

Funktionelle Analyse
des Lysin-Exportcarriers
aus *Corynebacterium glutamicum*

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Birgit Haier

aus Flußbach

Köln, Dezember 2000

Berichtersteller:

Professor Dr. Reinhard Krämer

Privatdozentin Dr. Sabine Waffenschmidt

Tag der Disputation: 12. Februar 2001

Functional characterization of the L-lysine exporter from *Corynebacterium glutamicum*

The L-lysine exporter (LysE) from *Corynebacterium glutamicum*, a Gram-positive soil bacterium, is a secondary transporter which catalyses the export of L-lysine in symport with 2 hydroxyl ions. It is the first member of the new LysE-superfamily that has been functionally characterized. Its gene *lysE* has been cloned and sequenced as the first one for an exporter of a primary metabolite. Because of its structure and its outstanding function it is of interest to study this transporter at the molecular level.

For further characterization, the protein was investigated in three systems different from its physiological environment. Measurements were done in intact *Escherichia coli* cells, in proteoliposomes and in fusion vesicles of *C. glutamicum* membranes with *E. coli* lipids. None of these systems showed any LysE mediated lysin transport activity. Therefore experiments were carried out *in vivo* in the *lysE*-deletion mutant *C. glutamicum* ATCC13032 Δ *lysEG* to identify structurally and functionally important amino acids. It was shown that no partial deletion of the large cytoplasmic *loop* connecting helices III and IV reduced transport activity. Using site directed mutagenesis, four essential amino acids were identified. The construction of a genetic dimer and the functional insertion of the dimeric protein into the cytoplasmic membrane gave insights into the topology of the protein and indicated that LysE acts as a dimer.

Funktionelle Charakterisierung des Lysin-Exportcarriers aus *Corynebacterium glutamicum*

Der Lysin-Exportcarrier (LysE) aus dem Gram-positiven Bodenbakterium *Corynebacterium glutamicum* ist ein sekundärer Transporter, der Lysin im Symport mit zwei Hydroxylionen über die Membran transportiert. Er wurde als erstes Mitglied der neuen LysE-Superfamilie funktionell charakterisiert. Mit der Klonierung und Sequenzierung des Gens *lysE* ist nun ein Carrier, der den Export eines Primärmetaboliten katalysiert, erstmals molekular zugänglich. Aufgrund der neuartigen Struktur und besonderen Funktion ist die Untersuchung dieses Transporters auf molekularer Ebene von großem Interesse.

Für die Charakterisierung des Proteins außerhalb seiner physiologischen Umgebung wurden drei Meßsysteme etabliert und funktionell getestet. Dabei handelte es sich um Messungen in *Escherichia coli*, in Proteoliposomen und in Fusionsvesikeln aus *C. glutamicum*-Membranen mit *E. coli*-Lipiden. LysE vermittelter Lysin-Transport konnte in keinem der Meßsysteme nachgewiesen werden. Untersuchungen zur Identifizierung von funktionell und strukturell wichtigen Aminosäureresten oder ganzen Proteinbereichen wurden daher *in vivo* in der *lysE*-Deletionsmutante *C. glutamicum* ATCC13032 Δ *lysEG* durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, daß kein Bereich des großen cytoplasmatischen *Loops* essentiell für die Transportaktivität ist. Durch ortsgerichtete Mutagenese konnten vier Aminosäurereste, die essentielle funktionelle oder strukturelle Bedeutung haben, identifiziert werden. Die Konstruktion eines genetischen Dimers und dessen funktionelle Insertion in die Cytoplasmamembran lieferte Hinweise auf die Topologie des Proteins und die mögliche dimere Struktur.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	10
2.1. Bakterienstämme und Plasmide	10
2.2 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen	14
2.2.1 Nährmedien für <i>E. coli</i> und <i>C. glutamicum</i>	14
2.2.2 Medienzusätze	14
2.2.3 Kultivierungsbedingungen	14
2.2.4 Herstellung transformationskompetenter Zellen und Transformation	15
2.3. Molekularbiologische Methoden	15
2.3.1 Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> und <i>C. glutamicum</i>	15
2.3.2 Modifikationen von DNA	15
2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion	15
2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese	16
2.3.5 Ortsgerichtete Mutagenese	16
2.3.6 DNA-Sequenzierung.....	19
2.4. Allgemeine analytische Methoden	20
2.4.1 Proteinbestimmungen.....	20
2.4.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	20
2.4.3 Western-Blot-Analyse.....	20
2.4.4 Silikonölzentrifugation.....	21
2.4.5 <i>reversed phase</i> HPLC	21
2.5. Biochemische Methoden	22
2.5.1 Quantitative Bestimmung von Aminosäuren	22
2.5.2 Membranpräparationen	22
2.5.2.1 Membranpräparation aus <i>E. coli</i>	23
2.5.2.2 Membranpräparation aus <i>C. glutamicum</i>	23
2.5.3 Bestimmung der NADH-Oxidase-Aktivität.....	24
2.5.4 Isolierung des Lysin-Exportcarriers über StrepTactin-Affinitätschromatographie... 24	24
2.5.5 Rekonstitution des Lysin-Exportcarriers in künstliche Lipidmembranen	25
2.5.5.1 Trübungsmessung	25
2.5.5.2 Rekonstitution des Lysin-Exportcarriers in Liposomen aus Phosphatidylcholin . 25	25
2.5.5.3 Rekonstitution des Lysin-Exportcarriers in Liposomen aus <i>E. coli</i> Lipiden	26
2.5.6 Fusion corynebakterieller Plasmamembranen mit <i>E. coli</i> -Lipiden	27

2.5.7 Innenvolumenbestimmung.....	27
2.5.7.1 Innenvolumenbestimmung der Fusionsvesikel.....	27
2.5.7.2 Innenvolumenbestimmung der Liposomen.....	28
2.5.8 Membranpotentialmessungen.....	28
2.5.8.1 Messung an Proteoliposomen aus <i>E. coli</i> Lipiden oder Phosphatidylcholin.....	28
2.5.8.2 Messung an Fusionsvesikeln.....	28
2.5.8.3 Messung an Zellen.....	29
2.5.9 Radiochemische Transportmessungen.....	29
2.5.9.1 Transportmessungen an Proteoliposomen.....	29
2.5.9.1.1 Aufnahmemessungen von Lysin.....	29
2.5.9.1.2 Exportmessungen von Lysin.....	30
2.5.9.1.3 Glycinbetain Transportmessungen.....	30
2.5.9.2 Transportmessungen an Fusionsvesikeln.....	30
2.5.9.2.1 Aufnahmemessungen von Lysin.....	30
2.5.9.2.2 Exportmessungen von Lysin.....	31
2.5.9.2.3 Glycinbetain Transportmessungen.....	31
3. Ergebnisse.....	32
3.1 Heterologe Expression des Lysin-Exportcarriers.....	32
3.1.1 Konstruktion der Expressionsplasmide.....	32
3.1.2 Isolierung des Lysin-Exportcarriers als StrepTag-Fusionsprotein.....	32
3.1.3 Funktion des Lysin-Exportcarriers im heterologen System.....	35
3.2 Rekonstitution des Lysin-Exportcarriers in Proteoliposomen.....	36
3.2.1 Charakterisierung der Proteoliposomen.....	37
3.2.2 Nachweis eines carriervermittelten Transportprozesses in Proteoliposomen.....	39
3.2.3 Rekonstitution von LysE.....	41
3.3 Herstellung von Fusionsvesikeln.....	42
3.4 Wiederherstellen der Lysinexkretion bei <i>C. glutamicum</i> ATCC13032ΔlysEG durch plasmidkodiertes LysE.....	44
3.5 Deletionsanalysen im cytoplasmatischen Loop von LysE.....	46
3.6 Mutagenesestudien zur Identifikation funktionell wichtiger Aminosäurereste von LysE.....	49
3.6.1 Bedeutung der geladenen Aminosäurereste in den ersten vier Helices.....	50
3.6.2 Bedeutung konservierter Aminosäurereste und der Region um das konservierte Motiv LNP.....	53

3.7 Konstruktion und Untersuchung eines genetischen LysE-Dimers	54
3.7.1 Herstellung des Expressionsvektors.....	55
3.7.2 Expression des Dimers.....	56
3.7.2 Aktivität des genetischen Dimers.....	57
4. Diskussion.....	58
4.1 Meßsysteme zur Charakterisierung von LysE	58
4.2 Benötigt LysE eine zweite Komponente zur Aktivität?	60
4.3 Funktionell wichtige Bereiche in LysE	61
4.4 Ist LysE ein Dimer?	64
5. Zusammenfassung	66
6.Literatur.....	68

Abkürzungen

Amp ^R	Ampicillin Resistenz
ATCC	<i>American type culture collection</i>
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
bp	Basenpaare
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpm	<i>Disintegrations per minute</i> (Zerfälle pro Minute)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EYPC	<i>egg yolk phosphatidylcholine</i>
F	Farad
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/sec ²)
HABA	2'-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl-β-Thiogalaktosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Km ^R	Kanamycin Resistenz
K _M	Michaelis-Konstante
KPi	Kaliumphosphatpuffer
LPR	Lipid-zu-Protein Verhältnis
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
NaPi	Natriumphosphatpuffer
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
OD ₆₀₀	Optische Dichte gemessen bei 600 nm
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	2-Amino-Hydroxymethylpropan-1,3-Diol
TG	Zell-Trockengewicht
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1957 wurde in Japan ein Gram-positives Bodenbakterium isoliert und als Glutamatproduzent charakterisiert (Kinoshita *et al.*, 1957). Dem zunächst als *Micrococcus glutamicus* benannten Bakterium wurde später der Name *Corynebacterium glutamicum* gegeben. Es ist ein unbewegliches, nicht sporenbildendes, Biotin-auxotrophes Eubakterium aus der Gruppe der mycolsäurehaltigen Actinomyceten und somit eng verwandt mit den Genera *Gordonia*, *Norcadia* und *Mycobacterium* (Pascual *et al.*, 1995). Namengebendes Merkmal von *C. glutamicum* ist seine stäbchen- bzw. keulenförmige (*coryneforme*) Gestalt und die Produktion von Glutamat durch Wildtypzellen (Kinoshita *et al.*, 1957). Durch ungerichtete Mutagenese von *C. glutamicum* konnten Mutanten isoliert werden, die L-Lysin ins Medium exkretieren (Kinoshita *et al.*, 1958; Shioo und Miyajima, 1969; Shioo und Sano, 1969). Mit *C. glutamicum* und seinen *subspecies flavum* und *lactofermentum* (Liebl *et al.*, 1991) werden pro Jahr 1000000 Tonnen L-Glutamat (Kinoshita, persönliche Mitteilung) und 350000 Tonnen L-Lysin produziert (Leuchtenberger, 1996). Neben L-Glutamat, das in Form von Mononatriumglutamat als Geschmacksverstärker in der Lebensmittelindustrie Anwendung findet, und L-Lysin, das als eine für Vertebraten essentielle Aminosäure hauptsächlich als Futtermitteladditiv und in der pharmazeutischen Industrie eingesetzt wird, werden in geringerem Maßstab noch weitere Aminosäuren (L-Alanin, L-Methionin, L-Threonin, L-Tryptophan, L-Prolin) durch *C. glutamicum* produziert (Leuchtenberger, 1996).

Die Lysinbiosynthese in *C. glutamicum* ist sowohl genetisch als auch biochemisch weitestgehend aufgeklärt (Sahm, 1995; Eggeling und Sahm, 1999). Sie erfolgt wie bei allen Prokaryoten als Teil eines mehrfach verzweigten Biosyntheseweges der Aminosäuren der Aspartatfamilie (Patte, 1996). In *C. glutamicum* stellt die Aspartatkinase, die durch das Gen *lysC* kodiert wird, das erste Enzym dar, das den Metabolitfluß in Richtung der Aminosäuren der Aspartatfamilie steuert (Kalinowski *et al.*, 1991). Während in *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* Isoenzyme der Aspartatkinase existieren, die jeweils unterschiedlich reguliert werden (Chen *et al.*, 1987; Cohen und Saint-Girons, 1987; Graves und Switzer, 1990), liegt in *C. glutamicum* nur eine Aspartatkinase vor, die durch das gemeinsame Vorliegen von L-Lysin und L-Threonin Endprodukt inhibiert wird (Nakayama *et al.*, 1966). Eine Regulation von *lysC* auf Transkriptionsebene, wie sie für *E. coli* beschrieben wurde (Richaud *et al.*, 1980), konnte für *C. glutamicum* nicht nachgewiesen werden (Cremer *et al.*, 1991). Die Überexpression des Gens für die *feed-back*-resistente Aspartatkinase *lysC^{FBR}* (Kalinowski *et al.*, 1991) führt bereits zur Produktion von Lysin durch *C. glutamicum* (Cremer *et al.*, 1991). Am Verzweigungspunkt der Biosynthese in Richtung L-Lysin bzw. L-Homoserin konkurrieren

die Enzyme Dihydrodipicolinatsynthase und Homoserindehydrogenase 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 und Shio, 1970) und durch Methionin reprimiert (Miyajima und 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). Die Überexpression des Dihydrodipicolinatsynthasegens *dapA* aber bewirkt eine gesteigerte Lysinbildung, und zwar sowohl im Wildtyp von *C. glutamicum* als auch in einem Stamm mit deregulierter Aspartatkinase (Cremer *et al.*, 1991; Eggeling, 1996, Eggeling *et al.*, 1998). 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). Zusätzlich zu den Kontrollmechanismen des L-Lysinbiosyntheseweges stellt auch die L-Lysinexkretion einen limitierenden Schritt für die L-Lysinproduktion dar. Biochemische Analysen des L-Lysinefflux in Wildtyp-Zellen und Produktionsstämmen ergaben, daß es sich bei dem L-Lysinexport um einen carriervermittelten Transport handelt (Bröer und Krämer, 1991a; Erdmann *et al.*, 1993).

Aktive Transportprozesse werden gemäß ihrer strukturellen, kinetischen und energetischen Aspekte klassifiziert. Mittlerweile ist das von Mitchell (1967) eingeführte Konzept, welches auf der Energienutzung beim aktiven Transport beruht, allgemein akzeptiert. Die direkte Kopplung der vektoriellen Substrattranslokation an primäre Energiequellen (Licht, ATP) wird als primärer Transport bezeichnet. Zu den primären Transportsystemen zählt man z.B. ATPasen und die zu der Superfamilie der ABC-Transporter (*ATP-binding cassette*) gehörigen Bindeprotein abhängigen Aufnahmesysteme für Aminosäuren (BPD-Systeme; *binding protein dependent systems*) (Tam und Saier, 1993). Das elektrochemische Ionenpotential über die Membran, das vorwiegend aus der asymmetrischen Verteilung der Ionen durch die oben genannten Systeme resultiert, kann zur Translokation eines Substrats gegen dessen Konzentrationsgradienten gekoppelt werden. Diese Art des Transports wird von sekundären Transportern katalysiert. Die sekundären Transportprozesse erfüllen eine essentielle Aufgabe bei der Translokation von löslichen Substraten über biologische Membranen von prokaryotischen als auch eukaryotischen Zellen (Konings *et al.*, 1995; Krämer, 1994c; Poolman und Konings, 1993). Transportsysteme (als Transporter, Carrier oder Permease bezeichnet), die für diesen Reaktionsmechanismus verantwortlich sind, besitzen bezüglich ihrer Kinetik und Energetik eine große Ähnlichkeit mit "normalen" Enzymen. Das wesentliche Merkmal besteht jedoch darin, daß sie die vektorielle Reaktion von Reaktanden katalysieren, die in zwei räumlich voneinander getrennten Kompartimenten

lokalisiert sind (Krämer, 1994c). Sekundäre Transportprozesse werden in drei generelle Kategorien unterteilt, wobei man zwischen Antiport, Symport (oder Co-Transport) und Uniport unterscheidet. Zu den Uniportsystemen, bei denen die unidirektionelle Translokation eines Substrates ausschließlich vom (elektro)chemischen Potential des Substrates getrieben wird, gehören beispielsweise die Arginin- und Lysin-Transporter aus *Bacillus stearothermophilus* (Heyne *et al.*, 1991). Während beim Antiport die Translokation eines Substrates mit der entgegengesetzten Translokation eines Cosubstrats energetisch gekoppelt wird, treibt beim Symportmechanismus das (elektro)chemische Potential des Cosubstrats den Transport beider Reaktanden in die gleiche Richtung. Da elektrisch neutrale, anionische oder kationische Substrate vorliegen können, wirkt sich neben dem chemischen Potential des Substrats und des Cosubstrats das elektrische Membranpotential unterschiedlich auf die treibende Kraft des Prozesses aus.

In den letzten Jahren wurden vermehrt Untersuchungen zum Efflux löslicher Substrate durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß in vielen Fällen auch der Export von Substanzen Carrier-vermittelt erfolgt (Konings *et al.*, 1992). Effluxcarrier können wie die Mitglieder der MDR-Familie (*multi drug resistance*) den Export von toxischen Substanzen wie Antibiotika oder interkalierenden Agentien katalysieren, und erlauben das Wachstum in toxischer Umgebung (Hillen und Berens, 1994; Jäger *et al.*, 1997). Ein Beispiel hierfür ist TetA aus *E. coli*, das den Export von Tetracyclin im Antiport gegen Protonen vermittelt (Hillen und Berens, 1994). Auch bei der fermentativen Bildung und cytoplasmatischen Anhäufung von Stoffwechselendprodukten wie z.B. Lactat bei *E. coli* oder *Lactococcus lactis* (Michels *et al.*, 1979; Konings *et al.*, 1992, 1995), Succinat bei der Fumarat-Atmung (Engel *et al.*, 1994; Six *et al.*, 1994) oder Nitrit bei der Nitrat-Atmung (Rowe *et al.*, 1994), ist eine Exkretion dieser Substanzen notwendig. Dagegen ist die Exkretion für die von *C. glutamicum* mit großem Energieaufwand gebildeten Aminosäuren nicht sofort einsichtig. Daß dies durch aktiven Transport geschieht, war lange Zeit umstritten. In der Literatur wurden passive Diffusion durch osmotisch kontrollierte Poren (Luntz *et al.*, 1986) oder Inversionsmodelle diskutiert, die, einen entsprechenden Gradienten des Substrates vorausgesetzt, einen Export durch das Aufnahmesystem vorsahen (Clement *et al.*, 1984). Die Exkretion von Lysin durch Poren konnte von Bröer und Krämer (1991a) ausgeschlossen werden. Obwohl die Polarität des Membranpotentials intrazellulär negativ ist, wird das kationische Lysin außerhalb der Zelle akkumuliert. Der unveränderte Lysinexport in einer *lysI* (*L-lysine import*) Inaktivierungsmutante widerlegte die Inversionshypothese (Seep-Feldhaus *et al.*, 1991). Die dritte Hypothese, nämlich der aktive Export von Aminosäuren durch Carrier konnte inzwischen bei *C. glutamicum* für Glutamat, Lysin, Isoleucin und Threonin bewiesen werden (Krämer, 1994b; Krämer, 1996; Ziegler, persönliche Mitteilung). Die Exkretion der

hydrophoben Aminosäure Isoleucin verläuft über zwei unabhängige Mechanismen: einem carriervermittelten Isoleucin/Protonen-Symport und einer diffusions-abhängigen Komponente (Ebbighausen *et al.* 1989; Zittrich und Krämer, 1994; Hermann und Krämer, 1996). Die Gene für den Isoleucinexportcarrier (*brnEF*) konnten kürzlich kloniert werden (Kennerknecht, persönliche Mitteilung). Der Export der negativ geladenen Aminosäure Glutamat erfordert neben dem Carrier noch eine Veränderung des Membranstatus, die vermutlich eine Modulation der Carrieraktivität durch die veränderte Membranspannung zur Folge hat (Gutmann, 1992; Krämer, 1994 a). Mit der Klonierung des Gens *thrE* für den Threonin-Exportcarrier ist auch die Untersuchung der Threoninexkretion in *C. glutamicum* auf molekularer Ebene möglich geworden (Ziegler, persönliche Mitteilung).

