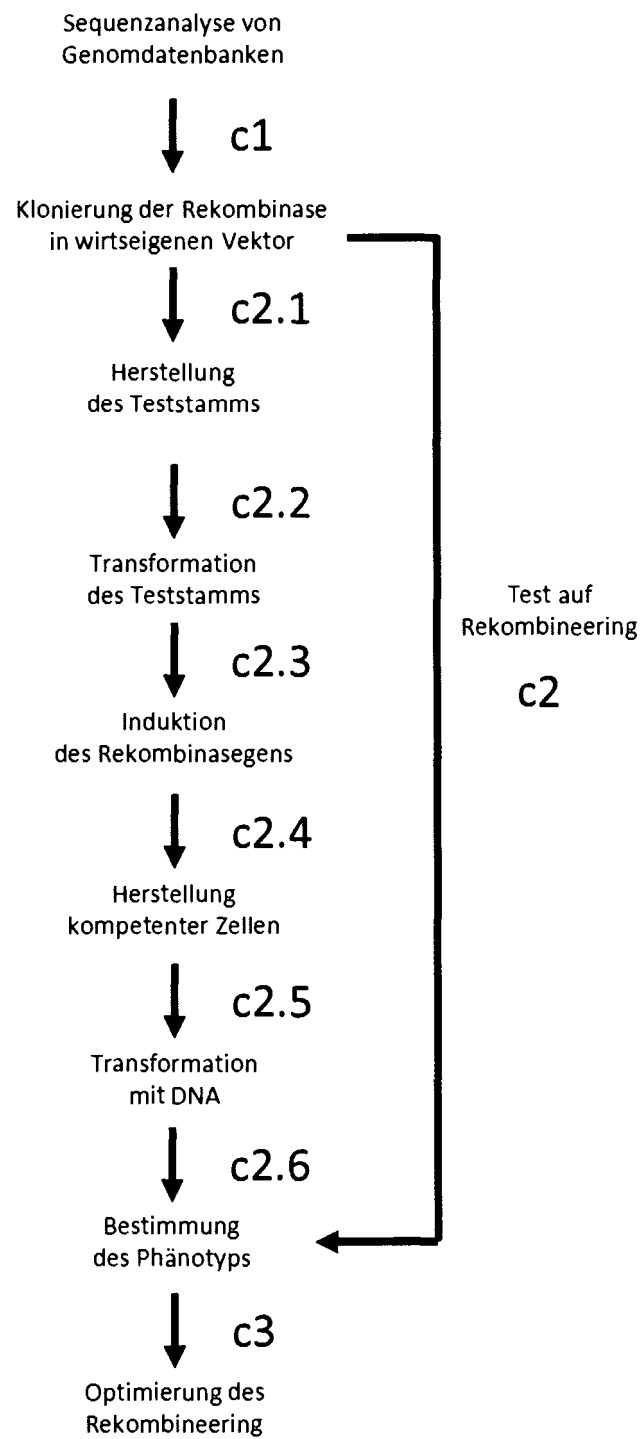


Fig. 2

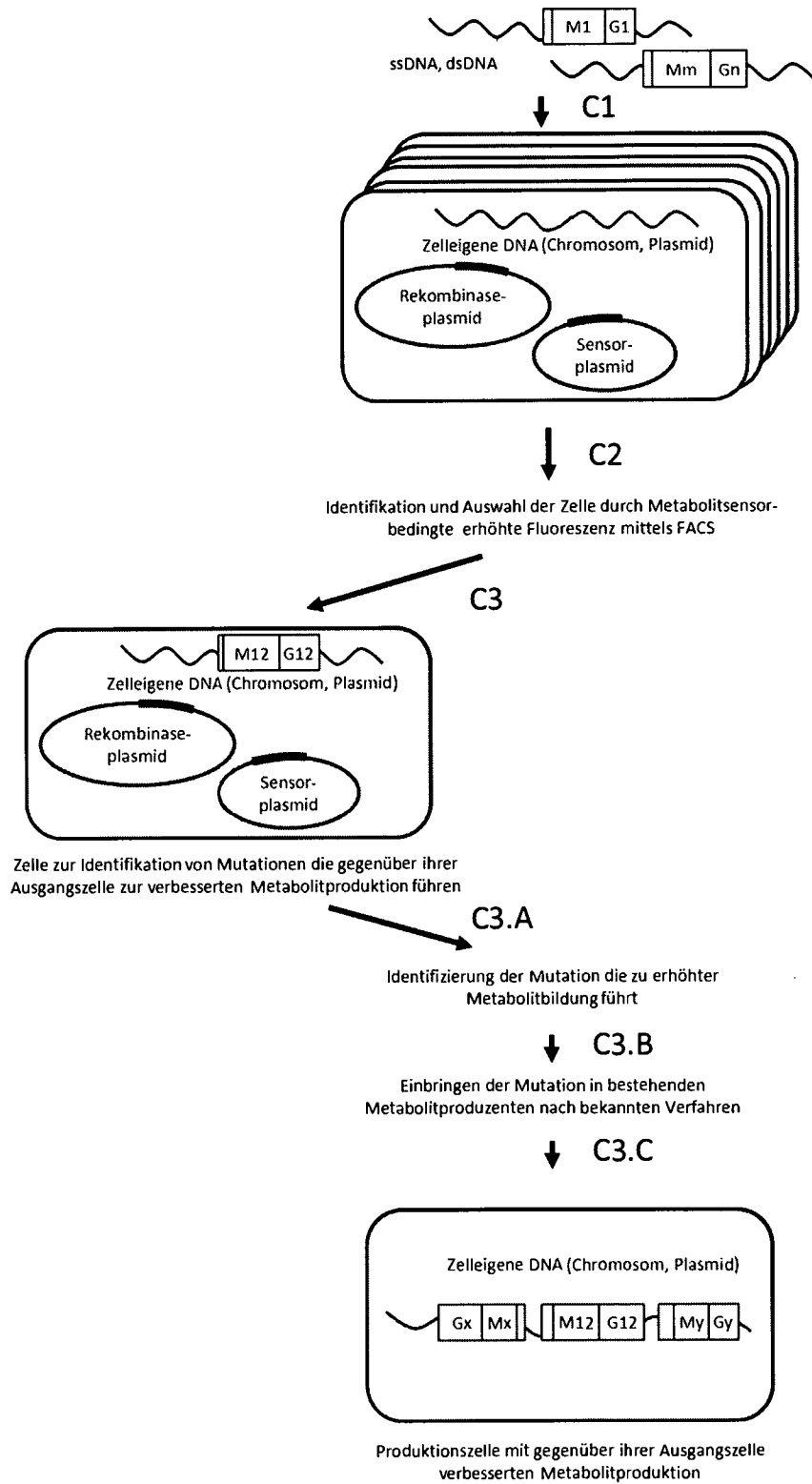


Fig. 3