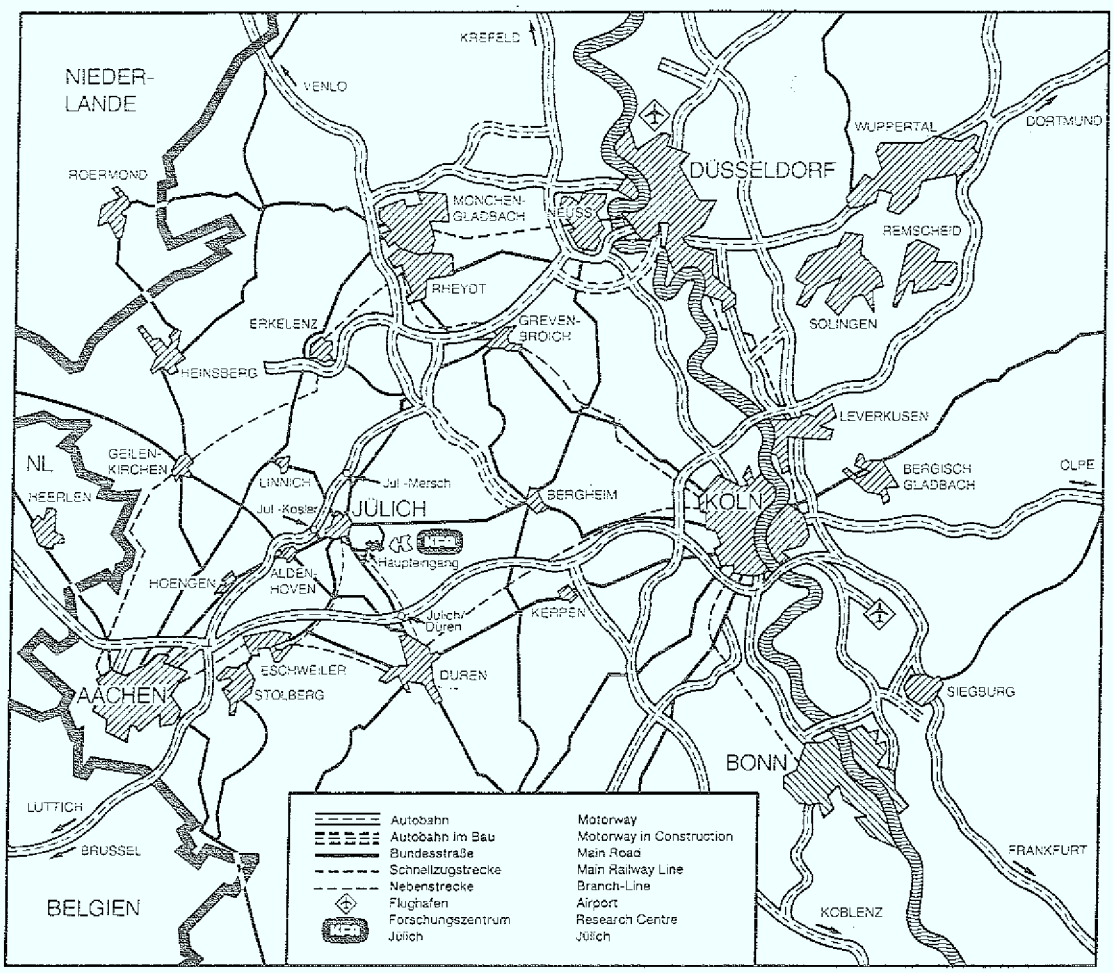
FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH
Institut für Biotechnologie

Klonierung, Charakterisierung und Amplifikation von Genen der Isoleucinbiosynthese-Enzyme aus Corynebacterium glutamicum

von

Christiana Cordes

Jül-2385
September 1990
ISSN 0366-0885



Als Manuskript gedruckt

Forschungszentrum Jülich: Berichte Nr. 2385
Institut für Biotechnologie Jül-2385
D 61 (Diss. Universität Düsseldorf)

Zu beziehen durch: ZENTRALBIBLIOTHEK · Forschungszentrum Jülich GmbH
Postfach 1913 · D-5170 Jülich (Bundesrepublik Deutschland)
Telefon: 02461/61-0 · Telex: 833556-70 kfa d · Telefax: 02461/61-6103

Klonierung, Charakterisierung und Amplifikation von Genen der Isoleucinbiosynthese-Enzyme aus Corynebacterium glutamicum

von

Christiana Cordes

INHALTSVERZEICHNIS

I EINLEITUNG.....1

II MATERIAL UND METHODEN.....10

1. Organismen 10
2. Chemikalien und Enzyme.....12
3. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen.....13
4. Bestimmung von Aminosäuren.....19
5. Herstellung von Rohextrakten.....21
6. Bestimmung von Enzymaktivitäten im Rohextrakt.....22
   6.1 Threonindehydratase.....22
   6.2 Acetohydroxysäuresynthase.....23
   6.3 Isomeroreductase.....23
   6.4 Dihydroxysäuredehydratase.....24
   6.5 Transaminase B.....25
7. Transformationstechniken 25
   7.1 Transformation von *E.coli*.....25
   7.2 Protoplasten-Transformation von *C.glutamicum*....27
   7.3 Transformation osmotisch sensitiver *C.glutamicum*- Zellen.....28
   7.4 Filterkreuzung von *C. glutamicum* und *E. coli*....29
   7.5 In vitro Verpackung von DNA und Herstellung von λ-Lysaten.....30
8. Präparation und Reinigung von Nukleinsäuren.....31
   8.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli*.....32
   8.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *C.glutamicum*....33
   8.3 Präparation chromosomaler DNA aus *C.glutamicum*..34
   8.4 Cäsiumchlorid-Gradientenzentrifugation.....35
9. Techniken zur Rekombination und Analyse von DNA.....36
   9.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen..36

9.2 Enzymatisches Auffüllen 5'-überstehender DNA-Enden.....36
9.4 Ligation 37
10. Gelelektrophorese.....37
10.1 Auftrennung nativer DNA in Agarosegelen.....38
10.2 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....38
11. Hybridisierungstechnik.....39
12. Transposonmutagenese.....40

III ERGEBNISSE.....41

1. Klonierung der Gene der Isoleucinbiosynthese-Enzyme aus *C. glutamicum*.....41
1.1 Überprüfung der zur Klonierung verwendeten Stämme.....41
1.2 Erstellung von Genbanken mit chromosomaler DNA aus *Corynebacterium glutamicum*.....42
1.3 Klonierung der Gene der Isoleucinbiosynthese-Enzyme.....44
2. Charakterisierung der Gene der Isoleucin-Biosynthese-Enzyme.....52
2.1 Subklonierung, physikalische Kartierungen und Hybridisierung des ilvE-Gens.....53
2.2 Subklonierung, physikalische Kartierung und Hybridisierung des ilvA-Gens.....56
2.3 Analyse des ilvBNC-Clusters.....59
2.3.1 Subklonierung, physikalische Kartierung und Hybridisierung des ilvBNC-Clusters...59
2.3.2 Deletionsanalyse.....61
2.3.3 Transposonmutagenese.....64
2.3.4 Bestimmung der Leserichtung.....67
2.4 Expression der Isoleucinbiosynthese-Gene in *E. coli*.....69

3. Expression der Gene der Isoleucinbiosynthese-Enzyme in *Corynebacterium glutamicum*.....71
3.1 Klonierung in den *E.coli/C.glutamicum* Shuttle Vektor pZ1.....71
3.2 Spezifische Enzymaktivitäten in *C. glutamicum*.
3.3 Auswirkung einzelner überexprimierter Gene.....75
auf die Bildung von Isoleucin.....78

IV DISKUSSION.....81

V ZUSAMMENFASSUNG.....90

VI LITERATURVERZEICHNIS.....92

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AHAS	Acetohydroxysäuresynthase
Ap	Ampicillinresistenz
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
CIP	Alkalische Phosphatase
Cm	Chloramphenicolresistenz
d	Dalton
DiHDH	Dihydroxysäuredehydratase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure(Titriplex III)
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
h	Stunde
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IAA	Isoamylalkohol
Ile	Isoleucin
ilvA	Gen der Threonindehydratase
ilvBN	Gene der Acetohydroxysäuresynthase
ilvC	Gen der Isomeroreductase
ilvD	Gen der Dihydroxysäuredehydratase
ilvE	Gen der TransaminaseB
IR	Isomeroreductase
Km	Kanamycinresistenz
kb	Kilobasen
Leu	Leucin
M	Molarität
min	Minute

NAD^+	β-Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (oxidiert)
$NADH+H^+$	β-Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduziert)
OD_{600}	optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge
PLP	Pyridoxalphosphat
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
t	Zeit
TAB	Transaminase B
Tc	Tetracyclinresistenz
Tda	Threonindehydratase
TPP	Thiaminpyrophosphat
Tris	Tris(Hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit, Enzymeinheit
Val	Valin
(w/v)	Gewicht pro Volumen

I Einleitung

L-Isoleucin ist eine der acht für höhere Lebewesen essentiellen Aminosäuren. Pro Jahr werden 150 t L-Isoleucin produziert (Hoppe und Martens, 1984), die hauptsächlich von der pharmazeutischen Industrie, vor allem als Additiv zu Infusionslösungen, verwendet werden (Hirose und Shibai, 1980).

Die Gewinnung von L-Isoleucin erfolgt überwiegend aus Proteinhydrolysaten (Leuchtenberger und Plöcker, 1986). Da die Ausbeute des Isoleucins bei Isolation aus Proteinen recht gering ist, und es sich schlecht von dem ebenfalls dabei anfallenden Leucin und Valin trennen läßt, ist es von Vorteil, diese Aminosäure mit Mikroorganismen herzustellen. Die mikrobielle Produktion von Isoleucin erfolgt unter Einsatz von Glucose oder Synthesevorstufen (Kinoshita et al., 1957; Kisumi et al., 1977; Matsushima und Mase, 1973).

Die Biosynthese des Isoleucins verläuft in fast allen Bakterien, Pilzen und Pflanzen gleich (Umbarger, 1983). Das einzige spezifische Enzym der Isoleucinbiosynthese, die Threonindehydratase, wird in allen bisher untersuchten Organismen durch Isoleucin feedback inhibiert (Umbarger, 1983). Dieses Enzym setzt Threonin zu α-Ketobutyrat um. Die vier folgenden Schritte der Isoleucinbiosynthese werden durch Enzyme, die ebenfalls die Valinbiosynthese durchführen, katalysiert (Abb. 1). Das erste dieser gemeinsamen Enzyme, die Acetohydroxysäuresynthase (AHAS), liegt in *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* in Form dreier Isoenzyme vor, von denen allerdings nur zwei aktiv sind und unterschiedlich reguliert werden. AHAS I und III werden in *E.coli* durch Leucin, AHAS III zusätzlich durch Valin reprimiert (Umbarger, 1983). In *Brevibacterium lactofermentum* wurde nur eine AHAS nachgewiesen, welche durch Valin, Leucin und Isoleucin reprimiert wird (Tsuchida und Momose, 1975). In *Corynebacterium glutamicum* konnten ebenfalls keine Isoenzyme nachgewiesen werden (Cordes, 1986; Eggeling, 1987). Die dort vorliegende AHAS wird durch Valin, Leucin und Isoleucin feedback inhibiert, wobei

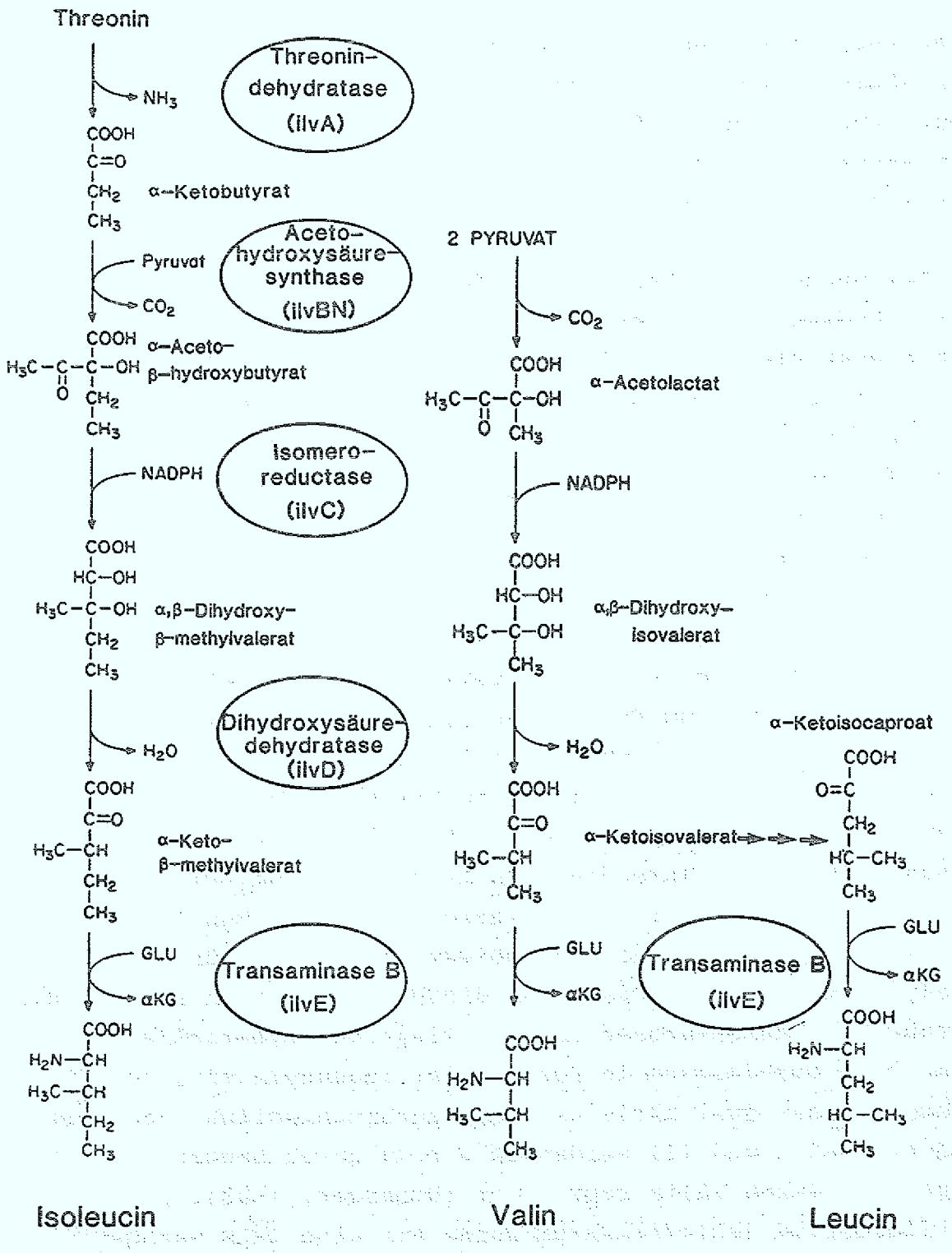


Abb. 1 Schema des Isoleucin-, Valin- und Leucinbiosyntheseweges

allerdings nur eine Hemmung bis zu 50% auftritt (Eggeling, 1986). Die AHAS setzt α-Ketobutyrat und Pyruvat zu Acetohydroxybutyrat, einer Vorstufe des Isoleucins um, bzw. zwei Pyruvatmoleküle zu Acetolactat, einer Vorstufe des Valins. Von der letzten Vorstufe des Valins, α-Ketoisovalerat, zweigt die Leucinsynthese ab. Die Transaminierung der Vorstufen zu den entsprechenden Aminosäuren wird in allen drei Biosynthesewegen durch die Transaminase B durchgeführt.

Die Anordnung der Gene der Isoleucinbiosynthese-Enzyme im Genom ist in verschiedenen Mikroorganismen unterschiedlich (Tab.1). In *E. coli*, *S. typhimurium* und anderen Enterobacteriacae sind die meisten dieser Gene als Operon organisiert (Driver und Lawther, 1985), wohingegen bei *Bacillus subtilis* diese Gene an verschiedenen Stellen des Genoms vorliegen (Piggot und Hoch, 1985). Das ilvGMEDA Operon von *E.coli* befindet sich bei ca. 85 min der *E.coli* Genkarte (Driver und Lawther, 1985). Es codiert beide Untereinheiten der AHAS II, welche aber in diesem Organismus aufgrund einer Leseraster-Mutation nicht als aktives Protein gebildet wird (Lawther, 1981). Die zwei weiteren Isoenzyme der AHAS befinden sich bei 2 min (ilvIH) und 82 min (ilvBN) der Genkarte. Im ilvGMEDA Operon sind als weiteres die codierenden Regionen der Transaminase B (ilvE), der Dihydroxysäuredehydratase (ilvD) und der Threonindehydratase (ilvA) enthalten.

Die Regulation des *E. coli* ilvGMEDA Operons erfolgt durch Attenuation (Lawther und Hatfield, 1985). Das Leadertranscript, welches ein kleines Leaderpeptid codiert, enthält vier Leucin-, fünf Isoleucin- und sechs Valincodons, wodurch die multivalente Repression dieses Operons durch alle drei Aminosäuren durch den Mechanismus der Attenuation bedingt ist (Nargang et al., 1980). Das ilvBN Operon, welches das AHAS I Isoenzym codiert, wird ebenfalls durch Attenuation in Anwesenheit der Aminosäuren Leucin und Valin reguliert (Hauser und Hatfield, 1983 und 1984). Ein weiterer Regulationsmechanismus dieses Operons ist die Katabolitrepression (Friden et al., 1982; Hauser et al., 1984). Dabei ist die Ablesung des ilvBN-Operons in Anwesenheit von Glucose um den Faktor 2 niedriger, als in Anwesenheit von

Tabelle 1 Organisation der Gene der Isoleucinbiosynthese-Enzyme in verschiedenen Mikroorganismen

Stamm	Genbezeichnung	Genkarten-position (min)	Referenz
Escherichia coli K-12	ilvGMEDA Operon	85	Driver und Lawther, 1985
	ilvY	85	Watson et al.,1979
	ilvC	85	"
	ilvBN	82	Friden et al.,1985
	ilvIH	2	Squires et al. 1981
Salmonella typhimurium LT2	ilvGMEDA Operon	83	Driver und Lawther, 1985
	ilvBN	80	Shaw et al., 1980
	ilvIH	3	Squires et al., 1983
Bacillus subtilis	ilvBNC-LeuACBD	250	Mackey et al., 1984
	ilvA	200	Barat, 1965
	ilvD	200	Barat, 1965
	ilvE	n.b.	

ilvBN : Acetohydroxysäuresynthase I
ilvGM : Acetohydroxysäuresynthase II
ilvIH : Acetohydroxysäuresynthase III
ilvA : Threonindehydratase
ilvY : Regulatorprotein
ilvC : Isomeroreductase
ilvE : TransaminaseB
n.b. : Genkartenposition wurde nicht bestimmt

Glucose und cyclischem AMP. Durch Bindung von cAMP-Rezeptor-protein und cAMP an eine Operatorregion vor den Strukturgenen wird das ilvBN-Operon positiv reguliert (Friden et al., 1982). Das die AHAS III codierende ilvIH Operon unterliegt offensichtlich nicht der Regulation durch Attenuation, die Synthese dieses AHAS Isoenzyms wird aber durch Leucin

reprimiert (De Felice et al., 1979).

Das Gen der Isomeroreductase(ilvC) befindet sich bei *E. coli* nicht innerhalb des ilvGMEDA Operons, sondern direkt benachbart im Genom. Das Enzym Isomeroreductase wird nicht durch die drei verzweigtkettigen Aminosäuren reguliert (Ratzkin et al., 1972), sondern dessen Gen ilvC durch ein positives Regulatorprotein, welches durch das ilvY-Gen codiert wird (Watson et al., 1979). Dabei bindet dieses Protein in Anwesenheit der Substrate der Isomeroreduktase an den gemeinsamen Promotor des ilvC und ilvY-Gens, von welchem beide Gene in unterschiedlicher Leserichtung abgelesen werden (Sameshima et al., 1989; Wek et al., 1986).

Die Gene der Isoleucinbiosynthese-Enzyme des grampositiven Bakteriums *Bacillus subtilis* sind dagegen an unterschiedlichen Stellen des Genoms lokalisiert. Die ilvA und ilvD Gene befinden sich eng benachbart bei Position 200 der *B. subtilis* Genkarte (Piggot und Hoch, 1975). Die Gene der Acetohydroxysäuresynthase (ilvBN) und Isomeroreductase (ilvC) bilden zusammen mit den Genen der Leucinbiosynthese leuA,C,B,D ein Operon, dessen Expression durch Leucin reprimiert wird, nicht aber durch Isoleucin und Valin (Vandeyar, 1987).

Die Produktion von L-Isoleucin mit Mikroorganismen erfordert Stämme, welche mit hoher Produktionsrate und hoher Ausbeute diese Aminosäure bilden, um eine wirtschaftliche Aufarbeitung zu gewährleisten. Daß coryneforme Bakterien aufgrund ihrer einfachen Enzymregulation und ihrer Ausscheidung von Aminosäuren dazu geeignet sind, zeigte sich schon früh (Kinoshita et al., 1957; Hirose und Okada, 1979). Um Produktionsstämme zu erhalten, müssen Regulationsmechanismen, welche eine Überproduktion der Aminosäure verhindern, umgangen oder ausgeschaltet werden. Dazu wurde zunächst mit Hilfe klassischer Methoden der Mutantenherstellung gearbeitet, wie z.B. Selektion analogaresistenter oder auxotropher Stämme.

Zur Isoleucinbildung wurden Mutanten isoliert, welche gegen Isoleucin-, Leucin- oder Valinstrukturanaloga resistent sind (Yoshinaga und Nakamori, 1983). So konnte z.B. mit einer

α-Amino-β-hydroxyvalerat (AHV) und O-Methyl-Threonin (OMT) resistenten *Brevibacterium flavuum* Mutante 14,5 g/l Isoleucin gebildet werden (Shiio et al., 1973a). Ebenso wurden auxotrophe Mutanten hergestellt, die eine Auxotrophie zeigten für diejenige Aminosäure, welche zur Hemmung der zu produzierenden Aminosäure beitrug. So bildete ein Threonin-auxotropher *C. glutamicum*-Stamm bei Zugabe von 15% der Vorstufe α-Aminobutyrat 14,5 g/l Isoleucin (Kinoshita, 1966). Bei der weiteren Stammentwicklung wurden auch analogaresistente und gleichzeitig auxotrophe Mutanten eingesetzt. So konnte die Isoleucinproduktion einer Methioninauxotrophen *C. glutamicum* Mutante durch zusätzliche Resistenz gegen Thiaisoleucin von 1 auf 6 g pro Liter gesteigert werden (Kase und Nakayama, 1976). Durch Einführung von Mehrfachresistenzen gegen Aminosäure-analoga war es ebenfalls möglich, die Isoleucinausbeute zu erhöhen. So konnte bei einer Aminohydroxyvaleratresistenten *Brevibacterium flavuum* Mutante konnte durch eine weitere Resistenz gegen Ethionin die spezifische Aktivität der Threonindehydratase erhöht werden und so die Bildung von Isoleucin von 1 auf 10 g pro Liter gesteigert werden (Ikeda et al., 1976).

Da während der letzten Jahre große Fortschritte in der Anwendung der rekombinanten DNA-Technologie für Corynebakterien erzielt wurden, findet diese Methode zunehmende Anwendung bei der Herstellung von Stämmen zur Aminosäureproduktion. Dabei ist es möglich, limitierende Schritte einer Biosynthese durch Amplifikation der entsprechenden Gene zu überwinden.

Durch Isolation von Plasmiden aus phytopathogenen Corynebakterien (Kono et al., 1983) war die Möglichkeit der Vektorkonstruktion für Corynebakterien gegeben. Die Herstellung von Shuttle Vektoren (Miwa et al., 1985; Yeh et al., 1986), welche nun den Transfer von DNA zwischen *E. coli* und Corynebakterien, bzw. Brevibakterien, erlauben und die Entwicklung eines Transformationssystems für *C. glutamicum* (Katsumata et al.,1984, Yoshihama et al., 1985) und *Brevibacterium lactofermentum* (Santamaria et al., 1984) ermöglichen nun auch die Anwendung der rekombinanten

DNA-Technologie für *C. glutamicum*.
Die Klonierung von Genen des Aminosäurestoffwechsels von Corynebakterien und Brevibakterien wurde bisher hauptsächlich auf zwei verschiedenen Wegen erreicht, der Komplementation auxotropher *E. coli* Mutanten mit chromosomaler Corynebakterien-DNA oder durch Direktklonierung von Corynebakterien-Genen in entsprechenden auxotrophen Corynebakterien- oder Brevibakterien-Mutanten (Martin et al., 1987). Der Vorteil der ersten Methode ist die Vielzahl zur Verfügung stehender auxotropher *E. coli* Mutanten. Der Nachteil dieser Methode ist es, daß es nicht in jedem Fall möglich ist, ein Corynebakteriengen in *E. coli* zu exprimieren (Batt et al., 1985; Martin et al., 1987).

Durch Komplementation aminosäureauxotropher *E.coli* Mutanten konnten die Gene dapB, asd und lysA der Lysinbiosynthese aus *C. glutamicum* (Batt, 1985) und *Brevibacterium lactofermentum* (Marquez, 1985) kloniert werden. Ebenfalls konnten Gene der Tryptophan- und Threoninsynthese aus *B. lactofermentum* (Del Real et al., 1985; Martin et al., 1987; Mateos et al., 1987a,b) isoliert werden. Durch das System der Direktklonierung wurden das pheA Gen aus *C. glutamicum* (Follettie und Sinskey, 1986), das thrC-, thrB- und hom-Gen der Threoninbiosynthese (Follettie und Sinskey, 1988), als auch Gene der Synthese der aromatischen Aminosäuren aus *B. lactofermentum* (Matsui et al., 1988) isoliert.

Durch die Isolation von Genen der Aminosäuresynthese, z.B. der Homoserindehydrogenase (Nakamori, 1986) oder der Phrephenatdehydrogenase (Ozaki, 1985), ist es möglich, durch Amplifikation des Gens die Enzymmenge innerhalb der Zelle anzuheben und somit die Bildung der entsprechenden Aminosäure zu steigern. Fermentationen mit rekombinanten *C. glutamicum*- und *B. lactofermentum*-Stämmen führten bisher zu einer 1,3 bis 1,5-fachen Steigerung in der Bildung der jeweils untersuchten Aminosäure (Tab.2).

Tabelle 2 Aminosäurebildung bei Coryne- und Brevibakterien durch Überexpression von Genen verschiedener Aminosäurebiosynthesewege

Stamm	verwendetes Gen	produzierte Aminosäure	Ausbeute (g/l) mit über-exprimiertem Gen	Ausbeute (g/l) Kontrolle ohne Gen	Faktor der Enzym-aktivitäts-steigerung	Referenz
Corynebacterium glutamicum	PrephenatDH	Phenylalanin	8,0	5,7	n.b.	Ozaki, 1985
"	HomoserinDH	Threonin	1,5	0,0	10	Nakamori, 1986
"	HomoserinDH	Isoleucin	1,0	0,0	10	Nakamori, 1986
Brevibacterium lactofermentum	HomoserinDH	Isoleucin	3,1	0,0	n.b.	Nakamori, 1986
"	HomoserinDH	Threonin	25,0	17,5	2	Nakamori, 1987
"	HomoserinDH	Homoserin	2,8	0,5	2	Nakamori, 1986
"	HomoserinDH und Homoserinkinase	Threonin	33,0	25,0	20	Morinaga, 1987
"	PEPCarboxylase	Prolin	18,0	10,5	1,6	Sano ., et al. 1987
"	PEPCarboxylase	Threonin	17,3	15,4	1,3	Sano et al. 1987

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Gene der Isoleucinbiosynthese aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 zu isolieren und ihre Organisation im Genom zu bestimmen. Als weiteres sollte die Amplifikation einzelner Gene auf die Bildung von L-Isoleucin bei diesem Bakterium untersucht werden, indem rekombinante *C. glutamicum*-Stämme hergestellt und die Bildung von L-Isoleucin durch diese Stämme bestimmt wurden.

II Material und Methoden

1. Organismen und Plasmide

In der vorliegenden Arbeit wurden *E. coli* und *C. glutamicum* Stämme verwendet, deren Eigenschaften in den Tabellen 1 und 2 aufgeführt sind.

Tabelle 3 Verwendete *E. coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
HB101	F^- hsdS20($r_B^- m_B^-$) recA13 proA2 ara-14 lacY1 galK2 rpsL20(Sm^r) xyl-5 mtl-1 supE44 λ^-	Boyer und Rouland-Dussoix, (1969)
JP 58	ilvC7 thi-1 argE3 galK2 mtl-1 xyl-5 strA704 (rpsL704) tfr-3 λ^- supE44	Butlin et al., (1975)
CGSC 5769	thi-1 ilvO603 ilvG605(am) ilvI614 ilvH612 ilvB619 HfrH spoT1 relA1 λ^- leu-8	Guardiola et al., (1974)
AB 1953	ilv88 argFI xyl-7 λ^- supE44 point of origin PO12 of HfrH AB3/2	Eggertson et al. (1965)
Cu 1230	ΔilvGE2130 ara thi recA56 src C300::Tn10 hsdR $hsdM^+$	Harms et al. (1985)
Cu2	ΔilvE12 ilv2025	McGilvary et al. (1974)
Cu 406	F^- ilvA454 galT12 λ^-	Smith et al. (1976)
DH5	thi^- F^- endAR1 hsdR17 (r^-,m^-) supE44 recA1 gyrA96, relA1	Hanahan, (1985)

ED 8767	recA56 supE supF $hsdS^-R^-M^+$ met^-	Murray et al. (1977)
ED 8654	supE supF $hsdS^{+-}M^+$ met^- trpR	Murray et al. (1977)

Tabelle 4 Verwendete *C. glutamicum* Stämme

Stamm		Genotyp
C. glut.	ATCC 13032	Wildtyp
C. glut.	ATCC 13032-DL2	D-Lactat, D,L-Hydroxybutyrat-Verwerter

Die für die molekulargenetischen Arbeiten verwendeten Plasmide sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Tabelle 5 Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Marker	Referenz
pBR322	Ap^r Tc^r	Bolivar et al., (1977b)
pHC79	Ap^r Tc^r	Hohn und Collins, (1980)
pUC18	Ap^r lacP(Polylinker) $lacZ^1$ replicon ColE1	Yanish-Perron et al., (1985)
pHC79	Ap^r Tet^r	Hohn et al., (1980)
pPU4	pBR313 Ω[0.029kb:: h80 dilv ilvGOED'4.8kb-11kb (-)]	McCorkle et al., (1978)
pPU118	pBR328 ilvE'DAY', Ap^r	Umbarger, Harms
pZ1	*C.glutamicum-E.coli* Shuttle-Vector: Km^r,Ap^r	Menkel et al., (1989)
pJC1	pZ1 Derivat mit pUC18-Polylinker SmaI-PstI	Cremer et al., (1988)

2. Chemikalien und Enzyme

Chemikalien

Die in nachfolgender Tabelle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck in Darmstadt bezogen.