Der L-Lysin-Exkretionsprozeß ist sowohl im Wildtyp als auch in Produktionsstämmen kinetisch charakterisiert worden (Bröer und Krämer, 1991; Bröer *et al.*, 1993; Erdmann *et al.*, 1993). Während die Lysinexkretion in den Produktionsstämmen einer Michaelis Menten Kinetik folgt (K_M : 20 mM, V_{max} : 12 nmol · mg TG⁻¹ · min⁻¹) (Bröer und Krämer, 1991a; Bröer *et al.*, 1993), tritt im Wildtyp Lysinexkretion erst oberhalb einer internen Lysinkonzentration von etwa 20 mM ein (Erdmann *et al.*, 1993). Der „pseudo K_M “ liegt im Wildtyp bei etwa 20 mM und die Maximalgeschwindigkeit beträgt mit 2 nmol · mg TG⁻¹ · min⁻¹ nur ein Sechstel der in Produktionsstämmen ermittelten Geschwindigkeit (Erdmann *et al.*, 1993). Auffällig an der Kinetik der Lysinexkretion ist weiterhin die sehr geringe Substrataffinität (K_M -Werte bei Aminosäureaufnahme-systemen liegen in der Regel im mikromolaren Bereich). In Abbildung 1 ist ein Modell des katalytischen Zyklus des Lysin-Exportcarriers gezeigt, das auf der kinetischen Analyse des *in vivo* Transportprozesses eines Lysinproduktionsstammes basiert (Bröer und Krämer, 1991b). Nach diesem Modell wird der Transport von Lysin gegen den elektrischen Gradienten durch den Symport zweier Hydroxylionen ermöglicht (Bröer und Krämer, 1991b). Die treibenden Kräfte sind das Membranpotential, das chemische Potential des Lysins und der Protonengradient über die Membran. Für den Translokationsschritt von Substrat und Cosubstrat sind die beiden Gradienten, für die Reorientierung des unbeladenen Carriers das Membranpotential bestimmend. Im Widerspruch zur prinzipiellen Reversibilität von Carrierprozessen unter Umkehrung der chemischen Potentiale der Transportsubstrate konnte eine Umkehrung der Transportrichtung von LysE unter entsprechenden Bedingungen bisher nicht beobachtet werden (Bröer und Krämer, 1991b).

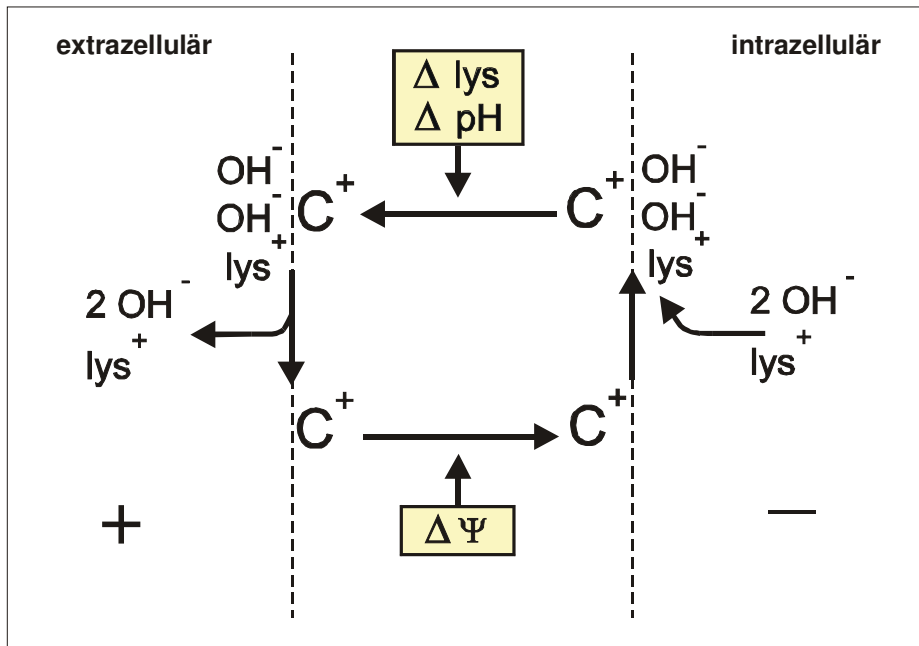


Abb 1: Katalytischer Zyklus des Lysin-Exportcarriers aus *C. glutamicum*. Dargestellt sind die Teilschritte des Zyklus, die beteiligten Transportsubstrate und die treibenden Kräfte. C: Carrier, $\Delta\Psi$: Membranpotential, ΔpH : pH Gradient, Δlys : Lysingradient.

Vrljic *et al.* (1995) gelang es, durch Deregulation des Lysinstoffwechsels bei *C. glutamicum*, cytoplasmatisch Lysin anzustauen und auf diese Weise eine Mutante zu isolieren, die unfähig war, Lysin aus der Zelle zu exkretieren. Durch homologe Komplementation mit einer Genbank aus dem Wildtyp konnte das für den Lysinexporter kodierende Gen (*lysE*) isoliert, kloniert und sequenziert werden (Vrljic *et al.*, 1996). Das offene Leseraster von *lysE* umfasst 708 bp und das zugehörige Genprodukt ist ein aus 236 Aminosäuren bestehendes hydrophobes Protein mit einer molekularen Masse von 25,5 kDa. Das aus der Sequenz abgeleitete Hydropathiediagramm weist sechs stark hydrophobe Bereiche auf, die laut computergestützter Sekundärstrukturvorhersage sechs durch hydrophile *Loops* verbundene Transmembranhelices bilden (Vrljic *et al.*, 1996) (Abb. 2A). Auf *phoA*- und *lacZ*-Fusionen basierende Topologieuntersuchungen stehen jedoch im Widerspruch zu dieser Berechnung (Vrljic *et al.*, 1999; Bellmann, 2000). Das aus den Fusionsstudien abgeleitete Modell sieht nur fünf Transmembranhelices vor (Abb. 2B). Der N-Terminus befindet sich nach diesem Modell im Cytoplasma. Im N-terminalen Bereich ist jedoch eine sechste hydrophobe Helix lokalisiert, die wahrscheinlich der Membran auf der periplasmatischen Seite anliegt (Vrljic *et al.*, 1999). Charakteristisch ist in beiden Modellen ein großer cytoplasmatischer *Loop* zwischen Aminosäure 90 und 142, der die Helices III und IV verbindet.

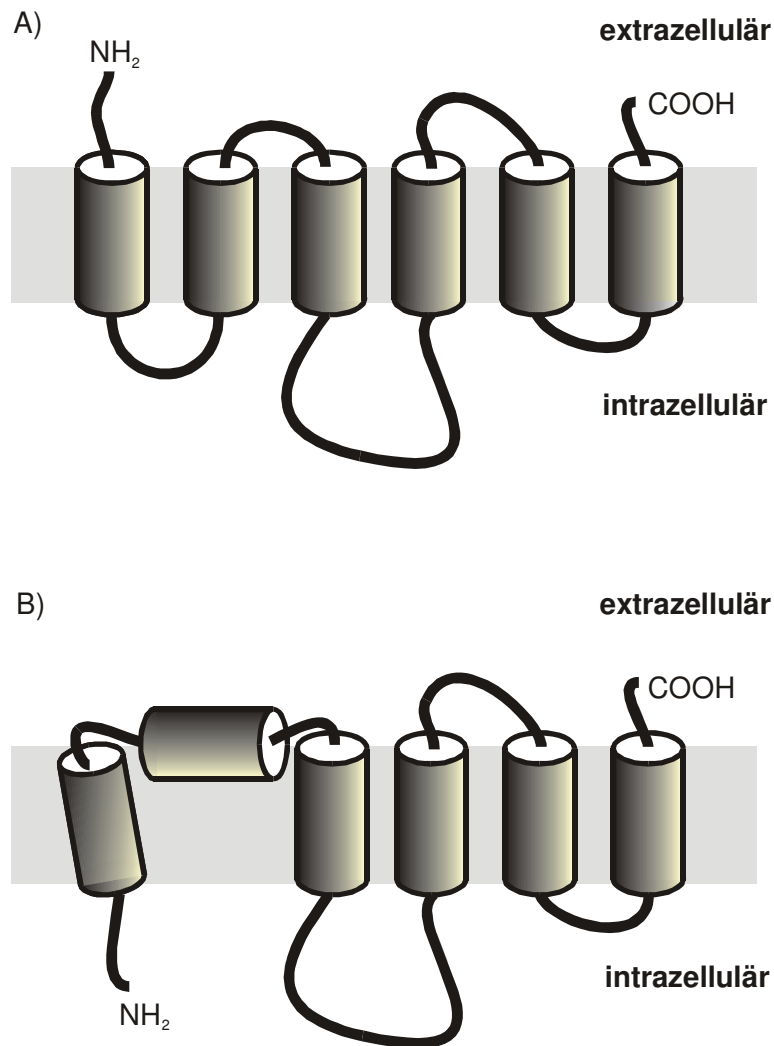
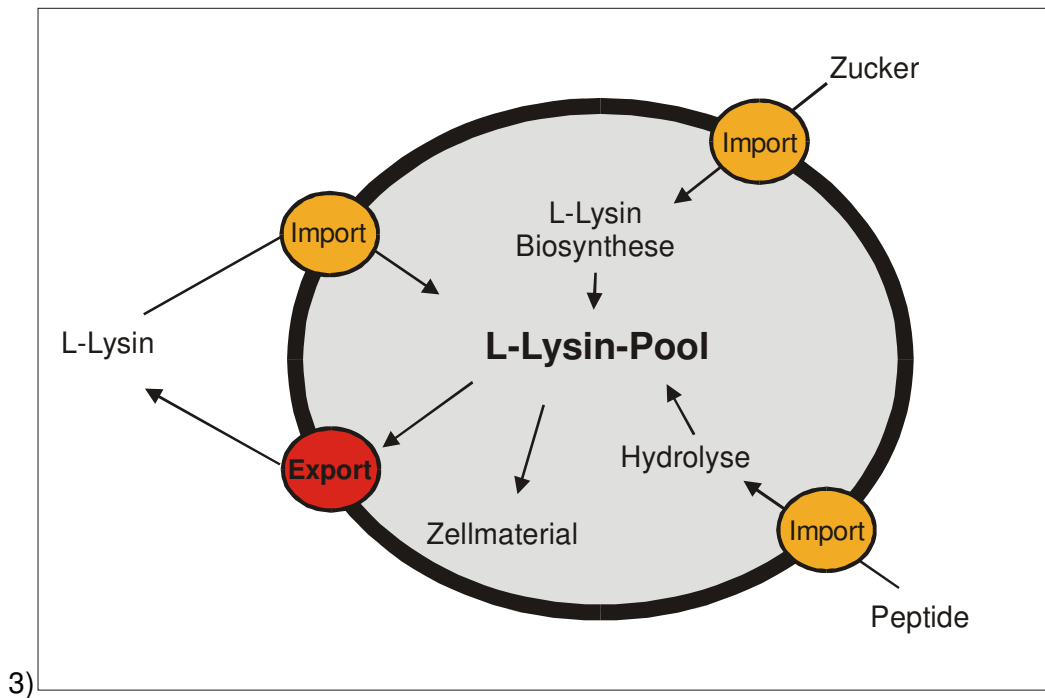


Abb. 2: Sekundärstrukturmodelle zur Topologie von LysE. In A) ist das 6-Helix-Modell nach einer computergestützten Sekundärstrukturvorhersage (Vrljic *et al.*, 1999) und in B) das auf den Ergebnissen der *phoA*- und *lacZ*-Fusionsstudien (Vrljic *et al.*, 1999) basierende Topologiemodell dargestellt. Transmembrane Bereiche sind grau unterlegt.

Die physiologische Notwendigkeit, Lysin aktiv zu exportieren, zeigte sich bei Experimenten mit *lysE*-Defektmutanten von *C. glutamicum* (Vrljic *et al.*, 1996). Bei Wachstum in Anwesenheit von L-Lysin haltigen Dipeptiden kommt es in dieser Mutante zu einer internen Lysinakkumulation von bis zu 1 M L-Lysin, was zu einem Wachstumsstopp der Zellen führt. Da *C. glutamicum* L-Lysin nicht katabolisieren kann (Nakayama *et al.*, 1985), dient der Exporter unter diesen Bedingungen der Kontrolle der internen Lysinkonzentration (Abb. 3).



3) **Abb. 3:** Die physiologische Funktion des Lysin-Exportcarriers in *C. glutamicum*. Der Lysin-Exportcarrier katalysiert den Efflux von Lysin nach Deregulation der Lysinbiosynthese, als ein Ergebnis natürlicher Fluß-Ungleichgewichte oder nach Aufnahme und zellinterner Hydrolyse von Peptiden.

Diese Situation der erhöhten Peptidaufnahme kann für *C. glutamicum* auch in seinem natürlichen Habitat, dem Boden, vorkommen. *C. glutamicum* trifft hier auf Peptide, die als C- und Energiequelle genutzt werden. Dabei werden nur diejenigen Aminosäuren katabolisiert, die nahe verwandt mit Molekülen des Zentralstoffwechsels sind (Glutamat, Aspartat und Alanin). Lysin wird cytoplasmatisch angehäuft und die zunächst physiologisch widersinnig erscheinende Lysinexkretion stellt nun eine Notwendigkeit in der Stoffwechselregulation von *C. glutamicum* dar, da hohe interne L-Lysinkonzentrationen einen bakteriostatischen Effekt ausüben. LysE ist, wie oben beschrieben, biochemisch als sekundärer Carrier charakterisiert (Bröer und Krämer, 1991a), weist aber weder auf molekularer noch auf struktureller Ebene Ähnlichkeiten zu einer der 12 bekannten Transportersuperfamilien auf, die am Efflux von organischen Molekülen und Kationen beteiligt sind (Saier *et al.*, 1994; Paulsen *et al.*, 1996). Aufgrund der neuartigen Funktion und ungewöhnlichen Struktur wurde LysE als erstes Mitglied einer neuen Translokatorfamilie identifiziert (Vrljic *et al.*, 1996). Mittlerweile konnten dieser Familie im Rahmen der Genomsequenzierungen zahlreiche Proteine allerdings bisher noch weitgehend unbekannter Funktion zugeordnet werden (Vrljic *et al.*, 1996; Vrljic *et al.*, 1999; Aleshin *et al.*, 1999; Zakataeva *et al.*, 1999). Die LysE Familie, zu der LysE gehört, bildet mit der RhtB Familie und der CadD Familie die LysE-Superfamilie, der bisher insgesamt 22 Mitglieder zugeordnet

sind (Vrljic *et al.*, 1999). Aus der LysE Familie ist der Lysin-Exporter aus *C. glutamicum* das bislang einzige funktionell charakterisierte Mitglied (Vrljic *et al.*, 1996). In der RhtB Familie konnte RhtB aus *E. coli* als L-Homoserin/Homoserinlactonexporter beschrieben werden (Zakataeva *et al.*, 1999), während RhtC aus *E. coli* funktionell als Threoninexporter charakterisiert ist (Zakataeva *et al.*, 1999). In der aus 4 Mitgliedern bestehenden CadD Familie konnten die plasmidkodierte Proteine CadB aus *Staphylococcus lugdunensis* und CadD aus *Staphylococcus aureus* mit der Cadmium-Resistenz in Verbindung gebracht werden (Chaouni *et al.*, 1996). Ein drittes Mitglied (QacF aus *Bacillus firmus*) ist mit dem Export quartärer Amine in Verbindung gebracht worden (siehe Datenbankeintrag).

Die Regulation des Lysin-Exportcarriers erfolgt sowohl auf Aktivitäts- als auch auf Expressionsebene (Erdmann *et al.*, 1994; Erdmann *et al.*, 1995). Obwohl der Mechanismus auf Ebene der Aktivität noch nicht komplett verstanden ist, scheint dabei die Art der Kohlenstoffquelle, die im Medium vorhanden ist, einen Einfluß auf den Export von L-Lysin zu haben. Da im Fall von Glucose die niedrigste Exportaktivität beobachtet werden konnte, wurde in Analogie zu *E. coli* (Potsma *et al.*, 1993) eine hemmende Wirkung von Komponenten des PTS-Systems (Phosphotransferase-Systeme) auf den Lysin-Exportcarrier vorgeschlagen (Erdmann *et al.*, 1994). Auf genetischer Ebene wird *lysE* durch den Regulator LysG (*governing L-lysine export*) reguliert. LysG weist hohe Ähnlichkeiten zu bakteriellen Regulatorproteinen der LTTR -Familie (*LysR type transcriptional regulator*) auf (Schell, 1993). Es besitzt am N-Terminus ein charakteristisches Helix-Turn-Helix Motiv für die DNA-Bindung. Für eine Regulation auf transkriptioneller Ebene spricht weiterhin, daß stromaufwärts des *lysE* Transkriptionsstarts die partiell palindromische Region ACTN₇AGT lokalisiert ist, welche als typische Erkennungssequenz zur Bindung eines LTTR's dienen kann (Schell, 1993). Durch Analyse von *lysE'**lacZ*-Fusionsstämmen konnte LysG als positiver Regulator der *lysE* Transkription identifiziert werden (Bellmann, 2000). Dabei wirkt L-Lysin als Induktor der LysG-vermittelten Transkription von *lysE*. Neben L-Lysin sind auch die beiden basischen Aminosäuren L-Arginin und L-Histidin, sowie L-Citrullin Induktoren der LysG-vermittelten *lysE*-Expression (Bellmann, 2000).

Ziel der Arbeit

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, daß der Export von verschiedenen niedermolekularen Substanzen Carrier-vermittelt erfolgt. Der Lysintransport in *C. glutamicum* ist dabei *in vivo* als sekundärer Prozeß charakterisiert worden. Nach Klonierung und Sequenzierung des *lysE*-Gens ist eine funktionelle Analyse des Lysin-Exportcarriers auf molekularer Ebene möglich geworden.

In der vorliegenden Arbeit sollten durch ortsgerichtete Mutagenese funktionell und/oder strukturell wichtige Aminosäurereste von LysE identifiziert werden. Die dabei interessant erscheinenden LysE-Mutanten sollen zu Untersuchungen der dimeren Struktur des Carriers dienen, als auch zur Analyse des Lysin-Exportcarriers unabhängig von seiner physiologischen und regulatorischen Umgebung eingesetzt werden. Dazu sollte der Exportcarrier heterolog in *E. coli* exprimiert und gereinigt werden. Die funktionelle Rekonstitution des Lysin-Exportcarriers in künstliche Liposomen sollte sich anschließen.

