



Institut für Biotechnologie

***Der Lysinexportcarrier in
Corynebacterium glutamicum
Topologie und Regulation***

Anja Bellmann

***Der Lysinexportcarrier in
Corynebacterium glutamicum
Topologie und Regulation***

Anja Bellmann

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3755
ISSN 0944-2952
Institut für Biotechnologie Jül-3755
D 61 (Diss. Universität Düsseldorf, 2000)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
☎ 02461/61-6102 · Telefax: 02461/61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

The Lysine Export Carrier in *Corynebacterium glutamicum*

- Topology and Regulation -

The L-lysine export carrier LysE of the Gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* represents the first functionally analysed member of a new widespread superfamily of bacterial translocators. The results of *phoA* and *lacZ* fusion analysis of the topology of LysE suggest a unique topology for LysE. There is good evidence supporting a model in which LysE spans the cytoplasmic membrane five times with one additional hydrophobic domain which is most probably attached to the external side of the cytoplasmic membrane.

The putative regulator gene *lysG* is located adjacent to *lysE* and is divergently transcribed. Single-copy transcriptional fusions of *lysE* with *lacZ* show that LysG is a positive regulator of *lysE* expression enabling it to be induced up to 20-fold. This induction requires an inducer molecule. Using dipeptide feeding experiments intracellular L-lysine, L-arginine, L-citrulline and L-histidine were shown to act as inducers on the LysG-mediated *lysE* expression. While L-arginine and L-lysine are substrates of LysE this is not the case for L-histidine and L-citrulline. An *in vivo* experiment and gel shift studies provided evidence that LysG binds to the intergenic region of *lysE* and *lysG*. This region was delimited to 105 bp of this divergent promoter region of *lysE* and *lysG*.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
II. Material und Methoden.....	9
1. Bakterienstämme und Plasmide	9
2. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen	13
3. Molekulargenetische Methoden	16
3.1. Isolierung von DNA	16
3.2. Restriktion und Modifikation von DNA	17
3.3. Polymerase-Kettenreaktion	17
3.4. DNA-Sequenzanalyse	18
4. Transformationstechniken	19
4.1. Transformation von <i>E. coli</i>	19
4.2. Transformation von <i>C. glutamicum</i>	19
5. Topologieanalysen von LysE	20
5.1. <i>phoA</i> -Analyse	20
5.2. <i>lacZ</i> -Analyse	21
6. Bestimmung von Aminosäuren	21
6.1. Silikonölzentrifugation	21
6.2. <i>reversed phase</i> HPLC	22
7. Herstellung von Rohextrakten	22
8. Bestimmung der β -Galactosidaseaktivität	24
9. Gelretardationsexperimente	24
9.1. Digoxigenin-Markierung von DNA-Fragmenten	25
9.2. Bindereaktion	25
9.3. nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese	25
9.4. Blot	25
10. Isolierung von His-markiertem LysG-Protein	26
10.1. Aufreinigung von His-markiertem LysG	27
10.2. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Silberfärbung	28
10.3. Renaturierung von H ₆ -LysG	29
III. Ergebnisse	30
1. Die Topologie des Lysinexportcarriers ist neuartig	30

1.1. Untersuchung der Topologie mittels <i>phoA</i> -Analyse	30
1.2. Untersuchung der Topologie des N-terminalen Bereiches von LysE.....	34
1.3. Bestätigung der Topologie durch <i>lacZ</i> -Fusionsstudien	36
2. Die Regulation des Lysinexportcarriers	38
2.1. Der Lysinexportcarrier wird auf Transkriptionsebene durch den Aktivator LysG reguliert.....	38
2.2. Die <i>lysE</i> -Expression ist in Anwesenheit von LysG medienabhängig.....	42
2.3. Lysin ist der Induktor von LysG.....	44
2.4. Auch Arginin induziert die LysG-vermittelte <i>lysE</i> -Expression.....	50
2.5. Histidin und Citrullin induzieren die <i>lysE</i> -Expression, werden aber nicht durch den Lysinexportcarrier exportiert.....	52
2.6. Einbringen des intergenischen Bereichs von <i>lysE</i> und <i>lysG</i> in hoher Kopienzahl setzt die <i>lysE</i> :: <i>lacZ</i> -Expression in 13032 Δ EG GE' <i>lacZ</i> herab.....	54
2.7. LysG bindet am intergenischen Bereich von <i>lysE</i> und <i>lysG</i>	56
2.7.1. Gelretardationsanalyse unter Verwendung von <i>E. coli</i> -Rohextrakten	56
2.7.2. Gelretardationsanalyse unter Verwendung von <i>C. glutamicum</i> - Rohextrakten.....	58
2.7.3. Isolierung von His-markiertem LysG-Protein.....	60
3. LysG besitzt ein zweites Target.....	64
IV. Diskussion	66
1. Die Topologie des Lysinexportcarriers LysE.....	66
2. Der Regulator des Lysinexportcarriers.....	70
3. Modell der LysG-vermittelten Regulation der <i>lysE</i> -Expression.....	75
V. Zusammenfassung.....	78
VI. Literaturverzeichnis	79
VII. Anhang.....	94

Abkürzungen

aa	Aminosäuren
Abb.	Abbildung
ABS	"Activation Binding Site"
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
Arg-Ala	Arginylalanin-Dipeptid
ATCC	American type culture collection
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (XP)
bp	Basenpaar
C	Celsius
C-/N-Terminus	Carboxy-/Aminoterminus von Peptiden
Cit-Phe	Citrullinylphenylalanin-Dipeptid
Cm ^R	Chloramphenicol-Resistenz
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleotid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F	Farad
FBR	feedback resistant
g	Gramm
H ₆ -LysG	N-terminal mit sechs Histidinresten markiertes LysG
h	Stunde
His-Ala	Histidinyllalanin-Dipeptid
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HTH	Helix-Turn-Helix
IPTG	Isopropyl-β-thiogalactosid
kb	Kilobasen
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
Km ^R	Kanamycin-Resistenz
KPP	Kalium-Phosphatpuffer
kV	Kilovolt
l	Liter
LacZ	β-Galactosidase

LTTR	"LysR-Type-Transcriptional Regulator"
Lys-Ala	Lysylalanin-Dipeptid
M	Molarität
min	Minute
MOPS	3-[N-Morpholino]-propansulfonsäure
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsalz
nt	Nucleotide
OD ₆₀₀	Optische Dichte gemessen bei 600 nm
orf	offenes Leseraster
ONPG	Ortho-nitrophenyl-β-galactosid
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PhoA	alkalische Phosphatase
RBS	"Recognition Binding Site"
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS	Natrium/Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunden
ssp.	Subspezies
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tet ^R	Tetracyclin-Resistenz
Tg.	Trockengewicht
Thr-Ala	Threonylalanin-Dipeptid
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit der Enzymaktivität [μmol min ⁻¹ mg Protein ⁻¹]
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
(v/v)	Volumen pro Volumen
(v/w)	Volumen pro Masse
Xgal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-galactosid
XP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat

I. Einleitung

L-Lysin gehört zu den neun der 20 proteinogenen Aminosäuren, die für Säugetiere essentiell sind. Da diese Aminosäuren in vielen Pflanzenproteinen in vergleichsweise geringen Mengen vorkommen, stellen sie häufig den limitierenden Faktor in der Nahrung dar [Malumbres *et al.*, 1995]. Aus diesem Grund kommt ihnen eine große Bedeutung als Lebensmittel- und Futtermitteladditive zu [Malumbres *et al.*, 1995; Crueger & Crueger, 1990]. Die Jahresproduktion von L-Lysin liegt derzeit bei etwa 350 000 Tonnen [Leuchtenberger, 1996]. Dies erfolgt ausschließlich auf mikrobiellem Wege mit *Corynebacterium glutamicum*. *C. glutamicum* wurde 1957 von Kinoshita *et al.* aus Bodenproben isoliert. Es handelt sich bei diesem Eubakterium um ein Gram-positives, biotin-auxotrophes, unbewegliches Bakterium, das keine Sporen bildet und von stäbchen- bis keulenförmiger Gestalt ist. Sein namensgebendes Merkmal ist seine Fähigkeit zur Glutamatproduktion, die bereits mit Wildtypzellen bei Biotinmangel erfolgt [Kinoshita *et al.*, 1957]. Im Laufe der Zeit konnten auch Mutantenstämme isoliert werden, die zur effektiven L-Lysinproduktion geeignet sind [Kinoshita *et al.*, 1958, Shiio & Miyajima, 1969; Shiio & Sano, 1969].

Die Lysinbiosynthese in *C. glutamicum* ist sowohl genetisch als auch biochemisch weitestgehend aufgeklärt [Sahm, 1995; Eggeling & Sahm, 1999]. Sie erfolgt wie bei allen Prokaryoten als Teil der mehrfach verzweigten Biosynthese der Aminosäuren der Aspartatfamilie [Patte, 1996] (s. Abb. 1). In *C. glutamicum* stellt die Aspartatkinase das erste Enzym dar, das den Metabolitfluß in Richtung der Aminosäuren der Aspartatfamilie steuert. Im Gegensatz zu *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis*, die beide Aspartatkinase-Isoenzyme besitzen, die jeweils unterschiedlich reguliert werden [Chen *et al.*, 1987; Cohen & Saint-Girons, 1987; Graves & Switzer, 1990], gibt es in *C. glutamicum* nur eine Aspartatkinase. Diese wird durch das Gen *lysC* kodiert [Kalinowski *et al.*, 1991]. Die Aspartatkinase unterliegt einer konzertierten Endprodukthemmung durch L-Lysin und L-Threonin [Nakayama *et al.*, 1986]. Eine Regulation von *lysC* auf Transkriptionsebene, wie sie für *E. coli* beschrieben wurde [Richaud *et al.*, 1980], konnte für *C. glutamicum* nicht nachgewiesen werden [Cremer *et al.*, 1991]. Bereits die Überexpression des Gens für die Endprodukt-resistente Aspartatkinase, *lysC^{FBR}* [Kalinowski *et al.*, 1991], führt im Wildtyp zur Produktion von L-Lysin durch *C. glutamicum* [Cremer *et al.*, 1991]. Am Verzweigungspunkt der Biosynthese in Richtung L-Lysin bzw. L-Homoserin (s. Abb. 1) konkurrieren die Enzyme Dihydrodipicolinatsynthase (*dapA*) und Homoserin-

dehydrogenase (*hom*) um das gemeinsame Substrat Aspartatsemialdehyd. Die Homoserindehydrogenase von *C. glutamicum* wird analog zu den *E. coli* Isoenzymen [Truffi-Bachi *et al.*, 1968; Dautry-Varsat *et al.*, 1977] durch Threonin oder Isoleucin inhibiert [Miyajima & Shii, 1970] und durch Methionin reprimiert [Miyajima & Shii, 1971, Follettie *et al.*, 1988]. Die Reduktion der Homoserindehydrogenaseaktivität führt zu einem erhöhten Fluß in Richtung L-Lysin [Nakayama *et al.*, 1961; Shii & Sano, 1969; Bachmann *et al.*, 1992; Schäfer *et al.*, 1994; Fernandez-Gonzalez *et al.*, 1996]. Die Dihydrodipicolinatsynthase wird im Gegensatz zu dem *E. coli* Enzym [Richaud *et al.*, 1986] nicht reguliert [Cremer *et al.*, 1988]. Dennoch bedingt die Überexpression von *dapA*, sowohl im Wildtyp als auch in einem Stamm mit deregulierter Aspartatkinase, eine Steigerung der Lysinbildung [Cremer *et al.*, 1991; Eggeling 1996, 1998]. Dies zeigt, daß die Synthase an der Flußkontrolle beteiligt ist. Offensichtlich limitiert die Gesamtzymmenge den Fluß [Eggeling, 1994]. Neben dem *lysC^{FBR}*- und dem *dapA*-Gen ist bislang kein anderes Gen der Lysinsynthese bekannt, durch dessen Expression eine erhöhte Lysinproduktion erreicht werden kann [Cremer *et al.*, 1991].

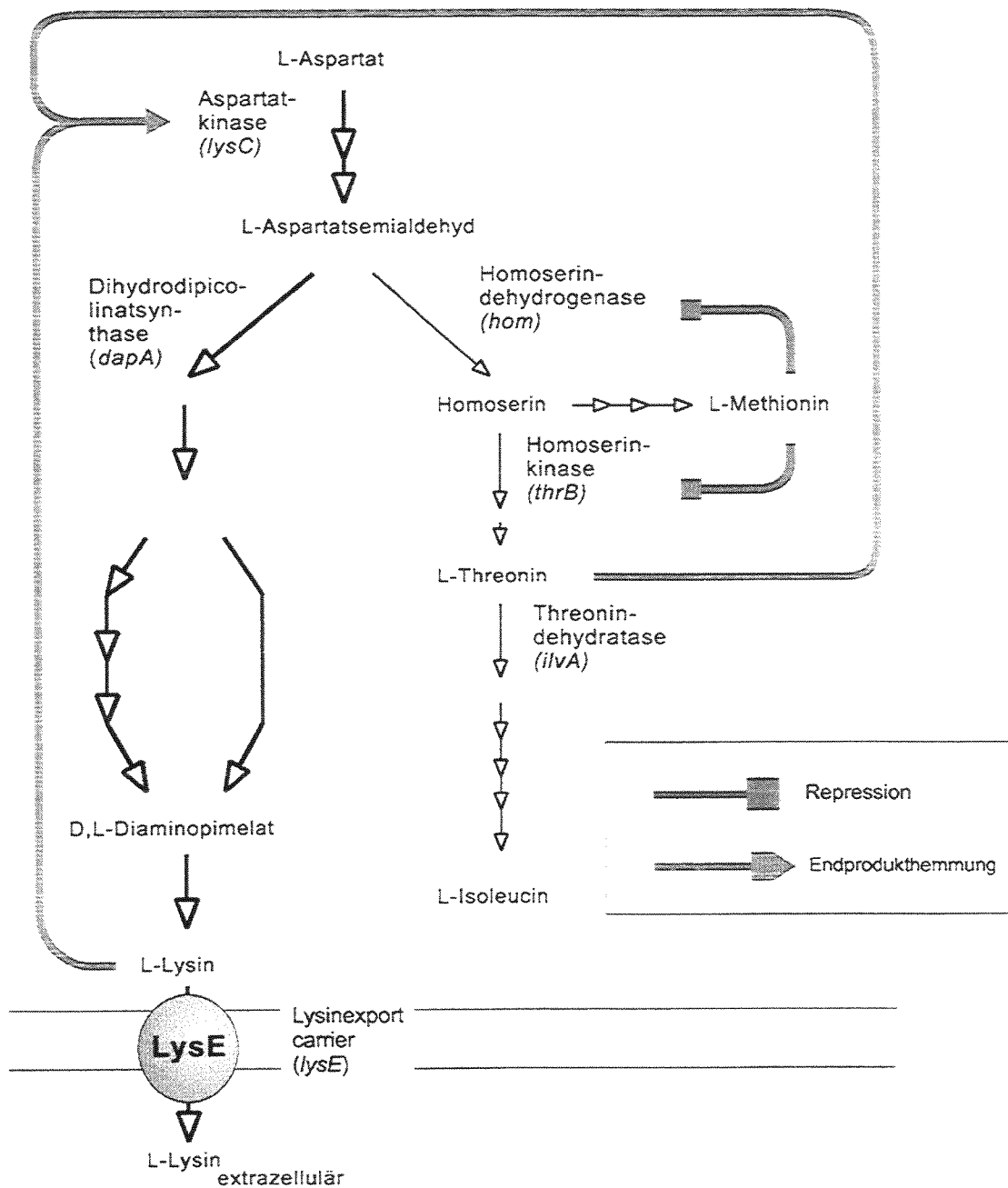


Abb. 1: Übersicht über die Biosynthese von L-Lysin und die der weiteren Aminosäuren der Aspartatfamilie in *Corynebacterium glutamicum*. Gezeigt ist die Regulation auf Repressions- und Aktivitätsebene. Die Schlüsselschritte der L-Lysinsynthese werden durch die Aspartatkinase, die Dihydrodipicolinatsynthase und den Lysinexportcarrier katalysiert.

Zusätzlich zu den Kontrollmechanismen des L-Lysinbiosyntheseweges stellt auch die L-Lysinexkretion einen limitierenden Schritt für die L-Lysinproduktion dar (Abb. 1) [Schrumpf *et al.*, 1991; Bröer *et al.*, 1993]. Biochemische Analysen des L-Lysinefflux mit ganzen Zellen ergaben, daß der L-Lysinexport Carrier-vermittelt abläuft [Bröer & Krämer, 1991a; Erdmann *et al.*, 1993]. Dabei wird L-Lysin in einem sekundären Transportprozeß im Symport mit zwei Hydroxylionen oder im Antiport mit zwei Protonen exportiert [Bröer & Krämer, 1991b]. Als treibende Kraft dient das Membranpotential. Der L-Lysin- und der Protonengradient über die Membran modulieren die Transportaktivität. Im IBT1 gelang die Isolierung des für den Exportcarrier kodierenden Gens *lysE* [Vrljić *et al.*, 1996]. Damit wurde erstmals ein für den Export von Aminosäuren spezifischer Translokator molekular zugänglich. Dies ermöglichte die gezielte Steigerung der Lysinexportleistung von *C. glutamicum*. Da die Diffusion von L-Lysin aufgrund der geringen Diffusionskonstante von $k=1,9 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ vernachlässigbar ist, kommt dann dem durch den Lysinexportcarrier vermittelten Export eine große Bedeutung für die biotechnologische Lysinproduktion zu [Vrljić *et al.*, 1996]. Bereits die Überexpression von *lysE* im Wildtyp kann zu einer zehnfach erhöhten L-Lysinexkretionsrate führen [Vrljić *et al.*, 1996]. Die Exkretionsrate ist damit sogar höher als die des durch ungerichtete Mutagenese entstandenen L-Lysinproduktionsstammes MH20-22B. Neben den Genen für Aspartatkinase und Diaminopimelatdecarboxylase steht mit dem Lysinexportcarriergen *lysE* ein drittes Zielgen zur Verfügung, dessen Überexpression eine verstärkte Lysinproduktion zur Folge hat.

Der Lysinexportcarrier *LysE* besitzt die Funktion, durch den Export von L-Lysin die cytosolische Konzentration dieser Aminosäure zu regulieren. Die physiologische Notwendigkeit dieses Exporters zeigte sich bei Experimenten mit *lysE*-Defektmutanten von *C. glutamicum* [Vrljić, 1997]. Bei Wachstum in Anwesenheit L-Lysin-haltiger Dipeptide kommt es in dieser Mutante zu einer internen Lysinakkumulation. So werden bei einer externen Lysylalaninkonzentration von 1 mM, intern Konzentrationen von mehr als 1 M L-Lysin erreicht, was zu einer Wachstumshemmung führt. Da *C. glutamicum* L-Lysin nicht abbauen kann, dient der Exporter unter Bedingungen, in denen es zu einer internen L-Lysinakkumulation kommt, folglich der Kontrolle der intrazellulären L-Lysinkonzentration [Vrljić *et al.*, 1996]. Diese neue Funktion eines Carriers könnte im natürlichen Habitat von *C. glutamicum* relevant sein. *C. glutamicum* ist ein Bodenbakterium und es ist denkbar, daß der Organismus dort gelegentlich mit Peptiden konfrontiert wird, die aufgenommen werden, um an die wertvollen Aminosäurebausteine zu gelangen [Erdmann *et al.*, 1993].

Neben der neuartigen Funktion ist auch die abgeleitete Polypeptidsequenz des Lysinexportcarriers neuartig. Der Carrier ist zwar biochemisch als sekundärer Carrier charakterisiert [Bröer & Krämer, 1991a], weist aber weder auf molekularer noch auf struktureller Ebene Ähnlichkeiten zu einer der 12 bekannten Transporter-Superfamilien auf [Saier, 1994; Saier *et al.*, 1994; Paulsen *et al.*, 1996]. Hinsichtlich Hydrophobizität, Länge und konservierten Aminosäureresten stellt LysE einen neuen Translokatorotyp dar [Vrljić *et al.*, 1996, 1999; Zakataeva *et al.*, 1999]. Aufgrund der neuartigen Funktion und Struktur wurde LysE als erstes Mitglied einer neuen Proteintranslokatorfamilie identifiziert [Vrljić *et al.*, 1996]. Mittlerweile konnten im Rahmen der Genomsequenzierung zahlreiche Proteine bisher noch unbekannter Funktion dieser Familie zugeordnet werden [Vrljić *et al.*, 1996, 1999; Aleshin *et al.*, 1999; Zakataeva *et al.*, 1999]. Der Sequenzvergleich dieser Proteine ergab, daß alle Mitglieder nicht nur durch eine ähnliche Größe und ein ähnliches Hydrophobizitätsprofil charakterisiert sind, sondern auch gleiche Sequenzmotive besitzen [Aleshin *et al.*, 1999]. Die LysE-Familie gehört mit der RhtB-Familie und der CadD-Familie zur LysE-Superfamilie [Vrljić *et al.*, 1999]. Die funktionell charakterisierten Proteine dieser Superfamilie sind wahrscheinlich alle am Export von Substanzen, wie Cadmium und quarternären Aminen [Chaouni *et al.*, 1996], beteiligt. Mit verschiedenen Computerprogrammen konnten zwei verschiedene Topologievorschlüsse zu LysE erarbeitet werden, die in Abbildung 2 dargestellt sind. Diese sind aber weder untereinander, noch mit gängigen Vorstellungen zur Verteilung geladener Aminosäurereste [v. Heijne, 1986] oder Flexibilität von Proteinregionen [Brooks *et al.*, 1985] in Einklang zu bringen. So ergeben die Vorhersagen, daß LysE sechs oder sieben transmembrane Helices besitzt [Vrljić *et al.*, 1996]. Bestenfalls bezüglich der Größe von LysE (236 Aminosäurereste) bestehen Ähnlichkeiten zu den Translokatoren der Mitochondrial Carrier Familie [MCF, Kuan & Saier, 1993], die ebenfalls sechs transmembrane Helices besitzen und durchschnittlich 500 Aminosäurereste umfassen. Eine ähnliche Größe und ebenfalls sechs transmembrane Domänen besitzen auch die Translokatoren der Major Intrinsic Protein Familie [MIP, Saier, 1994]. Aber auch zu diesen Proteinfamilien besitzt LysE keinerlei Ähnlichkeit auf Primärstrukturebene. Datenbankvergleiche von LysE mit bekannten Translokatoren ergaben keinerlei Ähnlichkeit zu Proteinen bekannter Funktion. Lediglich abgeleitete Aminosäuresequenzen von Proteinen unbekannter Funktion aus *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Mycobacterium tuberculosis* und *Helicobacter pylori* wiesen eine hohe Ähnlichkeit zu LysE auf. Die höchste Ähnlichkeit besteht mit 31% identischen und

52% ähnlichen Aminosäureresten zu dem Protein unbekannter Funktion Ygga aus *E. coli*. Geringe Ähnlichkeiten bestehen auch zu den kürzlich charakterisierten, am Threonin- bzw. Homoserin/Homoserinlactonefflux beteiligten Proteinen RhtC [Zakataeva *et al.*, 1999] und RhtB [Aleshin *et al.*, 1999] aus *Escherichia coli*. Wegen der ungewöhnlichen Struktur und der weiten Verbreitung LysE-ähnlicher Carrier, war es ein Ziel dieser Arbeit die Topologie des Carriers experimentell zu untersuchen.

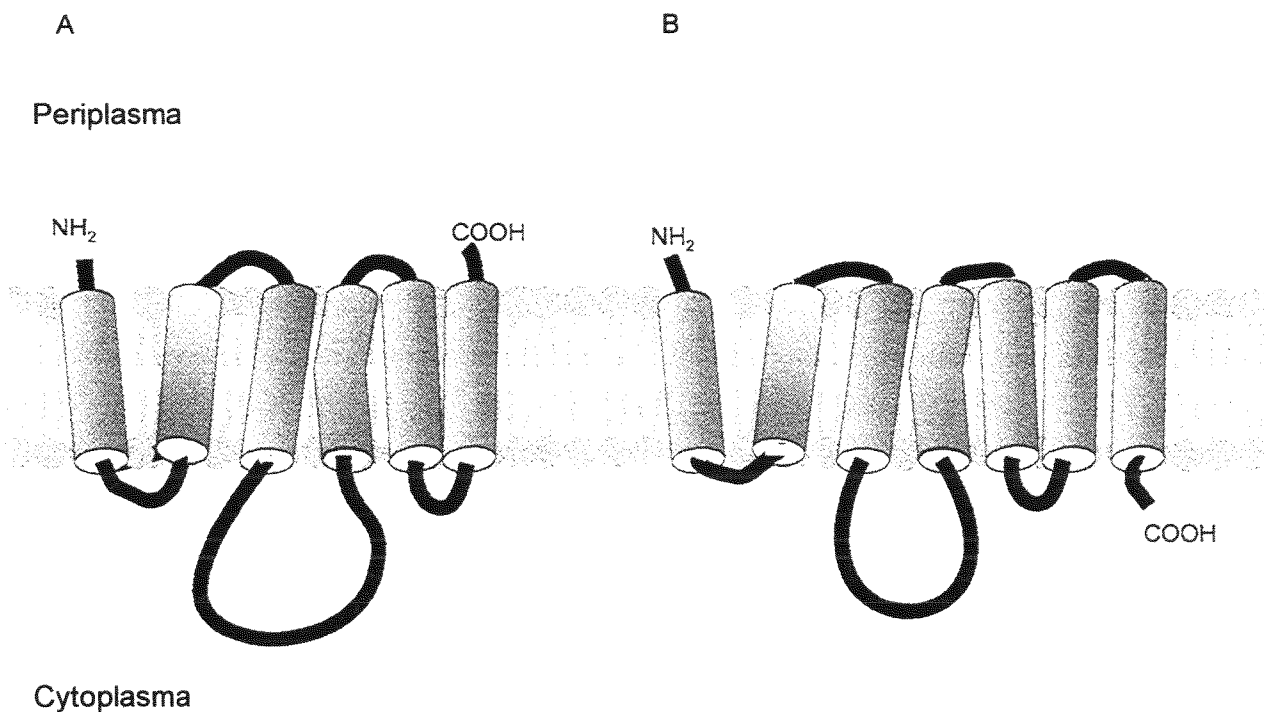


Abb. 2: Computervorhersagen zur Topologie von LysE. In (A) ist das 6-Helix-Modell nach dem Programm Phd.htm [Rost *et al.*, 1995] und in (B) das mittels des Programmes TMP entwickelte 7-Helix-Modell von LysE dargestellt.

Bei der Identifizierung und Isolierung von *lysE* wurde stromaufwärts von *lysE* ein weiteres Gen entdeckt, das wahrscheinlich einen Regulator des Lysinexportcarriergens kodiert. Das abgeleitete Polypeptid dieses *lysG*-Gens weist hohe Ähnlichkeiten zu Regulatoren der "LysR-Type-Transcriptional Regulator"-Familie (LTTR) auf [Henikoff *et al.*, 1988,

Schell, 1993]. Diese Regulatoren sind in Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien weit verbreitet [Schell, 1993]. Ihre Gene liegen sehr häufig, wie es auch bei *lysG* der Fall ist, direkt benachbart zum Zielgen und werden meist divergent zu diesem transkribiert. Der Regulator selbst besitzt üblicherweise drei charakteristische Domänen, die auch bei *LysG* erkannt wurden. Besonders stark konserviert ist die N-terminale DNA-Bindedomäne, die das charakteristische Helix-Turn-Helix-Motiv (HTH-Motiv) enthält. So liegt die Identität in diesem Bereich zwischen dem Aktivator der *dnaA*-Transkription *IciA* aus *E. coli* und *LysG* bei über 60 %. Die zweite konservierte Domäne liegt im zentralen Bereich des Regulators und ist an der Induktorerkennung und –antwort beteiligt [Schell, 1993]. Die im C-terminalen Bereich lokalisierte Domäne ist vermutlich essentiell für die Multimerisierung der LTTRs, die meist als Di- oder Tetramere aktiv sind [Schell, 1993]. Neben der Ähnlichkeit auf Primärstrukturebene besitzt *LysG* mit 290 Aminosäureresten auch die für einen LTTR typische Größe (276-324 aa) [Schell, 1993]. Für eine Regulation des Lysinexportcarriers auf transkriptionaler Ebene spricht desweiteren, daß stromaufwärts des *lysE*-Transkriptionsstarts die partiell palindromische Region ACTN₇AGT (-75 bp → -62 bp) lokalisiert ist, welche als typische Erkennungssequenz zur Bindung eines LTTRs dienen kann [Schell, 1993]. Ferner weist *LysG* mit nur sieben Lysinresten und 24 Argininresten die sogenannte Lys/Arg-Anomalie auf, die typisch für LysR-Typ-Regulatoren ist [Viale *et al.*, 1991]. Diese Anomalie besteht darin, daß fast alle LTTRs einen deutlich reduzierten Lysingehalt und einen erhöhten Arginingehalt im Vergleich zu anderen prokaryotischen Proteinen besitzen [Viale *et al.*, 1991]. Möglicherweise begünstigt der erhöhte Arginingehalt die Funktion der LTTRs, indem die Guanidiniumgruppe von L-Arginin zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Phosphatrückgrad der DNA eingeht.

Die Mitglieder der LTTR-Familie regulieren Gene, deren Genprodukte unterschiedlichste Funktionen ausüben. So regulieren die Transkriptionsaktivatoren CatR und ClcR aus *Pseudomonas putida* sowie weitere LTTRs [McFall *et al.*, 1997, McFall *et al.*, 1998; Junker *et al.*, 1997; Paradkar *et al.*, 1998] Operons und Gene, deren Genprodukte am Abbau von Aromaten beteiligt sind. Andere LTTRs regulieren wie das namensgebende Mitglied der LTTR-Familie LysR [Stragier *et al.*, 1983], Gene der Aminosäurebiosynthese [Wek *et al.*, 1986; Plamann & Stauffer, 1987] bzw. wie z.B. GcvA aus *E. coli* Gene des Aminosäureabbaus [Jourdan & Stauffer, 1998]. Andere wiederum kontrollieren die Transkription von Genen, deren Genprodukte an der Antibiotikasyntese beteiligt sind

[Nowak-Thompson *et al.*, 1999; Martínez-Costa *et al.*, 1999] oder für Virulenzfaktoren kodieren [Harris *et al.*, 1998; Sheehan & Dorman, 1998; Watnik *et al.*, 1998]. Erst ein einziger Regulator der LTTR-Familie ist bislang bekannt, der die Expression eines Translokatorgens kontrolliert. Dies ist der NhaR-Regulator aus *E. coli* [Dover *et al.*, 1996; Rahav-Manor *et al.*, 1992]. NhaR aktiviert die Transkription des *nhaA*-Gens, das den Na⁺/H⁺-Antiporter NhaA in *E. coli* kodiert. Für dieses System ist auch gezeigt worden, daß Na⁺ die NhaR-vermittelte Expression von *nhaA* induziert [Dover *et al.*, 1996].

Zahlreiche Mitglieder der LTTR-Familie sind mittlerweile untersucht worden. Bei den meisten handelt es sich um negativ autoregulierte Transkriptionsaktivatoren ihrer Zielgene [Christman *et al.*, 1989; Schell, 1993; Parsek *et al.*, 1994]. Bis auf wenige Ausnahmen [Muse & Bender, 1999] benötigen sie zur Steigerung der Transkription ihres Zielgens die Anwesenheit eines Induktormoleküls [Schell, 1993; Spaink *et al.*, 1989; Suominen *et al.*, 1999]. Auch bei einigen Transkriptionsregulatoren, die zu anderen Regulatorfamilien gehören, stellt die zu transportierende Substanz gleichzeitig das Induktormolekül dar. So wird die MerR vermittelte Expressionskontrolle der Schwermetall-detoxifizierenden Systeme Gram-negativer Bakterien durch Hg²⁺ induziert [Summers, 1992]. Entsprechend könnte L-Lysin als Induktor von LysG wirken. Dies würde die L-Lysinexkretion nur bei zellinterner L-Lysinakkumulation gewährleisten und damit verhindern, daß das normalerweise aufwendig synthetisierte L-Lysin exportiert wird. Der Regulator LysG könnte neben dem Lysinexportcarrier ein weiteres neues Target zur Steigerung der Lysinproduktion darstellen.

Ziel dieser Arbeit war, neben der Analyse der Topologie des Lysinexportcarriers, insbesondere die Untersuchung der Regulation des Lysinexportcarriergens auf molekularer und zellulärer Ebene. Es sollte untersucht werden, ob LysG die Expression des Carriergens steuert und in welcher Weise diese Kontrolle erfolgt. Dies sollte mit Hilfe verschiedener *lysE*/*lacZ*-Transkriptionsfusionen erfolgen, um zusammen mit biochemischen Methoden die *lysE*-Expression in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern zu quantifizieren. Dadurch sollte ein vertieftes Verständnis zur Regulation und Funktion des *lysE*, *lysG*-Systems gewonnen werden.

II. Material und Methoden

1. Bakterienstämme und Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 1, die verwendeten Plasmide in Tabelle 2 aufgeführt.

