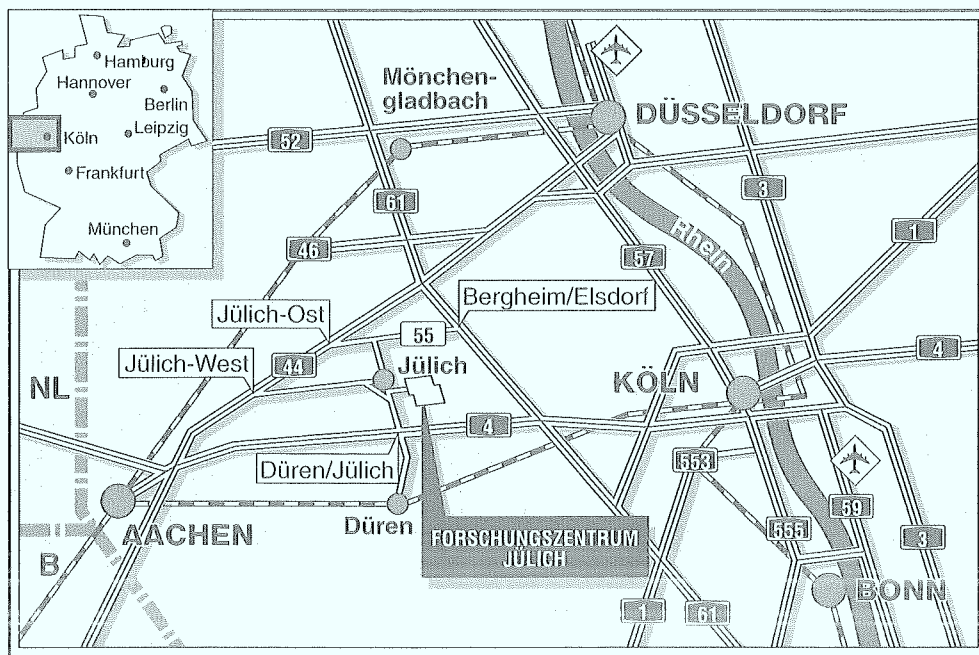




Institut für Biotechnologie

***L-Lysinexport bei Corynebacterium glutamicum:
Physiologische und molekularbiologische
Charakterisierung des Carrier-vermittelten
Exportes eines Primärmetaboliten***

Maria-Marina Vrljić



Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3349

ISSN 0944-2952

Institut für Biotechnologie Jül-3349

D61 (Diss. Universität Düsseldorf)

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

***L-Lysinexport bei Corynebacterium glutamicum:
Physiologische und molekularbiologische
Charakterisierung des Carrier-vermittelten
Exportes eines Primärmetaboliten***

Maria-Marina Vrljić

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	7
1. Bakterienstämme und Plasmide	7
2. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen	10
3. Mutagenese von <i>C. glutamicum</i> mit NNG	12
4. Bestimmung von Aminosäuren	12
4.1 Qualitative Bestimmung extrazellulären Lysins	12
4.2 Kultivierungen zur quantitativen Bestimmung von Aminosäuren	12
4.3 Silikonölzentrifugation	13
4.4 <i>reversed phase</i> HPLC	14
5. Radiochemische Transportstudien	15
5.1 Messung des Membranpotentials	15
5.2 Messung der Lysinaufnahme	16
6. Molekulargenetische Methoden	16
6.1 Isolierung von DNA	16
6.2 Restriktion und Modifikation von DNA	17
6.3 Größenfraktionierung chromosomaler DNA mittels Dichtegradienten-Zentrifugation	17
6.4 Erstellung einer Plasmidgenbank in <i>C. glutamicum</i>	18
6.5 Southern-Blot-Analyse	18
6.6 Synthese und Aufreinigung von Oligonukleotiden	19
6.7 Polymerase-Kettenreaktion	20
6.8 DNA-Sequenzanalyse	20
6.9 Computer-gestützte Sequenzanalyse	21
7. Transformationstechniken	22
8. Messung der spezifischen Homoserin- dehydrogenase-Aktivität	23
9. Western-Blot-Analyse zum Nachweis von LysE	24
9.1 Herstellung von Protein-Rohextrakten	24
9.2 Herstellung polyklonaler Antisera	25
9.3 Denaturierende Polyacrylamid- Gelelektrophorese und Western-Blot-Analyse	25

III. Ergebnisse	27
1. Etablierung eines Testsystems zur Isolierung des Gens	
für den Lysinexportcarrier	27
1.1 Der Methionineffekt zur Steuerung der Lysinexkretion durch <i>C. glutamicum</i>	27
1.2 Isolierung und Charakterisierung der Lysinexport- defekten Mutante <i>C. glutamicum</i> NA8	31
2. Klonierung und Sequenzierung des Gens	
für den Lysinexportcarrier	36
2.1 Erstellung einer Genbank und Klonierung eines DNA-Fragmentes, das den Lysinexport-Defekt von <i>C. glutamicum</i> NA8 komplementiert	36
2.2 Sequenzanalyse von <i>lysE</i> und benachbarten Genen	44
3. Funktion der durch <i>lysE</i> und <i>lysG</i> kodierten Polypeptide	56
3.1 LysE als essentielles Protein des Lysinexportes von <i>C. glutamicum</i>	56
3.2 Der Einfluß von LysG auf den Lysinexport von <i>C. glutamicum</i>	60
3.3 Isolierung und Sequenzanalyse von <i>lysE</i> - und <i>lysG</i> - Allelen verschiedener <i>C. glutamicum</i> Stämme	68
3.4 Die physiologische Funktion des Lysinexportcarriers LysE	71
IV. Diskussion	75
1. Die Isolierung des Gens für den Lysinexportcarrier von <i>C. glutamicum</i>	75
2. Der Lysinexportcarrier LysE	76
3. Der Regulator des Lysinexportes, LysG	80
4. Die physiologische Funktion des Lysinexportcarriers LysE	85
V. Zusammenfassung	89
VI. Literaturverzeichnis	90
VII. Anhang	115

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AEC	S-(2-Aminoethyl)-L-Cystein
Ap ^r	Ampicillin-Resistenz
AS	Aminosäuren
ATCC	<i>American type culture collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BCIP	5-Bromo-4-Chlor-2-Indoylphosphat (X-Phosphat)
C	Celsius
C-/N-Terminus	Carboxy-/Aminoterminal von Peptiden
CoA	CoEnzym A
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
dpm	<i>desintegrations per minute</i> (Zerfälle pro Minute)
$\Delta\psi$	Membranpotential
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F	Farad
<i>FBR</i>	<i>feedback</i> resistent
g	Gramm
h	Stunde
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kb	Kilobasen
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
Km ^r	Kanamycinresistenz
KPP	Kalium-Phosphatpuffer
kV	Kilovolt
l	Liter
M	Molarität
min	Minute
MOPS	3-[N-Morpholino]-propansulfonsäure
NADPH	β -Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat, reduzierte Form
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsalz
NNG	N-Methyl-N-Nitro-N-Nitrosoguanidin

OD ₆₀₀	Optische Dichte gemessen bei 600 nm
orf	offenes Leseraster
PMFS	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
<i>ssp.</i>	Subspecies
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tab.	Tabelle
Tg	Trockengewicht
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Einheit der Enzymaktivität [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$]
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
(v/v)	Volumen pro Volumen

I. Einleitung

Corynebacterium glutamicum wurde 1957 von Kinoshita *et al.* aus dem Boden isoliert. Dieses Gram-positive, Biotin-auxotrophe Bakterium ist unbeweglich, bildet keine Sporen und ist von stäbchen- bzw. keulenförmiger Gestalt. Namengebendes Merkmal von *Corynebacterium glutamicum* ist die Produktion von Glutamat durch Wildtypzellen (Kinoshita *et al.*, 1957). Mutantenstämme von *Corynebacterium glutamicum* exkretieren aber auch L-Lysin ins Medium (Kinoshita *et al.*, 1958, Shio & Miyajima, 1969, Shio & Sano, 1969). Heutzutage werden mit *Corynebacterium glutamicum* und seinen *subspecies flavum* und *lactofermentum* (Liebl *et al.*, 1991) pro Jahr 700000 Tonnen L-Glutamat und 300000 Tonnen L-Lysin produziert (Leuchtenberger, persönliche Mitteilung). Während L-Glutamat als Geschmacksverstärker in der Lebensmittelindustrie verwendet wird, dient die für Vertebraten essentielle Aminosäure L-Lysin hauptsächlich als Futtermitteladditiv (Yoshinaga & Nakamori, 1983).

Die Lysinbildung erfolgt in Prokaryoten als Teil eines mehrfach verzweigten Biosyntheseweges der Aminosäuren der Aspartatfamilie (Patte, 1996). Dabei weist die corynebakterielle Lysinbiosynthese einige Besonderheiten auf, die im Folgenden dargestellt werden (Abb. 1). Während in *E. coli* und *B. subtilis* Isoenzyme der Aspartatkinase (AK) existieren, die jeweils unterschiedlich reguliert werden (Cohen & Saint-Girons, 1987, Chen *et al.*, 1987, 1988, Graves & Switzer, 1990), liegt in *C. glutamicum* nur eine Aspartatkinase-Variante vor. Diese wird durch das Gen *lysC* kodiert (Kalinowski *et al.*, 1991), und durch das gemeinsame Vorliegen von Lysin und Threonin Endprodukt-inhibiert (Nakayama *et al.*, 1966). Eine Regulation von *lysC* auf Expressionsebene, so wie es für *E. coli* beschrieben ist (Richaud *et al.*, 1980), ist für *C. glutamicum* unbekannt (Cremer *et al.*, 1991). Die Überexpression des Gens für die Endprodukt-resistente Aspartatkinase, *lysC^{FBR}* (Kalinowski *et al.*, 1991), führt bereits zur Produktion von Lysin durch *C. glutamicum* (Cremer *et al.*, 1991). Damit stellt die Deregulation der Aspartatkinase den entscheidenden ersten Schritt dar, um Lysin-Produktionsstämme von *C. glutamicum* zu erhalten (Sahm *et al.*, 1995). Am Verzweigungspunkt der Biosynthese in Richtung Lysin bzw. in Richtung Homoserin konkurrieren die Enzyme Dihydrodipicolinatsynthase (*dapA*) und Homoserindehydrogenase (*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 & Shio, 1970) und durch Methionin

reprimiert (Miyajima & Shio, 1971, Follettie *et al.*, 1988). Dagegen wird die Dihydrodipicolinatsynthase von *C. glutamicum*, anders als das *E. coli* Enzym (Richaud *et al.*, 1986), nicht reguliert (Cremer *et al.*, 1988). Interessanterweise bewirkt aber die Überexpression des Synthasegens *dapA* eine gesteigerte Lysinbildung, und zwar sowohl im Wildtyp von *C. glutamicum* als auch in einem *C. glutamicum* Stamm mit deregulierter Aspartatkinase (Cremer *et al.*, 1991, Eggeling, 1996). Dies belegt eine Beteiligung der Dihydrodipicolinatsynthase an der Flußkontrolle, wobei dies direkt über die Enzymmenge, und nicht über den katalytischen Zustand des Enzyms vermittelt wird (Eggeling, 1994). Außer *lysC*^{FBR} und *dapA* ist bisher kein anderes Gen der Lysinbiosynthese von *C. glutamicum* bekannt, dessen Überexpression eine erhöhte Lysinproduktion zur Folge hat (Cremer *et al.*, 1991). Im Unterschied zu anderen Bakterien (Gilvarg, 1958, Misono *et al.*, 1976, White, 1983) besitzt *C. glutamicum* mit der Succinylase-Variante und der Dehydrogenase-Variante zwei parallele Wege, um D,L-Diaminopimelat zu bilden (Schrumpf *et al.*, 1991, Wehrmann *et al.*, 1994). Beide D,L-DAP-Synthesewege werden auch *in vivo* genutzt, wobei die Flußverteilung über beide Wege abhängig von der Verfügbarkeit von Ammonium ist (Sonntag *et al.*, 1993). Die Inaktivierung des Dehydrogenaseweges ist im Unterschied zur Inaktivierung des Succinylaseweges mit einer deutlichen Herabsetzung der Lysinbildung in Produktionsstämmen verbunden (Schrumpf *et al.*, 1991, Wehrmann, 1995). Dies zeigt, daß der Dehydrogenaseweg, obwohl nicht essentiell für das Wachstum, für einen gesteigerten Metabolitfluß zur Bildung von Lysin wichtig ist (Sahm, 1995).

Obwohl der Transport von Aminosäuren aus der Zelle eine entscheidende Voraussetzung für die industrielle Aminosäureproduktion ist, gab es hierzu lange Zeit weder mechanistische noch molekulare Untersuchungen. Dagegen ist die Aufnahme von Aminosäuren aus dem Kulturmedium sowohl biochemisch als auch molekularbiologisch gut charakterisiert. So kodiert das Gen *aroP* von *C. glutamicum* für einen sekundären Aufnahmecarrier der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan (Wehrmann *et al.*, 1995). Mit dem *gluABCD* Cluster von *C. glutamicum* konnten die Gene für ein primäres, Bindeprotein-abhängiges System zur Aufnahme von Glutamat kloniert werden (Kronmeyer *et al.*, 1995). In *Escherichia coli* erfolgt die Aufnahme von Lysin und Ornithin ebenfalls über ein primäres, ATP-abhängiges System, das Lysin-Arginin-Ornithin-System (LAO) (Rosen, 1971). Zusätzlich kann *E. coli* Lysin auch mittels LysP in einem Uniportprozeß (Rosen, 1971, Ellis *et al.*, 1995) oder mittels CadC in einem Antiport gegen Cadaverin aus dem Medium aufnehmen (Meng & Bennett, 1992).

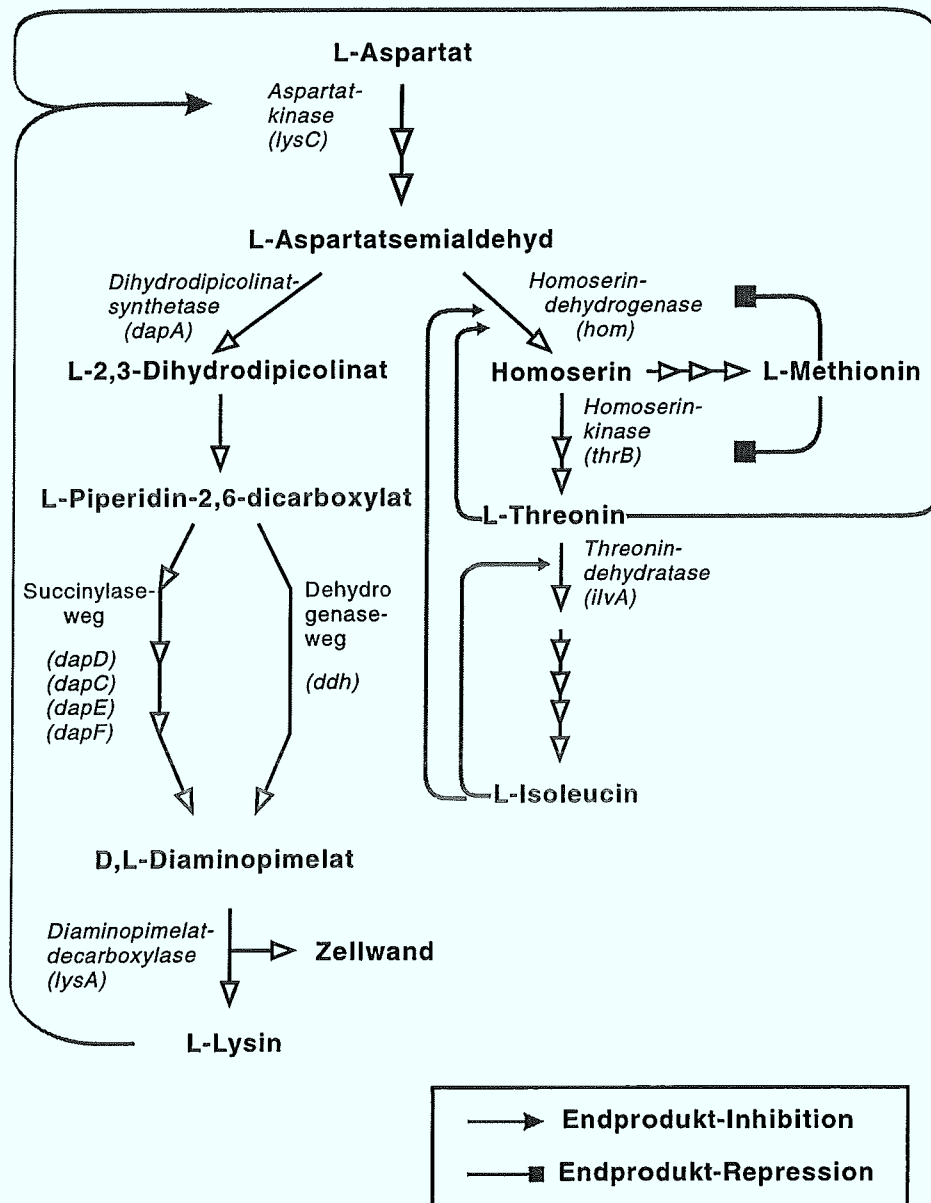


Abb. 1: Die Lysinbiosynthese von *Corynebacterium glutamicum* als Teil des verzweigten Biosyntheseweges der Aminosäuren der Aspartatfamilie und deren Regulation.

Da sowohl LysP als auch CadC durch niedrige pH-Werte des Mediums induziert werden, wird diskutiert, daß LysP und CadC an der pH-Homöostasis in *E. coli* beteiligt sind (Meng & Bennett, 1992, Steffes *et al.*, 1992). In *Lactococcus lactis* erfolgt die Aufnahme von

Lysin im Symport mit Protonen (Driessen *et al.*, 1989). Daneben besitzt *L. lactis* subsp. *lactis* einen Arginin-Ornithin-Antiporter. Mit diesem Antiporter konnte in Vesikeln von *L. lactis* subsp. *lactis* auch ein heterologer Antiport von Arginin und Lysin gezeigt werden (Driessen *et al.*, 1989). Durch Komplementation eines *C. glutamicum* Stammes, der gegen das toxische Lysin-Analogon S-(2-Amino-Ethyl)-Cystein resistent ist, konnte das Gen für das corynebakterielle Lysin-Aufnahmesystem isoliert werden (Seep-Feldhaus *et al.*, 1991). Das komplementierende Gen *lysI* (*L-lysine import*) kodiert für ein Polypeptid von 501 Aminosäuren mit dreizehn potentiellen transmembranen Helices (Seep-Feldhaus *et al.*, 1991). Auf Sequenzebene zeigt *LysI*, ebenso wie *CadC* aus *E. coli*, hohe Ähnlichkeit zu *ArcD*, dem Arginin-Ornithin-Antiporter aus *Pseudomonas aeruginosa* (Lüthi *et al.*, 1990). Die biochemische Charakterisierung ergab, daß die Lysinaufnahme von *Corynebacterium glutamicum* zwischen zwei Transportmodi wechseln kann (Bröer & Krämer, 1990). Ist ausreichend Lysin in der Zelle vorhanden, wird Lysin über einen homologen, elektroneutralen Lysin-Lysin-Antiport mit einer geringen Rate von $0,15 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Trockengewicht})^{-1}$ transportiert (Bröer & Krämer, 1990). Dagegen findet bei Herabsetzung des zellulären Lysin-pools ein heterologer, elektrogener Antiport von Lysin gegen Alanin, Valin oder Leucin statt, der in einer Netto-Aufnahme von Lysin resultiert (Bröer & Krämer, 1990).

In den letzten Jahren wurden vermehrt Untersuchungen zum Efflux löslicher Substrate aus der Bakterienzelle durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß in vielen Fällen auch der Export von Substanzen Carrier-vermittelt erfolgt (Konings *et al.*, 1992). So katalysieren Effluxcarrier den Export von Antibiotika und interkalierenden Agentien, und erlauben das Wachstum in einer ansonsten toxischen Umgebung (MDR-Familie, *multi drug resistance proteins*) (Hillen & Berens, 1994). Ein Beispiel hierfür ist TetA aus *E. coli*, das den Export von Tetracyclin im Antiport gegen Protonen vermittelt (Hillen & Berens, 1994). Andere Effluxcarrier exkretieren zellulär synthetisierte Substanzen, die bakteriostatisch oder bakteriotoxisch wirken. Hierzu gehören die verschiedenen Bacteriocin-Exporter, die beispielsweise Colicine oder Lanthibiotika transportieren (Jack *et al.*, 1995). Der α -Faktor-Transporter Ste6 aus *Saccharomyces cerevisiae* exportiert ein Pheromon (Higgins, 1992, Kölling & Hollenberg, 1994). Er ist damit ein Beispiel für einen Exportcarrier, der der Kommunikation mit anderen Zellen dient. Exportcarrier sind auch notwendig, um Stoffwechsel-Endprodukte zu entfernen, die besonders unter anaeroben Bedingungen zellintern akkumulieren. So wird zum Beispiel das Gärungsprodukt Lactat nicht nur durch Diffusion, sondern auch mittels eines sekundären Lactat-Protonen-Symporters aus *E. coli*

und *L. lactis* entfernt (Konings *et al.*, 1992). Weitere Beispiele sind der Export von Succinat bei der Fumarat-Atmung (Engel *et al.*, 1994, Six *et al.*, 1994) oder von Nitrit bei der Nitrat-Atmung (Rowe *et al.*, 1994).

Die physiologische Bedeutung der Exkretion von Antibiotika oder von Gärungsprodukten ist einleuchtend. Dagegen ist die Carrier-vermittelte Exkretion von Primärmetaboliten, wie Aminosäuren, nicht so naheliegend. Da Aminosäuren in der Bakterienzelle unter Energieverbrauch synthetisiert oder durch spezifische Aufnahmesysteme aufgenommen werden, wurde zunächst vermutet, daß der Efflux von Aminosäuren durch passive Diffusion erfolgt. Für den Export der hydrophilen Aminosäure Lysin durch *C. glutamicum* wurde die passive Diffusion mittels eines osmotisch kontrollierten Porenmodells diskutiert (Luntz *et al.*, 1986). Eine andere Hypothese zum Export von Aminosäuren wurde ursprünglich durch Clement *et al.* (1984) für die Exkretion von Glutamat etabliert. Diese „Inversionshypothese“ basiert auf der prinzipiellen Reversibilität von Transportprozessen analog zu Enzym-katalysierten Reaktionen. Sie geht von einem - bei Umkehrung der Gradienten - in Exportrichtung arbeitenden sekundären Aufnahmesystem aus. Der unveränderte Lysinexport in einer *lys*-Inaktivierungsmutante von *C. glutamicum* widerlegte aber die Inversionshypothese (Seep-Feldhaus *et al.*, 1991). Analog konnte auch die unveränderte Glutamatexkretion in einem Stamm mit Deletion des Glutamat-Aufnahmesystems gemessen werden (Kronmeyer *et al.*, 1995). Die „Carrierhypothese“ stellt eine dritte Möglichkeit dar, wie Aminosäuren aus der Zelle nach außen transportiert werden können. Sie geht davon aus, daß spezifische Aminosäure-Exportcarrier neben den entsprechenden Aminosäure-Aufnahmecarriern existieren (Krämer 1994 b). Durch die Charakterisierung der Effluxprozesse von Lysin, Isoleucin und Glutamat in *Corynebacterium glutamicum* konnte diese Hypothese biochemisch bestätigt werden. Dabei wurde die Exkretion der hydrophoben Aminosäure Isoleucin als ein Efflux charakterisiert, der sich aus einer Carrier-abhängigen sekundären Transportkomponente, aber auch aus einer Diffusions-abhängigen Komponente zusammensetzt (Ebbighausen *et al.*, 1989, Zittrich & Krämer, 1994). Der Export der Aminosäure Glutamat erfolgt ebenfalls Carrier-vermittelt (Hoischen & Krämer, 1989). Für eine effiziente Glutamatexkretion ist jedoch zusätzlich eine reversible Veränderung des Membranstatus notwendig, die vermutlich eine Modulation der Carrieraktivität durch die veränderte Membranspannung zur Folge hat (Gutmann, 1993, Krämer, 1994 a). Auch für die Exkretion der Aminosäure Lysin konnte biochemisch ein Carrier-vermittelter Transportprozeß gezeigt werden (Bröer & Krämer, 1991 a). Die Charakterisierung des

Lysinexportes durch *C. glutamicum* ergab, daß es sich um einen sekundären Transportprozeß handelt, bei dem Lysin im Symport mit zwei Hydroxyl-Ionen über die Membran transportiert wird. Die treibende Kraft zum Transport über die Membran stellt das Membranpotential dar; eine Modulation der Transportaktivität ist durch das Membranpotential und die über der Membran bestehenden Gradienten von Protonen und Lysin möglich (Bröer & Krämer, 1991a, 1991b, Bröer *et al.*, 1993).

In den letzten Jahren wurden mit steigender Zahl Gene für Exportcarrier kloniert, die Substanzen wie Antibiotika oder Bacteriocine transportieren (Jack *et al.*, 1995, Nikaido, 1994). Bis heute gibt es jedoch kein Beispiel für die Klonierung eines Gens, das für einen spezifischen Exportcarrier einer metabolisch wichtigen Substanz, wie einer Aminosäure, kodiert. Es existieren aber Hinweise, daß der Export von Aminosäuren in *C. glutamicum* limitierend ist. So akkumuliert *C. glutamicum* nach Überexpression von *lysC*^{FBR} und von *dapA*, den beiden wichtigen Charakteristika für eine erhöhte Lysinproduktion, bis 400 mM Lysin in der Zelle (Eggeling *et al.*, 1996). Die zellinterne Lysinkonzentration des Wildtypes von *C. glutamicum* liegt dagegen nur bei 20 mM (Vrljic *et al.*, 1995). Daher könnte das Gen für den Lysin-Exportcarrier ein weiteres Target zur Steigerung der Lysinproduktion durch *C. glutamicum* darstellen.

Das Ziel dieser Arbeit war die Isolierung des Gens für den Lysin-Exportcarrier von *Corynebacterium glutamicum*, um den Lysinexporter molekular charakterisieren zu können. Dabei konnte weder auf Mutanten zur heterologen Komplementation noch auf Sequenzinformationen für Hybridisierungsexperimenten zurückgegriffen werden. Es mußte also zunächst eine spezifisch im Lysinexport defekte Mutante von *C. glutamicum* isoliert werden. Während Aminosäure-Aufnahmedefekte Stämme durch Resistenz gegenüber toxische Aminosäureanaloge selektioniert werden können (Seep-Feldhaus *et al.*, 1991, Boles *et al.*, 1993), müssen zur Isolierung Aminosäure-Exportdefekter Mutanten die Stämme einzeln auf Verlust des Exportes getestet werden. Da außerdem der Wildtyp von *C. glutamicum* ohne Manipulationen zur Steigerung der zellinternen Lysinkonzentrationen überhaupt keine Exkretion von Lysin zeigt, mußte zunächst ein System etabliert werden, um die Lysinexkretion durch den Wildtyp von *C. glutamicum* zu erreichen. Die Nutzung eines induzierbaren Systems der Lysinexkretion würde dann die Isolierung einer Lysinexport-defekten Mutante von *C. glutamicum* für homologe Komplementations-Experimente erlauben.

II. Material und Methoden

1. Bakterienstämme und Plasmide

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

Tab. 1: Verwendete Bakterienstämme und ihre Eigenschaften.

Bakterienstamm	Genotyp / Phänotyp	Referenz
<i>E. coli</i>		
DH5 α MCR	<i>endA1 supE44 thi-1 λ^- recA1 gyrA96 relA1</i> <i>deoR Δ (lacZYA-argF) U169 Φ80d/lacZΔM15</i> <i>mcrA Δ(mrr hsdRMS mcrBC)</i>	Grant <i>et al.</i> , 1989
S17-1	<i>thi-1 F endAR1 hsdR17 supE44 λ^- pro</i>	Simon <i>et al.</i> , 1983
JM109(DE3)	<i>mcrA recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> <i>supE44 relA1 Δ(lac- proAB) F</i> <i>[traD36 proAB⁺ laqIQZΔM15] λ(DE3)</i>	Promega, Wisconsin USA
MC4100	<i>araD39 (argF-lac) U169 relA51 rps150</i> <i>flbB5301 deoC1 ptsF25</i>	Casadaban, 1976
<i>C. glutamicum</i>		
ATCC 13032	Wildtyp	Abe <i>et al.</i> , 1967
R127	Restriktionsdefekt, <i>res</i>	Liebl <i>et al.</i> , 1989
MH20-22B	Lysinproduzent, <i>lysC^{FBR}</i> , <i>leuCD</i>	Menkel <i>et al.</i> , 1989
DG52-5	Lysinproduzent, <i>lysC^{FBR}</i>	Cremer <i>et al.</i> , 1988
ATCC13287	Homoserin-, Methionin-, Isoleucin- auxotroph, <i>hom</i>	American type culture collection
49/3	Lysinauxotrophie, <i>lysA</i>	Vrljic <i>et al.</i> , 1995
NA8	Lysinexport-Defekt, <i>lysE</i> , <i>res</i>	Vrljic <i>et al.</i> , 1995

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

Bakterienstamm	Genotyp / Phänotyp	Referenz
<i>C. glutamicum</i>		
NA8-6-3	NA8 mit Plasmid pMV10	diese Arbeit
NA8-8-524	NA8 mit Plasmid pMV8-3	diese Arbeit
NA8-7-1	NA8 mit Plasmid pMV7-1	diese Arbeit
ATCC13032 $\Delta lysEG$	Deletion eines 1236bp <i>StuI-MluI</i> -Fragmentes mit größtem Teil der Gene <i>lysE</i> , <i>lysG</i>	diese Arbeit
ATCC13032 <i>lysE::</i> pEM/ <i>lysE</i> _{int}	<i>lysE</i> disruptiert durch den Vektor pEM1	diese Arbeit
ATCC13032 <i>lysG::</i> pEM/ <i>lysG</i> _{int}	<i>lysG</i> disruptiert durch den Vektor pEM1	diese Arbeit

Tab. 2: Verwendete Plasmide mit ihren Eigenschaften und Markern.

Plasmid	Marker / Eigenschaft	Referenz
pKW3	Pendelvektor, Kopienzahl in <i>C.g.</i> <5/Zelle <i>Km^r oriV_{E.c.} oriV_{C.g.} cos c⁸⁵⁷ λP_R λP_L</i>	Kronmeyer <i>et al.</i> , 1995
pFB-2.7p	Pendelvektor, Kopienzahl in <i>C.g.</i> <5/Zelle <i>Km^r oriV_{E.c.} oriV_{C.g.}</i>	Sonnen, 1991
pJC1	Pendelvektor, <i>Km^r oriV_{E.c.} oriV_{C.g.}</i>	Cremer <i>et al.</i> , 1990
pZ1	Pendelvektor, <i>Km^r oriV_{E.c.} oriV_{C.g.}</i>	Cremer <i>et al.</i> , 1990
pEM1	Integrationsvektor, <i>Km^r oriV_{E.c.} oriT</i>	Schrumpf <i>et al.</i> , 1991
pK18mobsacB	Integrationsvektor, <i>Km^r oriV_{E.c.} oriT sacB</i>	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pEKEx2	Expressionsvektor, <i>Km^r oriV_{E.c.} oriV_{C.g.} tac promotor</i>	Eikmanns <i>et al.</i> , 1991
pUC18 / pUC19	<i>Ap^r oriV_{E.c.}</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pSPORT	Expressionsvektor, <i>Ap^r oriV_{E.c.} T7-und SP6-Promotor</i>	GIBCO BRL

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

Plasmid	Marker / Eigenschaft	Referenz
pFB-Bam	pFB-2.7p mit Insertion eines 235bp <i>EcoRI-PvuII</i> -Fragmentes aus pUC19	diese Arbeit
pMV10	pJC1 mit 10 kb chromosomalem <i>Sau3A</i> Fragment und den Genen <i>lysE</i> und <i>lysG</i>	diese Arbeit
pMV8-3	pJC1 mit 8,3 kb chromosomalem <i>Sau3A</i> Fragment und den Genen <i>lysE</i> und <i>lysG</i>	diese Arbeit
pMV7-1	pJC1 mit 21 kb chromosomalem <i>Sau3A</i> Fragment und dem Operon <i>hom-thrB</i>	diese Arbeit
pMV7-2Bam	pJC1 mit 7.2 kb <i>BamHI</i> Insert aus pMV10	diese Arbeit
pJC <i>lysEG</i> _{2,4}	pJC1 mit 2.4 kb <i>BamHI</i> Insert aus pMV10 und den Genen <i>lysE</i> und <i>lysG</i>	diese Arbeit
pUC18 <i>lysEG</i> _{2,4}	pUC18 mit 2.4 kb <i>BamHI</i> Insert aus pMV10 und den Genen <i>lysE</i> und <i>lysG</i>	diese Arbeit
pEM <i>lysE</i> _{int}	pEM1 mit 343bp internem <i>lysE</i> Fragment	diese Arbeit
pEM <i>lysG</i> _{int}	pEM1 mit 266 bp internem <i>lysG</i> Fragment	diese Arbeit
pEM2 <i>lysG</i> _{int}	pEM <i>lysG</i> _{int} ohne <i>BamHI</i> -Schnittstelle	diese Arbeit
pEKEx2 <i>lysE</i>	pEKEx2 mit 858 bp <i>SalI-PvuII</i> Insert aus pJC <i>lysEG</i> _{2,4}	diese Arbeit
pSPORT <i>lysE</i>	pSPORT mit Insert wie in pEKEx2 <i>lysE</i>	diese Arbeit
pJC <i>lysE</i>	pJC1 mit 1.17 kb <i>HindIII-PvuII</i> Insert aus pJC <i>lysEG</i> _{2,4}	diese Arbeit
pK18mobsacB Δ <i>lysEG</i>	pK18mobsacB mit <i>lysEG</i> Sequenzen deletiert ist ein 1236 bp internes <i>StuI-MluI</i> Fragment der Gene <i>lysE</i> und <i>lysG</i>	diese Arbeit

2. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

Nährmedien für *E. coli*:

Zur Kultivierung der *E. coli* Stämme wurde das Vollmedium LB verwendet (Sambrook *et al.*, 1989). Nur für den Stamm *E. coli* JM109(DE3) wurde das Minimalmedium M9 nach Tanaka *et al.*, (1967) eingesetzt. Die Anzucht zur Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte auf SOB-Medium (Hanahan, 1985). Nach der Transformation wurden die Zellen in das Regenerationsmedium SOC (Hanahan, 1985) überführt.

Nährmedien für *C. glutamicum*:

Zur Stammhaltung, DNA-Isolierung und zur Kultivierung von *C. glutamicum* wurde das Vollmedium LB verwendet. Zur Messung des Membranpotentials und als Vorkulturmedium zur Messung der Lysinproduktion wurde das Komplexmedium BHI eingesetzt. Als weiteres Vollmedium wurde das für *C. glutamicum* optimierte Medium CGIII (Kase & Nakayama, 1972) verwendet. Es diente als Vorkulturmedium für Fermentationen zur Isoleucin- und Glutamatproduktion. Als Fermentationsmedium zur Quantifizierung von Aminosäure-Konzentrationen und zur Bestimmung von Enzymaktivitäten wurde das Minimalmedium CGXII genutzt (Keilhauer *et al.*, 1993); der Vorteil dieses Mediums liegt in der guten Pufferung durch 3-[N-morpholino]-propansulfonsäure (MOPS). Bei Fermentationen zur Induktion der Glutamatexkretion durch *C. glutamicum* wurde das CGXII-Medium nicht mit den üblichen 200 $\mu\text{g l}^{-1}$ Biotin, sondern nur mit 1 $\mu\text{g l}^{-1}$ Biotin angefertigt (Hoischen & Krämer, 1989).

Medienzusätze:

Zur Induktion der Lysinexkretion durch *C. glutamicum* Stämme mit Endprodukt-regulierter Aspartatkinase wurde dem Minimalmedium 5 mM L-Methionin hinzugesetzt (Vrljic *et al.*, 1995). Zur Induktion der Isoleucinexkretion wurde 50 mM Ketobutyrat verwendet (Eggeling *et al.*, 1987). Bei Kultivierungen auf Dipeptid-haltigem Medium enthielt das CGXII-Minimalmedium 1 mM Lysyl-Alanin (Erdmann *et al.*, 1993). Zur Expression von Genen, die unter der Kontrolle IPTG-induzierbarer Promotoren vorlagen, wurde den Medien, wenn nicht anders angegeben, 1 mM IPTG zugesetzt.

Selektionsmarker:

Zur Selektion rekombinanter *E. coli* Stämme wurden 50 mg l⁻¹ Carbenicillin bzw. 50 mg l⁻¹ Kanamycin eingesetzt. Die Selektion auf Kanamycin-resistente *C. glutamicum* Stämme erfolgte mit 50 mg l⁻¹ Kanamycin bzw. nach Elektroporation und Konjugation nur mit 15 mg l⁻¹ Kanamycin. Zusätzlich enthielt das Medium nach Konjugation 50 mg l⁻¹ Nalidixinsäure, um das Wachstum der *E. coli* Donorzellen zu verhindern. Die Selektion auf Excision des Vektors pK18mobsacB Δ lysEG aus dem Genom von *C. glutamicum* ATCC 13032 lysEG::pK18mobsacB Δ lysEG erfolgte auf LB-Medium mit 2 % Glukose und 10 % Saccharose.

