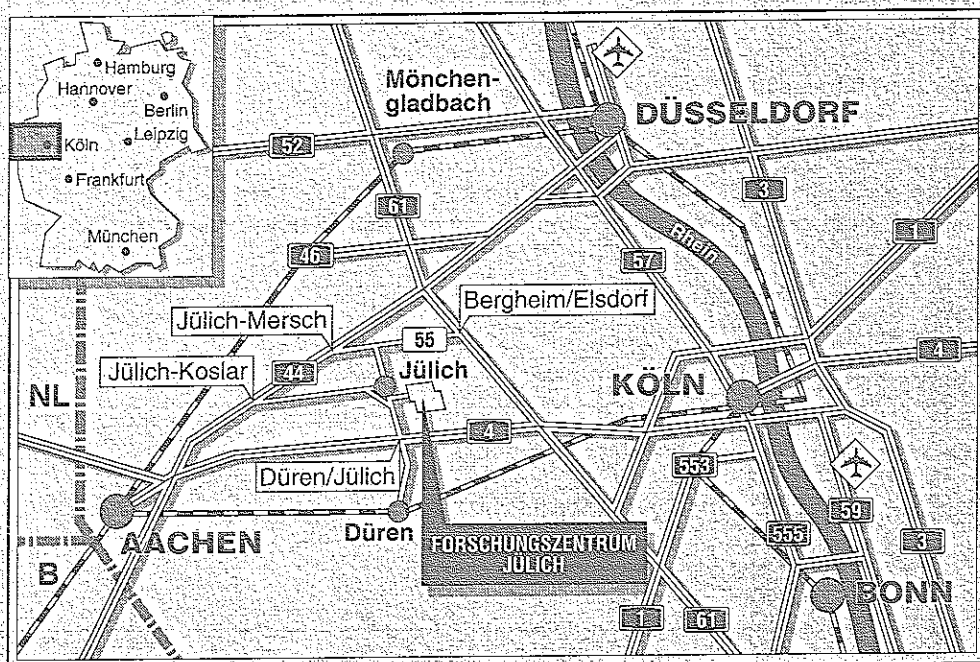


Institut für Biotechnologie

**Die Glutamat-Dehydrogenase von
Corynebacterium glutamicum:
genetische und physiologische
Untersuchungen**

Elke Börmann-Ei Kholy



Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 2929

ISSN 0944-2952

Institut für Biotechnologie Jüli-2929

D 61 (Diss. Universität Düsseldorf)

Zu beziehen durch : Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
Telefon : 024 61 / 61 - 61 02 · Telefax : 024 61 / 61 - 61 03 · Telex : 833 556-70 kfa d

Die Glutamat-Dehydrogenase von *Corynebacterium glutamicum* : genetische und physiologische Untersuchungen

Elke Börmann-El Kholy

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	7
1. Bakterienstämme und Plasmide	7
2. Chemikalien	9
3. Nährmedien und Kulturbedingungen	10
4. Präparation und Reinigung von DNA	12
5. Analyse und Rekombination von DNA	14
5.1 Restriktion und Modifikation der DNA	14
5.2 DNA-Sequenzanalyse	17
5.3 Synthese von Oligonukleotiden	18
5.4 Polymerase-Kettenreaktion	18
5.5 Southern Blot-Analyse	19
6. Transformationstechniken	21
6.1 Transformation von <i>E. coli</i>	21
6.2 Elektroporation von <i>C. glutamicum</i>	22
6.3 Konjugation	22
7. Konstruktion einer Cosmidgenbank in <i>E. coli</i>	23
8. Techniken zur Analyse von RNA	24
8.1 Isolierung und Reinigung der RNA von <i>C. glutamicum</i>	24
8.2 Northern Blot-Analyse	25
8.3 Transkriptionsstartbestimmung	27
9. Bestimmung von Enzymaktivitäten	29
9.1 Glutamat-Dehydrogenase-Aktivitätstest	29
9.2 Glutamat-Synthase-Aktivitätstest	30
9.3 Glutamin-Synthetase-Aktivitätstest	30
10. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	31
11. Bestimmung interner und externer Metaboliten	31
11.1 Silikonölzentrifugation und Aufarbeitung der Zellen	31
11.2 Bestimmung des Zellvolumens	32
11.3 Glutamatbestimmung	32
11.4 Glucosebestimmung	33

III. Ergebnisse	34
1. Feinstrukturanalyse des Glutamat-Dehydrogenase-Gens (<i>gdh</i>) von <i>C. glutamicum</i> ATCC13032	34
1.1 Subklonierung des <i>gdh</i> -Gens	34
1.2 Nukleotidsequenzanalyse des <i>gdh</i> -Gens	37
1.3 Isolierung und Sequenzierung des <i>gdh</i> -Terminator-Fragmentes	40
1.4 Homologievergleiche	43
1.5 Bestimmung der Transkriptlänge des <i>gdh</i> -Gens	45
1.6 Bestimmung des Transkriptionsstarts des <i>gdh</i> -Gens	47
2. Untersuchungen zur Rolle der Glutamat-Dehydrogenase im Stoffwechsel von <i>C. glutamicum</i> ATCC13032	49
2.1 Konstruktion der GDH-defekten <i>C. glutamicum</i> Mutante EB1	49
2.2 Konstruktion des <i>gdh</i> -überexprimierenden Stammes <i>C. glutamicum</i> (pEKgdh)	53
2.3 Vergleichende Wachstumsexperimente mit <i>C. glutamicum</i> 13032, <i>C. glutamicum</i> EB1 und <i>C. glutamicum</i> (pEKgdh)	56
2.4 Vergleichende Messungen der internen und externen Glutamatkonzentrationen unter Biotin-Mangel und Biotin-Überschuß	58
2.5 Bestimmung der Glutamat-Ausbeute während Kurz-Zeit-Fermentationen	60
2.6 Bestimmung der spezifischen Glutamin-Synthetase und Glutamat-Synthase-Aktivitäten in den verschiedenen <i>C. glutamicum</i> -Stämmen	62
3. Klonierung des <i>gdh</i>-Gens von <i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i> in <i>C. glutamicum</i> und Auswirkungen auf die Glutamatbildung	65
3.1 Klonierung des <i>gdh</i> -Gens von <i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i>	65
3.2 Heterologe Expression des <i>gdh</i> -Gens von <i>P. asaccharolyticus</i> in <i>C. glutamicum</i>	67
3.3 Untersuchungen zum Einfluß einer NAD-abhängigen GDH auf die Glutamat-Bildung von <i>C. glutamicum</i>	68
3.4 Kurz-Zeit-Fermentationen mit <i>C. glutamicum</i> (pEKEXpgdh)	71
4. Untersuchungen zur Glutamat-Synthase von <i>C. glutamicum</i>	72
4.1 Kinetische Untersuchungen zur Glutamat-Synthase von <i>C. glutamicum</i>	72
4.2 Untersuchungen zur Regulation der Glutamat-Synthase von <i>C. glutamicum</i>	75
5. Versuche zur Isolierung der <i>gluBD</i>-Gene von <i>C. glutamicum</i>, die für die Glutamat-Synthase kodieren	77
5.1 Aufbau einer chromosomalen Cosmid-Genbank von <i>C. glutamicum</i> EB1	77
5.2 Versuche zur Komplementation von <i>E. coli</i> PA340 mit der chromosomalen Cosmidgenbank von <i>C. glutamicum</i> EB1	79
5.3 Konstruktion einer rekombinationsdefekten, Glutamat-auxotrophen <i>E. coli</i> Mutante	80

5.4 Versuche zur Komplementation von <i>E. coli</i> EBE32 mit der chromosomalen Cosmidgenbank von <i>C. glutamicum</i> EB1	82
IV. Diskussion	83
V. Zusammenfassung	93
VI. Literatur	95

ABKÜRZUNGEN

Amp ^R	Ampicillinresistenz
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
Cm ^R	Chloramphenicolresistenz
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosid-5'-triphosphat
GDH	Glutamat-Dehydrogenase
<i>gdh</i>	Gen für die Glutamat-Dehydrogenase
<i>gl</i> BD	Gene für die große und kleine Untereinheit der Glutamat-Synthase
GOGAT	Glutamat-Synthase (Glutamin:2-Oxoglutarat Aminotransferase)
GS	Glutamin-Synthetase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
IPTG	Isopropylthiogalactosid
Kan ^R	Kanamycinresistenz
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
K _m	Michaelis-Konstante
LB	Luria-Bertani-Medium
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MM	Minimalmedium
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
NAD(H)	β-Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)
NADP(H)	β-Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduzierte Form)
nt	Nukleotide
P _i	anorganisches Phosphat
OD ₆₀₀	optische Dichte bei λ=600 nm
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
rpm	Umdrehungen pro Minute
ssp.	Subspezies
TTP	Thymidin-5'-triphosphat
Tet ^R	Tetracyclinresistenz
TG	Trockengewicht
Tris	2-Amino-Hydroxymethylpropan-1,3-Diol
U	Enzymeinheit
UTP	Uridin-5'-triphosphat
Vol.	Volumen

I. EINLEITUNG

Corynebacterium glutamicum wurde 1957 von Kinoshita isoliert (Kinoshita et al., 1957). Das Gram-positive, Biotin-bedürftige Bakterium ist unbeweglich, bildet keine Sporen und ist je nach physiologischem Zustand von stäbchen- bzw. keulenförmiger Gestalt (Abbildung 1). Charakteristische chemotaxonomische Merkmale sind die Zellwandbestandteile Galaktose, Arabinose, freie kurzkettige Mycolsäuren und meso-Diaminopimelinsäure, über die die einzelnen Ketten des Peptidoglukangerüsts der Zellwand miteinander verknüpft sind (Keddie und Cure, 1977). Die Genommasse von *C. glutamicum* beträgt 1.7×10^9 Dalton, was einer Größe von ungefähr 2500 kb entspricht (Debabov, 1990) und die DNA weist einen GC-Gehalt von 53 - 55 % auf (Liebl, 1991).

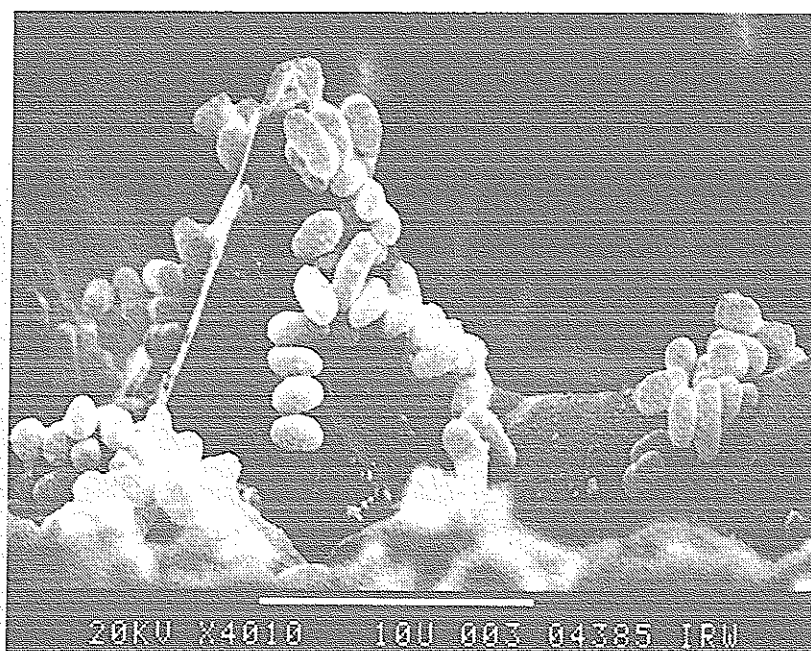
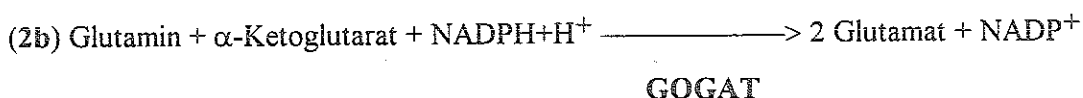
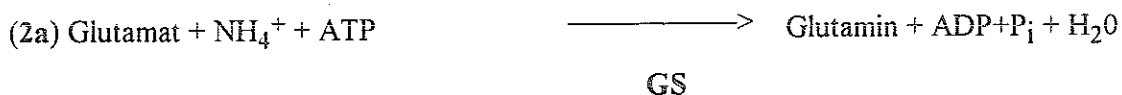
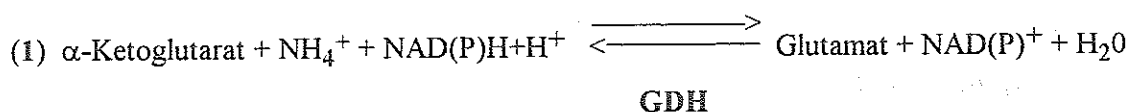


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Corynebacterium glutamicum*.

C. glutamicum sowie die sehr nahe verwandten *Corynebacterium callunae* und *Corynebacterium glutamicum* ssp. *flavum* (früher *Brevibacterium flavum*) (Liebl et al., 1991) werden zu den "Glutaminsäure-Bakterien" gezählt, da sie unter bestimmten Wachstumsbedingungen Glutamat in das Medium ausscheiden (Kinoshita, 1985). Sie sezernieren Glutamat unter Biotin-Limitierung (Shiio et al., 1962), nach Behandlung der Zellen mit Detergenzien (Takinami et al., 1965; Hucheng et al., 1984) sowie nach Zugabe von Penicillin zum Wachstumsmedium (Nunheimer et al., 1970). Aufgrund dieser Eigenschaften sind diese Organismen für die biotechnologische Herstellung von L-Glutamat von erheblicher Bedeutung. Auxotrophe Mutanten dieser Stämme können auch andere Aminosäuren ausscheiden. Interesse finden dabei neben Glutamat, vor allem die für die menschliche und tierische Ernährung essentiellen L-Aminosäuren Isoleucin, Lysin, Threonin, Tryptophan, und Phenylalanin. Diese Aminosäuren werden hauptsächlich als Zusatz bei der Futtermittelherstellung und als Geschmacksverstärker in der Nahrungsmittelindustrie verwendet. In der pharmazeutischen Industrie finden sie auch als Ausgangsprodukte bei der Herstellung von Medikamenten sowie als Zusatz in Infusionslösungen Verwendung (Kleemann et al., 1985). Obwohl die "Glutaminsäure-Bakterien" für die biotechnologische Produktion von Glutamat bedeutsam sind, ist relativ wenig über die Glutamat-bildenden Enzyme dieser Organismen bekannt.

L-Glutamat nimmt in Bakterien eine Schlüsselposition innerhalb des Aminosäurestoffwechsel ein. Es ist primäres Ammoniumassimilationsprodukt und dient als Donor für Aminogruppen bei der Aminosäure-Biosynthese und der Purinsynthese. Weiterhin ist L-Glutamat die Vorstufe für die Synthese der Aminosäuren der Glutamat-Familie. In Mikroorganismen kann Glutamat über zwei verschiedene Biosynthesewege gebildet werden. Die Glutamat-Dehydrogenase (GDH) katalysiert die reduktive Aminierung von α -Ketoglutarat zu Glutamat unter gleichzeitiger Oxidation von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ (Reaktion 1). Es wird angenommen, daß dieses Enzym für die Glutamatbildung bei hohen Ammoniumkonzentrationen ($> 1 \text{ mM}$) verantwortlich ist (Magasanik, 1982). Bei niedrigen Ammoniumkonzentrationen im Medium ($< 1 \text{ mM}$) wird Glutamat im allgemeinen über die gekoppelte Reaktion der Glutamin-Synthetase (GS) (Reaktion 2a) und Glutamat-Synthase (Glutamin:2-Oxoglutarat-Aminotransferase; GOGAT) gebildet (Reaktion 2b) (Magasanik, 1982).



Glutamat-Dehydrogenasen sind multimere, allosterische Enzyme, die ubiquitär verbreitet sind. Sie werden entsprechend ihrer Funktion, Herkunft und oligomeren Struktur unterschieden. NAD-abhängige GDH's (EC 1.4.1.2.) haben eine katabole Funktion und katalysieren die oxidative Desaminierung und damit den Abbau von Glutamat. NAD-abhängige GDH's konnten sowohl in Prokaryonten, z.B. in *Peptostreptococcus asaccharolyticus* (Hornby and Engel, 1984), *Clostridium symbiosum* (Syed und Engel, 1990) und *Pseudomonas fluorescens* (Miyamoto und Katsuki, 1991), aber auch in Eukaryonten, z.B. in den Ascomyceten *Aspergillus nidulans* (Kingshorn und Pateman, 1973), *Saccharomyces cerevisiae* (Grenson et al., 1974) und *Neurospora crassa* (Vierula und Kapoor, 1988) nachgewiesen werden. Die meisten dieser GDH's sind tetramere Enzyme, die sich aus vier identischen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von ungefähr 115000 je Monomer zusammensetzen (Lilley et al., 1991). Viele Organismen, z.B. *A. nidulans*, *S. cerevisiae*, *N. crassa* und *P. fluorescens*, besitzen neben einer NAD-abhängigen auch eine NADP-abhängige GDH (Kingshorn und Pateman, 1973; Roon et al., 1974; Blumenthal et al., 1975; Miyamoto und Katsuki, 1991). Die NADP-abhängigen GDH's (EC 1.4.1.4.) sind anabole Enzyme, die in die Glutamatbiosynthese und damit in die Ammoniumassimilation involviert sind. Diese Enzyme sind in der Regel Hexamere, die sich aus sechs identischen Untereinheiten zusammensetzen. Das Molekulargewicht eines Monomers beträgt ungefähr 48000 - 53500 (Rosenfeld und Brenchley, 1983; Fisher, 1985). Darüberhinaus sind auch GDH's mit dualer Coenzym-Spezifität (EC 1.4.1.3.) bekannt, z.B. die GDH der Rinderleber (Blumenthal et al., 1975; Smith et al., 1975), die sowohl NAD als

auch NADP als Coenzym akzeptiert. Für diese Enzyme wird eine amphibole Rolle im Glutamatstoffwechsel diskutiert.

Die Glutamin-Synthetase (EC 6.3.1.2.) ist ebenfalls ein ubiquitäres Enzym, das in den meisten Organismen vorkommt. Sie ist an einem weiteren möglichen Weg der primären Ammoniumassimilation beteiligt, indem sie die ATP-abhängige Synthese von Glutamin aus Glutamat und Ammonium katalysiert. Da die GS der meisten Organismen auf vielfältige Weise sowohl auf enzymatischer als auch auf genetischer Ebene reguliert wird, nimmt sie eine Schlüsselposition im Stickstoffmetabolismus ein (Reitzer und Magasanik, 1987). Die katalytisch aktive GS besteht in der Regel aus 12 identischen Untereinheiten, wobei das Molekulargewicht einer Untereinheit ungefähr 50000 beträgt (Rhee et al., 1985).

Die Glutamat-Synthase, ein Eisen-Schwefel-Flavoprotein, ist eine Amidotransferase, die bislang ausschließlich in Mikroorganismen und Pflanzen nachgewiesen werden konnte (Meister, 1985). Die GOGAT katalysiert den Transfer einer Aminogruppe des Glutamins auf α -Ketoglutarat und es werden somit zwei Moleküle Glutamat bei dieser Reaktion gebildet. Je nach Herkunft und/oder Lokalisation der GOGAT ist sie NAD- (EC 1.4.1.13) oder NADP-abhängig (EC 1.4.1.14). Photosynthetisch aktive Organismen besitzen eine Ferredoxin-abhängige GOGAT (EC 1.4.7.1.) (Lea und Mifflin, 1974; Suzuki und Gadal, 1984). In allen Organismen, in denen die GOGAT bekannt ist, besteht das native Enzym aus einem Aggregat vier katalytisch aktiver Dimere, die sich jeweils aus einer kleinen und einer großen Untereinheit (UE) zusammensetzen. Das Molekulargewicht der kleinen UE beträgt ungefähr 52000, während das Molekulargewicht der großen UE je nach Herkunft zwischen 130000 - 180000 variieren kann (Reitzer und Magasanik, 1987).

Die Regulation der Glutamat-bildenden Enzyme wurde intensiv bei den Enterobakterien wie z.B. bei *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* oder *Klebsiella aerogenes* untersucht. Innerhalb der Familie der Enterobacteriaceae werden die Glutamat-bildenden Enzyme durch Komponenten des Wachstumsmediums unterschiedlich reguliert. So wird die GDH von *E. coli* und *S. typhimurium* unabhängig von der Ammoniumverfügbarkeit gebildet (Pahel et al., 1978; Brenchley et al., 1975), ihre Synthese jedoch durch Glutamat reprimiert (Varrichio, 1969; Brenchley et al., 1975). Dagegen wird bei *K. aerogenes* die Expression des GDH-Gens sowohl durch niedrige Ammoniumkonzentrationen (Brenchley et al., 1973) als auch durch Glutamat reprimiert (Meers et al., 1970). Die Expression der GOGAT-Gene dieser Organismen wird durch Glutamat oder andere Aminosäuren der Glutamat-Familie sowie Histidin, reprimiert (Reitzer und Magasanik, 1987).

In *C. glutamicum* wurde sowohl die GDH als auch die GS nachgewiesen und gereinigt (Kimura, 1962; Oshima et al., 1964; Tachiki et al., 1981), während von *C. glutamicum* ssp. *flavum* sogar alle drei an der Glutamatbildung beteiligten Enzyme, GDH, GS und GOGAT im Enzymtest nachgewiesen und aufgereinigt werden konnten (Shiio und Ozaki, 1970, Sung et al., 1984; Tochikura et al., 1984). Dies bedeutet, daß grundsätzlich beide Stoffwechselwege zur Glutamatbildung in den "Glutamat-produzierenden" Bakterien funktionell sind.

Bislang wurde jedoch allgemein akzeptiert, daß die GDH das Hauptenzym der Glutamatbildung dieser Organismen ist (Kinoshita, 1985; Liebl, 1991). Dafür sprachen mehrere Argumente. Die GDH von *C. glutamicum* wird genauso wie die GDH's von *C. glutamicum* ssp. *flavum* und *C. callunae* unabhängig von der Ammoniumkonzentration oder Stickstoff-Quelle im Medium konstitutiv gebildet (Börmann, 1990; Börmann et al., 1992; Tochikura et al., 1984; Ertan, 1992b). Dagegen wird das GS/GOGAT-System von *C. glutamicum* ssp. *flavum* ebenso wie die Bildung der GOGAT von *C. callunae* durch hohe Ammoniumkonzentrationen, die üblicherweise zur Kultivierung dieser Organismen und zur Glutamat-Fermentation verwendet werden, reprimiert (Sung et al., 1985; Ertan, 1992b). Desweiteren sind die spezifischen GDH-Aktivitäten in *C. glutamicum* ssp. *flavum* (Sung et al., 1984), aber auch in *C. callunae* (Ertan, 1992a) um Größenordnungen höher als die der GOGAT. Weiterhin sind durch klassische Mutagenese erhaltene GDH-negative Mutanten von *C. glutamicum* ssp. *flavum* Glutamat-auxotroph (Shiio und Ujigawa, 1978) und von Sung et al. (1985) wurden unabhängig davon durch chemische Mutagenese erhaltene GDH-negative *C. glutamicum* ssp. *flavum*-Mutanten beschrieben, die nur noch sehr geringe Mengen an Glutamat produzierten.

Erst Mitte der achtziger Jahre wurden für die industriell bedeutenden "Glutaminsäure-Bakterien" Klonierungssysteme und effiziente Transformationstechniken entwickelt, um die Struktur, Organisation, Expression und Regulation von Genen dieser Organismen untersuchen zu können (für einen Überblick siehe Martin, 1989). Mit Hilfe dieser rekombinanten DNA-Techniken wurden dann zunächst Gene, die für Enzyme des Aminosäurestoffwechsel kodieren, z.B. für die Lysinbiosynthese (Cremer et al., 1990), die Threoninbiosynthese (Katsumata et al., 1986; Peoples et al., 1988; Han et al., 1990), die Isoleucinbiosynthese (Cordes et al., 1992) und die Phenylalaninbiosynthese (Ito et al., 1990) isoliert und charakterisiert. Daneben wurde aber auch die Isolierung von Genen beschrieben,

die für Zentralstoffwechselenzyme kodieren, z.B. für die Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase (Von der Osten et al., 1989), die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (Eikmanns et al., 1989; O'Reagan et al., 1989) sowie die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, 3-Phosphoglycerat-Kinase und Triosephosphat-Isomerase (Eikmanns, 1992). Auch die Isolierung des *gdh*-Gens, das für die Glutamat-Dehydrogenase von *C. glutamicum* kodiert, wurde beschrieben (Börmann, 1990). Die Feinstruktur dieser Gene wurde mit wenigen Ausnahmen ausschließlich auf DNA-Ebene analysiert, d.h. die Gene wurden isoliert, exprimiert und die DNA-Sequenz aufgeklärt. Erst nachdem auch effiziente Methoden zur Isolierung und Analyse von RNA für *C. glutamicum* zur Verfügung standen (Schwinde, 1991), konnten die genomische Organisation corynebakterieller Gene untersucht, sowie Transkriptionsstudien durchgeführt werden.

Trotz der offensichtlich wichtigen Position der NADP-abhängigen GDH im Glutamatstoffwechsel von *C. glutamicum* ist bislang nur sehr wenig über das *gdh*-Gen von *C. glutamicum* bekannt. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit bestand daher in der molekularbiologischen Charakterisierung des isolierten *gdh*-Gen von *C. glutamicum* (Börmann, 1990) sowohl auf DNA- als auch auf RNA-Ebene. Das charakterisierte *gdh*-Gen sollte dann zur Konstruktion eines *gdh*-überexprimierenden *C. glutamicum*-Stammes und einer definierten GDH-defekten *C. glutamicum* Mutante verwendet werden, um mit diesen Stämmen die Bedeutung der NADP-abhängigen GDH für das Wachstum und die Glutamatproduktion von *C. glutamicum* untersuchen zu können. Weiterhin war es interessant die Auswirkungen einer heterolog exprimierten NAD-abhängigen GDH auf die Glutamatproduktion von *C. glutamicum* zu untersuchen. Da wenig über den alternativen Glutamat-Biosyntheseweg in *C. glutamicum* bekannt ist, bestand ein weiteres Ziel dieser Arbeit darin, die Enzyme des alternativen Glutamat-Biosyntheseweges, GS und GOGAT, nachzuweisen sowie Versuche zur Aufklärung der Regulation der GOGAT und zur Isolierung der GOGAT-Gene *glfBD* zu unternehmen.

II. MATERIAL und METHODEN

1. Bakterienstämme und Plasmide

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene *Escherichia coli*-, *Corynebacterium glutamicum*- und *Peptostreptococcus asaccharolyticus*-Stämme verwendet, die in der nachfolgenden Tabelle 1 aufgelistet sind.

Tabelle 1: Verwendete *Escherichia coli*-, *Corynebacterium glutamicum*- und *Peptostreptococcus asaccharolyticus*-Stämme und ihre chromosomalen Marker.

Stamm	relevante Eigenschaften	Referenz
<i>E. coli</i> DH5	<i>supE44, hsdR, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i>	Hanahan, (1985)
PA340	<i>thr-1, fhuA2, leuB6, lacY1, supE44, gal-6, gdh-1, hisGL, rbfD1, galP63, (gltB-F), rpsL19, malT1, (λ^R), xyl-7, mlt-2, argH, thi-1</i>	Berberich, (1972)
GSJ403	<i>hfrC, tkt, hsdR, (srl-recA)::Tn10</i>	Sprenger, (1990)
EBE32	PA340, zusätzlich: <i>(srl-rec)Δ::Tn10</i>	diese Arbeit
S17-1	<i>thi-1, F⁻, endAR1, hsdR17, supE44, λ^-, pro</i>	Simon et al., (1983)
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	Wildtyp	American type culture collection
EB1	<i>(gdh::pSUPgdh)</i>	diese Arbeit
<i>P. asaccharolyticus</i> ATCC 14963	Wildtyp	American type culture collection

Die verwendeten Cosmide und Plasmide sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Verwendete Cosmide und Plasmide mit ihren Eigenschaften und Markern.

Vektor	Marker	Referenz
pHC79	Amp ^R , Tet ^R , cos , <i>ori colE1</i>	Hohn und Collins, (1980)
pHCgdh3	Amp ^R , pHC79-Derivat mit chromomalem 28 kb <i>Sau3A</i> -Fragment, <i>gdh</i>	Börmann, (1990)
pUC18	Amp ^R , <i>ori colE1</i>	Vieira und Messing, (1982)
pUC4.5gdh	Amp ^R , pUC18-Derivat mit 4.5 kb, <i>Sau3A</i> -Fragment aus pHCgdh3	Börmann, (1990)
pEK0	Kan ^R , <i>ori pBL1</i> , <i>ori colE1</i>	Eikmanns et al., (1991a)
pEK4.5gdh	Kan ^R , pEK0-Derivat mit 4.5 kb <i>EcoRI-HindIII</i> -Fragment aus pUC4.5gdh	Börmann, (1990)
pEKEX2	Kan ^R , <i>lacI^q</i> , <i>tacP</i> , <i>ori pBL1</i>	Eikmanns et al., (1991a)
pGEM4Z TM	Amp ^R , <i>ori colE1</i> , Promotoren für die SP6- und T7-RNA-Polymerasen	Promega, Heidelberg
pEC6	Cm ^R , Derivat von pEC5, <i>BamHI</i> -Schnittstelle vor <i>tac</i> -Promotor deletiert	Eikmanns et al., (1991a)
pSUP301	Amp ^R , Kan ^R , <i>oriT</i> , <i>oriV</i>	Simon et al., (1983)

2. Chemikalien

Soweit hier nicht aufgeführt, wurden analysenreine Chemikalien der Firma Merck AG, Darmstadt, verwendet. Restriktionsendonukleasen und andere Enzyme wurden von der Firma Boehringer, Mannheim bezogen. Produkte anderer Hersteller sind nachfolgend aufgelistet.

Amersham-Buchler, Braunschweig

α -[³⁵S] dATP, α -[³⁵S] CTP

Appligene, Heidelberg

Phenol, wassergesättigt

Biomol Feinchemikalien, Hamburg

NADPH, reduziert, Na₄-Salz; NADH, reduziert; 3-N-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)

Boehringer, Mannheim

Ampicillin Na-Salz; ATP; Chloramphenicol, kristallisiert; Dithiothreitol, kristallisiert; DNA Packaging Kit; NAD (freie Säure); NADP Na₂-Salz; Nonradioaktive DNA Labeling and Detection Kit; Nucleic Acid Detection Kit; pUC 18 Sequencing Kit; SP6/T7 Transkription Kit; RNA Labeling Kit; Tetracyclin Hydrochlorid;

Dianova, Hamburg

Geneclean Kit (Bio101 Inc., La Jolla, Ca, USA)

Difco Laboratories, Detroit, Mi, USA

Bacto-Agar; Bacto-Trypton; Brain-Heart-Infusion-Medium; Hefe-Extrakt; McConkey Agar Base

Gibco BRL Life Technologies Inc., Eggenstein

RNA Größenmarker (0.24 - 9.49 kb)

Pharmacia LKB, Freiburg

NAP-10 Säulen

Promega, Heidelberg

Ribonuclease Inhibitor (RNasin)

Schleicher und Schüll, Dassel, Schweiz

NL17 Membranfilter 0.45 μ m, Filter für Konjugation; Nytran-Nylonfilter N13

Serva Feinbiochemica, Heidelberg

Acrylamid; Agarose; Bisacrylamid; Harnstoff; Natriumdodecylsulfat (SDS);

Rinderserum-Albumin

Sigma Chemie, München

Diethylpyrocarbonat D5758 (DEPC); Ethidiumbromid; Isonicotinsäurehydrazid; N-Laurylsarcosin (Na-Salz); N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED); Tween 80; Nujol-Öl

3. Nährmedien und Kulturbedingungen

Die *E. coli* - Stämme wurden auf den Komplexmedien 2 x TY (16 g/l Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl) (Sambrook et al., 1989) oder Luria-Bertani (LB)-Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl) (Sambrook et al., 1989) kultiviert. McConkey Agar (McConkey, 1905) diente zur Identifizierung Sorbit-verwertender *E. coli* Stämme. Dazu wurde dem Medium (40 g/l McConkey Agar Base) nach dem Autoklavieren Sorbit steril in einer Endkonzentration von 1 % zugefügt. Sorbit-vergärende Stämme bilden auf diesem Medium rote Kolonien, Stämme die dazu nicht fähig sind, bilden weiße Kolonien. M9-Medium wurde als Minimalmedium für *E. coli* verwendet (Sambrook et al., 1989). Dieses Minimalmedium setzt sich aus 100 ml M9-Stammlösung (60 g/l Na_2HPO_4 , 30 g/l KH_2PO_4 , 10 g/l NH_4Cl , 5 g/l NaCl; pH 7.45) und 867 ml H_2O dest. zusammen. Nach dem Autoklavieren wurden dem Medium 30 ml Glucose (20 %), 0.1 ml CaCl_2 (1 M), 2 ml MgSO_4 (1 M) und 1 ml Thiamin (170 mg/ml) steril hinzugefügt. Zur Anzucht der Glutamat-auxotrophen *E. coli* Mutanten PA340 und EBE32 wurde dieses Medium durch Zugabe der Aminosäuren Arginin, Glutamat, Histidin, Isoleucin, Leucin, Methionin und Threonin in einer Endkonzentration von 1 mM ergänzt.

C. glutamicum-Stämmen wurden auf den bereits oben beschriebenen 2 x TY- oder LB-Komplexmedien gezüchtet. Als Selektionsmedium der *C. glutamicum*-Zellen nach der Konjugation wurde BHI-Medium (Brain-Heart-Infusion, 37 g/l) verwendet. Nach der Elektroporation wurde als Regenerationsmedium der *C. glutamicum*-Zellen BHIS-Medium (37 g/l Brain-Heart-Infusion, 0.5 M Sorbit) nach Liebl et al. (1989) verwendet. Zur Herstellung eines festen Nährbodens wurden den Medien 18 g/l Agar zugesetzt. Zur

Kultivierung der *C. glutamicum*-Stämme auf Minimalmedium wurde CgC mit 3-N-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS) (5 g/l $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$, 5 g/l Harnstoff, 5 mg/l K_2HPO_4 , 5 mg/l KH_2PO_4 , 37 g/l MOPS, 0.25 g/l MgSO_4 , 0.01 g/l CaCl_2 , 0.2 mg/l Biotin, 1 ml Spurenelementlösung [1 g/l FeSO_4 , 1 g/l MnSO_4 ; 0.1 g/l ZnSO_4 , 0.02 g/l CuSO_4 , 0.002 g/l NiCl ; in 100 ml H_2O dest. gelöst]; pH 6.3) (Eikmanns et al., 1991b) verwendet und die angegebenen Kohlenstoffquellen nach dem Autoklavieren steril hinzugefügt. Bei Anzucht von *C. glutamicum* auf Glutamat als alleiniger Kohlenstoff- und Stickstoffquelle wurden kein Ammoniumsulfat und kein Harnstoff dem Medium hinzugefügt, zusätzlich aber 30 mg/l Protocatechuat, 1 mg/l FeSO_4 und 0.3 mg/l FeCl_2 . Für die Experimente zur Glutamatproduktion wurde zur Anzucht von *C. glutamicum* CgC-Minimalmedium (5 g/l $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$), 5 g/l Harnstoff, 17 g/l KH_2PO_4 ; 21.76 g/l K_2HPO_4 , 0.25 g/l MgSO_4 , 0.01g/l CaCl_2 , 3 ml Spurenelementlösung; pH 7.0) verwendet und Glucose und Biotin in den angegebenen Konzentrationen nach dem Autoklavieren steril hinzugefügt. Für die Kurz-Zeit-Fermentationen mit *C. glutamicum* wurde das Mineralsalzmedium, wie bei Hoischen und Krämer, (1989) beschrieben, verwendet und Glucose nach dem Autoklavieren in der angegebenen Konzentration steril hinzugefügt.

Die Kultivierung der *E. coli* und *C. glutamicum* Stämme erfolgte, soweit nicht anders beschrieben, in 500 ml Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen, die 60 ml Medium enthielten. Die Kulturen wurden bei 120 rpm auf einem Rotationsschüttler inkubiert. *E. coli* wurde bei 37 °C, *C. glutamicum* bei 30 °C gezüchtet.

Für die Anzucht der *C. glutamicum* Stämme unter Glutamatproduktionsbedingungen wurden diese auf CgC-Minimalmedium mit 10 µg/l Biotin und 4 % Glucose vorgezüchtet bis sie eine OD_{600} von 20 erreicht hatten. Anschließend wurden damit die Hauptkulturen auf CgC mit 1 µg/l Biotin und 4 % Glucose mit einer OD_{600} von 0.3 angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 150 rpm im Laborschüttler, Modell Kühner (B. Braun, Melsungen). Für Kurz-Zeit-Fermentationen wurden die *C. glutamicum* Stämme zunächst unter Glutamatproduktionsbedingungen vorgezüchtet. In der frühen Glutamatproduktionsphase wurden die Zellen geerntet und mit 20 ml Mineralsalzmedium gewaschen. Anschließend erfolgte die Kurz-Zeit-Fermentation in 100 ml Erlenmeyerkolben mit 15 ml des entsprechenden Mineralsalzmediums mit 10 mM Glucose, aber ohne Zugabe von Biotin. Zur optimalen O_2 -Versorgung der Zellen in der Zellsuspension wurden diese im Wasserbad bei 30 °C mit einem Magnetrührer bei 650 rpm gerührt.

Zur Stammhaltung dienten Glycerinkulturen, die aus 70 % (v/v) einer Übernachtskultur und 30 % (v/v) einer sterilen Glycerinlösung angelegt wurden. Die Glycerinkulturen wurden bei - 70 °C gelagert. Sie wurden zum Animpfen der Stammhaltungsplatten benutzt, die bei 4 °C aufbewahrt und monatlich erneuert wurden.

4. Präparation und Reinigung von DNA

Plasmidpräparation aus *E. coli*

Für eine schnelle Isolierung von Plasmid-DNA wurde eine modifizierte Methode der alkalischen Lyse nach Birnboim (1983) verwendet. Dazu wurden die Zellen von 1.5 ml einer Übernachtskultur durch Zentrifugation (6000 rpm, 30 sek, RT) geerntet. Das Medium wurde vollständig von dem Zellpellet entfernt und dieses in 100 µl eiskalter Lösung A (50 mM Glucose, 25 mM Tris/HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0) resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200 µl Lösung B (0.2 N NaOH, 1 % SDS) und nach gründlichem Durchmischen wurde der Ansatz 5 min auf Eis inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 150 µl Lösung C (5 M Kaliumacetat, 1.8 M Essigsäure). Der Präparationsansatz wurde wiederum gründlich durchgemischt und weitere 5 min auf Eis inkubiert. Während dieser Zeit wurde der größte Teil der Proteine und die chromosomale DNA ausgefällt und anschließend abzentrifugiert (13000 rpm, 10 min, 4 °C). Der wässrige Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNA durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt. Anschließend erfolgte die Präzipitation der Plasmid-DNA durch Zugabe von 2 Vol. absolutem Äthanol, die Plasmid-DNA wurde 2 min bei RT gefällt und abzentrifugiert (13000 rpm, 10 min, RT). Das Präzipitat wurde zur Entfernung von Salzresten mit 70 % Äthanol gewaschen, in einer Vakuumzentrifuge (Speed Vac Concentrator, Bachofer) getrocknet und in 30 - 100 µl TE pH 7.6 (10 mM Tris/HCl pH 7.6, 1 mM EDTA pH 8.0) resuspendiert.