2. Material und Methoden

Alle im Text erwähnten Chemikalien und Reagenzien wurden, sofern nicht näher bezeichnet, von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech Inc. (Freiburg), BioRad GmbH (München), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Millipore (Eschborn), Roth (Karlsruhe), Schleicher & Schuell (Dassel), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen) und Qiagen (Hilden) bezogen. Voll- und Komplexmedien stammten von Difco Laboratories (Detroit, USA).

2.1. Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* - und *C. glutamicum* - Stämme sowie deren Eigenschaften sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tab. 1: Verwendete *E. coli* und *C. glutamicum*-Stämme sowie ihre Eigenschaften

Stamm	Relevanter Geno- / Phänotyp	Referenz
<u>E. coli</u>		
DH5 α -mcr	<i>endA1 supE44 thi-1 λ^- recA1 gyrA96 relA1 deoR $\Delta(lacZYA-argF)$ U169 $\Phi80\Delta lacZ \Delta M15mcrA \Delta(mmr hsdRMS mcrBC)$</i>	Grant <i>et al.</i> , 1990
JM109	<i>F' traD36 lac^f $\Delta(lacZ)M15 proA^+B^+ / e14^- (McrA^-) \Delta(lac-proAB) thi gyrA96 (NaI^R) endA1 hsdR17 (r_k^- m_k^-) relA1 supE44 recA1$</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
<u>C. glutamicum</u>		
ATCC 13032	Wildtyp	Abe <i>et al.</i> , 1967
ATCC13032 $\Delta lysEG$	Deletion eines 1236 bp <i>StuI-MluI</i> -Fragmentes mit größtem Teil der Gene <i>lysE</i> , <i>lysG</i>	Vrljic <i>et al.</i> , 1996
ATCC13032DHPE	Deletion der Gene <i>betP</i> , <i>putP</i> , <i>ectP</i> , <i>proP</i>	Peter <i>et al.</i> , 1998
R127	Restriktionsdefekt, <i>res</i>	Liebl <i>et al.</i> , 1989

Tab. 2: Verwendete Plasmide mit ihren Markern und Eigenschaften

Plasmid	Marker / Eigenschaft	Referenz
pET-3a/ <i>lysE</i>	pET-3a mit 708 bp <i>Bam</i> HI/ <i>Nde</i> I <i>lysE</i> Insert; amplifiziert durch PCR	Massow, unveröffentlicht
pUC18/ <i>lysEG2.4</i>	pUC18 mit 2.4 kb <i>Bam</i> HI Insert aus pMV10 und den Genen <i>lysE</i> und <i>lysG</i>	Vrljic <i>et al.</i> , 1996
pUC18/ <i>lysEG2.4B</i>	pUC18/ <i>lysEG2.4</i> mit durch ortsgerichtete Mutagenese eingeführter <i>Bgl</i> II-Schnittstelle an Position 15	diese Arbeit
pUC18/ <i>lysEG2.4BS</i>	pUC18/ <i>lysEG2.4B</i> mit durch ortsgerichtete Mutagenese eingeführter <i>Stu</i> I-Schnittstelle an Position 706	diese Arbeit
pASK-IBA3	Expressionsvektor für C-terminale Strep-tagII Fusion 3.23 kb; Amp ^R	Skerra <i>et al.</i> , 1994
pBEUM1	pASK-IBA3 mit 708 bp <i>lysE</i> -Insert; amplifiziert durch PCR	diese Arbeit
pBEUM4	pASK-IBA3 mit 708 bp <i>lysE</i> -Insert mit Stopcodon vor dem Streptag	diese Arbeit
pBEUM5	pASK-IBA3 mit 597 bp <i>lysE</i> -Insert; amplifiziert durch PCR	diese Arbeit
pBEUM11	pASK-IBA3 mit 708 bp <i>lysE</i> -Insert mit durch ortsgerichtete Mutagenese eingeführter <i>Bgl</i> II-Schnittstelle an Position 15	diese Arbeit
pBEUM12	pASK-IBA3 mit 712 bp <i>lysE</i> -Insert mit durch ortsgerichtete Mutagenese eingeführter <i>Stu</i> I-Schnittstelle an Position 706	diese Arbeit
pBEUM12C45A	durch ortsgerichtete Mutagenese in pBEUM12 hergestellte Vektoren mit einer Aminosäuresubstitution an angegebener Position	diese Arbeit
pBEUM12D49N		diese Arbeit
pBEUM12D49K		diese Arbeit
pBEUM12D49A		diese Arbeit
pBEUM12D49E		diese Arbeit
pBEUM12D61A		diese Arbeit
pBEUM12D61E		diese Arbeit
pBEUM12D61K		diese Arbeit
pBEUM12D72A		diese Arbeit
pBEUM12D72E		diese Arbeit

Plasmid	Marker/Eigenschaft	Referenz
pBEUM12R75E		diese Arbeit
pBEUM12R75K		diese Arbeit
pBEUM12T153A		diese Arbeit
pBEUM12L155A		diese Arbeit
pBEUM12N156A		diese Arbeit
pBEUM12N156Q		diese Arbeit
pBEUM12P157A		diese Arbeit
pBEUM12N158A		diese Arbeit
pBEUM12N158Q		diese Arbeit
pBEUM12N158H	durch ortsgerichtete Mutagenese in	diese Arbeit
pBEUM12D162N	pBEUM12 hergestellte Vektoren mit	diese Arbeit
pBEUM12D162K	einer Aminosäuresubstitution an	diese Arbeit
pBEUM12D162A	angegebener Position bzw. Deletionen der	diese Arbeit
pBEUM12D162E	angegebenen Kodons	diese Arbeit
pBEUM12 Δ 91-98	im <i>lysE</i> -Gen	diese Arbeit
pBEUM12 Δ 99-115		diese Arbeit
pBEUM12 Δ 115-126		diese Arbeit
pBEUM12 Δ 127-140		diese Arbeit
pBEUM12 Δ 91-140		diese Arbeit
pBEUM12 Δ 99-126		diese Arbeit
pBEUM12 Δ 91-114		diese Arbeit
pBEUM12 Δ 115-140		diese Arbeit
pBEUM12 Δ 91-126		diese Arbeit
pEKEx2	Expressionsvektor, Km ^R , tac Promotor, oriV _{E.c.} oriV _{C.g.}	Eikmanns <i>et al.</i> , 1991
pEKEx2/ <i>lysE</i>	pEKEx2 mit 858 bp <i>Scal-PvuII</i> Insert aus pJC/ <i>lysEG2.4</i>	Vrljic <i>et al.</i> , 1996
pSM1	pEKEx2 mit N-terminal Strep-getagtem BetP- Insert	Morbach, unveröffentlicht
pUMB	pEKEx2 mit 861 bp <i>Scal-PvuII</i> Insert aus pUC18/ <i>lysEG2.4BS</i>	diese Arbeit
pUMBVM	pUMB mit 723 bp <i>BglIII/StuI lysE</i> Insert; amplifiziert durch PCR	diese Arbeit
pUMBDimer	pUMB mit zweitem <i>lysE</i> -Gen vor dem Stopkodon	diese Arbeit

Plasmid	Marker/Eigenschaft	Referenz
pUMBC45A		diese Arbeit
pUMBD49N		diese Arbeit
pUMBD49K		diese Arbeit
pUMBD49A		diese Arbeit
pUMBD49E		diese Arbeit
pUMBD61A		diese Arbeit
pUMBD61E		diese Arbeit
pUMBD61K		diese Arbeit
pUMBD72A		diese Arbeit
pUMBD72E		diese Arbeit
pUMBR75E		diese Arbeit
pUMBR75K		diese Arbeit
pUMBT153A		diese Arbeit
pUMBL155A		diese Arbeit
pUMBN156A		diese Arbeit
pUMBN156Q	durch Umklonierung eines <i>BglIII</i> - <i>StuI</i>	diese Arbeit
pUMBP157A	Fragmentes aus dem entsprechenden	diese Arbeit
pUMBN158A	pBEUM12 Vektor in den ebenfalls <i>BglIII</i> - <i>StuI</i>	diese Arbeit
pUMBN158Q	geschnittenen Vektor pUMB	diese Arbeit
pUMBN158H		diese Arbeit
pUMBD162N		diese Arbeit
pUMBD162K		diese Arbeit
pUMBD162A		diese Arbeit
pUMBD162E		diese Arbeit
pUMB Δ 91-98		diese Arbeit
pUMB Δ 99-115		diese Arbeit
pUMB Δ 115-126		diese Arbeit
pUMB Δ 127-14		diese Arbeit
pUMB Δ 91-140		diese Arbeit
pUMB Δ 99-126		diese Arbeit
pUMB Δ 91-114		diese Arbeit
pUMB Δ 115-140		diese Arbeit
pUMB Δ 91-126		diese Arbeit

2.2 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

2.2.1 Nährmedien für *E. coli* und *C. glutamicum*

Zur Kultivierung von *E. coli* wurde das Vollmedium Luria Bertani (LB) (Bacto Trypton 10 g/l, Bacto Yeast Extrakt 5 g/l, NaCl 5 g/l) verwendet. Zur Herstellung von Festmedium wurde vor dem Autoklavieren 16 g/l Bacto Agar zugesetzt. Die *in vivo* Aminosäuretransportmessungen wurden in dem Minimalmedium M9 nach Tanaka *et al.* (1967) durchgeführt. Die Anzucht zur Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte auf SOB-Medium (2% Bacto Trypton, 0,5% Bacto Yeast Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂) (Hanahan, 1985). Nach der Transformation wurden die Zellen in das Regenerationsmedium SOC (SOB mit 20 mM Glucose) (Hanahan, 1985) überführt.

Zur Kultivierung von *C. glutamicum* und zum Zwecke der DNA-Isolierung wurde LB-Medium verwendet. Zur Kultivierung vor Durchführung der biochemischen Versuche wurden die Zellen in dem Komplexmedium BHI (Brain Heart Infusion, Difco Laboratories, Detroit, USA) angezogen. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in das Regenerationsmedium BHIS (BHI + 0,5 M Sorbitol) überführt.

2.2.2 Medienzusätze

Die Selektion von rekombinanten Stämmen erfolgte durch die Zugabe von sterilfiltriertem Carbenicillin (100 µg/ml), Kanamycin (25 µg/ml) bzw. Chloramphenicol (25 µg/ml) zu den jeweiligen autoklavierten Medien. Zur Induktion der Proteinexpression von Genen, die unter der Kontrolle des Tetrazyklinpromotors vorlagen, wurde dem Medium 200 µg/l Anhydrotetrazyklin zugesetzt. Zur Expression von Genen, die unter der Kontrolle IPTG-induzierbarer Promotoren vorlagen, wurde dem Medium, wenn nicht anders angegeben, 1 mM IPTG zugesetzt.

2.2.3 Kultivierungsbedingungen

Die Kultivierung von *E. coli*-Zellen erfolgte, wenn nicht anders angegeben, aerob bei 37°C unter Verwendung der durch die Resistenzmarker notwendigen Antibiotika. *C. glutamicum*-Kulturen wurden bei 30°C aerob auf Schüttlern bei 110-120 rpm inkubiert. Die Zelldichte der Bakterienkulturen wurde photometrisch durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm bestimmt (Spektrophotometer Novaspec II, Pharmacia Biotech Inc.). Dabei enthält eine Bakterienkultur mit einer OD₆₀₀ von 1 etwa 10⁹ Zellen pro ml (Miller, 1992). Bakterienstämme bzw. die mit den entsprechenden Plasmiden transformierten Stämme wurden als Glycerindauerkulturen gelagert. Hierzu wurden frische Kulturen, die sich in der stationären

Wachstumsphase befanden, mit Glycerin (50% Endkonzentration) versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte dann bei -80 °C oder kurzzeitig bei -20 °C.

2.2.4 Herstellung transformationskompetenter Zellen und Transformation

Transformationskompetente *E. coli* Zellen wurden nach der Methode von Inoue *et al.* (1990) hergestellt und transformiert. Kompetente Zellen von *C. glutamicum* wurden nach der Methode von Liebl *et al.* (1989), modifiziert durch van der Rest *et al.* (1999), hergestellt und durch Elektroporation (2,5 kV, 600 Ω , 2,5 μ F) mit einem Bio-Rad-Gene-Pulser (Bio-Rad, München) mit Plasmiden (1 μ g Plasmid DNA pro Transformation) transformiert.

2.3. Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Plasmidpräparation aus *E. coli* und *C. glutamicum*

Für die Plasmid-Mini-Präparation aus *E. coli* wurde das GFXTM Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Um größere Mengen an Plasmid-DNA zu erhalten wurde das QIAfilter Plasmid Midi Kit (QIAGEN, Hilden) verwendet. Die Plasmid-Mini-Präparation aus *C. glutamicum* wurde mit dem QIAprep Plasmid Spin Kit (QIAGEN, Hilden) durchgeführt. Dabei wurden folgende Modifikationen des Ausgangsprotokolls vorgenommen: Die Zellen wurden in der doppelten Menge Puffer P1, der mit 15 mg/ml Lysozym versetzt war, resuspendiert. Die Volumen der folgenden Puffer P2 und P3 wurden ebenfalls verdoppelt. Der optionale Waschschrift wurde grundsätzlich durchgeführt. Die mit den genannten Methoden isolierte Plasmid-DNA konnte direkt zur Elektroporation oder für die Sequenzierung eingesetzt werden.

2.3.2 Modifikationen von DNA

Die verschiedenen Techniken zur *in vitro* DNA-Rekombination wie Spaltung mit Restriktionsenzymen, Klenow-Reaktion, Behandlung mit alkalischer Phosphatase, Ligation, Phenolextraktion und Ethanolpräzipitation wurden nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt.

2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde zur *in vitro*-Vervielfältigung von DNA-Fragmenten verwendet (Mullis *et al.*, 1986; Saiki *et al.*, 1988). Die zur Klonierung des *lysE*-Gens verwendeten Oligodesoxynukleotide sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tab. 3: Synthetische Oligodesoxynukleotide zur Klonierung:

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
Strep 1 s	AGTAGT <u>GGTCTCGA</u> ATG GTGATCATGGAAATCTTC
Strep rev as	ACATGAG <u>GGTCTCAG</u> CGCTACCCATCAACATCAGTTTG
LysEDimer for s	GGCTT <u>AGGCCT</u> GATGGTGATCATGGAG
LysEDimer rev	CTAC <u>AGGCCT</u> AAGCCGGGACCCATCAACATCAG

Eigenschaften: Kursive, unterstrichene Sequenzabschnitte markieren die jeweiligen Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen. Fett gedruckte Kodons stellen die Start- bzw. Stoppkodons dar.

In einem 50 µl PCR-Ansatz wurden 10 ng Plasmid-DNA (*template*), je 20 pmol Primer, 1 µl eines dNTP-Gemisches (je 10 mM dATP, dCTP, dTTP, dGTP; Sigma, Deisenhofen), 1 µl *Pfu*-Polymerase (2 U/µl) und 5 µl des 10fach konzentrierten *Pfu*-Polymerasepuffers (100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 200 mM Tris-HCl pH 8,75, 20 mM MgSO₄, 1 % Triton X-100, 1 mg/ml BSA) gemischt und die PCR gestartet. Die gewählte Annealingtemperatur richtete sich nach dem verwendeten Primerpaar. In der Regel wurden 25 Zyklen durchgeführt. Zur Durchführung wurden Thermocycler der Firmen Eppendorf (Mastercycler Gradient) und PE Applied Biosystems, Weiterstadt (GeneAmp®PCR System 9700) benutzt.

2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Analytische und präparative Auftrennung von DNA oder ihren Restriktionsfragmenten erfolgte elektrophoretisch in 0,8 - 1,5 % (w/v) TAE-(40 mM Tris, 2 mM EDTA pH 8,0; 20 mM Essigsäure) Agarosegelen nach Sambrook *et al.* (1989). War die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen zur weiteren Klonierung notwendig, wurde die DNA mit Hilfe des QIAquick-Kits (QIAGEN, Hilden) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Zur Dokumentation wurde die Video-Geldokumentationsanlage ImageMaster (Amersham Pharmacia, Freiburg) genutzt.

2.3.5 Ortsgerichtete Mutagenese

Durch ortsgerichtete Mutagenese wurden rekombinante Lysin-Exportcarrier mit je einem Aminosäureaustausch konstruiert. In einer PCR-ähnlichen Reaktion wurde mit zwei komplementären Oligodesoxynukleotiden, die den gewünschten Basenaustausch trugen, die Mutation in die neusynthetisierten Stränge eingebaut. Bei der Reaktion wurde das gesamte Plasmid, das das zu mutierende Gen enthielt, amplifiziert. Anschließend wurde die „template“-DNA durch einen Verdau des Ansatzes mit *DpnI*, einem Restriktionsenzym, das

nur methylierte und hemimethylierte DNA als Substrat akzeptiert (Nelson und McClelland, 1992), abgebaut. Kompetente *E. coli* DH5 α mcr-Zellen wurden nach dem Verdau mit der verbleibenden, mutierten DNA transformiert. In den Zellen wurden die unterbrochenen Stränge durch Ligase verknüpft. Die für die Durchführung der Methode benötigten Enzyme und Lösungen wurden dem *QuickChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, Heidelberg) entnommen. Die Mutagenese wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die in Tabelle 4 aufgeführten Oligodesoxynukleotide wurden zur ortsgerichteten Mutagenese des *lysE*-Gens eingesetzt.

Tab. 4: Synthetische Oligodesoxynukleotide für die ortsgerichtete Mutagenese:

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
BgIII s	GGTGATCATGG <u>AGATCT</u> TCATTACAG
BgIII as	CTGTAATGA <u>AGATCT</u> CCATGATCACC
StuI s	CAAACGTATGTTGTT <u>AGGCCT</u> GTAGTTTTTCGCGG
StuI as	CCGCGAAAACCTAC <u>AGGCCT</u> AACAACATCAGTTTG
C45A s	GTTCTTCTCGTG GCG TTAATTTCTGAC
C45A as	GTCAGAAATTA CGC CACGAGAAGAAC
D49NKA s	GTTTAATTTCT RMW GTCTTTTTG
D49NKA as	CAAAAAGAC WKY AGAAATTAAC
D49N s	GTGTGTTTAATTTCT AAC GTCTTTTTGTTC
D49N as	GAACAAAAGAC GTT AGAAATTAACACAC
D61AKE s	TTGGGCGTT RMG CTTTTGTC
D61AKE as	GGACAAAAG CKY AACGCCCAAG
D72NKA s	GATCGTGCTC RMW ATTATGCGC
D72NKA as	GCGCATAAT WKY GAGCACGATC
R75EK s	GATATTATG RAA TGGGGTGCC
R75EK as	GCCACCCCA TTY CATAATATC
T153A s	CAATCGTGCTG GCG TGGTTGAAC
T153Aas	GTTCAACCA CGC CAGCACGATTG
Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
	CTGACCTGG GCG AACCCGAATG

L155A s	
L155A as	CATTCGGGTT CG CCAGGTCAG
N156AQ s	GACCTGGTTG SMG CCGAATGCG
N156AQ as	CGCATTTCGG CKS CAACCAGGTC
P157A s	CTGGTTGAAC GCG AATGCGTATTTG
P157A as	CAAATACGCATT CGC GTTCAACCAG
N158Q s	GGTTGAACCCG CAG GCGTATTTG
N158Q as	CAAATACGC CTG CGGGTTCAACC
D162NKA s	GCGTATTTG RMW GCGTTTGTG
D162NKA as	CACAAACGC WKY CAAATACGC
D162E s	GCGTATTTG GAA GCGTTTGTG
D162E as	CACAAACGC TTC CAAATACGC

Fett gedruckte Sequenzabschnitte markieren die jeweiligen Kodons zur gezielten Substitution einer Aminosäure durch ortsgerichtete Mutagenese. Kursive, unterstrichene Sequenzabschnitte zeigen Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen an. as und s bezeichnen die *antisense* oder *sense* Orientierung der Oligodesoxynukleotide. Nomenklatur der Basen nach NC-IUB (1985).

