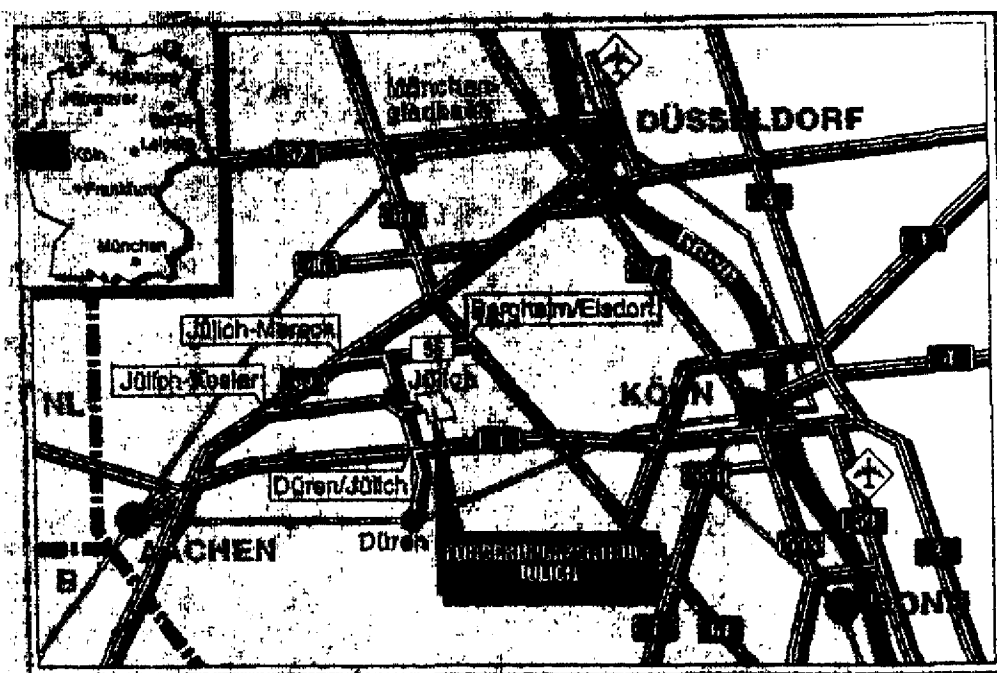


Institut für Biotechnologie

**Untersuchungen zur Aktivität der
2-Oxoglutarat-Dehydrogenase
von *Corynebacterium glutamicum* und
Charakterisierung des Gens für die
Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Untereinheit**

Jörg Schwinge



Berichte des Forschungszentrums Jülich : 3115

ISSN 0944-2952

Institut für Biotechnologie Jüli-3115

D 61 (Diss. Universität Düsseldorf)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

Telefon: 02461/61-6102 · Telefax: 02461/61-6103 · Telex: 833 555-70 kfa d

**Untersuchungen zur Aktivität der
2-Oxoglutarat-Dehydrogenase
von *Corynebacterium glutamicum* und
Charakterisierung des Gens für die
Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Untereinheit**

Jörg Schwinde

	Seite
INHALTSVERZEICHNIS	
I. EINLEITUNG	1
II. MATERIAL und METHODEN	8
1. Bakterienstämme und Plasmide	8 u. 9
2. Chemikalien	10
3. Nährmedien und Kulturbedingungen	11
4. Präparation und Reinigung von DNA	12
5. Analyse und Rekombination von DNA	13
6. Transformationstechniken	15
6.1. Transformation von Plasmid-DNA nach <i>E. coli</i>	15
6.2. Elektroporation von <i>C. glutamicum</i>	16
6.3. Konjugation von <i>E. coli</i> und <i>C. glutamicum</i>	16
7. Southern-Blot-Analyse	17
8. Präparation und Analyse von RNA	20
8.1. Isolierung von RNA aus <i>C. glutamicum</i>	20
8.2. Northern-Blot-Analyse	20
8.3. Transkriptionsstartbestimmung	22
9. DNA-Sequenzanalyse	24
9.1. Herstellung von Deletionsplasmiden	24
9.2. Nichtradioaktive Sequenzierung	24
9.3. Radioaktive Sequenzierung	25
9.4. Herstellung von Primern zur Sequenzierung	26
10. Bestimmung von Enzymaktivitäten	26
10.1. Herstellung von Rohextrakten und Proteinbestimmung	26
10.2. Aktivitätsmessung der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase und der Pyruvat-Dehydrogenase	27
10.3. Aktivitätsmessung der Dihydroliponamid-Dehydrogenase	27
10.4. Aktivitätsmessung der Galaktosid-Acetyltransferase	27
11. Reinigung und Charakterisierung der Dihydroliponamid-Dehydrogenase	28

	Seite
III. ERGEBNISSE	29
1. Nachweis der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase aus <i>C. glutamicum</i>	29
1.1. Biochemische Charakterisierung der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase in Zellextrakten von <i>C. glutamicum</i>	31
1.2. Einfluß der Kohlenstoffquelle auf die spezifische Aktivität der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase aus <i>C. glutamicum</i>	33
1.3. Einfluß der Kohlenstoffquelle auf die spezifische Aktivität der Pyruvat-Dehydrogenase aus <i>C. glutamicum</i>	35
2. Isolierung und Charakterisierung des Gens für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase (E3) aus <i>C. glutamicum</i>	36
2.1. Versuche zur Isolierung der Gene, die für die Untereinheiten der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase aus <i>C. glutamicum</i> kodieren	36
2.2. Identifizierung des Gens für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus <i>C. glutamicum</i> durch Southern-Hybridisierung mit DNA-Oligonukleotidsonden	37
2.3. Isolierung des chromosomalen DNA-Fragmentes, das das Gen für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus <i>C. glutamicum</i> trägt	40
2.4. Restriktionskartierung und Subklonierung des chromosomalen DNA-Fragmentes, das das Gen für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus <i>C. glutamicum</i> trägt	42
2.5. Southern-Blot-Analyse des Gens für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus <i>C. glutamicum</i> mit einer homologen DNA-Sonde	44
2.6. Sequenzierung und Charakterisierung des Gens für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus <i>C. glutamicum</i>	45
2.7. Vergleich der Aminosäuresequenz der Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus <i>C. glutamicum</i> mit entsprechenden Sequenzen aus anderen Organismen	48
2.8. Überexpression des Gens für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus <i>C. glutamicum</i>	50
2.9. Aktivitäten der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase und der Pyruvat-Dehydrogenase aus <i>C. glutamicum</i> bei Überexpression des Gens für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase	52
2.10. RNA-Analysen am Gen für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus <i>C. glutamicum</i>	53
3. Isolierung der Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus <i>C. glutamicum</i>	60
4. Inaktivierung des Gens für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase im Chromosom von <i>C. glutamicum</i>	63

	Seite
5. Analyse des DNA-Bereiches vor dem Gen für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus <i>C. glutamicum</i>	66
5.1. Isolierung und Sequenzierung des DNA-Bereiches vor dem Gen für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus <i>C. glutamicum</i>	66
5.2. Untersuchungen zur Funktion des vor dem Gen für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus <i>C. glutamicum</i> liegenden DNA-Bereiches (<i>orfY</i>)	70
IV. DISKUSSION	72
V. ZUSAMMENFASSUNG	80
VI. LITERATUR	81

ABKÜRZUNGEN

<i>aceE</i>	Gen für die Pyruvat-Decarboxylase
<i>aceF</i>	Gen für Dihydroliponamid-Acetyltransferase
Amp ^R	Ampicillinresistenz
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosid-5'-triphosphat
DTNB	Dithionitrobenzoesäure
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
Kan ^R	Kanamycinresistenz
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
K _M	Michaelis-Konstante
<i>lacA</i>	Gen für die (Thio-)Galaktosid-Transacetylase
LB	Luria-Bertani-Medium
Lip	Liponamid
<i>lpd</i>	Gen für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MM	Minimalmedium
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
NAD(H)	β-Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)
NADP(H)	β-Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduzierte Form)
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
OD ₆₀₀	optische Dichte bei λ = 600 nm
2-OGDH	2-Oxoglutarat-Dehydrogenase
PDH	Pyruvat-Dehydrogenase
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
rpm	Umdrehungen pro Minute
ssp.	Subspezies
<i>sucA</i>	Gen für die 2-Oxoglutarat-Decarboxylase
<i>sucB</i>	Gen für die Dihydroliponamid-Succinyltransferase
ThDP	Thiamin-Diphosphat
TTP	Thymidin-5'-triphosphat
Tris	2-Amino-Hydroxymethylpropan-1,3-Diol
U	Enzymeinheit
UTP	Uridin-5'-triphosphat
VADH	Verzweigt-kettige-Aminosäure-Dehydrogenase
Vol.	Volumen

I. EINLEITUNG

Corynebacterium glutamicum wurde 1957 von Kinoshita isoliert (Kinoshita *et al.*, 1957). Das Gram-positive Bakterium ist aerob, biotinbedürftig, unbeweglich und bildet keine Sporen. Abhängig vom physiologischen Zustand ist es von stäbchen- bis keulenförmiger Gestalt (Collins und Cummins, 1986). Chemotaxonomische Merkmale sind die Zellwandbestandteile Galaktose, Arabinose, freie kurzkettige Mykolsäuren sowie meso-Diaminopimelinsäure, durch die die Bestandteile des Peptidoglukangerüsts miteinander verknüpft sind (Keddie und Cure, 1977). Das *C. glutamicum*-Genom weist eine Größe von ungefähr 3000 kb (Correia *et al.*, 1994) und einen G+C-Gehalt von 54.6 % auf (Liebl *et al.*, 1991). *C. glutamicum* zählt ebenso wie *C. glutamicum* ssp. *flavum* und *C. glutamicum* ssp. *lactofermentum* wegen ihrer gemeinsamen Eigenschaft, unter bestimmten Bedingungen Glutamat auszuscheiden, zu den Glutamat-produzierenden Bakterien. Obwohl alle drei Stämme einer Spezies angehören, ist eine Differenzierung durch die Analyse der Zellwandlipide (Liebl *et al.*, 1991) und DNA-Fragment-Längenpolymorphismus (Eikmanns *et al.*, 1991a) möglich. Die Glutamat-Ausscheidung erfolgt z.B. unter Biotinmangel (Shiio *et al.*, 1962) oder durch Zugabe von Penizillin oder Detergenzien zum Wachstumsmedium (Takinami *et al.*, 1965; Nunheimer *et al.*, 1970; Huchenq *et al.*, 1984). Die Eigenschaft, Glutamat auszuscheiden, hat dazu geführt, daß *C. glutamicum* für die biotechnologische Herstellung dieser Aminosäure erhebliche Bedeutung erlangt hat (400 000 t/ Jahr). Außer Glutamat können von einigen *C. glutamicum*-Mutanten auch andere L-Aminosäuren ausgeschieden werden. Dazu zählen die essentiellen Aminosäuren L-Lysin, L-Threonin, L-Isoleucin, L-Histidin, L-Tryptophan und L-Phenylalanin, die in der Futtermittelindustrie oder in der Medizin als Supplemente in Infusionslösungen Verwendung finden (Kleemann *et al.*, 1985). Glutamat dient in der Nahrungsmittelindustrie als Geschmacksverstärker und Würzmittel. Die Glutamat-bildenden Enzyme Glutamat-Dehydrogenase und das Glutamin-Synthetase-/ Glutamat-Synthase-System wurden in *C. glutamicum* (Shiio und Ozaki, 1970; Sung *et al.*, 1984; Tochikura *et al.*, 1984; Ertan, 1992a, 1992b; Börmann EL-Kholy *et al.*, 1993) ausgiebig untersucht. Direkte Vorstufe in der Glutamatbiosynthese ist 2-Oxoglutarat, ein Zwischenprodukt des Tricarbonsäurezyklus (TCS-Zyklus). 2-Oxoglutarat ist aber auch das Substrat für die 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase (2-OGDH), sodaß an dieser Stelle eine Konkurrenzsituation zwischen der Glutamatbildung und dem weiteren Verlauf des TCS-Zyklus auftritt (**Abbildung 1**).

Innerhalb des TCS-Zyklus katalysiert die 2-OGDH die oxidative Decarboxylierung von 2-Oxoglutarat unter Bildung von Succinyl-CoA, $\text{NADH} + \text{H}^+$ und CO_2 . Der Reaktionsmechanismus ist in **Abbildung 2** schematisch dargestellt.

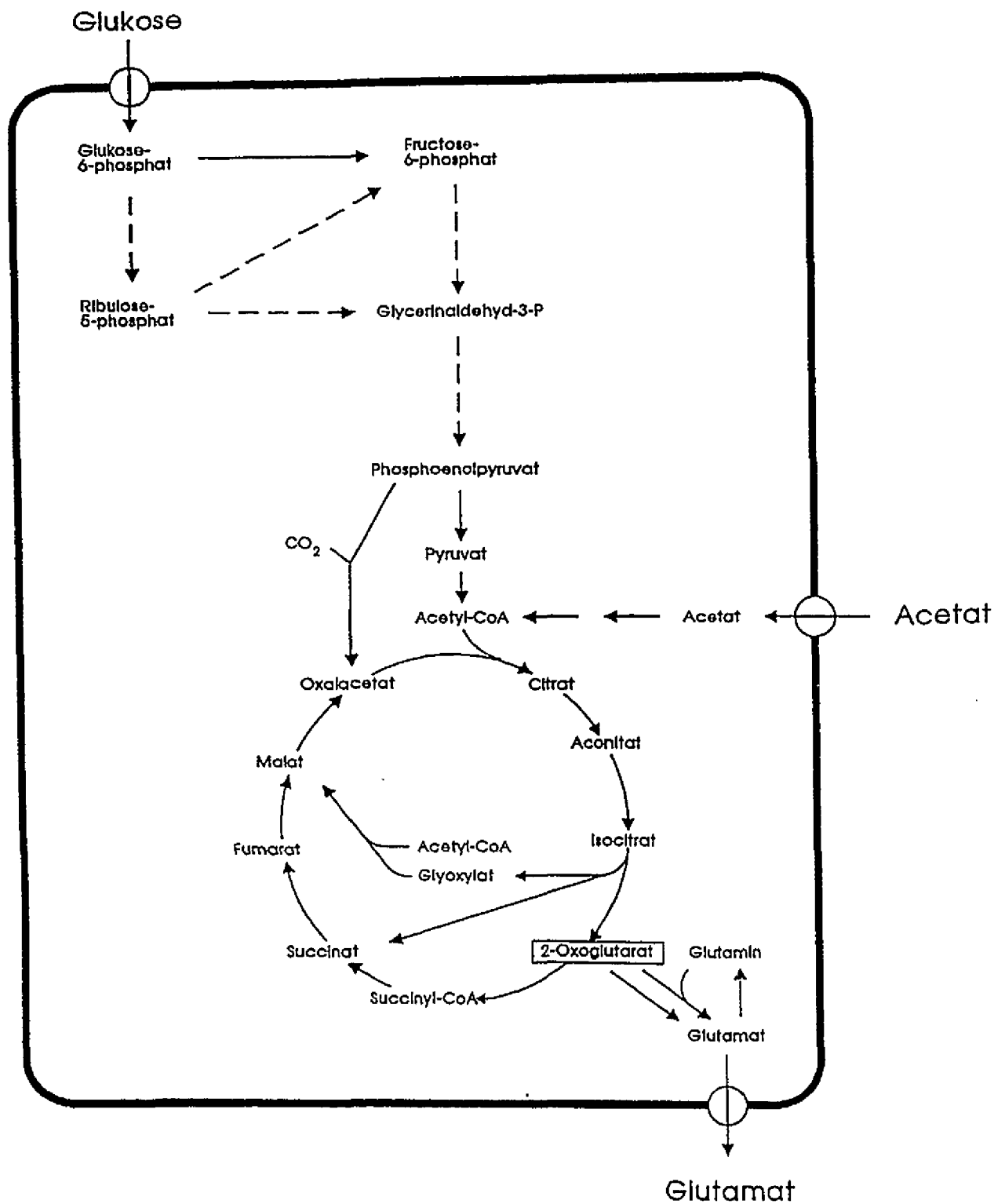


Abb. 1: Reaktionen des Zentralstoffwechsels und der Glutamatbiosynthese von *C. glutamicum*. Der Verzweigungspunkt zum Glutamat ist durch eine Rahmung hervorgehoben.

Die Katalyse findet in drei Schritten an den drei katalytisch aktiven Untereinheiten (UE) der 2-OGDH statt, nämlich an der 2-Oxoglutarat-Decarboxylase (E1) (EC 1.2.4.2), der Dihydroliponamid-Succinyltransferase (E2) (EC 2.3.1.6.1) und der Dihydroliponamid-Dehydrogenase (E3) (EC 1.8.1.4). E1 besitzt als Cofaktor Thiamin-Diphosphat (ThDP), E2 enthält Liponamid als prosthetische Gruppe und E3 ist eine flavinabhängige Oxidoreduktase. Im ersten Reaktionsschritt wird 2-Oxoglutarat decarboxyliert. Der verbleibende Hydroxybutyryl-Rest bleibt zunächst am Thiamin gebunden, wird anschließend auf das Liponamid von E2 übertragen und danach auf das CoA transferiert, sodaß Succinyl-CoA gebildet wird. Die prosthetische Gruppe von E2 bleibt als Dihydroliponamid zurück und wird im dritten Schritt oxidiert. E3 katalysiert diese Reaktion, in der $\text{NADH} + \text{H}^+$ entsteht.

E2 spielt aber nicht nur eine katalytische Rolle, sondern bildet das strukturelle Herzstück des Enzymkomplexes, indem an ihre Oberfläche die E1- und E3-Untereinheiten durch nichtkovalente Wechselwirkungen binden. Das Liponamid, die prosthetische Gruppe von E2, kann als "schwingender Arm" das Substrat zwischen den jeweiligen katalytischen Zentren der Untereinheiten vermitteln (Koike *et al.*, 1963; Bleile *et al.*, 1979; Oliver und Reed, 1982). Aufgrund des Bau- und des Funktionsprinzips zählt die 2-OGDH zu den 2-Oxosäure-Dehydrogenase-Komplexen, die allesamt Multienzymkomplexe sind und aus E1, E2 und E3-Untereinheiten bestehen (Perham und Packman, 1989).

Zu diesen Multienzymkomplexen gehören neben der 2-OGDH die Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) (Mattevi *et al.*, 1992; Behal *et al.*, 1993) und die Verzweigtkettige-Aminosäure-Dehydrogenase (VADH) (Randle *et al.*, 1987).

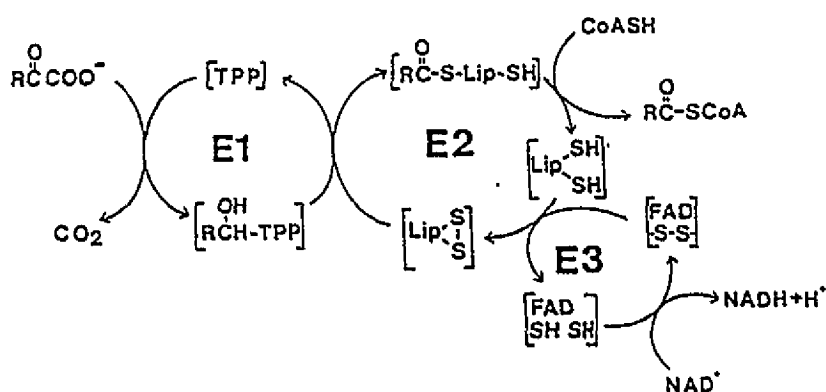


Abb. 2: Reaktionsmechanismus der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase an den drei katalytisch aktiven Untereinheiten 2-Oxoglutarat-Decarboxylase (E1), Dihydroliponamid-Succinyl-Transferase (E2) und Dihydroliponamid-Dehydrogenase (E3). Legende: R = $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}^-$, TPP = Thiaminpyrophosphat, Lip = Liponamid, FAD = Flavinadenin-Dinukleotid.

Auch bei diesen beiden Enzymkomplexen ordnen sich die zwei katalytisch aktiven Untereinheiten E1 und E3 um das jeweilige E2 zum Multienzymkomplex an. Die Substratspezifität beruht dabei auf E1 und E2, während E3 in allen Fällen für die Reoxidation des Dihydroliponamids zuständig ist. Dabei ist E3 in den verschiedenen Komplexen eines jeweiligen Organismus identisch. Eine Ausnahme stellt *Pseudomonas putida* dar. In diesem Organismus gibt es drei verschiedene E3-Untereinheiten, von denen eine Bestandteil der 2-OGDH und der PDH, und eine weitere Bestandteil der VADH ist (Burns *et al.*, 1989). Die Rolle der dritten Iso-Form ist unbekannt. Eine andere Variante stellt *A. eutrophus* dar, wo es Hinweise auf ebenfalls drei unterschiedliche E3-Untereinheiten gibt. Je ein E3 ist dabei spezifisch für die 2-OGDH, die PDH und für das Acetoin-Dehydrogenase-System (Priefert *et al.*, 1991; Silke Hein, persönliche Mitteilung).

Bei der 2-OGDH besteht in allen beschriebenen Organismen die katalytisch aktive E1-Untereinheit aus Homodimeren mit einem relativen Molekulargewicht (M_r) von ungefähr 220 000 (Darlison *et al.*, 1984). E2 setzt sich aus katalytisch aktiven Monomeren zusammen, mit einem jeweiligen M_r von ungefähr 45 000 (Robien *et al.*, 1992). E3 bildet ebenfalls Homodimere, die ein M_r von ungefähr 100 000 haben (Yeaman, 1989). In *Escherichia coli* besteht der Gesamtkomplex aus 24 E2-Polypeptidketten um die sich jeweils 6 Dimere von E1 und E3 anordnen, sodaß das relative Molekulargewicht für die 2-OGDH aus *E. coli* ungefähr 2 500 000 beträgt (Reed, 1974).

Die 2-OGDH wurde in verschiedenen Prokaryonten, z.B. in *E. coli* (Langley und Guest, 1978), *Azotobacter vinelandii* (Schulze *et al.*, 1990) und *Bacillus subtilis* (Ohné, 1975), aber auch in Eukaryonten, z.B. *Saccharomyces cerevisiae* (Dickinson *et al.*, 1986) und unterschiedlichen Säugetiergeweben nachgewiesen (Pawelczyk und Angielski, 1991; Smith *et al.*, 1992). Für die Mehrzahl der untersuchten 2-OGDH stellte sich eine NAD^+ -Abhängigkeit heraus. In denitrifizierenden *Pseudomonas*-Stämmen jedoch wurde eine 2-OGDH beschrieben, der je nach Wachstumsbedingungen NAD^+ oder $NADP^+$ -abhängig ist (Ziegler *et al.*, 1987). Es konnte gezeigt werden, daß denitrifizierende Pseudomonaden bei anaerobem Wachstum auf aromatischen Bestandteilen eine $NADP^+$ -abhängige 2-OGDH besitzen, während unter aeroben Bedingungen auf nichtaromatischen Bestandteilen eine NAD^+ -abhängige 2-OGDH benutzt wird (Lochmeyer und Fuchs, 1991). Da die Reduktion der Pyrimidinnukleotide von der E3-Untereinheit katalysiert wird, diskutieren die Autoren die Existenz zweier verschiedener E3, die je nach Wachstumsbedingungen an einem einzigen Enzymkomplex beteiligt sind.

Für die Synthese der drei an der 2-OGDH beteiligten Untereinheiten sind die Gene *sucA* (E1), *sucB* (E2) und *lpd* (E3) verantwortlich. Vollständig konnten die Gene bereits aus *E. coli* (Stephens *et al.*, 1983; Darlison *et al.*, 1984; Spencer *et al.*, 1984), *A. vinelandii* (Westphal und de Kok, 1987; Schulze *et al.*, 1989; Westphal und de Kok, 1989) und *B. subtilis* (Carlsson und Hederstedt, 1989; Hemilä *et al.*, 1990; Resnekov *et al.*, 1992)

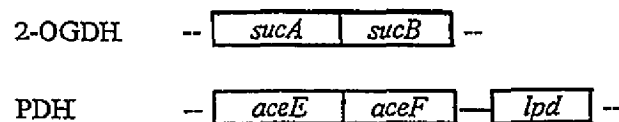
isoliert und charakterisiert werden. Für *B. subtilis* werden die Gene für E1 und E2 der 2-OGDH mit *odhA* und *odhB* bezeichnet. Die Gene der ersten beiden Untereinheiten der 2-OGDH sind in den bisher beschriebenen Fällen in einem Operon organisiert. Im Falle von *A. vinelandii* liegt auch das *lpd*-Gen in diesem Operon (Abbildung 3). Im Chromosom von *E. coli* und *B. subtilis* besteht eine andere Organisation: Das Gen für E3 liegt in Nachbarschaft zu den Genen, die für die Untereinheiten der PDH kodieren und, die ebenfalls in einem Operon organisiert sind (Abbildung 3). Die Gene für E1 und E2 der PDH werden für *E. coli* und *A. vinelandii* mit *aceE* und *aceF* bezeichnet. In *B. subtilis* besteht E1 der PDH aus den Heterodimeren E1 α und E1 β , die durch die Gene *pdhA* und *pdhB* kodiert werden. Das Gen für E2 heißt hier *pdhC* und für E3 *pdhD* (Perham und Packman, 1989; Borges *et al.*, 1990).

In derzeitigen Arbeiten ist die 2-OGDH eher Gegenstand von Isolierungsversuchen auf proteinchemischer und genetischer Ebene, sodaß zur Beschreibung von Regulationsphänomenen auf vergleichsweise ältere Studien verwiesen wird: In *E. coli* und *B. subtilis* wurde festgestellt, daß die Aktivität der 2-OGDH auf Glukose-haltigen Wachstumsmedien geringer war als auf Glukose-freien Medien (Amarasingham und Davis, 1965; Gray *et al.*, 1966; Fortnagel und Freese, 1968). Untersuchungen in *B. subtilis* ergaben, daß die Unterschiede in den Enzymaktivitäten auf einer Transkriptionsregulation der Gene *odhA* und *odhB* beruhen (Resnekov *et al.*, 1992). In *E. coli* wurde beobachtet, daß unter anaeroben Bedingungen die 2-OGDH nicht mehr nachgewiesen werden konnte, was darauf deuten könnte, daß die entsprechenden Gene bei Anaerobiose nicht exprimiert werden (Amarasingham und Davis, 1965; Yamamoto und Ishimoto, 1975).

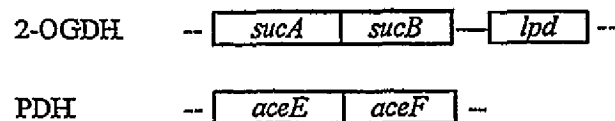
Für viele 2-OGDH konnte gezeigt werden, daß sie auf enzymatischer Ebene durch die Endprodukte Succinyl-CoA und NADH gehemmt werden und, daß die Hemmung durch CoA und NAD⁺ aufgehoben wird (Garland, 1964). Es wurde vorgeschlagen, daß diese Regulation *in vivo* auf dem Verhältnis von Succinyl-CoA/ CoA und NADH+H⁺/ NAD⁺ beruht (Reed, 1974). Außerdem wird die Aktivität des Enzymkomplexes durch ATP oder GTP gehemmt und durch ADP stimuliert (Denton *et al.*, 1978; McCormack und Denton, 1979; Lawlis und Roche, 1981). An der 2-OGDH aus Säugetierzellen, wo der Komplex in den Mitochondrien vorliegt, wurde gezeigt, daß die 2-OGDH unter der Kontrolle von Hormonen steht, die die intramitochondriale Ca²⁺-Konzentration beeinflussen wie Adrenalin in Herzzellen oder Vasopressin in Leberzellen (Rutter *et al.*, 1990). Der Effekt der Ca²⁺-Ionen beruht dabei auf einer allosterischen Aktivierung, indem der K_s-Wert für das Substrat 2-Oxoglutarat erniedrigt wird (McCormack und Denton, 1990). Eine Modifikation der 2-OGDH durch reversible Phosphorylierung, wie sie für eukaryotische PDH nachgewiesen wurde, ist bisher weder für prokaryotische noch für eukaryotische 2-OGDH beschrieben worden (Roche *et al.*, 1989; Patel und Roche, 1990).

Obwohl die 2-OGDH eine Schlüsselposition im TCS-Zyklus einnimmt, ist über sie fast nichts in *C. glutamicum* bekannt. Das ist sehr erstaunlich, weil der Enzymkomplex eine Reaktion an der Verzweigungsstelle zur Glutamatbiosynthese katalysiert. Es wurde angenommen, daß *C. glutamicum* keine 2-OGDH besitzt und, daß ein unvollständiger TCS-Zyklus die Voraussetzung darstellt, Glutamat in großen Mengen bilden zu können (Kinoshita und Tanaka, 1972). Den ersten Hinweis auf eine funktionsfähige 2-OGDH in Glutamat-bildenden Bakterien gab es in *C. glutamicum* ssp. *flavum* (Shiio und Ujigawa-Takeda, 1980). Die Autoren gaben als Grund für die Schwierigkeit beim Nachweis die Instabilität des Enzymkomplexes an.

Escherichia coli:



Azotobacter vinelandii:



Bacillus subtilis:

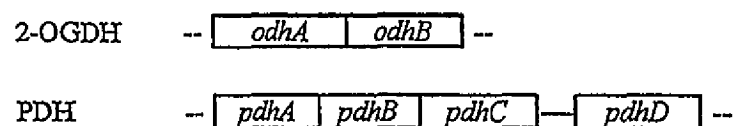


Abb. 3: Lokalisation der Gene für die Untereinheiten der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase (2-OGDH) und der Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) im Genom der Organismen *E. coli*, *A. vinelandii* und *B. subtilis*. *sucA* kodiert für die 2-Oxoglutarat-Decarboxylase und *sucB* für die Dihydroliponamid-Succinyltransferase. *aceE* enthält die genetische Information für die Pyruvat-Decarboxylase und *aceF* für die Dihydroliponamid-Acetyltransferase. *lpd* kodiert für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase. In *B. subtilis* werden die entsprechenden 2-OGDH-Gene mit *odhA* und *odhB* bezeichnet. Ferner besteht in *B. subtilis* die Pyruvat-Decarboxylase aus Heterodimeren, die durch die Gene *pdhA* (α -Kette) und *pdhB* (β -Kette) kodiert werden. *pdhC* kodiert hier für die Dihydroliponamid-Acetyltransferase und *pdhD* für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase.

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die 2-OGDH aus *C. glutamicum* enzymatisch nachzuweisen und Untersuchungen zu ihrer Aktivität durchzuführen. Es wurde der Frage nachgegangen, ob die Expression der für die katalytisch aktiven Untereinheiten E1, E2 und E3 kodierenden Gene in *C. glutamicum* reguliert wird. Die molekulargenetischen Arbeiten zielten darauf ab, die Gene *sucA*, *sucB* und *lpd* zu isolieren, wobei der Schwerpunkt der Versuche auf die Isolierung und die Charakterisierung des *lpd*-Gens gelegt wurde. Ferner war es interessant, zu untersuchen, ob durch die Überexpression oder die Inaktivierung des *lpd*-Gens Einfluß auf die Aktivität der 2-OGDH in *C. glutamicum* genommen werden kann.

II. MATERIAL und METHODEN

1. Bakterienstämme und Plasmide

In der vorliegenden Arbeit wurden die in **Tabelle 1** aufgeführten *E. coli*- und *C. glutamicum*-Stämme verwendet. In **Tabelle 2** sind die verwendeten Plasmide aufgelistet.

Tab. 1: *E. coli*- und *C. glutamicum*-Stämme mit ihren chromosomalen Markern.

Stamm	Relevante Eigenschaften	Referenz
<i>E. coli</i> DH5	<i>supE44</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	Hanahan, (1985)
<i>E. coli</i> S17-1	<i>thi-1</i> , F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , λ ⁻ , <i>pro</i>	Simon <i>et al.</i> , (1983)
<i>E. coli</i> JRG465	F ⁻ , <i>sucA</i> , <i>gal-25</i> , <i>trpA9767</i> <i>iclR7</i> , <i>trpR47</i> , IN(<i>rrnD</i> - <i>rrnE</i>)1, λ ⁻	Herbert und Guest, (1969)
<i>E. coli</i> Wsuc17	F ⁻ , <i>sucB9</i> , λ ⁻	Herbert und Guest, (1969)
<i>E. coli</i> JRG301	F ⁻ , <i>lpd</i> , <i>trpA58</i> , <i>trpE61</i>	Guest und Creaghan, (1974)
<i>C. glutamicum</i> ATCC13032	Wildtyp	Abe <i>et al.</i> , (1967)

Tab. 2: Plasmide mit ihren Eigenschaften und Markern.

Plasmid	Marker	Referenz
pUC18	Amp ^R , <i>ori</i> <i>colE1</i>	Vieira und Messing, (1982)
pUC18 lpd5.4	Amp ^R , pUC18-Derivat mit 5.4kb- <i>Bam</i> HI-Fragment aus chromosomaler DNA von <i>C. glutamicum</i>	Diese Arbeit
pUC18 lpd3.4	Amp ^R , pUC18-Derivat mit 3.4kb- <i>Kpn</i> I-Fragment aus chromosomaler DNA von <i>C. glutamicum</i>	Diese Arbeit
pEKO	Kan ^R , <i>ori</i> pBL1	Eikmanns <i>et al.</i> , (1991)
pEKO lpd5.4	Kan ^R , pEKO-Derivat mit 5.4kb- <i>Bam</i> HI-Fragment aus pUC18 lpd5.4	Diese Arbeit
pEKO orfY	Kan ^R , pEKO-Derivat mit 3.4kb- <i>Kpn</i> I-Fragment aus pUC18 lpd3.4	Diese Arbeit
pGEM4Z TM	Amp ^R , <i>ori</i> <i>colE1</i> , Promotoren für die SP6- u. T7-RNA-Polymerasen	Promega, Heidelberg
pGEM lpd1.1	Amp ^R , pGEM4Z TM -Derivat mit 1.1kb- <i>Sca</i> I/ <i>Sac</i> I-Fragment aus pUC18 lpd5.4	Diese Arbeit
pGEM lpd0.77	Amp ^R , pGEM4Z TM -Derivat mit 0.77kb- <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI-Fragment aus pUC18 lpd5.4	Diese Arbeit
pEM1	Kan ^R	Schrumpf <i>et al.</i> , (1991)
pEM1 lpd0.45	Kan ^R , pEM1-Derivat mit 0.45kb- <i>Sca</i> I/ <i>Eco</i> RI-Fragment aus pUC18 lpd5.4	Diese Arbeit

2. Chemikalien

Soweit nicht angegeben, wurden analysenreine Chemikalien des Herstellers Merck AG, Darmstadt, verwendet. Restriktionsendonukleasen und weitere Enzyme wurden von der Firma Boehringer Mannheim bezogen. Die Produkte anderer Hersteller sind im Folgenden aufgeführt.