Nach einer modifizierten Methode nach Sambrook et al., (1989) konnten durch alkalische Lyse aus einer 50 ml Übernachtskultur größere Mengen einer Plasmid-DNA mit höherem Reinheitsgrad, die z.B. für die Transformation von *C. glutamicum* oder die DNA-Sequenzanalyse benötigt wird, gewonnen werden. Nach Präzipitation der Proteine und chromosomaler DNA wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von 0.5 Vol. Isopropanol gefällt. Danach wurde das Präzipitat in 2 ml H₂O dest. resuspendiert und durch Zugabe von

2 ml 5 M LiCl₂/50 mM Tris/HCl pH 8.0 und anschließender 15 minütiger Inkubation auf Eis und Zentrifugation (5000 rpm, 15 min, 4 °C) der größte Teil der RNA entfernt. Danach wurde die DNA durch Zugabe von 2.5 Vol. absolutem Äthanol gefällt und ein Abbau der restlichen RNA durch RNase A (10 mg/ml in 10 mM Tris/HCl pH 7.5/15 mM NaCl) vorgenommen. Die anschließende Aufreinigung und Präzipitation der Plasmid-DNA erfolgte wie oben bereits beschrieben.

Plasmidpräparation aus *C. glutamicum*

Da zur Lyse des Gram-positiven *C. glutamicum* eine Behandlung der Zellen durch EDTA und SDS sowie ein alkalischer pH nicht ausreichend sind, mußten die Zellen zusätzlich noch mit Lysozym zum Abbau des Mureinsacculus behandelt werden. Die Zellen einer 5 ml Übernachtskultur wurden geerntet (4000 rpm, 10 min, 4 °C), in 1 ml TES-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl) gewaschen und anschließend in einer Lysozymlösung (20 mg/ml TE pH 7.6) resuspendiert und 1 bis 2 h unter leichtem Schütteln bei 37 °C inkubiert. Die weitere Präparation der Plasmid-DNA erfolgte wie für *E. coli* beschrieben.

Isolierung chromosomaler DNA

Chromosomale DNA von *C. glutamicum* und *P. asaccharolyticus* wurde nach einer modifizierten Methode nach Altenbuchner und Cullum (1984) isoliert. Dabei wurden die *C. glutamicum* Zellen über Nacht in 5 ml LB-Medium mit 0.5 % Glucose gezüchtet. Die Zellen wurden durch 10 minütige Zentrifugation bei 4000 rpm, 4 °C (Heraeus Minifuge RF) geerntet, mit 2 ml TE pH 7.6 gewaschen (5 min, 4000 rpm, 4 °C), zum Aufschluß der Zellen in 1.5 ml einer Lysozymlösung (15 mg/ml TE pH 7.6) resuspendiert und 3 h bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 300 µl SDS (10%) und eine weitere Inkubation für 10 min bei 65 °C. Nach Abkühlung des Lysats auf Raumtemperatur (RT) wurde diesem 5 ml TE-Puffer hinzugefügt. Zur Aufreinigung der chromosomalen DNA wurde das Lysat dreimal mit Phenol/Chloroform (Sambrook et al., 1989) extrahiert. Zur Präzipitation der DNA wurde diese mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat pH 5.2 versetzt und zur Ausfällung der DNA mit 1.2 Vol. Isopropanol gemischt. Die DNA-Präzipitation erfolgte bei RT. Das Präzipitat wurde zweimal mit 70 % Äthanol gewaschen und das DNA-Pellet in 500 µl TE-Puffer pH 7.6 resuspendiert. Chromosomale DNA von *P. asaccharolyticus* wurde nach der gleichen Methode isoliert.

5. Analyse und Rekombination von DNA

5.1 Restriktion und Modifikation der DNA

Restriktion der DNA

Die DNA wurde zur Charakterisierung und/oder Klonierung mit Restriktionsendonukleasen geschnitten. Inkubationspuffer und die optimale Reaktionstemperatur wurden gemäß den Produktinformationen des Herstellers für die einzelnen Restriktionsenzyme gewählt. Der Standard-Restriktionsansatz enthielt ungefähr 100 ng DNA, 1/10 Vol. Reaktionspuffer und 0.5 µl (ca. 1 U) des Restriktionsenzym. Das Volumen des Ansatzes wurde mit H₂O dest. auf 10 µl aufgefüllt. Nach Durchmischung des Reaktionsansatzes wurde dieser 90 min bei der entsprechenden Reaktionstemperatur inkubiert. Wenn größere Mengen DNA geschnitten wurden, wurde der Ansatz entsprechend vergrößert. Wurde die DNA mit mehr als einem Restriktionsenzym restringiert, so konnte diese Reaktion in einem Ansatz durchgeführt werden, falls die verwendeten Restriktionsendonukleasen den gleichen Reaktionspuffer benötigten. Waren die Enzyme in unterschiedlichen Puffern aktiv, so wurde die Restriktion zunächst in dem Reaktionspuffer mit der niedrigeren Salzkonzentration durchgeführt und anschließend der Puffer mit der höheren Salzkonzentration und das weitere Restriktionsenzym dem Ansatz hinzugefügt (Sambrook et al., 1989). Nach Abschluß der Restriktion wurde dem Reaktionsansatz 3 µl Blaumarker (4 M Harnstoff, 50 mM EDTA pH 8.0, 50 % (w/v) Saccharose, 0.1 % (w/v) Bromphenolblau) hinzugefügt und die Spaltprodukte auf einem Agarosegel entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Mittels eines Molekulargewichtsstandards konnte eine halblogarithmische Eichgrade erstellt und damit die Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente bestimmt werden. Die Herstellung der Agarosegele sowie die Durchführung der Gelektrophorese erfolgte nach Sambrook et al. (1989). Die Agarosekonzentration betrug entsprechend der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente 0.7 - 2.0 %. Als Puffersystem diente 1 x TAE (40 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0, 10 mM Natriumacetat). Für die Gelektrophorese wurden Elektrophoresekammern der Firma Gibco/BRL, Ort, verwendet und als Spannungsquelle diente ein Gleichstromgerät der Firma BioRad (Modell 100/200 powersupply). Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Agarosegel in wässriger Ethidiumbromid-Lösung (10 µg/ml) gefärbt. Die einzelnen DNA-Fragmente waren anschließend bei Betrachtung auf einem Transilluminator (Vetter GmbH, Wiesloch) unter UV-Licht bei

366 nm als orange-rot fluoreszierende Banden sichtbar. Das Ergebnis der Agarosegelelektrophorese wurde photographisch mit einer Polaroidkamera (MP-3 Land Camera) dokumentiert.

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Gewünschte DNA-Fragmente konnten aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des "Gene clean"-Kits (Dianova, Hamburg) aufgereinigt werden. Die Methode beruht auf der Freisetzung der DNA aus der bei 50 °C schmelzenden Agarose in Gegenwart von Natrium-Jodid. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der DNA-Fragmente durch selektive Bindung der einzel- und doppelsträngigen DNA an eine Kieselgelmatrix und Elution sowie Aufnahme der DNA in einem Puffer niedriger Salzkonzentration (TE pH 7.6). Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Behandlung überhängender DNA-Enden mit Klenow-Polymerase

Die Klenow-Polymerase ist ein carboxyterminales Teilfragment der DNA-Polymerase I von *E. coli*. Sie besitzt eine 5'-3' DNA-Polymerase-Aktivität, d.h. sie katalysiert in Gegenwart von Desoxynukleotidtriphosphaten die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einzelnen Nukleotiden, entsprechend eines 3'-5' komplementären DNA-Stranges, der als Matritze verwendet wird. Daneben verfügt dieses Enzym auch über eine 3'-5' Exonuklease-Aktivität. Die Klenow-Polymerase kann daher sowohl 5'überhängende DNA-Enden auffüllen als auch 3'überhängende DNA-Enden abbauen (Kornberg und Kornberg, 1974). Die Reaktion wurde 30 min bei Raumtemperatur nach Sambrook et al. (1989) in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Der Standard-Reaktionsansatz enthielt 10 µl linearisierte Plasmid-DNA, 1/10 Vol. Nick-Translationspuffer (250 mM Tris/HCl pH 7.8, 25 mM MgCl₂, 50 µg/ml Rinderserum-Albumin), 1/10 Vol. Desoxynukleotidtriphosphat-Mix (10 mM) und 2 U Klenow-Polymerase. Nach Ablauf der Reaktion wurde der Ansatz zur Inaktivierung der Klenow-Polymerase 10 min auf 70 °C erhitzt und anschließend das Enzym durch Phenol-Chloroform-Extraktion und Äthanolpräzipitation aus dem Ansatz entfernt. Die gereinigte DNA konnte direkt oder die Vektor-DNA nach Entfernung der 5'-Phosphatreste in die Ligation eingesetzt werden.

Behandlung mit alkalischer Phosphatase

Alkalische Phosphatase (CIP, calf intestine alkaline phosphatase) wird verwendet, um endständige 5'Phosphatreste aus einer linearen, doppelsträngigen Nukleotidkette zu entfernen. Eine Behandlung mit alkalischer Phosphatase dient dem Ziel, durch Dephosphorylierung eine Religation des Vektors in einem Ligationsansatz zu verhindern, da eine DNA-Ligase neben einer 3' OH-Gruppe auch einen terminalen 5'Phosphatrest zur Ausbildung einer Phosphodiesterbindung benötigt (Bolivar und Backman, 1979). Dadurch wird bei Klonierungsexperimenten der Einbau von Fremd-DNA in einen linearisierten Vektor begünstigt. Die alkalische Phosphatase-Behandlung der Vektoren erfolgte für 30 min bei 37 °C nach einer Methode von Sambrook et al. (1989) in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Der Standard-Reaktionsansatz setzte sich aus 10 µl linearisierter Vektor-DNA, 1/10 Vol. CIP-Reaktionspuffer und 1 U alkalischer Phosphatase zusammen. Nach Abschluß der Dephosphorylierungsreaktion wurde der Reaktionsansatz zur Inaktivierung der alkalischen Phosphatase 10 min auf 70 °C erhitzt, und das Enzym wurde durch anschließende Phenol/Chloroform Extraktion und Äthanolpräzipitation aus dem Ansatz entfernt. Die gereinigte DNA konnte dann in die Ligationsreaktion eingesetzt werden.

Ligation restringierter DNA

Zur Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit linearisierten Vektoren wurde die T4-DNA-Ligase verwendet. DNA-Ligasen katalysieren die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einer 3'OH - und 5'Phosphatgruppe der Nukleinsäuren. Die T4-DNA-Ligase kann sowohl überhängende einzelsträngige einander komplementäre Enden als auch glatte, einzelsträngige Enden eines linearen doppelsträngigen DNA-Moleküls miteinander verbinden (Weiss et al., 1968). Das molare Verhältnis von Vektor zu DNA-Fragment sollte hierbei 1:3 betragen. Die Durchführung erfolgte nach einem modifizierten Protokoll nach Sambrook et al. (1989). Der Ligationsansatz enthielt linearisierte Vektor-DNA, Fragment-DNA, 1/10 Vol. Ligationspuffer (660 mM Tris/HCl pH 7.5, 50 mM MgCl₂, 50 mM Dithiothreitol, 10 mM ADP) und 1 U T4-DNA-Ligase. Das Gesamtvolumen des Ligationsansatzes wurde mit H₂O dest. auf 20 µl aufgefüllt. Der Ligationsansatz wurde bei 16 °C 16 h inkubiert und danach direkt bei der Transformation eingesetzt.

5.2 DNA-Sequenzanalyse

Die DNA-Sequenzanalyse erfolgte nach dem Kettenabbruch-Prinzip von Sanger et al. (1977). Die Sequenzierung doppelsträngiger, superhelikaler DNA wurde mit dem "pUC Sequencing Kit" (Boehringer, Mannheim) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Da die zu sequenzierenden DNA-Fragmente in dem Vektor pUC18 inseriert wurden, konnten die "sequencing" (sp) und "reverse sequencing" (rsp) Standard-Primer für die Kettenverlängerungsreaktion verwendet werden. Zur Sequenzierung wurden 2 µg Plasmid-DNA durch Alkali-Behandlung frisch denaturiert und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Dann wurden 2.5 pmol sp- oder rsp-Primer sowie 1.5 µl Reaktionspuffer zu der DNA gegeben und der Reaktionsansatz auf 15 µl mit H₂O dest. aufgefüllt. Während einer 20-minütigen Inkubation bei 37 °C erfolgte die Anhybridisierung des Primers an die einzelsträngige Plasmid-DNA. Anschließend erfolgte die Zugabe von 4 U Klenow-Enzym und 16 µCi α-[³⁵S]-dATP. Zur Kettenverlängerungsreaktion wurde der Ansatz auf vier Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt, in denen sich jeweils Mixe der Desoxynukleotide A, C, G und T mit jeweils einer limitierenden Menge eines anderen Didesoxynukleotidtriphosphates (ddNTP) befanden. Während einer 20-minütigen Inkubation bei 37 °C wurde der Primer entsprechend der DNA-Matritze verlängert und durch Einbau von ³⁵[S]-dATP in den neusynthetisierten DNA-Strang wurde dieser markiert. Durch Einbau von ddNTP's anstelle der in der DNA vorkommenden Desoxynukleotide (dNTP) kommt es dann zu basenspezifischen Kettenabbruchsreaktionen. Anschließend wurden zusätzlich je 1.5 µl dNTP's (jeweils 125 µM dATP, dGTP, dCTP, dTTP; pH 7.5) dem Reaktionsansatz hinzugefügt, um DNA-Fragmente in die kein ddNTP eingebaut wurde, bis zu einem hohen Molekulargewicht aufzufüllen, so daß sie die spätere Auswertung des Experiments nicht störten. Die Reaktion wurde nach 15 min bei 37 °C durch Zugabe von Formamid-Farbmarker (4 M Harnstoff, 50 mM EDTA, 50 % (w/v) Saccharose, 0.1 % (w/v) Bromphenolblau, 50 % (v/v) Formamid) gestoppt. Die neusynthetisierten, radioaktiv-markierten DNA-Stränge konnten nach erneuter Denaturierung (3 min, 95 °C) gelektrophoretisch entsprechend ihres Molekulargewichts auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel (6 % Polyacrylamid/ 7 M Harnstoff) aufgetrennt werden, das nach Sambrook et al. (1989) hergestellt wurde. Es wurde eine Sequenzierungsapparatur der Firma Gibco BRL (Eggenstein) verwendet. Als Puffersystem diente 1 x TBE (10.8 g/l Tris-Base, 5.5 g/l Borsäure, 0.74 g/l EDTA; pH 8.3). Nach einem Vorlauf von ca. 1 h bei 2500 V wurden für die Gelektrophorese 1.5 µl der Reaktionsansätze

auf das auf 50-55 °C vorgewärmte Sequenzgel aufgetragen und die DNA-Fragmente 1-3 h bei 50 °C, 2500 V und 60 mA aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 10 min in 10 %iger (v/v) Essigsäure fixiert, anschließend gründlich mit H₂O bidest. gespült und 2 h bei 80 °C getrocknet. Danach wurde ein Röntgenfilm (Kodak, X-Omat XAR351) auf das trockene Gel gelegt und 12 h bei Raumtemperatur exponiert.

5.3 Synthese von Oligonukleotiden

Oligonukleotide für die DNA-Sequenzanalyse oder Polymerase-Kettenreaktion wurden mit Hilfe des DNA-Synthesizers (Gene Assembler Plus, Pharmacia LKB, Freiburg) synthetisiert (Caruthers et al., 1985). Dabei findet unter wasserfreien Bedingungen eine Kondensation der 3'OH-Gruppe mit dem 5'Phosphatrest der Desoxyribonukleotide statt. Alle übrigen freien OH-Gruppen sowie primäre Amine sind durch Bindung von Schutzgruppen vor der Reaktion geschützt. Nach der Synthese wurden die Oligonukleotide durch zweimaliges Waschen mit je 1 ml Ammoniak (30 % (v/v)) und 16 h Inkubation bei 55 °C von der Säule abgespalten und die Schutzgruppen von den primären Aminen entfernt. Zur Aufreinigung der Oligonukleotide wurde eine Gelfiltration durchgeführt. Dazu wurde eine NAP-10 Säule (Sephadex G25, Pharmacia LKB, Freiburg) mit 10 mM NaH₂PO₄ pH 7.0 äquilibriert und anschließend wurde die Oligonukleotid-Lösung aufgetragen. Durch Zugabe von 1.5 ml sterilem H₂O dest. wurde diese wieder von der Säule eluiert. Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt. Eine Extinktion von 1 bei 260 nm und einer Küvettschichtdicke von 1 cm entspricht einer einzelsträngigen DNA-Konzentration von 33 µg/ml.

5.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein *in-vitro* Verfahren zur selektiven Anreicherung von Nukleinsäurebereichen definierter Länge und Sequenz aus einem Gemisch von Nukleinsäure-Molekülen. Hierbei werden die Eigenschaften von DNA-Polymerasen genutzt, die einen Einzelstrang zu einem Doppelstrang auffüllen können, wenn ihnen ein kurzer doppelsträngiger Bereich als Primer zur Verfügung steht (Mullis et al., 1986). Die PCR-Reaktion wurde nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Der PCR-Ansatz bestand aus 200 - 500 ng chromosomaler DNA als Matritze, 100 pmol der Primer,

die zu jeweils einem der beiden DNA-Stränge komplementär waren und den zu amplifizierenden DNA-Bereich flankierten, 1/10 Vol. des Nukleotid-Mixes (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 1/10 Vol. $MgCl_2$ (25 mM), 1/10 Vol. Reaktionspuffer und 4 U Taq-Polymerase. Der Ansatz wurden anschließend mit Nujol-Öl (Sigma Chemie, München) überschichtet. Anschließend wurde die *in-vitro* DNA Synthese im DNA Thermal Cycler 480 (Perkin Elmer Cetus, USA) durchgeführt. Insgesamt wurden 25 Reaktionszyklen durchlaufen, die jeweils aus der Hitzedenaturierung der DNA-Matrize (1 min, 94 °C), der Anhybridisierung der Primer (1 min, 55 °C) und der DNA-Synthese durch die Taq-Polymerase (2 min, 72 °C) bestanden. Nach Abschluß der PCR-Reaktion wurden die PCR-Produkte durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Äthanolpräzipitation aufgereinigt und konnten nach Restriktion mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen in die Ligation eingesetzt werden.

5.5 Southern Blot Analyse

Bei der Southern Blot Hybridisierung wurde hochmolekulare DNA zunächst durch Restriktionsendonukleasen geschnitten und die Spaltprodukte gelelektrophoretisch entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Die in dem Agarosegel vorhandenen DNA-Fragmente wurden nach einer Methode von Southern (1975) denaturiert und aus der Gelmatrix auf eine Nylonmembran transferiert, immobilisiert und gegen eine spezifische markierte DNA-Sonde hybridisiert. Die DNA-DNA-Hybride konnten dann je nach Markierung der Sonde durch verschiedene Methoden nachgewiesen werden.

Vakuum-unterstützter Transfer der DNA

Die gelelektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fragmente auf einem 0.8 %igen Agarosegel erfolgte bei 20 V für 16 h. Anschließend wurden die DNA-Fragmente durch Vakuum-unterstützte Diffusion mit einem "VacuGen"-Blotter (Pharmacia LKB, Freiburg) auf eine Nylonmembran (Nytran N13, Schleicher und Schuell, Dassel, Schweiz) transferiert. Dazu wurde eine Nylonmembran auf die Größe des Agarosegels zugeschnitten, mit H_2O dest. angefeuchtet, auf eine Trägerplatte gelegt und mit einer Plastikmaske, deren Fenster über der Membran lag, abgedeckt. Auf die Öffnung der Maske wurde das Agarosegel mit der Unterseite plziert. Anschließend wurde ein Vakuum von 30 - 50 mbar eingestellt. Dann wurde das Gel für 4 min mit einer Depurinisationslösung (0.25 N NaOH) überschichtet, die

dann durch eine Denaturierungslösung (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) ersetzt wurde. Anschließend wurde das Gel für 3 min mit einer ausreichenden Menge an Neutralisationslösung (1 M Tris, 2 M NaCl, 75 ml /l konz. HCl; pH 5.0) bedeckt. Der eigentliche DNA-Transfer erfolgte durch Überschichtung des Gels für 1 h mit einer Transferlösung 20 x SSC (3 M NaCl, 0.3 M Na-Citrat; pH 7.0). Nach Beendigung des DNA-Transfers wurde die Nylonmembran für 10 min in 20 x SSC gebadet, getrocknet und die DNA durch UV-Licht (3 min, 366 nm) auf der Nylonmembran fixiert.

Digoxigenin-dUTP Markierung von DNA

DNA-Sonden wurden mit Digoxigenin-desoxy-11-uridintriphosphat unter Verwendung des "DIG DNA Labeling and Detection Kits" (Boehringer, Mannheim) markiert. Hierbei wurde an linearisierte, denaturierte DNA-Hexanukleotide ("random-primed"-Methode nach Feinberg und Vogelstein, 1983) hybridisiert und in Anwesenheit der Desoxynukleotide dATP, dCTP, dGTP, dTTP und dem Dig-markierten dUTP wurde mit Hilfe des Klenow-Enzyms ein Digoxigenin-markierter DNA-Strang polymerisiert. Der Standard-Ansatz enthielt ungefähr 1 µg linearisierte, denaturierte DNA, 1/10 Vol. Hexanukleotid-Mix, 1/10 Vol. dNTP-Markierungsmix (je 1 mM dATP, dCTP, dGTP, 0.65 mM dTTP, 0.35 mM dig-dUTP; pH 6.5) und 2 U Klenow-Enzym. Der Ansatz wurde auf das entsprechende Volumen mit H₂O dest. aufgefüllt. Die Reaktion erfolgte für 16 h bei 37 °C. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe 1/10 Vol. 0.2 M EDTA-Lösung, pH 8.0 gestoppt und die DNA durch nachfolgende Äthanol-fällung präzipitiert.

DNA-DNA-Hybridisierung

Zunächst wurde die Nylonmembran, an die die DNA gebunden war, mit 80 ml einer Hybridisierungslösung (5 x SSC, 0.1 % Na-Laurylsarcosin, 0.02 % SDS, 1 % Blocking Reagenz) für 4 - 6 h bei 68 °C prähybridisiert, um später unspezifische Bindungen der markierten DNA-Sonde an die Membran zu vermeiden. Danach wurde die Membran zusammen mit 3 ml der Hybridisierungslösung und 100 ng der frisch denaturierten, markierten DNA-Sonde in einen Plastikbeutel eingeschweißt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 68 °C unter leichtem Schütteln. Nach Abschluß der Hybridisierung wurde der Filter zweimal 8 min in Waschlösung 1 (2 x SSC, 0.1 % SDS) bei RT und zweimal jeweils 15 min in Waschlösung 2 (0.1 x SSC, 0.1 % SDS) bei 68 °C gebadet. Anschließend konnte die Membran bis zur Detektion trocken aufbewahrt werden.

Detektion der DNA-DNA-Hybride

Der Nachweis der DNA-DNA-Hybride erfolgte mit Hilfe des "DIG DNA Labeling and Detection Kits" (Boehringer, Mannheim) wie vom Hersteller beschrieben, unter Verwendung eines Digoxigenin-Antikörper-Alkalische Phosphatase-Konjugats und einer enzymgekoppelten Farbreaktion. Bei einem alkalischen pH entfernt die alkalische Phosphatase den Phosphatrest des 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (X-Phosphat) und gleichzeitig wird Nitroblau-Tetrazolium-Salz (NBT) zu Formazan reduziert. Bei beiden Reaktionen wird ein blauer bzw. purpurfarbener, unlöslicher Farbstoff gebildet, der an der Membran haften bleibt. Dazu wurde die Membran 1 min in Puffer I (100 mM Tris/HCl pH 7.6, 150 mM NaCl) gewaschen und anschließend 30 min bei RT in Puffer II (0.5 (w/v) Blocking Reagenz in Puffer I) inkubiert. Der Filter wurde wiederum kurz in Puffer I gebadet und dann 30 min bei RT mit einer Antikörper-Konjugat-Lösung (150 mU Anti-Digoxigenin-alkalische Phosphatase-Konjugat in 25 ml Puffer I) inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen mit Puffer I entfernt. Anschließend wurde die Membran 2 min in Puffer III (100 mM Tris/HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM $MgCl_2$) äquilibriert und danach zusammen mit 10 ml einer frisch angesetzten Färbelösung (45 μ l NBT, 35 μ l X-Phosphat in 10 ml Puffer III) in eine Plastikfolie eingeschweißt und im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde durch Waschen in TE-Puffer pH 8.0 gestoppt.

6. Transformationstechniken

6.1 Transformation von *E. coli*

Damit Zellwand und Zellmembran der *E. coli*-Stämme DH5, PA340 und EBE32 für superhelikale DNA-Moleküle durchlässig werden, wurden die Zellen nach einer modifizierten Methode nach Cohen et al., (1973) mit Calciumchlorid behandelt. Für die Transformation des *E. coli*-Mobilisatorstammes S17-1 wurden kompetente Zellen nach einem Protokoll von Hanahan (1985) mit Rubidiumchlorid behandelt. Anschließend wurden die Zellen in Aliquots von 400 μ l mit 100 μ l Glycerin (87%) gemischt und bei -70 °C gelagert. Die Transformation der *E. coli*-Stämme mit maximal 50 ng Plasmid-DNA erfolgte ebenfalls nach einer modifizierten Methode von Cohen et al. (1973). Die Transformanten wurden auf Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika selektioniert und bei 37 °C inkubiert. Nach 18 h waren die Transformanten gut sichtbar.

6.2 Elektroporation von *C. glutamicum*

Die *C. glutamicum*-Stämme wurden mittels Elektroporation transformiert. Bei der Elektroporation verursacht ein elektrischer Impuls eine vorübergehende Disorganisation der Zellmembran, wodurch diese dann für DNA und andere Makromoleküle permeabel wird. Kompetente *C. glutamicum*-Zellen wurden nach einer modifizierten Methode nach Haynes und Britz (1989) präpariert. Die Elektroporation der kompetenten Zellen erfolgte nach einem Protokoll von Liebl et al. (1989) mit einem BioRad Gene Pulser (BioRad, München). Zur Regeneration wurden die Zellen 50 min bei 30 °C in BHIS-Medium inkubiert und anschließend zur Selektion auf BHIS-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum (15 µg/ml) ausplattiert.

6.3 Konjugation

Die Konjugation von Bakterien stellt eine natürliche Art der DNA-Übertragung dar. Dabei wird die DNA gerichtet von einem F⁺-Donorstamm in einen F⁻ Rezipientenstamm transferiert.

Konjugation zwischen verschiedenen *E. coli* Stämmen

Um einen Transfer von DNA und einen anschließenden Austausch von bestimmten Wirtsgenen zu erreichen, wurde eine Methode nach Miller (1972) verwendet. Dazu wurden der *hfr*-Stamm *E. coli* GSJ403 und der Rezipient *E. coli* PA340 auf LB-Medium mit einer OD₆₀₀ von 0.05 angeimpft und bei 37 °C gezüchtet. Nach Erreichen der frühen exponentiellen Wachstumsphase bei OD₆₀₀ = 0.5 - 0.7 wurden Donor und Rezipient im Verhältnis 1:1 gemischt. Anschließend erfolgte der gerichtete Transfer der chromosomalen DNA von *E. coli* GSJ403 nach *E. coli* PA340 bei 37 °C. Nach 80 min wurde die Konjugation durch Zugabe von 250 µg/ml Streptomycin abgebrochen, da der *E. coli* - Donorstamm dagegen sensitiv ist. Zum Abbruch der Konjugationsbrücken wurden die Zellen 5 min bei 250 rpm geschüttelt und anschließend zur Selektion auf LB-Agarplatten mit 20 µg/ml Tetracyclin und 250 µg/ml Streptomycin ausplattiert.

Konjugation zwischen *E. coli* und *C. glutamicum*

DNA kann auch zwischen Zellen verschiedener Spezies via Konjugation übertragen werden. So konnte gezeigt werden, daß der Stamm *E. coli* S17-1 in der Lage ist, mobilisierbare

Plasmide wie pSUP301 mittels Konjugation nach *C. glutamicum* zu transferieren (Schäfer et al., 1990). Die Durchführung der Konjugation erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Schäfer et al. (1990). Der Rezipient *C. glutamicum* 13032 wurde auf 70 ml LB-Medium gezüchtet. Nach Erreichen einer OD_{600} zwischen 5 und 10 wurden die Zellen für 9 min bei 48.5 °C einem Hitzeschock unterzogen, um das Restriktionssystem dieses Stammes kurzzeitig auszuschalten. Der Donorstamm *E. coli* S17-1, der das mobilisierbare Plasmid enthielt, wurde in 5 ml LB-Medium über Nacht vorgezüchtet und anschließend auf frisches Komplexmedium mit einer OD_{600} von 0.05 überimpft. Nach Erreichen einer OD_{600} von 1.0 wurden die Zellen 10 min auf Eis gekühlt, um eine weitere Zellteilung zu verhindern. Danach wurden Donor und Rezipient im Verhältnis 1:4 gemischt und zusammen durch 10 minütige Zentrifugation (4500 rpm, 4 °C) sedimentiert. Das Zellpellet wurde vorsichtig in 150 µl LB-Medium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension auf einen sterilen Zellulosenitratfilter (NL17, Ø 0.45 µm, Schleicher und Schuell, Dassel, Schweiz), der auf eine LB-Agarplatte plaziert worden war, transferiert. Die Kreuzungsansätze wurden dann für 20 h bei 30 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen von dem Filter mit 600 µl LB-Medium abgeschwemmt und zur Selektion auf BHI-Agarplatten mit Nalidixinsäure (50 µg/ml) und dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und 48 h bei 30 °C inkubiert. Da der *E. coli* Donor-Stamm Nalidixinsäure-sensitiv ist, konnten auf diese Weise Donor und Rezipient voneinander getrennt werden.

7. Konstruktion einer Cosmidgenbank in *E. coli*

Zur Isolierung der Glutamat-Synthase Gene aus dem Chromosom von *C. glutamicum* wurde eine Cosmidgenbank aus chromosomaler *C. glutamicum*-DNA in *E. coli* erstellt. Dazu wurde chromosomale DNA von *C. glutamicum* EB1 partiell mit *Sau3A* geschnitten, die Fragmente in die *Bam*HI-Schnittstelle des Cosmids pHC79 ligiert, in die Proteinhülle des Bakteriophagen λ verpackt und *E. coli* DH5 damit transfiziert.

Die *in-vitro* Verpackung der rekombinanten Cosmide in die Proteinhülle des Bakteriophagen λ erfolgte nach einer Methode von Sternberg et al. (1979). Dazu wurde das "DNA Packaging Kit" (Boehringer, Mannheim) verwendet. Für den zell-freien Einbau von Cosmid-DNA in die Proteinhülle des Phagen wurde Ultraschallextrakt, der die Vorstufe der

Proteinhülle des Phagen λ enthielt, zusammen mit einem Zell-Lysat von *E. coli* BHB2688, das Komponenten zur Reifung des Phagen λ enthielt, langsam aufgetaut. Dann wurde die zu verpackende DNA (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) dem Ansatz hinzugefügt, das Gemisch vorsichtig homogenisiert und 1 h bei RT inkubiert. In dieser Zeit wurden alle von *cos*-Stellen flankierte DNA-Moleküle, welche 78 - 105 % der Größe des Phagengenoms von 48 kb aufwiesen, in die leeren Phagenköpfe verpackt und die Einzelkomponenten aggregierten zum kompletten Phagen. Anschließend wurden die rekombinanten Phagen mit einer Gelatinelösung (10 mM Tris/HCl pH 7.4, 10 mM MgSO_4 , 0.01 % (w/v) Gelatine) verdünnt und *E. coli*-Wirtszellen damit transfiziert.

E. coli DH5 wurde als Wirtstamm für die Infektion mit den rekombinanten λ Phagen verwendet. Er wurde auf Maltose-Komplexmedium (10 g/l Trypton, 8 g/l NaCl, 0.2 % Maltose) über Nacht gezüchtet. Dann wurden die Zellen geerntet (10 min, 4000 rpm, 4 °C) und in 40 % ihres ursprünglichen Volumens in 10 mM MgSO_4 resuspendiert und 45 min unter schnellem Schütteln (200 rpm) auf einem Laborschüttler Modell Kühner (B. Braun, Melsungen) bei 32 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit den rekombinanten Phagen im Verhältnis 1:1 gemischt und 20 min bei 37 °C inkubiert. Dann wurde 1 ml LB-Medium hinzugefügt und der Ansatz weitere 40 min bei 37 °C inkubiert und zur Selektion auf LB-Medium mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin ausplattiert.

8. Techniken zur Analyse von RNA

8.1 Isolierung und Reinigung der RNA von *C. glutamicum*

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus *C. glutamicum* wurde eine optimierte Methode von Schwinde (1991) verwendet. *C. glutamicum*-Zellen wurden in 50 ml Komplexmedium bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{600} 4-5) gezüchtet, in Eiswasser auf 0 °C abgekühlt und anschließend geerntet (10 min, 4000 rpm, 4 °C). Die Zellen wurden dann zweimal mit 10 ml eiskaltem Waschpuffer (50 mM Tris/HCl pH 6.6, 50 mM NaCl) gewaschen. Anschließend erfolgte der Zellaufschluß unter denaturierenden Bedingungen, um den Abbau von RNA durch RNasen zu vermeiden. Dazu wurde das Zellpellet in 5 ml 60 °C warmen Aufschlußpuffer (10 mM Na-Acetat, 1 % (v/v) SDS; pH 5.0) resuspendiert und sofort das gleiche Volumen 60 °C warmes, saures, wassergesättigtes Phenol hinzugegeben. Der Phenol-Zellaufschluß wurde 10 min bei 60 °C unter gelegentlichem

Schütteln inkubiert, anschließend 5 min in Eiswasser abgekühlt und die wässrige und organische Phase wurden durch Zentrifugation voneinander getrennt (10 min, 5000 rpm, 4 °C). Die saure Phenolextraktion diente dazu, selektiv Ribonukleinsäuren zu präparieren, da die DNA bei saurem pH in der organischen Phase verbleibt (Wallace, 1987). Diese Phenol-Extraktion wurde insgesamt dreimal wiederholt. Danach erfolgte die Präzipitation der Ribonukleinsäure aus der wässrigen Phase durch Zugabe von 1/10 Vol. Na-Acetat pH 5.2 und 2.5 Vol. -20 °C kaltem Äthanol bei - 20 °C. Die gefällte RNA wurde abzentrifugiert, zweimal mit kaltem 70 % igem Äthanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl DEPC-Wasser resuspendiert. Um den Abbau der isolierten RNA durch RNasen zu verhindern, wurde zu der gelösten RNA 80 U des RNase Inhibitors RNAsin hinzugegeben. Alle verwendeten Lösungen wurden in RNase-freiem DEPC-Wasser (0.25 % Diethylpyrocarbonat, unspezifischer RNase-Inhibitor) angesetzt und die für die RNA-Isolierung verwendeten Gefäße und Lösungen wurden 30 min autoklaviert. Die Konzentrationsbestimmung der gelösten RNA erfolgte photometrisch bei 260 nm. Eine Extinktion von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 33 µg/ml einzelsträngiger Nukleinsäure.

8.2 Northern Blot Analyse

Zur Bestimmung der Transkriptlänge wurde eine Northern Blot Analyse durchgeführt. Analog zu der Southern Blot Analyse wird hierbei zunächst die RNA durch denaturierende Gelelektrophorese entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Anschließend wird die RNA von der Gelmatrix auf eine Nylonmembran transferiert, immobilisiert und eine markierte RNA-Sonde dagegen hybridisiert (Alwine et al., 1977). Die RNA-RNA-Hybride können dann durch eine geeignete Methode nachgewiesen werden.

Auftrennung der RNA auf einem denaturierenden Agarosegel

Die Gesamt-RNA wurde mittels Agarosegelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen entsprechend ihres Molekulargewichts im Vergleich zu einem RNA-Größenmarker aufgetrennt. Dazu wurde ein 0.8 %iges Agarosegel, das 17 % deionisiertes Formaldehyd enthielt, nach Sambrook et al. (1989) hergestellt. 6 µg der aufzutrennenden Gesamt-RNA wurde mit 1 U DNase RQ1 10 min bei 37 °C inkubiert und anschließend mit 10 µl Ladepuffer versetzt. Der Ladepuffer bestand aus 75 µl deionisiertem Formamid, 30 µl

deionisiertem Formaldehyd, 30 µl 5 x MOPS-Puffer (200 mM MOPS, 50 mM Na-Acetat, 10 mM EDTA), 15 µl 10 x Farbmaler (0.25 (w/v) Bromphenolblau, 0.25 % (w/v) Xylencyanol, 30 % (v/v) Ficoll in 10 x TBE-Puffer) und 1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml). Die Proben wurden anschließend 10 min bei 65 °C erhitzt, auf Eis abgekühlt und auf das Agarose/Formaldehydgel aufgetragen. Als Puffersystem diente 1 x MOPS. Die Auftrennung der RNA erfolgte in einem Zeitraum von 3 h bei einer angelegten Spannung von 70 - 85 V. Nach Beendigung der Elektrophorese konnte die aufgetrennte RNA unter UV-Licht bei 366 nm kontrolliert und das Ergebnis photographisch dokumentiert werden.

Vakuum-unterstützter Transfer der RNA

Nach Abschluß der Gelelektrophorese konnte die RNA durch Vakuum-unterstützte Diffusion mit einem "VacuGen"-Blotter (Pharmacia LKB, Freiburg), wie bereits für die Southern-Blot-Analyse beschrieben, auf eine Nylonmembran transferiert werden. Lediglich die Zusammensetzung der alkalischen Denaturierungslösung (50 mM NaOH, 10 mM NaCl) und der Neutralisierungslösung (0.1 M Tris/HCl pH 7.4) unterschied sich von den entsprechenden Lösungen bei dem DNA-Transfer.

Herstellung einer Digoxigenin-markierten RNA-Sonde

Die Herstellung digoxigenin-markierter "antisense" mRNA erfolgte durch *in-vitro*-Transkription einer DNA-Matrize, die hinter den Promotor der SP6- oder T7-RNA-Polymerase des Transkriptionsvektors pGEM4Z™ (Promega, Heidelberg) kloniert wurde. Dabei bauen die verwendeten RNA-Polymerasen Digoxigenin-markiertes Uridintriphosphat (Dig-UTP) in die synthetisierte RNA ein. Zur Herstellung spezifischer RNA-Sonden wurde das "DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)" (Boehringer, Mannheim) verwendet. Der *in-vitro* Transkriptionsansatz bestand aus 1 µg linearisierter Plasmid-DNA, 1/10 Vol. NTP-Markierungsmix (je 1 mM ATP, CTP, GTP, 6.5 mM UTP, 3.5 mM Dig-UTP; pH 7.5), 1/10 Vol. Transkriptionspuffer und 2 U T7-RNA-Polymerase. Um den Abbau der neusynthetisierten RNA zu verhindern, wurde dem Ansatz 1 U RNase-Inhibitor hinzugesetzt. Das Volumen des Transkriptionsansatzes wurde mit DEPC-Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Der Markierungsansatz wurde gemischt und 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 1 U DNase I und 15 minütige Inkubation bei 37 °C abgebaut und die Reaktion durch Zugabe 1/10 Vol. 0.2 M EDTA pH 8.0

gestoppt. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung der markierten RNA durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion und nachfolgende Äthanolpräzipitation.