Tab. 1: Verwendete Bakterienstämme und ihre Eigenschaften

Bakterienstamm	Genotyp /Phänotyp	Referenz
<i>E. coli</i>		
CC118	<i>araD139 Δ(ara, leu)7697 ΔlacX74 phoAΔ20 galE galK thi rpsE rpoB argE_{am} recA1</i>	Manoil & Beckwith, 1985
DH5αMCR	<i>endA1 supE44 thi-1 λ⁻ recA1 gyrA96 relA1 deoR Δ(lacZYA-argF) U196φ80dlacZΔM15 mcrA Δ(mrr hsdRMS mcrBC)</i>	Grant <i>et al.</i> , 1989
M15	K12 Derivat, NaI ^S Str ^S Rif ^S Lac ⁻ Ara ⁻ Gal ⁻ Mtl ⁻ F ⁻ RecA ⁺ Uvr ⁺ Lon ⁺	Qiagen, Hilden
S17-1	<i>thi-1 F⁻ endA1 hsdR17 supE44 λ⁻ pro</i>	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>C. glutamicum</i>		
ATCC 13032	Wildtyp	Abe <i>et al.</i> , 1967
13032 ΔEG	Deletion eines 1236bp <i>StuI-MluI</i> - Fragmentes mit größtem Teil der Gene <i>lysG, lysE</i>	Vrljić <i>et al.</i> , 1996
13032 ΔEG GE' <i>lacZ</i>	pEMdppcGE' <i>lacZ</i> in das Chromosom von 13032 ΔEG stromabwärts des <i>ppc</i> Gens integriert	diese Arbeit
13032 ΔEG G ^{NarI} E' <i>lacZ</i>	pEMdppcG ^{ΔNarI} E' <i>lacZ</i> in das Chromosom von 13032 ΔEG stromabwärts des <i>ppc</i> Gens integriert	diese Arbeit

Tab. 1: Verwendete Bakterienstämme und ihre Eigenschaften (Fortsetzung)

Bakterienstamm	Genotyp /Phänotyp	Referenz
MH20-22B	<i>lysC</i> ^{FBR} , <i>leuCD</i>	Schrumpf <i>et al.</i> , 1992
MH20-22B <i>GE'lacZ</i>	pEMGE <i>lacZ</i> in das Chromosom von MH20-22B stromabwärts des <i>ppc</i> Gens integriert	diese Arbeit
LE4	Derivat von MH20-22B, Wildtyp <i>lysC</i>	Schrumpf <i>et al.</i> , 1992
LE4 <i>GE'lacZ</i>	pEMGE <i>lacZ</i> in das Chromosom von LE4 stromabwärts des <i>ppc</i> Gens integriert	diese Arbeit

Tab. 2: Verwendete Plasmide mit ihren Eigenschaften und Markern

Plasmide	Marker / Eigenschaften	Referenz
pUC18	<i>bla lacZ</i> α oriV _{E. coli}	Vieira & Messing, 1982
pUC18GE	pUC18:: <i>lysG lysE</i>	Vrljić <i>et al.</i> , 1996
pSPORT <i>lysE</i>	<i>bla lysE</i> oriV _{E.c}	Vrljić <i>et al.</i> , 1996
pPA4	<i>phoA bla</i> oriV _{E.c}	Meens, IBT1
pEA29	pPA4:: <i>lysE'phoA bla</i> oriV _{E.c} . die Nummer gibt den Aminosäurerest von LysE an, an den die alkalische Phosphatase in der resultierenden LysE'PhoA-Fusion fusioniert ist	diese Arbeit
pEA33		
pEA37		
pEA40		
pEA59		
pEA67		
pEA75		
pEA99		
pEA111		
pEA113		
pEA143		
pEA154		
pEA164		

Tab. 2: Verwendete Plasmide mit ihren Eigenschaften und Markern (Fortsetzung)

Plasmide	Marker / Eigenschaften	Referenz
pEA171	pPA4:: <i>lysE'</i> <i>phoA bla</i> oriV _{E.c.} die Nummer gibt den Aminosäurerest von LysE an, an den die alkalische Phosphatase in der resultierenden LysE'PhoA-Fusion fusioniert ist	diese Arbeit
pEA183		
pEA211		
pEA236		
pSWFIII	<i>phoA bla</i> oriV _{E.c.}	Ehrmann <i>et al.</i> , 1990
pSWFIII40/67	pSWFIII:: <i>lysE'</i> <i>phoA</i>	diese Arbeit
pGP21, 22, 23	Tet ^R ' <i>lacZ</i> oriV _{E.coli}	Haardt & Bremer, 1996
pGPEZ67	pGP21, 22, 23:: <i>lysE'</i> <i>lacZ</i> die Nummer gibt den Aminosäurerest von LysE an, an den die β -Galactosidase in der resultierenden LysE'LacZ-Fusion fusioniert ist	diese Arbeit
pGPEZ111		
pGPEZ211		
pEM1dppc	Integrationsvektor Km ^R oriV _{E.c.} oriV _{Cg} <i>dppc</i>	Vašíková <i>et al.</i> , 1998
pEMGE' <i>lacZ</i>	pEMdppc:: <i>lysGlysE'</i> <i>lacZ</i> -Genkassette	diese Arbeit
pEMG ^{ΔNarI} E' <i>lacZ</i>	pEMGE' <i>lacZ</i> -Genkassette aus der die zentralen 739 nt von <i>lysG</i> durch NarI-Restriktion deletiert sind	diese Arbeit
pJC1	Pendelvektor Km ^R oriV _{E.c.} oriV _{Cg.}	Cremer <i>et al.</i> , 1990
pVWEX2	Pendelvektor, induzierbar in <i>C. glutamicum</i> Tet ^R <i>lacI</i> ^Q <i>tac</i> Promotor oriV _{E.c.} oriV _{Cg.}	Wendisch, 1997
pEKEx2	Expressionsvektor, Km ^R <i>tac</i> Promotor oriV _{E.c.} oriV _{Cg.}	Eikmanns <i>et al.</i> , 1991

Tab. 2: Verwendete Plasmide mit ihren Eigenschaften und Markern (Fortsetzung)

Plasmide	Marker / Eigenschaften	Referenz
pJC/lysGE	pJC1::2,4kb <i>Bam</i> HI-Insert, das <i>lysG</i> und <i>lysE</i> enthält	Vrljić <i>et al.</i> , 1996
pVWEx2'EG'	pVWEx2::455 bp Fragment, das 155 bp von <i>lysG</i> und 239 bp von <i>lysE</i> sowie den intergenischen Bereich von <i>lysEG</i> umfaßt	diese Arbeit
pEC-T18mob	Tet ^R <i>lacZ</i> α <i>mob</i> oriV _{Ec} oriV _{Cg}	Kirchner, Degussa
pEC-T18GE'lacZ	pEC-T18::GE'lacZ	diese Arbeit
pEC-T18lysG	pEC-T18GE'lacZ aus dem <i>lysE'</i> lacZ mittels Restriktion mit <i>Sca</i> I und <i>Aat</i> II vollständig deletiert worden	diese Arbeit
pREP4	Km ^R <i>lacI</i> oriV _{E. coli}	Qiagen, Hilden
pQE31	Amp ^R Region, die für 6xHis kodiert, T5-Promotor mit zwei <i>lac</i> Operator Sequenzen; ermöglicht N-terminale His-Markierung von Proteinen	Qiagen, Hilden
pQE31NG	pQE31::lysG	diese Arbeit
pQE70	Amp ^R Region, die für 6xHis kodiert, T5-Promotor mit zwei <i>lac</i> Operator Sequenzen Amp ^R Region, die für 6xHis kodiert, T5-Promotor mit zwei <i>lac</i> Operator Sequenzen; ermöglicht C-terminale His-Markierung von Proteinen	Qiagen, Hilden

Tab. 2: Verwendete Plasmide mit ihren Eigenschaften und Markern (Fortsetzung)

Plasmide	Marker/Eigenschaften	Referenz
pQE70CG	pQE70::lysG	diese Arbeit

2. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

Nährmedien für *E. coli*

Zur Kultivierung der *E. coli*-Stämme, sowie für anschließende DNA-Isolierung und Gewinnung von Rohextrakten für die Gelretardationsanalyse bzw. zur Anzucht *one step* kompetenter Zellen [Chung *et al.*, 1989] wurde das Vollmedium LB verwendet [Sambrook *et al.*, 1989]. Die Anzucht zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen nach der RbCl-Methode erfolgte auf SOB-Medium [Hanahan, 1985]. Nach der Transformation wurden die Zellen in das Regenerationsmedium SOC [Hanahan, 1985] überführt.

Nährmedien für *C. glutamicum*

Sowohl zur Stammhaltung als auch für die DNA-Isolierung wurde das Vollmedium LB verwendet. Als Vorkulturmedium zur Messung des Histidin- und Citrullinexportes wurde das Vollmedium BHI (Brain Heart Infusion, Difco Laboratories, Detroit, USA) eingesetzt. Als weiteres Vollmedium wurde das für *C. glutamicum* optimierte CGIII-Medium [Kase & Nakayama, 1972] verwendet. Zur Bestimmung von internen Aminosäurekonzentrationen wurden die entsprechenden Stämme in Minimalmedium CGXII [Keilhauer *et al.*, 1993] unter Zusatz von Dipeptiden bzw. L-Methionin kultiviert. Die Verwendung von CGXII ist aufgrund der guten Pufferung des Mediums durch 3-[N-morpholino]-propansulfonsäure (MOPS) von Vorteil. Die Kultivierungen zur anschließenden Bestimmung der spezifischen β -Galactosidaseaktivität der *E'lacZ*-Fusionsstämme erfolgte entweder in BHI oder aber in CGXII. Zur Herstellung von Rohextrakten, die für die Gelretardationsexperimente eingesetzt wurden, erfolgte die Anzucht der Zellen auf BHI.

Medienzusätze

Der Phänotyp von Stämmen, die eine *lysE'**phoA*-Fusion enthielten, wurde auf Festmedium mit 40 µg/ml 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (XP) getestet, der von Stämmen mit *lysE'**lacZ*-Fusionen auf Festmedium mit 40 µg/ml 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosid (Xgal). Die Erhöhung der internen Lysinkonzentration erfolgte bei *C. glutamicum* Stämmen mit Endprodukt-regulierter Aspartatkinase durch Zugabe von bis zu 5 mM L-Methionin zum Minimalmedium [Vrljić *et al.*, 1995] bzw. durch Zusatz des Dipeptides Lysylalanin in Konzentrationen bis zu 2 mM (s. Ergebnisteil) [Erdmann *et al.*, 1993]. Eine interne Akkumulation von L-Arginin, L-Threonin, L-Histidin in *C. glutamicum* wurde erzielt durch Kultivierung der Zellen in Minimalmedium mit bis zu 2 mM des entsprechenden Arginyl-, Threonyl- bzw. Histidinyllalanin-Dipeptides. Durch Zusatz von bis zu 2 mM Citrullinylphenylalanin zum Minimalmedium wurde spezifisch die interne Citrullinkonzentration erhöht. Zur Expression von Genen, die unter Kontrolle IPTG-induzierbarer Promotoren vorlagen, wurde den Medien, sofern nicht anders angegeben, 1 mM IPTG zugesetzt.

Zur Selektion rekombinanter *E. coli* Stämme wurden 50 mg l⁻¹ Carbenicillin, 50 mg l⁻¹ bzw. 10 mg l⁻¹ Tetracyclin eingesetzt. Die Selektion Kanamycin-resistenter *C. glutamicum* Stämme erfolgte mit 25 mg l⁻¹ bei Transkonjuganden, die die *GE'**lacZ*-Genkassette in *single copy* enthielten, ansonsten mit 50 mg l⁻¹. Nach Elektroporation und Konjugation enthielt das Medium nur 15 mg l⁻¹ Kanamycin. Tetracyclin-resistente *C. glutamicum* Stämme wurden durch Selektion mit 5 mg l⁻¹ Tetracyclin identifiziert. Nach Konjugation enthielt das Medium zusätzlich zu den entsprechenden Antibiotika Nalidixinsäure, um das Wachstum der *E. coli* Donorzellen zu verhindern.

Kultivierung der Bakterien

Für Plasmidisolierungen im kleineren Maßstab wurden 5 ml Vollmedium im Reagenzglas verwendet. Zur Herstellung von kompetenten *C. glutamicum* Zellen wurde *C. glutamicum* in 500 ml Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen in 100 ml Nährmedium kultiviert. Zur Regeneration nach Elektroporation von *C. glutamicum* wurde LBHIS (BHI mit 0,5 M Sorbit) verwendet. Für Plasmidisolierungen im größeren Maßstab und zur

Quantifizierung der Aminosäurekonzentration in Langzeitversuchen erfolgte die Kultivierung der *E. coli* bzw. *C. glutamicum* Zellen in 500 ml Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen, die je nach Verwendungszweck 100 ml Vollmedium bzw. 50 oder 100 ml Minimalmedium enthielten. *C. glutamicum* Kulturen wurden über Nacht auf CGXII-Minimalmedium vorkultiviert, einmal mit eiskaltem Minimalmedium gewaschen, und dann in auf 30°C vorgewärmtes Minimalmedium übertragen. Das Minimalmedium enthielt jeweils die für die Fragestellung notwendigen Zusätze (s. Medienzusätze). Wurden dem Medium Dipeptide oder L-Methionin zugesetzt, so wurde eine anfängliche Zelldichte von $OD_{600}=2$ eingestellt. Die Probennahme erfolgte unter sterilen Bedingungen, sofern nicht anders angegeben, über einen Zeitraum von acht Stunden. Zur Messung der internen und externen L-Histidin- bzw. L-Citrullinkonzentration wurde eine modifizierte Form der Kurzzeitfermentation nach Hoischen und Krämer [1989] verwendet. Dazu wurde zunächst eine CGXII-Vorkultur mit in 5 ml CGIII vorkultivierten Zellen, die zweimal mit eiskaltem CGXII gewaschen wurde, angeimpft. Nach 16 Stunden Inkubation dieser Vorkultur bei 30°C wurden die Zellen erneut zweimal mit eiskaltem CGXII gewaschen und das vorgewärmte CGXII-Medium mit einer Animpf- $OD_{600}=8-10$ beimpft. Das verwendete Hauptkulturmedium enthielt 2 mM Histidinyllalanin bzw. Citrullinylphenylalanin. Die Probennahme für die Bestimmung der internen und externen Aminosäurekonzentrationen erfolgte nach 1,5 min und anschließend alle 15 min über einen Zeitraum von 1,25 Stunden.

Zur Bestimmung der spezifischen β -Galactosidaseaktivität wurden die *C. glutamicum* Zellen entweder in BHI-Vollmedium angezogen oder bei Kultivierung in Minimalmedium zunächst in 5 ml Vollmedium (BHI) über Tag vorkultiviert und 50 ml auf 30°C vorgewärmtes Minimalmedium mit 1 ml der Vollmediumsvorkultur angeimpft. Nach Kultivierung über Nacht wurde das Minimalmedium für die Hauptkultur mit einer Animpf- $OD_{600}=2$ angeimpft. Dazu wurden Aliquots der Vorkulturen in der Minifuge RF (Heraeus Christ GmbH, Osterode am Harz) bei 4°C und 5000 Upm abzentrifugiert und zweimal mit eiskaltem Minimalmedium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in das auf 30°C vortemperierte Minimalmedium überführt. Die Inkubation von Kulturen in Reagenzgläsern erfolgte bei 200 Upm, alle übrigen Kulturen wurden bei 140 Upm auf der Rotationsschüttelmaschine inkubiert. Die Wachstumstemperatur betrug für *C. glutamicum* 30°C und für *E. coli* 37°C.

Für die Aufreinigung von His-markiertem LysG Protein wurden die Stämme M15 pREP4 pQE31NG (Expression von N-terminal His-markiertem LysG) bzw. M15 pREP4 pQE70CG (Expression von C-terminal His-markiertem LysG) in 10 ml LB mit 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin über Nacht vorkultiviert. Anschließend wurden entweder 30 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika mit 500 µl der Vorkultur oder aber, zur anschließenden Rohextraktgewinnung unter nicht-denaturierenden Bedingungen 100 ml Medium mit 1,7 ml Vorkultur beimpft. Bei Erreichen einer $OD_{600} = 0,6$ wurde die Expression des *h₆-lysG* durch Zusatz von 1 mM IPTG induziert und die Kultur weitere vier Stunden bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation mit 5000 Upm in der Minifuge RF (Heraeus Christ GmbH, Osterode am Harz) abgeerntet und entweder bei -70°C gelagert oder direkt weiter verarbeitet.

Zur Stammhaltung wurden Dauerkulturen angelegt, die aus 50 % (v/v) einer auf Komplexmedium angezogenen Übernachtskultur und 50 % (v/v) sterilem Glycerin bestanden. Aliquots dieser Zellsuspensionen wurden bei -20°C bzw. -70°C aufbewahrt und zum Animpfen von LB-Festmedium verwendet. Diese Stammhaltungsplatten wurden für 18 Stunden bei 37°C (*E. coli*) oder für 48 Stunden bei 30°C (*C. glutamicum*) inkubiert. Die anschließende Lagerung erfolgte bei 4°C. Die Platten wurden alle 14 Tage erneuert.

3. Molekulargenetische Methoden

3.1. Isolierung von DNA

Zur schnellen Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde die Methode der alkalischen Lyse [modifiziert nach Birnboim & Doly, 1979] verwendet. Die Isolierung größerer Mengen DNA mit höherer Reinheit, die anschließend zur Sequenzierung eingesetzt werden sollte erfolgte über das "Midi-Plasmid-Purification" Kit (Qiagen, Hilden). Die so gewonnene Plasmid-DNA ist frei von Phenolrückständen (wird bei dieser Methode der DNA-Isolierung nicht verwendet) und Salzen. Plasmid-DNA aus *C. glutamicum* wurde mittels eines modifizierten Protokolls zur alkalischen Lyse von *E. coli* isoliert [Schwarzer & Pühler, 1991].

3.2. Restriktion und Modifikation von DNA

Alle Techniken zur Restriktion, Phenol-Extraktion, Präzipitation, Klenow- oder alkalischer Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Ligationen wurden mit dem *rapid ligation kit* (Roche, Mannheim) in 5 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Sollten Ligationsansätze direkt nach *C. glutamicum* transformiert werden, so erfolgte die Ligation über Nacht bei 16°C unter Nutzung der Ligase des Bakteriophagen T4. Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten, die mittels Restriktionsenzymen oder PCR generiert wurden, erfolgte in 0,5 % bis 2 % TAE-Agarosegelen [Sambrook *et al.*, 1989]. Die Isolierung von DNA-Fragmenten, die für weitere Klonierungen benötigt wurden, aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des "Spin Extraktions" Kits (Machery-Nagel, Düren).

3.3. Polymerase-Kettenreaktion

Zur *in vitro*-Vervielfältigung von DNA-Fragmenten wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) [Mullis *et al.*, 1986] verwendet. Dazu wurden zwei komplementäre, konvergierende Oligonukleotide (*primer*) verwendet, die das zu amplifizierende Fragment einrahmen [Saiki *et al.*, 1988]. Durch einen sich wiederholenden Zyklus aus DNA-Denaturierung, *primer*-Bindung (*annealing*) und Kettenverlängerung wurde die exponentielle Zunahme des zu amplifizierenden Fragmentes erreicht. Die Verwendung der thermostabilen Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* ermöglichte das Fortlaufen der Zyklen, ohne daß nach jedem Denaturierungsschritt die DNA-Polymerase erneut zugesetzt werden mußte [Tindall & Kunkell, 1988]. Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten, die anschließend zur Konstruktion der *lysE' lacZ* bzw. *lysE' phoA*-Fusionen verwendet werden sollten, wurde der *high fidelity kit* (Roche, Mannheim) verwendet. Der in diesem Kit enthaltene Polymerasemix besteht aus der thermostabilen Taq-Polymerase und der Pwo DNA-Polymerase aus *Pyrococcus woesei* [Dabrowski & Kur, 1998]. Die Pwo-Polymerase besitzt eine 3'-5'-Exonuclease *Proofreading* Aktivität, wodurch die Fehlerhäufigkeit im Vergleich zur PCR, in der ausschließlich die Taq-Polymerase verwendet wird, herabgesetzt ist. Durch die Verwendung von Oligonucleotiden mit angehängten Restriktionsschnittstellen wurde die Klonierung der Amplifikationsprodukte erleichtert. Die verwendeten Primer sind im Anhang (Tabelle 6-10) aufgelistet. In einem 100 µl PCR-

Ansatz wurden folgende Reagenzien eingesetzt: je 500 ng *sense* und *anti sense primer*, 0,1 µg "Template"-DNA (pSPORT/*lysE*), 2 µl 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 10 µl 10 x "Expand HF" Puffer (15 mM MgCl₂, 100 mM TrisHCl, pH 8,3, 500 mM KCl, 1 mg/ml Gelantine) und 0,75 µl "ExpandTM High Fidelity PCR System Enzyme Mix".

Die PCR wurde ebenfalls zum Nachweis der Integration der *lysE'**lacZ*-Genkassetten genutzt. Dafür wurde die PCR ausgehend von intakten Bakterienzellen durchgeführt. Dazu wurde von den zu untersuchenden Transkonjuganden jeweils eine halbe Kolonie in 100 µl H₂O resuspendiert und der Rest der Kolonie zur Stammerhaltung ausplattiert. Nach 5 min Aufkochen der Bakteriensuspension in einem Wasserbad wurden 0,5 µl der Bakteriensuspension zur PCR eingesetzt. Ein 50 µl PCR-Ansatz, wie er zur Kontrolle der Transkonjuganden durchgeführt wurde, setzte sich zusammen aus: je 250 ng *sense* und *anti sense primer*, 0,5 µl der Bakteriensuspension, 10 µl 1,25 mM dATP, dGTP, dTTP, dCTP, 5 µl 10x PCR-Puffer (Qiagen, Hilden) und 0,25 µl Taq-Polymerase (Qiagen, Hilden). Der Reaktionsansatz wurde mit Mineralöl überschichtet, und anschließend die PCR-Zyklen gestartet. Es wurden 30 Zyklen mit der nach der unten angegebenen Formel für die jeweils verwendeten Primer berechneten "Annealingtemperatur" und einer Elongationstemperatur von 72°C durchgeführt. Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurden jeweils 10 µl des Reaktionsansatzes im Agarosegel analysiert.

Formel zur Berechnung der "Annealingtemperatur" [Sambrook *et al.*, 1989]:

$$T[^\circ\text{C}] = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$$

3.4. DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzierung der für die Topologieuntersuchungen des Lysinexportcarriers konstruierten *lysE'**phoA*- und *lysE'**lacZ*-Fusionen wurde mittels der Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* [1977] durchgeführt. Die Sequenzierungsprodukte wurden Fluoreszenz-markiert und die Fluoreszenzsignale der Sequenzierungsprodukte mittels *Automated Laser Fluorescence* (A.L.F., Pharmacia LKB, Freiburg) angeregt, detektiert und aufgezeichnet. Die Sequenzierungsreaktionen wurden mit dem *AutoReadTM* Sequencing kit (Pharmacia, Freiburg) nach dem *fast protocol* des Herstellers durchgeführt.

4. Transformationstechniken

4.1. Transformation von *E. coli*

Zur Steigerung der Transformationseffizienz wurden Zellen von *E. coli* DH5 α MCR nach der Rubidiumchlorid-Methode, modifiziert nach Hanahan [1983, 1985], behandelt. Kompetente *E. coli* CC118 und M15 Zellen wurden mittels der Vorschrift für *one step* kompetente *E. coli* von Chung *et al.* erzeugt [1989].

4.2. Transformation von *C. glutamicum*

Zur Transformation von *C. glutamicum* wurde die Methode der Elektroporation verwendet, die sich im Vergleich zur Protoplastentransformation [Thierbach *et al.*, 1988] durch die einfachere Handhabung und die hohe Transformationseffizienz auszeichnet [Dower *et al.*, 1988; Dunican & Shirvan, 1989; Liebl *et al.*, 1989; Wolf *et al.*, 1989]. Hierbei werden die Zellen kurzfristig einem starken elektrischen Puls ausgesetzt, der zur reversiblen Bildung von Membranporen führt. Durch diese können die DNA und andere Makromoleküle in die Zelle gelangen [Sugar *et al.*, 1987]. Eine hohe Transformationseffizienz wurde bei der Elektroporation durch Anzucht von *C. glutamicum* in Anwesenheit von Zellwandmodifikatoren (Isonicotinsäure, Glycin, Tween 80) und in der Kälte erzielt [van der Rest *et al.*, 1999]. Dazu wurden die Zellen über Nacht in 10 ml LB mit 2 % Glucose bei 30°C kultiviert und anschließend in Anwesenheit von Zellwand-Modifikatoren bei 18°C und 170 Upm über 28 Stunden kultiviert. Bei Erreichen einer OD₆₀₀=1 wurden sie 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte das Abernten der Zellen in der Minifuge RF Heraeus Christ GmbH (Osterode am Harz Christ) (5000 Upm, 10 min, 4°C). Vor der Aufnahme des Zellpellets in 1 ml eiskaltem Glycerin (10 %) wurde es viermal mit 50 ml eiskaltem 10 %igen Glycerin gewaschen. Die Zellsuspension wurde dann in 100 μ l Aliquots auf vorgekühlte Eppendorfgefäße verteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Zur Elektroporation wurden 50 μ l Zellsuspension mit ca. 100 ng der zu transformierenden DNA gemischt und dann in vorgekühlte, sterile Bioradküvetten (16 S 2086) überführt. Die Zellen wurden bei einer Spannung von 2,5 KV, einem Parallelwiderstand von 600 OHM und einem kapazitären Widerstand von 25 μ F gepulst (BIORAD GENE PULSER); die Zeitkonstante der Entladung entsprach unter den angewandten Bedingungen 10-12 ms. Sofort nach Beendigung des elektrischen Pulses

wurde 1 ml LBHIS in die Küvette pipettiert und die Zellsuspension dann in ein steriles Schraubdeckelröhrchen überführt. Zur Regeneration und phänotypischen Expression wurden die Zellen für 45 Minuten auf der Rotationsschüttelmaschine (100 Upm) inkubiert und anschließend zur Selektion auf Antibiotika-haltigem LBHIS-Medium ausplattiert.

5. Topologieanalysen von LysE

5.1. *phoA*-Analyse

Topologieuntersuchungen an Membranproteinen mittels alkalischer Phosphatase (kodiert vom Gen *phoA*) beruhen auf der Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität der alkalischen Phosphatase von ihrer zellulären Lokalisation [Manoil & Beckwith, 1985]. Die alkalische Phosphatase zeigt nur im Periplasma der Bakterien hohe Aktivitäten und ist im Cytoplasma inaktiv, da dort die Ausbildung von Disulfidbrücken nicht möglich ist und somit eine korrekte Faltung nicht erfolgen kann [Derman & Beckwith, 1991]. Bei der *phoA*-Analyse von Membranproteinen verwendet man das *phoA*-Gen aus *E. coli*, ohne Promotor und ohne Signalsequenz, als Reportergen.

Fusioniert man das promotorlose *phoA*-Strukturgen an Sequenzen, die für periplasmatische Domänen eines Membranproteins kodieren, so wird die alkalische Phosphatase über die Cytoplasmamembran ins Periplasma exportiert, wo sie in ihre aktive Form übergeht. Wird sie hingegen durch Fusion an cytoplasmatische Domänen im Cytoplasma zurückgehalten, so bleibt sie inaktiv. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase kann durch einfache Plattentests mittels der chromogenen Substanz 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (XP) nachgewiesen werden. Kolonien mit aktiver alkalischer Phosphatase verfärben sich blau, da die alkalische Phosphatase das Substrat XP zu 5-Bromo-4-chloroindoxyl umsetzt, das an der Luft zu dem blauen Farbstoff 5,5'-Dibromo-4,4'-dichlorindigo oxidiert wird. Die gerichtete Erzeugung von *lysE**phoA*-Fusionen erfolgte durch Klonierung von PCR-Fragmenten von *lysE*, die sich in der Länge des 3'-Endes unterschieden, *in frame* mit dem *phoA*-Gen des Vektors pPA4 erzeugt. Alle erhaltenen Fusionen wurden sequenziert.

5.2. *lacZ*-Analyse

Die *lacZ*-Analyse von Membranproteinen beruht auf demselben Prinzip wie die *phoA*-Analyse. Anstelle des Reporterenzym alkalische Phosphatase wird die β -Galactosidase an das Membranprotein bzw. an Teile des Membranproteins fusioniert [Manoil, 1990]. Die *LacZ*-Fusionen sind durch einen zu den *PhoA*-Fusionen komplementären Phänotyp gekennzeichnet; während die alkalische Phosphatase nur im Periplasma aktiv ist, weist die β -Galactosidase nur im Cytoplasma eine hohe Aktivität auf [Michaelis & Beckwith, 1982; Beckwith & Silhavy, 1983]. Kolonien, die eine *lysE'*/*lacZ*-Fusion tragen, welche eine cytoplasmatische Lokalisation der β -Galactosidase bedingen, weisen daher auf Platten, denen das β -Galactosidasesubstrat 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactosid (Xgal) zugesetzt ist, eine blaue Färbung auf. Die Klonierung von *lysE'*-PCR-Fragmenten *in frame* mit dem Promotor- und Signalsequenz-freiem *lacZ*-Gen erfolgte in pGP-Vektoren [Haardt & Bremer, 1996]. Diese Vektoren tragen das Promotor-lose *lacZ*-Gen. Am 5'-Ende von *lacZ* ermöglichen zahlreiche Restriktionsschnittstellen die *in frame* Klonierung von Genen, die für Membranproteine kodieren.

6. Bestimmung von Aminosäuren

6.1. Silikonölzentrifugation

Zur Quantifizierung intrazellulärer Metabolite ist eine schnelle Inaktivierung des Stoffwechsels notwendig. Um eine Verfälschung interner Konzentrationen durch exkretierte Metabolite zu vermeiden, muß gleichzeitig eine rasche und möglichst vollständige Abtrennung der Bakterienzellen vom Kulturmedium erfolgen. Dies ist durch die Methode der Silikonölzentrifugation gewährleistet [Klingenberg & Pfaff, 1967]. Hierzu wurden 400- μ l-Mikrozentrifugenröhrchen (Beckman Instruments GmbH, München) eingesetzt, in denen jeweils 30 μ l 20 %ige Perchlorsäure von 65 μ l Silikonöl der Dichte 1,04 g cm⁻³ überschichtet waren. Jeweils 200 μ l einer Kultur wurden auf die Silikonölschicht pipettiert und sofort für 30 Sekunden in der Mikrofuge E bei 13750 Upm zentrifugiert. Dies bewirkte die Abtrennung der Zellen vom Kulturmedium. Das als Überstand auf der Silikonölphase verbliebene Kulturmedium wurde abpipettiert, vereinigt und bis zur Bestimmung der exkretierten Aminosäuren bei -20°C gelagert. Zur Bestimmung der zellinternen Aminosäurekonzentration war die Aufarbeitung des in der

Perchlorsäurephase vorliegenden Zellpellets notwendig. Sie erfolgte nach Hoischen & Krämer [1989]. Das Zellpellet wurde zunächst mit Ultraschall aufgeschlossen und die erhaltenen Extrakte anschließend mit 5 M KOH und 1 M Triethanolamin neutralisiert. Nach der Zentrifugation (10 min, 13000 Upm, 4°C, Sigma 202-MK, Sigma-Aldrich, Deisenhofen) konnten die Überstände zur Aminosäurebestimmung mittels HPLC verwendet werden. Pro Meßpunkt und Kultur wurden drei Silikonölröhrchen verwendet.

6.2. *reversed phase* HPLC

Zur quantitativen Bestimmung von Aminosäuren wurde die Methode der *reversed phase* HPLC [Lindroth & Mopper, 1979] genutzt. Dazu wurde ein HPLC-Gerät vom Typ 1100 (Hewlett-Packard, Waldbronn) mit angeschlossenem Fluoreszenzdetektor (HP 1046 A) verwendet. Die Systemsteuerung erfolgte über die „HP-Chem-Station“. 1 µl der zu analysierenden Probe wurde in einer automatischen Vorsäulenderivatisierung mit 20 µl *o*-Phthaldialdehyd/2-Mercaptoethanol-Fertigreagenz gemischt. Die Auftrennung der dabei entstehenden fluoreszierenden, thiosubstituierten Isoindole [Jones & Gilligan, 1983] erfolgte auf einer *reversed phase* Säule (Hypersil ODS 5µ) über ein Gradientenprogramm mit zunehmend unpolarer Phase (Methanol). Als polares Eluent diente dabei 0,1 M Natriumacetat, pH 7,2. Die Flußrate betrug 0,5 ml min⁻¹. Die Fluoreszenzdetektion der Aminosäurederivate erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 230 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm. Die Konzentration der Aminosäuren wurde berechnet über einen Vergleich mit einem externen Standard und Asparagin als zusätzlichem internen Standard. Folgende Parameter wurden zur Quantifizierung zellinterner Aminosäurekonzentrationen berücksichtigt [Gutmann, 1993]; eine optische Dichte von 1 gemessen bei 600 nm entspricht 0,3 mg Zelltrockengewicht pro ml. Biotin-supplementierte Zellen haben ein Volumen von 2 µl (mg Zelltrockengewicht)⁻¹.

7. Herstellung von Rohextrakten und Proteinbestimmung

C. glutamicum wurde für die Bestimmung der β-Galactosidaseaktivität in den einzelnen Experimenten zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Die Zellen wurden anschließend einmal mit 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 8,0 gewaschen, anschließend in

1 ml β -Galactosidasereaktionspuffer (5 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5 % Glycerin, 10 mM KCl) aufgenommen und in ein 2,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Der Aufschluß erfolgte mit einem Ultraschall-Desintegrator (Branson Sonifier W-250, Branson Sonic Power Co., Danbury, USA). Die vorgekühlten Zellen wurden im Eiswasserbad 10 min mit einer Beschallintensität von 2,5 und einer Pulslänge von 20 % aufgeschlossen. Nach der Ultraschallbehandlung wurden die Zelltrümmer durch 45 minütige Zentrifugation bei 4°C und 13000 Upm (Sigma 202-MK; Sigma-Aldrich, Deisenhofen) abgetrennt. Die Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität erfolgte direkt im Anschluß.

Zur Herstellung von Rohextrakten, die anschließend in Gelretardationsexperimenten eingesetzt werden sollten, wurden die *E. coli* Zellen 16 Stunden in 50 ml LB-Medium und die *C. glutamicum* Zellen in 50 ml BHI-Medium mit den entsprechenden Antibiotika kultiviert. Nach Abernten der Zellen in der Minifuge RF (4°C, 5000 Upm, 10 min) (Heraeus Christ GmbH, Osterode am Harz) wurde das Zellpellet zunächst in 1 ml je 1 g Naßgewicht TEK-Puffer (10 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 7 μ M 2-Mercaptoethanol, pH 7,6) resuspendiert und mittels Ultraschall-Desintegrator (Branson Sonifier W-250, Branson Sonic Power Co., Danbury, USA) aufgeschlossen. Die Aufschlußdauer betrug 5 min für *E. coli* und 10 min für *C. glutamicum* bei einer Beschallintensität von 2 und einer Pulslänge von 20 %. Nach Entfernen der Zelltrümmer mittels Zentrifugation (Sigma 202-MK, 45 min, 4°C, 13000 Upm) wurde den zellfreien Überständen 25 % (v/v) Glycerin zugesetzt. Die so erhaltenen Rohextrakte wurden anschließend in 50 μ l Aliquots bei -70°C gelagert.

Zur Aufreinigung von His-markiertem LysG unter nicht-denaturierenden Bedingungen wurden die Zellen des Stammes M15 pREP4 pQE31NG (Expression von N-terminal His-markiertem LysG) bzw. M15 pREP4 pQE70CG (Expression von C-terminal His-markiertem LysG) in 1ml "Lysispuffer" (50 mM NaH_2PO_4 , pH 8,0, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol) resuspendiert. Nach Zugabe von 1 mg Lysozym pro ml wurde die Zellsuspension eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Zellaufschluß mittels Ultraschallbehandlung. Die Zellsuspension wurde dazu in ein 2,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und im Eiswasserbad 4 min mit einem Ultraschall-Desintegrator (Branson Sonifier W250, Branson Sonic Power Co., Danbury, USA) bei einer Beschallintensität von 2 und einer Pulslänge von 30 % aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden durch 45 minütige Zentrifugation bei 4°C und 13 000 Upm in der Sigma Zentrifuge

202-MK (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) abgetrennt. Der so erhaltene zellfreie Rohextrakt wurde anschließend entweder direkt verwendet oder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Die Gewinnung von Rohextrakten unter denaturierenden Bedingungen erfolgte in Anwesenheit von 8 M Harnstoff. Das aufgetaute Zellpellet wurde in 1ml Puffer B (8 M Harnstoff, 0,1 M NaH_2PO_4 und 0,01 M Tris-HCl, pH 8,0) resuspendiert und eine Stunde bei Raumtempertur und 120 Upm inkubiert. Anschließend wurde das Lysat in einer Biofuge Pico (Heraeus Christ GmbH, Osterode am Harz) 30 min zentrifugiert, um die Zelltrümmer abzutrennen. Der Überstand wurde direkt zur Aufreinigung des H_6 -LysG-Proteins über Ni-NTA-Spinsäulchen (Qiagen, Hilden) eingesetzt.

Die nach Bensadoun & Weinstein [1976] modifizierte Lowry-Methode wurde zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen im Bereich von $10\text{-}50\text{ }\mu\text{g Protein ml}^{-1}$ angewendet. Lag der Proteingehalt bei $0,25\text{-}5\text{ mg Protein ml}^{-1}$, erfolgte die Bestimmung des Proteingehalts nach der Biuret-Methode [Gornall et al., 1949].

8. Bestimmung von Enzymaktivitäten

8.1. Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität

Die spezifische β -Galactosidaseaktivität wurde nach Miller [1972] colorimetrisch bestimmt. Dabei wird die von der β -Galactosidase katalysierte Hydrolyse von dem farblosen Substrat *o*-Nitrophenyl- β -D-Galactosid (ONPG) in das Galactosid und das gelbe *o*-Nitrophenol, dessen Konzentration photometrisch gemessen werden kann, quantifiziert.

8.2. Diaminopimelatdecarboxylase-Aktivität

Die Diaminopimelatdecarboxylaseaktivität wurde mittels eines diskontinuierlichen Enzymtests bestimmt. Der Reaktionsansatz enthielt 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5, 0,1 mM Pyridoxalphosphat, 0,5 mM EDTA, 25 mM Diaminopimelat und Rohextrakt. Nach Inkubation bei 30°C wurden jeweils nach 0, 5, 10, 15, 20 und 25 min Proben entnommen und die entstandene Lysinmenge mittels HPLC quantifiziert [Cremer et al. 1988].

9. Gelretardationsexperimente

Die Gelretardationsanalyse ermöglicht den Nachweis und die genauere Analyse von Protein-DNA-Wechslewirkungen auf molekularer Ebene [Fried & Crothers, 1981]. Grundlage dieser Analyse ist, daß das elektrophoretische Laufverhalten von Nukleinsäuren durch Bindung eines Proteins verändert, meist verzögert wird.

9.1. Digoxigenin-Markierung von DNA-Fragmenten

Die mittels PCR amplifizierten DNA-Fragmente wurden mittels des DIG-Markierungskits von Roche Mannheim durch die terminale Transferase mit DIG-11-UTP endmarkiert. Die Markierung erfolgte gemäß der Herstellerangaben. Die DIG-markierten PCR-Fragmente wurden so verdünnt, daß ihre Konzentration zwischen 0,4 bis 0,6 ng/µl lag.