Amersham-Buchler-USB, Braunschweig: [α - ^{35}S]dATP; [α - ^{35}S]CTP

Appligene, Heidelberg: Phenol, sauer, wassergesättigt

Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg: Agarose; Phenol

Biomol, Feinchemikalien, Hamburg: NADPH, reduziert, Na_4 -Salz; NADH, reduziert; 3-N-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)

Boehringer Mannheim: Ampicillin, Na_2 -Salz; ATP; Chloramphenicol, kristallin; Dithiothreitol, kristallin; NAD^+ , freie Säure; NADP^+ , Na_2 -Salz; Nonradioactive DNA Labeling and Detection Kit; Nonradioactive RNA Labeling and Detection Kit; pUC18 Sequencing Kit; SP6/ T7 Transcription Kit; DIG Oligonucleotide Tailing Kit; Tetracyclin Hydrochlorid

Dianova, Hamburg: GENE CLEAN Kit (Bio101 Inc., La Jolla, Ca, USA)

Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA: Bacto-Agar; Bacto-Trypton; Bacto-Peptone; Brain-Heart-Infusion-Medium; Hefe-Extrakt

Gibco BRL Life Technologies Inc., Eggenstein: RNA Größenmarker (0.24-9.49kb)

Pharmacia LKB, Freiburg: NAP-10 Säulen; AutoRead-Sequencing Kit

Promega, Heidelberg: Erase-a-Base Exonuclease Kit; Ribonuclease Inhibitor (RNasin); RNA-Größenmarker (0.36-9.5)

Schleicher und Schuell, Dassel: NL17 Membranfilter 0.45 μm (Filter für Konjugation); Nytran-Nylonfilter N13

Serva Feinbiochemica, Heidelberg: Acrylamid; Agarose; Bisacrylamid; Harnstoff; Natriumdodecylsulfat (SDS); Rinderserumalbumin; Nalidixinsäure; Sordolit; Serva-Blue

Sigma Chemie München: Ethidiumbromid; threo-(D,L)-Isocitrat; N-Laurylsarcosin (Na -Salz); N,N,N',N'-Tetraethylendiamin (TEMED), Tween 80; Coenzym A; Succinyl-CoA

United States Biochemicals: Sequenase-Sequenzierungs-Kit

3. Nährmedien und Kulturbedingungen

Die Kultivierung der *E. coli*-Stämme erfolgte in den Komplexmedien 2 x TY (Trypton, 16 g/l; Hefeextrakt, 10 g/l; NaCl, 5 g/l) oder Luria-Bertani (LB)-Medium (Trypton, 10 g/l; Hefeextrakt, 5 g/l; NaCl, 10 g/l) (Sambrook *et al.*, 1989). Für *E. coli* wurde M9-Medium als Minimalmedium verwendet (Sambrook *et al.*, 1989). Das Medium besteht aus 100 ml M9-Stammlösung (Na₂HPO₄, 60 g/l; KH₂PO₄, 30 g/l; NH₄Cl, 10 g/l; NaCl, 5 g/l; pH 7.45 und 867 ml H₂O, 30 ml Glukose (20%), 0.1 ml CaCl₂ (1M), 2 ml MgSO₄ (1M) und 1 ml Thiamin-HCl (170 mg/ml) wurden nach dem Autoklavieren steril hinzugefügt. Die Medien für die *E. coli*-Mutanten, die einen Defekt in den *sucA*-, *sucB*- oder *lpd*-Genen tragen, enthielten zusätzliche Supplemente: *E. coli* JRG465 (50 mM Succinat; 5 mM L-Tryptophan), *E. coli* Wsuc17 (50 mM Succinat) und *E. coli* JRG301 (je 50 mM Succinat und Acetat; 5mM L-Tryptophan). Die *C. glutamicum*-Stämme wurden ebenfalls auf den beschriebenen 2 x TY- und LB-Komplexmedien gezüchtet. Bei IPTG-induzierenden Bedingungen wurden *C. glutamicum*-Zellen auf 2 x TY-Komplexmedium bis zu einer OD₆₀₀ von 2 gezüchtet, dem Wachstumsmedium 0.5 mM IPTG (final) hinzugefügt, 2 h inkubiert und die Zellen dann geerntet. Als Selektivmedium für *C. glutamicum*-Zellen nach der Konjugation wurde BHI-Medium (Brain-Heart-Infusion, 37 g/l) verwendet. Als Regenerationsmedium nach der Elektroporation diente BHIS-Medium (Brain-Heart-Infusion, 37 g/l; 0.5 M Sorbit) nach Liebl *et al.* (1989). Feste Nährböden enthielten zusätzlich Agar (18 g/l). Zur Kultivierung der *C. glutamicum*-Stämme wurde CgC-Minimalmedium verwandt: (3-N-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS), 37 g/l; (NH₄)₂SO₄, 5 g/l; Harnstoff, 5 g/l; K₂HPO₄, 5 mg/l; KH₂PO₄, 5 mg/l; MgSO₄, 0.25 g/l; CaCl₂, 0.01 g/l; Biotin, 0.2 mg/l; 1 ml Spurenelementelösung [FeSO₄, 1g/l; MnSO₄, 1 g/l; ZnSO₄, 0.1 g/l; CuSO₄, 0.02 g/l; NiCl, 0.002g/l; in 100 ml H₂O dest. gelöst], pH 6.3 (Eikmanns *et al.*, 1991b). Die speziell genannten Kohlenstoffquellen wurden steril nach dem Autoklavieren hinzugefügt. Diente Glutamat bei der Anzucht von *C. glutamicum* als alleinige Kohlenstoff- und/ oder Stickstoffquelle wurde dem Minimalmedium kein Ammoniumsulfat und kein Harnstoff zugegeben, aber zusätzlich Protokatechuat, 30 mg/l; FeSO₄, 1 mg/l; und FeCl₂, 0.3 mg/l.

Wenn nicht anders beschrieben, erfolgte die Kultivierung der *E. coli*- und *C. glutamicum*-Stämme in 500ml-Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen, die 60 ml Medium enthielten. Die Kulturen wurden bei 120 rpm auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Die Kultivierungstemperatur betrug für *E. coli* 37°C und für *C. glutamicum* 30°C. Zur Stammhaltung dienten Glyzerinkulturen, die aus 70% (v/v) einer Übernachtskultur und 30% (v/v) einer sterilen Glyzerinlösung angelegt wurden. Die Lagerung erfolgte bei -70°C. Die Glyzerinkulturen dienten zum Animpfen der Stammhaltungsplatten, die bei 4°C gelagert und monatlich erneuert wurden.

Für die Kultivierung der *C. glutamicum*-Stämme unter Biotinlimitierung wurden diese auf CgC-Minimalmedium mit Biotin (10 µg/ l) und 4% Glukose vorgezüchtet bis sie eine OD₆₀₀ von 20 erreicht hatten. Anschließend wurden damit die Hauptkulturen auf CgC-Medium, das Biotin (1 µg/ l) und 4% Glukose enthielt, mit einer OD₆₀₀ von 0.3 angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 120 rpm im Laborschüttler (Modell Kühner, B. Braun, Melsungen).

4. Präparation und Reinigung von DNA

Plasmidpräparation aus *E. coli*

Zur schnellen Isolierung von Plasmid-DNA diente eine abgewandelte Methode nach Birnboim (1983). 1.5 ml einer Übernachtskultur wurden durch Zentrifugieren (6000 rpm; 30 s; RT) geerntet. Das Zellpellet wurde in 100 µl eisgekühlter Lösung A (50 mM Glukose; 25 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA, pH 8.0) resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Daraufhin wurden 200 µl Lösung B (0.2 N NaOH, 1 % SDS) hinzugegeben und der Ansatz nach gründlichem Durchmischen 5 min auf Eis inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 150 µl Lösung C (5 M Kaliumacetat, 1.8 M Essigsäure). Der Präparationsansatz wurde gründlich durchmischt und erneut 5 min auf Eis belassen. Mit diesem Schritt wird der größte Teil der Proteine und die chromosomale DNA ausgefällt. Nach Zentrifugieren (13000 rpm, 10 min 4°C) wurde der wäßrige Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte 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 (SpeedVac 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.

Um Plasmid-DNA in größerem Maßstab und höherem Reinheitsgrad zu gewinnen, wurde eine modifizierte Methode nach Sambrook *et al.* (1989) angewandt. Dabei wurde die DNA durch alkalische Lyse aus einer 50-ml-Übernacht-Kultur gewonnen, Proteine und chromosomale DNA wurden, wie oben beschrieben, präzipitiert und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 0.5 Vol. Isopropanol gefällt. Das Präzipitat wurde in 2 ml H₂O resuspendiert und durch Zugabe von 2 ml 5 M LiCl₂/ 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 und 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 5 µl RNase A (10 mg/ ml in 10 mM Tris-HCl, pH 7.5/ 15 mM NaCl) vorge-nommen. Die folgende Reinigung und Fällung der Plasmid-DNA erfolgte wie oben beschrieben.

Plasmidpräparation aus *C. glutamicum*

Für den Aufschluß von *C. glutamicum* müssen die Zellen vorher mit Lysozym zum Abbau des Mureinsacculus inkubiert werden. Die Zellen einer 5ml-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, 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 bei *E. coli*.

Isolierung chromosomaler DNA aus *C. glutamicum*

Die Isolierung chromosomaler DNA aus *C. glutamicum* wurde mit einer modifizierten Methode nach Altenbuchner und Cullum (1984) durchgeführt. Dazu wurden *C. glutamicum*-Zellen über Nacht in 5 ml LB-Medium mit 0.5 % Glukose gezüchtet. Die Zellen wurden durch 10minütige 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 hinzugegeben. 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.

5. Analyse und Rekombination von DNA

Restriktion der DNA

Die DNA wurde zur Charakterisierung und/ oder Klonierung mit Restriktionsendonukleasen geschnitten. Inkubationspuffer und die optimale Reaktionstemperatur wurden anhand der Produktinformationen des Herstellers für die einzelnen Restriktionsenzyme gewählt. Der Standardrestriktionsansatz enthielt ungefähr 100 ng DNA, 1/ 10 Vol. 10 x 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 behandelt, 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 der Verdau zunächst in dem Reaktionspuffer mit der niedrigeren Salzkonzentration durchgeführt und anschließend der Puffer mit der höheren Salzkonzentration und das weitere Restriktionsenzym dem Ansatz zugefügt (Sambrook *et al.*, 1989). Nach Abschluß des Verdaus 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 Eichgerade erstellt und damit die Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente bestimmt werden. Die Herstellung der Agarosegele sowie die Durchführung der Gelelektrophorese 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 Gelelektrophorese wurden Elektrophoresekammern der Firma Gibco/ BRL, (Ort) verwendet und als Spannungsquelle diente ein Gleichstromgerät der Firma BioRad (Modell 100/ 200 Power-supply). Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das DNA-Agarosegel in wäßriger Ethidiumbromidlösung (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 orangerot 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 aufgereinigt werden. Die Methode beruht auf der Freisetzung der DNA aus der bei 50°C schmelzenden Agarose in Gegenwart von Natriumiodid. 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-Puffer, 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 aus *E. coli*. Sie besitzt 5' - 3' DNA-Polymerase-Aktivität, d.h. sie katalysiert in Gegenwart von Desoxynukleosidtriphosphaten die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einzelnen Nukleotiden, entsprechend eines 3' - 5' komplementären Stranges, der als Matrize dient. 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 Enden abbauen (Kornberg und Kornberg, 1974).

Die Reaktion wurde 30 min bei RT 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. Desoxynukleosid-triphosphat-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 Protein 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.

Ligation restringierter DNA

Zur Verknüpfung von DNA-Enden 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 ATP) 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 zur Transformation eingesetzt.

6. Transformationstechniken

6.1. Transformation von Plasmid-DNA nach *E. coli*

Zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen wurde eine Modifikation der von Sambrook *et al.* (1989) beschriebenen CaCl₂-Methode verwendet. Eine 50 ml-*E. coli*-Kultur in 2 x Ty-Medium wurde bei einer OD₆₀₀ von 0.5 durch Zentrifugation sedimentiert, in 15 ml (70 mM CaCl₂; 20 mM MgSO₄) aufgenommen und 30 min bei 0°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut durch Zentrifugation sedimentiert und in 4 ml (70 mM CaCl₂; 20 mM MgSO₄) resuspendiert. Aliquots wurden mit 20% Glycerin versetzt und bei -70°C gelagert. Für die Transformation wurden je 100 µl kompetente Zellen mit der zu transformierenden DNA versetzt. Nach 30minütiger Inkubation in Eiswasser erfolgte bei 42°C für 90 s ein Hitzeschock, währenddessen die Plasmid-DNA von den Zellen aufgenommen wurde.

Die Regeneration der Zellen und die Ausprägung der Antibiotika-Resistenz fand in je 500 μ l 2 x TY-Komplexmedium statt. Zur Selektion wurden die Zellen auf LB-Agarplatten mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert.

6.2. Elektroporation von *C. glutamicum*

Die Herstellung kompetenter *C. glutamicum*-Zellen zur Elektroporation erfolgte nach einer modifizierten Methode nach Haynes und Britz (1989). Es wurde dazu der entsprechende Stamm in 500 ml LB-Medium, 4 mg/ml Isonikotinsäurehydrazid, 2.5% Glycerin und 0.1% Tween 80 bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 gezüchtet, anschließend 20 min auf Eis inkubiert und durch Zentrifugation bei 4°C sedimentiert. Die Zellen wurden einmal mit 250 ml, zweimal mit 100 ml und einmal mit 50 ml 10 %igem Glycerin gewaschen, in 2 ml 10 %igem Glycerin aufgenommen, zu je 200 μ l auf 1.5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt und bei -70°C gelagert.

Die Elektroporation von *C. glutamicum* erfolgte nach einem Protokoll von Liebl *et al.* (1989). Die zur Elektroporation verwendeten Kammern wurden zunächst unter UV-Licht sterilisiert und anschließend bei 4°C vorgekühlt. An der Spannungsquelle zur Elektroporation (Bio-Rad, Gene-Pulser) wurden folgende Einstellungen vorgenommen: Widerstand: 200 W; Spannung: 2.5 kV; Kapazität: 25 mF. In eine Elektroporationskammer wurden 50 μ l kompetente *C. glutamicum*-Zellen gegeben und mit der zu transformierenden DNA vermischt. Nach erfolgter Elektroporation wurde der Ansatz mit 0.6 ml BHIS versetzt, die Suspension in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 50 min bei 30°C und bei 125 rpm geschüttelt. Von jedem der Elektroporationsansätze wurden zweimal 300 μ l auf BHIS-Kanamycin-Platten ausplattiert.

6.3. Konjugation von *E. coli* und *C. glutamicum*

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. Die DNA kann auch zwischen Zellen verschiedener Spezies durch Konjugation übertragen werden. Die Durchführung der Konjugation erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Schäfer *et al.* (1990). Der Rezipient *C. glutamicum* ATCC13032 (Wildtyp) wurde auf 70 ml LB-Medium gezüchtet. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ zwischen 5 und 10 wurden die Zellen 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 OD₆₀₀ von 0.05 überimpft. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ 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 10minütige Zentrifugation (4500 rpm, 4°C) sedimentiert.

Das Zellpellet wurde vorsichtig in 150 µl LB-Medium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension auf ein steriles Zellulosenitratfilter (NL17, 0.45 µm Porengröße, Schleicher und Schuell, Dassel), das auf eine LB-Platte plaziert worden war, transferiert. Die Kreuzungsansätze wurden dann 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, final) und dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und 48 h bei 30°C inkubiert. Da der *E. coli*-Donorstamm Nalidixinsäure-sensitiv ist, konnten auf diese Weise Donor und Rezipient voneinander getrennt werden.

7. 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 vakuumunterstützt 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 Anfärbung der Hybridbanden auf dem Filter oder- im Falle der Chemilumineszenz- durch Exposition auf einem Röntgenfilm nachgewiesen werden.

Vakuumunterstützter Transfer der DNA

Die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente auf einem 0.8 %igen Agarosegel erfolgte bei 20 V für 16 h. Anschließend wurden die DNA-Fragmente durch Vakuumunterstützte Diffusion mit einem VacuGen-Blotter (Pharmacia LKB, Freiburg) auf eine Nylonmembran transferiert. Dazu wurde die Membran auf die Größe des Agarosegels zugeschnitten, mit H₂O 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 plaziert. Anschließend wurde ein Vakuum von 50 mbar eingestellt. Das Gel wurde 4 min mit einer Depurinierungslösung (0.25 N HCl) überschichtet. Diese Lösung wurde durch eine Denaturierungslösung (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) ersetzt. Anschließend wurde das Gel 3 min mit einer ausreichenden Menge Neutralisierungslösung (1 M Tris; 2 M NaCl; konz. HCl, 75 ml/l; pH 5) 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. Zusätzlich wurde die Membran 2 bis 4 h bei 80°C inkubiert.

Digoxigenin-dUTP Markierung von DNA

DNA-Sonden wurden mit Digoxigenin-desoxy-11-uridintriphosphat (DIG-dUTP) unter Verwendung des "DIG DNA Labeling and Detection Kits" markiert. Dabei wurden DNA-Hexanukleotide an linearisierte, denaturierte DNA ("random-primed-Methode" nach Feinberg und Vogelstein, 1983) hybridisiert und in Anwesenheit der Desoxynukleotide dATP, dCTP, dGTP, dTTP und dem DIG-markierten dUTP mit Hilfe des Klenow-Enzyms ein DIG-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. Es folgte eine 16 stündige Inkubation 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 Äthanol-fällung präzipitiert.

Oligonukleotide für Southern-Hybridisierungen wurden ebenfalls DIG-markiert. Dazu wurde der "DIG Oligonucleotide Tailing Kit" (Schmitz *et al.*, 1991) verwendet. Zur Herstellung von markierten Oligonukleotiden wurden DIG-dUTPs und dATPs verwendet, die in einer Matrizen-unabhängigen terminalen Transferase-Reaktion mit dem Oligonukleotid verknüpft wurden. Für die Reaktion wurden folgende Komponenten in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß auf Eis zusammengegeben: 4 µl Reaktionspuffer (1 M Kaliumkacodylat; 0,125 M Tris-HCl; 1,25 mg/ml Rinderserumalbumin; pH 6,6), 4 µl CoCl₂, 100 pmole Oligonukleotid, 1 µl DIG-dUTP-Lösung, 1 µl dATP-Lösung, 1 µl terminale Transferase (50 U/µl). Die Mischung wurde auf 20 µl mit A. dest. aufgefüllt und 15 min bei 37°C inkubiert. Mit 2 µl einer Lösung aus 0,1 µg/µl Glykogen in 0,2 M EDTA, pH 8,0, wurde die Reaktion abgestoppt. Es folgte eine Äthanol-fällung. Die DNA wurde in einem finalen Volumen von 20 µl A. dest. zu einer Endkonzentration von 5 pmolen/µl aufgenommen.

DNA-DNA-Hybridisierung

Zunächst wurde die Nylonmembran mit der transferierten DNA mit 80 ml einer Hybridisierungslösung (5 x SSC, 0,1 % Na-Laurylsarcosin, 0,02 % SDS, 1 % Blocking-Reagenz) 4 bis 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 (0,2 x SSC; 0,1 % SDS) bei 68°C gebadet. Anschließend konnte die Membran bis zur Detektion trocken aufbewahrt werden.

Die Prähybridisierung und Hybridisierung bei 68°C gilt für homologe DNA-Sonden. Degenerierte DNA-Oligonukleotide benötigten wegen ihrer geringeren Spezifität eine individuelle Prä- und Hybridisierungstemperatur, die in verschiedenen Schritten ermittelt werden mußte.

Detektion der DNA-DNA-Hybride

Der Nachweis der DNA-DNA-Hybride erfolgte mit Hilfe des "DIG DNA Labeling and Detection Kit", wie vom Hersteller beschrieben, unter Verwendung eines DIG-Antikörper-Alkalische-Phosphatase-Konjugats und einer enzymgekoppelten Farbreaktion. Bei einem alkalischen pH entfernt die alkalische Phosphatase den Phosphatrest des 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphats (X-Phosphat) und gleichzeitig wird Nitroblau-Tetrazoliumsalz (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% Blocking-Reagenz in Puffer I) inkubiert. Das Filter wurde wiederum kurz in Puffer I gebadet und dann 30 min bei RT mit einer Antikörper-Konjugat-Lösung (150 mU Anti-DIG-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 MgCl₂) äquilibriert und danach zusammen mit 10 ml einer frisch angesetzten Färbelösung (45 µl NBT, 35 µl X-Phosphat in 10 ml Puffer III) in eine Plastikfolie eingeschweißt und unter Lichtausschluß inkubiert. Die Reaktion wurde durch Waschen in TE-Puffer, pH 8.0, gestoppt. Diese Detektionsmethode beruht auf einer direkten Färbung auf dem Filter. Darüber hinaus kann die DIG-Markierung auch durch Chemilumineszenz detektiert werden. Der Nachweis beruht auf einer Lichtemission, die durch die Umsetzung des Chemilumineszenzsubstrates AMPPD durch alkalische Phosphatase hervorgerufen wird. Nach der Hybridisierung wird die Nylonmembran kurz in einem Maleinsäurepuffer (100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl; pH 7.5) plus 0.3 % Tween 20 gewaschen und anschließend 30 min in 1 % Blocking-Reagenz in Maleinsäurepuffer bei RT inkubiert. Anti-DIG-AP-Konjugat wurde auf 75 mU/ ml in dem Maleinsäurepuffer verdünnt und für weitere 30 min mit der Membran inkubiert. Das überschüssige Konjugat wurde mit 0.3 % Tween 20 in Maleinsäurepuffer entfernt. Die Chemilumineszenz-Reaktion erfolgte 5 min mit einer AMPPD-Lösung (AMPPD-Stammlösung [10 mg/ ml] 1:100 verdünnt in 100 mM Tris/ HCl; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl₂; pH 9.5) in Dunkelheit. Die Membran wurde in eine durchsichtige Folie eingeschweißt, für 12 min bei 37°C inkubiert und zum Nachweis auf einem Röntgenfilm exponiert. Die Expositionsdauer reichte von 10 bis 120 min (je nach Intensität der Signale).

8. Präparation und Analyse von RNA

8.1. Isolierung von RNA aus *C. glutamicum*

Die zur RNA-Isolierung benötigten Gefäße und Lösungen wurden zur Inaktivierung von RNasen zweimal autoklaviert. Zur Isolierung von RNA aus *C. glutamicum* wurden die Zellen bei 30°C in 2 x TY-Komplexmedium bis zu einer OD₆₀₀ von maximal 4 gezüchtet, 10 min in Eiswasser inkubiert und anschließend 5 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Bakterien wurden in 10 ml eiskaltem Waschpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.6; 50 mM NaCl) resuspendiert und erneut 5 min bei 4000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Nach Resuspension in 5 ml 68°C heißem Aufschlußpuffer (10 mM Na-Acetat, pH 5.0; 1 % SDS) wurden 5 ml 68°C heißes, wassergesättigtes, saures Phenol dazugegeben. Der Ansatz wurde 10 min unter gelegentlichem Schütteln bei 68°C inkubiert, anschließend 10 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Falcongefäß überführt. Die Phenolextraktion wurde insgesamt dreimal wiederholt. Zur Fällung der RNA wurde nach der letzten Phenol-Behandlung der wäßrige Überstand mit 0.1 Vol. Na-Acetatpuffer (3.0 M, pH 5.2; eiskühlt) sowie 2.5 Vol. absolutem Äthanol (-20°C) versetzt und 2 h bei -20°C inkubiert. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 4°C und 5000 rpm wurde das Präzipitat mit 5 ml 70 % igem Äthanol (-20°C) gewaschen, erneut 10 min bei 4°C mit 5000 rpm zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes 5 min unter Vakuum getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 50 µl A. dest., dem 2 µl RNasin (80 U) zugesetzt worden waren, resuspendiert.

8.2. Northern-Blot-Analyse

Um RNA durch Northern-Hybridisierung analysieren zu können, wurde diese zunächst unter denaturierenden Bedingungen nach einer Methode von Alwine *et al.* (1977) auf einem Agarosegel aufgetrennt und dann auf ein Filter übertragen. Mit Hilfe eines "DIG RNA Labeling Kits" wurden DIG-markierte RNA-Sonden hergestellt und gegen die auf dem Filter immobilisierte RNA hybridisiert. Durch die Alkalische-Phosphatase-Reaktion wurden die RNA-RNA-Hybridisierungsbanden in einer Farbreaktion sichtbar gemacht oder durch Chemilumineszenz detektiert.

Auftrennung der RNA und Übertragung auf eine Membran

Die RNA wurde in einem Formaldehyd-enthaltenden 0.8 %igen Agarosegel aufgetrennt. Dazu wurden 20 ml 5 x RNA-Puffer (0.2 M MOPS; 50 mM Na-Acetat; 10 mM EDTA) mit 63 ml A. dest. und 0.8 g Agarose gemischt, aufgekocht und nach Abkühlen auf 50°C der Lösung 17 ml deionisierter Formaldehyd (Sambrook *et al.*, 1989) zugesetzt. Als Laufpuffer diente 1 x RNA-Puffer.

Der RNA-Ladepuffer setzte sich aus 75 µl Formamid, 30 µl Formaldehyd, 30 µl 5 x RNA-Puffer, 15 µl 10 x Blaumarker (0.25 % Bromphenolblau, 0.25 % Xylencyanol, 30 % Glycerin) und 1 µl Ethidiumbromid (10 µg/ ml) zusammen. 1 bis 4 µl RNA-Lösung wurden mit 10 µl RNA-Ladepuffer aufs Gel aufgetragen. Die gelelektrophoretisch aufgetrennte RNA wurde vakuumunterstützt nach einer Methode von Gross *et al.* (1988) auf eine Nylonmembran übertragen. Dazu wurde das Gel jeweils 10 min mit A. dest., Denaturierungslösung (50 mM NaOH, 10 mM NaCl) und Neutralisierungslösung (100 mM Tris/ HCl, pH 7.4) bedeckt. Anschließend wurde das Gel mit Transferlösung (0.3 M Na-Citrat, pH 7.0; 3.0 M NaCl) überschichtet und die RNA 60 min auf die Membran übertragen. Die Nylonmembran wurde zwischen Whatman-Papier getrocknet, die transferierte RNA 3 min mit UV (366 nm) fixiert und das Filter 1 bis 2 h bei 80°C inkubiert.

Herstellung einer DIG-markierten RNA-Sonde

Zur Herstellung der DIG-markierten *lpd*-"antisense"-RNA-Sonde wurde ein 1.1kb-*ScaI*/*SacI*- Fragment des *lpd*-Gens in den mit *SmaI*/*SacI* geschnittenen Vektor pGEM4Z™ ligiert und das resultierende Plasmid mit *Bam*HI linearisiert. Die Markierung der Sonde erfolgte mit dem "DIG RNA Labeling and Detection Kit" (Boehringer Mannheim). Jeder Markierungsansatz enthielt in einem Volumen von 20 µl 1 µg linearisierte DNA, 0.5 µl (ca. 20 U) RNase-Inhibitor, 6 µl ATP-, CTP-, GTP-Gemisch (1:1:1), 2 µl UTP-, DIG-11-UTP-Gemisch (1:1), 2 µl 10 x Transkriptionspuffer, 3 µl A. dest. und 2 µl SP6-RNA-Polymerase. Der Ansatz wurde 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 2 µl DNase RQ1 (2 U) und 15-minütiger Inkubation bei 37°C entfernt. Die RNA des Ansatzes wurde durch zweimalige Phenolextraktion gereinigt, mit Äthanol gefällt, in 40 µl A. dest. aufgenommen und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Hybridisierung der RNA gegen eine spezifische RNA-Sonde und Nachweis der Hybridisierungsbanden

Zur Hybridisierung wurde die Nylonmembran mindestens 8 h bei 46°C in 80 ml Prähybridisierungslösung (1 x SSC; 50 % (v/v) Formamid; 0.1 % (w/v) Natriumlaurylsarcosin; 0.02 % (w/v) SDS; 5 % Blocking-Reagenz) inkubiert (Sambrook *et al.*, 1989). Anschließend wurde die Prähybridisierungslösung gegen 7 ml Hybridisierungslösung (Prähybridisierungslösung mit frisch denaturierter RNA-Sonde) ausgetauscht und der Ansatz über Nacht bei 46°C inkubiert. Die Detektion der RNA-Banden erfolgte entweder durch Anfärbung auf dem Filter oder mit Hilfe der Chemilumineszenz-Methode. Beide Verfahren wurden unter "Southern-Blot-Hybridisierung" beschrieben.

8.3. Transkriptionsstartbestimmung

Die Bestimmung des Transkriptionsstartes wurde nach zwei verschiedenen Methoden vorgenommen: Mit der Primer-Extension-Methode (Melton *et al.*, 1984) und mit der RNase-Protection-Methode (Sambrook *et al.*, 1989)

Primer-Extension-Methode

Bei der Primer-Extension-Methode wurde ein zur zu untersuchenden RNA komplementärer DNA-Primer gegen spezifische mRNA hybridisiert und durch AMV Reverse Transkriptase an der RNA als Template unter Zusatz von [α - 35 S]dATP und Desoxynukleotiden bis zum Anfang des Transkripts verlängert. Nach Hitzedenaturierung wurden die Extensionsprodukte auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiographisch detektiert. Gleichzeitig wurde eine dem Bereich des Transkriptionsstartes entsprechende DNA-Sequenzreaktion mitaufgetrennt. Eine RNA-Lösung, die 50-70 μ g Gesamt-RNA enthielt, wurde im Evaporator zur Trockenheit eingeeengt, in 100 μ l Hybridisierungspuffer (40 mM PIPES, pH 6.4; 1 mM EDTA, pH 8.0; 400 mM NaCl; 80 % (v/v) Formamid) gelöst, der DNA-Primer (ungefähr 20 pmole) hinzugegeben, 10 min hitzedenaturiert (siedendes Wasserbad) und 8 bis 12 h bei 42°C inkubiert. Dazu wurden 700 μ l -20°C kaltes Äthanol pipettiert. Der Ansatz wurde 1 h auf Eis inkubiert und 15 min bei 4°C und 12000 rpm zentrifugiert. Der Niederschlag wurde gewaschen, und es wurde erneut bei 4°C und 12000 rpm zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde im Evaporator getrocknet und in 19 μ l AMV-Reverse-Transkriptase-Puffer gelöst. Dazu wurden 1 μ l Actinomycin D (5 mg/ml abs. Äthanol), 2 μ l radioaktiv markiertes dATP, 1 μ l AMV Reverse Transkriptase pipettiert und 2 h bei 42°C inkubiert. Der AMV-Reverse-Transkriptase-Puffer enthielt je 500 μ M dCTP, dGTP und dTTP sowie 20 μ M dATP. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 μ l 0.5 M EDTA, pH 8, beendet. Anschließend wurde mit 2 μ l RNase A (10 mg/ml) 30 min bei 37°C inkubiert. Dazu wurden 150 μ l TE-Puffer, pH 7.6, der 1 M NaCl enthielt, pipettiert und mit 500 μ l -20°C kaltem Äthanol 1 h bei 0°C eine Äthanol-fällung durchgeführt. Anschließend wurde bei RT und 12000 rpm zentrifugiert, der Niederschlag gewaschen, im Evaporator getrocknet und in 3 μ l TE-Puffer, pH 7.4, gelöst. Dazu wurden 3 μ l Formamid-Ladepuffer (80 % Formamid (v/v); 10 mM EDTA, pH 8.0; 1 mg/ml Xylencyanol FF; 1 mg/ml Bromphenolblau) pipettiert und bei 95°C 5 min denaturiert. Nach kurzer Eiskühlung wurden 1.5 μ l davon gelelektrophoretisch bei 2500 V aufgetrennt.

RNase-Protection-Methode

In vivo isolierte mRNA wurde mit einer markierten "antisense" mRNA-Sonde, die den 5'-Bereich des zu untersuchenden Gens abdeckte, hybridisiert. Dabei entstanden sowohl zum 5'-Ende als auch zum 3'-Ende RNA-Einzelstränge, die durch gezielte RNase-Behandlung abgebaut wurden. Bei dieser RNase-Behandlung wurden nur die RNA-Einzelstränge abgebaut, während das RNA-RNA-Hybrid vor diesem Abbau geschützt bleibt. Die Größenbestimmung des hybridisierenden RNA-Bereiches erfolgte nach denaturierender Gelelektrophorese im Vergleich mit markierten RNA-Größenstandards.

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

Die Herstellung der RNA-Sonde bzw. der RNA-Größenstandards erfolgte durch *in vitro*-Transkription von DNA-Matrizen, die in dem Transkriptionsvektor pGEM4Z™ kloniert worden waren. Die Herstellung der markierten RNA-Sonde erfolgte mit dem "SP6/T7 Transcription Kit". Der Markierungsansatz enthielt 1 µg linearisierte Plasmid-DNA, 3 µl Nukleotid-Mix (ATP:GTP:UTP im Verhältnis 1:1:1), 50 µCi [α -³⁵S]CTP, 1/10 Vol. Transkriptionspuffer, 20 U RNasin und 1 U SP6-bzw. T7-RNA-Polymerase. Der Ansatz wurde mit H₂O auf 20 µl aufgefüllt. Er 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 mit Äthanol gefällt. 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. Die markierten RNA-Größenstandards wurden nach demselben Prinzip hergestellt. Dafür wurde der Transkriptionsvektor ohne Insert verwendet.

Durchführung der RNase-Protection-Methode

Die RNase-Protection-Methode wurde nach einem modifizierten Verfahren nach Sambrook *et al.*, (1989) durchgeführt. 100 µg isolierte, frisch hitzedenaturierte (10 min siedendes Wasserbad) Gesamt-RNA wurde in 15 µl Hybridisierungspuffer, der die mit [α -³⁵S]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 µg/ml RNase T1; 40 µg/ml RNaseA) 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. Enzyme und Abbauprodukte wurden durch Phenol-Chloroform-Extraktion entfernt, 100 µg *E. coli*-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 Hitzedenaturierung wurden die RNA-Hybride auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel (6 % Acrylamid/ 7 M Harnstoff) entsprechend ihrem Molekulargewicht bei 2500 V aufgetrennt und ihre Größe anhand mitlaufender Größenstandards bestimmt. Aufgrund der Größe der geschützten RNA und eines definierten Endes der mRNA konnte der Start des untersuchten Transkripts berechnet werden.

9. DNA-Sequenzanalyse

Die DNA-Sequenzanalyse erfolgte nach dem Kettenabbruch-Prinzip von Sanger *et al.* (1977). Zur nichtradioaktiven Sequenzierung wurden zunächst Deletionsplasmide konstruiert, die anschließend mit fluoreszenzmarkierten Primern sequenziert wurden. Die radioaktive Sequenzierung erfolgte nach einem als "Primer Walking" bezeichneten Verfahren (Sambrook *et al.*, 1989). Bei dieser Methode wurden anhand der Information des bereits sequenzierten Bereiches neue Primer synthetisiert, mit denen weitersequenziert wurde.

9.1. Herstellung von Deletionsplasmiden

Deletionsplasmide wurden mit Hilfe des "Erase-a-base-Kits" erzeugt. Die Plasmid-DNA wurde zunächst mit einem 3'-Enden erzeugenden sowie einem 5'-Enden-erzeugenden Restriktionsenzym geschnitten und anschließend durch Zusatz von Äthanol gefällt. Nach Trocknung der verdauten DNA wurde diese in 50 µl ExoIII-Puffer (66 mM Tris-HCl, pH 8; 7 mM MgCl₂) aufgenommen und mit 1.4 µl ExonukleaseIII (250 U) versetzt. Exonuklease III baut DNA an ihren 5'-überhängenden Enden ab, während 3' überhängende Enden vor dem Abbau geschützt sind. Zum Stop der ExonukleaseIII-Reaktion wurden in 30s-Abständen jeweils 2.5 µl Aliquots dem Ansatz entnommen, in 7.5 µl S1-Mix (60 U S1 Nuklease in 40 mM K-Acetat; 0.34 M NaCl; 1.4 mM ZnSO₄; 5% Glycerin; pH 4.6) überführt und auf Eis gelagert. Um einzelsträngige DNA abzubauen, wurden die Ansätze 30 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl S1 Stop-Puffer (0.3 M Tris; 0.05 M EDTA) beendet. Zum Auffüllen überhängender Enden wurden die Ansätze einer Behandlung mit Klenow-Polymerase unterzogen, anschließend ligiert und in den *E. coli*-Stamm DH5 transformiert.