Produkt	Hersteller
Aminosäurestandard Typ H	Benson Co., Reno, USA
Acetoin	Fluka AG Buchs, Schweiz
2-Acetoxy-2-ethyl-acetessigsäure-ethylester	Degussa AG, Hanau
Acrylamid (reinst, 2x krist., mind.99%)	Serva, Heidelberg
Adenosindiphosphat, Di-Na-salz	Boehringer, Mannheim
Agarose (Ultra Pure)	Gibco BRL, Eggenstein
Ampicillin (Trihydrat)	Boehringer, Mannheim
Bacto-Agar	Difco Lab., Detroit, USA
Bacto-Peptone	" "
Bacto-Trypton	" "
Bernsteinsäure, Na-salz	Serva, Heidelberg
Bisacrylamid	" "
Brenztraubensäure, Na-salz	" "
Harnstoff	" "
Rinder-Serumalbumin	Boehringer, Mannheim Basel, CH
Casaminoacids	Difco Lab.,Detroid, USA
Chloramphenicol	Boehringer, Mannheim
Cäsiumchlorid (Ultra Pure)	Gibco BRL, Eggenstein
1,4-Dithiothreitol	" "
EGTA	Serva, Heidelberg
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Gas Generating Kit	Oxoid Deutschland, Wesel
Hefeextrakt	Difco Lab., Detroit, USA

2-Hydroxybutyrat (D,L)	Degussa AG, Hanau
Kanamycin (Monosulfat)	Sigma, Deisenhofen
2-Ketobutyrat	Boehringer, Mannheim
2-Keto-β-methylvaleriansäure	Degussa AG, Hanau
2-Keto-β-isovaleriansäure, Na-salz	" "
2-Ketoisocapronsäure, Na-salz	" "
LMP-Agarose (Ultra Pure)	Gibco BRL, Eggenstein
Lysozyme L 6876	Sigma, München
McConkey Agar	" "
Membranfilter BA85 Porengröße 0,45 µm	Schleicher&Schüll, Basel, CH
NADH	Boehringer, Mannheim
Natriumpyruvat	Boehringer, Mannheim
Nalidixinsäure	Serva, Heidelberg
Polyethylenglykol 6000, Nr.46177	" "
Polyvinylpyrolidon 25, Nr.33420	Serva, Heidelberg
Sephadex G50	Pharmacia, Uppsala, S
Natriumdodecylsulfat	Serva, Heidelberg
Tetracyclin (Hydrochlorid)	Boehringer, Mannheim
Thiaminpyrophosphorsäurechlorid	Boehringer, Mannheim

Enzyme

Restriktionsendonukleasen, T4-Ligase, Alkalische Phosphatase, RNAse, Kornberg-Polymerase (DNA-Pol.I), Klenow-Polymerase (DNA-Pol.I, großes Fragment), Lysozym (aus Hühnereiweiß) und Proteinase K wurden von der Firma Boehringer Mannheim bezogen und gemäß Herstellerangaben verwendet.

3. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

Zur Kultivierung der verwendeten Corynebakterien-Stämme wurden folgende Medien verwendet:

Medium I: Stammhaltungsmedium (Claus et al., 1983)

Pepton	10	g/l
Fleischextrakt	10	g/l
Hefeextrakt	5	g/l
NaCl	3	g/l

Der pH-Wert wurde mit 1N NaOH auf 7,2 eingestellt. Zur Verfestigung wurde 2% (w/v) Bacto-Agar zugesetzt.

Medium II: Anzuchtmedium (Kase und Nakayama, 1972)

Pepton	10	g/l
Hefeextrakt	10	g/l
NaCl	2,5	g/l
Glucose	20	g/l

Der pH-Wert wurde mit 1N NaOH auf 7,2 eingestellt. Die Glucose wurde getrennt autoklaviert.

Medium III: Minimalmedium (modifiziert nach Kase und Nakayama, 1972)

$(NH_4)_2SO_4$	10	g/l
KH_2PO_4	10	g/l
Harnstoff	5	g/l
$MgSO_4x7H_2O$	0,4	g/l
$FeSO_4x7H_2O$	0,1	g/l
$MnSO_4xH_2O$	0,01	g/l
$CaCl_2$	0,1	mg/l
Glucose	20	g/l

Dem Medium wurde zur Verfestigung 2% Bacto-Agar zugesetzt und ein pH-Wert von 7,0 eingestellt. Die Glucose wurde getrennt autoklaviert. Aminosäuren und Antibiotika wurden dem Medium nach Autoklavieren in den jeweils angegebenen Konzentrationen sterilfiltriert zugesetzt.

Medium IV	Fermentationsmedium (modifiziert nach Tosaka und Takinami, 1978)	
$(NH_4)_2SO_4$	20	g/l
KH_2PO_4	0,5	g/l
K_2HPO_4	0,5	g/l
$MgSO_4xH_2O$	0,25	g/l
Glucose	20	g/l
1 ml Biotin	0,02	g/100ml
1ml Spurensalzlösung		

Die Salze wurden in 800 ml Aqua dest. aufgenommen und pro Schüttelkolben 80 ml Medium abgefüllt. Nach dem Autoklavieren wurden 8 ml 20% Glucose, sowie 2% trocken sterilisiertes $CaCO_3$ zugegeben. Nach Animpfen wurde das Volumen pro Kolben mit Aqua dest. auf 100 ml eingestellt.

Spurensalzlösung:

$FeSO_4x7H_2O$	1,0	g/l
$MnSO_4xH_2O$	1,0	g/l
$ZnSO_4x7H_2O$	0,1	g/l
$CuSO_4$	0,02	g/l
$NiCl_2x6H_2O$	0,002	g/l

Die Salze wurden in 100 ml Aqua dest. gelöst.

Medium MMYE:	Medium zur Herstellung osmotisch sensitiver Zellen und Protoplasten (Santamaria et al., 1985)	
$(NH_4)_2SO_4$	10	g/l
Harnstoff	3	g/l
$MgSO_4x7H_2O$	0,4	g/l
NaCl	0,05	g/l
$FeSO_4x7H_2O$	2	mg/l
$MnSO_4xH_2O$	2	mg/l
Hefeextrakt	1	g/l

Die Medienbestandteile wurden in 960 ml Aqua dest. gelöst und die Eisen- und Mangansalze als Stammlösungen zugegeben. Je 96 ml Medium wurden in 500 ml Erlenmeyerkolben abgefüllt. Nach dem

Autoklavieren wurden pro Kolben folgende sterile Lösungen zugesetzt:

2 ml Glucose	(50g/100ml)
1 ml K_2HPO_4	(10g/100ml)
1 ml Biotin/Thiamin	(5 mg Biotin und 20 mg Thiamin/l)

Medium MMYE-Glycin:
Zu 100 ml MMYE Medium wurden nach dem Autoklavieren 3,2 ml Natriumglycin (20g/100ml, pH 7,2) steril zugesetzt.

RCG-Agar: Regenerationsagar für Protoplasten
(modifiziert nach Santamaria et al., 1984)

Casaminoacids	5	g/l
Hefeextrakt	2,5	g/l
K_2HPO_4	3,5	g/l
KH_2PO_4	1,5	g/l
$MgCl_2x6H_2O$	0,4	g/l
Na_2-Succinatx$6H_2O$	135	g/l
Polyvinylpyrolidon	30	g/l
Bacto-Agar	22	g/l

Die Chemikalien wurden in 978 ml Aqua dest. gelöst und der pH-Wert der Lösung wurde auf 7,6 eingestellt. Folgende Stammlösungen wurden nach dem Autoklavieren steril zugegeben:

10 ml Glucose	(50g/100ml)
10 ml Biotin/Thiamin	(5 mg Biotin/l, 20 mg Thiamin/l)
2 ml Spurenelementlösung:	
$ZnCl_2$	40 mg/l
$FeCl_3x6H_2O$	200 mg/l
$CuCl_2x2H_2O$	10 mg/l
$MnCl_2x4H_2O$	10 mg/l
$Na_2B_2O_7x10H_2O$	10 mg/l
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}x4H_2O$	10 mg/l

Zur Transformandenselektion wurde dem Medium eine sterilfiltrierte Kanamycinlösung zugesetzt, so daß die Endkonzentration des Antibiotikums 300 µg/ml betrug.

RCG-Agarose:
Beinhaltet die gleichen Chemikalien wie RCG-Agar, jedoch wurde anstelle des Bactoagars 3 g/l Low-Melting-Point Agarose eingesetzt. Die RCG-Agarose diente zur Einbettung der Protoplasten bei deren Regeneration. Kurz vor Gebrauch wurde sie im Mikrowellenherd erwärmt und nach Zugabe aller Zusätze in 3 ml Portionen in sterile Röhrchen mit Schraubverschluß abgefüllt. Bis zur Verwendung wurde die Agarose bei 39°C im Wasserbad temperiert.

SB-Agar: Regenerationsagar für osmotisch sensitive Zellen (Yoshihama et al., 1985)

Trypton	10	g/l
Yeast-Extrakt	5	g/l
NaCl	10	g/l
Bactoagar	15	g/l
Sorbit	102	g/l

Die Chemikalien wurden in 960 ml Aqua dest. gelöst und der pH-Wert mit 1 N NaOH auf 7,5 eingestellt. Nach dem Autoklavieren wurden je 20 ml einer sterilen 1 M $MgCl_2$-Lösung und einer 1 M $CaCl_2$-Lösung und 600 µl steriler Kanamycinlösung (25 mg/ml) zugegeben.

Zur Kultivierung der verwendeten *E. coli*-Stämme wurden folgende Medien eingesetzt:

LB-Medium: (Maniatis et al., 1982)

Trypton	10	g/l
Yeast-Extrakt	5	g/l
NaCl	10	g/l

Es wurde ein pH-Wert von 7,5 eingestellt. Zur Medienverfestigung wurden 15 g/l Bactoagar zugesetzt (LB-Platten).

Minimalmedium: (modifiziert nach Tanaka et al., 1967)

Yeast nitrogen base	6,8	g/l
K_2HPO_4	6	g/l
KH_2PO_4	3	g/l

Für aminosäureauxotrophe Stämme wurden die entsprechenden Aminosäuren steril aus einer Stammlösung (30 mg/ml) zugegeben.

Bei Zugabe von Antibiotika zu *E. coli*-Nährmedien wurde eine entsprechend konzentrierte Stammlösung zu dem auf 50°C temperierten Agar in folgenden Endkonzentrationen gegeben:

Ampicillin	:	30 µg/ml
Kanamycin	:	25 µg/ml
Tetracyclin	:	15 µg/ml
Chloramphenicol	:	100 µg/ml
Nalidixinsäure	:	25 µg/ml

Kultivierungsbedingungen

Die Anzucht von Corynebakterien erfolgte, soweit nicht anders beschrieben, in 500 ml Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen, die 100 ml Nährmedium enthielten. Die Inkubation wurde bei 30°C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 100 rpm durchgeführt. Vorkulturen wurden von einer Vollmediumplatte angeimpft, die Zellen nach 16 h Wachstum in steriler 0,9% NaCl-Lösung gewaschen und die Hauptkultur mit einer Zellmasse entsprechend einer OD_{600} von 0,5 - 1,0 angeimpft. Zur Stammhaltung wurden 500 µl Vorkultur in 300 µl steriles Glyzerin pipettiert und bei -20°C bis zu einem halben Jahr gelagert.

E. coli-Stämme wurden in 20 ml Reagenzgläsern mit 4 ml LB-Medium bei 37°C oder 30°C, unter Schütteln angezogen. Bei Anzucht größerer Zellmengen wurden 100 ml Kulturen in 500 ml Erlenmeyerkolben, oder 500 ml Medium in 1 l Erlenmeyerkolben kultiviert.

Das Bakterienwachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm verfolgt. 2 ml Proben wurden in einer Christ Laborzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand zur Bestimmung von Aminosäuren verwendet. Das Bakterienpellet wurde in 0,9% NaCl gelöst und ab einer optischen Dichte von 0,3 entsprechend verdünnt.

4. Bestimmung von Aminosäuren

Aminosäureanalysator

Die in das Medium ausgeschiedenen Aminosäuren wurden mit einem Aminosäureanalysator LC 2000 der Firma Biotronik Wissenschaftliche Geräte GmbH mit angeschlossenem Integrator (Shimadzu Data Processor Chromopac C-R 18) bestimmt. Dabei werden die Aminosäuren nach dem Kationenaustauscherprinzip getrennt und mit Ninhydrin zu einem blauen Farbstoff umgesetzt, dessen Konzentration photometrisch bestimmt wird. Die zu analysierenden Proben wurden mit Verdünnungspuffer (pH 2,2) verdünnt, so daß eine Konzentration von 0,3 mM pro Aminosäure nicht überschritten wurde.

Probenverdünnungspuffer:

tri-Na-Citratx$2H_2O$	19,6	g
Phenol, fest	1,92	g
Thiodiäthanol	20	ml
Aqua dest.	ad 1000	ml

Der pH-Wert wurde mit 6 N HCl auf 2,2 eingestellt.

Trennbedingungen:

Trennsäule	0,6 x 35 cm
Trennharz	Durrum DC-6A
Probevolumen	100 µl
Probenkonzentration	max. 30 nmol pro Aminosäure und 60 nmol NH_3/100µl Probe
Puffer	Na-citrat/Na-chlorid
Durchflußrate	32 ml/h
Meßbereich	570 nm 0-1 EE 440 nm 0-1 EE

Betriebstemperatur	48°C bzw. 58°C	
Analysenzeit	92 min für Aminosäure-Elution	
	143 min einschließlich	
	Regenerieren u. Äquilibrieren	
Retentionszeiten	Valin	ca. 43,0 min
	Isoleucin	ca. 54,5 min
	Leucin	ca. 56,0 min

Die Eichung der Aminosäurekonzentrationen erfolgte mit Hilfe von käuflichen Aminosäurestandards.

Aminosäurebestimmung mit Hilfe eines HPLC-Gerätes

Es wurde ein HPLC-Gerät vom Typ Hewlett Packard HP 1090 verwendet. Der Vorteil dieser Methode ist die wesentlich kürzere Analysezeit beim Aminosäurenachweis. Zur quantitativen Bestimmung erfolgte zunächst eine Derivatisierung der Aminosäuren mit o-Phthalaldehyd automatisch vor Analysebeginn, wobei die primären Aminogruppen mit einem o-Phthalaldehyd/2-Mercaptoethanolgemisch fluoreszierende thio-substituierte Isoindole bilden (Schuster, 1984; Sternson, 1985). Die Auftrennung erfolgte auf der Hochdruckflüssigkeits-chromatographiesäule. Die Proben wurden mit Aqua dest. (0,01% Na-Azid) auf eine Konzentration von maximal 10 mM verdünnt.

Trennbedingungen:

Säule	Merck Lichrosorb RP 18
Laufmittel	A: 0,1 M Na-Acetat pH 7,2
	B: Methanol
Injektionsvolumen	2 µl
Durchflußrate	0,5 ml
Ofentemperatur	40°C
Druck	max. 400 bar
Laufzeit	12 min
Detektion	250 nm

Zur Bestimmung der Konzentration wurden externe und interne Standards mitgeführt.

5. Herstellung von Rohextrakten

Zellernte

Die Zellkulturen wurden in der exponentiellen Phase (OD_{600}: 12-15) in einer Heraeus Kühlzentrifuge (Minifuge RF) abzentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit 50 mM K-Phosphat-Puffer pH 7,0 wurden die Zellen in 10-15 ml Aufschlußpuffer (50 mM K-Phosphat-Puffer pH 7,0, 30% Glycerin) resuspendiert.

Zellaufschluß

Die in Aufschlußpuffer aufgenommenen Zellen wurden mit einem Ultraschall-Desintegrator (Sonifier B15 der Firma Sonic Power Co., Danburg, USA) mit maximaler Leistung beschallt. Die Einwirkungszeit betrug bei Corynebakterien 5 Minuten, bei *E.coli* 2 Minuten unter Kühlung in einem Eiswasserbad. Durch 30-minütige Zentrifugation in einer Beckmann Kühlzentrifuge J-21 bei 4°C und 25.000 g wurden die Zelltrümmer abgetrennt. Der Überstand wurde direkt zur Messung der Enzyme eingesetzt

Proteinbestimmung

Das im Rohextrakt enthaltene Protein wurde zunächst mit Trichloressigsäure (60%) ausgefällt, da das im Aufschlußpuffer enthaltenen Glycerin die Biuret-Farbreaktion störte. Das Pellet wurde in 0,2 N NaOH gelöst und die Proteinkonzentration nach der Biuret-Methode (Gornall et al. 1949) durchgeführt.

Biuret-Reagenz: 4,5 g K-Na-Tartrat
1,5 g $CuSO_4 x 5H_2O$
2,5 KJ

Die Chemikalien wurden in 500 ml 0,2 N NaOH gelöst.

Zu 0,5 ml Probe einer Proteinkonzentration von 0,2-3 mg/ml Protein wurden 2,5 ml Biuret-Reagenz gegeben und nach 30

Minuten die Extinktion bei 580 nm gegen einen Leerwert ohne Protein bestimmt. Die Eichgerade wurde mit Rinderserumalbumin erstellt.

6. Bestimmung von Enzymaktivitäten im Rohextrakt

Eine Enzymeinheit (U) entspricht einem µmol gebildeten Produktes oder verbrauchten Substrates pro Minute. Die spezifische Enzymaktivität wird in U/mg Protein angegeben.

6.1 Threonindehydratase

Die spezifische Aktivität der Threonindehydratase wurde modifiziert nach Umbarger und Hatfield (1971) gemessen.

Reaktionsansatz:	0,08 ml	1 M K-Phosphat Puffer pH 8,2
	0,08 ml	1 mM Pyridoxalphosphat
	0,04 ml	0,8 M L-Threonin
	0,05 ml	Rohextrakt
	0,550 ml	Aqua dest.

Der Reaktion wurde durch Zugabe von L-Threonin gestartet und nach 15-minütiger Inkubation bei 37°C mit 200 µl Sulfosalicylsäure abgestoppt. Das enthaltene Protein wurde 1 h bei 4°C ausgefällt. 500 µl Überstand der abzentrifugierten Proben (10.000 g, 10 min) wurden mit 500 µl Aqua dest. versetzt und zur Derivatisierung der gebildeten Ketobuttersäure 3 ml Dinitophenylhydrazin (0,025% in 0,5 N HCl) zugegeben und 15 min bei RT inkubiert. Danach wurde jeweils 1 ml 40 % NaOH zugegeben und anschließend die Extinktion bei 540 nm ermittelt. Die Eichgerade wurde ebenfalls bei 540 nm mit α-Ketobuttersäure erstellt.

6.2 Acetohydroxysäuresynthase

Die spezifische Aktivität der Acetohydroxysäuresynthase wurde mit einem modifizierten Test nach Umbarger und Brown (1958) bestimmt.

Reaktionsansatz:	2,00 ml	0,1 M K-Phosphat-Puffer pH 7,8
	0,01 ml	10 mg/ml TPP
	0,10 ml	0,1 M $MgCl_2$
	0,10 ml	Na-Pyruvat
	0,09 ml	Aqua dest.
	0,05 ml	Rohextrakt

Nach 15 minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion mit 100 µl 6 N H_2SO_4 gestoppt und das gebildete Acetolactat bei 62°C innerhalb von 15 Minuten, zu Acetoin decarboxyliert. Das Acetoin wurde anschließend nach der Methode von Westerfeld (1945) bestimmt.

Acetoinbestimmung:	0,25 ml	Probe
	0,50 ml	5%ige 2-Naphtollösung(frisch gelöst in 2,5 N NaOH)
	0,50 ml	0,5% Creatinlösung

Nach 60 Minuten Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 530 nm gegen einen Leerwert ohne Acetoin bestimmt. Die Eichgerade wurde mit Acetoin bei 530 nm erstellt.

6.3 Isomeroreductase

Diese Messung wurde nach Arfin und Umbarger (1969) durchgeführt. Da das Substrat α-Aceto-Hydroxybutyrat instabil ist, wurde es aus der Synthesevorstufe α-Acetoxy-2-ethyl-acetessigsäureethylester hergestellt. Dieser Ester ist stabil und kann bei -20°C aufbewahrt werden. Zu 2 Mol Ester wurden 2 Mol NaOH gegeben und 2 h gerührt. Bei der Esterhydrolyse entstehen als Nebenprodukte Natriumacetat und Ethanol. Diese

Nebenprodukte zeigen in den anfallenden Konzentrationsbereichen keine Auswirkungen auf die Isomeroreductase (Cordes, 1986).

Reaktionsansatz:	0,20 ml	0,5 M K-Phosphat-Puffer pH 7,5
	0,20 ml	0,015 M $MgCl_2$
	0,10 ml	0,001 M NADPH
	0,05 ml	Rohextrakt
	0,10 ml	0,1 M α-Aceto-α-Hydroxybutyrat
	0,35 ml	Aqua dest.

Der Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe von α-Aceto-α-Hydroxybutyrat. Die Extinktion wurde bei 340 nm und 30°C verfolgt.

6.4 Dihydroxysäuredehydratase

Die spezifische Aktivität der Dihydroxysäuredehydratase wurde nach einer modifizierten Vorschrift von Kiritani et al. (1966) gemessen.

Reaktionsansatz:	0,40 ml	0,25 M Tris/HCl Puffer pH 8,0
	0,10 ml	0,2 M $MgCl_2$
	0,10 ml	Rohextrakt
	0,15 ml	0,13 M α,β-Dihydroxy-β-methyl-valerat
	1,25 ml	Aqua dest.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von α,β-Dihydroxy-β-methylvalerat gestartet und bei 37°C bis zu 30 min inkubiert, wobei alle 5 min eine Probe entnommen wurde. Je 250 µl dieser Proben wurden zu 0,075 ml 6 N HCL gegeben zur Beendigung der Reaktion. Das gebildete α-Keto-β-methylvalerat wurde mit 500 µl Dinitophenylhydrazinlösung (200 mg/l Acetonitril) zur Derivatisierung versetzt und 2 h bei 30°C inkubiert. Der Nachweis des α-Keto-β-methylvalerates erfolgte mittels HPLC-

Analyse. Die Eichung wurde durch interne und externe Standards unterschiedlicher Konzentrationen von α-Keto-β-methylvalerat erstellt.

6.5 Transaminase B

Dieses Enzym wurde nach einer Vorschrift von Shiio et al. (1982), modifiziert nach Groeger (1986), gemessen.

Reaktionsansatz:	0,20 ml	1 M Tris/HCl-Puffer pH 8,0
	0,05 ml	5 mM Pyridoxalphosphat
	0,40 ml	2,5 mM Na-Glutamat
	0,05 ml	2,4 M NH_4Cl
	0,05 ml	60 mM ADP
	0,05 ml	3,4 mM NADPH
	0,05 ml	4 mM α-Ketoisocaproat
	0,007 ml	8U Glutamat-Dehydrogenase
	0,093 ml	Aqua dest.
	0,05 ml	Rohextrakt

Die Reaktion wurde durch Zugabe von α-Ketoisocaproat gestartet und die Extinktion bei 340 nm und 30°C gemessen.

7 Transformationstechniken

7.1 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA wurden kompetente Rubidiumchlorid-Zellen (Hanahan, 1985) hergestellt. Dazu wurde der betreffende Stamm in einer 50 ml SOB-Medium Kultur bei 37°C inkubiert, bis eine optische Dicht von ca. 0,2 erreicht war. Die Zellen wurden abzentrifugiert (15 min, 3.500 rpm, 4°C) und das Pellet in RF1-Lösung (1/3 Volumen des Ausgangsvolumens) gelöst. Nach 15 min Inkubation in Eis wurde erneut abzentrifugiert und RF2-Lösung (1/12,5 des Ursprungsvolumens) zugegeben und anschließend weitere 15 min in Eis inkubiert. Danach wurden die nun kompetenten Zellen in

0,2 ml Portionen abgefüllt und in Trockeneis/Ethanol oder flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70°C bis zu einem halben Jahr. Zur Transformation wurden die kompetenten Zellen bei RT aufgetaut.

Lösungen:

SOB-Medium:	2	%	Bacto-Pepton
	0,5	%	Yeast Extrakt
	10	mM	NaCl
	2,5	mM	KCl
	10	mM	$MgCl_2$
	10	mM	$MgSO_4$
RF-1-Lösung:	100	mM	RbCl
	50	mM	$MnCl_2xH_2O$
	30	mM	Kaliumacetat
	10	mM	$CaCl_2xH_2O$
	15	%	Glyzerin
	mit 0,2 M Essigsäure auf pH 5,8 einstellen		
RF-2-Lösung:	10	mM	Mops
	10	mM	RbCl
	75	mM	$CaCl_2xH_2O$
	15	%	Glyzerin
	mit NaOH auf pH 6,8 einstellen		

Zu den aufgetauten kompetenten Zellen (0,2 ml) wurde DNA in maximal 20 µl Puffer zugegeben und 30 min in Eis inkubiert. Anschließend wurde ein Hitzeschock bei 42°C, 90 sec, durchgeführt und die Zellen wieder 1 min in Eis aufbewahrt. SOC-Medium (SOB-Medium + 5 % Glucose) wurde zugegeben und die Zellen bei 37°C 60 min zur Regeneration und Expression der plasmidcodierten Gene inkubiert.

7.2 Protoplasten-Transformation von *C. glutamicum*

Die Herstellung und Transformation von Protoplasten wurde nach dem nachfolgend beschriebenen Protokoll von Thierbach et al. (1988) durchgeführt.

Protoplastenherstellung

Die Zellen wurden in Medium II ca. 8 h bei 30°C und 100 rpm angezogen. 100 ml MMYE-Medium + 0,63% Glycin wurden aus dieser Vorkultur mit einer entsprechenden Zellmenge beimpft, so daß die Kultur nach Inkubation über Nacht eine optische Dichte von 1,0 bis 1,5 aufwies. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min, 3.000 g) und 5 ml Sucrose-$MgCl_2$-MMYE und 5ml Lysozymlösung (20 mg/ml Sucrose-$MgCl_2$-MMYE) zugegeben. Die Suspension wurde 1,5 bis 3 h bei 33°C und 60 rpm im Wasserbad inkubiert. Nach Zentrifugation (10 min, 2.000 g) wurde das Pellet vorsichtig in 7 ml Sucrose-$MgCl_2$-MMYE resuspendiert, sowie 2 ml Sucrose-$MgCl_2$-MMYE Lösung mit 5 mg/ml Achromopeptidase zugesetzt und im Wasserbad 1,5 h bei 33°C inkubiert. Nach 30 min wurde 1 ml einer 10 mg/ml Lysozym enthaltenden Sucrose-$MgCl_2$-MMYE-Lösung zugesetzt. Die Bildung der Protoplasten wurde mikroskopisch verfolgt und die Inkubation abgebrochen, wenn 90 % der Zellen protoplastiert waren. Zur Entfernung der Enzymreste wurde 10 min bei 2.000 g abzentrifugiert und die Zellen einmal mit 40 ml TSMC-Lösung und einmal mit 5 ml TSMC-Lösung gewaschen. Danach wurden die Protoplasten in 1 ml TSMC resuspendiert und die Zellzahl in der Thomakammer bestimmt. Es wurde eine Zellzahl von 10^9 Zellen/ml eingestellt und Aliquots von 100 µl bei -70°C eingefroren oder direkt transformiert.

Transformation und Protoplastenregeneration

Zu 100 µl Protoplastensuspension wurden bis zu 10 µl DNA-Lösung (0,5-2 µg) gegeben. Anschließend wurden 700 µl einer 30%-igen PEG-6000-Lösung zugesetzt, vorsichtig durchmischt und 3 min bei RT inkubiert. Danach wurde 7,2 ml vorgewärmte TSMC*-Lösung zugemischt und 3 h bei 30°C inkubiert. Nach Zentrifugation (10

min, 2.000 g) wurden die transformierten Protoplasten in 500 µl TSMC aufgenommen und zur Regeneration in 3 ml RCG-Agarose (s.3.) eingebettet auf RCG-Platten ausgegossen. Die Inkubationsdauer bei 30°C betrug bis zu 10 Tagen. Die wachsenden Zellen wurden auf nicht stabilisierte Vollmediumplatten, d.h. ohne Natriumsuccinat, mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion der Transformanden ausgestichen.

Lösungen:

Sucrose-$MgCl_2$-MMYE:	8,00	ml	1,64 M Sucrose
	0,32	ml	1 M $MgCl_2$
	16	ml	MMYE (s.3.)
	7,68	ml	Aqua dest.
TSMC-Lösung:	92	ml	500 mM Na_2-Succinat
	1	ml	1 M $MgCl_2$
	2	ml	1 M $CaCl_2$
	5	ml	1 M Tris-HCl pH 7,0

die Lösungen wurden getrennt autoklaviert und anschließend zusammengegeben

TSMC*-Lösung:	100	ml	TSMC-Lösung
	0,5	ml	Hefeextrakt (20%)
	0,5	ml	Casaminoacids (20%)
	0,2	ml	Glucose (50%)

die Lösungen wurden getrennt autoklaviert und anschließend zusammengegeben

7.3 Transformation osmotisch sensitiver *C. glutamicum*-Zellen

Die Herstellung und Transformation osmotisch sensitiver Zellen erfolgte ebenfalls nach Thierbach et al. (1988).

Herstellung osmotisch sensitiver Zellen

Die Zellanzucht und Lysozymbehandlung zur Herstellung osmotisch sensitiver Zellen erfolgte wie unter 7.2 für Protoplasten beschrieben. Im Gegensatz zur Protoplastenherstellung wurden nach Abzentrifugation (10 min, 2.000 g) die Zellen nicht mit Achromopeptidase behandelt, sondern direkt in 4 ml TSMC gewaschen und anschließend auf eine Zellzahl von ca. 4×10^8 Zellen/ml mit TSMC verdünnt. Je 200 µl Portionen der osmotisch sensitiven Zellen wurden bei -70°C eingefroren.