Kultivierung der Bakterien:

C. glutamicum wurde zur Herstellung kompetenter Zellen in 2 l Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen in 500 ml Nährmedium kultiviert. Kultivierungen von *C. glutamicum* und *E. coli* für Plasmidisolationen in größerem Maßstab, für Aminosäure-Bestimmungen und zur Herstellung von Rohextrakten, erfolgten in 500 ml Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen. Diese 500 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen enthielten 100 ml Vollmedium bzw. 60 ml CGXII-Minimalmedium. Für Plasmidisolationen in kleinerem Maßstab wurden 5 ml Vollmedium im Reagenzglas verwendet. Zur Bestimmung von Aminosäure-Konzentrationen und Enzymaktivitäten wurden Bakterienkulturen zunächst auf Komplexmedium vorkultiviert, und dann in Minimalmedium übertragen. Dazu wurden Aliquots der Vorkulturen in der Minifuge RF (Heraeus Christ GmbH, Osterode) für 10 min bei 5000 Upm und 4°C geerntet, zweimal mit 50 ml 0,9 % sterilem NaCl gewaschen, und dann in das Minimalmedium überführt. Wenn nicht anders angegeben, wurde eine anfängliche Zelldichte von OD₆₀₀ = 0,5 eingestellt. Kulturen in Reagenzgläsern wurden bei 200 Upm, alle übrigen Kulturen bei 140 Upm auf der Rotationsschüttelmaschine inkubiert. Die Wachstumstemperatur für *C. glutamicum* betrug 30°C, für *E. coli* 37°C.

Zur Stammhaltung wurden Dauerkulturen angelegt, die aus 70 % (v/v) einer auf Komplexmedium angezogenen Übernachtskultur und 30 % (v/v) sterilem Glycerin bestanden. Aliquots dieser Zellsuspensionen wurden bei -20°C bzw. -70°C aufbewahrt und zum Animpfen von Festmedium verwendet. Diese Stammhaltungsplatten wurden für 18 Stunden bei 37°C (*E. coli*) bzw. 48 Stunden bei 30°C (*C. glutamicum*) inkubiert, dann bei 4°C gelagert und im 14-tägigem Rhythmus erneuert.

3. Mutagenese von *C. glutamicum* mit NNG

5 ml einer auf CGIII-Komplexmedium über Nacht angezogenen Vorkultur wurden mit 250 µl NNG (5 mg NNG ml⁻¹ Dimethylformamid) versetzt und 25 Minuten bei 30°C und 200 Upm inkubiert (Adelberg, 1958). Durch Zentrifugation wurde das Zellpellet geerntet, zweimal mit steriler NaCl-Lösung (0,9 %) gewaschen und dann in 3,5 ml Glukose-freiem CGIII-Medium resuspendiert. Nach Zusatz von 1,5 ml sterilem Glycerin (87 %) wurde die Zellsuspension in 500 µl Aliquots bei -20°C bis zur Verwendung aufbewahrt.

4. Bestimmung von Aminosäuren

4.1 Qualitative Bestimmung extrazellulären Lysins

Um den *C. glutamicum* Wildtyp qualitativ auf Veränderungen der Lysinexkretion testen zu können, wurde ein Plattentest verwendet (Vrljic *et al.*, 1995). Dazu wurde der Lysin-auxotrophe Indikatorstamm CG 49/3 auf CGIII-Komplexmedium kultiviert und in der spät-exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Die Zellen wurden gewaschen und mit einer Zelldichte von 10⁷ Zellen ml⁻¹ in das autoklavierte und auf 45°C abgekühlte CGIX-Minimalmedium (modifiziert nach Kase & Nakayama, 1972) eingerührt. Zur Induktion der Lysinexkretion durch den *C. glutamicum* Wildtyp wurde dem Medium zusätzlich 5 mM L-Methionin sterilfiltriert hinzugesetzt.

4.2 Kultivierungen zur quantitativen Bestimmung von Aminosäuren

C. glutamicum Kulturen wurden über Nacht auf Vollmedium vorkultiviert, zweimal mit 0,9 % steriler NaCl-Lösung gewaschen, und dann in CGXII-Minimalmedium übertragen. Die Medien enthielten die für die jeweilige Fragestellung notwendigen Zusätze (s. Medienzusätze). Kulturen, denen das Dipeptid Lysyl-Alanin zugesetzt worden war, wurden mit einer anfänglichen Zelldichte von OD₆₀₀ = 2,0 gestartet. Die Kulturen zur Induktion der Isoleucin-, Glutamat- und Lysinproduktion wurden mit OD₆₀₀ = 0,5 gestartet. Die Probenentnahmen erfolgten unter sterilen Bedingungen über einen Zeitraum von 24 Stunden. Um zellinterne Aminosäure-Konzentrationen bestimmen zu können, wurden die Proben zur Silikonölzentrifugation eingesetzt. Wurden nur extrazelluläre Aminosäure-

Konzentrationen bestimmt, wurden die Zellen kurz abzentrifugiert (5 min, 13000 Upm) und der Kulturüberstand zur HPLC-Analyse verwendet.

Um Lysin-Exkretionsraten zu bestimmen, wurde eine modifizierte Form der Kurzzeitfermentation nach Hoischen & Krämer, 1989 verwendet. Zur Steigerung der Lysinbildung wurden die *C. glutamicum* Stämme zwölf Stunden in CGXII-Minimalmedium unter Zusatz von 5 mM L-Methionin vorkultiviert. Dann wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und zweimal mit eiskaltem CGXII-Minimalmedium gewaschen (10 min, 5000 Upm, 4°C). Die Induktion der Lysinexkretion wurde durch Resuspendieren der Zellen in CGXII-Minimalmedium erreicht, das auf 30°C vorgewärmt war. Das Kultivierungsgefäß hatte ein Gesamtvolumen von 40 ml und enthielt 10 ml CGXII-Minimalmedium. Zusätzlich wurden dem Medium 5 mM L-Methionin zugesetzt. Die ausreichende Belüftung der Zellsuspensionen wurde durch Rühren (650 Upm) mittels eines Magnetrührers gewährleistet. Die im Testansatz vorhandene Zelldichte wurde auf 2,5 -3,0 mg Zell-Trockengewicht ml⁻¹ eingestellt. Über einen Meßzeitraum von 3 Stunden wurden alle 20 min Proben entnommen. Nach Quantifizierung der extrazellulären Lysinkonzentrationen konnten aus den Tangentensteigungen der Exportkurven, unter Berücksichtigung der jeweiligen Zell-Trockengewichte, die Exportraten berechnet werden.

4.3 Silikonölzentrifugation

Um intrazelluläre Metabolite quantifizieren zu können, ist eine schnelle Inaktivierung des Stoffwechsels notwendig. Gleichzeitig muß eine rasche und möglichst vollständige Abtrennung der Bakterienzellen vom Kulturmedium erfolgen, um Verfälschungen interner Konzentrationen durch exkretierte Metabolite zu vermeiden. Beide Anforderungen werden durch die Methode der Silikonölzentrifugation erfüllt (Klingenberg & Pfaff, 1967). Hierzu wurden 400-µl-Mikrozentrifugenröhrchen (Beckman Instruments GmbH, München) eingesetzt, in denen jeweils 30 µl 20%ige Perchlorsäure von 65 µl Silikonöl der Dichte 1,04 g cm⁻³ überschichtet war. Pro Meßpunkt und Kultur wurden vier Silikonöl-Röhrchen verwendet. Jeweils 200 µl einer Kultur wurden auf die Silikonölschicht pipettiert, und sofort für 30 Sekunden in der Microfuge E bei 13750 Upm zentrifugiert. So wurde eine Trennung der Zellen vom Kulturmedium erreicht. Das als Überstand auf der Silikonölphase verbliebene Kulturmedium wurde abpipettiert, vereinigt und bis zur Bestimmung der exkretierten Aminosäuren bei -20°C aufbewahrt. Zur Bestimmung der

zellinternen Aminosäure-Konzentrationen mußte das in der Perchlorsäurephase vorliegende Zellpellet aufgearbeitet werden. Die Aufarbeitung erfolgte nach Hoischen & Krämer, 1989. Dazu wurde das Zellpellet mit Ultraschall aufgeschlossen und die erhaltenen Extrakte mit KOH (5 M) und Triethanolamin (1 M) neutralisiert. Nach der Zentrifugation (10 min, 13000 Upm, 4°C) konnten die Überstände zur Aminosäure-Bestimmung mittels HPLC verwendet werden.

4.4 *reversed phase* HPLC

Die quantitative Bestimmung von Aminosäuren erfolgte mittels *reversed phase* HPLC (Lindroth & Mopper, 1979). Es wurde ein HPLC-Gerät vom Typ HP 1090 M (Hewlett-Packard, Waldbronn) mit angeschlossenem Fluoreszenzdetektor (HP 1046 A) verwendet; die Systemsteuerung erfolgte über die „HP-Chem-Station“. 2,5 µl der zu analysierenden Aminosäure-Lösung wurden in einer automatischen Vorsäulenderivatisierung mit 17,5 µl o-Phtaldialdehyd/2-Mercaptoethanol-Fertigreagenz gemischt. Die dabei entstehenden fluoreszierenden, thiosubstituierten Isoindole (Jones & Gilligan, 1983) wurden auf einer *reversed phase* Säule (Hypersil ODS 5µ) über ein Gradientenprogramm mit zunehmend unpolarer Phase (Methanol) aufgetrennt. Das polare Eluent war 0,1 M Natriumacetat, pH 7,2. Die Flußrate betrug 0,5 ml min⁻¹. Die Fluoreszenzdetektion der Aminosäure-Derivate erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 230 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm. Die Aminosäure-Konzentrationen wurden berechnet über einen Vergleich mit einem externen Standard und Ornithin als zusätzlichem internen Standard. Zur Quantifizierung der zellinternen Aminosäuren-Konzentrationen wurden folgende Parameter berücksichtigt (Gutmann, 1993):

OD ₆₀₀ =1	≡ 0,3 mg Zell-Trockengewicht ml ⁻¹
Zellvolumen Biotin-supplementierter Zellen	≡ 2,0 µl (mg Zell-Trockengewicht) ⁻¹
Zellvolumen Biotin-limitierter Zellen	≡ 1,6 µl (mg Zell-Trockengewicht) ⁻¹

5. Radiochemische Transportstudien

5.1 Messung des Membranpotentials

Zur Messung des Membranpotentials wurde das radioaktiv markierte Kation Tetra- ^{14}C -Phenylphosphoniumbromid (TPP^+) als Sonde eingesetzt (Rottenberg *et al.*, 1979, Kashket, 1985). Wegen seiner lipophilen Struktur kann TPP^+ über die Cytoplasmamembran permeieren, so daß es bei intaktem elektrischen Potential über der Membran im Zellinneren akkumuliert. 500 μl einer auf BHI exponentiell wachsenden Kultur (1,5 mg Zell-Trockengewicht ml^{-1}) wurden mit 15 μl ^{14}C - TPP^+ (2,25 Kbp im Ansatz) für 60 sec bei 30°C unter Rühren inkubiert. Zur Trennung von Zellen und Überstand wurden $3 \times 100 \mu\text{l}$ der Zellsuspension einer Silikonölzentrifugation unterzogen. Jeweils 50 μl der Überstände sowie $3 \times 50 \mu\text{l}$ der Zellsuspension wurden in die Flüssigszintillationszählung (Rackbeta 1214, LKB) eingesetzt. So konnte die Radioaktivität im Überstand und die Radioaktivität des Gesamtansatzes der Zellsuspension ermittelt werden. Aus der Differenz dieser Werte ergibt sich die Zell-assoziierte Radioaktivität. Unter Berücksichtigung des zellinternen Volumens kann so die intrazelluläre Volumenaktivität der Sonde berechnet werden. Hiermit ist unter Nutzung der Nernst'schen Gleichung das Membranpotential zu berechnen:

$$\Delta\psi = -2,303 \times R \times T \times \log (V_{A \text{ intern}})/(V_{A \text{ extern}})$$

- $\Delta\psi$ = Membranpotential [mV]
- $V_{A \text{ intern}}$ = $A_{\text{intern}} / V_{\text{intern}} \equiv$ intrazelluläre Volumenaktivität der Sonde
- $V_{A \text{ extern}}$ = Radioaktivität im Überstand [dpm/100 μl]
 $\equiv$ extrazelluläre Volumenaktivität der Sonde
- A_{intern} = Zellassoziierte Radioaktivität [dpm/ 100 μl Zellsuspension]
- V_{intern} = Intrazelluläres Volumen [μl /100 μl Zellsuspension]

5.2 Messung der Lysinaufnahme

Die Messung von Lysinaufnahmeraten in *C. glutamicum* erfolgte mit ^{14}C -Lysin. Dazu wurden auf LB + 5% Glukose exponentiell gewachsene Zellen geerntet, dreimal mit je 50 ml 50 mM Kalium-Phosphatpuffer (KPP), pH 7,0 gewaschen und auf ein Zell-Trockengewicht von 10 mg ml^{-1} eingestellt. 200 μl dieser Zellsuspension wurde mit 1200 μl Waschpuffer (50 mM KPP, pH 7,0) für 3 min bei 30°C im Wasserbad unter Rühren inkubiert ($1,5 \text{ mg Zell-Trockengewicht ml}^{-1}$ im Testansatz). Dann wurde durch die Zugabe einer L-Lysinlösung mit einer Endkonzentration von $100 \mu\text{M}$ die Messung gestartet. Die Radioaktivität im Testansatz betrug 20 Kbp. In Abständen von 30 sec wurden jeweils 200 μl Zelllösung entnommen und mittels einer Mehrfachfilteranlage (VF1, Amicon) durch Glasfaserfilter (Milipore) von der Lysinlösung getrennt. Zur Entfernung anhaftender Lösungsreste wurden die Zellen sofort zweimal mit je 1,5 ml eiskaltem 0,1 M LiCl gewaschen. Nach Trocknen der Filter wurde im Flüssigkeitsscintillationszähler (Rackbeta 1214, LKB) die inkorporierte Aktivität ermittelt. Aus der Zeit-abhängigen Zunahme zellinterner Aktivitäten konnten so die Lysin-Aufnahmeraten bestimmt werden.

6. Molekulargenetische Methoden

6.1 Isolierung von DNA

Zur schnellen Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde die Methode der alkalischen Lyse (modifiziert nach Birnboim & Doly, 1979) verwendet. Größere Mengen Plasmid-DNA mit höherer Reinheit wurden mit einer modifizierten Methode nach Sambrook *et al.* (1989) isoliert. Um Plasmid-DNA aus Coryneformen zu erhalten, wurde eine Modifikation des Protokolls zur alkalischen Lyse von *E. coli* verwendet (Schwarzer & Pühler, 1991). Die Isolierung chromosomaler DNA aus *C. glutamicum* und *E. coli* erfolgte nach Altenbuchner & Cullum (1984).

6.2 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* (Boehringer, Mannheim) in 5 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Wurden die Ligationsansätze direkt nach *C.glutamicum* transformiert, so erfolgte die Ligation über Nacht bei 16°C unter Nutzung der DNA-Ligase des Bakteriophagen T4. Zur Herstellung von Deletionsklonen mit dem Enzym Exonuklease III wurde das *Erase-a-base* System (Promega, Madison, USA) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten, die mittels Restriktionsenzymen generiert wurden, erfolgte in 0,5 bis 2%igen TAE-Agarosegelen (Sambrook *et al.*, 1989). Wurden die im Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente für weitere Klonierungen benötigt, so wurde die DNA nach Isolierung aus dem Gel mit Hilfe des *QIAEX kit* (QIAGEN, Hilden) aufgereinigt.

6.3 Größenfraktionierung chromosomaler DNA mittels Dichtegradienten-Zentrifugation

Um DNA schonend größenfraktionieren und hochrein isolieren zu können, erfolgte eine hochtourige Auftrennung in einem Saccharosegradienten. Dazu wurde mit einer 10 %igen und einer 40 %igen Saccharose-Lösung (in 10 mM TrisHCl, pH 8,0, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA) in einem Zentrifugenbecher ein linearer Saccharosegradient hergestellt (nach Herbort, persönliche Mitteilung). Dieser Gradient wurde mit partiell *Sau3A*-geschnittener chromosomaler DNA (5-100 µg) vorsichtig überschichtet, und im Ausschwingrotor SW28 bei 22000 Upm und 20°C für 28 Stunden zentrifugiert. Danach wurde der Gradient in 24 Fraktionen à 500 µl geerntet. Die Analyse der DNA einzelner Fraktionen mittels Gelelektrophorese ergab, daß die Fraktionen 2-7 DNA-Fragmente der gewünschten Größe von 5-10 kb enthielten. Zur Entfernung der Saccharose wurden diese Fraktionen in einen Dialyseschlauch überführt (Durchmesser 16 mm, Servapore, Heidelberg), und dann zweimal für jeweils 2 Stunden gegen 1,5 l 1 x TAE-Puffer bei 4°C dialysiert.

6.4 Erstellung einer Plasmidgenbank in *C.glutamicum*

In den Vektoren pJC1 (Cremer *et al.*, 1990) und pFB-Bam (diese Arbeit) wurden Genbänke von *C. glutamicum* aufgebaut. Dazu wurden diese Vektoren zunächst mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI linearisiert und dann mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Die so vorbehandelten Vektoren wurden dann zur Ligation mit den über Dichtegradienten-Zentrifugation größenfraktionierten chromosomalen DNA-Fragmenten eingesetzt. 25 ng Vektor-DNA wurden mit 100 ng chromosomaler DNA in einem Volumen von 10 µl über Nacht bei 16°C ligiert. Da nach Ymer (1991) die Anwesenheit der T4-Ligase in Elektroporations-Ansätzen die Transformationseffizienz senkt, wurden die Ligationsansätze aufgereinigt. Nach Hitzeinaktivierung der T4-Ligase (10 min, 70°C) wurde das Volumen mit H₂O bidest. auf 100 µl erhöht, und die Ligase durch Phenol/Chloroform-Extraktion entfernt. Die anschließende Nukleinsäurepräzipitation erfolgte mit 7,5 M Ammoniumacetat (Endkonzentration 1,45 M) und 400 µl absolutem Ethanol (1 Stunde, -20°C). Um Verluste der DNA während des Fällungsschrittes zu minimieren, erfolgte eine 45 minütige Zentrifugation bei 13000 Upm und 4°C. Das Nukleinsäure-Pellet wurde einmal mit 70% Ethanol gewaschen (13000 Upm, 15 min, 4°C), lyophilisiert, und in 2 µl sterilem H₂O bidest. resuspendiert. Diese DNA-Lösung wurde dann zur Elektroporation eingesetzt.

6.5 Southern-Blot-Analyse

Um zu prüfen, ob klonierte DNA-Fragmente entsprechend der genomischen Situation in *C. glutamicum* vorlagen, erfolgten DNA:DNA-Hybridisierungen nach Southern, 1975. Mit dieser Methode wurden auch Gen-gerichtete Disruptionen oder Deletionen von Zielgenen überprüft. Mit Restriktionsenzymen gespaltene und im Agarosegel über Nacht aufgetrennte DNA wurde mittels Vakuum-unterstützter Diffusion (LKB 2016 VacuGene; Pharmacia, Freiburg) auf eine Nylonmembran (Nytran N 13, Schleicher & Schuell, Dassel) transferriert. Dazu wurde das auf die Nylonmembran gelegte Agarosegel für jeweils 20 min zunächst mit Depurinierungslösung (0,3 M HCl), dann mit Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) und anschließend mit Neutralisationslösung (1 M TrisHCl, 1,5 M NaCl, pH 7,5) überschichtet. Der vollständige DNA-Transfer auf die Membran erfolgte, in dem das Gel für 60 min mit 20 x SSC-Lösung überschichtet wurde (0,3 M Na-Citrat pH 7,0, 3 M NaCl). Die Nylonmembran wurde für 5

min bei Raumtemperatur getrocknet, und die DNA durch 3 minütige UV-Bestrahlung bei 366 nm auf dem Filter fixiert. Zur DNA:DNA-Hybridisierung wurde die Nylonmembran für 16 Stunden bei 68°C unter leichtem Schwenken mit 200 ng hitzedenaturierter, Digoxigenin-markierter Sonde inkubiert. Um die DNA:DNA-Hybride nachzuweisen, wurde der Filter zunächst zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit 1% Blocking Reagenz (in 0,1 M TrisHCl, 0,15 M NaCl, pH 7,5) gebadet. Dann erfolgte die Inkubation mit einem Anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase-Konjugat. Der so spezifisch gebildete DNA:DNA-Hybrid-Konjugat-Komplex wurde in einer Enzym-katalysierten Farbreaktion mit den Substraten 5-Bromo-4-Chlor-2-Indoylphosphat (X-Phosphat) und Nitroblau-Tetrazoliumsalz (NBT) sichtbar gemacht. Die Blockierung der Nylonmembranen, die Markierung der Sonden und die Detektion der Hybridisierungsbanden mit Antikörper-Konjugat und X-Phosphat/NBT erfolgte mit Hilfe des *DIG DNA Labeling and Detection Kit* von Boehringer Mannheim entsprechend den Angaben des Herstellers.

6.6 Synthese und Aufreinigung von Oligonukleotiden

Synthetische Oligonukleotide wurden als Startermoleküle (Primer) in der PCR-Reaktion und für die DNA-Sequenzierung verwendet. Die Synthese erfolgte computergesteuert mit dem Gene Assembler Plus (Pharmacia LKB, Freiburg) nach der Methode von Caruthers (1985). Hierbei war das erste Nukleotid über sein 3'-Ende fest am Trägermaterial der verwendeten Säule gebunden. Die Synthese lief im organischen Lösungsmittel Acetonitril ab, wobei die reaktiven Gruppen der Nukleotide, d.h. die freien OH-Gruppen und primären Amine, während der Synthese durch Schutzgruppen maskiert waren. Die Trennung der Oligonukleotide vom Säulenmaterial und die Entfernung der Schutzgruppen erfolgte durch 16 stündige Inkubation der Säule mit 1 ml 30 %iger Ammoniaklösung bei 50°C in einem Reaktionsgefäß. Anschließend wurde die Oligonukleotidlösung durch Säulenchromatographie gereinigt (NAPTM-10 Säule, Sephadex G-25, Pharmacia, LKB, Freiburg). Die Konzentration der Oligonukleotidlösung wurde photometrisch bei 260 nm im Ultrospec Plus Spectrophotometer (Pharmacia LKB, Freiburg) bestimmt. Bei einer durchschnittlichen molekularen Masse eines dNTP von 325 g/mol gilt für ein Oligonukleotid von 20 Nukleotiden.

$$OD_{260}=1 \equiv 33 \mu\text{g/ml single strand DNA} \equiv 33 \mu\text{g} / 20 \times 325 \text{ g/mol} = 5 \text{ nmol}$$

6.7 Polymerase-Kettenreaktion

Der Nachweis der Gen-gerichteten Inaktivierung von *lysG* erfolgte mittels der Polymerase-Kettenreaktion mit dem Thermocycler der Firma Biozym Diagnostik (Oldendorf). Dabei wurde das zu amplifizierende Fragment von zwei flankierenden, komplementären, konvergierenden Oligonukleotiden eingerahmt (Saiki *et al.*, 1988). Durch einen sich wiederholender Zyklus aus DNA-Denaturierung, Primer-Bindung (*annealing*) und Kettenverlängerung wurde die exponentielle Zunahme des zu amplifizierenden Fragmentes erreicht. Die Nutzung der thermostabilen Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* ermöglichte das Fortlaufen der Zyklen, ohne daß nach jedem Denaturierungsschritt die DNA-Polymerase neu zugesetzt werden mußte (Tindall & Kunkel, 1988).

Es wurden die Primer TA1 und TA2 verwendet. Die Nukleotidzahlen geben die Position dieser DNA-Sequenzen auf dem in dieser Arbeit isolierten DNA-Fragment wieder.

TA1: 5'-198-CGAGGAGGATCACTTCTCCTGC-219-3'

TA2: 5'-605-CGCTCACGCTGCGCTTGGAAGA-584-3'

In einem 100 µl PCR-Ansatz wurden folgende Reagentien eingesetzt: je 500 ng Primer TA1 und TA2, 10 ng chromosomale DNA, 20 µl 1,25 M dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 10 µl 10 x Taq-Puffer (100 mM TrisHCl, pH 8,3, 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl, 1 mg/ml Gelatine) und 0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl). Der Reaktionsansatz wurde mit Mineralöl überschichtet, und anschließend die PCR-Zyklen gestartet. Es wurden 30 Zyklen mit einer Annealing-Temperatur von 63°C und einer Elongations-Temperatur von 72°C durchgeführt. Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurde das Mineralöl abpipettiert, und 5 µl des Reaktionsansatzes im Agarosegel analysiert.

6.8 DNA-Sequenzanalyse

Die Primärstruktur der isolierten DNA-Fragmente wurde mittels der Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* (1977) bestimmt. Dabei wurden zum einen radioaktiv markierte Nukleotide (³⁵S-dATP) verwendet, die eine Detektion der Sequenzierungsprodukte durch Autoradiographie (Röntgenfilm Kodak X-Omat)

ermöglichten. Bei der nicht-radioaktiven Sequenzierung wurden die Sequenzierungsprodukte Fluoreszenz-markiert, und die Fluoreszenzsignale der Sequenzierungsprodukte mittels *Automated Laser Fluorescence* (A.L.F., Pharmacia LKB, Freiburg) angeregt, detektiert und aufgezeichnet. Für die Sequenzierungsreaktionen unter Nutzung radioaktiv markierter Nukleotide wurde der *Sequenase kit* Version 2.0 (USB, Cleveland OH, USA) verwendet. Die Sequenzierungsreaktionen für die automatische Laser-Fluoreszenz-Detektion wurden mit dem *AutoReadTM Sequencing kit* (Pharmacia, Freiburg) nach dem *fast protocol* des Herstellers durchgeführt. Bei Primern, die mit dem Gene Assembler Plus (Pharmacia LKB, Freiburg) hergestellt wurden, erfolgte die Fluoreszenz-Markierung der neusynthetisierten Stränge mit Fluorescein-15-dATP nach dem F-dATP/AutoreadTM Protokoll des Herstellers. Die Sequenzierung der *lysE*- und *lysG*-Allele aus *C. glutamicum* Stämmen mit verändertem Lysinexport erfolgte durch die Firma Medigene (München) mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs mit einer automatischen DNA-Sequenzierapparatur (Applied Biosystems).

6.9 Computer-gestützte Sequenzanalyse

Die Assemblierung der DNA-Sequenzen und die Kodierbereichsanalyse erfolgte mit dem Programmpaket PCGENE (IntelliGenetics, Release 6.60). Die Datenbankrecherche zur Suche nach DNA- bzw. Aminosäure-Sequenzen mit Ähnlichkeit zu den in dieser Arbeit ermittelten Sequenzen erfolgte unter der Nutzung der Programme BLASTX bzw. BLASTP (Lipman & Pearson (1985), HUSAR 4.0, EMBL, Cambridge, Großbritannien). Zum Homologievergleich wurden die Programme GAP (Needleman & Wunsch, 1970, HUSAR 4.0), CLUSTAL (Higgins & Sharp, 1988, HUSAR 4.0) und MULTALIGN (Krueger & Osterburg, 1983, HUSAR 4.0) eingesetzt. Die Sekundärstrukturanalyse erfolgte einerseits unter der Nutzung der Programme PEPTIDESTRUCTURE, PEPLOT und PREDICT (HUSAR 4.0). Diese Programme ermöglichen Sekundärstrukturvorhersagen nach den Methoden von Chou & Fasman (1974a, 1974b), Garnier *et al.* (1978), und die Bestimmung der Hydrophobizität der Aminosäuresequenzen nach Kyte & Doolittle (1982). Zur Vorhersage membranhelikaler Bereiche kamen auch die Programme RAOARGOS (Rao & Argos, 1986, PCGENE, Release 6.60) und HELIXMEM (Eisenberg *et al.*, 1984, PCGENE, Release 6.60) zur Anwendung. Zur Vorhersage der Sekundärstruktur abgeleiteter Polypeptidsequenzen wurden weiterhin die Programme PHD Neuronal Net (Rost & Sander, 1993,1994, EMBL, Cambridge, Großbritannien), PHD-htm Neuronal Net

(Rost *et al.*, 1995, EMBL, Cambridge, Großbritannien) und TMP (Persson & Argos, 1994, tmap@embl-Heidelberg.de) genutzt. Der Vorteil der drei zuletzt genannten Programme besteht darin, daß sie die Ergebnisse mehrerer Einzelanalysen kombinieren.

7. Transformationstechniken

Transformation von *E. coli*:

Zur Erhöhung der Transformationseffizienz wurden Zellen von *E. coli* nach der Rubidiumchlorid-Methode, modifiziert nach Hanahan (1983, 1985), behandelt.

Transformation von *C. glutamicum*:

Zur Transformation von *C. glutamicum* wurde die Methode der Elektroporation verwendet (Dower *et al.*, 1988; Dunican & Shirvnan, 1989; Liebl *et al.*, 1989; Wolf *et al.*, 1989). Dazu wurden die Zellen nach einer modifizierten Methode von Haynes & Britz (1989) mit Zellwandmodifikatoren (500 ml LB-Medium, 4 mg ml⁻¹ Isonicotinsäurehydrazid, 2,5 % Glycin (v/v), 0,1 % Tween 80 (v/v)) bis zu einer optischen Zelldichte von OD₆₀₀=0,5 inkubiert. Die Zellen wurden dann in der Beckman-Zentrifuge (J2-21 M/E, Rotor JA 10, 6000 Upm, 8 min, 4°C) geerntet. Das Zellpellet wurde einmal mit 250 ml, zweimal mit 100 ml und einmal mit 50 ml eiskaltem 10 %igen Glycerin gewaschen, bevor es in 1 ml eiskaltem Glycerin (10 %) resuspendiert wurde. Die Zellsuspension wurde dann in 100 µl Aliquots bei -70°C gelagert. Zur Elektroporation wurden 50 µl Zellsuspension mit der DNA gemischt, luftblasenfrei in vorgekühlte, sterile Bioradküvetten (16 S 2086) überführt, und dann bei einer Spannung von 2,5 kV, einem Parallelwiderstand von 200 OHM und einem kapazitären Widerstand von 25 µF zur Elektroporation eingesetzt (Haynes & Britz, 1990). Dazu wurde der BIORAD GENE PULSERTM verwendet. Sofort nach Beendigung des elektrischen Pulses wurde 1 ml LBHIS in die Küvette pipettiert, und die Zellsuspension in ein steriles Reagenzglas überführt. Die Regeneration erfolgte für 45 min bei 30°C auf der Rotationsschüttelmaschine (100 Upm), bevor die Zellen auf Antibiotika-haltigem LBHIS-Medium (Liebl *et al.*, 1989) ausplattiert wurden.

Konjugativer Plasmid-Transfer von *E. coli* nach *C. glutamicum*:

Zum Transfer von Integrationsplasmiden zur gerichteten Inaktivierung von Genen wurde die Methode nach Schäfer *et al.* (1990) verwendet. Dazu wurden 400 µl einer LB-Vorkultur des Donorstammes S17-1pEM/ysE_{int} bzw. S17-1pEM/ysG_{int} in 20 ml LB (100 ml

Erlenmeyer mit zwei seitlichen Schikanen) übertragen und bei 37°C bis zu einer optischen Dichte $OD_{600} = 1$ inkubiert. Die Zellen wurden dann auf Eis gelagert. Pro Konjugationsansatz und zu transferierendem Plasmid wurden 3 ml einer LB-Übernachtskultur ($OD_{600} = 5$) des Rezipienten in einem Reagenzglas zum Hitzeschock (9 min, 48,5°C) eingesetzt. Dann wurden 1 ml Donorzellen mit 3 ml Rezipientenzellen in einem sterilen Reagenzglas gemischt, 30 sec bei 5000 Upm zentrifugiert, und nach Entfernung des Überstandes in 100 µl LB-Medium resuspendiert. Sterile Zellulosenitratfilter (Millipore, Typ HAWP, Poengröße 0,45 µm, Millipore S.A., Molsheim, Frankreich) wurden auf LB-Festmedium plaziert, und die Zellsuspensionen auf die Filter aufgetropft. Nach dem Antrocknen der Suspensionen wurden die Platten 20 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Filter wurden mit sterilen Pinzetten von den Platten abgenommen und in Reaktionsgefäße mit 0,6 ml LB-Medium überführt. Nach Resuspendieren der Zellen konnten die Zellsuspensionen auf LB-Festmedium mit 50 mg ml⁻¹ Nalidixinsäure und 25 mg ml⁻¹ Kanamycin plattiert werden.

8. Messung der spezifischen Homoserindehydrogenase-Aktivität

Auf CGXII-Minimalmedium ohne und mit Zusatz von 5 mM L-Methionin kultivierte *C. glutamicum* Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet (5000 Upm, 10 min, 4°C). Nach zweimaligem Waschen mit 50 ml 200 mM KPP, pH 7 (5000 Upm, 10 min, 4°C) wurde das Zellpellet in 1 ml des gleichen Puffers resuspendiert. Der Aufschluß der Zellen erfolgte mit Hilfe des Ultraschall-Desintegrators Branson Sonifier W-250 für 10 min mit einer Ultraschallfrequenz von 20% und einer Leistung von 30 W. Dabei wurden die Zellen konstant im Eis-Wasser-Bad gekühlt. Nach einem 30minütigen Zentrifugationsschritt (13000 Upm, 4°C) wurde ein klarer Überstand erhalten, der als Rohextrakt zur Proteinbestimmung und für die Enzymaktivitätsbestimmung eingesetzt wurde. Die Proteinkonzentrationen wurden nach der Biuret-Methode (Gornall *et al.*, 1949) bestimmt.

Die Homoserindehydrogenase (L-Homoserin:NADP-Oxidoreductase) katalysiert die NADPH-abhängige Reduktion von L-Aspartatsemialdehyd zu L-Homoserin. Durch Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 340 wurde die Konzentrationsabnahme des reduzierten Pyridinnucleotids NADPH verfolgt, die der Menge des umgesetzten Substrates Aspartatsemialdehyd entspricht. Die Messung erfolgte modifiziert nach

Cremer *et al.*, 1988. Dazu wurden 500 μ l 200 mM KPP, pH 7, 440 μ l Aqua dest., und 20 μ l NADPH- Na_4 in eine Halbmikroküvette pipettiert, und mit 20 μ l verdünnter Rohextraktlösung versetzt, so daß die Proteinkonzentration im Testansatz zwischen 50 μ g und 100 μ g lag. Durch Zugabe von 0,1 mM Aspartatsemialdehydlösung (20 μ l, Degussa AG, Halle-Künsebeck) wurde die Reaktion gestartet, und die Extinktionsänderung bei 340 nm und 30°C über einen Zeitraum von 3 Minuten verfolgt. Der Extinktionskoeffizient für NADPH bei 340 nm ist: $E_{340} = 6,26 \text{ ml mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

9. Western-Blot-Analyse zum Nachweis von LysE

9.1 Herstellung von Protein-Rohextrakten

Rekombinante Zellen von *C. glutamicum* und *E. coli* wurden in LB-Medium kultiviert. Bei Erreichen einer optischen Dichte von $\text{OD}_{600} = 0,5$ wurden die Kulturen für 4 Stunden mit 2 mM IPTG versetzt, um die Expression von Genen, die unter Kontrolle IPTG-induzierbarer Promotoren vorlagen, zu induzieren. Danach wurden die Zellen durch eine 10minütige Zentrifugation (5000 Upm, 4°C) geerntet, zweimal mit 0,9% NaCl gewaschen und in 6 ml 0,9% NaCl resuspendiert. Eine Hälfte der Zellsuspension wurde mit dem Ultraschall-Desintegrator Branson Sonifier W-250 für 10 min mit einer Ultraschallfrequenz von 20% und einer Leistung von 30 W aufgeschlossen. Die zweite Hälfte der Zellsuspension wurde für eine Stunde bei 37°C in Lysispuffer (5 mg/ml Lysozym in 10 mM Tris-HCl, 25 mM MgCl_2 , 200 mM NaCl) inkubiert (modifiziert nach Kallio *et al.*, 1986). So erfolgte ein schonender Abbau der Zellwände. Um den Abbau von Proteinen durch zelleigene Proteasen zu vermeiden, wurde dem Lysispuffer 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMFS), ein Protease-Inhibitor, zugesetzt. Der nach Ultraschallbehandlung und anschließender Zentrifugation (Kühlzentrifuge 202 MK, 13000 Upm, 4°C, 30 min) erhaltene, klare Überstand wurde zur Bestimmung der maximal freizusetzenden Proteinkonzentrationen verwendet. Die Proteinbestimmung wurde mit der Lowry-Methode modifiziert nach Bensadoun & Weinstein (1976) durchgeführt.

9.2 Herstellung polyklonaler Antisera

Mittels der von *lysE* abzuleitenden Aminosäuresequenz wurden Antikörper gegen LysE hergestellt. Dazu wurde ein fünfzehn Aminosäure-haltiges Peptid aus der deutlich hydrophilen Region des LysE-Proteins unter carboxyterminaler Addition eines Tyrosins synthetisiert (Aminosäure 118-131 von LysE): **Gly-Gly-Ser-Ala-Val-Ala-Thr-Asp-Thr-Arg-Asn-Arg-Val-Arg-Tyr** (nach Hoop & Woods, 1981, 1983, Kyte & Doolittle, 1982). Das Peptid wurde über das carboxyterminale Tyrosin an Bisdiazobenzidin (BDB) gekuppelt und dann auf Ovalbumin als Trägerprotein übertragen. Nach Injektion in Kaninchen wurde ein Antikörper-Gemisch gegen die antigene Determinante des LysE-Proteins, gegen die Kupplungsgruppe und gegen das Trägerprotein gebildet. Das aufgearbeitete klare Blutserum wurde von der Firma Neosystem S.A. (Straßburg, Frankreich) bezogen.