9.2. Nichtradioaktive Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmid-Deletionskonstrukte erfolgte unter Verwendung des "AutoRead" Sequenzierungs-Kits. Zur Denaturierung der DNA wurde in einem Volumen von 10 µl insgesamt 6 µl DNA mit 2 µl Fluoreszenz-Primer (Sequencing oder Reverse Sequencing) und 1 µl NaOH (1 M) gemischt und 5 min bei 70°C inkubiert.

Zur Anlagerung des Primers wurden dem Ansatz 1 μl HCl (1 M), 2 μl Anlagerungspuffer und 3 μl Dimethylsulfoxid zugesetzt und dieser 15 min bei 37°C inkubiert. Zum Start der Kettenabbruchreaktion wurden 1 μl Polymerisationspuffer und 2 μl T7- DNA-Polymerase (3 U) zugesetzt, je 4.5 μl dieses Ansatzes mit 2.5 μl Desoxy/ Didesoxy-Mix vermischt und der Ansatz 5 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 μl Stop-Lösung beendet, die Proben bei 80°C denaturiert und bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mit einer A.L.F. (Automated Laser Fluorescent) DNA-Sequenzierapparatur. Zur Herstellung des Sequenzgels wurden 16 ml 30 %iges Acrylamid/ Bisacrylamid (19:1), 33.6 g Harnstoff (Ultra Pure) und 0.5 g Ionenaustauscher gemischt und mit A. dest. auf 70 ml aufgefüllt. Nach Lösen des Harnstoffs wurde die Lösung durch ein Filter mit 0.45 μl Porengröße (Nalgene) filtriert, anschließend 4.8 ml 10 x TBE (1 M Tris, 0.83 M Borsäure, 10 mM EDTA) zugesetzt und der Ansatz mit A. dest. auf 80 ml aufgefüllt. Die Polymerisation des Gels erfolgte nach Zugabe von 70 μl TEMED und 280 μl 10 %igem Ammoniumpersulfat.

9.3. Radioaktive Sequenzierung

Die radioaktive Sequenzierung wurde mit einem "Sequenase-Sequenzierungs-Kit" (USB) und [α - ^{35}S]dATP (Amersham) durchgeführt. Zur Denaturierung der DNA wurden 2 μg DNA mit 40 μl Denaturierungspuffer (0.2 N NaOH) versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 4 μl Neutralisierungspuffer (2.5 M NH_4 -Acetat, pH 4.6) und 100 μl absoluter Äthanol (-20°C) zugesetzt und der Ansatz bei -70°C 10 min inkubiert. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C wurde das Pellet mit 1 ml 70 %igem Ethanol (-20°C) gewaschen, erneut 10 min bei 13000 rpm und 4°C abzentrifugiert und unter Vakuum getrocknet. Zur Anlagerung des Primers wurde die denaturierte DNA mit 1 μl Primer und 2 μl Reaktionspuffer (0.2 M Tris/ HCl, pH 7.5; 0.1 M MgCl_2 ; 0.25 M NaCl) versetzt, mit A. dest. auf 10 μl aufgefüllt und 20 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde gestartet durch Zugabe von 1 μl DTT (0.1 M), 2 μl Markierungs-Mix (je 7.5 μM dGTP, dCTP, dTTP), 0.5 μl [α - ^{35}S]dATP (5 μCi) und 2 μl Sequenase. Nach 5minütiger Inkubation bei RT wurden zur Kettenabbruchreaktion je 3.5 μl dem Ansatz entnommen und in vier Gefäße mit unterschiedlichen Terminationsmixin (je 80 μM dNTP, 8 μM ddNTP, 50 mM NaCl) überführt. Nach 5minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 4 μl Stop-Lösung (95 % Formamid; 20 mM EDTA; 0.05 % Bromphenolblau; 0.05 % Xylencyanol FF) beendet. Die Proben wurden 3 min bei 95°C denaturiert und bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Zur gelelektrophoretischen Auftrennung der Sequenzreaktion wurde ein Polyacrylamid-Sequenzgel nach den Angaben von Sambrook *et al.* (1989) hergestellt.

In einem Volumen von 100 ml enthielt dies 42.04 g Harnstoff, 20 ml 30 %iges Acrylamid/Bisacrylamid (19:1), 10 ml 10 x TBE (108 g Tris, 55 g Borsäure, 7.4 g EDTA), 600 µl 10 % iges Ammoniumpersulfat und 100 µl TEMED.

9.4. Herstellung von Primern zur Sequenzierung

Die Synthese von Oligonukleotiden zur DNA-Sequenzierung wurde mit einem Gene Assembler Plus (Pharmacia) durchgeführt (Caruthers *et al.*, 1985). Nach Beendigung der DNA-Synthese wurden die Oligonukleotide durch 16stündige Inkubation in 1 ml 30 %iger Ammoniaklösung bei 50°C von der Säule eluiert. Zur Reinigung der Oligonukleotide wurde eine NAP-10 Säule (Pharmacia) mit 15 ml A. dest. von der Säule eluiert und die Menge der gereinigten DNA photometrisch bei 260 nm bestimmt. Eine Extinktion bei 260 nm von 1 und einer Küvettenschichtdicke von 1 cm entspricht einer einzelsträngigen DNA-Menge von 33 µg/ml (Sambrook *et al.*, 1989).

10. Bestimmung von Enzymaktivitäten

10.1. Herstellung von Rohextrakten und Proteinbestimmung

70 ml einer *C. glutamicum*-Kultur wurden in der exponentiellen Wachstumsphase (Komplexmedium: OD₆₀₀ = 3; Minimalmedium OD₆₀₀ = 15) geerntet (10 min, 4000 rpm, 4°C). Zur Bestimmung der spezifischen Enzymaktivitäten der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase, der Pyruvat-Dehydrogenase und der Dihydroliponamid-Dehydrogenase im Rohextrakt dieser Zellen wurde das Zellpellet zweimal in eiskaltem TES-Waschpuffer (0.1 M TES-NaOH, pH 7.2; 10 mM MgCl₂ x 6 H₂O; 3 mM L-Cystein) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml TES-Aufnahmepuffer (0.1 M TES-NaOH, pH 7.2; 10 mM MgCl₂ x 6 H₂O; 3 mM L-Cystein; 30 % (v/v) Glyzerin) resuspendiert. Zur Bestimmung der Galaktosid-Acetyltransferase wurden die Zellen in 0.05 M Tris-HCl-Puffer, pH 7.8, gewaschen und das Zellpellet darin aufgenommen. Der Zellaufschluß erfolgte in einem 2ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß unter Eiskühlung durch Ultraschall (Sonifier B15, Branson Sonic Power, Danbury, USA). Es wurde 6 min diskontinuierlich bei einer Pulsfrequenz von 20 % und einer Leistung von 30 W beschallt. *E. coli*-Zellen wurden unter den gleichen Bedingungen 2 min beschallt. Nicht aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (45 min, 13000 rpm, 4°C) sedimentiert. Der zellfreie Extrakt wurde für die entsprechenden Enzymtests eingesetzt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration im Rohextrakt erfolgte nach der Biuret-Methode (Gornall *et al.*, 1949) mit Rinderserumalbumin als Standard.

10.2. Aktivitätsmessung der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase und der Pyruvat-Dehydrogenase

Die 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase (2-OGDH) katalysiert die oxidative Decarboxylierung von 2-Oxoglutarat unter Bildung von $\text{NADH} + \text{H}^+$ und Succinyl-CoA. Die Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) katalysiert die entsprechende Reaktion, in der $\text{NADH} + \text{H}^+$ und Acetyl-CoA gebildet werden. Zur Bestimmung der spezifischen 2-OGDH- bzw. PDH-Aktivität wurde eine Methode nach Guest und Creaghan (1972) verwendet. Der Testansatz enthielt 100 mM TES-NaOH, pH 7.2; 0.9 mM ThDP; 1.5 mM 2-Oxoglutarat; 3 mM L-Cystein; 10 mM $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$; 2 mM NAD^+ und 25-50 μl Zellextrakt. Für die PDH-Messung waren anstelle des 2-Oxoglutarates 3 mM Pyruvat in diesem Ansatz enthalten. Das Gesamtvolumen betrug 1 ml. Die jeweilige Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μl einer 20 mM CoA-Lösung gestartet und die Zunahme der Extinktion bei 340 nm über einen Zeitraum von 2 min bei 30°C verfolgt.

10.3. Aktivitätsmessung der Dihydroliponamid-Dehydrogenase

Die Dihydroliponamid-Dehydrogenase (E3) katalysiert im jeweiligen Enzymkomplex die Oxidation des Dihydroliponamids, d.h. des Acyltransferase-Cofaktors unter Bildung von $\text{NADH} + \text{H}^+$. Zur Bestimmung der E3-Enzymaktivität wurde eine modifizierte Methode nach van den Broek (1971) angewandt. Der Testansatz enthielt 100 mM TES-NaOH, pH 7.8, 2 mM NAD^+ und Zellextrakt in einem Volumen von 1 ml. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 25 μl einer Dihydroliponamid-Lösung (25 mg/ml Äthanol, abs.) gestartet und die Extinktionszunahme bei 340 nm und 30°C verfolgt. Das Dihydroliponamid wurde nach einer von Jeyaseelan *et al.* (1980) beschriebenen Methode synthetisiert und dankenswerterweise von Frau Dr. S. Bringer-Meyer zur Verfügung gestellt.

10.4. Aktivitätsmessung der Galaktosid-Acetyltransferase

Die Galaktosid-Acetyltransferase katalysiert die Übertragung des Acetyl-Restes von Acetyl-CoA auf Galaktoside bzw. auf Thiogalaktoside. Die Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität erfolgte nach einer von Alpers *et al.* (1964) beschriebenen Methode, die auf einer photometrischen Bestimmung von Thionitrobenzoesäure bei 412 nm und 30°C beruht. Der Testansatz enthielt 0.05 M Tris-HCl, pH 7.8; 1 mM DTNB; 2 mM EDTA; 50 mM IPTG und Zellextrakt. Gestartet wurde der Test durch Zugabe von 10 μl einer 10 mM Acetyl-CoA-Lösung. Das Gesamt-Testvolumen betrug 1 ml.

11. Reinigung und Charakterisierung der Dihydroliponamid-Dehydrogenase

Reinigung

Zur Reinigung der Dihydroliponamid-Dehydrogenase (E3) aus *C. glutamicum* wurden 100 ml einer auf 2 x TY gewachsenen Kultur verwendet. Die Zellen wurden zweimal in 20 ml 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7.0, gewaschen und in 1 ml des gleichen Puffers nach Zugabe von 5 U/ ml DNase, 15 µg/ ml RNase und 100 µM Phenylmethylsulfonyl-Fluorid (PMSF) resuspendiert. Der Zellaufschluß und das Entfernen der Zelltrümmer erfolgte wie unter "Herstellung von Zellextrakten" beschrieben. Alle Aufreinigungsschritte (Ultrazentrifugation, FPLC) wurden bei 4°C durchgeführt. Die Zellextrakte wurden mit 50 mM Tris-HCl, pH 7.0, auf 5 ml verdünnt. Nach 2 h Ultrazentrifugation bei 183 000 x g wurde der Überstand auf einer FPLC Anlage (Pharmacia) mit einer HR5/ 5 MonoQ-Anionenaustauschersäule chromatographiert. Während der chromatographischen Aufreinigung wurde die Dihydroliponamid-Dehydrogenase mit einem 0.1-0.4 M NaCl-Gradienten in 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7.0 eluiert.

Bestimmung des Molekulargewichts der Dihydroliponamid-Dehydrogenase

Zur Bestimmung des Molekulargewichts der Dihydroliponamid-Dehydrogenase wurde eine Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt (Laemmli, 1970). Es wurde dazu eine Sturdiel SE 400 Apparatur (Hoefel, San Francisco, USA) mit 14cm x 16cm x 1.5mm-Gelen verwendet. Das Trenngel besaß ein Volumen von ungefähr 27 ml und bestand aus 11.3 ml 30 % igem Acrylamid/ Bisacrylamid (36.5:1), 5.4 ml Glycerin (45 %), 6.75 ml Tris-HCl (1.5 M; pH 8.8), 3.1 ml A.dest., 0.27 ml SDS (10 %) 0.13 ml Ammoniumpersulfat (10 %) und 13 µl TEMED. Die Gele wurden bei 8 mA 14 h laufengelassen. Als Molekulargewichtsstandard diente der SDS-7B: Prestained Proteinmarker (Sigma). Zur Bandenfixierung wurden die Gele 30 min in 10 %igem Methanol inkubiert. Die Anfärbung der Proteinbanden erfolgte über einen Zeitraum von 20 min mittels einer Serva-Blue Färbelösung (0.05 % (wv) Serva-Blue, 10 % Methanol). Zum Entfernen unspezifischer Färbung wurde das Gel 2 h in 10 %iger Essigsäure inkubiert.

N-Terminus-Sequenzierung der Dihydroliponamid-Dehydrogenase

Zur Bestimmung des N-Terminus der gereinigten Dihydroliponamid-Dehydrogenase wurde diese durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem "Multiphor II Electrophoresis System" (Pharmacia LKB Biotechnology) auf eine Polyvinyliden-Difluorid-Membran (Millipore) übertragen. Das Protein wurde anschließend in einer Applied Biosystems 477A Sequenzier-Apparatur mit on-line HPLC (Modell 120) sequenziert. Dieser Vorgang wurde zwar durchlaufen, da aber die aufgereinigte Fraktion so homogen war, wurde sie nach dem FPLC-Lauf direkt zur Sequenzierung eingesetzt.

III. ERGEBNISSE

1. Nachweis der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase aus *C. glutamicum*

Die 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase (2-OGDH) katalysiert in Gegenwart von CoA und NAD^+ die oxidative Decarboxylierung von 2-Oxoglutarat unter Bildung von Succinyl-CoA, CO_2 und $\text{NADH} + \text{H}^+$. Zur enzymatischen Bestimmung der 2-OGDH wurden Zellen von *C. glutamicum* ATCC13032 (Wildtyp) zunächst auf Komplexmedium gezüchtet, in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und die spezifische 2-OGDH-Aktivität im Rohextrakt bestimmt. Außerdem wurde die Abhängigkeit der Enzymaktivität von den im Testansatz enthaltenen Reaktionskomponenten untersucht. Das Ergebnis dieser Messung ist in Tabelle 3 dargestellt. Mit den Substraten 2-Oxoglutarat, CoA und NAD^+ wurde eine spezifische Enzymaktivität von 0.150 U/ mg Protein gemessen. Fehlte jeweils eines dieser Substrate im Testansatz wurde keine Enzymaktivität festgestellt (< 0.003 U/ mg Protein). Dies war auch der Fall, wenn NADP^+ anstelle von NAD^+ als Elektronenakzeptor benutzt wurde, was zeigt, daß die Reaktion spezifisch für NAD^+ ist.

Tab. 3: Spezifische Aktivität der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase in Zellextrakten von *C. glutamicum* nach Wachstum auf Komplexmedium ohne Glukose mit Untersuchung der Abhängigkeit von den Reaktionskomponenten im Testansatz.

Reaktionsansatz	Spezifische Aktivität (U/ mg Protein)	Relative Aktivität (%)
Vollständig	0.150	100
- 2-Oxoglutarat	< 0.003	< 2
- CoA	< 0.003	< 2
- NAD^+	< 0.003	< 2
+ NADP^+ - NAD^+	< 0.003	< 2
- ThDP	0.084	56
- MgCl_2	0.025	17
- L-Cystein	0.036	24
+ DTT - L-Cystein	0.106	71

Weiterhin wurden ohne Mg^{2+} und ohne ThDP deutlich niedrigere Enzymaktivitäten (0.025 und 0.084 U/ mg Protein) gemessen als im vollständigen Ansatz. Das gilt auch für das Reduktionsmittel L-Cystein, ohne das die spezifische 2-OGDH-Aktivität nur 0.036 U/ mg Protein betrug. L-Cystein stellte sich im Vergleich zu DTT als wirksamer heraus, mit dem 0.106 U/ mg Protein gemessen wurden.

Neben der 2-OGDH gibt es noch weitere Enzyme, die oxidative Decarboxylierungen katalysieren, nämlich die Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) und die Verzweigtkettige-Aminosäure-Dehydrogenase (VADH). Die Aktivitäten beider Enzymkomplexe wurden in coryneformen Bakterien bislang nicht gemessen. Um auszuschließen, daß die gemessene 2-OGDH-Aktivität eine Seitenaktivität der PDH oder der VADH ist, wurden mit Zellextrakten von *C. glutamicum* vergleichende Enzymtests durchgeführt, in denen statt 2-Oxoglutarat die 2-Oxo-Verbindungen Pyruvat, 2-Oxoleucin (4-Methyl 2-Oxopentanoat), 2-Oxoisoleucin (3-Methyl 2-Oxopentanoat) oder 2-Oxovalin (3-Methyl 2-Oxobutyrat) verwendet wurden. Pyruvat ist das Substrat der PDH; 2-Oxoleucin, 2-Oxoisoleucin und 2-Oxovalin sind die Substrate der VADH. Das Ergebnis in Tabelle 4 zeigt, daß mit Pyruvat eine spezifische Enzymaktivität von 0.110-0.120 U/ mg Protein gemessen wurde. Wurden 2-Oxoglutarat und Pyruvat gleichzeitig im Enzymtest verwendet, betrug die spezifische Aktivität 0.210-0.230 U/ mg Protein und entsprach damit fast der Summe der Einzelaktivitäten der 2-OGDH und der PDH.

Tab. 4: Spezifische Enzymaktivitäten der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase, der Pyruvat-Dehydrogenase und der Verzweigtkettigen-Aminosäure-Dehydrogenase in Zellextrakten von *C. glutamicum* nach Wachstum auf Komplexmedium ohne Glukose.

Substrat	Spezifische Aktivität (U/ mg Protein)
2-Oxoglutarat a)	0.140 - 0.160
Pyruvat b)	0.110 - 0.120
2-Oxoglutarat a) + Pyruvat b)	0.210 - 0.230
2-Oxoleucin c)	< 0.003
2-Oxoisoleucin c)	< 0.003
2-Oxovalin c)	< 0.003

a) 1.5mM Endkonzentration im Test

b) 3mM Endkonzentration im Test

c) 1, 2, 5 oder 10mM Endkonzentration im Test

Daraus kann gefolgert werden, daß die oxidativen Decarboxylierungen von 2-Oxoglutarat und von Pyruvat in *C. glutamicum* mit zwei verschiedenen Enzymkomplexen katalysiert werden. Mit den 2-Oxo-Verbindungen der verzweigtkettigen Aminosäuren konnte keine Aktivität gemessen werden (< 0.003 U/ mg Protein), sodaß eine Seitenreaktion der VADH auszuschließen ist

1.1. Biochemische Charakterisierung der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase in Zellextrakten von *C. glutamicum*.

Kinetische Untersuchungen

Zur Bestimmung des pH-Optimums der 2-OGDH wurden verschiedene Testansätze mit 0.1M TES-NaOH-Puffer unterschiedlicher pH-Werte zwischen pH 6.8 und pH 8.2 verwendet und die spezifische 2-OGDH-Aktivität im Rohextrakt von *C. glutamicum* bestimmt. Dabei zeigte die 2-OGDH ein pH-Optimum über einen pH-Bereich von 7.1-7.6. Die weiteren Enzymmessungen wurden daraufhin bei pH 7.2 durchgeführt. Anschließend wurden die K_S -Werte für die Substrate 2-Oxoglutarat, CoA und NAD^+ bestimmt. Dazu wurde die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von je einem Substrat ermittelt, dessen Konzentration im Testansatz variierte, während die Konzentrationen der beiden anderen Substrate im Sättigungsbereich lagen und konstant gehalten wurden. Die K_S -Werte konnten aus einem Eadie-Hofstee-Diagramm mit dem Programm "Enzfit" ermittelt werden. Es zeigte sich, daß die 2-OGDH aus *C. glutamicum* eine hohe Affinität zu CoA (K_S : $6.5 \mu\text{M}$) besitzt, während die Affinität zu 2-Oxoglutarat (K_S : $131 \mu\text{M}$) und NAD^+ (K_S : $290 \mu\text{M}$) deutlich geringer ist.

Untersuchungen zur Regulation auf enzymatischer Ebene

Um Aussagen bezüglich der Regulation der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* zu treffen, wurde die Aktivität des Komplexes in Zellextrakten von durch Effektorstudien charakterisiert (Tabelle 5). Es konnte gezeigt werden, daß von den Intermediaten des Zentralstoffwechsels Oxalacetat, Phosphoenolpyruvat, Acetyl-CoA und Citrat die 2-OGDH nur wenig in ihrer Aktivität hemmten. DL-Isocitrat, das direkte Vorläufermolekül des 2-Oxoglutarates führte bei einer Konzentration von 10 mM zu einer 54 %igen Hemmung. Glyoxylat hemmte bereits bei 1 mM um 25%, bei 10 mM um fast 90%. Das konnte erwartet werden, da Glyoxylat bei Thiamin-abhängigen Reaktionen den Cofaktor ThDP blockiert und eine Katalyse verhindert wird (Uhlemann und Schellenberger, 1975). Die Nukleotide ATP und ADP zeigten in einer Konzentration von 10 mM einen geringen Hemmeffekt (um 13 %). 10 mM AMP hemmten die 2-OGDH deutlich (um 35 %).

Tab. 5: Einfluß von Intermediaten des Zentralstoffwechsels, Nukleosidphosphaten, den Endprodukten der Reaktion und verschiedenen Elektrolyten auf die Aktivität der 2-Oxo-glutarat-Dehydrogenase in Zellextrakten von *C. glutamicum*.

Effektor	Konzentration (mM)	Spez. Aktivität (U/ mg Protein)	Rel. Aktivität (%)
Ohne	0	0.150	100
Oxalacetat	1	0.125	83
	10	0.113	75
Phosphoenolpyruvat	0.1	0.140	93
	1	0.129	86
Acetyl-CoA	1	0.126	84
Citrat	1	0.158	105
	10	0.140	93
DL-Isocitrat	1	0.135	90
	10	0.069	46
Glyoxylat	1	0.113	75
	10	0.020	13
ATP	1	0.150	100
	10	0.131	87
ADP	1	0.158	105
	10	0.131	87
AMP	1	0.150	100
	10	0.098	65
Succinyl-CoA	0.1	0.143	95
	1	0.071	47
NADH	0.1	0.089	59
MgCl ₂	10	0.150	100
	30	0.120	80
	50	< 0.003	n.b.
MnCl ₂ (statt MgCl ₂)	10	0.113	75
	100	< 0.003	n.b.
NaCl	10	0.150	100
	50	0.099	66
KNO ₃	50	0.033	22
KCl	10	0.132	88
	100	0.020	13
K-Glutamat	100	0.147	98
	200	0.120	80
KCl/K-Glutamat	50/50	0.075	50

Die Verwendung der 2-OGDH-Reaktionsendprodukte als Effektoren ergab, daß bereits 0.1 mM NADH eine über 40 %ige Hemmung und 1 mM Succinyl-CoA eine 53 %ige Hemmung bewirkten. Das deutet darauf hin, daß die 2-OGDH durch Endprodukthemmung reguliert wird.

Die katalytische Aktivität der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase war abhängig von Mg^{2+} -Ionen, die im Testansatz als $MgCl_2$ in 10 mM Konzentration enthalten waren. Bei der Etablierung des 2-OGDH-Tests fiel auf, daß die Aktivität des Komplexes durch 30 mM $MgCl_2$ um 20 % gehemmt wurde und bei 50 mM nicht mehr nachweisbar war. Dieser Effekt wurde auch festgestellt, wenn statt $MgCl_2$ ein anderes zweiwertiges Salz, $MnCl_2$, für den Enzymtest verwendet wurde. $MnCl_2$ konnte in niedriger Konzentration (bis 10 mM) das $MgCl_2$ ersetzen (es wurden ungefähr 75 % der maximalen Aktivität festgestellt), aber bei 100 mM $MnCl_2$ konnte ebenfalls keine Aktivität mehr nachgewiesen werden. Danach wurden die einwertigen Salze NaCl, KNO_3 und KCl zusätzlich zum $MgCl_2$ im Enzymtest eingesetzt. Auch hier konnte eine Hemmung der 2-OGDH-Aktivität beobachtet werden: Mit 50 mM NaCl um 33 %, mit 50 mM KNO_3 um 78 % und mit 100 mM KCl um 87 %. Der Hemmeffekt wurde demnach mit unterschiedlichen Elektrolyten erzielt, unabhängig davon, ob sie einwertig oder zweiwertig waren und unabhängig von bestimmten Anionen oder Kationen. Das konnte so nicht erwartet werden, weil *C. glutamicum* dafür bekannt ist, Glutamat zellintern bis zu 200 mM zu akkumulieren (Hoischen und Krämer, 1989). Deshalb wurde auch der Einfluß von K-Glutamat auf die 2-OGDH-Aktivität von *C. glutamicum* untersucht. Bei einer Konzentration von 100 mM wurde eine um 2 %, selbst bei 200 mM eine nur um 20 % niedrigere Aktivität als die Ausgangsaktivität gemessen. Wenn aber 50 mM K-Glutamat plus 50 mM KCl zum Enzymtest gegeben wurden, war eine 50 %ige Hemmung der 2-OGDH zu beobachten. Daraus kann gefolgert werden, daß kleine Anionen die Hemmung bewirken. Zu einem ähnlichen Resultat führten Untersuchungen mit Elektrolyten, die an der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase aus *A. vinelandii* durchgeführt wurden (A. de Kok, persönliche Mitteilung). Es kann vermutet werden, daß kleine Anionen mit einer der drei Untereinheiten des Komplexes in Wechselwirkung treten, und so die Katalyse drastisch behindert wird.

1.2. Einfluß der Kohlenstoffquelle auf die spezifische Aktivität der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase aus *C. glutamicum*

Um den Einfluß der Kohlenstoffquelle (C-Quelle) auf die Aktivität der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* zu untersuchen, wurden Zellen des Wildtypstammes auf verschiedenen Wachstumsmedien gezüchtet und die spezifische 2-OGDH-Aktivität im Rohextrakt bestimmt. Das Ergebnis ist in **Tabelle 6** dargestellt. Nach Wachstum auf Komplexmedium ohne zusätzliche C-Quelle betrug die spezifische 2-OGDH-Aktivität 0.140-0.160 U/ mg Protein.

Tab. 6: Spezifische Aktivitäten der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase im Rohextrakt von *C. glutamicum* nach Wachstum auf verschiedenen Medien.

Medium	Spezifische Aktivität (U/ mg Protein)
Komplexmedium	0.140-0.160
Komplexmedium + 2% Glukose	0.120-0.140
Komplexmedium + 2% Glutamat	0.120-0.140
Minimalmedium + 4% Glukose	0.040-0.060
Minimalmedium + 4% Glukose + 50 mM 2-Oxogl.	0.040-0.060
Minimalmedium + 4% Glukose +100 mM 2-Oxogl.	0.040-0.060
Minimalmedium + 4% Glukose (1 µg Biotin/ l)	0.020-0.025
Minimalmedium + 2% Acetat	0.050-0.070
Minimalmedium + 2% Glutamat	0.017-0.020

Im gleichen Bereich (0.120-0.140 U/ mg Protein) lag die 2-OGDH-Aktivität mit den zusätzlichen C-Quellen Glukose oder Glutamat. Auf Minimalmedium mit Glukose wurden jedoch nur 0.040-0.060 U/ mg Protein gemessen. Die gleiche spezifische Aktivität wurde erhalten, wenn zusätzlich zur Glukose 50 mM bzw. 100 mM 2-Oxoglutarat im Medium enthalten waren. Wurden *C. glutamicum*-Zellen auf Glukose-Minimalmedium unter Biotinlimitierung (1 µg Biotin/ l) gezüchtet, war die 2-OGDH-Aktivität mit 0.020-0.025 U/ mg Protein noch einmal um 50 % geringer als auf dem vergleichbaren Medium mit Biotinüberschuß. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß die 2-OGDH unter Glutamatproduktionsbedingungen weniger aktiv ist als unter normalen Wachstumsbedingungen; aber sie ist signifikant vorhanden. Mit Acetat als alleiniger C-Quelle konnten 0.050-0.070 U/ mg Protein festgestellt werden. Diente Glutamat als C-Quelle, wurde mit 0.017-0.020 U/ mg Protein eine deutlich niedrigere spezifische Enzymaktivität als nach Wachstum auf Glukose- oder Acetatmedium beobachtet. Da die spezifischen Aktivitäten auf Komplexmedium mit und ohne Glutamat fast gleich waren, ist es jedoch unwahrscheinlich, daß Glutamat die Synthese der 2-OGDH in *C. glutamicum* auf genetischer Ebene beeinflusst. Die Untersuchungen zeigen, daß die spezifische Aktivität der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase auf Minimalmedium um mehr als 50% geringer ist als auf Komplexmedium. Dieser Befund weist auf eine genetische Regulation der beteiligten Gene hin.

Da oxidative Decarboxylierungen Thiamin- und Liponsäure-abhängig sind, wurde *C. glutamicum* auf Glukose-Minimalmedium gezüchtet, in dem zusätzlich Thiamin-HCl (0.34 g/l) und Liponsäure (0.2 g/l) enthalten waren. Die spezifische 2-OGDH-Aktivität betrug 0.040-0.060 U/ mg Protein und war somit genauso hoch wie nach Wachstum auf Glukose-Minimalmedium, das diese Supplemente nicht enthielt. Vorausgesetzt, die beiden Zusätze gelangen während des Wachstums in die Zelle, deutet dieses Ergebnis an, daß der Unterschied in der spezifischen Aktivität der 2-OGDH nach Wachstum auf Komplex- und Minimalmedium nicht auf einer Limitierung durch Thiamin oder Liponsäure beruht.

1.3. Einfluß der Kohlenstoffquelle auf die spezifische Aktivität der Pyruvat-Dehydrogenase aus *C. glutamicum*

Die spezifische Aktivität der Pyruvat-Dehydrogenase konnte in Rohextrakten von *C. glutamicum* bereits gemessen werden. Nach Wachstum auf Komplexmedium betrug sie 0.110-0.120 U/ mg Protein. Da die PDH und die 2-OGDH sowohl bezüglich des Bau- wie des Funktionsprinzips ähnlich sind, wurde auch die spezifische PDH-Aktivität in *C. glutamicum* nach Wachstum auf verschiedenen Medien gemessen. Das Ergebnis ist in **Tabelle 7** dargestellt. Nach Wachstum auf Komplexmedium mit den zusätzlichen C-Quellen Glukose oder Glutamat betrug die spezifische PDH-Aktivität 0.110-0.120 oder 0.120-0.130 U/ mg Protein und lag damit in der gleichen Größenordnung wie nach Wachstum auf Komplexmedium ohne zusätzliche C-Quelle. Auf Minimalmedium mit Glukose wurden 0.040-0.050 U/ mg Protein gemessen.

Tab. 7: Spezifische Aktivitäten der Pyruvat-Dehydrogenase im Rohextrakt von *C. glutamicum* nach Wachstum auf verschiedenen Medien.

Medium	Spezifische Aktivität (U/ mg Protein)
Komplexmedium	0.110-0.120
Komplexmedium + 2% Glukose	0.090-0.110
Komplexmedium + 2% Glutamat	0.120-0.130
Minimalmedium + 4% Glukose	0.040-0.050
Minimalmedium + 4% Glukose + 100 mM Pyruvat	0.040-0.050
Minimalmedium + 2% Acetat	0.040-0.050

Die gleiche spezifische Aktivität wurde auch erhalten, wenn das Medium zusätzlich zur Glukose 100 mM Pyruvat im Medium enthielt oder Acetat die alleinige C-Quelle war. Die Untersuchungen zeigten, daß nach Wachstum auf Minimalmedium ungefähr 50% geringere spezifische PDH-Aktivitäten festgestellt wurden als nach Wachstum auf Komplexmedium. Gleiches wurde auch für die 2-OGDH aus *C. glutamicum* beobachtet. Außerdem sind die spezifischen Enzymaktivitäten beider Komplexe in *C. glutamicum* ungefähr gleich hoch.

2. Isolierung und Charakterisierung des Gens für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase (E3) aus *C. glutamicum*

Nach dem enzymatischen Nachweis der 2-OGDH wurde nun versucht, die Gene für die drei Untereinheiten des Komplexes zu isolieren. Das Gen *sucA* kodiert für E1, *sucB* für E2 und *lpd* für E3 des Komplexes. Mit Hilfe von *E. coli*-Defektmutanten sollten die entsprechenden *C. glutamicum*-Gene durch heterologe Komplementation mit einer corynebakteriellen Cosmidgenbank isoliert werden. Bei den verwendeten *E. coli*-Mutanten handelte es sich um die Stämme JRG465 (*sucA*), JRGWsuc17 (*sucB*) und JRG301 (*lpd*). Die *sucA* und *sucB*-Mutanten können auf Glukose-Minimalmedium aerob nur dann wachsen, wenn dieses mit Succinat supplementiert wird (Herbert und Guest, 1969). Die *lpd*-Mutante benötigt zum aeroben Wachstum auf Glukose-Minimalmedium sowohl Succinat als auch Acetat, da das *lpd*-Genprodukt in *E. coli* Bestandteil der 2-OGDH und der PDH ist (Guest und Creaghan, 1974).

2.1. Versuche zur Isolierung der Gene, die für die Untereinheiten der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* kodieren

Vor der Transformation der *E. coli*-Mutanten mit der Cosmidgenbank von *C. glutamicum* wurde der Phänotyp dieser Stämme in Wachstumstests kontrolliert. Als Minimalmedium wurde M9-Glukose-Medium verwendet, das als Kontrollmedium die jeweiligen Supplemente Succinat und/ oder Acetat in 50 mM Konzentration enthielt, während es als Testmedium nicht supplementiert wurde. Die Mutanten wurden bei 37 °C auf dem jeweiligen Kontrollmedium und dem Testmedium inkubiert und das Wachstum über 72 Stunden beobachtet. Das Ergebnis in Tabelle 8 zeigt, daß die *E. coli*-Mutanten erwartungsgemäß auf dem Kontrollmedium wuchsen. Allerdings wurde in allen Fällen auch auf dem nicht-supplementierten Testmedium Wachstum festgestellt. Damit waren diese Mutanten für Komplementationsversuche ungeeignet, und es mußte eine alternative Methode zur Isolierung der Gene angewandt werden.

Tab. 8: Plattentest mit *E. coli*-Mutanten mit einem Defekt in den Genen, die für die Untereinheiten der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase kodieren. *sucA* kodiert für die 2-Oxoglutarat-Decarboxylase-, *sucB* für die Dihydroliponamid-Succinyltransferase- und *lpd* für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Untereinheit. Das Kontrollmedium war Glukose-Minimalmedium, das im Fall der *sucA*- und *sucB*-Mutanten mit 50 mM Succinat supplementiert war und im Fall der *lpd*-Mutante 50 mM Succinat und 50 mM Acetat enthielt. Das entsprechende Testmedium war nicht supplementiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C. Legende: +++ = sehr gutes Wachstum, ++ = gutes Wachstum, + = Wachstum.