Transformation osmotisch sensitiver Zellen

Die bei 37°C aufgetauten Zellen wurden einem 10 min Hitzeschock bei 49°C unterzogen und anschließend mit bis zu 10 µl DNA-Lösung (0,5-2 µg) versetzt. Nach 5 min bei RT wurden 700 µl einer 50%-igen PEG-Lösung in TSMC zugegeben und weitere 5 min bei RT inkubiert. Danach wurde der Ansatz in 2 ml TSMC*-Lösung pipettiert und über Nacht bei 30°C inkubiert. Je 500 µl des Transformationsansatzes wurden zur Regeneration auf SB-Patten ausplattiert und 3 bis 5 Tage bei 30°C inkubiert.

7.4 Filterkreuzung von *C. glutamicum* und *E. coli*

Diese Methode wurde nach dem Protokoll von A.Schäfer (mündl. Mitteilung) durchgeführt.

Zunächst wurde der Donor-*E. coli*-Stamm S17-1, welcher das zu mobilisierende Plasmid enthielt, in LB-Medium unter selektiven Bedingungen mit Kanamycin bis zu einer OD_{600} von ca. 0,9 angezogen.

Gleichzeitig wurde der *C. glutamicum* Rezipientenstamm bis zu einer OD_{600} von 3-4 in LB-Medium angezogen. 10 ml der Kultur wurden entnommen und einer 9 minütigen Hitzebehandlung bei 48,5°C unterzogen. Zu einem Teil Rezipientenzellen wurden ein bis fünf Teile Donorzellen gegeben und anschließend 2-3 min bei 10.000 g in der Eppendorfzentrifuge abzentrifugiert. Der

Überstand wurde verworfen, das Pellet in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf Nitrozellulosefilter (0,45 µm) aufgetragen. Die Filter waren zuvor auf vorgewärmte Platten gegeben worden. Nach 20 h Bebrütungszeit bei 30°C wurden die Filter mit 0,75 ml LB-Medium abgeschwemmt und auf LB-Platten mit Kanamycin zur Selektion des Plasmids, sowie mit Nalidixinsäure zur Abtötung der *E. coli*-Zellen, ausplattiert. Nach 2 Tagen Inkubation bei 30°C waren die Transkonjuganden zu weiteren Untersuchungen zu verwenden.

7.5 In Vito-Verpackung von DNA und Herstellung von Cosmid enthaltenden λ-Lysaten

Um Genbanken mit dem Cosmidvektor pHC79 in *E. coli* zu erstellen, wurde ein DNA-Packaging-Kit von Boehringer, Mannheim, benutzt (DNA Packaging Kit, Kat.nr.836818). Der Vorteil einer Genbank mit diesem Vektor ist, daß ca. 25 bis 35 kb DNA-Fragmente einligiert werden können und somit die Zahl der zur Repräsentation des gesamten Corynebakterien-Genoms notwendigen Klone stark reduziert werden kann.

In vito-Verpackung von DNA

Zur Erstellung der Genbank wurde der restriktions- und modifikationsnegative, durch den Phagen λ identifizierbare *E. coli* Stamm ED 8654 verwendet. Zellen dieses Stamms wurden 15 h bei 37°C in 100 ml TB-Medium angezogen. Nach Abzentrifugation wurden die Zellen in 40 ml $MgSO_4$-Lösung (10 mmol/l), resuspendiert und 45 min bei 32°C unter starkem Schütteln inkubiert. Die so behandelten Zellen konnten ohne Verlust der Transduktionsaktivität bei 4°C 1 bis 2 Wochen aufbewahrt werden.

Die zur Verpackung verwendete chromosomale DNA aus *C. glutamicum* wurde partiell mit Restriktionsenzymen verdaut, auf einem Agarosegel aufgetrennt und die Fragmente einer Länge von 20 bis 50 kb isoliert. Diese Fragmente wurden in den vollständig verdauten und mit alkalischer Phosphatase

behandelten Vektor pHC79 einligiert und der Ligationsansatz direkt zur Verpackung verwendet.

Für eine Verpackungsreaktion wurden die im Kit enthaltenen Verpackungsenzyme und die Phagenhüllen vosichtig in Eis aufgetaut. Dabei wurde 0,5 µg DNA des Ligationsansatzes zugegeben und weitere 30 min in Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 1 h bei 25°C aufbewahrt und danach mit Tris/HCl-Puffer (Tris/HCL 10 mmol/l; Gelatine 0,01%; $MgSO_4$ 10 mmol/l, pH 7,4) auf 100 µl aufgefüllt. 10 µl des so hergestellte Lysats wurde zur Transduktion von 100 µl der, wie oben beschrieben, behandelten *E. coli* ED 8654 Zellen eingesetzt. Der Ansatz wurde 20 min bei 37°C inkubiert, dann 1 ml LB-Medium zugegeben und weitere 30 min bei 37°C aufbewahrt. Die Transduktanden wurden anschließend auf LB mit Ampicillin ausplattiert und 20 h bei 37°C inkubiert.

Die im *E. coli* Stamm ED 8654 vorliegende Cosmidgenbank konnte nun durch Isolation und Transformation der Cosmide in die zur Klonierung von Corynebakterien-Genen benutzten *E. coli* Stämme verwendet werden. Eine weitere Möglichkeit ist die erneute Verpackung dieser Cosmide in λ-Phagenpartikel, um dann mit diesen Phagen die in einem Gen defekten *E. coli* Stämme zu transduzieren.

Herstellung von Cosmid-enthaltenden λ-Lysaten

Der eine Cosmidgenbank enthaltende *E. coli* Stamm ED 8654 wurde mit Phage λ infiziert. Während des Infektionszyklus wird in die dabei gebildeten λ-Phagenköpfe neben der eigenen DNA auch die in den Zellen vorhandene Cosmid-DNA verpackt.

Die Cosmid-tragenden Zellen des Stammes ED 8654 wurden zur Vorbereitung der Infektion mit Phage λ , wie oben beschrieben, mit TB-Medium angezogen und mit $MgSO_4$-Lösung behandelt. Anschließend wurde 0,5 bis 1 Phage einer λ-Phagenlösung pro Zelle zugegeben und 20 min bei 37°C inkubiert. Nach Regeneration mit 1 ml LB 30 min bei 37°C wurde der Ansatz zu 20 ml MB-Medium gegeben und 3 h bei 250 rpm inkubiert, wobei es

zur Lyse der Genbank-tragenden Zellen kommt. Nach 10 min Abzentrifugation mit 20000g erhält man einen Überstand, der Cosmid-tragende λ-Phagenhüllen enthält. Vor der Verwendung wurde das Lysat mit 400 µl Chloroform versetzt und bei 4°C 20 h aufbewahrt, um eventuell noch vorhandene lebende Zellen des *E. coli* Stammes ED 8654 abzutöten. Mit diesem Lysat wurden die Zellen der in verschiedenen ilv-Genen negativen *E. coli*-Stämme transduziert. Einne Trennung der Transduktanden und Zellen, die nur λ-DNA enthielten, war durch Ausplattierung auf LB-Platten mit AP möglich, so daß Cosmid-DNA enthaltende Zellen selektioniert wurden. Klone, die ausschließlich λ-DNA enthielten, konnten nicht wachsen.

8. Präparation und Reinigung von Nukleinsäuren

8.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Alkalische Präparation

Um kleine Mengen von Plasmid-DNA aus *E. coli* schnell zu präparieren wurde die Methode des alkalischen Aufschlußes nach Birnboim und Doly (1979) verwendet. Hierzu wurden die Zellen in 3 ml LB-Kulturen mit dem entsprechenden Antibiotikum über Nacht bei 37°C angezogen und anschließend bei 10.000 g in einer Eppendorf-Zentrifuge geerntet. Zum Pellet wurden 100 µl 4°C kalter Glucose-EDTA-Lösung zupipettiert, nach 5 min Inkubation in Eis 200 µl 1%-ige SDS-Lösung in 0,2 N NaOH und nach weiteren 5 min 150 µl Acetat-Lösung zugegeben. Die aufgeschlossenen Zellen wurden zur Beseitigung der Zelltrümmer 10 min bei 4°C und 10.000 g abzentrifugiert und der Überstand einmal mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) und zweimal mit Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (24:1) extrahiert. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte mit 1 ml abs. Ethanol bei RT für 2 min. Danach wurde 5 min bei 10.000 g zentrifugiert, das Pellet einmal mit 70%-igem Ethanol gewaschen und anschließen in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde zur Verwendung bei Transformationen oder Restriktionsverdaus in

20 µl TE-Puffer gelöst. In dieser Lösung ist sie bei 4°C über einen längeren Zeitraum haltbar.

Lösungen:

Glucose-EDTA-Lösung:	50 mM	Glucose
	10 mM	EDTA
	25 mM	Tris-HCl pH 8,0
Acetat-Lösung:	600 µl	5 M Na-Acetat-Lösung
	115 µl	96%iger Eisessig
	285 µl	Aqua dest.
TE-Puffer:	10 mM	Tris-HCl pH 8,0
	1 mM	EDTA pH 8,0

Großpräparation von *E. coli*-Plasmid-DNA

Zur Isolation größerer Mengen Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen wurde eine modifizierte Methode nach Maniatis et al. (1982) verwendet. Durch Abzentrifugation wurden die aus 1 l LB-Medium mit Antibiotikum angezogenen Zellen geerntet und anschließend mit Lysozym und Natriumdodecylsulfat aufgeschlossen. Die im Überstand enthaltene Plasmid oder chromosomale DNA wurde mit absolutem Ethanol ausgefällte und in TE-Puffer aufgenommene. Danach wurde die DNA weiter über einen CsCl-Gradientenlauf aufgereinigt (s.II/8.4).

8.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *C. glutamicum*

Die Isolation kleiner Plasmidmengen aus *C. glutamicum* erfolgte nach einer modifizierten Methode von Yoshihama et al. (1985).

C. glutamicum Zellen wurden in je 10 ml LB-Medium über Nacht angezogen und das Pellet nach Zentrifugation in 350 µl E-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 50 µl PEG-Lösung und 60 µl Lysozymlösung (100 mg/ml) dazugegeben. Es wurde 15 min bei 37°C unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Die Zellen wurden

durch Zugabe von 50 µl 0,5 M EDTA-lösung und 120 µl einer 10%-igen SDS-Lösung und durch 2 minütiges Kochen aufgeschlossen. Nach Abkühlen der Lösung wurde puffergesättigte Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) zugegeben und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 15 min bei 4°C und 10.000 g abzentrifugiert ein weiteres Mal mit Phenol-Lösung und 2x mit Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (24:1) extrahiert. Das weitere Vorgehen erfolgte wie unter II/8.1 für *E. coli* beschrieben.

Lösungen:

E-Puffer:	40	mM	Tris/HCl pH 7,9
	2	mM	EDTA pH 7,9
PEG-Lösung:	240	g	PEG 6000 in Aqua dest.

8.3 Präparation chromosomaler DNA aus *C. glutamicum*

Zur Präparation chromosomaler DNA aus *C. glutamicum* wurde eine Methode modifiziert nach Katsumata (1984) verwendet.

Mit 5 ml 15 h gewachsener Vorkultur wurde MMYE-Medium 0,63% Glycin (II/3.) angeimpft. Die Bakterien wurden bei 30°C, 100 rpm, inkubiert, bis eine OD_{600} von 2 bis 3 erreicht war. Nach Abzentrifugation (5 min, 8000 rpm) wurde das Pellet in 10 ml Saccharose-$MgCl_2$-MMYE-Medium (II/7.2) mit 10 mg Lysozym resuspendiert und 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde SDS-Lösung zugegeben und weitere 2 h bei 37°C schwach geschüttelt. Nach Zugabe von 20 ml Phenol wurde der Ansatz bei 4°C über Nacht aufbewahrt und am nächsten Morgen im JA-20 Rotor der Beckmannzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde 1x mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol Lösung (25:24:1) und 3x Chloroform-Isoamylalkohol Lösung (24:1) extrahiert. Nach Zugabe von LiCl (0,4 M Endkonzentration) und 20 ml abs. Ethanol wurde die DNA mindestens 2 h bei -70°C gefällt. Nach Zentrifugation wurde das Pellet 1x mit 70%igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Zur Entfernung mitausgefällter RNA wurde das Pellet in 2 ml TE-Puffer (II/8.1) mit 100 µg/ml RNAse versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 1x mit Phenol-

Chloroform-Isoamylalkohol Lösung (25:24:1) und 1x Chloroform-Isoamylalkohol Lösung (24:1) extrahiert. Nach erneutem Ausfällen der DNA wurde das Pellet in TE-Puffer aufgenommen und die Menge an erhaltener DNA bestimmt (II/8.4).

8.4 Cäsiumchlorid-Gradientenzentrifugation

Um besonders reine DNA-Mengen zu bekommen wurde eine Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation, modifiziert nach Maniatis et al. (1982), durchgeführt. Das hierbei verwendete Ethidiumbromid besitzt die Eigenschaft in die DNA-Helix zu interkalieren. Da die superhelikale Plasmid-DNA erheblich geringere Mengen Ethidiumbromid aufnimmt als chromosomale DNA und sie somit eine höhere Dichte besitzt, kommt es zu einer Trennung in unterschiedlichen Dichtebereichen des CsCl-Gradienten (Pühler et al., 1984).

Die zur Zentrifugation benötigte DNA-Probe wurde wie von Maniatis et al. (1982) beschrieben hergestellt. Zu 8 ml DNA-Lösung wurde 8 g CsCL sowie 0,8 ml Ethidiumbromidlösung (10g/l Aqua dest.) gegeben.Der Gradientenlauf wurde mit dem Rotor TI 50 in einer Beckmann Ultrazentrifuge (Typ L8-70 M) durchgeführt. Die Laufzeit betrug 36 h bei 50.000 rpm und 20°C. Anschließend wurde die DNA-Bande (chromosomale- od. Plasmid-DNA) mit einer Kanüle abgezogen und das Probevolumen bestimmt. Die Fällung erfolgte mit 2,5-facher Menge Aqua dest. und doppelter Menge abs. Ethanol (-20°C) des zuvor bestimmten Probevolumens bei 0°C mindestens 2 h. Nach Zentrifugation (Beckmann Zentrifuge J-21, 10.000 rpm, 30 min, 4°C) wurde die DNA in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, in 0,4 ml TE-Puffer (II/8.1) gelöst und zur weiteren Reinigung 3x mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1), sowie 2x mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Anschließend wurde die DNA mit 1/4 Volumenteilen 2 M LiCl-Lösung und 2 Volumenteilen abs. Ethanol (-20°C) 30 min bei 4°C gefällt, abzentrifugiert (30 min, 10.000 g, 4°C) und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Das Pellet wurde in einem geeigneten Volumen TE-Puffer aufgenommen und die DNA-Konzentration photometrisch, wie

von Maniatis et al. (1982) beschrieben, quantifiziert.

9. Techniken zur Analyse und Rekombination von DNA

9.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen

Restriktionsendonucleasen zur Spaltung von DNA wurden entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Die Verdauung isolierter DNA erfolgte, soweit nicht anders erwähnt, in 15 µl Ansätzen, welche 1,5 µl Restriktionspuffer der Firma Boehringer, 0,2 bis 1 µg Plasmid-DNA, 1 U/µg DNA Restriktionsendonuclease und Aqua dest. enthielten. Die Inkubationszeit betrug 2 h, bei Reaktionen mit 2 Enzymen 4 h. Die Inkubationstemperatur richtete sich nach dem jeweils verwendeten Enzym und wurde nach Herstellerangaben eingestellt. Um RNA in Ansätzen mit DNA, welche nicht mittels CsCl-Gradienten gereinigt war, zu entfernen, wurde DNAse-freie RNAse (20 µg/ml) eingesetzt. Die Reaktion wurde bei 65°C, 10 min, unter Zugabe von 20 mM EGTA abgestoppt.

Bei Spaltungsansätzen mit Vektor-DNA, bei welcher die 5'Phosphatgruppen abgespalten werden sollten, wurden 40 min vor Ende des Verdaus 1-2 U alkalische Phosphatase eingesetzt.

9.2 Enzymatisches Auffüllen 5'überstehender DNA-Enden

Überstehende Enden der gespaltenen DNA nach Verdau mit einem Restriktionsenzym wurden bei Bedarf enzymatisch mit Klenow-Polymerase (DNA-Polymerase I, große Untereinheit) aufgefüllt, wie von Maniatis et al. (1982) beschrieben.

9.3 Ligation

Um vor der Ligation Restriktionsendonucleasen aus der vorhergehenden Spaltung zu entfernen, wurde die DNA 1x mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol Lösung (25:24:1) und Chloroform-Isoamylalkohol Lösung (24:1) extrahiert, anschließend mit abs. Ethanol gefällt, getrocknet und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer (II/8.1) gelöst.

Die Ligation wurde mit T_4-Ligase der Firma Boehringer durchgeführt. Ein 15 µl-Ansatz enthielt gespaltenen phosphatasebehandelten Vektor und DNA im Konzentrationsverhältnis 1:3, 1,5 µl Ligationspuffer, 0,1 U T_4-Ligase und Aqua dest.. Die Ligation wurde bei Verknüpfung glatter Enden bei 15°C über Nacht, bei Verknüpfung überstehender Enden bei 22°C 6 h durchgeführt. Der Ligationsansatz konnte ohne weitere Aufarbeitung zur Transformation eingesetzt werden.

Ligationspuffer:	660 mM	Tris/HCl pH 7,5
	50 mM	$MgCl_2$
	50 mM	Dithiothreitol
	10 mM	ADP

10. Gelelektrophorese

10.1 Auftrennung nativer DNA auf Agarosegelen

Die Analyse von DNA-Fragmenten ist durch elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen gegeben. Die Herstellung der Gele und die Durchführung der Elektrophorese erfolgte nach Maniatis et al. (1982). Die Agarosekonzentration der Gele lag zwischen 0,8 und 1,5 %. Es wurden Elektrophoresrkammern der Firma BRL verwendet sowie als Spannungsquelle ein Powersupply der Firma LKB (Typ Macrodrive). Als Puffersystem diente TBE-Puffer. Das Anfärben der Gele erfolgte in einer 0,5 µg/ml enthaltenden Ethidiumbromidlösung. Mit Hilfe eines UV-Transilluminators konnten die DNA-Banden mit UV-Licht der Wellenlänge 366 nm sichtbar gemacht werden. Zur Größenbstimmung der einzelnen DNA-Fragmente wurden die Gele mit

einer Polaroidkamera unter Verwendung eines Rotfilters photographiert, das Bandenmuster mittels des Negativs auf halblogarithmisches Millimeterpapier übertragen und die Grössen der einzelnen Banden mit Hilfe eines Molekulargewichtsstandards bestimmt.

TBE-Puffer:	89 mM	Tris
	89 mM	Borsäure
	2 mM	EDTA pH 8,0

10.2 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolation von DNA-Fragmenten wurde TAE als Puffersystem verwendet.

Die Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte nach Spaltung und elektrophoretischer Auftrennung (II/10.1) der DNA. Es wurden zwei Methoden verwendet.

1. Im mit Ethidiumbromid gefärbten Gel wird unter UV-Licht in Laufrichtung vor der zu isolierenden Bande wie beschrieben (Maniatis et al., 1982) eine Geltasche geschnitten. Das Gel wird zurück in die Gelkammer gegeben und die Spannung wieder angelegt. Die in die Geltasche wandernde DNA-Bande wird mit einer Gilsenpipette abgesaugt und die Geltasche erneut mit TBE-Puffer gefüllt. Nach mehrmaliger Wiederholung ist die DNA-Bande vollständig isoliert. Anschließend wird die Lösung 1x mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol Lösung (25:24:1) und 2x mit Chloroform-Isoamylalkohol Lösung (24:1) extrahiert und die DNA mit abs. Ethanol gefällt.

2. Die gewünschte DNA-Bande wurde mit Hilfe eines Kits (GeneCleane, Firma Bio 101, California, USA) isoliert. Dabei wird die mit Ethidiumbromid angefärbte Bande unter UV-Licht aus dem Gel herausgeschnitten, 1 ml einer im Kit enthaltenen NaJ-Lösung zugegeben und zur Schmelzung der Agarose 5 min bei 55°C inkubiert. Anschließend wurden 5 µl "Glasmilk"-Lösung zugesetzt, die gefällte DNA 20 sec abzentrifugiert und 3x mit

"New"-Puffer gewaschen. Die DNA wurde mit 20 µl TE-Puffer (II/8.1) eluiert und konnte dierekt zur Ligation verwendet werden.

TAE-Puffer:	40 mM	Tris
	20 mM	Natriumacetat
	2 mM	EDTA pH 8,0

11. Hybridisierungstechnik

Diese Technik wurde dazu verwendet, bestimmte DNA-Banden in einem Agarosegel zu identifizieren.

DNA-Fragmente wurden in einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wurde das DNA-Bandenmuster auf eine Nylon Membran (Schleicher und Schuell, BA85 Membranfilter, 0,45 µm) nach der Technik von Southern (1975) übertragen. Zur Markierung und Hybridisierung wurde ein Kit von Boehringer Mannheim (DNA Labeling and Detection Kit, Nonradioactive, Boehringer Mannheim, Kat.nr. 1093657) nach Herstellerangaben benutzt. Die Markierung der Hybridisierungsprobe erfolgte mit Digoxigenin gekoppeltem dUTP. Die frisch denaturierte markierte Probe wurde mit der filtergebundenen DNA hybridisiert. Hybridisierung und Waschen der Membranen erfolgte nach Herstellerangaben. Zum Nachweis der Hybridisierung wurde eine Antikörperlösung zugegeben, wobei eine alkalische Phosphatase an die Antikörper gekoppelt war. Eine enzymkatalysierte Farbreaktion mit 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat und Nitroblau-Tetrazoliumsalz führte zu einem blauen Präzipitat an Stellen des Filters, an welchen Hybridisation stattgefunden hatte (Vogelstein, 1983). Das Ergebnis konnte durch Photographieren des Filters festgehalten werden.

12. Transposonmutagenese

Die Transposonmutagenese wurde durchgeführt nach Ubben und Schmitt (1986), um den codierenden Bereich der zu untersuchenden Gene einzugrenzen. Der verwendete *E.coli*-Donorstamm C600 pRts::Tn1725 enthielt das Transposon Tn1725 in das Plasmid pRts integriert. Das Transposon trug eine Chloramphenicolresistenz, Plasmid pRts eine Kanamycinresistenz. Kompetente Zellen des Stammes C600 wurden mit Plasmid-DNA des Plasmids pCC2-41 und pCC2-42, das eine Ap-Resistenz trägt, transformiert. Die Transformanden wurden auf LB-Platten mit Kan, Cm und Ap selektioniert, um sicherzustellen, daß das gewünschte Plasmid in dem transposontragenden Stamm C600 enthalten war. Die Transformanden wurden 7 Tage lang bei RT inkubiert, um eine Transposition des Transposons 1725 in die Plasmide pCC2-41 oder pCC2-42 zu ermöglichen. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Plasmide wieder aus *E. coli* C600 isoliert und nach Transformation in *E.coli* DH5 Zellen auf Plasmide selektioniert, welche ein Transposon trugen. Dazu wurden die Transformanden auf LB mit Ap und Cm ausplattiert. Diese Plasmide wurden isoliert und durch Restriktionsanalyse Plasmide mit Transposon-Insertionen im *C.glutamicum* DNA-Fragment ausgewählt. Diese Plasmide wurden in die ilvBN und ilvC negativen *E.coli* Selektionsstämme gebracht. Danach wurden die Transformanden dieser Stämme auf Minimalmediumplatten mit Antibiotikum ausplattiert und auf Wachstum hin untersucht, um festzustellen, ob die Transposoninsertionen die Ablesung des zu untersuchenden Gens beeinträchtigt.

III Ergebnisse

1. Klonierung der Gene der Isoleucinbiosynthese-Enzyme aus *Corynebacterium glutamicum*

1.1 Überprüfung der zur Klonierung verwendeten Stämme

Zur Klonierung der Gene der Isoleucinbiosynthese-Enzyme aus *C. glutamicum* wurde der Weg der heterologen Komplementation von *E. coli* Mutanten gewählt, da es in den letzten Jahren gelungen ist, auf diese Weise einige Aminosäurebiosynthese-Gene aus *C. glutamicum* zu isolieren (Yeh et al., 1988; O'Regan et al., 1989; Cremer, 1989). Diese Möglichkeit erlaubte die Nutzung von *E. coli* Mutanten und der für *E. coli* entwickelten host-vector Systeme. Die zur Klonierung der Gene der Isoleucinbiosynthese-Enzyme verwendeten Isoleucin-auxotrophen *E. coli* Stämme wurden auf ihre Eignung zur Komplementation und Selektion hin überprüft. Dazu wurden die Transformationsraten mit dem Vektor pBR322 und die Reversionsraten bestimmt (Tab. 6).

Tabelle 6 Bestimmung Reversionsraten- und Transformationsraten der verwendeten *E. coli* Stämme

Stamm	Defekt	Transformationsrate (Transformanden/ µg pBR322)	Reversionsrate	Referenz
JP 58	ilvC	$1x10^7$	$1x10^{-10}$	Butlin, 1975
AB 1953	ilvD	$2x10^7$	$3x10^{-8}$	Eggertson, 1965
Cu 2	ilvE	$3x10^6$	$1x10^{-8}$	McGilvary, 1974
Cu 1230	ilvE	$1x10^7$	$1x10^{-8}$	Harms, 1985
Cu 406	ilvA	$4x10^6$	$1x10^{-10}$	Smith, 1976
CGSC 5769	ilvBN, ilvGM, ilvIH	$1x10^6$	$1x10^{-7}$	Guardiola, 1974

Die niedrigen Reversionsraten zwischen 10^{-7} und 10^{-10} und die Transformationsraten mit pBR322 von 10^6 bis 10^7 zeigten die Eignung der aufgeführten Stämme zur Klonierung der Gene der Isoleucinbiosynthese-Enzyme aus *C. glutamicum*.

Da es sich im Laufe der vorliegenden Arbeit erwies, daß die ilvD *E. coli* Mutante AB 1953 nicht mit Fragmenten chromosomaler DNA aus *C. glutamicum* zu komplementieren war, wurde eine *C. glutamicum* Mutante isoliert und charakterisiert, mit der prinzipiell die homologe Komplementation mit dem kürzlich entwickelten System der Mobilisation chromosomaler Fragmente über den restriktionsnegativen *E. coli* Stamm S17-1 nach *C. glutamicum* möglich ist (Schäfer, 1989). Um eine solche Mutante zu erhalten wurde *C. glutamicum* ATCC 13032, wie von Eggeling et al. (1987) beschrieben, mit NMG mutagenisiert und Isoleucin-, Leucin- und Valin-bedürftige Mutanten isoliert. Von diesen Mutanten wurden Rohextrakte hergestellt und die spezifische Aktivität aller Isoleucinbiosynthese-Enzyme bestimmt. Die Mutante *C. glutamicum* 39/20 wies mit dem Wildtyp vergleichbare spezifische Aktivitäten der Threonindehydratase, Acetohydroxysäuresynthase, Isomeroreductase und TransaminaseB auf. Sie wies jedoch keine Dihydroxysäuredehydratase Aktivität auf, welche beim Wildtyp 0,003 U/mg Protein beträgt. Die Reversionsrate dieser Mutante mit $1x10^{-7}$ zeigte ihre Eignung zur homologen Komplementation.

1.2 Erstellung von Genbanken mit chromosomaler DNA aus *Corynebacterium glutamicum*

Zur Erstellung einer Genbank in dem restriktionsnegativen *E. coli* Stamm DH5 wurde chromosomale DNA von *C. glutamicum* partiell mit dem Restriktionsenzym Sau3A geschnitten und mit dem Vektor pBR322 ligiert, der zuvor BamHI gespalten und mit alkalischer Phosphatase behandelt worden war. Mit dem Ligationsansatz wurden kompetente Zellen von *E. coli* DH5 transformiert und die Zellen auf LB-Platten mit Ampicillin ausplattiert. Zur Überprüfung der Genbank wurden 24 kleine

Plasmidpräparationen durchgeführt und die Länge der DNA-Fragmente durch Restriktionsanalyse und Trennung im Agarosegel bestimmt. Die durchschnittliche Länge der Insertionen betrug 3,5 kb. 10% der Klone enthielten den Vektor ohne DNA-Fragment. Entsprechend der Beziehung

$$N = \frac{\ln(1-p)}{\ln(1-x/y)}$$

x : Insertionsgröße
p : Wahrscheinlichkeit
y : Größe des haploiden Genoms
N : Zahl der notwendigen Kolonien zur Abdeckung des Genoms mit einer Wahrscheinlichkeit von 99%

(Clarke und Carbon, 1976) wurde die Wahrscheinlichkeit, mit welcher die erstellte Genbank alle Gene des *C. glutamicum* Genoms enthält, bestimmt. Für das haploide Genom von *Corynebacterium glutamicum* wird eine Länge von ca. 2550 kb angegeben (Martin et al., 1987). Mit Hilfe dieser Information läßt sich berechnen, daß die pBR322-Genbank 1,2 Genomäquivalente des *C. glutamicum*-Genoms und ein bestimmtes Gen mit einer Wahrscheinlichkeit von 97% enthält.

Zusätzlich wurden Genbanken mit dem Cosmidvektor pHC79 erstellt. Der Vorteil einer Genbank mit dem Vektor pHC79 liegt darin, daß nach ligation DNA-Fragmente einer Länge von ca. 35 kb werden können (Hohn und Collins, 1980). Dies bietet die Möglichkeit, eventuell im *C. glutamicum* Genom benachbart liegende Gene gemeinsam zu klonieren.

Es wurde mit den Restriktionsenzymen Sau3A, SalI, HindIII oder BamHI verdaute und größenfraktionierte DNA verwendet. Die Fraktionierung der DNA erfolgte durch Auftrennen partiell gespaltener DNA in Agarosegelen und der Isolation von Fragmenten zwischen 20 und 50 kb aus dem Gel. Die gereinigte fraktionierte DNA wurde zur Ligation verwendet. Als Ligationsverhältnis wurden 1 Teil DNA und 3 Teile Vektor eingesetzt. Die Ligationsprodukte wurden in vitro in λ-Phagenpartikel nach Vorschrift (DNA-Packaging Kit, Kat.nr. 733806, Boehringer, Mannheim) verpackt und in den E. coli Stamm

ED 8767 durch Transduktion übertragen. Die Transduktanden wurden auf LB-Platten mit Ampicillin selektioniert und pro Infektionsansatz 10 kleine Plasmidpräparationen durchgeführt. Die Länge der DNA-Fragmente wurde durch Restriktionsverdau und Auftrennung im Agarosegel bestimmt. Daraus und aus der Zahl der erhaltenen Klone konnte die Anzahl der pro Genbank enthaltenen Genomäquivalente bestimmt werden. Alle hier beschriebenen Genbanken mit pHC79 sollten nach Clarke und Carbon (1976) ein bestimmtes Gen aus C. glutamicum mit 99%iger Wahrscheinlichkeit enthalten. In Tabelle 7 sind die Ergebnisse zu den erstellten Genbanken aufgeführt.