Hybridisierung und Nachweis der RNA-RNA-Hybride

Zunächst wurde die Nylonmembran, an die die RNA gebunden war, mit 80 ml einer Hybridisierungslösung (25 ml 20 x SSC, 50 ml deionisiertes Formamid, 0.1 % (v/v) Na-Laurylsarcosin, 0.2 % (v/v) SDS, 5 % (w/v) Blocking Reagenz in DEPC-Wasser) für 6 - 8 h bei 46 °C prähybridisiert. Anschließend wurde die Membran mit 7 ml Hybridisierungslösung und frisch hitzedenaturierter RNA-Sonde (5 min bei 95 °C) in eine Plastikfolie eingeschweißt und 16 h bei 46 °C unter leichtem Schütteln hybridisiert. Nach Abschluß der Hybridisierung wurde die Membran zweimal 10 min in Waschlösung I (2 x SSC, 0.1 (v/v) SDS in DEPC-H₂O) bei RT und zweimal 25 min in Waschlösung II (0.1 x SSC, 0.1 % (v/v) SDS in DEPC-H₂O) bei 68 °C gebadet. Anschließend konnte die Membran bis zur Detektion der RNA-RNA-Hybride trocken unter Lichtausschluß aufbewahrt werden. Der Nachweis der RNA-RNA-Hybride erfolgte wie für die Detektion der DNA-DNA-Hybride bei der Southern Blot Analyse bereits beschrieben.

8.3 Transkriptionsstartbestimmung

Das RNase Schutz-Experiment ist eine Methode, um den Transkriptionsstart von Genen zu bestimmen (Melton et al., 1984). Dabei wird *in-vivo* isolierte mRNA mit einer markierten "antisense" mRNA-Sonde, die sich über den Transkriptionsstart des zu untersuchenden Gens erstreckt, hybridisiert. Anschließend werden die einzelsträngigen Bereiche des RNA-RNA Hybrids durch gezielte RNase-Behandlung abgebaut. Die Größenbestimmung des RNA-RNA-Hybrids erfolgt durch denaturierende Gelelektrophorese im Vergleich mit markierten RNA-Größenstandards.

Herstellung einer radioaktiv-markierten RNA-Sonde und des RNA-Größenstandards

Die Herstellung der RNA-Sonde bzw. des RNA-Größenstandards erfolgte durch *in-vitro* Transkription von DNA-Matrizen, die in die Transkriptionsvektoren pGEM3Z™ und pGEM4Z™ (Promega, Heidelberg) kloniert worden waren. Die Herstellung der markierten RNA-Sonde erfolgte mit dem "SP6/T7 Transkription Kit" (Boehringer, Mannheim). Der Markierungsansatz enthielt 1 µg linearisierte Plasmid-DNA, 3 µl Nukleotid-Mix

(ATP:GTP:UTP im Verhältnis 1:1:1), 50 μCi α -[^{35}S]-CTP, 1/10 Vol. Transkriptionspuffer, 20 U RNasin und 1 U SP6- bzw. T7-RNA-Polymerase. Der Ansatz wurde mit DEPC- H_2O auf 20 μl aufgefüllt. Der Markierungsansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend die DNA-Matrize durch Zugabe von 1 U DNase RQ1 und 10 minütiger Inkubation bei 37 °C entfernt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1/10 Vol. 0.2 M EDTA pH 8.0 gestoppt. Die markierte RNA wurde durch Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigt und durch Äthanol präzipitiert. Die getrocknete RNA wurde in 100 μl Hybridisierungspuffer (40 mM PIPES pH 6.4, 1 mM EDTA pH 8.0, 400 mM NaCl, 80 % (v/v) Formamid) resuspendiert und bei - 20 °C gelagert. Markierte RNA-Größenstandards wurden nach der gleichen Methode hergestellt.

RNase-Schutz-Experiment

Das RNase-Schutz-Experiment wurde nach einer modifizierten Methode nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt. 100 μg isolierte, frisch hitzedenaturierte (5 min, 95 °C) Gesamt-RNA wurde in 15 μl Hybridisierungspuffer, der die α -[^{35}S]-CTP markierte RNA-Sonde enthielt, 12 h bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurde der Hybridisierungsansatz auf RT abgekühlt und 300 μl eines RNase-Mixes (300 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 7.4, 5 mM EDTA pH 8.0, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase T1, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A) hinzugefügt. Bei der anschließenden 60 minütigen Inkubation bei 30 °C bauen diese RNasen gezielt einzelsträngige Ribonukleinsäuren ab. Dann wurde zur Inaktivierung der Ribonukleasen 10 μl Proteinase K (10 mg/ml) dem Ansatz hinzugefügt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Enzyme und Abbauprodukte durch Phenol/Chloroform-Extraktion entfernt, 10 μg Hefe-tRNA hinzugefügt und die RNA-RNA-Hybride durch Äthanol ausgefällt. Die getrockneten Proben wurden in 5 μl Formamid-Farbmarker (80 % (v/v) Formamid, 10 mM EDTA pH 8.0, 1 mg/ml Xylencyanol FF, 1 mg/ml Bromphenolblau) resuspendiert. Nach Hitze-Denaturierung wurden die RNA-Hybride auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel (6 % Acrylamid/7 M Harnstoff) entsprechend ihrem Molekulargewicht über einen Zeitraum von 2 h bei 2500 V aufgetrennt und ihre Größe anhand mitlaufender RNA-Größenstandards bestimmt. Aufgrund der Größe der geschützten RNA und eines definierten Endes der mRNA konnte der Transkriptionsstart des untersuchten Gens berechnet werden.

9. Bestimmung von Enzymaktivitäten

Herstellung von Rohextrakten und Proteinbestimmung

100 ml einer Bakterienkultur wurden in der exponentiellen Wachstumsphase (*E. coli* OD₆₀₀=1.5; *C. glutamicum* OD₆₀₀=15) geerntet (10 min, 4000 rpm, 4 °C). Zur Bestimmung der spezifischen Glutamat-Dehydrogenase (GDH)-Aktivität im Rohextrakt dieser Zellen wurde das Zellpellet in 15 ml 200 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7.0 gewaschen und die Zellen in 1.5 ml dieses Puffers resuspendiert. Wurde die spezifische Glutamat-Synthase (GOGAT)-Aktivität bestimmt, wurden die Zellen zunächst fünfmal mit 25 ml eiskaltem 10 mM Kaliumphosphat-Puffer gewaschen und anschließend in 1.5 ml des Aufschlußpuffers (50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7.5, 1 mM EDTA pH 8.0, 10 mM L-Cystein, 10 µM α-Ketoglutarat) aufgenommen. Die häufigen Waschschrirte waren notwendig, um Ammonium, das den späteren GOGAT-Test stören würde, quantitativ aus der Zellsuspension zu entfernen. Für die Bestimmung der spezifischen Glutamin-Synthetase (GS)-Aktivität hingegen wurden das Zellpellet in 15 ml 100 mM Imidazol-Puffer pH 7.15 gewaschen und anschließend in 1.5 ml dieses Puffers resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß unter Eiskühlung durch Ultraschall (Sonifier B15, Branson Sonic Power, Danbury, USA). *E. coli*-Zellen wurden diskontinuierlich über einen Zeitraum von 2 min, einer Pulsfrequenz von 20 % und einer Leistung von 30 W beschallt. *C. glutamicum*-Zellen wurden unter den gleichen Bedingungen über einen Zeitraum von 6 min aufgeschlossen. Nicht aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer wurden anschließend durch Zentrifugation (30 min, 13000 pm, 4 °C) sedimentiert. Der zell-freie Extrakt konnte dann in die entsprechenden Enzymtests eingesetzt werden. Die Bestimmung der Proteinkonzentration im Rohextrakt erfolgte nach der Biuret-Methode (Gornall et al., 1949) mit Rinderserum-Albumin als Standard.

9.1 Glutamat-Dehydrogenase-Aktivitätstest

Die GDH katalysiert die reduktive Aminierung von α-Ketoglutarat zu Glutamat unter gleichzeitiger Oxidation von NAD(P)H. Zur Bestimmung der spezifischen GDH-Aktivität wurde eine modifizierte Methode nach Meers et al. (1970) verwendet. Der Testansatz enthielt 100 mM Tris/HCl pH 8.0, 20 mM NH₄Cl, 0.25 mM NAD(P)H und Rohextrakt in einer geeigneten Verdünnung. Das Volumen des Testansatzes wurde mit H₂O dest. auf 1 ml

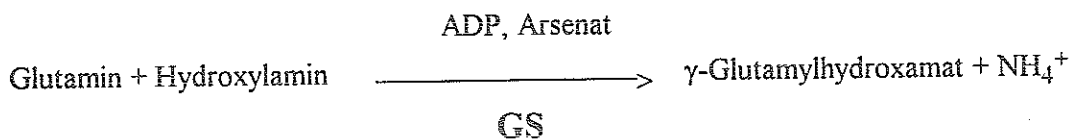
aufgefüllt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 mM α -Ketoglutarat gestartet. Da NAD(P)H bei dieser Reaktion oxidiert wird, konnte die Abnahme der Extinktion bei 340 nm über einen Zeitraum von 2 min (30 °C) verfolgt werden.

9.2 Glutamat-Synthase-Aktivitätstest

Die GOGAT katalysiert den Transfer einer Aminogruppe des Glutamins auf α -Ketoglutarat unter gleichzeitiger Oxidation von NADPH. Dabei entstehen 2 Moleküle Glutamat. Die spezifische GOGAT-Aktivität wurde ebenfalls nach einer modifizierten Methode nach Meers et al. (1970) bestimmt. Der Testansatz enthielt 100 mM Tris/HCl pH 7.6, 0.1 mM Dithiothreitol, 0.25 mM NADPH, 10 mM α -Ketoglutarat und Rohextrakt in einer geeigneten Verdünnung. Das Volumen des Testansatzes wurde mit H₂O dest. auf 1 ml aufgefüllt. Nach einer 2-minütigen Vorinkubation bei 30 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 mM Glutamin gestartet und die Abnahme der Extinktion bei 340 nm über einen Zeitraum von 2 min (30 °C) verfolgt.

9.3 Glutamin-Synthetase-Aktivitätstest

Die GS katalysiert die Aminierung von Glutamat zu Glutamin unter gleichzeitiger Spaltung von ATP. Daneben kann die GS auch eine Transfer-Reaktion katalysieren, in der γ -Glutamylhydroxamat unter Beteiligung von ADP und Arsenat gebildet wird.



Die Messung der Transferase-Aktivität der GS erfolgte diskontinuierlich nach einer modifizierten Methode von Shapiro und Stadtman (1970). 400 μ l frisch angesetzter Test-Mix (135 mM Imidazol/HCl pH 7.15, 18 mM NH₂OH, 0.27 mM MnCl₂, 25 mM KHAsO₄, 0.36 mM ADP und 10 - 50 μ l Rohextrakt) wurde 5 min bei 37 °C äquilibriert. Anschließend wurde die GS-Transferase-Reaktion durch Zugabe von 20 mM Glutamin gestartet. Nach 10 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Stop-Mix (55 mg/ml FeCl₃ x 6 H₂O, 20 mg/ml Trichloressigsäure, 21 μ l/ml 37 %ige HCl) gestoppt. Zur Entfernung von

Präzipitat wurden die Proben zentrifugiert (2 min, 13000 rpm, RT) und das gebildete γ -Glutamyl-Hydroxylamin wurde bei 540 nm gemessen. Auf die gleiche Weise wurde eine Blindprobe hergestellt, bei der der zell-freie Extrakt durch Wasser ersetzt worden war. Eine Eichgerade wurde mit γ -Glutamylhydroxamat als Standard erstellt.

10. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Bestimmung des Molekulargewichts der GDH von *C. glutamicum* wurde eine denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach der Methode von Laemmli (1970) durchgeführt. Dazu wurde eine Sturdier^R SE 400-Apparatur (Hoefer, San Francisco, CA, USA) verwendet. Die Proteingele hatten eine Größe von 14 cm x 16 cm x 1.5 mm. Das Sammelgel (8 ml) bestand aus 125 mM Tris/HCl pH 6.8, 1.34 ml 30 % Acrylamid/ 0.8 % Bisacrylamid, 0.1 % SDS, 4 μ l N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) und 60 μ l Ammoniumpersulfat (100 mg/ml). Das Trenngel (30 ml) setzte sich aus 375 mM Tris/HCl pH 8.8, 11.3 ml 30 % Acrylamid/0.8 % Bisacrylamid, 0.1 % SDS, 5.4 μ l TEMED, 54 μ l Ammoniumpersulfat und 50 mM Tris/Glycin/0.1 % SDS pH 6.8 zusammen. Die Proben wurden mit 125 mM Tris/HCl pH 6.8, 2 % SDS, 10 % Glycerin, 0.001 % Bromphenolblau und 5 % Mercaptoäthanol versetzt und 10 min bei 95 °C denaturiert. Als Puffersystem wurde 50 mM Tris/384 mM Glycin, 0.1 % SDS pH 8.3 verwendet. Die Proteinbanden wurden durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Als Größenstandard wurden Eichproteine (Combithek, Boehringer, Mannheim) mit einem Molekulargewicht zwischen 20100 bis 97400 verwendet.

11. Bestimmung interner und externer Metaboliten

11.1 Silikonölzentrifugation und Aufarbeitung der Zellen

Um zell-interne und externe Metabolitenkonzentrationen bestimmen zu können, war es notwendig, Zellen zum Zeitpunkt der Probennahme sofort zu inaktivieren. Dazu wurde eine Silikonölzentrifugation durchgeführt (Klingenberg und Pfaff, 1967). 100 μ l Zellsuspension wurden in ein vorbereitetes Silikonölröhrchen pipettiert, das 65 μ l Silikonöl PN200 (Bayer, Leverkusen) als Trennschicht und 30 μ l 20 % iger HClO_4 als Säureschicht enthielt. Je nach

spezifischer Dichte des Mediums wurde die Dichte des Silikonöls zwischen δ 1.03 - 1.04 variiert. Die Zellen wurden sofort in einer Beckman Microfuge E (Beckman, München) sedimentiert (30 sek., 14000 rpm, RT) und dadurch in der Perchlorsäure inaktiviert. Der Kulturüberstand konnte sofort für die Glutamatbestimmung verwendet werden, während das Zellpellet zunächst weiter aufgearbeitet wurde. Die Zellen wurden resuspendiert und durch Ultraschall aufgeschlossen. Dann wurde der Zellextrakt durch Zugabe von 25 μ l 5 M KOH/1M Triäthanolamin neutralisiert und zur besseren Abtrennung eventuell mitgeschleppter Silikonölreste mit Silikonöl δ 1.07 versetzt und auf Eis inkubiert. Zelltrümmer, denaturierte Proteine, präzipitiertes KClO_4 und Silikonöl wurden durch Zentrifugation (5 min, 14000 rpm, RT) entfernt. Der Überstand konnte dann zur Bestimmung der zell-internen Glutamatkonzentration verwendet werden.

11.2 Bestimmung des Zellvolumens

Um die intrazellulären Glutamatkonzentration berechnen zu können, war es notwendig das cytoplasmatische Volumen der Zellen zu bestimmen. Die Bestimmung des Zellvolumens erfolgte nach einer Methode von Rottenberg (1979). Dazu wurde [^{14}C] Inulin als nicht-penetrierender Marker, da er Zellmembran und Zellwand nicht passieren kann, sowie [^3H]-Wasser als permeabler Marker verwendet (Gutmann et al., 1992). Für Biotin-supplementierte *C.glutamicum*-Zellen wurde ein cytoplasmatisches Volumen von 2.0 $\mu\text{l}/\text{mg}$ TG und für Biotin-limitierte Zellen ein Zellvolumen von 1.6 $\mu\text{l}/\text{mg}$ TG bestimmt.

11.3 Glutamatbestimmung

Die internen und externen Glutamatkonzentrationen wurden enzymatisch nach einer modifizierten Methode von Beutler und Michal (1974) bestimmt. Dabei setzt die Glutamat-Dehydrogenase Glutamat zu α -Ketoglutarat unter gleichzeitiger Reduktion von NAD^+ zu NADH um. NADH wird dann in einer weiteren von der Diaphorase katalysierten Reaktion wieder oxidiert, wobei Iodonitrotetrazolium-Salz (INT) zu Formazan reduziert wird. Der rote Farbstoff Formazan kann bei 492 nm photometrisch nachgewiesen werden. Der Testansatz (0.95 ml) enthielt 850 μl Testpuffer (75 mM Triäthanolamin/HCl pH 8.0, 10 mM KH_2PO_4 , 0.5 % (v/v) Triton X-100), 10 μl 50 mM NAD, 50 μl 1.5 mM INT, 10 μl Diaphoraselösung (350 U/ml) und 10 μl Kulturüberstand in einer geeigneten Verdünnung. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μl Glutamat-Dehydrogenase

(1000 U/ml) gestartet und war nach 20 min beendet. Der Extinktionskoeffizient betrug unter diesen Bedingungen $19.9 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$. Die Glutamatkonzentration im Testansatz sollte maximal $25 \text{ }\mu\text{M}$ betragen, da ansonsten die Linearität zwischen gemessener Extinktion und der Glutamatkonzentration nicht mehr gewährleistet ist.

11.4 Glucosebestimmung

Zur Bestimmung des Glucoseverbrauchs der Zellen während einer Kurz-Zeit-Fermentation wurde die Glucosekonzentration im Kulturüberstand der Zellen nach einer Silikonölzentrifugation mit einem D-Glucose-Test (Boehringer, Mannheim) enzymatisch bestimmt. Bei dieser Methode wird Glucose durch die Hexokinase in Anwesenheit von ATP zu Glucose-6-Phosphat phosphoryliert. Anschließend wird Glucose-6-Phosphat durch die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase katalysierte Reaktion in Anwesenheit von NADP^+ zu Gluconat-6-Phosphat oxidiert. Die während der Reaktion gebildete NADPH-Menge ist zu der Glucose-Menge äquivalent und kann photometrisch bei 340 nm bestimmt werden (Bergmeyer et al., 1974). Der Testansatz enthielt 1 ml Lösung I (Triäthanolamin-Puffer $\text{pH } 7.6$, 2.4 mg/ml NADP, 5.8 mg/ml ATP, MgCl_2) und 0.1 ml Probelösung in einer geeigneten Verdünnung. Der Ansatz wurde anschließend mit H_2O dest. auf ein Volumen von 3 ml aufgefüllt, gemischt und nach 3 min die Extinktion der Probe bei 340 nm als Leerwert bestimmt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe $20 \text{ }\mu\text{l}$ des Enzymgemisches (5.8 U Hexokinase, 2.9 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase) gestartet. Nach einer Inkubation von 15 min bei RT war die Reaktion beendet und die Extinktion wurde erneut bei 340 nm bestimmt. Der Extinktionskoeffizient beträgt $6.3 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ und aus der Extinktionsdifferenz ließ sich die Glucosekonzentration der Probe berechnen.

III. ERGEBNISSE

Das *gdh*-Gen von *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, das für eine NADP-abhängige Glutamat-Dehydrogenase (GDH) kodiert, war durch heterologe Komplementation einer Glutamat-auxotrophen *Escherichia coli*-Mutante PA340 aus einer auf dem Cosmid pH79 basierenden chromosomalen Cosmidgenbank von *C. glutamicum* 13032 isoliert worden. Das *gdh*-Gen wurde auf zwei verschiedenen Cosmiden pH7gdh3 und pH7gdh8 lokalisiert und auf einem 4.5 kb *Sau3A*-Fragment in den *E.coli/C. glutamicum* Pendelvektor pEK0 subkloniert. In dem rekombinanten Stamm *C. glutamicum*(pEK4.5gdh) wurde das *gdh*-Gen homolog exprimiert und führte in diesem, im Vergleich zum Wildtyp *C. glutamicum* 13032, zu einer 8-fach erhöhten spezifischen GDH-Aktivität (Börmann, 1990).

1. Feinstrukturanalyse des Glutamat-Dehydrogenase-Gens (*gdh*) von *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

Ein Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Feinstruktur des *gdh*-Gens von *C. glutamicum* ATCC13032 aufzuklären. Dazu wurde das *gdh*-Gen zunächst auf ein kleineres DNA-Fragment eingegrenzt. Dann wurde die DNA-Sequenz aufgeklärt und das *gdh*-Gen auf RNA-Ebene analysiert (Börmann et al., 1992).

1.1 Subklonierung des *gdh*-Gens

Zur Eingrenzung des *gdh*-Gens von *C. glutamicum* einschließlich seiner 5'-und 3'- flankierenden Kontrollregionen auf dem chromosomalen 4.5 kb *Sau3A*-Fragment wurde eine Deletionsanalyse durchgeführt. Dazu wurden ein 2.55 kb *SalI*, ein 1.95 kb *NheI-SalI*-, ein 1.4 kb *SphI-SalI*- und ein 1.54 kb *SacI*-Fragment aus dem Vektor pEK4.5gdh isoliert (Abbildung 2). Die klonierten *SalI-SalI*, *NheI-SalI* und *SphI-SalI*-Fragmente entsprechen den chromosomalen DNA-Fragmenten *SalI-Sau3A*, *NheI-Sau3A* und *SphI-Sau3A*, da die *SalI*-Restriktionsenzymstichstelle aus der Klonierungsstelle des Vektors pUC18 stammt.

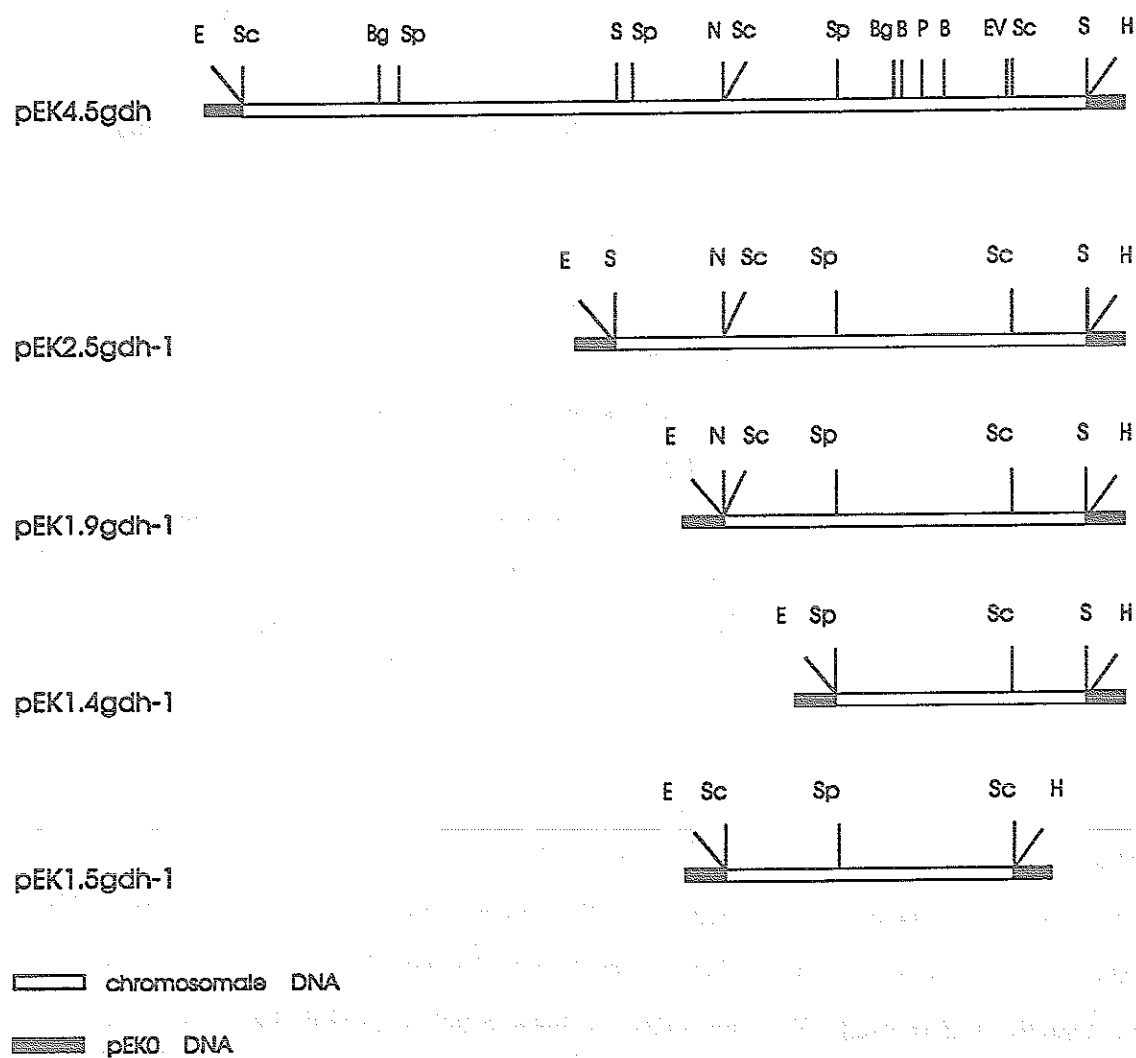


Abb. 2: Deletionsanalyse des Glutamat-Dehydrogenase-Gens (*gdh*) von *Corynebacterium glutamicum*. Die subklonierten DNA-Bereiche des 4.5 kb *gdh*-Fragmentes sowie die Restriktionskarten des 4.5 kb *gdh*-Fragmentes in pEK4.5gdh, des 2.55 kb *SalI*-Fragmentes in pEK2.5gdh-1, des 1.95 kb *NheI*-*SalI*-Fragmentes in pEK1.9gdh-1, des 1.4 kb *SphI*-*SalI*-Fragmentes in pEK1.4gdh-1 und des 1.5 kb *SacI*-Fragmentes in pEK1.5gdh-1 sind dargestellt. Abkürzungen: B, *Bam*HI; Bg, *Bgl*II; E, *Eco*RI; EV, *Eco*RV; H, *Hind*III; P, *Pst*I; N, *Nhe*I; S, *Sal*I; Sc, *Sac*I; Sp, *Sph*I.

Anschließend wurde das 2.55 kb *SalI*-Fragment in die *SalI*-Restriktionsschnittstelle und das 1.54 kb *SacI*-Fragment in die *SacI*-Schnittstelle des *E. coli/C. glutamicum* - Pendelvektors pEK0 ligiert und *E. coli* DH5 mit dem Ligationsansatz transformiert. Von jeweils 10 Transformanten jedes Ansatzes wurden Miniplasmidpräparationen durchgeführt und nach Restriktionsanalyse der Plasmid-DNA mit *PstI* konnten die Fragmente in den zwei möglichen Orientierungen im Vektor pEK0 nachgewiesen werden. Die rekombinanten Plasmide wurden pEK2.5gdh-1, pEK2.5gdh-2, pEK1.5gdh-1 und pEK1.5gdh-2 genannt. Für alle weiteren Experimente wurden jedoch nur die Plasmide pEK2.5gdh-1 und pEK1.5gdh-1 gewählt, die in Abbildung 2 dargestellt sind. Um die Fragmente 1.95 kb *NheI-SalI* und 1.4 kb *SphI-SalI* in den Vektor pEK0 klonieren zu können, wurden diese nach der Restriktion mit *NheI* bzw. *SphI* mit Klenow-Enzym behandelt, um auf einer Seite des Fragmentes "glatte Enden" zu erzeugen. Anschließend wurden die Fragmente in die *BamHI/SalI* Schnittstelle des "polylinkers" von pEK0 ligiert, wobei auch der Vektor nach der Restriktion mit *BamHI* mit Klenow-Enzym behandelt wurde. Dadurch konnten die Fragmente gerichtet in den Vektor pEK0 kloniert werden und ergaben die rekombinanten Plasmide pEK1.9gdh-1 und pEK1.4gdh-1. Aus 10 Transformanten jedes Ansatzes wurde die Plasmid-DNA isoliert und durch Restriktionsanalyse pEK1.9gdh-1 mit *PstI* bzw. pEK1.4gdh-1 mit *MluI* überprüft. Die rekombinanten Vektoren wurden mittels Elektroporation nach *C. glutamicum* 13032 transferiert und die spezifischen GDH-Aktivitäten im Rohextrakt dieser Stämme bestimmt. Die spezifischen GDH-Aktivitäten sind in Tabelle 3 dargestellt. Wie aus dieser Tabelle ersichtlich wird, besitzen die Stämme *C. glutamicum* pEK2.5gdh-1, *C. glutamicum* pEK1.9gdh-1 und *C. glutamicum* pEK4.5gdh eine 6- bis 8-fach höhere spezifische GDH-Aktivität (10.4 - 15.0 U/mg Protein) als *C. glutamicum* pEK0 (1.7 U/mg Protein) und *C. glutamicum* 13032 (1.8 U/mg Protein). Die rekombinanten *C. glutamicum* Stämme, die die Plasmide pEK1.4gdh-1 und pEK1.5gdh-1 tragen, verfügen dagegen über keine erhöhte spezifische GDH-Aktivität. Damit konnte das *gdh*-Gen von *C. glutamicum* auf das chromosomale 1.95 kb *NheI-Sau3A*-Fragment eingegrenzt werden (siehe Abb. 2). Zusätzlich wurde das 1.4 kb *SphI-SalI* Fragment auch in den *E. coli/C. glutamicum* Expressionspendelvektor pEKEX2 hinter den durch Isopropylthiogalactosid (IPTG) induzierbaren *tac*-Promotor kloniert und nach *C. glutamicum* 13032 transferiert. Zur Bestimmung der spezifischen GDH-Aktivität wurde dieser Stamm, *C. glutamicum*(pEKEX1.4gdh), auf Komplexmedium bis zur exponentiellen Wachstumsphase gezüchtet und nach 1-stündiger Inkubation mit 1 mM IPTG wurde die

spezifische GDH-Aktivität im Rohextrakt bestimmt (Tabelle 3). Der Stamm *C. glutamicum*(pEKEX1.4gdh) besitzt eine 8-fach höhere spezifische GDH-Aktivität (14.5 U/mg Protein) als der Wildtyp. Damit konnte indirekt der Promotor des *gdh*-Gens auf das 540 bp *NheI-SphI*-Fragment eingegrenzt werden.

Tabelle 3: Spezifische GDH-Aktivitäten in zell-freien Extrakten von *C. glutamicum* 13032 und rekombinanten *C. glutamicum* Stämmen, die die Plasmide pEK0, pEK4.5gdh, pEK2.5gdh-1, pEK1.9gdh-1, pEK1.4gdh-1 und pEK1.5gdh-1 und pEKEX1.4gdh tragen. Die Zellen wurden auf Minimalmedium mit 4 % Glucose und 50 mg /ml Kanamycin oder auf Komplexmedium mit Kanamycin gezüchtet.

Stamm		spezifische GDH-Aktivität (U/mg Protein)
<i>C. glutamicum</i> 13032		1.8
<i>C. glutamicum</i> (pEK0)		1.7
<i>C. glutamicum</i> (pEK4.5gdh)		15.0
<i>C. glutamicum</i> (pEK2.5gdh-1)		10.4
<i>C. glutamicum</i> (pEK1.9gdh-1)		13.5
<i>C. glutamicum</i> (pEK1.4gdh-1)		1.7
<i>C. glutamicum</i> (pEK1.5gdh-1)		1.8
<i>C. glutamicum</i> (pEKEX1.4gdh)	- IPTG	1.8
<i>C. glutamicum</i> (pEKEX1.4gdh)	+ IPTG	14.5

1.2 Nukleotidsequenzanalyse des *gdh*-Gens

Um die Feinstruktur des *gdh*-Gens von *C. glutamicum* 13032 und seiner Kontrollregionen aufzuklären, wurde eine DNA-Sequenzanalyse durchgeführt. Da eine detaillierte Restriktionskarte des *gdh*-tragenden chromosomalen, 4.5 kb *Sau3A* Fragmentes bereits existierte (Börmann, 1990), konnten nach Restriktion dieses Fragmentes mit verschiedenen Endonukleasen definierte, überlappende DNA -Fragmente isoliert, in den Vektor pUC18 subkloniert und in diesem nach der "Kettenabbruch-Methode" sequenziert werden. Die Sequenzierungsstrategie ist in Abbildung 3 dargestellt.

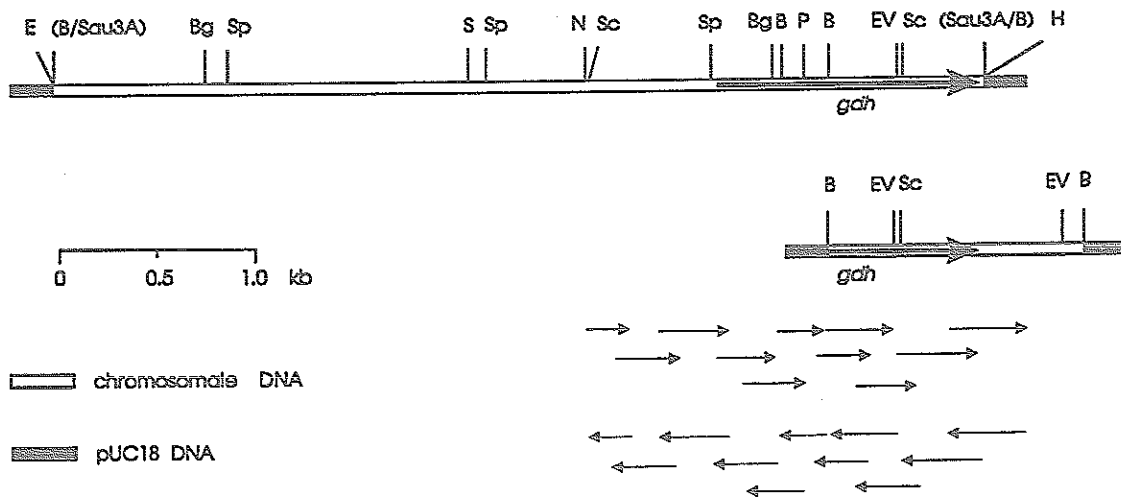


Abb. 3: Sequenzierungsstrategie des 2.7 kb *SacI*-*Sau3A*-Fragmentes im Vektor pUC4.5gdh und des 1.3 kb *BamHI*-Fragmentes in pUC1.3gdhT. Die dicken Pfeile markieren die Lage des *gdh*-Gens auf den beiden Fragmenten, während die kleinen Pfeile die Länge und Richtung der sequenzierten DNA-Bereiche angeben. Abkürzungen: B, *BamHI*; Bg, *BglIII*; E, *EcoRI*; EV, *EcoRV*; H, *HindIII*; N, *NheI*; P, *PstI*; S, *SalI*; Sc, *SacI*; Sp, *SphI*.

Auf diese Weise wurden beide Stränge des 1941 bp umfassenden *NheI*-*Sau3A*-Fragmentes sequenziert. Die erhaltene Nukleotidsequenz und die davon abgeleitete Aminosäure (AS)-Sequenz sind in Abbildung 4 gezeigt. Die DNA-Sequenz umfaßt ein offenes Leseraster, das sich von Nukleotid 350 bis 1912 erstreckt. Das Startcodon für die Translation ist wahrscheinlich das ATG in Position 572. 6 bp vor diesem Codon wurde die Sequenz "GAGGAA" identifiziert, die auf der mRNA als Ribosomenbindungsstelle fungieren könnte, da sie große Ähnlichkeit mit der Shine-Dalgarno-Sequenz (Shine und Dalgarno, 1974) für *E. coli* aufweist. Weiterhin spricht für dieses ATG als Translationsinitiationscodon, daß es in dieser Position mit dem Startcodon der Translation des *E. coli* *gdh*-Gens identisch ist, wie in einem späteren Homologievergleich noch gezeigt werden wird. Ein TAA-Stopcodon für die Translation wurde in Position 1913 gefunden. Damit hat das *gdh*-Gen von *C. glutamicum* ATCC13032 eine Größe von 1341 bp und kodiert für eine GDH-

Polypeptidkette bestehend aus 447 AS mit einem Molekulargewicht von 49050. Eine palindromische Nukleotidsequenz, die auf einen rho-unabhängigen Terminator der Transkription hinweisen würde, oder ein weiteres offenes Leseraster konnte "downstream" des *gdh*-Strukturgens nicht gefunden werden. Der sequenzierte Bereich erstreckt sich jedoch nur 42 bp über das Ende des *gdh*-Gens hinaus.

```

      . . . . . 50 . . . . . 100
GCTAGCCTCGGGAGCTCTAGGAGATCGTGAAAAACGGGTCAAATTTCTCCGATGTAGCGCCTATAAAAGTCGTACCAATTCATTTGAGGGCGCTCAATT

      . . . . . 150 . . . . . 200
GTGGCCAGGTTATATAACCAGTCAGTCAACTGGTCTCATTGCTGGTCCGATGAATTTAATTAAGAAGAGACTTCATGCGAGTTACCGCGGCTTTTGGC

      . . . . . "-43" . 250 "-35" . . . . . "-10" . . . . . 300
GATACAAATTGATAACCTAAAGAAATTTCAAACAAAATTTTAATTCTTTTGGTCATATCTGTGCGACACTGCCATAATTTGAACGTGAGCAGTTACCAG

      . . . . . 350 . . . . . 400
CCTAAATGCCCGCAGTGAGTTAAGTCTCAAAGCAAGAAGTGCTCTTTAGGGCATCCGTAGTTTAAACTATTAACCGTTAGGTATGACAAGCCGGTTGAT

      . . . . . 450 . . . . . 500
GTGAACGCAGTTTTTAAAGTTTCAGGATCAGATTTTTCACAGGCATTTTGCTCCAGCAAACGCCTAGGATGTACATGTGCCCTCAATGGGAACCAACAA

      . . . . . 550 . . . . . RBS . . . . . 600
CATCACTAAATGGCCAGGTACACACTTTAAATCGTGCGCGCATGCAGCCGAGATGGGAACCAGCAATCATGACAGTTGATGAGCAGGTCTCTAACTA
                                     M T V D E Q V S N Y
      . . . . . 650 . . . . . 700
TTACGACATGCTTCTGAAGCGCAATGCTGGCGAGCCTGAATTTACCAGGCAGTGGCAGAGGTTTTGGAATCTTTGAAGTCGCTCGGAAAAGGACCCT
Y D M L L K R N A G E P E F H Q A V A E V L E S L K L V L E K D P

      . . . . . 750 . . . . . 800
CATTACGCTGATTACGGTCTCATCCAGCGCCTGTGCGAGCCTGAGCGTCAGCTCATCTTCCGTGTGCCTTGGGTTGATGACCAGGGCCAGGTCCACGTCA
H Y A D Y G L I Q R L C E P E R Q L I F R V P W V D D Q G Q V H V

      . . . . . 850 . . . . . 900
ACCGTGGTTTTCCGCGTGCAGTTCAACTCTGCACTTGGACCATACAAGGGCGGCTGCGCTTCCACCCATCTGTAAACCTGGGCATTGTGAAGTTCTTGGG
N R G F R V Q F N S A L G P Y K G G L R F H P S V N L G I V K F L G

      . . . . . 950 . . . . . 1000
CTTTGAGCAGATCTTTAAAACTCCCTAACCGGCTGCCAATCGGTGGTGGCAAGGGTGGATCCGACTTCGACCCTAAGGGCAAGTCGGATCTGGAATC
F E Q I F K N S L T G L P I G G G K G G S D F D P K G K S D L E I

      . . . . . 1050 . . . . . 1100
ATCGGTTTCTGCCAGTCCTTCATGACCGAGCTACACCGCCACATCGGTGAGTACCGCGACGTTCTGCAGGTGACATCGGAGTTGGTGGCCGCGAGATCG
M R F C Q S F M T E L H R H I G E Y R D V P A G D I G V G G R E I

      . . . . . 1150 . . . . . 1200
GTTACCTGTTTGGCCACTACCGTCGCATGGCTAACCGACGAGTCCGGCTTTTGACCGGTAAGGGCCTGACCTGGGGTGGATCCCTGGTCCGACCGA
G Y L F G H Y R R M A N Q H E S G V L T G K G L T W G G S L V R T E

      . . . . . 1250 . . . . . 1300
GGCAACTGGCTACGGCTGCGTTTACTTCGTGAGTGAAATGATCAAGGCTAAGGGCGAGAGCATCAGCGGCCAGAAGATCATCGTTTCCGGTTCCGGCAAC
A T G Y G C V Y F V S E H I K A K G E S I S G Q K I I V S G S G N

```



Abb. 4: Nukleotidsequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz des *gdh*-Gens von *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032. Die mögliche Ribosomenbindungsstelle (RBS), das Stop-Codon der Translation (*), der Transkriptionsstartpunkt (⇒), die mögliche "-10"- ("-10"), "-35"- ("-35") und "-43"-Region ("-43") des *gdh*-Promotors, sowie der potentielle Terminator der Transkription (—><—) sind dargestellt.