<i>E. coli</i> -Stamm	Relevanter genetischer Marker	Wachstum auf	
		Kontrollmedium	Testmedium
JRG465	<i>sucA</i>	+++	+
Wsuc17	<i>sucB</i>	+++	++
JRG301	<i>lpd</i>	++	+

2.2. Identifizierung des Gens für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* durch Southern-Hybridisierung mit DNA-Oligonukleotidsonden

Neben der Möglichkeit der heterologen Komplementation können Gene auch durch Southern-Hybridisierungen mit geeigneten Gensonden detektiert werden.

In allen beschriebenen Fällen stellt das Gen für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase (*lpd*) das distale Gen des Operons dar, das für die 2-OGDH (z.B. *A. vinelandii*) bzw. für die PDH (z.B. *E. coli*) kodiert. Somit bestand die Hoffnung, durch die Isolierung und Analyse des für das *lpd*-Gen kodierenden Bereiches an die weiteren für den jeweiligen Komplex kodierenden Gene zu gelangen. Mit DNA-Oligonukleotiden als Sonden wurde daher versucht, zunächst das *lpd*-Gen zu identifizieren und anschließend zu isolieren.

Um geeignete Sequenzen für die *lpd*-Oligonukleotidsonden zu erhalten, wurden bereits veröffentlichte *lpd*-DNA-Sequenzen pro- und eukaryotischer Organismen in die entsprechende Aminosäuresequenz übersetzt und in einem computergestützten Vergleich auf konservierte Bereiche untersucht. Außer den Bereichen zur FAD(H)- bzw. NAD(H)-Bindung waren zwei weitere Bereiche konserviert: Je einer am Amino- und am Carboxy-Terminus, die als "Cys"- bzw. "His"-Region benannt wurden (**Abbildung 4**). Die beiden Regionen liegen auf Proteinebene ungefähr 400 Aminosäuren auseinander.

	"Cys-Region"													"His-Region"											
<i>P. flu.</i>	-C	L	N	V	G	C	I	P	S	K	A	L	L	-ca.	400	AS	-F	S	H	P	T	L	S	E	A-
<i>A. vin.</i>	-C	L	N	V	G	C	I	P	S	K	A	L	L	-ca.	400	AS	-F	A	H	P	A	L	S	E	A-
<i>E. col.</i>	-C	L	N	V	G	C	I	P	S	K	A	L	L	-ca.	400	AS	-H	A	H	P	T	L	H	E	S-
<i>P. put.</i>	-C	L	N	I	G	C	I	P	S	K	A	L	L	-ca.	400	AS	-H	A	H	P	T	L	G	E	A-
<i>H. sap.</i>	-C	L	N	V	G	C	I	P	S	K	A	L	L	-ca.	400	AS	-H	A	H	P	T	L	S	E	A-
<i>S.dom.</i>	-C	L	N	V	G	C	I	P	S	K	A	L	L	-ca.	400	AS	-H	A	H	P	T	L	S	E	A-
<i>S. cer.</i>	-C	L	N	V	G	C	I	P	S	K	A	L	L	-ca.	400	AS	-H	A	H	P	T	L	S	E	A-

Abb. 4: Aminosäuresequenzvergleich der aminoterminalen Region ("Cys-Region") und der carboxyterminalen Region ("His-Region") von Dihydroliponamid-Dehydrogenasen aus den Organismen *P. fluorescens* (Benen *et al.*, 1989), *A. vinelandii* (Westphal und de Kok, 1988), *E. coli* (Stephens *et al.*, 1983), *P. putida* (Burns *et al.*, 1988), *Homo sapiens*, *Suillus domesticans* (Otulakowski und Robinson, 1987) und *S. cerevisiae* (Ross *et al.*, 1988). Die beiden Regionen liegen ungefähr 400 Aminosäuren (AS) auseinander. Die Aminosäuresequenzen der "Cys-Region" und der "His-Region" wurden für die Synthese von DNA-Oligonukleotidsonden genutzt, die zur Identifizierung des Gens für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* in Southern-Hybridisierungen verwendet wurden.

Komplementär zu den Aminosäuresequenzen -C-I-P-S-K-A-L-L- ("Cys-Region") und -H-A-H-P-T-L-S-E-A ("His-Region") wurden gemäß des Codon-Gebrauchs von *C. glutamicum* für moderat-exprimierte Gene (Eikmanns, 1992) und gemäß der Wobble-Regel degenerierte DNA-Oligonukleotide synthetisiert. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in **Abbildung 5** dargestellt und wurden mit Oligo1 ("Cys-Region") und Oligo2 ("His-Region") bezeichnet. Oligo1 und Oligo2 wurden mit Digoxigenin-markierten-dUTP-Molekülen (DIG-dUTP) für den Gebrauch als nichtradioaktive Sonden in Southern-Hybridisierungen endmarkiert.

Für die Southern-Hybridisierungen wurde chromosomale DNA aus *C. glutamicum* mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI, *Bgl*II, *Cla*I, *Eco*RI, *Hind*III, und *Pst*II, geschnitten. Die DNA-Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Anschließend wurden die auf diese Weise immobilisierten Fragmente in getrennten Southern-Hybridisierungen gegen die DIG-dUTP-markierten Oligonukleotide Oligo1 und Oligo2 hybridisiert. Dazu wurde in mehreren Hybridisierungsschritten die für die jeweilige Oligonukleotidsonde optimale Hybridisierungstemperatur ermittelt. Sie betrug 38°C für Oligo1 und 40°C für Oligo2. Die Detektion der Banden erfolgte durch Chemilumineszenz.

1) Oligo1:

Aminosäure:		C	I	P	S	K	A	L	L	
Codon:	5'-	TGC	ATC	CCA	TCC	AAG	GCA	CTG	CTG	-3'
		C	C	A	C	G	A	G		
		C	C	A	C	G	T	T		
		C	C	T	T	G	T	T		
		T	T	T	T	A	C	A		
			T	C	G	A	G			

2) Oligo2:

Aminosäure:		H	A	H	P	T	L	S	E	A	
Codon:	5'-	CAC	GCA	CAC	CCA	ACC	CTG	TCC	GAA	GCA	-3'
		C	A	C	A	C	G	C	A		
		C	T	C	A	C	T	C	A		
		C	T	C	T	C	A	T	G		
		C	C	C	T	T		T	G		
		T	G	T	C	G		G	G		

Abb. 5: Degenerierte DNA-Oligonukleotide (Oligo1 und Oligo2) mit Angabe der Aminosäuresequenzen aus der "Cys-Region" und aus der "His-Region", die in die DNA-Sequenz von Oligo1 und Oligo2 übersetzt wurden. Nach Digoxigenin-Markierung wurden die Oligonukleotide als Sonden in Southern-Hybridisierungen zur Identifizierung des Gens für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* verwendet.

Es konnte in allen DNA-Fractionen neben schwachen Banden eine dominante DNA-Bande detektiert werden, die bei Hybridisierung mit Oligo1 und Oligo2 ein übereinstimmendes Signal ergab. Die schwachen Signale stammen vermutlich von unspezifischen Hybridisierungen. Das Ergebnis ist exemplarisch mit Oligo2 in **Abbildung 6** dargestellt. Das jeweilig am stärksten hybridisierende Fragment hatte im Falle des *Pst*I-Verdau 2.2kb, im Falle des *Bam*HI-Verdau 5.4kb und in allen anderen Fällen mehr als 6.4kb. Es lag nahe, daß mit diesem Ansatz *lpd*-tragende Fragmente identifiziert wurden. Weil beabsichtigt wurde, alle für die Untereinheiten der 2-OGDH kodierenden Gene zu isolieren, zielten die weiteren Versuche auf die Isolierung des 5.4kb *Bam*HI-Fragmentes ab. Aufgrund der Größe erschien das 2.2kb-*Pst*I-Fragment zu klein, das vollständige *lpd*-Gen tragen zu können bzw. Platz für weitere Gene zu haben.

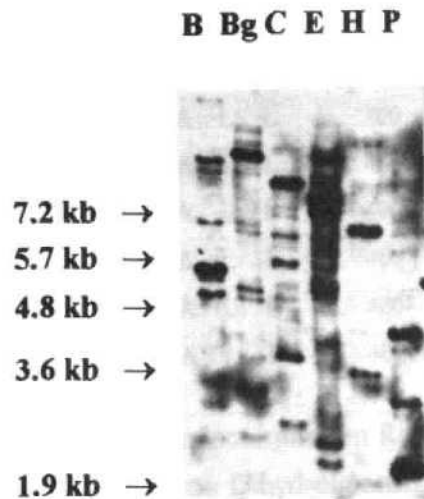


Abb. 6: Southern-Blot-Analyse zur Identifizierung eines chromosomalen DNA-Fragmentes, das das Gen für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* trägt. Dargestellt ist das Ergebnis mit dem Digoxigenin-dUTP-markierten Oligo2 als Gensonde. Die DNA wurde mit *Bam*HI (B), *Bgl*I (Bg), *Cla*I (C), *Eco*RI (E), *Hind*III (H), und *Pst*I (P) geschnitten. Die Detektion der Banden erfolgte durch Chemilumineszenz. Weitere Versuche zielten auf die Isolierung des hybridisierenden 5.4kb-*Bam*HI-Fragmentes.

2.3. Isolierung des chromosomalen DNA-Fragmentes, das das Gen für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* trägt

Zur Isolierung des durch Southern-Hybridisierung identifizierten 5.4kb-*Bam*HI-Fragmentes wurde eine partielle Genbank in dem Vektor pUC18 angelegt. Dazu wurde *Bam*HI-geschnittene chromosomale DNA aus *C. glutamicum* gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Fragmente von 4.8-6.0 kb aus dem Gel isoliert. Die DNA-Fragmente wurden durch GENECLAN gereinigt und in den ebenfalls mit *Bam*HI geschnittenen Vektor pUC18 ligiert. Diese Ligationsansätze wurden in *E. coli* DH5 transformiert. Es wurden 260 Transformanten erhalten. Mit jeweils 10 Transformanten wurde je eine 5ml-Kultur angelegt. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden die rekombinanten pUC18-Plasmide aus diesen 26 Koloniegemischen isoliert. Die Plasmide wurden mit *Bam*HI restriktionsverdaut, gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und gegen Oligo2 hybridisiert. Als Positivreferenz wurde *Bam*HI-geschnittene chromosomale Wildtyp-DNA aus *C. glutamicum* ebenfalls aufgetrennt und hybridisiert. Das Ergebnis ist in **Abbildung 7** gezeigt, in der 13 (Spuren A-F und Spuren H-O) der 26 Plasmidgemische dargestellt sind. Mit Oligo2 wurde eine Bande detektiert (Spur C), die bei Hybridisierung gegen die chromosomale DNA aus *C. glutamicum* (Spur G) auch auftrat. Damit konnte die Plasmidfraktion identifiziert werden, in der das pUC18-Plasmid mit dem hybridisierenden 5.4kb-*Bam*HI-Fragment enthalten war.

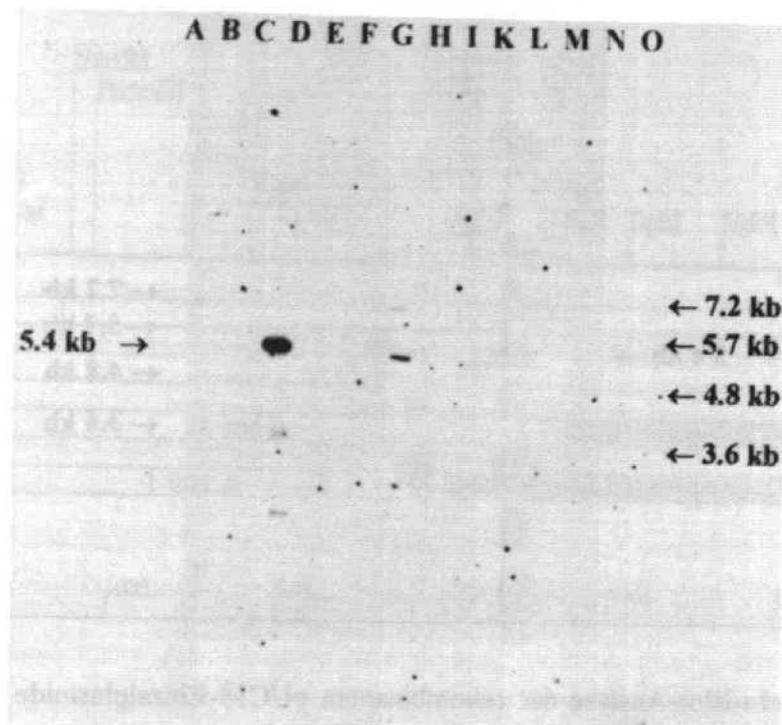


Abb. 7: Southern-Blot-Analyse von rekombinanten Plasmidgemischen aus der partiellen pUC18-Genbank mit corynebakteriellen DNA-Fragmenten von 4.8-6.0 kb zur Identifizierung eines Fragmentes, das das Gen für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* trägt. Dargestellt ist die DNA von 13 verschiedenen Plasmidgemischen (Spuren A-F und Spuren H-O) und chromosomale DNA aus *C. glutamicum* (Spur G) nach *Bam*HI-Verdau. Spur C zeigt das Plasmidgemisch mit dem 5.4kb-*Bam*HI-Fragment, das in Übereinstimmung mit der chromosomalen DNA hybridisierte. Als Sonde diente das Digoxigenin-dUTP-markierte Oligo2. Die Detektion erfolgte durch Chemilumineszenz.

Anschließend wurden von den 10 Einzelkolonien dieses positiven Koloniegemisches C 10 separate 5ml-Kulturen angelegt. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden aus diesen Kulturen die rekombinanten pUC18-Plasmide isoliert. Die Plasmid-DNA wurde in getrennten Ansätzen mit *Bam*HI restriktionsverdaut. Nach dem Transfer dieser geschnittenen Plasmid-DNA auf eine Nylonmembran wurde eine weitere Southern-Hybridisierung mit der Oligonukleotidsonde Oligo2 durchgeführt. Als Positivreferenzen dienten die Plasmid-DNA aus dem Koloniegemisch C und chromosomale DNA aus *C. glutamicum*, die ebenfalls mit *Bam*HI geschnitten waren. **Abbildung 8** stellt das Ergebnis dieser Southern-Hybridisierung dar. Von den 10 rekombinanten pUC18-Plasmiden enthielten 3 Plasmide (Spuren 3, 4 und 11) ein *Bam*HI-Fragment, das in Übereinstimmung mit dem Plasmidgemisch C (Spur 6) und der chromosomalen DNA aus *C. glutamicum* (Spur 7) hybridisierte.

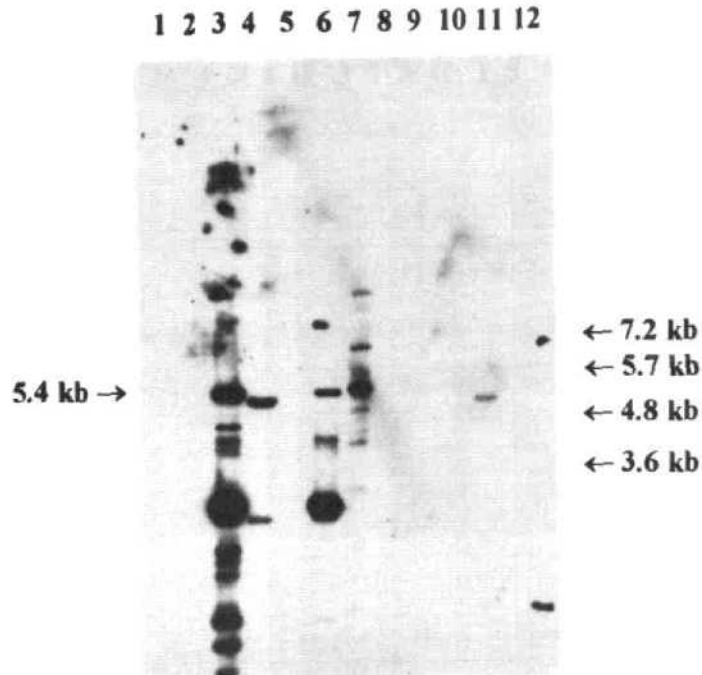


Abb. 8: Southern-Blot-Analyse der rekombinanten pUC18-Einzelpasmide aus dem Plasmidgemisch C zur Identifizierung eines Fragmentes, das das Gen für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* trägt. Dargestellt ist die DNA von 10 Plasmiden (Spuren 1-5 und Spuren 8-12), die DNA des Plasmidgemisches C (Spur 6) und chromosomale DNA aus *C. glutamicum* (Spur 7) nach *Bam*HI-Verdau. Spur 3 zeigt das Plasmid mit dem hybridisierenden 5.4kb-Fragment, pUC18 lpd5.4, das im Folgenden analysiert wurde. Als Sonde diente das Digoxigenin-dUTP-Markierte Oligo2. Die Detektion erfolgte durch Chemilumineszenz.

Das jeweils hybridisierende Fragment in den Spuren 4 und 11 erschien etwas kleiner als 5.4kb, was durch einen inhomogenen Transfer aus dem Agarosegel auf die Nylonmembran verursacht worden sein könnte. Im Folgenden wurde das 5.4kb-*Bam*HI-Fragment in Spur 3 zur weiteren Analyse verwendet. Das entsprechende rekombinante pUC18-Plasmid wurde mit pUC18 lpd5.4 bezeichnet.

2.4. Restriktionskartierung und Subklonierung des chromosomalen DNA-Fragmentes, das das Gen für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* trägt

Zur groben Charakterisierung des isolierten Fragmentes wurde das Plasmid pUC18 lpd5.4 mit den Restriktionsenzymen *Sca*I, *Eco*RI, *Hind*III, *Sac*I, *Kpn*I, *Sph*I, *Pst*I, *Sal*I und *Nde*I geschnitten und anhand der Größenbestimmung der erhaltenen Fragmente eine Restriktionskarte erstellt (Abbildung 9).

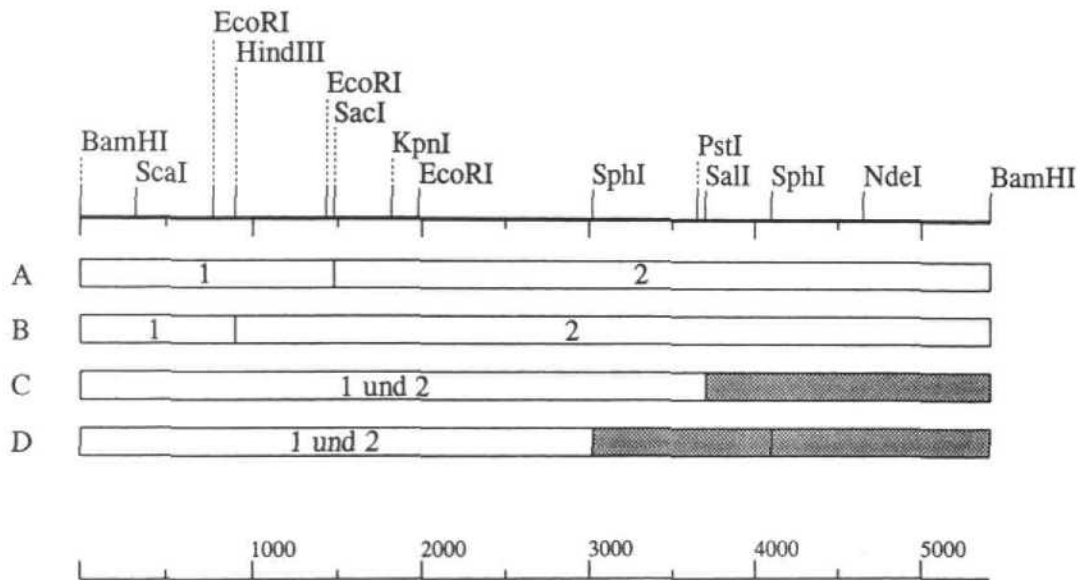


Abb. 9: Restriktionskartierung und Subfragmentierung des 5.4kb-*Bam*HI-Fragmentes, das nach der Southern-Blot-Analyse mit den Oligonukleotid-Sonden Oligo1 und Oligo2 das Gen für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* trägt. Die Restriktionskartierung wurde an dem rekombinanten Plasmid pUC18 lpd5.4 vorgenommen. Die Doppelrestriktionen wurden mit den Enzymen *Bam*HI/ *Sac*I (A), *Bam*HI/ *Hind*III (B), *Bam*HI/ *Sal*I (C) und *Bam*HI/ *Sph*I (D) durchgeführt. Die Subfragmente wurden durch Southern-Hybridisierungen gegen die Oligonukleotid-Sonden Oligo1 (1) und Oligo2 (2) ermittelt. Die hybridisierenden Fragmente sind mit 1 und/ oder 2 gekennzeichnet. Die nicht hybridisierenden Fragmente sind schattiert gekennzeichnet. Das *Sca*I/ *Sac*I-Fragment hat eine Größe von 1.1kb und wurde sowohl für die Herstellung einer homologen DNA-Sonde zur Southern-Blot-Analyse (Kap. 2.5.) als auch für die Herstellung einer RNA-Sonde zur Northern-Blot-Analyse (Kap. 2.10) verwendet

Um die gegen Oligo1 und Oligo2 hybridisierenden Bereiche auf dem isolierten Fragment einzuengen, wurden Doppelrestriktionen mit *Bam*HI/ *Sal*I, *Bam*HI/ *Sac*I, *Bam*HI/ *Hind*III und *Bam*HI/ *Sph*I durchgeführt und die Subfragmente gegen beide Oligonukleotidsonden hybridisiert. Das Ergebnis ist in **Abbildung 9** schematisch dargestellt und zeigt, daß das kleinste gegen beide Sonden hybridisierende Fragment ein ungefähr 3kb-*Bam*HI/ *Sph*I-Fragment ist. An dem Hybridisierungsmuster ist zu erkennen, daß Oligo1 mit einem Bereich hybridisiert, der am *Bam*HI-Ende des *Bam*HI/ *Sph*I-Fragmentes liegt (Hybridisierung mit einem 0.95kb-*Bam*HI/ *Hind*III-Fragment und mit einem 1.45kb-*Bam*HI/ *Sac*I-Fragment).

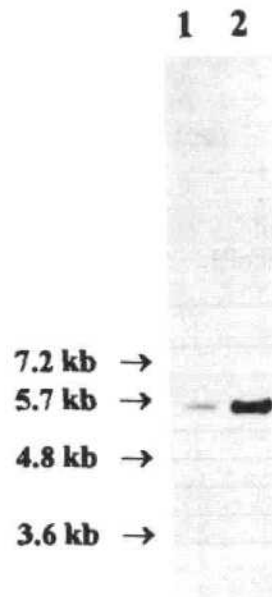


Abb.10: Southern-Blot-Analyse chromosomaler DNA aus *C. glutamicum* (Spur 1) und DNA des Plasmids pUC18 lpd5.4 (Spur 2) zum Nachweis des 5.4kb-*Bam*HI-Fragmentes aus *C. glutamicum*. Die DNA wurde jeweils mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI geschnitten. Als Sonde diente ein 1.1kb-*Sca*I/ *Sac*I-Fragment, das aus einem Bereich des gegen Oligo1 und Oligo2 hybridisierenden 3kb-*Bam*HI/ *Sph*I-Fragmentes stammte und mit Digoxigenin-dUTP markiert war. Die Detektion erfolgte durch Anfärbung der hybridisierenden Banden.

Oligo2 hybridisierte mit einem Bereich, der dem *Sph*I-Ende des *Bam*HI/ *Sph*I-Fragmentes zugewandt ist (Hybridisierung mit einem 3.95kb *Sac*I/ *Bam*HI-Fragment und mit einem 4.45kb *Hind*III/ *Bam*HI-Fragment). Da die DNA-Sequenz von Oligo1 aus der Aminosäuresequenz übersetzt wurde, die aminoterminal liegt, und die DNA-Sequenz von Oligo2 einer carboxyterminalen Aminosäureregion entspricht, konnte die Orientierung des corynebakteriellen Gens für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase vorläufig determiniert werden. Vom resultierenden Polypeptid konnte somit der Amino-Terminus dem *Bam*HI-Ende und der Carboxy-Terminus dem *Sph*I-Ende des *Bam*HI/ *Sph*I-Fragmentes zugeordnet werden.

2.5. Southern-Blot-Analyse des Gens für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* mit einer homologen DNA-Sonde

Die Southern-Blot-Analyse wurde durchgeführt, um nachzuweisen, daß das *lpd*-tragende 5.4kb-*Bam*HI-Fragment tatsächlich aus *C. glutamicum* stammte. Als Sonde wurde ein 1.1kb-*Sca*I/*Sac*I-Fragment verwendet (Abbildung 9). Chromosomale DNA (Spur 1) sowie DNA des Plasmids pUC18 lpd5.4 (Spur 2) wurden mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI geschnitten und gegen die homologe DNA-Sonde hybridisiert. Das dabei erhaltene Ergebnis ist in Abbildung 10 dargestellt.

Chromosomale *C. glutamicum*-DNA und die DNA des Plasmids pUC18 *lpd*5.4 zeigten ein übereinstimmendes Signal bei 5.4kb. Dies zeigt, daß das isolierte Fragment aus *C. glutamicum* stammt, und es anhand dieses Ergebnisses keinen Hinweis auf ein weiteres *lpd*-Gen im Chromosom von *C. glutamicum* gibt.

2.6. Sequenzierung und Charakterisierung des Gens für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus *C. glutamicum*

Da aus den Hybridisierungsexperimenten hervorging, daß das Gen für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase auf dem *Bam*HI/ *Sph*I-Fragment liegen sollte, wurde dieses Fragment sequenziert. Dafür wurde es in beiden Orientierungen nach Auffüllen der Enden in die *Sma*I-Schnittstelle des *E. coli*-Vektors pUC18 ligiert. Von den resultierenden Plasmiden wurden Deletionskonstrukte hergestellt, die anschließend nach der Methode von Sanger *et al.* (1977) sequenziert wurden. Durch computergestützte Analyse nach kodierenden Regionen wurde auf dem 3kb-*Bam*HI/ *Sph*I-Fragment ein vollständiger offener Leserahmen identifiziert, der - wie die Computeranalyse ergab - Ähnlichkeit zu Genen für Dihydroliponamid-Dehydrogenasen aus anderen Organismen zeigte. Die Lage und die Länge dieses mit *lpd* bezeichneten offenen Leserahmens sind in **Abbildung 11** schematisch dargestellt. 210bp stromabwärts vom *lpd*-Gen konnte ein weiterer offener Leserahmen von 858bp identifiziert werden, der für ein Polypeptid von 286 AS kodiert. Ein computergestützter Vergleich mit Polypeptiden aus der EMBL-Genbank ergab keine signifikante Ähnlichkeit. Daher wurde dieser Leserahmen *orfX* bezeichnet (**Abbildung 11**).

Die Nukleinsäuresequenz des *lpd*- und *orfX*-tragenden 3kb-*Bam*HI/ *Sph*I-Fragmentes ist zusammen mit der davon abgeleiteten Aminosäuresequenz in **Abbildung 12** dargestellt. Das *lpd*-Gen beginnt bei bp 212 und endet bei bp 1619. Es kodiert für ein Polypeptid von 469 Aminosäuren mit einem errechneten relativen Molekulargewicht von 50619. Vor dem von der Sequenz abgeleiteten *lpd*-Startcodon konnte keine typische Ribosomenbindungsstelle festgestellt werden. 13bp stromabwärts vom *lpd*-Strukturgen liegt eine potentielle rho-unabhängige Terminationsstruktur. Für die Bildung der Terminationsschleife wurde eine freie Energie von -34.2 kcal/ mol berechnet. Der Codon-Gebrauch entspricht dem moderat-exprimierter Gene von *C. glutamicum* (Eikmanns, 1992). *orfX* beginnt bei bp 1831 und endet bei bp 2689. Stromaufwärts vom *lpd*-Gen verblieben zur Analyse 211bp, die keinen Hinweis auf einen offenen Leserahmen lieferten, sodaß dieser Bereich einer weiteren Analyse bedurfte.

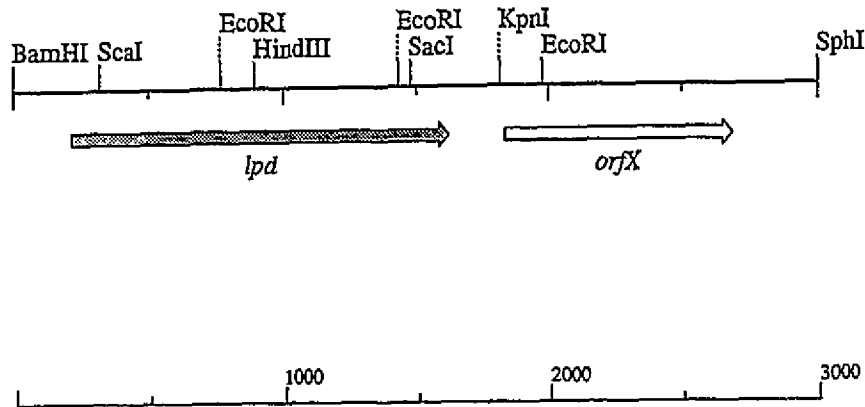


Abb. 11: Darstellung der offenen Leserahmen des Gens für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase (*lpd*) und von *orfX* auf dem sequenzierten 3kb-*Bam*HI/ *Sph*I-Fragment aus *C. glutamicum*. Das durch *lpd* kodierte Polypeptid zeigte Ähnlichkeit zu Dihydroliponamid-Dehydrogenasen aus anderen Organismen. Das durch *orfX* kodierte Genprodukt hatte keine Ähnlichkeit zu in der Genbank abgelegten Proteinsequenzen.

```

                    50                                100
GGATCCTCCGCATTAGTAATCTTTCCACAGCATCGGCTTGTCTAAACAGCACGGTGCTTAGACCGTACATAAAACACCTGCATTCTGTGCCCAT
                    150                                200
TGGGCCCGGATGTGGGTGTTTTCATTTTCTTCCACTCTAAATTAAGTATGGAAAACCAACCGCACCCGGATGCACGACAATGACCCACTAAACACGTA

                    lpd.                                250                                300
TCCTTGAATGCGTGACTGAACATTATGACGTAGTAGTACTCGGAGCCGGCCCCGGTGGCTATGTCTCCGCCATCCGTGCAGCGCAGCTTGGCAAGAAGGT
      V T E H Y D V V V L G A G P G G Y V S A I R A A Q L G K K V
                    350                                400
TGCTGTAATTGAGAAGCAGTACTGGGGTGGTGTTCCTAAACGTGGGCTGCATTCTTCCAAGTCTCTGATCAAAACGCTGAAGTTGCCCATACCTTT
      A V I E K Q Y W G G V C L N V G C I P S K S L I K N A E V A H T F
                    450                                500
ACCCATGAGAAGAAGACCTTCGGCATCAATGGCGAAGTGACCTTCAACTATGAGGATGCTCACAAGCGTTCGGTGGCGTTCGACAAAGATCGTTGGAG
      T H E K K T F G I N G E V T F N Y E D A H K R S R G V S D K I V G
                    550                                600
GCGTTCATTACTTGATCAAGAAGAACAAGATCATCGAAATTCATGGTCTTGGAAACTTCAAGGATGCTAAGACTCTTGAGGTCACCGACGGTAAGGATGC
      G V H Y L M K K N K I I E I H G L G N F K D A K T L E V T D G K D A
                    650                                700
TGGAAGACCATCACCTTGTGACTGCATCATCGCAACCGGTTCCGTAGTCAACACCCCTCCGTGGCGTGTGACTTCTCAGAGAAGCGTTGTGTCTTTGAA
      G K T I T F D D C I I A T G S V V N T L R G V D F S E N V V S F E
                    750                                800
GAGCAGATTCTTAACCGTGTTCGCCAAAGAAGATGGTCATTGTTGGTCAGGCGCAATTGGAATGGAATTCGCCTACGTTCTTGGTAACTACGGTGTAG
      E Q I L N P V A P K K M V I V G A G A I G M E F A Y V L G N Y G V
                    850                                900
ATGTAACCGTCATCGAGTTCATGGATCGTGTGCTTCCAAATGAAGATGCTGAAGTCTCCAAGGTTATTGCAAAGGCTTACAAGAAGATGGGCGTTAAGCT
      D V T V I E F M D R V L P N E D A E V S K V I A K A Y K K M G V K L
                    950                                1000
TCTTCTGGCCATGCAACCACTGCTGTTCCGGGACAACGGTGACTTGTGCGAGGTTGATTACCAGAAGAAGGGCTCTGCAAGACAGAGACTCTTACTGTT
      L P G H A T T A V R D N G D F V E V D Y Q K K G S D K T E T L T V
                    1050                                1100
GATCGAGTCAATGGTTTCCGTTGGTTTCCGTTCCACGCGTTGAGGATTTGGTCTTGAAACACTGGCGTTAAGCTCACCGAGCGTGGCGCAATCGAGATCG
      D R V M V S V G F R P R V E G F G L E N T G V K L T E R G A I E I
                    1150                                1200
ATGATTACATGCGTACCAACGTGATGGCATTACGCCATCGGTGACGTGACCGCCAAAGCTTCAGCTTGCTCAGCTCGCAGAAGCACAGGGCATTGTTGC
      D D Y M R T N V D G I Y A I G D V T A K L Q L A H V A E A Q G I V A
                    1250                                1300
CGCAGAGACTATTGCTGGTGCAGAACTCAGACTCTTGGTGATTACATGATGATGCCACGTGCAACCTTCTGCAACCCACAGGTTTCTTCTTGGTTAC
      A E T I A G A E T Q T L G D Y N M M P R A T F C N P Q V S S F G Y
                    1350                                1400
ACCAAGAGCAGGCCAAGGAGAAGTGGCCAGATCGTGATCAAGTTGCTTCTTCCATTCTCTGCAAACGGTAAAGCAGTTGGCGCTGGCAGAAACTG
      T E E Q A K E K W P D R E I K V A S F P F S A N G K A V G L A E T

```

```

      1450                                     1500
ATGGYTTTCGCAAAGATCGTTGCTGATGCAGAATTCGGTGAGCTGCTCGGTGCACACCTGGTTGGAGCAAATGCATCAGAGCTCATCAATGAATTGGTGCT
D G F A K I V A D A E F G E L L G A H L V G A N A S E L I N E L V L
      1550                                     1600
TGCTCAGAACTGGGATCTCACCAGTGAAGAGATCTCTCGTAGCGTCCATATTCACCCAACGCTATCTGAGGCAGTTAAGGAAGCTGCACACGGTATCTCT
A Q N W D L T Y E E I S R S V H I H P T L S E A V K E A A H G I S
      1650                                     1700
GGACACATGATCAACTTCTAGAATCCACCTCGTTGGCCCTGTTTCTGTATGGAAACAGGGCCAAACCGATTTCATCCAAACCGAGTGCTGGTTAGTG
G H M I N F * -----> <-----
      1750                                     1800
CTCATACTCACACAAACTTTTCGATTATCAAAGAGAATTATTTCTAAAATTCGGTATCGTCTAAGAAATGAGTTTGCCAATAGCTCAGCATCAAATGCT

      orfX      1850                                     1900
GTAAAACTGTCGTGGTACCAGCTGCAGGAATGGGAACCGGTTCTTCCTGCAACGAAGACAATCCAAAGGAGCTTCTCTCTGTAGTTGATACCCCGG
M G T R F L P A T K T I P K E L L P V V D T P
      1950                                     2000
GTATTGAACCTGTTGCCAAAGAGGCTGCTGATCTTGGTGCAACTCGGTTAGCAATTATCACTGCTCCGAACAAAGACGGAATTCTTAACACTTCGAGGA
G I E L V A K E A A D L G A T R L A I I T A P N K D G I L K H F E E
      2050                                     2100
GTTCCCTGAGCTTGAGGCAACTCTTGAGGCTCGCGTAAGACTGATCAACTGAATAAAGTTGAGCAGCTCGAGAATTGATTGCAACAGTTCAGTGGTT
F P E L E A T L E A R G K T D Q L N K V R A A R E L I A T V P V V
      2150                                     2200
CAAGAAAAGCCATTGGGGCTTGGTCACGCTGTTGGCCTTGCTGAGTCTGTGCTCGATGATGAAGATGTTGTGGCTGTCATGCTGCCAGACGATTGG
Q E K P L G L G H A V G L A E S V L D D D E D V V A V M L P D D L
      2250                                     2300
TGCTGCCATTTGGTGTGACCGAGAGAATGGCAGAAGTTCGCGTAAGTTTGGCGGATCTGTTCTTCGAGCAATTGAGGTGGCTGAAGATGAAGTCTCAA
V L P F G V T E R M A E V R A K F G G S V L A A I E V A E D E V S N
      2350                                     2400
TTACGGAGTATTTAAGCTCGGTGAACCTCGATGCAGAGTCCGAAAGTGAAGGCATTAGGCGTGTGTAGGAATGGTTGAAAAGCCTGCCCTGAAGATGCA
Y G V F K L G E L D A E S E S E G I R R V V G M V E K P A P E D A
      2450                                     2500
CCATCAAGGTTTGCCGCAACGGGCCGTTATCTACTTGATCGAGCTATTTTGATGCACCTGCGTGAATTGAGCCTGGTGGTGGGAGAACTGCAATTA
P S R F A A T G R Y L L D R A I F D A L R R I E P G A G G E L Q L
      2550                                     2600
CAGATGCCATCGCATTATTGATCGAAGAAGGCCATCCGGTACACATTGTGGTTTCATGAAGGAAAGCGCCATGACCTTGGTAATCCAGCTGGGTACATTCC
T D A I A L L I E E G H P V H I V V H E G K R H D L G N P A G Y I P
      2650                                     2700
TGCTGTTGTGTACTTCGGAATTCGTCATGCAGAGTACGGTTCCAAGATTCACCGTCCGGTGAAGGAAATACTCGCTGAGTTGAATCTTAAAGGAAAC
A V V Y F G L R H A E Y G S K I H R A V K E I L A E F E S *
      2750                                     2800
CGCCTTCCACATTGTGGGAGGCGGTTTTCTCATGCGATTAGAATCTTATGCCATGGCTAAGAAAGTAGACACCTCGAACGCTACCCCGCTCTAGCCCTT
      2850                                     2900
CTTACGGAGAGGCAGATTCCTTTTGAGCTGGATGTTCATGATGTAGATCCAAATCATCAAAGGGCTTGCATTGGATGCCCTCTGAAGTAATGGGTGTGG
      2950                                     3000
AGCCGGAAGTGGTGTTTAAACGCTCATGGCAGATATTGATGGTGAACACGTGGTCCGATTGTTCCAGCCAGCAGAACGTTGAATCTCAAGCAGTTGGC
TAAGGCTGGAAAAGGTAAGGGCATG

```

Abb. 12: Nukleinsäuresequenzen und die davon abgeleiteten Aminosäuresequenzen des Gens für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase (*lpd*) aus *C. glutamicum* und des *orfX*, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz keine Ähnlichkeit zu in der Genbank abgelegten Polypeptiden zeigte. * bezeichnet das Stop-Codon der Translation. Der potentielle Terminator der *lpd*-Transkription ist durch antiparallel verlaufende Pfeile dargestellt.