Tabelle 7 Genbanken mit chromosomaler DNA aus C.glutamicum in E.coli

Vektor	Restriktions-Enzym	Anzahl Klone	durchschnittliche Insertionslänge (kb)	Genom-äquivalente
pBR322	Sau3A	4000	3,5	1,2
pHC79	Sau3A	2000	36,0	7
"	BamHI	6000	25,0	10
"	HindIII	2000	38,8	7,4
"	SalI	6000	38,4	22

Mit rekombinanten Vektoren dieser Genbanken wurden die Isoleucin-auxotrophen *E. coli* Stämme transformiert, bzw., nach vorheriger erneuter Vepackung dieser Vektoren in λ-Phagenhüllen, transduziert.

1.3 Klonierung der Gene der Isoleucin-Biosynthese-Enzyme

Zur Klonierung der Gene der Isoleucin-Biosynthese-Enzyme aus *C. glutamicum* wurden Isoleucin-auxotrophe *E. coli* Stämme mit den oben genannten Genbanken transformiert bzw. transduziert. Zur Transduktion wurden die mit BamHI- und SalI-geschnittener

chromosomaler DNA aus *C. glutamicum* angefertigten Genbanken verwendet. Dazu wurde zunächst überprüft, ob die verwendeten *E. coli* Stämme durch den Phagen λ infizierbar waren. Diese Stämme wurden in MgSO4-Lösung angezogen (II/7.5) und mit einem -Phagen pro Zelle inkubiert. Zur Feststellung der entstehenden Phagenplaques wurden die *E. coli*-Zellen in Weichagar eingebettet und auf LB-Platten ausgebracht. Als Kontrolle wurde der mit dem λ-Phage infizierbare *E. coli* Stamm ED 8654 verwendet und die Anzahl Plaques pro 100 µl Phagenlysat bestimmt. Alle zuvor aufgeführten Isoleucin-auxotrophen *E. coli* Stämme konnten durch den Phagen λ infiziert werden. Zur Übertragung der Cosmide der mit BamHI- und SalI-geschnittener chromosomaler DNA aus *C. glutamicum* angefertigten Cosmid-Genbanken in die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* Stämme durch Transduktion wurden Lysate der Genbanken hergestellt (s.II, 7.5), wobei die Zellen der Genbanken mit dem Phagen λ infiziert wurden und die Cosmide wieder in λ-Phagenpartikel verpackt wurden. Nach Transduktion dieser beiden Genbanken, bzw. nach Transformation der restlichen drei in kompetente Zellen der einzelnen *E. coli* Stämme wurden Transformanden, bzw. Transduktanden, auf LB-Platten mit Ampicillin selektioniert. Pro Stamm und Genbank wurde durch je 12 kleine Plasmidpräparationen überprüft, ob die Plasmide der jeweils verwendeten Genbank repräsentativ in den entsprechenden Stämmen vorzufinden waren (Tab. 8).

Parallel dazu wurden die erhaltenen Klone auf Minimalmedium ohne Isoleucin, Leucin und Valin gestempelt. Alle dort wachsenden Klone sollten das die entsprechende Isoleucin-auxotrophe Mutante komplementierende Fragment enthalten. Auf Minimalmedium wachsende Klone wurden zunächst auf McConkey-Platten sowie auf MM-Platten ohne die für den jeweiligen Stamm notwendigen Supplemente ausgestrichen, um sicherzustellen, daß es sich um die eingesetzte *E. coli*-Mutante handelte.

Tabelle 8 Überprüfung der einzelnen Genbanken in den Isoleucin-auxotrophen *E. coli* Stämmen

Stamm	verwendete Genbank	Anzahl erhaltener Klone	durchschnittliche Insertionsgröße (kb)
JP 58	pBR322	10000	3,2
	pHC79/Sau3A	5220	35
	pHC79/SalI	4000	38,4
	pHC79/HindIII	5000	38,8
	pHC79/BamHI	10000	25
CGSC 5769	pBR322	8000	2,5
	pHC79/Sau3A	5000	24,5
	pHC79/HindIII	2000	26
AB 1953	pBR322	5000	2,5
	pHC79/Sau3A	6000	25
	pHC79/HindIII	4000	32
	pHC79/BamHI	6000	24
Cu 2	pBR322	10000	27
	pHC79/Sau3A	3000	30
	pHC79/SalI	5100	24
	pHC79/BamHI	10000	25
Cu 406	pHC79/Sau3A	3500	30

Anschließend wurden von den so selektierten Transformanden kleine Plasmidpräparationen angefertigt, die Länge des im Vektor enthaltenen DNA-Fragmentes überprüft und in den Selektionsstamm retransformiert. Dies diente dazu sicherzustellen, daß das gesuchte Gen auf dem erhaltenen Plasmid vorhanden war. Mit dieser Vorgehensweise konnten vier verschiedene Cosmide, bzw. ein Plasmid, aus sechs verschiedenen Stämmen isoliert werden (Tab. 9).

Tabelle 9 Komplementation Isoleucin-auxotropher E. coli-Mutanten mit den Plasmiden pCC1-pCC4

Stamm	Defekt	Plasmid			
		pCC1	pCC2	pCC3	pCC4
Cu 406	ilvA	-	-	-	+
CGSC 5769	ilvBN	-	+	-	-
JP 58	ilvC	+	+	-	-
AB 1953	ilvD	-	-	-	-
Cu 2	ilvE	-	-	+	-
Cu 1230	ilvE	-	-	+	-

ilvE : Gen der Transaminase B
ilvA : " Threonindehydratase
ilvBN : " Acetohydroxysäuresynthase
ilvC : " Isomeroreductase
ilvD : " Dihydroxysäuredehydratase

Aus der Genbank mit dem Vektor pBR322 wurde Plasmid pCC1 isoliert, das ein den IR⁻-*E. coli* Stamm komplementierendes 2,0 kb DNA-Fragment enthielt. Alle übrigen klonierten Gene stammten aus den Cosmid-Genbanken und wurden fortlaufend mit pCC2 bis pCC4 bezeichnet.

Cosmid pCC2 konnte ebenfalls, wie Plasmid pCC1, den Isomeroreductase-negativen *E. coli* Stamm JP 58 komplementieren. Dieses Cosmid wurde unabhängig davon auch durch Komplementation der Acetohydroxysäuresynthase-negativen *E. coli* Mutanten CGSC 5769 kloniert, was darauf hinweist, daß dieses Cosmid die genetische Information für beide Enzyme enthält. Die Länge der DNA-Insertion betrug 25,5 kb.

Cosmid pCC3 wurde durch Komplementation des Transaminase B-negativen *E. coli* Stammes Cu 2 erhalten und enthielt ein DNA-Fragment einer Länge von 25 kb. Es komplementierte ebenfalls einen weiteren verwendeten *E. coli* ilvE⁻-Stamm, Cu1230. Cosmid pCC4 wurde durch Komplementation des *E. coli* Stammes Cu

406 erhalten. Dieses Cosmid beinhaltete ein DNA-Fragment einer Länge von 35 kb. Ein die ilvD-Mutation in E. coli AB 1953 komplementierendes Fragment konnte nicht erhalten werden.

Mit den vier verschiedenen Plasmiden (pCC1 bis pCC4) wurde zunächst in die entsprechenden auxotrophen *E. coli* Stämme retransformiert, um sicherzustellen, daß die isolierten DNA-Fragmente die gesuchte genetische Information enthielten. In jedem Fall konnte nach Retransformation eine Aufhebung des Defektes der auxotophen Mutanten beobachtet werden. Anschließend wurden die in Tabelle 9 aufgeführten Isoleucin-auxotrophen *E. coli* Mutanten mit den vier verschiedenen Plasmiden transformiert, um gegebenenfalls durch benachbart liegende ilv-Gene eine Kreuzkomplementation festzustellen. Es zeigte sich, daß außer Cosmid pCC2, welche den ilvC- und ilvBN-*E. coli* Stamm komplementieren konnte, keines der übrigen Plasmide mehr als einen der Isoleucin-auxotrophen *E. coli* Stämme komplementierte.

Das Gen für die Dihydroxysäuredehydratase aus *C. glutamicum* konnte als einziges der fünf Gene der Isoleucinbiosynthese-Enzyme nicht durch Komplementation des entsprechenden *E.coli* Stammes (AB 1953) kloniert werden. Zur Überprüfung des Selektionssystems für ilvD wurde daher das *E. coli*-ilvD-Gen aus Plasmid pPU118 (Harms und Umbarger, nicht publiziert) isoliert. IlvD wurde in pUC18 ligiert und in *E. coli* AB 1953 retransformiert. Alle Transformanden konnten auf Minimalmediumplatten wachsen, was zeigt, daß diese *E. coli* Mutante prinzipiell zur Klonierung des ilvD-Gens aus *C. glutamicum* durch Komplementation geeignet ist. Da ferner repräsentative Genbanken benutzt wurden (Tab. 7), welche mit 99%ige Wahrscheinlichkeit das ilvD-Gen aus *C. glutamicum* enthalten sollten und diese Genbanken auch vollständig in den *E. coli* Stamm AB 1953 überführt wurden (Tab. 9), muß davon ausgegangen werden, daß das ilvD aus C. glutamicum in *E. coli* nicht abgelesen wird.

Als weiteres wurde versucht, über Hybridisierung mit dem aus *E. coli* isolierten ilvD-Gens gegen chromosomale *C. glutamicum*-DNA das ilvD-Gen aus *C. glutamicum* zu erhalten. Als Sonde wurde ilvD aus Plasmid pPU118 benutzt, als zu untersuchende DNA chromosomale *C. glutamicum*-DNA und DNA der Cosmide pCC2, pCC3 und pCC4. Als positive Kontrolle wurde chromosomale DNA aus *E. coli* und das isolierte ilvD-Gen aus *E. coli* aufgetragen. Die Hybridisierung erfolgte bei 68°C (Kontrolle) und unter abgeschwächten Bedingungen bei 55°C, um eine Hybridisierung zwischen Genen geringerer Sequenzhomologie zu ermöglichen. Mit diesem Experiment konnte keinerlei Signal in der chromosomalen *C. glutamicum*-DNA oder in den die Cosmid-DNA von pCC2-pCC4 enthaltenen Gelspuren beobachtet werden (Abb. 2).

Parallel wurde das ilvE-Gen aus *C. glutamicum* gegen das aus Plasmid pPU4 (McCorkle et al., 1978) isolierte SmaI/SalI ilvE-DNA-Fragment aus *E. coli* K12 hybridisiert. Auch hier war bei 55°C Hybridisationstemperatur keine Hybridisierung zwischen dem ilvE-Gen aus *C. glutamicum* und ilvE aus *E. coli* zu beobachten (Abb. 3). Dies zeigt, daß die beiden hier untersuchten *C. glutamicum*-Gene eine zu geringe Sequenzhomologie zu den entsprechenden *E. coli*-Genen besitzen, um bei Hybridisierung zu einem Signal zu führen.

Da im Verlauf dieser Arbeit eine ilvD-Mutante von *C. glutamicum* isoliert werden konnte und die Möglichkeit besteht, daß ilvD, ähnlich der Genomorganisation in *B. subtilis* (Piggot und Hoch, 1985), durch nur zwei Gene von ilvA getrennt ist, wurde untersucht, ob ilvA-enthaltende *C. glutamicum*-DNA-Fragmente die *C. glutamicum* ilvD-Mutante 39/20 komplementieren konnten. Dazu wurden DNA-Fragmente benutzt, die in den Shuttle-Vektoren pZ1 oder pJC1 (pCC4-1) vorlagen (Tab. 10).

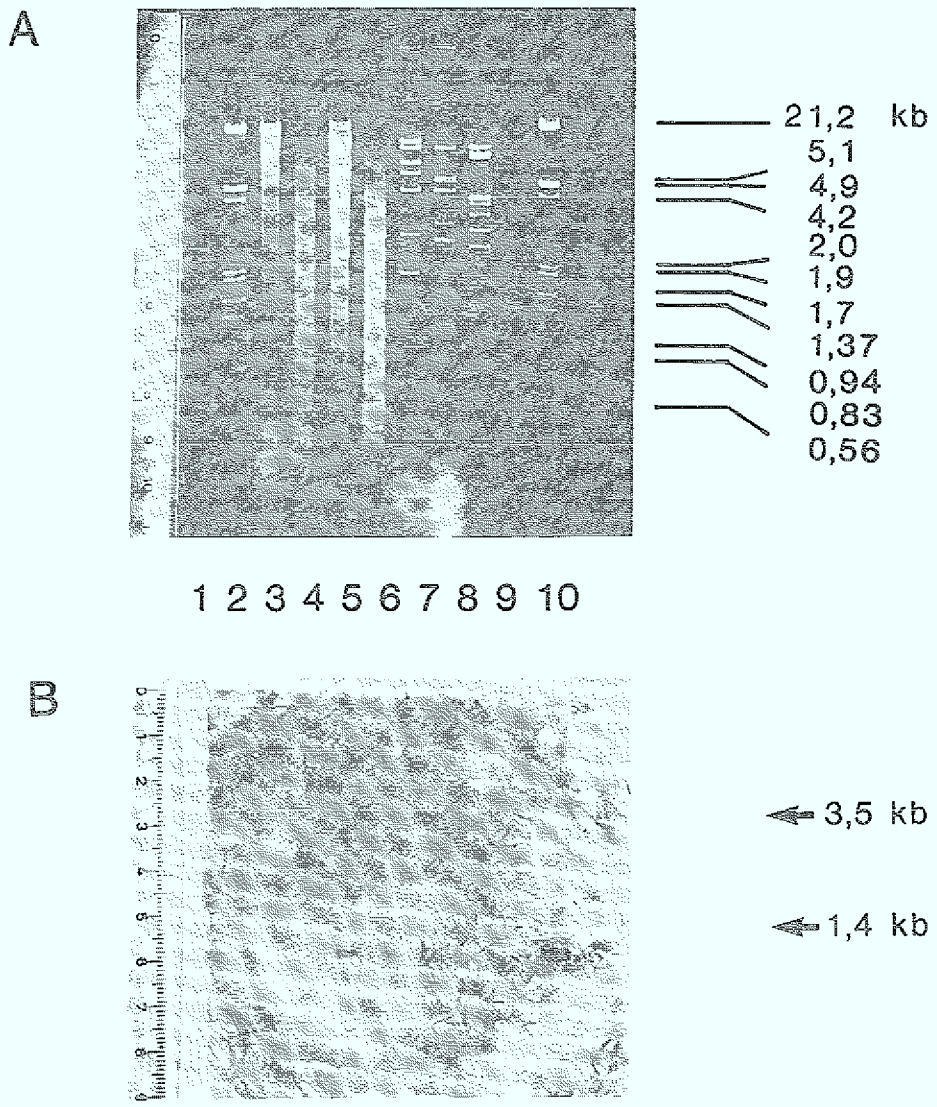


Abb. 2 Hybridisierung des ilvD-Gens aus *E. coli* gegen chromosomale DNA aus *C. glutamicum* und *E. coli*

A: Das zur Hybridisationsanalyse verwendete Gel
B: Filter der Hybridisierung
Spur 1: λ-Standard 3 (EcoRI/HindIII verdaut)
2: *E. coli* chromosomale DNA, SalI verdaut
3: *E. coli* chromosomale DNA, HindII/XhoI verdaut
4: *C. glut.* chromosomale DNA, SalI verdaut
5: *C. glut.* chromosomale DNA, verdaut
6-8: pCC4, pCC3, pCC2 SalI verdaut
9: *E. coli* ilvD-HindII/XhoI-Fragment aus pPU118 (Kontrolle)
10: λ-Standard 3

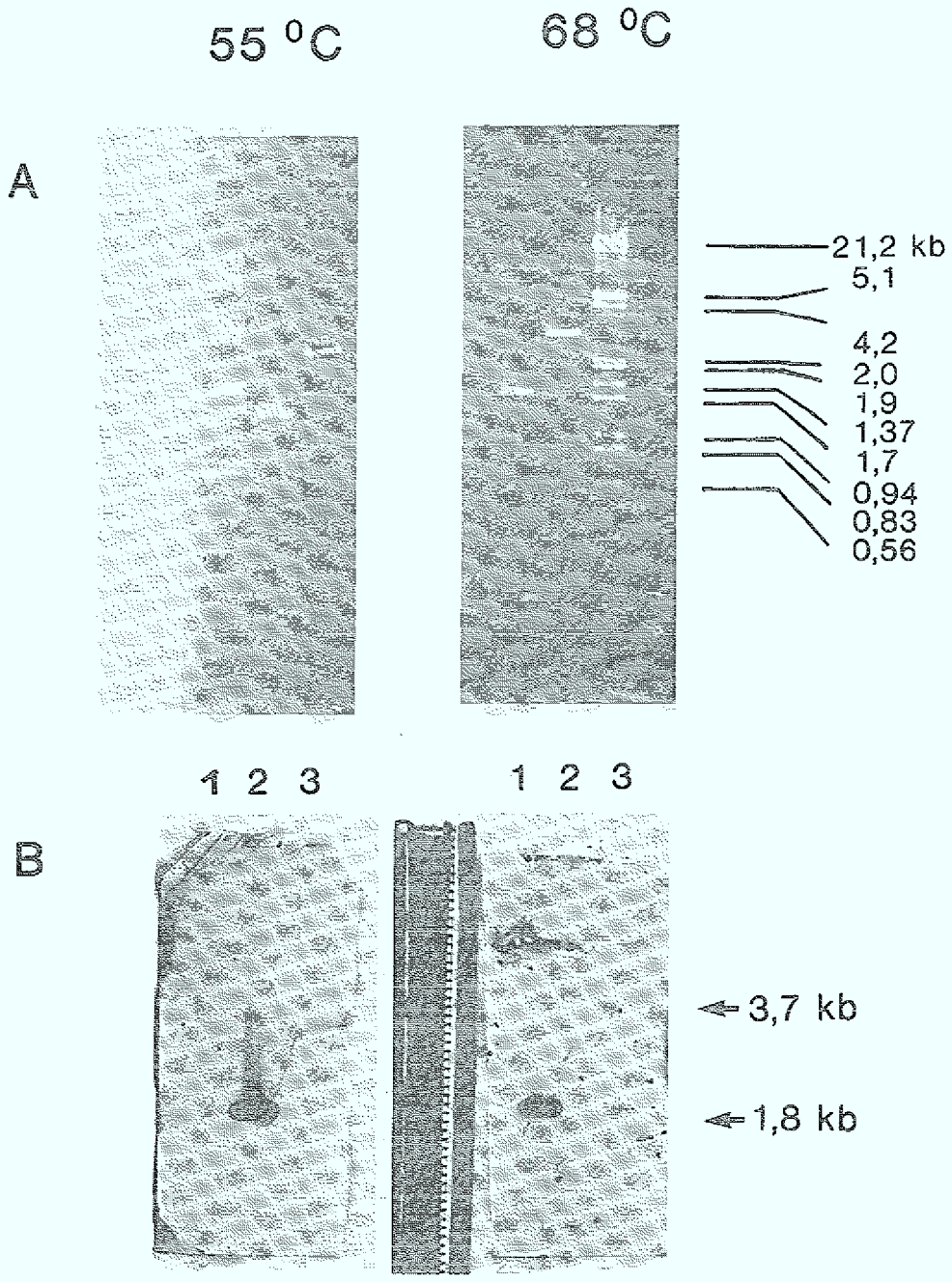


Abb. 3 Hybridisierung des ilvE-Gens aus *E. coli* gegen ilvE aus *C. glutamicum*

A: Das zur Hybridisationssanalyse verwendete Gel
B: Filter der Hybridisierung

Gel I Spur 1: λ-Standard 3 (EcoRI/HindIII verdaut)
2: ilvE-SmaI/SalI-Fragment aus *E. coli*
3: ilvE-ScaI/BglII-Fragment aus *C. glutamicum*

Gel II 1: ilvE-SmaI/SalI-Fragment aus *E. coli*
2: ilvE-ScaI/BglII-Fragment aus *C. glutamicum*
3: λ-Standard 3

Tabelle 10	Transformation von *C. glutamicum* 39/20 mit *C. glutamicum*-ilv-Genen enthaltenden Plasmiden			
Stamm	Plasmid	Größe der Insertion(kb)	Gen	Komplementation
39/20	pJC1	-	-	-
	pCC4-8	2,8	ilvA	-
	pCC4-9	2,8	ilvA	-
	pCC4-1	7,5	ilvA	-
	pCC2-44	7,5	ilvBNC	-

C. glutamicum 39/20 konnte auch mit diesen Plasmiden nicht komplementiert werden. Damit steht fest, daß die hier verwendeten Plasmide das Gen der DiHDH aus *C. glutamicum* nicht oder in unvollständiger Form enthalten.

2. Charakterisierung der Gene der Isoleucinbiosynthese-Enzyme

Zur Charakterisierung der Gene der Isoleucinbiosynthese-Enzyme erfolgten Subklonierungen der chromosomalen *C. glutamicum*-DNA-Fragmente in den *E. coli*-Vektor pUC18 unter Nutzung der verschiedenen Klonierungsstellen im Polylinker dieses Plasmids. Zum Teil wurden die DNA-Fragmente auch direkt in die *C. glutamicum*/*E. coli*-Shuttle-Vektoren pZ1 (Menkel et al., 1989) oder dessen Derivat pJC1 (Cremer, 1989) einligiert. Die verkleinerten DNA-Fragmente wurden auf ihre Fähigkeit zur Komplementation der entsprechenden *E. coli*-Mutante hin untersucht. Um sicherzustellen, daß die klonierten DNA-Fragmente aus *C. glutamicum* stammten, wurde ihre Herkunft durch Hybridisierung mit chromosomaler *C. glutamicum*- und *E. coli*-DNA überprüft.

2.1 Subklonierung, physikalische Kartierung und Hybridisierung des ilvE-Gens

Das den ilvE-*E. coli* Stamm komplementierende Cosmid pCC3 wurde mit den Restriktionsenzymen SalI, BamHI, EcoRI und HindIII vollständig verdaut. Nach Aufarbeitung wurden die resultierenden Fragmente jeweils im Verhältnis 1:3 in den entsprechend geschnittenen Vektor pUC18, bzw. pJC1 oder pZ1 ligiert. Die Ligationsansätze wurden in die ilvE-*E. coli* Stämme Cu2 oder Cu 1230 transformiert. Auf LB-Platten mit Ampicillin erhaltene Transformanden wurden auf Minimalmedium-Platten replikaplattiert. Mit allen Ansätzen, mit Ausnahme des EcoRI-Ligationsansatzes, wurde eine Vielzahl prototropher Klone erhalten, die durch kleine Plasmidpräparationen überprüft wurden. Die aus dem SalI-Ligationsansatz erhaltenen Klone enthielten ein 10 kb DNA-Fragment, die Klone des BamHI-Ligationsansatz enthielten ein 15 kb DNA-Fragment. Das kleinste komplementierende Fragment mit 4,2 kb wurde mit dem HindIII-Ligationsansatz erhalten. Zur Herstellung von Subklonen und zur Restriktionskartierung wurde dieses pCC3-1 genannte Plasmid mit der 4,2 kb DNA-Insertion im Vektor pZ1 ausgewählt. Zur Restriktionskartierung wurden folgende Restriktionsenzyme verwendet: HindIII, EcoRI, PstI, DraI, BamHI, Pvu2, SalI und ClaI. Anhand von Einfach- und Doppelverdauungen wurden die Schnittstellen im DNA-Fragment lokalisiert. Abbildung 4 zeigt ein Schema der Restriktionskarte des 4,2 kb Fragmentes aus Plasmid pCC3-1. Da anhand der Plasmide mit der 10 kb SalI- und 15 kb BamHI-Insertionen gesichert war, daß diese Schnittstellen nicht im codierenden Bereich der TAB liegen konnten, wurden zunächst Deletionsklone mit diesen beiden Enzymen angefertigt. Dazu wurden die entsprechenden DNA-Fragmente aus einem Agarosegel isoliert und nach Klenowbehandlung in die SmaI-Schnittstelle des Vektors pUC18 ligiert. Es wurden die Deletionsklone pCC3-2, pCC3-4 und pCC3-7 erhalten (Abb.4). Diese Klone waren in der Lage, die ilvE-Mutation in *E. coli* Stamm Cu 1230 zu komplementieren. Mit dieser Deletionsanalyse gelang es, den codierenden Bereich der TAB aus C. glutamicum auf 1,5 kb einzuschränken.

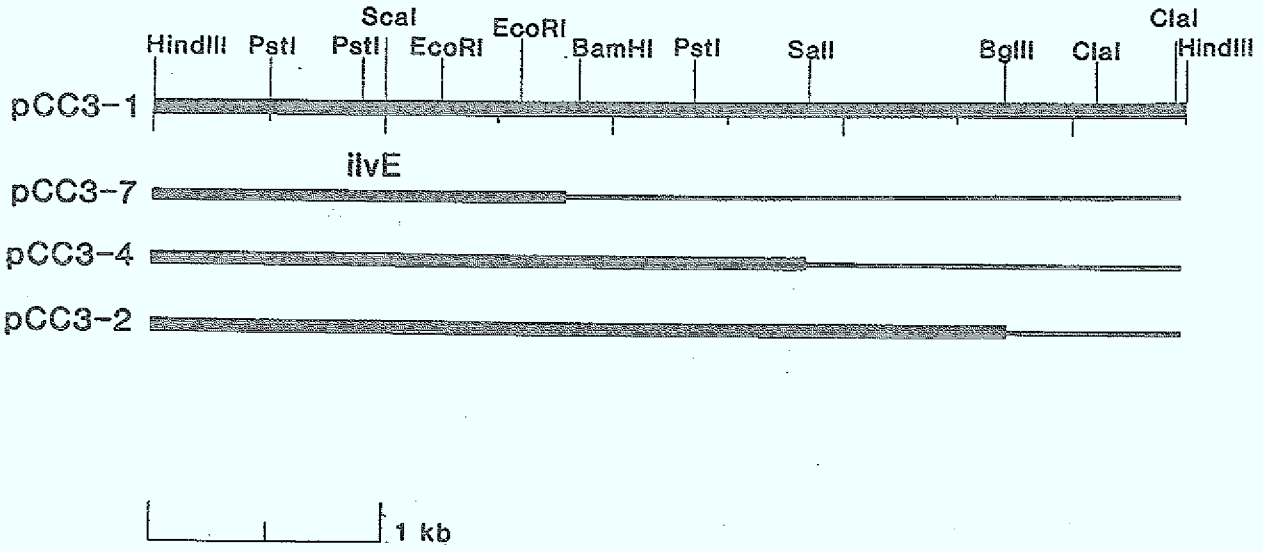


Abb. 4 Restriktionskarte und Deletionsanalyse des ilvE-Gens aus *Corynebacterium glutamicum*

pCC3-1: pZ1/ScaI mit 4,2 kb C. glut.-DNA-Fragment
pCC3-7; pCC3-4; pCC3-2 : pUC18/ScaI mit 1,7 kb; 2,8 kb und 3,7 kb *C. glut.*-DNA-Fragment

Zur Hybridisierung der TAB wurde das ScaI/BglII-Fragment aus pCC3-1 isoliert und mit Digoxigenin-markiertem dUTP markiert. Chromosomale DNA aus C.glutamicum ATCC13032 und *E. coli* DH5, sowie die Cosmide pCC2, pCC3 und pCC4 wurden mit den Restriktionsenzymen ScaI und BglII verdaut und die Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach Durchführung eines Southern-Blots wurde mit dem markierten Fragment als Sonde hybridisiert. Gel und Hybridisationsfilter sind in Abbildung 5 dargestellt. Diese Analyse beweist, daß das die Transaminase B tragende Genfragment aus *C. glutamicum* stammt und im Verlauf der Klonierung keine Umorganisation des untersuchten Fragmentes stattgefunden hat. In Spur 2, welche die chromosomale DNA aus *E. coli* enthält, war kein Signal festzustellen. Ebenfalls konnte keine Kreuzhybridisierung des markierten Fragmentes mit den Fragmenten der Cosmide pCC2 und pCC4 festgestellt werden.