9.3 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot-Analyse

Die Auftrennung von Proteinen nach deren Molekülgröße erfolgte durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli (1970). Es wurden 12 %ige Trenngele, überschichtet von 6 %igen Sammelgelen nach Sambrook *et al.* (1989) verwendet. Eine Hälfte der Gele wurde zur Anfärbung der Proteine mittels Coomassie-Blau (1,75 g Serva Blau R, 454 ml Methanol, 92 ml Eisessig ad 1 l) oder mit Silberfärbung behandelt, die identische zweite Gelhälfte wurde ohne vorherige Anfärbung zum Western-Blot eingesetzt. Der Transfer erfolgte im SemiDry-Blotting-Verfahren auf Polyvinylidendifluorid-Membranen (PVDF, Pharmacia LKB, Freiburg). Dazu wurde das Gel zunächst 15 min im Blot-Puffer (10 mM CAPS pH 11, 10 vol% Methanol) äquilibriert, die PVDF-Membran kurz (1 min) mit Methanol gebadet, und anschließend Membran, Gel und ebenfalls im Blot-Puffer äquilibrierte Filterpapiere in die SemiDry-Blotting-Apparatur (Pharmacia LKB, Freiburg) überführt. Der Transfer der Proteine erfolgte für 1 Stunde mit $0,8 \text{ mA cm}^{-2}$ entsprechend den Angaben des Herstellers.

Zum immunologischen Nachweis der Proteine mit Antikörpern wurde die Methode von Towbin *et al.* (1979) verwendet. Die Protein-tragende Membran wurde zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 1 h bei 37°C in 50 ml Lösung I unter leichtem Schwenken inkubiert, und dann mit 1:250 in 50 ml Lösung II verdünntem, nach Immunisierung isoliertem Blutserum über Nacht bei 4°C inkubiert. Zur Entfernung nicht

gebundener, überschüssiger Antikörper wurde die Membran zweimal mit je 50 ml Lösung II für 30 min bei 37°C gewaschen, und dann mit dem zweiten Antikörper inkubiert. Als zweiter Antikörper wurde Biotin-konjugiertes Anti-Kaninchen Immunglobulin aus Ziegen (Sigma Immuno Chemicals, Product No. B-7389, Sigma, St. Louis, MO, USA) verwendet. Dieser Biotin-konjugierte Antikörper erlaubte eine nachfolgende Behandlung mit einem Extravidin-alkalische Phosphatase-Komplex. Der Vorteil dieses Biotin-Extravidin-Systems ist die außerordentliche Stabilität und die Bildung von Quervernetzungen zur Signalverstärkung (Berman & Basch, 1980; Hsu *et al.*, 1981). Die Protein-tragende PVDF-Membran wurde für 1 h bei 37°C mit 50 ml der zweiten Antikörper-Lösung (1:10000 in Lösung II) inkubiert. Dann wurden überschüssige, nicht gebundene Antikörper durch zweimaliges Waschen mit 50 ml Lösung II (30 min, 37°C) entfernt. Die Membran wurde für 2 min in Lösung III äquilibriert, bevor der Extravidin-alkalische Phosphatase-Komplex (Sigma Immuno Chemicals, Product No. E-2636, Sigma, St. Louis, MO, USA) als eine 1:50000 Verdünnung in 50 ml Lösung III zugegeben wurde. Nach einer Inkubation mit diesem Komplex für 30 min bei 37°C wurde die Membran zweimal mit 50 ml Lösung III für je 15 min bei 37°C gewaschen, worauf die Färbereaktion mit BCIP/NBT und somit der spezifische Nachweis Antikörper-markierter Proteine folgte. Zum Abstoppen der Färbereaktion wurde die Membran in Lösung IV gewaschen.

Lösung I: 100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 3 % BSA, 0,9% NaCl

Lösung II: 100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,3 % BSA, 0,9 % NaCl, 0,1 % Tween 20

Lösung III: 100 mM Tris-HCl, pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂

Lösung IV (pro 1 l): 2,45 g EDTA, 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,24 g KH₂PO₄, 1,81 g Na₂HPO₄

III. Ergebnisse

1. Etablierung eines Testsystems zur Isolierung des Gens für den Lysinexportcarrier

1.1 Der Methionineffekt zur Steuerung der Lysinexkretion von *C. glutamicum*

Der Wildtyp von *Corynebacterium glutamicum* exkretiert bei Kultivierung auf Mineralsalzmedium kein L-Lysin. Um eine im Lysinexport defekte Mutante zu isolieren, mußte also zunächst ein System etabliert werden, das zur Lysinexkretion von *C. glutamicum* führt. Überraschenderweise wurde bei Untersuchungen zur Steuerung der Aspartatkinase-Aktivität durch zellinterne Threoninlimitation festgestellt, daß der *C. glutamicum* Wildtyp dann Lysin exkretierte, wenn L-Methionin im Kulturmedium vorlag. In Kulturen ohne Methioninzusatz lag die extrazelluläre Lysinkonzentration in der exponentiellen Wachstumsphase unter 0,06 mM, und in der stationären Wachstumsphase unter 0,3 mM. Dagegen führte der Zusatz von 5 mM L-Methionin ins Kulturmedium zu einer etwa zwanzigfachen Steigerung des extrazellulären Lysins auf 1,5 mM in der exponentiellen und 3 - 5 mM in der stationären Wachstumsphase (Abb. 2). Auch zellintern wurden nach Methioninzusatz erhöhte Lysinkonzentrationen gemessen. Dann akkumulierte *C. glutamicum* bis zu 70 mM L-Lysin, während in der Kultur ohne Methionin maximal 40 mM L-Lysin intrazellulär vorhanden war. Auffällig war eine erniedrigte Wachstumsrate für *C. glutamicum* von $0,37\text{ h}^{-1}$ bei Methioninzusatz im Vergleich zu $0,40\text{ h}^{-1}$ ohne Methioninzusatz. Neben dem Wildtyp wurde auch der *C. glutamicum* Stamm R127 auf diesen Methionineffekt geprüft. *C. glutamicum* R127 ist restriktionsdefekt und besitzt eine hohe Transformationseffizienz für homologe und heterologe DNA (Liebl *et al.*, 1989). Exportdefekte Mutanten dieses Stammes würden sich daher besonders für zukünftige Klonierungsexperimente eignen. Wie aus der Tabelle 3 hervorgeht, führte Methionin auch in *C. glutamicum* R127 zur Steigerung von intrazellulären und extrazellulären Lysinkonzentrationen. Maximal sechsfach erhöhte externe Lysinkonzentrationen lagen für *C. glutamicum* R127 nach Methioninzusatz im Vergleich zur Kultivierung ohne Methionin vor.

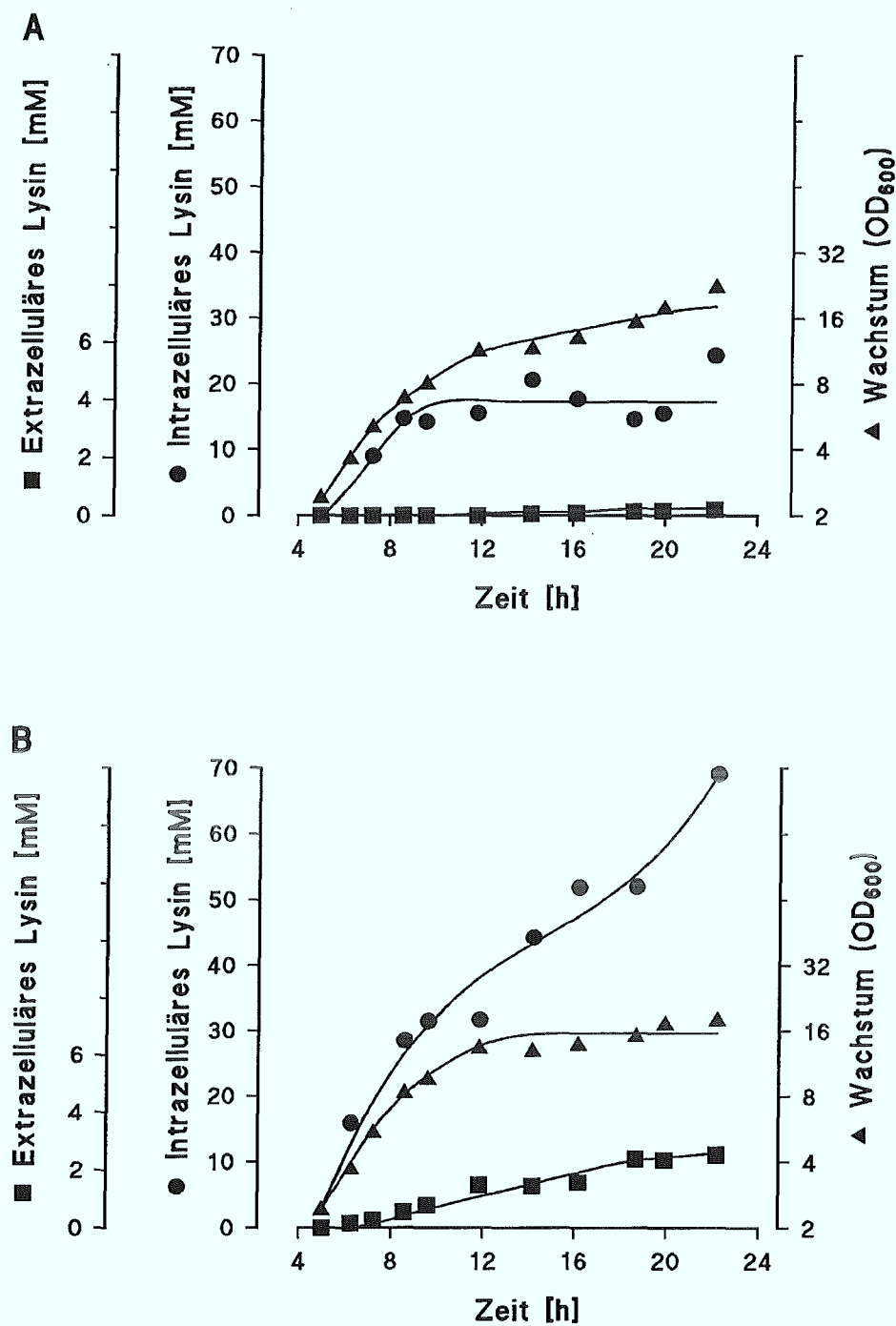


Abb. 2: Intrazelluläre und extrazelluläre L-Lysinkonzentrationen bei Kultivierung von *C. glutamicum* ATCC13032 auf CGXII-Minimalmedium (A) ohne und (B) mit Zusatz von 5 mM L-Methionin.

Tab. 3: Intrazelluläre und extrazelluläre L-Lysinkonzentrationen und Lysin-Exkretionsraten von *C. glutamicum* in Abhängigkeit von L-Methionin (5 mM) im Nährmedium.

<i>C. glutamicum</i>	Methionin-Zusatz	Wachstumsphase	Lysin-Konz. ^a [mM]		Exkretionsrate [nmol mg ⁻¹ min ⁻¹]
			intrazellulär	extrazellulär	
ATCC13032	+	exp. ^b	15-30	1,5	1,5
	+	stat. ^c	40-70	3-5	0,5
	-	exp.	10-15	<0,06	nb ^d
	-	stat.	15-25	<0,3	nb
R127	+	exp.	30-40	1-3	2,5
	-	exp.	20	0,5	nb

^a Lysinkonzentration

^b exponentiell

^c stationär

^d nicht bestimmt

Zur Analyse der Methionin-abhängigen Lysinexkretion wurde die Spezifität des Effektes geprüft. Methioninzusatz hatte keine erhöhte Exkretion anderer Aminosäuren zur Folge. Valin, Prolin, Arginin, Tryptophan und Cystein als Vertreter der anderen Aminosäure-Familien führten nicht zu einer gesteigerten Lysinbildung. Die einzige Aminosäure, die neben Methionin einen Effekt auf die Lysinproduktion hatte, war Isoleucin. Durch Zusatz von 5 mM L-Isoleucin zu Kulturen des Wildtypes von *C. glutamicum* konnte eine Steigerung der extrazellulären Lysinkonzentrationen um den Faktor 3 auf 0,15 mM L-Lysin erreicht werden. Methionin, und in geringerem Maß auch Isoleucin, beeinflussten also spezifisch die Lysinproduktion. In *C. glutamicum* wird kein Enzym der Lysinbiosynthese durch Methionin und Isoleucin reguliert (Cremer *et al.*, 1988). Mit der Homoserindehydrogenase existiert jedoch ein Enzym, das mit dem Lysinbiosynthese-Enzym Dihydrodipicolinatsynthase um das gemeinsame Substrat Aspartatsemialdehyd konkurriert, und das durch Methionin (Follettie *et al.*, 1988) und Isoleucin (Miyajima *et al.*, 1968) reguliert wird. Eine verminderte Homoserindehydrogenase-Aktivität würde zur herabgesetzten Bildung der sich von Homoserin ableitenden Aminosäuren Threonin, Isoleucin und Methionin führen. Dies würde die reduzierte Wachstumsrate von *C. glutamicum* in Nährmedium mit Methionin-Zusatz erklären. Wie aus der Tabelle 4 hervorgeht, führte der Zusatz von Methionin sowohl in *C. glutamicum* ATCC13032 als

auch in *C. glutamicum* R127 zu einer Herabsetzung der spezifischen Homoserindehydrogenase-Aktivitäten auf nur noch 30% im Vergleich zur Kultivierung ohne Methionin. Zusätzlich zeigten sich stammspezifische Unterschiede. Für *C. glutamicum* R127 lag immer eine um 50% reduzierte Homoserindehydrogenase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp vor, die auf die Mutagenese, die R127 zur Stammentwicklung durchlaufen hat, zurückzuführen sein muß. Die Bestimmung der zellinternen Threoninkonzentrationen ergab 6 - 9 mM für den Wildtyp ohne Methioninzusatz, und nur noch 0,5 - 2 mM nach Methioninzusatz zum Nährmedium. In *C. glutamicum* waren die intrazellulären Threoninkonzentrationen schon ohne Methioninzusatz reduziert im Vergleich zum Wildtyp. Die Kultivierung von R127 mit Methionin im Nährmedium führte zu einer weiteren Abnahme des zellinternen Threoningehaltes.

Tab. 4: Homoserindehydrogenase-Aktivitäten und zellinterne Threoninkonzentrationen für zwei *C. glutamicum* Stämme nach Kultivierung auf CGXII-Minimalmedium ohne oder mit Methioninzusatz. Die spezifische Enzymaktivität ist in $\mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ angegeben.

<i>C. glutamicum</i>	Methionin- Zusatz (5 mM)	Homoserin- dehydrogenase- Aktivität	zellinternes Threonin [mM]
ATCC13032	-	1,23	6-9
	+	0,32	0,5-2
R127	-	0,59	3-6
	+	0,16	0,5-1

Diese Ergebnisse zeigen, daß der Zusatz von Methionin zum Kulturmedium zu einer Repression der Homoserindehydrogenase führt, was herabgesetzte Threoninkonzentrationen zur Folge hat. Die beobachtete Verzögerung des Wachstums von *Corynebacterium glutamicum* nach Methioninzusatz ist direkt auf die herabgesetzten Threoninkonzentrationen zurückzuführen. Durch Zusatz von Threonin zu Kulturen, die in Methionin-haltigem Medium wuchsen, ließ sich die Wachstumsverzögerung aufheben. Die Aminosäure Threonin ist ein allosterischer Effektor des ersten Enzyms der Lysinbiosynthese, der Aspartatkinase (Shiio & Miyajima, 1969). Daher ist zu folgern, daß

die verringerte Threoninkonzentration zu einer verringerten allosterischen Hemmung der Aspartatkinase führt, und in einer gesteigerten Lysinbildung mit anschließender Exkretion von Lysin resultiert. Für *C. glutamicum* Stämme mit einer konstitutiv deregulierten Aspartatkinase wurde eine gesteigerte Lysinproduktion bereits nachgewiesen (Cremer *et al.*, 1991, Schruppf *et al.*, 1992).

Der Zusatz von Methionin führte auch auf Festmedium zur Induktion der Lysinexkretion von *C. glutamicum*. Auf Mineralsalz-Festmedium mit 5 mM L-Methionin exkretierten *C. glutamicum* ATCC13032 und R127 Lysin, was durch den Wachstumshof des ins Medium eingesäten, lysinauxotrophen Indikatorstammes *C. glutamicum* 49/3 angezeigt wurde. Mit diesem auxanographischen Plattentest war ein einfaches biologisches System etabliert, um Mutanten von *C. glutamicum* auf Verlust der Lysinexkretion untersuchen zu können.

1.2 Isolierung und Charakterisierung der Lysinexport-defekten Mutante

C. glutamicum NA8

Der Methionineffekt wurde genutzt, um ausgehend vom restriktionsnegativen *C. glutamicum* Stamm R127 eine im Lysinexport defekte Mutante zu isolieren. Da die Größe des durch den Indikatorstamm gebildeten Wachstumshofes abhängig ist von der Größe der zu testenden Kolonie, wurden die nach NNG-Mutagenese erhaltenen Kolonien (12000) einzeln auf Indikatorplatten mit bzw. ohne L-Methioninzusatz gepickt. 108 Kolonien, die keine Kreuzfütterung des lysinauxotrophen Indikatorstammes zeigten, wurden isoliert. In einem zweiten Plattentest konnte der Phänotyp der deutlich reduzierten Lysinexkretion für elf Kolonien bestätigt werden. Um zu unterscheiden, ob die fehlende bzw. stark reduzierte Lysinexkretion dieser elf Mutanten auf eine herabgesetzte Lysinbiosynthese oder auf den gewünschten Lysinexport-Defekt zurückzuführen war, wurden Flüssigkultivierungen zur Quantifizierung der Lysinkonzentrationen durchgeführt. Für zehn der analysierten Mutanten wurden deutlich reduzierte zellinterne Lysinkonzentrationen festgestellt. In diesen Stämmen war also der herabgesetzte Lysinexport nur auf eine verringerte Lysinbiosynthese zurückzuführen. Für die Mutante *C. glutamicum* NA8 ergab sich jedoch ein anderes Bild. Sie zeigte mit 174 mM L-Lysin bei Methioninzusatz bzw. 62 mM ohne Methioninzusatz immer stark erhöhte zellinterne Lysinkonzentrationen im Vergleich zum Ausgangsstamm R127. Dagegen lagen die extrazellulären Lysinkonzentrationen stets unter 1 mM, und damit unterhalb der

Konzentrationen, die durch den Ausgangsstamm schon ohne Methioninzusatz exkretiert wurden. Damit zeigte *C. glutamicum* NA8 den für einen Lysinexport-defekten Stamm erwarteten Phänotyp.

Tab. 5: Zellinterne und extrazelluläre Lysinkonzentrationen für drei Mutanten, die als Kolonien mit verringerter Lysinexkretion aus dem Plattentest isoliert wurden. Zum Vergleich sind die Lysinkonzentrationen des Ausgangsstammes *C. glutamicum* R127 mit aufgeführt.

<i>C. glutamicum</i>	Methioninzusatz (5 mM)	Wachstum OD ₆₀₀	Lysinkonz. ^a [mM]	
			intrazellulär	extrazellulär
R127	+	29	53	5,9
	-	34	22	1,0
NA7	+	17	14	1,3
	-	20	7	0,2
NA8	+	28	174	0,7
	-	22	62	0,1
NA9	+	16	23	0,6
	-	20	8	<0,1

^a Lysinkonzentration

Für eine detaillierte Charakterisierung der Mutante NA8 wurde der zeitliche Verlauf zellinterner und externer Lysinmengen vergleichend zu *C. glutamicum* R127 untersucht (Abb. 3). In den ersten 17 Kultivierungsstunden wurde durch *C. glutamicum* NA8 auch bei Methioninzusatz kein L-Lysin exkretiert, während der Ausgangsstamm R127 bis zu 3 mM L-Lysin exkretierte. Im weiteren Kultivierungsverlauf konnten für *C. glutamicum* NA8 nur maximal 0,5 mM L-Lysin im Medium nachgewiesen werden, wobei die Lysin-Exkretionsrate unterhalb von 0,1 nmol min⁻¹ (mg Zell-Trockengewicht)⁻¹ lag. Durch den Ausgangsstamm *C. glutamicum* R127 wurde hingegen bis 8 mM L-Lysin exkretiert; die maximale Exkretionsrate betrug 2,5 nmol min⁻¹ (mg Zell-Trockengewicht)⁻¹. Überraschend war der zeitliche Verlauf der zellinternen Lysinkonzentrationen, der für *C. glutamicum* R127 und NA8 identisch war, nur daß die Lysinkonzentration in der Mutante NA8 um mindestens den Faktor 2 erhöht war. Zum Ende der Kultivierung war stets ein deutlicher

Abfall der intrazellulären Lysinkonzentrationen zu beobachten. Berechnungen ergaben, daß in *C. glutamicum* NA8 in der stationären Wachstumsphase der Lysinbedarf für die Zellsynthese aus dem intrazellulären Lysinpool und nicht durch Neusynthese von Lysin gedeckt wurde. Dabei wurde nach Marx *et al.*, 1996 für *C. glutamicum* ein intrazellulärer Lysingehalt von $191 \mu\text{mol (g Zell-Trockengewicht)}^{-1}$ zu Grunde gelegt.

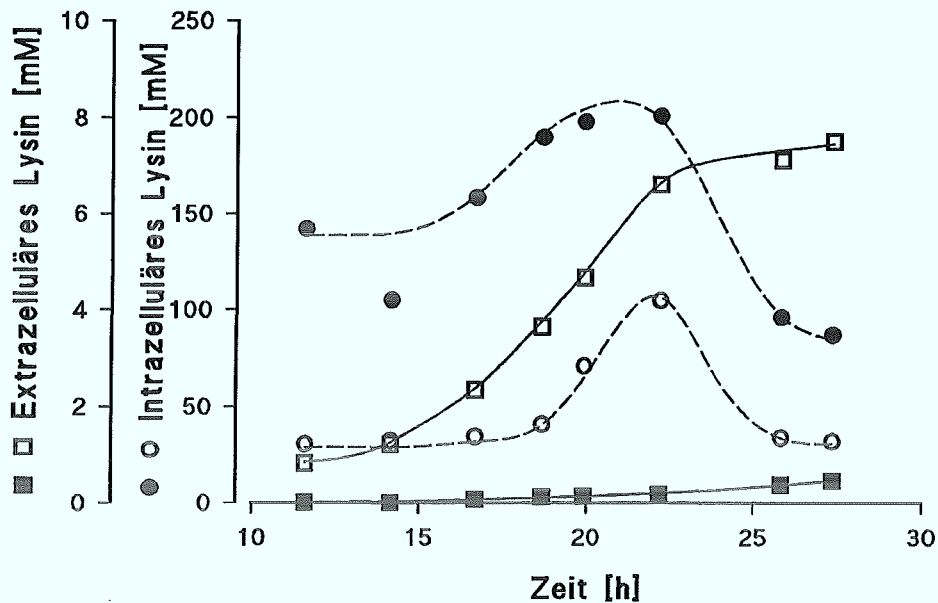


Abb. 3: Intrazelluläre und extrazelluläre Lysinkonzentrationen der Lysinexport-defekten Mutante *C. glutamicum* NA8 (geschlossene Symbole) und des Ausgangsstammes *C. glutamicum* R127 (offene Symbole) nach Methioninzusatz. ●,○ intrazelluläres Lysin; ■,□ extrazelluläres Lysin.

Um zu beweisen, daß die Mutante NA8 spezifisch im Lysinexport defekt ist, war zu zeigen, daß der carriervermittelte Transport anderer Aminosäuren unverändert war. Dazu wurde die Exkretion der Aminosäuren Isoleucin und Glutamat vergleichend für *C. glutamicum* NA8 und R127 gemessen. Die Induktion der Isoleucinexkretion in *C. glutamicum* wird experimentell durch den Zusatz von 2-Ketobutytrat zum Minimalmedium erreicht (Ebbighausen *et al.* 1989). Dabei kommt es nach Aufnahme von 2-Ketobutytrat zu einer Umsetzung dieser Vorstufe zu Isoleucin, das zellintern akkumuliert und exkretiert

wird. Nach Ketobutyrat-Zugabe wurde für *C. glutamicum* NA8 und R127 ein sofortiger Anstieg der Isoleucinekkretion beobachtet (Abb. 4). Über den gesamten Kultivierungsverlauf wurden für beide Stämme nahezu identische zellinterne und extrazelluläre Isoleucinkonzentrationen gemessen. Ebenso ergab die Bestimmung von Isoleucin-Exkretionsraten vergleichbare Werte von $2,6 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Zell-Trockengewicht})^{-1}$ für *C. glutamicum* R127 und $2,8 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Zell-Trockengewicht})^{-1}$ für die Lysinexportdefekte Mutante NA8.

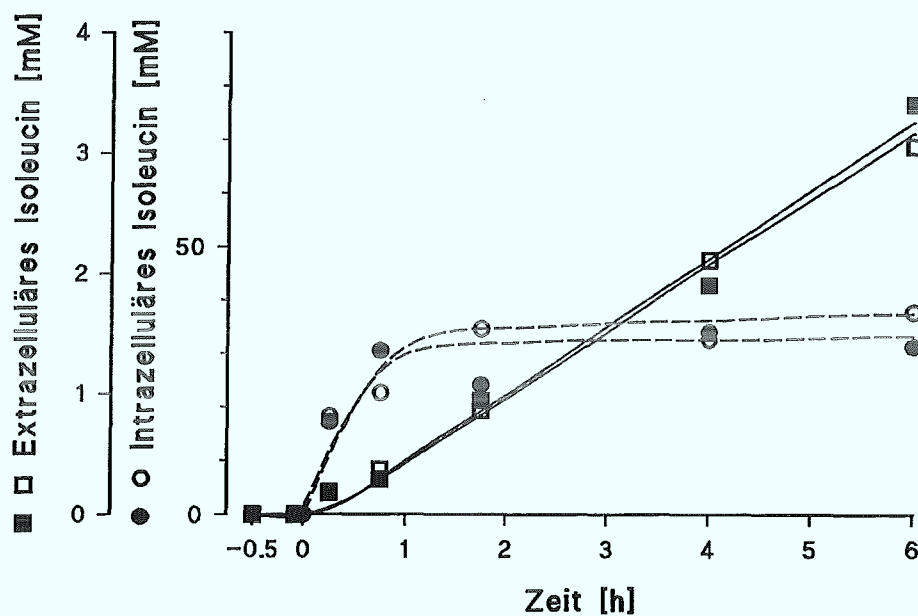


Abb. 4: L-Isoleucineexport in der Lysinexport-defekten Mutante *C. glutamicum* NA8 und dem Ausgangsstamm R127. 2-Ketobutyrat-Zusatz erfolgte zum Zeitpunkt $t=0$. Geschlossene Symbole, *C. glutamicum* NA8, offene Symbole, *C. glutamicum* R127. ●,○ zellinternes Isoleucin; ■,□ extrazelluläres Isoleucin.

Zur Exkretion von Glutamat durch *Corynebacterium glutamicum* ist eine zellinterne Akkumulation dieser Aminosäure nicht ausreichend. Eine Limitation im Baustoffwechsel bei gleichzeitig ausreichender Versorgung mit Kohlen- und Stickstoffquelle und eine reversible Membranveränderung sind die für eine effektive Glutamatexkretion notwendigen Voraussetzungen (Gutmann *et al.*, 1992). Diese Bedingungen können z.B.

durch die Kultivierung des biotinauxotrophen Bakteriums *C. glutamicum* unter biotinlimitierenden Bedingungen ($1 \mu\text{g l}^{-1}$ Biotin) erreicht werden (Shiio *et al.*, 1962). Die Abbildung 5 zeigt die extrazelluläre Akkumulation von Glutamat durch beide Stämme auf 15-23 mM. Die Unterschiede der extrazellulären Glutamatkonzentrationen im zeitlichen Verlauf spiegeln die Wachstumsunterschiede beider Stämme wider. Die zellinternen Glutamatkonzentrationen beider Stämme waren nahezu identisch und über den Kultivierungszeitraum konstant.

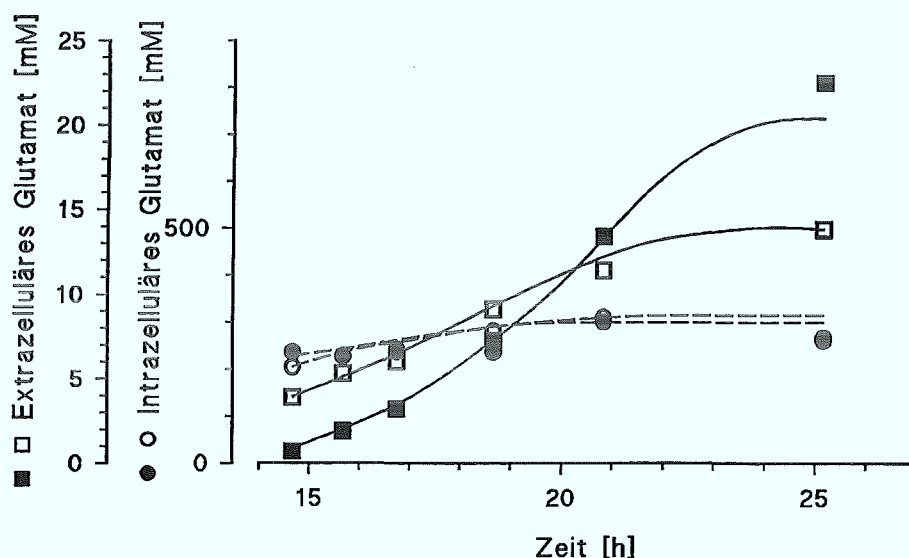


Abb. 5: L-Glutamatexport und zellinterne Glutamatkonzentrationen in der Lysinexportdefekten Mutante *C. glutamicum* NA8 und dem Ausgangsstamm R127. Geschlossene Symbole, *C. glutamicum* NA8, offene Symbole, *C. glutamicum* R127. ●,○ zellinternes Glutamat; ■,□ extrazelluläres Glutamat.

Das Membranpotential ist eine treibende Kraft für den Lysinexport-Prozeß bei *C. glutamicum* (Bröer & Krämer, 1991b). Es konnte gezeigt werden, daß eine Herabsetzung des Membranpotentials durch Inhibitoren direkt mit einer Herabsetzung des Lysinexportes korreliert (Bröer & Krämer, 1991b). Damit stellte sich die Frage, ob in der Lysinexportdefekten Mutante NA8 der Verlust des Lysinexportes nur auf einer Erniedrigung des

Membranpotentials beruht. Die Messung des Membranpotentials unter Nutzung der radioaktiven Sonde Tetraphenylphosphoniumbromid (TPP^+) (Rottenberg, 1979, Kashket, 1985) ergab Werte von -156 mV für *C. glutamicum* NA8 und -149 mV für *C. glutamicum* R127. Dieses Ergebnis belegt, daß der Verlust der Lysinexkretion in der Mutante NA8 nicht auf eine Veränderung des Membranpotentials zurückzuführen ist.

Abschließend wurde geprüft, ob *C. glutamicum* NA8 in der Lysinaufnahme unverändert ist, da eine Inversion des Aminosäure-Aufnahmeprozesses als eine Möglichkeit zur Aminosäure-Exkretion diskutiert wurde (Clement *et al.*, 1984). Für *C. glutamicum* NA8 wurde eine maximale Lysin-Aufnahmerate von $0,42 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Zell-Trockengewicht})^{-1}$, für *C. glutamicum* R127 von $0,35 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Zell-Trockengewicht})^{-1}$ bestimmt. Dieses Experiment zeigt, daß *C. glutamicum* NA8 bei Verlust des Exportes von Lysin diese Aminosäure noch aufnehmen kann. Es ist also ein Beleg für die getrennte Existenz von Lysinaufnahme- und Exportcarrier in *Corynebacterium glutamicum*. Alle Ergebnisse unterstreichen, daß mit *C. glutamicum* NA8 eine spezifisch im Lysinexport defekte Mutante isoliert wurde. *C. glutamicum* NA8 ist bezüglich anderer Aminosäure-Transportcharakteristika unverändert zum Ausgangsstamm und eignet sich daher für Komplementationsexperimente zur Isolierung am Lysinexport beteiligter Gene.

2. Klonierung und Sequenzierung des Gens für den Lysinexportcarrier

2.1 Etablierung einer Genbank und Klonierung eines DNA-Fragmentes, das den Lysinexport-Defekt von *C. glutamicum* NA8 komplementiert

Die meisten Gene von *Corynebacterium glutamicum* wurden bisher durch heterologe Komplementation von *Escherichia coli* kloniert (Jetten & Sinskey, 1995). Zur Komplementation wurden in *E. coli* erstellte Genbanken von Vektoren mit hoher Kopienzahl eingesetzt. Um die Klonierung des Gens für den Lysinexportcarrier zu ermöglichen, wurde jedoch eine Genbank in einem Vektor mit moderater Kopienzahl aufgebaut, da Membranproteine nach Überexpression des kodierenden Gens toxisch sein können (Hennig *et al.*, 1978, 1979; Beck & Bremer, 1980). Überdies hatte sich in Vorversuchen gezeigt, daß *E. coli* bestimmte DNA-Fragmente aus *C. glutamicum* nicht

akzeptiert und somit als Zwischenwirt nicht geeignet war. Es mußte also eine homologe Genbank direkt in der Lysinexport-defekten Mutante *C. glutamicum* NA8 aufgebaut werden. Deshalb war es notwendig, hohe Transformationsraten von *C. glutamicum* zu erreichen.

Um Zellen von *C. glutamicum* NA8 mit möglichst hoher Kompetenz zur DNA-Aufnahme zu erhalten, wurden Untersuchungen zur Maximierung des Anteils kompetenter NA8-Zellen durchgeführt. Dabei ergab sich eine Zunahme des Anteils kompetenter Zellen um jeweils den Faktor 10, wenn die Zellen auf Vollmedium (VM), VM + Glycin, VM + Glycin + Tween 80, bzw. auf VM + Glycin + Tween 80 + Isonicotinsäurehydrazid angezogen wurden. Der maximale Anteil kompetenter Zellen konnte so bei Anzucht unter Zusatz aller drei Wachstumsinhibitoren mit 0,1 % bestimmt werden; in der Literatur finden sich Werte von 0,01 % bis 10 % kompetenter *E. coli* Zellen pro Transformationsansatz (Hanahan, 1985).

Chromosomale DNA des Ausgangsstammes R127 wurde isoliert, partiell *Sau3A* geschnitten, und dann größenfraktioniert. Dazu wurde eine Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt (Abb. 6). Fraktionen mit DNA-Fragmenten der Größe von 5 -10 kb wurden mittels Dialyse gegen TE-Puffer aufgereinigt, und zur Ligation eingesetzt.

Zur Erstellung der corynebakteriellen Genbank wurde zunächst der Vektor pKW3 genutzt, der mit ca. 5 Kopien/Zelle repliziert und mit dem die Klonierung der Gene des Bindeprotein-abhängigen Glutamataufnahmesystems von *C. glutamicum* gelungen war (Kronemeyer *et al.*, 1995). Die aufgereinigten chromosomalen DNA-Fragmente wurden in den durch *Bam*HI-Verdau linearisierten und durch alkalische Phosphatasebehandlung dephosphorylierten Vektor pKW3 ligiert. Dann wurde *C. glutamicum* NA8 mittels Elektroporation mit den aufkonzentrierten Ligationsansätzen transformiert. Umfangreiche Analysen Kanamycin-resistenter Transformanden ergaben aber, daß nur 15% der Transformanden ein chromosomales DNA-Insert im Vektor pKW3 enthielten. Zudem wurden veränderte Fragmentmuster des Vektors festgestellt, was möglicherweise mit der Lage der singulären Klonierungsstelle *Bam*HI direkt stromaufwärts vom Kanamycin-resistenz-Gen zusammenhängt.

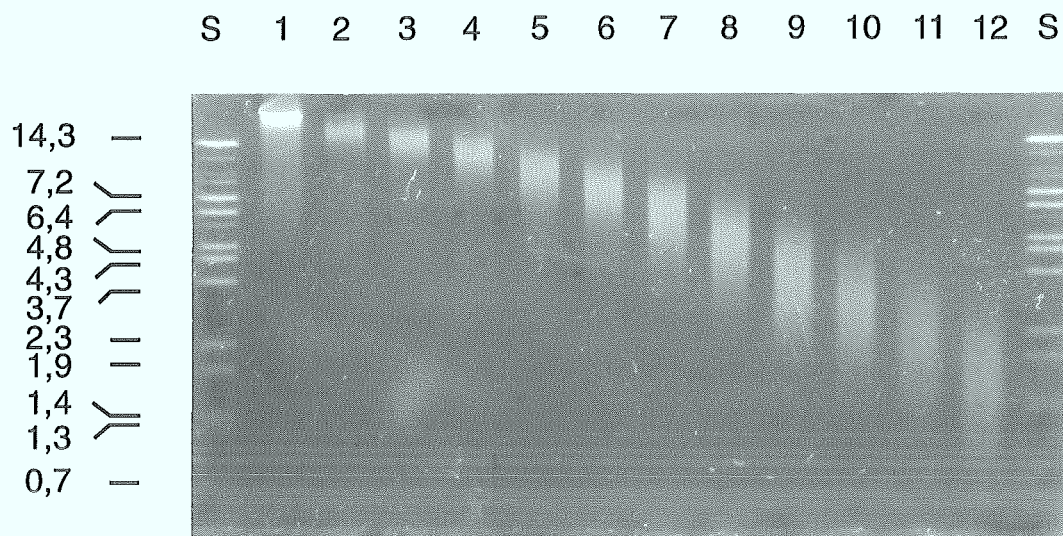


Abb. 6: Ergebnis der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation zur Größenfraktionierung *Sau3A* gespaltener chromosomaler DNA von *C. glutamicum* R127. In den Spuren 1-12 des Agarosegels ist die DNA der einzelnen Fraktionen aufgetrennt. S steht für den Molekulargewichtsstandard (λ DNA-Fragmente von 14,3 kb bis 0,7 kb).