2.7. Vergleich der Aminosäuresequenz der Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* mit entsprechenden Sequenzen aus anderen Organismen

Die von der DNA-Sequenz abgeleitete AS-Sequenz von der Dihydroliponamid-Dehydrogenase (E3) aus *C. glutamicum* wurde mit entsprechenden AS-Sequenzen von Dihydroliponamid-Dehydrogenasen anderer Organismen verglichen (Abbildung 13). Dabei zeigte die E3-AS-Sequenz aus *C. glutamicum* mit den AS-Sequenzen der NAD⁺-abhängigen Dihydroliponamid-Dehydrogenasen aus *E. coli* (Stephens *et al.*, 1983), *B. subtilis* (Hemilä *et al.*, 1990) und *S. cerevisiae* (Ross *et al.*, 1988) 35.9%, 42.1% und 37.2% identische AS-Reste.

Bei diesen Vergleichen fielen einige stark konservierte AS-Sequenzbereiche auf, die für die Struktur und die katalytischen Eigenschaften der Dihydroliponamid-Dehydrogenasen verantwortlich sein könnten. So konnte im aminoterminalen Teil des Polypeptids ein Bereich erkannt werden, der die FAD-Bindestelle darstellt. Ebenfalls aminoterminal liegt der redoxaktive Bereich um die zwei Cystein-Reste (Cys-Region). Im mittleren Bereich befindet sich die NAD(H)-Bindestelle und in einer weiteren stark konservierten Region am Carboxy-Terminus wurde ein Bereich um einen Histidin-Rest identifiziert (His-Region), der allen verglichenen Polypeptiden gemein ist.

I---FAD-Binde-Region---I-----Cys-Region-----I

C. glut. -----VT-EH Y----DVVV LGAGPGGYS A IRAAQLG-KK VAVIEK-YWG GVCNLVGCIP SKSLIKAeva
E. coli -----MST-EK T----QVVV LGAGPAGYAA FRCADLGL ET VIVERY-TLG GVCNLVGCIP SKALLHAKV-
B. subt. -----MVVGDF-PE T----DTLV IGAGPGGYAA IRAAQLG-QK VTVEK-TLG GVCNLVGCIP SKA-LIAGHR
S. cer. MLRIRSLNN KRAFSSTVRL TINKSHDVI IGGGPAGYAA IKAALGFNT ACV-EKRKL GTCLNVGCIP SKALLNSHLF

+ + + ++++ ++**++**+* +++*** + * + + +* ***** ****+ + *

C. glut. HTFTHEKKTG GI--NEVTFN YEDAHKRSRG VSDKVGGVHY LMKNNKIEI HGLNFKDAKT LEV-TDGKDA G-KT-ITFD-
E. coli IEEAKALAEH GI-VFEPKT IDKIRTWKEK VINQTGGLAG MAKGRKVKV V NGLKFTGANT LEV---EGEN G-KTVINFD-
B. subt. YENAKHSDDM GI-TANVTVD FTKVQEWKAS VVNKTGGVAG LLKGNKVDVV KGEYFVDSHS VRV--MDENS A-QT-YTFK-
S. cer. HQMHTAQKR GIDVNDIKIN VANFQKAKOD AVKQTGGIEL LFKNNKVTTY KGNSEFEDTK IRVTPVDGLE GTKEDHILDV
++ +++ ** +++++ + + +++++ +++++*++++ + +***+ ++ +** * +++++ +** ++ + ++ ++

I---NAD(H)-Binde-REGION---I

C. glut. -DCIIATGSV VTL--RGVDF SENVVSFEEQ LNPVAKKMY IVGAGAIGMF AYVLGNYGVD VTVIEFMDVL P-NEDAIEVSK
E. coli -NAIIAAGSR PQLPFIHED PRIMSTDAL L-KEVPERLL VMGGGIIGLM GTVYHALGSQ IDVYEMFDVI P-AADKDIVK
B. subt. -NAIIATGSR PEL-PNFKYS ERVLNSTGAL L-KEIPKLV VIGGGYIGTL GTAYANFGTE LVILEGGDIL PGFEKQSSSL
S. cer. KNIIVATGSE VPFGIEIDE EKIVSSTGAL L-KEIPKRLT IIGGGIIGLM GSVYSRLGSK VTVVE-FQQI GASMDGEVAK
+++++*+++ + + + + +++++*+ + + + +*++++ +++++*++ + +++++* +++ + + + +++++

C. glut. V-IAKAYK-- MGVKLLPGHA TTAVRDGDFV EVDYQKKGS D KTETLVDRVM VSVGFPRPVE GFGLTNGVKL TERGAIEIDD
E. coli VFTKRISK-- FNLMLT-K VTAVEADGI YVTMEGK-KA PAEPQYDAVL VAIGRVPNGK NLDAGAGVEV DDRGFIRVDK
B. subt. V-TRRLLK-- GNVEIHTNAM AKGVPEPDGV TVTFEVKGEE K--TVADYYL ITVGRRPNPTD ELGLQVGIM TDRGIVKTDK
S. cer. -ATQFKLKQG LDFKLSTKVI SAKRNDKNVV EIIVEDTKTN KQENLAEVLL VAVGRRPPIYA GLGAKIGLEV DKRGRLVIDD

+ + + * ++++ + ++++++ ++ +++ + ++ + +++++ ++ +++**+++ +++++ *+++ +++* + **+

[illegible]

I-----His-REGION-----I

C. glut. FSANGKAVGL AETDGFQKIV ADAEFGELLG AHLVGANSEL INELVLAQNW DLTTEESRSV HIHPTLSEAV KEAAHGISGH
E. coli WAASGRAIAS DCADGMTCLI FDKESHVRIG GAIVGTNGEL LGEIGLAIEM GCDAEDALTI HAHPTLHESV GLAAEFEGS-
B. subt. FAANGRALSL NETDGMFKLI TRKEDGLVIG AQIAGASSDM ISELSLAIEG GMTAEDAMTI HAHPTLGEIT MEAAEAIGSP
S. cer. FAANSRAKTN QDTGVFVKLI -DSKTERILG AHII GPNGEM IAEAGLLEY GASAEDARVC HAHPTLSEAF KEANMAYDKA

+++++ + +++* ++ ++ ++* +++++++ + *++++ + +++++* *****+ ++++++

C. glut. MINF----- --
E. coli ITDLPNPKAK KK
B. subt. IHIVK----- --
S. cer. INC----- --
+

Abb. 13: Vergleich von Aminosäuresequenzen von Dihydroliponamid-Dehydrogenasen aus *C. glutamicum*, *E. coli*, *B. subtilis* und *S. cerevisiae*. Gekennzeichnet sind die FAD-Bindestelle, die Cys-Region, die NAD(H)-Bindestelle und die His-Region. Legende: * in allen verglichenen Polypeptiden identische Aminosäuren; + in mindestens zwei der vier verglichenen Polypeptide identische Aminosäuren.

2.8. Überexpression des Gens für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus *C. glutamicum*

Die enzymatische Aktivität der Dihydroliponamid-Dehydrogenase kann einzeln nachgewiesen werden, indem synthetisches Dihydroliponamid in Gegenwart von NAD^+ oxidiert wird (van den Broek, 1971). Um zu testen, ob das isolierte *lpd*-Gen in *C. glutamicum* funktionsfähig ist, wurde das 5.4kb-*Bam*HI-Fragment aus dem Vektor pUC18 *lpd*5.4 isoliert und in die *Bam*HI-Schnittstelle des *E. coli*/*C. glutamicum*-Pendelvektor pEKO ligiert (Abbildung 14). Durch Elektroporation wurde das rekombinante Plasmid pEKO *lpd*5.4 in den *C. glutamicum*-Wildtyp transformiert.

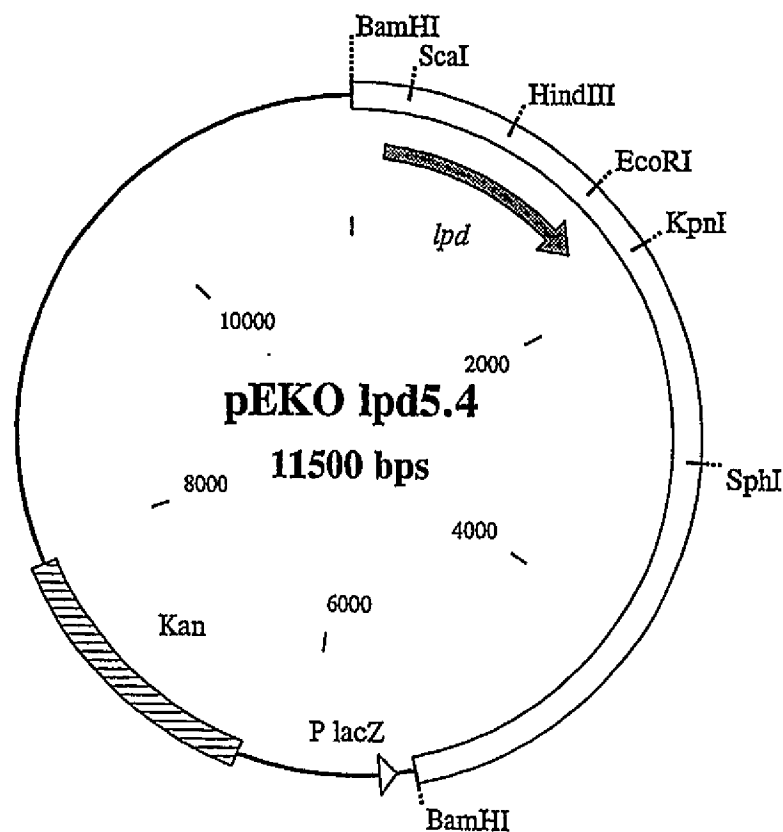


Abb. 14: Restriktionskarte des rekombinanten Plasmids pEKO *lpd*5.4 mit dem Gen für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase (*lpd*) aus *C. glutamicum* (grauer Pfeil). Die Spitze des grauen Pfeiles deutet auf den C-Terminus des resultierenden Polypeptids hin.

Tab. 9: Spezifische Aktivitäten der Dihydroliponamid-Dehydrogenase in Zellextrakten von *C. glutamicum* und der rekombinanten Stämme *C. glutamicum* (pEKO) und *C. glutamicum* (pEKO lpd5.4) nach Wachstum auf Komplexmedium ohne Glukose.

Stamm	Spezifische Aktivität (U/ mg Protein)
<i>C. glutamicum</i> (Wildtyp)	0.15-0.17
<i>C. glutamicum</i> (pEKO)	0.15-0.17
<i>C. glutamicum</i> (pEKO lpd5.4)	1.80-2.00

Die Aktivität der Dihydroliponamid-Dehydrogenase wurde in dem Stamm *C. glutamicum* (pEKO lpd5.4) im Vergleich zum Ausgangsstamm und zum Wildtypstamm mit dem Plasmid pEKO nach Wachstum auf Komplexmedium gemessen. Tabelle 9 zeigt, daß die spezifische Aktivität der Dihydroliponamid-Dehydrogenase in Zellextrakten vom Wildtypstamm und vom Stamm *C. glutamicum* (pEKO) 0.15-0.17 U/ mg Protein betrug. Der rekombinante Stamm (pEKO lpd5.4) zeigte mit 1.8-2.0 U/ mg Protein eine ungefähr 12fache Überexpression des *lpd*-Gens. Das Ergebnis zeigt, daß das auf dem 5.4kb-*Bam*HI-Fragment isolierte *lpd*-Gen in *C. glutamicum* funktionsfähig ist. Die Aktivität der Dihydroliponamid-Dehydrogenase wurde auch in den rekombinanten *E. coli* Stämmen (pUC18 lpd5.4) und (pEKO lpd5.4) im Vergleich zum *E. coli* Stamm DH5 nach Wachstum auf Komplexmedium gemessen. Sowohl in den Zellextrakten des Ausgangsstammes DH5 als auch der rekombinanten Derivate betrug die spezifische Enzymaktivität 1.9-2.2 U/ mg Protein. Die Aktivität der Dihydroliponamid-Dehydrogenase in *E. coli* war damit 10fach höher als in *C. glutamicum*, aber es konnte keine Überexpression mit dem klonierten Fragment gemessen werden. Das Ergebnis deutet darauf hin, daß das aus *C. glutamicum* isolierte *lpd*-Gen in *E. coli* nicht exprimiert wurde.

2.9. Aktivitäten der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase und der Pyruvat-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* bei Überexpression des Gens für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase

Es wurde nun untersucht, ob in *C. glutamicum* bei Überexpression des *lpd*-Gens die Gesamtaktivitäten der 2-OGDH und der PDH beeinflusst wurden. Dazu wurden Zellen von *C. glutamicum* und der beiden rekombinanten Stämme *C. glutamicum* (pEKO) und *C. glutamicum* (pEKO *lpd*5.4) auf Komplexmedium ohne Glukose und auf Glukose-Minimalmedium gezüchtet und die spezifischen Enzymaktivitäten der Dihydroliponamid-Dehydrogenase (E3), der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase und der Pyruvat-Dehydrogenase in den Zellextrakten bestimmt (Tabelle 10). Nach Wachstum auf Komplexmedium ohne Glukose betrug die spezifische E3-Aktivität im Wildtyp und in dem Stamm *C. glutamicum* (pEKO) 0.15 U/ mg Protein, während in dem Stamm *C. glutamicum* (pEKO *lpd*5.4) eine spezifische E3-Aktivität von 1.9 U/ mg Protein gemessen wurde. Im Stamm *C. glutamicum* (Wildtyp) wurde eine spezifische 2-OGDH-Aktivität von 0.14 U/ mg Protein, in *C. glutamicum* (pEKO) von 0.15 U/ mg Protein und in dem Stamm *C. glutamicum* (pEKO *lpd*5.4) von 0.03 U/ mg Protein festgestellt. Die spezifische PDH-Aktivität betrug in *C. glutamicum* (Wildtyp) und in *C. glutamicum* (pEKO) 0.12 U/ mg Protein. Im Stamm *C. glutamicum* (pEKO *lpd*5.4) wurde eine spezifische PDH-Aktivität von 0.025 U/ mg Protein ermittelt. Diese Messungen zeigten, daß nach Wachstum auf Komplexmedium ohne Glukose die spezifischen Enzymaktivitäten sowohl der 2-OGDH als auch der PDH um mehr als 70% erniedrigt waren, wenn das *lpd*-Gen überexprimiert wurde. Nach Wachstum auf Glukose-Minimalmedium wurde im Wildtypstamm und im Stamm *C. glutamicum* (pEKO) eine spezifische E3-Aktivität von 0.17 und 0.16 U/ mg Protein gemessen. In *C. glutamicum* (pEKO *lpd*5.4) betrug die spezifische E3-Aktivität 1.85 U/ mg Protein. Die spezifische 2-OGDH-Aktivität war mit 0.05 U/ mg Protein in den Stämmen *C. glutamicum* (Wildtyp) und *C. glutamicum* (pEKO) gleich hoch, während sie in *C. glutamicum* (pEKO *lpd*5.4) mit 0.03 U/ mg Protein etwas geringer war. Im Wildtypstamm und in *C. glutamicum* (pEKO) wurde jeweils eine spezifische PDH-Aktivität von 0.04 U/ mg Protein gemessen. Mit 0.028 U/ mg Protein fiel auch die spezifische PDH-Aktivität in dem *lpd*-überexprimierenden Stamm *C. glutamicum* (pEKO *lpd*5.4) etwas niedriger aus als in den beiden Vergleichsstämmen.

Diese Enzymmessungen zeigten, daß bei Überexpression des *lpd*-Gens die spezifischen Aktivitäten der 2-OGDH und der PDH erniedrigt werden. Die Reduktion der Gesamtaktivitäten beider Enzymkomplexe war nach Wachstum auf Komplexmedium ohne Glukose stärker als nach Wachstum auf Glukose-Minimalmedium. Die spezifische E3-Aktivität war nach Wachstum auf Komplexmedium ohne Glukose und nach Wachstum auf Glukose-Minimalmedium gleich hoch, woraus geschlossen werden konnte, daß in *C. glutamicum* die Expression des *lpd*-Gens auf genetischer Ebene nicht reguliert wird.

Tab. 10: Spezifische Aktivitäten der Dihydroliponamid-Dehydrogenase (E3), der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase (2-OGDH) und der Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) in Zellextrakten von *C. glutamicum* und der rekombinanten Stämmen *C. glutamicum* (pEKO) und *C. glutamicum* (pEKO lpd5.4) nach Wachstum auf Komplexmedium ohne Glukose und Glukose-Minimalmedium.

Stamm	Spezifische Aktivität (U/ mg Protein)					
	Komplexmedium			Glukose-Minimalmedium		
	E3	2-OGDH	PDH	E3	2-OGDH	PDH
<i>C. g.</i> (Wildtyp)	0.15	0.14	0.12	0.17	0.05	0.04
<i>C. g.</i> (pEKO)	0.15	0.15	0.12	0.16	0.05	0.04
<i>C. g.</i> (pEKO lpd5.4)	1.9	0.03	0.025	1.85	0.03	0.028

2.10. RNA-Analysen am Gen für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus *C. glutamicum*

Bestimmung der Transkriptlänge des Gens für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase

Um die genomische Organisation des Gens für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase (*lpd*) in *C. glutamicum* zu bestimmen, wurde die *lpd*-mRNA durch Northern-Blot-Analyse untersucht. Für die Northern-Hybridisierung wurde eine RNA-Sonde verwendet, weil RNA-RNA-Hybride stabiler sind als DNA-RNA-Hybride. Außerdem ist bei einer RNA-Sonde, anders als bei einer DNA-Sonde, eine Selbsthybridisierung auszuschließen (Melton *et al.*, 1984). Zur Herstellung der Sonde wurde ein 1.1kb *ScaI*/ *SacI*-Fragment (Abbildung 11) aus dem Vektor pUC18 lpd5.4 isoliert und in die *SmaI*/ *SacI*-Schnittstelle des Transkriptionsvektors pGEM4Z™ vor den Promotor der SP6-RNA-Polymerase ligiert. Mit dem resultierenden Vektor pGEM lpd1.1 (Abbildung 15) wurde der *E. coli*-Stamm DH5 transformiert und die Plasmid-DNA aus den Transformanten isoliert. Der rekombinante Vektor wurde mit *Bam*HI linearisiert und durch *in vitro*-Transkription mit der SP6-RNA-Polymerase konnte eine DIG-UTP markierte *lpd*-spezifische "antisense"-RNA-Sonde gewonnen werden, die komplementär zur *lpd*-mRNA war.

Es wurde dann Gesamt-RNA aus dem Wildtypstamm und dem *lpd*-überexprimierenden Stamm *C. glutamicum* (pEKO *lpd*5.4) isoliert, durch denaturierende Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Nach Fixierung durch UV-Licht und Inkubation bei 80°C wurde die RNA gegen die *lpd*-RNA-Sonde hybridisiert.

Das Ergebnis der Northern-Blot-Analyse ist in **Abbildung 16** dargestellt. Spur 1 zeigt das *lpd*-Transkript des Wildtypstammes und Spur 2 das entsprechende Transkript des *lpd*-überexprimierenden Stammes *C. glutamicum* (pEKO *lpd*5.4). Es wurde in beiden RNA-Fractionen ein einzelnes Transkript von ungefähr 1.5kb Länge detektiert, was gut mit dem offenen Leserahmen des *lpd*-Gens von 1407bp und der bis 50bp stromabwärts davon liegenden Terminationsstruktur übereinstimmt. Die Intensität des Signals war mit der RNA des *lpd*-überexprimierenden Stammes stärker als der RNA des Wildtyps. Dies zeigt, daß im Stamm *C. glutamicum* (pEKO *lpd*5.4) erheblich mehr *lpd*-mRNA vorliegt als im Wildtypstamm, und daß das erhaltene Signal spezifisch ist. Darüber hinaus kann man aus der Größe des *lpd*-Transkriptes ableiten, daß das *lpd*-Gen als Monocistron im Chromosom von *C. glutamicum* vorliegt. Die Expression geht demnach von seinem eigenen Promotor aus.

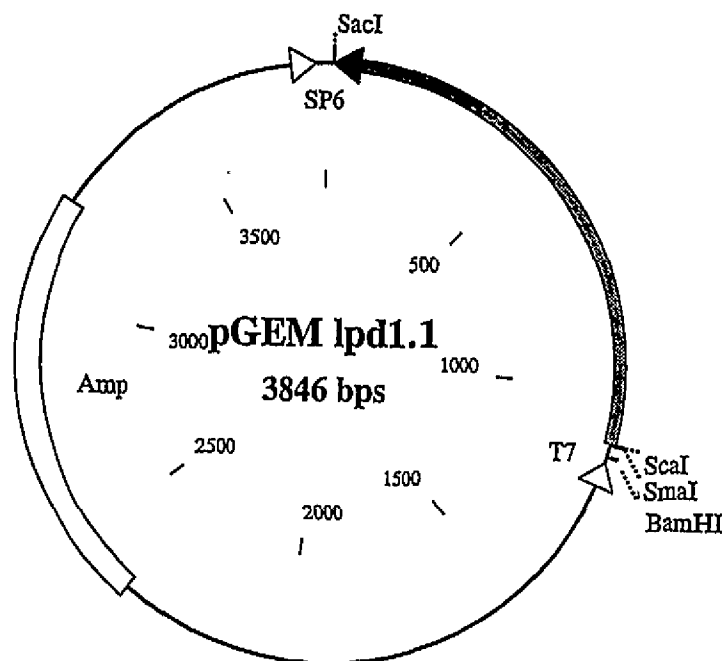


Abb. 15: Restriktionskarte des Vektors pGEM *lpd*1.1, der zur Synthese der "antisense"-RNA-Sonde für die Northern-Blot-Analyse des Transkripts vom Gen für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* verwendet wurde. Der graue Pfeil zeigt das 1.1kb-*ScaI*/*SacI*-Fragment aus dem internen Bereich des Gens. Dieses Fragment wurde in die *SmaI*/*SacI*-Schnittstelle des Vektors ligiert. Die Spitze des grauen Pfeiles deutet auf das 3'-Ende des Fragmentes. Die *in vitro*-Transkription wurde mit der SP6-RNA-Polymerase nach Linearisierung des Vektors mit *Bam*HI durchgeführt. Die Sonde wurde durch Digoxigenin-UTP markiert.

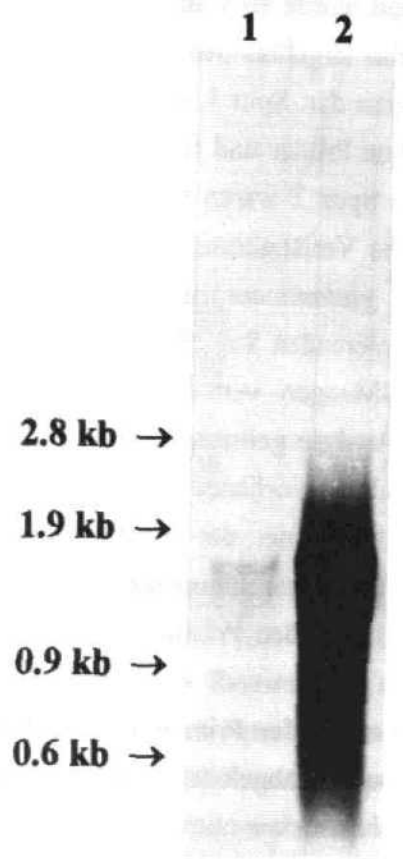


Abb. 16: Northern-Blot-Analyse vom Transkript des Gens für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus *C. glutamicum*. Verwendet wurde Gesamt-RNA aus *C. glutamicum* (Wildtyp) (Spur 1) und aus dem rekombinanten Stamm *C. glutamicum* (pEKO lpd5.4) (Spur 2). Zur Herstellung der RNA-Sonde diente ein 1.1kb *ScaI*/*SacI*-Fragment aus dem internen Bereich des Gens. Die Sonde wurde mit Digoxigenin-UTP markiert. Die Detektion erfolgte durch Anfärbung der hybridisierenden Banden.

Bestimmung des Transkriptionsstarts vom Gen für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus *C. glutamicum*

Die Transkriptionsstartbestimmung des *lpd*-Gens wurde zunächst mit Hilfe der Primer-Extension-Methode mit radioaktivem [α - 35 S]dATP durchgeführt. Als Primer wurde ein DNA-Oligonukleotid (lpd1) verwendet, das dem Bereich von Basenpaar 22 bis Basenpaar 42 stromabwärts vom potentiellen *lpd*-Translationsstart komplementär ist. Dieses Oligonukleotid wurde gegen jeweils gleiche Mengen Gesamt-RNA aus *C. glutamicum* (Wildtyp) und aus *C. glutamicum* (pEKO lpd5.4) hybridisiert. Als Kontrolle wurde ein Ansatz mit RNA aus *C. glutamicum*, jedoch ohne Primer, gewählt, um unspezifische Signale, die durch "self-priming" der RNA Moleküle entstehen könnten, von spezifischen Signalen zu unterscheiden.

Das gleiche DNA-Oligonukleotid wurde als Primer für die parallele DNA-Sequenzreaktion genutzt. **Abbildung 17** stellt das Ergebnis des Primer-Extension-Experimentes neben der entsprechenden *lpd*-DNA-Sequenz dar. Spur 1 zeigt den Versuchsansatz mit Wildtyp-RNA, Spur 2 den Reaktionsansatz ohne Primer und Spur 3 die Reaktion mit RNA aus dem *lpd*-überexprimierenden Stamm. In Spur 2 waren keine Signale zu sehen, d.h. unspezifische, durch "self-priming" entstandene Verlängerungsprodukte konnten ausgeschlossen werden. Der Wildtyp und der Stamm *C. glutamicum* (pEKO *lpd*5.4) zeigten ein übereinstimmendes Signal, das beim *lpd*-überexprimierenden Stamm erheblich intensiver war als beim Wildtyp, obwohl gleiche Gesamt-RNA-Mengen verwendet wurden. Diese Beobachtung wurde bereits bei der Northern-Blot-Analyse gemacht und zeigt, daß im Stamm *C. glutamicum* (pEKO *lpd*5.4) viel mehr *lpd*-mRNA vorhanden ist als beim Wildtyp. Das mit *lpd*1 erzielte Ergebnis wurde mit einem zweiten Primer, der dem DNA-Bereich von Basenpaar 50 bis 70 stromabwärts vom potentiellen *lpd*-Translationsstart komplementär ist (*lpd* 2), bestätigt. **Abbildung 18** zeigt den mit den beiden Primern ermittelten Transkriptionsstart des *lpd*-Gens.

Erstaunlicherweise stimmte der mit den Primern *lpd*1 und *lpd*2 ermittelte Transkriptionsstart mit dem von der DNA-Sequenz abgeleiteten *lpd*-Translationsstart überein. Das ist ein Befund, der bis jetzt bei *C. glutamicum* noch nicht gemacht wurde. Aus diesem Grund wurde die Bestimmung des Transkriptionsstartes mit einer zum Primer-Extension-Experiment alternativen Methode überprüft, nämlich mit dem RNase-Protection-Assay. Für den RNase-Protection-Assay wurde eine mit [α - 35 S]CTP radioaktiv markierte "antisense"-RNA-Sonde, die den Bereich des potentiellen *lpd*-Translationsstartes abdeckte, gegen die *lpd*-mRNA hybridisiert. Dabei entstanden vom Anfang des *lpd*-Transkriptes an RNA-RNA-Hybride mit einzelsträngigen, überhängenden Enden. Die Einzelstränge wurden durch gezielten RNase-Verdau abgebaut, während das doppelsträngige Hybrid vor diesem RNase-Verdau geschützt ist. Nach Denaturierung und gelelektrophoretischer Auftrennung gegen ebenfalls radioaktiv markierte RNA-Größenmarker wurde die Größe des geschützten RNA-Fragmentes abgeschätzt, und es konnte der Start der Transkription bestimmt werden.

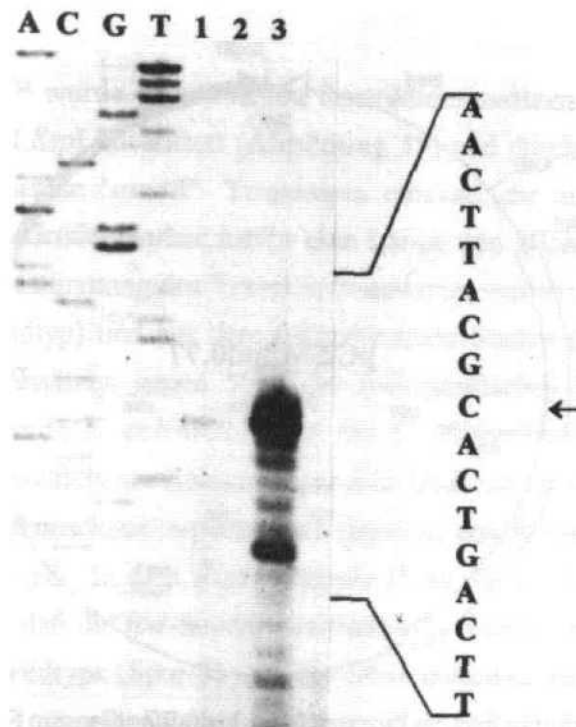


Abb. 17: Primer-Extension-Experiment zur Bestimmung des Transkriptionsstartes vom Gen für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus *C. glutamicum*. Es wurde ein Primer verwendet, der dem Bereich von Basenpaar 22 bis Basenpaar 42 stromabwärts des von der DNA-Sequenz abgeleiteten Translationsstartes komplementär ist (lpd1). Der gleiche Primer diente für die entsprechende DNA-Sequenzreaktion (Spuren A-T). Spur 1 zeigt das Signal aus der Reaktion mit RNA von *C. glutamicum* (Wildtyp), Spur 2 das Kontrollexperiment ohne Primer und Spur 3 das Signal von dem überexprimierenden Stamm *C. glutamicum* (pEKO lpd5.4). Daneben ist die Sequenz des kodogenen Stranges mit Angabe der Base gezeigt, an der die Transkription beginnt. Für die Bestimmung des Transkriptionsstartes und die Sequenzreaktion wurde $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{dATP}$ verwendet. Die Detektion erfolgte durch Autoradiographie.

```

                    50                                100
GGATCCTCCGCATTCAGTAATCTTTCCACAGCATCGGCTTGTCTAAACAGCACGGTGCTTAGACCGTACATAAAACACCTGCATTCTGTGCCCATT

                    150                                " -35"                                " -10"
TGGGCCCGGATGTGGGTGTTTTTCATTTTCTTCCACTCTAAATTAAGTATGGAAACCAACCGCACCCGGATGCACGACAATGACCCACTAAACACGTA

                    mRNA                                lpd1                                lpd2                                300
TCCTTGAATGCGTGACTGAACATTATGACGTAGTAGTACTCGGAGCCGGCCCGGTGGCTATGTCTCCGCCATCCGTGCAGCGCAGCTTGCCAAGAAGGT
V T E H Y D V V V L G A G P G G Y V S A I R A A Q L G K K V

                    350                                400                                450                                500
TGCTGTAATTGAGAAGCAGTACTGGGGTGGTGTTCCTAAACGTGGGCTGCATTCTTCCAAGTCTCTGATCAAAACGCTGAAGTTGCCCATACCTTT
A V I E K Q Y W G G V C L N V G C I P S K S L I K N A E V A H T F
ACCCATGAGAAGAAGACCTTCGGCATCAATGGCGAAGTGACCTTCAACTAGGAGTGTCTACAAGCGTCCCGTGGCGTTTCCGACAAGATCGTTGGAG
T H E K K T F G I N G E V T F N Y E D A H K R S R G V S D K I V G

```

Abb. 18: Sequenzausschnitt aus dem 5'-Bereich des Gens für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus *C. glutamicum*. Der Pfeil zeigt den durch Primer-Extension ermittelten Transkriptionsstartpunkt des Gens an. Doppelt unterstrichen sind die potentiellen "-10"- und "-35"-Promotorregionen.