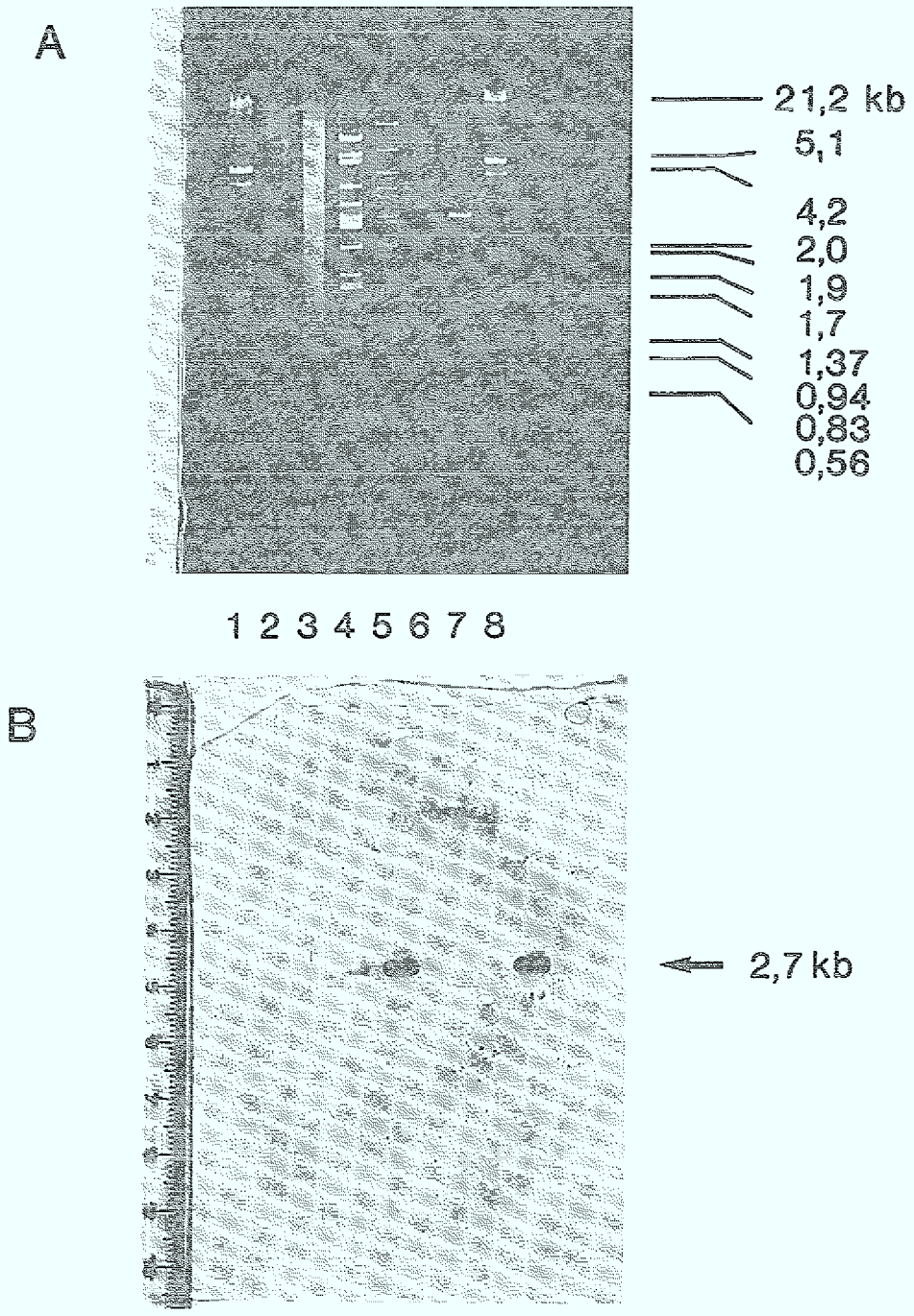


Abb. 5 Hybrisisationsanalyse des ilvE-Gens aus *C.glutamicum*

A: Das zur Hybridisationsanalyse verwendete Gel
B: Filter nach Hybridisierung
Spur 1: λ-Standard 3 (EcoRI/HindIII verdaut)
2: *E. coli* chromosomale DNA, ScaI/BglII verdaut
3: *C. glut.* chromosomale DNA, ScaI/BglII verdaut
4 - 6: pCC3; pCC4; pCC2, ScaI/BglII verdaut
7: ilvE ScaI/BglII-Fragment (Kontrolle)
8: λ-Standard 3

2.2. Subklonierung, physikalische Kartierung und Hybridisierung des ilvA-Gens

Das die Threonindehydratase tragende Cosmid pCC4 wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI geschnitten und in den *C. glutamicum/E. coli* Shuttle Vektor pJC1 ligiert. Es wurde ein Plasmid mit einer 7,5 kb-Insertion erhalten, welches pCC4-1 genannt wurde. Ausgehend von diesem Plasmid wurden mit den Restriktionsenzymen SalI (pCC4-3) und HindIII (pCC4-7) weitere Subklone mit Hilfe des Vektors pJC1 bzw. pZ1 erstellt. All diese Subklone wurden in den Tda$^-$-*E. coli* Stamm Cu 406 transformiert, um zu prüfen, ob sie diesen Stamm noch komplementieren konnten. Das die kleinste Insertion enthaltende Plasmid pCC4-7 (2,8 kb) wurde zur Erstellung einer Restriktionskarte verwendet (Abb. 6). Die dort ermittelten Schnittstellen wurden auch in pCC4-1 überprüft.

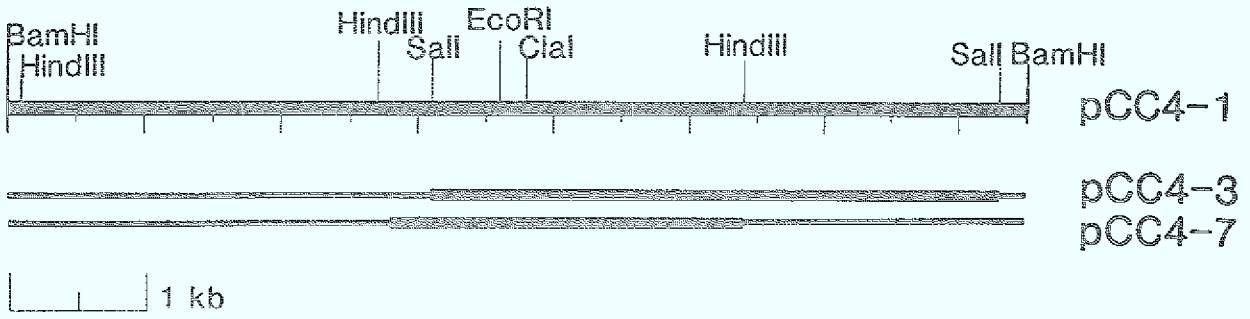


Abb. 6 Restriktionskarte und Deletionsanalyse des ilvA-Genfragmentes aus *C. glutamicum*

pCC4-1: pJC1/BamHI mit 7,5 kb C. glut. DNA-Fragment
pCC4-3: pJC1/SalI mit 4,2 kb C. glut. DNA-Fragment
pCC4-7: pJC1/SalI, Klenowbehandelt, mit 2,8 kb *C. glut.* DNA-Fragment

Die Deletionsanalyse ergab, daß sich die codierende Region des ilvA-Gens auf einem 2,1 kb SalI/HindIII DNA-Fragment befindet.

Das 2,8 kb HindIII-Fragment aus pCC4-7 wurde isoliert und zur Hybridisierung markiert. Die chromosomale DNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 und *E.coli* DH5, sowie die Cosmide pCC2, pCC3, pCC4 und Plasmid pCC4-7 wurden mit Restriktionsenzym HindIII und im Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen HindIII und ClaI geschnitten. Bei Hybridisation wurden ein 2,9 kb Fragment bzw. ein 1,7 kb- und 1,2 kb-Fragment erwartet. Wie Abbildung 7 zeigt, treten diese drei Fragmente auf. Dies beweist, daß das ilvA-Genfragment in pCC4-7 aus *C. glutamicum* stammt. Eine Hybridisierung dieses Fragmentes mit chromosomaler DNA aus *E. coli* und den Cosmiden pCC2 und pCC3 in Gelspur 6 und 7 war nicht zu beobachten (Abb. 7).

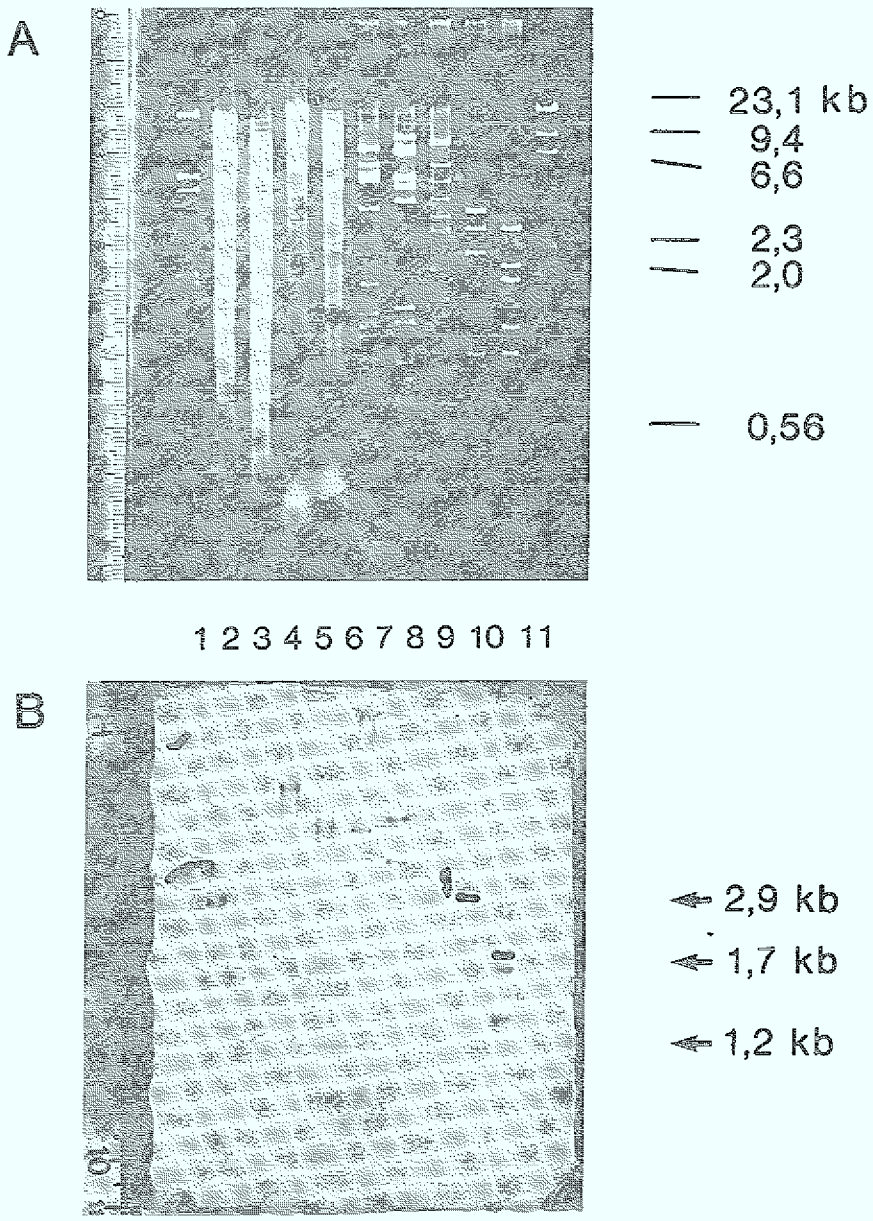


Abb. 7 Hybridisationsanalyse des ilvA tragenden Genfragmentes aus *C. glutamicum*

A: Das zur Hybridisation verwendete Gel
B: Filter der Hybridisierung
Spur 1: λ-Standard 3 (EcoRI/HindIII verdaut)
2: *C. glut.* chromosomale DNA HindIII verdaut
3: *C. glut.* chromosomale DNA HindIII/ClaI verdaut
4: *E. coli* chromosomale DNA HindIII verdaut
5: *E. coli* chromosomale DNA HindIII/ClaI verdaut
6-8: pCC2; pCC3; pCC4, HindIII verdaut
9: ilvA-Fragment in pJC1-7, HindIII (Kontrolle)
10: ilvA-Fragment in pJC1-7, HindIII/ClaI (Kontrolle)
11: λ-Standard 2, HindIII verdaut

2.3 Analyse des ilvBNC-Clusters

2.3.1. Subklonierung, physikalische Kartierung und Hybridisierung des ilvBNC-Clusters

Die Klonierung des IR-Gens und des AHAS-Gens aus *C. glutamicum* ATCC 13032 erfolgte parallel durch Komplementation der entsprechenden Isoleucin-auxotrophen *E. coli* Stämme. Bei Vergleich des Restriktionsmusters zeigte sich, daß die beiden so erhaltenen Cosmide identisch waren. Dieses pCC2 genannte Cosmid wurde mit den Restriktionsenzymen SalI, BamHI, EcoRI und HindIII vollständig verdaut und die Fragmente in den entsprechend geschnitten *E. coli*-Vektor pUC18 ligiert. Die Ligationsansätze wurden sowohl in kompetente Zellen des IR^--, als auch des $AHAS^-$-*E. coli* Stammes transformiert. Lediglich aus dem mit HindIII geschnittener DNA hergestellten Ligationsansatz wurde nach Transformation in kompetente Zellen der *E. coli* Stämme JP 58 und CGSC 5769 ein 7,5 kb Fragment enthaltendes Plasmid erhalten, welches die Mutation beider Stämme komplementieren konnte. Dies beweist, daß die Gene der IR und AHAS im *C. glutamicum* Genom eng benachbart vorliegen. Das 7,5 kb Fragment wurde in beiden Orientierungen in pUC18 isoliert (pCC2-41, pCC2-42). Die Restriktionskarte wurde mit folgenden Restriktionsenzymen erstellt: HindIII, SalI, EcoRI, PstI, ClaI, SphI, DraI, PvuI, NcoI, BstEII, EcoRV und KpnI. Abbildung 8 zeigt ein Schema der Restriktionskarte. Unabhängig von Cosmid pCC2 war zuvor das Plasmid pCC1, welches ebenfalls die ilvC-Mutation des *E. coli* Stammes JP 58 komplementieren konnte, isoliert worden. Eine Restriktionskarte des 2,0 kb C. glutamicum DNA-Fragmentes war mit den Restriktionsenzymen NcoI, PvuII, SalI, ClaI EcoRV, DraI SalI, BstEII, SphI und StuI angefertigt worden. Anhand der Information dieser physikalischen Karte konnte dieses Gen auf dem 7,5 kb Fragment durch Vergleich der Schnittstellen beider Fragmente miteinander lokalisiert werden (Abb. 9). In Abbildung 9 ist zur Orientierung bereits ilvBN mit eingezeichnet.

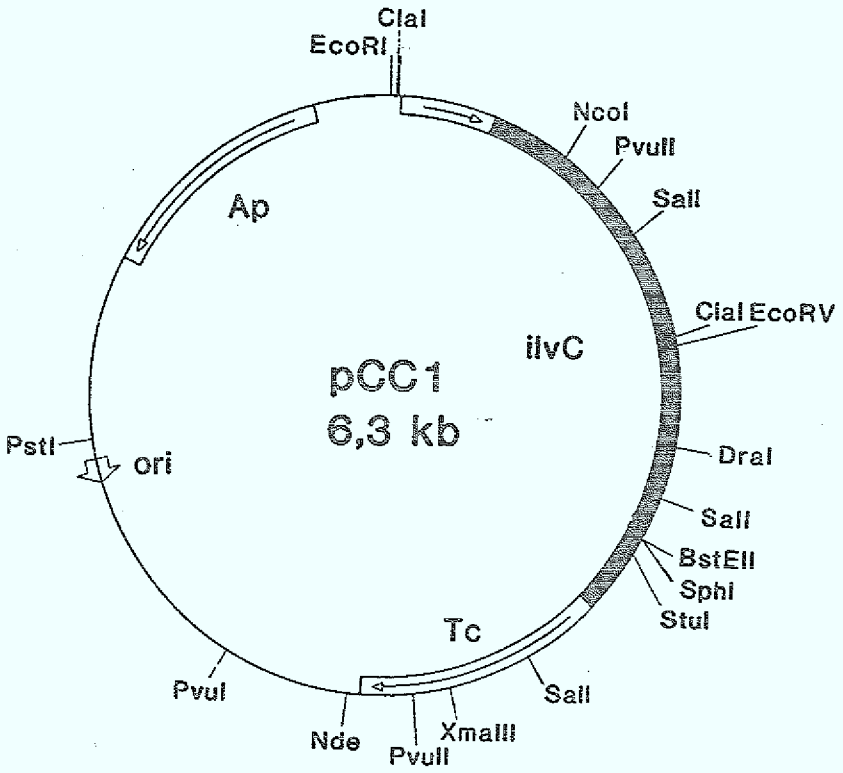


Abb. 8 Restriktionskarte des ilvC-Gens aus *C. glutamicum*

Schwarz markiertes Fragment: *C glut.* 2,8 kb DNA-Fragment einligiert in den Vektor pBR322

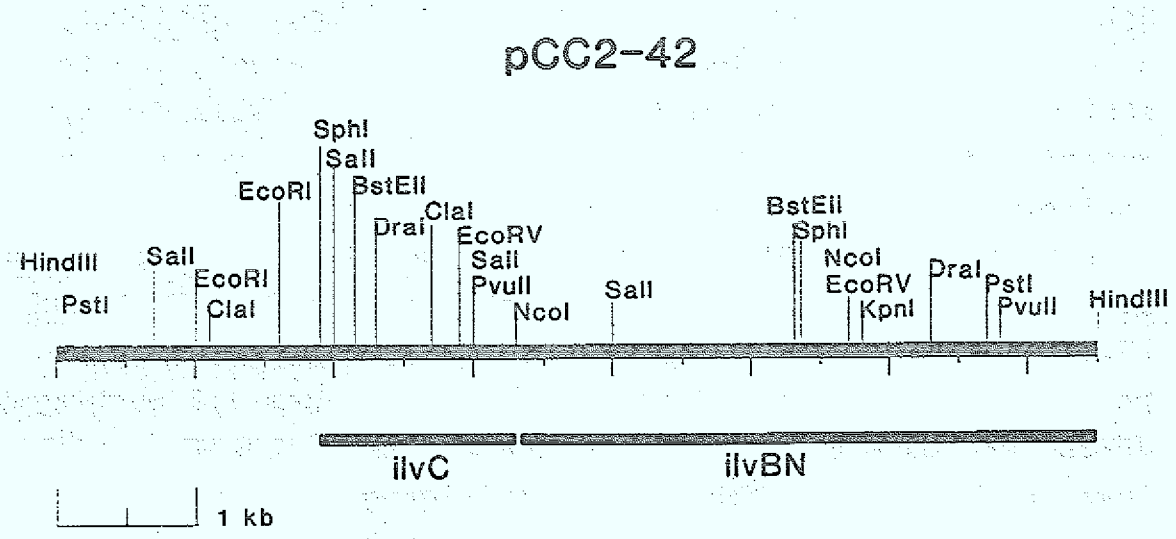


Abb. 9 Restriktionskarte des 7,5 kb ilvBNC-DNA-Fragmentes aus *C. glutamicum*

Das Fragment ist in beiden Orientierungen einligiert in den Vektor pUC18

Zur Überprüfung des in Plasmid pCC2-42 enthaltenen 7,5 kb-Fragment wurde anschließend eine Hybridisierung durchgeführt. Das 4,0 kb-DraI-Fragment, welches sowohl das Gen der IR als auch dasjenige der AHAS enthält, wurde als Sonde isoliert und markiert. Chromosomale DNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 und *E. coli* DH5, sowie die Cosmide pCC2 - pCC4 und pCC2-42 wurden mit dem Restriktionsenzym DraI geschnitten. Ebenfalls wurde ein Doppelverdau mit DraI und SalI durchgeführt. Bei Verdau mit DraI wurde ein 4,0-kb DNA-Fragment erwartet, mit DraI und SalI ein 1,0-kb, 0,7-kb und 2,3-kb DNA-Fragment. Abbildung 10 zeigt, daß das untersuchte Fragment aus *C. glutamicum* stammt und identisch ist mit den entsprechenden Genombereichen. Es trat keine Hybridisierung mit chromosomaler DNA aus *E. coli* und den in Gelspur 7 und 8 aufgetragenen Cosmiden pCC3 und pCC4 auf.

2.3.2 Deletionsanalyse des ilvBNC-Clusters

Zur Bestimmung der Lage der Gene der AHAS und IR im 7,5 kb-DNA-Fragment des Pasmids pCC2-42, bzw. pCC2-41 und zur Eingrenzung der codierenden Genbereiche wurde eine Deletionsanalyse durchgeführt. Dazu wurden verschiedenen Bereiche der 7,5 kb-Insertion deletiert und eine Religation der geschnittenen DNA durchgeführt. Die erhaltenen Ligationsansätze wurden in kompetente Zellen des IR^-- und des $AHAS^-$-*E. coli* Stammes transformiert und zur Überprüfung der entsprechenden Genaktivitäten auf MM-Platten mit Ampicillin ausplattiert. Lediglich mit Plasmid pCC2-50, in welchem ein Teil des die IR codierenden Genbereichs deletiert war, konnte der AHAS- *E. coli* Stamm komplementiert werden, nicht jedoch mit den Subklonen pCC2-45 bis pCC2-48, welche DNA-Bereiche vor dem ilvC-Gen enthielten (Abb.11). Diese Ergebnisse ließen die Schlußfolgerung zu, daß das AHAS-Gen direkt neben dem Gen der IR lokalisiert ist. Mit dieser Analyse konnte der Genbereich, der zur Codierung eines aktiven AHAS-Proteins benötigt wurde, auf ein ca. 4 kb Fragment eingeschränkt werden. Zur weiteren Eingrenzung des die AHAS und IR codierenden Genbereiches wurde anschließend eine Transposonmutagenese durchgeführt.

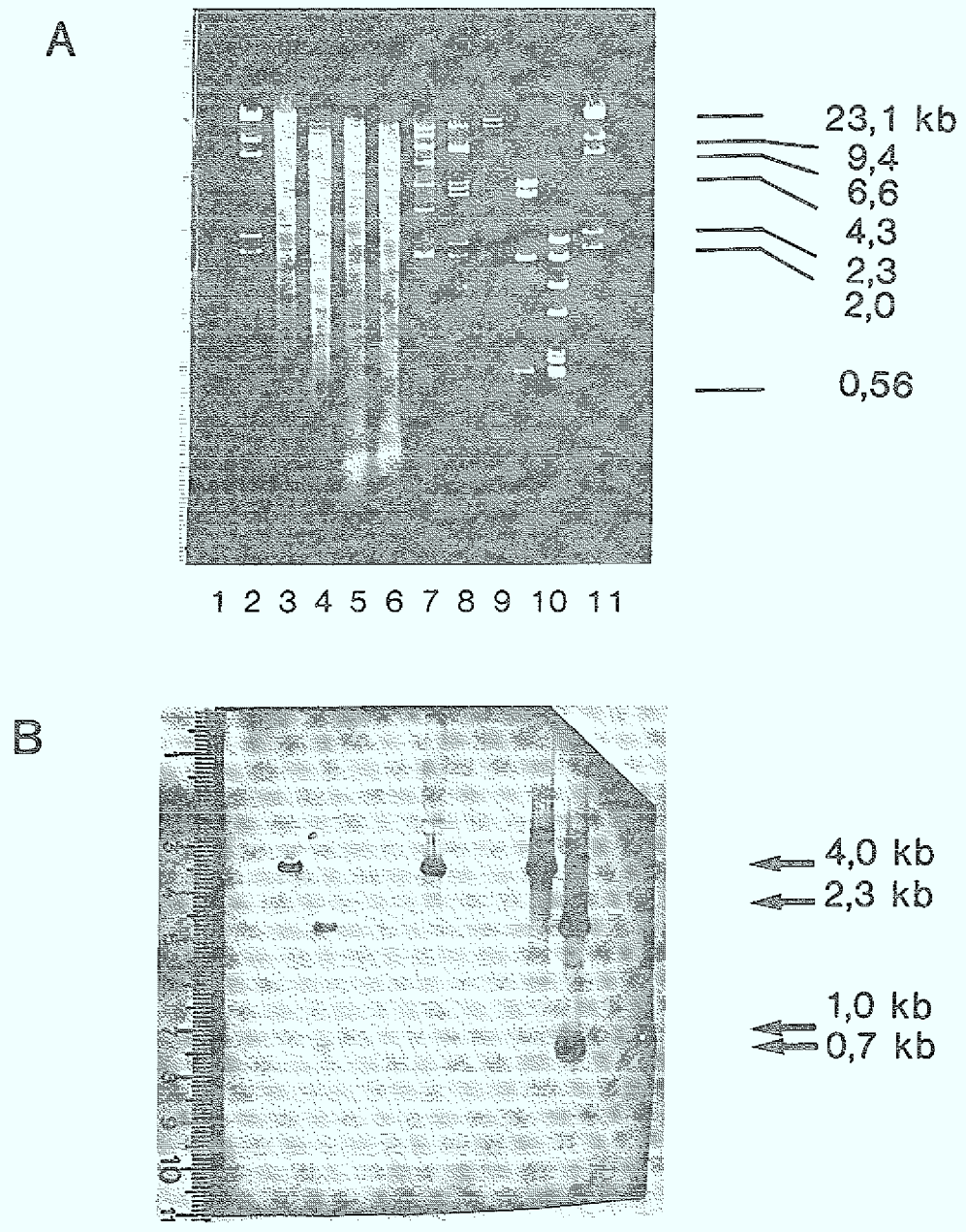


Abb. 10 Hybridisationsanalyse des <u>ilvBNC</u> Clusters aus *C. glutamicum*

A: Das zur Hybridisation verwendete Gel
B: Filter der Hybridisation
Spur 1: λ-Standard 2, HindIII verdaut
2: *C. glut.* chromosomale DNA, DraI verdaut
3: *C. glut.* chromosomale DNA, DraI/SalI verdaut
4: *E. coli* chromosomale DNA, DraI verdaut
5: *E. coli* chromosomale DNA, DraI/SalI verdaut
6-8: pCC2; pCC3; pCC4, DraI verdaut
9: pCC2-42 DraI verdaut (Kontrolle)
10: pCC2-42 DraI/SalI verdaut (Kontrolle)
11: λ-Standard 2

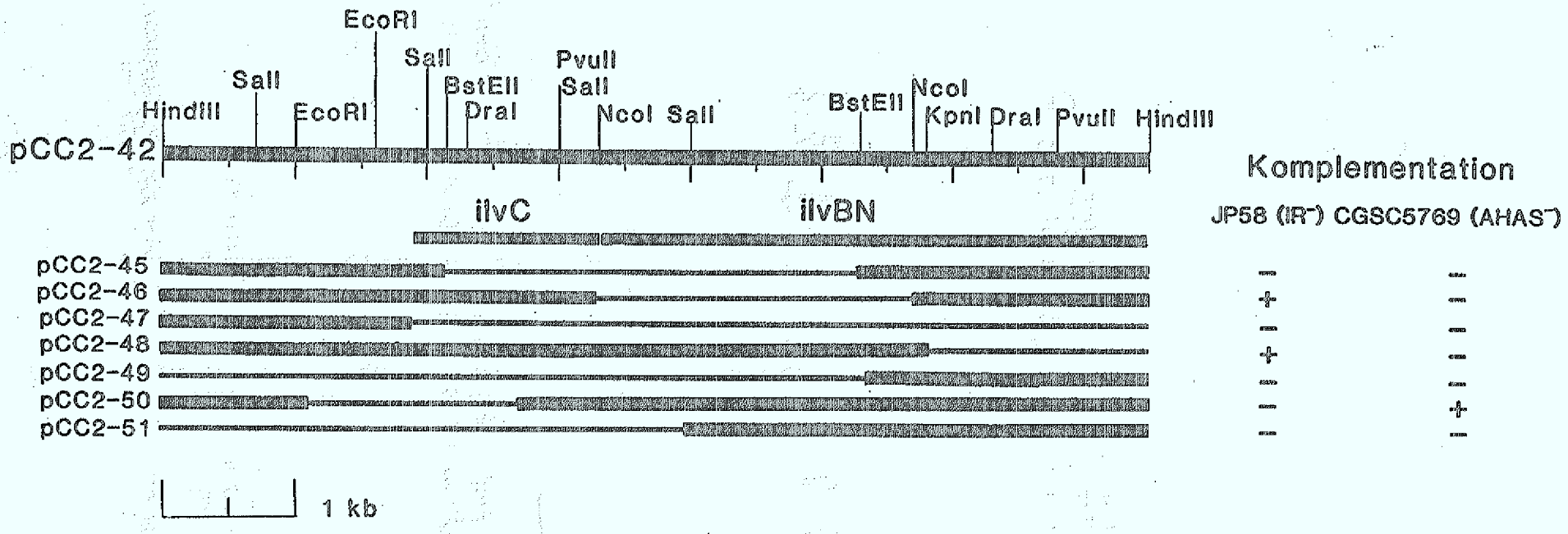


Abb. 11 Deletionsanalyse des 7,5 kb *C. glutamicum* ilvBNC-DNA-Fragentes

pCC2-45 bis pCC2-51: erhaltene Deletionsklone; dünne Linie: deletierte Bereiche
verwendeter Vektor: pUC18
+ Wachstum der auxotrophen *E. coli*-Stämme auf Minimalmedium
- kein Wachstum der auxotrophen *E. coli*-Stämme auf Minimalmedium

2.3.3 Transposonmutagenese

Das Plasmid pCC2-42 wurde in den *E. coli* Stamm C600 pRts::Tn1725 transformiert, welcher das Transposon 1725 mit einer Cm-Resistenz trug. Nach 7-tägiger Inkubation, in welchen Transposition stattfand, wurde die Plasmide isoliert und anschließend in kompetente Zellen der Stämme JP 58 und CGSC 5769 transformiert, um durch Ausplattieren auf LB-Platten mit Chloramphenicol und Ampicillin Klone mit Transposon-tragenden

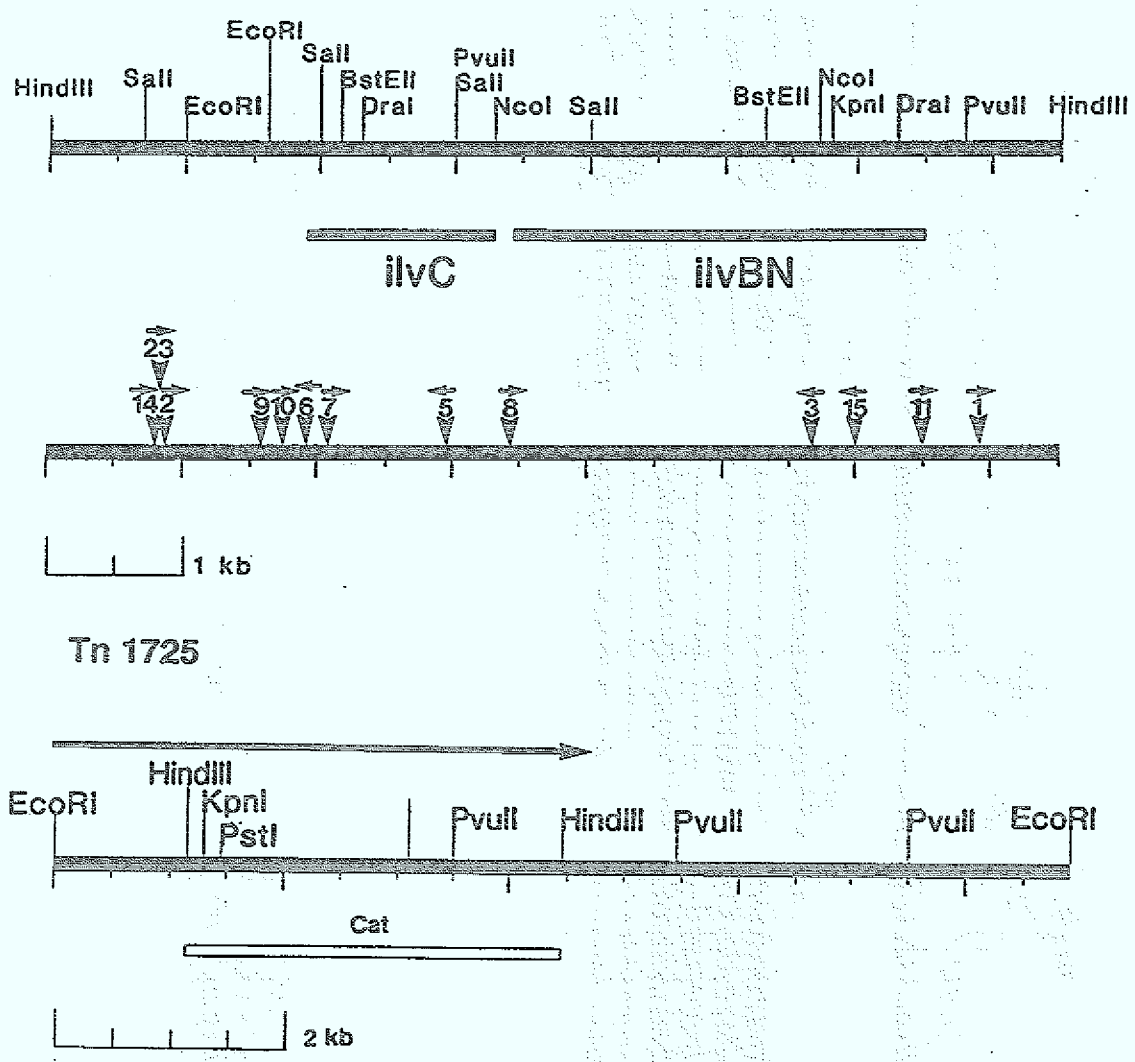


Abb. 12 Transposonmutagenese des 7,5 kb HindIII DNA-Fragmentes aus *C. glutamicum*

: Insertionen des Tn1725, Pfeile geben dessen Orientierung im *C. glut.* DNA-Fragment an

Vektoren zu selektionieren. Zur Überprüfung der Genaktivitäten wurden diese Klone parallel auf MM-Platten mit Ampicillin und Chloramphenicol ausgestrichen. Die Transposon-tragenden Plasmide wurden isoliert und die Position der Transposoninsertionen im 7,5 kb *C. glutamicum* DNA-Fragment durch Restriktionsanalysen bestimmt. Abbildung 12 zeigt, daß sich vor allem im Bereich der EcoRI-Schnittstellen Transposoninsertionen fanden. Dies ist damit zu erklären, daß Tn1725 an beiden Enden eine EcoRI-Schnittstellen besitzt und es daher bevorzugt zu Insertionen in der Nähe dieser Schnittstellen kommt.