9.2. Bindungsreaktion

Die Bindungsansätze enthielten 0,05-10 µg Protein (Rohextrakt), 1 ng DIG-markiertes DNA-Fragment, 1 µg Poly [d(I-C)] (Kompetitor-DNA zum Zurückdrängen unspezifischer Protein-DNA-Interaktionen), 1 µg Polylysin und 4 µl 5x Bindepuffer (100 µl Hepes, pH7,6, 5 mM EDTA, 50 mM (NH₄)₂SO₄, 5 mM DTT, 1 % (w/v) Tween 20, 150 mM KCl) [modifiziert nach Fried & Crothers, 1981, Bannister & Kuzarides, 1992]. Der 5 x Bindepuffer, das Polylysin und die Kompetitor-DNA stammten aus dem DIG-Gel Shift Kit von Roche, Mannheim. Die Reaktionsansätze wurden auf Eis zusammenpipettiert und anschließend 15 min bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsansätze (Gesamtvolumen 20 µl) mit jeweils 5 µl Bromphenol-freiem 5 x Auftragspuffer (0,25 x TBE, 60 % Glycerin) aus dem DIG Gel Shift Kit (Roche, Mannheim) versetzt und über Gelelektrophorese analysiert.

9.3. Nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden 6 %ige DNA-Retardations-Fertiggele der Firma Novex Electrophoresis (Frankfurt a. M.) verwendet

[Revzin, 1989]. Als Laufpuffer wurde 0,25facher TBE-Puffer [Sambrook *et al.*, 1989] verwendet. Die Gelelektrophorese wurde in der XCell II Mini Cell-Kammer (Novex Electrophoresis, Frankfurt a. M.) bei 6 mA und 4°C über 1 ½ Stunden durchgeführt [modifiziert nach Tayler *et al.*, 1994]. Anschließend erfolgte der Transfer der DNA-Fragmente auf eine positiv geladene Nylonmembran.

9.4. Blot

Für den Transfer der DNA-Fragmente auf eine positiv geladene Nylonmembran wurde ein Tankblot in der Blotapparatur der Firma Novex Electrophoresis durchgeführt [Sambrook *et al.*, 1989]. Dafür wurde zunächst die in 0,25 x TBE equilibrierte Nylonmembran (BM Membran, Roche Mannheim) luftblasenfrei auf das feuchte Gel aufgelegt. Sowohl auf die freie Seite des Gels als auch auf die Nylonmembran wurden jeweils vier Lagen von in 0,25 x TBE getränktem Whatmann 2MM-Papier aufgelegt. Das Whatmann-Gel-Nylonmembran-Whatman Sandwich wurde anschließend in die Blotkassette eingelegt und diese in die Tankblot-Apparatur eingesetzt. Als Transferpuffer wurde 0,25 x TBE verwendet. Der Blot erfolgte innerhalb von 30 min bei 235 mA. Anschließend wurde die Nylonmembran kurz in 10 x SSC (1,5 M NaCl, 0,15 M Natriumcitrat) [Sambrook *et al.*, 1989] gespült, getrocknet und die DNA in dem "Crosslinker" (Stratagene GmbH, Heidelberg) mit 120 mJ für 40 s auf der Membran fixiert. Danach wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindestellen für 30 min in Blockingpuffer (0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH 7,5 und 1 % (w/v) Blocking Reagenz (Roche Mannheim)) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran 30 min lang in 20 ml einer 1:10000fach Verdünnung des Anti-Digoxigenin-alkalische-Phosphatase-Konjugats (Roche, Mannheim) in Blockierungspuffer inkubiert. Durch zweimaliges Waschen der Membran (15 min) mit Waschpuffer (0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH 7,5 + 0,3 % (v/v) Tween 20) wurden ungebundene Konjugate entfernt. Zur Detektion der DNA-Fragmente wurde die Membran zunächst 2 min in Puffer 3 (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl₂) equilibriert. Dann wurde die Membran mit der 1:1000fach verdünnten CSPD-Lösung (Roche, Mannheim) benetzt und in Folie eingeschweißt. Die Detektion der Chemolumineszenz-Signale erfolgte mittels des Luminescent Image Analyser (Fujifilm, Omiya, Japan) bzw. durch Belichtung eines Chemiluminescent Detection Films (Roche, Mannheim, 20-60 min Belichtungsdauer).

10. Isolierung des LysG-Proteins mit Hilfe eines His-Tags

Die His-Markierung des LysG-Proteins erfolgte durch Klonierung des *lysG*-Gens *in frame* mit dem für sechs Histidinreste kodierenden Bereich des pQE31- bzw. pQE70-Vektors der Firma Qiagen (Hilden). Der pQE31-Vektor ermöglicht die Konstruktion eines N-terminal His-markierten Proteins, der Vektor pQE70 die eines C-terminal markierten Proteins. In beiden Vektoren unterliegt die Expression des *lysG*-Gens der Kontrolle des T5-Promotors. Der Promotor enthält zusätzlich zwei *lac*-Operatorsequenzen, so daß die Expression IPTG induzierbar ist. Durch Verwendung des *E. coli* Stammes M15 mit dem pREP4-Plasmid, das den *lacI*-Repressor enthält, wird die Induktion der Expression von *h₆-lysG* ermöglicht.

Der Nachweis der Expression von H₆-LysG (His-markiertem LysG) erfolgte über einen Kolonieblot [QIAexpress Detection and Assay Handbook, 1999]. Dazu wurden die zu untersuchenden Transformanten zunächst auf eine positiv geladene Nitrozellulosemembran (Millipore, Eschbon) übertragen. Anschließend wurde dann die Expression des *lysG*-Gens, das *in frame* mit der Region, die für sechs Histidinreste kodiert, vorliegt, durch Transfer der Membran auf eine IPTG-haltige LB-Platte induziert. Nach vierstündiger Inkubation der Membran auf der IPTG-haltigen LB-Platte wurden die auf der Membran befindlichen Zellen durch alkalische Lyse zerstört und anschließend das auf der Membran gebundene H₆-LysG-Protein wie bei einem Westernblot [Towbin *et al.*, 1979] nachgewiesen. Als Antikörper wurde das Anti-His-Konjugat der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Dieser Antikörper enthält als Reporterenzym die alkalische Phosphatase, so daß eine direkte Detektion dieses Antikörpers möglich ist. Der Nachweis der alkalischen Phosphatase erfolgte mit dem Substrat der alkalischen Phosphatase 5-Bromo-4-Chloro-3-indolylphosphat und dem Farbstoff Nitroblautetrazoliumchlorid. Zum Nachweis der alkalischen Phosphatase wurden die Blotmembranen mit dem in Wasser gelösten BCIP/NBT-Reagenz (Sigma-Aldrich, Deisenhofer) inkubiert. Die Blotmembran färbt sich an Stellen, auf denen His-markiertes LysG enthaltende Zellen lysiert sind, blau.

10.1. Aufreinigung von His-markiertem LysG

Die Aufreinigung von His-markiertem LysG erfolgte mittels der Ni-NTA-Spinsäulchen der Firma Qiagen (Hilden), die eine Aufreinigung von bis zu 125 µg His-markiertem Protein

ermöglichen. Diese Aufreinigungsmethode beruht auf dem Prinzip der immobilisierten Metall-Affinitätschromatographie (IMAC) [Porath *et al.*, 1975]. Als Chelatbildner wird in den Spinsäulchen an Silicagel gebundene Nitrilotriessigsäure verwendet [Angaben des Herstellers, Qiagen, Hilden]. Durch diesen vierzähligen Liganden ist das Nickelkation komplexiert, so daß noch zwei der sechs Ligandenbindungsstellen des Nickelkations frei sind. An diesen freien Bindestellen kann jeweils ein Histidinrest des His-markierten Proteins binden [Hochuli, 1989; Janknecht *et al.*, 1991]. Auf die Spinsäulchen wurde der Rohextrakt des *E. coli* *h₆-lysG*-Überexprimierers M15 pREP4 pQE31NG aufgetragen. Bei der Aufreinigung unter nicht-denaturierenden Bedingungen erfolgte die Elution nach mehrmaligem Waschen mit Waschpuffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol) durch 250 mM Imidazol. Wurde das Protein unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt, so enthielten alle verwendeten Puffer 8 M Harnstoff. Nach Auftragen des Rohextraktes wurde die Säule zunächst viermal mit Waschpuffer (8 M Harnstoff, 0,1 M NaH₂PO₄ und 0,01 M Tris-HCl, pH 6,3) gewaschen. Anschließend wurde zweimal mit 200 µl Elutionspuffer, der die gleiche Zusammensetzung wie der Waschpuffer besaß, dessen pH aber bei 4,5 lag, eluiert. Die einzelnen Fraktionen der Aufreinigung wurden jeweils auf einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert.

10.2. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Silberfärbung

Die analytische Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte über Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli [1970]. Es wurden 12,5 %ige Trenngele, überschichtet von 6 %igen Sammelgelen nach Sambrook *et al.* [1989] verwendet. Vor dem Auftragen wurden die Proteine mit 2xProbenpuffer (120 mM Tris-HCl, pH 6,8, 20 % Glycerin, 6 % SDS, 10 %β-Mercaptoethanol, 0,005 % Bromphenolblau) versetzt und zur Denaturierung 5 min auf 95°C erhitzt. Als Eichstandards wurden die Proteinstandards Mark12™Wide Range Protein Standard (6-200 kDa) und der vorgefärbte MutlitMark™Multi-Colored Standard (12-188 kDa) der Firma Novex Electrophoresis (Frankfurt a. M.) verwendet. Die Gele wurden nach einstündiger Fixierung in einem Ethanol/Essigsäure/Wassergemisch (3:1:6) nach Görg *et al.* [1985] mit Silbernitrat gefärbt.

10.3. Renaturierung von H₆-LysG

Da das aufgereinigte, His-markierte LysG zu Gelretardationsexperimenten verwendet werden sollte, war es notwendig das Protein, das nach der Aufreinigung im denaturierten Zustand vorlag, zu renaturieren. Zur Renaturierung wurde eine Dialyse gegen Puffer mit schrittweise abnehmender Harnstoffkonzentration durchgeführt [Sambrook *et al.*, 1989, Dhandayuthapani *et al.*, 1997]. Als Dialysekammer wurden die Slide-A-Lyzer-Dialyskassetten (PIERCE, Rockford) mit einem Ausschlußmolekulargewicht von 2000 kDa und einem Volumen von 1,0 bis maximal 3,0 ml verwendet. Die Dialyse erfolgte für jeweils eine Stunde gegen 500 ml der folgenden Puffer; A: 10 mM Tris, pH 6,6, 8 M Harnstoff; B: 10 mM Tris, pH 7,6, 8 M Harnstoff. Anschließend erfolgte die Dialyse gegen Puffer B mit sinkenden Harnstoffkonzentrationen; zunächst 6 M, dann 4 M, 2 M und 1 M Harnstoff. Der letzte Dialyseschritt erfolgte über vier Stunden gegen den Aufbewahrungspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA und 50% Glycerin) [modifiziert nach Dhandayuthapani *et al.*, 1997]. Parallel wurde auch eine Säulenaufreinigung unter nicht-denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Dazu wurde Rohextrakt der H₆-LysG-Überexprimierer, der unter denaturierenden Bedingungen, d.h. in Anwesenheit von 8 M Harnstoff, hergestellt worden war, auf die mit 600 µl Waschpuffer (8 M Harnstoff, 0,1 M NaH₂PO₄, 0,01 M Tris-HCl pH 8.0) equilibrierte Ni-NTA-Spinsäule (Qiagen, Hilden) aufgetragen. Die Säule wurde anschließend jeweils dreimal mit 600 µl der Dialysepuffer mit abnehmender Harnstoffkonzentration gewaschen (Zusammensetzung der Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 8/6/4/2/1/0 M Harnstoff). Die Elution des gereinigten Proteins erfolgte mit 250 mM Imidazol.

III. Ergebnisse

1. Die Topologie des Lysinexportcarriers

Mit der Klonierung des Gens des Lysinexportcarriers [Vrljić *et al.*, 1996] wurde erstmals ein Transporter molekular zugänglich, der spezifisch den Export einer Aminosäure katalysiert. Aus diesem Grund und da LysE das erste identifizierte und biochemisch charakterisierte Mitglied einer neuen Proteinsuperfamilie darstellt [Aleshin *et al.*, 1999; Vrljić *et al.*, 1999], sollte die Topologie des Lysinexportcarriers mittels *phoA*- und *lacZ*-Analyse untersucht werden.

1.1. Untersuchung der Topologie mittels *phoA*-Analyse

Die Untersuchung der Topologie sollte zunächst durch gerichtete Konstruktion von *lysE'*-*phoA*-Fusionen erfolgen. Dabei wird LysE progressiv am C-terminalen Ende verkürzt und mit der alkalischen Phosphatase fusioniert. Dieses Reporterenzym ist nur im Periplasma aktiv, so daß Rückschlüsse auf die Lokalisation von LysE-Bereichen möglich sind [Hoffman & Wright, 1985; Manoil & Beckwith, 1985]. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase kann durch einfache Plattentests mittels der chromogenen Substanz, 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (XP), nachgewiesen werden. Kolonien mit aktiver alkalischer Phosphatase verfärben sich blau [Manoil & Beckwith, 1985].

Zur Konstruktion der *lysE'*-*phoA*-Fusionen wurde der Vektor pPA4 [J. Meens, IBT1] verwendet. Dieser Vektor enthält das *'phoA*-Gen, ohne Signalsequenz unter Kontrolle des *lac*-Promotors (s. Abb. 3). Drei Restriktionsschnittstellen (*EcoRV*, *PmaCI* und *HpaI*) am 5'-Ende von *'phoA* ermöglichen die Klonierung ins richtige Leseraster von *'phoA*. Um die alkalische Phosphatase an den 29sten Aminosäurerest von LysE zu fusionieren, wurde zunächst das entsprechende 87 bp *lysE*-Fragment amplifiziert. Dabei wurde der *sense primer* (PE-0) so gewählt, daß der *lysE* eigene Promotor im PCR-Produkt nicht vorlag, um die Konstruktion unter Kontrolle des *lac*-Promotors von pPA4 zu ermöglichen. Durch Einführung einer *PstI*-Schnittstelle in das 5'-Ende des PCR-Fragmentes mittels des *sense primers* und einer *HpaI*-Schnittstelle am 3'-Ende des *anti sense primers*, wurde die gerichtete Klonierung in den Vektor pPA4 ermöglicht. Nach der Amplifikation des *lysE*-

Fragmentes über PCR (als Template diente der Vektor pSPORT/*lysE*) wurde das aufgereinigte PCR-Fragment in den mit *Sma*I-geschnittenen Vektor pUC18 aus dem SureCloneKit (Roche Mannheim) kloniert. Mit diesem Ligationsansatz wurde *E. coli* DH5 α transformiert. Aus den Carbenicillin-resistenten Transformanten gewonnene Plasmid-DNA wurde mittels Restriktionsanalyse auf das Vorliegen des gewünschten Ligationsproduktes überprüft. Das gewünschte PCR-Fragment wurde durch *Pst*II-*Hpa*I-Restriktion aus pUC18 isoliert und in den mit *Pst*II und *Hpa*I geschnittenen Vektor pPA4 kloniert. Dieser Klonierungsschritt wurde bereits in dem *E. coli*-Stamm CC118 durchgeführt, der keine endogene alkalische Phosphatase-Aktivität aufweist und daher zur Überprüfung des durch die *lysE'**phoA*-Fusionen bedingten Phänotyps geeignet ist. Nach Überprüfung der Transformanten auf das Vorliegen der richtigen *lysE'**phoA*-Fusion, wurde die Fusionsstelle ansequenziert und das PCR-Produkt vollständig sequenziert, um eventuelle Fehler durch die Taq-Polymerase auszuschließen.

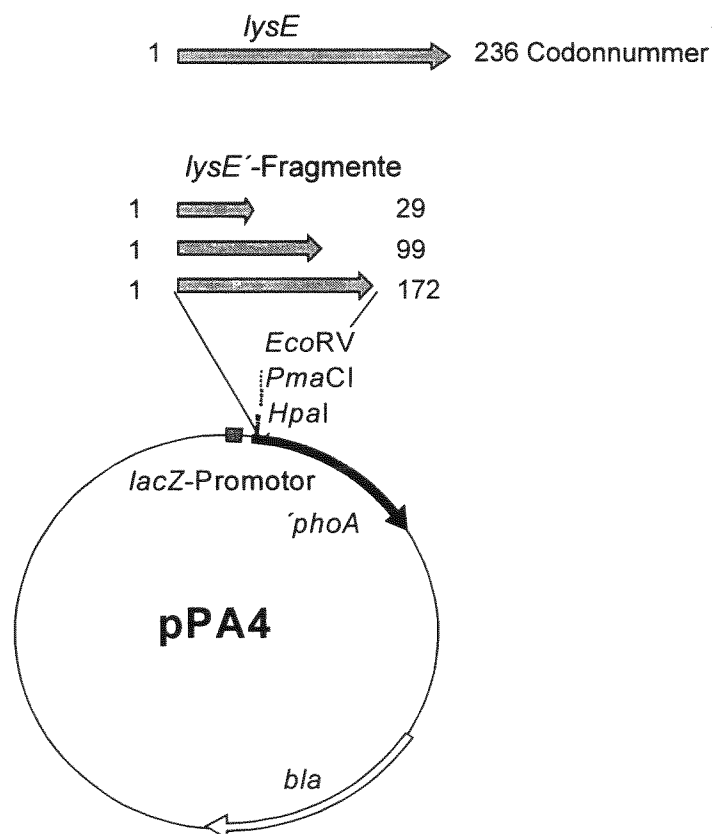


Abb. 3: Schematische Darstellung der Fusion von *lysE'*-Fragmenten mit *'phoA*. Spezifische sukzessiv am 3'-Ende verkürzte *lysE'*-Fragmente wurden *in frame* mit dem Signalsequenz-freien Strukturgen der alkalischen Phosphatase (*'phoA*) kloniert.

Mit dem Ziel, in jeder einzelnen cytoplasmatischen und periplasmatischen Schleife mindestens eine LysE'PhoA-Fusion zu erzeugen (s. Abb. 4), wurden noch 18 weitere *lysE*-Fragmente mittels PCR amplifiziert. Die anschließende Klonierung erfolgte wie für Fusion 29 (vgl. Abb. 3) beschrieben. In fünf Fällen war es trotz mehrfacher Versuche nicht möglich, die erhaltenen PCR-Produkte in den Vektor pPA4 zu klonieren. Die fünf nicht klonierbaren Fusionen hätten LysE'PhoA-Fusionen ergeben, in denen die alkalische Phosphatase am 20., 24., 80., 90. bzw. 205. Aminosäurerest fusioniert vorgelegen hätte. Es wurden insgesamt 14 *lysE-phoA*-Fusionen durch die Klonierung von PCR-Fragmenten von *lysE in frame* mit *phoA* erhalten.

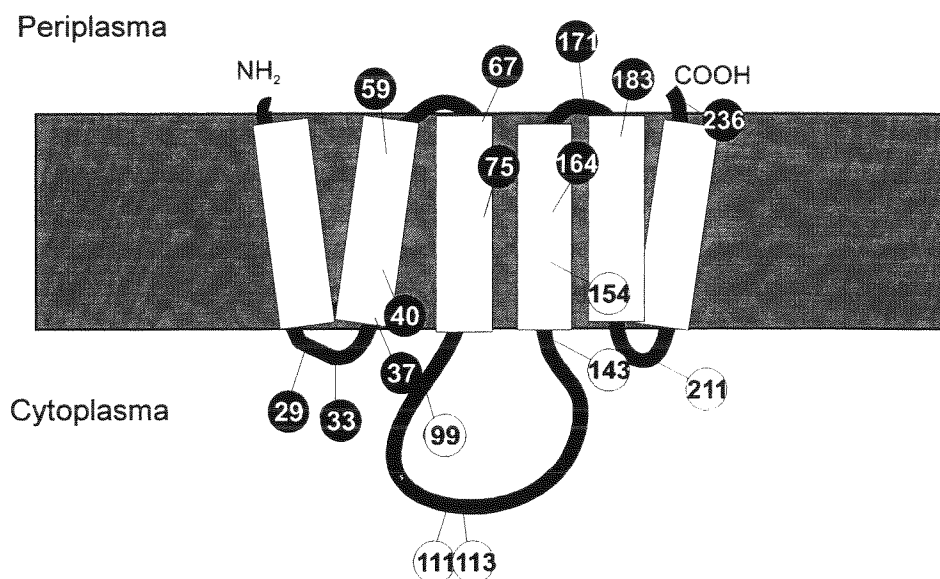


Abb. 4: Lage der *phoA*-Fusionen in dem Topologiemodell gemäß der Computer-vorhersage nach Phd.htm [Rost *et al.*, 1994]. Die Fusionen sind durch Kreise dargestellt, die Nummer in den Kreisen bezeichnet den letzten Aminosäurerest von LysE innerhalb des Fusionsproteins. Gefüllte Kreise stellen Fusionen, mit Phosphatase-positivem Phänotyp, offene Kreise, solche mit Phosphatase-negativem Phänotyp dar.

Die erhaltenen Konstrukte wurden auf ihre alkalische Phosphatase-Aktivität hin untersucht. Dazu wurden die entsprechenden rekombinanten *E. coli* CC118-Stämme auf XP- und IPTG-haltigen LB-Platten ausplattiert. Dabei diente der Stamm CC118 mit dem Leervektor pPA4, der *'phoA* ohne Signalsequenz enthält als Negativkontrolle und CC118 pKY3, der eine *secY'*-*phoA*-Fusion trägt, als Positivkontrolle [Tschauder, 1993]. Die Fusion der Phosphatase an die Aminosäurereste 99, 111, 113, 143, 154 bzw. 211 von LysE resultierte in einem Phosphatase-negativen Phänotyp. Hingegen führten die Fusionen an Position 29, 59, 67, 75, 164, 171, 183 bzw. 236 zu einer starken Blaufärbung der Kolonien. In Abbildung 4 ist die Lage der Fusionen in dem ComputermodeLL von LysE nach Phd.htm dargestellt. Die im ersten Ansatz erhaltene Fusion 29 ist blau und widerspricht somit diesem Modell im N-terminalen Bereich. Die Fusionen 59, 67, 75, 99, 111, 113, 143, 154, 164, 171, 183, 211 bzw. 236 zeigten hingegen in CC118 den erwarteten Phänotyp.

Auffallend ist, daß die Fusion 29, die im N-terminalen Bereich von LysE liegt, einen stark positiven alkalische Phosphatase-Phänotyp zeigt. Dies bedeutet, daß bereits das N-terminale, 29 Aminosäurereste umfassende LysE'-Polypeptid die hydrophobe Signalsequenz der alkalischen Phosphatase ersetzen kann. Allerdings sind in Position 30 und 31 von LysE jeweils basische Aminosäurereste lokalisiert. Da positiv geladene Aminosäurereste an der Orientierung von Membranhelices maßgeblich beteiligt sein können [v. Heijne, 1986; v. Heijne, 1994] wurden zusätzlich drei weitere *'phoA*-Fusionen an Position 33, 37 und 40 konstruiert, die auch in Abbildung 4 wiedergegeben sind. Trotz der positiv geladenen Reste, die im LysE'-Polypeptid dieser Fusionen enthalten sind, wurde auch in diesen Fällen die alkalische Phosphatase transloziert. Somit scheint die Topologie von LysE im N-terminalen Bereich von dem Modell nach Phd.htm abzuweichen. In Abbildung 5 ist das erweiterte LysE-Topologiemodell entsprechend den Ergebnissen der *phoA*-Analyse dargestellt.

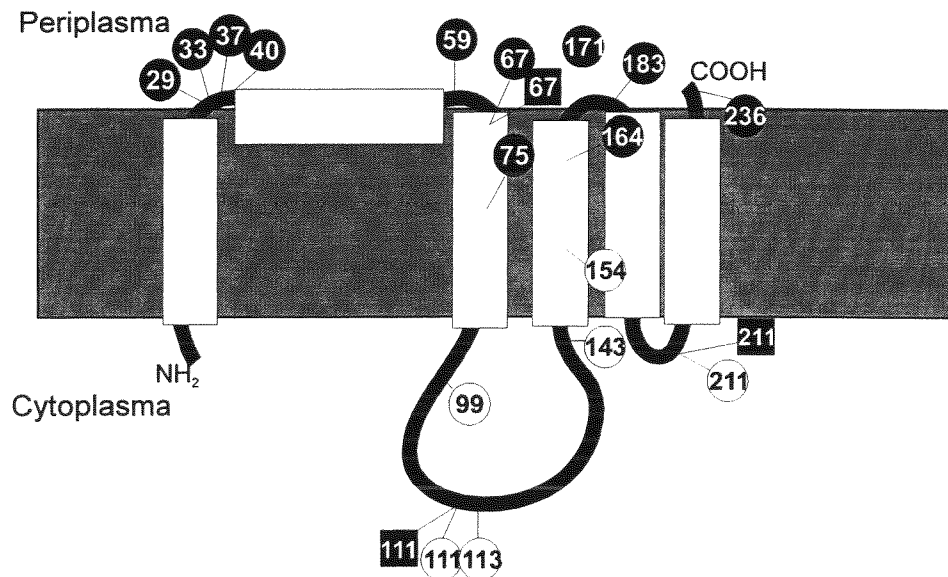


Abb. 5: Lage der *'phoA*-Fusionen im erweiterten LysE-Topologiemodell. Dieses Modell enthält zusätzlich die LysE'*LacZ*-Fusionen. Diese sind durch Vierecke wiedergegeben. Gefüllte Vierecke stellen die LacZ-Fusionen mit aktiver β -Galactosidase und die offenen Vierecke die mit β -Galactosidase-negativem Phänotyp dar. Alle anderen Angaben entsprechen denen in Abbildung 4.

1.2. Untersuchung der Topologie des N-terminalen Bereiches von LysE

Um die Ergebnisse im N-terminalen Bereich weiter zu festigen, sollten zwei *phoA*-Sandwich-Fusionen konstruiert werden. Bei diesem Ansatz wird das promotor-lose und Signalsequenz-freie *'phoA*-Gen in das Gen des zu untersuchenden Membranproteins inseriert, so daß sowohl der 5'-Bereich als auch der 3'-Bereich des zu untersuchenden Gens vollständig vorliegt (s. Abb. 6) [Ehrmann *et al.*, 1990]. Somit wird gewährleistet, daß die translationale *phoA*-Fusion die topogene Information des gesamten zu untersuchenden Membranproteins (LysE) enthält und nicht nur topogene Signale des N-terminalen Bereiches [Ehrmann *et al.*, 1990]. Dies ist insbesondere bei der Topologieaufklärung im N-terminalen Bereich von Membranproteinen von Bedeutung, da die Fusionen ansonsten nur wenige Aminosäurereste des Membranproteins enthalten und

daher häufig eine veränderte Lokalisation in der Membran aufweisen [Froshauer *et al.*, 1988; Calamia & Manoil, 1992; Traxler *et al.*, 1993].

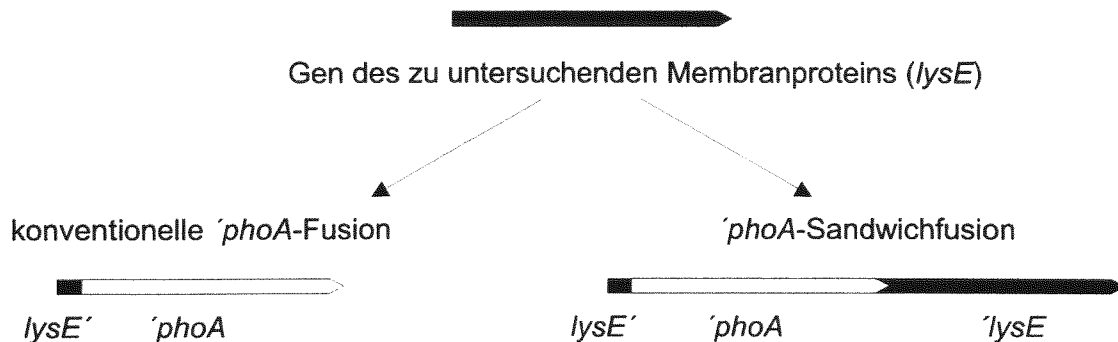


Abb. 6: Schematische Darstellung der Konstruktion von konventionellen 'phoA-Fusionen und 'phoA-Sandwichfusionen.

Die alkalische Phosphatase sollte in LysE nach dem 40. bzw. 67. Aminosäurerest inseriert werden. Die so erzeugten Fusionen wären im LysE-Modell laut Abbildung 4 im Cytoplasma vor bzw. im Periplasma nach der zweiten transmembranen Helix lokalisiert. Somit müßte die Fusion am 40ten Aminosäurerest von LysE einen alkalische Phosphatase-negativen Phänotyp und die in Position 67 einen alkalische Phosphatase-positiven Phänotyp aufweisen. Zunächst wurde für jedes Konstrukt das entsprechende 5'- und 3'-*lysE*-Fragment über PCR amplifiziert. Dabei wurde in das 5'-*lysE*-Fragment eine *PstI*-Schnittstelle am 5'-Ende und eine *BamHI*-Schnittstelle am 3'-Ende inseriert. In das 3'-*lysE*-Fragment wurde am 5'-Ende eine *BstEII*-Schnittstelle eingeführt. Diese Schnittstellen sollten eine gerichtete Klonierung beider Fragmente *in frame* mit 'phoA ermöglichen. Zur Konstruktion der Sandwich-Fusionen wurde das 'phoA-Strukturgen als *BamHI*-Fragment aus dem Vektor pSWFIII [Ehrmann *et al.*, 1990] isoliert. Anschließend wurde in den mit *BamHI* und *PstI* geschnittenen Vektor pSWFIII das entsprechende 5'-*lysE*-Fragment kloniert. Der so erhaltene Vektor pSWFP40 bzw. pSWFP67 wurde mit *BamHI* geschnitten und mit dem *BamHI*-*'phoA*-Fragment ligiert. Dadurch lagen zunächst zwei neue *lysE''phoA*-Fusionen vor, deren Test auf alkalische Phosphatase-Aktivität in beiden Fällen positiv war, d.h. die alkalische Phosphatase war im Periplasma lokalisiert.

Sie bestätigen somit das erweiterte Topologiemodell, das auf den bisherigen 'phoA-Fusionen beruht.

Um die Sandwich-Fusionen vollständig herzustellen, war noch die Klonierung des 3'-Endes von *lysE* in frame mit der entsprechenden 5'-*lysE'**phoA*-Fusion notwendig. Dazu wurde der Vektor pSWFP40::'*phoA* bzw. pSWF67P::'*phoA* mit *Bst*EII und *Eco*RV geschnitten und mit den entsprechenden 3'-*lysE*-PCR-Fragmenten ligiert. Die Klonierung des 3'-Endes von *lysE* erwies sich jedoch bei beiden Fusionen als nicht erfolgreich. Nach diesem Konstruktionsschritt wiesen alle Plasmide Deletionen im '*phoA*-Genbereich bzw. in *lysE* selbst auf. Auch durch eine andere Reihenfolge der einzelnen Klonierungsschritte war es nicht möglich, die gewünschten *phoA*-Fusionen zu konstruieren. Bereits bei den vorangegangenen *phoA*-Analysen hatte es sich gezeigt, daß zahlreiche *lysE'**phoA*-Fusionen toxisch für *E. coli* sind. So traten bei einigen Fusionen, wie aus der Literatur bekannt, Deletionen innerhalb von *phoA* bzw. *lysE* auf [Manoil & Traxler, 1995; Franke *et al.* 1996]. So sind einige Fälle [Horabin & Webster, 1988, Cordes *et al.*, 1996] beschrieben, in denen selbst die Expression von Proteinfragmenten nur in bestimmten *E. coli* Stämmen möglich war, in denen aufgrund einer Mutation die Plasmidzahl gesenkt ist [Zagorec & Postma, 1992]. Der Phänotyp der beiden neuen *lysE'**phoA*-Fusionen stimmte mit dem erweiterten *phoA*-Topologiemodell von LysE überein (s. Abb. 5). Beide Fusionen ergaben in Übereinstimmung mit dem *phoA*-Topologiemodell eine starke alkalische Phosphatase-Aktivität.

1.3. Bestätigung der Topologie durch *lacZ*-Fusionsstudien

Zur weiteren Überprüfung des LysE-Topologiemodells wurden *lysE'**lacZ*-Fusionen hergestellt. Im Gegensatz zu der alkalischen Phosphatase ist die β -Galactosidase (kodiert durch *lacZ*) nur im Cytoplasma aktiv, so daß damit eine weitere Methode zur Topologieanalyse zur Verfügung steht [Michaelis & Beckwith, 1982; Beckwith & Silhavy, 1983].

Es wurden sechs verschiedene *lysE'**lacZ*-Fusionen ausgewählt, so daß in jeder putativen cytoplasmatischen bzw. periplasmatischen Schleife mindestens eine *lacZ*-Fusion vorhanden war. Die β -Galactosidase sollte in der resultierenden LysE'-LacZ-Fusion an

die Aminosäurereste 29, 67, 111, 171, 211 bzw. 236 von LysE fusioniert sein (s. Abb. 5). Zur Konstruktion der entsprechenden Fusionen wurden die pGP20, -21, -22-Vektoren [Haardt & Bremer, 1996] genutzt, die das promotorlose *lacZ*-Gen enthalten und eine Klonierung in allen drei Leserahmen ermöglichen. Die benötigten *lysE*-Fragmente wurden wiederum mittels PCR hergestellt (die verwendeten Primer sind im Anhang in Tabelle 6 aufgelistet). Da die pGP-Vektoren im Gegensatz zu dem Vektor pPA4 keinen Promotor stellen, wurde der *sense primer* so gewählt, daß der gesamte *lysE*-Promotor im Fragment enthalten war. Außerdem wurde durch diesen *primer* am 5'-Ende von *lysE* eine *EcoRI*-Schnittstelle eingeführt. Der *anti sense primer* enthielt eine *HpaI*-Schnittstelle. Dies ermöglichte die gerichtete Klonierung in die pGP-Vektoren. Nach Klonierung der PCR-Fragmente in *SmaI*-geschnittenen pUC18 (SureClone Kit, Roche, Mannheim), wurden sie als *EcoRI-HpaI*-Fragment isoliert und mit dem entsprechenden *EcoRI* und *SmaI*-geschnittenen pGP-Vektor ligiert. Mit diesem Ligationsansatz wurde *E. coli* DH5 α MCR transformiert. Trotz zahlreicher Versuche und verschiedener Klonierungsstrategien konnten nur drei der sechs geplanten Fusionen konstruiert werden. Dabei handelt es sich um die Fusionen an Aminosäurerest 67, 111 und 211 von LysE. Mit diesen Konstrukten wurde der *E. coli* Stamm CC118 transformiert. Nach Restriktionsanalyse wurden Plasmide, die das gewünschte Konstrukt enthielten, sequenziert (AGOWA, Berlin). Der Phänotyp von Klonen mit diesen Konstrukten wurde auf LB-Platten, die das Substrat der β -Galactosidase 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -Galactosid (Xgal) enthielten, überprüft. Alle drei Fusionen wiesen auf Xgal-haltigen Platten eine intensive Blaufärbung auf. Da die Konstruktion der Fusionen an Aminosäurerest 29, 171 und 236 von LysE erfolglos blieb, wurde versucht, diese Fusionen unter Kontrolle des *lac*-Promotors zu klonieren. Jedoch wurde erneut kein Konstrukt mit der gewünschten Fusion erhalten. Bei allen Konstruktionsversuchen wiesen die Plasmide Deletionen im *lysE*- oder *lacZ*-Gen auf. Dies deutet wiederum darauf hin, daß die Zelle die gewünschten Konstrukte nicht toleriert. Auffallend war, daß alle *lysE'*/*lacZ*-Fusionen, die nicht konstruiert werden konnten, nach der *phoA*-Analyse die Translokation der β -Galactosidase ins Periplasma bedingen würden. Eine mögliche Erklärung für die Probleme bei der Konstruktion von *lysE'*/*lacZ*-Fusionen, die vermutlich zu einer periplasmatischen Lokalisation der β -Galactosidase führen, ist, daß die β -Galactosidase zwar als Substrat von dem Translokationsapparat der Zelle erkannt wird, aber nicht vollständig transloziert wird. Dadurch wird auch der Export von für die Zelle essentiellen Proteinen beispielsweise OmpA, verhindert [Nikaido,

1994; „hybrid protein jamming“, Snyder & Silhavy, 1995]. Ein Hinweis darauf ist auch, daß die beiden cytoplasmatischen LysE'-LacZ-Fusionen ohne Probleme erhalten wurden.