Daher war der Vektor pKW3 zur Erstellung einer vollständigen Genbank ungeeignet, und die Arbeiten wurden mit dem Vektor pFB-2.7p (Sonnen, 1991), der ebenfalls mit nur 5 Kopien/Zelle in *Corynebacterium glutamicum* repliziert, fortgesetzt. Dieser Vektor trägt keine *Bam*HI-Schnittstelle, daher wurde für eine erste Überprüfung der besseren Eignung des Vektors partiell *Eco*RI gespaltene chromosomale DNA in den durch *Eco*RI-Verdau linearisierten und dephosphorylierten Vektor ligiert. Bei ersten Versuchen wurden 500 kanamycinresistente Transformanten der Mutante NA8 erhalten. Durch Plasmidanalysen konnte ein Anteil rekombinanter Vektoren von mindestens 30% nachgewiesen werden. Restriktionen und veränderte Fragmentmuster wurden nicht beobachtet. Deswegen wurde im folgenden eine *Bam*HI-Schnittstelle in diesen Vektor inseriert, um die mit dem Restriktionsenzym *Sau3A* generierten Fragmente ligieren zu können. Zur Integration

dieser *Bam*HI-Schnittstelle wurde ein *Pvu*II-*Eco*RI-Fragment aus dem Plasmid pUC19 in den mit *Sma*I und *Eco*RI geschnittenen Vektor pFB-2.7p ligiert. Mit dem resultierenden Vektor pFB-Bam wurde dann eine Genbank direkt in *C. glutamicum* NA8 aufgebaut. Parallel wurde auch der Vektor pJC1, der eine moderate Kopienzahl von ca. 50 Kopien/Zelle besitzt, zum Aufbau einer Genbank eingesetzt. Insgesamt wurden aus den Arbeiten mit dem Vektor pFB-Bam 5000 Transformanden, mit dem Vektor pJC1 4500 Transformanden erhalten (Tab. 6). In umfangreichen Plasmidanalysen wurden die Transformanden stichprobenartig auf den Anteil und die Größe chromosomaler DNA-Fragmente überprüft. Dann wurden die Kolonien einzeln mit ähnlichen Zellmengen, um eine Vergleichbarkeit der durch den Indikatorstamm gebildeten Wachstumshöfe zu gewährleisten, auf Indikatorplatten mit Zusatz von 5 mM L-Methionin übertragen. Als Positivkontrolle diente *C. glutamicum* R127, als Negativkontrolle die Mutante NA8. Insgesamt wurden 29 Klone mit rekombinanten pJC1-Vektoren und 20 Klone mit rekombinanten pFB-Bam-Vektoren isoliert, um die durch den Indikatorstamm Wachstumshöfe veränderter Größen gebildet wurde. Diese Stämme wurden in einem zweiten Test erneut auf die Lysinexkretion überprüft. So konnten drei Klone isoliert werden, die einen von *C. glutamicum* NA8 abweichenden Phänotyp der Lysinexkretion zeigten.

Tab. 6: Erstellung einer Genbank in der Lysinexport-defekten Mutante NA8.

	Vektor pJC1	Vektor pFB-Bam
Gesamtzahl getesteter Klone	4500	5000
durchschnittlicher Insertanteil	50 %	40%
durchschnittliche Insertgröße	8 kb	5 kb
Wahrscheinlichkeit P ^a	0,99	0,96
Klone mit verstärkter Lysinexkretion	2	0
Klone mit Verlust der Lysinexkretion	1	0

^a Wahrscheinlichkeit für die Präsenz eines bestimmten Gens in der Genbank (Clarke & Carbon, 1976)

Um zwei Klone, *C. glutamicum* NA8-6-3 und *C. glutamicum* NA8-8-524, wurde durch den lysinauxotrophen Indikatorstamm ein ebenso großer Wachstumshof gebildet wie um die

Positivkontrolle *C. glutamicum* R127 (Abb. 7). Damit schienen diese Klone komplementierende Informationen für den Lysinexport-Defekt der Mutante *C. glutamicum* NA8 zu tragen. Zusätzlich wurde mit dem Klon *C. glutamicum* NA8-7-1 ein Stamm isoliert, der überhaupt kein Lysin mehr exkretierte. Während um die Mutante NA8 nach 72-stündiger Inkubation auf methioninhaltigen Indikatorplatten eine geringe Hofbildung durch den Indikatorstamm zu beobachten war, fehlte diese Hofbildung beim Stamm NA8-7-1 völlig. Zur Prüfung, ob die beschriebenen Phänotypen auch tatsächlich auf plasmidkodierte Informationen zurückgeführt werden konnten, wurden Retransformations- und Kurierungsexperimente durchgeführt. Die Retransformation der rekombinanten Plasmide nach *C. glutamicum* NA8 führte wiederum zu verstärkter bzw. im Fall von pMV7-1 zu völlig fehlender Hofbildung. Entsprechend wurde nach Plasmidverlust der Phänotyp des Ausgangsstammes NA8 beobachtet.

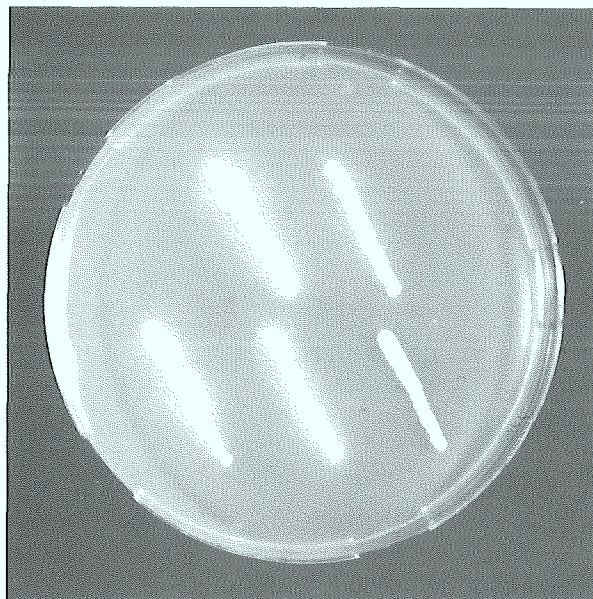


Abb. 7: Untersuchung der Lysinexkretion von *C. glutamicum* im auxanographischen Plattentest zur Isolierung von *C. glutamicum* NA8 Stämmen, in denen der Lysinexport-Defekt komplementiert wurde. *C. glutamicum* R127 (oben links), Lysinexport-defekte Mutante NA8 (oben rechts) und die aus dem Komplementationstest isolierten *C. glutamicum* Stämme NA8-6-3 (unten links), NA8-8-524 (unten Mitte) und NA8-7-1 (unten rechts).

Um Aufschluß über die plasmidkodierte Informationen zu bekommen, die zum vollständigen Verlust der Lysinexkretion in *C. glutamicum* NA8 führten, wurden die zellinternen und externen Lysinkonzentrationen von *C. glutamicum* NA8 pMV7-1 gemessen. Während der Referenzstamm *C. glutamicum* NA8 bei einer geringen externen Lysinkonzentration von 0,1 mM bis zu 150 mM Lysin intrazellulär akkumulierte, waren im Stamm NA8 pMV7-1 zellintern nur noch 20 mM Lysin vorhanden. Die extrazelluläre Lysinkonzentration lag unterhalb der Nachweisgrenze von 0,1 mM. Dieser Phänotyp könnte mit der Klonierung eines Gens erklärt werden, dessen Produkt die Lysinbildung in *C. glutamicum* beeinflusst. Denkbar wäre die Klonierung des Gens für die Homoserindehydrogenase. Durch eine gesteigerte Homoserindehydrogenase-Aktivität bei Überexpression des kodierenden Gens könnte die Umsetzung von Aspartatsemialdehyd zu Dihydrodipicolinat und als Folge die Bildung von Lysin deutlich herabgesetzt werden. Tatsächlich war mit dem Plasmid pMV7-1 die Komplementation des Homoserindehydrogenase negativen Stammes *C. glutamicum* ATCC13287*hom* möglich. Für *C. glutamicum* ATCC13287 pMV7-1 konnten zehnfach erhöhte spezifische Homoserindehydrogenase-Aktivitäten im Vergleich zum *C. glutamicum* Wildtyp nachgewiesen werden (Tab. 7). Eine Restriktionsfragment-Überprüfung zeigte außerdem, daß auf dem Plasmid pMV7-1 ein 3,7 kb *Sall*-Fragment vorhanden ist, welches das *hom-thrB*-Operon trägt (Follettie *et al.*, 1988). Damit ist neben dem Gen für die Homoserindehydrogenase auch das Gen des Folgeenzym, der Homoserinkinase, auf dem Plasmid pMV7-1 vorhanden, und die Überexpression dieses *hom-thrB*-Operons (Follettie *et al.*, 1988) hebt die Methionin-bedingte Steigerung der Lysinbildung auf.

Tab. 7: Spezifische Homoserindehydrogenase-Aktivitäten für die Homoserin-auxotrophe Mutante *C. glutamicum* ATCC13287*hom* ohne und mit dem Plasmid pMV7-1, das den auxotrophen Phänotyp der Mutante ATCC13287*hom* komplementiert. Zum Vergleich ist die spezifische Homoserindehydrogenase-Aktivität des *C. glutamicum* Wildtypes aufgeführt.

Stamm	spez. Homoserin-DH-Aktivität [$\mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$]
ATCC13287 <i>hom</i>	<0,01
ATCC13287pMV7-1	3,80
ATCC13032	0,39

Die zwei aus dem Komplementationstest isolierten *C. glutamicum* Stämme NA8-6-3 und NA8-8-524, um die im Plattentest Wachstumshöfe des lysinauxotrophen Indikatorstammes gebildet wurden, exkretierten bei Flüssigkultivierung 1,3 mM bzw. 1,6 mM L-Lysin. *C. glutamicum* R127 exkretierte unter den gleichen Kultivierungsbedingungen (18 Stunden in CGXII-Minimalmedium bei Methioninzusatz) 2,1 mM L-Lysin, die Lysinexport-defekte Mutante *C. glutamicum* NA8 0,2 mM L-Lysin. Damit bestätigte die Flüssigkultivierung der isolierten *C. glutamicum* Stämme das Bild des auxanographischen Plattentestes. Zusammen mit dem positiven Ergebnis der Retransformation bedeutete dies, daß nun zwei rekombinante Plasmide mit chromosomalen DNA-Fragmenten von 8,3 kb (pMV8-3) bzw. 10 kb (pMV10) vorlagen, die am Lysinexport von *Corynebacterium glutamicum* beteiligte Informationen trugen.

Zur Charakterisierung des komplementierenden Bereiches wurden Restriktionskarten für die chromosomalen DNA-Fragmente der Vektoren pMV10 und pMV8-3 erstellt (vgl. Abb. 8). Dabei zeigte sich, daß das chromosomale DNA-Fragment des Vektors pMV8-3 mit dem größten Teil des chromosomalen DNA-Fragmentes des Vektors pMV10 übereinstimmte. Um den zur Komplementation von *C. glutamicum* NA8 notwendigen DNA-Bereich einzugrenzen, erfolgte eine Subklonierung des chromosomalen DNA-Fragmentes von pMV10. Über einen partiellen *Bam*HI-Verdau wurde das 2,4 kb *Bam*HI-Fragment bzw. das 7,2 kb *Bam*HI-Fragment aus dem Vektor pMV10 entfernt, die resultierenden Vektoren religiert, und damit *C. glutamicum* NA8 transformiert. Als weiterer Subklon wurde *C. glutamicum* NA8 pMV3-7 mit einem 3,7 kb *Sal*I-*Xho*I-Fragment im Plasmid pJC1 eingesetzt. Während sich im Plattentest um *C. glutamicum* NA8 pMV7-2*Bam* und NA8 pMV3-7 keine Wachstumshöfe zeigten, war um *C. glutamicum* NA8 pJC*lysEG*2,4 ein deutlicher Wachstumshof sichtbar. Eine quantitative Analyse intra- und extrazellulärer Lysinkonzentrationen ergab übereinstimmende Werte für *C. glutamicum* NA8 pJC*lysEG*2,4 und den das Ausgangsplasmid tragenden Stamm *C. glutamicum* NA8 pMV10. Hierdurch wurde bestätigt, daß die zur Komplementation des Lysinexport-Defektes von *C. glutamicum* NA8 benötigte Information auf dem 2,4 kb *Bam*HI-Fragment vorhanden ist.

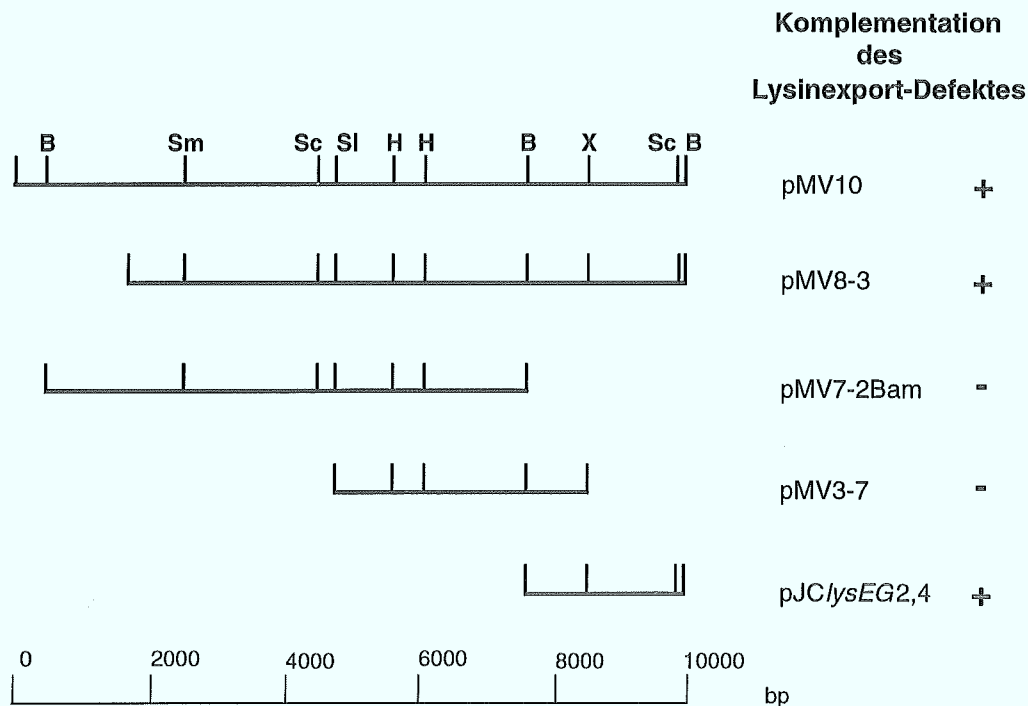


Abb. 8: Restriktionskarte der beiden *Sau3A*-*Bam*HI-Fragmente der Vektoren pMV10 und pMV8-3 aus *C. glutamicum* R127. Beide rekombinanten Vektoren komplementieren den Lysinexport-Defekt von *C. glutamicum* NA8. Die Abbildung gibt zudem die Komplementation bei Subklonierung des chromosomalen DNA-Fragmentes aus dem Vektor pMV10 wieder. B = *Bam*HI, H = *Hind*III, Sc = *Sac*I, Sl = *Sal*I, Sm = *Sma*I, X = *Xho*I.

Zum Nachweis, daß das komplementierende 2,4 kb *Bam*HI-Fragment auch mit der genomischen Organisation *in vivo* übereinstimmt, wurde eine Southern-Blot-Hybridisierung durchgeführt. Dazu wurde genomische DNA von *C. glutamicum* R127, *C. glutamicum* ATCC13032 und vom Lysinproduktionsstamm *C. glutamicum* MH20-22B mit *Bam*HI geschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert, und gegen eine DNA-Sonde hybridisiert. Zusätzlich wurde die genomische DNA des Wildtyps auch mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI, *Xho*I, *Sac*I und *Cl*aI geschnitten, um Informationen über die genomische Nachbarschaft des distal auf dem Plasmid pMV10 lokalisierten 2,4 kb Fragmentes zu erhalten. Als Sonde diente ein 1,2 kb *Xho*I-*Eco*RI-Fragment des komplementierenden 2,4 kb *Bam*HI-Fragmentes; diese wurde mit Digoxigenin-dUTP markiert. Wie aus der Abbildung 9 zu sehen ist, zeigten sich

Hybridisierungssignale gleicher Größe nicht nur im Vergleich von Plasmid-DNA (Spur 5) zur Gesamt-DNA des Stammes R127 (Spur 8), sondern auch zur Gesamt-DNA des Wildtypes ATCC13032 (Spur 7) und des Lysinproduktionsstammes MH20-22B (Spur 9). Damit war die genomische Integrität des 2,4 kb komplementierenden Fragmentes belegt.

1 2 3 4 5 6 7 8 9

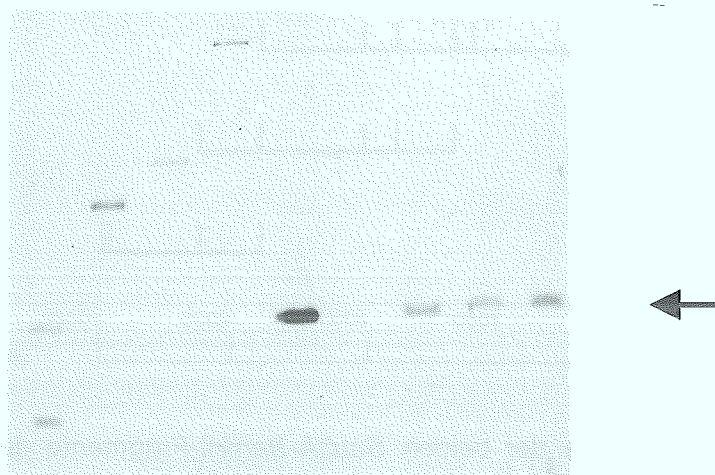


Abb. 9: Southern-Blot-Analyse zum Nachweis der genomischen Integrität des komplementierenden 2,4 kb *Bam*HI-Fragmentes. Als Sonde diente ein internes 1,2 kb *Xho*I-*Eco*RI-DNA-Fragment. Spuren 1-4: chromosomale DNA des Wildtypes ATCC13032 geschnitten mit den Restriktionsenzymen *Cl*al (1), *Eco*RI (2), *Sac*I (3) und *Xho*I (4). Spur 5: pJC*lysEG*2,4, Spur 6: pMV7-2*Bam*, Spuren 7-9: chromosomale DNA von *C. glutamicum* ATCC 13032 (7), R127 (8) und MH20-22B (9). DNA der Spuren 5-9 jeweils *Bam*HI geschnitten.

2.2 Sequenzanalyse von *lysE* und benachbarten Genen

Zur Ermittlung der Nukleotidsequenz wurde zunächst das 2,4 kb *Bam*HI-Fragment aus pJC1 in die *Bam*HI-Schnittstelle des Sequenziervektors pUC18 ligiert. Es konnten beide Orientierungen erhalten werden. Dies sprach, vorausgesetzt, das auf dem Fragment lokalisierte Gen wurde in *E. coli* exprimiert, gegen eine mögliche Toxizität des kodierten

Polypeptides. Durch ExonucleaseIII-Verdau erfolgte eine sukzessive Verkleinerung des chromosomalen Fragmentes von pUC18/*lysEG2,4*, um überlappende Deletionsklone zur Sequenzierung zu erhalten. Sieben Deletionsklone wurden zur Sequenzierung eingesetzt. Zusätzlich wurden Deletionsfragmente des 2,4 kb Fragmentes direkt aus pJC1/*lysEG2,4* isoliert, in pUC18 ligiert und zur Sequenzierung verwendet. Die Sequenzanalyse des Gegenstranges erfolgte mittels *primer-walking*. Hierbei diente ein endständiger Bereich der bereits ermittelten DNA-Sequenz als Template zur Synthese eines neuen Startermoleküls (Primer) für die DNA-Polymerase. Die Sequenzierung erfolgte mit der Didesoxy-Methode nach Sanger *et al.* (1977). Zur Detektion der Sequenzierungsprodukte wurde der *Automated Laser Fluorescence-Sequencer* (A.L.F.) eingesetzt. Die Abbildung 10 gibt einen Überblick über die Sequenzierungsstrategie des 2,4 kb *Bam*HI-Fragmentes.

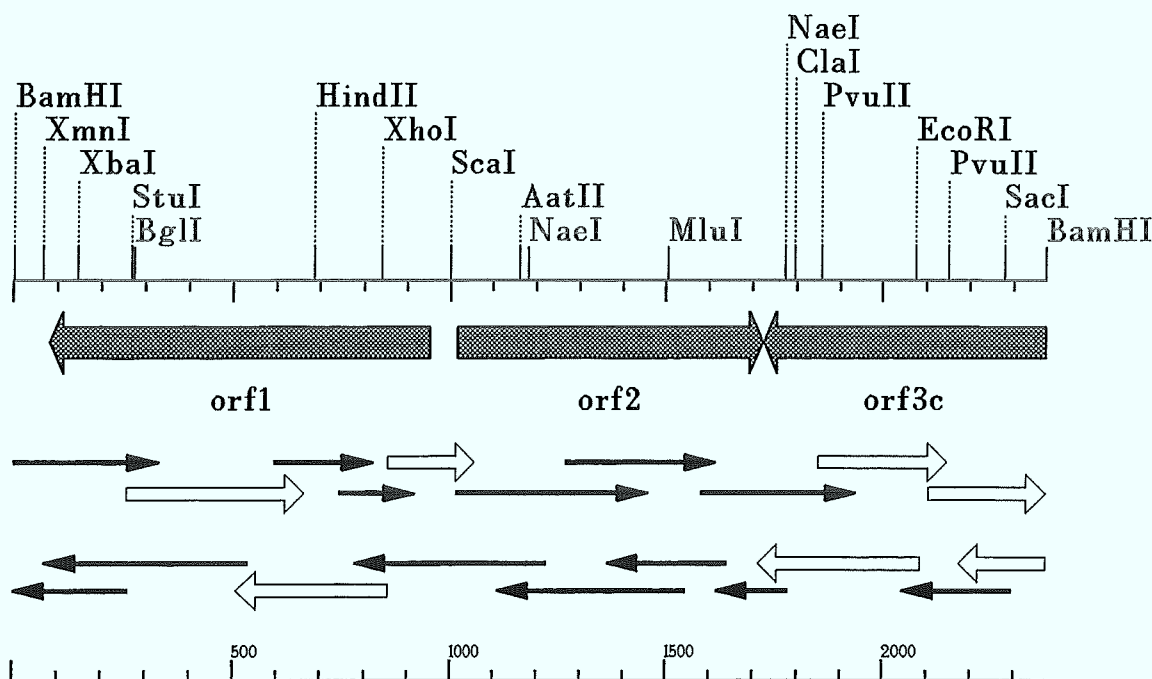


Abb. 10: Restriktionskarte des 2,4 kb *Bam*HI-Fragmentes, das den Lysinexport-Defekt von *C. glutamicum* NA8 komplementiert, sowie die angewandte Sequenzierungsstrategie. Die in Leserichtung von orf2 zeigenden schwarzen Pfeile stehen für Sequenzen, die mit Hilfe von Deletionsklonen ermittelt wurden. Die Sequenz des Gegenstranges wurde mittel *primer walking* bestimmt. Die offenen Pfeile zeigen die Sequenzen an, die mit den Subklonen *Xho*I-*Eco*RI, *Bgl*I-*Cl*aI und *Sca*I-*Bam*HI erhalten wurden.

CCTTTGCCGGTAGCCAGGAAGCGCACAAACGAGGCGTAC -361
 AAGCGGCTTTGGGTTGCGTTGGACTGGCTAGAAGATCGCTTATCGACGCGACGTTACCTC -301
 ATGGGGGATCACATAACCGAGCGGATATCCGCCCTCTACCCAACCCCTCGTGCGTTTCGATG -241
 CCGTCTACCACGGACACTTCAAGTGTGGCCGCAACAAGATCACCGAAATGCCGAATCTAT -181
 GGGGCTACTGCGGGATCTTTTCCAGACCCCAGGCTTTGGCGACACCACCGATTTCACCGA -121
 AATCAAGCAGCACTACTACATCACCCACGCGGAGATTAACCCACCCGGATCGTTCCAGT -61
 CGGACCAGATCTGTCTGGTTTCGCGACACCACACGCCGTGAAAAGCTCGGCGGATCCCC - 1
 GGTAAACGACTTCCACAATGAGACGGACCGGTTAAGGACGCCCGCTTCTTCACTTTTGT 60
 -LysG 120
 GGACTTGGAAGTCTTCATTGATTCGGCGTTAGGGAGCTAACGACGTAGTTGCTGCCG
 - P R L G E I A A D V V A 180
 CAGACACTCAGATCGATCTCTAGATCTAAGGTCCGCGGTAGCAACGGTTATGTAGCCACA
 D T L R A L S R S E L R W R Q W Y M P T 240
 CAGTTACCCATAGAGTAGTCTCTCTAGTGAAGAGGACGAAAATCGTACCCTCGTGAAC
 D I P I E D L L I V E G A K L M P A A Q 300
 CCAAAGCCCTTCTTCAGGGGTTGGTTCCGGAGCCGCTTAACGGAGTGTTTGGGAAGGCG
 T E P L L G W G L G R R I A E G F G E A 360
 GCTGCCCTGTTACCTATGCGCGGACGCGGGGTGTCCTGGTAGCTGCGCGGGCAGGTCCAG
 S P V I S V R R R G V P G D V R G D L D 420
 TGCCAGAAGTTCGTGTAGAAACCTGGCTTCGCATTCTGCCCGTAGCGTCGGGTTAGATC
 R D Q L V D K P G F R L V P M A A W D L 480
 AAAGGGTAGTTGGTACATCCGTAGGGCGTTACTCCCCAACGTTACCGGTTACCGCGTA
 K G D V M Y A D R L S P T A I A L H R M 540
 CCAAGGTTCAAGATGATGAAGTGTAGGGCGGTGCCCTAATCGAAGTGCCCAATGGCGAGG
 T G L E V V E C G A V P N A E R T V A G

ATTTTGTAGAGGTGCGGCGTCGTTTCCTATTACACACGCGAAGTAGAAGGTTTCGCGTCGCA 600
L V D G R R L L S L T H A E D E L R L T
CTCGCAACGAGGTGGGGTTCCTTCGATGGAGCAACTTGTGCCCTCCTTTGGTACACCTATC 660
L T A G G W S A V E N F V P P F W T S L
GCTTAGACGCAACTACCGCTACCAATTGCCCTAAAGTCGTTCCGCAGGTCTATCAACGCG 720
S D A N I A I T L P I E A L R G S L Q A
AAATCAAAGACGAACGTCGTTGTGGTAAAAGGCGCGACGAACGTGTTTCCTGAAGTGGGCG 780
K T E A Q L L V M K R A A Q V L V E G A
AAGCCAACGAAACCGGCCAACCCACGCGCTATGGTTGTGAGCTGGGTGCACTACGAGCTC 840
E T A K A P Q T R S V L V R G V H H E L
TCGAAATTGCGCGACTGAGTGGCGGCTCCCCCTTTACCTTTCCCGATTCTCCGCGGAAG 900
A K V R Q S V A S P S I S L A L S A G E
RCGS 960
<---LysG
CTTCGACGGAAGTAGTTACTAACTCTCGTTTCACAGGTCAACTTACCCCAAGTA-----5'
5'---TGCCTTCATCAATGATTGAGAGCAAAGTGTCCAGTTGAATGGGGTTCATGAAGCT
F S G E D I I S L L T D L Q I P N M
RBS 1020
ATATTAAACCATGTTAAGAACCAATCATTTTACTTAAGTACTTCCATAGGTCACGATGGT
M V
LysE--->
GATCATGGAAATCTTCATTACAGGTCTGCTTTTGGGGGCCAGTCTTTTACTGTCCATCGG 1080
I M E I F I T G L L L G A S L L L S I G
ACCGCAGAATGTACTGGTGATTAAACAAGGAATTAAGCGCGAAGGACTCATTCGCGTTCT 1140
P Q N V L V I K Q G I K R E G L I A V L
TCTCGTGTGTTTAATTTCTGACGTCTTTTGTTCATCGCCGGCACCTTGGGCGTTGATCT 1200
L V C L I S D V F L F I A G T L G V D L
TTTGTCCAATGCCGCGCCGATCGTGCTCGATATTATGCGCTGGGGTGGCATCGCTTACCT 1260
L S N A A P I V L D I M R W G G I A Y L
GTTATGGTTTGGCGTCATGGCAGCGAAAGACGCCATGACAAACAAGGTGGAAGCGCCACA 1320
L W F A V M A A K D A M T N K V E A P Q
GATCATTGAAGAAACAGAACCAACCGTGCCCGATGACACGCCTTTGGGCGGTTTCGGCGGT 1380
I I E E T E P T V P D D T P L G G S A V
>>>>>> > < <<<<<<<
GGCCACTGACACGCGCAACCGGGTGCGGGTGGAGGTGAGCGTCGATAAGCAGCGGGTTTG 1440
A T D T R N R V R V E V S V D K Q R V W

1500
 GGTAAAGCCCATGTTGATGGCAATCGTGCTGACCTGGTTGAACCCGAATGCGTATTTGGA
 V K P M L M A I V L T W L N P N A Y L D
 1560
 CGCGTTTGTGTTTATCGGCGGCGTCGGCGCGCAATACGGCGACACCGGACGGTGGATTTT
 A F V F I G G V G A Q Y G D T G R W I F
 1620
 CGCCGCTGGCGCGTTCGCGGCAAGCCTGATCTGGTTCCCGCTGGTGGGTTTCGGCGCAGC
 A A G A F A A S L I W F P L V G F G A A
 1680
 AGCATTGTCACGCCCGCTGTCCAGCCCCAAGGTGTGGCGCTGGATCAACGTCGTCGTGGC
 A L S R P L S S P K V W R W I N V V V A
 1740
 >>>>>> <<<<<<< *orf3*
 - N E R T K
 5' C T A C T G G C G T A A C C G G T A G T T T G A C T A C A A C T A C C C A A T C A A A A G C G C C C A A A A
 A G T T G T G A T G A C C G C A T T G G C C A T C A A A C T G A T G T T G A T G G G T T A G T T T T C G C G G G 5'
 V V M T A L A I K L M L M G -
Lyse / >>>>>

1800
 CCTTAGCCACCGGAAGCGGGTTTACAACCTACGGCCGCAGCACCCCTTTAGAGTAGCTAGCG
 S D T A K A W I N I G A D H S I E D I A
 <<<<<

1860
 GAGGTTGAGCCGCAGTCTTTTGAGGTTCAACAACCTCACTTAGTTCGACACAGGTCGAC
 E L E A D S F E L N N L S D L S N D L Q
 1920
 GAGTTGACTGCTTCGTGGTTAGTTACGTGACCAGTGCCATAGGCGCGGCATGAGAGGAAC
 E V S S A G I L A S T V T D A G Y E G Q
 1980
 GAGCGCGTCGTGGGTACGTTTCGCGGTAGACGCGTTCCTGACGGGCGCAAGGACCCGCTA
 E R L V W A L A M Q A L S Q G R E Q A I
 2040
 CAGTAACTCGAACGCCTGGTATAGTTATAACAAGTGCAAGTTGTACGGGAGTCTGTCCCT
 D N L K R V M D I N N V N L M G E S L S
 >>>>>

2100
 GAATGGGACCGACCGCGCCCTTGGGAGACCTTAAGGTAGCTCTATAAACAGGCACTCGTC
 K G Q S A R S G E P I G D L Y K D T L L
 <<<<<

2160
 CGGGACGCGTTACCACTCTTTTCGTTACTGCGGTTCTGGTAACAACCGTCGACTGACGTT
 G Q A L P S F A I V G L G N N A A S Q L
 2220
 GTTCAAGAGTGGCAGTAGCGGGCCAAGGAGGTGGGTTGCTAATTACTACCTTATCGAACC
 L N E G D D G P E E V W R N I I S Y S P
 2280
 GACTACTTAGTCTTCGCCCCGTCGGGAGGAGGCGGTACTTGAGTCGGCGGAGGCGACACTC
 Q H I L L P C G E E A M F E A A E A T L

GAGACCTGGGCATCCTTCTTTATGGGTGCATTTCTCGGAAAGGTCTGCGTTGTTACAGTGC 2340
 E P G Y S S I G V Y L A K G S A V I D R

 2374
 <-orf3+
 GTTACGCATGTACCAAAGAAGGTTTCCTCATAGA
 L A Y M T E E L P T D

konservierten Aminosäureresten sehr hohe Ähnlichkeit zeigt LysE zu YGGA_ECOLI, einem Polypeptid unbekannter Funktion. Auf chromosomaler Ebene ist *ygga_ecoli* benachbart zu den Genen *gapB*, *pgk* und *fda* lokalisiert, die für die Glykolyseenzyme Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, 3-Phosphoglycerat-Kinase und Fruktose-1,6-bisphosphat-Aldolase kodieren und auf dem *E. coli* Chromosom bei 62 min lokalisiert sind (Alefounder & Perham, 1989). Zum Aminosäurevergleich wurde das Polypeptid LysE mit einer Größe von 236 Aminosäuren (Molekulargewicht 25425) eingesetzt. Dabei wurde das ATG 1016, welches den Anfang des offenen Leserasters darstellt, auch als potentieller Translationsstartpunkt betrachtet, da ohne die Isolierung und nachfolgende Ansequenzierung des LysE-Proteins keine definitiven Aussagen gemacht werden können, ob das ATG 1016, das GTG 1019 oder das ATG 1025 den tatsächlichen Translationsstartpunkt darstellt. Das GTG 1091 und das GTG 1097 scheiden vermutlich als Translationsstartpunkte aus, da sich diese direkt stromabwärts von einer Region befinden, deren abgeleitete Aminosäuresequenz identisch zu YGGA_ECOLI ist (Abb. 12). Weiterhin favorisiert die potentielle Ribosomenbindestelle vor *lysE* (Nukleotide 1008-1015) eines der drei frühen Startcodons. In der Abbildung 12 ist der Aminosäurevergleich zwischen den von *lysE* und *ygga* abgeleiteten Polypeptiden dargestellt.

Eine Hydrophobizitätsanalyse nach dem Algorithmus von Kyte & Doolittle (1982) mit einem Fenster von 13 Aminosäuren zeigte, daß sich die hydrophoben Regionen von LysE über das gesamte Polypeptid erstrecken (Abb. 13). Im zentralen Bereich des Polypeptides, Aminosäure 94-145, befindet sich ein sehr großer hydrophiler Abschnitt von 52 Aminosäuren, der interessanterweise im Polypeptid YGGA_ECOLI nur 13 Aminosäuren umfaßt. Mit den Sekundärstrukturvorhersage-Programmen TMP (Persson & Argos, 1994) und PHD.htm Neuronal Net (Rost *et al.*, 1995) wurden für LysE sechs (PHD.htm) bzw. sieben (TMP) transmembrane Segmente ermittelt. Damit zeigt *lysE* auf Primärstrukturebene keinerlei Ähnlichkeit zu bisher bekannten Transporter-Genen, und ähnelt bezüglich seiner Größe und Sekundärstruktur eher mitochondrialen Carriern (Kuan & Saier, 1993) als Carriern zur Aminosäure-Aufnahme oder zum Export toxischer Substanzen mit zwölf transmembranen Bereichen (Marger & Saier, 1993, Nikaido, 1994).