Zur weiteren Eingrenzung der codierenden Bereiche der ilvC- und ilvBN-Gene wurden ausgewählte Transposon-tragende Derivate des Plasmids pCC2-42 verwendet. Diese Plasmide wurden in kompetente Zellen der IR⁻- und AHAS⁻-*E. coli* Stämme transformiert und die Transformanden auf Komplementation hin überprüft (Tab. 11). Auf diese Weise konnte der die IR codierende Genbereich auf 1,2 kb, derjenige der AHAS auf ca. 3,0 kb eingeschränkt werden (Abb. 12).

Tabelle 11 Transposonmutagenese des Subklons pCC2-42

Transposon1725-Insertion	Komplementation	
	JP58(IR-)	CGSC5769(AHAS-)
1	+	+
5	-	+
6	+	+
7	+	+
8	-	+
11	+	+
15	+	-
Deletionsderivate		
5-1 (pCC2-A3)	-	-
7-1 (pCC2-A1)	+	+
8-1 (pCC2-A2)	-	+

Da Tn1725 an beiden Enden eine EcoRI Schnittstelle trägt, war es weiterhin durch die Transposonmutagenese möglich, neue EcoRI Schnittstellen in das 7,5 kb *C. glutamicum* DNA-Fragment einzuführen. So wurde mit Hilfe der Insertion 8 (s. Abb.12) durch die an den Enden des Tn zur Verfügung stehenden EcoRI-Schnittstellen ein Vektor gebildet, der den die IR codierenden Genbereich nicht mehr enthielt. Mit diesem Vektor pCC2-A2 (Abb.13) konnte der AHAS-*E. coli* Stamm CGSC 5769 komplementiert werden. Somit stand ein Vektor zur Verfügung, der nur ilvBN enthielt und mit welchem unabhängig von ilvC der ilvBN-Genbereich in *E. coli* exprimiert werden konnte.

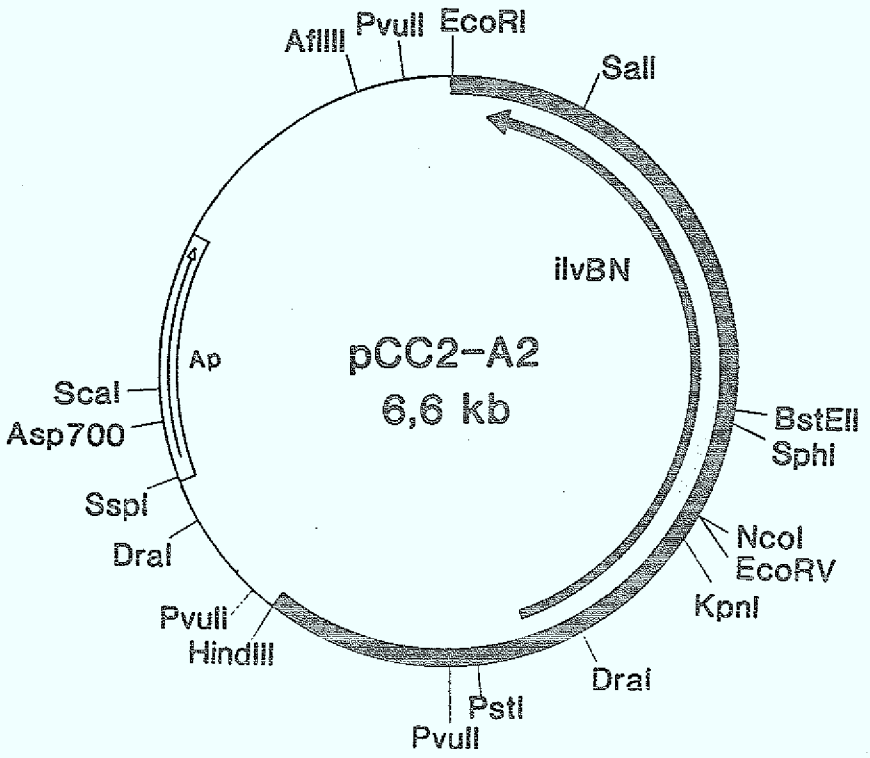


Abb. 13 Plasmid pCC2-A2

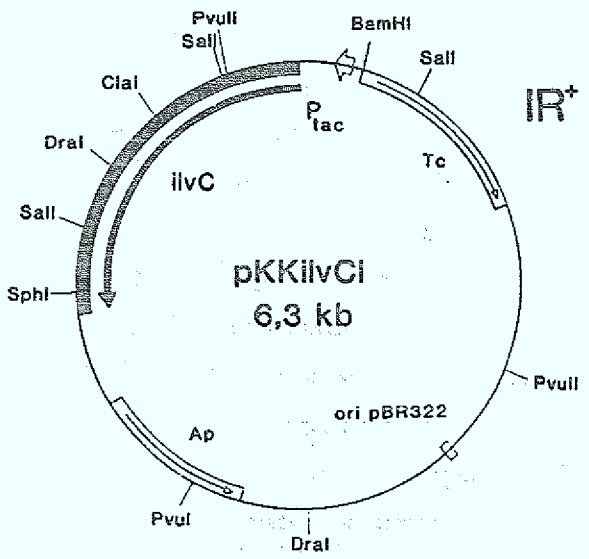
schwarz markiertes Fragment: *C. glut.* DNA-Fragment; verwendeter Vektor: pUC18

2.3.4 Bestimmung der Leserichtung

Zur Bestimmung der Leserichtung des ilvBN und ilvC-Gens wurden beide Gene getrennt voneinander in einen Expressionsvektor ligiert. Dazu wurde das das ilvBN-Gen enthaltende PvuII-Fragment und das das ilvC enthaltende NcoI/SphI-Fragment aus Plasmid pCC2-42 isoliert und in den dazu geeigneten *E. coli*-Expressionsvektor pKK223-3 (Brosius und Holy, 1984) ligiert. Da *C. glutamicum*-Expressionsvektoren bis vor kurzem noch nicht zur Verfügung standen (Eikmanns, Tolouse, 1989), wurde der gut charakterisierte *E. coli*-Expressionsvektor pKK223-3 verwendet, um in *E. coli* DH5 die Leserichtung der Gene zu bestimmen. Das käufliche Plasmid pKK223-3 enthält außer dem starken künstlichen tac-Promotor die starken Terminatoren des für die ribosomale RNA codierenden rrnB Gens aus *E. coli* (Brosius und Holy, 1984). Zur Umklonierung wurde das StuI/NcoI ilvC enthaltende DNA-Fragment und das PvuII ilvBN enthaltende DNA-Fragment verwendet und in die SmaI Schnittstelle des pKK223-3 Polylinkers einligiert. Mit den Ligationsansätzen wurde *E. coli* DH5 transformiert. Durch Plasmidpräparationen wurden die beiden möglichen Orientierungen (I oder II) der einligierten Fragmente überprüft. Zur Überprüfung der Expression der untersuchten Gene wurden die Plasmide der Orientierung I (pKKilvCI) und II (pKKilvCII) in kompetente Zellen des IR^--*E. coli* Stammes JP 58 und entsprechend pKKilvBNI und pKKilvBNII in kompetente Zellen des *E. coli* Stammes CGSC 5769 transformiert. Die Transformanden wurden auf MM-Platten mit AP ausplattiert. Parallel wurde die Enzymaktivität der AHAS und IR in den entsprechenden rekombinanten Stämmen bestimmt (Tab. 12). Dazu wurden die Stämme in Minimalmedium angezogen. Beide Versuche zeigten übereinstimmend das Ergebnis, daß die Gene im Plasmid mit der Orientierung I der Fragmente, also pKKilvCI und pKKilvBNI, abgelesen werden. Gleichzeitig zeigte dieses Experiment, daß die ilvBN- und ilvC-Gene in gleicher Richtung abgelesen werden und somit die Leserichtung vom ilvBN-Gen zum ilvC-Gen führt (Abb.14).

Tabelle 12 Bestimmung der Leserichtung des ilvBN- und ilvC-Gens aus *C. glutamicum* mit dem Expressionsvektor pKK223-3

Stamm	Plasmid	Wachstum auf MM-Platten	spez. Enzymaktivität AHAS(U/mg)	IR(U/mg)
CGSC 5769	pKK223-3	-	0,00	n.b.
CGSC 5769	pKKilvBNI	+	0,05	n.b.
CGSC 5769	pKKilvBNII	-	0,00	n.b.
JP 58	pKK223-3	-	n.b.	0,00
JP 58	pKKilvCI	+	n.b.	0,25
JP 58	pKKilvCII	-	n.b.	0,00



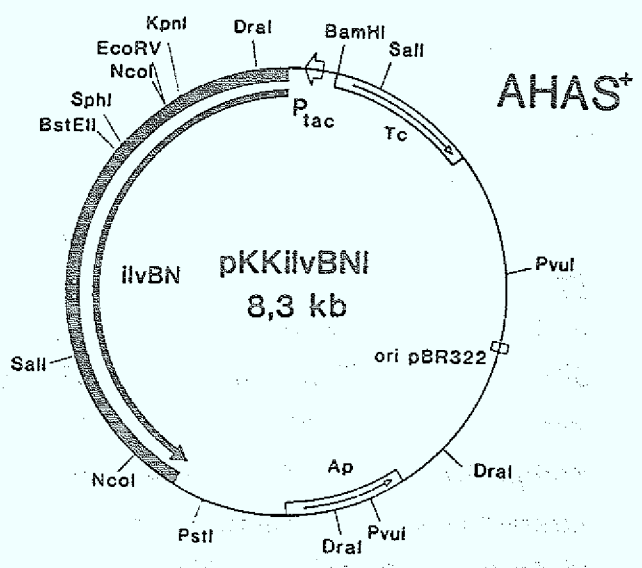


Abb. 14 Leserichtungsbestimmung der ilvBN- und ilvC-Gene

abgebildet sind die Orientierungen der *C. glut.* DNA-Fragmente (schwarz markiert), in welchen starke Expression stattfand

2.4 Expression der Isoleucinbiosynthese-Gene in *E. coli*

Als Kriterium für die erfolgreiche Klonierung der Gene der Isoleucinbiosynthese-Enzyme aus *C. glutamicum* in *E. coli* war die Komplementation auxotropher *E. coli* Mutanten durch die isolierten Genomfragmente getestet worden. In den komplementierten *E. coli* Mutanten sollten sich daher die durch die amplifizierten Gene codierten Enzyme nachweisen lassen. Daher wurde die spezifische Aktivität dieser Enzyme in den zur Klonierung verwendeten *E. coli* Stämmen gemessen. Es wurden die Aktivität in Stämmen, die das Cosmid enthielten und in Stämmen die einen Subklon enthielten, bestimmt. Die Stämme wurden 15 h in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angezogen und anschließend MM-Medium mit Antibiotikum mit gewaschenen Zellen beimpft, so daß eine Ausgangs-OD_{600} von 0,1 vorlag. In der exponentiellen Phase (OD_{600} 1 bis 2) wurden die Zellen nach Zentrifugation aufgeschlossen und die spezifischen Aktivitäten der Enzyme bestimmt. Als Kontrollen wurden jeweils der entsprechende *E. coli* Stamm mit Vektor ohne inseriertes Fragment und *E. coli* DH5, dessen chromosomal codierten Isoleucinbiosynthese-Enzyme gemessen wurden, verwendet. Bei Messung der AHAS in *E. coli* DH5 muß berücksichtigt werden, daß hier alle drei Isoenzyme vorliegen und die Gesamtaktivität dieser Enzyme bestimmt wurde. Um einen Vergleich der spezifischen Aktivität der in *E. coli* klonierten Isoleucinbiosynthese-Enzyme mit den chromosomal codierten Enzymen aus *C. glutamicum* zu ermöglichen, wurden die Enzymaktivitäten in *C. glutamicum* ATCC 13032 bestimmt (Tab. 13).

Tabelle 13 Spezifische Enzymaktivitäten von Genen der Isoleucinbiosynthese-Enzyme in verschiedenen Plasmiden in *E. coli* im Vergleich zu *E. coli* DH5 und *C. glutamicum* ATCC 13032

Stamm	Plasmid	inseriertes Gen	spez. Aktivität des Enzyms	
			plasmid-codiert	chromosomal-codiert
E. coli CGSC 5769	pHC79	-	-	0,000
E. coli CGSC 5769	pCC2	ilvBN	0,007	-
E. coli CGSC 5769	pUC18	-	-	0,000
E. coli CGSC 5769	pCC2-A2	ilvBN	0,014	-
E. coli DH5	-	-	-	0,10
C. glut. ATCC 13032	-	-	-	0,05
E. coli JP 58	pHC79	-	-	0,000
E. coli JP 58	pCC2	ilvC	0,065	-
E. coli JP 58	pBR322	-	-	0,000
E. coli JP 58	pCC1	ilvC	0,070	-
E. coli DH5	-	-	-	0,021
C. glut. ATCC 13032	-	-	-	0,10
E. coli Cu2	pHC79	-	-	0,000
E. coli Cu2	pCC3	ilvE	0,0012	-
E. coli Cu2	pUC18	-	-	0,000
E. coli Cu2	pCC3-1	ilvE	0,007	-
E. coli DH5	-	-	-	0,05
C. glut. ATCC 13032	-	-	-	0,06
E. coli Cu 406	pHC79	-	-	0,000
E. coli Cu 406	pCC4	ilvA	0,003	-
E. coli DH5	-	-	-	0,07
C. glut. ATCC 13032	-	-	-	0,013

Die Tabelle 13 zeigt, daß die Enzymaktivitäten der in *E. coli* klonierten Gene derIsoleucinbiosynthese-Enzyme aus *C. glutamicum* in jedem Fall nachgewiesen werden konnten. Die Expression der Gene aus *C. glutamicum* in *E. coli* war geringer, als die der chromosomal codierten Enzyme aus *C. glutamicum*. Die spezifische Aktivität der IR war um den Faktor 2, der AHAS um einen Faktor 7 und der Tda um den Faktor 4 geringer. Die spezifische Aktivität der TAB lag, abhängig vom verwendeten Vektor, im Vektor pHC79 um den Faktor 50 niedriger, im Vektor pUC18 um den Faktor 10 niedriger. Mit Ausnahme der spezifischen Aktivität der IR, die um den Faktor 3 höher lag, waren die spezifischen Aktivitäten der übrigen *C. glutamicum* Gene der Isoleucinbiosynthese-Enzyme in *E. coli* niedriger, als die spezifische Aktivität der in *E. coli* DH5 chromosomal codierten Enzyme.

3 Expression der Gene der Isoleucinbiosynthese-Enzyme in *Corynebacterium glutamicum*

3.1 Klonierung in den *E.coli/C.glutamicum* Shuttle Vektor pZ1

Zur Expression der Gene der Isoleucinbiosynthese-Enzyme in *C. glutamicum* war es erforderlich, die subklonierten DNA-Fragmente in einen *E. coli/C. glutamicum* Shuttle Vektor umzuklonieren, der neben einem *E. coli*- einen *C. glutamicum*-Replikationsursprung enthält. Verwendet wurde der Vektor pZ1 (Menkel et al., 1989).

Zur Umklonierung des Gens der Threonindehydratase in pZ1 wurde das 2,8 kb HindIII-Fragment aus dem Subklon pCC4-7 verwendet und nach Klenow-Behandlung in mit ScaI geschnittenen pZ1 ligiert. Beide Orientierungen des Fragmentes wurden erhalten, die entsprechenden Plasmide (pCC4-8, pCC4-9) in kompetente Zellen von E. coli Cu 406 transformiert und die Transformanden auf MM-Platten mit Kanamycin ausplattiert. Die Plasmide pCC4-8 und pCC4-9 führten beide zur Komplementation des ilvA-defekten

E. coli Stammes.

Das den Transaminase B-negativen E. coli Stamm komplementierende Fragment wurde als 1,7 kb HindIII/BamHI DNA-Fragment aus pCC3-7 isoliert und nach Klenow-Behandlung in beiden Orientierungen in mit ScaI geschnittenen pZ1 ligiert (pCC3-8, pCC3-9). Die Überprüfung der Genexpression erfolgte durch Transformation beider Plasmide in kompetente Zellen von E. coli Cu 1230 und Ausplattieren der Transformanden auf MM-Platten mit Km. Cu 1230 konnte durch beide Plasmide komplementiert werden.

Zur Umklonierung des Isomeroreductase-Gens und des Acetohydroxysäure-synthase-Gens wurde zum einen das gesamte, beide Gene enthaltende, 7,5 kb DNA-Fragment aus pCC2-42 isoliert und nach Klenow-Behandlung in beiden Orientierungen in mit ScaI geschnittenen pZ1 ligiert, zum anderen beide Gene getrennt nach Klenow-Behandlung in mit ScaI geschnittenen pZ1 ligiert. Beide Orientierungen des 7,5 kb Fragmentes wurden in pZ1 erhalten (pCC2-43, pCC2-44). Das Isomeroreductase-Gen wurde als 1,9 kb SphI/NcoI DNA-Fragment aus pCC1 isoliert und Klenow-Behandelt, das Acetohydroxysäuresynthase-Gen wurde als 3,0 kb PvuII-DNA-Fragment aus pCC2-42 isoliert. Jeweils beide Fragmente konnten in beiden Orientierungen in pZ1 ligiert werden (pCC2-53, pCC2-54; pCC2-55, pCC2-56). Da die Umklonierungen in *E. coli* DH5 durchgeführt wurden, erfolgte anschließend die Überprüfung der Genexpression aller genannten Klone durch Komplementation des IR^-- bzw. $AHAS^-$-*E. coli* Stammes. Dazu wurden die oben genannten Plasmide pCC2-43, pCC2-44, pCC2-53 und pCC2-54 in kompetente Zellen von *E. coli* JP 58 transformiert und auf MM-Platten mit Km ausplattiert. Diese Überprüfung erfolgte ebenfalls mit pCC2-43, pCC2-44, pCC2-55 und pCC2-56 in *E. coli* CGSC 5769. Es wurde in jedem Fall eine Komplementation der Auxotrophie dieser *E. coli* Stämme durch die verwendeten Plasmide erhalten. Eine Übersicht der Shuttle Vektoren mit ilv-Genfragmenten zeigt Abb. 15 und 16.

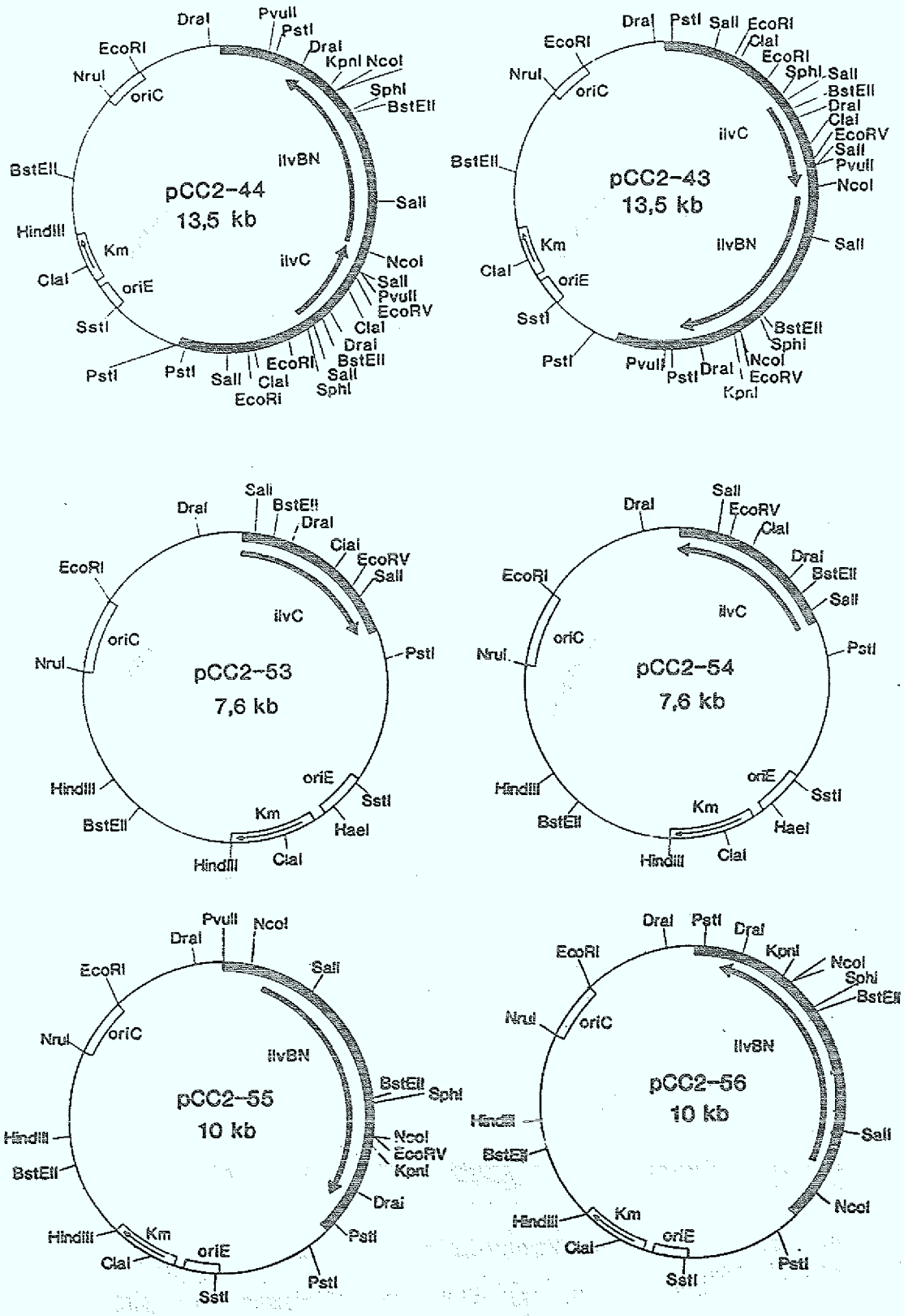


Abb. 15 Shuttle Vektoren mit <u>ilvBN</u>- und <u>ilvC</u>-*C. glutamicum* DNA-Fragmenten

schwarz markierte Fragmente : *C. glutamicum* DNA-Fragmente
schwarze Pfeile : Leserichtung der DNA-Polymerase
pCC2-43; pCC2-44: 7,5 kb ilvBNC-DNA-Fragment in pJC1
pCC2-53; pCC2.54: 1,9 kb ilvC-DNA-Fragment in pZ1
pCC2-55; pCC2-56: 3,0 kb ilvBN-DNA-Fragment in pZ1

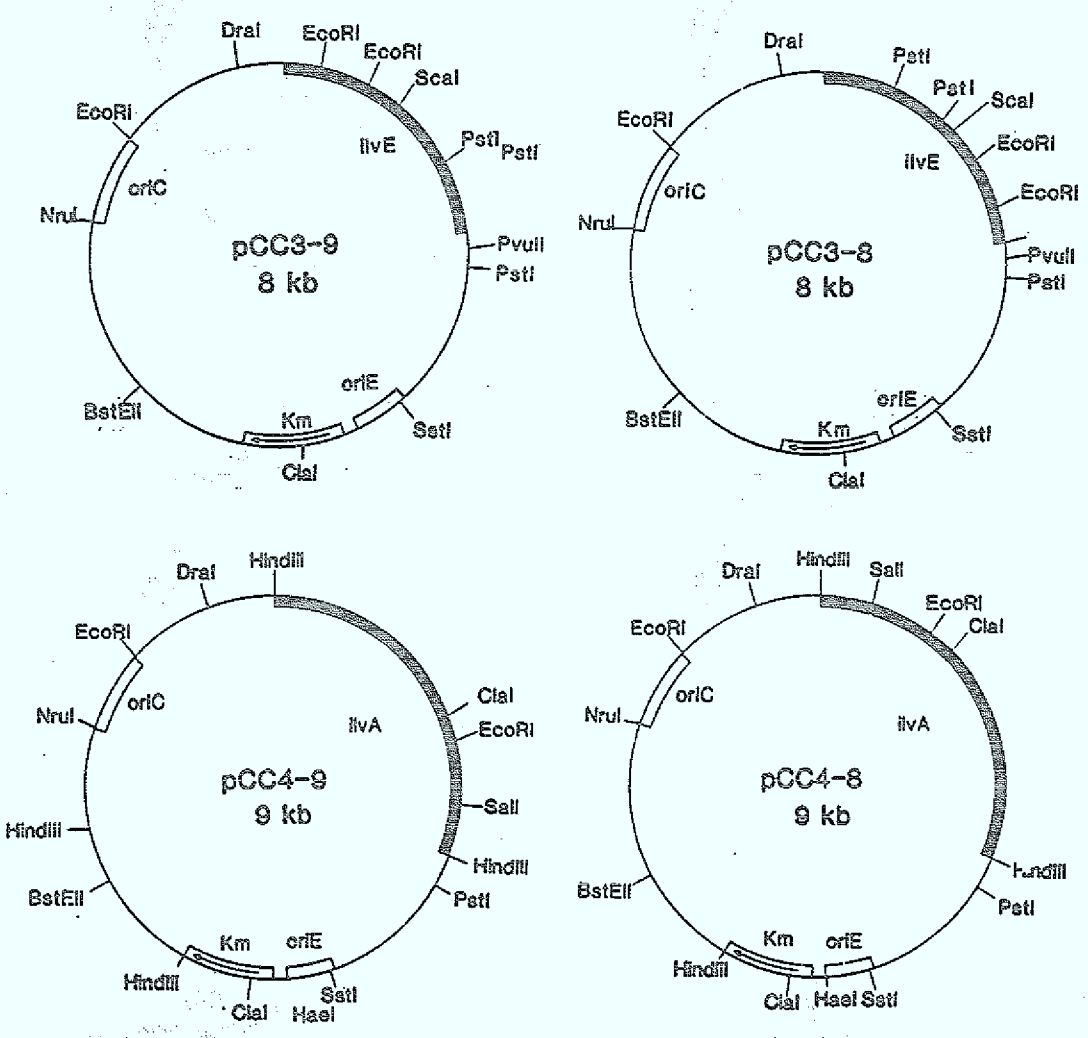


Abb. 16 Shuttle Vektoren mit <u>ilvE</u>- und <u>ilvA</u>-*C. glutamicum* DNA-Fragmenten

schwarz markierte Fragmente : *C. glutamicum* DNA-Fragmente
pCC4-8; pCC4-9: 2,8 kb ilvA-DNA-Fragment in pJC1
pCC3-8; pCC3-9: 1,5 kb ilvE-DNA-Fragment in pJC1

Nach Umklonierung der Gene der Isoleucinbiosynthese-Enzyme in den Shuttle Vektor pZ1 wurden große Plasmidpräparationen dieses Vektors angefertigt. Mit jeweils 1,5 µg der entsprechenden Plasmid-DNA wurden kompetente Zellen der *C. glutamicum* Stämme ATCC 13032 und DL2 transformiert. Neben dem Wildstamm ATCC 13032 wurde dessen Derivat DL2 verwendet, da dieser Stamm die Vorstufe 2-Hydroxybutyrat vollständig aufnehmen und zu Isoleucin umwandeln kann. Es wurde sowohl die Transformation von Protoplasten (Katsumata et al., 1984), als auch die Transformation von Sphäroblasten (Thierbach et al., 1988) durchgeführt. Die Transformanden wurden auf RCG-Platten, bzw. SB-Platten, mit Km ausplattiert. Die nach einigen Tagen sichtbaren Kolonien wurden durch kleine Plasmidpräparationen auf das entsprechende Plasmid hin überprüft und durch die Plasmide durch Restriktionsanalyse geprüft.

3.2. Spezifische Enzymaktivitäten in *C.glutamicum*

Die erhaltenen rekombinanten *C. glutamicum* Stämme wurden auf Expression der plasmidcodierten homologen Gene hin untersucht. Dazu wurden die 16 unterschiedlichen Stämme 24 h in Minimalmedium IV (II/3) angezogen und nach Zentrifugation die Zellen aufgeschlossen. Als Kontrolle wurde jeweils ein *C. glutamicum* Stamm verwendet, der den Shuttle Vektor ohne Gene der Isoleucinbiosynthese-Enzyme enthielt. Die spezifische Aktivität der Tda, TAB, IR und AHAS wurde bestimmt (Tab. 14). Die in Tabelle 14 enthaltenen Daten zeigen, daß das ilvA-DNA-Fragment in pCC4-8 und pCC4-9 in *C. glutamicum* ATCC 13032 zu einer bis zu 35-fachen Steigerung der spezifischen Aktivität führte, in *C. glutamicum* DL2 zu einer 16-fachen Steigerung. Die Überexpression war unabhängig von der Orientierung des DNA-Fragmentes im verwendeten Vektor. Dies zeigt, daß das ilvA-Gen aus *C. glutamicum* mit seinem eigenen Promotor kloniert wurde. In Stämmen, die das die ilvE-*E. coli*-Mutante komplementierende *C. glutamicum* DNA-Fragment enthielten, konnte keine Erhöhung der spezifischen Aktivität gegenüber der Kontrolle gemessen werden.