Überraschend ist, daß die Fusion an den Aminosäurerest 67 von LysE einen β -Galactosidase-positiven Phänotyp aufwies, so daß man davon ausgehen muß, daß eine cytoplasmatische Lokalisation der β -Galactosidase vorliegt. Dies paßt nicht ins Bild. Jedoch ist das anhand der *phoA*-Fusionen erstellte Topologiemodell aufgrund der Vielzahl der mit ihm übereinstimmenden LysE'-PhoA-Fusionen als relativ gesichert anzusehen. Auch die beiden anderen LysE'-LacZ-Fusionen bestätigten dieses PhoA-Modell. Eine weitere Aufklärung der Topologie dieses Bereiches ist mittels der hier verwendeten Reporterfusions-Ansätze nicht möglich. Es ist bekannt, daß Reporterfusionen gerade im N-terminalen Bereich von Membranproteinen durchaus widersprüchliche Ergebnisse liefern, da die topogene Information der kurzen N-terminalen Fragmente für eine korrekte Translokation häufig nicht ausreicht [Haardt & Bremer, 1996].

2. Die Regulation des Lysinexportcarriers

2.1. Der Lysinexportcarrier wird auf Transkriptionsebene durch den Aktivator LysG reguliert

Direkt benachbart zu dem *lysE*-Gen konnte das Gen *lysG* identifiziert werden [Vrljić *et al.*, 1996], das divergent zu *lysE* transkribiert wird. Das von diesem Gen abgeleitete Polypeptid LysG weist sowohl auf der Ebene der Primär-, als auch auf der der Sekundärstruktur Ähnlichkeiten zu den LysR-ähnlichen Regulatoren [„LysR-Type-Transcriptional-Regulators“=LTTRs, Schell, 1993] auf.

Um nachzuweisen, daß LysG an der Regulation von *lysE* beteiligt ist, sollte die *lysE'*-Expression in *lysE'*/*lacZ*-Fusionsstämmen quantifiziert werden. Dazu wurden zunächst zwei verschiedene *lysE'*/*lacZ*-Fusionsstämme konstruiert, die sich nur in der An- bzw. Abwesenheit von *lysG* unterscheiden. Dafür wurde eine transkriptionelle *lysE'*/*lacZ*-Fusion konstruiert. Zunächst wurde das *lacZ*-Gen mit seiner Ribosomenbindestelle als Asp718-*Xba*I-Fragment aus dem Vektor piWiT10 [v. Wilken-Bergmann *et al.*, 1986] isoliert und nach Auffüllen der überstehenden Enden in die *Rsr*II-Schnittstelle von *lysE* inseriert (Abb.

7). Dies führte zu einer *lysE*::*lacZ*-Fusion, bei der *lacZ* nach Nukleotid 62 in *lysE* fusioniert ist. Durch die Nutzung der *RsrII*-Schnittstelle entstand ein Stopcodon nach dem 62 nt von *lysE*, so daß es sich bei der so erzeugten *lysE*::*lacZ*-Fusion um eine transkriptionale und nicht um eine translationale Fusion handelt. Die Insertion erfolgte in Vektor pJC/*lysGE* [Vrlije *et al.*, 1996]. Die so erhaltene *GE*'*lacZ*-Genkassette enthält neben der *lysE*::*lacZ*-Fusion auch eine vollständige Kopie von *lysG*. Um den Einfluß von LysG auf die *lysE*-Expression in *single copy* in *C. glutamicum* zu untersuchen, war es notwendig die *GE*'*lacZ*-Genkassette ins Chromosom des *lysG*-*lysE*-Deletionsstammes 13032 Δ EG zu integrieren. Dazu wurde die Genkassette zunächst als *Bam*HI-Fragment in den Integrationsvektor pEM1 *dppc* [Vašiková *et al.*, 1998] ligiert. Dieser Vektor ist in *C. glutamicum* nicht replizierbar und kann aufgrund des *dppc*-Fragmentes (*dppc*= *downstream ppc*) stromabwärts des *ppc*-Gens (PEP-Carboxylase-Gen) in das Chromosom von *C. glutamicum* integrieren [Eikmanns *et al.*, 1991]. Das so erhaltene Integrationsplasmid pEMGE'*lacZ* wurde dann zur Konjugation von *E. coli* S17-1 mit *C. glutamicum* 13032 Δ EG eingesetzt. Die erhaltenen kanamycinresistenten Transkonjuganten wurden mittels PCR auf korrekte Integration des Plasmides und auf Vollständigkeit der *GE*'*lacZ*-Kassette hin überprüft. Dies erwies sich als notwendig, da vorherige Klonierungen von *lysG*-haltigen Fragmenten eine Häufung von Deletionen gezeigt hatten (Sequenz und Lage der Primer, s. Tabelle 8 und Abb. 23, Anhang). Zwei der fünf getesteten Transkonjuganten enthielten die gewünschte Integration (Abb. 8).

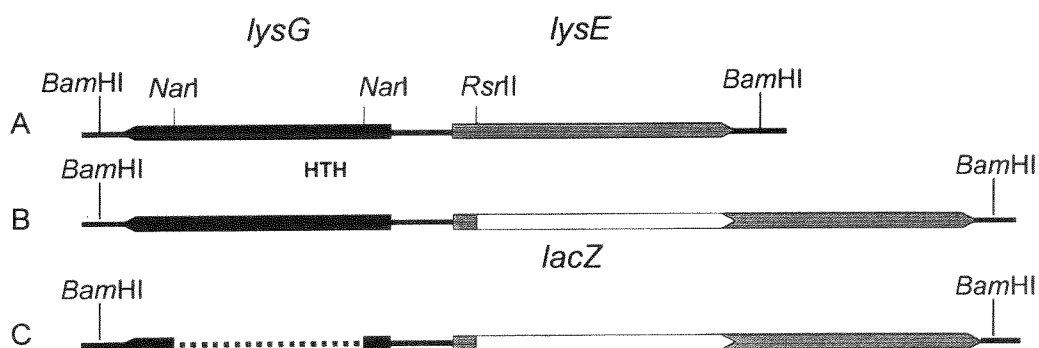


Abb. 7: Darstellung der *lysE*::*lacZ*-Genkassette, die zur Konstruktion der *lysE*::*lacZ*-Fusionsstämme verwendet wurde. (A) zeigt das *lysGE*-Gencluster mit den für die Konstruktion der Genkassette wichtigen Restriktionsschnittstellen; HTH: kennzeichnet den Bereich von *lysG*, der die N-terminale Helix-Turn-Helix-Domäne von LysG kodiert; in (B) ist die zur Konstruktion des *GE*'*lacZ*-Fusionsstammes und in (C) die zur Konstruktion des *G* ^{Δ *NarI*}*E*'*lacZ*-Fusionsstammes verwendete Genkassette dargestellt.

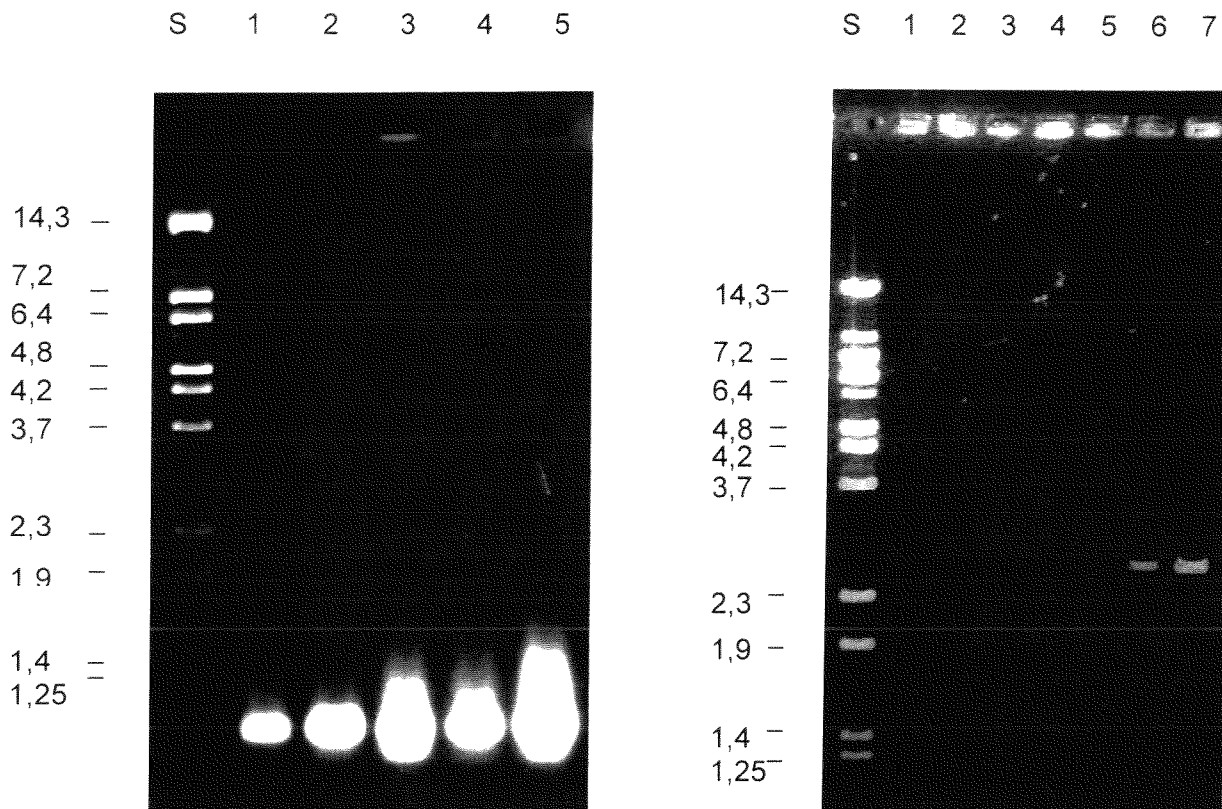


Abb. 8: Kontrolle des Stammes 13032 Δ EG *GE'lacZ*. Das linke Bild zeigt den Nachweis der Integration von *pEMGE'lacZ* in dem *dppc*-Bereich (verwendete Primer: SG4 u. SG5). In den Spuren 1-5 sind jeweils 10 μ l des PCR-Ansatzes von fünf getesteten Transkonjuganden aufgetragen. Alle fünf Spuren zeigen das für die korrekte Integration erwartete 0,9 kb-Fragment. Im rechten Bild ist die Überprüfung auf Vollständigkeit der *GE'lacZ*-Genkassette gezeigt (verwendete Primer: AB1 u. BA1). Die Spuren 1-7 enthalten jeweils 10 μ l des entsprechenden PCR-Ansatzes von Transkonjuganden, bei denen die korrekte Integration nachgewiesen worden war. Nur zwei der getesteten Transkonjuganden weisen das erwartete 2,4 kb große PCR-Fragment auf (Spuren 6+7). S: λ -DNA-Fragmente von 14,3 kb bis 0,7 kb.

Um die *lysE*-Expression auch in Abwesenheit von LysG quantifizieren zu können, wurde ein weiterer Stamm ausgehend von der *GE'lacZ*-Kassette konstruiert. Um die zentralen 739 nt von *lysG* zu deletieren, wurde *pJCGE'lacZ* mit *NarI* restringiert und anschließend religiert (Abb. 7). Die dadurch hergestellte Genkassette *G ^{Δ NarI}E'lacZ* kodiert nur für die

ersten 21 Aminosäurereste von LysG. In diesem LysG-Fragment fehlt das N-terminale Helix-Turn-Helix-DNA-Bindemotiv (HTH), das charakteristisch für Proteine der LTTR-Familie ist [Schell, 1993]. Die $G^{\Delta N_{arl}}E'lacZ$ -Genkassette wurde als *Bam*HI-Fragment aus dem Vektor pJCG $^{\Delta N_{arl}}E'lacZ$ isoliert und in den ebenfalls mit *Bam*HI geschnittenen Integrationsvektor pEM1 *dppc* ligiert. Mit dem Integrationsplasmid pEMG $^{\Delta N_{arl}}E'lacZ$ wurde *E. coli* S17-1 transformiert, und der resultierende Stamm zur Konjugation mit dem Stamm 13032 Δ EG eingesetzt. So wurden 20 Kanamycin-resistente Transkonjuganden von *C. glutamicum* erhalten, in denen das in *C. glutamicum* nicht replikative Integrationsplasmid im Chromosom integriert war. Die Überprüfung der Transkonjuganden erfolgte wieder, wie bereits beschrieben, über PCR. Zwei der zehn getesteten Transkonjuganden enthielten die vollständige $G^{\Delta N_{arl}}E'lacZ$ -Genkassette integriert in dem *dppc*-Bereich.

Zur Quantifizierung der Abhängigkeit der *lysE'::lacZ*-Expression von der Anwesenheit von LysG, wurden die beiden *lysE'::lacZ*-Fusionsstämme in BHI-Medium kultiviert und die spezifische β -Galactosidase-Aktivität nach sechs Stunden bestimmt. Während der Stamm 13032 Δ EG *GE'lacZ* mit 6,49 U/mg Protein eine hohe spezifische β -Galactosidase-Aktivität aufwies, war die bei 13032 Δ EG $G^{\Delta N_{arl}}E'lacZ$ gemessene spezifische β -Galactosidase-Aktivität mit 0,33 U/mg Protein mehr als 20-fach verringert. Dies ist somit ein deutlicher Hinweis, daß LysG ein positiver Regulator der *lysE*-Expression ist.

In einem Kontrollexperiment wurde in den Fusionsstamm ohne *lysG* dieses Gen vektor-kodiert wieder eingebracht. Zunächst wurde das vollständige *GE'lacZ*-Fragment durch Restriktion mit *Bam*HI aus pJCG $E'lacZ$ isoliert, in pEC-T18mob ligiert und anschließend *lysE'::lacZ* durch eine Restriktion mit *Aat*II und *Sc*I deleted. Diese Vorgehensweise war notwendig, da eine direkte Klonierung von *lysG* unmöglich war, da sie stets zu Transformanden mit Deletionen im Vektor bzw. Insert führte. Der Stamm 13032 Δ EG $G^{\Delta N_{arl}}E'lacZ$ mit dem resultierenden Vektor pEC-T18mob *lysG* wies eine verglichen mit dem Kontrollstamm 13032 Δ EG $G^{\Delta N_{arl}}E'lacZ$ (0,30 U/mg Protein) ca. fünffach erhöhte spezifische β -Galactosidase-Aktivität von 1,5 U/mg Protein auf. Daß die Erhöhung der Aktivität verglichen mit der 20fachen Erhöhung in dem Stamm 13032 Δ EG *GE'lacZ* vergleichsweise gering ist, liegt möglicherweise am beobachteten schlechten Wachstum

wahrscheinlich durch das Einbringen von LysG in höherer Kopienzahl bedingt. Die hier beschriebenen Experimente zeigen, daß LysG ein positiver Regulator der *lysE*-Expression ist, der in *trans* die *lysE*-Expression beeinflusst.

2.2. Die *lysE*-Expression ist medienabhängig

Der Einfluß des Mediums auf die *lysE*-Expression sollte mittels der *lysE'*/*lacZ*-Fusionsstämme untersucht werden. Zunächst wurde die *lysE*-Expression bei Wachstum auf Vollmedium (BHI) mit der auf Minimalmedium (CGXII) verglichen. Dazu wurden die beiden Klone der zwei Fusionsstämme parallel auf den verschiedenen Medien kultiviert. Zur Quantifizierung der *lysE':lacZ*-Expression wurde dann zu verschiedenen Zeitpunkten die spezifische β -Galactosidase-Aktivität bestimmt.

Der Stamm 13032 Δ EG *GE'*/*lacZ* zeigt im Gegensatz zum *lysG*-Deletionsstamm eine starke Abhängigkeit der *lysE':lacZ*-Expression vom Medium. Auf Minimalmedium ist die erreichte β -Galactosidase-Aktivität mit ca. 0,5 U/ mg Protein mehr als 10fach geringer als die bei Wachstum auf Vollmedium gemessene (s. Abb. 9). Lediglich nach 24 Stunden Kultivierung in Minimalmedium wird eine erhöhte Expression von 4 U/ mg Protein erreicht. Dies ist ein Hinweis darauf, daß die *lysE*-Expression in Anwesenheit eines Induktormoleküls, das im Vollmedium in genügend hoher Konzentration vorliegt, durch LysG induziert wird. Der *lysG*-Deletionsstamm 13032 Δ EG *G ^{Δ Nat}E'*/*lacZ* zeigte auf beiden Medien eine gleichbleibend niedrige β -Galactosidase-Aktivität von ca. 0,3 U/mg Protein. Die Notwendigkeit des Vorhandenseins zusätzlicher Effektoren für die Aktivierung der Transkription des Zielgenes, ist für die Mehrzahl der Regulatoren der LTTR-Familie gezeigt [Schell, 1993]. So wird die Expression des Na⁺/H⁺-Antiporters NhaA von *E. coli* durch steigende Konzentrationen des Effektors Na⁺ und den Aktivator NhaR erhöht [Dover *et al.*, 1996]. CatR aus *Pseudomonas putida* aktiviert nur in Anwesenheit von *cis,cis*-Muconat die Transkription des *catBCA*-Operons [McFall *et al.*, 1998]. Da bekannt ist, daß eine erhöhte interne Lysinkonzentration in *C. glutamicum* zu einem verstärktem Lysinefflux führt [Vrljić *et al.*, 1995] und *C. glutamicum* bei Wachstum auf BHI bis zu 77 mM Lysin intern enthält, handelt es sich bei dem Effektor von LysG wahrscheinlich um L-Lysin.

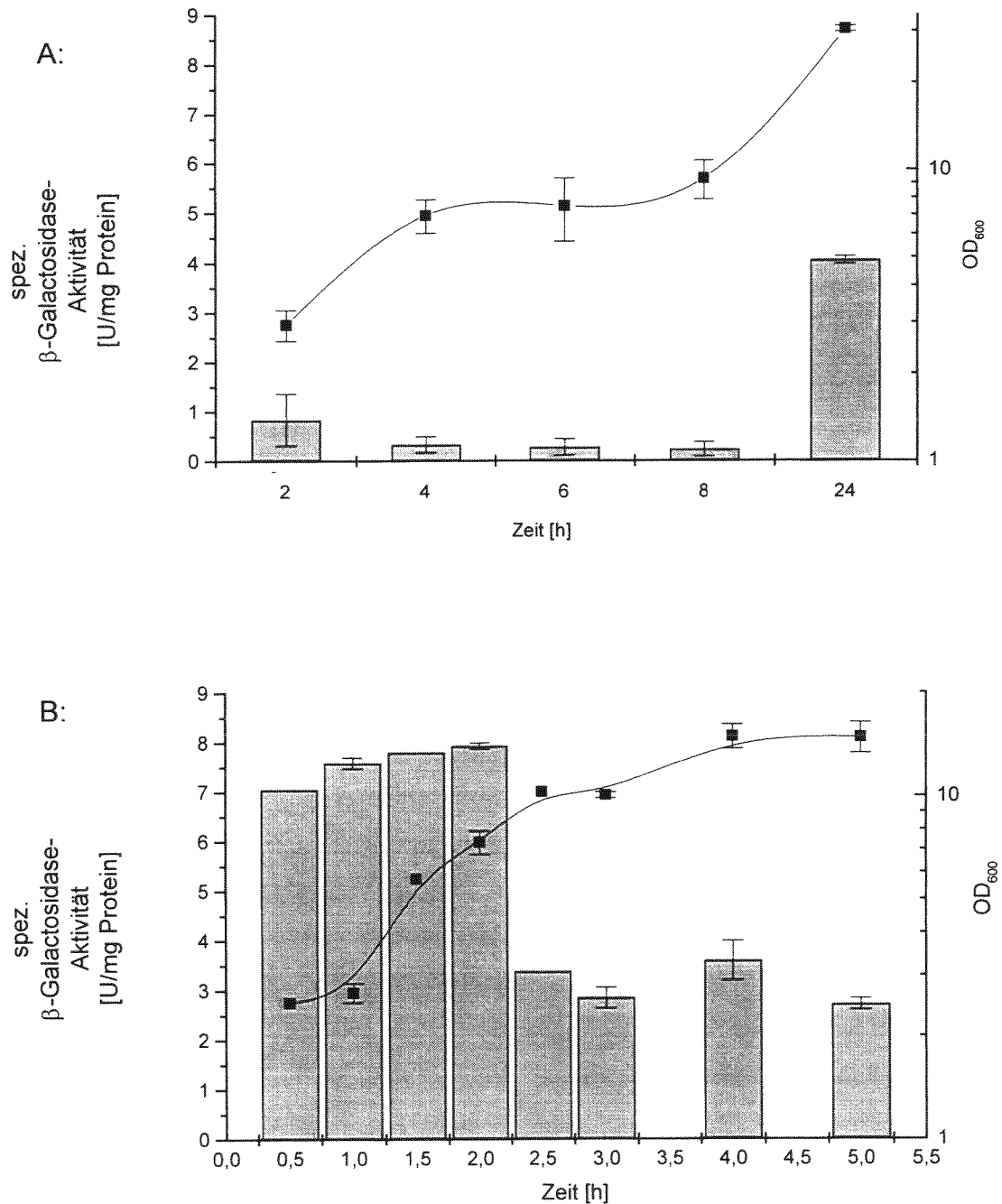


Abb. 9: Die *lysE*-Expression bei Wachstum auf verschiedenen Medien. Gemessen wurde die β -Galactosidase-Aktivität der *lysE'::lacZ*-Fusion in Stamm 13032 Δ EG *GE'lacZ*. Die β -Galactosidase-Aktivitäten wurden mindestens zweimal mit jeweils zwei verschiedenen Klonen bestimmt. Säulen geben die spezifische β -Galactosidase-Aktivität und Linien das Wachstum wieder. A: nach Wachstum auf Minimalmedium (CGXII); B: nach Kultivierung auf Vollmedium (BHI).

2.3. L-Lysin ist der Induktor von LysG

Um zu prüfen, ob L-Lysin als Induktor auf die LysG-vermittelte *lysE*-Expression wirkt, wurde gezielt die interne L-Lysinkonzentration im Stamm 13032 Δ EG *GE'**lacZ* erhöht. Während die externe Konzentration einer Aminosäure durch Mediumzusatz beliebig beeinflußt werden kann, ist eine gezielte Erhöhung der internen Konzentration einer bestimmten Aminosäure nur mittels spezieller Techniken möglich. Dies ist z.B. durch L-Methioninzugabe [Vrljić *et al.*, 1995] oder Dipeptidzugabe möglich [Erdmann & Krämer, 1993; Zittrich & Krämer, 1994].

Zunächst wurde *C. glutamicum* in CGXII unter Zusatz verschiedener L-Methioninkonzentrationen kultiviert. Dies führt zu einer verringerten Homoserindehydrogenase-Aktivität und damit zu einer erhöhten internen L-Lysinkonzentration [Cremer *et al.*, 1988; Vrljić *et al.*, 1995]. Um nun zu überprüfen, ob die durch Methionin bedingte Erhöhung der internen L-Lysinkonzentration tatsächlich zu einer Steigerung der β -Galactosidase-Aktivität führt, wurde 13032 Δ EG *GE'**lacZ* in CGXII, dem 0, 0,1, 1 und 5 mM L-Methionin zugesetzt worden war, kultiviert und nach 8 h parallel die interne L-Lysinkonzentration und die spezifische β -Galactosidase-Aktivität bestimmt. Es zeigte sich, daß die β -Galactosidase-Aktivität bei Zugabe von 1 mM L-Methionin um einen Faktor von etwa zwanzig erhöht ist, während die interne L-Lysinkonzentration nur um den Faktor vier steigt (Tabelle 3). In Anwesenheit von 0,1 mM Methionin zeigte sich noch keine signifikante Erhöhung der *lysE':lacZ*-Expression, während die Zugabe von mehr als 1 mM Methionin zu keiner weiteren Steigerung der *lysE':lacZ*-Expression führte. Dies könnte bedeuten, daß erst nach Überschreiten einer bestimmten internen L-Lysinkonzentration eine Steigerung der *lysE*-Transkription erfolgt, die durch eine weitere Erhöhung der internen L-Lysinkonzentration nicht gesteigert wird.

Tab. 3: Einfluß der externen L-Methioninkonzentration auf die *lysE'*-Expression. Gemessen wurde die β -Galactosidase-Aktivität und die interne L-Lysin-konzentration des *lysE'lacZ*-Fusionsstammes 13032 Δ EG *GE'lacZ* nach 8 h Kultivierung in CGXII-Medium unter Zusatz der angegebenen L-Methioninkonzentrationen.

L-Methionin [mM]	Spezifische	Interne
	β -Galactosidaseaktivität [mM]	L-Lysinkonzentration [mM]
0	0,12	8,4
0,1	0,19	16,0
1	2,00	31,3
5	1,74	37,8

Zur Kontrolle durchgeführte Experimente mit dem *lysG*-Deletionsstamm 13032 Δ EG *G^{ΔNari}E'lacZ* ergaben, wie erwartet keine erhöhte *lysE':lacZ*-Expression, was die Notwendigkeit von LysG zur Expression bestätigt. Ein Nachteil dieses Systems zur Steigerung der L-Lysinbiosynthese durch L-Methionin besteht darin, daß die Erhöhung der internen Lysin-konzentration indirekt erzielt wird und daher nicht auszuschließen ist, daß z.B. L-Methionin als Effektor von LysG wirkt.

Deswegen wurde in zusätzlichen Experimenten die interne L-Lysin-konzentration durch Zugabe verschiedener Konzentrationen des Dipeptides Lysylalanin (Lys-Ala) erhöht. Dabei wurde ausgenutzt, daß *C. glutamicum* in der Lage ist Dipeptide aus dem Medium aufzunehmen und in der Zelle zu den entsprechenden Aminosäuren zu hydrolysieren [Erdmann & Krämer, 1993; Zitrach & Krämer, 1994]. Dies ermöglicht die gezielte Erhöhung der internen Konzentration bestimmter Aminosäuren. Um zu testen, welche Dipeptidkonzentrationen zur Steigerung der internen L-Lysin-konzentration geeignet sind, wurde in einem Vorexperiment die spezifische β -Galactosidase-Aktivität des Stammes 13032 Δ EG *GE'lacZ* bei Kultivierung auf Minimalmedium, dem steigende Konzentrationen Lys-Ala-Dipeptid zugesetzt worden waren, bestimmt. Wie ausgehend von den vorherigen Experimenten erwartet, stieg die β -Galactosidase-Aktivität mit zunehmender Lys-Ala-Konzentration im Medium an (Abb. 10). Jedoch zeigte sich bereits ab einer Konzentration

von 0,75 mM Lys-Ala im Medium eine deutliche Wachstumshemmung und bei 2 mM Lys-Ala im Medium wuchs der Fusionsstamm überhaupt nicht mehr. Dies ist damit zu erklären, daß die Fusionsstämme keine intakte Kopie des Lysinexportcarriergens enthalten und es daher zu einer starken internen Lysinakkumulation kommt, die toxisch für die Zelle ist. Daher wurde für die folgenden Experimente nur noch Medium mit Lys-Ala-Konzentrationen bis maximal 0,75 mM verwendet. Als Negativkontrolle verwendetes Medium mit Thr-Ala-Zusatz hatte keinerlei Einfluß auf die β -Galactosidaseaktivität, so daß eine Beeinflussung der *lysE*-Expression sowohl durch die Erhöhung der internen Alanin- als auch der L-Threoninkonzentration ausgeschlossen werden kann. Als weitere Kontrolle wurde die *lysE*-Expression des Stammes 13032 Δ EG $G^{\Delta Nal}E'lacZ$ in Anwesenheit steigender Lys-Ala-Konzentrationen gemessen. Erwartungsgemäß zeigte sich keine Beeinflussung der *lysE*-Expression durch steigende Lys-Ala-Konzentrationen.

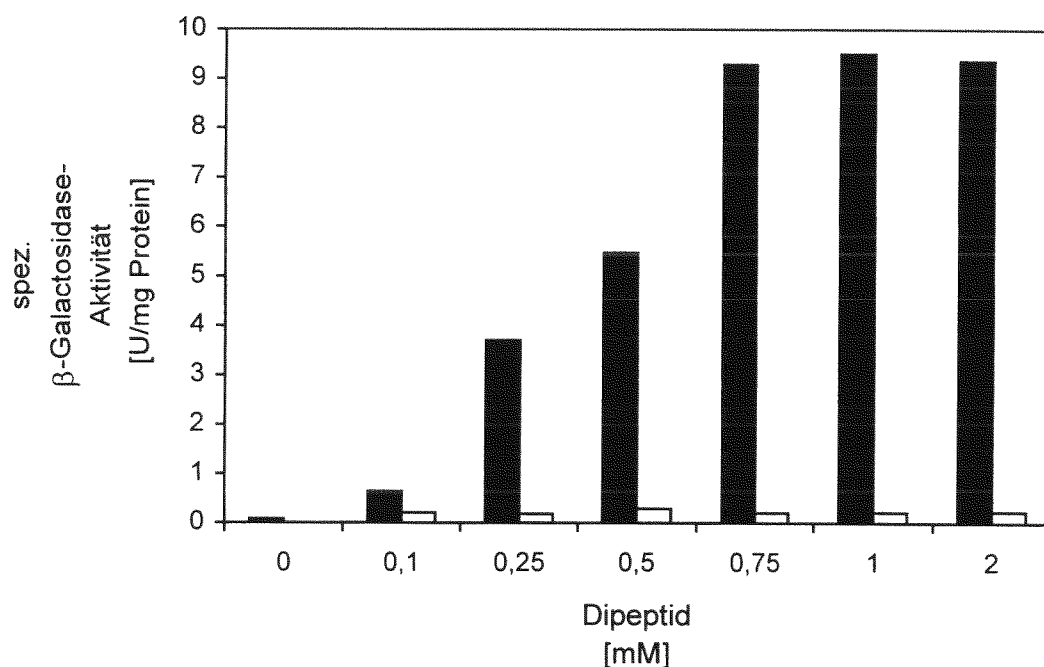


Abb. 10: Einfluß des Zusatzes von Lys-Ala- und Thr-Ala-Dipeptiden zu Minimalmedium (CGXII) auf die *lysE*-Expression. Die spezifische β -Galactosidaseaktivität der *lysE'::lacZ*-Fusion von 13032 Δ EG $GE'lacZ$ wurde nach 8,5 h Kultivierung in CGXII mit der entsprechenden Lys-Ala-Konzentration (schwarze Säulen) bzw. Thr-Ala (weiße Säulen) gemessen.

Um eine direkte Korrelation der internen L-Lysinkonzentration mit der *lysE*-Expression prüfen zu können, wurde 13032 Δ EG *GE'**lacZ* in Minimalmedium unter Zusatz von 0, 0,25, 0,5 und 0,75 mM Lys-Ala kultiviert. Alle zwei Stunden wurde eine Probe der Zellen zur Bestimmung der spezifischen β -Galactosidase-Aktivität und der internen L-Lysinkonzentration entnommen. Die Ergebnisse dieses Experimentes sind in Abbildung 11 zusammengefaßt. Bereits in Anwesenheit von 0,25 mM Lys-Ala kommt es zu einer Erhöhung der internen L-Lysinkonzentration auf maximal 62 mM und einer deutlichen Steigerung der *lysE'*::*lacZ*-Expression auf 5,6 U/mg Protein gegenüber maximal 0,7 U/mg Protein in Abwesenheit von Lys-Ala. Wie erwartet führten steigende Lys-Ala-Konzentrationen im Medium zu einer Erhöhung der internen L-Lysinkonzentration. So wurden in Anwesenheit von 0,50 mM Lys-Ala intern bis zu 142 mM Lysin und bei einer externen Lys-Ala-Konzentration von 0,75 mM intern 240 mM Lysin akkumuliert. Auch die spezifische β -Galactosidase-Aktivität stieg entsprechend an. Jedoch zeigte die β -Galactosidase-Aktivität über die Kultivierungszeit je nach externer Lys-Ala-Konzentration einen unterschiedlichen Verlauf. Während sie bei 0,25 mM Lys-Ala stetig sinkt, erreicht sie z.B. bei 0,75 mM Lys-Ala erst nach 6 h ihr Maximum, so daß keine direkte Korrelation zwischen einer bestimmten internen L-Lysinkonzentration und einer daraus resultierenden spezifischen β -Galactosidase-Aktivität erkennbar ist. Das Fehlen einer direkten Korrelation zwischen der internen L-Lysinkonzentration und der spezifischen β -Galactosidase-Aktivität ist möglicherweise durch die Art des Experimentes selbst erklärbar: Durch den Dipeptidzusatz zum Medium kommt es beim Überimpfen der Zellen zu einer plötzlichen, drastischen Erhöhung der internen L-Lysinkonzentration, gefolgt von einem langsamen Abfall. Möglicherweise beeinflußt auch das bei hohen internen L-Lysinkonzentrationen verschlechterte Wachstum die *lysE'*::*lacZ*-Expression. Insgesamt waren die gemessenen β -Galactosidaseaktivitäten deutlich höher als nach Methioninzugabe. Dies ist möglicherweise damit erklärbar, daß die Methioninzugabe erst nach einem längerem Zeitraum zu einer starken Erhöhung der internen L-Lysinkonzentration führt.

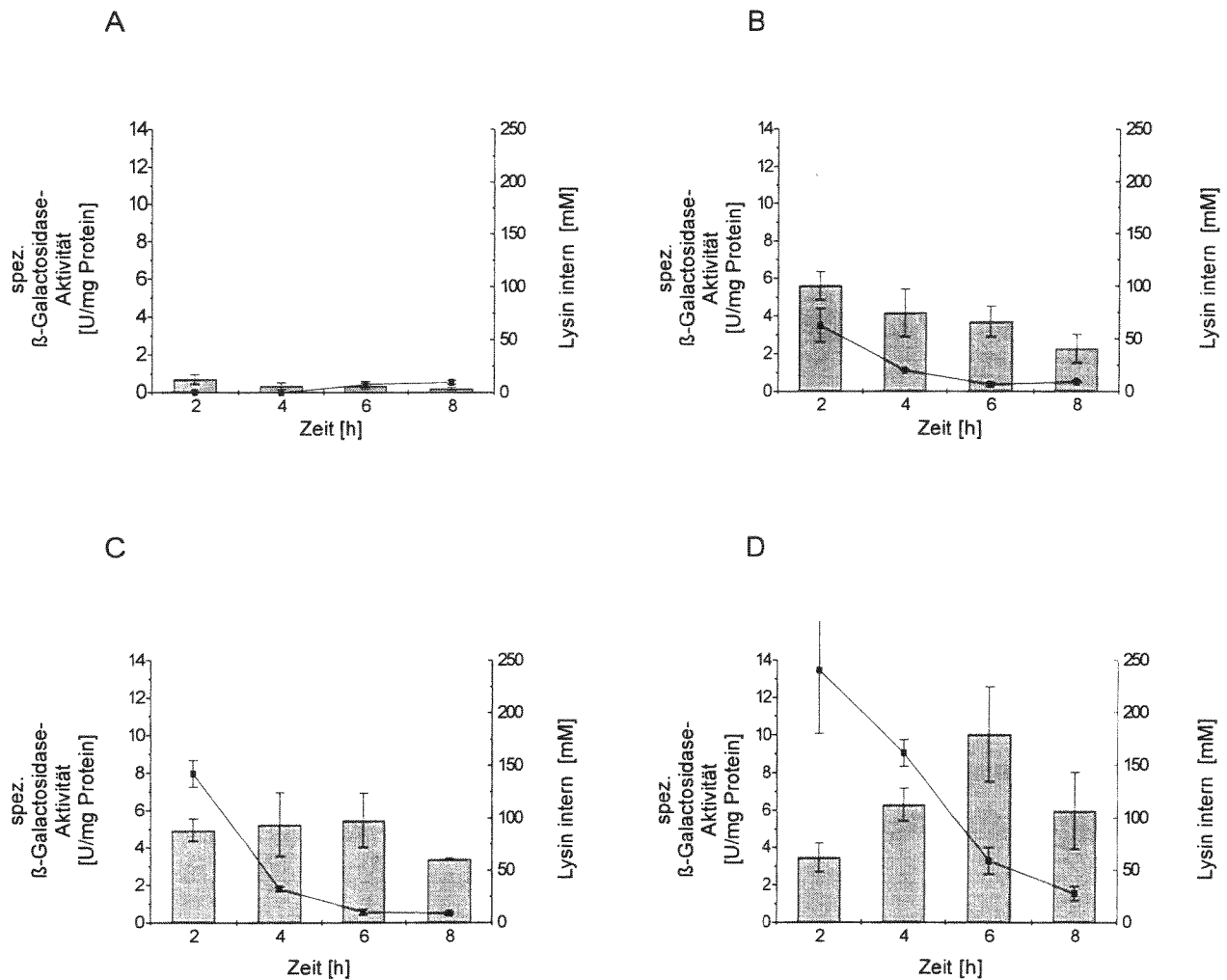


Abb. 11: Einfluß der internen Lysinkonzentration auf die *lysE':lacZ*-Expression. nach Wachstum von 13032 Δ EG *GE'lacZ* in Minimalmedium mit

(A) 0 mM

(B) 0,25 mM

(C) 0,50 mM

(D) 0,75 mM Lys-Ala

Die Säulen geben die spezifische β -Galactosidaseaktivität, die Linien die interne Lysinkonzentration an.