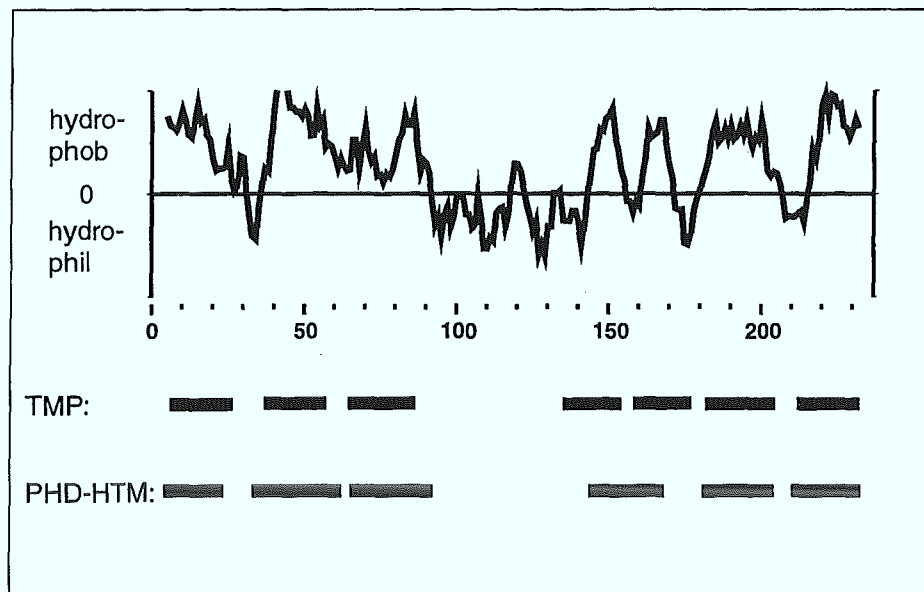


Abb. 13: Hydrophobizitätsanalyse für LysE nach Kyte & Doolittle (1982) mit einem Fenster von 13 Aminosäuren (PEPPLOT, Husar 4.0). Aufgetragen ist die durchschnittliche lokale Hydrophobizität auf der vertikalen Achse für den jeweiligen Aminosäurerest auf der horizontalen Achse. Die sechs bzw. sieben Balken geben die mögliche Lage transmembraner Helices an, deren Lage mittels der Sekundärstrukturvorhersage-Programme PHD.htm Neuronal Net (Rost *et al.*, 1995) bzw. TMP (Persson & Argos, 1994) ermittelt wurde.

Sekundärstrukturvorhersage-Programm für cytoplasmatische Proteine, konnte in der abgeleiteten Aminosäuresequenz von LysG aminoterminal ein Helix-Turn-Helix Motiv (HTH-Motiv) ermittelt werden. Dieses ist sowohl von seiner aminoterminalen Lage als auch von der Größe her ähnlich zu den HTH-Motiven übriger Mitglieder dieser Regulatorfamilie. In der Abbildung 14 ist ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *lysG* und *iciA* dargestellt. Wegen der Übereinstimmungen von LysG und ICIA auf Aminosäure-Sequenzebene ist es wahrscheinlich, daß das ATG in der Position 954, das den Beginn des offenen Leserasters markiert und in der Abbildung 14 als Translationsstart angenommen wurde, auch den tatsächlichen Translationsstart darstellt. Damit würde das abzuleitende Polypeptid von 290 Aminosäuren ein

Molekulargewicht von 31388 besitzen. Ein alternativer Translationsstart wäre bei dem GTG in der Position 861 gegeben. Dies würde jedoch zu einem Wegfall konservierter Regionen im Aminosäurevergleich zu ICI A und zum Verlust des Helix-Turn-Helix-Motives führen. Zusätzlich wäre das resultierende Protein mit nur noch 258 Aminosäuren kleiner als die übrigen Mitglieder der LTTR-Familie mit typischen Größen von 276-324 Aminosäuren (Schell, 1993).

LysG	1	MNPIQ... <u>LDTLLSIIDEGSFEGASLALSISPSAVSQRVKALEHHVGRVL</u>	47
		.. : .: .: : . .:.. .: .: :. ..	
IciA	1	MKRPDYRTLQALDAVIRERGFERAAQKLCITQSAVSQRIKQLENMFGQPL	50
LysG	48	VSRTQPAKATEAGEVLVQAARKMVLLQAETKAQLSGRLAEIPLTIAINAD	97
		: .: .: .: .: .: .: .: .: .:	
IciA	51	LVRTVPFRPTEQGQKLLALLRQVELLEEEWLGDEQGTGSTPLLLSLAVNAD	100
LysG	98	SLSTWFPPVFNEVASWGGATLTLRLEDEAHTLSLLRRGDVLGAVTREANP	147
		.: .:.. . :. .: .: .: . .: .: .: : :.	
IciA	101	SLATWLLPALAPVLADSPIRLNLQVEDETRTQERLRRGEVVGAVSIQHQA	150
LysG	148	VAGCEVVELGTMRHAIATPSLRDAYMVDGKLDWAAM..PVLRFPGPKDVL	195
		:.: . .: . :.:.: : .: . : .: .: :	
IciA	151	LPSCLDVKLGALDYL FVSSKPF AEKYFPNGVTRSALLKAPVVAFDHLDDM	200
LysG	196	QDRDL DGRVDGPVGRRRVSI VPSAEGFGEAIRRGLGWGLLPETQAAPMLK	245
		: : .:.. .: . . .: .: .: . :.: . . .	
IciA	201	HQAF LQQNF DLPPG SVPCHIVNSSEAFVQLARQGTTCMIPHLQIEKELA	250
LysG	246	AGEVILLDEIPIDTPM.YWQWRWLESRSLARLTDVVVDAAIEGLRP.	290
		. .: .. :. : .: .: : :.: .: : .. .	
IciA	251	SGELIDLTPGLFQRRMLYWHRFAPESRMMRKVTDALLDYGHKVL RQD	297

Abb. 14: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von *lysG* aus *C. glutamicum* und *iciA* aus *E. coli* mittels des Programmes GAP, Husar 4.0 (| = identische Aminosäuren, : = konservierte Aminosäure-Austausche). Das potentielle Helix-Turn-Helix Motiv für LysG ist unterstrichen.

Neben der Ähnlichkeit zu Mitgliedern der LTTR-Familie auf Sequenzebene zeigt LysG eine Reihe weiterer Charakteristika, die für diese Regulatorfamilie typisch sind. Dies ist erstens der schon angesprochene Besitz des Helix-Turn-Helix Motives am Aminotermminus des abgeleiteten Polypeptides (Aminosäure 18 bis Aminosäure 43), die

potentielle DNA-Bindungsdomäne. Zweites Charakteristikum ist die divergente Transkription vom zu kontrollierenden Gen, was in diesem Fall *lysE* wäre. Drittens ist der Abstand von 61 Nukleotiden zwischen den divergent transkribierten Genen typisch für die LTTR-Familie (Abstand LTTR zu Target-Gen: 25-70 Nukleotide). Als viertes Charakteristikum ist auch eine DNA-Erkennungsregion vorhanden, die partiell palindromisch ist, mit dem Translationsstart des Regulatorproteins überlappt und bei der Familie der LTTRs als Bindungsstelle für das Regulatorprotein fungiert (*regulator recognition sequence*-RCGS, Nukleotide 941-953) (Schell, 1993). Aufgrund dieser Übereinstimmungen von *LysG* zur LTTR-Familie wurde postuliert, daß *LysG* potentieller Regulator des L-Lysinexportes von *Corynebacterium glutamicum* ist.

Während eine Datenbankrecherche mit den stromaufwärts von *lysG* gelegenen Sequenzen lediglich Ähnlichkeiten zu offenen Leserastern unbekannter Funktion (YQJG_ECOLI P42620, YK56_YEAST P36156, YM992005_YEAST S53073) zeigte, konnte für die abzuleitende Aminosäuresequenz des unvollständigen Leserasters orf3c überraschenderweise eine recht hohe Ähnlichkeit zur carboxyterminalen Hälfte des Kvβ1-Proteins aus Eukaryonten festgestellt werden (33% identische und 55% konservierte Aminosäureaustausche) (Abb. 15). Hierbei handelt es sich um die cytoplasmatische Komponente eines spannungskontrollierten Kalium-Kanals, die die Kanalaktivität modulieren kann (Scott *et al.*, 1994; Rettig *et al.*, 1994). Diese Komponente wurde bisher im Rattenhirn, und etwas modifiziert auch als Kvβ2 im Rinderhirn, bislang aber nicht in Prokaryonten nachgewiesen. Mit KcsA wurde kürzlich ein neuartiger prokaryotischer Kalium-Kanal, der ebenfalls spannungskontrolliert ist, aus dem Gram-positiven Bakterium *Streptomyces lividans* isoliert (Schrempf *et al.*, 1995). Daher wäre eine Isolierung und Analyse des vollständigen orf3 aus dem corynebakteriellen Genom äußerst interessant, um die Frage zu klären, ob auch in Prokaryonten Untereinheiten des Kanals existieren und ob diese ebenfalls einen modularen Einfluß auf die Kanalaktivität nehmen können. Versuche zur Inaktivierung von orf3 durch gezielte Disruption im Genom von *C. glutamicum* ATCC13032 waren nicht erfolgreich. Daher ist nicht auszuschließen, daß das von orf3 abzuleitende Polypeptid essentiell für *C. glutamicum* ist.

Strukturell interessant ist der Befund, daß die Stoppcodons von orf3 und *lysE* überlappen. Aufgrund der konvergenten Orientierung von orf3 und *lysE* läßt sich hieraus die Lage der Terminatoren für orf3 bzw. für *lysE* im jeweils anderen Transkript folgern (Abb. 11). Mittels RNA-Faltungsanalyse-Programmen (Stem-Loop, Terminator, Husar 4.0, EMBL,

Cambridge, Großbritannien) konnten vier potentielle Bereiche identifiziert werden, deren Sekundärstrukturausbildung die Transkriptionstermination initiieren könnten. Sowohl für *orf3* als auch für *lysE* ist jeweils ein solcher Bereich direkt folgend auf das Stoppcodon zu finden, während der zweite Bereich ca. 300 Nukleotide vom jeweiligen Stoppcodon entfernt lokalisiert ist.

Orf3	1	VGISSYGPELTAEEAAE	16
		.: .: .: .:	
Kvβ1	151	YVDVVFANRPDPNTPMEETVRAMTHVINQGMAMYWGTSRWSSMEIMEAYS	200
Orf3	17	FMAE.EGCEPILLIHQPSYSIINRWVEEPGDDGENLLQSAANNGLGVIAFSP	65
		. : : . :.. .: :.. .: : :.: .: :.:	
Kvβ1	201	VARQFNLIIPPICEQAEYHMFQR..EKVEVQLPELFHKI...GVGAMTWSP	245
Orf3	66	LAQGLLTDKYLDGIPEGSRAS.....QGKSLSEGMLNVNNIDMVRKLN	108
		.: .: .: .: .: .: .: .:	
Kvβ1	246	LACGIVSGKYDSGIPPYSRASLKGQWLKDKILSEE..GRRQQAKLKELQ	293
Orf3	109	DIAQERGQSLAQMALAWVLREQGEYGADTVTSALIGASSVEQLDNSLDSL	158
		. : .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: :.: .:	
Kvβ1	294	AIAERLGCTLPQLAIAWCLRNEG.....VSSVLLGASNAEQLMENIGAI	337
Orf3	159	NNL.EFSDAELEAIDEISHDAGINIWAKATDSKTREN	194
		. :.: .: .: .: .: .: .:	
Kvβ1	338	QVLPKLSSSIVHEIDSI...LGKPYSKKDYRS....	367

Abb. 15: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz des unvollständigen Leserasters *orf3c* von *C. glutamicum* mit Kvβ1 aus *Rattus norvegicus* mittels des Programmes GAP, Husar 4.0 (|= identische Aminosäuren, : = konservierte Aminosäure-Austausche).

3. Funktion der durch *lysE* und *lysG* kodierten Polypeptide

3.1 *LysE* als essentielles Protein des Lysinexportes von *C. glutamicum*

Zum Nachweis, daß das durch *lysE* kodierte Membranprotein tatsächlich am Lysinexport in *C. glutamicum* beteiligt ist, erfolgte die Inaktivierung von *lysE* mittels der von Schwarzer & Pühler (1991) etablierten Methode der gezielten Geninaktivierung (*gene disruption*). Dazu wurde der von Schrupf *et al.* (1991) konstruierte Integrationsvektor pEM1 eingesetzt. Ein 343 bp internes *NaeI-HindIII* Fragment von *lysE* wurde aus einem pUC18/*lysEG*_{2,4}-Exonuklease-Deletionsklon unter Nutzung der *HindIII*-Schnittstelle des pUC-Derivates isoliert, und in den Vektor pEM1 ligiert. Dieses Integrationsplasmid pEM/*lysE*_{int} wurde dann zur Konjugation von *E. coli* S17-1 pEM/*lysE*_{int} mit *C. glutamicum* ATCC13032 eingesetzt. Es konnten drei kanamycinresistente Klone isoliert werden. Die korrekte Integration des Inaktivierungsvektors in die chromosomale Kopie des *lysE*-Gens wurde mit einer Southern-Blot-Analyse bestätigt.

Kurzzeitfermentationen zur Bestimmung extrazellulärer Lysinkonzentrationen und Lysin-Exkretionsraten ergaben, daß die *lysE*-Inaktivierungsmutante *C. glutamicum* ATCC13032 *lysE*::pEM/*lysE*_{int} kein Lysin mehr ins Kulturmedium exkretierte (Abb. 16). Dagegen exkretierte der *C. glutamicum* Wildtyp L-Lysin mit einer Rate von 0,8 nmol min⁻¹ (mg Trockengewicht)⁻¹. Dieses Ergebnis, daß die Inaktivierung von *lysE* zum vollständigen Verlust der Lysinexkretion führt, bestätigt nicht nur eine Beteiligung von *LysE* am Lysinexport, sondern beweist, daß *LysE* essentiell für den Lysinexport von *C. glutamicum* ist. Die Analyse des Kulturüberstandes der *lysE*-Inaktivierungsmutante ergab bis auf Lysin das identische Aminosäurespektrum zum *C. glutamicum* Wildtyp. Beispielhaft ist in der Abbildung 16 der Efflux von Alanin aufgeführt. Dies zeigt, daß die Inaktivierung von *lysE* einen spezifischen Exportdefekt für Lysin zur Folge hat. Der Lysinexkretionsverlust der Mutante *C. glutamicum* ATCC13032 *lysE*::pEM/*lysE*_{int} wurde nicht nur bei Kultivierung auf CGXII-Minimalmedium mit Methionin, sondern auch auf BHI-Komplexmedium beobachtet. Dies spricht gegen die Existenz eines zweiten, nur unter bestimmten Bedingungen exprimierten Lysin-Exportsystems, im Unterschied z.B. zu den zweien, in Abhängigkeit vom Nährmedium exprimierten Glutamat-Aufnahmesystemen von *C. glutamicum* (Kronmeyer *et al.*, 1995, Burkovski *et al.*, 1996).

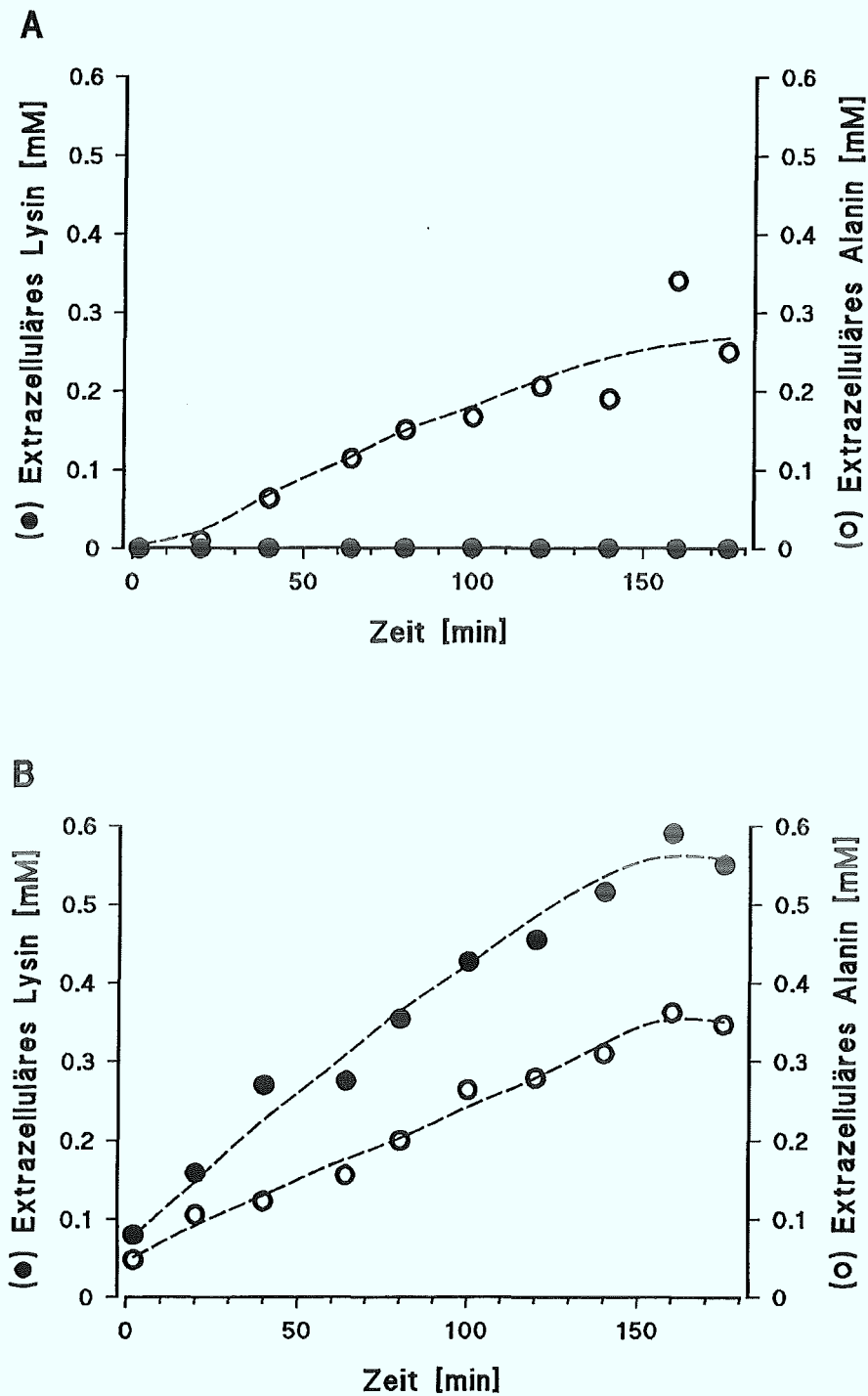


Abb.16: Exkretion von Lysin und Alanin durch *C. glutamicum* ATCC13032 *lysE::pEM/lysE_{int}* (A) und *C. glutamicum* ATCC13032 pJC1 (B) auf Minimalmedium mit Methionin. ● extrazelluläres Lysin, ○, extrazelluläres Alanin.

Um die Bildung des Genproduktes von *lysE* nachzuweisen, wurde zunächst ein *lysE*-Expressionsvektor konstruiert. Dazu wurde ein 0,85 kb *Scal-PvuII* Fragment, welches das *lysE*-Strukturgen einschließlich der Ribosomenbindestelle trägt, in den partiell *SmaI* geschnittenen Expressionsvektor pEKEx2 (Eikmanns *et al.*, 1991) ligiert. Im resultierenden Vektor pEKEx2/*lysE* liegt das *lysE*-Gen unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren *tac*-Promotors vor. In Rohextrakten und Zelllysaten IPTG-induzierter Kulturen von *C. glutamicum* ATCC13032 pEKEx2/*lysE* konnte nach Auftrennung im SDS-Gel und Silber-Färbung im Vergleich zu *C. glutamicum* ATCC13032 pEKEx2 keine zusätzlich verstärkte Proteinbande beobachtet werden. Daher wurden zum Nachweis von LysE Epitop-gerichtete Antikörper hergestellt. Als antigene Determinante diente ein vierzehn Aminosäuren großes, chemisch synthetisiertes Peptid, das einem Ausschnitt (Aminosäure 118-131) des hydrophilen Loop des LysE-Polypeptides entspricht. Dieses Peptid wurde mittels Bisdiazobenzidin als Kupplungsgruppe auf Ovalbumin als Carrierprotein übertragen und zur Immunisierung eingesetzt. Wie in der Abbildung 17 zu sehen ist, konnte in *C. glutamicum* ATCC13032 pEKEx2/*lysE* nach Induktion der *tac*-abhängigen *lysE*-Expression eine spezifische Polypeptidbande nachgewiesen werden, die in dem Vergleichsstamm *C. glutamicum* ATCC13032 pEKEx2 ohne die plasmidkodierte Kopie von *lysE* fehlte. Diese Polypeptidbande, die einer molekularen Masse von ca. 25 kDa entspricht, bestätigt die aus der Nukleotidsequenz abgeleitete molekulare Masse von LysE (25425 Da). Die Beobachtung, daß in dem Kontrollstamm ATCC13032 pEKEx2 mit chromosomaler Kopie von *lysE* kein Nachweis des 25 kDa Polypeptides möglich war, weist auf sehr niedrige Konzentrationen des Lysinexporters in *C. glutamicum* hin. Mit einem weiteren Plasmid, pSPORT/*lysE*, welches das *lysE*-Gen unter der Kontrolle des *lac*-Promotors trägt, gelang auch die heterologe Überexpression und der Nachweis des LysE-Polypeptides in *E. coli*.

Zur Prüfung, ob die verstärkte Bildung von LysE in *C. glutamicum* ATCC13032 pEKEx2/*lysE* mit einem erhöhten Export von Lysin korreliert werden konnte, wurde die Lysinexkretion dieses Stammes vergleichend zu der von *C. glutamicum* ATCC13032 pEKEx2 (ohne plasmidkodiertes *lysE*) untersucht. Dazu wurden beide Stämme auf Minimalmedium unter Zusatz von 1 mM IPTG und 5 mM L-Methionin vorkultiviert und dann zur Bestimmung der Lysin-Exkretionsraten in Kurzzeitfermentationen eingesetzt (Abb. 18). *C. glutamicum* ATCC13032 pEKEx2/*lysE* exkretierte L-Lysin mit einer zehnfach höheren Rate als *C. glutamicum* ATCC13032 pEKEx2: $3,76 \text{ nmol min}^{-1} \text{ (mg Zell-Trocken-}$

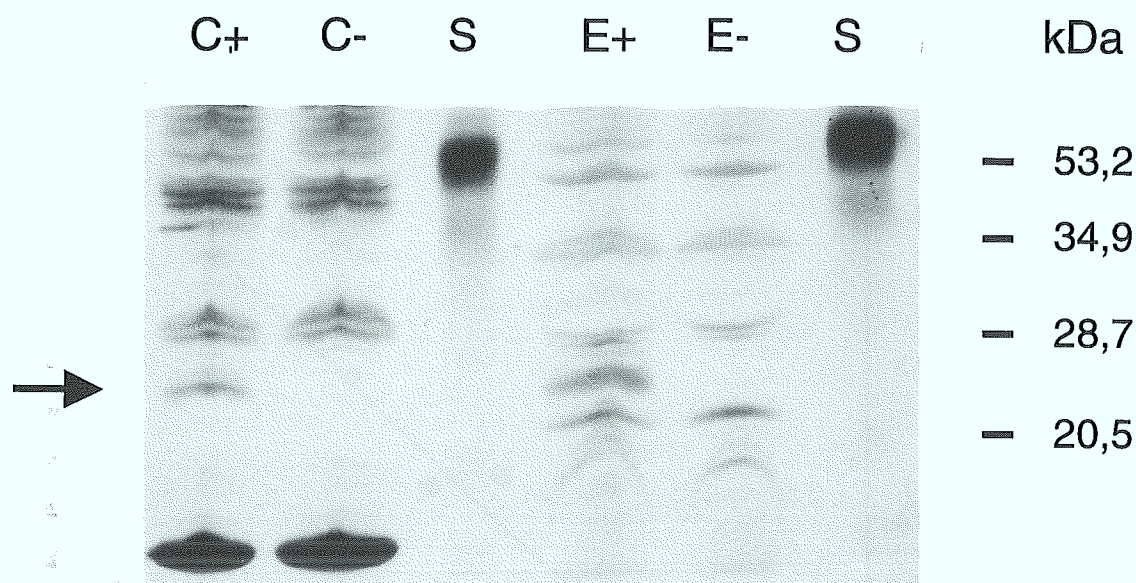


Abb. 17: Western-Blot-Analyse zum Nachweis des *lysE*-Genproduktes in *Corynebacterium glutamicum* (C) und im heterologen Wirt *Escherichia coli* (E). + und - Zeichen geben die Anwesenheit des *lysE*-Gens auf den Plasmiden pEKEx2 (im Fall von *C. glutamicum*) bzw. pSPORT (im Fall von *E. coli*) an. S markiert den Molekulargewichtsstandard; die entsprechenden molekularen Massen der Markerproteine sind auf der vertikalen Achse in kDa angegeben. Die 25 kDa LysE- Antikörper reaktive Bande ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die intensive Reaktion des Markerproteins Ovalbumin im Molekulargewichtsstandard resultiert aus der Nutzung von Ovalbumin als Carrierprotein für das LysE-Antigen zur Antikörperproduktion.

gewicht)⁻¹ bzw. 0,32 nmol min⁻¹ (mg Zell-Trockengewicht)⁻¹. Gleichzeitig wurde durch *C. glutamicum* ATCC13032 pEKEx2/*lysE* die sechsfache Menge L-Lysin im Vergleich zu *C. glutamicum* ATCC13032 pEKEx2 ins Kulturmedium exkretiert. Dieses Ergebnis zeigt, daß allein durch erhöhte Expression des Lysinexportcarrier-Gens die Lysinproduktion durch den *C. glutamicum* Wildtyp möglich wird. Die Lysin-Exkretionsrate nach Überexpression von *lysE* war nicht nur die höchste, die je im *C. glutamicum* Wildtyp auf Minimalmedium erreicht wurde (Erdmann *et al.*, 1993, Vrljic *et al.*, 1995), sondern übertraf sogar die Lysin-

Exkretionsrate des Lysin-Produktionsstammes MH20 (Schrumpf *et al.*,1992). Dieser *C. glutamicum* Stamm wurde durch ungerichtete Mutagenese und Selektion auf erhöhte Lysinbildung isoliert und produziert Lysin wegen einer konstitutiv deregulierten Aspartatkinase.

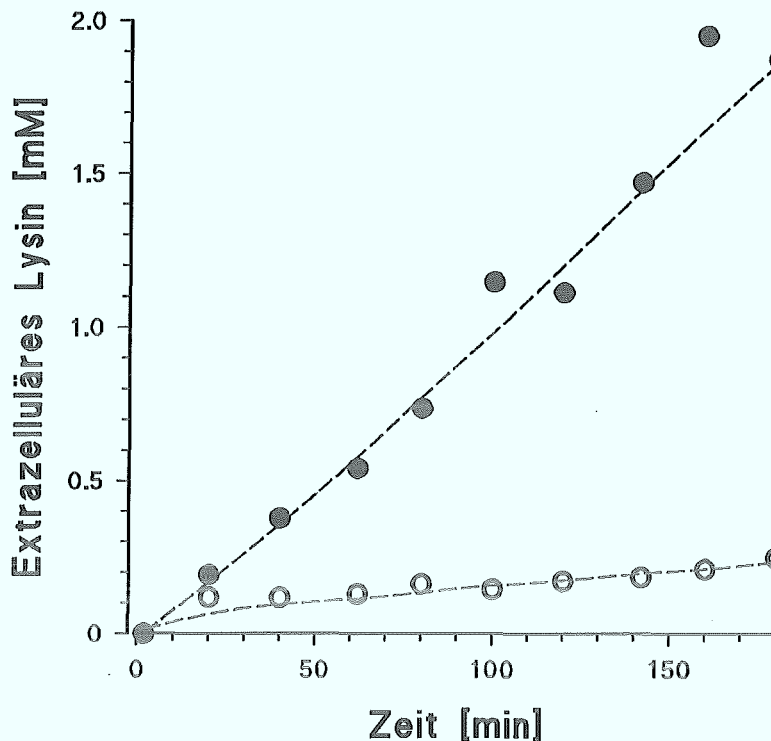


Abb. 18: Steigerung der Lysinexkretion durch Überexpression von *lysE* im Wildtyp von *C. glutamicum*. *C. glutamicum* ATCC13032 pEKEEx2*lysE* (●) und ATCC13032 pEKEEx2 (○) wurden auf CGXII-Minimalmedium mit Zusatz von 1 mM IPTG und 5 mM L-Methionin kultiviert.

3.2 Der Einfluß von LysG auf den Lysinexport von *C. glutamicum*

Auf dem 2,4 kb *Bam*HI-Fragment, das den Lysinexport-Defekt von *C. glutamicum* NA8 komplementiert, befindet sich neben *lysE* das offene Leseraster *lysG*. Das abgeleitete Polypeptid LysG zeigt auf Primär- und Sekundärstruktur-Ebene Ähnlichkeiten zur Familie der LysR-ähnlichen Transkriptionsregulatoren (LTTR) (Schell, 1993). Zusammen mit der

für Mitglieder der LTTR charakteristischen divergenten Genorganisation von *lysE* und *lysG* machte dies einen Einfluß von *LysG* auf den Lysinexport von *C. glutamicum* wahrscheinlich. Deshalb wurde die Deletionsmutante *C. glutamicum* ATCC13032 Δ *lysEG* konstruiert, die es ermöglichen sollte, die Effekte von *lysE* und *lysG* einzeln oder in Kombination zu untersuchen.

Zunächst wurde ein 1,2 kb *StuI-MluI* Fragment aus dem Plasmid pUC18/*lysEG*_{2,4} entfernt, so daß von den Genen *lysG* und *lysE* nur jeweils 184 bp bzw. 219 bp, die die Carboxytermini der abgeleiteten Polypeptide kodieren, zurückblieben (Abb. 19). Aus dem resultierenden Vektor pUC18 Δ *lysEG* wurden die chromosomalen Anteile des ursprünglich 2,4 kb *Bam*HI Fragmentes als ein 838 bp *Bam*HI-*Eco*RI Fragment isoliert, und dann in den ebenfalls *Bam*HI-*Eco*RI geschnittenen Vektor pK18mobsacB (Schäfer *et al.*, 1994) ligiert. In dem so konstruierten Integrationsplasmid pK18mobsacB Δ *lysEG* grenzten also Fragmente von 268 bp bzw. von 570 bp, die im Genom durch 1200 bp voneinander getrennt sind, direkt aneinander. Das Integrationsplasmid wurde nach *E. coli* S17-1 transformiert, und der resultierende Stamm S17-1 pK18mobsacB Δ *lysEG* zur Konjugation mit *C. glutamicum* ATCC13032 eingesetzt. So wurden kanamycinresistente Transkonjuganten von *C. glutamicum* ATCC13032 erhalten, in denen das in *C. glutamicum* nicht replikative Integrationsplasmid in einen der beiden die Deletion umgebenden homologen DNA-Bereiche integriert war. Der besondere Vorteil des Plasmides pK18mobsacB besteht in der Möglichkeit, auch auf das zweite Rekombinationsereignis, also Verlust des Integrationsplasmides, positiv selektionieren zu können. Das auf dem Vektor pK18mobsacB vorhandene Gen *sacB* kodiert für das Enzym Levansucrase und führt zur Synthese von Levan aus Saccharose. Da Levan für *C. glutamicum* toxisch ist, können nur *C. glutamicum* Zellen, die das Integrationsplasmid verloren haben, auf Saccharose-haltigem Medium wachsen (Jäger *et al.*, 1992). Der gewünschte Gen-Austausch zwischen dem chromosomal kodierten *lysEG*-Gencluster und dem plasmidkodierten intern deletierten *lysEG*-Fragment erfolgt jedoch nicht bei jedem Rekombinationereignis. Nur wenn die zweite Rekombination zwischen den DNA-Regionen erfolgt, die nicht an der ersten Rekombination beteiligt waren, wird die zuvor plasmidkodierte Deletion im Genom von *C. glutamicum* etabliert. Andernfalls wird die genomische Situation des Wildtypes wieder hergestellt. Insgesamt wurden nach Kultivierung der Integrationsmutante auf Antibiotika-freiem Vollmedium 73 Klone isoliert, die Saccharose-resistent und Kanamycin-sensitiv waren, also den Vektor pK18mobsacB

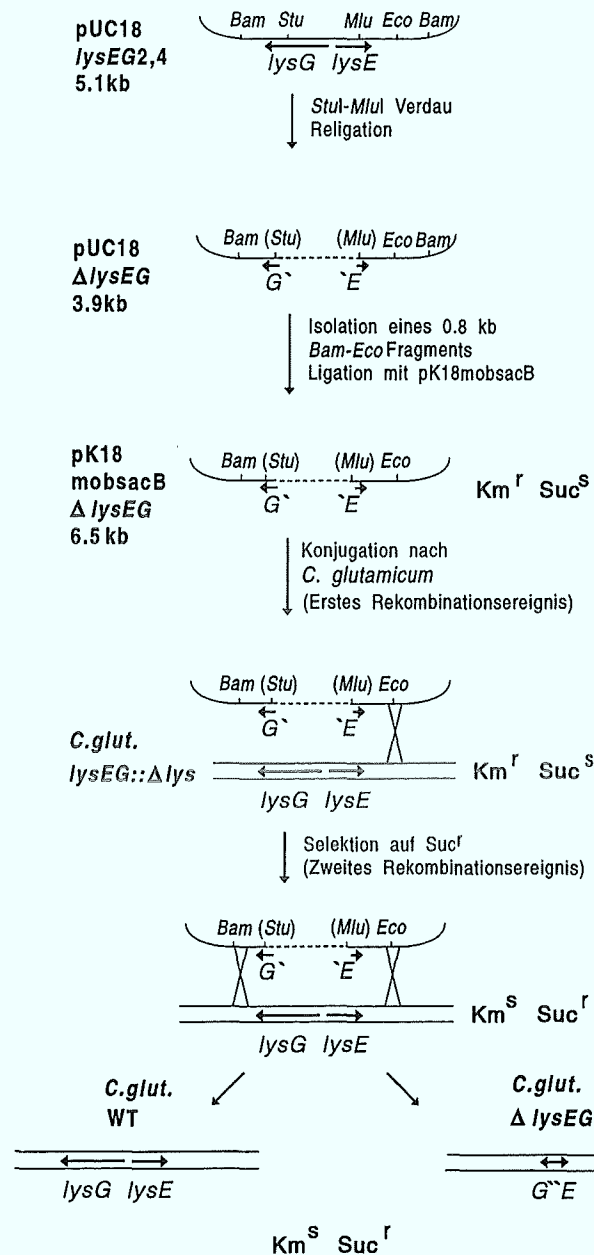


Abb. 19: Schema zur Konstruktion der Deletionsmutante *C. glutamicum* ATCC13032 Δ *lysEG*. Dargestellt ist die Konstruktion und die Integration des Plasmides pK18mobsacB Δ *lysEG* in das Genom von *C. glutamicum* ATCC13032. Ein zweites Rekombinationsereignis führt zur Excision des Integrationsplasmides aus dem Genom. Die Plasmid-kodierte Deletion wird nur dann im Genom von *C. glutamicum* etabliert, wenn die zweite Rekombination nicht zwischen den DNA-Regionen stattfindet, die an der ersten Rekombination beteiligt waren. *Bam*, *Bam*HI; *Eco*, *Eco*RI; *Stu*, *Stu*I; *Mlu*, *Mlu*I, *Km^r*, Kanamycin-Resistenz, *Km^s*, Kanamycin-Sensitivität, *Suc^r*, Saccharose-Resistenz, *Suc^s*, Saccharose-Sensitivität.

wieder verloren hatten. Diese wurden im Lysin-Indikatorplattentest auf ihre Fähigkeit zur Lysinexkretion untersucht. Zwölf der getesteten Klone waren Lysinexkretions-negativ. Eine Southern-Blot-Analyse mit drei dieser Lysinexkretions-negativen Klone bestätigte die chromosomale Deletion des internen *lysEG*-Fragmentes.

Die Deletionsmutante *C. glutamicum* ATCC13032 Δ *lysEG* und der *C. glutamicum* Wildtyp ATCC13032 wurden mit dem Plasmid pZ1*lysE* transformiert. Dieses Plasmid trägt das *lysE*-Gen zusammen mit 300 stromaufwärts von *lysE* lokalisierten Nukleotiden. Dadurch blieben die potentielle *lysE*-Ribosomenbindestelle, die DNA-Erkennungsregion für LysG (Schell, 1993) und der intergene Bereich von *lysG* und *lysE* vor dem *lysE*-Strukturgen erhalten. Die Transkription von *lysE* erfolgte ausgehend vom corynebakteriellen Promotor. Zusätzlich wurden die Deletionsmutante *C. glutamicum* ATCC13032 Δ *lysEG* und der Wildtyp *C. glutamicum* ATCC13032 mit dem Plasmid pZ1*lysEG*_{2,4} transformiert. Auf diesem Plasmid ist das 2,4 kb *Bam*HI-Fragment mit *lysE* und *lysG* lokalisiert, das aus dem Komplementationstest isoliert worden war.

Tab. 8: Übersicht der konstruierten *C. glutamicum* Stämme zur Analyse der Effekte von LysG auf den Lysinexport.