Tabelle 14 Spezifische Aktivitäten der durch die ilvA- und ilvE-Gene codierten Enzyme der Isoleucin-biosynthese in *Corynebacterium glutamicum*

Inseriertes Gen	Vektor	Stamm	Enzymaktivität (U/mg Protein)
-	pZ1	ATCC 13032	0,013
ilvA	pCC4-8	ATCC 13032	0,46
ilvA	pCC4-9	ATCC 13032	0,54
-	pZ1	DL 2	0,05
ilvA	pCC4-8	DL 2	0,80
ilvA	pCC4-9	DL 2	0,80
-	pZ1	ATCC 13032	0,06
ilvE	pCC3-8	ATCC 13032	0,06
ilvE	pCC3-9	ATCC 13032	0,06
-	pZ1	DL2	0,05
ilvE	pCC3-8	DL2	0,05
ilvE	pCC3-9	DL2	0,06

pZ1 : *E.coli/C.glutamicum* Shuttle-Vektor
Die C.glutamicum Genfragmente sind jeweils in beiden Orientierungen in ATCC 13032 und DL2 eingebracht

Tabelle 15 zeigt die Expression der ilvBN- und ilvC-Gene in unterschiedlichen Stämmen und verschiedenen Vektoren. Im Falle von pCC2-43 und pCC2-44 wurde eine mehr als 20-fach gesteigerte spezifische Aktivität der AHAS und eine etwa 15-fach gesteigerte IR-Aktivität bestimmt. Dies zeigt, daß das klonierte 7,5 kb *C. glutamicum* DNA-Fragment die Gene der AHAS und IR enthält und ferner die gesamte notwendige Information zur Expression enthält. Die Expression beider Gene ist ebenfalls unabhängig von der Orientierung des 7,5 kb DNA-Fragmentes im Vektor. Die jeweils nur für eines der beiden Enzyme codierten Plasmide pCC2-53 bis pCC2-56 (Abb. 15),

führten in *C. glutamicum* nur zu einer geringen Überexpression um den Faktor 2. Dies heißt, daß nur der intakte ilvBNC-Cluster zu einer Überexpression in *C. glutamicum* führt.

Tabelle 15 Spezifische Aktivität der durch die ilvBN- und ilvC-Gene codierten Enzyme der Isoleucin-biosynthese in *Corynebacterium glutamicum*

Inseriertes Gen	Vektor	Stamm	Enzymaktivität (U/mg Protein)
-	pZ1	ATCC 13032	0,01
ilvBN	pCC2-44	ATCC 13032	0,35
-	pZ1	DL 2	0,01
ilvBN	pCC2-44	DL 2	0,26
ilvBN	pCC2-44*	DL 2	0,25
ilvBN	pCC2-43	DL 2	0,23
-	pZ1	ATCC 13032	0,33
ilvC	pCC2-44	ATCC 13032	5,0
-	pZ1	DL 2	0,34
ilvC	pCC2-44	DL 2	4,2
ilvC	pCC2-44*	DL 2	4,0
ilvC	pCC2-43	DL 2	4,2
-	pZ1	ATCC 13032	0,02
ilvBN	pCC2-55	ATCC 13032	0,06
ilvBN	pCC2-56	ATCC 13032	0,08
-	pZ1	ATCC 13032	0,10
ilvC	pCC2-53	ATCC 13032	0,21
ilvC	pCC2-54	ATCC 13032	0,23

Hydroxybutyratkonzentration: 150 mM
Glucosekonzentration : 20 g/l
* Fermentationen mit Hydroxybutyrat

3.3 Auswirkung einzelner überexprimierter Gene auf die Bildung von Isoleucin

Die Überexpression von ilvBN, ilvC und ilvA ermöglichte die Analyse der Auswirkung dieser Gene auf die Bildung von L-Isoleucin. Dazu wurden die in Tabelle 16 aufgeführten *C. glutamicum* Stämme in Minimalmedium (II/3) mit Glucose oder in Minimalmedium mit Glucose und 150 mM 2-Hydroxybutyrat angezogen und nach 48 und 72 h Proben des Kulturfiltrates zur Aminosäurebestimmung entnommen. Die Überprüfung der Plasmidstabilität erfolgte gegen Ende der Fermentation (72 h) durch Ausplattieren von Zellen aus den Kulturen auf LB-Platten mit und ohne Kanamycin. Gleichzeitig wurde durch kleine Plasmidisolationen das Vorhandensein des entsprechenden Vektors überprüft. Da alle Fermentationen unter Selektionsdruck durchgeführt wurden (in Anwesenheit von Kanamycin) waren, der Erwartung entsprechend, bei allen getesteten Fermentationen 99 bis 100% der Klone kanamycinresistent und enthielten das gesuchte Plasmid.

Wie Tabelle 16 zeigt, bildete der Wildtyp *C. glutamicum* ATCC 13032 nur Spuren von Isoleucin (1 mM), ebenso die beiden Stämme mit geringer ilvBN und ilvC Expression. Demgegenüber wurde mit dem gesamten Cluster ilvBNC eine erhöhte Isoleucinbildung festgestellt. Daß trotz der bis zu 30-fachen Überexpression von ilvBNC nur eine Erhöhung auf 3 mM stattfand, zeigt, daß die Isoleucinbildung im Wildtyp weiterhin effektiv kontrolliert wird. Grund hierfür ist die fehlende Nachlieferung der Isoleucinvorstufe 2-Ketobutyrat durch die Threonindehydratase, dem einzigen Isoleucinspezifischen Enzym. Die Threonindehydratase wird in *Brevibacterium flavuum* durch Isoleucin feedback inhibiert (Miyajima und Shiio, 1972; Calhoun, 1973). Das gleiche gilt für die Threonindehydratase aus *C. glutamicum* (Möckel, mündl. Mitteilung). Dies zeigt sich auch bei Fermentationen mit überexprimiertem ilvA-Gen in *C. glutamicum* ATCC 13032 und DL2, wobei 4 mM Isoleucin

ausgeschieden wurden.

Tabelle 16 Auswirkung überexprimierter Gene der Isoleucin-biosynthese auf die Bildung von L-Isoleucin

Stamm	Substrat	Plasmid	Gen	L-Isoleucin (mM) (nach 72 h)
ATCC 13032	Glucose	-	-	1
ATCC 13032	Glucose	pCC4-8	ilvA	3
ATCC 13032	Glucose	pCC4-9	ilvA	3
ATCC 13032	Glucose	pCC2-44	ilvBNC	3
ATCC 13032	Glucose	pCC2-53	ilvC	1
ATCC 13032	Glucose	pCC2-54	ilvC	1
ATCC 13032	Glucose	pCC2-54	ilvBN	1
ATCC 13032	Glucose	pCC2-56	ilvBN	1
ATCC 13032	Glucose	pCC3-8	ilvE	1
ATCC 13032	Glucose	pCC3-9	ilvE	1
ATCC 13032	Glucose, 2-Hydroxybutyrat	-	-	16
ATCC 13032	"	pCC2-44	ilvBNC	36
DL2	Glucose	-	-	1
DL2	Glucose	pCC4-8	ilvA	3
DL2	Glucose	pCC4-9	ilvA	4
DL2	Glucose, Hydroxybutyrat	-	-	37
DL2	"	pCC2-43	ilvBNC	63
DL2	"	pCC2-44	ilvBNC	70

Hydroxybutyratkonzentration: 150 mM
Glucosekonzentration : 20 g/l

Daß bei Überexpression von ilvBNC mehr Isoleucin gebildet werden kann, zeigte sich bei Einsatz von D,L-Hydroxybutyrat bei Fermentationen mit Stamm ATCC 13032 und DL2. Stamm DL2 ist ein

direkter Abkömmling von *C. glutamicum* ATCC 13032 und hat die Eigenschaft, auch das D-Isomer des Hydroxybutyrates vollständig zu verwerten (Scheer, 1988). Hydroxybutyrat wird zu 2-Ketobutyrat umgewandelt und kann somit unter Umgehung der Reaktion der Threonindehydratase in den Isoleucinbiosyntheseweg einfließen. DL2 produzierte mit Hydroxybutyrat 70 mM Isoleucin, wobei der Kontrollstamm ohne ilvBNC nur 37 mM produzierte. Ebenso produzierte Stamm ATCC 13032 mit ilvBNC-Cluster 36 mM Isoleucin im Vergleich zur Kontrolle, welche nur 16 mM bildete. Dies bestätigt die entscheidende Rolle der Acetohydroxysäuresynthase bei der Kontrolle des Substratflußes zum Isoleucin (Eggeling, 1987; Scheer, 1988), bei Umgehung der Hemmung der Threonindehydratase durch Isoleucin. Da aus physiologischen Untersuchungen hervorgeht, daß IR und TAB keine limitierenden Schritte bei der Isoleucinproduktion sind (Wilhelm, 1989), ist es somit nun möglich, mittels gentechnischer Arbeiten zu ilvA und ilvBN mit *C. glutamicum* aus Glucose Isoleucin zu produzieren.

IV Diskussion

Die Bildung von L-Isoleucin mit *Corynebacterium glutamicum* erfolgt über eine lange Sequenz von Biosyntheseschritten über Aspartat, Homoserin und Threonin. Um Limitationen bei der Bildung des L-Isoleucins zu umgehen, werden Vorstufen eingesetzt, die erst auf der Stufe des 2-Ketobutyrates in die Biosynthese einmünden. Arbeiten hierzu haben gezeigt, daß in der dann noch verbleibenden Sequenz von vier Biosyntheseschritten einzig der durch die Acetohydroxysäure-synthase katalysierte Schritt den Substratfluß limitiert (Wilhelm et al., 1989). Bei Verwendung von Glucose als Substrat ist weiterhin abzusehen, daß die Reaktion der Threonindehydratase, welche 2-Ketobutyrat aus Threonin bereitstellt, limitierend ist, da dieses Enzym durch Isoleucin feedback inhibiert wird (Möckel, mündl. Mitteilung).

Die für eine erhöhte Isoleucinbildung aus Glucose notwendigen Gene der Threonindehydratase (ilvA) und Acetohydroxysäuresynthase (ilvBN), sowie die Gene der Isomeroreductase (ilvC) und der Transaminase B (ilvE) konnten in dieser Arbeit durch heterologe Komplementation von Isoleucin-auxotrophen *E. coli*-Mutanten isoliert werden. Bisher wurden aus den gramnegativen Organismen *E. coli* und *S. typhimurium* die Gene der Isoleucinbiosynthese-Enzyme isoliert. In beiden Organismen liegen sie als Operon organisiert vor (Watson et al., 1979; Driver und Lawther, 1985). Nur die Gene der AHAS und Isomeroreductase, ilvBNC, sind bisher aus dem grampositiven Organismus *Bacillus subtilis* isoliert worden, wo sie mit den Genen der Leucinbiosynthese ein polycistronisches Operon bilden (Vandeyar, 1987). Weitere Gene der Isoleucinbiosynthese wurden bisher nicht aus einem grampositiven Organismus isoliert. Die Benennung der Gene der Isoleucinbiosynthese-Enzyme aus *C. glutamicum* wurde in Anlehnung an die *E. coli*- und *S. typhimurium*-Nomenklatur vorgenommen, welche auch für *B. subtilis* angewendet wird.

Der Nachweis der Klonierung der Gene der Isoleucinbiosynthese-Enzyme erfolgte durch Hybridisierung und Messung der spezifischen Aktivität der Enzyme in *E. coli* und *C. glutamicum*. Alle in *E. coli* klonierten Gene der Isoleucinbiosynthese-Enzyme aus *C. glutamicum* konnten nachgewiesen werden, die spezifische Enzymaktivität lag in jedem Fall bis zu 20-fach niedriger im Vergleich zum Wildtyp von *C. glutamicum*. Die Erhöhung der spezifischen Enzymaktivität der AHAS, Tda und IR nach Retransformation in *C. glutamicum* um den Faktor 20 bis 30 bestätigte, daß die ilvBN-, ilvC- und ilvA-Gene enthaltenden DNA-Fragmente aus *C. glutamicum* isoliert wurden. Eine Steigerung der spezifischen Enzymaktivität in *C. glutamicum* durch Überexpression wurde inzwischen mehrfach beschrieben, z.B. bei Reklonierung der Homoserindehydrogenase um den Faktor 10 (Nakamori, 1986) und bei Überexpression der Lysingene (dapA, dapB, asd, ddh, lysC und lysA) um den Faktor 10 bis 20 (Cremer, 1989). Mit dem die ilvE-*E. coli* Mutante komplementierenden 1,5 kb DNA-Fragment aus *C. glutamicum* konnte in *C. glutamicum* keine Erhöhung der spezifischen Aktivität der TAB erreicht werden. Dieses Enzym konnte in der entsprechenden TAB^--*E. coli*-Mutante zuvor nachgewiesen werden. In *E. coli* wird dieses Enzym durch ein 0,95 kb DNA-Fragment codiert (Cox et al., 1987). Denkbar ist, daß der Promotor des *C. glutamicum* Gens nicht mitkloniert wurde. Die Expression dieses *C. glutamicum*-Gens in *E. coli* kann durch andere als die nativen Promotorsequenzen bedingt werden. Dies wurde gezeigt für das asd-Gen aus *C. glutamicum*, welches in *E. coli* durch eine DNA-Sequenz vor dem Gen, die in *E. coli* zufällig der klassischen Promotorsequenz entspricht, abgelesen wurde (Kalinowski, 1989). In *C. glutamicum* fungierte diese Sequenz nicht als Promotor (Kalinowski, 1989). Die Bildung von Durchlesetranskripten in den verwendeten Vektor ist ebenfalls denkbar. Da die Vektorentwicklung für coryneforme Bakterien erst in den Anfängen ist (Martin, 1989), liegt auch noch kein geeigneter Vektor vor, der Terminatoren vor und hinter der Klonierungsstelle trägt, mit welchem die vorliegende Fragestellung weiter geklärt werden könnte.

Das Gen der Dihydroxysäuredehydratase (ilvD) konnte durch

heterologe Komplementation der *E. coli* ilvD-Mutante AB1953 nicht kloniert werden. Die Eignung dieser Mutante zur Komplementation war zuvor dadurch nachgewiesen worden, daß das entsprechende *E. coli* ilvD-Gen aus Plasmid pPU118 isoliert, in pBR322 einligiert und in diese Mutante retransformiert wurde, was zur Wiederherstellung des Wildphänotyps führte. Daß die Isolation eines Gens aus *C. glutamicum* oder *B. lactofermentum* nicht immer durch heterologe Komplementation möglich ist, war schon zuvor beschrieben worden (Batt et al., 1985; Martin et al., 1987). Der Grund hierfür kann eine ungenügende Konsensussequenz im Promotorbereich sein, die eine Ablesung des *C. glutamicum*-Gens in *E. coli* verhindert. Aufgrund der fehlenden -35-Region vor dem Promotor des hom-Gens aus *C. glutamicum*, welches in *C. glutamicum* zusätzlich die Ablesung des thrB Gens bewirkt (Peoples et al., 1988), erfolgte keine Expression dieser Gene in *E. coli* (Mateos et al., 1988). Das 2,5 Diketo-D-Gluconsäure-Reductase-Gen aus *Corynebacterium sp.* wurde ebenfalls nicht in *E. coli* abgelesen (Anderson et al., 1985). Hier konnte nach Sequenzierung keine Promotorsequenz gefunden werden, die *E. coli*-Promotoren ähnlich war. Im Falle der DiHDH aus *C. glutamicum* ist es weiterhin möglich, daß das ilvD-Gen zwar abgelesen wurde, die Aktivität des Enzyms in *E. coli* jedoch nicht zur Komplementation der ilvD-Mutante ausreichte. Ein Hinweis hierfür ist die Messung der spezifischen Aktivität der übrigen in dieser Arbeit klonierten Gene in *E. coli*, welche um den Faktor 10 bis 20 niedriger lag als ihre spezifische Aktivität in *C. glutamicum* ATCC 13032. Da die DiHDH aus *C. glutamicum* im Wildstamm eine geringe spezifische Aktivität von 0,003 U/mg zeigt, könnte die in *E. coli* vorhandene Aktivität zu gering gewesen sein, um die Zelle lebensfähig zu erhalten. Als weitere Möglichkeit, das ilvD-Gen aus *C. glutamicum* zu isolieren, wurde das ilvD-Gen aus *E. coli* zur Hybridisierung gegen chromosomale *C. glutamicum*-DNA verwendet. Neben *S. typhimurium* ist *E. coli* das einzige Bakterium, aus welchem ilvD bisher isoliert wurde. Da bei Hybridisierung kein Signal auftrat, ist davon auszugehen, daß keine oder nur sehr geringe Homologie zwischen den ilvD-Genen aus *C. glutamicum* und *E. coli* besteht. Gleiches wurde auch

beobachtet bei Hybridisierung des ilvE-Gens aus *E. coli* (aus Plasmid pPU4; McCorkle et al., 1978) mit dem ilvE-Gen aus *C. glutamicum*. Somit war eine Klonierung des ilvD-Gens aus *C. glutamicum* auf diesem Weg nicht möglich. Es konnte jedoch eine *C. glutamicum*-Mutante isoliert werden, die keine DiHDH-Aktivität mehr zeigt. Da bekannt ist, daß in *B. subtilis* das ilvD-Gen eng benachbart zum ilvA-Gen ist (Piggot und Hoch, 1985), wurde mit verschiedenen ilvA-enthaltenden DNA-Fragmenten versucht, diese Mutante zu komplementieren. Keines dieser und auch nicht ilvBNC- und ilvE-tragende DNA-Fragmente führten zur Komplementation. Dieses Experiment zeigt, daß im *C. glutamicum* Genom das ilvD-Gen keinem der anderen Gene der Isoleucinbiosynthese-Enzyme benachbart ist.

Die Analyse der chromosomalen Organisation der ilvBN-, ilvC-, ilvA- und ilvE-Gene durch Kreuzkomplementation und Kreuzhybridisierung hat ergeben, daß in *C. glutamicum*, mit Ausnahme von ilvBN und ilvC, die Gene der Isoleucinbiosynthese-Enzyme nicht geclustert vorliegen. Damit entspricht die Organisation der Gene der Isoleucinbiosynthese-Enzyme in *C. glutamicum* nicht derjenigen in *E.coli*. Dort liegt fast alle dieser Gene in Form des ilvGMEDA-Operons vor (Driver und Lawther, 1985). Zusätzlich befindet sich direkt anschließend im Genom das Gen der Isomeroreductase (ilvC) und dessen Regulatorgen ilvY (Watson et al., 1979). Eine höhere Analogie der *C. glutamicum*-Genanordnung ist offensichtlich zur Anordnung der Gene bei *Bacillus subtilis* gegeben. Dort liegen ilvA und ilvD nur durch zwei weitere Gene getrennt bei 200 min der *B. subtilis* Genkarte vor, ilvBN bildet zusammen mit ilvC und den anschließenden Leucingenen leuACBD ein polycistronisches Operon (Vandeyar, 1987) bei 250 min der Genkarte. Eine weitere Übereinstimmung der Anordnung der Gene der Isoleucinbiosynthese-Enzyme in *B. subtilis* und *C. glutamicum* zeigt die Anordnung der AHAS und IR in Form eines ilvBNC-Clusters in *C. glutamicum* und die Leserichtung beider Gene. In *B. subtilis* werden ilvBN und ilvC von einem gemeinsamen Promotor, welcher sich vor den ilvBN-Genen befindet, abgelesen (Vandeyar, 1987). Auch in *C. glutamicum* werden beide Gene in

der gleichen Richtung abgelesen. Die Transkriptionsrichtung führt ebenfalls vom ilvBN- zum ilvC-Gen. Die Position des Gens der Transaminase B (ilvE) im Genom von *B. subtilis* ist noch nicht bestimmt worden. Ein weiteres Beispiel einer ähnlichen Genomorganisation in *B. subtilis* und *C. glutamicum* sind die Gene der Aspartokinase. Für *B. subtilis* konnte gezeigt werden, daß innerhalb eines Aspartokinasegens im gleichen Leseraster ein zweites kleineres Leseraster liegt (Chen et al., 1987; Chen und Paulus, 1988). Alle bisherigen Befunde sprechen dafür, daß bei *C. glutamicum* die gleiche Genanordnung vorliegt (Cremer 1989, Kalinowski, 1989). Dies zeigt, daß offensichtlich zwischen der Genomorganisation der grampositiven Bakterien *B. subtilis* und *C. glutamicum* höhere Analogie besteht, als zur Genomorganisation des gramnegativen Bakteriums *E. coli*.

Zur Charakterisierung des ilvBNC-Clusters aus *C. glutamicum* wurden die codierenden Genbereiche der beiden Gene durch Deletionsanalyse und Transposonmutagenese eingeengt. Dabei konnte der codierende Bereich des ilvC-Gens auf 1,2 kb eingeschränkt werden. Dies stimmt überein mit den in anderen Organismen bestimmten DNA-Fragmenten zur Codierung eines funktionellen IR-Enzyms. In *E. coli* codiert ein 1,47 kb DNA-Fragment das 54000 Dalton IR-Protein (Wek und Hatfield, 1986). Auch das 36000 Dalton IR-Protein aus *B. subtilis* wird durch ein recht kleines 1,02 kb DNA-Fragment codiert (Vandeyar, 1987). Der für die AHAS codierende Genbereich konnte auf ca. 3,0 kb begrenzt werden. Die AHAS-Isoenzyme in allen bisher untersuchten Organismen bestehen aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten, deren Gene direkt benachbart sind und zur Codierung eines funktionellen Enzyms eine bis zu 2,3 kb lange DNA-Sequenz benötigen. Die codierenden Genbereiche der AHAS-Isoenzyme von *E. coli* K12 weisen für die große Untereinheit des Proteins ein DNA-Fragment einer Länge von 1,6 bis 1,9 kb auf, für die kleine Untereinheit von 0,26 bis 0,40 kb. Das AHAS-Protein in *B. subtilis* wird ebenfalls durch zwei Untereinheiten gebildet, die durch DNA-Fragmente einer Länge von 1,7 und 0,52 kb codiert werden. Da der die AHAS aus *C. glutamicum* codierende Genbereich weder durch Deletionsanalyse, noch durch

Transposonmutagenese auf mehr als 3 kb verkleinert werden konnte, ist es wahrscheinlich, daß auch die AHAS in *C. glutamicum* aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten besteht. Abbildung 17 zeigt einen Vergleich der Genomorganisation der ilvBNC-Gene in *B. subtilis* und *C. glutamicum*.

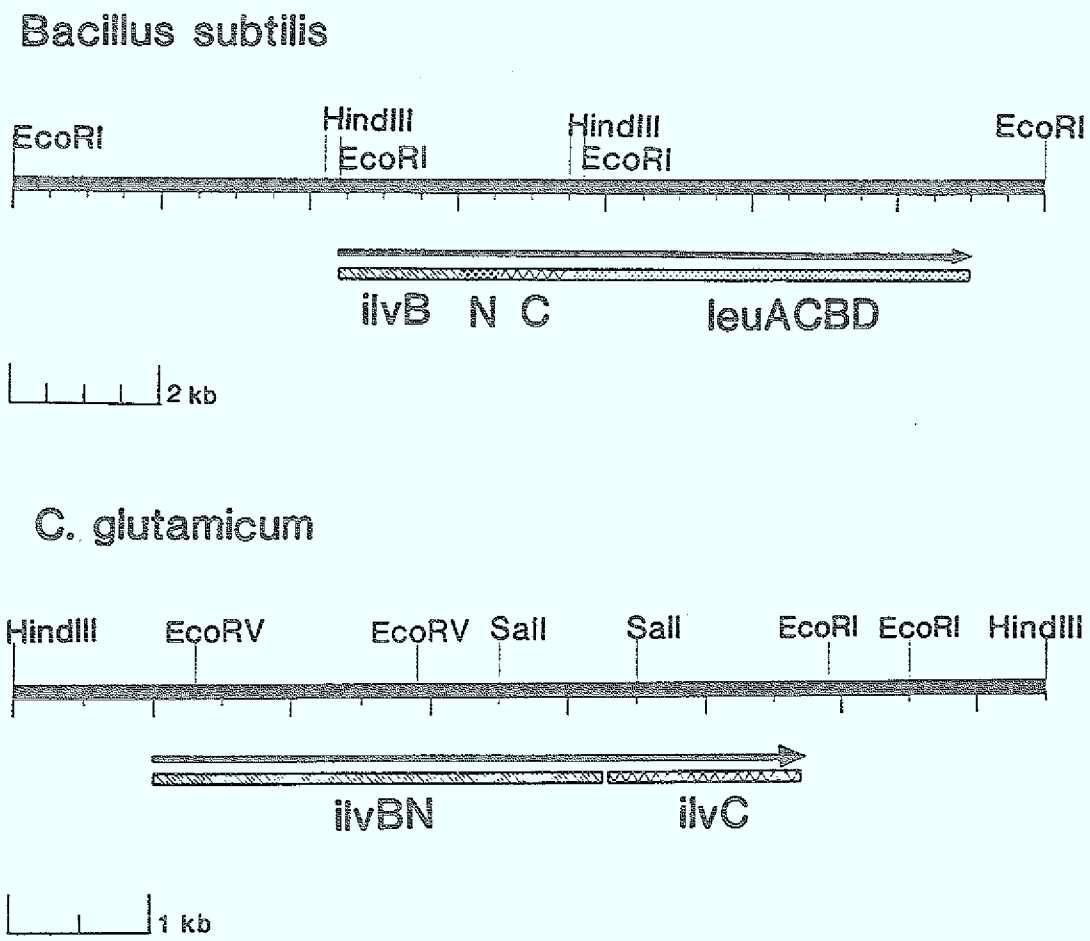


Abb. 17 Genomorganisation der ilvBNC-Gene in *B. subtilis* (nach Vandeyar, 1987) und *C. glutamicum*

Die Trennung der Gene der AHAS (ilvBN) und IR (ilvC) und ihre Expression in *C. glutamicum* führte zu dem Ergebnis, daß beide Gene eine Überexpression um den Faktor 2 zeigten. Die vorangegangene Untersuchung des Gesamtclusters in *C. glutamicum* hatte zu einer 20- bis 30-fachen Überexpression beider Gene geführt. Für die Expression des distalen ilvC-Gens kann dies bedeuten, daß die Ablesung von einem lediglich schwachen

internen Promotor erfolgt. Ein Hinweis dafür, daß ein eigener Promotor des ilvC-Gens aus *C. glutamicum* vorliegt, zeigte das Ergebnis der mit Tn1725 durchgeführten Transposonmutagenese. Trotz Insertionen von Tn1725 in den vorderen oder hinteren Bereich der codierenden Sequenz des Acetohydroxysäuresynthase-Gens, die dieses Gen inaktivierten, konnte der ilvC-*E. coli* Stamm komplementiert werden. Das ilvC-Gen konnte ebenfalls getrennt von ilvBN in pBR322 (pCC1) in *E. coli* kloniert werden. Es wurde in diesem Vektor nur in einer Orientierung erhalten, offensichtlich war in diesem Fall durch Gegenlesen der pBR322 Promotoren keine andere Orientierung möglich. In Frage kommen hierbei die in pBR322 im Bereich der Basenpaare 1-80 liegenden Promotoren P1 des Tetracyclin Repressor Gens (tetR) und P2, der Promotor des Tetracyclinresistenzgens (tetA) (Stueber und Bujard, 1981; Brosius et al., 1982). In Einklang damit, daß aufgrund dieser Promotoren nur eine Orientierung des ilvC-Gens in pBR322 möglich war, steht, daß die Leserichtung des integrierten ilvC-Gens in Leserichtung dieser Promotoren liegt. Für das *B. subtilis* ilvC-Gen konnte bisher kein eigener interner Promotor nachgewiesen werden (Vandeyar, 1987). Die ebenfalls schwache Ablesung der vom ilvC-Gen getrennten ilvBN-Gene war überraschend. Möglicherweise sind Operon-interne Terminatorstrukturen auf dem Subklon nicht vorhanden, wodurch es zur Bildung eines inaktiven Proteins kommen kann. Ebenso können Bereiche vor den Strukturgenen essentiell sein, da das zur Subklonierung in pZ1 verwendete PvuII-Fragment nicht die gesamte vor ilvBN liegende DNA-Sequenz des Ursprungsklons beinhaltet. Diese vorgeschaltete Sequenz könnte die Bindestelle eines positiven Regulatorproteins beinhalten, welche durch Subklonierung entfernt wurde. Die entfernten Sequenzen würden für eine Bindestelle ausreichen. Für das ilvBN Operon aus *E. coli* ist eine solche Bindestelle beschrieben worden (Friden et al., 1982). Dieses Operon wird positiv reguliert durch Bindung von cyclischem AMP und cAMP-Rezeptorprotein an eine Operatorregion vor den Strukturgenen. Ebenfalls ist eine solche Bindestelles für das ilv-Operon aus *E.coli* beschrieben worden. Dort sind zwei Promotoren, Gp1 und Gp2, den Strukturgenen vorgelagert (Lawther et al., 1980; Adams et al., 1985). An

Promotor Gp1 erfolgt in vivo die Bindung eines Proteins, welches eine Steigerung der Expression des ilv-Operons von Promotor Gp2 aus bewirkt (Adams und Hatfield, 1984; Pereira et al., 1988). Ebenfalls ist sowohl für das ilvBN-Operon, als auch für das ilv-Operon aus *E. coli* eine herabgesetzte Expression in Mutanten, denen dieses Bindeprotein fehlt, beschrieben worden (Friden et al., 1984a; Tsui und Freundlich, 1988).