1.3 Isolierung und Sequenzierung des *gdh*-Terminator-Fragmentes

Zur vollständigen Feinstrukturanalyse des *gdh*-Gens von *C. glutamicum* war es notwendig, ein weiteres chromosomales DNA-Fragment zu finden, das gemeinsame Bereiche mit dem isolierten 4.5*gdh*-Fragment aufwies und sich weiter als dieses über den 3'-Bereich des *gdh*-Gens erstreckte. Zur Identifizierung eines solchen DNA-Fragmentes wurde eine Southern Blot-Analyse durchgeführt. Als Sonde wurde ein 0.45 kb *Pst*I/*Eco*RV Fragment, das einen Teil der kodierenden Region des *gdh*-Gens umfaßt, aus dem Vektor pUC4.5*gdh* (siehe **Abbildung 3**) isoliert und mit Digoxigenin-dUTP markiert. DNA der Cosmide pH*Cgdh*3

und pHCGdh8, die Teile der chromosomalen Genbank enthielten, aus denen in vorangegangenen Arbeiten das *gdh*-Gen isoliert worden war, wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten. Zur Restriktion der DNA wurden die Endonukleasen *Bam*HI, *Pst*II, *Nhe*I, und *Sal*II gewählt, da für sie jeweils auch eine Schnittstelle in dem 4.5gdh Fragment existiert, und zur Kontrolle wurde die DNA auch mit *Pst*II/*Eco*RV geschnitten. Da sich diese Schnittstellen jeweils 5' vor dem als Sonde isolierten 0.45 kb *Pst*II/*Eco*RV Fragment im *gdh*-Gen befanden, war damit sichergestellt, daß sich die damit identifizierten DNA-Fragmente über das 3' Ende des *gdh*-Gens hinaus erstrecken würden. Die geschnittene DNA wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und gegen die DNA-Sonde hybridisiert. Das Ergebnis der Southern Blot-Hybridisierung ist in **Abbildung 5** gezeigt. Bei der Hybridisierung der 0.45 kb *Pst*II/*Eco*RV-Sonde gegen Cosmid-DNA gab es Signale bei 1.3 kb (*Bam*HI), bei 6.3 kb (*Pst*II), bei 6.5 kb (*Sal*II) und bei 5.5 kb (*Nhe*I). Bei der Hybridisierung der Sonde gegen die zur Kontrolle mit *Pst*II/*Eco*RV geschnittene Cosmid-DNA trat, wie erwartet, eine Bande bei 0.45 kb auf. Zum Nachweis, daß die gefundenen DNA-Fragmente aus dem Chromosom von *C. glutamicum* stammten, wurde eine weitere Southern Blot-Analyse durchgeführt. Chromosomale DNA aus *C. glutamicum* ATCC13032 wurde ebenfalls mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI, *Pst*II, *Sal*II, *Nhe*I und zur Kontrolle mit *Pst*II/*Eco*RV geschnitten und gegen die 0.45 kb *Pst*II/*Eco*RV Sonde hybridisiert. Das Ergebnis ist ebenfalls in **Abbildung 5** dargestellt. Bei allen Ansätzen wurde jeweils ein Signal gefunden, das identisch war mit dem, das bei der Hybridisierung der Sonde mit der Cosmid-DNA auftrat. Die 1.3 kb *Bam*HI-Bande war das kleinste bei der Hybridisierung auftretende Signal, und das 1.3 kb *Bam*HI-Fragment erstreckte sich ungefähr 500 bp über das 3' Ende des *gdh*-Gens. Dieses Fragment wurde aus dem Cosmid pHCGdh3 isoliert, in die *Bam*HI-Schnittstelle des Vektors pUC18 kloniert und der rekombinante Vektor pUC1.3gdhT genannt. Die DNA-Sequenz des dem 3' Ende des *gdh*-Gens angrenzenden Teils des 1.3 kb *Bam*HI-Fragmentes wurde dann ebenfalls nach der in **Abbildung 3** dargestellten Sequenzierungsstrategie aufgeklärt. Dazu wurden spezifische Oligonukleotid-Primer verwendet, die komplementär zu der Nukleotid-Sequenz am 3' Ende des *gdh*-Gens waren. Die ermittelte DNA-Sequenz und die davon abgeleitete AS-Sequenz sind in **Abbildung 4** enthalten.

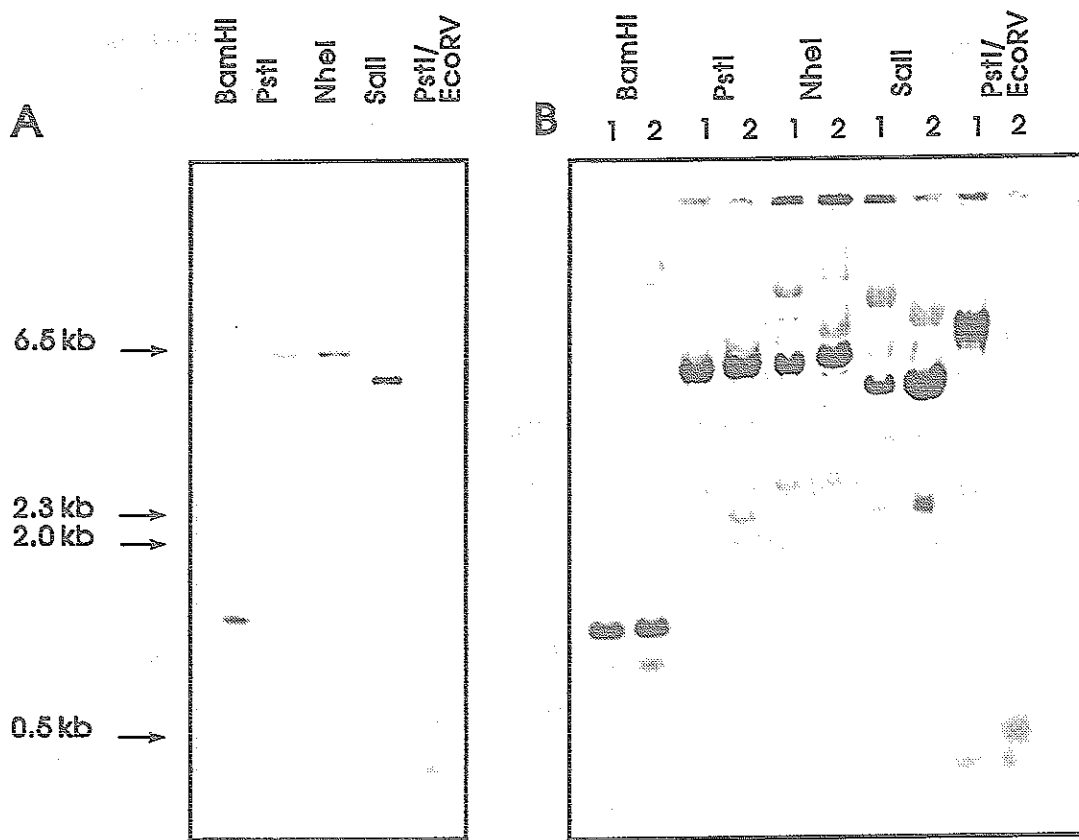


Abb. 5: Southern Blot-Analyse (A) der genomischen DNA von *C. glutamicum* ATCC13032 und (B) der DNA der *gdh*-tragenden Cosmide pHCgdh3 (1) und pHCgdh8 (2). Als Sonde wurde ein Digoxigenin-dUTP-markiertes 0.45 kb *PstI*-*EcoRV*-Fragment verwendet, das aus dem Vektor pUC4.5gdh isoliert worden war. Diese Sonde wurde gegen die mit *Bam*HI, *Pst*I, *Nhe*I, *Sal*I und zur Kontrolle mit *Pst*I/*EcoRV* restringierte DNA hybridisiert.

Unmittelbar hinter dem *gdh*-Gen in Position 1934 bis 1966 befindet sich eine palindromische Sequenzstruktur. Auf RNA-Ebene kann sich dort ein "stem-loop" mit einer freien Bildungsenergie von $\Delta G = -22$ kcal/mol (25 °C) (berechnet nach den Regeln von Tinoco et al., 1973) ausbilden, der große Ähnlichkeit mit der Struktur rho-unabhängiger *E. coli* Terminatoren hat (Rosenberg und Court, 1979). Direkt hinter der potentiellen Haarnadelstruktur befinden sich auf RNA-Ebene fünf aufeinanderfolgende Uracil-Reste, die ebenso ein charakteristisches Merkmal rho-unabhängiger Terminatoren sind.

1.4 Homologievergleiche

Die von der ermittelten DNA-Sequenz abgeleitete AS-Sequenz des GDH-Monomers von *C. glutamicum* wurde mit den entsprechenden AS-Sequenzen von Glutamat-Dehydrogenasen anderer Organismen verglichen. Ein Vergleich der AS-Sequenz der *C. glutamicum* GDH mit den entsprechenden AS-Sequenzen der NADP-abhängigen GDH's von *E. coli* (McPherson und Wootton, 1983; Valle et al., 1984), *Neurospora crassa* (Kinnaird und Fincham, 1983) und *Saccharomyces cerevisiae* (Nagasu und Hall, 1985; Moye et al., 1985) ergab 57.6 %, 54.1 % und 51.5% identische AS-Reste, während beim Vergleich mit der Proteinsequenz der NAD-abhängigen GDH des Gram-positiven Bakteriums *Peptostreptococcus asaccharolyticus* (Snedecor et al., 1991) nur 35.4 % der AS-Reste identisch waren (Abbildung 6).

Bei diesen Homologievergleichen fielen einige sehr stark konservierte AS-Sequenz-Bereiche auf, die für die Struktur, für die katalytischen und/oder regulatorischen Eigenschaften der GDH verantwortlich sein könnten. So konnte einem dieser Bereiche eine mögliche Funktion bei der Bindung des Coenzym NADP zugeordnet werden. Durch AS - "fingerprints" (Wierenga et al., 1986) und Homologievergleiche (Scrutton et al., 1990) wurde ein NADP-Bindungsmotiv gefunden, das aus den AS -G-x-G-x-x-A-x-x-A-x-x-x-x-x-x-x-G- besteht. Dieses Motiv konnte auch in der AS-Sequenz der *C. glutamicum* GDH zwischen den AS-Resten 240 und 256 -G-S-G-N-V-A-T-Y-A-I-E-K-A-Q-E-L-G- gefunden werden. Es kann angenommen werden, daß es sich bei diesem Motiv um die NADP-Bindungsstelle handelt.

In einer weiteren sehr stark konservierten Region am Amino-Terminus des GDH-Polypeptids konnte ein Lysin-Rest in Position 128 identifiziert werden, der vermutlich entsprechend den Befunden bei *E. coli* (Valle et al., 1984) und *Aspergillus nidulans* (Hawkins et al., 1989) in die Bindung des Substrates α -Ketoglutarat involviert ist. Bei eukaryontischen GDH's konnte durch chemische Modifikationsexperimente gezeigt werden, daß dieser Rest für die Bindung von α -Ketoglutarat und für die katalytische Aktivität dieses Enzyms wichtig ist (Smith et al., 1975).

<i>C. glut.</i>	MTVDEQVSNY	YDMLLRNAG	EPEFHQVAE	VLES-LKVL	-EKDPHYADY	GLIQRICEPE	RQL-IFRVPW	67
<i>E. coli</i>	MDQTYSLSEF	LNHVQKRDPN	QTEFAQAVRE	VMTTL-WPFL	-EQNPKYRQM	SLLERLVEPE	RVI-QFRVW	67
<i>N. crassa</i>	M-----	-----SNLPS	EPEFEQAYKE	LAYTLENSL	FQKHPEY-RT	AL-TVASIP	RVI-QFRVW	53
<i>S. cerevi.</i>	M-----	-----S	EPEFEQAYEE	VVSSLENSTL	FEQHPEY-RK	VL-PIVSVPE	RVI-QFRVTW	49
<i>P. asacch.</i>	M-----	---TDTLNP-	---LVAAQEL	V--RIACEKL	GCDPAVY---	EL---LKEPQ	RVIEISIPVK	46
	*		+	++++	+	+	+	+
<i>C. glut.</i>	VDDQGGVHVN	RGFRVQFNSA	LGPYKGGRLR	HPSVNLGIVK	FLGFEQIFKN	SLTGLPIGGG	KGGSDFDPKG	137
<i>E. coli</i>	VDDRNIQVNV	RAHRVQFSSA	IGPYKGGMR	HPSVNLGIVK	FLGFEQIFKN	ALTTLPMTGG	KGGSDFDPKG	137
<i>N. crassa</i>	EDDNGNVQVN	RGYRVQFNSA	LGPYKGGRLR	HPSVNLGIVK	FLGFEQIFKN	ALTGLSMGGG	KGGADFDPKG	123
<i>S. cerevi.</i>	ENDKGEQVVA	QGYRVQYNSA	KGPYKGGRLR	HPSVNLGIVK	FLGFEQIFKN	SLTGLDMGGG	KGGLCVDLKG	119
<i>P. asacch.</i>	MDD-GTVKVF	KGHRSAHSSA	VGPSKGGVRF	HPNVNMDEVK	ALSLWMTPKG	GALGLPYGGG	KGGICVDPAE	115
	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. glut.</i>	KSDLEIMRFC	QSFMTLHRH	IGEYRDVPAG	DIGVGGREIG	YLF-GHYRR-	MANQHESGVL	TGKGLTWGGS	205
<i>E. coli</i>	KSEGEVMRFC	QALMTELYRH	LGADTDVPAG	DIGVGGREVG	FMA-GMMKK-	LSN-NTACVF	TGKGLSFGGS	204
<i>N. crassa</i>	KSDAIEIRRFC	CAFMAELHKK	IGADTDVPAG	DIGVGGREIG	YMF-GAYRK-	AARFE-GVL	TGKGLSWGGS	190
<i>S. cerevi.</i>	RSNNIEIRRIC	YAFMRELSRH	IGQDTDVPAG	DIGVGGREIG	YLF-GAYRS-	YKNSWE-GVL	TGKGLNWGGS	186
<i>P. asacch.</i>	LSERELEQLS	RGWVRGLYKY	LGDRIDIPAP	DVNTNG-QIM	SHFVDEYVKL	NGERMIDIGTF	TGLPVAFGGS	184
	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. glut.</i>	LVRTEATGYG	CVYFVSEM--	IKAKG-ESIS	GQKIIVSGSG	NVATYAIEKA	QE-LGATV--	IGFSD-SSG-	267
<i>E. coli</i>	LIRPEATGYG	LVYFTEAM--	LKRHG-MGFE	GMRVSVSGSG	NVAQYAIEKA	ME-FGARV--	ITASD-SSG-	266
<i>N. crassa</i>	LIRPEATGYG	LVYVGHM--	LEYSAGSYA	GKRVALSGSG	NVAQYAALKL	IE-LGATV--	VSLSD-SKGA	254
<i>S. cerevi.</i>	LIRPEATGYG	LVYVTQAMID	YATNGKESFE	GKRVTISGSG	NVAQYAALKV	IE-LGGTV--	VSLSD-SKG-	251
<i>P. asacch.</i>	EGRNEATGFG	-V-AVVVRES	AKRFG-IKME	DAKIAVQGFG	NV-GTFTVKV	IERQGGKVC	IAEWDRENG	250
	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. glut.</i>	WV-HTPNGV-	DVAKL-R--E	IK---EVRRA	RVSUY-ADEV	EGATYHTDGS	IW--DLKCDI	ALPCATQNEL	326
<i>E. coli</i>	TV-VDESGF-	TKEKLARLIE	IK---ASRDG	RVADY-AKE-	FGLVYLEGQQ	PW--SLPVDI	ALPCATQNEL	327
<i>N. crassa</i>	LVATGESGI-	TVEDINAVMA	IK---EARQS	LTSF---QHA	GHLKWIEGAR	PWLHVQKVDI	ALPCATQNEV	317
<i>S. cerevi.</i>	-CIISETGI-	TSEQVADISS	AKVNFKSLEQ	IVNEYSTFSE	NKVQYIAGAR	PWTHVQKVDI	ALPCATQNEV	319
<i>P. asacch.</i>	YALYNENGID	FKELLA----	YK---EANKT	LIGFPGA-E-	----RITDEE	FW--TKEYDI	IVPAALENVI	305
	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. glut.</i>	NGENAKTLAD	NGCRFVAEGA	NMPSTPEAVE	VF-----RE	RD--IRFGPG	KAANAGGVAT	SALEMQQNAS	388
<i>E. coli</i>	DVDAAHQLIA	NGVKAVAEGA	NMPTTIEATE	LF-----QQ	AG--VLFAPG	KAANAGGVAT	SGLEMAQNAA	389
<i>N. crassa</i>	SKEEAEGLLA	AGCLFVAEGS	NMGCTLEAIG	VF-ENNRKEK	KGEAVWYAPG	KAANCGGVAV	SGLEMAQNSQ	386
<i>S. cerevi.</i>	SGEEAKALVA	QGVKFIAEGS	NMGSTPEAIA	VFETARSTPL	DQATVWYGPP	KAANLGGVAV	SGLEMAQNSQ	389
<i>P. asacch.</i>	TGERAKTINA	---KLVCEAA	NGPTTPEGDK	V-----LTE	RG--INLTPD	ILTNSGGVLV	SYVEHVQNQY	364
	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. glut.</i>	RDSWSFEYTD	ERLQVIM---	KNIFKTCAET	AAE--YGHEN	DYVVGANIAG	FKKVADAMLA	QG-VI	447
<i>E. coli</i>	RLGMKAQKVD	ARLHHIM---	LDIHHACVEH	GGE---GEQT	NYVQGANIAG	FVKVADAMLA	QG-VI	447
<i>N. crassa</i>	RLNWTQAEVD	EKLKIDIMKNA	FFNGLNTAKT	YVEAAEGELP	SLVAGSNIAG	FVKVQAAMHD	QG-DHWSKN	454
<i>S. cerevi.</i>	RITWTSERVD	QELKRIMINC	FNEDIDYA-K	KYTKDGKVL	SLVKGANIAS	FIKVSAMFD	QGDVF	453
<i>P. asacch.</i>	GYWTEAEVE	E--KQEADMM	KAIGVFA-V	ADE-YNVTLR	EAVMYAI-K	SIDV--AMKL	RGHY	421
	+	+	+	+	+	+	+	+

Abb. 6: Vergleich der abgeleiteten Proteinsequenz der *C. glutamicum* GDH mit den Proteinsequenzen der GDH's von *E. coli*, *N. crassa*, *S. cerevisiae* und *P. asaccharolyticus*. Die Prozentzahlen am Ende der Aminosäuresequenzen verdeutlichen den Anteil identischer AS-Reste mit der *C. glutamicum* GDH. Legende: (*) in allen verglichenen GDH's identische AS; (+) in mindestens drei der fünf verglichenen GDH's identische AS.

1.5 Bestimmung der Transkriptlänge des *gdh*-Gens

Zur weiteren Charakterisierung des *gdh*-Gens von *C. glutamicum* wurde dieses auch auf RNA-Ebene untersucht. Um die Größe des *gdh*-Transkripts zu bestimmen, wurde eine Northern Blot-Hybridisierung durchgeführt. Für die Hybridisierung wurde eine RNA-Sonde verwendet, da erstens RNA-RNA-Hybride stabiler als DNA-RNA-Hybride sind und zweitens keine Selbsthybridisierung wie bei einer DNA-Sonde stattfinden kann (Melton et al., 1984). Zur Herstellung dieser Probe wurde ein 1.05 kb *SacI/PstI* Fragment, auf dem der 5' kodierende Bereich des *gdh*-Strukturgens lokalisiert ist, aus dem Vektor pUC4.5gdh isoliert (siehe Abbildung 3) und in die *SacI/PstI*-Schnittstelle des Transkriptionsvektors pGEM4Z™ vor den Promotor der T7-RNA Polymerase ligiert und *E. coli* DH5 damit transformiert. Aus 10 Transformanten wurde die Plasmid-DNA isoliert und durch Restriktionsanalyse mit *SacI/PstI* wurde die Orientierung des Fragmentes bestätigt. Der rekombinante Vektor pGEM1.05gdh (Abbildung 7) wurde mit *SacI* linearisiert und durch *in-vitro* Transkription mit der T7-RNA Polymerase konnte eine Digoxigenin-UTP markierte *gdh*-spezifische "antisense" RNA-Sonde gewonnen werden, die komplementär zur *gdh*-spezifischen mRNA war. Aus *C. glutamicum* 13032 wurde die Gesamt-RNA isoliert und 6 µg davon auf einem Agarose/Formaldehyd-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und gegen die RNA-Sonde hybridisiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 8 dargestellt. Bei der Hybridisierung der 1.05 kb RNA-Sonde gegen die Gesamt-RNA aus *C. glutamicum* 13032 wurde ein Signal bei 1.65 kb beobachtet. Dieses Ergebnis zusammen mit der Terminatorstruktur hinter dem *gdh*-Gen zeigen, daß das *gdh*-Gen als einzelne Transkriptionseinheit im Genom von *C. glutamicum* vorliegt.

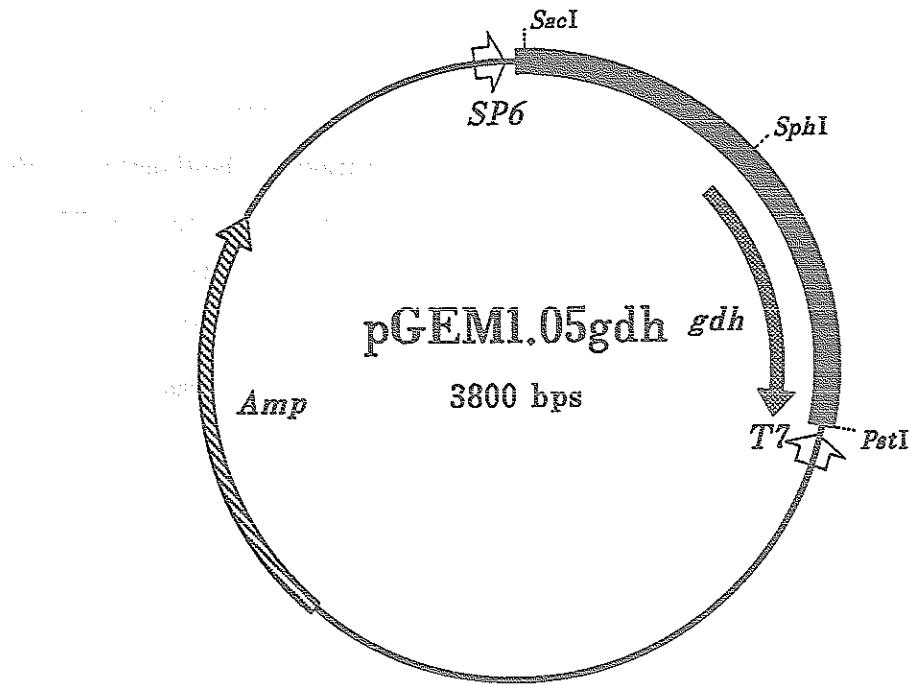


Abb. 7: Restriktionskarte des rekombinanten Transkriptionsvektors pGEM1.05gdh. Abkürzungen: *Amp*, Ampicillinresistenz; *gdh*, Glutamat-Dehydrogenase-Gen; SP6, Promotor der SP6-RNA-Polymerase; T7, Promotor der T7-RNA-Polymerase.

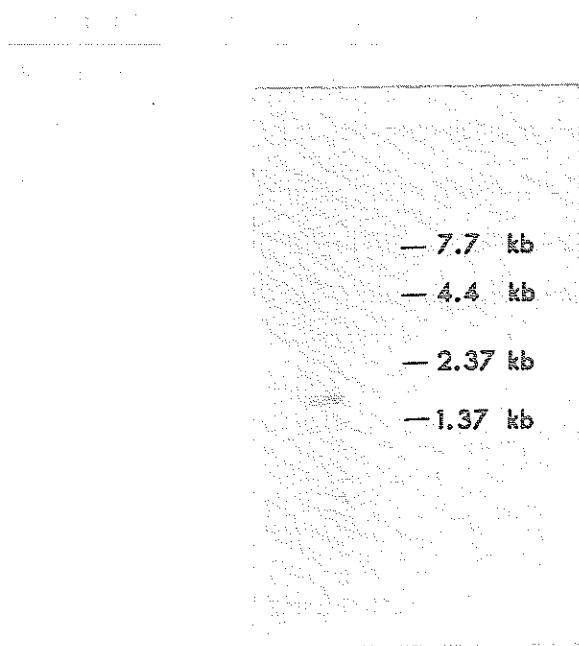


Abb. 8: Northern Blot-Analyse des *gdh*-Transkripts von *C. glutamicum*. 6 µg Gesamt-RNA aus *C. glutamicum* ATCC13032 wurden entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und gegen eine Digoxigenin-UTP markierte *gdh*-spezifische RNA-Sonde hybridisiert.

1.6 Bestimmung des Transkriptionsstarts des *gdh*-Gens

Um den Transkriptionsstart des *gdh*-Gens von *C. glutamicum* zu bestimmen, wurde ein "RNase Schutz-Experiment" durchgeführt. Zur Herstellung einer *gdh*-spezifischen "antisense" mRNA-Sonde, die den aus den Subklonierungsexperimenten ermittelten potentiellen Transkriptionstartbereich abdeckte, wurde ein 0.53 kb *Sph*I-*Sac*I-Fragment aus dem Vektor pUC4.5*gdh* isoliert (Nukleotide 12 - 542 in **Abbildung 4**), in die *Sph*I-*Sac*I Schnittstelle des Transkriptionsvektor pGEM4Z™ kloniert und *E. coli* DH5 damit transformiert. Nach Linearisierung des Vektors pGEM0.53*gdh* mit *Eco*RI konnte durch *in-vitro* Transkription mit der T7-RNA-Polymerase eine [³⁵S]-CTP "antisense" mRNA hergestellt werden, die aus 553 Nukleotiden (nt) bestand und die komplementär zu dem zu analysierenden *gdh*-Transkript war. 50 ng dieser *gdh*-spezifischen Sonde wurden gegen 50 µg Gesamt-RNA aus *C. glutamicum* 13032 hybridisiert, so daß dabei vom Transkriptanfang des *gdh*-Gens ein doppelsträngiges RNA-RNA-Hybrid mit einzelsträngigen Enden entstand. Der Ansatz wurde anschließend mit RNaseA und RNaseT1 behandelt, um überhängende, einzelsträngige RNA abzubauen. Nur der doppelsträngige Bereich der RNA-RNA-Hybride ist vor dem Abbau geschützt. Anschließend wurden die Hybride entsprechend ihrer Größe auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel im Vergleich mit den entsprechenden RNA-Größenmarkern elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Abschätzung der Größe des geschützten RNA-Fragmentes wurde in einem Vorversuch dieses mit RNA-Größenmarkern von 63 nt, 105 nt, 261 nt, 306 nt und 329 nt verglichen. Damit konnte die Größe des geschützten RNA-Fragmentes auf 260 - 275 nt eingegrenzt werden. In dem nachfolgenden Hauptexperiment, bei dem wie bereits oben beschrieben vorgegangen wurde, wurde dann die Größe des geschützten RNA-Fragmentes mit RNA-Größenmarkern von 261 nt, 271 nt und 275 nt verglichen. Als Kontrolle wurde auch Hefe-tRNA anstelle der *C. glutamicum* RNA in die Hybridisierung eingesetzt und anschließend mit den RNasen behandelt. Dadurch sollten Artefakte ausgeschlossen werden, die auftreten konnten, falls die 553 nt *gdh*-Sonde RNase resistente Strukturen enthalten würde. Das Ergebnis dieses "RNase Schutz-Experiments" ist in **Abbildung 9** dargestellt.

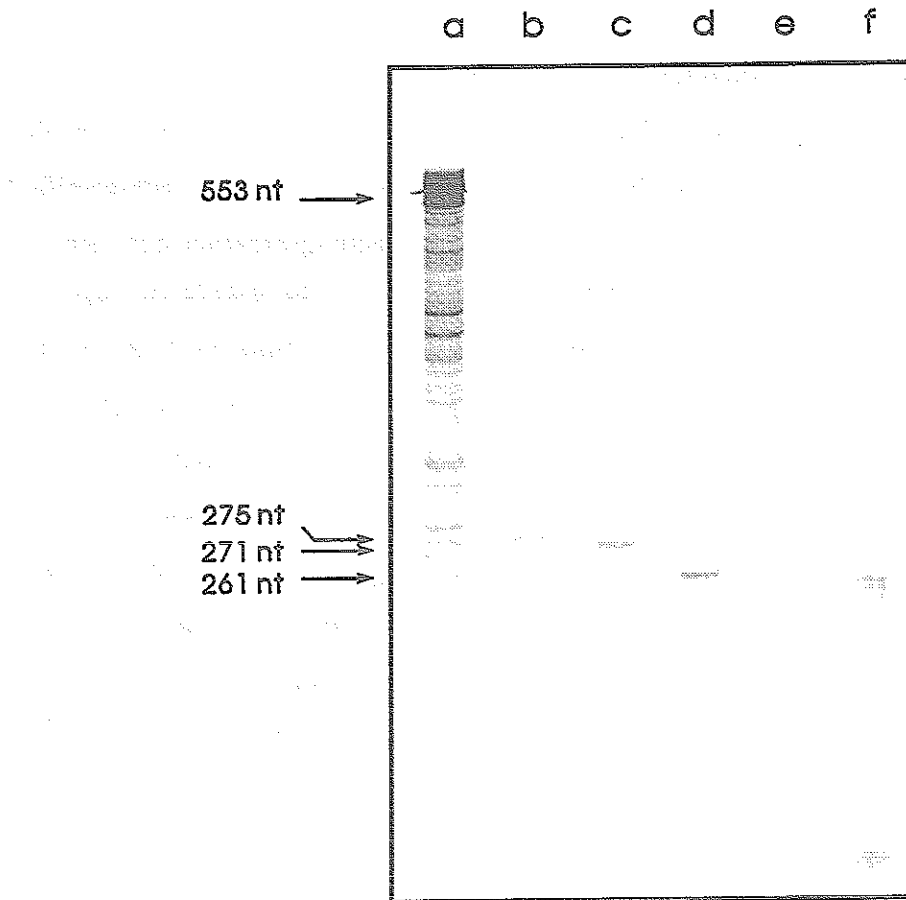


Abb. 9: RNase Schutz-Experiment zur Bestimmung des 5'Endes der *gdh*-mRNA von *C. glutamicum*. Spur a enthält 20 ng der [35 S]-CTP-markierten 553 nt *gdh*-spezifischen RNA-Sonde; die Spuren b, c und d enthalten jeweils ungefähr 20 ng der 275 nt, 271 nt und 261 nt großen RNA-Marker; Spur e enthält 50 ng der markierten *gdh*-spezifischen RNA-Sonde, die gegen 50 μ g Hefe-tRNA hybridisiert und anschließend mit den Ribonukleasen behandelt worden war; Spur f enthält 50 ng der markierten *gdh*-spezifischen RNA Sonde, die gegen 50 μ g Gesamt-RNA aus *C. glutamicum* hybridisiert und anschließend mit den Ribonukleasen behandelt worden war. Die Autoradiographie dauerte 4 Tage.

Wie erwartet wurde kein Signal bei dem Kontrollansatz gefunden. Daraus konnte geschlossen werden, daß die Hefe-tRNA mit der *gdh*-RNA Sonde nicht unspezifisch hybridisierte und daß die *gdh*-spezifische RNA-Sonde selber keine RNase resistenten Bereiche enthielt. Bei der Hybridisierung der *gdh*-spezifischen RNA-Sonde gegen die *C. glutamicum* RNA traten mehrer Signale auf. Das größte der vor dem RNase-Abbau geschützten Fragmente hatte eine Länge von 261 nt. Da das genaue 5'Ende der *gdh*-spezifischen mRNA-Sonde bekannt war, konnte somit durch die bestimmte Größe des

geschützten RNA-Fragmentes der Transkriptionsstart des *gdh*-Gens berechnet werden. Die RNA-Polymerase initiiert damit die Transkription an einen Guanin in Position 288 der Nukleotidsequenz (siehe Abbildung 4). Dieser Guanin-Rest liegt 284 bp vor dem ATG Startcodon der Translation. 11 bp vor der bestimmten Transkriptionsinitiationsstelle befindet sich ein DNA-Sequenz-Motif "5'-CATAAT-3'" und im Abstand von 35 bp vor dem bestimmten Transkriptionsstart befindet sich ein weiteres DNA-Sequenzelement "5'-TGGTCA-3'". Weiterhin konnte 43 bp vor dem G₂₈₈ eine AT-reiche-Region gefunden werden. Diese Charakteristika deuten auf einen *E. coli*-ähnlichen Promotor hin.

2. Untersuchungen zur Rolle der Glutamat-Dehydrogenase im Stoffwechsel von *C. glutamicum* ATCC13032

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde die Rolle der GDH im Stoffwechsel von *C. glutamicum* untersucht. Eine definierte, GDH-defekte *C. glutamicum* Mutante und ein *gdh*-überexprimierender *C. glutamicum* Stamm wurden konstruiert, um dann mit diesen Stämmen die Bedeutung der GDH für das Wachstum, den internen Glutamat-Pool und die Glutamat-Produktion von *C. glutamicum* zu analysieren (Börmann-El Kholi et al., 1993).

2.1 Konstruktion der GDH-defekten *C. glutamicum* Mutante EB1

Die Isolierung und Charakterisierung des *gdh*-Gens ermöglichte die Konstruktion eines definierten GDH-negativen *C. glutamicum*-Stammes durch "Gen-gerichtete Mutagenese". Dabei wurde die kodierende Region des chromosomalen *gdh*-Gens von *C. glutamicum* durch Integration eines nicht-replikativen Plasmides, welches ein internes *gdh*-Fragment trug, unterbrochen. Für die Konstruktion dieses Vektors wurde ein 0.45 kb *Pst*I/*Eco*RV-Fragment aus dem Vektor pUC4.5*gdh* isoliert (Abbildung 10a), zur Erzeugung "glatter Enden" mit Klenow-Enzym behandelt, um es anschließend in die *Sca*I-Schnittstelle des mobilisierbaren, in *C. glutamicum* nicht-replikativen Vektors pSUP301 ligieren zu können. Das rekombinante Plasmid pSUP*gdh* (Abbildung 10b) wurde dann in den *E. coli* Mobilisatorstamm S17-1 transferiert. Anschließend erfolgte eine Konjugation zwischen

E. coli S17-1(pSUPgdh) und *C. glutamicum* 13032, wobei die Plasmid-DNA gerichtet nach *C. glutamicum* transferiert wurde. Die Selektion der *C. glutamicum* Transkonjuganden erfolgte auf Kanamycin und auf Nalidixinsäure. Auf diesem Medium ist der verwendete *E. coli* - Donorstamm nicht in der Lage zu wachsen, da er Nalidixinsäure-sensitiv ist. Der verwendete Vektor ist in *C. glutamicum* nicht-replikativ. Deshalb konnten nur *C. glutamicum* Transkonjuganden auf dem Selektionsmedium überleben, bei denen der Vektor durch homologe Rekombination zwischen der auf dem Vektor vorhandenen *gdh*-Sequenz und dem chromosomalen *gdh*-Gen in das Chromosom integriert war und so die Kanamycin-Resistenz vermitteln konnte (Abbildung 10c). DNA von 10 Kolonien wurde isoliert und durch Analyse der DNA auf einem Agarosegel konnte gezeigt werden, daß keine autonomen Plasmide vorhanden waren. Da der Vektor pSUPgdh ein internes *gdh*-Fragment trägt, sollte eine Integration des Vektors nur innerhalb der kodierenden Region des *gdh*-Gens erfolgt sein. Einer dieser Transkonjuganden wurde als *C. glutamicum* EB1 bezeichnet. Um den Nachweis zu erbringen, daß der Vektor pSUPgdh tatsächlich in den kodierenden Bereich des *gdh*-Gens integriert war, wurde eine Southern Blot Analyse durchgeführt. Als Sonde wurde ein 1.5 kb *SacI*-Fragment, das den größten Teil der kodierenden Region des *gdh*-Gens umfaßt, aus dem Vektor pUC4.5gdh isoliert (siehe Abbildung 10a) und mit Digoxigenin-dUTP markiert. Chromosomale DNA des Wildtyps *C. glutamicum* 13032 und der potentiellen GDH-defekten Mutante *C. glutamicum* EB1 wurde isoliert und mit dem Restriktionsenzym *SacI* geschnitten. Die DNA-Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und gegen die *gdh*-Sonde hybridisiert. Das Ergebnis dieser Southern Blot Analyse ist in Abbildung 11 gezeigt. Bei der Hybridisierung der 1.5 kb *SacI*-Sonde gegen die *SacI* geschnittene chromosomale DNA des Wildtyps trat, wie erwartet, ein Signal bei 1.5 kb auf. Dagegen hybridisierte die 1.5 kb *SacI*-Sonde mit einem 7.4 kb *SacI*-Fragment der chromosomalen DNA von *C. glutamicum* EB1. Da das Plasmid pSUPgdh keine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *SacI* besitzt, war zu erwarten, daß bei dieser Hybridisierung ein Signal bei 7.4 kb auftrat, daß sich aus den 1.5 kb des ursprünglichen *SacI*-Fragmentes und den 5.9 kb des Vektors pSUPgdh zusammensetzte. Dieses Ergebnis belegt, daß in dem Stamm *C. glutamicum* EB1 eine Integration des Vektors pSUPgdh in das chromosomale *gdh*-Gen stattgefunden hat und dieses dadurch unterbrochen wurde.