Für die Einführung von Deletionen wurden die Primer so gewählt, daß sie den gewünschten Deletionsort flankierten. In der PCR wurde mit Ausnahme der gewünschten Deletion die gesamte DNA des Elternplasmids pBEUM12 amplifiziert. Das PCR-Fragment wurde nach Gelreinigung phosphoryliert und religiert. Zur Herstellung der Mutanten wurden die in Tabelle 5 aufgeführten Oligodesoxynukleotide verwendet.

Tab. 5: Synthetische Oligodesoxynukleotide für die Deletionen:

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
Δ91-98 s	GAAGCGCCACAGATC
Δ91-98 as	CGCTGCCATGACGGC
Δ99-114 s	ACGCCTTTGGGCGGTTC
Δ99-114 as	CACCTTGTTTGTTCATGG
Δ115-126 s	CGCAACCGGGTGCG
Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
Δ115-126 as	GTCATCGGGCACGG
Δ127-140 s	GTTTGGGTAAAGCCC

Δ127-140 as	CGTGTCAGTGGCCAC
-------------	-----------------

as und s bezeichnen die *antisense* oder *sense* Orientierung der Oligodesoxynukleotide.

2.3.6 DNA-Sequenzierung

Zur Überprüfung von Klonierungen und Mutationen wurden die jeweils konstruierten Plasmide sequenziert. Die Sequenzreaktion basiert auf der Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* (1977) und wurde nach Zimmermann *et al.* (1990) modifiziert. Bei dieser Methode wird der Kettenabbruch von Nukleotiden ausgelöst, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Die Reaktion entspricht einer abgewandelten PCR, in der eine modifizierte AmpliTaq®DNA Polymerase eingesetzt wird. Die Sequenzierreaktion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt (ABI PRISM™ Big Dye Reaction Terminator Cycle Sequencing Kit, PE Applied Biosystems, Weiterstadt) und die Sequenzierungsprodukte mit einer automatischen Sequenzierapparatur ABI PRISM 310 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) kapillarelektrophoretisch getrennt und detektiert. Die für die Sequenzierreaktionen eingesetzten Oligodesoxynukleotide sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tab. 6: Synthetische Oligodesoxynukleotide zur Sequenzierung

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
E2 s	GGCACCTTGGGCGTTGATC
E3 s	GGAGGTGAGCGTCGATAAG
E4 s	CAAGCCTGATCTGGTTCCC
E5 as	TTCAATGATCTGTGGCG
ASK for s	GAGTTATTTTACCACTCCCT
ASK rev as	CGCAGTAGCGGTAAACG

as und s bezeichnen die *antisense* oder *sense* Orientierung der Oligodesoxynukleotide.

2.4. Allgemeine analytische Methoden

2.4.1 Proteinbestimmungen

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden verschiedene Methoden verwendet. Die Bestimmung der Proteinkonzentration in Gesamtzellaufschlüssen, im Cytoplasma und in den Membranfraktionen wurden mit der Methode nach Lowry (Lowry *et al.*, 1951), modifiziert nach Helenius und Simons (Helenius und Simons, 1972) durchgeführt. Die Methode nach Bradford (Bradford, 1976) wurde angewendet um die Proteinkonzentrationen der Fraktionen nach der StrepTactin-Affinitätschromatographie zu bestimmen. Zur Bestimmung der Proteinmenge in Proteoliposomen wurde die Proteinkonzentration nach der Amido Schwarz-Methode (Schaffner und Weissmann, 1973) bestimmt.

2.4.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bakterielle Proteine oder Zellextrakte aus *E. coli* wurden in 12%-igen SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970) elektrophoretisch getrennt. Membranpräparationen aus *C. glutamicum* wurden in 10%-igen Glycerin-haltigen Tricine-SDS-Polyacrylamidgelen (Schägger & Jagow, 1987) elektrophoretisch getrennt. Der direkte Nachweis der Proteine in den Gelen erfolgte je nach aufgetragener Proteinmenge mittels Silberfärbung (Blum *et al.*, 1987) oder Coomassie Brilliant Blau Färbung (Sambrook *et al.*, 1989). Für eine spezifische Detektion des Lysinsekretionscarriers wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt.

2.4.3 Western-Blot-Analyse

Zum immunologischen Nachweis der Proteine mit Antikörpern wurde die Methode von Towbin *et al.* (1979) verwendet. Die Übertragung der Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF (Polyvinyliden-Difluorid)-Membran wurde mittels des *semi-dry* Blotverfahrens (Kyhse-Andersen, 1984) durchgeführt. Der anschließende immunologische Nachweis von LysE erfolgte entweder mit einem polyklonalen Antikörper, der gegen den *Loop* von LysE gerichtet war (Vrljic *et al.*, 1996) oder einem polyklonalen Antikörper, der gegen LysEStrep hergestellt wurde (diese Arbeit). Nach Blockieren der freien Bindungsstellen auf der Membran mit Milchpulver, wurde der erste Antikörper für 2 h bei RT 1:1000 und der zweite Antikörper (Ziege anti-Kaninchen, gekoppelt an alkalische Phosphatase) bei RT für 1 h (1:10000) inkubiert. Der kolorimetrische Nachweis erfolgte durch die Reaktion der alkalischen Phosphatase mit den Substraten BCIP und NBT (Roth, Karlsruhe).

2.4.4 Silikonölzentrifugation

Um intrazelluläre Metabolite analysieren und 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 und Pfaff, 1967). Hierzu wurden 400 µl-Mikrozentrifugenröhrchen (Beckman Instruments GmbH, München) eingesetzt, in denen jeweils 30 µl 20%-ige Perchlorsäure von 70 µl Silikonöl der Dichte $1,04 \text{ g cm}^{-3}$ (AR 200, Wacker Chemie, München) überschichtet war. Pro Meßpunkt und Kultur wurden drei Silikonöl-Röhrchen verwendet. Jeweils 200 µl Kultur wurden auf die Silikonölschicht pipettiert und sofort für 45 Sekunden in der Microfuge E (Beckman Instruments GmbH, München) bei 13750 rpm zentrifugiert. Das als Überstand auf der Silikonölphase verbliebene Kulturmedium wurde abpipettiert, vereinigt und bis zur Bestimmung der Aminosäuren bei -20°C aufbewahrt. Zur Bestimmung der zellinternen Aminosäure-Konzentrationen mußte das in der Perchlorsäurephase vorliegende Zellpellet aufgearbeitet werden. Die Aufarbeitung erfolgte nach der bei Hoischen und Krämer (1989) beschriebenen Methode durch Ultraschallaufschluß der Zellen und Neutralisation des so erhaltenen Extrakts durch KOH (5 M) und Triethanolamin (1 M). Nach Zentrifugation (10 min, 13000 rpm, 4°C) konnten die Überstände zur Aminosäure-Bestimmung mittels HPLC (*high performance liquid chromatography*) verwendet werden.

2.4.5 reversed phase HPLC

Die quantitative Bestimmung von Aminosäuren erfolgte mittels *reversed phase* HPLC (Lindroth und Mopper, 1979). Es wurden HPLC-Geräte der Typen HP1090 und HP1100 (Hewlett-Packard, Waldbronn) mit angeschlossenem Fluoreszenzdetektor (HP1046 A) verwendet; die Systemsteuerung erfolgte über die „HP-Chem-Station“. 1 µl der zu analysierenden Aminosäure-Lösung wurde zur automatischen Vorsäulenderivatisierung mit 10 µl *o*-Phthaldialdehyd/2-Mercaptoethanol-Fertigreagenz (FluoraldehydeTM, Pierce, USA) gemischt. Die dabei entstehenden fluoreszierenden, thiosubstituierten Isoindole (Jones und Gilligan, 1983) wurden auf einer *reversed phase* Säule (Hypersil 5µ ODS; CS Chromatographie Service, Langerwehe) über ein Gradientenprogramm mit zunehmend unpolarer Phase (Methanol) aufgetrennt. Das polare Eluent war 0,1 M Natriumacetat pH 7,2. Die Flußrate lag bei $0,5 \text{ ml min}^{-1}$. Die Detektion der Aminosäure-Derivate erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 230 nm und einer Emissionswellenlänge von 455 nm. Die Aminosäure-Konzentrationen wurden über einen Vergleich mit einem externen Standard und Ornithin als zusätzlichem internen Standard berechnet. Zur Quantifizierung der zellinternen

Aminosäure-Konzentrationen wurden folgende Parameter berücksichtigt (Gutmann, 1993): Eine optische Dichte (OD_{600}) von 1 entspricht $0,3 \text{ mg Zellrockengewicht ml}^{-1}$ und die Zellen haben ein Volumen von $2,0 \text{ } \mu\text{l mg Zell-Trockengewicht}^{-1}$.

2.5. Biochemische Methoden

2.5.1 Quantitative Bestimmung von Aminosäuren

C. glutamicum-Kulturen wurden über Nacht bei 30°C auf Komplexmedium vorkultiviert und am Morgen in frisches Komplexmedium übertragen. Die Kulturen wurden mit einer anfänglichen Zelldichte von $OD_{600} = 0,5$ gestartet und bei einer $OD_{600} = 2$ mit 1 mM IPTG induziert. Nach weiterem Wachstum für zwei Stunden bei 30°C wurden die Zellen durch Zentrifugation bei Raumtemperatur geerntet und dreimal mit sterilem MOPS-Puffer (50 mM MOPS , 10 mM NaCl , 10 mM KCl , $\text{pH } 7,5$) gewaschen. Die Zelldichte im Testansatz ($11,5 \text{ ml MOPS-Puffer} + 20 \text{ mM Glucose}$, $+ 1 \text{ mM Dipeptid} + 1 \text{ ml Zellsuspension}$) wurde auf eine OD_{600} von 7-8 eingestellt. Die ausreichende Belüftung der Zellsuspension wurde durch Rühren mittels eines Magnetrührers gewährleistet.

Für die Dipeptidfütterung mit *E. coli* wurden 50 ml LB-Medium mit einer frischen Übernachtskultur, die bei 30°C geschüttelt war, angeimpft, auf eine OD_{600} von 0,2 verdünnt und weiterhin bei 30°C auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Bei Erreichen einer OD_{600} von etwa 1,5 wurden die Zellen mit $200 \text{ } \mu\text{g/l Anhydrotetrazyklin}$ induziert und für weitere 1,5–2 Stunden kultiviert. Nach Zentrifugation der Zellen und zweimaligem Waschen mit M9-Medium wurden sie in M9-Medium resuspendiert. Die Zelldichte im Testansatz ($11,5 \text{ ml M9-Medium} + 0,4\% \text{ Glucose} + 1 \text{ mM Dipeptid} + 1 \text{ ml Zellsuspension}$) wurde auf eine OD_{600} von 5-6 eingestellt. Die ausreichende Belüftung der Zellen wurde auch hier durch Rühren auf einem Magnetrührer gewährleistet.

Die Probenentnahme bei beiden Ansätzen erfolgte über einen Zeitraum von 2 Stunden. Nach Quantifizierung der extrazellulären Lysinkonzentrationen konnten aus den Tangentensteigungen der Exportkurven, unter Berücksichtigung der jeweiligen Zell-Trockengewichte, die Exportraten berechnet werden.

Um zellinterne Aminosäure-Konzentrationen bestimmen zu können, wurden die Proben zur Silikonölzentrifugation (vgl. 2.4.4) eingesetzt.

2.5.2 Membranpräparationen

Der Lysin-Exportcarrier wurde sowohl bei homologer Expression in *C. glutamicum*, als auch bei heterologer Expression in *E. coli* in die Cytoplasmamembran der Zellen eingebaut. Zur Isolierung des Proteins und zur Herstellung von Fusionsvesikeln aus der Cytoplasmamembran von *C. glutamicum* wurden die Plasmamembranen präpariert.

2.5.2.1 Membranpräparation aus *E. coli*

Für die Präparation der Plasmamembran aus *E. coli* wurden 500 ml Zellen einer Kultur drei Stunden nach ihrer Induktion mit 200 µg/l Anhydrotetracyclin (IBA, Göttingen) geerntet und einmal mit TE-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,1 mM EDTA) gewaschen. Die Zellen wurden durch zwei „French-Press“ Durchgänge bei einem Druck von 20.000 psi in einer 40K French pressure cell (SLM Aminco, Rochester, USA) aufgeschlossen. Durch differentielle Zentrifugationsschritte wurden die Membranen aus dem Zelllysat isoliert. Nicht aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer wurden bei 20.000xg (4°C, 30 min) von der Suspension getrennt. Die Zentrifugation des Überstandes bei 200.000xg (4°C, 60 min;) führte zur Sedimentation der Membranfragmente. Diese wurden in 500 µl Puffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0) resuspendiert, einmal gewaschen und bis zu ihrer Verwendung bei –80°C gelagert.

2.5.2.2 Membranpräparation aus *C. glutamicum*

Für die Präparation von Membranen aus *C. glutamicum* wurden 500 ml einer Übernacht-Kultur in BHI Medium nach ihrer Ernte zweimal mit 0,9% NaCl (w/v) gewaschen und anschließend in Phosphatpuffer (50 mM NaPi pH 7,0, 1 mM MgSO₄) aufgenommen. Der Zellaufschluß erfolgte durch drei „French-Press“ Durchgänge bei einem Druck von 20.000 psi in einer 40K French pressure cell (SLM Aminco, Rochester, USA). Im Anschluß wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 20.000 xg abgetrennt. Anschließend wurden die Membranen mit einer 60 minütigen Ultrazentrifugation bei 200.000xg (4°C) konzentriert, zweimal mit Phosphatpuffer gewaschen und in Phosphatpuffer, der den Protease-Inhibitor Complete (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) enthielt, resuspendiert.

Die Auftrennung der erhaltenen Membranfragmente erfolgte auf einem Saccharose-Gradienten (3 ml 45 % Saccharose (w/v), 4 ml 55 % Saccharose (w/v) und 3 ml 70 % Saccharose (w/v)) nach Niederweiss *et al.* (1995). Die Membranen wurden 16 h bei 170.000xg (4°C) zentrifugiert. In dem Saccharosegradienten waren nach der Zentrifugation unterschiedliche Fraktionen zu erkennen. Diese Fraktionen wurden getrennt abgenommen, mit Phosphatpuffer gewaschen, die Membranen durch Zentrifugation bei 75.000xg sedimentiert und mit Phosphatpuffer auf eine Proteinkonzentration von 1 µg/µl eingestellt.

Zur Präparation kleiner Mengen Membranen aus *C. glutamicum* wurden 5 ml der Zellsuspension 2 h nach der Induktion mit 1 mM IPTG durch Zentrifugation (3200xg, 4°C, 10 min) geerntet, das Zellpellet in Phosphatpuffer (50 mM NaPi pH 7,0, 1 mM MgSO₄) resuspendiert und mit einem Ultraschalldesintegrator (Branson Sonifier W-250, Branson Sonic Power Co, Danbury, USA) im Eisbad aufgeschlossen. Die Aufschlussdauer betrug zweimal 5 Minuten bei einem „duty cycle“ von 30 % und einer Beschallintensität von 3. Nach

der Ultraschallbehandlung wurden die Zelltrümmer durch eine 30 minütige Zentrifugation (4 °C, 20.000 xg) abgetrennt. Der Überstand wurde abgenommen und die Membranen durch eine Zentrifugation (45 min, 4 °C, 200.000xg) pelletiert. Diese wurden in einem geringen Volumen Phosphatpuffer resuspendiert und bis zu ihrer Verwendung bei –20 °C gelagert.

2.5.3 Bestimmung der NADH-Oxidase-Aktivität

Zur Lokalisation der Plasmamembran in den durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation erhaltenen Membranfraktionen wurde die Aktivität der NADH-Oxidase mit einem Enzym-Assay nach Osborn *et al.* (1972) bestimmt. Gemessen wird hierbei die Extinktionsabnahme bei 340 nm nach Zugabe der Membranfragmente (Proteinkonzentration 1 µg/µl) zu 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5, der 0,12 mM NADH sowie 0,2 mM DTT enthält. Das Reaktionsvolumen betrug 1 ml. Die Reaktion folgt einer Kinetik erster Ordnung. Die spezifische Aktivität wurde aus der Änderung der Extinktion über die Zeit mit einem Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{\text{NADH}}=6,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ berechnet.

2.5.4 Isolierung des Lysin-Exportcarriers über StrepTactin-Affinitätschromatographie

Zur Isolierung des Lysin-Exportcarriers aus *E. coli*-Plasmamembranen wurden diese wie unter 2.5.2.1 beschrieben hergestellt und 500 µl pro Reinigung eingesetzt (entspricht 6-7 mg Membranprotein). Die Membranen wurden in einem Gesamtvolumen von 1 ml auf eine Endkonzentration von 100 mM Tris/HCl pH 8, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 3 % Triton X-100 (oder 2 % Dodecylmaltosid) eingestellt. Die Solubilisierung wurde durch das tropfenweise Zugeben des Detergenz zu den auf Eis rührenden Membranen gestartet, anschließend für weitere 30 Minuten unter Rühren inkubiert. Das Solubilisat wurde zentrifugiert (30 min, 4 °C, 20.000xg), der Überstand abgenommen und mit Puffer W (100 mM Tris/HCl pH 8, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl) im Verhältnis 1:1 (v/v) verdünnt.

Die Reinigung des heterolog in *E. coli* exprimierten rekombinanten Lysin-Exportcarriers erfolgte mit dem an den C-Terminus fusionierten Streptag II Affinitätsanhängsels (Schmidt *et al.*, 1996). Dieses vermittelt die Bindung an das StrepTactin (Voss und Skerra, 1997), das mit einem Beladungsgrad von 5 mg/ml an aktivierte Sepharose gekoppelt war (IBA, Göttingen). Eine mit der derivatisierten Sepharose befüllte Chromatographiesäule mit einem Bettvolumen von 1-2 ml wurde bei 4 °C mit Puffer W (100 mM Tris/HCl pH 8, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl), dem je nach Solubilisierung des Proteins 0,1 % Triton X-100 oder 0,1 % Dodecylmaltosid zugesetzt war, äquilibriert. Die Fußgeschwindigkeit der Säule wurde auf 0,5 ml min⁻¹ eingestellt. Nach Auftragen der solubilisierten Membranproteine wurde mit 10 fachem Säulenvolumen Puffer W (+ Detergens) gewaschen und das Protein mit 6 fachem Säulenvolumen 2,5 mM Desthiobiotin in Puffer W + Detergens eluiert. Zur Regeneration der

Säule wurde das Desthiobiotin mit 10 Säulenvolumen 1 mM HABA (in Puffer W) verdrängt, was zu einer intensiven Orangefärbung des Säulenmaterials führte. Das HABA wurde schließlich bis zur vollständigen Entfärbung des Säulenmaterials mit Puffer W ausgewaschen. Der Reinigungsverlauf wurde durch SDS-Gelelektrophorese überprüft, LysE-haltige Fraktionen vereinigt und sofort verwendet bzw. bei -20°C gelagert.