<i>C. glutamicum</i>	chromosomale Kopie von <i>lysE</i> und <i>lysG</i>	Plasmid-kodierte Kopie von <i>lysE</i>	Plasmid-kodierte Kopie von <i>lysG</i>
ATCC13032 Δ <i>lysEG</i>	-	-	-
ATCC13032 Δ <i>lysEG</i> pZ1 <i>lysE</i>	-	+	-
ATCC13032 Δ <i>lysEG</i> pZ1 <i>lysEG</i> _{2,4}	-	+	+
ATCC13032 pZ1	+	-	-
ATCC13032 pZ1 <i>lysE</i>	+	+	-
ATCC13032 pZ1 <i>lysEG</i> _{2,4}	+	+	+

Um zu prüfen, ob sich die konstruierten *C. glutamicum* Stämme (Tabelle 8) in ihrer Fähigkeit zur Lysinexkretion unterschieden, wurden Kurzzeitfermentationen auf

Methionin-haltigem Minimalmedium durchgeführt (Abb. 20). Die Deletionsmutante *C. glutamicum* ATCC13032 Δ *lysEG* exkretierte - ebenso wie es für die *lysE*-Inaktivierungsmutante beobachtet worden war - kein Lysin ins Kulturmedium. Nach Transformation von *C. glutamicum* ATCC13032 Δ *lysEG* mit dem Plasmid pZ1*lysE* kam es zum Export von Lysin, obwohl ATCC13032 Δ *lysEG* pZ1*lysE* keine Kopie des *lysG*-Gens besitzt. Dieses Experiment zeigte also, daß *lysG* im Unterschied zu *lysE* nicht essentiell für den Lysinexport von *C. glutamicum* ist. ATCC13032 Δ *lysEG* pZ1*lysE* akkumulierte sogar über 200% mehr Lysin im Vergleich zum Wildtyp ATCC13032 pZ1 im Kulturmedium. Die Lysin-Exkretionsrate von *C. glutamicum* ATCC13032 Δ *lysEG* pZ1*lysE* war mit $2,62 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Zell-Trockengewicht})^{-1}$ ebenfalls um 250% erhöht im Vergleich zu der des Wildtyps mit $0,73 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Zell-Trockengewicht})^{-1}$.

Wurde dagegen zusätzlich zu *lysE* auch *lysG* im Deletionsstamm überexprimiert (*C. glutamicum* ATCC13032 Δ *lysEG* pZ1*lysEG*2,4), so wurde dreimal weniger Lysin exkretiert als im *lysG*-freien *C. glutamicum* Stamm ATCC13032 Δ *lysEG* pZ1*lysE*. Die Lysin-Exkretionsrate war im Deletionsstamm nach gemeinsamer Überexpression von *lysE* und *lysG* um mehr als die Hälfte reduziert im Vergleich zur Mutante ohne *lysG* ($1,12 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Zell-Trockengewicht})^{-1}$ bzw. $2,62 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Zell-Trockengewicht})^{-1}$). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß *lysG* bzw. das kodierte Polypeptid einen negativen Effekt auf den Lysinexport besitzt.

Der Stamm *C. glutamicum* ATCC13032 pZ1*lysE* exkretierte L-Lysin in geringerem Maße als *C. glutamicum* ATCC13032 Δ *lysEG* pZ1*lysE*. Beide Stämme unterschieden sich nur darin, daß ATCC13032 pZ1*lysE* eine chromosomal kodierte Kopie von *lysG* besitzt und daher im Gegensatz zu ATCC13032 Δ *lysEG* pZ1*lysE* ein LysG-Polypeptid bilden kann. Dieses Ergebnis bestätigte den negativen Effekt von *lysG* auf den Lysinexport. Weiterhin zeigt der Vergleich dieser beiden Stämme (ATCC13032 pZ1*lysE* bzw. ATCC13032 Δ *lysEG* pZ1*lysE*), daß der Effekt von *lysG* *in trans* vermittelt wird, d.h. der Phänotyp durch das Protein selbst, und nicht durch den kodierenden DNA-Bereich verursacht wird.

Die Lysinkonzentrationen und Lysin-Exkretionsraten von *C. glutamicum* ATCC13032 Δ *lysEG* pZ1*lysEG*2,4, *C. glutamicum* ATCC13032 pZ1*lysE* und *C. glutamicum* ATCC 13032 pZ1*lysEG*2,4 waren vergleichbar. Da sich diese drei Stämme nur in der *lysG*-

Kopienzahl unterschieden, zeigt dieses Ergebnis, daß zur Herabsetzung extrazellulärer Lysinkonzentrationen eine *lysG*-Kopie ausreichend ist, und eine erhöhte Kopienzahl von *lysG* keine weitere Reduktion der Lysinkonzentrationen und Lysin-Exkretionsraten zur Folge hat.

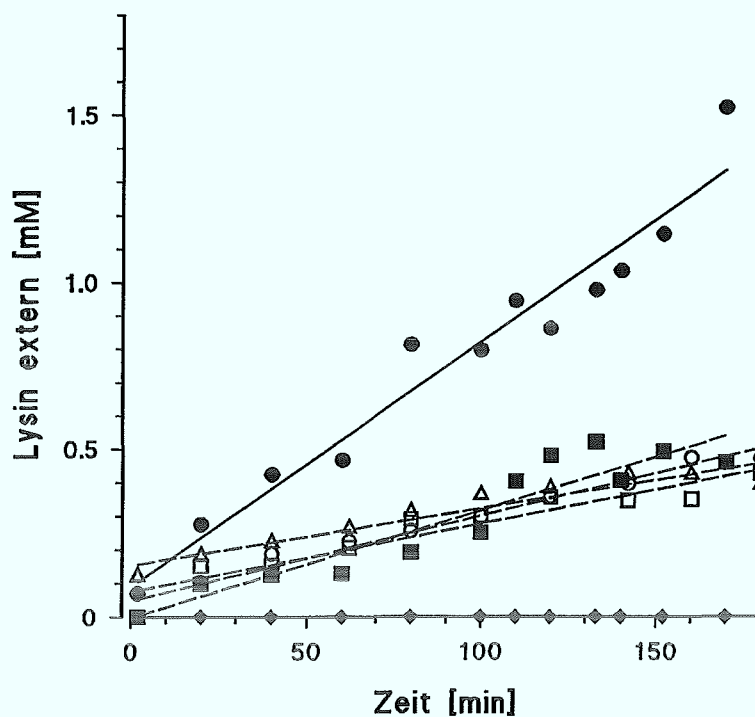


Abb. 20: Der Einfluß von LysG auf den Lysinexport von *C. glutamicum*. Dargestellt sind die extrazellulären Lysinkonzentrationen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit für die *C. glutamicum* Stämme ATCC13032 Δ lysEG pZ1/lysE (●), ATCC13032 Δ lysEG pZ1/lysEG2,4 (■), ATCC13032 pZ1/lysE (○) und ATCC13032 pZ1/lysEG2,4 (□). Zum Vergleich sind auch die Deletionsmutante *C. glutamicum* ATCC13032 Δ lysEG (◆) und der *C. glutamicum* Wildtyp ATCC13032 pZ1 (Δ) aufgeführt.

Zusätzlich zur *lysEG*-Deletionsmutante *C. glutamicum* ATCC13032 Δ lysEG wurde auch die *lysG*-Inaktivierungsmutante *C. glutamicum* ATCC13032 pEM/lysG::pEM/lysG_{int} konstruiert. Hierzu wurde ein 266 bp *Stu*I-*Bst*EII internes *lysG*-Fragment in den Inaktivierungsvektor pEM1 ligiert. Nach Konjugation von *E. coli* S17-1 pEM/lysG_{int} mit *C.*

glutamicum ATCC13032 wurden Kanamycin-resistente Transkonjuganten erhalten. Die Überprüfung von drei Transkonjuganten auf korrekte Integration des Vektors pEM/lysG_{int} in die chromosomale Kopie des *lysG*-Gens erfolgte unter der Nutzung der Polymerasekettenreaktion (Saiki *et al.*, 1985, 1988, Ehrlich, 1989). Die Analyse externer Lysinkonzentrationen und der Lysin-Exkretionsrate ergab nur geringe Unterschiede zum *C. glutamicum* Wildtyp ATCC13032 pJC1 (Abb. 21). Die Lysin-Exkretionsrate von *C. glutamicum* ATCC13032 pEM/lysG::pEM/lysG_{int} betrug 0,6 nmol min⁻¹ (mg Zell-Trockengewicht)⁻¹, die des *C. glutamicum* Wildtyps 0,73 nmol min⁻¹ (mg Zell-Trockengewicht)⁻¹. Dies bestätigte die mit der *lysEG*-Deletionsmutante erhaltenen Ergebnisse, nach denen *lysG* im Unterschied zu *lysE* nicht essentiell für den Lysinexport ist. Die Daten zur Überexpression von *lysE* im *lysEG*-Deletionsstamm bzw. im *C. glutamicum* Wildtyp zeigten einen negativen, *in trans* wirkenden Effekt von LysG auf den Lysinexport. Durch Inaktivierung von *lysG* konnte jedoch keine Steigerung des Lysinexportes erreicht werden. Dies deutet die Existenz weiterer Elemente an, die einen regulatorischen Einfluß auf den Lysinexport in *C. glutamicum* haben.

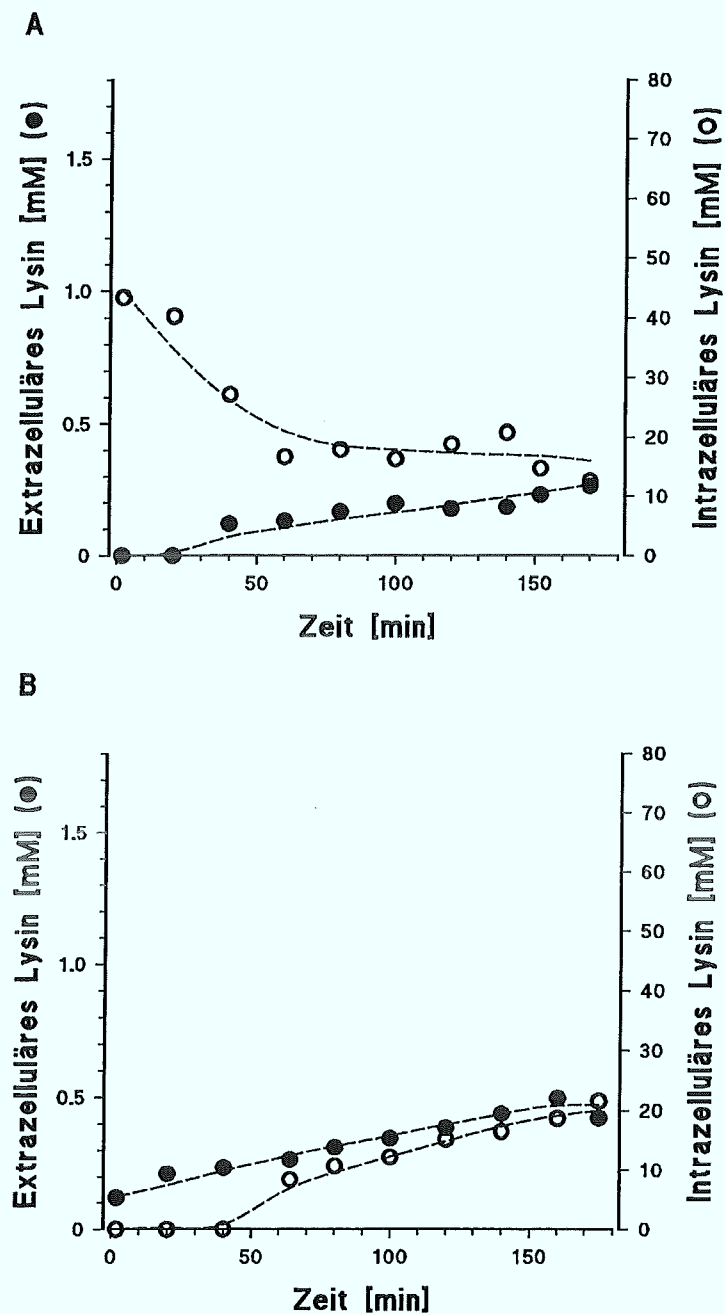


Abb. 21: Lysinexkretion der *lysG*-Inaktivierungsmutante *C. glutamicum* ATCC13032 pEM/*lysG*::pEM/*lysG*_{int}. Die Abbildung zeigt die Lysinkonzentrationen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit vergleichend für die *lysG*-Inaktivierungsmutante (A) und den Wildtyp *C. glutamicum* ATCC13032 pJC1 (B). (●) extrazelluläres Lysin, (○) intrazelluläres Lysin

3.3 Isolierung und Sequenzanalyse von *lysE*- und *lysG*-Allelen verschiedener *C. glutamicum* Stämme

Zur Prüfung der Hypothese, daß Lysin-Produktionsstämme Mutationen im Gen des Lysinexportcarriers tragen (Bröer *et al.*, 1993), wurde das *lysEG*-Gencluster aus drei verschiedenen Lysin-Produktionsstämmen isoliert. Zusätzlich wurde das Gencluster auch aus dem *C. glutamicum* Wildtyp ATCC13032 isoliert und sequenziert, da bisher nur die Sequenz des restriktionsdefekten Stammes R127 bestimmt wurde. Die Isolierung und Sequenzierung des Genclusters aus dem Lysinexport-defekten Stamm *C. glutamicum* NA8 sollte die molekulare Erklärung für den beobachteten Exportdefekt liefern.

Zur Klonierung von *lysE* und *lysG* mittels *plasmid rescue* wurde der bereits zur Inaktivierung des *lysG*-Gens konstruierte Vektor pEM $lysG_{int}$ verwendet. Zuvor wurde jedoch die in der multiplen Klonierungsstelle des Vektors vorhandene *Bam*HI-Schnittstelle entfernt. Hierdurch war es nämlich möglich, das *plasmid rescue* unter Nutzung der *Bam*HI-Schnittstellen, die das 2,4 kb *lysEG*-Fragment flankieren, durchzuführen. Der erhaltene Vektor pEM2 $lysG_{int}$ wurde mittels Konjugation von *E. coli* S17-1pEM2 $lysG_{int}$ nach *C. glutamicum* MH20-22B, DG52-5, DM346-1, ATCC13032 und NA8 transferriert (Abb. 22). Da pEM2 $lysG_{int}$ keinen Replikationsursprung für *C. glutamicum* trägt, wurde durch das Kanamycin-haltige Konjugationsmedium auf die Integration des Vektors ins Genom von *C. glutamicum* selektioniert. Aus drei parallelen Konjugationsansätzen wurden pro *C. glutamicum* Stamm jeweils 10-100 Transkonjuganten erhalten. Aus je zwei Transkonjuganten pro *C. glutamicum* Stamm wurde die chromosomale DNA isoliert, mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI vollständig geschnitten, und dann religiert. Nach Transformation von *E. coli* DH5 α mit diesen Ligationsansätzen wurden Kanamycin-resistente Transformanten erhalten. Plasmidisolierungen aus diesen Transformanten wurden mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RI überprüft. In allen Fällen wurden die erwarteten Bandenmuster für die aus dem Integrationsvektor pEM2 $lysG_{int}$ und dem 2,4 kb *Bam*HI-Fragment bestehenden rekombinanten Plasmide festgestellt. Jeweils ein rekombinantes Plasmid pro *C. glutamicum* Ausgangsstamm wurde dann zur Sequenzierung des isolierten 2,4 kb *Bam*HI-Fragmentes eingesetzt.

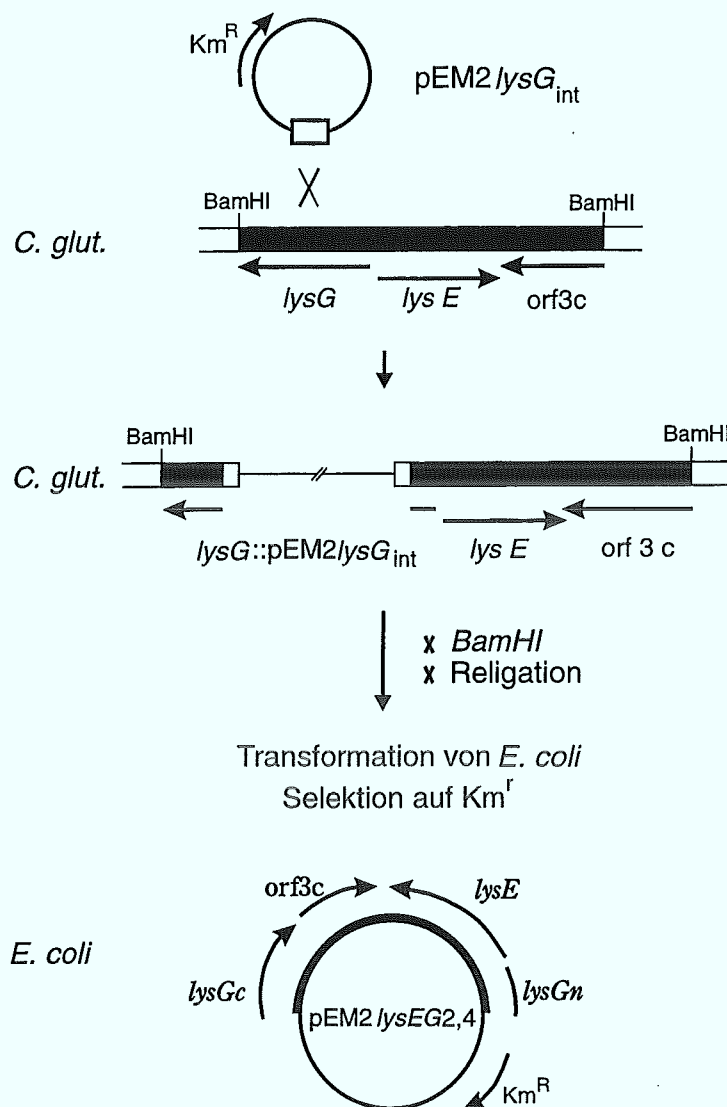


Abb. 22: Schema zur Isolierung von Allelen des *lysEG*-Genclusters mittels *plasmid rescue* aus verschiedenen *C. glutamicum* Stämmen. Dargestellt ist die Integration von *pEM2/lysG_{int}* in das Genom von *C. glutamicum* über homologe Rekombination und das anschließende *plasmid rescue*. Dazu wurde aus den Kanamycin-resistenten Transkonjuganten die chromosomale DNA isoliert, mit *Bam*HI geschnitten und religiert. Mit diesen Ligationsansätzen wurde *E. coli* DH5 α transformiert. Aus den Kanamycin-resistenten *E. coli* Transformanten konnten die rekombinanten Vektoren *pEM/lysEG2,4* isoliert werden. *Km^r*, Kanamycin-Resistenz, *lysG_n*, *lysG_c*, *orf3c*, für den amino- bzw. carboxy-terminalen Bereich des abzuleitenden Polypeptides kodierende Sequenz.

Die Nukleotidsequenz des *lysEG*-Genclusters von *C. glutamicum* ATCC13032 war identisch zu der des restriktionsdefekten Stammes *C. glutamicum* R127. Für *C. glutamicum* NA8, der als Lysinexport-defekter Stamm isoliert worden war, und der die Klonierung des *lysE*-Gens möglich gemacht hatte, zeigte sich ein einziger Nukleotidaustausch zur Wildtyp-Sequenz. Hier führte die Mutation G¹⁵⁹⁴→A¹⁵⁹⁴ in der dritten Position des Codons TGG zur Bildung des Stoppcodons TGA, und damit zum vorzeitigen Translationsende. In *C. glutamicum* NA8 wird also ein um 43 Aminosäuren verkürztes, nur noch 193 Aminosäuren großes LysE-Polypeptid gebildet.

ATCC 13032	5'- ¹⁵⁸⁰	GCAAGCCTGATCT <u>TGG</u> TCCCG	¹⁶⁰⁰ -3'
	AS 189	A S L I W F P	
NA8	5'- ¹⁵⁸⁰	GCAAGCCTGATCT <u>GAT</u> TCCCG	¹⁶⁰⁰ -3'
	AS 189	A S L I - - -	

Abb. 23: Identifikation der Mutation im *lysE*-Gen von *C. glutamicum* NA8, die zum Verlust der Lysinexkretion dieses Stammes führt. Transition des Guanins¹⁵⁹⁴ zu Adenin¹⁵⁹⁴ in der dritten Position eines Triplets führt zur Entstehung eines Stopp-Codons und damit zur Bildung eines um 43 Aminosäuren verkürzten LysE-Polypeptides.

Überraschenderweise wurde für die Lysin-Produktionsstämme *C. glutamicum* MH20-22B, DG52-5 und DM346-1 keine Mutation in den *lysE*-Allelen festgestellt. Nicht einmal Nukleotidaustausche, die zu konservierten Aminosäure-Austauschen führen, waren vorhanden. Dieses Ergebnis widerlegt also die bisherige Hypothese, nach der veränderte pH- und Membranpotential-Abhängigkeiten des Lysinexportes von Produktionsstämmen auf mutierte *lysE*-Allele zurückzuführen sind (Bröer *et al.*, 1993). Die weitere Sequenzierung der 2,4 kb *Bam*HI-Fragmente ergab, daß auch die *lysG*-Allele und die intergenen Regionen zwischen *lysE* und *lysG* in den Produktionsstämmen unverändert zu denen des *C. glutamicum* Wildtypes waren. Damit können die veränderten Lysinexport-Charakteristika der Produktionsstämme auch nicht mit Mutationen des potentiellen Lysinexport-Regulators LysG erklärt werden. Bislang gibt es keine Hinweise auf eine

verstärkte Expression von *lysE* in diesen Lysin-Produktionsstämmen; eine verstärkte LysE-Bildung kann aber auch nicht ausgeschlossen werden.

3.4 Die physiologische Funktion des Lysinexportcarriers LysE

Als Bodenbakterium muß *C. glutamicum* in der Lage sein, auf komplexen, in Zusammensetzung und Konzentration variablen Medien zu wachsen, und z.B. im Boden vorhandene Proteine bzw. deren Abbauprodukte als Nahrungsquelle zu nutzen. Solch eine Nutzung setzt das Vorhandensein spezifischer Permeasen für Oligo-, Tri- oder Dipeptide voraus, wie sie für *E. coli* (Higgins & Gibson, 1986) und *L. lactis* (Mierau *et al.*, 1994, Bosman *et al.*, 1990; Nardi *et al.*, 1991) bekannt sind und in letzter Zeit auch für die Bodenbakterien *B. subtilis* (Slack *et al.*, 1993, 1995) und *C. glutamicum* (Erdmann *et al.*, 1993) nachgewiesen wurden. Nach Aufnahme der Peptide in die Zelle und zellinterner Hydrolyse stehen die Aminosäuren für den anabolen Stoffwechsel oder zur katabolen Verwertung zur Verfügung. Bei verschiedenen Mikroorganismen (Payne & Smith, 1994), einschließlich *C. glutamicum* (Erdmann *et al.*, 1993), konnte auch ein Efflux von Aminosäuren nach Aufnahme von Peptiden beobachtet werden. Zur Untersuchung der physiologischen Funktion des Lysinexportcarriers wurde geprüft, wie die Deletionsmutante ATCC13032 $\Delta lysEG$ auf verschiedenen Nährmedien wächst. BHI-Komplexmedium wurde als nährstoffreiches Vollmedium verwendet. Das Medium CGXII diente als definiertes Minimalmedium. Weiterhin wurde CGXII-Mineralsalzmedium mit dem Dipeptid Lysyl-Alanin als Zusatz verwendet. Die Gabe von Lysyl-Alanin war deshalb von besonderem Interesse, da es sich hier um eine Substanz handelt, von der nur eine Komponente verstoffwechselt werden kann (Alanin). Für die zweite Komponente, L-Lysin, existieren in *C. glutamicum* keine Abbauwege (Nakayama, 1985). Als Kohlenstoffquelle enthielten die CGXII-Minimalmedien 4 % Glukose. Wie aus der Abbildung 24 hervorgeht, wuchs die Deletionsmutante *C. glutamicum* ATCC13032 $\Delta lysEG$ auf allen drei Medientypen langsamer als der *C. glutamicum* Wildtyp. Dies konnte mit erhöhten zellinternen Lysinkonzentrationen der Deletionsmutante korreliert werden. Während im *C. glutamicum* Wildtyp bis 50 mM L-Lysin intrazellulär vorlagen, akkumulierte *C. glutamicum* ATCC13032 $\Delta lysEG$ auf dem Komplexmedium und dem CGXII-Minimalmedium etwa 200 mM - 300 mM L-Lysin.

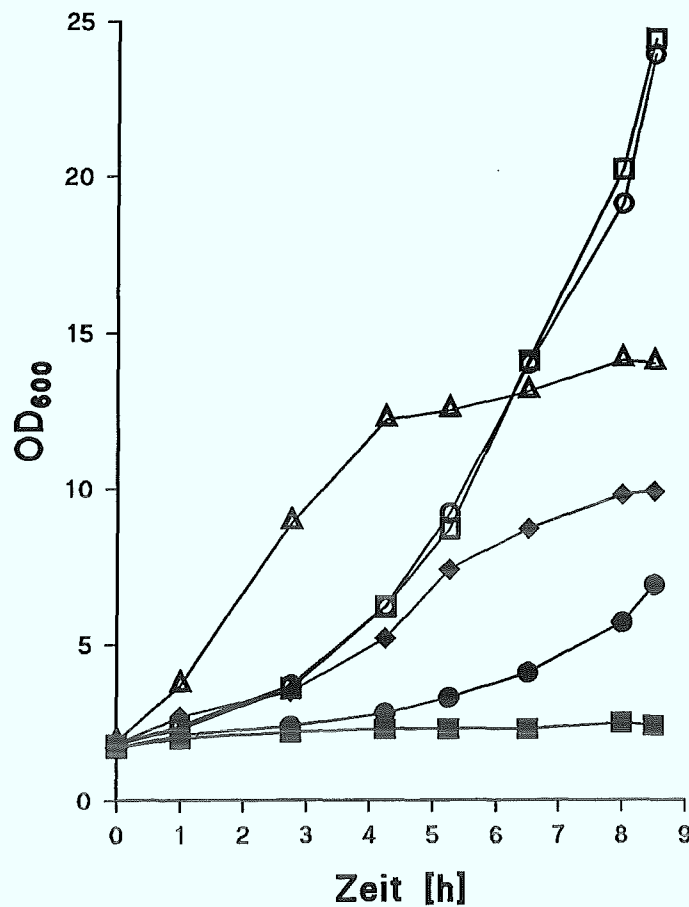


Abb. 24: Wachstum der Deletionsmutante *C. glutamicum* ATCC13032 Δ *lysEG* auf verschiedenen Nährmedien. Dargestellt ist ein Vergleich des Wachstums der *lysEG*-Deletionsmutante mit dem Wachstum des *C. glutamicum* Wildtypes ATCC13032. Geschlossene Symbole stehen für den Deletionsstamm ATCC13032 Δ *lysEG*, offene Symbole für den Wildtyp ATCC13032. (◆,Δ) BHI-Komplexmedium, (●,○) CGXII-Minimalmedium, (■,□) CGXII-Minimalmedium mit Zusatz von 1 mM Dipeptid Lysyl-Alanin

Der größte Unterschied zwischen *C. glutamicum* ATCC13032 Δ *lysEG* und *C. glutamicum* ATCC13032 zeigte sich auf Lysyl-Alanin-haltigem Minimalmedium (Abb. 25). Während der Wildtyp mit einer Rate von $0,42 \text{ h}^{-1}$ wuchs, konnte die Deletionsmutante

C. glutamicum ATCC13032 $\Delta lysEG$ auf diesem Medium überhaupt nicht wachsen. Dabei war dieser Wachstumsverlust spezifisch für das Dipeptid Lysyl-Alanin, da die *lysEG*-Deletionsmutante auf Arginyl-Alanin (Spies, persönliche Mitteilung) und auf Isoleucyl-Alanin (Burkovski, persönliche Mitteilung) wachsen konnte. Die Deletionsmutante und der Wildtyp nahmen aber beide das Dipeptid Lysyl-Alanin im Verlauf der Kultivierung aus dem Medium auf. Im Medium von *C. glutamicum* ATCC13032 war bereits nach einer Stunde kein Nachweis von Lysyl-Alanin möglich. Im Medium des Deletionsstammes war die Abnahme der Dipeptid-Konzentrationen langsamer. Erst nach 4,5 Stunden war kein Lysyl-Alanin mehr nachweisbar. Der Wildtyp exkretierte bis zu 1,5 mM L-Lysin, während für den Deletionsstamm die externen Lysinkonzentrationen unter 0,5 mM lagen. Eine Analyse der zellinternen Lysinkonzentrationen zeigte, warum der *lysEG*-Deletionsstamm auf Medium mit Lysin-haltigem Dipeptid nicht wachsen konnte. Während die zellinternen Lysinkonzentrationen im Wildtyp bei 20 mM bis 30 mM lagen, akkumulierte L-Lysin im Deletionsstamm bis 1100 mM. Mit diesem Gradienten, der in der Deletionsmutante für externes und internes Lysin über die Cytoplasmamembran aufgebaut wurde, konnte die Diffusionskonstante für Lysin berechnet werden. Die Konstante $k=1,9 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ verdeutlicht, daß eine Diffusion von Lysin über die Cytoplasmamembran vernachlässigbar gering ist. Diese Ergebnisse sind so zu interpretieren, daß das Dipeptid Lysyl-Alanin offenbar auch bei zellintern erhöhten Lysinkonzentrationen weiter aufgenommen und hydrolysiert wird. Dies hat im Deletionsstamm *C. glutamicum* ATCC13032 $\Delta lysEG$ mit fehlendem Lysinexport und ohne Möglichkeit zur katabolen Verwertung von L-Lysin (Nakayama *et al.*, 1985) eine massive Akkumulation von Lysin zur Folge. Für die Aminosäure Alanin wurden dagegen vergleichbare Werte für den Wildtyp und die Deletionsmutante um 50 mM zellintern und 0,2 mM extern nachgewiesen. Alanin wurde also durch beide *C. glutamicum* Stämme sowohl katabol verwertet als auch exkretiert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Existenz eines funktionierenden Exportcarriers für Aminosäuren, die nicht zu verstoffwechseln sind, essentiell für das Wachstum im natürlichen Habitat ist. Vor allen Dingen scheint dies bei Wachstum auf peptidhaltigem Medium zu gelten, wenn auf der Stufe des Importes keine Selektion auf bestimmte Peptidsorten möglich ist.

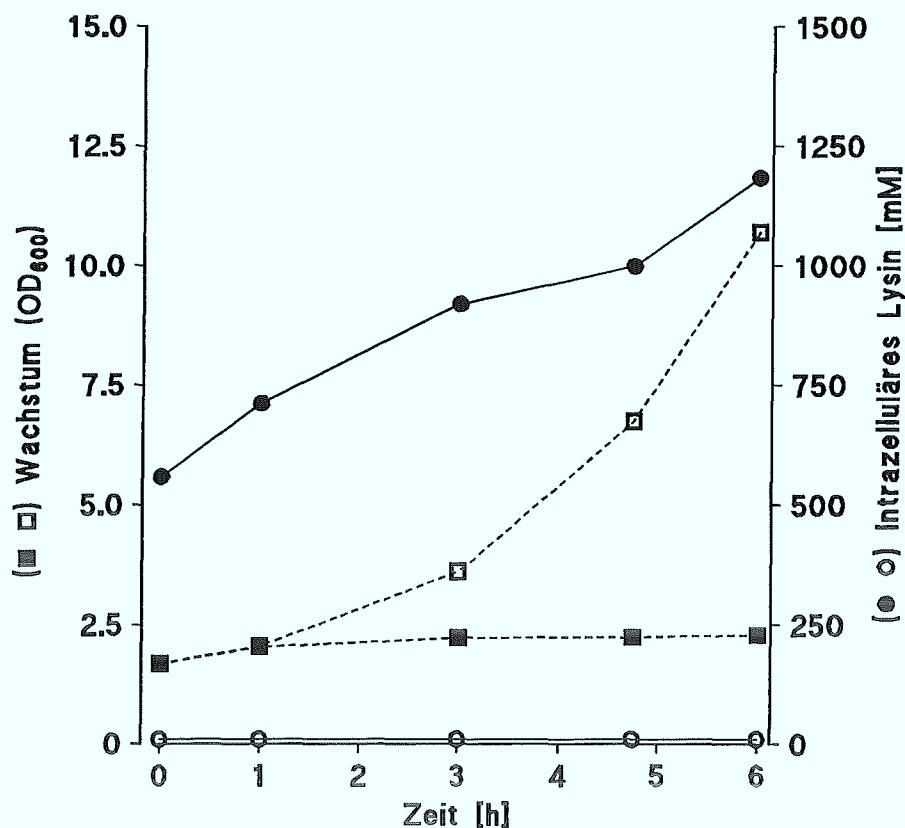


Abb. 25: Einfluß des Dipeptides Lysyl-Alanin auf das Wachstum und die zellinterne Lysinakkumulation von *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 Δ lysEG. Dargestellt ist ein Vergleich von Wachstum (■, □) und zellinternen Lysinkonzentrationen (●, ○) für die Deletionsmutante ATCC13032 Δ lysEG (geschlossene Symbole) und den Wildtyp *C. glutamicum* ATCC13032 (offene Symbole) auf CGXII-Minimalmedium mit 4 % Glukose als Kohlenstoffquelle und dem Zusatz von 1 mM Dipeptid Lysyl-Alanin.

IV. Diskussion

1. Die Isolierung des Gens für den Lysinexportcarrier von *C. glutamicum*

Für das Ziel, das Gen für den Lysinexportcarrier von *C. glutamicum* zu isolieren, war der entdeckte Methionineffekt grundlegend. Damit wurde ein biologisches System etabliert, um die Lysinexkretion durch den Wildtyp von *C. glutamicum* zu erreichen. Der Zusatz von L-Methionin ins Medium hat eine herabgesetzte Homoserindehydrogenase-Aktivität und eine zellinterne Threoninlimitation zur Folge. Dies führt zur Verringerung bzw. Aufhebung der Hemmung der Aspartatkinase (Cremer *et al.*, 1988) und damit zur erhöhten Lysinbildung. Ein zweiter Effekt besteht auf der Ebene Aspartatsemialdehyd-umsetzender Reaktionen. Die Methionin-bedingte Repression der Homoserindehydrogenase (Follettie *et al.*, 1988) führt zu einer verstärkten Bildung von Dihydrodipicolinat aus Aspartatsemialdehyd durch die Dihydrodipicolinatsynthase. Hierdurch wird eine weitere Steigerung der Lysinbildung erreicht (Cremer *et al.*, 1988). Die verstärkte Lysinbildung in Threoninlimitierten Zellen von *C. glutamicum* ist bekannt (Shio & Sano, 1969). Allerdings wurden damals Threonin-auxotrophe Mutanten von *C. glutamicum* zur Lysinproduktion verwendet. Das Besondere des Methionineffektes ist es, reversibel Veränderungen der zellinternen Threoninkonzentrationen und damit der Lysinbildung im Wildtyp von *C. glutamicum* erreichen zu können. Dies ermöglichte es, bei Methioninzusatz mutagenisierte Klone des restriktionsdefekten Stammes *C. glutamicum* R127 auf Verlust der Lysinexkretion zu prüfen. Durch Kultivierung unter nicht-induzierten Bedingungen (ohne Methioninzusatz) wurde eine mögliche toxische Akkumulation von L-Lysin in einem exkretorisch defekten Stamm vermieden. Mit diesem System gelang die Isolierung der Lysinexport-defekten Mutante *C. glutamicum* NA8. Dieser Stamm exkretiert kein L-Lysin mehr, akkumuliert aber zellintern bis 150 mM L-Lysin. Der carriervermittelte Export von Isoleucin und Glutamat (Krämer, 1994 b) ist in *C. glutamicum* NA8 vergleichbar zum Ausgangsstamm, was die Spezifität des Exportdefektes belegt. Die unveränderte Lysinaufnahme von *C. glutamicum* NA8 lieferte darüber hinaus einen genetischen Beweis für die separate Existenz von Lysinaufnahme- und Lysinexportcarrier in *Corynebacterium glutamicum*. Umgekehrt konnten Seep-Feldhaus *et al.* (1991) zeigen, daß der Lysinexport in einem Stamm mit deregulierter Aspartatkinase und inaktivem Lysinaufnahme-Carrier unverändert ist.

Die Kopienzahl des Klonierungsvektors kann eine kritische Größe zur Klonierung von Genen für Membranproteine darstellen. Denn eine erhöhte Zahl von Transportern und deren unkontrollierter Einbau in die Membran können das Membranpotential beeinflussen und wichtige Transportvorgänge stören (Eckert & Beck, 1989). Daher wurden zur homologen Komplementation Genbanken mit zwei Vektoren, die sich in ihrer Kopienzahl unterschieden (5 bzw. 50 Kopien / Zelle), direkt in *C. glutamicum* NA8 aufgebaut. Die Klonierung des Lysinexportcarrier-Gens gelang mit dem Vektor pJC1, der mit ca. 50 Kopien / Zelle repliziert (Cremer *et al.*, 1990). In *C. glutamicum* liegt das Gen für den Lysinexportcarrier benachbart zu einem Gen für ein Regulatorprotein, unter dessen Kontrolle es sich befindet. Die vermutlich negative Kontrolle der Expression des Exporter-Gens durch diesen Regulator (vgl. 4.3) scheint eine gemeinsame Klonierung von Exporter und Regulator gefördert zu haben. Anzeichen hierfür ist, daß beide aus dem Komplementationstest isolierten Plasmide sowohl *lysE* als auch *lysG* tragen, obwohl mehrere Restriktionsschnittstellen zwischen *lysE* und *lysG* theoretisch auch zur separaten Klonierung beider Gene hätten führen können.