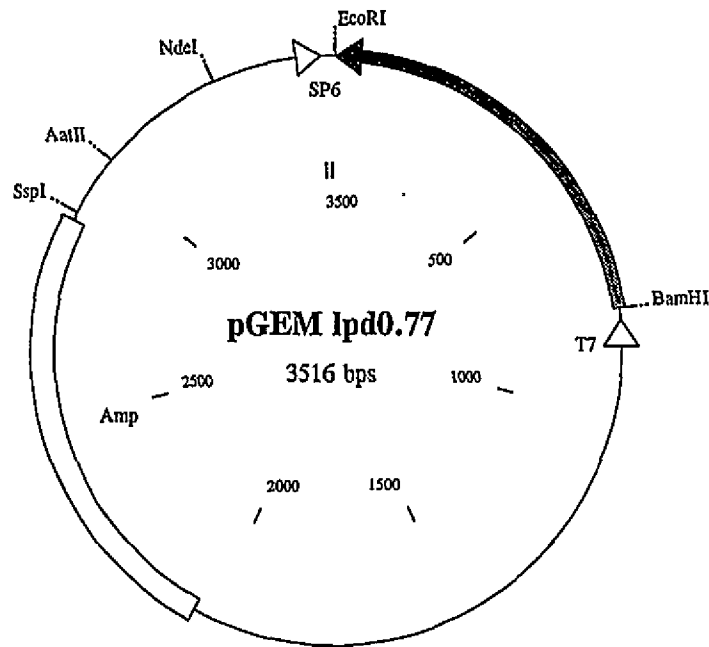


Abb. 19: Restriktionskarte des Vektors pGEM lpd0.77, der zur Synthese der "antisense"-RNA-Sonde für den RNase Protection Assay zur Bestimmung des Transkriptionsstartes des Gens für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* verwendet wurde. Der graue Pfeil zeigt das 0.77 *Bam*HI/ *Eco*RI-Fragment, das den 5'-Bereich des Gens und zusätzlich 211 Basenpaare des stromaufwärts liegenden Bereiches umfaßt. Die Spitze des grauen Pfeiles deutet auf das 3'-Ende des Fragmentes. Die *in vitro*-Transkription wurde mit der SP6-RNA-Polymerase nach Linearisierung des Vektors mit *Bam*HI durchgeführt. Der Vektor wurde ohne Insert zur Synthese von RNA-Größenmarkern benutzt. Dazu erfolgte die *in vitro*-Transkription mit der T7-RNA-Polymerase nach Linearisierung des Vektors mit *Nde*I, *Aat*II und *Ssp*I. Die resultierenden RNA-Größenmarker hatten eine Länge von 305 (*Nde*I), 554 (*Aat*II) und 672 Nukleotiden (*Ssp*I). Die Sonde und die Größenmarker wurden durch [α - 35 S]CTP markiert.

Zur Synthese der RNA-Sonde wurde ein 0.77kb-*Bam*HI/ *Eco*RI-Fragment aus dem Vektor pUC18 lpd5.4 (Nukleotide 1-772 in **Abbildung 12**) in die *Eco*RI/ *Bam*HI-Schnittstelle vor den Promotor der SP6-RNA-Polymerase des Transkriptionsvektors pGEM4ZTM kloniert und der rekombinante Vektor in *E. coli* DH5 transformiert. Die Plasmide pGEM lpd0.77 (**Abbildung 19**) wurden aus den Transformanten präpariert und mit *Bam*HI linearisiert. Durch *in vitro*-Transkription mit der SP6-RNA-Polymerase konnte eine "antisense"-mRNA hergestellt werden. Diese bestand aus 778 Nukleotiden, da in dem Vektor pGEM4ZTM zwischen dem Startpunkt der SP6-Transkription und der *Eco*RI-Klonierungsstelle 6bp liegen, die mittranskribiert werden. Nach dem gleichen Transkriptionsprinzip wurden die RNA-Größenmarker synthetisiert.

Der Vektor pGEM4ZTm wurde in getrennten Restriktionsansätzen mit den Restriktionsenzymen *Nde*I, *Aat*I und *Ssp*I linearisiert (**Abbildung 19**) und durch *in vitro*-Transkription mit der T7-RNA-Polymerase "runoff"-Transkripte erhalten, die als RNA-Größenmarker verwendet wurden. Die Größenmarker hatten eine Länge von 305nt (*Nde*I), 554nt (*Aat*I) und 672nt (*Ssp*I). Zur Bestimmung des Transkriptionsstartes wurden je 50µg Gesamt-RNA aus *C. glutamicum* (Wildtyp) und aus dem rekombinanten Stamm *C. glutamicum* (pEKO *lpd*5.4) in getrennten Ansätzen gegen 50ng der *lpd*-spezifischen Sonde hybridisiert. In einem Kontrollansatz wurde *E. coli*-tRNA statt der *C. glutamicum*-RNA in die Hybridisierung eingesetzt und ebenfalls mit RNasen behandelt. Dadurch sollte das Maß potentieller Fremdhybridisierungen abgeschätzt werden. Das Ergebnis des RNase-Protection-Assay ist in **Abbildung 20** dargestellt. In dem Kontrollansatz (Spur 2) wurde kein Signal erhalten. Daraus ist zu schließen, daß die *lpd*-Sonde spezifisch hybridisierte. Bei der Hybridisierung mit Gesamt-RNA des Wildtyps (Spur 3) und des rekombinanten Stammes *C. glutamicum* (pEKO *lpd*5.4) (Spur 1) traten Signale auf, von denen das größte Signal auf ungefähr 550nt bestimmt wurde. Unterhalb dieses Signals waren weitere Banden zu sehen, die durch die Hybridisierung der Sonde gegen bereits durch Abbau entstandene *lpd*-mRNA-Fragmente entstanden sein könnten. Da das genaue 5'-Ende der *lpd*-spezifischen mRNA-Sonde bekannt war, konnte durch die Größe des geschützten RNA-Fragmentes der Transkriptionsstart bestimmt werden. Die Transkription wird aufgrund dieses Experimentes an dem Adenin-Rest in Position 222 initiiert. Der mit dieser Methode ermittelte Startpunkt liegt 10bp stromabwärts von dem mit der Primer-Extension-Methode bestimmten Initiationspunkt. Obwohl beide Bestimmungen nicht zu einer vollkommenen Übereinstimmung führten, stimmte doch der Bereich der Transkriptionsinitiiierung überein, und es konnte der Befund bestätigt werden, daß der Start der Transkription nicht stromaufwärts vom Start der Translation liegt. Aus Untersuchungen am Transkript des Gens für die Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* (Diplomarbeit J. Schwinde, 1991) konnte die Erfahrung gemacht werden, daß der RNase-Protection-Assay nicht die Genauigkeit liefern kann, wie es bei der Primer-Extension-Methode der Fall ist. Das könnte dadurch bedingt sein, daß an den Enden eine unvollständige Hybridisierung bestand, sodaß durch den RNase-Verdau ein etwas größerer Bereich als vorhersehbar abgebaut wurde.

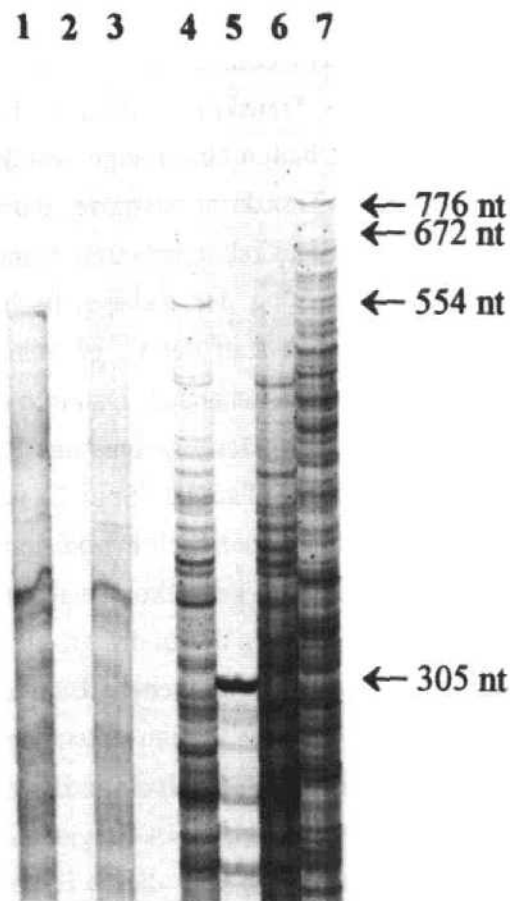


Abb. 20: RNase-Protection-Assay zur Bestimmung des Transkriptionsstartes vom Gen für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus *C. glutamicum*. Es wurde eine RNA-Sonde verwendet, die den 5'-Bereich des Gens und zusätzlich 211 Nukleotide des stromaufwärts liegenden Bereiches umfaßte. Spur 1 zeigt das Hybridisierungsergebnis mit RNA aus dem überexprimierenden Stamm *C. glutamicum* (pEKO lpd5.4), Spur 2 das Kontrollexperiment mit tRNA aus *E. coli* und Spur 3 das Ergebnis mit RNA aus *C. glutamicum* (Wildtyp). In den Spuren 4-6 sind die RNA-Größenmarker dargestellt. Spur 7 zeigt die verwendete RNA-Sonde, die ebenfalls als Größenmarker genutzt wurde. Die Sonde und die Größenmarker wurden durch [α - 35 S]CTP markiert. Die Detektion erfolgte durch Autoradiographie.

3. Isolierung der Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus *C. glutamicum*

Es konnte festgestellt werden, daß der Transkriptionsstart des *lpd*-Gens mit dem von der DNA-Sequenz abgeleiteten Start der Translation übereinstimmte. Um den Translationsstart experimentell zu bestimmen, wurde die Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus Extrakten des rekombinanten Stammes *C. glutamicum* (pEKO lpd5.4) isoliert und der aminoterminal Bereich ansequenziert. Um die Proteinbande der Dihydroliponamid-Dehydrogenase zu detektieren, wurden Zellextrakte von *C. glutamicum* (Wildtyp) und von dem überexprimierenden Stamm *C. glutamicum* (pEKO lpd5.4) auf einem SDS-PAGE-Gel aufgetrennt.

Nach Anfärben des Gels mit Serva-Blue konnte in dem Extrakt des überexprimierenden Stammes eine Proteinbande identifiziert werden, die erheblich intensiver war als in dem Zellextrakt des Wildtyps. Es lag nahe, daß es sich um die Bande der Dihydroliponamid-Dehydrogenase handelte, sodaß die weiteren Versuche darauf abzielten, diese Proteinbande zu isolieren. Die Zellen aus zwei 50ml-Kulturen des Stammes *C. glutamicum* (pEKO lpd5.4) wurden nach Wachstum auf Komplexmedium mit 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7, in einem Volumen von 1 ml konzentriert und anschließend durch Ultraschall aufgeschlossen. Nach Zentrifugation wurden von diesem Zellextrakt 0.2 ml für die Bestimmung der Enzymaktivität und des Proteingehaltes pipettiert. Die restlichen 0.8 ml des Zellextraktes wurden ebenfalls mit 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7, auf 5 ml verdünnt und in einem ersten Reinigungsschritt einer 2-stündigen Ultrazentrifugation bei 183000 x g unterzogen. Von dem Überstand wurden 1.5 ml wiederum zur Bestimmung der Enzymaktivität und des Proteingehaltes pipettiert und danach die verbliebenen 3.5 ml in einem zweiten Schritt durch FPLC über eine MonoQ-Säule, pH 7, aufgereinigt. Alle Schritte wurden bei 40°C durchgeführt. Nach der FPLC wurden 92 Eluatfraktionen erhalten, die auf Enzymaktivität der Dihydroliponamid-Dehydrogenase getestet wurden. In den Fraktionen 71, 72 und 73 konnte enzymatische Aktivität gemessen werden. Die Aufreinigung der Dihydroliponamid-Dehydrogenase ist zusammenfassend in **Tabelle 11** dargestellt. Ihr ist zu entnehmen, daß die Aktivitätsausbeute nach der Ultrazentrifugation im Vergleich zum Rohextrakt bei 64% lag und der Reinigungsfaktor 1.4 betrug. Nach der FPLC-Behandlung des Ultrazentrifugates betrug die Aktivitätsausbeute 50%, und es wurde ein Reinigungsfaktor von 14.5 im Vergleich zum Rohextrakt erzielt.

Ferner wurden Proben vom Rohextrakt, vom Ultrazentrifugat und von den MonoQ-Fraktionen 71, 72 und 73 durch SDS-PAGE aufgetrennt. In dem mit Serva-Blue gefärbten Gel war nach der FPLC-Behandlung in den Fraktionen 71, 72 und 73 jeweils eine einzige Proteinbande zu erkennen. Daraus konnte geschlossen werden, daß das Enzym bis zur Homogenität gereinigt wurde (**Abbildung 21**).

Die MonoQ-Fraktion 73 wurde mit Hilfe des Edman-Abbaus ansequenziert, wobei die ersten 14 Aminosäuren des Polypeptids ermittelt werden konnten. Die Sequenzanalyse ergab die AS-Sequenz: T-E-H-Y-D-V-V-V-L-G-A-G-P-G. Bis auf die erste Aminosäure stimmt das Ergebnis mit der von der DNA-Sequenz abgeleiteten Amino-terminalen Region überein (**Abbildung 12 und 18**). Das Startcodon des *lpd*-Gens ist ein GTG-Triplett, das für die Aminosäure Valin codiert. *In vivo* wird jedoch ein Formyl-Methionin an dieser Position eingebaut, das vom reifen Protein prozessiert wird, sodaß zu erwarten war, es in der Sequenz nicht zu finden (Ben-Bassat und Bauer, 1987).

Tab. 11: Isolierung der Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* (pEKO lpd5.4) nach Wachstum auf Komplexmedium.

Reinigungs- schritt	Volumen (ml)	Gesamt- protein (mg)	Enzymakti- vität (U)	Spez. Aktivität (U/ mg)	Aktivitäts- ausbeute (%)	Reinigungs- faktor
Rohextrakt	0.8	14	30.8	2.2	100	1.0
Ultrazentri- fugation	5.0	6.7	20	3.0	64	1.4
MonoQ, pH7	3.5	0.49	15.5	32	50	14.5

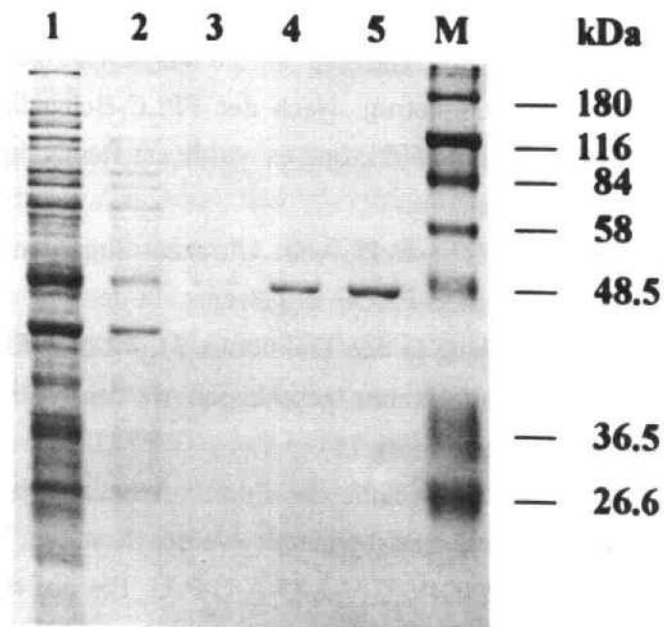


Abb. 21: SDS-PAGE der bei der Isolierung der Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* (pEKO lpd5.4) anfallenden Fraktionen. Spur 1: Rohextrakt, Spur 2: Extrakt nach Ultrazentrifugation, Spuren 3, 4 und 5 Extraktfraktionen 71, 72 und 73 nach FPLC mit der MonoQ-Säule bei pH7. Spur M zeigt die Molekulargewichtstandards: α -2-Makroglobulin (180 kDa), β -Galactosidase (116 kDa), Fructose-6-phosphat-Kinase (84kDa), Pyruvat-Kinase 58 kDa, Fumarase (48.5 kDa), Lactat-Dehydrogenase (36,5 kDa) und Triosephosphat-Isomerase (26,6 kDa).

4. Inaktivierung des Gens für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase im Chromosom von *C. glutamicum*

Um nachzuweisen, ob das Produkt des isolierten *lpd*-Gens für die Aktivität der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase und die Aktivität der Pyruvat-Dehydrogenase erforderlich ist, wurde das *lpd*-Gen im Chromosom von *C. glutamicum* durch eine Methode, die als "Genunterbrechung" bezeichnet wird (Schwarzer und Pühler, 1991), inaktiviert werden. Für die Inaktivierung wurde ein *lpd*-internes 0.45 kb *ScaI*/ *EcoRI*-Fragment (Abbildung 22) nach Auffüllen der Enden in den mit *KpnI* geschnittenen Vektor pEM1, dessen Enden ebenfalls aufgefüllt worden waren, ligiert. Das rekombinante Plasmid pEM1 *lpd*0.45 wurde in den *E. coli*-Donorstamm S17-1 transformiert und danach über Konjugation in *C. glutamicum* transferiert. Durch den Einbau des Vektors pEM1 ins Genom erhält der Empfängerstamm eine Resistenz gegenüber Kanamycin. Da der Vektor aber in *C. glutamicum* nicht repliziert, wurden nach Selektion auf kanamycinhaltigem Medium Klone erhalten, bei denen das pEM1-Derivat ins Chromosom integriert sein mußte. Das Transkonjuganden-Medium enthielt außerdem Nalidixinsäure, um das Wachstum des Nalidixinsäure-sensitiven *E. coli*-Donorstammes zu verhindern. *C. glutamicum* ist unempfindlich gegenüber Nalidixinsäure. Der Einbau des Vektors ins corynebakterielle Chromosom erfolgt über homologe Rekombination. Da der Vektor pEM1 keine chromosomalen Anteile aus *C. glutamicum* enthält, sollte die Rekombination nur zwischen dem internen Fragment und dem *lpd*-Gen stattfinden.

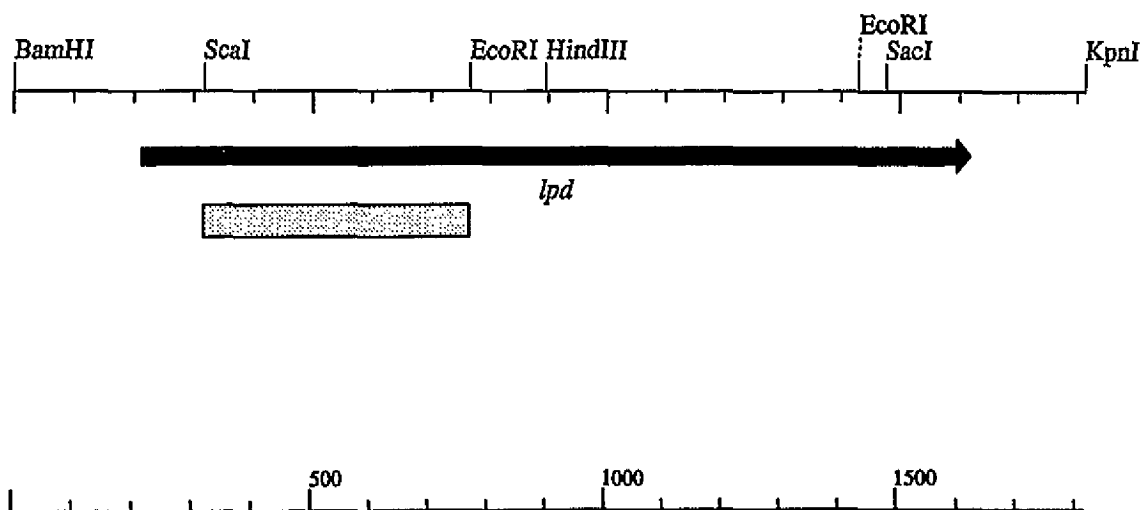


Abb. 22: Restriktionskarte vom Gen für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus *C. glutamicum*. Die Spitze des grauen Pfeiles gibt den Carboxy-Terminus des resultierenden Polypeptids an. Mit dem grauen Rahmen ist das interne 0.45kb-*ScaI*/ *EcoRI*-Fragment gekennzeichnet, das zur "Unterbrechung" des Gens benutzt wurde.

Es wurde eine Transkonjugande erhalten, die auf kanamycinhaltigem Medium wuchs. Obwohl für die Anzucht der Zellen nach der Konjugation mit Acetat und Succinat supplementiertes BHI-Komplexmedium verwendet wurde, benötigte die Transkonjugande zum Wachstum 60-70 Stunden. Die erworbene Kanamycinresistenz deutete auf eine Integration des Vektors ins Genom hin. Das schlechte Wachstum der Zellen war zudem ein guter Hinweis, daß das *lpd*-Gen zerstört wurde. Die potentielle *lpd*-Mutante wurde als *C. glutamicum* JS1 bezeichnet.

Durch einen Plattentest wurde der Phänotyp des Stammes *C. glutamicum* JS1 im Vergleich zu *C. glutamicum* (pEKO) analysiert. Das Ergebnis ist in **Tabelle 12** dargestellt. Die Transkonjugande wuchs nur, wenn das Medium Acetat und Succinat als Zusätze enthielt. Der Bedarf von Acetat wies auf einen Defekt in der Pyruvat-Dehydrogenase und der Bedarf von Succinat auf einen Defekt in der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase des Stammes *C. glutamicum* JS1 hin. Der Phänotyp dieser Mutante entsprach der Erwartung, wenn im Chromosom nur ein *lpd*-Gen vorliegt, dessen Genprodukt Bestandteil beider Enzymkomplexe ist.

Tab. 12: Plattentest mit den Stämmen *C. glutamicum* (pEKO) und *C. glutamicum* JS1, mit dem die "Unterbrechung" des Gens für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase im Chromosom durchgeführt wurde. Die Anzucht der Zellen erfolgte auf BHI-Komplexmedium, das Nalidixinsäure (50 µg/ l) und Kanamycin (15 µg/ l) enthielt. Die Supplemente Acetat und Succinat waren je in 50 mM Konzentration enthalten. Legende: - = kein Wachstum; + = Wachstum.

<i>C. glutamicum</i> - Stamm	Medium			
	BHI ohne Supplemente	BHI + Acetat	BHI + Succinat	BHI +Acetat +Succinat
<i>C. g.</i> (pEKO)	+	+	+	+
<i>C. g.</i> JS1	-	-	-	+

Tab. 13: Spezifische Enzymaktivitäten der Dihydroliponamid-Dehydrogenase (E3), der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase (2-OGDH) und der Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) in den Stämmen *C. glutamicum* (pEKO) und *C. glutamicum* JS1, mit dem die "Unterbrechung" des Gens für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase im Chromosom durchgeführt wurde. Die Anzucht der Zellen erfolgte auf Kulturplatten mit BHI-Komplexmedium, das Nalidixinsäure (50 µg/ l) und Kanamycin (15 µg/ l)) enthielt. Die Supplemente Acetat und Succinat waren je in 50 mM Konzentration enthalten.

<i>C. glutamicum</i> -Stamm	Spezifische Aktivität (U/ mg Protein)		
	E3	2-OGDH	PDH
<i>C. g.</i> (pEKO)	0.150	0.073	0.065
<i>C. g.</i> JS1	0.105	0.040	0.044

Aus Flüssigkulturen des Stammes *C. glutamicum* JS1 wurden Zellextrakte gewonnen, um die enzymatischen Aktivitäten der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase, der Pyruvat-Dehydrogenase und der Dihydroliponamid-Dehydrogenase im Vergleich zu *C. glutamicum* (pEKO) zu bestimmen. Beim Züchten der Zellen fiel auf, daß der Stamm *C. glutamicum* JS1 48 Stunden benötigte, um von einer Animpf-OD₆₀₀ von 0.3 auf eine OD₆₀₀ von 3 anzuwachsen. Erst nach einer langen lag-Phase von 30-36 Stunden wurde ein mit dem Referenzstamm *C. glutamicum* (pEKO) vergleichbares Wachstum beobachtet, der auf dem BHI-Komplexmedium 3 bis 4 Stunden benötigte, um von einer OD₆₀₀ von 0.3 auf eine OD₆₀₀ von 3 anzuwachsen. In den sich anschließenden Enzymtests waren im Stamm *C. glutamicum* JS1 die Enzymaktivitäten der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase, der Pyruvat- und der Dihydroliponamid-Dehydrogenase mit denen des Referenzstammes vergleichbar. Es gab aufgrund dieser Messungen keinen Hinweis auf einen Defekt im *lpd*-Gen. Gleichwohl signalisierte der potentielle Mutantenstamm im Plattentest einen Phänotyp, der auf einen Defekt im *lpd*-Gen schließen ließ. Daher wurden Zellextrakte direkt von auf Kulturplatten gezüchteten Zellen hergestellt und die enzymatischen Aktivitäten bestimmt. Das Ergebnis ist in **Tabelle 13** dargestellt.

Es konnte gezeigt werden, daß der Stamm *C. glutamicum* (pEKO), wie aus einer Flüssigkultur, eine spezifische Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Aktivität von 0.15 U/ mg Protein aufwies, während die spezifischen Aktivitäten der 2-OGDH (0.073 U/ mg Protein) und der PDH (0.065 U /mg Protein) um 50% geringer waren als nach Wachstum im Schüttelkolben (**Kapitel 1.1., Tabelle 4**).

Der Stamm *C. glutamicum* JS1 zeigte im Vergleich dazu eine um 30 % geringere spezifische Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Aktivität (0.105 U/ mg Protein) und ebenfalls niedrigere Enzymaktivitäten der 2-OGDH (0.040 U/ mg Protein) und der PDH (0.044 U/ mg Protein).

Durch Southern-Blot-Analyse wurde untersucht, ob der Vektor pEM1 lpd0.45 tatsächlich in das *lpd*-Gen integriert war und, ob eine Korrelation zu den geringeren Enzymaktivitäten im Stamm *C. glutamicum* JS1 bestand. Chromosomale DNA wurde aus auf Kulturplatten gezüchteten Zellen von *C. glutamicum* (Wildtyp) und *C. glutamicum* JS1 isoliert, mit *Bam*HI restriktionsverdaut und gegen eine homologe *lpd*-DNA-Sonde hybridisiert. Es wurde nur eine DNA-Bande nachgewiesen, die dem 5.4kb-*Bam*HI-Fragment zugeordnet werden konnte, auf dem das *lpd*-Gen ursprünglich identifiziert wurde. Eine Integration des Vektors pEM1 lpd0.45 wurde nicht festgestellt. Da der Stamm *C. glutamicum* JS1 im Plattentest den für einen Defekt im *lpd*-Gen charakteristischen Phänotyp gezeigt hatte, liegt der Schluß nahe, daß im frühen Wachstumsstadium eine Integration des Vektors pEM1 lpd0.45 und damit Zerstörung des *lpd*-Gens bestand. Der Grund für die Instabilität der Integrationsmutante *C. glutamicum* JS1 im fortgeschrittenen Wachstumsstadium bedarf aber weiterer Untersuchungen.

5. Analyse des DNA-Bereiches vor dem Gen für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus *C. glutamicum*

Auf dem *lpd*-tragenden *Bam*HI/ *Sph*I-Fragment standen zur DNA-Sequenzanalyse des vom *lpd*-Gen stromaufwärts liegenden Bereichs nur 211bp zur Verfügung. Das reichte nicht aus, um Aussagen zu treffen, ob sich noch ein weiteres Gen in der Nachbarschaft zum *lpd*-Gen befindet. Da die genetischen Untersuchungen in *E. coli* und *A. vinelandii* zeigten, daß das *lpd*-Gen im Chromosom stromabwärts der *aceE*/ *aceF*-Gene (*E. coli*) oder der *sucA*/ *sucB*-Gene (*A. vinelandii*) liegt (Einleitung), konzentrierten sich die weiteren Untersuchungen auf die Identifizierung, Isolierung und Sequenzanalyse des DNA-Bereiches, der stromaufwärts vom *lpd*-Gen liegt (5'-Bereich).

5.1. Isolierung und Sequenzierung des DNA-Bereiches vor dem Gen für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus *C. glutamicum*

Zur Identifizierung des vor dem *lpd*-Gen liegenden DNA-Bereiches wurde eine Southern-Blot-Analyse durchgeführt. Als homologe DNA-Sonde diente das 1.1kb *Sca*II/ *Sac*I-*lpd*-Fragment, das bereits in der in Kapitel 2.5 beschriebenen Southern-Blot-Analyse verwendet wurde. Mit dieser Sonde konnte aus chromosomaler DNA von *C. glutamicum* ein 3.4kb-*Kpn*I-Fragment detektiert werden, das außer dem vollständigen *lpd*-Gen ungefähr 1700bp des davor liegenden DNA-Bereiches umfaßte.

Zur Isolierung dieses Fragmentes wurde eine partielle Genbank in dem Plasmid pUC18 angelegt. Aus chromosomaler *KpnI*-geschnittener DNA von *C. glutamicum* wurden Fragmente von 3.0-3.8 kb isoliert und in den Vektor pUC18 ligiert, der ebenfalls mit dem Restriktionsenzym *KpnI* geschnitten worden war. Die Ligationsansätze wurden dann in den *E. coli*-Stamm DH5 transformiert. Es wurden 112 Transformanten erhalten, von denen 5ml-Kulturen mit je 8 Kolonien angelegt wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden die rekombinanten Plasmidgemische isoliert und mit *KpnI* restriktionsverdaut. Die Verdau wurde auf eine Nylonmembran transferiert und gegen die homologe *lpd*-DNA-Sonde hybridisiert. In einem Plasmidgemisch konnte das hybridisierende Fragment identifiziert werden. Danach wurden die Einzelplasmide dieses Gemisches nach *KpnI*-Verdau durch Southern-Hybridisierung analysiert und das Plasmid mit dem 3.4kb-*KpnI*-Fragment detektiert, das mit pUC18 *lpd*3.4 bezeichnet wurde (**Abbildung 23**). Das Fragment wurde mittels eines als "Primer walking" bezeichneten Verfahrens nach der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) sequenziert.

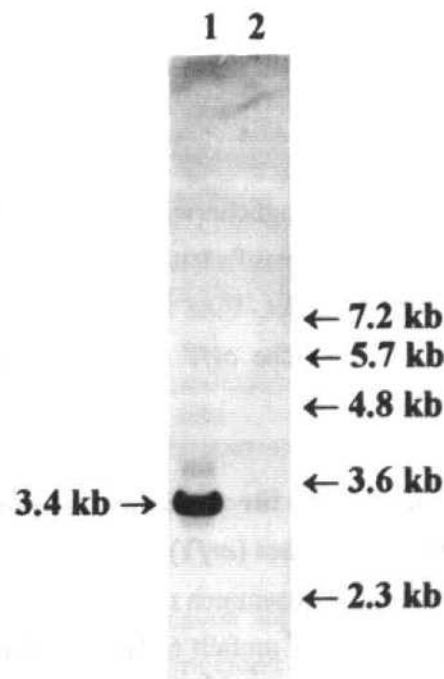


Abb. 23: Southern-Blot-Analyse von DNA des rekombinanten Plasmids pUC18 *lpd*3.4 (Spur 1) und chromosomaler DNA aus *C. glutamicum* (Spur 2). pUC18 *lpd*3.4 enthält das chromosomale 3.4kb-*KpnI*-Fragment, das das Gen für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase und ungefähr 1700bp des davor liegenden DNA-Bereiches aus *C. glutamicum* umfaßt. Die DNA wurde jeweils mit dem Restriktionsenzym *KpnI* geschnitten. Als Sonde diente ein 1.1kb-*ScaI*/*SacI*-Fragment aus dem kodierenden Bereich des Gens für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus *C. glutamicum*. Die Sonde wurde mit Digoxigenin-dUTP markiert. Die Detektion der hybridisierenden Banden erfolgte durch Anfärbung.

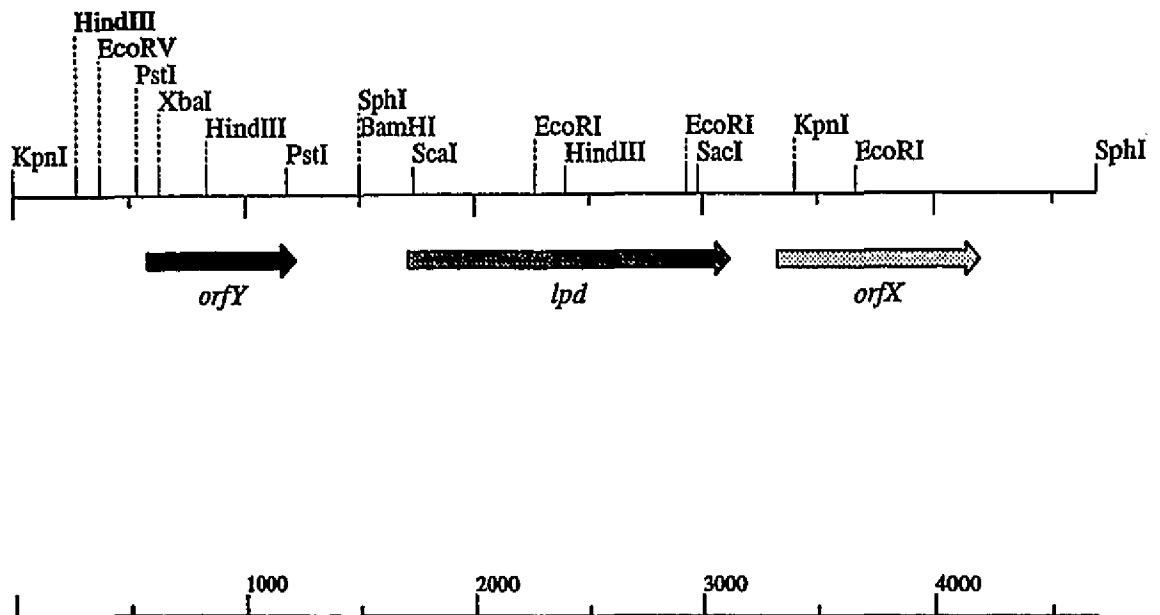


Abbildung 24: Restriktionskarte von dem Gen für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* (*lpd*) und der flankierenden DNA-Bereiche *orfY* und *orfX* im Chromosom. Das von *orfY* abgeleitete Polypeptid zeigte Ähnlichkeit zur Galaktosid-Acetyltransferase aus *E. coli* (Hediger *et al.*, 1985). Zu dem von *orfX* abgeleiteten Polypeptid konnte keine Ähnlichkeit mit in der Genbank abgelegten Sequenzen festgestellt werden.

Die computergestützte Suche nach möglicherweise kodierenden Regionen ergab einen offenen Leserahmen, der 1137bp stromaufwärts vom *lpd*-Translationsstart beginnt und 492bp stromaufwärts vom *lpd*-Gen endet. Eine zusammenfassende Darstellung vom *lpd*-Gen und der flankierenden DNA-Bereiche *orfY* und *orfX* im Chromosom von *C. glutamicum* ist in **Abbildung 24** gezeigt.