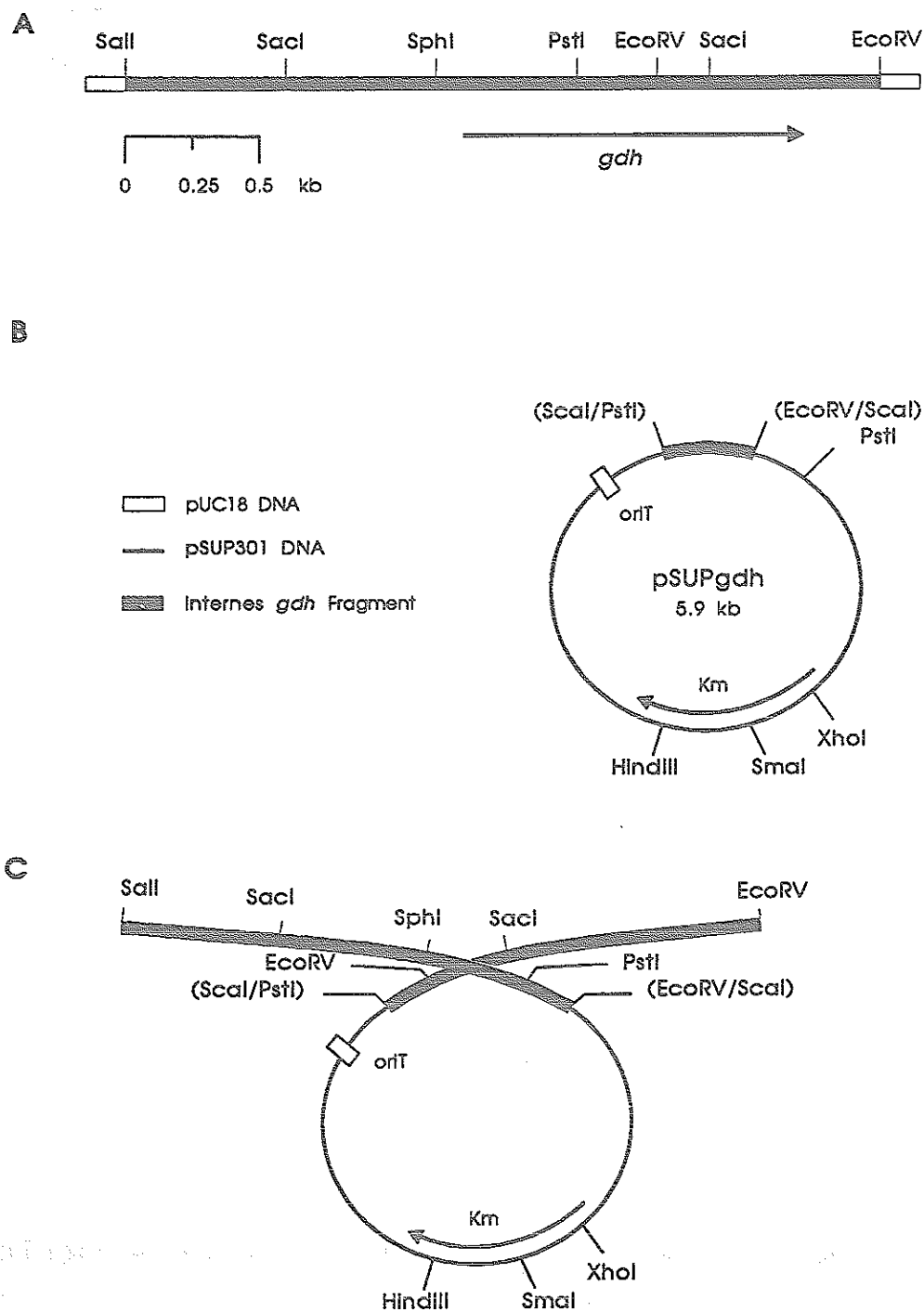


Abb. 10: Restriktionskarten (A) des chromosomalen 2.75 kb *C. glutamicum* DNA-Fragmentes in dem Vektor pUC4.5gdh, (B) des rekombinanten Vektors pSUPgdh, der das interne 0.45 kb *PstI-EcoRV gdh*-Fragment trägt, und (C) der genomischen *gdh*-Region nach der homologen Rekombination zwischen pSUPgdh und der *PstI-EcoRV*-Region des chromosomalen *gdh*-Gens von *C. glutamicum*. Abkürzungen: Km, Kanamycin-Resistenz; *oriT*, Replikationsursprung für den Transfer.

Um den physiologischen Nachweis zu erbringen, daß das *gdh*-Gen in *C. glutamicum* EB1 nicht mehr funktionell ist, wurden die spezifischen GDH-Aktivitäten im Rohextrakt dieses Stammes bestimmt. Wie in Tabelle 4 gezeigt, verfügt *C. glutamicum* EB1 im Gegensatz zum Wildtyp *C. glutamicum* ATCC13032 (1.8 U/ mg Protein) über keine nachweisbare GDH-Aktivität mehr und damit handelt es sich bei dem Stamm *C. glutamicum* EB1 um eine definierte GDH-defekte Mutante.

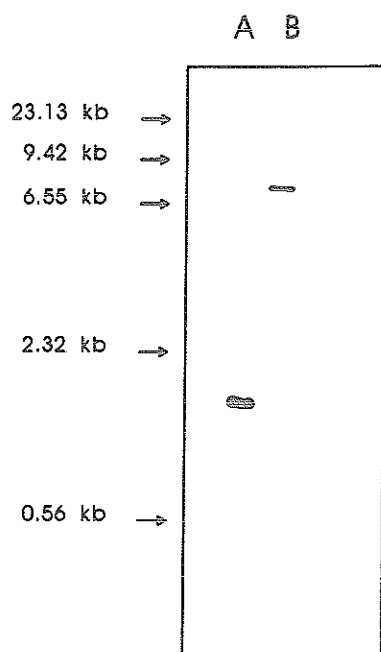


Abb. 11: Southern Blot-Analyse der genomischen DNA von *C. glutamicum* ATCC13032 (A) und *C. glutamicum* EB1 (*gdh::pSUPgdh*) (B). Die chromosomale DNA wurde mit *SacI* geschnitten und gegen eine Digoxigenin-dUPT-markierte 1.5 kb *SacI*-Sonde, die aus dem Plasmid pUC4.5*gdh* isoliert worden war, hybridisiert.

2.2 Konstruktion des *gdh*-überexprimierenden Stammes *C. glutamicum* (pEKgdh)

Um die Rolle der GDH im Stoffwechsel von *C. glutamicum* aufzuklären, wurde auch ein *gdh*-überexprimierender Stamm konstruiert, der über ein Plasmid-kodiertes *gdh*-Gen einschließlich seiner eigenen Promotor- und Terminatorregion verfügt. Zur Konstruktion dieses Stammes wurde der Vektor pEK2.5gdh-2 mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* linearisiert. Auf dem 1.95 kb großen *SalI/EcoRV*-Bereich des 2.5 kb *SalI*-Fragmentes im Vektor pEK2.5gdh-2 befindet sich der Promotor und der 5' kodierende Bereich des *gdh*-Strukturgens (Abbildung 12a). Weiterhin wurde aus dem Vektor pUC1.3gdhT ein 0.8 kb *EcoRV*-Fragment isoliert, auf dem der 3' kodierende Bereich des *gdh*-Gens und der Terminator lokalisiert waren (Abbildung 12b). Anschließend wurde das 0.8 kb *EcoRV*-Fragment in den *EcoRV* geschnittenen Vektor pEK2.5gdh-2 ligiert und *E. coli* DH5 mit dem rekombinanten Plasmid pEKgdh (Abbildung 12c) transformiert. Zur Konstruktion von pEKgdh (C) wurde das 0.8 kb *EcoRV*-Fragment in der richtigen Orientierung in den Vektor pEK2.5gdh-2 ligiert. Die korrekte Orientierung der Insertion wurde durch Restriktionsanalyse mit *SacI* überprüft. Danach wurde das Plasmid pEKgdh nach *C. glutamicum* 13032 tranferiert und der rekombinante Stamm *C. glutamicum*(pEKgdh) genannt. Um zu überprüfen, ob das Plasmid-kodierte *gdh*-Gen in *C. glutamicum*(pEKgdh) exprimiert wird, wurden die spezifischen GDH-Aktivitäten im Rohextrakt dieses Stammes bestimmt. Das Ergebnis ist in Tabelle 4 gezeigt. *C. glutamicum*(pEKgdh) besitzt eine 14-fach höhere spezifische GDH-Aktivität (24.6 U/mg Protein) als der Elternstamm *C. glutamicum* 13032 (1.8 U/mg Protein). Damit konnte gezeigt werden, daß das *gdh*-Gen in *C. glutamicum*(pEKgdh) funktionell ist.

Tabelle 4: Spezifische Glutamat-Dehydrogenase-Aktivitäten in zell-freien Extrakten von *C. glutamicum* 13032, *C. glutamicum* EB1 und *C. glutamicum*(pEKgdh). Die Zellen wurden auf Minimalmedium mit 4 % Glucose gezüchtet.

Stamm	spez. GDH Aktivität (U/mg Protein)
<i>C. glutamicum</i> 13032	1.8
<i>C. glutamicum</i> EB1	<0.004
<i>C. glutamicum</i> (pEKgdh)	24.6

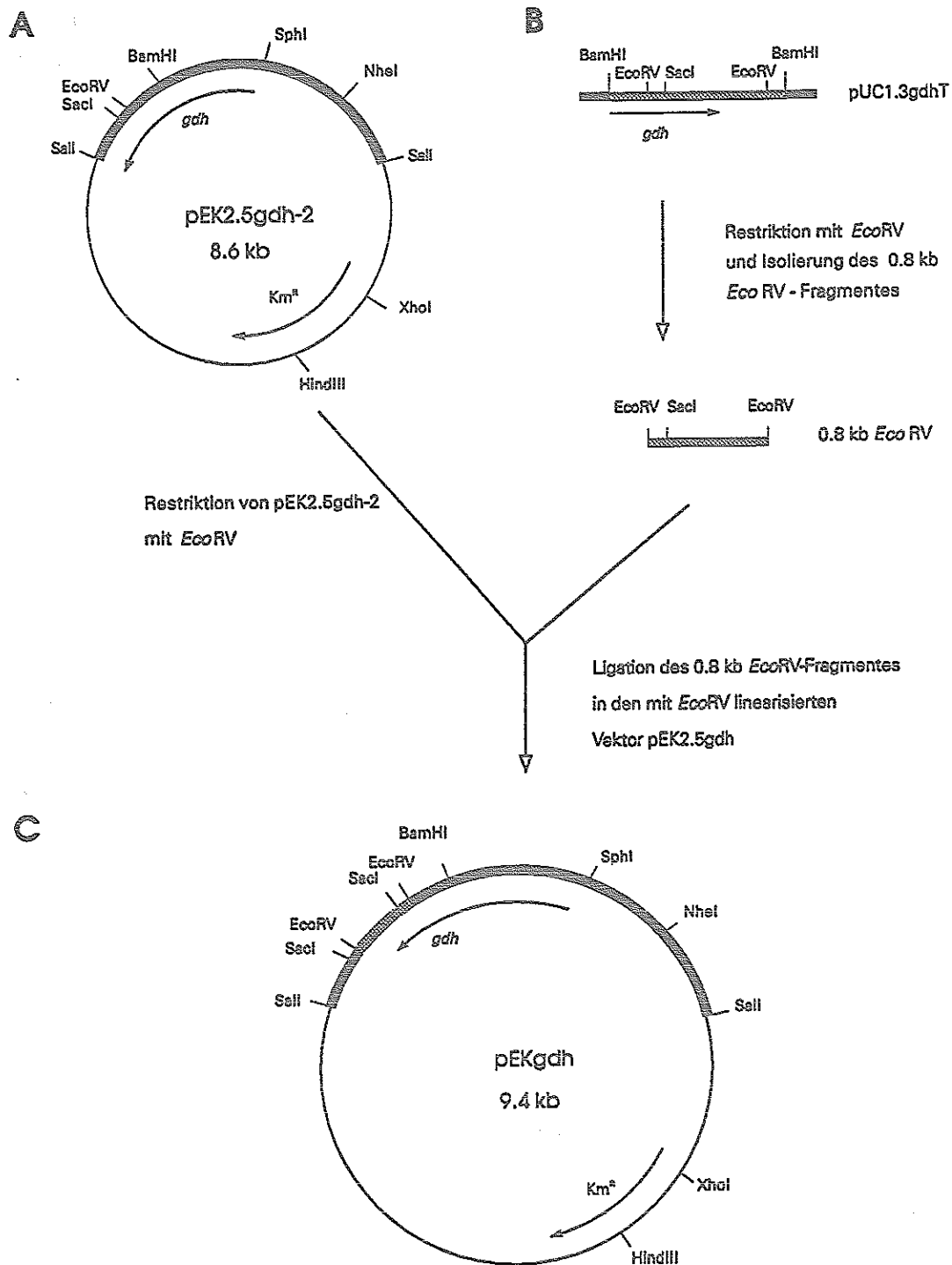


Abb. 12: Konstruktion des rekombinanten Plasmides pEKgdh, auf dem das vollständige *gdh*-Strukturgen von *C. glutamicum* einschließlich seiner 5'- und 3'-flankierenden Kontrollregionen lokalisiert ist. Dazu wurde (A) pEK2.5gdh-2, auf dem das *gdh*-Strukturgen mit Promotor lokalisiert ist, mit *EcoRV* linearisiert und (B) aus pUC1.3gdhT ein 0.8 kb *EcoRV*-Fragment, auf dem der Terminator des *gdh*-Gens liegt, isoliert und dieses in das Plasmid pEK2.5gdh-2 ligiert. Dies ergab den Vektor pEKgdh (C).

Als weiterer Nachweis der Überexpression des *gdh*-Gens in dem Stamm *C. glutamicum*(pEKgdh) wurde eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurden 150 µg Protein eines zell-freien Extraktes von *C. glutamicum*(pEKgdh) im Vergleich zu dem Wildtyp *C. glutamicum* 13032 und der GDH-defekten Mutante *C. glutamicum* EB1 auf ein denaturierendes SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, die Proteine nach ihrer Molmasse aufgetrennt und mit einem Molmassenstandard verglichen. Das Ergebnis ist in Abbildung 13 dargestellt.

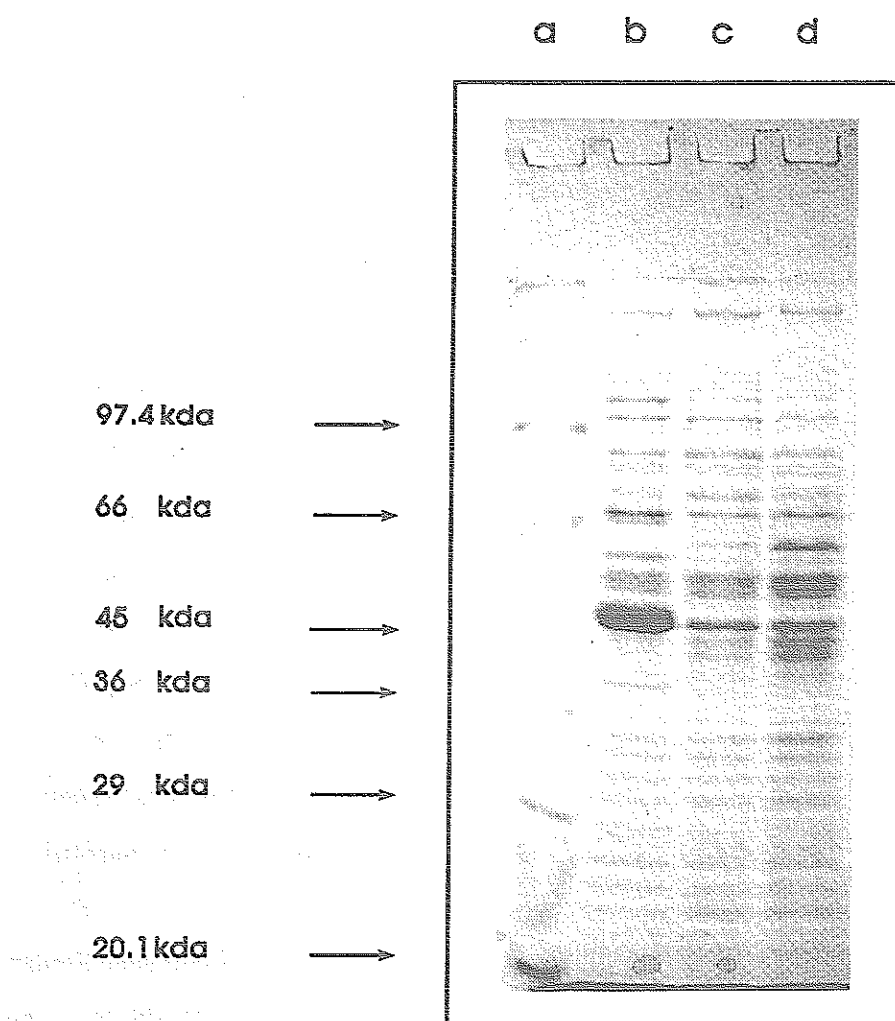


Abb. 13: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese der zell-freien Extrakte von *C. glutamicum*(pEKgdh) (b), *C. glutamicum* 13032 (c) und *C. glutamicum* EB1 (d) im Vergleich mit dem Molmassenstandard (a). Abkürzungen: kDa, Kilodalton

Im aufgetrennten Rohextrakt von *C. glutamicum*(pEKgdh) ist eine deutliche Proteinbande bei einem Molekulargewicht von ungefähr 50000 zu erkennen, die in dieser Intensität weder bei dem Wildtyp noch bei der GDH-defekten Mutante zu finden ist. Damit konnte gezeigt werden, daß in dem *gdh*-überexprimierenden Stamm *C. glutamicum*(pEKgdh) deutlich mehr GDH als in den anderen Stämmen gebildet wird.

2.3 Vergleichende Wachstumsexperimente mit *C. glutamicum* 13032, *C. glutamicum* EB1 und *C. glutamicum*(pEKgdh).

Zur Charakterisierung der GDH-defekten Mutante *C. glutamicum* EB1 und des *gdh*-überexprimierenden Stammes *C. glutamicum*(pEKgdh), und um Aufschluß über die Bedeutung der GDH für das Wachstum von *C. glutamicum* zu erhalten, wurden vergleichende Wachstumsexperimente auf Minimalmedium mit unterschiedlichen Kohlenstoff (C)- und Stickstoff (N)- Quellen durchgeführt. Das Wachstum dieser Stämme wurde auf Minimalmedium (MM) mit 4 % Glucose, 2 % Ribose oder 2 % Acetat als C-Quelle und jeweils 5 g/l Ammoniumsulfat und Harnstoff als N-Quelle und auf MM mit 2 % Glutamat als alleiniger C- und N- Quelle im Vergleich zum Wildtyp *C. glutamicum* 13032 untersucht. Die Stämme wurden auf MM mit den jeweiligen C- und N-Quellen vorgezüchtet, und anschließend wurde das Wachstumsmedium mit dieser Kultur mit einer OD₆₀₀ von 0.5 angeimpft. Das Wachstum der Kulturen wurde bis zur stationären Phase verfolgt. Zum Abschluß jedes Wachstumsversuches wurden die Zellen in der stationären Wachstumsphase geerntet und zur Kontrolle die spezifischen GDH-Aktivitäten im Rohextrakt bestimmt. Das Ergebnis dieser Wachstumsexperimente ist in Abbildung 14 a-d zusammengefaßt. Das Wachstum der GDH-defekten Mutante *C. glutamicum* EB1 unterscheidet sich auf keinem der getesteten Wachstumsmedien von dem des Wildtyps *C. glutamicum* 13032. Beide Stämme haben eine Verdopplungszeit in der exponentiellen Wachstumsphase von 120 min auf MM mit Glucose, 195 min auf MM mit Ribose, 180 min auf MM mit Acetat und 390 min auf MM mit Glutamat. Der *gdh*-überexprimierende Stamm *C. glutamicum*(pEKgdh) zeigte dagegen eine etwas längere lag-Phase und Verdopplungszeiten von 140 min auf MM mit Glucose und von 240 min auf MM mit Acetat als C- Quelle. Auf MM mit Ribose bzw. auf MM mit Glutamat als C- und N-Quelle unterscheidet sich das Wachstum dieses Stammes nicht von dem des Wildtyps *C. glutamicum* 13032.

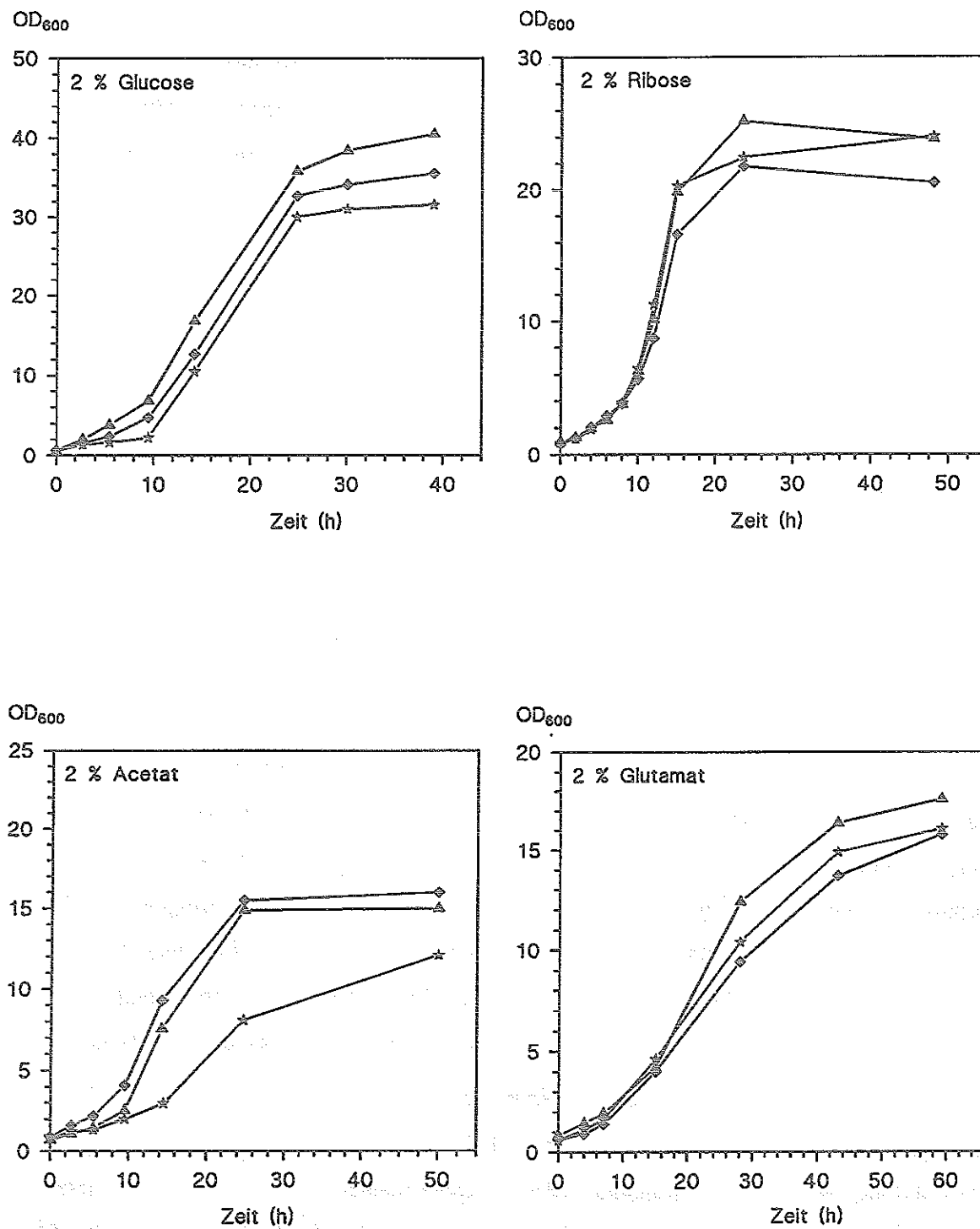


Abb. 14: Vergleichende Wachstumsexperimente mit *C. glutamicum* 13032 (▲), *C. glutamicum*(pEKgdh) (★) und *C. glutamicum* EB1 (◆). Die Stämme wurden auf Minimalmedium mit 4 % Glucose, 2 % Ribose, 2 % Acetat und 2 % Glutamat gezüchtet und das Wachstum als optische Dichte bei OD₆₀₀ bis in die stationäre Phase verfolgt.

2.4 Vergleichende Messungen der internen und externen Glutamatkonzentrationen unter Biotin-Mangel und Biotin-Überschuß

Corynebacterium glutamicum ist in der Lage unter bestimmten Wachstumsbedingungen wie z.B. unter Biotin-Limitierung große Mengen an Glutamat in das umgebende Medium zu sezernieren. Da die Glutamatbildung der Zellen unter Biotin-Limitierung das bislang am besten untersuchte System ist, wurde dieses gewählt, um unter diesen Bedingungen die Bedeutung der GDH für die Glutamatbildung näher zu ermitteln. Dazu wurden vergleichende Messungen der zell-internen und externen Glutamatkonzentrationen durchgeführt. Für diese Untersuchungen standen die drei Stämme, *C. glutamicum* 13032, *C. glutamicum*(pEKgdh) und *C. glutamicum* EB1 zur Verfügung, die sich in ihrem Level an GDH (siehe Tabelle 4) unterscheiden, ansonsten aber einen genetisch identischen Hintergrund besitzen. Für diese Experimente wurden die Zellen zunächst auf Minimalmedium mit 4 % Glucose und 10 µg/l Biotin vorgezchtet, damit sie anschließend in der Hauptkultur in die Biotin-Limitierung wachsen konnten. Dann wurden diese Vorkulturen der drei zu untersuchenden Stämme verwendet, um Minimalmedium mit 1 µg/l Biotin mit einer OD₆₀₀ von 0.3 anzuimpfen. Während des Wachstums wurden zu bestimmten Zeitpunkten Proben zur Bestimmung der zell-internen und externen Glutamat-Konzentration genommen. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 7 bis 8 waren alle drei Stämme aufgrund des Biotin-Mangels in die stationäre Phase gewachsen und sezernierten mit vergleichbarer Rate Glutamat in das umgebende Medium. Die Glutamatsekretionsrate des Wildtyp *C. glutamicum* 13032 betrug 20 µmol/min*g TG, die des *gdh*-überexprimierenden Stammes *C. glutamicum*(pEKgdh) 18 µmol/min*g TG, und die der GDH-defekten Mutante *C. glutamicum* EB1 21 µmol/min*g TG während der ersten 10 Stunden der Glutamatproduktion (Tabelle 5). Es war auffällig, daß der *gdh*-überexprimierende Stamm *C. glutamicum*(pEKgdh) in allen Experimenten niedrigere Glutamat-Sekretionsraten als der Wildtyp zeigte. Der Wildtyp *C. glutamicum* 13032 akkumuliert unter diesen "Glutamat-Produktionsbedingungen" während der exponentiellen Wachstumsphase intern 140 ± 20 mM Glutamat, die GDH-defekte Mutante *C. glutamicum* EB1 110 ± 10 mM Glutamat und der *gdh*-überexprimierende Stamm *C. glutamicum*(pEKgdh) 250 ± 50 mM Glutamat (Tabelle 5).

Tabelle 5: Glutamatsekretionsraten und interne und externe Glutamat-Konzentrationen von *C. glutamicum* 13032, *C. glutamicum* EB1 und *C. glutamicum*(pEKgdh) unter Biotin-Mangel und Biotin-Überschuß im Medium. Die Zellen wurden auf Minimalmedium mit 4 % Glucose und 1 µg/l bzw. 200 µg/l Biotin gezüchtet.

Stamm	Glutamat-Sekretion ^a (µmol/min*g TG)	interne Glutamat-Konzentration (mM) ^b	
		1 µg	200 µg
		Biotin/l	Biotin/l
<i>C. glutamicum</i> 13032	20 ± 2	140 ± 20	180 ± 30
<i>C. glutamicum</i> (pEKgdh)	18 ± 2	250 ± 50	280 ± 30
<i>C. glutamicum</i> EB1	21 ± 2	110 ± 10	120 ± 10

^aDie Glutamatsekretionsrate wurde während der ersten 10 Stunden der Glutamatproduktion bestimmt.

^bDie ermittelten ± Werte der internen Glutamatkonzentrationen wurden aus 6 unabhängigen Messungen pro Experiment bestimmt.

Corynebacterium glutamicum ist dafür bekannt, daß es auch unter "Nicht-Glutamat-Produktionsbedingungen" d.h. unter Biotin-supplementierten Wachstumsbedingungen intern sehr große Mengen an Glutamat akkumuliert. Um zu klären, ob die GDH am Aufbau dieses internen Glutamat-Pools beteiligt ist, wurden die zell-internen und externen Glutamat-Konzentrationen von *C. glutamicum* 13032, *C. glutamicum* EB1 und *C. glutamicum*(pEKgdh) auch unter Biotin-Überschuß im Medium bestimmt. Für diese Experimente wurden die drei Stämme auf Minimalmedium mit 4 % Glucose und 200 µg/l Biotin vorgezogen und anschließend das gleiche Wachstumsmedium mit einer OD₆₀₀ von 0.3 angeimpft. Das Wachstum der Kulturen wurde bis in die stationäre Phase verfolgt. Zu bestimmten Zeiten während des exponentiellen Wachstums wurden Proben für die Bestimmung der zell-internen und der externen Glutamatkonzentrationen genommen. Das Ergebnis ist ebenfalls in Tabelle 5 dargestellt. Die untersuchten *C. glutamicum* Stämme

verfügten über hohe interne Glutamat-Pools. Die internen Glutamatkonzentrationen der GDH-defekten Mutante *C. glutamicum* EB1 (120 ± 10 mM) war deutlich niedriger als die des Wildtyps *C. glutamicum* 13032 (180 ± 30 mM). Der interne Glutamat-Pool des *gdh*-überexprimierenden Stammes *C. glutamicum*(pEKgdh) war dagegen mit 280 ± 30 mM Glutamat deutlich gegenüber dem Wildtyp erhöht.

2.5 Bestimmung der Glutamat-Ausbeute während Kurz-Zeit-Fermentationen

Es wurde untersucht, ob und welchen Einfluß die GDH auf die Glutamat-Produktion von *C. glutamicum* während einer Kurz-Zeit-Glutamat-Fermentation hat. Auch für diese Experimente wurden die bereits beschriebenen in ihrem GDH-Level unterschiedlichen *C. glutamicum* Stämme *C. glutamicum* 13032, *C. glutamicum* EB1 und *C. glutamicum*(pEKgdh) herangezogen. Diese Stämme wurden zunächst auf Biotin-reduziertem ($10 \mu\text{g/l}$ Biotin) MM mit 4 % Glucose vorgezchtet und anschließend auf biotin-limitiertem ($1 \mu\text{g/l}$ Biotin) MM mit 4 % Glucose überimpft. Nachdem die Zellen aufgrund des sich einstellenden Biotin-Mangels in die stationäre Phase gewachsen waren und zwischen 5 und 10 mM Glutamat sezernierten, wurden sie geerntet, mit MM ohne Biotin und Glucose gewaschen und auf MM mit 10 mM Glucose überimpft. Die anschließende Kurz-Zeit-Glutamat-Fermentation dauerte zwei Stunden, und während dieses Zeitraums wurden alle 15 min Proben zur Bestimmung des Glucoseverbrauchs und der externen Glutamatkonzentration genommen. Das Ergebnis ist in **Abbildung 15** dargestellt. Der Wildtyp *C. glutamicum* 13032, der *gdh*-überexprimierende Stamm *C. glutamicum*(pEKgdh) und die GDH-defekte Mutante *C. glutamicum* EB1 nahmen Glucose mit Raten von $42 \mu\text{mol/min}\cdot\text{g TG}$, $33 \mu\text{mol/min}\cdot\text{g TG}$ und $48 \mu\text{mol/min}\cdot\text{g TG}$ auf. Während dieser Kurz-Zeit-Fermentationen sezernierten *C. glutamicum* 13032, *C. glutamicum*(pEKgdh) und *C. glutamicum* EB1 mit Raten von $28 \mu\text{mol/min}\cdot\text{g TG}$, $20 \mu\text{mol/min}\cdot\text{g TG}$, und $23 \mu\text{mol/min}\cdot\text{g TG}$ Glutamat in das umgebende Medium. Der Wildtyp setzte während dieser Fermentation 56 %, der *gdh*-Überexprimierer 57 % und die GDH-defekte Mutante 45 % der eingesetzten Glucose zu Glutamat um.

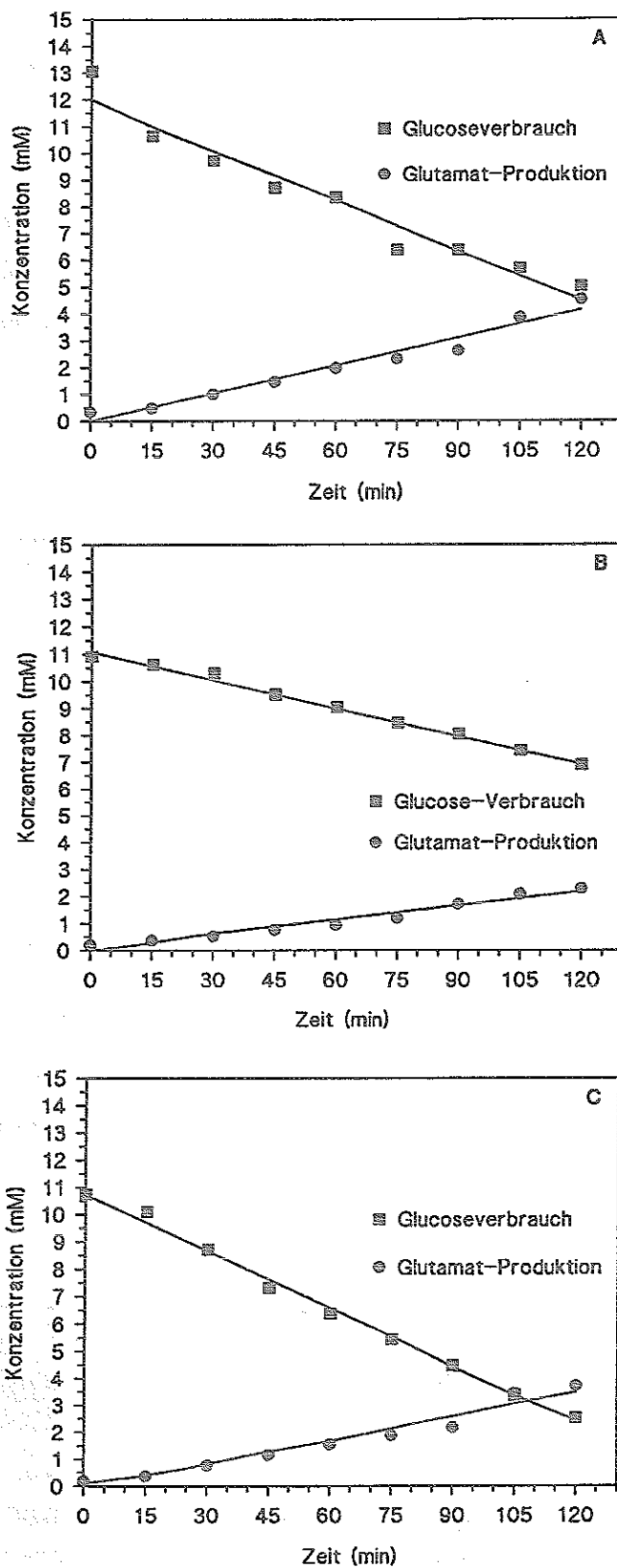


Abb. 15: Kurz-Zeit-Fermentationen mit dem Wildtyp *C. glutamicum* 13032 (A), dem *gdh*-überexprimierenden Stamm *C. glutamicum*(pEKgdh) (B) und der GDH-defekten Mutante *C. glutamicum* EB1 (C). Über einen Zeitraum von 2 Stunden wurden der Glucoseverbrauch (■) und die Glutamat-Produktion (●) der Stämme bestimmt.

2.6 Bestimmung der spezifischen Glutamin-Synthetase und Glutamat-Synthase-Aktivitäten in den verschiedenen *C. glutamicum* Stämmen

Alternativ zu der Glutamat-Biosynthese durch die GDH katalysieren die Glutamin-Synthetase (GS) und Glutamat-Synthase (GOGAT) in einer gekoppelten Reaktion die Bildung von Glutamat. Zum Nachweis dieses alternativen Glutamat-Biosynthese-Weges in *C. glutamicum* und zur Charakterisierung der konstruierten *C. glutamicum* Stämme, die sich in ihrem Level an GDH unterschieden, wurden die spezifischen GS und GOGAT-Aktivitäten im Rohextrakt der verschiedenen *C. glutamicum* Stämme bestimmt. Dazu wurden der Wildtyp *C. glutamicum* 13032, der *gdh*-überexprimierende Stamm *C. glutamicum*(pEKgdh) und die GDH-defekte Mutante *C. glutamicum* EB1 auf Minimalmedium mit 4 % Glucose gezüchtet. Nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase wurden die Zellen geerntet, und die spezifischen GS und GOGAT-Aktivitäten bestimmt. Zur Kontrolle und Charakterisierung der Stämme wurden auch die spezifischen GDH-Aktivitäten im Rohextrakt gemessen. Wie in Tabelle 6 gezeigt, konnten in allen untersuchten Stämmen spezifische GS- und GOGAT-Aktivitäten nachgewiesen werden.

Tabelle 6: Spezifische Glutamat-Dehydrogenase (GDH), Glutamin-Synthetase (GS)- und Glutamat-Synthase (GOGAT)- Aktivitäten in zell-freien Extrakten von *C. glutamicum* 13032, *C. glutamicum*(pEKgdh), *C. glutamicum* EB1 und *C. glutamicum*(pEC6gdh). Die Zellen wurden auf Minimalmedium mit 4 % Glucose gezüchtet und zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase geerntet.

Stamm	spezifische Enzymaktivitäten (U/mg Protein)		
	GDH	GS	GOGAT
<i>C. glutamicum</i> 13032	1.8	0.45	0.008
<i>C. glutamicum</i> (pEKgdh)	24.6	0.39	0.003
<i>C. glutamicum</i> EB1	n.n. ^a	0.90	0.089
<i>C. glutamicum</i> EB1(pEC6gdh)	5.2	n.b. ^b	0.005

^a n.n., nicht nachweisbar; ^b n.b., nicht bestimmt

Die GDH-defekte Mutante *C. glutamicum* EB1 besitzt 2-fach höhere GS (0.9 U/mg Protein) und 10-fach höhere GOGAT-Aktivitäten (0.089 U/ mg Protein) verglichen mit dem Wildtyp *C. glutamicum* 13032 (GS: 0.45 U/mg Protein; GOGAT: 0.008 U/mg Protein), während die GS (0.39 U/mg Protein) und GOGAT-Aktivitäten (0.003 U/mg Protein) im Stamm *C. glutamicum*(pEKgdh) etwas niedriger als im Elternstamm sind.

Um sicherzustellen, daß die 10-fach höhere spezifische GOGAT-Aktivität der GDH-defekten Mutante *C. glutamicum* EB1 ausschließlich auf das Fehlen der spezifischen GDH-Aktivität in diesem Stamm zurückzuführen ist, wurde ein weiterer *C. glutamicum* EB1-Stamm konstruiert, der ein Plasmid-kodiertes *gdh*-Gen besitzt. Dazu wurde das *gdh*-Strukturgen mit seiner Promotor- und Terminatorregion auf einem 2.8 kb *SalI*-Fragment aus dem Vektor pEKgdh (siehe Abbildung 12c) isoliert und in die *SalI*-Schnittstelle des *E. coli*/*C. glutamicum* Pendelvektors pEC6 ligiert. Das rekombinante Plasmid wurde pEC6gdh genannt und nach *E. coli* DH5 transferiert. Anschließend wurde pEC6gdh (Abbildung 16) nach *C. glutamicum* EB1 transferiert und die spezifische GDH-Aktivität im Rohextrakt des Stammes *C. glutamicum* EB1(pEC6gdh) bestimmt. Wie ebenfalls in Tabelle 6 gezeigt, besitzt *C. glutamicum* EB1(pEC6gdh) eine deutlich höhere spezifische GDH-Aktivität (5.2 U/mg Protein) als der Elternstamm *C. glutamicum* EB1 (>0.004 U/mg Protein) und der Wildtyp (1.8 U/mg Protein). Weiterhin wurde auch die spezifische GOGAT-Aktivität in *C. glutamicum* EB1(pEC6gdh) bestimmt. Wie in Tabelle 6 gezeigt, besitzt *C. glutamicum* EB1(pEC6gdh) eine deutlich niedrigere spezifische GOGAT-Aktivität (0.005 U/mg Protein) als der Elternstamm *C. glutamicum* EB1. Die bestimmte spezifische GOGAT-Aktivität ist mit der des Wildtyps vergleichbar. Die erhöhte spezifische GOGAT-Aktivität in der GDH-defekten Mutante *C. glutamicum* EB1 ist somit auf die fehlende GDH-Aktivität in diesem Stamm zurückzuführen.