2. Der Lysinexportcarrier LysE

Biochemisch konnte der Export der Aminosäure Lysin durch *C. glutamicum* als ein sekundärer Transportmechanismus charakterisiert werden (Bröer & Krämer, 1991 b). Entsprechend wurde auf dem komplementierenden DNA-Fragment ein Gen erwartet, dessen abgeleitetes Polypeptid Ähnlichkeit zu sekundären Aminosäure-Aufnahme-Carriern oder zu sekundären Exportern toxischer Substanzen zeigt. Vertreter der APC-Familie (*amino acids, polyamines, cholines*, Saier, 1994), die die Aufnahme von Aminosäuren, Polyaminen und Cholin katalysieren, ähneln strukturell Vertretern der MFS-Familie (*major facilitator superfamily*, Marger & Saier, 1993), die z.B. den Efflux von Tetracyclin (TetA, Aldema *et al.*, 1996) vermitteln. Beide Carrier-Familien besitzen eine durchschnittliche Größe von 500 Aminosäuren und haben die Fähigkeit, zwölf transmembrane Helices mit einer deutlich hydrophilen Loop-Region zwischen der 6. und 7. Helix auszubilden. Die sogenannte Smr-Familie (*staphylococcal multidrug resistance*, Nikaido, 1994) stellt die zweite Gruppe sekundärer Exporter toxischer Substanzen dar. Namengebender Vertreter dieser Familie ist das Polypeptid Smr (QacC) aus *Staphylococcus aureus* (Paulsen *et al.*, 1995), das mit einer Länge von 107 Aminosäuren

nur vier potentielle transmembrane Helices bildet, und den Export von quartären Ammoniumverbindungen und Farbstoffen vermittelt. Überraschenderweise besitzt jedoch das abgeleitete Polypeptid des in dieser Arbeit klonierten *lysE*-Gens weder auf molekularer noch auf struktureller Ebene Ähnlichkeit zu den genannten Transportern. Mit nur 236 Aminosäuren ist LysE ein kleines Polypeptid, das stark hydrophob ist und sechs potentielle transmembrane Helices ausbildet. Nach Größe des Polypeptides und Anzahl der Helices ist LysE den mitochondrialen Carriern mit einer durchschnittlichen Größe von 300 Aminosäuren und sechs transmembranen Helices (*mitochondrial carrier family*, Kuan & Saier, 1993) oder den *major intrinsic proteins* (MIP-Familie, Saier, 1994) ähnlicher. Bekannter prokaryotischer Vertreter der letzten Gruppe ist der Glycerin-Diffusions-Facilitator (GlpF) aus *E.coli*, der aus 281 Aminosäuren besteht und ebenfalls sechs potentielle hydrophobe α -Helices bildet (Weissenborn *et al.*, 1992). Unterschiede finden sich in den Transportmechanismen, mit denen die Carrierproteine der MIP- und MCF-Familie ihre Substrate über die Membran bewegen. Während GlpF die erleichterte Diffusion von Glycerin und damit einen Liganden-spezifischen Uniportprozeß ermöglicht, arbeiten mitochondriale Transportproteine wie der Aspartat-Glutamat-Carrier aus Rinderherzmitochondrien als typische Antiporter (Dierks *et al.*, 1990 a, b). Allerdings kann der Transportmechanismus des Aspartat-Glutamat-Carriers durch chemische Modifikation mit sulfhydrierenden Substanzen auch in einen Kanal-ähnlichen Uniport überführt werden (Dierks *et al.*, 1990 a, b). Auch für einen Substrat:H⁺-Symporter wie die β -Galactosid-Permease aus *E.coli* (LacY) konnte gezeigt werden, daß ein Aminosäure-Austausch zu einem Kanal-ähnlichen Uniportprozeß führen kann (Nikaido & Saier, 1992). Daher ist eine Ähnlichkeit des Lysinexporters als Lysin:OH⁻-Symporter zu MIP- oder MCF-Mitgliedern prinzipiell denkbar. Es finden sich jedoch auf Primärstrukturebene weder Identitäten von LysE zu diesen Transportproteinen noch zu anderen Proteinen bekannter Funktion. Intensive Vergleiche verschiedener Segmente von LysE ergaben zudem keinerlei intramolekulare Homologien, wie es z.B. für die mitochondriale Carrierfamilie mit der Triplikation einer Zweierhelix oder für die MIP-Familie mit der Duplikation einer Dreierhelix gezeigt werden konnte (Reizer *et al.*, 1991, Kuan & Saier, 1993). Damit kann auch nicht auf eine analoge evolutionäre Vorgeschichte von LysE zu Transportproteinen mit sechs transmembranen Helices geschlossen werden. Bisher ist mit YGGA_ECOLI (Alefounder & Perham, 1989) nur ein einziges Polypeptid bekannt, das auf Sequenzebene Ähnlichkeiten zu LysE aus *C.glutamicum* zeigt. Die Funktion dieses Polypeptides ist noch unbekannt. Somit lassen die Besonderheiten von LysE in Bezug auf

seine Primär- und Sekundärstruktur vermuten, daß es sich hier um den ersten Vertreter einer neuen Translokatorfamilie handelt.

Mit dem Sekundärstrukturvorhersage-Programm PHD.htm Neuronal Net (Rost *et al.*, 1995) wurde die mögliche Position und Ausdehnung der sechs potentiellen transmembranen Segmente von LysE ermittelt. Auffällig sind die sehr kurzen Amino- und Carboxytermini des LysE-Polypeptides und ein großer hydrophiler Loop, der von Aminosäure 94 bis zur Aminosäure 145 reicht, und somit 20% des gesamten Polypeptides ausmacht.

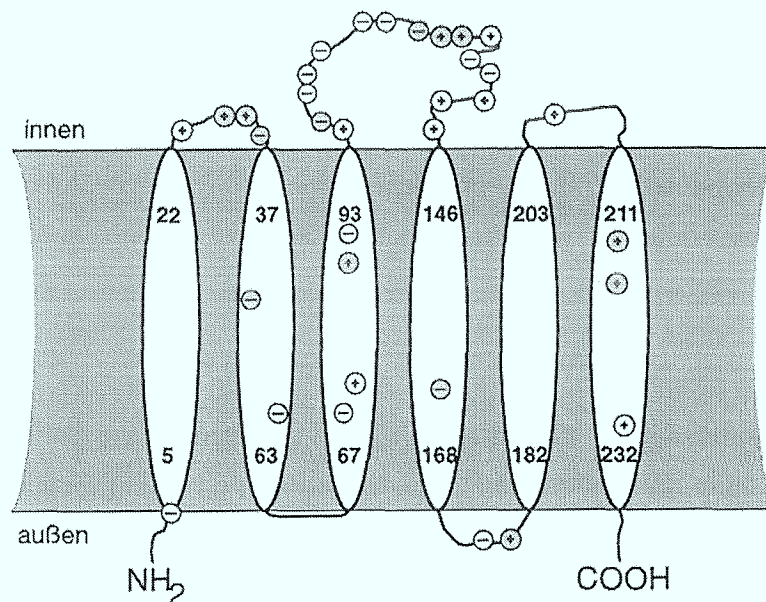


Abb. 26: Hypothetisches Modell für die Topologie des Lysinexportcarriers LysE entsprechend dem Sekundärstrukturvorhersage-Programm Phd.htm Neuronal Net (Rost *et al.*, 1995). Ladungen der Aminosäure-Seitenketten sind mit + oder mit - markiert. Grau unterlegt sind geladene Aminosäuren, die identisch sind zum einzigen, zu LysE ähnlichen Polypeptid YGGA_ECOLI bzw. konservierte Aminosäure-Austausche darstellen.

Ein anderes Strukturvorhersage-Programm, TMP von Persson & Argos (1994), spaltete die in der Abbildung 26 als vierte Helix vorhergesagte Region mit angrenzenden Bereichen in zwei Helices auf, so daß sieben potentielle transmembrane Bereiche vorlägen. Die Anordnung dieser sieben α -Helices ist jedoch nicht in Übereinstimmung zur Innen-Positiv-Regel nach Gunnar von Heijne (1992) möglich. Auch Vorhersagen flexibler Proteinregionen (Brooks *et al.*, 1985) und unpolarer α -Helices (Engelmann *et al.*, 1986) favorisieren das Sechs-Helix-Modell. Die mit dem Programm PHD.htm vorhergesagten sechs α -Helices von LysE sind zudem in völliger Übereinstimmung zur Innen-Positiv-Regel anzuordnen, wenn Amino- und Carboxyterminus extrazellulär, und der hydrophile Loop cytoplasmatisch lokalisiert sind. Obwohl diese Carriertopologie natürlich noch experimentell überprüft werden muß, weist dieses hypothetische Modell Merkmale auf, die mit der Funktion in Einklang zu bringen sind. Denkbar wäre eine Interaktion der zwei negativen Nettoladungen der hydrophilen Loop-Region mit den positiven Ladungen eines Lysinmoleküls. Auch wäre die Anordnung der hydrophilen Loop-Region als Membran-integrale Struktur möglich, so daß innerhalb einer hydrophoben Carrier-Umgebung eine kationische Pore gebildet wird. Ein solches Modell konnte für den mitochondrialen ADP/ATP-Carrier experimentell belegt werden, und es konnte sogar eine Korrelation zwischen Transportfunktion und Lokalisation der Loop-Region gezeigt werden (Majima *et al.*, 1995). Interessanterweise ist diese 52 Aminosäuren große, hydrophile Loop-Region in dem einzigen zu LysE ähnlichen Polypeptid - YGGA_ECOLI - nicht vorhanden, sondern lediglich eine mit 13 Aminosäuren viel kürzere hydrophile Region.

Aus der Lysinexport-defekten Mutante *C. glutamicum* NA8 wurde mittels *plasmid rescue* das *lysE*-Gen isoliert. Die Sequenzanalyse ergab, daß nur ein Nukleotidaustausch zur *lysE*-Sequenz des Ausgangsstammes *C. glutamicum* R127 vorhanden war. Hierdurch wurde das Tryptophan-kodierende Triplett TGG an Position 578 des *lysE*-Gens (Position 1594 des *lysEG*-Genclusters) in das Stoppcodon TGA überführt. Die Folge dieses Nukleotidaustausches ist das vorzeitige Translationsende und die Bildung eines mit nur noch 193 Aminosäuren um 43 Aminosäuren verkürzten, inaktiven Carrierproteins. Dieses Ergebnis bestätigt die biochemische und physiologische Charakterisierung von *C. glutamicum* NA8 auf molekularer Ebene. Es ist zudem eine Erklärung, wie ein einzelner Nukleotidaustausch in einem Carrier-Allel zur vollständigen Inaktivierung des Proteins führen kann. In *E. coli* wurden bei der Suche nach essentiellen Aminosäuren für die Carrieraktivität 300 der 417 Aminosäure-Reste von *lacY* durch Cystein ausgetauscht.

Interessanterweise zeigten mehr als 95% aller Mutanten noch β -Galactosid-Aufnahme (Kaback *et al.*, 1994). Insgesamt konnten aus diesen und weiteren Experimenten nur drei Aminosäuren identifiziert werden, die wichtig für die Transportaktivität von LacY sind (Kaback *et al.*, 1994). Hieraus wurde abgeleitet, daß individuelle Aminosäure-Austausche keine globalen Konformationswechsel von Carrierproteinen zur Folge haben (Kaback, 1994). Interessant wird es sein zu prüfen, ob das verkürzte LysE-Protein von *C. glutamicum* NA8 noch in die Membran integrieren kann. Sequentielle Verkürzungen von LacY ergaben, daß Deletionen in der Transmembranhelix XII zu einem vollständigen Verlust der Transportaktivität führen. Weitere Arbeiten deuten darauf hin, daß nicht der Carboxyterminus, sondern der letzte "turn" der Transmembranhelix XII wichtig für eine stabile Integration von LacY in die Membran ist (McKenna *et al.*, 1991, 1992, Kaback *et al.*, 1994). Dem verkürzten LysE-Derivat von *C. glutamicum* NA8 fehlen die letzten beiden Transmembrandurchgänge (Abb. 26). Damit bietet dieses verkürzte Derivat von LysE eine erste Möglichkeit zu prüfen, ob auch für LysE die terminale Helix zur Integration in die Membran notwendig ist.

3. Der Regulator des Lysinexportes, LysG

Benachbart zu *lysE* liegt das Gen *lysG* (*governing L-lysine export*), dessen abzuleitendes Polypeptid alle typischen Eigenschaften eines prokaryotischen Transkriptionsregulators der LTTR-Familie (*LysR-type transcriptional regulators*) besitzt (Schell, 1993). Neben hohen Sequenzähnlichkeiten zu IciA, einem Mitglied der LTTR-Familie, zeichnet sich LysG vor allem durch ein aminoterminal Helix-Turn-Helix Motiv als potentielles DNA-Bindungsprotein aus. Stromaufwärts vom LysE-Translationsstart befindet sich die partiell palindromische Region CTGAN₇TCAG (-72 bp → -58 bp), die als typische Erkennungssequenz zur Bindung eines LysR-ähnlichen Regulators dienen kann. Außerdem werden die beiden Gene *lysE* und *lysG* divergent transkribiert, was ebenfalls charakteristisch für die meisten Mitglieder der LTTR-Familie ist (Schell, 1993). Diese stetig wachsende Gruppe zumeist negativ autoregulativer, positiver Transkriptionsregulatoren kontrolliert Zielgene, deren Proteine unterschiedlichste Funktionen besitzen. So werden Gene, die Proteine zum Aromaten-Abbau (Neidle *et al.*, 1989, Romero-Arroyo *et al.*, 1995) kodieren, ebenso durch LysR-ähnliche Regulatoren kontrolliert wie Gene für Aminosäure-

biosynthese-Enzyme (Stragier *et al.*, 1983b). Bisher existiert mit *nhaA* aus *E. coli* (früher: *ant*), einem Gen für einen Na^+/H^+ -Antiporter, jedoch erst ein einziges Beispiel, wo ein Translokator-Gen durch einen LysR-ähnlichen Regulator (NhaR, früher: AntO) kontrolliert wird (Rahav-Manor *et al.*, 1992, Carmel *et al.*, 1994). Ein weiteres Charakteristikum der LysR-ähnlichen Regulatoren ist ihre Wirkungsweise in Abhängigkeit von Induktormolekülen. Für NhaR, den Regulator des Natrium-Protonen-Antiporters NhaA aus *E. coli*, ist Natrium der Induktor (Carmel *et al.*, 1994). Auch bei einer anderen Gruppe von Transkriptionsregulatoren, die wie MerR Schwermetall-detoxifizierende Systeme kontrollieren, stellt die zu transportierende Substanz gleichzeitig das Induktormolekül dar (Summers, 1992). Entsprechend könnte Lysin das Effektormolekül für LysG darstellen. Dies würde eine Exkretion von Lysin nur nach zellinterner Lysinakkumulation gewährleisten. Weniger sinnvoll wäre beispielsweise Diaminopimelat, der unmittelbare Vorläufer des Lysins in der Biosynthese, als Effektormolekül für LysG. Dies könnte zu einem verstärkten Lysinexport führen, obwohl intrazelluläres Lysin nicht akkumuliert vorliegt. Tatsächlich konnte eine zweifache Steigerung der Lysinexport-Aktivität in *C. glutamicum* mit erhöhten cytosolischen Lysinkonzentrationen korreliert werden, wobei allerdings auch die Konzentrationen anderer Aminosäuren verändert waren (Erdmann *et al.*, 1993).

Zur Analyse der Wirkungsweise von LysG auf den Lysinexport in *Corynebacterium glutamicum* wurden Defektmutanten von *lysG* und *lysE* konstruiert, und auch die Überexpression von *lysE* einzeln oder in Kombination mit *lysG* untersucht. Hierbei zeigte sich, daß die Lysinexkretion von *C. glutamicum* auch ohne funktionstüchtiges LysG-Protein möglich war. LysG ist also im Unterschied zu LysE nicht essentiell für den Lysinexport von *C. glutamicum*. Die Anwesenheit einer Kopie des *lysG*-Gens war ausreichend, um die nach Überexpression von *lysE* erreichte Steigerung der Lysin-Exkretionsrate abzusenken. Die Verminderung der Lysin-Exkretionsrate war unabhängig davon, ob die Genkopie chromosomal oder Plasmid-kodiert vorlag. Dies zeigt, daß der Phänotyp durch das von *lysG* kodierte Protein, und nicht durch den kodierenden DNA-Bereich verursacht wird. Hieraus kann, unter Berücksichtigung der sich aus den Sequenzinformationen abzuleitenden Daten, gefolgert werden, daß LysG ein negativer Transkriptionsregulator von LysE ist. Andere Beispiele aus der LTTR-Familie, die negativ auf ihre Zielgene wirken, sind AmpR (Lindberg *et al.*, 1985) und IciA (Thöny *et al.*, 1991). In Abwesenheit von β -Lactamen wirkt AmpR, der Transkriptionsregulator der β -Lactamase (AmpC) aus *Citrobacter freundii*, als *trans*-wirkender Repressor. Die

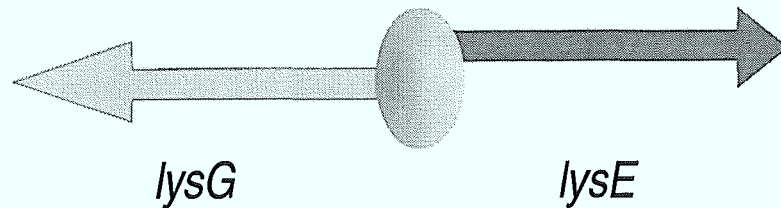
Anwesenheit von β -Lactamen ist mit einer Steigerung der Expression von *ampC* durch AmpR verbunden (Lindberg *et al.*, 1985, Bartowsky & Normark, 1993). IciA ist als negativer Regulator der Initiation der Chromosomen-Replikation *in vitro* beschrieben (Thöny *et al.*, 1991). Hier verhindert die Bindung von IciA an die 13mer Region des *E. coli* eigenen *oriC*-Locus die Initiation der Replikation (Hwang & Kornberg, 1990). Zusätzlich wirkt IciA auch aktivierend auf die Transkription von *dnaA* (Lee *et al.*, 1996). Weitere Beispiele, allerdings nicht von Mitgliedern der LTTR-Familie, stellen die in Enterobacteriaceae vorhandenen Tetracyclin-Efflux-Systeme TetA-TetR (Hillen & Berens, 1994) und der AcrR-AcrAB abhängige Efflux lipophiler Inhibitoren in *E. coli* dar (Ma *et al.*, 1995). Hierbei handelt es sich sogar um Systeme, bei denen die Expression eines Export-Translokators negativ durch das Regulatorprotein kontrolliert wird (Hillen & Berens, 1994, Ma *et al.*, 1996). Zudem liegt mit der divergenten Transkription des Regulator-Gens vom Translokator-Gen eine genetische Organisation vor, wie sie auch für LysG und LysE zutrifft.

Entgegen den Erwartungen führte die Gen-gerichtete Disruption von *lysG* nicht zu einer Steigerung der Lysin-Exkretionsrate. Im *lysG*-Inaktivierungstamm ATCC13032 *lysG::pEM/lysG_{int}* lagen vergleichbare Lysin-Exkretionsraten zum *C. glutamicum* Wildtyp vor. Dies deutet auf einen zusätzlichen Regulationsmechanismus der *lysE*-Expression hin. Eine Möglichkeit wäre eine Regulation *in cis* durch die überlappenden Transkripte von *lysE* und *orf3*. Interessanterweise überlappen nämlich die letzten drei Nukleotide des stromabwärts von *lysE* gelegenen *orf3* (=kv β 1) mit den endständigen Nukleotiden von *lysE*, und es lassen sich, aufgrund der konvergenten Orientierung von kv β 1 und *lysE*, potentielle Bereiche zur Initiation der Transkriptions-Termination im jeweils anderen Transkript identifizieren. Diese 3'-überlappenden Transkripte könnten eine regulatorische Funktion auf die Synthese von LysE - und Kv β 1 - ausüben. Übereinstimmend mit den Ergebnissen aus *lysG*-Inaktivierung und alleiniger Überexpression von *lysE* im Deletionsstamm würde diese zweite regulatorische Komponente von *lysE* nur *in cis* ihre Wirkung zeigen. Eine solche überlappende Genanordnung ist mit Ausnahme viraler Gene eher ungewöhnlich. Sie wird als eine Form der Genregulation diskutiert, die nicht auf Promotorstrukturen oder Regulatoren, sondern auf der benachbarten Lage zweier Gene beruht (Normark *et al.*, 1983). Der Regulationsmechanismus solcher überlappenden Transkripte erfolgt über die Zusammenlagerung der Transkripte zu RNA-Doppelsträngen, die für RNAsen sensibler als einzelsträngige RNA-Moleküle sind und somit verstärkt abgebaut werden (Hildebrandt & Nellen, 1992, Bonnelye & Laudet, 1994). Auch in *E. coli*

existiert mit *acrAB* ein Export-Translokator, der ohne funktionelles AcrR-Regulatorprotein exprimiert wird, und für den AcrR nicht der einzige Regulator ist (Ma *et al.*, 1996).

Aus den bisherigen Ergebnissen zur Wirkung von *lysG* auf den Lysinexport und unter Berücksichtigung regulatorischer Beispiele anderer, hier diskutierter Translokationsprozesse wird folgende Arbeitshypothese für den Export der Aminosäure Lysin und dessen Regulation in *C. glutamicum* aufgestellt (Abb. 27). Der Lysinexportregulator LysG bindet an eine Operatorstruktur, die im intergenen Bereich zwischen *lysG* und *lysE* lokalisiert ist. Dadurch wird die Transkription von *lysE* unterbunden und Lysin wird nicht exkretiert. Da die Bindung von LysG an den Operator auch die eigene Transkription verhindert, LysG also einer Autoregulation unterliegt, kann nicht ausgeschlossen werden. Die Bindung von Lysin an LysG wirkt als Signal zur Transkriptionsinduktion des Lysinexporter-Gens. Durch die Bildung des LysG-Lysin-Komplexes kommt es zu einer Konformationsänderung und damit zu einer herabgesetzten Affinität des Komplexes zum Operator. Aufgrund der herabgesetzten Bindungswahrscheinlichkeit des LysG-Lysin-Komplexes am Operator kann die Transkription von *lysE*, und auch von *lysG*, erfolgen. Ob die überlappenden Transkripte von *lysE* und *kvβ1* einen zusätzlichen Regulationsmechanismus darstellen, bleibt unklar. Mehrere Versuche zur Inaktivierung von *kvβ1* in *C. glutamicum* waren nicht erfolgreich. Dies könnte eine essentielle Funktion von Kvβ1 unter den Versuchsbedingungen andeuten. Zukünftig wird die exakte Wirkung von *lysG* auf die *lysE*-Expression mit *lysE-lacZ*-Fusionen in einer genomischen Umgebung unabhängig vom *kvβ1*-Transkript untersucht werden. Damit wird auch Auskunft darüber zu erhalten sein, ob das *kvβ1*-Transkript die Expression von LysG beeinflusst.

1. negative Kontrolle durch LysG



2. Substratinduktion durch Lysin

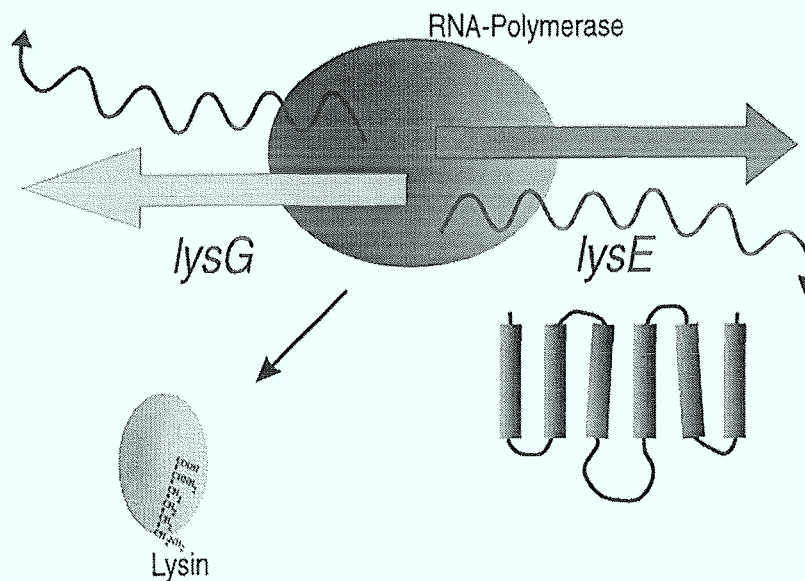


Abb. 27: Hypothese zur LysG-vermittelten Regulation des Lysinexportes von *C. glutamicum*. Die Bindung von LysG an eine Operatorstruktur im intergenen Bereich von *lysE* und *lysG* verhindert die Transkription. Lysin wirkt als Induktor, bindet an LysG und setzt die Bindungswahrscheinlichkeit des LysG-Lysin-Komplexes zum Operator herab. Die RNA-Polymerase kann an den DNA-Doppelstrang binden, und die Transkription von *lysE* und *lysG* initiieren.

4. Die physiologische Funktion des Lysinexportcarriers LysE

Aus Lysin-Produktionsstämmen, die durch ungerichtete Mutagenesen und Selektion auf erhöhte Lysin-Produktivität erhalten worden waren, wurden die *lysE*-Allele isoliert und sequenziert. Dabei ergab sich überraschenderweise, daß die Nukleotidabfolgen der drei sequenzierten Exportcarrier-Allele unverändert zum Wildtyp-Gen waren. Dies widerlegt die bisherige Hypothese, daß veränderte pH- und Membranpotential-Abhängigkeiten des Lysinexportes in Produktionsstämmen auf Mutationen im Carrierallel zurückzuführen sind (Bröer *et al.*, 1993). Neben *lysE* war auch die Sequenz von Allelen des Lysinexport-regulators in den Lysin-Produktionsstämmen unverändert. Dies deutet an, daß weitere Faktoren einen Einfluß auf den Lysinexport besitzen. Denkbar ist eine Mutation in einer weiteren regulatorischen Komponente des Lysinexportes neben LysG. Im Einklang hiermit stehen biochemische Untersuchungen zum Lysinexport durch den Lysin-Produktionsstamm MH20-22B (Erdmann *et al.* 1995). Diese lassen auch eine veränderte allosterische Regulation von LysE als Ursache für eine erhöhte Lysin-Exkretionsaktivität im Produktionsstamm *C. glutamicum* MH20-22B möglich erscheinen.

Ein weiterer Faktor, der einen Einfluß auf die Aktivität von Carriermolekülen hat, ist die Lipidzusammensetzung der Membran (Chen & Wilson, 1984, Carruthers & Melchior, 1986, Uratani *et al.*, 1987). Eine veränderte Lipidumgebung des LysE-Carriers könnte auch zu veränderten Transporteigenschaften führen. Unterstützt wird diese These durch die Isolierung einer *C. glutamicum* Mutante, die kein Lysin exkretiert, aber zusätzlich eine erhöhte Biotin-Bedürftigkeit besitzt (unveröffentlichte Daten). In *C. glutamicum* existieren nur zwei Biotin-abhängige Enzyme, die Pyruvatcarboxylase (Peters-Wendisch, 1996) und die Acyl-CoA-Carboxylase (Jäger *et al.*, 1996). Für die an der Fettsäuresynthese beteiligte Acyl-CoA-Carboxylase wird eine wichtige Funktion bei der Carrier-vermittelten Glutamataxkretion in *Corynebacterium glutamicum* diskutiert (Krämer, 1994 a). Zudem wurde das Gen für die Acyl-CoA-Carboxylase von *C. glutamicum* im Zusammenhang mit verändertem Lysinexport gefunden (Jäger, persönliche Mitteilung). Zukünftig muß also geprüft werden, ob auch der Carrier-vermittelte Lysinexport Einflüssen des Membranzustandes unterliegt.

Die Deletion von Lysinexportcarrier und Lysinexportregulator im *C. glutamicum* Wildtyp führte zu einem enormen Konzentrationsgradienten von Lysin über die

Cytoplasmamembran. Mit der Deletionsmutante *C. glutamicum* ATCC13032 $\Delta lysE$ wurde eine Diffusionskonstante für Lysin von $k = 1,9 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ermittelt. Dieser Wert zeigt, daß die Diffusion als Transportprozeß für Lysin im Unterschied zur Diffusion aromatischer Aminosäuren wie Phenylalanin ($k = 0,45 \text{ min}^{-1}$, Krämer *et al.*, 1994) vernachlässigbar ist. Zudem betont dies die besondere Bedeutung des Lysinexportcarriers für die biotechnologische Lysinproduktion (Abb. 28). Die IPTG-induzierte Expression von *lysE* führte zu einer zehnfach erhöhten Lysin-Exkretionsrate im Vergleich zum Wildtyp. Mit $3,76 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Zell-Trockengewicht})^{-1}$ war diese Exkretionsrate sogar höher als die des Lysin-Produktionsstammes MH20 ($3 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Zell-Trockengewicht})^{-1}$) (Schrumpf *et al.*, 1992), der Lysin wegen einer konstitutiv deregulierten Aspartatkinase produziert. Das bedeutet, daß neben *lysC*^{FBR} (Kalinowski *et al.*, 1991) und *dapA* (Cremer *et al.*, 1991, Eggeling, 1996) nun mit *lysE* ein drittes Zielgen zur Verfügung steht, dessen Überexpression eine verstärkte Lysinproduktion zur Folge hat. Im Unterschied zu *lysC*^{FBR} und *DapA*, die die intrazellulären Lysinkonzentrationen durch verstärkte Lysinbiosynthese erhöhen können (Cremer *et al.*, 1991, Eggeling, 1996), wirkt *LysE* über verstärkten Lysinexport, was eine Neubildung der exportierten Substanz zur Folge hat. In den letzten Jahren hat sich gezeigt, daß in *Corynebacterium glutamicum* nicht nur Limitationen des Exportes von L-Lysin bestehen (Eggeling, 1996). Bei Steigerungen der L-Threonin- und L-Isoleucinbiosynthese wurden auch Limitationen des Exportes dieser Aminosäuren beobachtet (Reinscheid *et al.*, 1994, Morbach *et al.*, 1995). Da der Exportprozeß von Threonin und Isoleucin ebenfalls Carrier-vermittelt ist (Krämer *et al.*, 1994), eröffnet die Isolierung von *lysE* neue Perspektiven für die industrielle Produktion bakterieller Metabolite.

Die natürliche Funktion des Lysinexportcarriers kann es nicht sein, eine aufwendig synthetisierte Aminosäure zu exkretieren. Aber es existieren Bedingungen, unter denen der Lysinexportcarrier auch im Wildtyp benötigt wird. So ist *C. glutamicum* nicht immer in der Lage, die Lysinbiosynthese effektiv zu regulieren (Vrljic *et al.*, 1995, diese Arbeit). Erhöhte Methioninkonzentrationen führen zu einer zellinternen Lysinakkumulation (Abb. 28), die nur durch den Lysinexporter abgebaut werden kann, da *C. glutamicum* Lysin nicht katabol verwertet (Nakayama, 1985). Diese Situation mag spezifisch für *C. glutamicum* sein und hängt mit der einfacheren Regulation der corynebakteriellen Lysinbiosynthese im Unterschied zu *E. coli* zusammen (Nakayama, 1985, Patte, 1996). Der Besitz eines Aminosäure-Exporters kann aber auch von Wichtigkeit für andere Bakterien sein. Die Bildung von Aminosäuren aus Peptiden wurde bereits für

Lactokokken (Pritchard & Coolbear, 1993) und *Escherichia coli* (Payne *et al.*, 1979, Payne & Smith, 1994) gefunden. Auch für *C. glutamicum* konnte die Bildung von Aminosäuren aus Dipeptiden gezeigt werden. Hier wurden Transportcharakteristika für die Dipeptid-Aufnahme und den nach Peptidzusatz erfolgenden Export von Aminosäuren studiert (Erdmann *et al.*, 1993, Zittrich & Krämer, 1994). Wie die Kultivierung von *C. glutamicum* ATCC13032 $\Delta lysEG$ auf Lysyl-Alanin-haltigem Medium zeigte, scheint keine strikte Kontrolle der Peptid-Aufnahme und der Hydrolyse von Peptiden in *C. glutamicum* vorhanden zu sein. In Peptid-haltiger Umgebung und ohne Aminosäure-abbauende Enzymaktivitäten müssen also die Aminosäuren aus der Zelle entfernt werden, um zellinterne Aminosäure-Akkumulationen zu vermeiden (Abb. 28). Damit könnte der Lysinexporter dem Bakterium *C. glutamicum*, das aus Bodenproben und dem Kot von Tieren isoliert wurde (Kinoshita, persönliche Mitteilung), die Möglichkeit bieten, sich wechselnden Substrat-Zusammensetzungen anzupassen. Aber auch für andere Bakterien, die in einer Peptid-reichen Umgebung leben, wie die in der Nahrungsmittel-industrie verwendeten Milchsäurebakterien oder tier- und humanpathogene Bakterien, ist die Existenz spezifischer Aminosäure-Exportcarrier denkbar. Diese können ein Ungleichgewicht zellulärer Metabolite abbauen, und führen damit ebenso zu ausgeglichenen Metabolitkonzentrationen wie es die Regulationsmechanismen der Metabolit-Biosynthesewege tun.

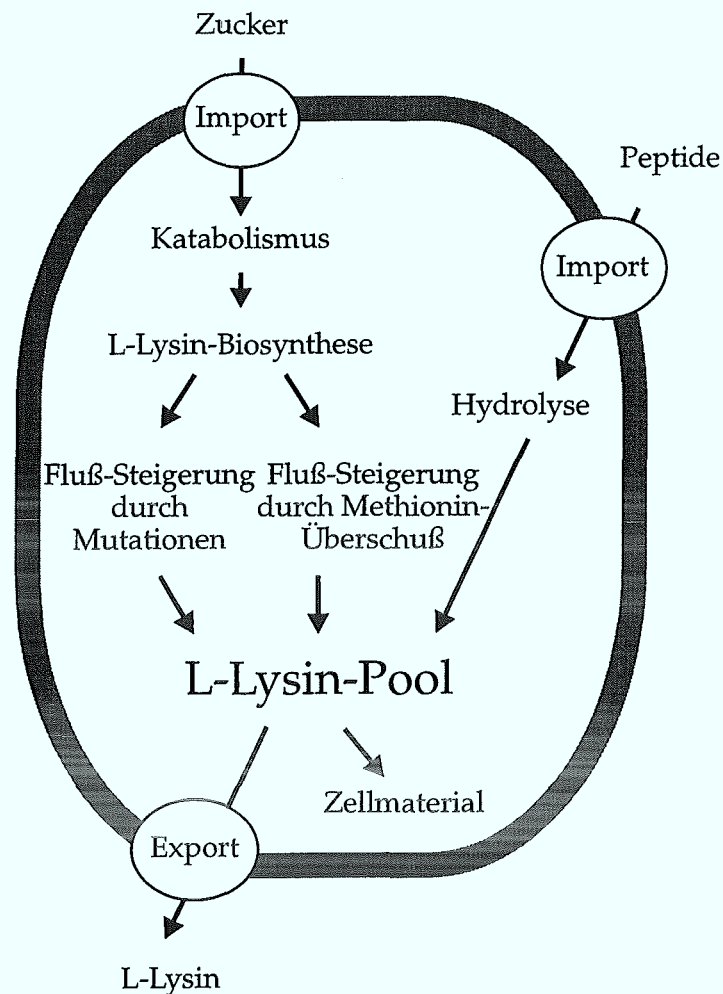


Abb. 28: Die physiologische Funktion des Lysinexporters in *C. glutamicum*. Der Export-Carrier katalysiert den Efflux von Lysin nach Deregulation der Lysinbiosynthese, als ein Ergebnis natürlicher Fluß-Ungleichgewichte oder nach Aufnahme und zellinterner Hydrolyse von Peptiden.

V. Zusammenfassung

Für das Aminosäuren produzierende Bakterium *Corynebacterium glutamicum* konnte kürzlich biochemisch gezeigt werden, daß die Lysinexkretion Carrier-vermittelt ist. Ziel dieser Arbeit war es, das Gen für den Lysin-Exkretionscarrier aus *C. glutamicum* zu isolieren und den Lysinexport physiologisch zu analysieren.

1. Es wurde ein biologisches System etabliert, das die Lysinexkretion in *C. glutamicum* in Abhängigkeit von Methionin induziert. Damit konnte die im Lysinexport defekte Mutante *C. glutamicum* NA8 isoliert werden. *C. glutamicum* NA8 wurde mit einer direkt in dieser Mutante erstellten Genbank komplementiert.
2. Das komplementierende Gen *lysE* (*L-lysine export*) kodiert für ein Polypeptid (236 AS) mit sechs potentiellen transmembranen α -Helices und einem Molekulargewicht von 25425. Dieses Polypeptid besitzt keine Sequenzähnlichkeit zu Proteinen bekannter Funktion. Das LysE-Genprodukt konnte durch Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden. Die Inaktivierung zeigte, daß *lysE* essentiell für die Lysinexkretion von *C. glutamicum* ist. Die Überexpression von *lysE* führt mit $3,76 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Zell-Trockengewicht})^{-1}$ zu einer zehnfach erhöhten Lysin-Exkretionsrate.
3. Das Gen *lysG* (*governing L-lysine export*) liegt benachbart zu *lysE* auf dem Genom von *C. glutamicum*, wird aber divergent transkribiert. Das abgeleitete Polypeptid (290 AS) besitzt am Aminoterminus ein Helix-Turn-Helix Motiv. Auf Sequenzebene zeigt LysG bis zu 35% Identität zu prokaryotischen, LysR-ähnlichen, autoregulativen Transkriptionsregulatoren. LysG wirkt in *trans* und führt zu einer Herabsetzung der Lysinexkretion durch *C. glutamicum*.
4. Für die Lysinexport-defekte Mutante *C. glutamicum* NA8 konnte die Transition $G^{1594} \rightarrow A^{1594}$ nachgewiesen werden, wodurch im *lysE*-Gen ein Stopp-Codon entsteht. Das abgeleitete LysE-Polypeptid ist in *C. glutamicum* NA8 um 43 Aminosäuren verkürzt. Allele von *lysE* und *lysG* aus drei Produktionsstämmen sind unverändert zu den Wildtypallelen.
5. Eine *lysEG*-Deletionsmutante zeigt auf Minimalmedium mit Glukose nach dem Zusatz Lysin-haltiger Dipeptide kein Wachstum mehr. Zellintern werden dann bis zu 1100 mM Lysin akkumuliert. Somit besteht die physiologische Funktion des Lysinexportcarriers von *C. glutamicum* darin, extrem hohe zellinterne Lysinkonzentrationen zu vermeiden.