2.5.5 Rekonstitution des Lysin-Exportcarriers in künstliche Lipidmembranen

2.5.5.1 Trübungsmessung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rekonstitution in Anlehnung an die Methode von Rigaud (Rigaud *et al.*, 1995) durchgeführt. Dabei wird das Protein in bereits zu 25 % solubilierte Liposomen eingebaut. Um die Tritonkonzentration zu bestimmen, die benötigt wird, um die Liposomen zu 25% zu solubilisieren, wurde eine Trübungsmessung durchgeführt. Hierzu wurden unterschiedliche Mengen einer zuvor für vier Minuten mit Ultraschall behandelten Lipidlösung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und langsam wieder aufgetaut. Um Liposomen einheitlicher Größe zu erhalten, wurde die Lösung 15 mal durch einen 400 nm Polycarbonatfilter (Milsch Equipment, Laudenbach) extrudiert. Bei dem hierzu verwendeten Extruder handelte es sich um einen LiposoFastTM-Basic von der Firma Avestin Inc. (Ottawa, Kanada). Die optische Dichte dieser Liposomensuspension wurde im Photometer bei 600 nm bestimmt. Durch sukzessiven Zusatz einer 20%-igen (w/v) Triton X-100 Lösung konnte die zunehmende Solubilisierung der Liposomen bis hin zur vollständigen *mixed micelles*-Bildung über die Abnahme der optischen Dichte verfolgt werden.

2.5.5.2 Rekonstitution des Lysin-Exportcarriers in Liposomen aus Phosphatidylcholin

Phosphatidylcholin aus Truthahneiern (Typ XII-E, Sigma) wurde in 20 mM HEPES pH 6,8/ 50 mM KCl (oder 50 mM NaCl) resuspendiert und auf eine Konzentration von 100 mg/ml eingestellt. Diese Lipidsuspension wurde für 20 Minuten in einem Eisbad bei einem „duty cycle“ von 30 % und einer Beschallintensität von 3 in Rosettengefäßen beschallt (Branson Sonifier W-250, Branson Sonic Power Co, Danbury, USA). Die durch die Beschallung gebildeten Liposomen wurden aliquotiert und bei -20°C gelagert. Zur Rekonstitution wurden bei einem Gesamtvolumen des Ansatzes von 700 μl 112 μl beschallte Liposomen (100 mg/ml) mit 70 μl 1M HEPES pH 7,0 und einem variablen Volumen an Wasser verdünnt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und langsam aufgetaut. Nach 15maligem Extrudieren durch einen 400 nm Polycarbonatfilter wurde eine homogene Liposomensuspension hergestellt. Dieser Lösung wurden 35 μl 20% Triton X-100 (w/v) zugesetzt und der Ansatz für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Sollten die Liposomen

mit ^{14}C -Lysin oder ^{33}P -Phosphat beladen werden, so wurde dieses nach der Triton X-100 Zugabe hinzupipettiert. Das isolierte, solubilisierte LysEStrep wurde 10 Minuten später zugegeben. Die Menge an zugegebenem Protein war von dem einzustellenden Lipid-zu-Protein-Verhältnis (LPR) abhängig. Dieses wurde zwischen 200:1 und 50:1 variiert.

Um das Detergens wieder aus der Lösung zu entfernen, wurden Bio-Beads (Bio-Beads SM-2, 20-50 mesh; BioRad, München) zugegeben. Bio-Beads sind Polystyrolkugelchen, die das Detergens und andere hydrophobe Substanzen unspezifisch binden. Durch zweimalige Zugabe der 5-fachen Menge (w/w) an Bio-Beads (bezogen auf die eingesetzte Detergensmenge) und jeweilige Inkubation für 1h bei Raumtemperatur und eine weitere Zugabe der 10-fachen Menge an Bio-Beads und anschließender Inkubation für weitere zwei Stunden, konnte das Detergenz entfernt werden.

2.5.5.3 Rekonstitution des Lysin-Exportcarriers in Liposomen aus *E. coli* Lipiden

Der *E. coli polar total lipid extract* (Avanti Polar Lipids, Inc., USA) wurde zur Lagerung in Chloroform aufbewahrt. Vor Gebrauch der Lipide wurde das Chloroform am Rotationsverdampfer entfernt und die zurückbleibenden Lipide zur vollständigen Entfernung des Chloroforms für weitere 30 Minuten an einem Lyophilisator (Lyovac GT 2, Leybold Vacuum, Köln) gefriergetrocknet. Die Lipide wurden in 100 mM NaPi (oder 100 mM KPi) pH 7,0, dem 1,5% Octylglucosid (Calbiochem, Bad Soden) zugesetzt war, resuspendiert und auf eine Konzentration von 20 mg/ml eingestellt. Die Lipidsuspension wurde in Dialyseschläuche gefüllt und gegen 100 mM NaPi (oder 100 mM KPi) pH 7,0 mit 2 mM β -Mercaptoethanol unter leichtem Rühren bei RT dialysiert. Der Puffer wurde dreimal nach jeweils 4-5 h gewechselt. Die dialysierten Lipide wurden aliquotiert und bei -80°C gelagert. Zur Rekonstitution des Lysin-Exportcarriers wurden die *E. coli*-Lipide in 100 mM NaPi-Puffer pH 7,0/100 mM Sorbitol (oder 100 mM KPi-Puffer pH 7,0/100 mM Sorbitol) auf eine Konzentration von 5 mg/ml (w/v) verdünnt. Durch 15maliges Extrudieren durch einen 400 nm Polycarbonatfilter wurden unilamellare Liposomen einheitlicher Größe geformt. 5 mg dieser Liposomen wurden durch Zugabe von 25 μl 20% Triton X-100 (w/v) zum Teil solubilisiert und mit variablen Mengen an in 0,1 % Dodecylmaltosid (w/v) (oder 0,1% Triton X-100) vorliegendem gereinigtem Protein gemischt. Durch zweimalige Zugabe von Biobeads (5 fache Menge pro mg Triton X-100 (w/w); 10 fache Menge pro mg Dodecylmaltosid (w/w)) für je 1 Stunde bei Raumtemperatur und durch eine weitere Zugabe der doppelten Menge und Inkubation über Nacht, wurde das Detergenz entzogen und der Einbau des Proteins in die Liposomen gewährleistet. Nach Abtrennung der Bio-Beads wurden die Proteoliposomen abzentrifugiert (4°C , 30 min, 350.000xg), dreimal in 100 mM NaPi pH 7,0/100 mM Sorbitol (oder 100 mM KPi-Puffer pH 7,0/100 mM Sorbitol) gewaschen, in 50 μl des gleichen Puffers resuspendiert und bis zur Transportmessung bei -80°C gelagert.

2.5.6 Fusion corynebakterieller Plasmamembranen mit *E. coli*-Lipiden

Die durch Dialyse hergestellten *E.coli*-Lipid Liposomen wurden nach dem Auftauen im Eisbad beschallt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und langsam bei Raumtemperatur wieder aufgetaut. Dieser Einfrier-Auftauzyklus wurde zweimal wiederholt. Durch diese Zyklen entstehen große multilamellare Liposomen, die sich in der Größe und Anzahl der Lamellen unterscheiden. Durch 11 maliges Extrudieren durch einen 400 nm Polycarbonatfilter wurden unilamellare und in ihrer Größe homogene Liposomen hergestellt. Die Plasmamembranen wurden mit den unilamellaren Liposomen in einem Verhältnis von 1 mg Membranprotein (ca. 1 mg Lipid) zu 10 mg exogenem Lipid (Liposomen) gemischt. Dieses Gemisch wurde wiederum in flüssigem Stickstoff eingefroren und langsam bei Raumtemperatur aufgetaut. Die resultierenden multilamellaren Vesikel wurden 11 mal durch einen 400 nm Polycarbonatfilter extrudiert. Diese unilamellaren Fusionsvesikel wurden nach Ultrazentrifugation und Aufnahme in einem geeigneten Puffer auf eine Konzentration von 15 mg Protein/ml eingestellt und zu Transportmessungen eingesetzt.

2.5.7 Innenvolumenbestimmung

2.5.7.1 Innenvolumenbestimmung der Fusionsvesikel

Die Innenvolumenbestimmung der Fusionsvesikel erfolgte über den Einbau und anschließenden Nachweis von Glutamat in den Vesikeln. Dazu wurden die Vesikel wie unter 5.8 beschrieben in Gegenwart von 100 mM Glutamat hergestellt. Das Glutamat außerhalb der Vesikel wurde nach der Extrusion mittels Gelfiltrations-Chromatographie (Sephadex G75 Säule, 6 ml Säulenvolumen) abgetrennt und die resultierenden Vesikel zur Glutamatbestimmung eingesetzt. Die Glutamatbestimmung erfolgte über einen optischen Test, wobei vorhandenes Glutamat in Gegenwart von NAD^+ von der Glutamatdehydrogenase in 2-Oxoglutarat + NADH_2 + NH_3 umgesetzt wird. Das NADH_2 wird in der Folgereaktion in Gegenwart von INT (Iodnitrotetrazolium) von dem Enzym Diaphorase zu NAD^+ oxidiert. Dabei entsteht Formazan, welches einen violetten Niederschlag bildet, der jedoch in Gegenwart von Triton X-100 löslich ist, und bei einer Wellenlänge von 490 nm detektiert werden kann (Beutler und Michal, 1974). Bei Glutamatmengen von 1-6 nmol Glutamat bestand lineare Abhängigkeit zwischen der Glutamatmenge und der A_{490} .

2.5.7.2 Innenvolumenbestimmung der Liposomen

Das Innenvolumen der Proteoliposomen wurde über eine ^{33}P -Phosphatverteilung bestimmt. Dazu wurden die Liposomen in Gegenwart von ^{33}P -Phosphat hergestellt und das äußere Medium über eine Gelfiltrations-Chromatographie (Sephadex G75 Säule, 6 ml Säulenvolumen; Pharmacia Biotech, Freiburg) abgetrennt. Die Liposomen wurden aufgefangen und das Gesamtvolumen bestimmt. Verglichen wurden die dpm der Probe (bezogen auf das Gesamtvolumen) vor der Gelfiltration und die Gesamtcounts nach der Gelfiltration. Dies ergab das prozentuale Innenvolumen, welches in $\mu\text{l}/\text{mg}$ Phospholipid umgerechnet wurde.

2.5.8 Membranpotentialmessungen

Da für den Transport von Lysin mittels des Lysin-Exportcarriers ein Membranpotential vorhanden sein muß, wurde mit Fluoreszenzfarbstoffen das durch Valinomycin induzierte Kaliumdiffusionspotential in den Proteoliposomen und Fusionsvesikeln nachgewiesen.

2.5.8.1 Messung an Proteoliposomen aus *E. coli* Lipiden oder Phosphatidylcholin

Die Proteoliposomen wurden auf eine LPR von 100:1 eingestellt und enthielten intern 100 mM KPi pH 7,0. Die Reaktion wurde in 2 ml eines 100 mM NaPi pH 7,0, dem der kationische Fluoreszenzfarbstoff DiSC₃(5) (3,3'-Diisopropyl-thiocarbocyanin-iodid; Molecular Probes, Leiden) in einer Endkonzentration von 1,5 μM zugesetzt war, unter Rühren durchgeführt. Die Messung erfolgte mit einem Aminco Bowman Series 2 Lumineszenzspektrometer (SLM Instruments, Inc. USA) mit einer Anregungswellenlänge von 643 nm und einer Emissionswellenlänge von 666 nm. Die Bandbreite wurde auf 4 nm eingestellt. Das Potential wurde durch Zugabe von 0,5 μM Valinomycin (Endkonzentration) aufgebaut und konnte durch Zugabe von 0,5 μM Nigericin wieder aufgehoben werden. Pro Messung wurde 300 μg Lipid eingesetzt.

2.5.8.2 Messung an Fusionsvesikeln

Die Fusionsvesikel wurden in Gegenwart von 100 mM KPi pH 7,0 hergestellt und die Messung wurde wie unter 5.8.1 beschrieben durchgeführt. Pro Messung wurde 75 μg Lipid eingesetzt.

2.5.8.3 Messung an Zellen

Die Messungen des Membranpotentials an *C. glutamicum* Zellen wurde mit dem kationischen Fluoreszenzfarbstoff DiOC₅(3) (3,3'-Dipentyl-oxacarbocyanin-iodid; Molecular Probes, Leiden) durchgeführt. Die Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet, in 50 mM NaPi pH 7,0, 0,3 mM KCl, 10 mM Glucose gewaschen und auf eine OD₆₀₀ von 9 eingestellt. Zu 2 ml Puffer (50 mM NaPi pH 7,0, 0,3 mM KCl) wurde der Fluoreszenzfarbstoff in einer Endkonzentration von 200 nM zugegeben. Von der Zellsuspension wurden pro Messung 20 µl eingesetzt. Durch Zugabe von 2 µM Valinomycin und steigenden KCl-Konzentrationen, wurde das Potential schrittweise aufgehoben. Die Messung erfolgte mit einem Aminco Bowman Series 2 Lumineszenzspektrometer (SLM Instruments, Inc. USA) mit einer Anregungswellenlänge von 484 nm und einer Emissionswellenlänge von 510 nm. Die Bandbreite wurde auf 4 nm eingestellt.

2.5.9 Radiochemische Transportmessungen

2.5.9.1 Transportmessungen an Proteoliposomen

Der Lysin-Exportcarrier kann bei der Rekonstitution in zwei Orientierungen in die Liposomen eingelagert werden. Zum einen in der „*right side out*“ Orientierung, zum anderen in der *inside out* Orientierung. Daher wurden zwei verschiedenen Ansätze durchgeführt, um den LysE vermittelten Lysintransport in Proteoliposomen zu messen.

2.5.9.1.1 Aufnahmemessungen von Lysin

Zur Transportmessung wurden die Proteoliposomen aufgetaut, mit 300 µl 100 mM NaPi pH 7,0/100 mM Sorbitol aufgefüllt und 15 mal durch einen 400 nm Polycarbonatfilter extrudiert. Nach Ultrazentrifugation (20 min, 4°C, 350.000xg) und Aufnahme der Liposomen in 50 µl Puffer konnte der Lysinimport in die Proteoliposomen gemessen werden. Pro Meßansatz wurde 1 mg Lipid eingesetzt. Zu 1 ml des Transportpuffers (100 mM KPi pH 7,0/ 50 mM Lysin, 0,25 µM Valinomycin) wurden 5 µl ¹⁴C-Lysin (1,85 MBq/ml) pipettiert und der Puffer auf 30°C vorgewärmt. Die Transportreaktion (unter Rühren bei 30°C) wurde durch Zugabe des Puffers zu den Liposomen gestartet und nach verschiedenen Zeitpunkten wurden jeweils 100 µl der Lösung entnommen, über einen 0,2 µm Zellulosemischesterfilter (Millipore, Eschborn) mit einer Mehrfachfiltrationsanlage (Hoefer, Pharmacia Biotech) abfiltriert und zweimal mit 2,5 ml 100 mM LiCl gewaschen, um noch an den Zellen oder Filtern haftendes Medium zu entfernen. Die Filter wurden entnommen, mit 3,8 ml Szintillationscocktail (Rotiszint ecoplus, Roth, Karlsruhe) versetzt und die auf dem Filter verbleibende Radioaktivität in einem β-Counter (Beckman, München) bestimmt.

2.5.9.1.2 Exportmessungen von Lysin

Die Proteoliposomen wurden aufgetaut, mit 300 μl 100 mM KPi pH 7,0/50 mM Lysin und 5 μl ^{14}C -Lysin (1,85 MBq/ml) aufgefüllt und 15 mal extrudiert. Nach Ultrazentrifugation und Aufnahme der Liposomen in 50 μl Puffer konnte der Lysinexport aus den Proteoliposomen gemessen werden. Pro Meßansatz wurde 1 mg Lipid eingesetzt. Durch Zugabe des auf 30 °C vorgewärmten Transportpuffers (100 mM NaPi pH 7,0/ 100 mM Sorbitol, 0,25 μM Valinomycin) wurde die Transportreaktion (unter Rühren bei 30 °C) gestartet. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden jeweils 100 μl des Ansatzes entnommen, über 200 nm Zellulosemischesterfilter filtriert, gewaschen und die auf dem Filter verbleibende Radioaktivität im β -Counter bestimmt.

2.5.9.1.3 Glycinbetain Transportmessungen

Zur Bestimmung von Glycinbetain-Transport wurden Proteoliposomen verwendet, die das Protein BetP (Glycinbetain-Transporter aus *C. glutamicum*) enthielten (Rübenhagen *et al.*, 1999). Diese Proteoliposomen wurden wie unter 2.5.5.3 beschrieben hergestellt. Es wurde eine LPR von 20:1 eingestellt, und bei dem internen Puffer handelte es sich um 100 mM KPi pH 8,0. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Transportpuffers (100 mM Tris/Mes/250 mM NaCl, 0,125 μM Valinomycin, 15 μM ^{14}C -Glycin-Betain (650 Bq)) zu 5 μl Proteoliposomen (entspricht einer Proteinmenge von 7,5 μg) unter Rühren bei 30 °C gestartet. Nach 5, 10, 20 und 30 Sekunden wurden jeweils 200 μl der Lösung entnommen, filtriert, gewaschen und die verbleibende Radioaktivität in einem β -Counter bestimmt.

2.5.9.2 Transportmessungen an Fusionsvesikeln

Die wie unter 2.5.6 beschriebenen hergestellten Fusionsvesikel wurden nach dem Auftauen im Eisbad in einem Gesamtvolumen von 400 μl 100 mM NaPi pH 7,0 (oder 100 mM KPi pH 7,0) aufgenommen und 15 mal durch einen 400 nm Polycarbonatfilter extrudiert. Nach Ultrazentrifugation (20 min, 15 °C, 350.000xg) wurden sie in einem geeigneten Puffer aufgenommen und auf eine Konzentration von 15 mg Protein/ml eingestellt.

2.5.9.2.1 Aufnahmemessungen von Lysin

Die Vesikel wurden in 100 mM NaPi pH 7,0 /100 mM Sorbitol hergestellt. Der Transportpuffer bestand aus 980 μl 100 mM KPi pH 7,0 /50 mM Lysin (^{14}C -markiert), dem 5 μl 0,2 mM Valinomycin (Endkonzentration 1 μM) (oder 5 μl EtOH) zugesetzt wurden. Die Reaktion wurde durch Zugabe des auf 30 °C vorgewärmten Puffers zu den Fusionsvesikeln (16,6 μl ; entspricht 250 μg Protein) gestartet und nach 0, 1, 2, 3, 5, 7 und 10 Minuten wurden 100 μl des Ansatzes entnommen, über einen 0,45 μm Zellulosemischesterfilter abfiltriert und der

Filter zweimal mit 2,5 ml 100 mM LiCl gewaschen. Die auf dem Filter verbleibende Radioaktivität wurde in einem β -Counter bestimmt.