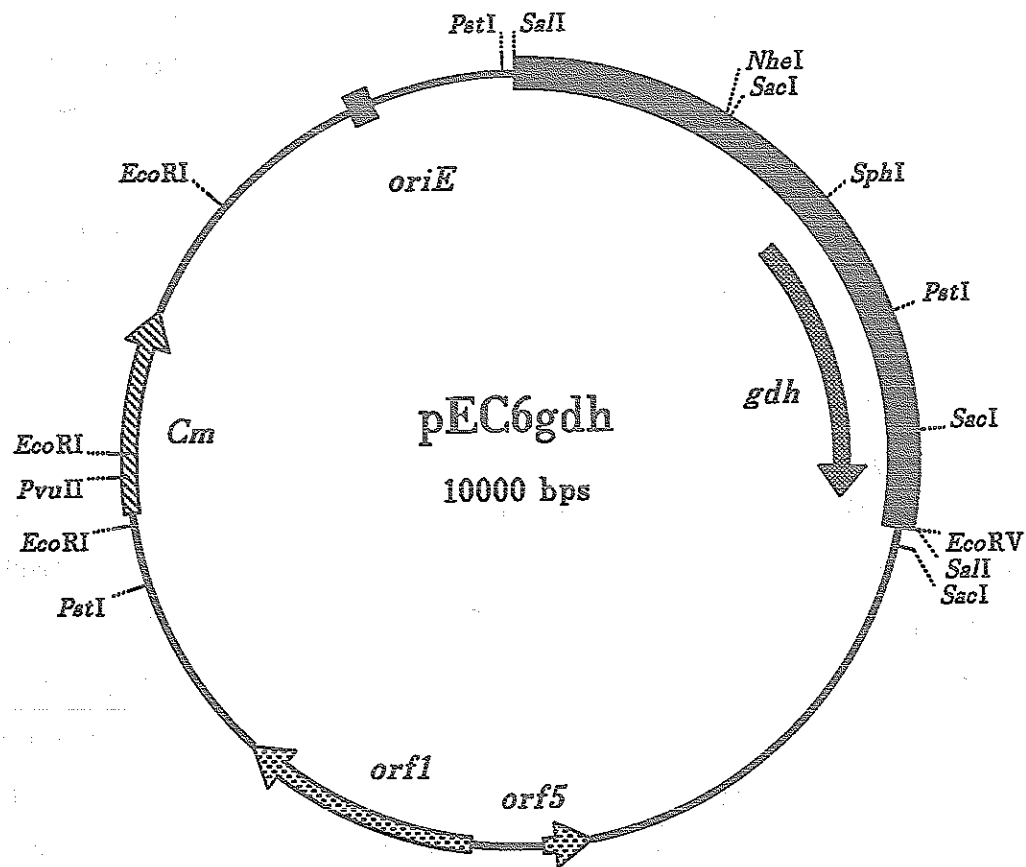


Abb. 16: Restriktionskarte des Vektors pEC6gdh. Abkürzungen: *Cm*, Choramphenicolresistenz; *gdh*, Glutamat-Dehydrogenase-Gen; *oriE*, Replikationsursprung für *E. coli*; *orf1*, *orf5*, offene Leseraster 1 und 5, Replikationsursprung für *C. glutamicum*.

3. Klonierung des *gdh*-Gens von *Peptostreptococcus asaccharolyticus* in *C. glutamicum* und Auswirkungen auf die Glutamatbildung

Um zu prüfen, ob möglicherweise eine NAD-abhängige statt einer NADP-abhängigen GDH Einfluß auf den internen Glutamat-Pool und die Glutamat-Produktion von *C. glutamicum* hat, wurde ein *gdh*-Gen, das für eine NAD-abhängige GDH kodiert in *C. glutamicum* heterolog exprimiert und die Auswirkungen auf die interne Glutamat-Konzentration und die Glutamat-Produktion untersucht.

3.1 Klonierung des *gdh*-Gens von *Peptostreptococcus asaccharolyticus*

Zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Experimente war *Peptostreptococcus asaccharolyticus* das einzige bekannte Gram-positive Bakterium, das anstelle einer NADP-abhängigen GDH eine NAD-abhängige GDH besitzt. In diesem Organismus fungiert die GDH hauptsächlich als kataboles Enzym und katalysiert den Abbau von Glutamat. Von Snedecor et al. (1991) wurde jedoch gezeigt, daß die NAD-abhängige GDH auch die Synthese von Glutamat katalysieren und damit als anaboles Enzym fungieren kann. Das *gdh*-Gen, das für diese NAD-abhängige GDH kodiert, hat eine Größe von 1.4 kb. Es wurde aus *P. asaccharolyticus* isoliert und sequenziert (Snedecor et al., 1991). Ein Ziel dieser Arbeit bestand darin, einen *C. glutamicum* Stamm zu konstruieren, der eine regulierbare NAD-abhängige GDH besitzt, um damit letztendlich auch den Einfluß einer NAD-abhängigen GDH auf die Glutamatbildung von *C. glutamicum* untersuchen zu können. Da die DNA-Sequenz des *P. asaccharolyticus* *gdh*-Gens bekannt war (Snedecor et al., 1991), wurde dieses als promotorloses Gen aus dem Chromosom von *P. asaccharolyticus* mit Hilfe der "Polymerase-Kettenreaktion" (PCR) amplifiziert. Als Primer für die PCR wurden zwei Oligonukleotide synthetisiert, die zu jeweils einem der beiden *gdh*-tragenden DNA-Stränge komplementär sind und das *gdh*-Gen flankieren. Der Primer Pgdh1 besteht aus 28 Nukleotiden und ist komplementär zu der *gdh*-Sequenz, die 34 bp in 5'-Richtung vor dem ATG-Startcodon der Translation liegt. Der Primer Pgdh2 besteht aus 29 Nukleotiden und ist komplementär zu der DNA-Sequenz 163 bp 3' hinter dem TAA-Stopcodon der Translation, d.h. hinter dem *gdh*-Strukturgen. An das 5'-Ende des Primers Pgdh1 wurde die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Bam*HI, und an den Primer Pgdh2 die

Erkennungsstelle für *SacI* angefügt, um das PCR-Produkt später gerichtet in den Expressionspendelvektor pEKEX2 klonieren zu können. Chromosomale DNA wurde aus *P. asaccharolyticus* isoliert und als Matritze neben den Primern in die PCR-Reaktion eingesetzt. Nach Beendigung der Kettenreaktion wurde das PCR-Produkt aufgereinigt und auf einem Agarosegel nachgewiesen. Anschließend wurde das 1.4 kb große PCR-Produkt mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Sac*I geschnitten und gerichtet in den ebenfalls mit *Bam*HI und *Sac*I geschnittenen *E. coli*/*C. glutamicum* Expressionspendelvektor pEKEX2 hinter den durch IPTG induzierbaren *tac*-Promotor kloniert. *E. coli* DH5 wurde mit dem rekombinanten Plasmid pEKEXpgdh (Abbildung 17) transformiert. Aus 10 Transformanten wurde anschließend die Plasmid-DNA isoliert und durch Restriktionsanalyse mit *Mlu*I konnte das PCR-Produkt im Vektor pEKEXpgdh nachgewiesen werden. Da bei einer weiteren Restriktionsanalyse auch von der DNA-Sequenz des *P. asaccharolyticus* *gdh*-Gens abgeleiteten Restriktionsschnittstellen für *Eco*RI und *Sph*I nachgewiesen wurden, konnte davon ausgegangen werden, daß tatsächlich das *gdh*-Gen aus dem Genom von *P. asaccharolyticus* amplifiziert worden war. Als weiteren Nachweis, daß ein funktionelles *gdh*-Gen amplifiziert worden war, wurden die spezifischen NAD-abhängigen GDH-Aktivitäten im Rohextrakt des rekombinanten Stammes *E. coli*(pEKEXpgdh) vor und nach Zugabe von 1 mM IPTG bestimmt. Wie in Tabelle 7 gezeigt ist, verfügt der rekombinante Stamm *E. coli*(pEKEXpgdh), sowohl ohne als auch mit IPTG im Wachstumsmedium, über eine deutlich höhere spezifische GDH-Aktivität als der Wildtyp.

Tabelle 7: Spezifische NAD-abhängige Glutamat-Dehydrogenase Aktivitäten in zell-freien Extrakten von *E. coli* DH5 und *E. coli*(pEKEXpgdh). Die Zellen wurden auf Komplexmedium mit 50 µg/l Kanamycin gezüchtet und nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase wurde 1 mM IPTG dem Wachstumsmedium zugesetzt und die Zellen 1 Stunde inkubiert.

Stamm	IPTG	spez. GDH-Aktivität (U/mg Protein)
<i>E. coli</i> DH5	–	0.05
<i>E. coli</i> (pEKEXpgdh)	–	1.12
<i>E. coli</i> (pEKEXpgdh)	+	5.4

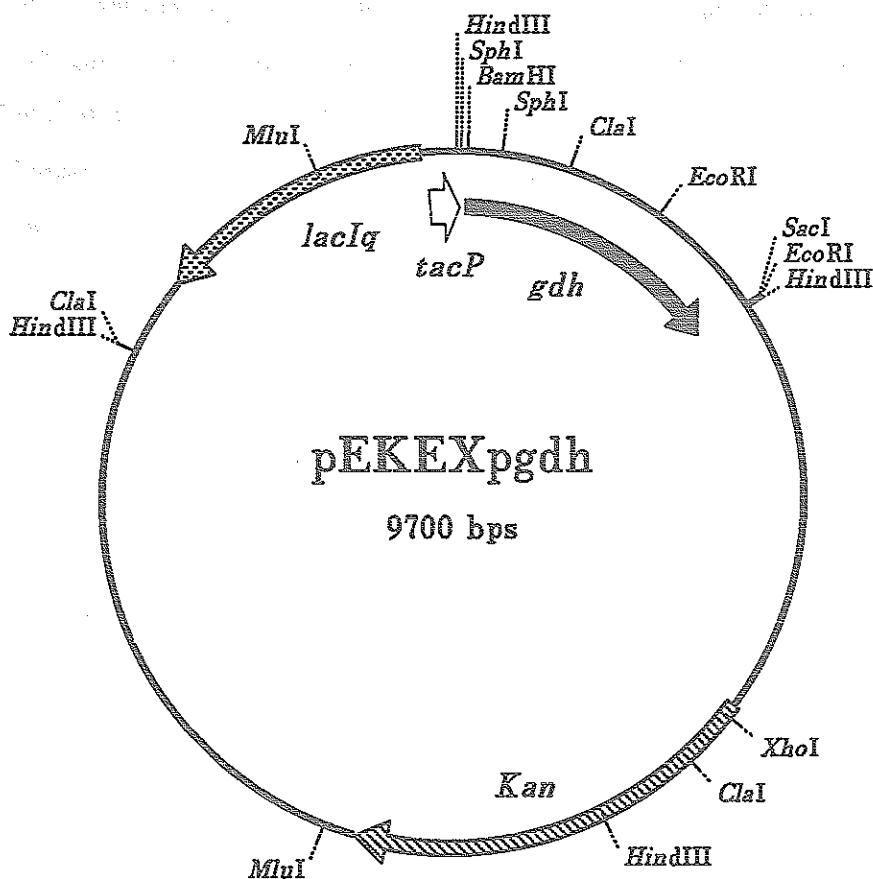


Abb. 17: Restriktionskarte des Vektors pEKEXpgdh. Abkürzungen: *gdh*, Glutamat-Dehydrogenase-Gen aus *P. asaccharolyticus*; *Km*, Kanamycinresistenz; *lacIq*, Gen für den konstitutiv exprimierten Repressor des Lactose-Operons von *E. coli*; *tacP*, Tac-Promotor;

3.2 Heterologe Expression des *gdh*-Gens von *P. asaccharolyticus* in *C. glutamicum*

Um das *gdh*-Gen von *P. asaccharolyticus*, das für die NAD-abhängige GDH kodiert, auch in *C. glutamicum* heterolog zu exprimieren, wurde das Plasmid pEKEXpgdh mittels Elektroporation nach *C. glutamicum* 13032 transferiert. Zum Nachweis, daß das *gdh*-Gen von *P. asaccharolyticus* in *C. glutamicum* exprimiert wird, wurde die spezifische Aktivität der NAD-abhängigen GDH im Rohextrakt von *C. glutamicum*(pEKEXpgdh) ebenfalls vor und nach Zugabe von 1 mM IPTG bestimmt. Zur Kontrolle wurde auch die spezifische GDH-Aktivität des Wildtyps *C. glutamicum* 13032 mit NAD als Coenzym bestimmt. Das Ergebnis dieses Enzymtests ist in Tabelle 8 dargestellt. *C. glutamicum*(pEKEXpgdh) zeigt

eine im Vergleich zum Wildtyp *C. glutamicum* 13032 (0.01 U/mg Protein) deutlich erhöhte NAD-abhängige spezifische GDH-Aktivität. Ohne IPTG-Zugabe besitzt *C. glutamicum*(pEKEXpgdh) eine spezifische GDH-Aktivität von 0.96 U/ mg Protein. Nach 1-stündiger Inkubation mit 1 mM IPTG verfügt dieser Stamm über eine 6-fach höhere spezifische GDH-Aktivität von 6.68 U/mg Protein. Die bestimmten Enzymaktivitäten belegen somit eindeutig, daß das *gdh*-Gen von *P. asaccharolyticus* in *C. glutamicum* heterolog exprimiert wird und die Expression durch IPTG-Zugabe reguliert werden kann. Die Expression des *gdh*-Gens in Abwesenheit von IPTG im Wachstumsmedium deutet darauf hin, daß sich auf dem amplifizierten DNA-Fragment entweder der eigene Promotor oder aber eine Sequenz befindet, die von der *C. glutamicum* RNA-Polymerase als Promotor erkannt wird.

Tabelle 8: Spezifische NAD-abhängige Glutamat-Dehydrogenase-Aktivitäten in zell-freien Extrakten von *C. glutamicum* 13032 und *C. glutamicum*(pEKEXpgdh). Die Zellen wurden auf Komplexmedium mit 50 µg/ml Kanamycin gezüchtet und nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase wurden die Kulturen aufgeteilt, einem Teil des Mediums wurde 1 mM IPTG hinzugesetzt und die Zellen 1 h damit inkubiert.

Stamm	IPTG	spez. GDH-Aktivitäten (U/mg Protein)
<i>C. glutamicum</i> 13032	–	0.01
<i>C. glutamicum</i> (pEKEXpgdh)	–	0.96
<i>C. glutamicum</i> (pEKEXpgdh)	+	6.68

3.3 Untersuchungen zum Einfluß einer NAD-abhängigen GDH auf die Glutamatbildung von *C. glutamicum*

Mit *C. glutamicum*(pEKEXpgdh) konnte nun der Einfluß einer NAD-abhängigen GDH auf den internen Glutamat-Pool und die Glutamatbildung untersucht werden. Zunächst wurden vergleichende Messungen der zell-internen Glutamatkonzentrationen mit dem Wildtyp *C. glutamicum* 13032 und *C. glutamicum*(pEKEXpgdh) unter Biotin-supplementierten Wachstumsbedingungen durchgeführt. Dazu wurden die beiden Stämme auf MM mit 4 % Glucose und 200 µg/l Biotin vorgezüchtet und die Hauptkulturen mit OD₆₀₀ von 0.3

angeimpft. Das Wachstum der Stämme wurde verfolgt und nach 6.5 h, d.h. zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase wurde dem Stamm *C. glutamicum*(pEKEXpgdh) 1 mM IPTG hinzugefügt, um die Expression des *gdh*-Gens zu induzieren. Um eventuelle Wachstumsnachteile des Stammes *C. glutamicum*(pEKEXpgdh) durch die IPTG Zugabe gegenüber dem Wildtyp auszugleichen, wurde bei diesem Ansatz auch in das Medium des Wildtyps *C. glutamicum* 13032 1 mM IPTG zugegeben. Zu bestimmten Zeiten wurden Proben genommen und die zell-internen und externen Glutamatkonzentrationen bestimmt. In der *lag*-Phase, vor Zugabe von IPTG und in der exponentiellen Wachstumsphase nach Zugabe von IPTG sind die internen Glutamatkonzentrationen von *C. glutamicum*(pEKEXpgdh) mit 330 mM und *C. glutamicum* 13032 mit 310 mM vergleichbar. Beide Stämme sezernieren unter Biotin-Überschuß im Medium kein Glutamat.

Weiterhin wurde der Einfluß der NAD-abhängigen GDH auf die Glutamatproduktion von *C. glutamicum* untersucht. Dazu wurden vergleichende Messungen der internen und externen Glutamatkonzentrationen unter "Glutamatproduktionsbedingungen", d.h. unter Biotin-Limitierung der Zellen durchgeführt. Für diese Experimente wurden wiederum der Wildtyp *C. glutamicum* 13032 und *C. glutamicum*(pEKEXpgdh) herangezogen. Vorkulturen beider Stämme wurden auf MM mit 4 % Glucose und 10 µg/ml Biotin gezüchtet. Mit diesen Kulturen wurden dann die Hauptkulturen auf MM mit 4 % Glucose und 1 µg/ml Biotin angeimpft. Beide Kulturen wurden mit einer OD₆₀₀ von 0.3 angeimpft und das Wachstum der Stämme bis in die stationäre Phase verfolgt. In der exponentiellen Wachstumsphase bei OD₆₀₀ von 2.0 wurde 1 mM IPTG zu den Kulturen gegeben und zu bestimmten Zeitpunkten wurden Proben zur Bestimmung der zell-internen und externen Glutamatkonzentrationen genommen. In Abbildung 18 ist das Ergebnis dieser Messungen dargestellt. Beide Stämme erreichten bei einer OD₆₀₀ von 8.0 die stationäre Phase und begannen mit der Sekretion von Glutamat. *C. glutamicum*(pEKEXpgdh) sezernierte in den ersten 10 Stunden der Glutamatproduktion mit einer Rate von 20 µmol/min*g TG Glutamat in das umgebende Medium. Diese Rate war mit der des Wildtyps *C. glutamicum* 13032 (19 µmol/min*g TG) vergleichbar. Bei beiden Stämmen war die interne Glutamatkonzentration unter Biotin-limitierten Wachstumsbedingungen niedriger als unter Biotin-supplementierten Wachstumsbedingungen. Während der exponentiellen Wachstumsphase besaßen beide Stämme eine vergleichbare interne Glutamatkonzentration von ca. 200 mM Glutamat.

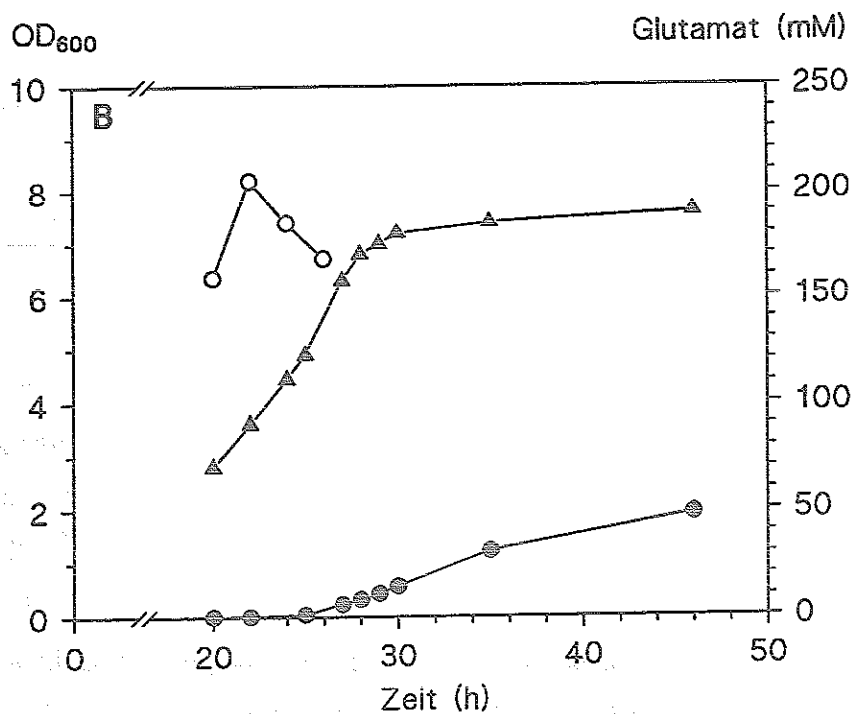
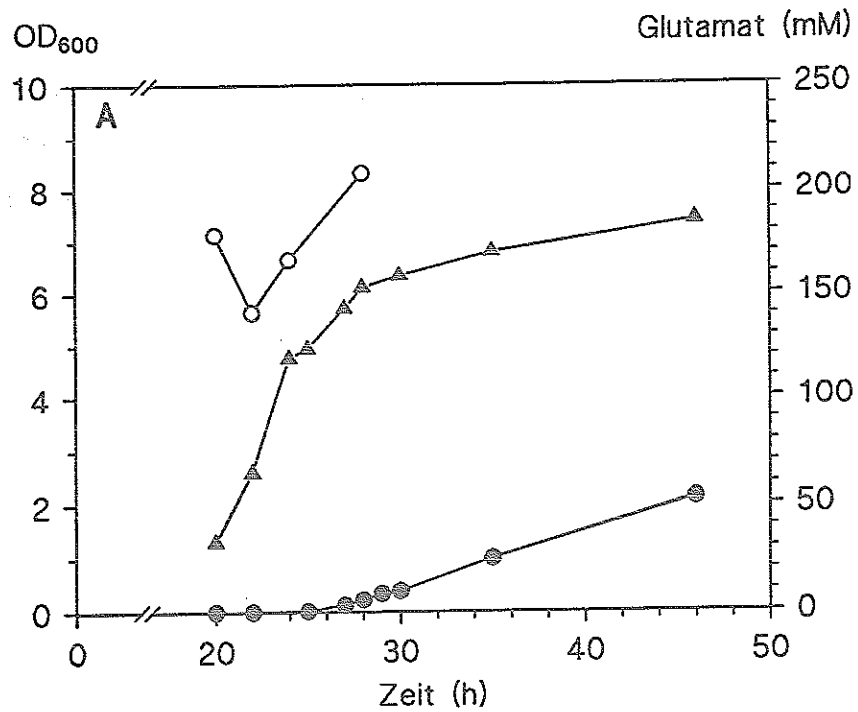


Abb. 18: Vergleich der Glutamat-Bildung bei *C. glutamicum* 13032 (A) und *C. glutamicum*(pEKEXpgdh) (B). Während des Wachstums (▲) auf Biotin-limitiertem MM mit 4 % Glucose wurden die internen (○) und externen (●) Glutamatkonzentrationen bestimmt. Nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase wurde dem Medium beider Stämme 1 mM IPTG hinzugefügt und die Zellen damit inkubiert.

3.4 Kurz-Zeit-Fermentationen mit *C. glutamicum*(pEKEXpgdh)

Um den Einfluß einer NAD-abhängigen GDH auf die Glutamatproduktion von *C. glutamicum* zu untersuchen, wurden auch vergleichende Kurz-Zeit-Fermentationen mit dem Wildtyp *C. glutamicum* 13032 und *C. glutamicum*(pEKEXpgdh) durchgeführt. Dazu wurden die Stämme auf MM mit 4 % Glucose und 10 µg/l Biotin vorgezchtet und die Zellen anschließend als Inokulum für die Hauptkulturen auf Minimalmedium mit 4 % Glucose und 1 µg/l Biotin verwendet. Nach 20 h wurde beiden Kulturen jeweils 1 mM IPTG hinzugefügt. Nach 24 h hatten beide Stämme bei einer OD₆₀₀ von 6.5 bis 7.0 die stationäre Phase erreicht und begannen mit der Sekretion von Glutamat. In dieser Phase sezernierten beide Stämme Glutamat mit einer identischen Rate von 20 µmol/min*g TG. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen geerntet und für die eigentlichen Kurz-Zeit-Fermentation verwendet. Die Zellen wurden in MM ohne Biotin resuspendiert und eine OD₆₀₀ von 4.0 eingestellt. Nach Zugabe von 10 mM Glucose und 1 mM IPTG wurden über einen Zeitraum von 2 h Proben zur Bestimmung des Glucoseverbrauchs und der externen Glutamatkonzentration genommen. *C. glutamicum* 13032 nimmt mit einer Rate von 40 µmol/min*g TG Glucose aus dem umgebenden Medium auf, sezerniert Glutamat mit einer Rate von 20 µmol/min*g TG und setzt während dieser Zeit 56 % der aufgenommenen Glucose zu Glutamat um. *C. glutamicum*(pEKEXpgdh) nimmt mit einer Rate von 24 µmol/min*g TG Glucose aus dem umgebenden Medium auf, sezerniert während dieser Kurz-Zeit-Fermentation mit einer Rate von 12 µmol/min*g TG Glutamat und setzt somit 52 % der aufgenommenen Glucose zu Glutamat um. Bei den vorangegangenen Glutamatproduktionsexperimenten unter Biotin-limitierten Wachstumsbedingungen sezernierten beide Stämme mit vergleichbarer Rate Glutamat in das umgebende Medium. Warum *C. glutamicum*(pEKEXpgdh) bei den Glutamat-Kurz-Zeit-Fermentationen wiederholt mit geringerer Rate als der Wildtyp Glucose verbrauchte und Glutamat sezernierte, bleibt ungeklärt.

4. Untersuchungen zur Glutamat-Synthase von *Corynebacterium glutamicum*

Aus den vorangegangenen Experimenten konnte geschlossen werden, daß die GOGAT die GDH in ihrer Funktion ersetzen kann und somit eine wichtige Bedeutung für den Glutamatstoffwechsel von *C. glutamicum* hat. Daher wurde dieses Enzym charakterisiert und die Regulation der GOGAT auf genetischer Ebene untersucht. Diese Experimente wurden hauptsächlich mit der GDH-defekten Mutante *C. glutamicum* EB1 durchgeführt, da diese über eine 10-fach-höhere spezifische GOGAT-Aktivität als der Wildtyp verfügt und zudem die GDH-Reaktion als störende Blindreaktion im GOGAT-Aktivitätstest nicht vorhanden ist. Die wichtigsten Messungen wurden jeweils mit dem Wildtyp *C. glutamicum* 13032 wiederholt.

4.1 Kinetische Untersuchungen zur Glutamat-Synthase von *C. glutamicum*

Die GOGAT ist eine Amidotransferase, die die Bildung von Glutamat ausgehend von den Substraten Glutamin, α -Ketoglutarat und NAD(P)H katalysiert. Die GOGAT von *C. glutamicum* katalysiert die Aminierungsreaktion nur in Gegenwart von NADPH. Wird NADH als Coenzym anstelle von NADPH in die Reaktion eingesetzt, ist keine Aktivität meßbar. Weiterhin ist die GOGAT-katalysierte Reaktion *in-vitro* nicht reversibel, da bei Testansätzen mit 100 mM Glutamat und entweder NADP oder NAD als Coenzym und verschiedenen pH-Werten von 7.2 bis 9.2 keine GOGAT-Aktivität im Rohextrakt von *C. glutamicum* bestimmt werden konnte. Zur Bestimmung des pH-Optimums wurden verschiedene Testansätze mit 100 mM Tris/HCl-Puffer unterschiedlicher pH-Werte zwischen pH 6.5 und 9.0 gewählt und die spezifischen GOGAT-Aktivitäten im Rohextrakt bestimmt (Abbildung 19) Das pH-Optimum der Aminierungsreaktion der GOGAT von *C. glutamicum* liegt bei pH 7.2.

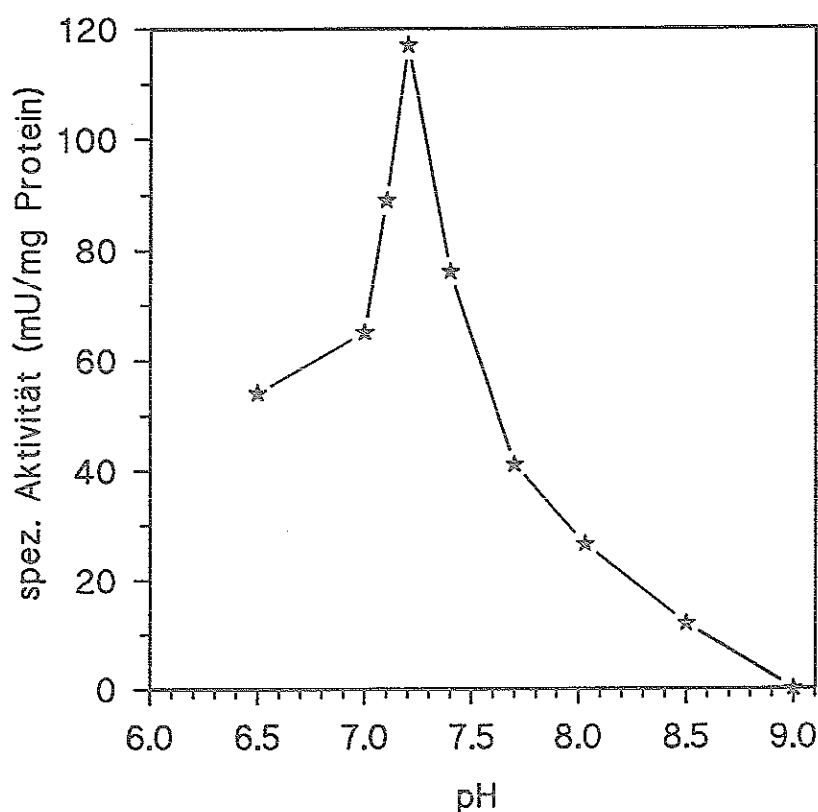


Abb. 19: Bestimmung des pH-Optimums der Glutamat-Synthase von *C. glutamicum*.

Anschließend wurden die apparenten K_m - Werte der GOGAT für ihre Substrate α -Ketoglutarat, Glutamin und NADPH bestimmt. Dazu wurden verschiedene Testansätze mit 100 mM Tris/HCl pH 7.2 gewählt. Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von jeweils einem Substrat, dessen Konzentration im Testansatz variierte, wurde ermittelt, während die Konzentrationen der anderen beiden Substrate im Sättigungsbereich des Enzyms lagen und konstant gehalten wurden. Die apparenten K_m -Werte konnten aus einem Lineweaver-Burk-Diagramm ermittelt werden. Die GOGAT von *C. glutamicum* besitzt einen apparenten K_m -Wert von 100 μ M für α -Ketoglutarat, von 310 μ M für Glutamin und von 56 μ M für NADPH. Als Effektoren der GOGAT von *E. coli* wurden L-Glutamat, L-Aspartat und L-Methionin (Miller und Stadtman, 1972) und als Inhibitor der GOGAT von *Corynebacterium callunae* wurde ATP beschrieben (Ertan, 1992a). Daher wurde der Einfluß dieser Effektoren auf die spezifische GOGAT-Aktivität in *C. glutamicum* untersucht. L-Glutamat wurde in steigenden Konzentrationen von 10 - 400 mM, und

L-Aspartat, L-Methionin und ATP wurden in Konzentrationen zwischen 1 mM und 10 mM im Testansatz auf ihren Einfluß auf die spezifische GOGAT-Aktivität untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefaßt. Die GOGAT von *C. glutamicum* wird durch Glutamat als Endprodukt des Syntheseweges nicht Feedback gehemmt. Mit einer physiologischen Glutamat-Konzentrationen von 100 mM im Testansatz war sogar ein Anstieg der spezifischen GOGAT-Aktivität im Rohextrakt von *C. glutamicum* EB1 um 57 % (140 mU/mg Protein) im Vergleich zu dem Ansatz ohne Glutamat (89 mU/mg Protein) zu beobachten. Ein ähnlicher Anstieg der spezifischen GOGAT-Aktivität war bei Anwesenheit von 1 mM L-Aspartat oder 10 mM L-Methionin zu beobachten. Auch ATP in Konzentrationen zwischen 1 bis 10 mM im Testansatz hat keine oder nur eine sehr geringe Hemmung der GOGAT von *C. glutamicum* zur Folge.

Tabelle 9: Effektoren der Glutamat-Synthase von *C. glutamicum*.

Effektor	Konzentration (mM)	spez. GOGAT-Aktivität (mU/mg Protein)	Aktivität (%)
ohne	0	89	100
L-Glutamat	10	121	136
	100	140	157
	200	130	146
	300	113	127
	400	87	97
L-Aspartat	1	122	137
	5	119	133
	10	106	119
L-Methionin	1	109	122
	5	114	128
	10	125	140
ATP	1	89	100
	5	75	87
	10	75	87

4.2 Untersuchungen zur Regulation der Glutamat-Synthase von *C. glutamicum*

Weiterhin wurde auch die Regulation der GOGAT durch Komponenten des Wachstumsmediums untersucht. Für diese Untersuchungen wurden *C. glutamicum* 13032 und *C. glutamicum* EB1 auf MM mit 4 % Glucose als C-Quelle und verschiedenen Ammoniumsulfat- und Harnstoff-Konzentrationen als N-Quelle, auf MM mit 2 % Glutamat als alleiniger C- und N-Quelle, auf MM mit 2 % Glutamat als C-Quelle und verschiedenen Ammonium- und Harnstoffkonzentrationen als N-Quelle, auf MM mit 4 % Glucose als C-Quelle und 2 % Glutamat als N-Quelle, sowie auf Komplexmedium mit und ohne 2 % Glucose gezüchtet und die spezifischen GOGAT-Aktivitäten im zell-freien Extrakt bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengefaßt. Auf dem üblicherweise für *C. glutamicum* verwendeten MM mit 4 % Glucose als C-Quelle und jeweils 5 g/l Ammoniumsulfat und Harnstoff als N-Quelle besitzt der Wildtyp *C. glutamicum* 13032 eine spezifische GOGAT-Aktivität von 8 mU/mg Protein, während die GDH-defekte Mutante *C. glutamicum* EB1 auf demselben Medium über eine 10-fach höhere spezifische GOGAT-Aktivität von 89 mU/mg Protein verfügt. Bei einer erhöhten Ammoniumkonzentration von 20 g/l Ammoniumsulfat und 10 g/l Harnstoff als N-Quelle im Medium und 4 % Glucose als C-Quelle, nimmt die spezifische GOGAT-Aktivität von *C. glutamicum* drastisch ab. Der Stamm *C. glutamicum* EB1, der auf diesem Medium nur noch sehr schlecht wuchs, besaß eine spezifische GOGAT-Aktivität von 2 mU/mg Protein.

Bei Wachstum von *C. glutamicum* 13032 und *C. glutamicum* EB1 auf MM mit Glutamat als alleiniger C- und N-Quelle war nur noch eine spezifische GOGAT-Aktivität von 3-5 mU/mg Protein nachweisbar und in *C. glutamicum* EB1 konnte bei Wachstum auf MM mit Glutamat als C-Quelle und unterschiedlichen Ammoniumkonzentrationen als N-Quelle nur eine sehr geringe spezifische GOGAT-Aktivität von 1 - 2 mU/mg Protein nachgewiesen werden. Da jedoch die spezifische GOGAT-Aktivität von *C. glutamicum* EB1 bei Wachstum auf MM mit Glucose und Glutamat (75 mU/mg Protein) sich nur geringfügig von der spezifischen GOGAT-Aktivität dieses Stammes bei Wachstum auf MM mit Glucose und jeweils 5 g/l Ammoniumsulfat/Harnstoff unterschied, konnte damit ein regulatorischer Einfluß von Glutamat auf die spezifische GOGAT-Aktivität von *C. glutamicum* ausgeschlossen werden.

Tabelle 10: Untersuchungen zur Regulation der Glutamat-Synthase von *Corynebacterium glutamicum* nach Wachstum auf Minimalmedium (MM) mit unterschiedlichen C- und N-Quellen und auf Komplexmedium (KM) mit und ohne Glucose.

Stamm	Medium	C-Quelle	N-Quelle	spez. Aktivität (mU/mg Protein)
<i>C. glut.</i> 13032	MM	Glucose	5 g/l NH_4^+ 5 g/l Urea	8
<i>C. glut.</i> EB1	MM	Glucose	5 g/l NH_4^+ 5 g/l Urea	89
<i>C. glut.</i> EB1	MM	Glucose	20 g/l NH_4^+ 10 g/l Urea	2
<i>C. glut.</i> 13032	MM	Glutamat	Glutamat	3
<i>C. glut.</i> EB1	MM	Glutamat	Glutamat	5
<i>C. glut.</i> EB1	MM	Glutamat	5 g/l NH_4^+ 5 g/l Urea	2
<i>C. glut.</i> EB1	MM	Glutamat	10 g/l NH_4^+ 3 g/l Urea	1
<i>C. glut.</i> EB1	MM	Glutamat	20 g/l NH_4^+ 10 g/l Urea	1
<i>C. glut.</i> EB1	MM	Glucose	Glutamat	75
<i>C. glut.</i> 13032	KM	Glucose	---	15
<i>C. glut.</i> 13032	KM	---	---	2
<i>C. glut.</i> EB1	KM	Glucose	---	32
<i>C. glut.</i> EB1	KM	---	---	5

Bei vergleichenden Messungen der spezifischen GOGAT-Aktivität von *C. glutamicum* 13032 und *C. glutamicum* EB1 nach Wachstum auf Komplexmedium (KM) mit und ohne Glucose hingegen, war ein deutlicher Unterschied der spezifischen GOGAT-Aktivitäten zu beobachten. Bei Wachstum auf KM mit Glucose war die spezifische GOGAT-Aktivität beider Stämme mit 15 mU/mg Protein bzw. 32 mU/mg Protein 7-fach höher als bei Wachstum auf KM ohne Glucose (2 mU/mg Protein bzw. 5 mU/mg Protein). Glucose hat also einen positiven regulatorischen Effekt auf die spezifische GOGAT-Aktivität.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Prof. Krämer wurde festgestellt, daß die GDH-defekte Mutante *C. glutamicum* EB1 kein Glutamat mehr in das umgebende Medium sezerniert, wenn sie unter Wachstumsbedingungen gezüchtet wurde, unter denen sie keine nachweisbare spezifische GOGAT-Aktivität besitzt.

5. Versuche zur Isolierung der *gltBD*-Gene von *C. glutamicum*, die für die Glutamat-Synthase kodieren

Da die GOGAT offensichtlich eine wichtige Position im Glutamatstoffwechsel von *C. glutamicum* einnimmt, lag es nahe, neben der biochemischen Charakterisierung und den Untersuchungen zur Regulation der GOGAT auf genetischer Ebene, auch die Gene für die GOGAT zu isolieren. Die Glutamat-Synthase setzt sich aus zwei verschiedenen Untereinheiten (UE) zusammen. Das *gltB*-Gen kodiert für die große, das *gltD*-Gen für die kleine UE der GOGAT. Alle bislang bekannten *gltBD*-Gene sind zusammen mit dem *gltF*-Gen, das für ein Regulatorprotein des *ntr*-Systems kodiert, in einem Operon organisiert.