Um die Expression von *lysE* in Anwesenheit konstanter interner L-Lysinkonzentrationen zu bestimmen, wurden *lysE'*/*lacZ*-Fusionsstämme konstruiert, die sich von vornherein in ihrer internen L-Lysinkonzentration unterschieden. Dazu wurden isogene *C. glutamicum*-Stämme verwendet, die sich nur in der Regulation des Schlüsselenzyms der zellulären Lysinsynthese, der Aspartatkinase, unterscheiden [Cremer *et al.*, 1991]. Die Aspartatkinase in Stamm MH20-22B ist *feedback*-resistent [Kalinowski *et al.*, 1990], während LE4 die Wildtyp Aspartatkinase besitzt, die durch L-Lysin und L-Threonin konzentriert *feedback*-inhibiert wird. In diese zwei Stämme wurde mittels Konjugation mit *E. coli* S17-1 pEMGE'*lacZ* die GE'*lacZ*-Fusionskassette eingeführt. Die Kontrolle der erhaltenen Transkonjuganden erfolgte wie oben beschrieben. Aus 35 erhaltenen Transkonjuganden von LE4 GE'*lacZ* wurden zwei Klone ausgewählt, die die gewünschte *lysE'*/*lacZ*-Fusion enthielten. Die einzige erhaltene Transkonjugande des Stammes MH20-22B GE'*lacZ* enthielt ebenfalls die *lysE'*/*lacZ*-Fusion. Die Ergebnisse der Bestimmung der internen L-Lysinkonzentration und der spezifischen β -Galactosidaseaktivität, nach Kultivierung auf Minimalmedium sind in Tabelle 4 zusammengefaßt. Im Stamm LE4 GE'*lacZ* ist intern kein L-Lysin nachweisbar, während MH20-22B GE'*lacZ* eine mit 28,4 mM deutlich erhöhte interne L-Lysinkonzentration aufweist. Der Stamm LE4GE'*lacZ* zeigt wie erwartet mit nur 0,13 U/mg Protein eine wesentlich geringere spezifische β -Galactosidaseaktivität als der Stamm MH20-22B GE'*lacZ* mit 6,12 U/mg Protein. Auch dieses Experiment, in dem auf jegliche Beeinflussung durch extrazelluläre Zusätze verzichtet wurde, bestätigt, daß L-Lysin als Induktor von LysG wirkt.

Tab. 4: *lysE*-Expression in isogenen *C. glutamicum* Stämmen mit unterschiedlicher interner L-Lysinkonzentration. Die *lysE'*-Expression wurde über die *lysE'*/*lacZ*-Expression der Fusionsstämmen bestimmt. Zum Vergleich sind die interne L-Lysinkonzentration und die spezifische β -Galactosidase-Aktivität auch von den Ausgangsstämmen angegeben.

Stamm	Interne Lysinkonzentration [mM]	Spezifische β -Galactosidase-Aktivität [U/mg Protein]
LE4	<0,05	0,05
LE4 <i>GE'</i> / <i>lacZ</i>	<0,05	0,38
MH20-22B	28,4	0,07
MH20-22B <i>GE'</i> / <i>lacZ</i>	34,9	6,12

In drei verschiedenen Experimenten konnte somit gezeigt werden, daß die interne L-Lysinkonzentration, die LysG-vermittelte *lysE*-Expression beeinflusst. L-Lysin wirkt demnach als Induktor von LysG.

2.4. Auch L-Arginin induziert die LysG vermittelte *lysE*-Expression

Da bekannt ist, daß der Lysinexportcarrier neben L-Lysin auch L-Arginin exportiert (Vrljić persönl. Mitteilung), stellte sich die Frage, ob auch eine Erhöhung der internen L-Argininkonzentration die *lysE*-Expression beeinflusst.

Um dies zu untersuchen, wurde der Stamm 13032 Δ EG *GE'*/*lacZ* in Minimalmedium unter Zusatz verschiedener Arginylalanin-Konzentrationen (Arg-Ala) kultiviert und die spezifische β -Galactosidase-Aktivität bestimmt. Die Daten sind in Abbildung 12 gezeigt. Wie ersichtlich bedingt auch der Zusatz von Arg-Ala eine drastische Steigerung der *lysE'*/*lacZ*-Expression. Folglich wirkt nicht nur L-Lysin sondern auch L-Arginin als Induktor der *lysE*-Expression. Jedoch führt die Zugabe von mehr als 0,5 mM Arg-Ala zu keiner weiteren Steigerung der *lysE*-Expression. Dies könnte damit zu erklären sein, daß Arg-Ala bereits ab einer Konzentration von 0,5 mM im Minimalmedium zu einer deutlichen Wachstumsverzögerung führt, die noch stärker ist, als die durch hohe Lys-Ala-

Konzentrationen ausgelöst. Die bei einer Konzentration von 2 mM Arg-Ala im Medium durchgeführte Bestimmung der internen L-Argininkonzentration zeigte, daß das Dipeptid ebenso wie Lys-Ala aufgenommen und in der Zelle hydrolysiert wird. Die interne L-Argininkonzentration, die unter diesen Bedingungen in dem Deletionsstamm 13032 Δ EG erreicht wird, ist mit ungefähr 800 mM vergleichbar mit der in Anwesenheit von Lys-Ala intern akkumulierten L-Lysinkonzentration.

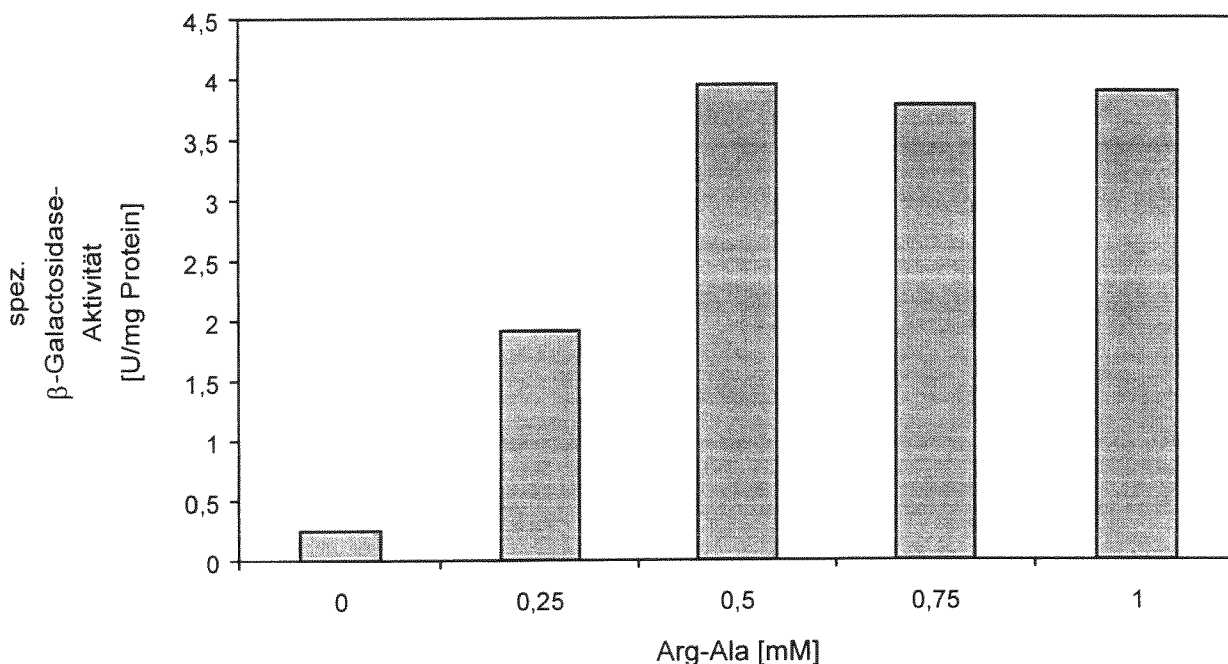


Abb. 12: Einfluß des Dipeptides Arg-Ala auf die *lysE*-Expression. Gemessen wurde die spezifische β -Galactosidase-Aktivität der *LysE*::*LacZ*-Fusion des Stammes 13032 Δ EG *GE'**lacZ*. Dieser Stamm wurde 6 h in CGXII unter Zusatz der angegebenen Arg-Ala-Konzentrationen kultiviert.

Um zu zeigen, daß auch L-Arginin über *LysG*-vermittelt die *lysE*-Expression induziert, wurde auch der *lysG*-Deletionsstamm 13032 Δ EG *G^{ΔNarI}E'**lacZ* in Anwesenheit steigender Arg-Ala-Konzentrationen kultiviert und anschließend die β -Galactosidase-Aktivität bestimmt. Hier zeigte sich wie bei den vorherigen Experimenten zur L-Lysin-bedingten Induktion, daß L-Arginin in Abwesenheit von *LysG* keine Induktion der *lysE*-Expression auslöst.

2.5. L-Histidin und L-Citrullin induzieren die *lysE*-Expression, werden aber nicht durch den Lysinexportcarrier exportiert

Da L-Lysin und L-Arginin sowohl die LysG-vermittelte *lysE*-Expression induzieren als auch durch LysE exportiert werden, lag es nahe weitere basische Aminosäuren auf Induktion und Export hin zu untersuchen. Dazu wurden Dipeptidfütterungsexperimente mit Histidiny-Alanin (His-Ala) und Citrullinyl-Phenylalanin (Cit-Phe) durchgeführt. Der Stamm 13032 Δ EG *GE'**lacZ* wurde in Minimalmedium unter Zusatz steigender Dipeptidkonzentrationen kultiviert und die spezifische β -Galactosidase-Aktivität nach 6 h Wachstum bestimmt. In Abbildung 13 sind die Ergebnisse dieser Experimente zusammengefaßt. Sowohl der Zusatz von His-Ala, als auch der von Cit-Phe bedingen eine starke Erhöhung der *lysE'*:*lacZ*-Expression von 13032 Δ EG *GE'**lacZ*. Zur Kontrolle wurde die *lysE'*:*lacZ*-Expression im *lysG*-Deletionsstamm 13032 Δ EG *G^{ΔNar}E'**lacZ* gemessen. In Abwesenheit von LysG wird die *lysE*-Expression wie erwartet nicht durch steigende Konzentrationen der beiden verwendeten Dipeptide im Minimalmedium beeinflusst.

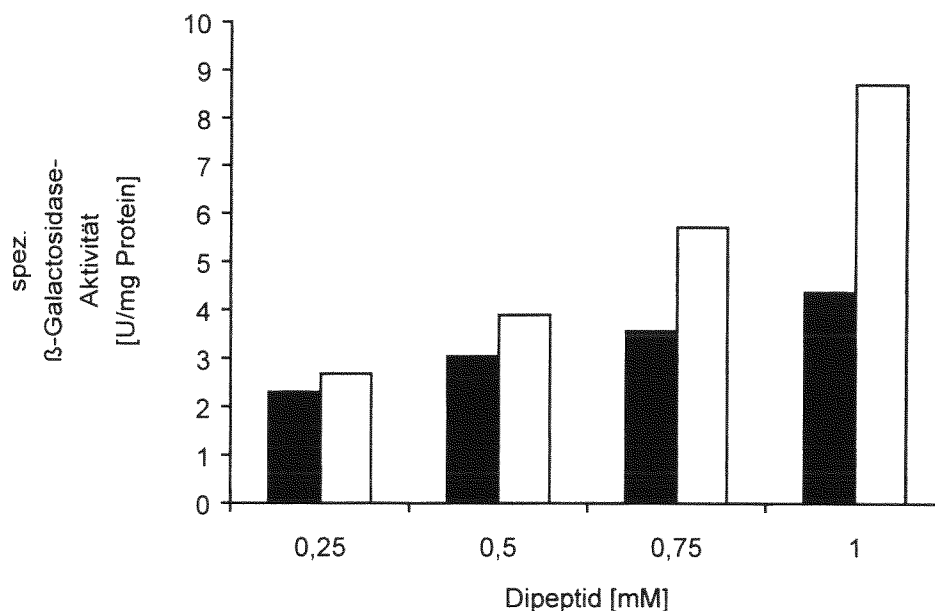
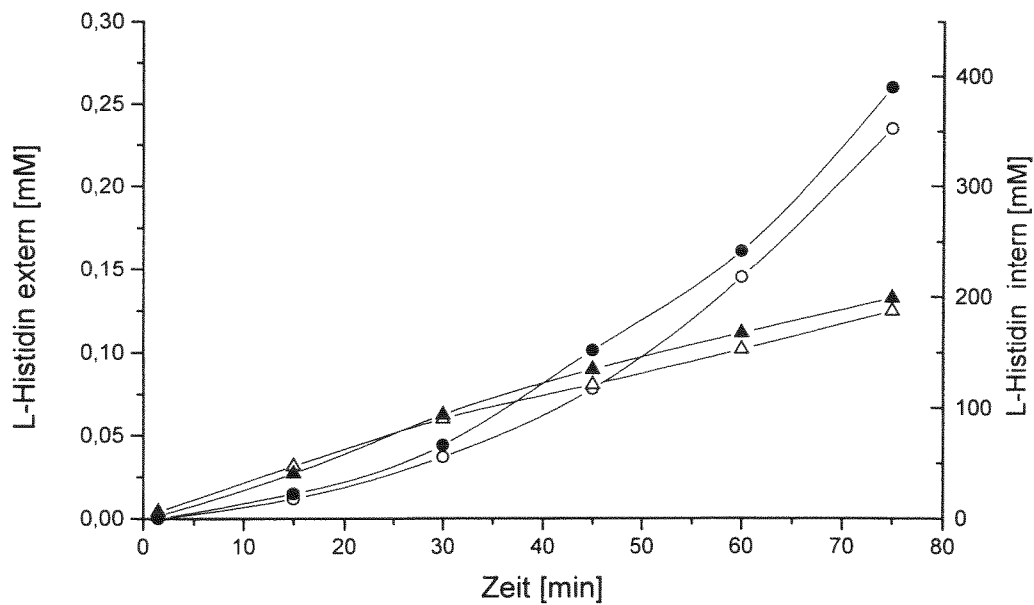


Abb. 13: Einfluß steigender His-Ala- bzw. Cit-Phe-Konzentrationen auf die *lysE* - Expression. Die spezifische β -Galactosidaseaktivität der *LysE'**LacZ*-Fusion wurde nach 6 h Kultivierung von 13032 Δ EG *GE'**lacZ* in Minimalmedium unter Zusatz der angegebenen Dipeptidkonzentration bestimmt. Schwarze Säulen: His-Ala-Zusatz, weiße Säulen: Cit-Phe-Zusatz.

A:



B:

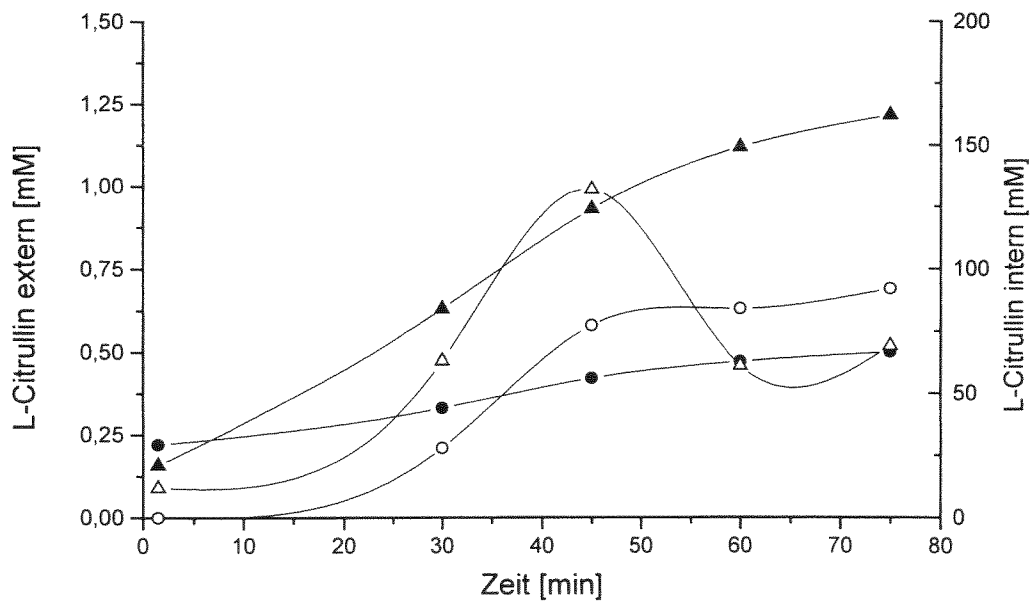


Abb. 14: Akkumulation und Export von L-Histidin (A) und L-Citrullin (B) im Wildtyp 13032 und in 13032 ΔEG . Beide Stämme wurden in Minimalmedium mit 2 mM His-Ala bzw. 2 mM Cit-Phe kultiviert. Δ / $\blacktriangle$: interne L-Histidin-/ L-Citrullinkonzentration; $\circ$ $\bullet$ externe L-Histidin- bzw. L-Citrullinkonzentration; ausgefüllte Symbole: 13032; offene Symbol: 13032 ΔEG ;

Um zu prüfen, ob der Lysinexportcarrier auch L-Histidin und L-Citrullin exportieren kann, wurde in Kurzzeitfermentationen der Export beider Substanzen im *C. glutamicum* Wildtyp 13032 und in der Deletionsmutante 13032 Δ EG untersucht. Dazu wurden beide Stämme auf Minimalmedium vorkultiviert und dann zur Bestimmung des L-Histidin- bzw. L-Citrullinexportes in Minimalmedium, das 2 mM His-Ala bzw. 2 mM Cit-Phe enthielt überimpft. Alle 15 min wurden Proben zur Bestimmung der internen und externen L-Histidin- bzw. L-Citrullinkonzentration genommen. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 14 dargestellt. Bei Wachstum auf CGXII mit 2 mM His-Ala stieg die intrazelluläre L-Histidinkonzentration in beiden Stämmen auf ca. 200 mM an. Auch die externe L-Histidinkonzentration zeigte keinen Unterschied zwischen dem Wildtyp mit intaktem Lysinexportcarrier und der *lysEG*-Deletionsmutante. Während der Histidinexport offensichtlich nicht durch die An- bzw. Abwesenheit des Lysinexportcarriergens beeinflusst wird, ist die Situation in Bezug auf den Citrullinexport komplizierter. In Anwesenheit des Lysinexportcarriergens ist die interne Citrullinkonzentration sogar etwas höher verglichen mit dem *lysEG*-Deletionsstamm. Da der Deletionsstamm eine verglichen mit dem Wildtyp erhöhte extrazelluläre Citrullinkonzentration aufweist, kann aber ausgeschlossen werden, daß der Lysinexportcarrier am Citrullinexport direkt beteiligt ist. Eine Erhöhung der internen L-Arginin- bzw. L-Lysinkonzentration war bei beiden verwendeten Stämmen nicht zu beobachten (nicht gezeigt).

Zusammenfassend bleibt festzustellen, daß sowohl L-Histidin als auch L-Citrullin zwar als Effektoren von LysG wirken, beide Aminosäuren aber nicht von LysE exportiert werden. Die durchgeführten Experimente zeigen, daß es weitere noch unbekannte Exporter für L-Histidin und L-Citrullin geben muß.

2.6. Einbringen des intergenischen Bereichs von *lysE* und *lysG* in hoher Kopienzahl setzt die *lysE*::*lacZ*-Expression in 13032 Δ EG *GE*'*lacZ* herab.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Regulation der *lysE*-Expression auf molekularer Ebene. Mit dem Ziel eine Interaktion zwischen dem LysG-Protein und der Promotorregion von LysG nachzuweisen, sollte ein Titrationsexperiment mit ganzen Zellen von *C. glutamicum* durchgeführt werden. Dazu wurde die vermutete LysG-Bindesequenz zunächst in den Vektor pVWEX2 [Wendisch, 1997] kloniert.

Im Bereich des divergenten Promotors von *lysE* und *lysG* befindet sich eine partiell palindromische DNA-Sequenz, die einer typischen DNA-Erkennungssequenz von Regulatoren der LTTR-Familie ähnelt. Um eine Interaktion zwischen dieser Region und LysG nachzuweisen wurde ein 455 bp Fragment ('EG' in Abb. 15), das neben dem intergenischen Bereich von *lysE* und *lysG* auch Teile beider Gene enthielt, mittels über PCR eingefügte *Bam*HI-Schnittstellen aus dem *lysGE*-Gencluster isoliert und in den Vektor pVWEX2 [Wendisch, 1997] kloniert. Mit dem so erhaltenen Vektor pVWEX2'EG' wurde der Stamm 13032 Δ EG *GE'**lacZ* transformiert. Anschließend wurde der resultierende Stamm 13032 Δ EG *GE'**lacZ* pVWEX2 und der Stamm 13032 Δ EG *GE'**lacZ* pVWEX2'EG' in Vollmedium kultiviert und die spezifische β -Galactosidase-Aktivität nach sechs Stunden Kultivierungszeit bestimmt. Die spezifische β -Galactosidase-Aktivität in Anwesenheit des Vektors pVWEX2'EG' betrug 0,30 U/mg Protein und ist damit mit der des LysG-Deletionsstamms von 0,38 U/mg Protein vergleichbar. Dagegen zeigten die Klone, die den Leervektor enthielten eine β -Galactosidase-Aktivität von ca. 6 U/mg Protein, die der in Abwesenheit des Vektors gemessenen entsprach.

Durch dieses *in vivo* Experiment ist gezeigt, daß LysG mit dem intergenischen Bereich von *lysE* und *lysG* interagiert und in der Zelle frei diffundiert. Außerdem wurde hierdurch der Bereich, in dem LysG bindet bereits eingegrenzt.

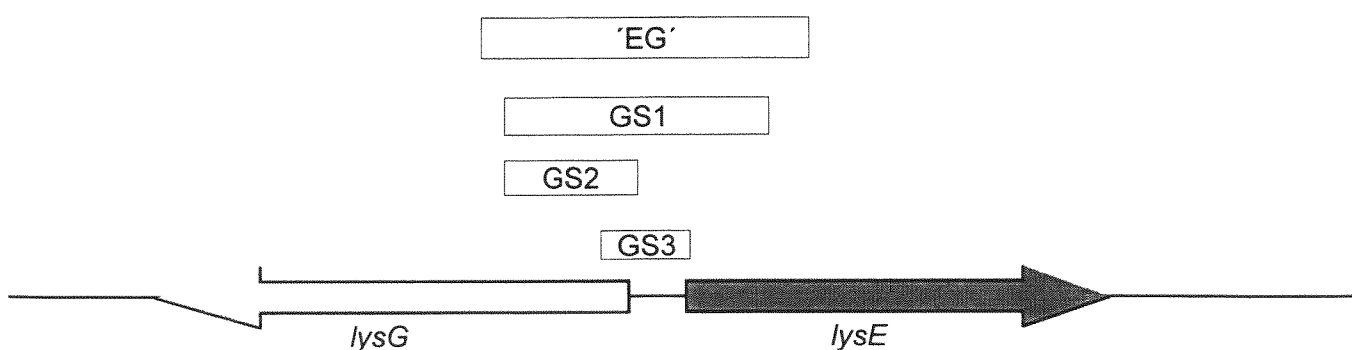


Abb. 15: Lage der im Titrationsexperiment und in den Gelretardations-experimenten verwendeten Promotorfragmente innerhalb des *lysGE*-Genclusters. Die Fragmente GS1, GS2 und GS3 wurden für die Gelretardationsexperimente und das 'EG'-Fragment für das "Austitrierexperiment" verwendet

2.7. LysG bindet am intergenischen Bereich von *lysG* und *lysE*

Um *in vitro* eine Interaktion zwischen LysG und dem intergenischen Promotor von *lysE* und *lysG* nachzuweisen, wurden Gelretardationsexperimente durchgeführt. Dieses Verfahren beruht darauf, daß das elektrophoretische Laufverhalten von Nucleinsäuren durch die Bindung eines Proteins verändert, meist verzögert, wird [Fried & Crothers, 1981].

2.7.1. Gelretardationsanalyse unter Verwendung von *E. coli*-Rohextrakten

Als Quelle von LysG wurden *E. coli*-Rohextrakte von den *lysG*-Überexprimierern DH5 α MCR pUC18GE und DH5 α MCR pJCGE'*lacZ* verwendet. Diese Vektoren wurden genutzt, da die Überexpression von *lysG* in Abwesenheit des *lysE*-Gens in *E. coli* zu einer starken Wachstumsverzögerung und häufig auch zu Deletionen in den entsprechenden Plasmiden führte. Als Kontrolle dienten Rohextrakte, die denselben Vektor enthielten, in dem aber *lysG* durch Restriktion mit *NarI* und anschließende Religation fast vollständig deletiert war. Die Rohextrakte wurden mit dem DIG-markierten DNA-Fragment GS1 inkubiert, das mit 321 bp den gesamten intergenischen Bereich (61 bp) von *lysE* und *lysG* sowie 140 bp von *lysG* und 120 bp von *lysE* umfaßte (Abb. 15). Außerdem enthielt der Reaktionsansatz 5 x Inkubationspuffer, Poly[d(I-C)] als Kompetitor-DNA und Poly-Lysin, das die DNA-Bindung unterstützt [Bannister *et al.*, 1989]. Die Auftrennung erfolgte in einem 6% nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel. Abbildung 16 zeigt eine der mehrfach durchgeführten Gelretardationsanalysen. Zwar sind in den Spuren, in denen Reaktionsansätze, die Rohextrakte von den *lysG*-Überexprimierern enthalten, zwei Verzögerungsbanden zu erkennen, jedoch finden sich beide Banden auch in den Kontrollen (DH5 α MCR pUC18G Δ *NarI*E, DH5 α MCR pJCG Δ *NarI*E'*lacZ* und DH5 α MCR ohne Vektor). Dies zeigt, daß die beobachtete Retardation nicht LysG-spezifisch ist. Zur Kontrolle wurde die Konzentration der Kompetitor-DNA verdoppelt, so daß sie im 2000fachen Überschuß im Vergleich zu dem DIG-markierten GS1-Fragment vorlag. Auch unter diesen Bedingungen verminderte sich die Intensität der Verzögerungsbanden nicht. Um zu überprüfen, ob es sich um eine spezifische Verzögerung handelt, wurden Retardationsexperimente mit DIG-markierten DNA-Fragmenten aus dem Pilz *Ashbya gossypii* (800 bp PCR-Fragment, amplifiziert von I. Maeting) und einem 500 bp-Fragment aus dem *dtSR1*-Gen von *C. glutamicum* (isoliert von Y. Tilg) durchgeführt. Hier zeigte sich

2.7.2. Gelretardationsanalyse unter Verwendung von *C. glutamicum*-Rohextrakten

Aufgrund der derzeit vorliegenden Genomdaten von *C. glutamicum* ist es unwahrscheinlich, daß *C. glutamicum* neben *lysG* noch weitere Regulatoren der LTTR-Familie besitzt. Daher sollte bei Verwendung von *C. glutamicum*-Rohextrakten das Auftreten einer LysG-unspezifischen Retardationsbande unwahrscheinlich sein. Aus diesem Grund wurden die Gelretardationsexperimente mit Rohextrakten aus verschiedenen *C. glutamicum lysG*-Überexprimierern wiederholt. Die Rohextrakte wurden aus den Stämmen 13032 Δ EG pJCGE'*lacZ*, R127 Δ EG pJCGE'*lacZ* und 13032 pMV*lysG* gewonnen. Als Kontrolle dienten die Stämme mit dem Vektor pJCG ^{Δ NarI}E'*lacZ*. Zunächst zeigte sich keinerlei Verzögerung. Erst nachdem der pH-Wert des Zellaufschlußpuffers von vorher 8,5 auf einen pH von 7,6 herabgesetzt wurde, erfolgte eine Retardation der GS1-Bande. Neben einer verzögerten Bande, die auch nach Inkubation von GS1 mit Rohextrakten von *lysG*-Deletionsstämmen sichtbar wird, zeigten die Spuren, in denen Reaktionsansätze mit GS1 und Rohextrakt von *lysG*-Überexprimierern aufgetrennt wurden, eine noch stärker retardierte Bande (Komplex, s. Abb. 17A). Wie Abbildung 17A zeigt, war diese in den Kontrollen nicht nachweisbar. Auch bei Verwendung des DNA-Fragmentes aus *Ashbya gossypii* bzw. des *dtsR1*-Fragmentes aus *C. glutamicum* trat keinerlei Verzögerung auf. Dies zeigt, daß die beobachtete Retardation LysG- und DNA-Fragment-spezifisch ist.

Um den LysG-Bindebereich einzugrenzen wurden Retardationsexperimente mit zwei weiteren DIG-markierten DNA-Fragmenten aus dem Promotorbereich von *lysG* und *lysE* durchgeführt. Die Lage dieser Fragmente innerhalb des *lysGE*-Genclusters ist in Abbildung 15 dargestellt. Das PCR-Fragment GS3 umfaßt mit 105 bp nur 32 nt von *lysG* und 12 nt von *lysE* sowie den gesamten intergenischen Bereich. Bei Verwendung dieses GS3-Fragmentes (die zur Amplifikation verwendeten Primer sind im Anhang in Tabelle 9 angegeben), tritt ebenfalls eine deutliche Retardationsbande auf (Komplex, s. Abb. 17B). Diese ist LysG-spezifisch und trat in den Negativkontrollen nicht auf. Hingegen erfährt das GS2-Fragment, das bis auf 5 nt des intergenischen Bereiches ausschließlich aus dem *lysG*-kodierenden Bereich stammt (Abb. 15), durch LysG-haltigen Rohextrakt keine Verzögerung (nicht gezeigt). Damit ist es möglich, die DNA-Binderegion auf die 105 nt einzugrenzen, die in dem GS3-DNA-Fragment vorliegen.

Verzögerung (nicht gezeigt). Damit ist es möglich, die DNA-Binderegion auf die 105 nt einzugrenzen, die in dem GS3-DNA-Fragment vorliegen.

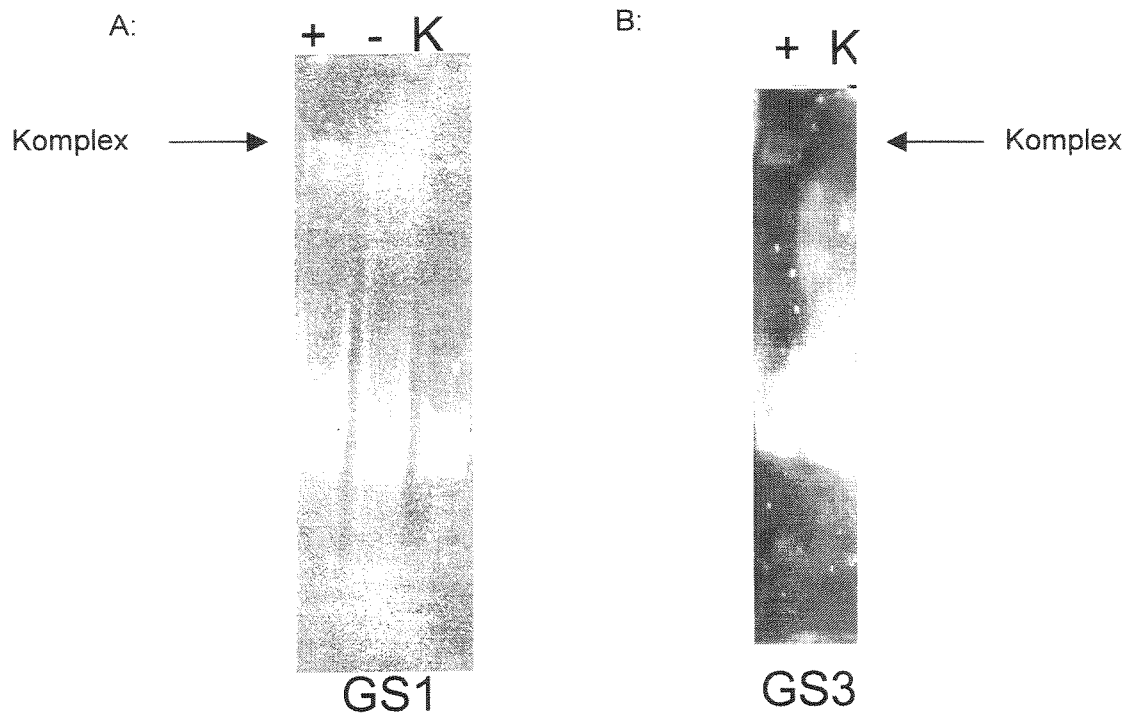


Abb. 17: Gelretardationsexperimente unter Verwendung verschiedener *C. glutamicum*-Rohextrakte und der DNA-Fragmente GS1(A) und GS3 (B). Die Auftrennung erfolgte in einem 6% DNA-Retardationsgel (Novex Electrophoresis). Die Detektion der DIG-markierten DNA erfolgte über Chemolumineszenz der Anti-DIG-alkalische Phosphatase-Konjugate. +: Gelretardationsansatz bestehend aus dem entsprechenden DNA-Fragment und LysG-haltigem Rohextrakt; -: Gelretardationsansatz bestehend aus dem entsprechenden DNA-Fragment und LysG-freiem Rohextrakt; K: freie DNA; Komplex: LysG-spezifischer DNA-Proteinkomplex;

2.7.3. Isolierung von His-markiertem LysG-Protein

Um zukünftige Gelretardationsexperimente mit reinem LysG-Protein zu ermöglichen, sollte LysG als His-Derivat über Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. LysG weist am N-Terminus die für die Mitglieder der LTTR-Familie charakteristische Helix-Turn-Helix-Domäne und im C-terminalen Bereich eine der putativen Multimerisierungsdomänen der für LTTRs typischen Regionen auf [Schell, 1993].

Sowohl die N- als die C-terminale Region von Proteinen der LTTR-Familie enthält Domänen, die essentiell für die DNA-Bindung bzw. die Transkriptionsaktivierung ihrer Zielgene sind [Schell, 1993]. Da in der Literatur sowohl Beispiele beschrieben sind, in denen eine N-terminale His-Markierung als auch eine C-terminale Markierung die effiziente Bindung an die DNA stört, sollte LysG sowohl als N- als auch als C-terminal His-markiertes Protein isoliert werden. Hinzu kommt, daß eine C-terminale Fusion gewährleistet, daß nur vollständige Proteine aufgereinigt werden.