2.5.9.2.2 Exportmessungen von Lysin

Hierzu wurden die in KPi pH 7,0 hergestellten *E.coli* Liposomen mit den Membranfragmenten in Gegenwart von 50 mM ^{14}C -Lysin hergestellt. Diese Fusionsvesikel wurden anschließend 2 mal mit 100 mM KPi pH 7,0/100 mM Sorbitol gewaschen und auf eine Proteinkonzentration von 15 mg/ml eingestellt. Der Transportpuffer setzte sich in diesen Messungen aus 100 mM NaPi pH 7,0/100 mM Sorbitol und 1 μM Valinomycin zusammen. Gestartet wurde die Reaktion wiederum durch Zugabe des auf 30°C vorgewärmten Puffers zu den Fusionsvesikeln (16,6 μl ; entspricht 250 μg Protein) und nach 0, 1, 2, 3, 5, 7 und 10 Minuten wurden 100 μl des Ansatzes entnommen und über einen 0,45 μm Zellulosemischesterfilter abfiltriert. Die auf dem Filter verbleibende Radioaktivität wurde in einem β -Counter bestimmt.

2.5.9.2.3 Glycinbetain Transportmessungen

Die Fusionsvesikel wurden aus Membranen der *C. glutamicum* Stämme ATCC13032DHPE und dem Stamm ATCC13032DHPEpSM1 in Gegenwart von 100 mM KPi-Puffer pH 8,0 nach dem unter Punkt 2.5.6 beschriebenen Protokoll hergestellt. Pro Meßansatz wurden 16,6 μl Fusionen (entspricht 250 μg Membranprotein) eingesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Fusionsvesikel zu dem auf 30°C vorgewärmten Transportpuffer (100 mM Tris/Mes pH 7.5/250 mM NaCl, 1 μM Valinomycin, 15 μM ^{14}C -Glycinbetain gestartet und zum Zeitpunkt 0, nach 5, 10, 20, 30, 60, 150 und 300 Sekunden jeweils 100 μl der Lösung entnommen und über Zellulosemischesterfilter der Porengröße 0,45 μm (Millipore, Eschborn) filtriert. Die auf den Filtern verbleibende Radioaktivität wurde im β -Counter bestimmt.

3. Ergebnisse

3.1 Heterologe Expression des Lysin-Exportcarriers

Eine Voraussetzung für die Untersuchung des Lysin-Exportcarriers außerhalb seiner natürlichen Umgebung war, eine ausreichende Menge an gereinigtem Protein zur Verfügung zu haben. Im Vorfeld dieser Arbeit wurden bereits Versuche durchgeführt, um die heterologe Expression von *lysE* unter der Kontrolle verschiedener Promotoren in *E. coli* zu optimieren (Massow, persönliche Mitteilung). Die Expressionshöhe war jedoch immer sehr niedrig. Daher wurde in dieser Arbeit zur Expression und Reinigung des Lysin-Exportcarriers das StrepTactin-System verwendet.

3.1.1 Konstruktion der Expressionsplasmide

Die zu untersuchenden Gene unterliegen in dem StrepTactin-System der Kontrolle des Tetrazyklinpromotors und können durch die Fusion an eine Sequenz, die für ein Peptid aus zehn Aminosäuren kodiert (StrepTag), nach Expression durch Affinitätschromatographie gereinigt werden. Zur Herstellung einer C-terminalen Fusion von LysE an das StrepTag wurde das *lysE*-Gen per PCR amplifiziert, mit der Restriktionendonuklease *BsaI* verdaut und in den ebenfalls mit *BsaI* behandelten Vektor pASK-IBA3 kloniert. Der resultierende Vektor wurde pBEUM1 benannt. Bei dieser Klonierung entstand durch eine bei der PCR zufällig eingeführte Punktmutation eine *BsaI*-Schnittstelle im *lysE*, die zu einer C-terminal um 37 Aminosäuren verkürzten, aber *in frame* mit dem StrepTag fusionierten LysE-Mutante führte. Dieser Vektor wurde pBEUM5 genannt. Auch das unmarkierte Protein wurde unter der Kontrolle des Tetrazyklinpromotors exprimiert. Dazu wurde ein *XbaI/BamHI* Fragment aus dem Vektor pET-3a/*lysE* in den *XbaI/BamHI* geschnittenen Vektor pASK-IBA3 ligiert. Durch diese Klonierung befindet sich das *lysE* eigene Stopkodon vor der StrepTag-Sequenz und das Gen wird ohne StrepTag exprimiert. Der resultierende Vektor wurde pBEUM4 genannt.

3.1.2 Isolierung des Lysin-Exportcarriers als StrepTag-Fusionsprotein

Die *E. coli* Kulturen wurden bei 30 °C inkubiert und die Proteinsynthese durch Zugabe von Anhydrotetrazyklin induziert. Die Zugabe des Induktors führte bei den LysE exprimierenden Stämmen zu einem sofortigen Wachstumsstopp, während die Zellen mit dem Leervektor normale Teilungsraten zeigten (Abb. 4). Ebenso zeigte die Expression der C-terminal verkürzten Mutante von LysE, die von dem Vektor pBEUM5 kodiert wurde, diesen Wachstumsarrest. Aus Analogieschlüssen zu der *C. glutamicum* Mutante NA8, die ein

C-terminal um 42 Aminosäuren verkürztes LysE kodiert (Vrljic *et al.*, 1996), wurde angenommen, daß es sich bei dieser LysE-Mutante ebenfalls um ein inaktives Protein handelte. Um die Ausbeute an Protein aus den Kulturen zu erhöhen, wurden die Zellen nachfolgend in der spätexponentiellen Wachstumsphase bei einer optischen Dichte von 1,5 induziert.

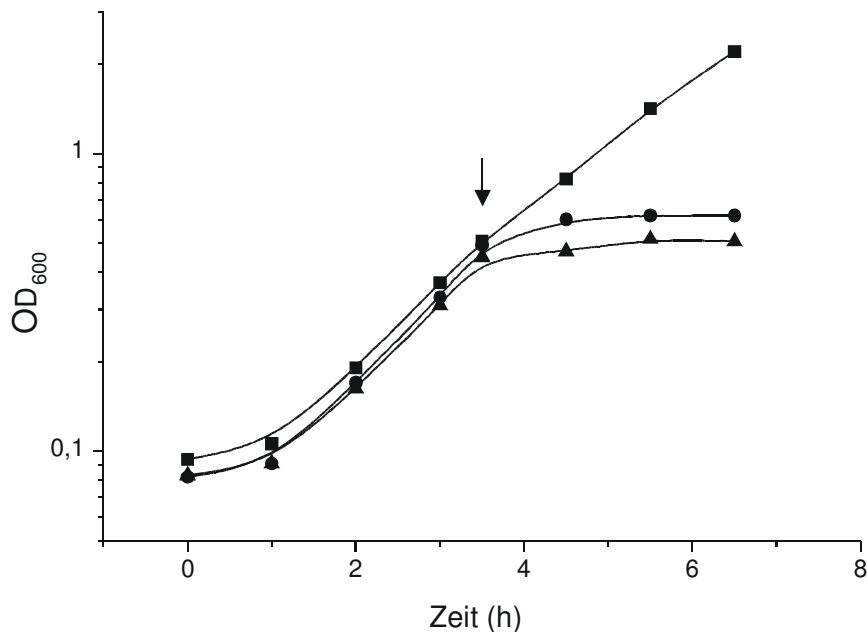


Abb. 4: Wachstum der *E. coli*-Stämme DH5 α -mcr pASK-IBA3(■), pBEUM1 (●) und pBEUM4 (▲). Die Kulturen wurden bei 30°C angezogen. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Induktion mit 200 μ g/l Anhydrotetrazyklin an.

Die Zellen wurden in der Regel nach der Induktion für 1,5-2 Stunden bei 30°C geschüttelt. Die Anzuchttemperatur von 30°C wurde gewählt, da bei der Synthese von Membranproteinen niedrigere Temperaturen häufig zu einer besseren Ausbeute an korrekt in die Membran eingebautem Transportprotein führten. Die Produktion von LysE konnte nach Auftrennung von Gesamtzellextrakten im SDS-Polyacrylamidgel weder durch Coomassie-Färbung noch durch Silberfärbung des SDS-Polyacrylamidgels gezeigt werden. Nur mit Hilfe der Western-Blot Analyse war der Nachweis des Proteins möglich. Nach Fraktionierung der Zellbestandteile durch differentielle Zentrifugation konnte gezeigt werden, daß das rekombinante Protein in die Cytoplasmamembran eingelagert wird. Zur Reinigung des Lysin-Exportcarriers wurden die Plasmamembranen präpariert und die Proteine durch Zugabe von Detergenz (3% Triton X-100 oder 2% Dodecylmaltosid) solubilisiert. Nach Auftragen der solubilisierten Membranproteine auf die StrepTactin-Säule konnte das spezifisch an das Säulenmaterial gebundene LysEStrep mit Desthiobiotin eluiert werden. In

den ersten Reinigungsversuchen wurden noch unspezifisch gebundene Proteine zusammen mit LysE eluiert. Durch Erhöhung der Ionenstärke in den verwendeten Chromatographie- und Solubilisierungspuffern (50 mM NaCl) konnte diese unspezifische Bindung verhindert werden. Eine SDS-PAGE, die den Verlauf der optimierten Reinigung dokumentiert, ist in Abbildung 5 dargestellt. Man erkennt deutlich die Proteinbande bei etwa 25 kDa, die dem vorausgesagten Molekulargewicht des gereinigten Lysin-Exportcarriers entspricht (Spur 9 und 10).

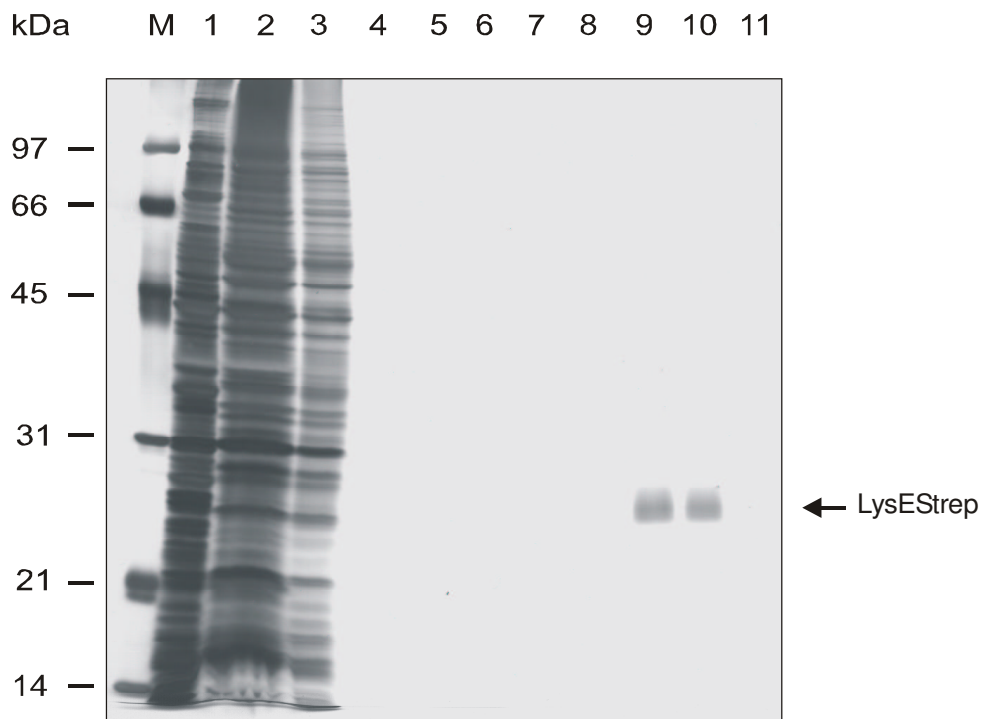


Abb. 5: Reinigung von LysEStrep durch StrepTactin-Affinitätschromatographie. Auf ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel wurden Gesamtzellextrakt der für 2 h bei 30°C mit 200 µg/l Anhydrotetrazyklin induzierten Kultur von DH5α-mcrpBEUM1 (Spur 1), die Waschfraktionen (Spur 2-6) und die Elutionsfraktionen (Spur 7-11) aufgetragen. Der Nachweis der Proteine im Gel erfolgte durch Silberfärbung. LysEStrep ist durch den Pfeil gekennzeichnet. M: Molekulargewichtsstandard (Broad Range, BioRad)

Bei dem Vergleich der *E. coli*-Stämme DH5α-mcr und JM109 stellte sich heraus, daß bei Verwendung von JM109 die höchsten Proteinausbeuten erzielt werden konnten. Aus 1 Liter *E. coli*-Kultur (300 mg Gesamtprotein) konnten im Durchschnitt etwa 100-200 µg rekombinantes Protein isoliert werden. Einen Überblick über die Ausbeuten der einzelnen Reinigungsschritte für LysEStrep aus JM109pBEUM1 gibt Tabelle 7.

Tab. 7: Reinigung von LysEStrep aus *E. coli* JM109pBEUM1 ausgehend von 1 Liter Kultur

Fraktion	Volumen (ml)	Protein (mg)
Zellsuspension	40	150
Membranen	0,5	20
vereinigte Elutionsfraktion	1,5-2	0,05-0,1

3.1.3 Funktion des Lysin-Exportcarriers im heterologen System

Wie unter 3.1.2 bereits erwähnt, wurde das rekombinante Protein in die Cytoplasmamembran von *E. coli* eingebaut. Zur Funktionsanalyse von LysE im heterologen System wurde eine Dipeptidfütterung *in vivo* durchgeführt. Dazu wurden *E. coli* JM109-Stämme verwendet, die mit Leervektor (pASK-IBA3), pBEUM1, pBEUM4 oder pBEUM5 transformiert waren. Die anhand der durchgeführten Dipeptidfütterungen mit 1 mM Lysyl-Alanin errechneten Transportraten sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tab. 8: Lysin-Exportraten nach Dipeptidfütterung von *E. coli* mit 1 mM Lysyl-Alanin bei 30°C

Stamm	Lysin-Transportrate [nmol min ⁻¹ (mg Zell-Trockengewicht ⁻¹)]
JM109 pASKIBA3	41
JM109 pBEUM1	31
JM109 pBEUM4	30
JM109 pBEUM5	38

Die gemessenen Transportaktivitäten der *E. coli* Stämme, die mit dem Leervektor oder mit pBEUM5 transformiert waren, ergaben Transportraten von etwa 40 nmol min⁻¹ (mg Zell-Trockengewicht)⁻¹. Die Stämme mit einer plasmidkodierten Kopie des lysE-Gens zeigten etwas geringere Transportraten von 30 nmol min⁻¹ (mg Zell-Trockengewicht)⁻¹. Bei der Betrachtung der zellinternen Lysinkonzentration konnten jedoch deutliche Unterschiede festgestellt werden. Die Stämme, die LysE und LysEStrep exprimierten, zeigten keine interne Anhäufung von Lysin. Die mit dem Leervektor pASK-IBA3 bzw. mit dem Vektor pBEUM5 transformierten Stämme zeigten dagegen nach Fütterung mit Lysinhaltigen Dipeptiden eine kurzzeitige Akkumulation von L-Lysin bis zu einer Konzentration von 50 mM Lysin (Abb. 6).

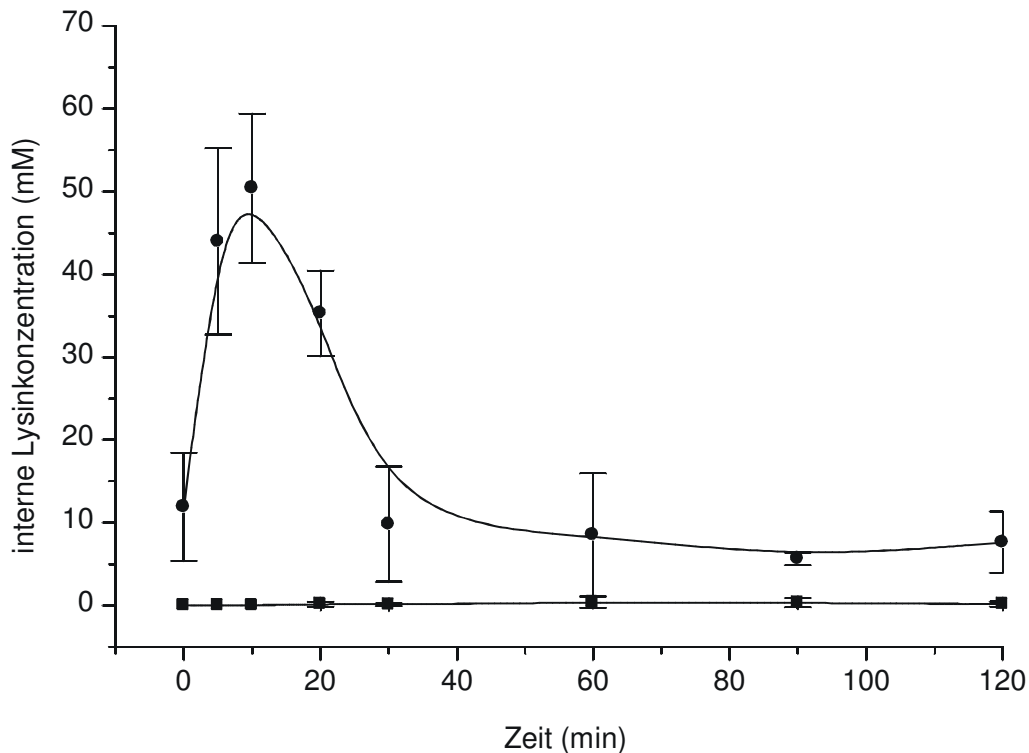


Abb. 6: Zellinterne L-Lysinkonzentrationen in *E. coli* nach Dipeptidfütterung mit 1 mM Lysyl-Alanin. Die Stämme JM109pBEUM1(■) und JM109pBEUM5(●) wurden bei 30°C nach 2 stündiger Induktion mit 200 µg/l Anhydrotetracyclin zur Dipeptidfütterung eingesetzt. Dem Minimalmedium wurde 1 mM Lysyl-Alanin zugesetzt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und die intrazelluläre Aminosäurekonzentration nach Silikonölzentrifugation bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Aus den Unterschieden in der intern akkumulierten Lysinmenge, bei denen sich das Strep-getaggte und das ungetaggte LysE nicht unterschieden (Daten nicht gezeigt), konnte geschlossen werden, daß das heterolog exprimierte LysE in *E. coli* Lysin-Exportfunktion übernommen hat.

3.2 Rekonstitution des Lysin-Exportcarriers in Proteoliposomen

Eine Methode für die molekulare Charakterisierung von Transportproteinen ist die funktionelle Rekonstitution in künstliche Liposomen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rekonstitution nach der Methode von Rigaud (Rigaud *et al.*, 1995) durchgeführt. Dabei wird das solubilisierete Protein in bereits vorgeformte und zu 25% solubilisierete Liposomen eingelagert. Die zur Solubilisierung verwendeten Detergenzien werden durch portionsweise Zugabe von Bio-Beads aus dem Reaktionsansatz entfernt und die Proteine dabei in die

Lipiddoppelschicht integriert. Variationsmöglichkeiten zur Optimierung der Rekonstitution, die für jedes Protein verschieden sein kann, bestehen unter anderem in der Verwendung unterschiedlicher Lipide, unterschiedlicher Detergenzien und dem eingestellten Lipid-zu-Protein-Verhältnis.