5.1 Aufbau einer chromosomalen Cosmidgenbank von *C. glutamicum* EB1

Bei der vorangegangenen Isolierung des *gdh*-Gens aus *C. glutamicum* wurde durch heterologe Komplementation einer Glutamat-auxotrophen *E. coli* Mutante PA340 (*gdh*⁻, *gltB31*) ausschließlich Komplementanten erhalten, die das *gdh*-Gen auf dem Cosmid trugen (Börmann, 1990). Um zu vermeiden, daß bei einer erneuten heterologen Komplementation wiederum ausschließlich das *gdh*-Genprodukt die Glutamat-Auxotrophie

von *E. coli* PA340 komplementiert, wurde eine neue Genbank aus chromosomaler DNA der GDH-defekten Mutante *C. glutamicum* EB1 (*gdh::pSUPgdh*) erstellt. Zum Aufbau dieser Genbank wurde chromosomale DNA von *C. glutamicum* EB1 partiell *Sau3A* geschnitten und die 30 - 40 kb Fragmente in die *Bam*HI-Schnittstelle des Cosmids pHC79 ligiert, anschließend in die Proteinhülle des Phagen λ verpackt und *E. coli* DH5 damit infiziert. Von 3580 erhaltenen Transformanten wurden 3300 auf LB-Agarplatten mit 50 μ g/ml Ampicillin gepickt. 100 Transformanten wurden zusätzlich auf LB-Agarplatten mit 20 μ g/ml Tetracyclin getestet. Daß alle getesteten Klone Tetracyclin-sensitiv waren, bedeutete, daß sie eine Insertion in der *Bam*HI-Schnittstelle des Cosmids pHC79 trugen und dadurch das Gen für die Tetracyclinresistenz unterbrochen war. Anschließend wurde aus 20 Klonen die Plasmid-DNA isoliert und analysiert. Alle durch Restriktionsanalyse mit *Bam*HI getesteten Klone enthielten insertierte chromosomale DNA-Fragmente mit einer durchschnittlichen Größe von 33 kb. Es konnte daher davon ausgegangen werden, daß in dieser Cosmidgenbank das Chromosom von *C. glutamicum* EB1 zu 99 % repräsentiert ist. Um zu überprüfen, ob in der chromosomalen Cosmidgenbank nur das inaktivierte und nicht das intakte *gdh*-Gen von *C. glutamicum* vorhanden war, wurde eine Southern Blot-Analyse zur Kontrolle der verschiedenen Cosmidgemische der Genbank durchgeführt. 2 μ g Cosmid-DNA von 8 Cosmidgemischen und zur Kontrolle 5 μ g chromosomale DNA des Wildtyps *C. glutamicum* 13032 wurde mit *Sac*I restringiert. Die DNA-Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und gegen eine Digoxigenin-dUTP-markierte 1.5 kb *Sac*I-Sonde aus dem kodierenden Bereich des *gdh*-Gens von *C. glutamicum* hybridisiert. Das Ergebnis ist in **Abbildung 20** gezeigt. Wie zu erwarten, trat bei der Hybridisierung der 1.5 kb *gdh*-Sonde gegen die chromosomale DNA von *C. glutamicum* 13032 eine Bande bei 1.5 kb auf. Bei 2 von 8 getesteten Cosmidgemischen gab es nach der Hybridisierung kein Signal, aber bei 6 der 8 getesteten Cosmidgemische war eine Bande bei 7.4 kb zu beobachten. Bei dieser Hybridisierung waren neben der 7.4 kb Bande auch größere Banden zu beobachten, die wahrscheinlich auf eine unvollständige Restriktion der Cosmid-DNA mit *Sac*I zurückzuführen sind. Diese Southern Blot-Analyse belegt eindeutig, daß das *gdh*-Gen in der chromosomalen Cosmidgenbank weiterhin durch Integration des Vektors pSUPgdh unterbrochen ist.

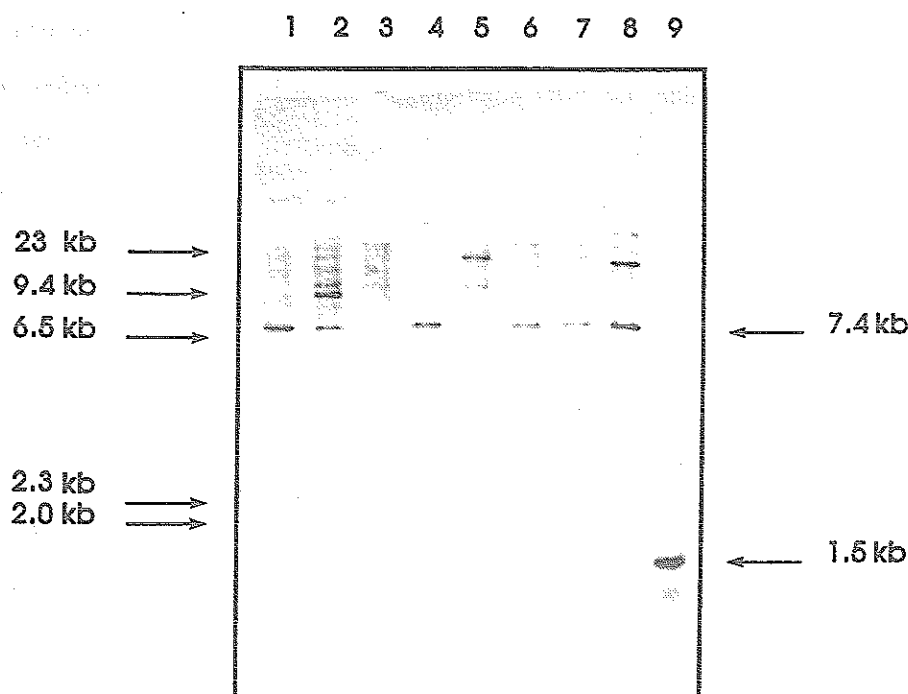


Abb. 20: Southern Blot-Analyse der DNA der rekombinanten pH79-Cosmidgemische der chromosomalen Cosmidgenbank von *C. glutamicum* EB1. DNA von 8 verschiedenen Cosmidgemischen (Spur 1-8), sowie chromosomale DNA von *C. glutamicum* 13032 (Spur 9) wurde mit *SacI* geschnitten und gegen eine 1.5 kb Digoxigenin-markierte *SacI*-Sonde, die aus pUC4.5gdh isoliert worden war, hybridisiert.

5.2 Komplementation von *E. coli* PA340 mit der chromosomalen Cosmidgenbank von *C. glutamicum* EB1

Die Glutamat-auxotrophe Mutante *E. coli* PA340 wurde mit der DNA der Genbank transformiert und die Transformanden zunächst auf Komplexmedium mit 50 µg/ml Ampicillin selektioniert. Es wurden insgesamt 70.000 Transformanden erhalten (Transformationseffizienz $1.2 \cdot 10^4/\mu\text{g DNA}$). Da die verwendete *E. coli* Mutante Glutamat-auxotroph ist und somit nicht auf M9-Minimalmedium ohne Glutamatsupplementation wachsen kann, wurden die Transformanden zur weiteren Selektionierung mittels Replikaplattierung auf M9-Agarplatten ohne Glutamat transferiert und das Wachstum von Kolonien nach 48 h kontrolliert. *E. coli* PA340-Transformanden,

die die Gene für die GOGAT auf dem Cosmid pH79 tragen, können Glutamat bilden und sollten daher in der Lage sein, auf Minimalmedium ohne Glutamat-Zusatz zu wachsen. 69 von 70.000 Transformanten konnten auch nach wiederholtem Überimpfen auf M9-Agarplatten ohne Glutamat wachsen. 20 dieser Komplementanten wurden anschließend im Enzymtest auf ihre spezifischen GOGAT- und GDH-Aktivitäten untersucht. Alle getesteten Transformanten besaßen ebenso wie der Elternstamm *E. coli* PA340 keine nachweisbare GOGAT-Aktivität, im Vergleich zu dem Glutamat-prototrophen Stamm *E. coli* DH5 (43 mU/mg Protein). Entgegen aller Erwartungen verfügten jedoch alle getesteten Transformanten über eine im Vergleich zu *E. coli* PA340 deutlich erhöhte spezifische GDH-Aktivität (0.4 - 3.4 U/mg Protein). Da bereits vorher nachgewiesen werden konnte, daß die chromosomale Cosmidgenbank von *C. glutamicum* EB1 nur das integrations-inaktivierte *gdh*-Gen von *C. glutamicum* enthielt, legten die Ergebnisse dieser Komplementationsversuche den Schluß nahe, daß in den *E. coli* PA340-Komplementanten, die das inaktivierte *gdh*-Gen auf dem Cosmid pH79 trugen, ein Rekombinationsereignis stattgefunden haben mußte. Dadurch entstand auf dem Cosmid dieser Transformanten wiederum ein intaktes *gdh*-Gen, daß dann die Glutamat-Auxotrophie der *E. coli* Mutante komplementieren konnte.

5.3 Konstruktion einer rekombinationsdefekten, Glutamat-auxotrophen *E. coli* Mutante

Um trotzdem durch heterologe Komplementation die *gliBD*-Gene aus der chromosomalen Cosmidgenbank von *C. glutamicum* EB1 zu isolieren, war es notwendig einen Glutamat-auxotrophen und gleichzeitig rekombinationsdefekten *E. coli* Stamm zu konstruieren, damit Rekombinationsereignisse während der Komplementation nicht mehr stattfinden können. Grundsätzlich ist für Rekombinationsereignisse in der Zelle das *recA*-Protein von essentieller Bedeutung. Um einen *recA*-defekten, Glutamat-auxotrophen *E. coli* Stamm zu konstruieren, wurde eine Konjugation zwischen *E. coli* GSJ403 und *E. coli* PA340 durchgeführt. *E. coli* GSJ403, der als Donor während der Konjugation fungiert, ist ein *hfr*-Stamm, bei dem nach der Konjugation besonders häufig ein Austausch von Wirtsgenen mit der transferierten DNA stattfindet. Daneben ist dieser Stamm Streptomycin-sensitiv. Diese Eigenschaft erleichtert nach der Konjugation die Trennung des Donors und Rezipienten. Desweiteren besitzt dieser Stamm die chromosomalen Marker $(srI-recA)\Delta::Tn10$, d.h. der

kodierende Bereich der Gene, die für die Enzyme der Sorbitverwertung kodieren (*srl*) und dem benachbarten Gen für das *recA*-Protein ist durch Integration des Transposons Tn10 (*Tet^R*) unterbrochen. *E. coli* PA340, der während der Konjugation als Rezipient fungiert, ist Glutamat-auxotroph, Streptomycin-resistent, nicht-rekombinationsdefekt und in der Lage Sorbit zu verwerten. Die Konjugation zwischen *E. coli* GSJ403 und *E. coli* PA340 wurde nach 80 min unterbrochen und die Konjuganden auf LB-Agarplatten mit 10 µg/ml Tetracyclin und 50 µg/ml Streptomycin selektioniert. Auf diesem Medium konnten nur die *E. coli* PA340-Konjuganden überleben, bei denen ein Austausch der Gene in der *srl-recA*-Region stattgefunden hat, da die Konjuganden nur so die Tetracyclin-Resistenz erhalten konnten. Von den insgesamt 3480 erhaltenen Konjuganden wurden 100 auf ihre Glutamat-Auxotrophie durch Selektion auf M9-Agarplatten ohne Glutamat und auf ihre Fähigkeit zur Sorbitverwertung auf McConkey-Agarplatten mit 1 % Sorbit getestet. 98 von 100 getesteten Transformanden waren Glutamat-auxotroph, und von diesen wiederum 35 nicht mehr in der Lage im Vergleich zum Ausgangsstamm *E. coli* PA340, Sorbit zu verwerten. Da die chromosomalen Marker *srl* und *recA* gekoppelt sind, war dies ein erster Hinweis darauf, daß diese Konjuganden auch rekombinationsdefekt (*recA*⁻) waren. In einem weiteren Test wurden 4 der 35 Konjuganden auf ihre UV-Sensitivität getestet. Verfügten diese Transformanden über ein inaktives *recA*-Protein, so sollten sie schon nach sehr kurzer UV-Bestrahlung nicht mehr lebensfähig sein, da das *recA*-Protein neben der Rekombination auch für die DNA-Reparatur von UV-Schäden essentiell ist. Die Konjuganden wurden zusammen mit den Ausgangstämmen *E. coli* GSJ403 und *E. coli* PA340 auf LB-Agarplatten ausgestrichen und die Stämme in Intervallen von 0 - 60 sec mit UV-Licht ($\lambda=260$ nm) bestrahlt und anschließend 24 h bei 37 °C inkubiert. Alle 4 Konjuganden waren bereits nach 15 sec UV-Bestrahlung ebenso wie der Stamm *E. coli* GSJ403 nicht mehr lebensfähig, im Vergleich zu *E. coli* PA340, der auch noch nach 60 sec UV-Bestrahlung auf LB-Medium wachsen konnte. Auch im anschließend durchgeführten Enzymtest besaßen diese Konjuganden keine nachweisbare GDH- und GOGAT-Aktivität. Die Konjuganden waren somit Glutamat-auxotroph und rekombinationsdefekt und einer von ihnen wurde *E. coli* EBE32 (*gdh*⁻, *gltB31*, *recA*⁻) genannt.

5.4 Komplementation von *E. coli* EBE32 mit der chromosomalen Cosmidgenbank von *C. glutamicum* EB1

Die DNA der chromosomalen Cosmidgenbank von *C. glutamicum* EB1 wurde dann nach *E. coli* EBE32 transferiert und die Transformanden zunächst auf LB-Agarplatten mit 50 µg/ml Ampicillin selektioniert. Anschließend wurden die 15.660 erhaltenen Klone durch Replikaplattierung auf M9-Agarplatten ohne Glutamat transferiert und auf einen Glutamat-prototrophen Phänotyp selektioniert. Eine Transformante, die auch nach wiederholtem Überimpfen auf M9-Agarplatten ohne Glutamatsupplementation wachsen konnte, wurde anschließend im Enzymtest auf ihre spezifische GOGAT- und GDH-Aktivitäten untersucht (Tabelle 11). Die Komplementante besaßen im Vergleich zu dem Glutamat-prototrophen Stamm *E. coli* DH5 (43 mU/mg Protein), ebenso wie der Elternstamm *E. coli* EBE32, keine nachweisbare spezifische GOGAT-Aktivität und keine spezifische GDH-Aktivität. Das Cosmid aus dieser Komplementante wurde isoliert und pHCGlt2 genannt. Es hatte eine Größe von ungefähr 28 kb. Um sicherzustellen, daß das isolierte Cosmid mindestens ein funktionstüchtiges Gen für die große Untereinheit der Glutamat-Synthase (*gltB*) trägt, wurde *E. coli* EBE32 erneut mit diesem Cosmid transformiert. Von dem Retransformationsansatz wurden 10 Klone auf M9-Agarplatten ohne Glutamat transferiert. Da diese Klone nach 48 h auf diesem Medium gewachsen waren, konnte daraus geschlossen werden, daß wahrscheinlich das oder die Gene für die GOGAT von *C. glutamicum* isoliert worden waren. In zukünftigen Arbeiten kann das oder können die Gene für die GOGAT durch Subklonierungsexperimente weiter eingegrenzt und charakterisiert werden.

Tabelle 11: Spezifische GDH- und GOGAT- Aktivitäten in zell-freien Extrakten von *E. coli* EBE32 und dem rekombinanten, im Komplementationstest positiven *E. coli* EBE32 Stamm und *E. coli* DH5. Die Zellen sind auf Komplexmedium mit 50 µg/ml Ampicillin gezüchtet worden.

Stamm	spezifische Enzymaktivitäten (U/mg Protein)	
	GOGAT	GDH
<i>E. coli</i> EBE32	< 0.001	<0.01
<i>E. coli</i> EBE32(pHCglt2)	< 0.002	0.01
<i>E. coli</i> DH5	0.043	0.05

IV. DISKUSSION

Bisher wurde angenommen, daß die Glutamat-Dehydrogenase (GDH) eine Schlüsselposition im Stoffwechsel des Glutamat-produzierenden Bakteriums *Corynebacterium glutamicum* einnimmt. Dennoch wurde die GDH dieses Organismus bislang kaum auf genetischer Ebene untersucht. Das Glutamat-Dehydrogenase-Gen (*gdh*) von *Corynebacterium melassecola*, einem nahe verwandten Bakterium, war zwar isoliert (Takeda et al., 1990; Leblon et al., 1990), aber weder Expressionsdaten noch Daten zur Feinstrukturanalyse dieses Gens sind bekannt. Mittlerweile sind eine Reihe anderer *gdh*-Gene aus den verschiedensten Organismen isoliert und charakterisiert worden (für einen Überblick siehe Benachenhou-Lahfa et al., 1993). Die vorliegende Arbeit beschreibt die erste molekulare Analyse der Primärstruktur des *gdh*-Gens, das für eine NADP-abhängige GDH eines Gram-positiven, Glutamat-produzierenden Bakteriums kodiert, auf DNA- und auf RNA-Ebene.

Das *gdh*-Strukturgen von *C. glutamicum* hat eine Länge von 1341 bp. Die Länge dieses Gens ist somit identisch mit der des *gdh*-Strukturgens von *Escherichia coli* (McPherson und Wootton, 1983; Valle et al., 1984) und vergleichbar mit der Länge der *gdh*-Gene der Ascomyceten *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa* und *Saccharomyces cerevisiae* von 1377 bp, 1362 bp und 1359 bp, die alle für NADP-abhängige Glutamat-Dehydrogenasen kodieren (Hawkins et al., 1989; Kinnaird und Fincham, 1983; Nagasu und Hall, 1985).

Basierend auf Untersuchungen von *E. coli*-Promotoren (Rosenberg und Court, 1979; Hawley and McClure, 1983) und Promotoren einiger Gram-positiver Bakterien (Moran et al., 1982; Graves und Rabinowitz, 1986) konnten gemeinsame DNA-Sequenz-Merkmale dieser Promotoren formuliert werden. Sie bestehen im allgemeinen aus einer "-10" Region, auch *Pribnow-Box* genannt, mit einem stark konservierten DNA-Sequenz-Motiv "5'-TATAAT-3'", das 8 - 10 bp vor dem eigentlichen Transkriptionsstart des Gens liegt (Pribnow, 1975). 15 - 18 bp von dieser "-10"-Region entfernt ist eine sogenannte "-35"-Region "5'-TTGACA-3'" lokalisiert, deren Nukleotidsequenz jedoch weniger streng konserviert ist. Zudem wurde für starke *E. coli*-Promotoren eine weitere charakterische AT-reiche "-43"-Region beschrieben (Bujard, 1980), die auch in Promotoren Gram-positiver Organismen vorkommt (Graves und Rabinowitz, 1986). Weit weniger ist dagegen über *C. glutamicum*-Promotoren bekannt. Das ist z.T. darauf zurückzuführen, daß bislang

nur von sieben *C. glutamicum*-Genen die Transkriptionsinitiationsstellen experimentell bestimmt worden sind.

Als Transkriptionsstart des *gdh*-Gen von *C. glutamicum* wurde ein Guanin, 284 bp vor dem AUG₅₇₂, bestimmt. Die Lage des Transkriptionsstarts korreliert gut mit den Ergebnissen der Deletionsanalyse, durch die der Promotor des *gdh*-Gens von *C. glutamicum* auf ein 540 bp *NheI*-*SphI*-Fragment eingegrenzt wurde. 11 bp vor dem G₂₈₈ befindet sich ein DNA-Sequenz-Motiv "5'-CATAAT-3'", das bis auf die erste Base mit der "-10"-Region typischer *E. coli*-Promotoren identisch ist. Weiterhin wurde 17 bp vor der möglichen "-10" Region eine Sequenz "5'-TGGTCA-3'" gefunden, die bis auf die 2. und 4. Base identisch ist mit der Konsensussequenz der "-35"-Region typischer *E. coli*-Promotoren. Auch eine AT-reiche "-43"-Region befindet sich 9 bp vor der potentiellen "-35"-Region. Beim Vergleich der Nukleotidsequenz der potentiellen Promotorregion des *gdh*-Gens von *C. glutamicum* mit den DNA-Sequenzen "upstream" des bestimmten Transkriptionsstarts von *hom-thrB* (Peoples et al., 1988), *fda* (von der Osten et al., 1989), *thrC* (Han et al., 1990), *orfX-lysA* (Marcel et al., 1990), *gap* und *pgk* (Schwinde et al., 1993) konnte ein gemeinsames 6 bp-Motiv, ungefähr 10 bp vor dem bestimmten Transkriptionsstart identifiziert werden, das starke Ähnlichkeit mit der Konsensussequenz der "-10"-Region aufweist. Weitere offensichtliche Sequenzähnlichkeiten waren jedoch nicht zu entdecken. Auch eine typische "-35"-Region konnte, außer in der 5'-flankierenden Region des *gdh*-Strukturgens, nicht gefunden werden. Da das *gdh*-Gen auch in *E. coli* heterolog exprimiert wurde (Börmann et al., 1992), legt dies den Schluß nahe, daß die "-10"- und "-35"-Region durchaus gemeinsame Transkriptionsinitiationssignale für die RNA-Polymerasen von *C. glutamicum* und *E. coli* sein können. Ob der Promotor des *gdh*-Gens in *C. glutamicum* jedoch tatsächlich aus der *E. coli* analogen "-10" und "-35"-Region besteht, müssen weitere Experimente wie z.B. Deletionsanalysen, Austausche einzelner Nukleotide aus dem potentiellen Promotorbereich sowie DNA-Protein-Bindungsstudien mit einer RNA-Polymerase aus *C. glutamicum* zeigen.

17 bp hinter dem TAA-Stopcodon des *gdh*-Strukturgens von *C. glutamicum* konnte in Position 1933 bis 1966 der DNA-Sequenz eine palindromische Sequenzstruktur identifiziert werden, die auf RNA-Ebene eine Haarnadelstruktur ($\Delta G = -22$ kcal/mol) ausbilden kann. Unmittelbar am Ende dieser Haarnadelstruktur befinden sich mehrere Uracil-Reste. Da diese Struktur sehr große Ähnlichkeit mit der rho-unabhängiger Terminatoren (Rosenberg und

Court, 1979) aufweist, handelt es sich bei dieser Sequenz wahrscheinlich um den Terminator der Transkription des *gdh*-Gens.

Durch eine "Northern Blot"-Analyse wurde gezeigt, daß ein 1.65 kb langes *gdh*-Transkript in *C. glutamicum* gebildet wird. Die Länge des Transkriptes stimmt gut mit dem bestimmten Transkriptionsstart des *gdh*-Gens 284 bp vor dem AUG₅₇₂, der Größe des *gdh*-Strukturgens und dem aus der DNA-Sequenz abgeleiteten Terminator in Position 1933 - 1966 der Nukleotidsequenz überein. Dieses Ergebnis bedeutet, daß das *gdh*-Gen von *C. glutamicum* monocistronisch ist. Somit konnte auch für das *gdh*-Gen von *C. glutamicum* gezeigt werden, daß es entsprechend den Befunden bei *E. coli* (Merino et al., 1987), *N. crassa* (Kinnaird und Fincham, 1983) und *Chlorella sarcosiniana* (Cock et al., 1991) als einzelne Transkriptionseinheit im Chromosom vorliegt.

Da das *gdh*-Strukturgen von *C. glutamicum* eine Länge von 1341 bp hat, kodiert es für ein GDH-Polypeptid bestehend aus 447 Aminosäuren (AS) mit einem davon abgeleiteten Molekulargewicht (M_r) von 49050. Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung mit dem experimentell bestimmten M_r von ungefähr 50000 des GDH-Monomers in zell-freiem Extrakt von *C. glutamicum*. Damit ist das M_r des GDH-Monomers vergleichbar mit den Molekulargewichten der Untereinheiten aufgereinigter GDH's von *E. coli* (M_r 50000) (Sakamoto et al., 1975), *Bacillus fastidiosus* (M_r 48000) (Op den Camp et al., 1989) *Clostridium symbiosum* (M_r 49295) (Teller et al., 1992) und *N. crassa* (M_r 48000) (Wootton, 1973).

Homologievergleiche der AS-Sequenz des GDH-Polypeptids von *C. glutamicum* mit den entsprechenden GDH-AS-Sequenzen von *E. coli*, *N. crassa* und *S. cerevisiae* ergaben, daß die AS-Sequenzen der prokaryontischen und eukaryontischen NADP-abhängigen GDH's sich sehr ähnlich sind. Daraus konnte geschlossen werden, daß es sich bei der NADP-abhängigen GDH um ein im Laufe der Evolution sehr stark konserviertes Enzym handelt. Die geringere Homologie zwischen der NADP-abhängigen GDH von *C. glutamicum* und der NAD-abhängigen GDH des Gram-positiven *Peptostreptococcus asaccharolyticus* könnte in der unterschiedlichen Funktion der beiden Enzyme begründet liegen. Dies unterstützt auch die Schlußfolgerung von Mattaj et al. (1982), daß die Gene, die für die unterschiedlichen GDH-Klassen kodieren, sich schon sehr früh in der Evolution, noch vor der Entwicklung einer separaten eukaryontischen Linie, voneinander unabhängig entwickelt haben könnten.

Die GDH wurde bislang als das Hauptenzym für die Glutamatbildung bei den "Glutaminsäurebakterien" angesehen (Kinoshita, 1985; Liebl, 1991). Um die Rolle der GDH im Stoffwechsel von *C. glutamicum* untersuchen zu können, standen neben dem Wildtyp, eine definierte GDH-defekte *C. glutamicum* Mutante und ein *gdh*-überexprimierender *C. glutamicum* Stamm zur Verfügung. Diese drei Stämme unterscheiden sich in ihrem GDH-Level, ansonsten besitzen sie aber einen identischen genetischen Hintergrund. Die vergleichenden Wachstumsexperimenten mit dem Wildtyp *C. glutamicum* 13032 und der GDH-defekten Mutante *C. glutamicum* EB1 zeigten deutlich, daß weder die Glutamat-Synthese noch der Glutamat-Abbau von der GDH-Aktivität abhängig sind. Daß die GDH in den Glutamat-Abbau involviert ist, wurde nicht unbedingt erwartet, da NADP-spezifische GDH's in der Regel eine Funktion im Anabolismus der Zelle haben. Zudem wurde auch schon früher berichtet, daß bei *C. glutamicum* ssp. *flavum* Glutamat über die Transaminase A-katalysierte Reaktion zu α -Ketoglutarat und Oxalacetat abgebaut wird, da Transaminase A-defekte Mutanten dieses Stammes nicht mehr auf Glutamat als alleiniger Kohlenstoff- und Stickstoffquelle wuchsen (Shiio et al., 1962). Überraschend war jedoch, daß die NADP-abhängige GDH auch für die Glutamat-Synthese nicht essentiell ist. Dieses Ergebnis war insofern unerwartet, da GDH-defekte Mutanten von *C. glutamicum* ssp. *flavum* als Glutamat-auxotroph (Shiio und Ujigawa, 1978) oder als stark in ihrem Wachstum eingeschränkt (Sung et al., 1985) beschrieben wurden. Diese GDH-defekten *C. glutamicum* ssp. *flavum*-Mutanten wurden jedoch durch klassische Mutagenese erhalten und es ist wahrscheinlich, daß weitere Mutationen, die den Glutamatstoffwechsel dieses Organismus betreffen, in den Mutanten vorhanden sind.

Die Wachstumsexperimente mit dem *gdh*-überexprimierenden Stamm *C. glutamicum*(pEKgdh) zeigten, daß sich eine Überexpression der GDH oder als Folge davon eine höhere intrazelluläre Glutamatkonzentration, negativ auf das Wachstum dieses Stammes auswirkte, da *C. glutamicum*(pEKgdh) auf Glucose- und Acetat-Minimalmedium etwas längere Verdopplungszeiten in der exponentiellen Wachstumsphase als der Wildtyp besaß. Als Ursache für das schlechte Wachstum des *gdh*-überexprimierenden Stammes ist ein Ungleichgewicht der Reduktionsäquivalente denkbar, da die GDH-katalysierte Reaktion NADPH verbraucht. Auch bei rekombinanten *Salmonella typhimurium*-Stämmen, die eine 30 - 200-fach höhere spezifische GDH-Aktivität als der Wildtyp besaßen, wurde eine drastischen Reduktion der Wachstumsrate, jedoch unabhängig vom Wachstumsmedium, beobachtet (Miller und Brenchley, 1984). Die Autoren diskutierten als Grund für das

schlechte Wachstum dieser Stämme einen Mangel an α -Ketoglutarat für die Succinyl-CoA-Synthese.

C. glutamicum verfügt über eine relativ hohe interne Glutamatkonzentration und ist in der Lage unter Biotin-Mangel Glutamat in das umgebende Medium zu sezernieren (Shiio et al., 1962). Untersuchungen der intrazellulären Glutamatkonzentrationen der drei *C. glutamicum*-Stämmen belegten, daß die GDH am Aufbau des internen Glutamat-Pools, sowohl unter Glutamat-Produktions- als auch unter Nicht-Produktionsbedingungen, beteiligt ist. Wider erwarten war jedoch die Glutamatproduktion von *C. glutamicum* nicht von der GDH abhängig. Weder ein hoher GDH-Level noch eine fehlende GDH beeinflussen die Glutamat-Produktion. Da die im Vergleich zum Wildtyp und zu *C. glutamicum* EB1 erhöhte intrazelluläre Glutamatkonzentration des *gdh*-überexprimierenden Stammes *C. glutamicum*(pEKgdh) keinen Effekt auf die Glutamatproduktion hatte, könnte dies ein Hinweis darauf sein, daß das Glutamat-Transportsystem, das erst kürzlich beschrieben und charakterisiert wurde (Hoischen und Krämer, 1989; Gutmann et al., 1992), für die Glutamat-Produktion in *C. glutamicum* limitierend ist.

Daß die GDH für die Glutamatproduktion von *C. glutamicum* nicht essentiell ist, wurde ebenso durch die Resultate einer Glutamat-Kurz-Zeit-Fermentation unterstützt, bei der der Wildtyp und der *gdh*-Überexprimierer vergleichbare Glutamat-Ausbeuten von 56 % und 57 % zeigten. Im Gegensatz dazu setzte die GDH-defekte Mutante *C. glutamicum* EB1 nur 45 % der eingesetzten Glucose zu Glutamat um. Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung mit Literaturdaten, nach denen Glutamat-produzierende Bakterien 30-50 % der aufgenommenen Glucose zu Glutamat umsetzen (Kinoshita, 1985). Die geringere Glutamat-Ausbeute von *C. glutamicum* EB1 im Vergleich zu den beiden anderen *C. glutamicum*-Stämmen ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß dieser Stamm den energetisch ungünstigeren Weg der Glutamat-Synthese über das GS/GOGAT-System einschlagen muß, bei dem im Vergleich zum GDH-katalysierten Biosyntheseweg ATP zur Glutamatbildung gebraucht wird.

Die Ergebnisse mit *C. glutamicum* EB1 deuteten daraufhin, daß in *C. glutamicum* ein alternativer Weg zur Glutamat-Synthese vorhanden sein muß, über den ausreichend Glutamat für das Wachstum, die Glutamatproduktion und den Aufbau des internen Glutamat-Pools von ungefähr 100 mM gebildet werden kann. Im Wildtyp *C. glutamicum* 13032, im *gdh*-überexprimierenden Stamm *C. glutamicum*(pEKgdh) und in der GDH-

defekten Mutante *C. glutamicum* EB1 waren sowohl spezifische Glutamin-Synthetase (GS) als auch Glutamat-Synthase-Aktivitäten nachweisbar. Damit konnte auch in *C. glutamicum* ein funktionelles GS/GOGAT-System nachgewiesen werden, das für *C. glutamicum* ssp. *flavum* (Tochikura et al., 1984) und *Corynebacterium callunae* (Ertan, 1992a) bereits beschrieben war. Das GS/GOGAT-System ist wahrscheinlich für die Glutamat-Synthese während des Wachstums und die Glutamat-Produktion von *C. glutamicum* EB1 verantwortlich. Auffallend war jedoch, daß *C. glutamicum* EB1 über 2-fach höhere spezifische GS- und über 10-fach höhere spezifische GOGAT-Aktivitäten als der Wildtyp und der *gdh*-Überexprimierer verfügte. Dies wurde früher auch bei GDH-defekten *C. glutamicum* ssp. *flavum* Mutanten beobachtet (Sung et al., 1985).

Möglicherweise war bei der Konstruktion der GDH-defekten Mutante *C. glutamicum* EB1 auf eine weitere Mutation selektioniert worden, die eine erhöhte GS- und GOGAT-Aktivität zur Folge hatte. Daher wurde das *gdh*-Gen auf einem Plasmid in *C. glutamicum* EB1 wieder eingeführt. Da der Stamm *C. glutamicum* EB1(pEC6gdh) ebenso wie der Wildtyp keine erhöhte GOGAT-Aktivität besaß, konnte eine Sekundärmutation als Grund für die erhöhte GS- und GOGAT-Aktivität ausgeschlossen werden. Ebenfalls konnte durch Enzymtests ausgeschlossen werden, daß in *C. glutamicum* das GS/GOGAT-System direkt über die Anwesenheit oder Abwesenheit der GDH reguliert wird. Denkbar wäre aber, daß die GDH über einen sekundären Effekt, wie die intrazelluläre Glutamatkonzentration, die α -Ketoglutarat-Konzentration oder die NADPH-Verfügbarkeit einen regulatorischen Effekt auf das GS/GOGAT-System ausübt. Ob eine Regulation des GS/GOGAT-Systems auf Proteinebene oder genetischer Ebene stattfindet, und worin die Ursache für die beobachteten erhöhten spezifischen GS- und GOGAT-Aktivitäten in dem Stamm *C. glutamicum* EB1 liegt, bleibt zu untersuchen.

Die Bildung von Glutamat wird in *C. glutamicum* durch die NADPH-abhängigen Enzyme GDH oder GOGAT katalysiert. Um nun zu überprüfen, ob möglicherweise NADPH ein limitierender Faktor der Glutamatproduktion bei *C. glutamicum* ist, wurden die Auswirkungen einer GDH mit geänderter Coenzympezifität auf die Glutamatproduktion von *C. glutamicum* untersucht. Dazu wurde die NAD-abhängige GDH des Gram-positiven Bakteriums *Peptostreptococcus asaccharolyticus* in *C. glutamicum* heterolog exprimiert. In *P. asaccharolyticus* katalysiert die NAD-abhängige GDH zwar den Abbau von Glutamat, aber Snedecor et al. (1991) konnten zeigen, daß diese GDH auch in Richtung der

Glutamatbildung arbeitet und die Glutamatsynthese katalysiert, wenn es in *E. coli* heterolog exprimiert wurde. Bei den Untersuchungen zur Glutamatproduktion von *C. glutamicum*(pEKEXpgdh) stellte sich heraus, daß die Anwesenheit eines hohen Levels an NAD-abhängiger GDH weder Einfluß auf die intrazelluläre Glutamatkonzentration noch auf die Glutamatproduktion und die Glutamat-Ausbeuten hatte. Die Ergebnisse legten den Schluß nahe, daß NADPH als Coenzym für die Glutamatbildung in *C. glutamicum* nicht limitierend ist. Denkbar wäre jedoch, daß die anderen Substrate der GDH, Ammonium oder α -Ketoglutarat für die Glutamatbildung limitierend sein könnten. Eine Ammonium-Limitierung ist jedoch unwahrscheinlich, da die Untersuchungen zur Glutamat-Produktion mit einer sehr hohen Ammoniumkonzentration von ungefähr 320 mM durchgeführt wurden. Außerdem wurde beschrieben, daß eine Ammonium-Limitierung der Zellen eine Reduktion der Glucoseverbrauchsrate zur Folge hat (Kinoshita und Tanaka, 1972). Eine solche reduzierte Glucoseverbrauchsrate wurde jedoch nicht beobachtet. α -Ketoglutarat als limitierender Faktor der Glutamatproduktion von *C. glutamicum* konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden. α -Ketoglutarat wird durch die Isocitrat-Dehydrogenase (ICDH)-katalysierte Reaktion unter Reduktion von NADP aus Isocitrat gebildet und dann von der GDH durch reduktive Aminierung zu Glutamat umgesetzt, während NADPH bei dieser Reaktion wiederum zu NADP oxidiert wird. Eine strenge Kopplung der ICDH- und GDH-katalysierten Reaktionen als wichtige Voraussetzung für die Glutamatbildung bei *C. glutamicum*, wie sie von Kinoshita (1985) postuliert wird, könnte ebenfalls ein Grund dafür sein, daß die Expression einer NAD-abhängigen GDH zu keiner Steigerung der intrazellulären Glutamatkonzentration in *C. glutamicum* führte. Zu prüfen bleibt weiterhin, ob möglicherweise ein *C. glutamicum* Stamm, der die ICDH, oder die ICDH gemeinsam mit der GDH überexprimiert, mehr Glutamat bildet.

Die Wachstums- und Glutamatproduktionsexperimente ließen den Schluß zu, daß neben der GDH auch die Glutamat-Synthase (GOGAT) für den Glutamatstoffwechsel von *C. glutamicum* von Bedeutung ist. Die GOGAT von *C. glutamicum* akzeptierte ausschließlich NADPH als Coenzym, ebenso wie die GOGAT's von *C. glutamicum* ssp. *flavum* (Sung et al., 1984) und *E. coli* (Miller und Stadtman, 1972). Im Gegensatz dazu besitzt die GOGAT von *C. callunae* eine duale Coenzympezifität, d.h. sie akzeptiert sowohl NADPH als auch NADH als Coenzym (Ertan, 1992a). Das ermittelte pH-Optimum von 7.2 der Aminierungsreaktion der GOGAT von *C. glutamicum* stimmt gut mit den

pH-Optima der GOGAT's von *E. coli* (7.6) (Miller und Stadtman, 1972), *C. glutamicum* ssp. *flavum* (7.0) (Sung et al., 1984), *C. callunae* (7.6) (Ertan, 1992a) und *Candida albicans* (6.85) (Holmes et al., 1989) überein. Auch die apparenten K_m -Werte der GOGAT von *C. glutamicum* für ihre Substrate α -Ketoglutarat (α -KGA) (100 μ M), Glutamin (Gln) (310 μ M) und NADPH (56 μ M) unterscheiden sich kaum von denen der GOGAT von *C. glutamicum* ssp. *flavum* ($K_{m\alpha\text{-KGA}}$ 60 μ M; $K_{m\text{Gln}}$ 240 μ M; $K_{m\text{NADPH}}$ 60 μ M) (Sung et al., 1984) *C. callunae* ($K_{m\alpha\text{-KGA}}$ 100 μ M; $K_{m\text{Gln}}$ 220 μ M) (Ertan, 1992b) und *C. albicans* ($K_{m\alpha\text{-KGA}}$ 65 μ M; $K_{m\text{Gln}}$ 750 μ M) (Holmes et al., 1989). Die aufgereinigte GOGAT von *E. coli* hat für Glutamin ebenfalls einen vergleichbaren K_m -Wert von 250 μ M, während der K_m -Wert für α -Ketoglutarat von 7.3 μ M deutlich niedriger ist (Miller und Stadtman, 1972). Als Effektoren der GOGAT von *E. coli* wurden L-Aspartat, L-Methionin und L-Glutamat beschrieben (Miller und Stadtman, 1972). 10 mM dieser Aminosäuren im Testansatz bewirkten eine 50 %ige Inhibition der GOGAT von *E. coli*. ATP in einer Konzentration von 25 mM im Testansatz verursachte eine Inhibition der spezifischen GOGAT-Aktivität von *C. callunae* um 68 % (Ertan, 1992a). Andere Effektoren der GOGAT sind bislang nicht bekannt. Die spezifische GOGAT-Aktivität von *C. glutamicum* wurde durch keine der getesteten Effektoren beeinflusst. Offensichtlich ist die GOGAT von *C. glutamicum* auf Enzymebene nicht reguliert. ATP wurde nur bis zu einer Konzentration von 10 mM getestet, da dies der intrazellulären ATP-Konzentration von 2 - 8 mM von *C. glutamicum* entspricht (Gutmann et al., 1992). Diese Ergebnisse zeigen, daß die GOGAT von *C. glutamicum* grundsätzlich ähnliche kinetische Eigenschaften wie die Glutamat-Synthasen anderer Organismen besitzt; sie ist jedoch auf Enzymebene nicht reguliert.