Charakterisierung des vor dem Gen für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* liegenden DNA-Bereiches (*orfY*)

Die Nukleinsäuresequenz von *orfY* ist zusammen mit der davon abgeleiteten Aminosäuresequenz in **Abbildung 25** dargestellt. *orfY* umfaßt 645bp, die für ein Polypeptid von 215 AS mit einem errechneten Molekulargewicht von 22325 kodieren. Vor dem von der DNA abgeleiteten Startcodon (ATG₅₇₅) befindet sich eine wenig mit einer typischen Ribosomenbindungsstelle übereinstimmende Sequenz. Die abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte 22.3% Identität zur Galaktosid-Acetyltransferase aus *E. coli* (Hediger *et al.*, 1985). Der Vergleich der Aminosäuresequenzen ist in **Abbildung 26** dargestellt.

```

      . . . . . 50 . . . . . 100
GGTACCTTGCTAATTTTGTCTGACAATTTAATGCGTTCATGTTCTTTTACCCATTGGGGAACATCCTTAATGGGCGCCCGTCCAGAACTAGGACT
      . . . . . 150 . . . . . 200
ATTTGCCAGTTTTTCATAGTTTTGTTGCGAAACCGATTTAATAGATTGACTGCAATATTCGTCATAAGCGATTGTTGGGATTACTACACTTATTAATGGAG
      . . . . . 250 . . . . . 300
CGGAAGTAGTCATGGTGGCTTTCTTTGAGAATATTTTCGCTGACTGCTTTAATTTACTTGATGGGGCAATAAGCTTACATCGAAATATTGAAGAATAGC
      . . . . . 350 . . . . . 400
TTCTCCTCTGGGGCATAAGAGAAAAGAGGCAATTTGCTTCTAATTTTGTGTTTCTATTGAACAGGGCTAGCTTGATATCTGGCTCTGAGCGGGATTTA
      . . . . . 450 . . . . . 500
TAGACCCCTTCAGGATCTTTTTCAAAATGTAATTCATTTATGGTTCGAATTATGATCGCTATATGCTTTTAGTAAAGAGAAGATGTGTTGAAGGAGAGG
      . . . . . 550 . . . . . 600
TTAGAGAGATAAGGCTCTATTTGATCATCTGCAGATAGATACGTGTTTCAAGAACTTGCAATTAAGAGGGAAGATGGTGTCTCAAAACTCAGTCGTAGT
      . . . . . 650 . . . . . 700
GATAGGTGCATCTGGATTCCGGTAGGGAGAGCTAGACGTTCTCGAAGCAATGAAGGAAGCCGGACATTTCGTTAGAGATAATTGGAGTAGTTGATGACAAT
      . . . . . 750 . . . . . 800
CCTGCTGCAATCAATTTGCAGCGTCTTGCAGAGCGAAAAATCGAATATCTAGGAACTTTAAAGAATGGATTGAGGGATCTCCAAGTCGTGTAAGTATG
      . . . . . 850 . . . . . 900
TGCTTGGGATTGGAAACCAACGATTGCGCATAAGCTTTCTGCTCTTTAGACAAGTCTGGTTTCGATGCATTTACGGCGGTGCATCCCTCTGCAGTGAT
      . . . . . 950 . . . . . 1000
VLAIGNPTIRHKL SALLDKSGFDAFTAVHP SAVI
      . . . . . 1050 . . . . . 1100
AGGAAGCCAAGTAGTGTTGGGTCTGGGGCTGTTGTATGTTCTGGGGCCGTGATTTGACCAATGTAAGGCTTGGTGTGCATGTGCATATCAACCCAAAT
      . . . . . 1150 . . . . . 1200
GAGCTCGGCTACAGTATTGCAAGGACTGACTATCGGGAATAGGTTCGTTAGTGGGTGCATCTTCGTGCGTCACTAAGGATATTTCTGCAGGGAAGGTAGT
      . . . . . 1250 . . . . . 1300
GAAATV LQGLTYIGNRSLV GASSCVTKDISAGKV V
      . . . . . 1350 . . . . . 1400
TAAGGGTATTCCTGCGCGCTAAAAAAGTAGAAATTATCGACCTTTAACGCCATTGTGATTAGTATTTGGCGTTGCCTCCTGAGCGACTTGCAAAATAGTT
      . . . . . 1450 . . . . . 1500
KGI PAR *
      . . . . . 1500
CATTTCGGCAGAGTGCTAACGGTTAGGCACTATTTCCGTTAGTTCCTTTGTAGTCCCGACGCATCTAAGCCGAAACAGCTAAAAGTCGCACAGGGCCGT
      . . . . . 1550
GTAATGCCCGTAAGAGATATTTAAGGAATCTAACTATGCCAATTCATGAACAGATCATCTTCTTCATCAACGAAATCCTAGGTTACGGCTGCATGCTG
      . . . . . 1600
GATCC

```

Abb. 25: Nukleinsäuresequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz des vor dem Gen für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* liegenden DNA-Bereiches, der mit *orfY* bezeichnet wurde. RBS = potentielle Ribosomenbindungsstelle. * = Stop der Translation. Die Sequenz ist bis zur stromaufwärts vom *lpd*-Gen liegenden *Bam*HI-Schnittstelle gezeigt (einfach unterstrichen).

C. glut.	M--VAQNSVV	VI--GASGFR	ESLDVLEAMK	EAGHSLEIGV	VDDNPAAINL	QRLAERK-EY	LGTLKE--WI
E. coli	M---NHPMTE	RI--RA---K	LFTDMCEGLP	E-KRLRGKLM	YEFNHSHPS	VEKRESLKEM	FATVGENAWV
	+	+	+	+	+	+	+
C. glut.	E--GSPSCKY	VLAIG-NPTI	RHKLSLLD--	-KSGFDAFTA	--VHSAVIGS	QV---VFGSG	AVVSGAVIST
E. coli	E-PPVYSYGS	NIHIGRNFYA	NFNLTVDYDT	VTIGDNVLIA	PNVTS-VTGH	PVHHELRKNG	EMYFPITIGN
	+	+	++	+	+	+	+
C. glut.	NVRLGVHVHI	NPV--TIG-H	DS-I-LEDYV	-SINPAATIS	GEVLIMEETL	GAAATVLQGL	TIGNRSLVGS
E. coli	NVWIGSHVVI	NPV--TIG-D	NSVIGAGSIV	TDIPPNVVAA	G-VPCRVI	RE NDRDKHYFFK	DYKVESSV--
	++	+	++	++	++	+	+
C. glut.	SCVTKDISAG	KVKVGIPA					
E. coli	-----	-----					

Abb. 26: Vergleich der Aminosäuresequenzen zwischen dem von *orfY* kodierten Polypeptid aus *C. glutamicum* und der Galaktosid-Acetyltransferase aus *E. coli* (Hediger *et al.*, 1985).
Legende: + = identische AS-Reste. Der Bereich, der für die Ähnlichkeit besonders signifikant war, ist einfach unterstrichen.

5.2. Untersuchungen zur Funktion des vor dem Gen für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* liegenden DNA-Bereiches (*orfY*)

Da im zweiten Reaktionsschritt der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase und der Pyruvat-Dehydrogenase auch Acylgruppen übertragen werden, wurde auf enzymatischer Ebene untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen dem von *orfY* kodierten Polypeptid und den beiden Enzymkomplexen besteht.

Das *orfY*-und *lpd*-tragende 3.4kb-*KpnI*-Fragment wurde aus dem Vektor pUC18 *lpd*3.4 isoliert und in den *E. coli*/*C. glutamicum*-Pendelvektor pEKO kloniert. Der resultierende Vektor (pEKO *orfY*) wurde anschließend in *C. glutamicum* (Wildtyp) transformiert. Nach Wachstum auf Komplexmedium ohne Glukose wurden die Enzymaktivitäten der 2-OGDH, der PDH und der Dihydroliponamid-Dehydrogenase gemessen. Das Ergebnis dieser Messung ist in **Tabelle 14** dargestellt. Es konnte gezeigt werden, daß im Vergleich zum Stamm *C. glutamicum* (pEKO) in dem rekombinanten Stamm *C. glutamicum* (pEKO *orfY*) das *lpd*-Gen ungefähr 15fach überexprimiert wurde und bei dieser Überexpression die jeweilige Gesamtaktivität der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase und der Pyruvat-Dehydrogenase auf etwa 25% der Ausgangsaktivität sank. Diese Beobachtung wurde bereits gemacht, wenn das *lpd*-Gen allein überexprimiert wurde (**Kapitel 2.8**). Es war bei diesen Enzymmessungen kein Effekt festzustellen, der auf eine Beteiligung des von *orfY* kodierten Polypeptids mit der 2-OGDH oder der PDH schließen ließ.

Tab. 14: Aktivitäten der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase (2-OGDH), der Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) und der Dihydroliponamid-Dehydrogenase (E3) in den Stämmen *C. glutamicum* (pEKO) und *C. glutamicum* (pEKO orfY), der das Gen für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* und *orfY* plasmidgebunden enthält. Die von *orfY* abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte Ähnlichkeit zur Galaktosid-Acetyltransferase aus *E. coli*. Die Zellen wurden auf Komplexmedium ohne Glukose gezüchtet.

<i>C. glutamicum</i> -Stamm	Spezifische Enzymaktivität (U/ mg Protein)		
	2-OGDH	PDH	E3
<i>C. g.</i> (pEKO)	0.120	0.110	0.190
<i>C. g.</i> (pEKO orfY)	0.030	0.035	3.000

Die Galaktosid-Acetyltransferase aus *E. coli* wird durch das *lacA*-Gen kodiert, das das distale Gen des *lac*-Operons ist. Es wurde im Stamm *C. glutamicum* (pEKO orfY) sowohl unter IPTG-induzierenden als auch unter nichtinduzierenden Bedingungen versucht, dieses Enzym zu messen. Es konnte aber keine Galaktosid-Acetyltransferase-Aktivität festgestellt werden. Die Funktion von *orfY* in *C. glutamicum* bedarf daher weiterer Untersuchungen.

IV. DISKUSSION

Es wurde lange Zeit angenommen, daß das Glutamat-produzierende *C. glutamicum* keine funktionsfähige 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase (2-OGDH) besitzt, 2-Oxoglutarat nicht zu Succinyl-CoA umgesetzt werden kann, und es folglich keinen vollständigen Tricarbonsäurezyklus in *C. glutamicum* gibt. Da 2-Oxoglutarat die direkte Vorstufe in der Glutamatbiosynthese ist, wurde das Fehlen der 2-OGDH in *C. glutamicum* als wichtige Voraussetzung angesehen, Glutamat produzieren zu können (Kinoshita und Tanaka, 1975). Diese Annahme wurde erstmalig durch den enzymatischen Nachweis einer 2-OGDH in dem nahe verwandten Bakterium *C. glutamicum* ssp. *flavum* widerlegt (Shiio und Ujigawa-Takeda, 1980). Von *C. glutamicum* existierten weder enzymatische noch genetische Daten bezüglich der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase.

In der vorliegenden Arbeit wurde die 2-OGDH im Rohextrakt von *C. glutamicum* mit einer maximalen spezifischen Aktivität von 0.14-0.16 U/ mg Protein nachgewiesen. Für eine oxidative Decarboxylierungsreaktion sprach, daß die Umsetzung von 2-Oxoglutarat zu Succinyl-CoA nur in Gegenwart der Cofaktoren ThDP, CoA und NAD^+ erfolgte: ThDP signalisierte die Decarboxylierung, CoA den Acylgruppen- und NAD^+ den Elektronentransfer (Reed, 1974, Wynn *et al.*, 1992). Außerdem wurde festgestellt, daß die Enzymaktivität von Mg^{2+} -Ionen abhing. Dies ist typisch für ThDP-abhängige Reaktionen im allgemeinen, da die Bindung dieses Cofaktors an die enzymatisch aktive Untereinheit durch Mg^{2+} -Ionen vermittelt wird (Walsh *et al.*, 1976). Mg^{2+} -Ionen können aber auch zu den ionischen Wechselwirkungen beitragen, die den Zusammenhalt der Untereinheiten zu einem Enzymkomplex bewirken (Amarasingham und Davis, 1965). Die 2-OGDH-Aktivität in *C. glutamicum* war ungefähr 3fach höher als in *E. coli* (Langley und Guest, 1978), 7fach höher als in *B. subtilis* (Ohné, 1975), und sie war vergleichbar mit der aus *P. putida* (Sykes *et al.*, 1985). Es ist aber nur bedingt möglich, die Enzymaktivitäten unter den verschiedenen Organismen zu vergleichen, da die Messungen nicht bei einheitlichen Testbedingungen erfolgten. Gemeinsames Merkmal ist, daß sie relativ niedrig sind (0.02-0.15 U/ mg Protein). Die 2-OGDH-Aktivitäten sind möglicherweise *in vivo* höher als in den *in vitro*-Messungen festgestellt werden kann. Ein Teil der Komplexe könnte bei der Aufarbeitung der Zellen zu zellfreien Extrakten (Ultraschall-Behandlung) in seine Untereinheiten zerfallen und somit enzymatisch inaktiv werden.

Es wurde gezeigt, daß die Enzymaktivität spezifisch für die 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase ist und keine Nebenaktivität der Verzweigkettigen-Aminosäure-Dehydrogenase (VADH) oder der Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) darstellt. Eine Aktivität der Verzweigkettigen-Aminosäure-Dehydrogenase wurde unter den beschriebenen Bedingungen nicht festgestellt. Messungen an diesem Enzymkomplex in *P. putida* ergaben, daß die für dessen Untereinheiten kodierenden Gene erst bei Wachstum auf den 2-Oxo-Verbindungen der

Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin induziert werden (Sokatch *et al.*, 1981; McCully *et al.*, 1986). Diese Substrate sind in nur geringen Mengen in dem Komplexmedium enthalten, das für die Anzucht der *C. glutamicum*-Zellen verwendet wurde.

Die spezifische Aktivität der Pyruvat-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* betrug maximal 0.11-0.12 U/ mg Protein und lag damit in dem gleichen Bereich wie die spezifische Aktivität der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase. Es konnte der Schluß gezogen werden, daß die oxidativen Decarboxylierungen von 2-Oxoglutarat und von Pyruvat an zwei separaten Enzymkomplexen stattfinden, weil mit 2-Oxoglutarat und Pyruvat zusammen als Substraten eine spezifische Enzymaktivität gemessen wurde, die sich annähernd aus den Einzelaktivitäten der beiden Enzymkomplexe zusammensetzte. Eine zweifache Rolle wie in *B. subtilis*, wo ein Enzymkomplex die Funktion der Pyruvat- und der Verzweigketten-Aminosäure-Dehydrogenase hat (Lowe *et al.*, 1983), kann somit für *C. glutamicum* ausgeschlossen werden.

Die Regulationsuntersuchungen auf enzymatischer Ebene zeigten, daß die 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase in *C. glutamicum* durch die Endprodukte der Reaktion inhibiert wurde. Dies ist sowohl bei eukaryotischen als auch bei prokaryotischen 2-OGDH beschrieben (Yeaman, 1986; Perham, 1991). Von den getesteten Zentralstoffwechsel-Intermediaten wurde die 2-OGDH durch Glyoxylat, DL-Isocitrat und AMP gehemmt. Untersuchungen an Thiamin-abhängigen Enzymreaktionen hatten ergeben, daß Glyoxylat den Cofaktor ThDP blockiert (Uhlemann und Schellenberger, 1975). Dadurch kann der Decarboxylierungsschritt an der ersten Untereinheit des Enzymkomplexes nicht mehr stattfinden. Isocitrat könnte aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zum 2-Oxoglutarat um das aktive Zentrum der ersten Untereinheit des Komplexes konkurrieren und die Bindung des 2-Oxoglutarates erschweren.

Die 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* wurde durch Anionen wie Cl⁻-Ionen drastisch gehemmt. Die Größe der Ionen muß bei diesem Effekt eine Rolle spielen, da im Gegensatz zu den Cl⁻-Ionen Glutamat im Enzymtest die 2-OGDH-Aktivität nicht signifikant beeinträchtigte. Die Anionen könnten in hoher Konzentration die Statik des Multienzymkomplexes stören, sodaß er katalytisch inaktiv wird. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, daß sich die Anionen am katalytischen Zentrum einer der Untereinheiten anlagern und so die Enzymaktivität verhindern. Eine solche Hypothese wurde von A. de Kok geäußert, der ähnliche Befunde an der 2-OGDH von *A. vinelandii* hatte.

Die Wachstumsexperimente mit *C. glutamicum* (Wildtyp) ergaben, daß die spezifische 2-OGDH-Aktivität nach Anzucht auf Komplexmedium zwei- bis dreimal so hoch war wie nach Anzucht auf Minimalmedium. Dies deutet auf eine Regulation der Expression der beteiligten Gene hin. Es wurde festgestellt, daß in *C. glutamicum* die Expression des *lpd*-Gens nicht reguliert wird. Daraus ist zu schließen, daß die Gene *sucA* und *sucB* Ziel der Regulation sind.

Ein Einfluß auf die Regulation der Expression dieser Gene durch Glukose oder Acetat konnte ausgeschlossen werden, ein Ergebnis, das auch für *C. glutamicum* ssp. *flavum* festgestellt wurde (Shiio und Ujigawa-Takeda, 1980). Im Gegensatz dazu zeigten Messungen an *E. coli* (Amarasingham und Davis, 1965) und *B. subtilis* (Ohné, 1975), daß auf Glukose-haltigen Medien eine geringere 2-OGDH-Aktivität gemessen wurde als auf vergleichbaren Medien ohne Glukose. In *B. subtilis* wurde gezeigt, daß die Regulation auf Transkriptionsebene des *odhA/ odhB*-Operons (kodiert für die E1- und E2 der 2-OGDH) beruht (Resnekov *et al.*, 1992). In *E. coli* wurde der Anteil 2-OGDH relativ zum Gesamt-Protein in der Zelle quantifiziert. Es wurde beobachtet, daß nach Wachstum auf Glukose-haltigen Medien weniger E1/ E2-Apo-Komplexe nachzuweisen waren (Smith und Neidhardt, 1983). Der Grund könnte entweder auf Transkriptions- oder Translationsebene liegen.

Es konnte gezeigt werden, daß die spezifische 2-OGDH-Aktivität in *C. glutamicum* unter Glutamat-Produktionsbedingungen niedriger war als unter Wachstumsbedingungen. Dieser Befund paßt zu Ergebnissen aus NMR-Markierungsexperimenten, in denen nach Wachstum auf ^{13}C -markierter Glukose eine ^{13}C -Anreicherung im Glutamat gemessen wurde (Sonntag *et al.*, 1995, eingereicht). Die Intensität der Anreicherung kann als Maß für den Kohlenstofffluß durch den Tricarbonsäurezyklus dienen. Unter Glutamat-Produktionsbedingungen wurde eine vergleichsweise geringere ^{13}C -Anreicherung als unter Wachstumsbedingungen gemessen.

Es ist bemerkenswert, daß unter Glutamat-Produktionsbedingungen eine signifikante 2-OGDH-Aktivität festgestellt werden konnte, die fähig ist, einen vollständigen "turnover" durch den Tricarbonsäurezyklus zu bewirken, wie die NMR-Markierungsexperimente zeigten. Die Fähigkeit von *C. glutamicum*, Glutamat akkumulieren und sezernieren zu können, beruht daher nicht auf einer zu geringen oder gar defizienten 2-OGDH-Aktivität, wie lange Zeit angenommen wurde (Kinoshita und Tanaka, 1972; Kinoshita 1985). Die physiologische Relevanz der 2-OGDH in *C. glutamicum* liegt nach den Befunden darin, einen kompletten Tricarbonsäurezyklus zu ermöglichen und damit einen entscheidenden Beitrag zum Energiehaushalt und Baustoffwechsel der Zelle zu leisten. Ein unvollständiger Tricarbonsäurezyklus ist offensichtlich für *C. glutamicum* ungünstig, da es nicht möglich war, über die Zerstörung des Gens für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Untereinheit (*lpd*) die 2-OGDH-Aktivität in stabiler Weise zu beseitigen. Durch diese Maßnahme hätte der Tricarbonsäurezyklus unterbrochen werden können, und der Kohlenstofffluß eventuell vermehrt in Richtung Glutamat geleitet werden können.

Die spezifische PDH-Aktivität in *C. glutamicum* war nach Wachstum auf Minimalmedium um etwa 50% niedriger als nach Wachstum auf Komplexmedium. Der Unterschied weist auf die gleiche Regulation auf genetischer Ebene hin, wie sie bereits bei der 2-OGDH festgestellt wurde.

Die Expression der PDH-Gene wurde im Gegensatz zu *E. coli* nicht durch Glukose beeinflusst (Langley und Guest., 1978). Ferner wurde im Unterschied zu *E. coli* festgestellt, daß Pyruvat nicht als Induktor bei der PDH-Genexpression wirkt (Dietrich und Henning, 1970; Smith und Neidhardt, 1983). Es kann angenommen werden, daß in *C. glutamicum* eine Grundaktivität der PDH besteht, da nach Wachstum auf Acetat kein Unterschied zur Aktivität auf Glukose-Medium gewachsener Zellen festzustellen war.

Durch Southern-Hybridisierungen mit degenerierten, nichtradioaktiv markierten DNA-Oligonukleotiden gelang es, ein Fragment aus chromosomaler DNA von *C. glutamicum* mit dem Gen für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase zu isolieren. Es wurden neben dem dominierenden Signal eine ganze Reihe von Hintergrundsignalen festgestellt. Dies mag daran liegen, daß degenerierte Oligonukleotide benutzt wurden, die unspezifisch hybridisieren können. Außerdem wird bei der Digoxigenin-Markierung an den Enden der Oligonukleotide zunächst ein Poly(A)-Gerüst synthetisiert (Boehringer Mannheim, Produktinformation), das unspezifisch gegen Poly(T)-Regionen in der chromosomalen DNA hybridisieren kann.

Es sprachen mehrere Gründe dafür, zunächst die Isolierung des *lpd*-Gens zu forcieren: 1) Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen von Dihydroliponamid-Dehydrogenasen aus pro- und eukaryotischen Organismen zeigten, daß sich die Enzyme sehr ähnlich sind und über hochkonservierte Bereiche verfügen. Das bedeutete, daß relativ spezifische Aminosäuresequenzen zur Translation in die DNA-Oligonukleotid-Sequenzen genutzt werden konnten. 2) Die Dihydroliponamid-Dehydrogenase kann enzymatisch unabhängig vom Enzymkomplex erfaßt werden (Van den Broek, 1971), sodaß durch die Messung der Überexpression des *lpd*-Gens der funktionelle Nachweis des isolierten Gens erbracht werden konnte. 3) Das *lpd*-Gen liegt in den beschriebenen Fällen hinter den *sucA/ sucB*-Genen oder hinter den *aceE/ aceF*-Genen. Unter der Annahme, daß auch in *C. glutamicum* die *sucA*-, *sucB*- und *lpd*-Gene im Chromosom benachbart sind, ermöglichte ein isoliertes *lpd*-Gen durch die DNA-Analyse der angrenzenden Bereiche auch zu diesen Genen vorzudringen.

Das Gen für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* kodiert für ein Polypeptid mit 469 AS mit einem relativen Molekulargewicht (M_r) von 50619. Die Länge des Polypeptids aus *C. glutamicum* paßt gut zu den Dihydroliponamid-Dehydrogenasen aus *A. vinelandii* (476 AS) (Westphal und de Kok, 1988), *B. stearrowthermophilus* (469 AS) (Borges *et al.*, 1990), *S. aureus* (468 AS) (Hemilä, 1991) und zu der Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus *P. putida*, die mit der Verzweigtkettigen-Aminosäure-Dehydrogenase assoziiert ist (459 AS) (Burns *et al.*, 1988). Eine Ausnahme unter diesen Enzymen stellt die an die Pyruvat-Dehydrogenase gebundene Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus *Alcaligenes eutrophus* dar, die eine Länge von 594 Aminosäuren hat (Hein und Steinbüchel, 1994).

Dieses Polypeptid weist neben den typischen Merkmalen für Dihydroliponamid-Dehydrogenasen (Rice *et al.*, 1984; Schierbeek, 1988) zusätzlich eine aminoterminal Lipoyl-Domäne auf, die eigentlich für die Acyltransferase von Multienzymkomplexen charakteristisch ist (Reed und Hackert, 1990).

Die dem *lpd*-Gen benachbarten Bereiche im Chromosom von *C. glutamicum* zeigten keine Ähnlichkeit zu den Genen der 2-Oxoglutarat- bzw. der Pyruvat-Dehydrogenase. Der stromaufwärts vom *lpd*-Gen liegende *orfY* war der Galaktosid-Acetyltransferase aus *E. coli* ähnlich (Hediger *et al.*, 1985). In *E. coli* wird diese Acyltransferase durch das *lacA*-Gen kodiert. Das *lacA*-Gen ist das distale Gen des Lactose-Operons aus *E. coli*. Weitere Gene dieses Operons sind *lacI*, *lacZ* und *lacY*, die für den *lac*-Repressor, die β -Galaktosidase und die Lactose-Permease kodieren (Farabaugh, 1978; Buchel *et al.*, 1980; Kalnins *et al.*, 1983). Die physiologische Bedeutung der Galaktosid-Acetyltransferase in *E. coli* liegt, darin, toxische Galaktoside zu acetylieren, worauf diese aus der Zelle entfernt werden (Fowler *et al.*, 1985; Beckwith, 1987). Mit 22.3% identischen AS-Resten war die Homologie zur Galaktosid-Acetyltransferase aus *E. coli* aber sehr gering. An dem Vergleich der Aminosäuresequenzen beider Polypeptide war zu erkennen, daß der jeweils carboxyterminale Bereich eine große Ähnlichkeit zeigte. Dieser Bereich wurde in einer Reihe weiterer Acyl- bzw. Acetyltransferasen gefunden (Downie, 1989; Vaara, 1992; Annunziato, 1994) und weist ein für diese Gruppe neues Motiv auf, nämlich den sog. "isoleucine patch" (Dicker und Seetharam, 1992).

Wenn *orfY* in *C. glutamicum* tatsächlich für eine Acyltransferase kodieren sollte, ist es unwahrscheinlich, daß diese Bestandteil der 2-Oxoglutarat- oder der Pyruvat-Dehydrogenase ist, da im Enzymtest mit Rohextrakten des *C. glutamicum*-Stammes, der *orfY* plasmidgebunden enthielt, kein Effekt auf die Gesamtaktivitäten der Enzymkomplexe festgestellt wurde. Ebenso wurde keine Galaktosid-Acetyltransferase-Aktivität gemessen. Es bleibt unklar, welche Bedeutung das Genprodukt von *orfY* im Stoffwechsel von *C. glutamicum* hat.

Die Wachstumsexperimente mit dem rekombinanten Stamm *C. glutamicum* (pEKO *lpd5.4*), der das Gen für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase überexprimierte, zeigten eine etwa 12fach höhere spezifische Enzymaktivität als im Wildtyp. Dabei war die Aktivität spezifisch für NAD^+ und das Substrat Dihydroliponamid. Die Überexpression führte zu einer über 50 %igen Erniedrigung der Gesamtaktivitäten sowohl der 2-Oxoglutarat- als auch der Pyruvat-Dehydrogenase. Das läßt den Schluß zu, daß das Produkt des *lpd*-Gens in *C. glutamicum* Bestandteil beider Enzymkomplexe ist. Gestützt wird diese Annahme, daß die *lpd*-Mutante, *C. glutamicum* JS1, am Anfang ihres Wachstums einen Phänotyp zeigte, der auf Defekte sowohl in der 2-Oxoglutarat- als auch in der Pyruvat-Dehydrogenase schließen ließ.

Ein Grund für die Erniedrigung der Gesamtaktivitäten ist vielleicht im strukturellen Aufbau der Multienzymkomplexe zu suchen (Reed, 1974; Yeaman, 1989; Perham, 1991). Bei einer drastischen Erhöhung von E3-Untereinheiten könnten diese untereinander um die Bindungsstelle an der E2-Untereinheit des Enzymkomplexes so konkurrieren, daß sie sich gegenseitig davon verdrängen und eine geordnete Katalyse verhindern, was sich dann in einer Erniedrigung der Gesamtaktivität ausdrückt. Die E1- und E3-Untereinheiten binden in festen stöchiometrischen Verhältnissen an die E2-Untereinheit (Robien *et al.*, 1992; Machado *et al.*, 1992). Es wäre möglich daß die E3-Untereinheiten bei einer dramatischen Überzahl die E1-Untereinheiten von ihrer Koordinationsstelle verdrängen und der Eingangsschritt, also geschwindigkeitsbestimmende Schritt, der Katalyse verhindert wird. Daß ein Ungleichgewicht der Untereinheiten zu einer Erniedrigung der Gesamtaktivität des Enzymkomplexes führt, wurde auch bei Pyruvat-Dehydrogenase von *E. coli* beobachtet und mit dem Verdrängungsprozeß zwischen den E1- und E3-Untereinheiten begründet (Russel und Guest, 1990).

Es gibt in *C. glutamicum* keinen Hinweis auf ein weiteres *lpd*-Gen, da die Southern-Hybridisierung mit einer homologen *lpd*-DNA-Sonde nur ein Signal ergab. Sollte ein weiteres *lpd*-Gen existieren, hat es nur eine geringe Ähnlichkeit zu diesem isolierten *lpd*-Gen. Außerdem konnte die *lpd*-Mutante *C. glutamicum* JS1 nicht stabilgehalten werden. Das läßt den Schluß zu, daß das charakterisierte *lpd*-Gen essentiell für *C. glutamicum* ist, dessen Funktion von keinem weiteren Iso-Gen übernommen werden kann.

Die Northern-Blot-Analyse des *lpd*-mRNA in *C. glutamicum* ergab ein einziges Transkript von ungefähr 1.5kb Länge. Da das *lpd*-Gen einen offenen Leserahmen von 1407bp aufweist und die *lpd*-Regulationseinheit inklusive der potentiellen Terminationsstruktur 1460bp umfaßt, paßt die Transkriptlänge gut zu dem *lpd*-kodierte Bereich. Das bedeutet, daß das Gen für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase in *C. glutamicum* ein Monocistron bildet. Aufgrund der Northern-Blot-Analyse gibt es keinen Hinweis auf eine Operon-Struktur wie in *E. coli*, *A. vinelandii* oder *B. subtilis* (Darlison *et al.*, 1984; Spencer *et al.*, 1984; Schulze *et al.*, 1990; Resnekov *et al.*, 1992). Die Expressionsdaten hatten bereits gezeigt, daß das *lpd*-Gen unabhängig exprimiert werden kann, also über eigene Expressionssignale verfügen muß. Aber selbst bei einer Operon-Struktur liegt vor dem *lpd*-Gen in allen beschriebenen Fällen ein separater Promotor (Spencer und Guest, 1983; Westphal und de Kok, 1988; Quail *et al.*, 1994). Vermutlich wird damit gewährleistet, daß über eine eigenständige Expression des *lpd*-Gens eine Verteilung des Genprodukts auf mehr als einen Enzymkomplex, unabhängig von der jeweiligen Regulationseinheit, möglich ist (Spencer und Guest, 1985).

Die Bestimmung des Transkriptionsstarts vom *lpd*-Gen führte zu einem überraschenden Ergebnis; denn dieser stimmte mit dem Start der Translation überein. Ein solches Befund ist bisher für *C. glutamicum* nicht beschrieben worden.

Es führte zu der Frage, wie die Translation ohne Ribosomen-Bindungsstelle (RBS) (Shine und Dalgarno, 1974) funktioniert und, ob der von der DNA-Sequenz des *lpd*-Gens abgeleitete Start der Translation stimmte. Dieser konnte bestätigt werden, da die aminoterminal Aminosäuresequenz der zur Homogenität gereinigten Dihydroliponamid-Dehydrogenase bis auf die erste Aminosäure mit der theoretischen Sequenz übereinstimmte. Gene, bei denen der Translationsstart mit dem Transkriptionsstart identisch ist, wurden in der Mehrzahl bei Streptomyceten (Lopez *et al.*, 1989; Lopes-Crabrera *et al.*, 1989; Murray *et al.*, 1989), als Ausnahme auch in *E.coli* (Ptashne *et al.*, 1976; Klock und Hillen, 1986) und Eukaryoten (Adam, 1991) gefunden. Es wurde vorgeschlagen, daß - im Falle der Prokaryoten- die 16S rRNA an eine Stelle unmittelbar stromabwärts vom Translationsstart bindet (Suzuki und Yamada, 1988; Spengart *et al.*, 1990). Direkt stromabwärts vom Translationsstart des *lpd*-Gens aus *C. glutamicum* wurde keine Sequenz identifiziert, die eine Ähnlichkeit zur RBS aufweist. 75bp stromabwärts vom *lpd*-Translationsstart befindet sich ein Bereich, der einer RBS in *C. glutamicum* ähnlich ist (5'-GGC AAG AAG GTT-3'). Möglicherweise kommt es durch die Ausbildung von Sekundärstrukturen im 5'-Bereich des *lpd*-Transkriptes zu einer Annäherung dieser Struktur an den Translationsstart und so zu einer Bindung der 16S rRNA.

Untersuchungen an *E. coli*-Promotoren (Rosenberg und Court, 1979; Hawley und McClure, 1983) und Promotoren einiger Gram-positiver Bakterien (Moran *et al.*, 1982; Graves und Rabinowitz, 1986) bildeten die Grundlage für die Formulierung gemeinsamer Strukturen für Promotoren. Im allgemeinen bestehen sie aus einer "-10"-Region, auch Pribnow-Box genannt, mit einem stark konservierten DNA-Sequenzmotiv "5'-TATAAT-3'", das 8-10bp vor dem eigentlichen Start der Transkription liegt (Pribnow, 1975). 15-18bp von diesem Bereich entfernt befindet sich eine sogenannte "-35"-Region "5'-TTGACA-3'", deren Nukleotidsequenz jedoch weniger stark konserviert ist. Außerdem wurde für starke *E. coli*-Promotoren eine weitere charakteristische AT-reiche "-43"-Region beschrieben (Bujard, 1980), die auch in Promotoren Gram-positiver Organismen vorkommt (Graves und Rabinowitz, 1986).

Die Promotoranalyse des *lpd*-Gens ergab 10bp stromaufwärts vom G₂₁₂ ein DNA-Sequenzmotiv "5'-TAT CCT-3'", das bis auf die beiden Cytosin-Reste mit der "-10"-Region typischer *E. coli*-Promotoren identisch ist. Weiterhin 16bp vor der möglichen "-10"-Region wurde eine Sequenz "5'-ACG ACA-3'" gefunden, die Ähnlichkeit zu einer *E. coli* "-35"-Region zeigt und gut mit der "-35"-Region des *fda*-Gens aus *C. glutamicum* (von der Osten *et al.*, 1989) übereinstimmt. Der Vergleich möglicher Promotorsequenzen aus *C. glutamicum* in **Abbildung 27** stellt dar, daß es zwar gute Übereinstimmungen zur *E. coli* "-10"-Region gibt, daß sich aber die "-35"-Region uneinheitlich darstellt.