VI. Literaturverzeichnis

- Abe S., Takayama K-I., Kinoshita S. (1967).** Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 13, 279-301
- Adelberg E. A. (1958).** Selection of bacterial mutants which excrete antagonists of antimetabolites. *J. Bacteriol.* 76: 326
- Aldema M.L., McMurry L.M., Walmsley A.R., and Levy S.B. (1996).** Purification of the Tn10-specified tetracycline efflux antiporter TetA in a native state as a polyhistidine fusion protein. *Mol. Microbiol.* 19 (1): 187-195
- Alefounder P.R. and Perham R.N. (1989).** Identification, molecular cloning and sequence analysis of a gene cluster encoding the Class II fructose 1,6-bisphosphate aldolase, 3-phosphoglycerate kinase and a putative second glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 3 (6): 723-732
- Altenbuchner J. & Cullum J. (1984).** DNA amplification and an unstable arginine gene in *Streptomyces lividans* 66. *Mol. Gen. Genet.* 195: 134-138
- Ames G. F. L. (1990).** Energetics of periplasmic transport systems. In: *The Bacteria*, Vol. XII, Academic Press, Inc.: 225-247
- Bartowsky E., and Normark S. (1993).** Interactions of wild-type and mutant AmpR of *Citrobacter freundii* with target DNA. *Mol. Microbiol.* 10(3): 555-565
- Beck E., Bremer E. (1980).** Nucleotide sequence of the gene *ompA* coding the outer membrane protein II of *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* 8 (13)
- Bensadoun A. & Weinstein D. (1976).** Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal. Biochem.* 70: 241-250

- Berman J.W. & Basch R.S. (1980).** Amplification of the biotin-avidin immunofluorescence technique. *J. Immunol. Methods* 36: 335-338
- Birnboim H.C., Doly J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7 (6), 1513-1523
- Boles E., Ebbighausen H., Eikmanns B., Krämer R. (1993).** Unusual regulation of the uptake system for branched-chain amino acids in *Corynebacterium glutamicum*. *Arch. Microbiol.* 159: 147-152
- Bonnelye E., and Laudet V. (1994).** Les genes chevauchants. *Medecine/Sciences* 10: 805-816
- Bosman B.W., Tan P.S.T., and Konings W.N. (1990).** Purification and characterization of a tripeptidase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1839-1843
- Bröer S., Krämer R. (1990).** Lysine uptake and exchange in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 172, 7241-7248
- Bröer S., Krämer R. (1991 a).** Lysine excretion by *Corynebacterium glutamicum*. 1. Identification of a specific secretion carrier system. *Eur. J. Biochem.* 202, 131-135
- Bröer S., Krämer R. (1991 b).** Lysine excretion by *Corynebacterium glutamicum*. 2. Energetics and mechanism of the transport system. *Eur. J. Biochem.* 202, 137-143
- Bröer S., Eggeling L., Krämer R. (1993).** Strains of *Corynebacterium glutamicum* with different lysine produktivities may have different lysine excretion systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (1), 316-321
- Brooks C.L., Brunger A., and Karplus M. (1985).** Active site dynamics in protein molecules: a stochastic boundary molecular-dynamics approach. *Biopolymers* 24 (5): 843-865

- Burkovski A., Weil B., Krämer R. (1996).** Characterization of a secondary uptake system for L-glutamate in *Corynebacterium glutamicum*. FEMS Microbiol. Lett. 136: 169-173
- Carmel O., Dover N., Rahav-Manor O., Dibrov P., Kirsch D., Karpel R., Schuldiner S., and Padan E. (1994).** A single amino acid substitution (Glu134→Ala) in NhaR1 increases the inducibility by Na⁺ of the product of *nhaA*, a Na⁺/H⁺ antiporter gene in *Escherichia coli*. EMBO J. 13(8): 1981-1989
- Caruthers M.H., Barone A.D., Beaucage S.L., Dodds D.R., Fisher E.F., McBride L.J., Matteucci M., Staninsky Z., Tang J.Y. (1985).** Chemical synthesis of deoxyoligonucleotides by the phosphoramidite method. Science 230: 281
- Caruthers A. & Melchior D.L. (1986).** How bilayer lipids affect membrane protein activity. TIBS 11: 331-335
- Casadaban M.J. (1976).** Transposition and fusion of the *lac* genes to select promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and mu. J. Mol. Biol. 105: 541-555
- Chen C.-C. and Wilson T.H. (1984).** The phospholipid requirement for activity of the lactose carrier of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 259(16): 10150-10158
- Chen N.-Y., Hu F.-M., and Paulus, H. (1987).** Nucleotide sequence of the overlapping genes for the subunits of *Bacillus subtilis* aspartokinase II and their control regions. J. Biol. Chem. 262: 8787-8798.
- Chen, N.-Y., and Paulus, H. (1988).** Mechanism of expression of the overlapping genes of *Bacillus subtilis* aspartokinase II. J.Biol.Chem. 263: 9526-9532.
- Chou P.Y. & Fasman G. D. (1974 a).** Conformational parameters for amino acids in helical, β -sheet, and random coil regions calculated from protein. Biochemistry 13: 211-222

- Chou P.Y. & Fasman G.D. (1974 b).** Prediction of protein conformation. *Biochemistry* 13: 222-244
- Clarke L., Carbon J. (1976).** A colony bank containing synthetic ColEI hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* 9, 91-99
- Clement Y., Escoffier C., Trombe M.C., and Lanelle G. (1984).** Is glutamate excreted by its uptake system in *Corynebacterium glutamicum*? A working hypothesis. *J. Gen. Microbiol.* 130: 2589-2594
- Cohen G.N., Saint-Girons I. (1987).** Biosynthesis of Threonine, Lysine, and Methionine. in: Neidhardt (ed), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, American Society for Microbiology, Washington D.C., Vol.1, 429-444.
- Cremer J., Treptow, C., Eggeling L., Sahm, H. (1988).** Regulation of enzymes of lysine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Gen. Microbiol.* 134: 3221-3229
- Cremer J., Eggeling L., 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., Sahm H. (1991).** Control of the lysine biosynthesis sequence in *Corynebacterium glutamicum* as analyzed by overexpression of the individual corresponding genes. *App. Environ. Microbiol.* 57 (6): 1746-1752
- Dautry-Varsat A., Sibilli-Weill L., and Cohen G.-N. (1977).** Subunit structure of the methionine-repressible aspartokinase II-homoserine dehydrogenase II from *Escherichia coli* K-12. *Eur. J. Biochem.* 76: 1-6
- Dierks T., Salentin A., Heberger C., and Krämer R. (1990 a).** The mitochondrial aspartate/glutamate and ADP/ATP carrier switch from obligate counterexchange to unidirectional transport after modification by SH-reagents. *Biochim. Biophys. Acta* 1028: 268-280

- Dierks T., Salentin A., and Krämer R. (1990 b).** Pore-like and carrier-like properties of the mitochondrial aspartate/glutamate carrier after modification by SH-reagents: evidence for a preformed channel as a structural requirement of carrier-mediated transport. *Biochim. Biophys. Acta* 1028: 281-288
- 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
- Driessen A. J. M., Leeuwen C. v., and W. N. Konings (1989).** Transport of basic amino acids by membrane vesicles of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 171 (3): 1453-1458
- 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
- Ebbighausen H., Weil B., Krämer R. (1989).** Isoleucine excretion in *Corynebacterium glutamicum*: evidence for a specific efflux carrier system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31, 184-190
- Eckert B. & Beck C.F. (1989).** Overproduction of transposon Tn10-encoded tetracycline resistance protein results in cell death and loss of membrane potential. *J. Bacteriol.* 171: 3557-3559
- Eggeling I., Cordes C., Eggeling L., Sahm H. (1987).** Regulation of acetohydroxy acid synthase in *Corynebacterium glutamicum* during fermentation of α -ketobutyrate to L-isoleucine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25: 346-351
- Eggeling L. (1994).** Biology of L-lysine overproduction by *Corynebacterium glutamicum*. *Amino Acids* 6: 261-272
- Eggeling, L. (1996).** Quantifying and directing metabolite flux: Application to amino acid overproduction. *Adv. Biochem. Engineering* 54: 2-30.

- Eikmanns B., Kleinertz E., Liebl W., Sahm H. (1991).** A family of *Corynebacterium glutamicum* / *Escherichia coli* shuttle vectors for gene cloning, controlled gene expression, and promotor probing. *Gene* 102: 93-98
- Eisenberg D., Schwarz E., Komaromy M., Wall R. (1984).** Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J. Mol. Biol.* 179:125-142
- Ellis J., Carlin A., Steffes C., Wu J., Liu J., and B. P. Rosen (1995).** Topological analysis of the lysine-specific permease of *Escherichia coli*. *Microbiology* 141: 1927-1935
- Engel P., Krämer R., and G. Uden (1994).** Transport of C₄-dicarboxylates by anaerobically grown *Escherichia coli*. Energetics and mechanism of exchange, uptake and efflux. *Eur. J. Biochem.* 222: 605-614
- Engelmann D.M., Steitz T.A., and Goldman A. (1986).** Identifying nonpolar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins. *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 15: 321-353
- Erdmann A., Weil B., Krämer R. (1993).** Lysine secretion by wild-type *Corynebacterium glutamicum* triggered by dipeptide uptake. *J. Gen. Microbiol.* 139: 3115-3122
- Erdmann A., Weil B., Krämer R. (1995).** Regulation of lysine excretion in the lysine producer strain *Corynebacterium glutamicum* MH20-22B. *Biotechnol. Lett.* Vol. 17 No.9: 927-932
- Ehrlich H.A. (ed) (1989).** PCR Technology: principles and applications for DNA amplification. Stockton, New York
- 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
- Garnier J (1978).** Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J. Mol. Biol.* 120: 97-120

- Gilvarg C. (1958).** The enzymatic synthetis of diaminopimelic acid. J. Biol. Chem. 233: 1501-1504
- Gornall A.G., Bardawill C.J., David M.M. (1949).** Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J. Biol. Chem. 177, 751-766
- Grant S.G.N., Jessee J., Bloom F.R., and Hanahan D. (1989).** 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
- Gutmann M., Hoischen C. Krämer R. (1992).** Carrier-mediated glutamate secretion by *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation. Biochem. Biophys. Acta 1112: 115-123
- Gutmann M. (1993).** Glutamatsekretion bei *Corynebacterium glutamicum*: Mechanismus und physiologische Bedeutung des carriervermittelten Exports. Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Hanahan D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166, 557-580
- Hanahan D. (1985).** Techniques for transformation of *E.coli*. In: Glover D.M. (ed), DNA-cloning. IRL-Press, Oxford/Washington DC Vol.1, 109-135
- Haynes J.A., Britz M.L. (1989).** Electrotransformation of *Brevibacterium lctofermentum* and *Corynebacterium glutamicum*: growth in tween 80 increases transformation frequencies. FEMS Microbiol. Lett. 61, 329-334
- Haynes J.A., Britz M.L. (1990).** The effect of growth conditions of *Corynebacterium glutamicum* on the transformation frequency obtained by electroporation. J. Gen. Microbiol. 136, 255-263

- Heijne von G. (1992).** Membrane protein structure prediction. *J. Mol. Biol.* 225: 487-494
- Henning U., Sonntag I., Hindennach I. (1978).** Mutants (*ompA*) affecting a major outer membrane protein of *Escherichia coli* K12. *Eur. J. Biochem.* 92, 491-498
- Henning U., Royer H.D., Teather R.M., Hindennach I., Hollenberg C.P. (1979).** Cloning of the structural gene (*ompA*) for an integral outer membrane protein of *Escherichia coli* K12. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76 (9), 4360-4364
- Higgins C.F. & Gibson M.M. (1986).** Peptide transport in bacteria . *Methods in Enzymology* 125: 365-377
- Higgins D.G. & Sharp P.M. (1988).** CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* 73: 237-244
- Higgins, C.F. (1992).** ABC transporters from microorganisms to man. *Ann. Rev. Cell Biol.* 8: 67-113
- Hildebrandt M., Nellen W. (1992).** Differentiell antisense transcription from the dictyostelium EB4 gene locus: implications on antisense-mediated regulations of mRNA stability. *Cell* 69: 197-204
- Hillen W. & Berens C. (1994).** Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* 48: 345-369
- Hoheisel J.D. (1993).** On the activities of *Escherichia coli* exonuclease III. *Analyt. Biochem.* 209: 238-246
- 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
- Hoop T.P. & Woods K.R. (1981).** Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 3824-3828

- Hoop T.P. & Woods K.R. (1983).** A computer program for predicting protein antigenic determinants. *Mol. Immunol.* 20: 483-489
- Hsu S.-M., Raine L., Fanger H. (1981).** Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* 29: 577-580
- Hwang D.S. and Kornberg A. (1990).** A novel protein binds a key origin sequence to block replication of an *E.coli* minichromosome. *Cell* 63: 325-331
- Jack R.W., Tagg J.R., and Ray B. (1995).** Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59: 171-200
- Jäger W., Schäfer A., Pühler A., Labes G., and Wohlleben W. (1992).** Expression of the *Bacillus subtilis* *sacB* gene leads to sucrose sensitivity in the Gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* but not in *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* 174: 5462-5465
- Jäger W., Peters-Wendisch P.G., Kalinowski J. & Pühler A. (1996).** A *Corynebacterium glutamicum* gene encoding a two-domain protein homologous to biotin carboxylases and biotin carboxyl carrier proteins. *Arch. Microbiol.* (im Druck).
- Jetten M. S. M. and Sinskey A. J. (1995).** Recent advances in the physiology and genetics of amino acid-producing bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* 15 (1): 73-103
- 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
- Kaback H.R., Frillingos S., Jung H., Jung K., Prive G.G., Ujwal M.L., Weitzman H., Wu J., and Zen K. (1994).** The lactose permease meets Frankenstein. *J. exp. Biol.*: 183-195

- Kalinowski J., Cremer J., Bachmann B., Eggeling L., Sahm H., Pühler A. (1991).** Genetic and biochemical analysis of the aspartatokinase from *Corynebacterium glutamicum*. Mol. Microbiol. 5: 1197-1204
- Kallio P., Simonen M., Palva I., Sarvas M. (1986).** Synthesis of OmpA of *Escherichia coli* K12 in *Bacillus subtilis*. J. Gen. Microbiol. 132: 667-687
- Kase, H. & Nakayama, K. (1972).** Mechanism of L-threonine and L-lysine production by analog-resistant mutants. Agric. Biol. Chem. 36 (9): 1611-1621
- Kashket E.R. (1985).** The proton motive force in bacteria: a critical assessment of methods. Ann. Rev. Microbiol. 39: 219-242
- Katsumata R., Ozaki A., Oka T., Furuya K. (1984).** Protoplast transformation of glutamate-producing bacteria with plasmid DNA. J. Bacteriol. 159: 306-311
- Keilhauer C., Eggeling L., Sahm H. (1993).** Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: Molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* Operon. J. Bacteriol. 175 (17): 5595-5603
- Kinoshita S., Udaka S., Shimono M. (1957).** Studies on the amino acid fermentation, I. Produktion of L-glutamic acid by various microorganism. J. Gen. Appl. Microbiol. 3: 193-205
- Kinoshita S., Nakayama K., Kitada S. (1958).** L-lysine production using microbial auxotrophs. J. Gen. Appl. Microbiol. 4 (2), 128-129
- Klingenberg M., Pfaff E. (1967).** Means of terminating reactions. In: Estabrook R.W., Pullmann M.R. (eds): Methods in Enzymology Vol X. Academic press Inc., London, New York, 680-684
- Kölling R. and Hollenberg C. P. (1994).** The ABC-transporter Ste6 accumulates in the plasma membrane in a ubiquitinated form in endocytosis mutants. EMBO J. 13 (14): 3261-3271

- Konings W. N., Poolman B., and A. J. M. Driessen (1992).** Can the excretion of metabolites by bacteria be manipulated? FEMS Microbiol. Rev. 88: 93-108
- Krämer R. (1994 a).** Systems and mechanisms of amino acid uptake and excretion in prokaryotes. Arch. Microbiol. 162: 1-13
- Krämer R. (1994 b).** Secretion of amino acids by bacteria: Physiology and mechanism. FEMS Microbiol. Rev. 13: 75-94
- Krämer R., Boles E., Eggeling L., Erdmann A., Gutmann M., Kronmeyer W., Palmieri L., Zittich S. (1994).** Mechanism and energetics of amino acid transport in coryneform bacteria. Biochim. Biophys. Acta 1187:245-249
- Kronmeyer W., Peekhaus N., Krämer R., Sahm H., Eggeling L. (1995).** Structure of the *gluABCD* cluster encoding the glutamate uptake system of *Corynebacterium glutamicum*. J. Bacteriol. 177: 1152-1158
- Kuan J. and Saier Jr. M.H. (1993).** The mitochondrial carrier family of transport proteins: structural, functional, and evolutionary relationships. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 28 (3): 209-233
- 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 (2): 389-396
- Liebl W., Bayerl A., Schein B., Stillner U., Schleifer K.H. (1989).** High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells. FEMS Microbiol. Lett. 65, 299-30

Liebl W., Ehrmann M., Ludwig W., Schleifer K.H. (1991). Transfer of *Brevibacterium divaricatum* DSM 20297^T, „*Brevibacterium flavum*“ DSM20411, „*Brevibacterium lactofermentum*“ DSM 20412 and DSM 1412, and *Corynebacterium lilium* DSM 20137^T to *Corynebacterium glutamicum* and their distinction by rRNA gene restriction patterns. Internat. J. Syst. Bacteriol. 41: 255-260

Lindberg F., Westman L., and Normark S. (1985). Regulatory components in *Citrobacter freundii* *ampC* β -lactamase induction. Proc.Natl.Acad. Sci. USA 82: 4620-4624

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

Lipman D.J. & Pearson W.R. (1985). Rapid and sensitive protein similarity searches. Science 227: 1435-1441

Lomovskaya O. and Lewis K. (1992). *emr*, an *Escherichia coli* locus for multidrug resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 89: 8938-8942

Luntz M.G., Zhdanova N.I., Bourd .I. (1986). Transport and exkretion of L-lysine in *Corynebacterium glutamicum*. J. Gen. Microbiol. 132, 2137-2146

Lüthi E., Baur H., Gamper M., Brunner F., Villeval D., Mercenier A., and Haas D. (1990). The *arc* operon for anaerobic arginine catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* contains an additional gene, *arcD*, encoding a membrane protein. Gene 87: 37-43

Ma D., Cook D. N., Alberti M., Pon N. G., Nikaido H., and Hearst J. E. (1995). Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 16 (1): 45-55

Ma D., Alberti M., Lynch C., Nikaido H., and Hearst J.E. (1996). The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of *acrAB* genes of *Escherichia coli* by global stress signals. Mol. Microbiol. 19(1): 101-112

- Majima E., Ikawa K., Takeda M., Hashimoto M., Shinohara Y., and Terada H. (1995).** Translocation of loops regulates transport activity of mitochondrial ADP/ATP carrier deduced from formation of a specific intermolecular disulfide bridge catalyzed by copper- σ -phenanthroline. *J. Biol. Chem.* 270(49): 29548-29554
- Marger M.D. & Saier Jr. M.H. (1993).** A major superfamily of transmembrane fascilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *TIBS* 18: 13-20
- Marx A., de Graaf A.A., Wiechert W., Eggeling L., Sahm H. (1996).** Determination of the fluxes in the central metabolism of *Corynebacterium glutamicum* by nuclear magnetic resonance spectroscopy combined with metabolite balancing. *Biotechnol. Bioeng.* 49, 111-129
- McElhaney R.N. (1983).** Effects of membrane lipids on transport and enzymic activities. *Current Topics in Membranes and Transport* 17: 317-381
- McKenna E., Hardy D., Pastore J.C., Kaback H.R. (1991).** Sequential truncation of the lactose permease over a three-amino acid sequence near the carboxyl terminus leads to progressive loss of activity and stability. *Proc.Natl.Acad. Sci. USA* 88: 2969-2973
- McKenna E., Hardy D., and Kaback H.R. (1992).** Evidence that the final turn of the last transmembrane helix in the lactose permease is required for folding. *J. Biol. Chem.* 267 (10): 6471-6474
- Meng S. -Y. and Bennett G. N. (1992).** Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* cad operon: a system for neutralization of low extracellular pH. *J. Bacteriol.* 174 (8): 2659-2669
- Menkel E., Thierbach G., Eggeling L., Sahm H. (1989).** Influence of increased aspartate availability on lysine formation by a recombinant strain of *Corynebacterium glutamicum* and utilization of fumarate. *App. Environ. Microbiol.* 55 (3): 684-688

- Mierau I., Haandrikman A.J., Velterop O., Tan P.S.T., Leenhouts K.L., Konings W.N., Venema G., and Kok J. (1994).** Tripeptidase gene (*pepT*) of *Lactococcus lactis*: molecular cloning and nucleotide sequencing of *pepT* and construction of a chromosomal deletion mutant. J. Bacteriol. 176 (10): 2854-2861
- Misono H., Togawa H., Yamamoto T., Soda K. (1976).** Occurrence of meso- α,ϵ -diaminopimelate dehydrogenase in *Bacillus sphaericus*. Biochem. Biophys. Res. Com. 72: 89-93
- Miyajima R., Otsuka S.-I., Shiio I. (1968).** Regulation of aspartate family amino acids of the enzymes in threonine biosynthesis. J. Biochem. 63 (2), 139-148
- Miyajima R., Shiio I. (1970).** Regulation of aspartate family amino acid biosynthesis in *Brevibacterium flavum*; Part III. Properties of Homoserine Dehydrogenase. J. Biochem. 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
- Morbach, S., Sahm, H. and Eggeling, L. (1995).** Use of feedback-resistant threonine dehydratases of *Corynebacterium glutamicum* to increase carbon flux towards L-isoleucine. Appl. Environ. Microbiol. 61: 4315-4320
- Nakayama K., Tanaka H., Hagino H., Kinoshita S. (1966).** Studies on lysine formation; 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, vol.3, Moo-Young (ed). Oxford: Pergamon Press

- Nardi M., Chopin M.-C., Chopin A., Cals M.-M., and Gripon J.-C. (1991).** Cloning and DNA sequence analysis of an X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase gene from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 763. Appl. Environ. Microbiol. 57: 45-50
- Needleman & Wunsch (1970).** A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. J. Mol. Biol. 48: 895-903
- Neidle E.L., Hartnett C., and Ornston L.N. (1989).** Characterization of *Acinetobacter calcoaceticus* *catM*, a repressor gene homologous in sequence to transcriptional activator genes. J. Bacteriol. 171(10): 5410-5421
- Nikaido H. and Saier, Jr. H. (1992).** Transport proteins in bacteria: common themes in their design. Science 258: 936-942
- Nikaido H. (1994).** Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. Science 264: 382-388
- Normark S., Bergström S., Edlund T., Grundström T., Jaurin B., Lindberg F.P., Olsson O. (1983).** Overlapping genes. Ann. Rev. Genet. 17: 499-525
- 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
- Paulsen I.T., Brown M.H., Dunstan S.J., and Skurray R.A. (1995).** Molecular characterization of the staphylococcal multidrug resistance export protein QacC. J. Bacteriol. 177 (10): 2827-2833
- Payne, J.W. and Bell, G. (1979).** Direct determination of the properties of peptide transport systems in *Escherichia coli*, using fluorescent-labeling procedure. J Bacteriol 137: 447-455.
- Payne, J.W. and Smith, M.W. (1994).** Peptide transport by microorganisms. Adv. Microbiol. Physiol. 36: 2-80.

- Persson B., and Argos P. (1994).** Prediction of transmembrane segments in proteins utilising multiple sequence alignments. *J. Mol. Biol.* 237: 182-192
- Peters-Wendisch P. (1996).** Anaplerotische Reaktionen in *Corynebacterium glutamicum*: Untersuchungen zur Bedeutung der PEP-Carboxylase und der Pyruvat-Carboxylase im Zentralstoffwechsel und bei der Aminosäure-Produktion. Dissertation. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Pritchard G.G., and Coolbear T. (1993).** The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 179-206
- 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*. *J. Biol. Chem.* 267(15): 10433-10438
- Rao J.K.M. & Argos P. (1986).** A conformational preference parameter to predict helices in integral membrane proteins. *Biochem. Biophys. Acta* 869: 197-214
- Reinscheid, D.J., Kronmeyer, W., Eggeling, L., Eikmanns, B.J. and Sahm, H. (1994).** Stable expression of *hom-1thrB* in *Corynebacterium glutamicum* and its effect on the carbon flux to threonine and related amino acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 126-132.
- Reizer A., Pao G.M. and Saier Jr. M.H. (1991).** Evolutionary relationship among the permease proteins of the bacterial phosphoenol:sugar phosphotransferase system. Construction of phylogenetic trees and possible relatedness to proteins of eukaryotic mitochondria. *J. Mol. Evol.* 33: 179-193.
- Rettig J., Heinemann S.H., Wunder F., Lorra C., Parcej D.N., Dolly J. O. & Pongs O. (1994).** Inactivation properties of voltage-gated K⁺ channels altered by presence of β -subunit. *Nature* 369: 289-294

Richaud F., Phuc N.H., Cassan M., and 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., and Patte J.-C. (1986). Chromosomal location and nucleotide sequence of the *Escherichia coli* *dapA* gene. J. Bacteriol. 166: 297-300.

Romero-Arroyo C.E., Schell M.A., Gaines III G.L., and Neidle E.L. (1995). *catM* encodes a LysR-type transcriptional activator regulating catechol degradation in *Acinetobacter calcoaceticus*. J. Bacteriol. 177 (20): 5891-5898

Rosen B. P. (1971). Basic amino acid transport in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 246: 3653-3662

Rosenberg M. & Court D. (1979). Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. Annu. Rev. Genet. 13: 319-353

Rost B., and Sander C. (1993 a). Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. J. Mol. Biol. 232: 584-599

Rost B. and Sander C. (1993 b). Improved prediction of protein secondary structure by use of sequence profiles and neuronal networks. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 7558-7562

Rost B., and Sander C. (1994). Combining evolutionary information and neural networks to predict protein secondary structure. Proteins 19: 55-72

Rost B. Casadio R., Fariselli P., Sander C. (1995). Transmembrane helices predicted at 95% accuracy. Protein Science 4: 521-533

Rottenberg H. (1979). The measurement of membrane potential and pH in cells, organelles, and vesicles. Methods in Enzymology Vol. 55: 547-569

- Rowe J.J., Ubbink-Kok T., Molenaar D., Konings W.N., and Driessen A.J.M. (1994).** NarK is a nitrite-extrusion system involved in anaerobic nitrate respiration by *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 12: 579-586
- Sahm H. (1995).** Metabolic design in the amino-acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. Folia Microbiol. 40 (1): 23-30
- Sahm H., Eggeling L., Eikmanns B., and Krämer R. (1995).** Metabolic design in amino acid producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. FEMS Microbiol. Rev. 16: 243-252
- Saier Jr. M.H. (1994).** Computer-aided analyses of transport protein sequences: gleaned evidence concerning function, structure, biogenesis, and evolution. Microbiol. Rev. 58: 71-93
- Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G. T., Erlich H.A., Arnheim N. (1985).** Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230: 1350-1354
- 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., Maniatis T. (1989).** Molecular Cloning: A Laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sanger F., Nicklen C., Coulson A.R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467
- Santamaria R., Gil J.G., Martin J.F. (1985).** High-frequency transformation of *Brevibacterium lactofermentum* protoplasts by plasmid DNA. J. Bacteriol. 162: 463-467

Schäfer A., Kalinowski J., Simon R., Seep-Feldhaus A.-H., Pühler A. (1990). High-frequency conjugal plasmid transfer from gram-negative *Escherichia coli* to various gram-positive coryneform bacteria. J. Bacteriol. 172: 1663-1666

Schäfer A., Tauch A., Jäger W., Kalinowski J., Thierbach G., 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. (1993). Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. Ann. Rev. Microbiol. 47: 597-626

Scherer G.F.E., Walkinshaw M.D., Arnott S., and Morre D.J. (1980). The ribosome binding sites recognized by *E.coli* ribosomes have regions with signal character in both the leader and protein coding segments. Nucleic Acids Res. 8: 3895-3907

Schrempf H., Schmidt O., Kümmerlein R., Hinnah S., Müller D., Betzler M., Steinkamp T., and Wagner R. (1995). A prokaryotic potassium ion channel with two predicted transmembrane segments from *Streptomyces lividans*. EMBO J. Vol. 14 No. 21: 5170-5178

Schrumpf B. (1991). Lysinbildung mit *Corynebacterium glutamicum*: Analyse des Metabolitflusses durch Bestimmung zellinterner Aminosäurekonzentrationen und enzymatische Untersuchungen. Dissertation, Heinrich Heine Universität Düsseldorf

Schrumpf B., Schwarzer A., Kalinowski J., Pühler A., Eggeling L., Sahm H. (1991). A functionally split pathway for lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. J. Bacteriol. 173: 4510-4516

Schrumpf B., Eggeling L., 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. (1990).** Genetic manipulation of the amino acid-producing *Corynebacterium glutamicum* strain ATCC 13032 by gene disruption and gene replacement. Biomed. Tech. 9: 84-87
- Schwarzer A. & Pühler A. (1991).** Manipulation of *Corynebacterium glutamicum* by gene disruption and replacement. Bio/Technology 9: 84-87
- Scott V.E.S., Rettig J., Parcej D.N., Keen J.N., Findlay J.B.C., Pongs O., and Dolly J.O. (1994).** Primary structure of a β subunit of α -dendrotoxin-sensitive K^+ channels from bovine brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 1637-1641
- Seep-Feldhaus A.H., Kalinowski J., Pühler A. (1991).** Molecular analysis of the *Corynebacterium glutamicum lysI* gene involved in lysine uptake. Mol. Microbiol. 5 (12), 2995-3005
- Shiio I., Otsuka S. I., and Takahashi M. (1962).** Effect of biotin on the bacterial formation of glutamic acid. I. Glutamate formation and cellular permeability of amino acids. J. Biochem. 51: 56-62
- Shiio I. & 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. Gen. Appl. Microbiol. 15, 267-287
- Simon R., Priefer U., 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
- Six S., Andrews S.C., Uden G., and Guest J.R. (1994).** *Escherichia coli* possesses two homologous anaerobic C4-dicarboxylate membrane transporters (DcuA and DcuB) distinct from the aerobic dicarboxylate transport system (Dct). J. Bacteriol. 176: 6470-6478

- Sonnen H. (1991).** Molekulargenetische Charakterisierung von Phagen-Wirt-Beziehungen bei Coryneformen Aminosäure-Produzenten. Dissertation, Technische Hochschule Darmstadt
- Sonntag K., Eggeling L., de Graaf A.A., Sahm H. (1993).** Flux partitioning in the split pathway of lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. Eur. J. Biochem. 213: 1325-1331
- Southern E.M. (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503-517
- Steffes C., Ellis J., Wu J., and Rosen B.P. (1992).** The *lysP* gene encodes the lysine - specific permease. J. Bacteriol. 174 (10): 3242-3249
- Steiner H.-Y., Naider F., and Becker J.M. (1995).** The PTR family: a new group of peptide transporters. Mol. Microbiol. 16 (5): 825-834
- Stormo G.D., Schneider T.D., and Gold L.M. (1982).** Characterization of translational initiation sites in *E.coli*. Nucleic Acids Res. 10: 2971-2995
- Stragier P., Richaud F., Borne F., Patte J.-C. (1983a).** Regulation of diaminopimelate decarboxylase synthesis in *Escherichia coli*. I. Identification of a *lysR* gene encoding an activator of the *lysA* gene. J. Mol. Biol. 168: 307-320
- Stragier P., Danos O., Patte J.-C. (1983b).** Regulation of diaminopimelate decarboxylase synthesis in *Escherichia coli*. II. Nucleotide sequence of the *lysA* gene and its regulatory region. J. Mol. Biol. 168: 321-331
- Stragier P. & Patte J.-C. (1983).** Regulation of diaminopimelate decarboxylase synthesis in *Escherichia coli*. III. Nucleotide sequence and regulation of the *lysR* gene. J. Mol. Biol. 168: 333-350
- Summers A.O. (1992).** Untwist and shout: a heavy metal-responsive transcriptional regulator. J. Bacteriol. 174 (10): 3097-3101

Tanaka S., Lerner S.A., Lin E.C.C. (1967). Replacement of a phosphoenolpyruvate phosphotransferase by a nicotinamide adenine dinucleotide-linked dehydrogenase for the utilization of mannitol. *J. Bacteriol.* 93: 642-648

Taylor W.R., Jones D.T., Green N.M. (1994). A method for α -helical integral membrane protein fold prediction. *Proteins* 18: 281-294

Thöny B., Hwang D.S., Fradkin L., and Kornberg A. (1991). *iciA*, an *Escherichia coli* gene encoding a specific inhibitor of chromosomal initiation of replication *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4066-4070

Tindall K.R. & Kunkel T.A. (1988). Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* 27: 6008-6013

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

Truffi-Bachi P., van Rapenbusch R., Janin J., Gros C., and Cohen G.-N. (1968). The threonine-sensitive homoserine dehydrogenase and aspartokinase activities of *Escherichia coli* K-12. *Eur. J. Biochem.* 5: 73-80.

Uratani Y., Wakayama N., and Hoshino T. (1987). Effect of lipid acyl chain length on activity of sodium-dependent leucine transport system in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 262 (35): 16914-16919

Wehrmann A., Eggeling L., and Sahm H. (1994). Analysis of different DNA fragments of *Corynebacterium glutamicum* complementing *dapE* of *Escherichia coli*. *Microbiology (Reading)* 140: 3349-3356

Wehrmann A. (1995). Das Diaminopimelat-Gencluster aus *Corynebacterium glutamicum*: Physiologische Untersuchungen zur verzweigten Lysinbiosynthese und zum Transport aromatischer Aminosäuren. Dissertation, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Wehrmann A., Morakkabati S., Krämer R., Sahm H. and Eggeling L. (1995).

Functional analysis of sequences adjacent to *dapE* of *Corynebacterium glutamicum* reveals the presence of *aroP*, which encodes the aromatic amino acid transporter. J. Bacteriol. 177 (20): 5991-5993

Weinberger S. & Gilvarg C. (1970). Bacterial distribution of the use of succinyl and acetyl blocking groups in diaminopimelic acid biosynthesis. J. Bacteriol. 101: 323-324

Weissenborn D.L., Wittehundt N. and Larson T.J. (1992). Structure and regulation of the *glpFK* operon encoding glycerol diffusion facilitator and glycerol kinase of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem 267: 6122-6131.

White P.J. (1983). The essential role of diaminopimelate dehydrogenase in the biosynthesis of lysine by *Bacillus sphaericus*. J. Gen. Microbiol. 129: 739-749

Wolf H., Pühler A., Neumann E. (1989). Electrotransformation of intact and osmotically sensitive cells of *Corynebacterium glutamicum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 30, 283-289

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

Yoshinaga F. & Nakamori S. (1983). Production of amino acids. In: Herrmann K. M. & R. L. Somerville (eds); Amino Acids: Biosynthesis and genetic regulation. Addison-Wesley Publishing Co., Inc., Reading, Mass, 405-429

Ymer S. (1991). Heat inactivation of DNA ligase prior to electroporation increases transformation efficiency. Nucleic Acids Res. 19, 6960

Zittrich S. & Krämer R. (1994). Quantitative discrimination of carrier-mediated excretion of isoleucine from uptake and diffusion in *Corynebacterium glutamicum*. J. Bacteriol. 176 (22): 6892-6899

Auszüge dieser Arbeit sind in folgenden Artikeln veröffentlicht worden:

Vrljić M., Kronemeyer W., Sahm H., Eggeling L. (1995). Unbalance of L-lysine flux in *Corynebacterium glutamicum* and its use for the isolation of excretion-defective mutants. J. Bacteriol. 177 (14): 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 (5): 815-826

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

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

Bei Herrn Prof. Dr. Cornelis P. Hollenberg bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Der Hermann-Schlosser-Stiftung Frankfurt a. M. danke ich für die finanzielle Unterstützung in Form eines Stipendiums.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Herrn Dr. Lothar Eggeling für seine vertrauensvolle Betreuung, seine ständige Diskussionsbereitschaft und seine Ratschläge, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Vielen Dank für die anregenden und hilfreichen Diskussionen an Petra, Bernd, Carlo, Peter und Volker.

Für die schöne Atmosphäre in und außerhalb des Labors möchte ich mich bei Uwe, Susanne, Achim, Michi, Anja, Andreas, Katrinchen, Adela, Marion, Klaus, Silke, Helga-Maria, Georg, Bodo und Ruth bedanken.

Allen Mitarbeitern des Instituts danke ich für das freundliche Arbeitsklima und die stets gewährte Hilfsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt Axel, meinen Eltern und Steffi für ihre große Unterstützung und ihr Verständnis während meiner gesamten Promotionszeit.

Forschungszentrum Jülich



Jül-3349
Februar 1997
ISSN 0944-2952