Nach der Klonierung der Gene der Isoleucinbiosynthese-Enzyme wurde die Auswirkung ihrer Überexpression auf die Bildung von L-Isoleucin geprüft. Der Wildtyp von *C. glutamicum* (ATCC 13032) zeigte bei Überexpression von ilvA eine Steigerung der Isoleucinbildung aus Glucose von 1 auf 3 mM. Der Grund für diese deringe Steigerung könnte sein, daß aufgrund der langen Biosynthesesequenz kein Threonin für die Isoleucinüberproduktion zur Verfügung steht. Auch denkbar ist, daß die durch Isoleucin bewirkte feedback Hemmung der Threonindehydratase eine gesteigerte Isoleucinbildung verhindert. Diese letzte Möglichkeit entspricht der Situation, wie sie für die Aspartokinase bei der Lysinbildung besteht. Hier führt die Überexpression der regulierten Aspartokinase nicht zu erhöhter Lysinbildung, wogegen die des deregulierten Enzyms zu etwa 30 mM Lysin führte (Cremer, 1989). Es besteht deswegen die Notwendigkeit, das Gen der feedback-insensitiven Threonindehydratase zu isolieren, um die Möglichkeit der Steuerung der Isoleucinbiosynthesesequenz über Aspartat, Homoserin und Threonin zur Verfügung zu haben. Bei Einsatz von 2-Hydroxybutyrat konnte mit *C. glutamicum* ATCC 13032 mit überexprimiertem ilvBNC eine Steigerung der Isoleucinbildung von 16 auf 36 mM festgestellt werden. Dies bestätigt, daß die AHAS im Wildtyp ein limitierendes Enzym der Isoleucinbiosynthese ist (Scheer, 1987). Ferner wurde ilvBNC im Stamm DL2 überexprimiert, welcher sich durch vollständige Umwandlung von D- und L-Hydroxybutyrat auszeichnet (Scheer, 1988). In diesem Stamm ist offensichtlich ebenfalls der durch das AHAS-Enzym ausgeführte Syntheseschritt zum L-Isoleucin limitierend, da bei Überexpression eine Steigerung von 37 auf 70 mM erreicht wurde. Eine weit höhere Steigerung konnte nicht

erwartet werden, da jüngste Ergebnisse es wahrscheinlich machen, daß die Isoleucinsekretion in *C. glutamicum* eine weitere Barriere bei der Produktion des Isoleucins ist (Wilhelm et al., 1989; Ebbighausen et al., 1989).

Somit lassen sich zwei weitere Arbeitsrichtungen aufzeigen, die zu effektiver Isoleucinbildung führen. Es sind dies zum einen Arbeiten zu den Genen des Isoleucintransportsystems und zum anderen zu den Genen der Threoninbiosynthese. Da die feedback-inhibierte Threonindehydratase eine starke Barriere bei der Bildung von L-Isoleucin aus Glucose ist, wäre es von großem Vorteil, das deregulierte Gen zu isolieren, da sich nur zusammen mit diesem und den in dieser Arbeit klonierten Genen Isoleucin in hoher Ausbeute und Rate aus Glucose bilden läßt.

V Zusammenfassung

Die mikrobielle Produktion der Aminosäure L-Isoleucin wurde überwiegend mit Hilfe konventionell hergestellter Mutanten durchgeführt. Die in den letzten Jahren entwickelten Methoden der rekombinanten DNA-Technologie für Corynebakterien ermöglichen es, durch Überexpression von Genen des Aminosäurestoffwechsels die Produktion der gewünschten Aminosäure zu steigern. In der vorliegenden Arbeit wurden Gene der Isoleucinbiosynthese isoliert, charakterisiert und ihre Auswirkung auf die Bildung von L-Isoleucin *bei C. glutamicum* verfolgt.

1. Vier Gene der Isoleucinbiosynthese-Enzyme aus *C. glutamicum* ATCC 13032 wurden durch heterologe Komplementation von Isoleucin-auxotrophen *E. coli*-Mutanten isoliert: ilvA (Threonindehydratasegen), ilvBN (Acetohydroxysäure-synthasegene), ilvC (Isomeroreductasegen), sowie ein die ilvE (Transaminase B-Gen) *E. coli*-Mutante komplementierendes DNA-Fragment. Das Gen der Dihydroxysäuredehydratase, ilvD, konnte durch heterologe und homologe Komplementation der entsprechenden Isoleucin-auxotrophen *E. coli*- und *C. glutamicum*-Mutante nicht isoliert werden.

2. Die Gene der Acetohydroxysäuresynthase und der Isomeroreductase bilden im *C. glutamicum* Genom ein Cluster der Anordnung ilvBNC. Die Transkription beider Gene erfolgt in gleicher Richtung. Beide Gene konnten getrennt voneinander in *C. glutamicum* und *E.coli* exprimiert werden. Durch Deletionsanalyse und Transposonmutagenese konnte der codierende Bereich des Gens der Isomeroreductase auf 1,2 kb, der codierende Bereich der Acetohydroxysäuresynthase auf 3,0 kb eingegrenzt werden.

3. Bei Klonierung des ilvA, ilvBN und ilvC-Gens in die *C. glutamicum*-Stämme ATCC 13032 und DL2 konnte eine Steigerung der spezifischen Aktivität der durch diese Gene codierten Enzyme um den Faktor 20 bis 30 erzielt werden.

Die Klonierung des ilvE-DNA-Fragmentes führte nicht zu einer Überexpression in *C. glutamicum*

4. Bei Fermentationen mit den ilvA- und ilvBNC-Genen enthaltenden rekombinanten *C. glutamicum*-Stämmen wurde eine Verdopplung der Isoleucinausscheidung erreicht. Bei Zugabe von Glucose als Substrat fand eine Steigerung von 1 mM auf 3 bis 4 mM Isoleucin statt, bei Zugabe der Synthesevorstufe 2-Hydroxybutyrat von 16 mM auf 36 mM, bzw. mit Stamm DL2 von 37 mM auf 70 mM.

VI Literaturverzeichnis

Abe, S., Takayama, K.I., Kinoshita, S.,(1967). Taxonomical studies on glutamic acid producing bacteria. *J Gen Appl Microbiol* 13: 279-301

Adams, C.W., Hatfield, G.W. (1984). Effects of promotor strengths and growth conditions on copy number transcription fusion vectors. *J biol Chem* 259: 7399- 7403

Adams, C.W., Rosenberg, M., Hatfield, G.W. (1985). Analysis of in vitro RNA transcription products of the ilvGEDA attenuator region of *Escherichia coli* K12. J Biol Chem 260: 8538-8544

Adelberg, E.A. (1958). Selection of bacterial mutants which excrete antagonists of antimetabolites. *J Bact* 76: 326

Anderson, S., Marks, C.B., Lazarus, R., Miller, J., Stafford, K.(1985). Production of 2-keto-L-gluconate, an intermediate in L-ascorbate synthesis by a genetically modified Erwinia herbicola. *Science* 230: 144-149

Arfin, S.M., Umbarger, H.E. (1969). Purification and properties of the Acetohydroxy Acid Isomeroreductase of Salmonella typhimirium. *J Biol Chem* 244: 1118-1127

Bachmann, B. (1983). Linkage map of Escherichia coli. Eddition 7 *Microbiol. Rev.* 47: 180-230

Balbas, P., Soberon, X., Bolivar, F., Rodriguez, R.L. (1988). The Plasmid pBR322. aus: Vectors, A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses. ed. Rodriguez. R.L., Denhardt D.T.: 5-83

Barat, M., Anagnostopoulos, C., Schneider, A.-M. (1965). Linkage relationships of genes controlling isoleucine, valine and leucine biosynthesis in Bacillus subtilis. *J Bact* 90: 357-369

Batt, C.A., Follettie, M.T., Sinskey, A.J. (1985). Genetic engineering of coryneform bacteria. *TIBS* 3: 305-310

Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acids Res* 7: 1513-1523

Blatt, C.A., Follettie, M.T., Shin, H.K., Yeh, P., Sinskey, A.J. (1985). Genetic engeneering of coryneform bacteria. *Trends in Biotech* 3: 305-310

Blazey , D.L., Burns, R.O. (1984). *J.Bacteriol* 159: 951-957

Blazey , D.L., Burns, R.O. (1979). Genetic organization of the Salmonelle typhimurium gene cluster. *Mol Gen Genet* 177: 1-11

Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.M. and Falkow, S. (1977b). Construction and characterization of new cloning vehicles, II A multipurpose cloning system

Boyer, H.W., Roulland-Dussoix, D. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in Escherichia coli. *J Mol Biol* 41: 459-470

Brosius, J. und Holy, A. (1984). Regulation of ribosomal RNA promoters with a synthetic lac operator. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 6929-6933

Butlin, J.D. Cox, G.B., Gibson, F. (1971). Oxidative Phosphorylation in Escherichia coli K-12. *J Biochem* 124: 75-81

Calhoun, D.H., Rimerman, R.A., Hatfield, G.W. (1973). Threonine deaminase from Escherichia coli. I. Purification and properties. *J Biol Chem* 248: 3511-3526

Chen, N. Y., Paulus, H. (1988). Mechanism of expression of the overlapping genes of Bacillus subtilis aspastokinase II *J Biol Chem* 263: 9526-9532

Chen, N. Y., Hu, F., Paulus, H. (1987). Nucleotide sequence of the overlapping genes for the subunits of Bacillus subtilis aspastokinase II. *J Biol Chem* 262: 8787-8798

Clarke, L., Carbon, J. (1976). A colony bank containing synthetic ColE1 hybrid plasmids representative of entire E. coli genome. *Cell 9: 91-99*

Claus, D., Lack,P., Neu, B. (1983). Deutsch Stammsammlung von Mikroorganismen, Catalogue of Strains; Bacteria, Filamentous Fungi, Yeasts. Gesell Biot Forschung, Braunschweig

Cordes, Ch. (1986). Untersuchungen zur Regulation der Isoleucin-biosynthetischen Enzyme bei Corynebacterium glutamicum. *Diplomarbeit*, Universität Düsseldorf

Cox, J.C., Cox, B.J., Fidanza, V.,Calhoun, D.H., (1987). The complete nucleotide sequence of the ilvGMEDA cluster of Escherichia coli K-12. *Gene* 56: 185-198

Cremer, J., Treptow, C., Eggeling, L., Sahm, H. (1988). Regulation of enzymes of lysine biosynthesis in Corynebacterium glutamicum. *J Gen Microbiol* 134 3211-3229

Cremer, J. (1989). Die Lysinbiosynthesesequenz in Corynebacterium glutamicum: Regulation, Klonierung und Bildung von Lysin durch Genamplifikation. *Dissertation* Universität Düsseldorf

De Felice, M., Levinthal M., Iaccarion M., Guardiola, J. (1979). Growth inhibition as a consequence of antagonism between related amino acids: effect of valine on Escherichia coli K-12. *Microbiol Rev* 43: 42-58

Del Real, A., Aguilar,A., Martin, J.F. (1985). Cloning and expression of Tryptophan genes from Brevibacterium lactofermentum in Escherichia coli. *Biochem Biophys Res Comm* 133:1013-1019

Driver, R.P., Lawther, R.P. (1985). Restriction endonuclease analysis of the ilvGEDA operon of members of the family enterobacteriaceae. *J Bact* 162: 1317-1319

Ebbighausen, H., Weil, B., Krämer, R. (1989). Isoleucine excretion in Corynebacterium glutamicum: evidence for a specific efflux carrier system. *Appl Microbiol Biotechnol* 31: 184-190

Eggeling, I. (1986). Untersuchungen zur Umsetzung von 2-Ketobutyrat zu l-Isoleucin mit Corynebacterium glutamicum. *Dissertation*, Universität Düsseldorf

Eggeling, I., Cordes, CH., Eggeling, L., Sahm H. (1987). Regulation of acetohydroxy acid synthase in Corynebacterium glutamicum during fermentation of α-ketobutyrate to L-isoleucine. *Appl Microbiol Biotechnol* 25: 346-351

Eggertson G., Adelberg E.A. (1965). Map positions and specifities of supressor mutations in Escherichia coli K-12. *Genetics* 52: 319-

Follettie, M.T., Sinskey, A.J. (1986a). Molecular cloning and nucleotide sequence of the Corynebacteium glutamicum pheA gene. *J Bact* 167:695-702

Follettie, M.T., Shin, H.K., Sinskey, A.J. (1988). Organization and characterization of the Corynebacterium glutamicum hom-thrB and thrC loci. *Mol Microbiol* 2:53-62

Friden, P., Newman, T., Freundlich, M. (1982). Nucleotide sequence of the ilvB promotor-regulatory region: a biosynthetic operon controlled by attenuation and cyclic AMP. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 6156-6160

Friden, P., Voelkel, K., Sternglanz, R., Freundlich, M. (1984a). Reduced expression of the isoleucine and valine enzymes in integration host factor mutants of Escherichia coli. *J Mol Biol* 172: 573-579

Friden, P., Donegan, J., Mullen, P., Tsui, P. and Freundlich, M. (1985). The ilvB locus of *Escherichia coli* K-12 is an operon encoding both subunits of acetohydroxyacid synthase I. *Nucleic Acids Res* 13: 3979-3993

Gentz, R., Langner, A., Chang, A.C.Y., Cohen, S.N., Bujard, H. (1981). Cloning and analysis of strong promoters is made possible by downstream placement of RNA termination signal. *Proc Natl Acad Sci* USA 78: 4936-4940

Gornall, A.G., Bardawill, C.J., Maxima M.D. (1949). Determiation of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 177: 751-766

Groeger, U. (1986). Mikrobielle Gewinnung von L-Leucin aus α-Ketoisocapronsäure. Dissertation, Universität Düsseldorf

Guardiola, J., De Felice, M., Iaccarino M. (1974). Mutant of Eschrichia coli K-12 missing acetolactate synthase activity. *J Bact* 120: 536-538

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580

Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of *Escherichia coli*. "DNA Cloning", IRL Press, Oxford, Washington DC, Vol.1: 109-136

Hatfield, G.W., Umbarger, H.E. (1971). L-Threonine deaminase, biosynthethic. *Methods in Enzymology* 17B: 561-566

Harms, E., Hsu, J.-H., Subrahmanyam, C.S., Umbarger H.E. (1985) Comparison of the regulatory region of ilvGEDA operons from several entric organisms. *J Bact* 164: 207-216

Hauser, C.A., Harfield, G.W. (1984). Attenuation of the ilvB operon by amino acids reflecting substrates or products of the ilvB gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 76-79

Hirose, Y., Okada, H. (1979). Microbial production of amino acids. *Microbial Technology*, 2nd ed. Peppler, H.J., Perlman, D. (eds), New York, I: 211-240

Hirose, Y., Shibai, H. (1980). Amino acid fermentation. *Biotech Bioengineering* 22 suppl.1: 111-125

Hohn, B. and Collins, J. (1980). A small cosmid for efficient cloning of large DNA fragments. *Gene* 11: 291-298

Hoppe, B., Martens, J. (1984). Aminosäuren-Herstellung und Gewinnung. *Chemie in unserer Zeit* 18: 73-86

Ikeda, Sh., Fugita, I., Yoshinaga, F. (1976). Screening of L-isoleucine producers among ethionine resistant mutants of L-threonine producing bacteria. *Agric Biol Chem* 40: 511-516

Ishino, S., Mizukami, T., Yamaguchi, K., Katsumata, R., Araki, K. (1988). Cloning and sequencing of the meso-Diaminopimelate-D-dehydrogenase (ddh) gene of Corynebacterium glutamicum. *Agric Biol Chem* 52: 2903-2909

Kalinowski, J. (1989). Vortrag VAAM-Tagung 1989, Marburg

Kase, H., Nakayama, K. (1972). Production of L-threonine by analog resistent mutants. *Agric Biol Chem* 36: 1611-1621

Kase, H., Nakayama, K. (1977). L-isoleucine production by analog resistent mutants derived from threonine producing strains of *C.glutamicum*. *Agric Biol Chem* 41: 109-116

Katsumata, R., Ozaki, A., Oka, T., Furuya, A. (1984). Protoplast transformation of glutamate-producing bacteria with plasmid-DNA. *J Bact* 159: 306-311

Kinoshita, S., Udaka, S., Shimino, M. (1957). Studies on the amino acid fermentation I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J Gen Appl Microbiol* 3: 193-205

Kinoshita, S. (1966). US Patent Nr. 3262861

Kisumi, M., Komatsubara, S., Chibata, I. (1977). Enhancement of isoleucine hydroxamate-mediated growth inhibition and improvment of isoleucine producing strains of Serratia marcescens. *Appl Environ Microbiol* 34: 647-653

Kiritani, K., Narise, S., Wagner, R.P. (1966). The Dihydroxy Acid Dehydratase of Neurospora crassa. *J Biol Chem* 241: 2042-2046

Kleemann, A., Leuchtenberger, W., Hoppe, B., Tanner, H. (1985). Amino acids. Ullman's Encyclopedia of industrial chemistry, *VCH Verlagsgesell.*, Weinheim A2: 57-97

Kono, M., Sasatsu, M., Aoki, T. (1983). R plasmids in Corynebacterium xerosis strains. *Agents Chemother* 23: 506-509

LaCara, F. and DeFelice, M. (1980). Chromotographic detection of the acetohydroxy acid synthase isoenzymes of Escherichia coli K-12. *Biochem Biopys Res Commun* 91: 319-326

Lawther, R.L., Hatfield, G. (1980). Multivalent translational controll of transcription termination at attenuator site of ilvGEDA operon of Escherichia coli K12. *Proc Natl Acad Sci* USA 77: 1862- 1866

Lawther, R.L., Calhoun, D.H., Adams, C.W., Hauser, C.A., Gray, J., Hatfield, G. (1981). Molecular basis of valine resistance in Escherichia coli K-12. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 922-925

Lawther, R.L., Wek, R.C., Pereira R., Taillon, B.E., Hatfield, G.W. (1987). The complete nucleotide sequence of the ilvGMEDAC operon of Escherichia coli K-12. *Nucl Acids Res* 2137-2155

Maniatis , T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

Marquez, G., Fernandez-Sousa J.M., Sanchez, F. (1985). Cloning and expression in E.coli of genes involved in the lysine biosynthethic pathway of Brevibacterium lactofermentum. *J Bact* 164: 379-383

Matsui,, K., Miwa, K., Sano, K. (1988). Cloning of a gene cluster of aroB, aroE, and aroL for aromatic amino acid biosynthesis in Brevibacterium lactofermentum, a glutamic acid producing bacterium. *Agric Biol Chem* 52:525-531

Martin, J.F. (1989). Molecular genetics of amino acid producing corynebacteria. S.Banmberg, I.Hunter, M.Rhodes (eds.) Society for General Microbiology Symposium 44. Cambridge University Press, 1989

Martin, J.F., Santamaria, R., Sandoval, H., Del Real, G., Mateos, L.M., Gil, J.A., Aguilar, A. (1987). Cloning systems in amino acid producing Corynebacteria. *Biotechn 5:* 137-146

Mateos, L.M., Del Real, G., Aguilar, A., Martin, J.F. (1987a). Cloning and expression in E.coli of homoderine kinase (thrB) gene from Brevibacterium lactofermentum. *Mol Gen Genet* 206: 361-367

Mateos, L.M., Del Real, G., Aguilar, A., Martin, J.F. (1987b). Nucleotide sequence of homoserine dehydrogenase (thrA) gene of Brevibacterium lactofermentum. *Nucleis Acids Res* 15: 3922

Matsushima, H., Mase, Y. (1973). Screening of microorganisms for production of L-isoleucine from D,L-2-hxdroxybutyric acid or D,L-2-Brombutyric acid. *J Ferment Technol* 54: 340-349

McCorkle, G.M., Leathers, T.D., Umbarger, H.E. (1978). Physical organization of the ilvEDAC genes of *Escherichia coli* strain K-12. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 89-93

McGilveray, D. and Umbarger, H.E. (1974). Regulation of transaminaseC synthesis in Escherichia coli: conditional leucine auxotrophy. *J Bact* 120: 715-723

Menkel, E., Thierbach, G., Eggeling, L., Sahm, H. (1989). Consequences of increased aspartate availability on lysine formation by a recombinant strain of Corynebacterium glutamicum and use of fumarate. *Appl Environ Microbiol* 55: 684-688

Miyajima, R., Shiio, I. (1972). Regulation of aspartat family amino acid biosynthesis in Brevibacterium flavuum. VI Effects of isoleucine and valine on threonine dehydratase activity and its formation. *J Biochem* 71: 951-960

Miwa, K., Matsui, K., Terabe, M., Ito, K., Ishida, M., Takagi, H., Nakamori, S., Sano, K. (1985). Construction of novel shuttle vectors and a cosmid vector for the glutamic acid-producing bacteria Brevibacterium lactofermentum and Corynebacterium glutamicum. *Gene* 39: 281-286

Morinaga, Y., Takagi, H., Ishida, M., Miwa, K., Sato, T., Nakamori, S., Sano, K. (1987). Threonine production by co-existence of cloned genes coding homoserine dehydrogenase and homoserine kinase in Brevibacterium lactofermentum. *Agric Biol Chem* 51: 93-100

Murray, N.E., Brammar, W.J., Murray, K. (1977). Lambdoid phages that simplify the recovery of in vitro recombinants. *Mol Gen Genet* 150: 53-61

Nakamori, S., Ishida, M., Takagi, H., Miwa, K., Ito, K., Sano, K. (1986). Coryneform bacteria carrying recombinant plasmids and their use in the fermentation of L-threonine and L-isoleucine *US Patent* Nr. 4601983

Nakamori, S., Ishida, M., Takagi, Ito, K., Miwa, K., Sano, K. (1987). Improved L-Threonine production by the amplification of the encoding homoserine dehydrogease in Brevibacterium lactofermentum. *Agric Biol Chem* 51: 87-91

Nargang, F.E., Subrahmanyam, C.S., Umbarger, H.E. (1980). Nucleotide sequence of ilvGEDA operon attenuator region of *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA 77: 1823-1827

O'Regan, M., Thierbach, G., Bachmann, B., Villeval, D., Lepage, P., Viret, J.-F., Lemoine Y. (1989). Cloning and nucleotide sequence of the phosphoenolpyruvate carboxylase-coding gene of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Gene* 77: 237-251

Ozaki. A., Katsumata, R., Oka, T., Furuya, A. (1985). Cloning of the genes concerned in phenylalanine biosynthesis in Corynebacterium glutamicum and its application to breeding of a phenylalanine producing strain. *Agric Biol Chem* 49: 2925-2930

Pereira, R.F., Ortuno, J.M., Lawther, R.P. (1988). Binding of integration host factor (IHF) to the ilvGpl promotor of the ilvGMEDA operon of Escherichia coli K12. *Nucleic Acids Res* 16: 5973-5989

Piggot, J.P., Hoch, J.A. (1985) Revised genetic linkage map of Bacillus subtilis. *Microbio Rev 49:* 158-179

Ratzkin, B., Arfin, S.M., Umbarger, H.E. (1972). Isoleucine and Valine Metabolism in Escherichia coli. XVIII. Induction of Acetohydroxy acid Isomeroreductase. *J Bact* 112: 131-141

Sameshima, J.H., Wek, R.C., Hatfield G.W. (1989). Overlapping Transcription and Termination of the convergent ilvA and ilvY genes of Escherichia coli. *J Biol Chem* 264, 1224-1231

Sano, K., Ito, K., Miwa, K., Nakamori, S. (1987). Amplification of Phosphoenol pyruvate carboxylase gene of Brevibacterium lactofermentum to improve amino acid production. *Agric Biol Chem* 51: 597-599

Santamaria, R.I., Gil, J.A., Mesas, J.M., Martin, J.F. (1984). Characterization of an endogenous plasmid and development of Cloning vectors and a transformation system in Brevibacterium lactofermentum. *J Gen Microbiol* 130: 2237-2246

Santamaria, R.I., Gil, J.A., Martin, J.F. (1985). High frequency transformation of Brevibacterium lactofermentum protoplasts by Plasmid DNA. *J Bact* 162: 463-467

Scheer, E. (1988). Untersuchungen zur L-Isoleucinbildung aus D,L 2-Hydroxybutyrat mit Corynebacterium glutamicum. *Dissertation* Universität Düsseldorf

Schäfer, A., Kalinowski, J., Simon, R., Seep-Feldhaus, A.-H., Pühler, A. (1989). High frequency conjugal plasmid transfer from Gram-negative Escherichia coli to various gram-positive coryneform bacteria. *J Bact* 172

Scheer, E., Cordes, Ch., Eggeling, L., H.Sahm (1987). Regulation of acetohydroxy acid synthase in Corynebacterium glutamicum during isoleucine formation from α-hydroxybutyric acid. *Arch Microbiol* 149: 173-174

Schloss, J.V., Van Dyke, D.E., Vasta, J.F., Kutny, R.M. (1985). Purification and properties of Salmonella typhimurium Acetolactate synthase Isoenzyme II from Escherichia coli HB101/pDU9. *Biochemisty* 24 4952-4959

Schuster, R. (1984). Automatic oncolumn derivatization of free amino acids with OPA on microbore columns. *HPLC Application Note*, Hewlett Packard GmbH, Waldbronn, FRG

Shiio, I., Mori, M., Ozaki, H. (1982). Amina acid aminotransferases in an amino acid producing bacterium, Brevibacterium flavum. *Agric Biol Chem* 46: 2967-2977

Smith, J.M., Smolin, D.E., and Umbarger, H.E. (1976). Polarity and the regulation of the ilv gene cluster in *Escherichia coli* strain K-12. *Mol Gen Genet* 148: 111-124

Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517

Squires, C.H., DeFelice, M., Devereux, J., Calvo, J. (1983). Molecular structure of ilvIH and its evolutionary relationship to ilv G in Escherichia coli K12. *Nucleic Acids Res* 11: 5299-5313

Squires, C.H., DeFelice, M., Lago, C.T., Calvo, J.M. (1983). ilvHI locus of Salmonella typhimurium. *J Bact* 154: 1054-1063

Steitz, J., Sprague, K., Steege, D., Yuan, R., Laughrea, M., Moore, P., Whaba, A. (1977). Nucleic Acids Protein Recognition, Vogel, H. (ed.), Academic Press New York: 491-508

Sternson, L.A., Stobaugh, J.F., Repta, A.J. (1985). Rational design and evaluation of improved o-phtalaldehyde-like fluorogenic reagents. *Anal Biochem* 144: 233-246

Stueber, D., Bujard H. (1981). *Proc Natl Acad Sci* USA 78: 167-171

Stueber, D., Bujard H. (1982). Transcription from efficient promoters can interfere with plasmid replication and diminish expression of plasmid specified genes. *EMBO J* 1:1399-1404

Thierbach, G., Schwarzer, A., Pühler, A. (1988). Transformation of spheroplasts and protoplasts of Corynebacterium glutamicum. *Appl Microbiol Biotechnol* 29: 356-362

Tosaka, O., Takinami, K. (1978). pathway and regulation of lysine biosynthesis in Brevibacterium lactofermentum. *Agri Biol Chem* 42: 95-100

Tsui, P., Freundlich, M. (1988). Integration host factor binds specifically to sites in the ilvGMEDA operon in Escherichia coli. *J Mol Biol* 203: 817-820

Tsuchida, T., Momose, H. (1975). Genetic changes in regulatory mechanisms occured in leucine and valine producing mutants derived from Brevibacterium lactofermentum 2256. *Agric Biol Chem* 39: 2193-2198

Ubben, D., Schmitt, R. (1986). Tn1721 derivatives for transposon mutagenesis, restriction mapping and nucleotide sequence analysis. *Gene* 41: 145-152

Umbarger, H.E., Brown, B. (1958). Isoleucine and valine matabolism in Escherichia coli VIII. The formation of acetolactate. *J Biol Chem* 233: 1156-1160

Umbarger, H.E. (1983). The biosynthesis of isoleucine and valine and its regulation. *Amino acids biosynthesis and genetic regulation*, Herman, K.M., Somerville, R.L. (eds.), Addison-Wesley Publishing company: 245-266

Umbarger, H.E. (1978). Amino acid biosynthesis and its regulation. *Annu Rev Biochem* 47: 533-606

Vandeyar, M.A. (1987). Studies on the ilvBNC genes of Bacillus subtilis. *Dissertation*, Cornell University, USA

Ward, J.B., Zahler, S.A. (1973). Genetic studies of leucine biosynthesis in Bacillus subtillis. *J Bact* 116: 716-726

Westerfeld, W.W. (1945). A colorimetric determination of blood acetoin. *J Biol Chem* 161: 495-502

Watson, M.D., Wild, J., Umbarger, H.E. (1979). Positiv control of ilvC expression in Escherichia coli K-12: Identification and mapping of regulatory gene ilvY

Wek, R.C., Hauser, C.A., Hatfield, G.W. (1983). The nucleotide sequence of ilvBN operon of Escerichia coli: sequence homologies of the acetohydroxy acid synthase isoenzymes. *Nucleic Acids Research* 13: 3995-4010

Wek, R.C., Hatfield, G.W. (1986). Nucleotide sequence and in vivo expression of the ilvY and ilvC genes in *Escherichia coli* K12. *J Biolog Chem* 261: 2441-2450

Wek, R.C., Hatfield, G.W. (1988). Transcriptional activation at adjacent operators in the divergent overlapping in ilvY and ilvC promoters of Escherichia coli. *J Mol Biol* 203: 643-663

Wilhelm, C., Eggeling, I., Nassenstein, A., Jebsen, C., Eggeling, L., Sahm, H. (1989). Limitations during hydroxybutyrate conversion to isoleucine with Corynebacterium glutamicum as analysed by the fpormation of by-products. *Appl Microbiol Biotechnol* 31: 458-462

Yanish-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985) Improved M13 phage vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119

Yeh, P., Oreglia, J., Prévots, F., Sicard, A.M. (1986). A shuttle vector system for Brevibacterium lactofermentum. *Gene* 47: 301-306

Yoshihama, M., Higashiro, K., Rao, E.A., Akedo, M., Shanabruch, W.G., Follettie, M.T., Walker, G.C., Sinskey, A.J. (1985). Cloning vector system for Corynebacterium glutamicum. *J Bact* 162: 591-597

Zeigler, D.R., Dean, D.H. (1985). Revised genetic map of *Bacillus subtilis* 168. FEMS Microbol Rev 32: 101-134

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie 1 der Kernforschungsanlage Jülich durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Sahm danke ich für die Überlassung des Themas, für die großzügige Unterstützung meiner Arbeit, seine stete Diskussionsbereitschaft und seine Anregungen.

Herrn Dr. Eggeling danke ich für die Betreuung dieser Arbeit, seine Hilfsbereitschaft und seine zahlreichen Ratschläge.

Bei Herrn Dr. Sprenger und Herrn Dr. Eikmanns möchte ich mich für ihre Hilfestellung bedanken.

Weiterhin gilt mein Dank Frau Karin Krumbach und Herrn Josef Engelmann für ihre Unterstützung.

Elke Menkel, Elisabeth Scheer und Bärbel Schrumpf bin ich sehr zu Dank verpflichtet für die angenehme Atmosphäre und sehr gute Zusammenarbeit in unserem Labor.

Für die photographischen Arbeiten möchte ich mich bei Herrn Peters und Frau Bräker bedanken.

Ebenfalls gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Instituts für Biotechnologie für ihre ständige Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Diese Arbeit wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Forschung und Technologie und der Degussa AG, Hanau, finanziert.