	-60	-50	-40	-30	-20	-10	+1
P _{lpd}	GGAAAACCAA	CCGCACCCGG	ATGC <u>ACGACA</u>	ATGACCCACT	AAACACGTAT	<u>CCTTGAATGC</u>	GTG
P _{fda}	CTTAGGTTGA	AGGAAATATC	ACACGACAAA	AGTTGAGTGA	TGCAGGCATA	<u>ATTGGCTATA</u>	GGC
P _{glta}	GGGAAT <u>TGGC</u>	<u>TCTCACTTCG</u>	GATATGGCTA	AACCGCATTT	<u>ATCGGTATAG</u>	<u>CGTGTTAACC</u>	GGA
P _{gap}	ATGTGTCTGT	ATGATTTTGC	<u>ATCTGCTGCG</u>	AAATCTTTGT	TTCCCCGCTA	<u>AAGTTGAGGA</u>	CAG
P _{pgk}	TTAATCAATA	CAATTGAATA	CCGGT <u>TGCCA</u>	GCGCCACACA	ATGTGTGGCA	<u>ATCTGGGACA</u>	GTG
P _{gdh}	TTCAAACAAA	TTTAATTCT	<u>TTGTGGTCAT</u>	ATCTGTGCGA	<u>CCTGCCATA</u>	<u>ATTTGAACGT</u>	GAG
P _{hom}	GAAGGTGAAT	CGAATTTCCG	GGCTTTAAAG	CAAAAATGAA	CAGCTTGGTC	<u>TATAGTGGCT</u>	AGG
P _{thrC}	CCTTTTTCAA	CATATTTGAG	<u>ACGGTGTGGG</u>	GGAGTATTGT	GTCACCCCTT	<u>GGGATAGGGT</u>	TAT
P _{lysA}	GGATT <u>TGTTA</u>	TAAGTATGGG	TCGTATTCTG	TGCGACGGGT	GTACCTCGGC	<u>TAGAATTTCT</u>	CCC

E. coli/ *B. subtilis*

Konsensus-Sequenz -----TTGACA -----TAT AAT-----

Abb. 27: Vergleich von potentiellen Promotorsequenzen von Genen aus *C. glutamicum*: Der Transkriptionsstart ist mit +1 bezeichnet. Die Gene kodieren für die folgenden Polypeptide: *lpd* (Dihydroliponamid-Dehydrogenase; diese Arbeit), *fda* (Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase; von der Osten *et al.*, 1989), *glta* (Citrat-Synthase; Eikmanns *et al.*, 1994), *gap* (Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; Schwinde *et al.*, 1993), *pgk* (3-Phosphoglyzerat-Kinase, Schwinde *et al.*, 1993), *gdh* (Glutamat-Dehydrogenase, Börmann *et al.*, 1992), *hom* (Homoserin-Dehydrogenase, Peoples *et al.*, 1988), *lysA* (Diaminopimelat-Decarboxylase, Marcel *et al.*, 1990). Die potentiellen "-10"- und "-35"-Regionen sind doppelt unterstrichen. In der letzten Zeile sind die *E. coli* Sigma 70 und *B. subtilis* Sigma 43 Konsensus-Sequenzen dargestellt.

Ob der Promotor des *lpd*-Gens tatsächlich aus einer *E. coli* analogen "-10" und "-35"-Region besteht, müßten weitere Experimente, z.B. gezielte Austausche einzelner Nukleotide aus dem potentiellen Promotorbereich zeigen. Eine aktuelle Analyse corynebakterieller Sequenzen mit möglicher Promotorfunktion zeigt, daß häufig vor der "-10"-Region ein -GG-Duplett und ein AT-reicher Bereich zu finden sind (Pâtek *et al.*, 1995, eingereicht). Beides konnte für den potentiellen *lpd*-Promotor nicht beobachtet werden. In Übereinstimmung mit o.g. Studie und mit der "Bujard-Regel" befindet sich aber vor der "-35"-Region eine AT-reiche Sequenz, die für die Promotorfunktion eine Rolle spielen könnte.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase in dem Glutamat-produzierenden *Corynebacterium glutamicum* nachzuweisen, die Regulation zu untersuchen sowie das Gen für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase, einer Untereinheit dieses Enzyms, zu isolieren und zu charakterisieren.

1. Die 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase konnte im Rohextrakt von *C. glutamicum* mit einer spezifischen Aktivität von 0.15 U/ mg Protein nach Wachstum auf Komplexmedium und einer spezifischen Aktivität von 0.05 U/ mg Protein nach Wachstum auf Minimalmedium nachgewiesen werden. Die unterschiedlichen Enzymaktivitäten nach Wachstum auf den verschiedenen Medien weisen auf eine Regulation der Genexpression hin. Auf enzymatischer Ebene wurde die 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase durch Succinyl-CoA, NADH, DL-Isocitrat und Glyoxylat gehemmt.
2. Das Gen für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* wurde mittels markierter Oligonukleotid-Sonden auf einem 5.4kb-*Bam*HI-Fragment identifiziert und isoliert. Die DNA-Sequenzanalyse ergab, daß das Gen eine Größe von 1407bp hat und für ein Polypeptid mit 469 Aminosäuren kodiert. Das Polypeptid besitzt im Vergleich zu Dihydroliponamid-Dehydrogenasen aus anderen Organismen bis zu 42% identische Aminosäuren.
3. Untersuchungen auf Transkriptionsebene ergaben, daß das Gen für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase aus *C. glutamicum* monocistronisch ist, die Länge des Transkriptes ungefähr 1.5kb beträgt, und der Transkriptionsstart mit dem Translationsstartpunkt identisch ist. Die Dihydroliponamid-Dehydrogenase wurde durch Ultrazentrifugation und FPLC bis zur Homogenität gereinigt und der Amino-Terminus ansequenziert. Der experimentell bestimmte Translationsstart stimmt mit dem aus der DNA-Sequenz abgeleiteten Start der Translation überein.
4. Der Stamm *C. glutamicum* (pEKO lpd5.4), der das Gen für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase plasmidgebunden enthält, zeigte eine 12fach höhere Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Aktivität (1.90 U/ mg Protein) als der Wildtyp (0.16 U/ mg Protein). In den überexprimierenden Stämmen lagen die Gesamtaktivitäten der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase und der Pyruvat-Dehydrogenase um 50-70% niedriger als in den Ausgangsstämmen.
5. Durch "Gen-gerichtete" Mutagenese wurde eine definierte im Gen für die Dihydroliponamid-Dehydrogenase defekte Mutante, *C. glutamicum* JS1, konstruiert. Der Phänotyp wies auf fehlende Aktivitäten der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase und der Pyruvat-Dehydrogenase hin. Allerdings erwies sich der Stamm als instabil, was darauf deutet, daß das Dihydroliponamid-Dehydrogenase-Gen für *C. glutamicum* essentiell ist.

VI. LITERATUR

- Abe S., K.I. Takayama and S. Kinoshita (1967).** Taxonomical studies on glutamic acid producing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 13:279-301.
- Adam, R.D. (1991).** The biology of *Giardia* spp.. *Microbiol. Rev.* 55:706-732.
- Altenbuchner, J. and 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. and 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.
- Amarasingham C. R. and B. D. Davis (1965).** Regulation of α -Ketoglutarate Dehydrogenase Formation in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 240 No. 9, U.S.A..
- Annunziato P.W., Wright, L.F., Vann, W.F. and R. P. Silver (1994).** Nucleotide Sequence and Genetic Analysis of the *neuD* and *neuB* Genes in Region 2 of the Polysialic Acid Gene Cluster of *Escherichia coli* K1. *J. Bacteriol.* 177:312-319.
- Beckwith, J. (1987).** The lactose operon. In: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*. Neidhard, F.C. (ed.): American Society for Microbiology Washington, D.C. pp.1444-1452.
- Behal, R.H., Buxton, J.G., Robertson J.G. and M.S. Olson (1993).** Regulation of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. *Annu. Rev.* 13:497-520
- Birnboim, H.C. (1983).** A rapide alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Meth. Enzymol.* 100:243-255.
- Bleile, D.M., Munk P., Oliver R.M. and L. J. Reed (1979).** Subunit structure of dihydrolipoyl transacetylase component of pyruvate dehydrogenase complex from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76:4385-4389.
- Borges A., Hawkins C. F. Packman L.C. and R. N. Perham (1990).** Cloning and sequence analysis of the genes encoding the dihydrolipoamide acetyltransferase and the dihydrolipoamide dehydrogenase components of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex of *Bacillus stearothermophilus*. *Eur. J. Biochem.* 194:95-102.
- Börmann, E.R., Eikmanns, B.J. and H.Sahm (1992).** Molecular analysis of the *Corynebacterium glutamicum* *gdh* gene encoding glutamate dehydrogenase. *Mol. Microbiol.* 6:317-326.
- Börmann-EL Kohly, E.R., Eikmanns, B.J., Gutmann, M. and H. Sahm (1993).** Glutamate dehydrogenase is not essential for glutamate formation by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environm. Microbiol.* 59:2329-2331.
- Buchel, D.E., Gronenborn, B. and B. Müller-Hill (1980).** Sequence of the lactose permease gene. *Nature* (London). 283:541-545.

- Bujard, H. (1980).** The interaction of *E. coli* RNA polymerase with promoters. *Trends in Biochem. Sciences* 5:274-278.
- Burns, G., Brown T., Hatter K. and J.R. Sokatch (1989).** Sequence analysis of the *lpdV* gene for lipoamide dehydrogenase of branched-chain-oxoacid dehydrogenase of *Pseudomonas putida*. *Eur. J. Biochem.* 179:61-69.
- C. Lochmeyer and G. Fuchs (1991).** NADP⁺-specific 2-oxoglutarate dehydrogenase in denitrifying *Pseudomonas* species. *Arch. Microbiol.* 153:226-229.
- Carlsson P. and L. Hederstedt (1989).** Genetic characterization of *Bacillus subtilis* *odhA* and *odhB*, encoding 2-oxoglutarate dehydrogenase and dihydrolipoamide transsuccinylase, respectively. *J. Bacteriol.* 171:3667-3672.
- Caruthers, M.H., Barone, A.D., Beaucage, S.L., Dodds, D.R., Fisher, E.F., McBride, L.J., Matteuci, M., Staninsky, Z. and J.Y. Tang (1985).** Chemical synthesis of deoxynucleotides by the phosphoramidite method. *Science* 230:281.
- Collins M.D., Cummins C.S. (1986).** Genus *Corynebacterium*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2; Sneath P.H.A., Mair S.N., Sharpe M.E. and J.G. Holt (eds.) Williams & Wilkins, Baltimore pp.1266-1277.
- Correia, A., Martin, J.F. and J.M. Castro (1994).** Pulsed-field gel electrophoresis analysis of the genome of the amino acid producing corynebacteria: chromosome sizes and diversity of restriction patterns. *Microbiology* 140: 2841-2847.
- D. Langley and J.R. Guest (1978).** Biochemical Genetics of the α -Keto Acid Dehydrogenase Complexes of *Escherichia coli* K12: Genetic Characterization and Regulatory Properties of Deletion Mutants. *Journal of General Microbiology* 106:103-117.
- Darlison, M.G., M.E.Spencer and J.R. Guest (1984).** Nucleotide sequence of the *sucA* gene encoding the 2-oxoglutarate dehydrogenase of *E. coli* K12. *Eur. J. Biochem.* 141:351-359.
- Denton, R.M., Richards D.A. and J.G. Chin (1978).** The effects of calcium ions and adenine nucleotides on the activity of pig-heart 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. *Biochem. J.* 176:899-906.
- Dicker, I.B. and S. Seetharam (1992).** What is known about the structure and function of the *Escherichia coli* protein FirA? *Mol Microbiol.* 6:817-823.
- Dickinson J.R., Roy, D. J. and I.W. Dawes (1986).** A mutation affecting lipoamide dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase and 2-oxoglutarate dehydrogenase activities in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics* 204:103-107.
- Dietrich, J. and U. Henning (1970).** Regulation of pyruvate dehydrogenase synthesis in *Escherichia coli* K12. *Eur. J.Biochem.* 14:258-269.
- Downie, J.A. (1989).** The *nodL* gene from *Rhizobium leguminosarum* is homologous to the acetyltransferases encoded by *lacA* and *cysE*. *Mol. Microbiol.* 3:1649-1651.

- 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.
- Eikmanns, B. J., Kircher M. and D. J. Reinscheid (1991a). Discrimination of *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum* by restriction pattern analysis of DNA adjacent to the *hom* gene. *FEMS Microbiol Letts.* 82:203-208.
- Eikmanns, B.J., Kleinertz, E., Liebl W. and H Sahm (1991b). A family of *Corynebacterium glutamicum*/ *Eschericia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression and promotor probing. *Gene* 102:93-98.
- Eikmanns, B.J., Thum-Schmitz, N., Eggeling L., Lüdtkke, K. U. and H. Sahm (1994). Nucleotide sequence, expression and transcriptional analysis of the *Corynebacterium glutamicum gltA* gene encoding citrate synthase.
- Ertan H. (1992a). The effect of various culture conditions on the levels of ammonia assimilatory enzymes of *Corynebacterium callunae*. *Arch. Microbiol.* 158:42-47.
- Ertan, H. (1992b). Some properties of glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase and glutamate synthase from *Corynebacterium callunae*. *Arch. Microbiol.* 158:35-41.
- Farabaugh, P.J. (1978). Sequence of the *lacI* gene. *Nature* (London). 274:765-769.
- Feinberg, K. and Vogelstein (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specificity. *Anal. Biochem.* 132:6-13.
- Fortnagel P., Freese E. (1968). Analysis of sporulation mutants. II. Mutants blocked in the citric acid cycle. *J. Bacteriol.* 95:1431-1438.
- Fowler, A.V., Hediger, M.A., Musso, R.E. and Irving Zabin (1985). The amino acid sequence of thiogalactoside transacetylase of *Escherichia coli*. *Biochimie* 67:101-108.
- Garland, PB (1964). Some kinetic properties of pig-heart oxoglutarate dehydrogenase that provide a basis of metabolic control of the enzyme activity and also a stoichiometric assay for coenzymeA in tissue extracts. *Biochem. J.* 92:10c.
- Gornall, A.G., Bardawill, C.J. and M.M. David (1949). Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *J. Biological Chemistry* 177:751-766.
- Graves, M.C. and J.C. Rabinowitz (1986). *In vivo* and *in vitro* transcription of the *Clostridium pasteurianum* ferredoxin gene. *J. Biol. Chem.* 261:11409-11415.
- Gray C. T., Wimpenny J.W.T. and W.R. Mossman (1966). Regulation of metabolism in facultative bacteria. II. Effects of aerobiosis, anaerobiosis and nutrition on the formation of Kreb's cycle enzymes in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 117:33-41.
- Gross, D.S., Collins K.W., Hernandez, E.M. and W.T. Garrad (1988). Vakuum blotting: a simple method for transferring DNA from sequencing gels to nylon membranes. *Gene* 74:347-356.

- Guest, J.R. and I.T. Creaghan (1974). Further studies with lipoamide dehydrogenase mutants of *Escherichia coli* K12. *J.Gen. Microbiol.* **81**:237-245.
- Hanahan (1985). Techniques for transformation of *E. coli* In: *DNA cloning*. Glover D.M. (ed.). IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA Vol. I: 109-135.
- Hawley, D.K. and W.R. McClure (1983). Compilation and analysis of promotor DNA-sequences. *Nucleic Acids Research* **11**:2237-2255.
- Haynes, J.A. and M.L. Britz (1989). Electrotransformation of *Brevibacterium lactofermentum* and *Corynebacterium glutamicum*: Growth in Tween 80 increases transformation frequencies. *FEMS Microbiol. Letts.* **61**:329-334.
- Hediger, M.A., Johnson, D.F., Nierlich, D.P. and Irving Zabin (1985). DNA sequence of the lactose operon: The *lacA* gene and the transcriptional termination region. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. **82**, pp. 6414-6418.
- Hein, S. and A. Steinbüchel (1994). Biochemical and Molecular Characterization of the *Alcaligenes eutrophus* Pyruvate Dehydrogenase Complex and Identification of a New Type of Dihydrolipoamide Dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **176**:4394-4408.
- Hemilä H., Palva A., Paulin L., Arvidson S. and I. Palva (1990). Secretory S complex of *Bacillus subtilis*: Sequence analysis and identity to pyruvate dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **172**:5052-5063.
- Hemilä, H. (1991). Lipoamide dehydrogenase of *Staphylococcus aureus*: nucleotide sequence and sequence analysis. *Biochimica et Biophysica Acta* **1129**:119-123.
- Herbert, A.A. and J.R. Guest (1969). Studies with α -ketoglutarate dehydrogenase mutants of *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics* **105**:182-190.
- Hoischen, C., and R. Krämer (1989). Evidence for an efflux carrier system involved in the secretion of glutamate by *Corynebacterium glutamicum*. *Arch. Microbiol.* **151**:342-347.
- Hucheng, A., Marquet, M., Welby, W., Montrozier, H., Goma G. and G. Laneelle (1984). Glutamate excretion triggering mechanism: a reinvestigation of the surfactant-induced modification of cell lipids. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* **135B**:53-67.
- Jeyaseelan, K., Guest, J.R. and J. Visser (1980). The Pyruvate Dehydrogenase Complex of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. Purification, Properties and Characterization of Mutants. *J. Gen. Microbiol.* **120**:393-402.
- Kalnins, A., Otto, K., Ruther, U. and B. Müller-Hill (1985). Sequence of the *lacZ* gene of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **2**:593-597.
- 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.
- Kinoshita S., Udaka S. und M. Shimino (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. (1985).** Glutamic acid bacteria. In: *Biology of industrial microorganisms*. Demain, A.L. and N.A. Solomon (eds.). *The Benjamin/Cummings Publishing Company*, London pp.115-142.
- Kinoshita, S. and K. Tanaka (1972).** Glutamic acids. In: *The microbial production of amino acids*. Yamada, K., Kinoshita, S., Tsunoda, T. and K. Aida (eds.). *John Wiley and sons*, New York, USA pp. 263-304.
- Kleemann, A., Leuchtenberger, W., Hoppe, B. und H. Tanner (1985).** Amino acids. In: *Ullmann's Encyclopedia of industrial chemistry*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim Vol. A2:57-59.
- Klock, G. and W. Hillen (1986).** Expression, purification and operator binding of the transposon Tn1721-encoded Tet repressor. *J. Mol. Biol.* 189:633-641.
- Kornberg, T. and A. Kornberg (1974).** Bacterial DNA Polymerases. In: *The Enzymes*. Boyer, P.D. (ed.). Academic Press, N.Y., USA, Vol. 10:114-119.
- L. J. Reed (1974).** Multienzyme complexes. *Acc. Chem. Res.* 7:40-46.
- Langley, D. and J.R. Guest (1978).** Biochemical Genetics of the α -Keto Acid Dehydrogenase Complexes of *Escherichia coli* K12: Genetic Characterization and Regulatory Properties of Deletion Mutants. *J. Gen. Microbiol.* 106:103-117.
- Lawlis V.B. and T.E. Roche (1981).** Inhibition of bovine kidney α -ketoglutarate dehydrogenase complex by reduced nicotinamide adenine dinucleotide in the presence or absence of calcium ion and effect of adenosine 5'-diphosphate on reduced nicotinamide adenine dinucleotide inhibition. *Biochemistry* 20:2519-2524.
- Liebl, W. (1991).** The Genius *Corynebacterium*-Nonmedical. In: *The Prokaryotes. 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., Bayerl, A., Schein, B., Stillner, U., and K.H. Schleifer (1989).** High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells. *FEMS Microbiol. Letts.* 65:299-304.
- Liebl, W., Ehrmann, M., Ludwig, W. und K.H. Schleifer (1991).** Transfer of *Brevibacterium divaricatum* DSM20297^T, "*Brevibacterium flavum*" DSM20411, "*Brevibacterium lactofermentum*" DSM20412 und DSM1412, and *Corynebacterium lilium* DSM20137^T to *Corynebacterium glutamicum* and their distinction by rRNA gene restriction patters. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 41:255-260.
- Lopez, P., Martinez, S., Diaz A. and M. Espinosa (1987).** *Streptococcus pneumoniae* *polA* gene is expressed in *Escherichia coli* and can functionally substitute for the *E. coli* *polA* gene. *J. Bacteriol.* 169:4869-4871.

- Lopez-Cabrera, M., Perez-Gonzales, Heinzl P. Piepersberg W. and A. Jinenez (1989).** Isolation and nucleotide sequencing of an aminocyclitol acetyltransferase gene from *Streptomyces rimosus* forma *paromomycinus*. *J. Bacteriol.* **171**:321-328.
- Lowe, P.N., Hodgson, J.A. and R.N. Perham (1983).** Dual role of a single multienzyme complex in the oxidative decarboxylation of pyruvate and branched-chain 2-oxo acids in *Bacillus subtilis*. *Biochem. J.* **215**:132-140.
- M. Ohne' (1975).** Regulation of the Dicarboxylic Acid Part of the Citric Acid Cycle in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, Apr. 1975, pp. 224-234.
- Machado, R.S., Clark, D.P. and J.R. Guest (1992).** Construction and properties of pyruvate dehydrogenase complexes with up to nine lipoyl domains per lipoate acetyltransferase chain. *FEMS Microbiology Letters* **100**:243-248.
- Marcel, T., Archer, J.A.C., Mengin-Lecreux, D. and A.J. Sinskey (1990).** Nucleotide sequence and organization of the upstream region of the *Corynebacterium glutamicum* *lys A* gene *Mol. Microbiol.* **4**:1819-1830.
- Mattevi, A., De Kok, A. and R.N. Perham (1992).** The pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. *Current Opinion in structural Biology*. Current Biology Ltd ISSN 0959-440X.
- McCormack J.K. and R.M. Denton (1979).** The effects of calcium ions and adenine nucleotides on the activity of pig-heart 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. *Biochem. J.* **211**: 529-527.
- McCormack, J.G., Halestrap, A.P. and R. M. Denton (1990).** Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol. Rev.* **70**:391-425.
- McCully V., Burns, G. and J.R. Sokatch (1986).** Resolution of branched-chain oxo acid dehydrogenase complex of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Biochem J.* **233**:737-742.
- Melton, D.A., Krieg, P.A., Rebagliati, M.R., Maniatis, T., Zinn, K. and M.R. Green (1984).** Efficient *in vitro* synthesis of biological active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promotor. *Nucleic Acids Res.* **12**:7035-7056.
- Moran, C.P., Lang, N., LeGrice, S.F.J., Lee, G., Stephens, M., Sonnenshein, A.L., Pero, L. and R. Losik (1982).** Nucleotide sequences that signal the initiation of Transcription and translation of *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* **186**:339-346.
- Murray, I.A., Gil, J.A., Hopwood, D.A. and W.V. Shaw (1989).** Nucleotide sequence of the chloramphenicol acetyltransferase gene of *Streptomyces acrimycini*. *Gene* **85**:283-291.
- Nunheimer, T.D., Birnbaum, J., Ihnen, E.D. and A.L. Demain (1970).** Product inhibition of the fermentive formation of glutamic acid. *Appl. Microbiol.* **20**:215-217.
- Oliver, R.M. and L.J. Reed (1982).** Multienzyme Complexes. In: *Electron Microscopy of Proteins*. Edited by Harris J.R.: Academic Press.

- Otulakowski, G. and B. H. Robinson (1987).** Isolation and Sequence Determination of cDNA Clones for Porcine and Human Lipoamide Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 262:17313-17318.
- Patek, M., Eikmanns, B.J., Patek, J. and H. Sahm (1995),** eingereicht. Cloning and Molecular Analysis of Promotor Sequences from *Corynebacterium glutamicum*: Search for a Consensus Motif.
- Patel M.S. and T.E. Roche (1990).** Molecular biology and biochemistry of pyruvate dehydrogenase complexes. *FASEB J.* 4:3224-3233.
- Peoples, O.P., Liebl, W., Bodis, M., Maeng, P.J., Follettie, M.T., Archer, J.A. and A.J. Sinskey (1988).** Nucleotide sequence and fine structure analysis of the *Corynebacterium glutamicum* *hom-thrB* operon. *Mol. Microbiol.* 2:53-62.
- Perham, R. N. (1991).** Domains, Motifs, and Linkers in 2-Oxo Acid Dehydrogenase Multienzyme Complexes: A Paradigm in the Design of a Multifunctional Protein. *Biochemistry* 30:35.
- Perham, R.N. and L.C. Packman (1989).** 2-Oxo Acid Dehydrogenase Multienzyme Complexes: Domains, Dynamics and Design. *Ann NY Acad.Sci.* 573:1-20.
- Pribnow, D. (1975).** Bacteriophage T7 early promoters: Nucleotide sequence of two RNA polymerase binding sites. *J.Mol. Biol.* 99:419-443.
- Priefert H., S. Hein, N. Krüger, K. Zeh, B. Schmidt and A. Steinbüchel (1992).** Identification and molecular characterization of the *Alcaligenes eutrophus* H16 *aco* operon genes involved in acetoin catabolism. *J. Bacteriol.* 173:4056-4071.
- Ptashne, M., Backman, K., Humayun, M.Z., Jeffrey, A., Maurer, R. and R.T. Sauer (1976).** Autoregulation and function of a repressor in bacteriophage lambda. *Science* 194: 156-161.
- Quail, M.A., Haydon, D.J. and J.R. Guest (1994).** The *pdhR-aceEF-lpd*-operon of *Escherichia coli* expresses the pyruvate dehydrogenase complex. *Mol Microbiol.* 12:95-104.
- Randle, P.J., P.A. Patson and J. Espinal (1987).** Multienzyme complexes. In: *The Enzymes* (Boyer, P.D. and E.G. Krebs, eds.) Vol. 18, pp.97-121, Academic Press, Orlando,
- Reed, L.J. and M.L. Hackert (1990).** Structure-function relationships in dihydrolipoamide acyltransferases. *J.Biol.Chem.* 265:8971-8974.
- Resnekov O., Melin L., Carlsson P., Mannerlöv M., von Gabain A and L. Hederstedt (1992).** Organization and regulation of the *Bacillus subtilis* *odhAB* operon, which encodes two of the subenzymes of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. *Mol. Gen. Genet.* 234:285-296.
- Rice, D.W., Schulz, G.E. and J.R. Guest (1984).** Structural Relationship between Glutathione Reductase and Lipoamide Dehydrogenase. *J.Mol.Biol.* 174:483-496.

- Robien, M.A., Clore, G.M., Omichinski, J.G., Perham, R.N., Ettore, A., Sakagichi, K. and A.M. Gronenborn (1992). Three-Dimensional Solution Structure of the E3-Binding domain of the Dihydrolipoamide Succinyltransferase Core from the 2-Oxoglutarate Dehydrogenase Multienzyme Complex of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **31**:3463-3471.
- Roche T.E., Rahmatullah M., Li L., Radke G.A., Chang C.L. and S.L. Powers Greenwood. The lipoyl-containing components of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex: roles in modulating and anchoring the PDH kinase and PDH phosphatase. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **573**:168-174.
- Rosenberg, M. and D.Court (1979). Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Annu. Rev. Genet.* **13**:319-353.
- Ross, J., Graeme, R.A. and I.W. Dawes (1988). The Nucleotide Sequence of the LPD1 Gene Encoding Lipoamide Dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*: Comparison between Eukaryotic and Prokaryotic Sequences for Related Enzymes and Identification of Potential Upstream Control Sites. *J. Gen. Microbiol.* **134**:1131-1139.
- Russel, G.C. and J.R. Guest (1990). Overexpression of restructured pyruvate dehydrogenase complexes and site directed mutagenesis of a potential active site histidine residue. *Biochem J.* **269**:443-450.
- Rutter G.A., Leake M.L., McCormack J.G. and R.M. Denton (1990). Role of Ca^{2+} and Mg^{2+} in the Hormonal Control of the Pyruvate Dehydrogenase and α -Oxoglutarate Dehydrogenase complexes. *Biochemistry and Physiology of Thiamine Diphosphate Enzymes*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- S.J. Yeaman (1986). The mammalian dehydrogenases: a complex family. *TIBS* 11-July.
- S.J. Yeaman (1989). The 2-oxo acid dehydrogenase complexes: recent advances. *Biochem. J.* **257**:625-632.
- Sambrook, J., Fritsch E.F. and J. Maniatis (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanger, F., Nicklen, S. and 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. and A. Pühler (1990). High frequency conjugal plasmid transfer from gram-negative *Escherichia coli* to various gram-positive coryneform bacteria. *J. Bacteriol.* **172**:1663-1666.
- Schierbeek, A.J., Swarte, B.W., Dijkstra, W., Vriend, G., Read, R.J., Hol, W.G.J., Drenth, J. and C. Betzel (1989). X-ray Structure of Lipoamide Dehydrogenase from *Azotobacter vinelandii* Determined by a Combination of Molecular and Isomorphous Replacement Techniques. *J. Mol. Biol.* **206**:365-379.
- Schmitz, G.G., Walter, T., Seibl, R. and C. Kessler (1991). Nonradioactive Labeling of Oligonucleotides *in vitro* with the Hapten Digoxigenin by Tailing with Terminal Transferase. *Anal. Biochem.* **192**:222-231.

- Schrumpf, B., Schwarzer A., Kalinowski J., Pühler A., Eggeling L. and H. Sahm (1991). A functionally split pathway for lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 173:4510-4516.
- Schulze E., Westphal, A. H., Hanemaaijer R. and A. de Kok (1990). The 2-oxoglutarate dehydrogenase complex from *Azotobacter vinelandii*. 1. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding the 2-oxoglutarate dehydrogenase component. *Eur. J. Biochem.* 187:229-234.
- Schwinde, J.W., Thum-Schmitz, N., Eikmanns, B.J. and H. Sahm (1993). Transcriptional analysis of the *gap-pgk-tpi-ppc* gene cluster of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 175:3905-3908.
- Shiio, I. and 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. and K. Ujigawa-Takeda (1980). Presence and regulation of α -Ketoglutarate Dehydrogenase Complex in a Glutamate-Producing Bacterium, *Brevibacterium flavum*. *J. Biol. Chem.* 44:(8), 1879-1904.
- Shiio, I., Otsuka, S.I. and 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.
- Shine, J. and L. Dalgarno (1974). The 3' terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosomal binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71:1342-1346.
- Simon, R., Priefer, U. and 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 B. C., Clotfelter E.A., Cheung J.Y. and K.F. Lanoue (1992). Differences in 2-oxoglutarate dehydrogenase regulation in liver and kidney. *Biochem. J.* 284:819-826.
- Smith, M.W. and F.C. Neidhardt (1983). 2-Oxoacid Dehydrogenase Complexes of *Escherichia coli*: Cellular Amounts and Patterns of Synthesis. *J. Bacteriol.* 156:81-88.
- Sokatch, J.R., McCully, V., Gebrosky, J. and D.J. Sokatch (1981). Isolation of a specific lipoamide dehydrogenase for a branched chain keto acid dehydrogenase from *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 148:639-646.
- Sonntag, K., Schwinde, J., de Graaf, A.A., Marx, A., Eikmanns, B. J., Wiechert, W. and H. Sahm (1995), eingereicht.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517.
- Spencer M. E., Darlison M.G., Stephens P.E., Duckenfield I.K. and J.R. Guest (1984). Nucleotide sequence of the *sucB* gene encoding the dihydrolipoamide succinyltransferase of

- Escherichia coli* K12 and homology with the corresponding acetyltransferase. *Eur. J. Biochem.* **141**:361-374.
- Spencer, M. and J. R. Guest (1985). Transcription analysis of the *sucAB*, *aceEF* and *lpd* genes of *Escherichia coli*. MGG pp. 146-154.
- Spengart, M.L., Fatscher, H.P. and E. Fuchs (1990). The initiation of translation in *E. coli*: apparent base pairing between the 16S rRNA and downstream sequences of the mRNA. *Nucleic Acids Res.* **18**:1719-1723.
- Stephens P.E., Lewis H.M., Darlison M. G. and J.R. Guest (1983). Nucleotide sequence of the lipoamide dehydrogenase gene of *Escherichia coli* K12. *Eur. J. Biochem.* **135**:519-527.
- Sung, H.C., Tachiki, T., Kumagai, H. and T. Tochura (1984). Production and preparation of glutamate synthase from *Brevibacterium flavum*. *J. Ferment. Technol.* **62**:371-376.
- Suzuki, Y. and T. Yamada (1988). The nucleotide sequence of 16S rRNA gene from *Streptomyces lividans* TK21. *Nucleic Acids Res.* **16**:370.
- Sykes, P.J., Menard, J., McCully V. and J.R. Sokatch (1985). Conjugative Mapping of Pyruvate, 2-Ketoglutarate, and Branched Chain Keto Acid Dehydrogenase Genes in *Pseudomonas putida* Mutants. *J. Bacteriol.* **162**:203-208.
- T. Pawelczyk and S. Angielski (1991). Effect of ionic strength on the regulatory properties of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. *Biochimie* **74**:171-176.
- Takinami, K., Yoshii, H. and 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.
- Uhlemann, H. and A. Schellenberger (1975). Glyoxylic Acid As An Active Site Marker of Yeast Pyruvate Decarboxylase. *FEBS Letts.* **63**:1
- Vaara, M. (1992). Eight bacterial proteins, including UDP-N-acetylglucosamine acetyltransferase (LpxA) and three other transferases of *Escherichia coli*, consist of a six-residue periodicity theme. *FEMS Microbiol. Lett.* **97**:249-254.
- Van den Broek, H.J.W. (1971). Thesis, Agricultural University, Wageningen.
- 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.
- 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.

- Walsh, D.A., Cooper, R.H., Denton, R.M., Bridges, B.J. and Randle, P.J. (1976). The elementary reactions of the pig-heart pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem. J.* 157:41-67.
- 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.
- Westphal A. H. and A. de Kok (1989). The 2-oxoglutarate dehydrogenase complex from *Azotobacter vinelandii*: Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding the succinyltransferase component. *Eur. J. Biochem.* 187:235-239.
- Westphal A.H. and A. de Kok (1987). Lipoamide dehydrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *Eur. J. Biochem.* 172:299-305.
- Wynn, R.M., Chuang, J.L., Davie, J.R., Fisher, C.W., Hale, M.A., Cox, R.P. and D.T. Chuang (1992). Cloning and Expression in *Escherichia coli* of Mature E1 β Subunit of Bovine Mitochondrial Branched-chain α -Keto acid Dehydrogenase Complex. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 267, No.3, pp.1881-1887.
- Yamamoto I. and M. Ishimoto (1975). Effect of nitrate reduction on the enzyme levels in carbon metabolism in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* 78:307-315.
- Ziegler K., Braun K., Böckler A. and G. Fuchs (1987). Studies on the anaerobic degradation of benzoic acid and 2-aminobenzoic acid by a denitrifying *Pseudomonas* strain. *Arch. Microbiol.* 149:62-69.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie 1 der Forschungszentrum Jülich GmbH angefertigt.

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

Herrn PD Dr. J. Heinisch danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

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.

Dr. Elke Börmann-EL Kholy, Anke Hofmann, Eva Kleinertz, Petra Peters-Wendisch, Doris Rittmann, Natalie Thum-Schmitz, Ulrike Zahnnow, Dr. Dieter Jürgen Reinscheid, Dr. Peter Stahmann und Volker Wendisch möchte ich für den freundlichen Umgang und die nette Atmosphäre im Labor danken.

Allen Institutsangehörigen sei an dieser Stelle für die freundliche Aufnahme und die ständige Hilfsbereitschaft gedankt.

JÜL-3115
September 1995
ISSN 0944-2952