3.2.1 Charakterisierung der Proteoliposomen

Die während der Rekonstitution des Lysin-Exportcarriers in die Liposomen tatsächlich eingebaute Proteinmenge wurde durch Proteinbestimmung nach der Amido-Schwarz-Methode (Kaplan und Pedersen, 1985) durchgeführt. Aliquots der rekonstituierten Proteoliposomen mit unterschiedlichen LPRs wurden direkt zur Proteinbestimmung eingesetzt. Die durchschnittlichen prozentualen Einbaumengen in Abhängigkeit von dem eingestellten Lipid-zu-Protein-Verhältnis sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tab. 9: Proteineinbau in Proteoliposomen aus EYPC mit rekonstituiertem LysE

LPR	Protein eingesetzt (μg)	Protein eingebaut (μg)	Einbau (%)
200:1	28	8	30
100:1	56	16	29
75:1	75	27	30
50:1	112	32	28

Diese geringen Einbauraten von nur 30% des eingesetzten Proteins waren unabhängig vom zur Rekonstitution eingesetzten Detergenz und unabhängig vom verwendeten Lipid. Zur Innenvolumenbestimmung wurden Proteoliposomen unterschiedlicher Lipid-zu-Protein-Verhältnisse mit ^{33}P -Phosphat beladen und die Verteilung der radioaktiv markierten Substanz bestimmt. In Tabelle 10 sind die Ergebnisse der Innenvolumenbestimmung der Proteoliposomen aus Phosphatidylcholin aus Truthahneigelb zusammengefasst.

Tab. 10: Innenvolumen von EYPC-Proteoliposomen mit rekonstituiertem LysE in Abhängigkeit von dem Lipid-zu-Protein-Verhältnis

LPR	Innenvolumen ($\mu\text{l}/\text{mg}$ Phospholipid)
Liposomen	7,1
200:1	3,7
100:1	2,1
75:1	1,4
50:1	0,3

Das Innenvolumen nimmt mit abnehmender LPR ebenfalls ab. Im Vergleich zum Innenvolumen der Liposomen aus EYPC, welches $7 \mu\text{l}/\mu\text{g}$ Phospholipid betrug, war das Innenvolumen der in dieser Arbeit ebenfalls getesteten *E. coli*-Lipid Liposomen mit $5,6 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Phospholipid etwas geringer. Voraussetzung für die Transportaktivität ist im Falle von LysE die Existenz eines Membranpotentials (Bröer und Krämer, 1991a). In künstlichen Liposomen kann ein Membranpotential unter anderem in Form eines Kaliumdiffusionspotentials hergestellt werden. Die aus Phosphatidylcholin oder aus *E. coli*-Lipiden bestehenden Proteoliposomen mit einer LPR von 100:1 wurden in Gegenwart von 100 mM KPi pH 7,0 hergestellt. Der Meßpuffer bestand aus 100 mM NaPi pH 7,0, dem der Fluoreszenzfarbstoff DiSC₃(5) zugesetzt war. Die Zugabe des Kalium-Ionophors Valinomycin führt zum Kaliumausstrom aus den Proteoliposomen und damit zu einem Kaliumpotential über der Membran. Der kationische Fluoreszenzfarbstoff DiSC₃(5) akkumuliert an diesen hyperpolarisierten Membranen und lagert sich in den Lipid-Bilayer ein. Die Einlagerung in die Membran führt zu einer Abnahme der Fluoreszenz. Wird ein Entkoppler wie z.B. Nigericin hinzupipettiert, oder wird das Membranpotential durch Protonendiffusion geringer, so nimmt die Fluoreszenz wieder zu. Abbildung 7 zeigt die Ergebnisse einer solchen Messung.

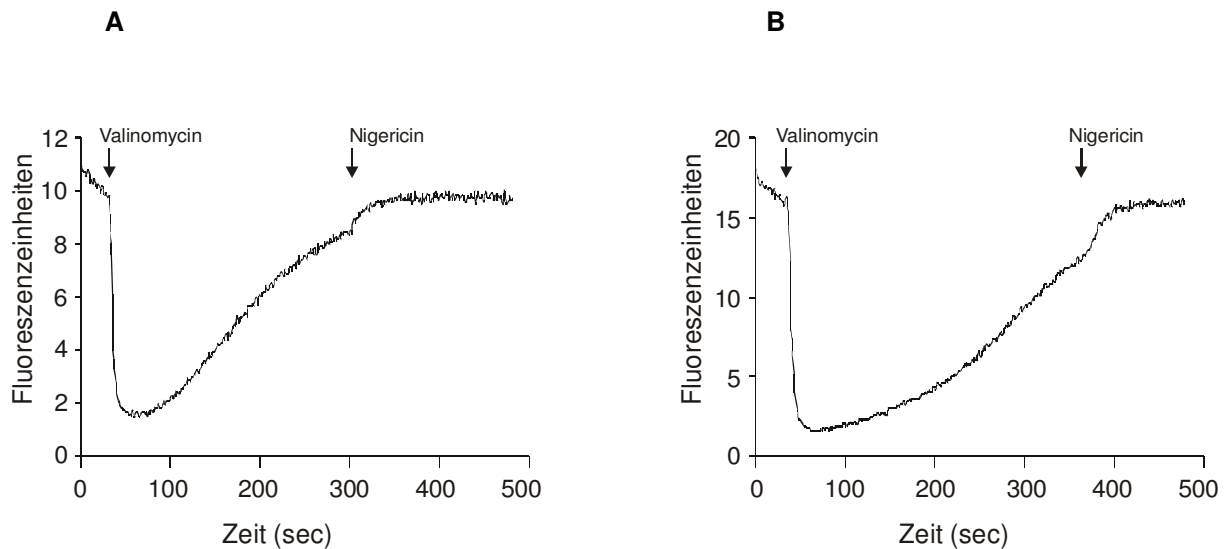


Abb. 7: Membranpotentialmessung an LysE-haltigen Proteoliposomen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiSC₃(5). Die Proteoliposomen wurden mit einer LPR von 100:1 hergestellt und pro Messung wurden 300 µg Lipid eingesetzt. Die Endkonzentration von DiSC₃(5) im Puffer betrug 1,5 µM und die Messung wurde bei einer Excitationswellenlänge von 643 nm und einer Emissionswellenlänge von 666 nm durchgeführt. Valinomycin und Nigericin wurde zu den markierten Zeitpunkten in einer Endkonzentration von je 0,5 µM zugesetzt. In A ist die Messung an *E. coli*-Lipid Proteoliposomen, in B die Messung der Proteoliposomen aus EYPC dargestellt.

An den Proteoliposomen wird das durch Valinomycin induzierte Kaliumdiffusionspotential nur über etwa 4 Minuten (*E. coli*-Lipid Proteoliposomen) bzw. 5 Minuten (EYPC-Proteoliposomen) aufrechterhalten und ist damit gegenüber dem Membranpotential der Liposomen, welches über 12 Minuten (*E. coli*-Lipid Liposomen) bzw. 8 Minuten (EYPC-Liposomen) aufrechterhalten werden kann, deutlich kürzer vorhanden. Einflüsse der Zugabe von Valinomycin oder Nigericin auf den Fluoreszenzfarbstoff wurden durch Kontrollmessungen ausgeschlossen.

3.2.2 Nachweis eines carriervermittelten Transportprozesses in Proteoliposomen

Nach der Charakterisierung der Proteoliposomen bezüglich Proteineinbau, Membranpotential und Innenvolumen wurde die Fähigkeit der Proteoliposomen getestet, Transportfunktionen zu katalysieren. Dazu wurde mit dem im rekonstituierten System gut charakterisierten Glycinbetain-Transporter (BetP) aus *C. glutamicum* gearbeitet (Rübenhagen *et al.*, 2000). Dieser Transporter zeichnet sich durch schnelle und effektive Aufnahme von Substrat aus und kann daher gut untersucht werden. BetP wurde wie

LysEStrep über eine StrepTactin-Affinitätschromatographie aus *E. coli*-Membranen isoliert und zur Rekonstitution eingesetzt (Rübenhagen *et al.*, 2000). Mit diesem Protein, welches unter den gleichen Bedingungen wie LysE gereinigt und rekonstituiert wurde, konnte, wie in Abbildung 8 dargestellt, der zeitliche Verlauf einer BetP-vermittelten Glycinbetainaufnahme in die Proteoliposomen nachgewiesen werden. Als Kontrolle wurden die Messungen an Liposomen ohne Protein und in Abwesenheit eines Membranpotentials durchgeführt, um unspezifische Aufnahmen auszuschließen. Aus der ermittelten Glycinbetainaufnahme der Proteoliposomen bei Vorliegen eines Membranpotentials wurde eine Glycinbetain-Transportrate von $800 \text{ nmol Glycinbetain min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$ errechnet. BetP transportiert Glycinbetain unter optimalen Bedingungen mit einer Rate von $1200 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$ (Rübenhagen, persönliche Mitteilung). Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, daß die Proteoliposomen transportaktiv sind.

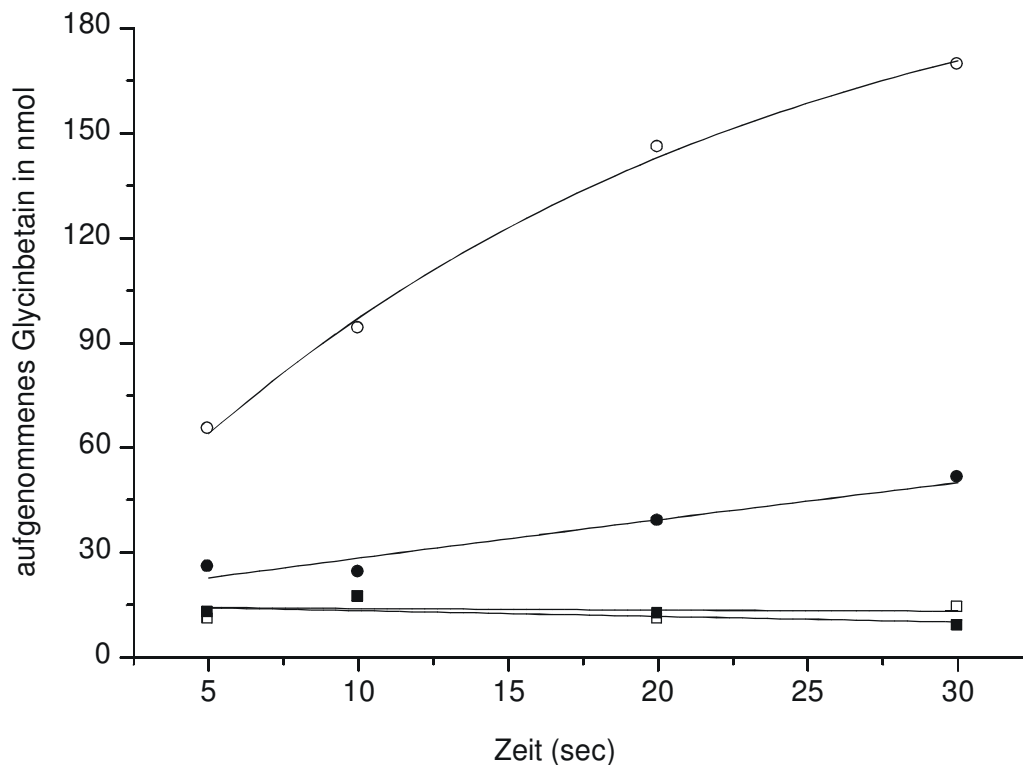


Abb. 8: Glycinbetainaufnahme in Proteoliposomen. Der Ansatz enthielt insgesamt $7,5 \mu\text{g}$ Protein. Es wurde eine Glycinbetainkonzentration von $15 \mu\text{M}$ eingestellt. Die Messungen wurden mit Proteoliposomen (●) einer LPR von 20:1 und mit Liposomen ohne Protein (■) in Gegenwart (offene Symbole) oder Abwesenheit (geschlossene Symbole) von $1 \mu\text{M}$ Valinomycin durchgeführt. Zur Messung wurden zu den angegebenen Zeiten $100 \mu\text{l}$ Probe ($1,5 \mu\text{g}$ Protein) entnommen, filtriert und die verbleibende Radioaktivität auf dem Filter im β -Counter gemessen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte einer Doppelbestimmung.

3.2.3 Rekonstitution von LysE

Zur funktionellen Rekonstitution von LysE wurden die LPR, das zur Solubilisierung und Reinigung eingesetzte Detergenz und die Lipide variiert. Der Einbau von LysE wurde in *E. coli*-Lipid-Liposomen und EYPC-Liposomen nachgewiesen. Die LPR wurde dabei zwischen 300:1 und 20:1 variiert. Um einen negativen Einfluß des zur Solubilisierung der *E. coli*-Membranen und zur Reinigung durch StrepTactin-Affinitätschromatographie eingesetzten Detergenz Triton X-100 auszuschließen, wurde ein anderes Detergenz mit einer ähnlichen CMC (*critical micellar concentration*) (Dodecylmaltosid) verwendet. Die Solubilisierung der Membranproteine erfolgte mit diesem Detergenz bereits bei einer Endkonzentration von 2 % (w/v). An der Proteinausbeute konnte kein Unterschied festgestellt werden. Eine weitere Möglichkeit zur Stabilisierung des Proteins während der Reinigung bestand in dem Zusatz von 10 % Glycerin (v/v) zu den Chromatographiepuffern (P. Maloney, persönliche Mitteilung). Die in Gegenwart von Glycerin durchgeführte Proteinreinigung führte zu um 50 % reduzierten Ausbeuten von LysE. Da über die Orientierung der Carriermoleküle in der Lipiddoppelschicht keine Aussage gemacht werden konnte, wurden die Messungen in beiden Transportrichtungen (Aufnahme in Proteoliposomen oder Transport aus beladenen Proteoliposomen) durchgeführt. Unter keiner der verwendeten Bedingungen konnte Lysin-Transport gezeigt werden.

3.3 Herstellung von Fusionsvesikeln

Da wie unter 3.2.3 beschrieben, alle Versuche zur funktionellen Rekonstitution des Lysin-Exportcarriers aus *C. glutamicum* erfolglos waren, wurde versucht, die Aktivität des Proteins in einem System zu untersuchen, in dem das Protein nicht aus seiner natürlichen Umgebung (Cytoplasmamembran) isoliert und damit möglicherweise inaktiviert wurde. Hierzu wären funktionell aktive Membranvesikel aus der Cytoplasmamembran von *C. glutamicum* ein geeignetes Meßsystem. Da es zu Beginn dieser Arbeit nicht möglich war, transportaktive Membranvesikel (*inside out* oder *right side out*) aus der Plasmamembran von *C. glutamicum* zu präparieren (persönliche Mitteilung D. Molenaar, Düsseldorf), wurde versucht Fusionsvesikel aus *E. coli*-Lipiden und der Plasmamembran von *C. glutamicum* herzustellen. Diese Methode wurde zur Herstellung von Fusionsvesikeln aus Cytoplasmamembranen verschiedener Gram-positiver Bakterien erfolgreich beschrieben. Voraussetzung hierfür war es, die Zellwand von *C. glutamicum*, die Porine enthält (Niederweiss *et al.*, 1995), zu entfernen. Zur vollständigen Trennung von Zellwand und Plasmamembran wurde der Rohextrakt der Membranfragmente nach French-Press Aufschluß auf einem Saccharose-Gradienten aufgetrennt (Abbildung 9).

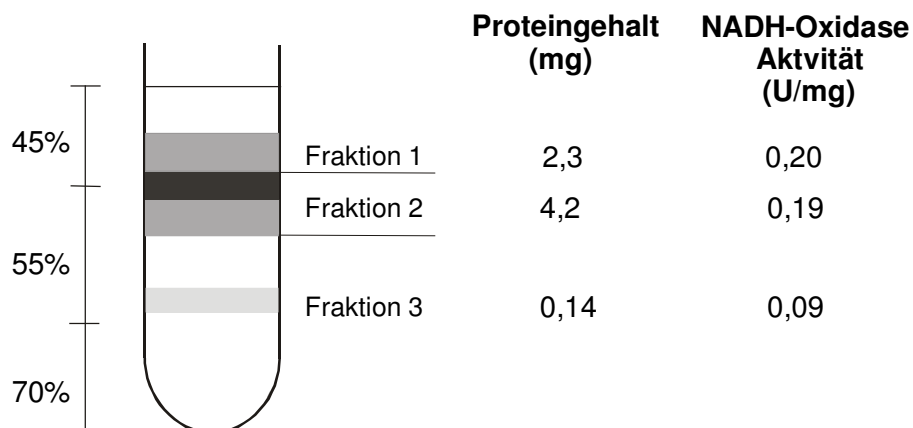


Abb. 9: Auftrennung der Membranfragmente von *C. glutamicum* ATCC13032. Die Membranfragmente nach French-Press Aufschluß wurden auf den Saccharose-Gradienten aufgetragen. Drei Fraktionen, die aufgrund ihrer Farbe deutlich voneinander unterschieden werden konnten, wurden gesammelt. Der Proteingehalt sowie die NADH-Oxidaseaktivität wurden bestimmt und sind im rechten Teil der Abbildung angegeben.

Als Markerenzym für die Cytoplasmamembran wurde die NADH-Oxidase verwendet. Die NADH-Oxidase-Aktivität der einzelnen Fraktionen wurde ermittelt und auf den jeweiligen Proteingehalt bezogen. Die Fraktionen 1 und 2 zeigten die höchste spezifische Aktivität und wurden daher zur Herstellung der Membranvesikel eingesetzt. Die Fusion von Membranfragmenten und *E. coli*-Lipid Liposomen wurde durch Einfrier-/Auftau-Zyklen erzeugt, wobei das Verhältnis von Membranen zu Lipid 1:10 betrug. Zur Charakterisierung der aus der Fusion corynebakterieller Membranfragmente mit *E. coli*-Liposomen entstandenen Vesikel wurde das Innenvolumen und die Fähigkeit, ein durch Valinomycin induziertes Kaliumdiffusionspotential aufzubauen, gemessen. Außerdem wurden Enzymtests zur Überprüfung der Integrität der Proteine der Plasmamembran durchgeführt und die Fähigkeit der Vesikel zum Transport eines Substrates überprüft. In Tabelle 11 sind die Ergebnisse dieser Charakterisierung aufgeführt.

Tab. 11: Charakterisierung der Fusionsvesikel

Parameter	Ergebnis
Internes Volumen	15 µl/mg Protein
Dauer des Membranpotentials	11 Minuten
NADH-Oxidase Aktivität	0,17-0,2 U/mg Protein

Um die Fusionsvesikel auf Transportfunktion zu untersuchen, wurden Fusionsvesikel mit Membranen der Stämme ATCC13032DHPE und ATCC13032DHPEpSM1 hergestellt. Die Fusionsvesikel wurden wie unter 2.5.6 beschrieben hergestellt und der Glycinbetaintransport gemessen. In Abbildung 10 ist das Ergebnis dieser Transportmessung dargestellt.