Für die Konstruktion des C-terminal His-markierten LysG's, wurde *lysG* zunächst mittels PCR, unter Verwendung von Primern, die am 5'-Ende von *lysG* eine *Bam*HI- und am 3'-Ende eine *Sph*I-Schnittstelle einführen (s. Tabelle 10, Anhang), einschließlich des eigenen Startcodons amplifiziert. Nach Klonierung des PCR-Fragmentes in den mit *Sma*I-geschnittenen Vektor pUC18 (SureClone-Kit, Roche Mannheim), wurde *lysG* als 882 bp großes *Bam*HI-*Sph*I-Fragment aus diesem Vektor isoliert. Anschließend wurde dieses Fragment mit dem mit *Bam*HI und *Sph*I geschnittenen pQE70-Vektor (Qiagen, Hilden) ligiert, so daß *lysG* hinter dem T5-Promotor und *in frame* mit einer stromabwärts gelegenen, für 6 His-Reste kodierenden Region vorlag. Das resultierende Plasmid pQE70CG wurde nach *E. coli* M15 pREP4 transformiert. Das in diesem Stamm vorliegende Plasmid pREP4 kodiert den LacI-Repressor und ermöglicht so die Induktion der *lysG*-Expression durch IPTG-Zusatz. Außerdem ist die Expression des *lysG*-Gens in Abwesenheit von IPTG so gering, daß auch falls LysG bzw. die LysG-His-Fusion schädlich für die Zelle sein sollte, die Konstruktion möglich sein sollte. Um die Identifikation solcher Klone des Stammes M15 pREP4 pQE70CG zu erleichtern, die C-terminal His-markiertes LysG (LysG-H₆) exprimieren, wurde zunächst mit den erhaltenen Transformanten ein Kolonieblot durchgeführt und parallel die Plasmide von zehn der

(Qiagen, Hilden) in einer für die Gelretardation ausreichenden Menge aufgereinigt werden (Abb. 19).

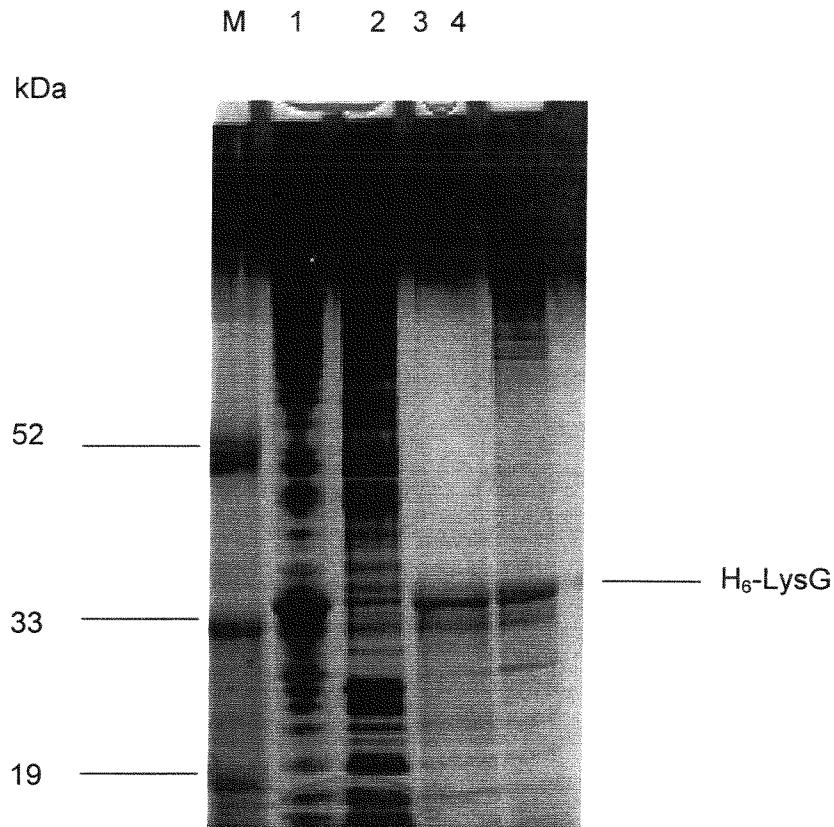


Abb. 18: SDS-PAGE von unter nicht-denaturierenden Bedingungen bzw. unter denaturierenden Bedingungen erzeugten Rohextrakten von *E. coli* M15 pREP4 pQE31NG. M: Proteinstandard; 1: Pellet, nach Zellaufschluß unter nicht-denaturierenden Bedingungen; 2: Rohextrakt nach Aufschluß unter nicht-denaturierenden Bedingungen; 3: Pellet, nach Zellaufschluß unter denaturierenden Bedingungen, 1:10 fach verdünnt; 4: Rohextrakt, nach Aufschluß unter denaturierenden Bedingungen, 1:10 fach verdünnt.

Da das His-markierte LysG-Protein für die Gelverzögerungsanalysen in nativer Form vorliegen muß, wurden zwei verschiedene Verfahren angewandt, um H₆-LysG wieder zu renaturieren. Zum einen wurde das unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigte H₆-LysG gegen eine Reihe von Puffern mit schrittweise abnehmender Harnstoffkonzentration dialysiert, zum anderen wurde das Protokoll zur LysG-Aufreinigung modifiziert. Dabei erfolgte nur noch der Zellaufschluß unter denaturierenden Bedingungen und die Säulenaufreinigung nach mehrmaligen Waschen mit den Dialysepuffern mit abnehmender

Harnstoffkonzentration unter nicht-denaturierenden Bedingungen. Mit dem auf die verschiedenen Arten gewonnenen H₆-LysG-Protein wurden dann Gelretardationsexperimente durchgeführt. Da LysG keinerlei enzymatische Aktivität besitzt, die *in vitro* nachweisbar wäre, läßt sich nur durch positiv-verlaufende Gelretardationsexperimente prüfen, ob das isolierte H₆-LysG im nativen Zustand vorliegt. Die Retardationsanalysen unter verschiedenen Bedingungen zeigten aber keinerlei Retardation der freien DNA (verwendet wurde sowohl das Fragment GS1 als auch GS3, s. Abb. 15). Aufgrund der fehlenden Enzymaktivität von LysG war nicht zu klären, ob das Ausbleiben der Gelverzögerung dadurch bedingt wird, daß H₆-LysG auch nach den Renaturierungsversuchen nicht in seiner nativen Form vorliegt, oder ob die N-terminale His-Markierung eine effiziente Interaktion zwischen der DNA und H₆-LysG verhindert. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, daß im Reaktionsansatz ein Effektor fehlt, der bei Verwendung von Rohextrakten von *lysG*-Überexprimierern vorhanden ist bzw. an LysG gebunden vorliegt. Dies müßte durch weitere Gelretardationsanalysen geklärt werden.

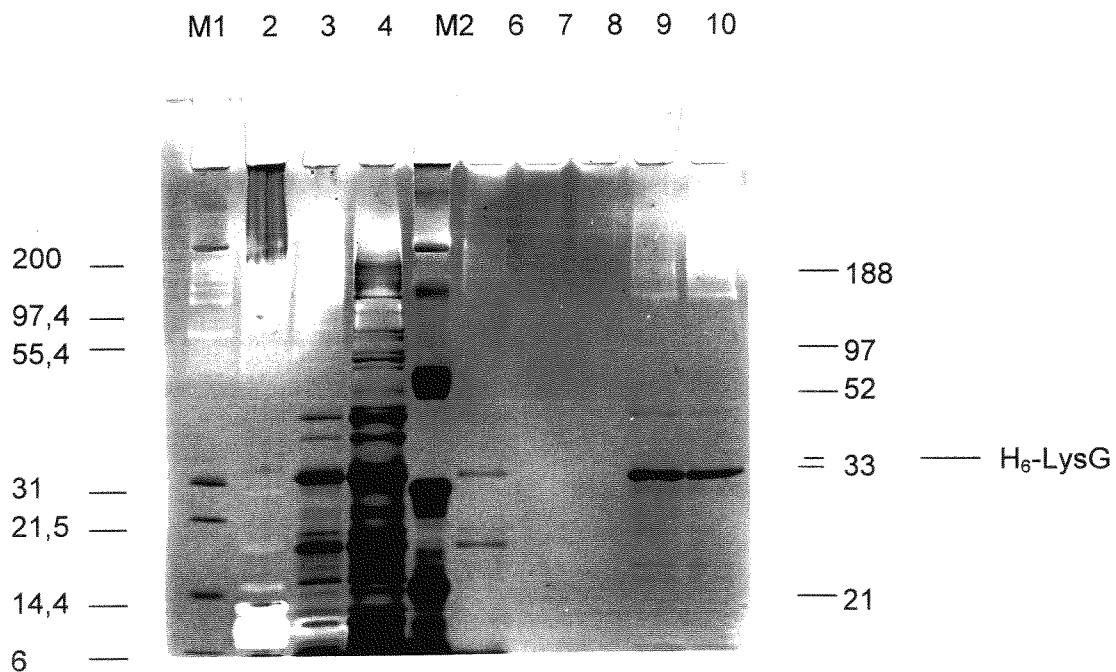


Abb. 19: Aufreinigung von N-terminal markiertem His-LysG (H₆-LysG) unter denaturierenden Bedingungen. Auf das mit Silber-gefärbte SDS-PAGE wurden folgende Probenaufgetragen. Spur 2: Rohextrakt von M15 pREP4 pQE31NG nicht-induziert; 3: Rohextrakt von M15 pREP4 pQE31NG induziert; 4: Durchflußfraktion der Säulenaufreinigung über Ni-NTA-Spinsäulchen; 6-8: Waschfraktion 1-3; 9: Eluat 1; 10: Eluat 2; M1 und M2: Proteinstandards.

3. LysG besitzt ein zweites Target

Mittels der *lacZ*-Fusionsstudien wurde belegt, daß LysG die Transkription von *lysE* steigert. In physiologischen Experimenten, in denen die Lysineffluxrate von drei verschiedenen Stämmen verglichen wurde [Vrljić, 1997], zeigte sich jedoch, daß LysG einen negativen Einfluß auf den Lysinefflux besitzt. Diese Messungen erfolgten mit ganzen Zellen, so daß einander gegenläufige Effekte von LysG, beispielsweise ein positiver Effekt auf die *lysE*-Expression und eine negative Beeinflussung der Lysinbiosynthese einander überlagern könnten. Da die Ergebnisse der physiologischen Experimente eindeutig einen negativen Effekt von LysG auf den Lysinefflux ergaben, die genetischen Experimente aber LysG als positiven Regulator von *lysE* identifizierten, könnte LysG neben *lysE* noch ein oder mehrere weitere Targetgene besitzen, die einen negativen Einfluß auf die Lysinbiosynthese haben. Bestärkt wird diese Hypothese durch die Tatsache, daß bei gleichzeitiger Überexpression des *lysE* und *lysG*-Gens die interne Lysinkonzentration verglichen mit einem *lysE*-Überexprimierer ohne *lysG* sinkt [Vrljić, 1997].

Ein mögliches Zielgen von LysG ist *lysA*, das Gen für die Diaminopimelatdecarboxylase. In *E. coli* wird die *lysA*-Expression durch LysR, dem namensgebenden Mitglied der LTTR-Familie, reguliert [Stragier *et al.*, 1983]. Hinzu kommt, daß eine Regulation der Lysinbiosynthese nach der Bildung des Zellwandbestandteiles D,L-Diaminopimelat sinnvoll erscheint, um eine Limitierung durch D,L-Diaminopimelat zu vermeiden. Aus diesem Grund wurde der Einfluß von LysG auf die Aktivität der Diaminopimelatdecarboxylase untersucht.

Die Enzymaktivität wurde parallel im Wildtypstamm 13032, 13032 Δ EG und 13032 Δ *lysG* gemessen. Dazu wurden die Stämme über Nacht in Vollmedium angezogen und anschließend zellfreie Rohextrakte aus diesen Zellen hergestellt. Die spezifische Diaminopimelatdecarboxylase-Aktivität wurde durch Nachweis des aus Diaminopimelat gebildeten L-Lysins mittels HPLC bestimmt. Alle drei Stämme weisen unabhängig von der An- bzw. Abwesenheit von *lysG* keine signifikanten Unterschiede in der Diaminopimelatdecarboxylase-Aktivität auf (Tabelle 5). Demzufolge handelt es sich bei dem Gen der Diaminopimelatdecarboxylase nicht um das zweite Target von LysG.

Tab. 5: Aktivität der Diaminopimelatdecarboxylase im Wildtyp 13032 und in den *lysG*-Deletionsstämmen 13032 Δ EG und 13032 Δ G im Vergleich.

Stamm	Diaminopimelatdecarboxylase-
	Aktivität [U/ mg Protein]
13032	0,065
13032 Δ EG	0,075
13032 Δ G	0,077

IV. Diskussion

1. Die Topologie des Lysinexportcarriers LysE

Ziel der durchgeführten Topologieuntersuchungen mittels PhoA- bzw. LacZ-Reporterfusionen war die Prüfung des mittels spezieller Software [Rost *et al.*, 1995] erstellten Topologiemodelles. Zur experimentellen Untersuchung der 2D-Struktur des Lysinexportcarriers war ein genetischer Ansatz gewählt worden, bei dem Fusionen des verkürzten C-Terminus von LysE mit der alkalischen Phosphatase bzw. mit der β -Galactosidase eine Aussage über die Lokalisation der Fusionsstelle ermöglichen [Manoil & Beckwith, 1985; Froshauer *et al.*, 1988; Boyd *et al.*, 1993]. Die Ergebnisse der Analyse der PhoA-Fusionen im C-terminalen Bereich von LysE (s. Abb. 5) stimmen mit der Computervorhersage für diesen Bereich überein, in dem jede Helix die Membran einmal durchspannt (Abb. 20). Auch die beiden LacZ-Fusionen am 111. bzw. 211. Aminosäurerest von LysE bestätigen das in Abbildung 20 dargestellte Modell. Dagegen ist die Situation im N-terminalen Bereich, der $\frac{1}{4}$ des Proteins ausmacht, ungewöhnlich. Die Zuordnung der Domänen und die Ergebnisse der *lacZ*- bzw. *phoA*-Studien erfordern eine ungewöhnliche Anordnung der ersten drei hydrophoben Domänen. Die vier PhoA-Fusionen am 29., 30., 33. und 40. Aminosäurerest von LysE, die überraschenderweise alkalische Phosphatase-Aktivität aufweisen, sprechen für eine periplasmatische Lokalisation dieser LysE-Bereiche. Dies ist auch aufgrund der absoluten spezifischen Aktivitäten der alkalischen Phosphatase anzunehmen, die in diesen vier Fällen jeweils sehr hoch war. Boyd *et al.* [1987] konnten nämlich zeigen, daß PhoA-Fusionen am N-terminalen Ende einer cytoplasmatischen Schleife eine bis zu 20fach höhere Aktivität als eine Fusion am C-Terminus der gleichen cytoplasmatischen Schleife gelegen, aufweisen. Da die Fusionen 29, 33, 37 und 40 an verschiedenen Stellen der Schleife lokalisiert sind, wären nach Boyd *et al.* [1987] bei einer cytoplasmatischen Lokalisation dieser Schleife im intakten LysE Unterschiede in den Phosphatase-Aktivitäten zu erwarten. Da sogar die *phoA*-Fusion an dem 67. Aminosäurerest von LysE einen alkalische Phosphatase-positiven Phänotyp bedingt, müssen von Position 29 bis 67 alle Aminosäurereste von LysE ins Periplasma transloziert werden. Einzig die LacZ-Fusion 67 stimmt mit diesem experimentell erhaltenen Bild nicht überein. Möglicherweise genügt der kurze aminoterminaler Teil von LysE nicht, den β -Galactosidase-Anteil des Fusionsproteins durch die Membran zu ziehen. Grundsätzlich ist bekannt, daß Fusionen unmittelbar am Aminoterminus aufgrund der kurzen

Sequenz des zu untersuchenden Proteins problematisch sind. So können Fusionen, in denen große Teile des C-terminalen Bereiches des Membranproteins durch alkalische Phosphatase oder β -Galactosidase ersetzt sind, die Translokation der alkalischen Phosphatase oder β -Galactosidase verhindern [Tate & Henderson, 1993; Turk *et al.*, 1996] oder sogar die Orientierung von transmembranen Helices umkehren, wenn positive Reste fehlen [v. Heijne, 1994]. Jedoch ist darauf hinzuweisen, daß im Falle der PhoA-Fusionen bei LysE nicht die Translokation behindert wird, sondern die PhoA-Fusionen ins Periplasma transloziert werden. Es erfolgt also bereits im Falle der PhoA-Fusionen mit kurzen N-terminalen Sequenzen von LysE die Translokation der alkalischen Phosphatase. Deswegen ist anzunehmen, daß die zweite Helix peripher auf der periplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran angeordnet ist oder vielleicht auch in diese eintaucht. Ein Beispiel für ein Membranprotein, in dem ebenfalls stark hydrophobe Bereiche im Periplasma lokalisiert sind, ist das Chromatresistenzprotein A (ChrA) aus *Alcaligenes eutrophus* [Nies *et al.*, 1998]. Unterstützt wird dieses ungewöhnliche Topologiemodell für LysE durch die Tatsache, daß die erste transmembrane Helix mit nur 15 Aminosäureresten relativ kurz ist und daher die Membran möglicherweise gar nicht vollständig durchquert. Untersuchungen zum Aquaporin [Walz *et al.*, 1997] haben kürzlich gezeigt, daß Regionen, die weder als transmembrane Helix die Membran durchspannen, noch als Schleife im Cyto- bzw. Periplasma lokalisiert sind, funktionell und mechanistisch von großer Bedeutung sein können. Für eine besondere Bedeutung der zweiten Helix von LysE spricht ferner, daß innerhalb dieses Bereiches LysE starke Ähnlichkeiten zu weiteren Mitgliedern der LysE-Familie aufweist [Aleshin *et al.*, 1999].

Entsprechend des Topologiemodelles (s. Abb. 20) besitzt LysE nur fünf transmembrane Domänen. Zwar sind die meisten integralen Membranproteine aus Untereinheiten von je sechs oder zwölf transmembranen Helices aufgebaut [Saier, 1994], es existieren allerdings auch solche, die nur fünf transmembrane Domänen besitzen. Dazu gehören z.B. die Proteine HisQ und HisM, die am Histidintransport von *Salmonella typhimurium* beteiligt sind [Kerppola *et al.*, 1992]. Aufgrund der neuartigen Topologie sowie der Primärsequenz ist LysE einer neuen Superfamilie zuzuordnen [Vrlić *et al.*, 1996; Aleshin *et al.*, 1999; Vrlić *et al.*, 1999]. LysE gehört innerhalb der Superfamilie zu der LysE-Familie. Diese bildet zusammen mit der kürzlich entdeckten RhtB-Familie [Aleshin *et al.*, 1999] und der CadD-Familie [Vrlić *et al.*, 1996, Vrlić *et al.*, 1999] die LysE-Superfamilie. Das namensgebende RhtB-Protein und das RhtC-Protein aus *E. coli* sind vermutlich wie LysE am Export von Aminosäuren oder deren Derivaten beteiligt

[Aleshin *et al.*, 1999, Zakataeva *et al.*, 1999]. RhtC ist vermutlich am Threoninexport und RhtB am Efflux von Homoserin bzw. Homoserinlacton beteiligt [Zakataeva *et al.*, 1999].

Das erstellte Topologiemodell von LysE zusammen mit der Identifizierung von Aminosäureresten, die innerhalb der LysE-Familie konserviert sind [Aleshin *et al.*, 1999; Vrljić *et al.*, 1999], und einer *Helical Wheel* Analyse ermöglichen es, Hypothesen über Aminosäurereste mit funktioneller Bedeutung aufzustellen. Ein auffallendes Charakteristikum von LysE ist die große hydrophile Schleife zwischen der zweiten und dritten transmembranen Helix, die laut des Topologiemodelles im Cytoplasma lokalisiert ist. Diese Schleife ist in keinem anderen Mitglied der LysE-Superfamilie in dieser Größe vorhanden [Vrljić *et al.*, 1999]. In LysE enthält sie einen Bereich, der sehr reich an Valin- und Arginin-Resten ist und zwei negative Nettoladungen enthält (s. Abb. 20). Ähnlich stark geladene *repeat*-Sequenzen sind in Schleifenregionen anderer Transporter gefunden worden, ohne daß allerdings ihre Funktion bekannt wäre [Paulsen & Saier, 1997; Eng *et al.*, 1998]. Daß diese Ladungen direkt an der L-Lysintranslokation beteiligt sind, ist nicht anzunehmen, da alle anderen Translokatoren der LysE-Superfamilie diese Schleife nicht besitzen. Die am stärksten konservierte Region in LysE mit der Konsensussequenz LNPHVYL (die Aminosäuren sind im Ein-Buchstabencode angegeben) ist ganz ähnlich in allen drei Subfamilien zu finden. Dies ist ein Hinweis darauf, daß diese Region essentiell für die Funktion der Translokatoren der LysE-Superfamilie ist. In LysE liegt sie in der Mitte der dritten transmembranen Helix (Abb. 20), die sehr wahrscheinlich einen zentralen Teil des Translokationskanals ausmacht. Das vollständig konservierte Asparagin könnte zusammen mit dem vier Aminosäurereste, und damit genau eine Helixwindung, entfernt gelegenen konservierten Threoninrest als ein Teil einer aktiven, transmembranen Region wirken. In Übereinstimmung damit ist die Lage des Prolinrestes innerhalb des konservierten LNP-Motivs; Prolinreste sind bekannt dafür, daß sie in transmembranen Helices durch Einführung von 20°-Winkeln funktionell wichtige Reste in die zur Translokation erforderliche Position bringen [Deisenhofer & Michel, 1989; Grigorieff *et al.*, 1996]. In Bacteriorhodopsin ist gezeigt worden, daß der Prolinrest in Position 50 die Funktion besitzt, ein ungepaartes Sauerstoffatom einer Carbonylgruppe so zu positionieren, daß dieses Teil des Kanals wird [Deisenhofer & Michel, 1989]. Der Abstand zwischen dem Prolinrest und dem Threoninrest beträgt im Bacteriorhodopsin wie in LysE nur vier Aminosäurereste [Deisenhofer & Michel, 1989]. Die Prolin- und Threoninreste in LysE könnten zusammen mit dem Aspartatrest aus der zweiten Domäne an der Bindung von Lysin bzw. eines im Symport oder Antiport transportierten

Kations beteiligt sein [Vrljić *et al.*, 1999]. Weitere konservierte Reste, wie der vollständig konservierte Aspartatrest in der zweiten putativ peripher angeordneten hydrophoben Region, der Asparagin- und der Threoninrest in der dritten transmembranen Helix sowie die vollständig konservierten aromatischen Reste in der vierten transmembranen Helix und die Aspartat- bzw. Asparagin- und Methioninreste in der fünften transmembranen Helix könnten sehr wohl auf der Innenseite des Kanals liegen, der durch die Interaktion aller transmembranen Helices gebildet wird [Vrljić *et al.*, 1999].

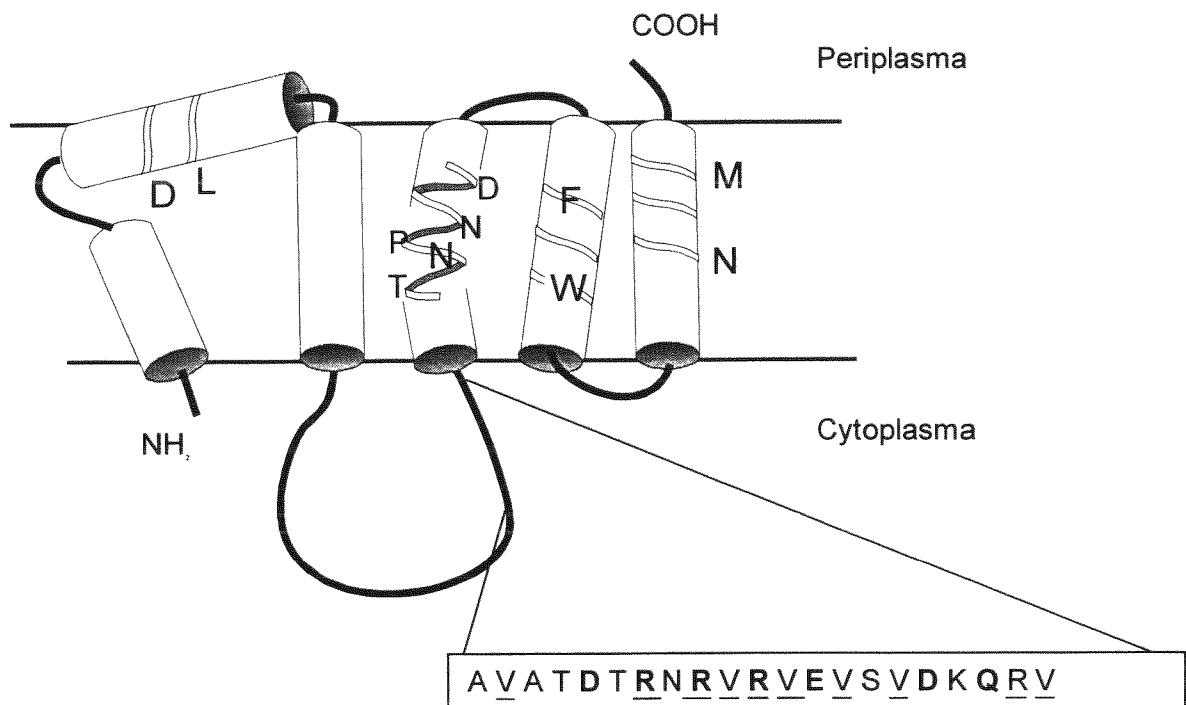


Abb. 20: Vorstellung zur Anordnung des Lysinexportcarriers in der Cytoplasmamembran. Funktionell wichtige Aminosäurereste sind im Ein-Buchstaben-Code eingezeichnet. Die dargestellte Topologie basiert auf den Ergebnissen der *phoA*- und *lacZ*-Fusionsstudien. Im Kasten ist die Valin- und Arginin-reiche *repeat*-Sequenz innerhalb der zentralen, hydrophilen Schleife von LysE dargestellt; die Arginin-(R) und Valinreste (V) sind unterstrichen, alle geladenen Aminosäurereste fettgedruckt.

2. Der Regulator des Lysinexportcarriers

Die mit den *lysE':lacZ*-Fusionen erhaltenen Ergebnisse belegen, daß die Anwesenheit von LysG für die *lysE*-Transkription erforderlich ist. Überraschenderweise ergaben die den dieser Arbeit vorausgehenden Untersuchungen zu LysG von M. Vrljić [1997] Hinweise, daß es sich bei LysG um einen negativen Regulator handeln könnte. So war z.B. bei Überexpression von *lysE* in einer *lysG*-Deletionsmutante der Lysinefflux höher, als bei gemeinsamer Überexpression von *lysE* und *lysG*. Ein ähnliches Bild ergab sich auch in Stammkonstrukten mit anderem *lysG*-Status. Dieser scheinbare Widerspruch läßt sich dadurch erklären, daß es sich bei den von M. Vrljić durchgeführten Experimenten um physiologische Untersuchungen mit ganzen Zellen handelte [Vrljić *et al.*, 1996; Vrljić, 1997], so daß hier einander entgegengerichtete Effekte von LysG, wie ein positiver Effekt auf die *lysE*-Expression und eine negative Regulation der Lysinbiosynthese einander überlagern könnten. Tatsächlich weisen Messungen der intrazellulären Aminosäurekonzentrationen daraufhin, daß LysG auch die Höhe der intrazellulären Lysinkonzentration bestimmt [Vrljić *et al.*, 1996; Vrljić, 1997]. Da aus *Escherichia coli* bekannt ist, daß dort die Aktivität der Diaminopimelatdecarboxylase durch ein Mitglied der LTTR-Familie reguliert wird, wurde in der vorliegenden Arbeit die spezifische Aktivität dieses Enzyms in An- und Abwesenheit von LysG bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, daß in *C. glutamicum* durch LysG hier keine Regulation der Lysinbiosynthese erfolgt, so daß das zweite Zielgen von LysG woanders zu suchen ist. Es ist bekannt, daß eine Reihe von Mitgliedern der LTTR-Familie an der Regulation der Transkription mehrerer Zielgene beteiligt sind, so aktiviert OxyR mindest neun Gene auf Transkriptionsebene [Dhandayuthapani *et al.*, 1997] und CysB reguliert die Expression mehrerer Operons, die an der Biosynthese von Cystein in *Escherichia coli* beteiligt sind [Tyrell *et al.*, 1997]. Um weitere Zielgene von LysG zu identifizieren bieten sich mehrere Wege an. Die in dieser Arbeit gezielt durchgeführte Suche nach dem T_n-A-Motiv, das häufig in der Binderegion von LTTRs vorliegt [Schell, 1993], führte zu keinem Erfolg. Es stehen aber weitere experimentelle Ansätze zur Verfügung, wie z.B. (i) durch Durchführung von Gelretardationsexperimenten mit genomischer DNA und anschließender Isolation des durch LysG-gebundenen Fragmentes [Boffini & Prentki, 1991], (ii) Immunopräzipitation mit anschließender PCR [Kinzler & Vogelstein, 1989; Tao, 1997] oder (iii) Titrationsexperimente mit Genbanken, die im Falle von LysG zu reduzierter Expression der *lysE':lacZ*-Expression führen würden [Stojiljkovic *et al.*, 1994; Wood *et al.*, 1998].

Wie in dieser Arbeit gezeigt, ist zur LysG-abhängigen Expression von *lysE* der Induktor L-Lysin erforderlich. Fast alle Mitglieder der LTTR-Familie bedingen nur in Anwesenheit eines Induktormoleküls die Aktivierung der Transkription ihres Zielgens [Schell, 1993]. So wird z.B. in *Acinetobacter* die Transkription von *pobA*, dessen Genprodukt die Umwandlung von p-Hydroxybenzoat zu Protocatechuat katalysiert, nur in Anwesenheit von p-Hydroxybenzoat durch den LTTR PobR induziert [Kok *et al.*, 1998]. Ebenso steigert NahR aus *Pseudomonas putida* nur in Anwesenheit von Salicylat, einem Zwischenprodukt des Naphthalinabbaus, die Expression des *nah*- bzw. des *sal*-Operons, deren Genprodukte am Naphthalinabbau beteiligt sind [Schell & Poser, 1989]. Es gibt aber bisher nur sehr wenige Beispiele, wo die tatsächlich im Zellinneren vorliegende Induktorkonzentration bestimmt wurde. Meist existieren nur indirekte Belege für die Identität des Induktors der die LTTR-vermittelte Expression in der Zelle bewirkt. So konnte in Gelretardationsexperimenten gezeigt werden, daß in Anwesenheit des Induktors cis,cis-Muconat die Bindung des Regulators des *cat*-Operons von *Pseudomonas putida* CatR an der DNA verändert wird [Parsek *et al.*, 1995]. Einer der wenigen LTTRs für den direkt gezeigt wurde, daß eine Erhöhung der internen Induktorkonzentration die Expression des Zielgens induziert ist NhaR aus *E. coli*. NhaR ist zudem der einzige bisher bekannte Vertreter der LTTR-Familie, der die Transkription eines Exportergens kontrolliert [Schell, 1993]. Wenn die interne Na⁺-Konzentration 0,15 mM übersteigt, induziert NhaR die Transkription des Na⁺/H⁺-Antiporter-Gens [Rahav-Manor *et al.*, 1992]. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist bei 62 mM zellinternem L-Lysin bereits eine sehr hohe Expression der *lysE*::*lacZ*-Fusion von 5,8 U/mg Protein erreicht. Zum Erreichen der erhöhten Konzentration war die Zugabe des Dipeptides Lys-Ala erforderlich. Ohne Peptidzugabe lag die zellinterne L-Lysinkonzentration bei 10 mM und es wurde eine β -Galactosidase-Grundaktivität von 0,7 U/mg Protein bestimmt. Da bei Peptidzugabe immer ein Puls von erhöhter zellinterner Aminosäurekonzentration erreicht wird (s. Abb. 11) [Erdmann *et al.*, 1993] und keine konstant gleichbleibende Konzentration vorhanden ist, ist eine Korrelation zwischen verschiedenen internen L-Lysinkonzentrationen und der Expressionsstärke nicht möglich. Deswegen wurde zusätzlich ein Experiment mit isogenen *C. glutamicum*-Stämmen durchgeführt, die sich in ihrer internen L-Lysinkonzentration unterscheiden. So zeigt der Vergleich des Lysinproduzenten MH20-22B mit seinem isogenen nicht mehr L-Lysin-produzierenden Abkömmling LE4, daß bereits die Erhöhung der internen L-Lysinkonzentration auf etwa 30 mM L-Lysin intern zu einer spezifischen β -Galactosidaseaktivität von 6,1 U/mg Protein führt. Das bedeutet, daß bereits eine relativ moderate Erhöhung zur Induktion der *lysE*-Expression ausreicht. Dies zeigt weiter, wie außerordentlich empfindlich die

lysE-Expression durch LysG und den Induktor gesteuert wird. Nur so ist gewährleistet, daß bei zelleigener Synthese kein aufwendig synthetisiertes L-Lysin ausgeschieden wird.

Neben L-Lysin bedingen auch die Aminosäuren L-Arginin und L-Histidin sowie L-Citrullin eine starke Steigerung der *lysE*-Expression, die mit der bei Induktion durch L-Lysin vergleichbar ist. Auch von einigen Mitgliedern der LTTR-Familie ist bekannt, daß sie nicht spezifisch durch nur eine Substanz, sondern durch verschiedene, strukturell ähnliche Substanzen induziert werden können. So induzieren verschiedene Flavone die durch NodD regulierte Expression der *nod*-Gene in *Rhizobium spec.* [Firmin *et al.*, 1986]. Im Falle der gemeinsamen Kontrolle des Lysinexportcarrier-Gens durch LysG und L-Arginin bzw. L-Lysin ist der physiologische Nutzen ersichtlich, da beide Aminosäuren von dem Lysinexportcarrier mit einer vergleichbaren Affinität transportiert werden [Vrlić, pers. Mitteilung]. Da L-Histidin und L-Citrullin nicht durch LysE aus *C. glutamicum* exportiert werden [diese Arbeit], erscheint es ungewöhnlich, daß diese beiden Substanzen dennoch als Induktoren die Transkription von LysE beeinflussen. In der Literatur finden sich aber Beispiele von Regulatoren aus anderen Regulatorfamilien, die durch Substanzen induziert werden können, die nicht als Substrat des Genproduktes bzw. der Genprodukte des kontrollierten Gens bzw. Operons dienen können, so z.B. in der Familie der MalT-Regulatoren. Die durch AlkS-regulierte Expression der *alk*-Gene in *Pseudomonas oleovorans*, deren Genprodukte an der Biodegradation von linearen Alkanen beteiligt sind, wird nicht nur durch die als Substrat tauglichen linearen Alkane, sondern auch durch eine Vielzahl verzweigtkettiger Alkane, Alkene, Halogenalkane, Ether und sogar Ketone induziert [Wubbolts, 1994]. Diese fehlende Spezifität von Transkriptionsregulatoren ist möglicherweise ein Hinweis auf die fortlaufende evolutionäre Optimierung der Transkriptionskontrolle der beteiligten Operons oder Gene [de Lorenzo & Pérez-Martín, 1996].

Durch die Tatsache, daß das *lysEG*-System sowohl durch L-Lysin als auch durch L-Arginin induziert wird, und LysE auch beide Aminosäuren exportiert, ergibt sich unter Umständen ein zusätzliches Problem bei der Kontrolle der intrazellulären Aminosäurekonzentration. In Anwesenheit erhöhter L-Lysinkonzentrationen würde L-Lysin exportiert werden, gleichzeitig würde aber auch L-Arginin exportiert werden, da L-Arginin mit der gleichen Affinität wie L-Lysin durch LysE exportiert wird [M. Vrlić, pers. Mitteilung]. Dies würde zu einer Verarmung von L-Arginin führen. Dies erklärt möglicherweise, warum ein Gen des L-Lysinstoffwechsels mit einem des L-Argininstoffwechsels ein Operon darstellt [Oguiza *et al.*, 1993]. Dieses Operon ist *argS*

lysA, dessen Expression sowohl durch L-Lysin als auch L-Arginin kontrolliert wird. Bei erhöhten L-Lysinkonzentrationen würde eine erhöhte *argS*-Expression die vermehrte Synthese der Arginyl-tRNA-Synthetase zur Folge haben. Dadurch würde der Abfall der L-Argininkonzentration durch vermehrte Bindung an die Arginyl-tRNA kompensiert, da so der Export des L-Arginins verhindert würde.