Bei den meisten Bakterien, bei denen beide Wege zur Ammoniumassimilation und Glutamatbildung, GDH und GS/GOGAT, existieren, wird die Synthese dieser Enzyme über einen Repressions-Derepressionsmechanismus durch die Art und die Konzentration der Stickstoff-Quelle im Medium reguliert (Meers et al., 1970; Tyler, 1978; Matsuoka und Kimura, 1986). In *Bacillus subtilis* konnte gezeigt werden, daß diese Regulation auf Transkriptionsebene stattfindet (Bohannon et al., 1985; Fisher et al., 1984; Schreier et al., 1989). Auch bei *C. glutamicum* gibt es einen Hinweis darauf, daß die GOGAT auf genetischer Ebene reguliert wird, da die spezifische GOGAT-Aktivität dieses Organismus durch die Ammoniumkonzentration und durch Glucose im Medium beeinflusst wurde. Ein

negativer Effekt hoher Ammoniumsulfat- und Harnstoffkonzentrationen (320 mM) auf die spezifische GOGAT-Aktivität konnte sowohl bei *C. glutamicum* als auch bei *C. glutamicum* ssp. *flavum* (Tochikura et al., 1984) und *C. callunae* (Ertan, 1992b) beobachtet werden. Bei beiden letzteren Organismen war allerdings schon bei Wachstum auf 60 mM bzw. 100 mM Ammonium im Medium keine spezifische GOGAT-Aktivität mehr nachweisbar. Im Gegensatz dazu wird bei den Enterobakterien *E. coli*, *S. typhimurium* und *Klebsiella aerogenes* die Synthese der GOGAT nicht über die Ammoniumkonzentration im Medium reguliert (Reitzer und Magasanik, 1987). Glucose im Medium führt zu einer erhöhten Expression der GOGAT von *C. glutamicum*. Dies wurde bei anderen Organismen bislang nicht beobachtet. Glutamat reguliert nicht die Expression der GOGAT bei *C. glutamicum*, wohingegen bei *C. glutamicum* ssp. *flavum* (Tochikura, et al., 1984) und *C. callunae* (Ertan, 1992b) gezeigt werden konnte, daß Glutamat im Medium zu einer erhöhten GOGAT-Synthese führt. Bei den Enterobakterien dagegen wird die spezifische GOGAT-Aktivität durch Glutamat oder andere Aminosäuren der Glutamat-Familie negativ beeinflusst (Reitzer und Magasanik, 1987). Die Tatsache, daß die Synthese der GOGAT der "Glutaminsäure-Bakterien" nur durch die Ammoniumkonzentration im Medium negativ reguliert und durch Glutamat im Medium gar nicht oder positiv reguliert wird, könnte neben der konstitutiv hoch exprimierten GDH (Börmann, 1990; Tochikura et al., 1984; Ertan, 1992b) eine Ursache dafür sein, daß diese Organismen große Mengen an Glutamat produzieren können.

Die GOGAT ist ein multimeres Enzym, das sich aus zwei verschiedenen Untereinheiten zusammensetzt (Reitzer und Magasanik, 1987). Das *gltB*-Gen kodiert für die große, das *gltD*-Gen für die kleine Untereinheit dieses Enzyms. Beide Gene sind bei allen Organismen, aus denen sie bislang isoliert werden konnten, in einem Operon organisiert. Bei *E. coli* (Garciaarrubio et al., 1983), *B. subtilis* (Bohannon und Sonenshein, 1989) und *Rhizobium meliloti* (Lewis et al., 1990) konnten die Gene durch homologe bzw. heterologe Komplementation der Glutamat-auxotrophen *E. coli* Mutante PA340 (*gdhA*⁻, *gltB31*) isoliert werden. Auch in dieser Arbeit wurde versucht die *gltBD*-Gene durch heterologer Komplementation dieser Mutante und eines rekombinationsdefekten Abkömmlings (*E. coli* EBE32) aus einer chromosomalen Cosmidgenbank der GDH-defekten Mutante *C. glutamicum* EB1 zu isolieren. Bei den Komplementationsexperimenten wurde ein Klon erhalten, der wiederholt auf Minimalmedium ohne Glutamatsupplementation wachsen

konnte. Er besaß jedoch keine nachweisbare spezifische GOGAT-Aktivität. Denkbar wäre, daß auf dem rekombinanten Cosmid pHCGlt2 der eigene Promotor der möglicherweise isolierten *gltB* oder *gltBD*-Gene nicht vorhanden ist oder, daß dieser Promotor von der *E. coli* RNA-Polymerase nicht erkannt wird. Dafür spricht auch, daß es trotz mehrmaliger Versuche nicht gelang, die GOGAT-Gene durch heterologe Komplementation von *E. coli* PA340 aus einer chromosomalen Cosmidgenbank des Wildtyps *C. glutamicum* 13032 zu isolieren (Börmann, 1990). In dem Cosmid pHC79 befindet sich in der Nähe der *Bam*HI-Schnittstelle, in die die chromosomalen *Sau*3A-Fragmente von *C. glutamicum* ligiert wurden, der Promotor des Tetracyclin-Resistenzgens P2 (Stüber und Bujard, 1981), von dem aus potentiell eine Transkription des oder der Gene stattfinden könnte. Eine schwache Transkription der Gene von ihrem eigenen oder von diesem Promotor würde ausreichen, um eine Komplementation der Glutamat-Auxotrophie der *E. coli*-Mutante zu bewirken. Auch bei der Isolierung des Homoserin-Dehydrogenase-Gens (*hom*) aus *C. glutamicum* konnte ein Plasmid mit dem *hom*-Gen eine entsprechende *E. coli*-Mutante komplementieren, obwohl keine erhöhte spezifische Homoserin-DH-Aktivität nachweisbar war. In diesem Fall konnte gezeigt werden, daß der *C. glutamicum*-Promotor tatsächlich nicht in *E. coli* funktioniert (Eikmanns et al., unveröffentlichte Ergebnisse).

Ob auf dem rekombinanten Cosmid pHCGlt2 tatsächlich das *gltB*-Gen oder die *gltBD*-Gene lokalisiert sind, müssen weitere Subklonierungsexperimente sowie die homologe Expression in *C. glutamicum* zeigen. Da die GOGAT von *C. glutamicum* durch die Ammoniumkonzentration im Medium reguliert wird, könnte in weiterführenden Arbeiten eine Feinstrukturanalyse dieser Gene möglicherweise Aufschluß über einen potentiell Ammonium-regulierten Promotor geben, die für Promotoren von *E. coli*-Genen beschrieben wurde, die in die Ammonium-Assimilation involviert sind (Magasanik und Neidhart, 1987). Weiterhin könnten die charakterisierten GOGAT-Gene zur Konstruktion definierter GOGAT-defekter und GDH/GOGAT-defekter *C. glutamicum*-Stämme genutzt werden, um damit die Auswirkungen auf den Glutamatstoffwechsel von *C. glutamicum* untersuchen zu können.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Feinstruktur-Analyse des Glutamat-Dehydrogenase-Gens (*gdh*) von *Corynebacterium glutamicum* 13032 und die Aufklärung der Bedeutung der NADP-abhängigen Glutamat-Dehydrogenase (GDH) für das Wachstum, den internen Glutamat-Pool und die Glutamatproduktion.

1. Die Feinstruktur des *gdh*-Gen von *C. glutamicum* konnte aufgeklärt werden. Das *gdh*-Gen besteht aus 1341 bp und kodiert für ein GDH-Polypeptid aus 447 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 49050. Untersuchungen auf Transkriptionsebene ergaben, daß das *gdh*-Gen von *C. glutamicum* monocistronisch ist und die Länge des *gdh*-Transkripts 1.65 kb beträgt. Der Transkriptionsstart des *gdh*-Gens wurde mittels eines "RNase Schutz-Experimentes" bestimmt. Die RNA-Polymerase initiiert die Transkription 284 bp vor dem AUG-Startcodon der Translation an einem Guanin.
2. Es wurde ein *gdh*-überexprimierender Stamm *C. glutamicum*(pEKgdh) konstruiert, der das *gdh*-Strukturgen, die Promotorregion und die Terminatorregion auf dem Plasmid pEK0 trägt. Dieser Stamm besaß im Vergleich zum Wildtyp (1.8 U/mg Protein) eine 14-fach höhere spezifische GDH-Aktivität (24.6 U/mg Protein). Desweiteren wurde durch "Gen-gerichtete Mutagenese" eine definierte, *gdh*-defekte Mutante, *C. glutamicum* EB1 konstruiert, die keine meßbare GDH-Aktivität mehr besaß. *C. glutamicum* 13032, *C. glutamicum*(pEKgdh) und *C. glutamicum* EB1 besaßen vergleichbare Verdopplungszeiten auf Minimalmedium mit unterschiedlichen Kohlenstoff- und Stickstoff-Quellen und produzierten unter Biotin-Mangel Glutamat mit vergleichbarer Rate von 20 µmol/min*g TG. Diese Ergebnisse zeigen, daß die GDH weder für das Wachstum noch für die Glutamat-Produktion von *C. glutamicum* essentiell ist. Die GDH ist jedoch am Aufbau des internen Glutamat-Pools von *C. glutamicum* beteiligt, da die drei untersuchten Stämme unterschiedliche interne Glutamat-Konzentrationen besaßen.

3. Die heterologe Expression des Gens für die NAD-abhängige GDH von *Peptostreptococcus asaccharolyticus* in *C. glutamicum* hatte keinen Einfluß auf die interne Glutamatkonzentration, die Glutamat-Produktion und die Glutamat-Ausbeute während einer Kurz-Zeit-Fermentation.
4. Der Wildtyp *C. glutamicum* 13032, der *gdh*-überexprimierende Stamm *C. glutamicum*(pEKgdh) und die GDH-defekte Mutante *C. glutamicum* EB1 besaßen Glutamin-Synthetase (GS)- und Glutamat-Synthase (GOGAT)-Aktivitäten. Der Stamm *C. glutamicum* EB1 verfügte jedoch über 2-fach höhere spezifische GS- (0.9 U/mgProtein) und über 10-fach höhere GOGAT-Aktivitäten (0.09 U/mg Protein) verglichen mit dem Wildtyp (GS: 0.45 U/mg Protein; GOGAT: 0.008 U/mg Protein). Untersuchungen zur Regulation der GOGAT zeigten, daß hohe Ammoniumkonzentrationen im Medium eine Erniedrigung und Glucose im Medium eine Erhöhung der spezifischen GOGAT-Aktivität zur Folge haben.

VI. LITERATUR

- Altenbuchner, J., und J. Cullum (1984). DNA amplification and an unstable arginine gene in *Streptomyces lividans* 66. *Mol. Gen. Genet.* 195:134-138.
- Alwine, J.C., Kemp, D.J., und G.R. Stark (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5350-5354.
- Benachenhou-Lahfa, N., Forterre, P., und B. Labedan (1993). Evolution of glutamate dehydrogenase genes: evidence for two paralogous protein families and unusual branching patterns of the Archaeobacteria in the universal tree of life. *J. Mol. Evol.* 36:335-346.
- Berberich, M.A. (1972). A glutamate dependent phenotype in *E. coli* K-12: the result of two mutations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47:1498-1503.
- Bergmeyer, H.U., Bernt, E., Schmid, F., und H. Stork (1974). D-Glucose Bestimmung mit Hexokinase und Glucose-6-phosphat Dehydrogenase. In: *Methoden der enzymatischen Analyse*. Bergmeyer, H.U. (ed). Verlag Chemie, Weinheim Vol. II:1241-1250.
- Beutler, H.O., und G. Michal (1974). L-Glutamatbestimmung mit Glutamat-Dehydrogenase, Diaphorase, und Tetrazoliumsalzen. In: *Methoden der enzymatischen Analyse*. Bergmeyer, H.U. (ed). Verlag Chemie, Weinheim Vol. II:1753-1759.
- Birnboim, H.C. (1983). A rapide alkaline extraction method for the isolation of plasmid-DNA. *Meth. Enzymol.* 100:243-255.
- Blumenthal, K.M., Moon, K., und E.L. Smith (1975). Nicotinamid adenine dinucleotide phosphate-specific glutamate dehydrogenase of *Neurospora*. *J. Biol. Chem.* 250:3644-3654.
- Börmann, E.R. (1990). Isolierung, Charakterisierung und Expression des Gens für die Glutamat-Dehydrogenase aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032. Diplomarbeit Universität Köln.
- Börmann, E.R., Eikmanns, B.J., und H. Sahm (1992). Molecular analysis of the *Corynebacterium glutamicum* *gdh* gene encoding glutamate dehydrogenase. *Mol. Microbiol.* 6:317-326.
- Börmann-El Kholy, E.R., Eikmanns, B.J., Gutmann, M., und H. Sahm (1993). Glutamate Dehydrogenase is not essential for glutamate formation by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2329-2331.
- Bohannon, D.E., Rosenkrantz, M.S., und A.L. Sonenshein (1985). Regulation of *Bacillus subtilis* glutamate synthase genes by the nitrogen source. *J. Bacteriol.* 163:957-964.
- Bohannon, D.E., und A.L. Sonenshein (1989). Positive regulation of glutamate biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 171:4718-4727.
- Bolivar, F., und K. Backman (1979). Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors. *Meth. Enzymol.* 68:245-267.

- Brenchley, J.E., Prival, M.J., und B. Magasanik (1973). Regulation of the enzymes responsible for glutamate formation in *Klebsiella aerogenes*. *J. Biol. Chem.* 248:6122-6128.
- Brenchley, J.E., Baker, C.A., und L.G. Patil (1975). Regulation of the ammonia assimilatory enzymes in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 124:182-189.
- Bujard, H. (1980). The interaction of *E. coli* RNA polymerase with promoters. *Trends in Biochem. Sciences* 5:274-278.
- Caruthers, M.H., Barone, A.D., Beaucage, S.L., Dodds, D.R., Fisher, E.F., McBride, L.J., Matteucci, M., Staninsky, Z., und J.Y. Tang (1985). Chemical synthesis of desoxynucleotides by the phosphoramidite method. *Science* 230: 281.
- Cock, J.M., Kim, K.D., Miller, P.W., Hutson, R.G., und R.R. Schmidt (1991). A nuclear gene with many introns encoding ammonium-inducible chloroplastic NADP-specific glutamate dehydrogenase(s) in *Chlorella sarcosiniana*. *Plant. Mol. Biol.* 17:1023-1044.
- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., und L.Hsu (1973). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:2110-2114.
- Cordes, C., Möckel, B., Eggeling, L., und H. Sahm (1992). Cloning, organization and functional analysis of *ilvA*, *ilvB*, and *ilvC* genes from *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 112:113-116.
- Cremer, J., Eggeling, L., und H. Sahm (1990). Cloning the *dapA dapB* cluster of the lysine-secreting bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Gen. Genet.* 220:478-480.
- Debabov, V.G. (1990). A genetic and molecular-physiological study of glutamate-producing *Corynebacteria*. In: 6th International Symposium on genetic of industrial microorganisms, Strasbourg. Heslot, H., Davies, J., Florent, J., Bobichon, L., Durand, G., und L. Penasse (eds.). *Société Française de Microbiologie* I:353-362.
- Eikmanns, B.J., Follettie, M.T., Griot, M.U., und A.J. Sinskey (1989). The phosphoenolpyruvate carboxylase gene of *Corynebacterium glutamicum*: Molecular cloning, nucleotide sequence and expression. *Mol. Gen. Genet.* 218:330-339.
- Eikmanns, B.J., Kleinertz, E., Liebl, W., und H. Sahm (1991a). A family of *Corynebacterium glutamicum* /*Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression and promoter probing. *Gene* 102:93-98.
- Eikmanns, B.J., Metzger, M., Reinscheid, D., Kircher, M., und H. Sahm (1991b). Amplification of three threonine biosynthesis genes in *Corynebacterium glutamicum* and its influence on carbon flux in different strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34:617-622.
- Eikmanns, B.J. (1992). Identification, sequence analysis, and expression of a *Corynebacterium glutamicum* gene cluster encoding the three glycolytic enzymes Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase, 3-Phosphoglycerate Kinase, and Triosephosphate Isomerase. *J. Bacteriol.* 174:6076-6086.

- Ertan, H. (1992a). Some properties of glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase and glutamate synthase from *Corynebacterium callunae*. *Arch. Microbiol.* 158:35-41.
- Ertan, H. (1992b). The effect of various culture conditions on the levels of ammonia assimilatory enzymes of *Corynebacterium callunae*. *Arch. Microbiol.* 158:42-47.
- Feinberg, K., and R. Vogelstein (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specificity. *Anal. Biochem.* 132:6-13.
- Fisher H.F. (1985). L-Glutamate dehydrogenase from bovine liver. *Meth. Enzymol.* 113:16-27.
- Fisher, S.H., Rosenkratz, M.S., und A.L. Sonenshein (1984). Glutamine synthetase of *Bacillus subtilis*. *Gene* 32:427-438.
- Garciarrubio, A., Lozoya, E., Covarrubias, A., und F. Bolivar (1983). Structural organization of the genes that encode two glutamate synthase subunits of *Escherichia coli*. *Gene* 26:165-170.
- Gornall, A.G., Bardawill, C.J., und M.M. David (1949). Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *J. Biological Chemistry* 177:751-766.
- Graves, M.C., und J.C. Rabinowitz (1986). *In vivo* and *in vitro* transcription of the *Clostridium pasteurianum* ferredoxin gene. *J. Biol. Chem.* 261:11409-11415.
- Grenson, M., Dubois, E., Piotrowska, M., Drillien, R., und M. Aigle (1974). Ammonia assimilation in *Saccharomyces cerevisiae* as mediated by the two glutamate dehydrogenases. *Mol. Gen. Genet.* 128:73-85.
- Gutmann, M., Hoischen, C., und R. Krämer (1992). Carrier mediated glutamate secretion by *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation. *Biochim. Biophys. Acta* 1112:115-123.
- Han, K.S., Archer, J.A.C., und A.J. Sinskey (1990). The molecular structure of the *Corynebacterium glutamicum* threonine synthase gene. *Mol. Microbiol.* 4:1693-1702.
- Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of *E. coli*. In: *DNA cloning*. Glover D.M. (ed). IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA Vol. I: 109-135.
- Hawkins, A.R., Gurr, S.J., Montague, P., und J.R. Kingshorn (1989). Nucleotide sequence and regulation of expression of the *Aspergillus nidulans* *gdhA* gene encoding NADP dependent glutamate dehydrogenase. *Mol. Gen. Genet.* 218:105-111.
- Hawley, D.K., und W.R. McClure (1983). Compilation and analysis of promotor DNA sequences. *Nucleic Acids Research* 11:2237-2255.
- Haynes, J.A., und M.L. Britz (1989). Electrotransformation of *Brevibacterium lactofermentum* and *Corynebacterium glutamicum*: growth in Tween 80 increases transformation frequencies. *FEMS Microbiol. Letts.* 61:329-334.
- Hohn, B., und J. Collins (1980). A small cosmid for efficient cloning of large DNA fragments. *Gene* 11:291-298.
- Hoischen, C., und R. Krämer (1989). Evidence for an efflux carrier system involved in the secretion of glutamate by *Corynebacterium glutamicum*. *Arch. Microbiol.* 151:342-347.

- Holmes, A.R., Collings, A., Farnden, K.J.F., und M.G. Shepherd (1989). Ammonium assimilation by *Candida albicans* and other yeasts: Evidence for activity of glutamate synthase. *J. Gen. Microbiol.* 135:1423-1430.
- Hornby, D.P., und P.C. Engel (1984). Characterization of *Peptostreptococcus asaccharolyticus* glutamate dehydrogenase purified by dye-ligand chromatography. *J. Gen. Microbiol.* 130:2385-2394.
- Hucheng, A., Marquet, M., Welby, W., Montrozier, H., Goma, G., und G. Lanéelle (1984). Glutamate excretion triggering mechanism: a reinvestigation of the surfactant-induced modification of cell lipids. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* 135B:53-67.
- Ito, H., Sato, K., Matsui, K., Sano, K., Enei, H., und Y. Hirose (1990). Molecular breeding of a *Brevibacterium lactofermentum* L-phenylalanine producer using a cloned prephenate dehydratase gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33:190-195.
- Katsumata, R., Mizukami, T., Kikuchi, Y., und K. Kino (1986). Threonine production by the lysine producing strain of *Corynebacterium glutamicum* with amplified threonine biosynthetic operon. In: *Fifth International Symposium on the Genetics of industrial microorganisms*. Alacevic, M., Hranueli, D., und Z. Toman (eds.). B. Pliva, Zagreb pp. 217-226.
- Keddie, R.M., und G.L. Cure (1977). The cell wall composition and distribution of free mycolic acids in named strains of coryneform bacteria and in isolates from various natural sources. *J. Appl. Bacteriol.* 42:229-252.
- Kimura, K. (1962). The significance of glutamic dehydrogenase in glutamic acid fermentation. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 8:253-260.
- Kingshorn, J.R., und J.A. Pateman (1973). NAD and NADP L-glutamate dehydrogenase activities of *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 78:39-46.
- Kinnaird, J.H., und J.R.S. Fincham (1983). The complete nucleotide sequence of the *Neurospora crassa am* (NADP-specific glutamate dehydrogenase) gene. *Gene* 26:253-260.
- Kinoshita, S., Udaka, S., und M. Shimono (1957). Studies of the amino acid fermentation. I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 3:193-205.
- Kinoshita, S., und K. Tanaka (1972). Glutamic acids. In: *The microbial production of amino acids*. Yamada, K., Kinoshita, S., Tsunoda, T., und K. Aida (eds.). John Wiley and sons, New York, USA pp. 263-304.
- Kinoshita, S. (1985). Glutamic acid bacteria. In: *Biology of industrial microorganisms*. Demain, A.L., und N.A. Solomon (eds.). The Benjamin/Cummings Publishing Company, London pp.115-142.
- Kleemann, A., Leuchtenberger, W., Hoppe, B., und H. Tanner (1985). Amino acids. In: *Ullmann's Encyclopedia of industrial chemistry*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim Vol. A2:57-97.

- Klingenberg, M., und E. Pfaff (1967). Means of terminating reactions. *Methods in Enzymology* Vol X:680-684.
- Kornberg, T., und A. Kornberg (1974). Bacterial DNA Polymerases. In: *The Enzymes*. Boyer, P.D. (ed.) *Academic Press*, New York, USA Vol. 10:119-114.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lea, P.J., und B.J. Mifflin (1974). An alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature* 251:614-616.
- Leblon, G., Reyes, O., Guyonvarch, A., Bonamy, C., Labarre, J., und F. Wojcik (1990). Construction and utilization of integrative vectors for corynebacteria. In: *6 th International symposium on Genetics of microorganisms, Strasbourg*. Heslot, H., Davies, J., Florent, J., Bobichon, L., Durand, G., und L. Penasse (eds.) *Société Française de Microbiologie*, pp. 293-314.
- Lewis, T.A., Gonzalez, R., und J.L. Botsford (1990). *Rhizobium meliloti* glutamate synthase: cloning and initial characterization of the *glt* locus. *J. Bacteriol.* 172:2413-2420.
- Liebl, W., Bayerl, A., Schein, B., Stillner U., und K.H. Schleifer (1989). High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells. *FEMS Microbiol. Letts.* 65:299-304.
- Liebl, W. (1991). The Genius *Corynebacterium*-Nonmedical. In: *The Procaryotes. A handbook on the biology of bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., und K.H. Schleifer (eds.) *Springer-Verlag*, 2. Auflage, Vol. 1:1157-1171.
- Liebl, W., Ehrmann, M., Ludwig, W., und K.H. Schleifer (1991). Transfer of *Brevibacterium divaricatum* DSM20297^T, "*Brevibacterium flavum*" DSM20411, "*Brevibacterium lactofermentum*" DSM20412 and DSM1412, and *Corynebacterium lilium* DSM20137^T to *Corynebacterium glutamicum* and their distinction by rRNA gene restriction patterns. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41:255-260.
- Lilley, K.S., Baker, P.J., Britton, K.L., Stillman, T.J., Brown, P.E., Moir, A.J.G., Engel, P.C., Rice, D.W., Bell, J.E., und E. Bell (1991). The partial amino acid sequence of the NAD-dependent glutamate dehydrogenase of *Clostridium symbiosum*: implications for the evolution and structural basis of coenzyme specificity. *Biochim. Biophys. Acta* 1080:191-197.
- Magasanik, B. (1982). Genetic control of nitrogen assimilation in bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 16:135-168.
- Magasanik, B., und F.C. Neidhardt (1987). Regulation of carbon and nitrogen utilization. In: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Cellular and molecular biology*. Neidhardt, F.C. (ed.) *American Society for microbiology*, Washington DC, Vol. II:1318-1325.

- Marcel, T., Archer, J.A.C., Mengin-Lecreulx, D., und A.J. Sinskey (1990). Nucleotide sequence and organization of the upstream region of the *Corynebacterium glutamicum* *lysA* gene. *Mol. Microbiol.* 4:1819-1830.
- Martin, J.F. (1989). Molecular genetics of amino acid-producing *Corynebacteria*. In: *Society for general microbiology symposium 44*. Baumberger, S., Hunter, I., und M. Rhodes (eds.). *Cambridge University Press* pp. 25-59
- Matsuoka, K., und K. Kimura (1986). Glutamate synthase from *Bacillus subtilis* PCI219. *J. Biochem.* 99:1087-1100.
- Mattaj, I.W., McPherson, M.J., und J.C. Wootton (1982). Localisation of a strongly conserved section of coding sequence in glutamate dehydrogenase genes. *FEBS letts.* 147:21-25.
- McConkey, A. (1905). Lactose fermenting bacteria in faeces. *J. Hyg.* 5:333-378.
- McPherson, M.J., und J.C. Wootton (1983). Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* *gdhA* gene. *Nucleic Acids Research* 11:5257-5266.
- Meers, J.L., Tempest, D.W., und C.M. Brown (1970). "Glutamine (amide); 2-Oxoglutarate amidotransferase oxidoreductase (NADP) an enzyme involved in the synthesis of glutamate by some bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 64:187-194.
- Meister, A. (1985). Glutamate Synthase from *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes* und *Saccharomyces cerevisiae*. *Meth. Enzymol.* 113:327-337.
- Melton, D.A., Krieg, P.A., Rebagliati, M.R., Maniatis, T., Zinn, K., und M.R. Green (1984). Efficient *in vitro* synthesis of biological active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res.* 12:7035-7056.
- Merino, E., Becerril, B., Valle F., und F. Bolivar (1987). Deletion of a repetitive extragenic palindromic (REP) sequence downstream from the structural gene of *Escherichia coli* glutamate dehydrogenase affects the stability of its mRNA. *Gene* 58:305-309.
- Miller, J.H. (1972). Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York.
- Miller, E.S., und J.E. Brenchley (1984). Cloning and characterization of *gdhA*, the structural gene for glutamate dehydrogenase of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 157:171-178.
- Miller, R.E., und E.R. Stadtman (1972). Glutamate synthase from *Escherichia coli*. An iron-sulfide flavoprotein. *J. Biol. Chem.* 247:7407-7419.
- Miyamoto, K., und H. Katsuki (1991). Possible physiological roles of Aspartase, NAD- and NADP-requiring Glutamate Dehydrogenase of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Biochem.* 112:52-56
- Moran, C.P., Lang, N., LeGrice, S.F.J., Lee, G., Stephens, M., Sonenshein, A.L., Pero, L., und R. Losik (1982). Nucleotide sequences that signal the initiation of transcription and translation of *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 186:339-346.

- Moye, W.S., Amuro, N., Rao, J.K.M., und H. Zalkin (1985). Nucleotide sequence of yeast *GDH1* encoding nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent glutamate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 260:8502-8508.
- Mullis, K.B., Faloona, F.A., Scharf, S.J., Saiki, R.K., Horn, G.T., und H.A. Erlich (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Sym. Quant. Biol.* 51:263-273.
- Nagasu, T., und B.D. Hall (1985). Nucleotide sequence of the GDH gene coding for the NADP-specific glutamate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 37: 247-253.
- Nunheimer, T.D., Birnbaum, J., Ihnen, E.D., und A.L. Demain (1970). Product inhibition of the fermentative formation of glutamic acid. *Appl. Microbiol.* 20: 215-217.
- op den Camp, H.J.M., Liem, D.K., Meesters, P., Hermans, J.M.H., und C. van der Drift (1989). Purification and characterization of the NADP-dependent glutamate dehydrogenase from *Bacillus fastidiosus*. *Antonie van Leeuwenhoek* 55:303-311.
- Oshima, K., Tanaka, K., und S. Kinoshita (1964). Studies on L-glutamic acid fermentation. XI. Purification and properties of L-glutamic acid dehydrogenase from *Micrococcus glutamicus*. *Agric. Biol. Chem.* 28: 714-722.
- O'Reagan, M., Thierbach, G., Bachmann, B., Villeval, D., Lapage, P., Viret, J.F., und Y. Lemoine (1989). Cloning and nucleotide sequence of the phosphoenolpyruvate carboxylase-coding gene of *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032. *Gene* 77:237-251.
- Pahel, G., Zelenetz, A.D., und B.M. Tyler (1978). *gluB* gene and regulation of nitrogen metabolism by glutamine synthetase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 133:139-148.
- Peoples, O.P., Liebl, W., Bodis, M., Maeng, P.J., Follettie, M.T., Archer, J.A., und A.J. Sinskey (1988). Nucleotide sequence and fine structure analysis of the *Corynebacterium glutamicum* *hom-thrB* operon. *Mol. Microbiol.* 2:53-62.
- Pribnow, D. (1975). Bacteriophage T7 early promoters: Nucleotide sequence of two RNA polymerase binding sites. *J. Mol. Biol.* 99:419-443.
- Reitzer, L.J., und B. Magasanik (1987). Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine and D-alanine. In: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Cellular and molecular biology*. Neidhardt, F.C. (ed.). American Society for Microbiology, Washington DC, Vol. 1:302-320.
- Rhee, S.G., Chock, P.B., und E.R. Stadtman (1985). Glutamine Synthase from *Escherichia coli*. *Meth. Enzymol.* 113:213-241.
- Roon, E.R., Even, H.L., und F. Larimore (1974). Glutamate-Synthase: properties of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide-dependent enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 118:89-95.
- Rosenberg, M., und D. Court (1979). Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Annu. Rev. Genet.* 13:319-353.

- Rosenfeld, S.A., und J.E. Brenchley (1983). Regulation of glutamate and glutamine synthesis. In: *Amino Acids: Biosynthesis and genetic regulation*. Hermann, K.M., und R.L. Somerville (eds.) Addison-Wesley Publishing Company, Mass. USA pp. 1-14.
- Rottenberg, H. (1979). The measurement of membrane potential and pH in cells, organelles and vesicles. *Meth. Enzymol.* 55:547-569.
- Sakamoto, N., Kotre, A.M., und M.A. Savageau (1975). Glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*: purification and properties. *J. Bacteriol.* 124:775-783.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., und T. Maniatis (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold spring harbor laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Sanger, F., Nicklen, S., und A.R. Coulson (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467.
- Schäfer, A., Kalinowski, J., Simon, R., Seep-Feldhaus, A.H., und A. Pühler (1990). High frequency conjugal plasmid transfer from gram-negative *Escherichia coli* to various gram-positive coryneform bacteria. *J. Bacteriol.* 172:1663-1666.
- Schreier, H.J., Brown, S.W., Hirschi, K.D., Nomellini, J.F. und A.L. Sonenshein (1989). Regulation of *Bacillus subtilis* glutamine synthetase gene expression by the product of the *glnR* gene. *J. Mol. Biol.* 210:51-63.
- Schwinde, J. (1991). RNA-Arbeiten am Gen für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase von *Corynebacterium glutamicum*. Diplomarbeit Universität Marburg.
- Schwinde, J.W., Thum-Schmitz, N., Eikmanns, B.J., und H. Sahm (1993). Transcriptional analysis of the *gap-pgk-tpi-ppc* gene cluster of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 175:3905-3908.
- Scrutton, N.S., Berry, A., und R.N. Perham (1990). Redesign of the coenzyme specificity of a dehydrogenase by protein engineering. *Nature* 343:38-43.
- Shapiro, B.M., und E.R. Stadtman (1970). Glutamine synthetase (*Escherichia coli*). *Methods in Enzymology* 17A:910-922.
- Shiio, I., Otsuka, S.I., und M. Takahashi (1962). Effect of biotin on the bacterial formation of glutamic acid. I. Glutamate formation and cellular permeability of amino acids. *J. Biochem.* 51:56-62.
- Shiio, I., und H. Ozaki (1970). Regulation of nicotinamide adenine phosphate specific-glutamate dehydrogenase from *Brevibacterium flavum*, a glutamate producing bacterium. *J. Biochem.* 68:633-647.
- Shiio, I., und K. Ujigawa (1978). Enzymes of the glutamate and aspartate synthetic pathways in glutamate-producing bacterium *Brevibacterium flavum*. *J. Biochem.* 84:647-657.
- Shine, J., und L. Dalgarno (1974). The 3' terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsens triplets and ribosomal binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71:1342-1346.

- Simon, R., Priefer, U., und A. Pühler (1983). A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Bio/Technology* 1:784-791.
- Smith, F., Austen, B., Blumenthal, K.M., und J. Nyc (1975). Glutamate Dehydrogenase. In: *The Enzymes*. Boyer P.D. (ed.). Academic Press, New York, USA pp. 293-367.
- Snedecor, B., Chu, H., und E. Chen (1991). Seletion, expression and nucleotide sequencing of the glutamate dehydrogenase gene of *Peptostreptococcus asaccharolyticus*. *J. Bacteriol.* 173:6162-6167.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517.
- Sprenger, G.A. (1990). Cloning and preliminary characterization of the transketolase gene from *Escherichia coli* K-12. In: *Biochemistry and physiology of thiamin diphosphate enzymes*. Bisswanger H., und J. Ullrich (eds.) VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, pp. 322-326.
- Sternberg, N., Tiemeier, D., und L. Enquist (1979). *In vitro* packaging of a λ dam vector containing EcoRI DNA fragments of *Escherichia coli* and phage P1. *Gene* 1:255-280.
- Stüber, D., und H. Bujard (1981). Organisation of transcriptional signals in plasmid pBR322 and pACYC184. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:167-171.
- Sung, H.C., Tachiki, T., Kumagai, H., und T. Tochikura (1984). Production and preparation of glutamate synthase from *Brevibacterium flavum*. *J. Ferment. Technol.* 62:371-376.
- Sung, H.C., Takahashi, M., Tamaki, H., Tachiki, T., Kumagai, H., und T. Tochikura (1985). Ammonia assimilation by glutamine synthetase/glutamate synthase system in *Brevibacterium flavum*. *J. Ferment. Technol.* 63:5-10.
- Suzuki, A., und P. Gadal, (1984). Glutamate synthase: physicochemical and functional properties of different forms in higher plants and other organisms. *Physiol. Vég.* 22:471-461.
- Syed, S. E.-H. und P.C. Engel (1990). A pH-dependent activation-inactivation equilibrium in glutamate dehydrogenase of *Clostridium symbiosum*. *Biochem. J.* 271:351-355.
- Tachiki, T., Wakisaka, S., Kumagai, H., und T. Tochikura (1981). Crystallization of glutamine synthetase from *Micrococcus glutamicus*. *Agric. Biol. Chem.* 45:549-550.
- Takeda, Y., Nakajyoh, Y., und S. Isshiki (1990). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the glutamate dehydrogenase gene, *gdh*, from *Corynebacterium melassecola*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 69:317-321.
- Takinami, K., Yoshii, H., Tsuru, H., und H. Okada (1965). Biochemical effects of fatty acid and its derivatives on glutamic acid fermentation. Part III. Biotin tween 60 relationship in the accumulation of L-glutamic acid and the growth of *Brevibacterium lactofermentum*. *Agric. Biol. Chem.* 29:351-359.

- Teller, J.K., Smith, R.J., McPherson, M.J., Engel, P.C., and J.R. Guest (1992). The glutamate dehydrogenase gene of *Clostridium symbiosum*. *Eur. J. Biochem.* 206:151-159.
- Tochikura, T., Sung, H.C., Tachiki, T., and H. Kumagai (1984). Occurrence of glutamate synthase in *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.* 48:2149-2150.
- Tinoco, Jr. I., Borer, P.N., Dengler, B., Levine, M.D., Uhlenbeck, O.C., Crothers, D.M., and J. Gralla (1973). Improved estimation of secondary structure in ribonucleic acid. *Nature New Biol.* 246:40-41.
- Tyler, B. (1978). Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. *Annual review of biochemistry* 47:1147-1162.
- Valle, F., Becerril, B., Chen, E., Seeburg, P., Heyneker, H., and F. Bolivar (1984). Complete nucleotide sequence of the glutamate dehydrogenase gene from *Escherichia coli* K-12. *Gene* 27:193-199.
- Varrichio, F. (1969). Control of glutamate dehydrogenase synthesis in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Acta* 177:560-564.
- Vieira, J., and J. Messing (1982). The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19:259-268.
- Vierula, P.J., and M. Kapoor (1988). NAD-specific glutamate dehydrogenase of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 264:1108-1114.
- Von der Osten, C.H., Barbas, C.F., Wong, C.H., and A.J. Sinskey (1989). Molecular cloning, nucleotide sequence and fine structural analysis of the *Corynebacterium glutamicum fda* gene: structural comparison of the fructose-1,6-bisphosphate aldolase to class I and II aldolases. *Mol. Microbiol.* 3:1625-1637.
- Wallace, D.M. (1987). Large and small scale phenol extractions. *Methods in Enzymology* 152:33-41.
- Weiss, B., Jacquemin-Sablon, A., Live, T.R., Fareed, G.C., and C.C. Richardson (1968). Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4. *J. Biol. Chem.* 243:4543-4555.
- Wierenga, R.K., Terpstra, P., and W.G.L. Hol (1986). Prediction of the occurrence of the ADP-binding $\beta\alpha\beta$ -fold in proteins using an amino acid sequence fingerprint. *J. Mol. Biol.* 187:101-107.
- Wootton, J.C. (1973). Studies on the structure and function of a *Neurospora* glutamate dehydrogenase and its mutant forms. *Biochem. Soc. Trans.* 1:1250-1252.

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

Herrn Prof. Dr. H. Sahm danke ich für die Überlassung des Themas, seine Anregungen und das Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. M. v. Ciriacy-Wantrup danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Bernd Eikmanns für die engagierte Betreuung, die wertvollen Ratschläge und Diskussionsbeiträge, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. R. Krämer danke ich für zahlreiche anregende Diskussionen und wertvollen Hinweise. Bei Frau Dr. Marcella Gutmann möchte ich mich für die Einführung in die Glutamat-Fermentation und Glutamatbestimmung bedanken.

Eva Kleinertz, Petra Peters-Wendisch, Dr. Peter Stahmann, Dieter Reinscheid, Doris Rittmann, Jörg Schwinde und Natalie Thum-Schmitz danke ich für die stetige Hilfsbereitschaft und die kameradschaftliche und schöne Atmosphäre im Labor.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Biotechnologie gilt mein Dank für die freundliche Aufnahme und stets gewährte Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

JUL - 2929

Juli 1994

ISSN 0944-2952