Die meisten Mitglieder der LTTR-Familie binden an der DNA an die T_{n+1} A-Konsensussequenz. Im *lysE*-Promotorbereich im Bereich von -75 → -62 (nt) vor dem Transkriptionsstart von *lysE* befindet sich die partiell palindromische Region ACTN₇AGT (s. Abb. 21) [Schell, 1993; Vrljić, 1997]. Durch das Titrationsexperiment und die Gelretardationsexperimente konnte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* gezeigt werden, daß LysG im intergenischen Promotorbereich von *lysE* und *lysG* bindet. In den zunächst mit Rohextrakten von *E. coli-lysG*-Überexprimierern durchgeführten Gelretardationsexperimenten zeigte sich überraschenderweise bereits mit Rohextrakt aus dem Wildtyp von *E. coli* eine Verzögerung des eingesetzten DNA-Fragmentes. Da *E. coli* mehr als 40 Regulatoren der LTTR-Familie besitzt und diese im Bereich der DNA-Bindungsdomäne sehr hohe Sequenzidentitäten zu anderen LTTRs und auch zu LysG aufweisen, wäre es denkbar, daß einer dieser LTTRs an dem DNA-Fragment bindet. In der Literatur sind Fälle beschrieben, in denen ein Regulator an den Promotor eines Genes, das durch einen anderen Regulator kontrolliert wird, bindet und teilweise sogar dessen Transkription aktiviert bzw. reprimiert [McFall *et al.*, 1999; de Lorenzo & Pérez-Martín, 1996; Everett *et al.*, 1995]. Dabei kann es auch zum „Cross Talk“ zwischen Regulatoren verschiedener Organismen kommen. So können die unspezifischen DNA-bindenden, Chromatin-assoziierten Proteine HMG1 und HMG2 des Säugers das bakterielle, Histon-ähnliche HU-Protein sowohl *in vivo* als auch *in vitro*, in Gelretardationsanalysen, funktionell ersetzen [Paull *et al.*, 1993; Megraw & Chae, 1993; Travers *et al.*, 1994]. Durch Gelretardationsexperimente unter Verwendung von Rohextrakt von *C. glutamicum-lysG*-Überexprimierern wurde eine LysG-spezifische Verzögerung des DNA-Fragmentes GS1 nachgewiesen. Zusätzlich konnte auch eine LysG-unspezifische Retardationsbande identifiziert werden, was darauf hinweist, daß noch ein weiteres DNA-bindendes Protein in *C. glutamicum* vorliegt. Mittels der Gelretardationsanalysen war es möglich, die LysG-Binderegion innerhalb des divergenten *lysGE*-Promotorbereiches einzugrenzen. Das kleinste DNA-Fragment, an dem LysG spezifisch bindet, GS3 ist dadurch gekennzeichnet, daß es sowohl die ACTN₇AGT-Region als auch ein Palindrom, das im Bereich der -35-Region von *lysE* lokalisiert ist, enthält (Abb. 21). Da bei Verwendung des GS2-

Genfragmentes keine Verzögerung erfolgt, in GS2 jedoch die gesamte putative Binderegion ACTN₇AGT von LysG noch enthalten ist, scheinen zusätzliche Nukleotide stromabwärts dieser Region für eine ausreichend feste Bindung von LysG an der DNA notwendig zu sein. Zur weiteren Eingrenzung der LysG-Binderegion sind weitere Gelretardationsexperimente mit anderen DNA-Fragmenten aus dem *lysGE*-Gencluster notwendig.

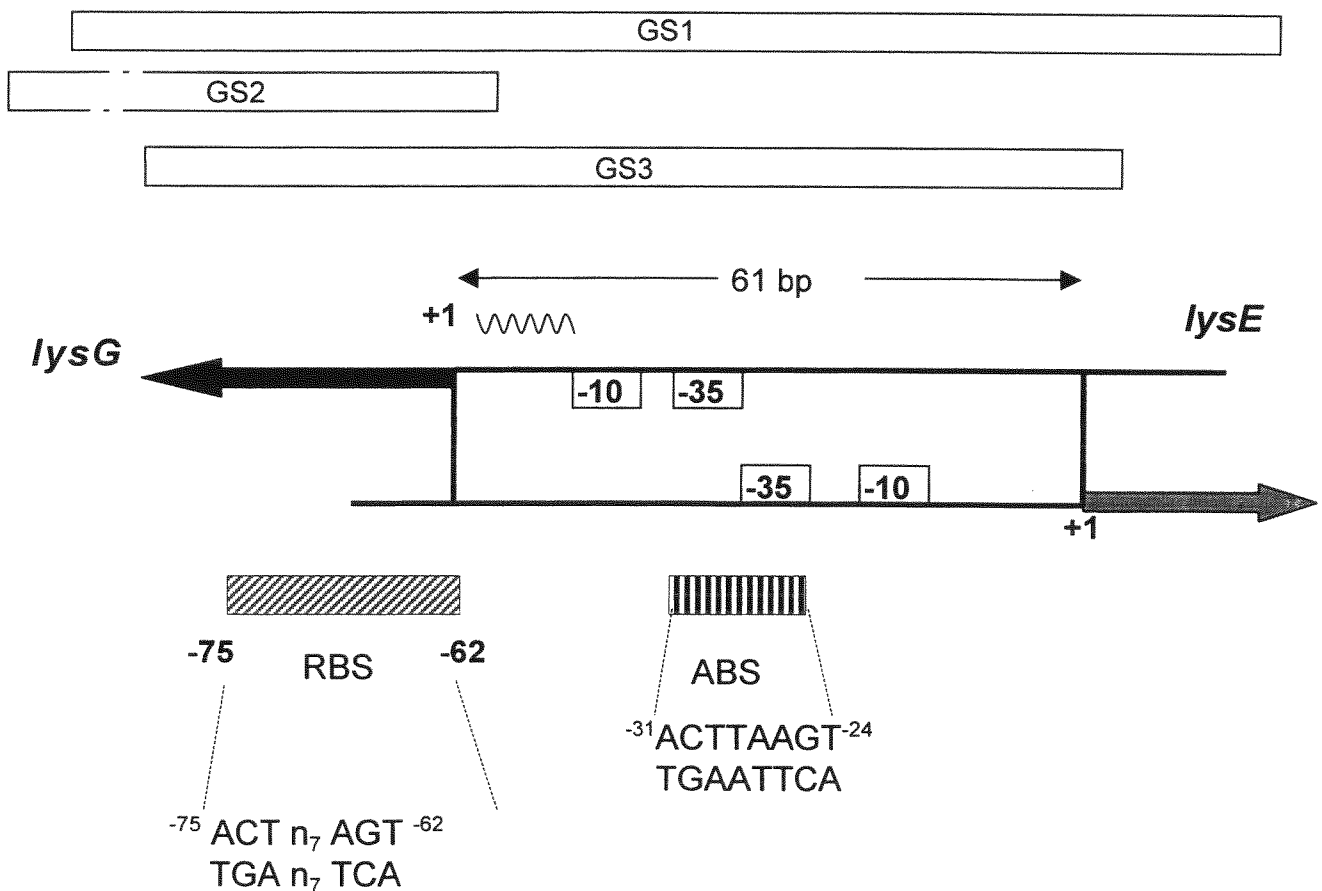


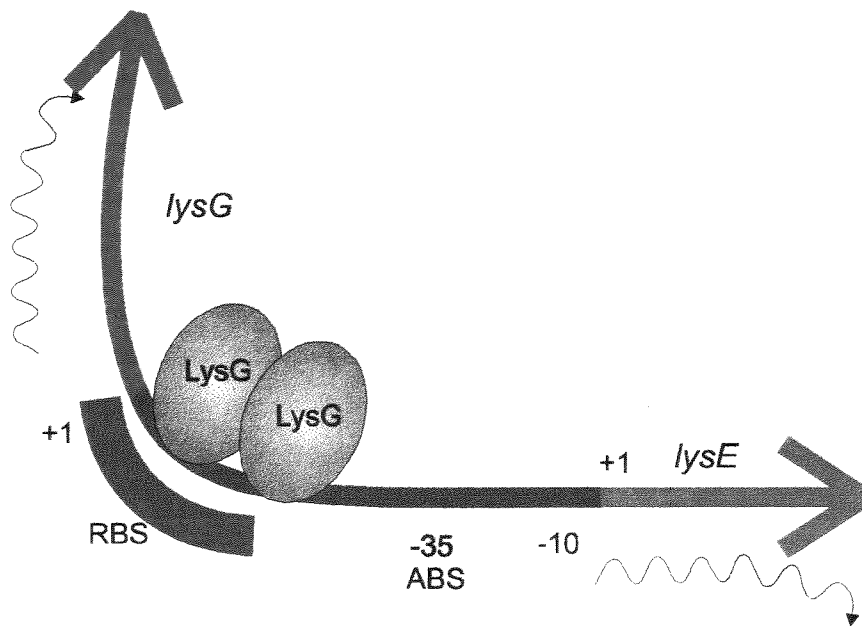
Abb. 21: Schematische Darstellung der Organisation des intergenischen Promotorbereiches von *lysG* und *lysE* und Lage der für die Gelretardationsexperimente benutzten Fragmente. -10 und -35 geben die überlappenden Promotorbereiche von *lysG* und *lysE* an und +1 den jeweiligen Transkriptionsstart dieser Gene. RBS ist die mögliche Erkennungsregion von LysG mit der konservierten für LTTRs typischen Sequenz; ABS ist die putative DNA-Binderegion von LysG bei Anwesenheit des Induktors. Innerhalb der ABS Region ist das Pallindrom eingezeichnet. Die Wellenlinie markiert den DNA-Bereich, der eine intrinsische Biegung der DNA bedingen könnte. Mit GS1-3 sind die in den Gelretardationsanalysen verwendeten Fragmente bezeichnet.

3. Modell der LysG-vermittelten Regulation der *lysE*-Expression

Anhand der Ergebnisse der experimentellen Untersuchungen und unter Berücksichtigung der hier diskutierten Beispiele der durch LTTRs gesteuerten Transkriptionskontrolle wird das folgende Modell für die Regulation des Lysinexportcarriergens in *C. glutamicum* aufgestellt (Abb. 22). Da der putative LysG-DNA-Komplex im Gelretardationsexperiment ein sehr schlechtes Laufverhalten im Polyacrylamidgel aufwies, auch wenn das verwendete DNA-Fragment nur 105 bp umfaßte, bindet LysG wahrscheinlich nicht als Monomer sondern möglicherweise als Dimer an der DNA. In Übereinstimmung damit wurde für die meisten LTTRs festgestellt, daß sie als Dimere oder sogar Tetramere binden. So bindet IciA [Lee *et al.*, 1997] wie ClcR und CatR als Dimer an der DNA [McFall *et al.*, 1998], während für CysB gezeigt werden konnte, daß es als Tetramer bindet [Tyrell *et al.*, 1997]. Wie die Gelretardationsexperimente zeigen, bindet LysG ohne Induktor an Fragment GS3 (und auch GS1). In Analogie zu den detailliert untersuchten DNA-Interaktionen anderer Mitglieder der LTTR-Familie wird die Bindung in dem mit RBS bezeichneten Bereich erfolgen. Dieser Bereich enthält die typische T_n A-Region. Die Tatsache, daß mit dem Fragment GS2 keine Bindung im Gelretardationsexperiment nachweisbar war, ist ein Hinweis darauf, daß möglicherweise Nachbarsequenzen die Bindung stabilisieren. Die erhaltene Gelverzögerung zeigt, daß LysG auch ohne den Induktor L-Lysin bereits mit dem intergenischen Promotorbereich interagiert. Wie für andere LTTRs gezeigt werden konnte [Schell, 1993; Tyrell *et al.*, 1997; Peng *et al.*, 1999; McFall *et al.*, 1998], ist dies die Grundlage der negativen Autoregulation der Transkription von *lysG*, die gewährleistet, daß immer eine bestimmte Grundmenge von LysG-Regulatorprotein vorliegt. Bereits diese Bindung bedingt wahrscheinlich eine geringe Biegung des DNA-Stranges. Dies konnte für ClcR, [McFall *et al.*, 1999], OxyR [Toledano *et al.*, 1994] und eine Reihe anderer LTTRs nachgewiesen werden. Diese Biegung wird für *lysGE* wahrscheinlich durch die Nukleotide im -67 → -64 Bereich von *lysE* begünstigt werden, die aufgrund ihrer Sequenz eine intrinsische Biegung der DNA bedingt (s. Abb. 21) [Patek, pers. Mitteilung]. Es ist bekannt, daß solche Sequenzen, die beispielsweise Regionen enthalten, in denen G-C-Basenpaarregionen an eine A-T-Basenpaarregion grenzen, bereits ohne Wechselwirkung mit einem Protein zu einer Biegung um 10-20° führen [Allemann & Egli, 1997]. Diese Ausgangssituation, in der noch keine *lysE*-Expression erfolgt, ist in Abb. 22 oben dargestellt. In Anwesenheit von Induktormolekülen erfolgt eine gering veränderte Interaktion des Regulators mit der DNA, was eine veränderte Biegung der DNA zur Folge hat (Abb. 22 unten). Wie für TrpI, dem Aktivator der Gene der Tryptophanbiosynthese, gezeigt werden konnte, tritt TrpI erst in Anwesenheit des Induktors

Indolglycerinphosphat mit der Aktivierungsregion in Wechselwirkung. Die Bindung an dieser Aktivierungsregion ist essentiell für die Transkriptionsaktivierung [Tullius *et al.*, 1987; Gao & Gussin, 1991]. In Analogie dazu würde der LysG-L-Lysin-Komplex dann mit der Aktivierungsregion ABS interagieren. Diese Sequenz zeichnet sich durch das Vorliegen einer T_n, A-Konsensussequenz (-37 nt → -26 nt) und einer damit überlappend palindromischen Sequenz (-31 nt → -24 nt) aus. DNA-bindende Proteine binden häufig an solchen partiell palindromischen oder vollständig pallindromischen Sequenzen [Lewin *et al.*, 1994]. Die DNA-Biegung ist vermutlich durch die Wechselwirkungen bedingt verringert. Dies konnte für eine Reihe von Regulatoren der LTTR-Familie gezeigt werden. Der Regulator des *cbb*- und des *gap-pgk*-Operons, deren Genprodukte an der CO₂-Fixierung beteiligt sind, CbbR aus *Xanthobacter flavus* bedingt in Abwesenheit von NADPH eine 64° Biegung der DNA, die in Anwesenheit von NADPH um 9° relaxiert wird [van Keulen *et al.*, 1998]. Für OccR [Wab *et al.*, 1992], CatR [Parsek *et al.*, 1995], NocR [Kreusch *et al.*, 1995] und CysB [Monroe *et al.*, 1990] konnte mittels Gelretardationsexperimenten ebenfalls eine Relaxierung der DNA-Biegung in Anwesenheit des entsprechenden Induktors nachgewiesen werden. Entsprechend dieser Befunde und der strukturellen Gemeinsamkeiten von LysG mit den Mitgliedern der LTTR-Familie, bewirkt der LysG-L-Lysinkomplex ebenfalls eine Relaxierung des DNA-Biegungswinkels, was zu der festgestellten erhöhten Transkription von *lysE* führen könnte. Dieses Modell zur *lysEG*-Transkription erklärt die wesentlichen Befunde der vorliegenden Arbeit. Es zeigt, daß das ubiquitär vorhandene Prinzip der Regulation vom Typ der LTTRs auch in *C. glutamicum* verwirklicht ist. LysG stellt damit das erste Beispiel eines Regulators der LTTR-Familie in *C. glutamicum* dar.

A: negative Autoregulation in Abwesenheit des Induktors



B: Induktion der Transkription durch den Induktor

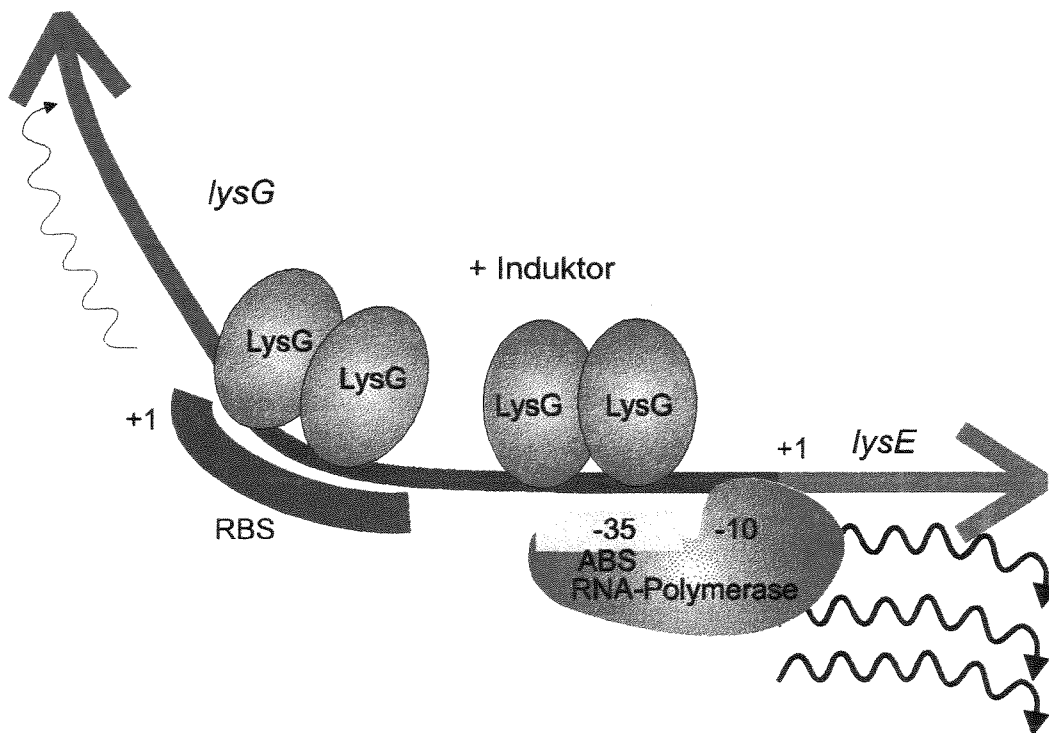


Abb. 22: Modell der LysG-vermittelten *lysE*-Expression . A: In Abwesenheit des Induktors (L-Lysin, L-Arginin, L-Histidin bzw. L-Citrullin) interagiert LysG mit der RBS (Erkennungsregion), was zu einer Basaltranskription von *lysG* und *lysE* führt. B: In Anwesenheit des Induktors erfolgt eine Konformationsänderung des LysG-DNA-Komplexes, die eine gesteigerte *lysE*-Transkription bedingt. LysG interagiert zusätzlich mit der Aktivierungsregion (ABS). Dadurch nimmt der Biegungswinkel der DNA ab, und es erfolgt eine starke Transkription von *lysE* .

V. Zusammenfassung

Mit der Klonierung des Lysinexportcarriergens aus *C. glutamicum* ist erstmals ein für den Export von Aminosäuren spezifischer Translokator molekular zugänglich geworden. Wie dessen abgeleitete Polypeptidsequenz zeigt, stellt dieser Carrier das bisher einzige funktionell charakterisierte Mitglied einer sehr großen und weit verbreiteten Familie von Carrierproteinen dar. Benachbart zum Carriergen liegt ein mutmaßliches Regulatorgen. Ziel dieser Arbeit war es, sowohl die Topologie des Carriers, als auch die Funktion des Regulators zu untersuchen.

- Es wurden mehr als 20 *phoA*- und *lacZ*-Fusionen des Carriergens *lysE* hergestellt. Aus deren Analyse läßt sich ableiten, daß der Carrier fünfmal die Membran durchspannt. Im N-terminalen Bereich ist eine sechste hydrophobe Helix lokalisiert, die wahrscheinlich der Membran auf der periplasmatischen Seite anliegt.
- Durch Analyse von *lysE'*/*lacZ*-Fusionsstämmen konnte LysG als positiver Regulator der *lysE*-Transkription identifiziert werden. Die intrazelluläre L-Lysinkonzentration wurde variiert, und es gelang zu zeigen, daß L-Lysin als Induktor zur LysG-vermittelten Transkription von *lysE* erforderlich ist. Bereits die Erhöhung von etwa 0,1 mM auf 30 mM intrazellulären L-Lysin führt zu etwa 20fach erhöhter *lysE*-Expression. Neben L-Lysin sind auch die beiden basischen Aminosäuren L-Arginin und L-Histidin sowie L-Citrullin Induktoren der LysG-vermittelten *lysE*-Expression.
- In einem *in vivo* Titrationsexperiment mit *C. glutamicum* Zellen konnte gezeigt werden, daß LysG an dem intergenischen Promotorbereich von *lysE* und *lysG* bindet. Das LysG-Protein wurde isoliert. Mit Gelretardationsexperimenten konnte die Region, an der LysG im *lysE*-Promotorbereich bindet, auf 105 bp eingegrenzt werden.
- Exportstudien belegen, daß L-Citrullin und L-Histidin nicht durch den Lysinexportcarrier transportiert werden, sondern neben LysE wahrscheinlich noch weitere unbekannte Carrier in *C. glutamicum* existieren.

VI. Literaturverzeichnis

- Abe, S., Takayama, K. and Kinoshita, S. (1967) Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *J Gen Appl Microbiol Tokyo* **13**: 279-301.
- Ahmed, M., Borsch, C.M., Taylor, S.S., Vázquez-Laslop, N. and Neyfakh, A.A. (1994) A protein that activates expression of a multidrug efflux transporter upon binding the transporter substrates. *J Biol Chem* **269**: 28506-28513.
- Aleshin, V.V., Zakataeva, N.P. and Livshits, V.A. (1999) A new family of amino-acid-efflux proteins. *TIBS* **24**: 133-135.
- Allemann, R.K. & Egli, M. (1997) DNA recognition and bending. *Chemistry & Biology* **4**: 643-650.
- Bannister, A.J. & Kouzarides, T. (1992) Basic peptides enhance protein/DNA interaction *in vitro*. *Nuc Acid Res* **20**: 3523.
- Beckwith, J., Silhavy, T.J. (1983) Genetic analysis of protein export in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* **97**: 3-11.
- Bensadoun, A. & Weinstein, D. (1976) Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal Biochem* **70**: 241-250.
- Birnboim H.C. & Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7(6)**: 1513-1523.
- Boffini, A., Prentki, P. (1993) Two-dimensional gel selection of protein binding sites on DNA. *Electrophoresis* **14(4)**: 259-65.
- Boyd D. & Manoil C. (1987) Determinants of membrane protein topology. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 8525-8529.
- Boyd, D., Traxler, B., Beckwith, J. (1993) Analysis of the Topology of a Membrane Protein by Using a Minimum Number of Alkaline Phosphatase Fusions. *J Bacteriol* **175**: 553-556.
- Bröer, S. and Krämer, R. (1990) Lysine uptake and exchange in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **172**: 7241-7248.
- Bröer, S. and Krämer, R. (1991) Lysine excretion by *Corynebacterium glutamicum* 1. Identification of a specific secretion carrier system. *Eur. J. Biochem.* **202**: 131-135.
- Bröer, S. and Krämer, R. (1991) Lysine excretion by *Corynebacterium glutamicum* 2. Energetics and mechanism of the transport system. *Eur J Biochem* **202**: 137-143.
- Bröer, S., Eggeling, L. and Krämer, R. (1993) Strains of *Corynebacterium glutamicum* with different lysine productivities may have different lysine excretion systems. *Appl Environ Microbiol* **59**: 316-321.
- Brooks, C.L., Brunger, A., Karplus, M. (1985) Active site dynamics in protein molecules: a stochastic boundary molecular-dynamics approach. *Biopolymers* **24(5)**: 843-865.
- Calamia J. & Manoil C. (1992) Membrane protein spanning segments as export signals. *J. Mol. Biol.* **242**: 539-543.

- Carmel, O., Dover, N., Rahav-Manor, O., Dibrov, P., Kirsch, D., Karpel, R., Schuldiner, S. and Padan, E. (1994) A single amino acid substitution (Glu 134→Ala) in NhaR1 increases the inducibility by Na⁺ of the product of *nhaA*, a Na⁺/H⁺ antiporter gene in *Escherichia coli*. *EMBO J* **13**: 1981-1989.
- Carmel O., Rahav-Manor O., Dover N., Shaanan B., Padan E. (1997) The Na⁺-specific interaction between the LysR-type regulator, NhaR and the *nhaA* gene encoding the Na⁺/H⁺ antiporter of *Escherichia coli*. *EMBO J* **16**: 5922-9
- Cebolla, A., Sousa, C., de Lorenzo, V. (1997) Effector Specificity Mutants of the Transcriptional Activator NahR of Naphthalene Degrading *Pseudomonas* Define Protein Sites Involved in Binding of Aromatic Inducers. *J Bio Chem* **272**: 3986-3992.
- Chang, M. & Crawford, I.P. (1990) The roles of indoleglycerol phosphate and the TrpI protein in the expression of trpBA from *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Res* **18**: 979-988.
- Chaouni, L.B., Etienne, J., Greenland, T. and Vandenesch, F. (1996) Nucleic acid sequence and affiliation of pLUG10, a novel cadmium resistance plasmid from *Staphylococcus lugdunensis*. *Plasmid* **36**:1-8.
- Chen, C.-C., Hu, F.-M., Paulus, H. (1987) Nucleotide sequence of the overlapping genes from the subunits of *Bacillus subtilis* aspartokinase II and their control regions. *J Biol Chem* **262**: 8787-8798.
- Chung, C.T., Niemela, S.L., Miller, R.H. (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 2172-5.
- Chou, P.Y. & Fasman, U.D. (1974) Prediction of protein conformation. *Biochem.* **13**: 211-213.
- Chou, P.Y. & Fasman, U.D. (1978) Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv. Enzymol.* **47**: 45-148.
- Christman, M.F., Storz, Ames, B.N. (1989) OxyR, a positive regulator of hydrogen peroxide-inducible genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, is homologous to a family of bacterial regulatory proteins. *Biochemistry* **86**: 3484-3488
- Cohen, G.N. & Saint-Girons, I. (1987) Biosynthesis of threonine, lysine and methione, In: Neidhard (ed.); *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*.
- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., et al. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**: 537-544.
- Cordes, C., Meima, R., Twiest, B., Kazemier, B., Venema, G., van Dijk, J.M., Bron, S. (1996) The expression of a plasmid-specified exported protein causes structural plasmid instability in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **178**: 5235-42.
- Cremer J, Treptow C, Eggeling L, Sahm H (1988) Regulation of enzymes of lysine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *J Gen Microbiol* **134**: 3221-9.

- Cremer, J., Eggeling L., and Sahm, H. (1990) Cloning the *dapA dapB* cluster of the lysine-secreting bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Gen Genet* **220**: 478-480.
- Cremer, J., Eggeling, L., and Sahm, H. (1991) Control of the lysine biosynthetic sequence in *Corynebacterium glutamicum* as analyzed by overexpression of the individual corresponding genes. *Appl Environ Microbiol* **57**: 1746-1752.
- Crueger W., Crueger A. (1990) Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology, 2nd ed., T.D. Brock (ed.). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Dabrowski, S., Kur, J. (1998) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the recombinant His-tagged DNA polymerases from *Pyrococcus furiosus* and *Pyrococcus woesei*. *Protein Expr Purif* **14(1)**:131-8.
- Dautry-Varsat, A., Cohen, G.N. (1977) Proteolysis of the bifunctional methionine-repressible aspartokinase II-homoserine dehydrogenase II of *Escherichia coli* K12. Production of an active homoserine dehydrogenase fragment. *J Biol Chem* **252(21)**:7685-9.
- de Lorenzo, V. & Pérez-Martín, J. (1996) Regulatory noise in prokaryotic promoters: how bacteria learn to respond to novel environmental signals. *Molec Microbiol* **19**: 117-1184.
- Deisenhofer, J., Michel, H. (1989) The photosynthetic reaction centre from the purple bacterium *Rhodospseudomonas viridis*. *Biosci Rep* **9(4)**:383-419.
- Derman, A.I. & Beckwith, J. (1991) *Escherichia coli* alkaline phosphatase fails to acquire disulfide bonds when retained in the cytoplasm. *J Bacteriol* **173**: 7719-7722.
- Dhandayuthapani, S., Mudd, M., Deretic, V. (1997) Interactions of OxyR with the promoter region of the *oxyR* and *ahpC* genes from *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* **179**: 2401-9.
- Dover, N., Higgins, C.F., Carmel, O., Rimon, A., Pinner, E., Padan, E. (1996) Na⁺-Induced Transcription of *nhaA*, Which Encodes an Na⁺/H⁺ Antiporter in *Escherichia coli*, Is Positively Regulated by *nhaR* and Affected by *hns*. *J Bacteriol* **178**: 6508-6517.
- Dower W.J., Miller J.F., Ragsdale C.W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**: 6127-6145.
- Dunican L.K., Shivnan E. (1989) High frequency transformation of whole cells of amino acid producing coryneform bacteria using high voltage electroporation. *Bio/Technology* **7**: 1067-1070.
- Eggeling, L. (1994) Biology of L-lysine overproduction by *Corynebacterium glutamicum*. *Amino Acids* **6**: 261-271.
- Eggeling, L. (1996) Quantifying and directing metabolite flux: Application to amino acid overproduction. *Adv Biochem Engineering* **54**: 2-30.
- Eggeling, L., Oberle, S., Sahm, H. (1998) Improved L-lysine yield with *Corynebacterium glutamicum*: use of *dapA* resulting in increased flux combined with growth limitation. *Appl Microbiol Biotechnol* **49**: 24-30.

- Eggeling, L. & Sahm, H. (1999) L-Glutamate and L-lysine: traditional products with impetuous developments. *Appl Microbiol Biotechnol* **52**: 146-153.
- Eggeling, L., De Graaf, A. and Sahm, H. (1996) Quantifying and directing metabolite flux: Application to amino acid overproduction. *Adv Biochem Engineering* **54**: 2-30.
- Ehrmann, M., Boyd, D., Beckwith, J. (1990) Genetic analysis of membrane protein topology by a sandwich gene fusion approach. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 7574-7578.
- Eikmanns, B.J., Follettie, M.T., Griot, M.U., Sinskey, A.J. (1989) The phosphoenolpyruvate carboxylase gene of *Corynebacterium glutamicum*: molecular cloning, nucleotide sequence and expression. *Mol Gen Genet* **218**: 330-9.
- Eikmanns, B., Kleinertz, E., Liebl, W. and Sahm, H. (1991) A family of *Corynebacterium glutamicum*/*Escherichia coli* shuttle vectors for gene cloning, controlled gene expression and promoter probing. *Gene* **102**: 93-98.
- Ellis, J., Carlin, A., Steffes, C., Wu, J., Liu, J., Rosen, B.P. (1995) Topological analysis of the lysine-specific permease of *Escherichia coli*. *Microbiology* **141**: 1927-1935.
- Eng, B.H., Gueriot, M.L., Eide, D., Saier, M.H. Jr (1998) Sequence analyses and phylogenetic characterization of the ZIP family of metal ion transport proteins. *J Membr Biol* **166**: 1-7.
- Engelman D.M., Steitz T.A., Goldman A. (1986) Identifying nonpolar trans-bilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **15**: 321-353
- Erdmann, A., Weil, B. and Krämer, R. (1993) Lysine secretion by wild-type *Corynebacterium glutamicum* triggered by dipeptide uptake. *J Gen Microbiol* **139**: 3115-3122.
- Everett, M., Walsh, T., Guay, G., Bennett, P. (1995) GcvA, a LysR-type transcriptional regulator protein, activates expression of the cloned *Citrobacter freundii* *ampC* β -lactamase gene in *Escherichia coli*: cross-talk between DNA-binding proteins. *Microbiology* **141**: 419-430.
- Fernandez-Gonzalez, C., Gil, J.A., Mateos, L.M., Schwarzer, A., Schäfer, A., Kalinowski, J., Pühler, A., Martin, J.F. (1996) Construction of L-lysine-overproducing strains of *Brevibacterium lactofermentum* by targeted disruption of the *hom* and *thrB* genes. *Appl Microbiol Biotechnol* **46**: 554-8.
- Firmin, J.L., Wilson, K.E., Rossen, L., Johnston, A.W.B. (1986) Flavonoid activation of nodulation genes in *Rhizobium* reversed by other compounds present in plants. *Nature* **324**: 90-92.
- Follettie M.T., Shin H.K., Sinskey A.J. (1988) Organization and regulation of the *Corynebacterium glutamicum* *hom-thrB* and *thrC* loci. *Mol. Microbiol.* **2(1)**: 53-62.
- Franke C.M., Leenhouts K.J., Haandrikman A.J., Kok J., Venema G., Venema K. (1996) Topology of LcnD, a protein implicated in the transport of bacteriocins from *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* **178**: 1766-1769.
- Fried, M. & Crothers, D.M. (1981) Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nuc Acid Res* **9**: 6505-6525.

- Froshauer S., Green G.N., Boyd D., McGovern K., Beckwith J. (1988) Genetic analysis of the membrane insertion and topology of MalF, a cytoplasmic membrane protein of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **200**: 500-511.
- Gao, J. & Gussin, G.N. (1991) Mutations in TrpI binding site II that differentially affect activation of the trpBA promoter of *Pseudomonas aeruginosa*. *EMBO J* **10**: 4137-4144.
- Görg, A., Postel, W., Weser, J., Schiwara, H.W., Boesken, W.H. (1985) Horizontal SDS electrophoresis in ultrathin pore-gradient-gels for the analysis of urinary proteins. *Science Tools*, 32.
- Gornall, A.G., Bardawill, C.J., David, M.M. (1949) Determination of serum proteins by means of biuret reaction. *J Biol Chem* **177**: 751-766 1989.
- Grant, S.G.N., Jessee, J., Bloom, F.R. and Hanahan, D. (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 4645-4649.
- Graves, L.M. & Switzer, R.L. (1990) Aspartokinase III, a new isoenzyme in *Bacillus subtilis* 168. *J Bacteriol* **172**: 218-223.
- Grigorieff N, Ceska TA, Downing KH, Baldwin JM, Henderson R (1996) Electron-crystallographic refinement of the structure of bacteriorhodopsin. *J Mol Biol* **259**: 393-421
- Gutman, P.D. & Minton, K.W. (1993) Conserved sites in the 5'-3' exonuclease domain of *Escherichia coli* DNA polymerase. *Nucleic Acids Res* **21**: 4406-7.
- Haardt M. & Bremer E. (1996) Use of *phoA* and *lacZ* fusions to study the membrane topology of ProW, a component of the osmoregulated ProU transport system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**: 5370-5381.
- Hanahan D. (1983) Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- Hanahan D. (1985) Techniques of transformation of *E. coli*. In: Glover D.M. (ed.), DNA-cloning. IRL-Press, Oxford/ Washington D.C. Vol.1, 109-135.
- Harris, S.J., Shih, Y.L., Bentley, S.D., Salmond, G.P. (1998) The *hexA* gene of *Erwinia carotovora* encodes a LysR homologue and regulates motility and the expression of multiple virulence determinants. *Mol Microbiol* **28**:705-17.
- Henikoff, S., Haughn, G.W., Calvo, J.M., Wallace, J.C. (1988) A large family of bacterial activator proteins. *Biochemistry* **83**: 6602-6606.
- Hillenga, D.J., Versantvoort, H.J.M., Driessen, A.J.M., Konings, W.N. (1996) Basic Amino Acid Transport in Plasma Membrane Vesicles of *Penicillium chrysogenum*. *J Bacteriol* **178**: 3991-3995.
- Hochuli, E. (1989) Genetically designed affinity chromatography using a novel metal chelate absorbent. *Biologically Active Molecules* 217-239.
- Hoffmann, C.S. & Wright, A. (1985) Fusions of secreted proteins to alkaline phosphatase: An approach for studying protein secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 5107-5111.

- Hoischen, C. & Krämer, R. (1989) Evidence for an efflux carrier system involved in the secretion of glutamate by *Corynebacterium glutamicum*. *Arch Microbiol* **151**: 342-347.
- Hong, G.F., Burn, J.E., Johnston, A.W. (1987) Evidence that DNA involved in the expression of nodulation (*nod*) genes in *Rhizobium* binds to the product of the regulatory gene *nodD*. *Nucleic Acids Res* **15**: 9677-9690.
- Horabin, J.I & Webster, R.E (1988) An amino acid sequence which directs membrane insertion causes loss of membrane potential. *J Biol Chem* **263**: 11575-11583.
- Huang, J. & Schell, M.A. (1991) *In vivo* interaction of the NahR transcriptional activator with its target sequences: inducer mediated changes resulting in transcription activation. *J Biol Chem* **266**: 10830-10838.
- Janknecht, R., de Martynoff, G., Lou, J., Hipskind, R.A., Nordheim, A., Stunnenberg, H.G. (1991) Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 8972-8976.
- Jones, B.M. & Gilligan, J.P. (1983) o-Phthaldialdehyde precolumn derivatization and reversed-phase-high-performance liquid chromatography of polypeptide hydrolysates and physiological fluids. *J Chromatography* **266**: 471-482.
- Jourdan, A.D. & Stauffer, G.V. (1998) Mutational analysis of the transcriptional regulator GcvA: amino acids important for activation, repression and DNA binding. *J Bacteriol* **180**: 4865-71.
- Junker, F., Kiewitz, R., Cook, A.M. (1997) Characterization of the p-toluenesulfonate operon *tsaMBCD* and *tsaR* in *Comamonas testosteroni* T-2. *J Bacteriol* **179**: 919-27.
- Kalinowski, J., Bachmann, B., Thierbach, G., Pühler, A. (1990) Aspartokinase genes *lysC* alpha and *lysC* beta overlap and are adjacent to the aspartate beta-semialdehyde dehydrogenase gene *asd* in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Gen Genet* **224**: 317-24.
- Kalinowski, J., Cremer, J., Bachmann, B., Eggeling, L., Sahm, H. and Pühler, A. (1991) Genetic and biochemical analysis of the aspartokinase from *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol* **5**: 1197-1204.
- Kase, H. & Nakayama, K. (1972) Mechanism of L-threonine and L-lysine production by analog-resistant mutants. *Agri Biol Chem* **36(9)**: 1611-1621.
- Keilhauer, C., Eggeling, L. and Sahm, H. (1993) Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: Molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon. *J Bacteriol* **175**: 5595-5603.
- Kerppola R.E. & Ames G.F.-L. (1992) Toplogy of the hydrophobic membrane-bound components of the histidine periplasmic permease. *J. Biol. Chem.* **267**: 2329-2336.
- Kinoshita, S., Udaka, S. and Shimono, M. (1957) Studies on the amino acid fermentation. I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J Gen Appl Microbiol, Tokyo* **3**: 193-205.
- Kinoshita, S., Nakayama, K., Kitada, S. (1958) L-lysine production using microbial auxotrophs. *J Gen Appl Microbiol, Tokyo* **4(2)**: 128-129..

- Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. (1989) Whole genome PCR: application to the identification of sequences bound by gene regulatory proteins. *Nucleic Acids Res* **17**(10): 3645-53.
- Klingenberg, M., and Pfaff, E. (1977) Means of terminating reactions. *Methods in Enzymology* **X**: 680-684.
- Kok, R.G., D'Argenio, D.A., Ornston, L.N. (1998) Mutation Analysis of PopR and PcaU, Closely Related Transcriptional Activators in *Acinetobacter*. *J Bacteriol* **180**: 5058-5069.
- Kreusch, D., von Lintig, J., Schroder, J. (1995) Ti plasmid-encoded octopone and nopaline catabolism in *Agrobacterium*: specificities of the LysR-type regulators OccR and NocR, and protein induced DNA bending. *Mol Gen Genet* **249**: 102-110.
- Kuan J., Saier Jr., M.H. (1994) Phylogenetic relationships among bacteriorhodopsins. *Res Microbiol.* **145**: 273-285.
- Kunst, K., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessi eres, P. et al. (1997) The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**: 249-256.
- Kyte J., Doolittle R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**: 105-132.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lee, Y.S., Kim, H., and Hwang, D.S. (1996) Transcriptional activation of the *dnaA* gene encoding the initiator for *oriC* replication by IciA protein, an inhibitor of in vitro *oriC* replication in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **19**: 389-396.
- Lee, Y., Lee, H., Yim, J., Hwang, D. (1997) The binding of two dimers of IciA protein to the *dnaA* promoter 1P element enhances the binding of RNA polymerase to the *dnaA* promoter 1P. *Nucleic Acids Res* **25**(17): 3486-9.
- Leuchtenberger, W. (1996) Amino acids-technical production and use. p 455-502. In: Rehm, H.J. and G. Reeds (eds.). Products of primary metabolism. *Biotechnology Vol. 6, VHC Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany*.
- Liebl, W., Bayerl, A., Stillner, U., and Schleifer, K.H. (1989) High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells. *FEMS Microbiol Lett* **65**: 299-304.
- Lindroth, P. & Mopper, K. (1979). High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthaldialdehyde. *Anal Chem* **51**(11): 1167-1174.
- Littlejohn, T.G., DiBerardino, D., Messerotti, L-J., Spiers, S.J., and Skurray, R.A. (1990) Structure and evolution of a family of genes encoding antiseptic and disinfectant resistance to *Staphylococcus aureus*. *Gene* **101**: 59-66.
- Malumbres, M., Mateos, L.M., Martín, J.F. (1995) Microorganisms for amino acid production: *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*. *Food Biotechnology*, VCH

- Manoil, C. (1990) Analysis of protein localization by use of gene fusions with complementary properties. *J Bacteriol* **172**: 1035-42.
- Manoil, C. & Beckwith, J. (1985) TnPhoA: a transposon probe for protein export signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 8129-8133.
- Manoil C. & Traxler B. (1995) Membrane protein assembly: genetic, evolutionary and medical perspectives. *Annu. Rev. Gen.* **29**: 131-150.
- Marger M.D. & Saier Jr.M.H. (1993) A major superfamily of transmembrane facilitators catalyzing uniport, symport and antiport. *Trends Biochem. Sci.* **18**: 13-20.
- Martinez-Costa, O.H., Martin-Triana, A.J., Martinez, E., Fernandez-Moreno, M.A., Malpartida, F. (1999) An additional regulatory gene for actinorhodin production in *Streptomyces lividans* involves a LysR-type transcriptional regulator. *J Bacteriol* **181**: 4353-64.
- McFall, S.M., Parsek, M.R., Chakrabarty, A.M. (1997) 2-Chloromuconate and ClcR-Mediated Activation of the *clcABD* Operon: In Vitro Transcriptional and DNase I Footprint Analyses. *J Bacteriol* **179**: 3655-3663.
- McFall, S.M., Chugani, S.A., Chakrabarty, A.M. (1998) Transcriptional activation of the catechol and chlorocatechol operons: variations on a theme. *Gene* **223**: 257-267.
- Megraw, T.L. & Chae, C.B. (1993) Functional complementarity between the HMG1-like yeast mitochondrial histone HM and the bacterial histone-like protein HU. *J Biol Chem* **268**: 12758-63.
- Michaelis, S. & Beckwith, J. (1982) Mechanism of incorporation of cell envelope proteins in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol* **36**: 435-65.
- Miller, J.H. (1972) Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.*
- Miyajima, R. & Shiio, I. (1970) Regulation of aspartate family amino acid biosynthesis in *Brevibacterium flavum*. Part III. Properties of Homoserine Dehydrogenase. *J. Biochem. (Tokyo)* **68**: 311-319.
- Miyajima, R. & Shiio, I. (1971) Regulation of aspartate family amino acid biosynthesis in *Brevibacterium flavum*. Part IV. Repression of the enzymes in threonine biosynthesis. *Agr Biol Chem* **35**: 424-430.
- Monroe RS, Ostrowski J, Hryniewicz MM, Kredich NM (1990) In vitro interactions of CysB protein with the *cysK* and *cysJH* promoter regions of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **172**: 6919-29.
- Morrison CE, Lichstein HC (1976) Regulation of lysine transport by feedback inhibition in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **125**: 864-71.
- Mullis K., Faldon F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **51**: 263-273.

- Muse, W.B. & Bender, R.A. (1999) The Amino-Terminal 100 Residues of the Nitrogen Assimilation Control Protein (NAC) Encode All Known Properties of NAC from *Klebsiella aerogenes* and *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**: 934-940.
- Nakayama, K., Tanaka, H., Hagino, H., Kinoshita, S. (1966) Studies on lysine fermentation; Part V. Concerted feedback inhibition of aspartokinase and the absence of lysine inhibition on aspartic semialdehyde-pyruvate condensation in *Micrococcus glutamicus*. *Agr Biol Chem* **30(6)**: 611-616.
- Nakayama, K. (1985) Lysine. In: *Comprehensive Biotechnology*. Moo-Young. M. (ed), Oxford: Pergamon Press, Volume 3, pp 607-620.
- Nies, D.H., Koch, S., Wachi, S., Peitzsch, N., Saier, M.H. Jr (1998) CHR, a novel family of prokaryotic proton motive force-driven transporters probably containing chromate/sulfate antiporters. *J Bacteriol* **180**: 5799-802.
- Nikaido, H. (1994) Maltose transport system of *Escherichia coli*: an ABC-type transporter. *FEBS Lett* **346(1)**: 55-8.
- Nowak-Thompson, B., Chaney, N., Wing, J.S., Gould, S.J., Loper, J.E. (1999) Characterization of the pyoluteorin biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *J Bacteriol* **181**: 2166-2174.
- Oguiza, J.A, Malumbres, M., Eriani, G., Pisabarro, A., Mateos, L.M., Martin, F., Martin, J.F. (1993) A gene encoding arginyl-tRNA synthetase is located in the upstream region of the *lysA* gene in *Brevibacterium lactofermentum*: regulation of *argS-lysA* cluster expression by arginine. *J Bacteriol* **175**: 7356-62.
- Paradkar, A.S., Aidoo, K.A., Jensen, S.E. (1998) A pathway-specific transcriptional activator regulates late steps of clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Mol Microbiol* **27**: 831-43.
- Parsek, M.R., Coco, W.M., Chakrabarty, A.M. (1994) Gel-shift assay and DNase I footprinting in analysis of transcriptional regulation of biodegradative genes. *Methods Mol Genet* **3**: 273-290.
- Parsek, M.R., Kivisaar, M., Chakrabarty, A.M. (1995) Differential DNA bending introduced by the *Pseudomonas putida* LysR-type regulator, CatR, at the plasmid-borne *pheBA* and chromosomal *catBC* promoters. *Mol Microbiol* **15**: 819-28.
- Patte, J.C. (1996) Biosynthesis of threonine and lysine. In: *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology*. ASM Press, Washington, D.C. Second Edition, Vol.1: 528-541.
- Paull, T.T., Haykinson, M.J., Johnson, R.C. (1993) The nonspecific DNA-binding and -bending proteins HMG1 and HMG2 promote the assembly of complex nucleoprotein structures. *Genes Dev* **7**: 1521-34.
- Paulsen, I.T. & Saier, M.H. Jr (1997) A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. *J Membr Biol* **156**: 99-103.

- Paulsen, I.T., Brown, M.H., Skurray, R.A. (1996) Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol Rev* **60**: 575-608.
- Peng, H.L., Shiou, S.R., Chang, H.Y. (1999) Characterization of *mdcR*, a regulatory gene of the malonate catabolic system in *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol* **181**: 2302-6.
- Persson B., Argos P. (1994) Prediction of transmembrane segments in proteins utilizing multiple sequence alignments. *J. Mol. Biol.* **237**: 182-192.
- Plamann, L.S. & Stauffer, G.V. (1987) Nucleotide sequence of the *Salmonella typhimurium metR* gene and the *metR-metE* control region. *J Bacteriol* **169**: 3932-3937.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., Belfrage, G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**: 598-9.
- QIAexpress Detection and Assay Handbock (1999)
- Rahav-Manor, O., Carmel, O., Karpel, R., Taglicht, D., Glaser, G., Schuldiner, S. and Padan, E. (1992) NhaR, a protein homologous to a family of bacterial regulatory proteins (LysR), regulates *nhaA*, the sodium proton antiporter gene in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **267**: 10433-10438.
- Revzin, A. (1989) Gel electrophoresis assays for DNA-protein interactions. *Biotechniques* **7**: 346-55.
- Richaud, F., Phuc, N.H., Cassan, M., Patte, J.C. (1980) Regulation of aspartokinase III in *Escherichia coli*: isolation of mutants containing *lysC-lac* fusions. *J Bacteriol* **143**: 513-515.
- Richaud, F., Richaud, C., Ratet, P., Patte, J.C. (1986) Chromosomal location and nucleotide sequence of the *Escherichia coli dapA* gene. *J Bacteriol* **166**: 297-300.
- Rost B., Casadio R., Fariselli P., Sander C. (1995) Transmembrane helices predicted at 95% accuracy. *Protein Sc.* **4**: 521-533.
- Rost B., Sander C. (1994) Combining evolutionary information and neural networks to predict protein secondary structure. *Proteins: Str., Fct., Gen.* **19**: 55-72.
- Sahm, H. (1995) Metabolic design in the amino-acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Folia Microbiol* **40(1)**: 23-30.
- Saier Jr. M.H. (1991) Mechanisms of carbohydrate transport in bacteria and comparison with those in eucaryotes. In P.L. Yeagle (ed.), The structure of biological membranes. CRC Press. Inc. Boca Raton, Fla.
- Saier Jr., M.H. (1994) Computer-aided analyses of transport protein sequences: gleanig evidence concerning function, structure, biogenesis and evolution. *Microbiol. Rev.* **58(1)**: 71-93.
- Saier, M.H. Jr, Tam, R., Reizer, A., Reizer, J. (1994) Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol Microbiol* **11**: 841-7.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higushi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **23**: 487-491.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinoski, J., Thierbach, G., and Pühler, A. (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73.
- Schell, M.A. & Wender, P.E. (1986) Identification of the *nahR* gene product and nucleotide sequences required for its activation of the *sal* operon. *J Bacteriol* **166**: 9-14.
- Schell, M.A & Poser, E. (1989) Demonstration, characterization, and mutational analysis of NahR protein binding to the *sal* and *nah* promoters. *J Bacteriol* **171**: 837-846.
- Schell, M.A., Brown, P.H., Raju, S. (1990) Use of saturation mutagenesis to localize probable functional domains in the NahR protein, a LysR-type transcriptional regulator. *J Biol Chem* **265**: 3844-3850.
- Schell, M.A. (1993) Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Ann Rev Microbiol* **47**: 597-626.
- Schell, M.A. (1996) To be or not to be: how *Pseudomonas solanacearum* decides whether or not to express virulence genes. *Eur J plant Pathol* **102**: 459-469.
- Schrumpf, B. (1991) Lysinbildung in *Corynebacterium glutamicum*: Analyse des Metabolitflusses durch Bestimmung zellinterner Aminosäurekonzentrationen und enzymatischer Untersuchungen. Ph.D. Thesis, Heinrich-Heine University Duesseldorf.
- Schrumpf, B., Schwarzer, A., Kalinowski, J., Pühler, A., Eggeling, L., and Sahm, H. (1991) A functionally split pathway for L-lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **173**: 4510-4516.
- Schrumpf, B., Eggeling, L., and Sahm, H. (1992) Isolation and prominent characteristics of an L-lysine hyperproducing strain of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* **37**: 566-571.
- Schwarzer, A. & Pühler, A. (1991) Manipulation of *Corynebacterium glutamicum* by gene disruption and replacement. *Bio/Technology* **9**: 84-87.
- Seep-Feldhaus, A.H., Kalinowski, J., and Pühler, A. (1991) Molecular analysis of the *Corynebacterium glutamicum* *lysI* gene involved in lysine uptake. *Mol. Microbiol* **5**: 2995-3005.
- Sheehan, B.J. & Dorman, C.J. (1998) *In vivo* analysis of the interactions of the LysR-like regulator SpvR with the operator sequences of the *spvA* and *spvR* virulence genes of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **30**: 91-105.
- Shiio I., Miyajima R. (1969) Concerted inhibition and its reversal by end products of aspartate kinase in *Brevibacterium flavum*. *J. Biochem.* **65(6)**: 849-859.

- Shiio I., Sano K. (1969) Microbial production of L-lysine; Part II. Production by mutants sensitive to threonine or methionine. *J. Appl. Microbiol.* **15**: 267-287.
- Simon, R., Priefer, U. and Pühler, A. (1983) A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Bio/Technologie* **11**: 784-791.
- Snyder, W.B. & Silhavy, T.J. (1995) Beta-galactosidase is inactivated by intermolecular disulfide bonds and is toxic when secreted to the periplasm of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **177**: 953-963.
- Spaink, H.P., Wijffelman, C.A., Okker, R.J., Lugtenberg, B.J. (1989) Localization of functional regions of the *Rhizobium nodD* product using hybrid *nodD* genes. *Plant Mol Biol* **12**:59-73.
- Stojiljkovic, I., Baumler, A.J., Hantke, K. (1994) Fur regulon in gram-negative bacteria. Identification and characterization of new iron-regulated *Escherichia coli* genes by a *fur* titration assay. *Mol Biol* **236**: 531-45.
- Stragier, P., Danos, O., Patte, J. (1983) Regulation of diaminopimelate decarboxylase synthesis in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **168**: 307-350.
- Sugar, I.P., Förster, W., Neumann E. (1987) Model of cell electrofusion; Membrane electroporation, pore coalescence and percolation. *Biophys Chem* **26**: 321-335.
- Summers, A.O. (1992) untwist and shout: a heavy metal-responsive transcriptional regulator. *J Bacteriol* **174**: 3097-3101.
- Suominen, L., Paulin, L., Saano, A., Saren, A.-M., Tas, E., Lindström, K. (1999) Identification of nodulation promoter (*nod*- box) regions of *Rhizobium galegae*. *FEMS Microbiol Lett* **177**: 217-223.
- Sychrová, H., Horák, J., Kotyk, A. (1989) Transport of L-lysine in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochim Biophys Acta* **978**: 203-208.
- Tao, K. (1997) *oxyR*-dependent induction of *Escherichia coli grx* gene expression by peroxide stress. *J Bacteriol* **179**: 5967-70.
- Tate, C.G. & Henderson, P.J. (1993) Membrane topology of the L-rhamnose-H⁺ transport protein (RhaT) from enterobacteria. *J Biol Chem* **268**: 26850-7.
- Taylor, J.D., Ackroyd, A.J., Halford, S.E. (1994) The Gel Shift Assay for the Analysis of DNA-Protein Interactions. *Methods in Molecular Biology* **30**: 263-279.
- Thierbach, G., Schwarzer, A., Pühler, A. (1988) Transformation of spheroplasts and protoplasts of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* **29**: 356-362.
- Tindall, K.R. & Kunkell, T.A. (1988) Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* **27**: 6008-6013.
- Toledano, M.B., Kullik, I., Trinh, F., Baird, P.T., Schneider, T.D., Storz, G. (1994) Redox-dependent shift of OxyR-DNA contacts along an extended DNA-binding site: a mechanism for differential promoter selection. *Cell* **78**: 897-909.

- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **67**: 4350-4354.
- Travers, A.A., Ner, S.S., Churchill, M.E. (1994) DNA chaperones: a solution to a persistence problem? *Cell* **77**: 167-9.
- Traxler B, Boyd D, Beckwith J (1993) The topological analysis of integral cytoplasmic membrane proteins. *J Membr Biol* **132**: 1-11.
- Truffi-Bachi, P., van Rapenbusch, R., Janin, J., Gros, C., Cohen, G.-N. (1968) the threonine-sensitive homoserine dehydrogenase and aspartokinase activities of *Escherichia coli* K12. *Eur J Biochem* **5**: 73-80.
- Tschauder S. (1993) Isolierung und Charakterisierung der secY-Gene aus *Bacillus licheniformis* und *Staphylococcus carnosus*. Dissertation.
- Tullius, T.D., Dombroski, B.A., Churchill, M.E.A., Kam, L. (1987) Hydroxylradical footprinting: a high resolution method for mapping protein-DNA contacts. *Methods Enzymol* **155**: 537-558.
- Tyrell, R. Verschueren, K.H.G., Dodson, E.J., Murshudov, G.N., Addy, C., Wilkinson, A.J. (1997) The structure of the cofactor-binding fragment of the LysR family member, CysB: a familiar fold with a suprising subunit arrangement. *Structure* **5**: 1017-1032.
- van der Rest, M.E., Lange, C., Molenaar, D. A. (1999) A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA. *Appl Microbiol Biotechnol* **52**: 541-545.
- van Keulen, G., Girbal, L., van den Bergh, E.R., Dijkhuizen, L., Meijer, W.G. (1998) The LysR-type transcriptional regulator CbbR controlling autotrophic CO₂ fixation by *Xanthobacter flavus* is an NADPH sensor. *J Bacteriol* **180**: 1411-7.
- Vašicová, P., Abrahámová, Z., Nešvera, J., Pátek, M., Sahm, H. and Eikmanns, B. (1998). Integrative and autonomously replicating vectors for analysis of promoters in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol. Tech.* **12**: 743-746.
- Viale, A.M., Kobayashi, H., Akazawa, T., Henikoff, S. (1991) RcbR, a gene coding for a member of the LysR family of transcriptional regulators, is located upstream of the expressed set of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase genes in the photosynthetic bacterium *Chromatium vinosum*. *J Bacteriol* **173**: 5224-5229.
- Vieira, J. & Messing, J. (1982) The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**: 259-68.
- Vrljić, M., Konemeyer, W., Sahm, H. and Eggeling, L. (1995) Disbalance of L-lysine flux in *Corynebacterium glutamicum* and its use for the isolation of excretion defective mutants. *J Bacteriol* **177**: 4021-4027.
- Vrljić, M., Sahm, H. and Eggeling, L. (1996) A new type of transporter with a new type of cellular function: L-lysine export from *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol* **22**: 815-826.

- Vrljić, M. (1997) L-Lysinexport bei *Corynebacterium glutamicum*: Physiologische und molekularbiologische Charakterisierung des Carrier-vermittelten Exportes eines Primärmetaboliten. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Vrljić, M., Garg, J., Bellmann, A., Wachi, S., Freudl, R., Malecki, M.J., Sahm, H., Kozina, V.J., Eggeling, L. and Saier, M.H. JR. (1999) The LysE superfamily: Topology of the lysine exporter LysE of Cg., a paradigm for a novel superfamily of transmembrane solute translocators. *JMMB* **1(2)**: 327-336.
- von Heijne G. (1986) The distribution of positively charged residues in bacterial inner membrane proteins correlates with the trans-membrane topology. *EMBO J.* **5**: 3021-3027.
- von Heijne G. (1988) Transcending the impenetrable: how proteins come to terms with membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **947**: 307-333.
- von Heijne G. (1994) Sec-independent protein insertion into the inner *E. coli* membrane. A phenomenon in search of an explanation. *FEBS* **346**: 69-72.
- von Heijne G. (1995) Membrane protein assembly: rules of the game. *Bioessays* **17**: 25-30.
- von Wilken-Bergmann, B., Tils, D., Sartorius, J., Auerswald, E.A., Schröder, W. and Müller-Hill, B. (1986) A synthetic operon containing 14 bovine pancreatic trypsin inhibitor genes is expressed in *E. coli*. *EMBO J* **5**: 3219-3225.
- Wab, L., Helmann, J.D., Winans, S.C. (1992) The *A. tumefaciens* transcriptional activator OccR causes a bend at a target promoter, which is partially relaxed by a plant tumor metabolite. *Cell* **69**: 659-67.
- Walz, T., Hirai, T., Murata, K., Heymann, J.B., Mitsuoka, K., Fujiyoshi, Y., Smith, B.L., Agre, P., Engel, A. (1997) The three-dimensional structure of aquaporin-1. *Nature* **387**: 624-7.
- Wek, R.C., Hatfield, G.W. (1986) Examination of the internal promoter, PE, in the *ilvGMEDA* operon of *E. coli* K-12. *Nucleic Acids Res* **14(6)**: 2763-77.
- Wendisch, V. (1997) Physiologische und NMR-spektroskopische Untersuchungen zur *in vivo*-Aktivität zentraler Stoffwechselwege im Wildstamm und in rekombinaten Stämmen von *Corynebacterium glutamicum*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Wolf H., Pühler A., Neumann E. (1989) Electrotransformation of intact and osmotically sensitive cells of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 283-289.
- Wood, G.E., Khelef, N., Guiso, N., Friedman, R.L. (1998) Identification of Btr-regulated genes using a titration assay. Search for a role for this transcriptional regulator in the growth and virulence of *Bordetella pertussis*. *Gene* **209**: 51-58.
- Wubbolts, M. (1994) Xylene and alkane mono-oxygenases from *Pseudomonas putida*. PhD Thesis, University of Groningen, Groningen, The Netherlands.
- Zagorec, M. & Postma, P.W. (1992) Cloning and nucleotide sequence of the *ptsG* gene of *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet* **234**: 325-328.

- Zakataeva, N.P., Aleshin, V.V., Tokmakova, I.L., Troshin, P.V., Livshits, V.A. (1999) The novel transmembrane *Escherichia coli* proteins involved in the amino acid efflux. *FEBS Letters* **452**: 228-232.
- Zittrich, S. & Krämer, R. (1994) Quantitative discrimination of carrier-mediated excretion of isoleucine from uptake and diffusion in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **176**: 6892-6899.

VII. Anhang

Tab.6: Sequenz der zur Amplifikation von *lysE*-Fragmenten für die Konstruktion von *lysE'**phoA*- bzw. *lysE'**lacZ*-Fusionen verwendeten Primer. Die *HpaI*-Schnittstelle am 3'-Ende der *anti sense primer* ist fettgedruckt, die *PstI*-Schnittstelle am 5'-Ende des *sense primers* unterstrichen.

Primer	Sequenzen
<i>sense primer</i>	5' CTG TCC TGC AGC TTC CAT AGG TCA CGA TGG TG 3'
PE-0	
<i>sense primer:</i>	5' CTG TCC <u>GAA</u> <u>TTC</u> TTC CAT AGG TCA CGA TGG TG 3'
PI-0	
<i>anti sense primer</i>	
PE-1	3' CCT TGG TTA ACC ACC AGT ACA TTC TGC GGT CC 5'
PE-2	3' GCC ACG TTA ACG CAT ATT ATC GAG CAC GAT CGG 5'
PE-3	3' CTG TGG TTA ACC CAC CTT GTT TGT CAT GGC GTC 5'
PE-4	3' GCG CAA GTT AAC GCA CGG TTG GTT CTG TTT CTT C 5'
PE-5	3' GTT CAA GTT AAC CAG CAC GAT TGC CAT CAA CAT G 5'
PE-6	3' CGC GCC GTT AAC GAA AAT CCA CCG TCC GGT GTC 5'
PE-7	3' CAC ACC GTT AAC CTG GAC AGC GGG CGT GAC AAT G 5'
PE-8	3' CGC GAA GTT AAC CCC ATC AAC ATC AGT TTG ATG GC 5'
PE-9	3' CTG CGG GTT AAC GGA CAG TAA AAG ACT GGC 5'
PE10	3' CAC CAG GTT AAC CTG CGG TCC GAT GGA CAG TAA AG 5'
PE-11	3' CCA TAA GTT AAC AGC GAT GCC ACC CCA GCG C 5'
PE-12	3' CAT GGC GTT AAC CGC TGC CAT GAC GGC AAA CC 5'
PE-13	3' GGA CAG GTT AAC TGA CAA TGC TGC TGC GCC GAA AC 5'
PK-1	3' GAT CGT TAA CCA AGG TGC CGG CGA TGA AC 5'
PK-2	3' CAC GAT GTT AAC GGC ATT GGA CAA AAG ATC AAC G 5'
PK-3	3' GCC ACC GTT AAC CAT AAT ATC GAG CAC GAT CGG CG 5'
PK-4	3' ATG GGC GTT AAC CAA ACC CGC TGC TTA TCG ACG CTC 5'
PK-5	3' GGG TTC GTT AAC GTC AGC ACG ATT GCC ATC AAC ATG 5'
PK-6	3' AAA CAC GTT AAC GTC CAA ATA CGC ATT CGG GTT C 5'
PK-7	3' GTA TTG GTT AAC GAC GCC GCC GAT AAA CAC AAA C 5'
PK-3+2	5' GCC ACC GTT AAC ATA ATA TCG AGC ACG ATC GGC G 3'
PK-7+2	5' GTA TTG GTT AAC ACG CCG CCG ATA AAC ACA AA C 3'

Tab. 7: Sequenz der zur Amplifikation von *lysE*-Fragmenten zur Konstruktion der *lysE'**phoA*-Sandwichfusionen verwendeten Primer. Die *Bam*HI-Schnittstelle ist einfach, die *Pvu*II-Schnittstelle doppelt unterstrichen.

Primer	Sequenzen
<i>sense primer</i>	
PI-0	5' CTG TCC <u>GAA TTC</u> TTC CAT AGG TCA CGA TGG TG 3'
SW40	5' CTC <u>GGT ACA CC</u> GTT CTT CTC GTG TGT TTA ATT TC 3'
SW67	5' GAT <u>G GT ACACC</u> CGC TGG GGT GGC ATC GCT TA 3'
<i>anti sense primer</i>	
P-40	5'GAA <u>GGG ATC CCAA</u> TGA GTC CTT CGC GCT TAA TTC C 3'
P-67	5'CAG <u>GGA TCG</u> CAT AAT ATC GAG CAC GAT CGG CG 3'
SWR	5'CCC ATC AAC ATC AGT TTG TTG ATG GC 3'

Tab. 8: Sequenz der zur PCR-Kontrolle der *lysE'**lacZ*-Fusionsstämme verwendeten Primer.

Primer	Sequenzen
<i>sense primer</i>	
AB1	5' GAT CCC TCT GGA CCG TAG GAA G 3'
SG4	5' GCG ACC AAA GCG AGC AAG TGT CC 3'
<i>anti sense primer</i>	
BA1	5' GAT TAG CGC CGGT GGC CTG ATT 3'
SG5	5' CGT GTT CCG CTT CCT TTA GCA GC 3'

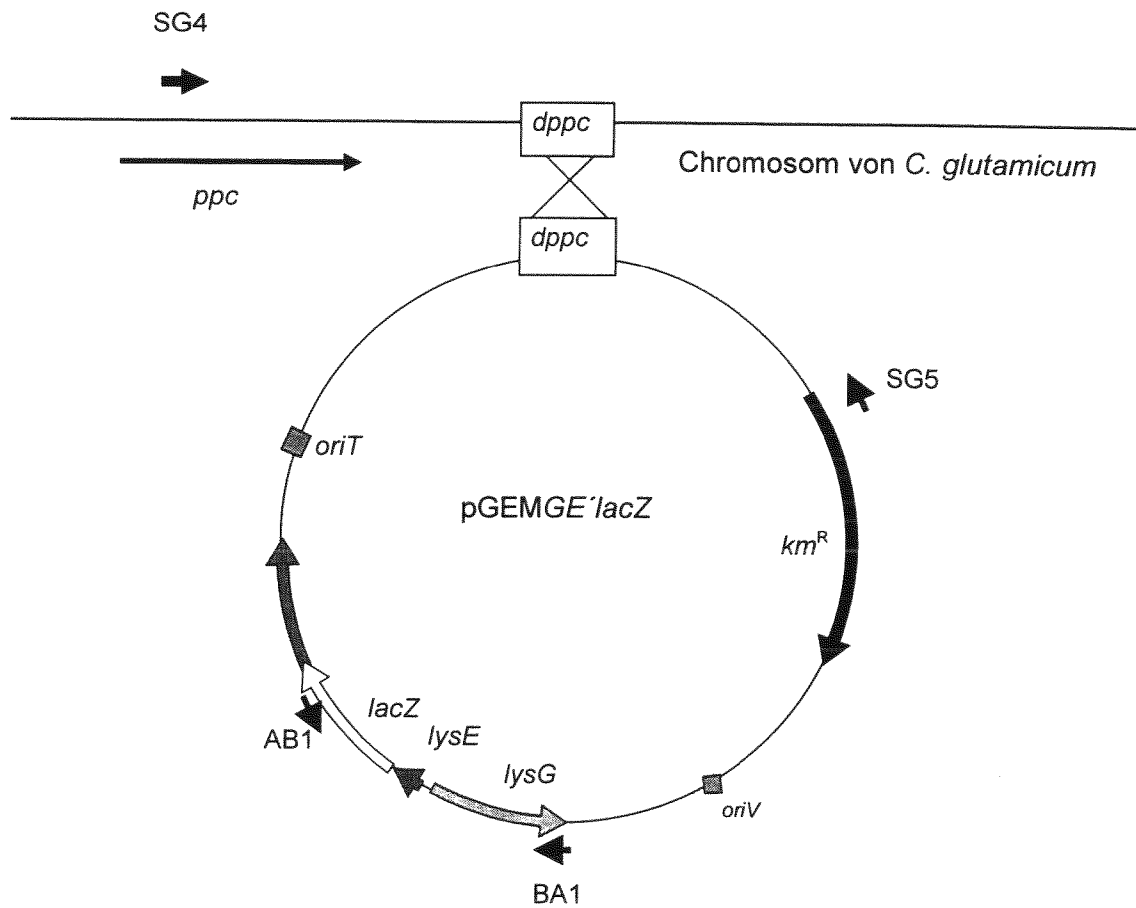


Abb. 23: Lage der zur Überprüfung der Integration von *pEMGE'lacZ* verwendeten Primer. Die Primer SG4 und SG5 dienten der Kontrolle der Integration des Plasmides ins Chromosom in *dppc*, AB1 und BA1 der Kontrolle auf Vollständigkeit der *GE'lacZ* bzw. *G^{ΔNarI}E'lacZ*-Genkassette

Tab. 9: Primer, die zu Amplifikation der in den Gelretardationsexperimenten verwendeten *lysGE*-Promotorfragmenten verwendet wurden.

Primer	Sequenzen
<i>sense primer</i>	
GS1F	5' GAG AGC AAA GTT GTC CAG TTG AAT 3'
GS2F	5' CAA CAC TCG ACC CAC GTG ATG 3'
<i>anti sense primer</i>	
GS1R	5' CAT GAT CAC CAT CGT GAC CTA TG 3'
GS2R	5' GCT TCA TGA ACC CCA TTC AAC 3'
P40b	5'GCA ATG AGT CCT TCG CGC TTA ATT CCT 3'

Tab. 10: Primer, die zu Amplifikation von *lysG* zur Konstruktion von N- bzw. C-terminal His-markiertem LysG, verwendet wurden. Die *Bam*HI-Schnittstelle ist einfach, die *Pvu*II-Schnittstelle doppelt unterstrichen, die *Sph*I-Schnittstelle unterkringelt.

Primer	Sequenzen
<i>sense primer</i>	
GNHISF	5' <u>CAG CTG</u> CTA AGG CCG CAA TCC CTC GAT TG 3'
CHISF	5' <u>GGA TCC</u> AGG CCG CAA TCC CTC GAT TG 3'
<i>anti sense primer</i>	
GNHISR	5' <u>GGA TCC</u> GAA CCC CAT TCA ACT GGA CAC 3'
CHISR	5' <u>GCA TGC</u> ATG AAC CCC ATT CAA CTG GAC 3'

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biotechnologie 1 des Forschungszentrums Jülich angefertigt.

Herrn Prof. Dr. H. Sahm danke ich für die Überlassung des Themas und die großzügige Unterstützung der Arbeit.

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

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Lothar Eggeling für die intensive Betreuung, die wertvollen Ratschläge und ständige Diskussionsbereitschaft, sowie für die Ruhe und Gelassenheit, auch wenn eine Katastrophe (Gipsarm...) die andere jagte.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. R. Freudl für die Diskussionen und Ratschläge zur *phoA*-Analyse.

Der Degussa Hüls AG danke ich für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit.

Petra Ziegler, Ines Maeting und Sigrid Grolle (speziell für die Unterstützung in der Abendgestaltung), Karin Krumbach (für unzählige Tips), Carlo Schimz (für die vielen „Flurdiskussionen“), Yvonne Tilg (für vielfach gewährte seelische Unterstützung..), Thomas Junold (der mich mutig im Kampf gegen die LysG-Tücken unterstützte), Nicole Kennerknecht, Eva Krings, Anja Schmitz, Petra Peters-Wendisch, Dr. Pögeler und Dr. Rüb und dem ganzen Team vom betriebsärztlichen Dienst (für großartige Unterstützung im „Schadensfall“), Marina Vrljić, Uwe Reuter, Madhavan Nampoothiri, Sören Petersen, Volker Wendisch, Doris Rittmann, Sibylle Kaspar (für die Dialysetips und –kammern), Ulli Degner, Simon Curvers (für die Übernahme von Transportdiensten aller Art) möchte ich für die freundliche Atmosphäre in und außerhalb des Labors und die große Hilfsbereitschaft danken.

Allen Institutsangehörigen sei an dieser Stelle für die freundliche Aufnahme und die stets gewährte Unterstützung gedankt.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern für die zahlreichen Aufmunterungen und finanzielle Unterstützung, meiner "großen" Schwester Britta fürs Durchfüttern, wenn die Kasse mal wieder leer und das Semester lang war und meinem "kleinen" Bruder Jens insbesondere für die schnelle PC-Nothilfe.

Forschungszentrum Jülich



Jül-3755
März 2000
ISSN 0944-2952