Mit der in dieser Arbeit etablierten Methode konnten transportaktive Fusionsvesikel aus *C. glutamicum* hergestellt werden. Zur Messung des LysE vermittelten Transportes an Fusionsvesikeln wurde mit zwei verschiedenen *C. glutamicum* Stämmen gearbeitet. Zum einen mit *C. glutamicum* ATCC13032, der in Gegenwart von 5 mM Methionin im Komplexmedium angezogen wurde. Die Zugabe von Methionin ins Medium führt bei Kulturen dieses Stammes in der logarithmischen Wachstumsphase zu einer Lysin-Exportrate von $1,5 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Zell-Trockengewicht})^{-1}$. Ohne Methionin-Zusatz ist kein Lysin-Export feststellbar (Vrljic *et al.*, 1995). Dieser Effekt wurde ausgenutzt, um die *lysE*-Expression und Aktivität maximal zu stimulieren. Zum anderen wurde mit dem Stamm ATCC13032 Δ *lysEGpEKEEx2lysE* gearbeitet, der nach Induktion mit IPTG ebenfalls LysE-Aktivität zeigt. Da über die Orientierung der Membranfragmente keine Aussage gemacht werden konnte, wurden die Lysintransportmessungen als Aufnahmemessung und als Exportmessung durchgeführt. Das Ergebnis war unabhängig von dem Stamm und der

Transportrichtung immer gleich. Ein LysE vermittelter Lysintransport mit Fusionsvesikeln konnte nicht nachgewiesen werden.

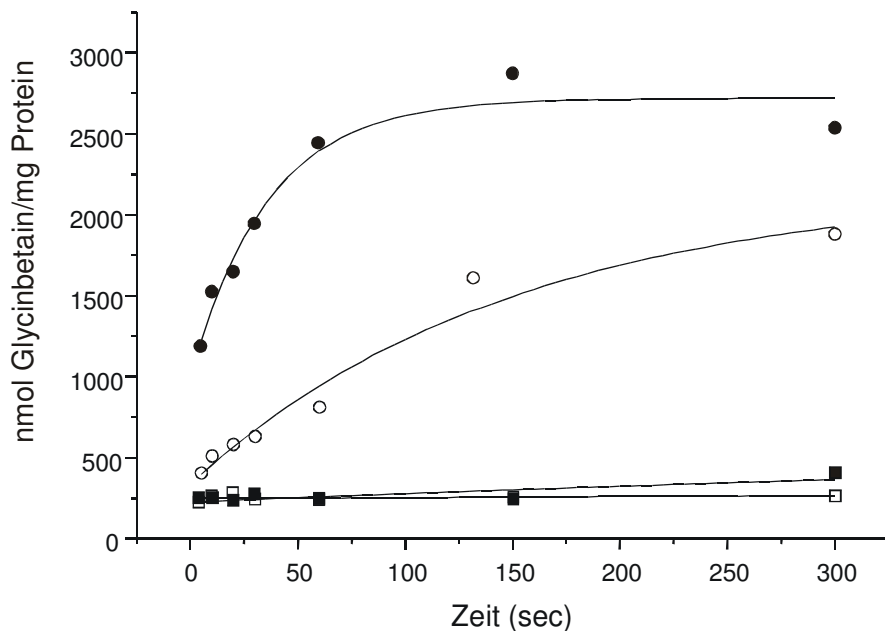


Abb. 10: Glycinbetainaufnahme in *C. glutamicum* Fusionsvesikel. Die Vesikel wurden aus Membranen von ATCC13032DHPE(■) und ATCC13032DHPEpSM1(●) hergestellt und in Gegenwart (geschlossene Symbole) oder Abwesenheit (offene Symbole) von 1 μ M Valinomycin vermessen. Es wurde eine Glycinbetainkonzentration von 15 μ M eingestellt. Zur Messung wurden nach den angegebenen Zeitpunkten 100 μ l Probe entnommen, filtriert und im β -Counter gemessen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte einer Doppelbestimmung.

3.4 Wiederherstellen der Lysinexkretion bei *C. glutamicum* ATCC13032 Δ lysEG durch plasmidkodiertes LysE

Als geeigneter Stammhintergrund für die *in vivo* Analysen der modifizierten Transportermoleküle diente der *C. glutamicum* Stamm ATCC13032 Δ lysEG (Vrljic *et al.*, 1996). Durch Transformation des Stammes mit dem Plasmid pEKEx2lysE konnte die Komplementation der Lysinexkretion nach Fütterung mit 1 mM Lysyl-Alanin gezeigt werden, während der mit dem Plasmid pEKEx2 transformierte Stamm den Transport-negativen Phänotyp behielt. Zur Herstellung des Vektors pUMB wurde eine stille Mutation zur Einführung einer *Bgl*II-Schnittstelle am 5'-Ende des *lysE*-Gens eingeführt, das Kodon der Aminosäure Methionin an Position 235 gegen Leucin ausgetauscht und zur Herstellung der *Stu*I-Schnittstelle ein Kodon für die Aminosäure Leucin am 3'-Ende inseriert. Um den Einfluß

dieser Veränderungen zu überprüfen, wurde der Vektor pUMB ebenfalls in den Stamm *C. glutamicum* ATCC13032 Δ lysEG transformiert und die Lysin-Exkretionsrate analysiert. Abbildung 11 zeigt, daß die durch ortsgerichtete Mutagenese erzeugte lysE-Genkassette keinen zum Wildtyp veränderten Einfluß auf die Transportaktivität hatte. Der Stamm *C. glutamicum* ATCC13032 Δ lysEGpEKEEx2lysE exkretierte Lysin unter diesen Versuchsbedingungen mit einer Rate von $9,4 \pm 0,5 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Zell-Trockengewicht})^{-1}$. Die Lysin-Exportrate von ATCC13032 Δ lysEGpUMB mit $9,6 \pm 0,8 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Zell-Trockengewicht})^{-1}$ war gleich. Der Stamm ATCC13032 Δ lysEGpEKEEx2 transportiert kein Lysin. Die Aufnahme rate des Dipeptids Lysyl-Alanin war in den untersuchten Stämmen mit einer Rate von etwa $12 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Zell-Trockengewicht})^{-1}$ ähnlich hoch. Die Quantifizierung der internen Aminosäurekonzentrationen ergab die in Abbildung 12 dargestellten Konzentrationen.

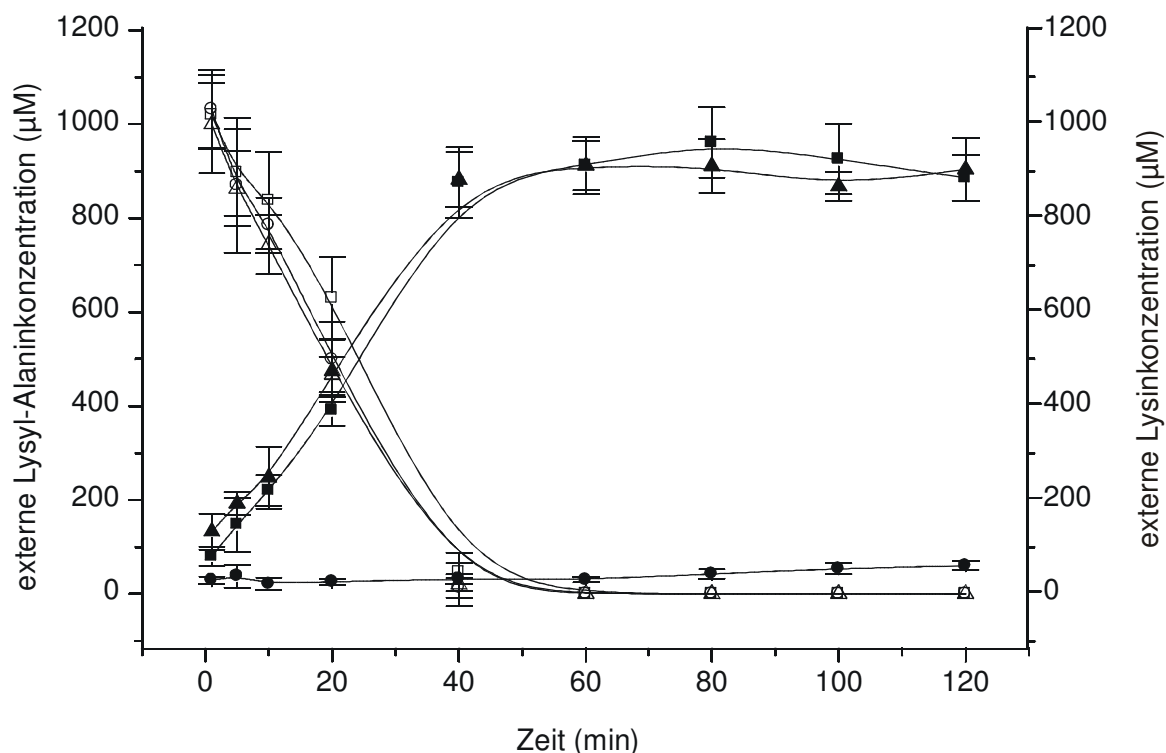


Abb. 11: Aufnahme von Lysyl-Alanin (offene Symbole) und Exkretion von Lysin (geschlossene Symbole) durch *C. glutamicum*. Dargestellt sind ATCC13032 Δ lysEGpUMB (▲), ATCC13032 Δ lysEGpEKEEx2lysE (■) und ATCC13032 Δ lysEGpEKEEx2 (●). Die Zellen wurden bei 30 °C unter Zusatz von 1 mM Lysyl-Alanin in MOPS-Puffer (+ 20 mM Glucose) kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben zur Bestimmung der Aminosäurekonzentration entnommen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

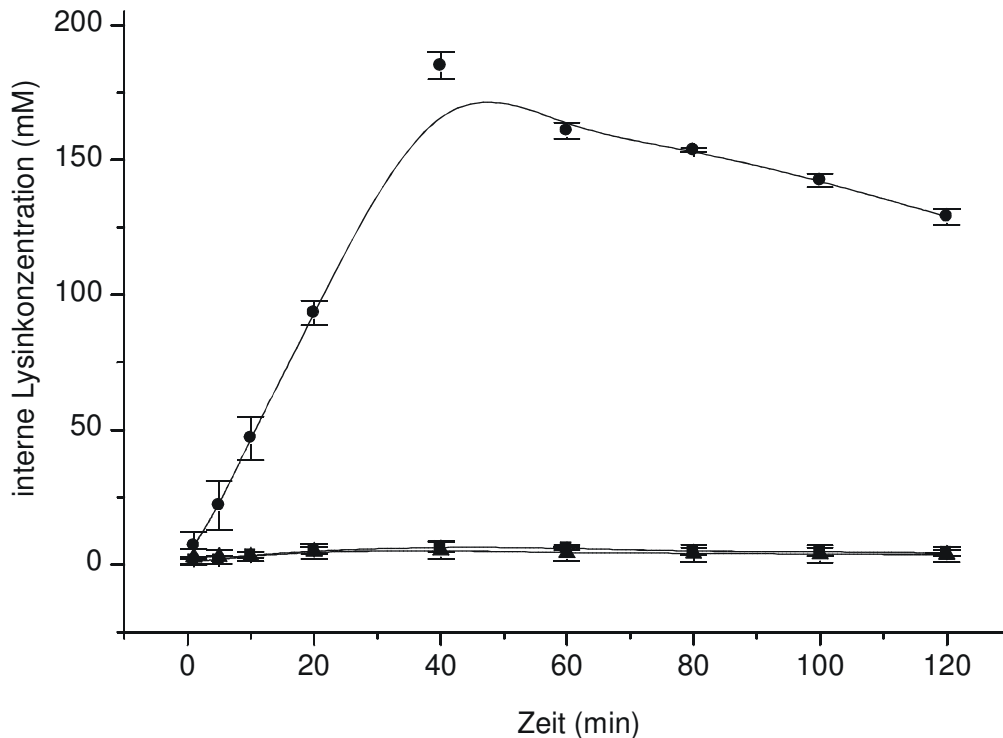


Abb. 12: Interne Akkumulation von Lysin durch *C. glutamicum*. Dargestellt sind ATCC13032ΔlysEGpUMB (▲), ATCC13032ΔlysEGpEKEx2lysE (■) und ATCC13032ΔlysEGpEKEx2(●). Die Zellen wurden bei 30°C unter Zusatz von 1 mM Lysyl-Alanin in MOPS-Puffer (+20 mM Glucose) kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben zur Bestimmung der Aminosäurekonzentration entnommen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

3.5 Deletionsanalysen im cytoplasmatischen *Loop* von LysE

Ein auffallendes Charakteristikum von LysE ist der große hydrophile cytoplasmatische *Loop*, der die Helices III und IV verbindet. Von allen Mitgliedern der LysE Familie ist der *Loop* des Lysin-Exporters mit 53 Aminosäureresten der längste (Vrljic *et al.*, 1999) und weist außerdem eine Valin- und Argininreiche Region auf. Ähnlich stark geladene *repeat*-Sequenzen sind in Schleifenregionen anderer Transporter gefunden worden, ohne daß bislang ihre Funktion bekannt wäre (Paulsen und Saier, 1997; Eng *et al.*, 1998). Um eine mögliche strukturelle oder funktionelle Aufgabe dieses *Loops* beim Lysintransport zu zeigen, wurden definierte Deletionen in den *Loop* eingeführt. Die Transportaktivität der einzelnen Deletionsmutanten wurde durch Dipeptidfütterungsversuche bestimmt. In Abbildung 13 ist die Lage der Deletionen, die Restlänge des *Loops* und die mit diesen Mutanten gemessenen Lysin-Transportraten dargestellt. Die vier Einzeldelationen in LysE (Δ91-98, Δ99-114, Δ115-

126, Δ 127-140) zeigten bis auf die Deletion der Aminosäurereste 91-98 keinen Einfluß auf die Transportaktivität des Carriers. Selbst die Deletionsmutante in der die Valin- und Argininreiche Region deletiert ist (LysE Δ 127-140) zeigt mit einer Rate von $11,2 \pm 1,3$ nmol min^{-1} (mg Zell-Trockengewicht $^{-1}$) eine dem Wildtyp vergleichbare Transportaktivität. Die Deletionsmutante LysE Δ 91-98 zeigt dagegen gegenüber dem Wildtyp eine um etwa 30 % erniedrigte Transportaktivität von $6,9 \pm 0,2$ nmol min^{-1} (mg Zell-Trockengewicht $^{-1}$). Wenn die Deletionen jedoch so große Bereiche einschließen, daß für die Bildung des *Loops* nur noch etwa 20 Aminosäuren zur Verfügung stehen, nimmt die Transportfähigkeit unabhängig von der Lage der Deletion drastisch ab. Dies konnte für die Deletionsmutanten LysE Δ 91-114, LysE Δ 99-126, LysE Δ 91-140, LysE Δ 91-126 und LysE Δ 99-140 gezeigt werden (Abb. 13).

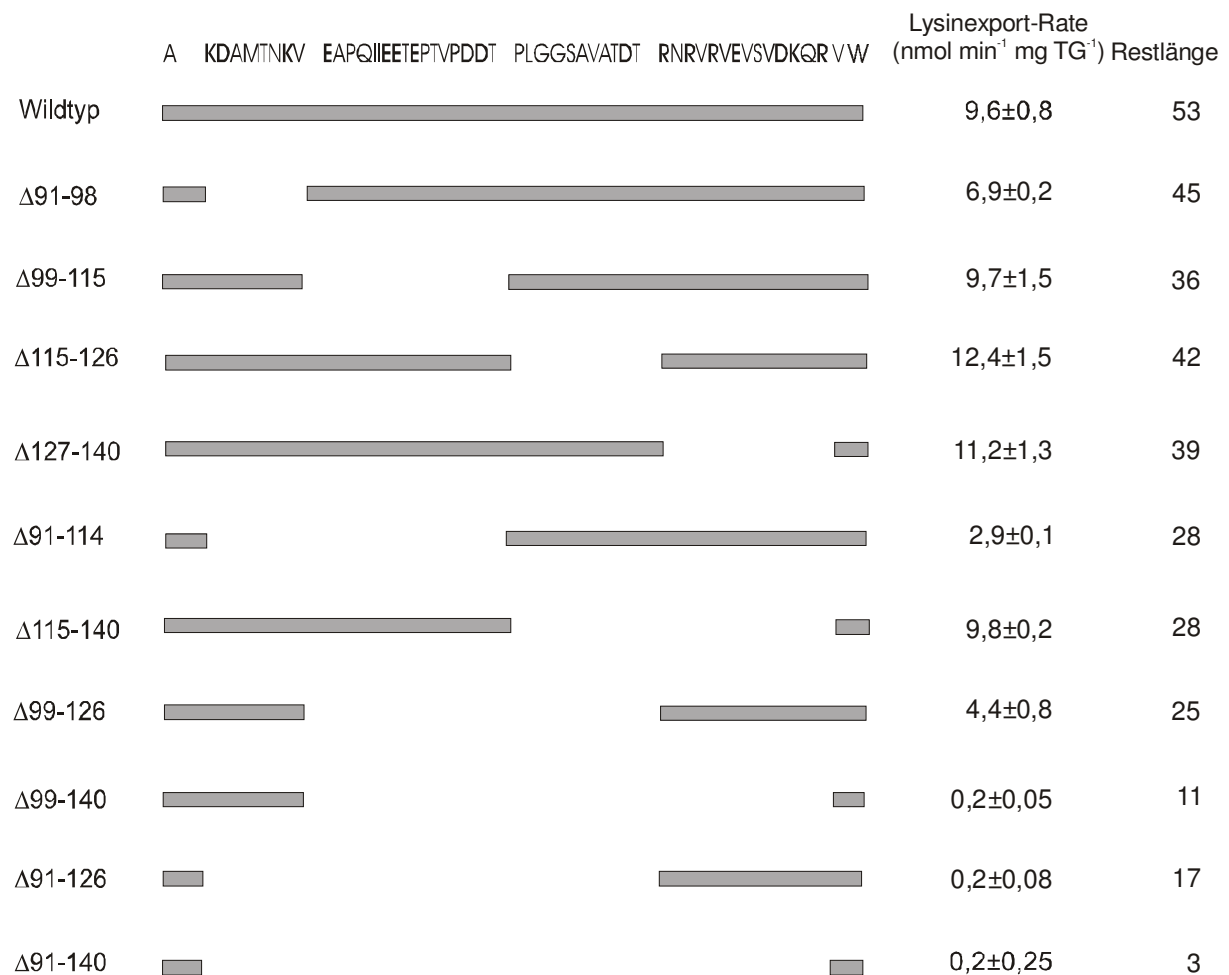


Abb. 13: Lage der Deletionen im großen cytoplasmatischen *Loop* von LysE und deren Transportaktivitäten. Die noch vorhandenen Proteinbereiche sind als graue Balken dargestellt. Die Transportrate ist als Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten angegeben. Die Restlänge des *Loops* (Aminosäuren) der einzelnen Deletionsmutanten ist auf der rechten Seite des Abbildung angegeben. Die geladenen Aminosäuren sind fett gedruckt. Die Aminosäurereste sind im Ein-Buchstabencode angegeben.

Da der verwendete polyklonale Antikörper gegen die Aminosäurereste 118-132 des großen hydrophilen *Loops* von LysE gerichtet ist, konnten Mutanten, denen diese Aminosäurereste fehlten, in Western-Blot-Analysen nicht nachgewiesen werden. Daher gelang der Nachweis der Deletionsmutanten in Western-Blot-Analysen nur für die verkürzten Proteine LysE Δ 91-98, LysE Δ 99-115 und LysE Δ 91-114. Mit dem Einsatz eines weiteren polyklonalen Antikörpers, der gegen gereinigtes LysE_{Strep} hergestellt wurde (C. Schimtz, KFA Jülich), konnte keine der Deletionsmutanten nachgewiesen werden. In Abbildung 14 ist die Western-Blot-Analyse einiger Deletionsmutanten dargestellt.

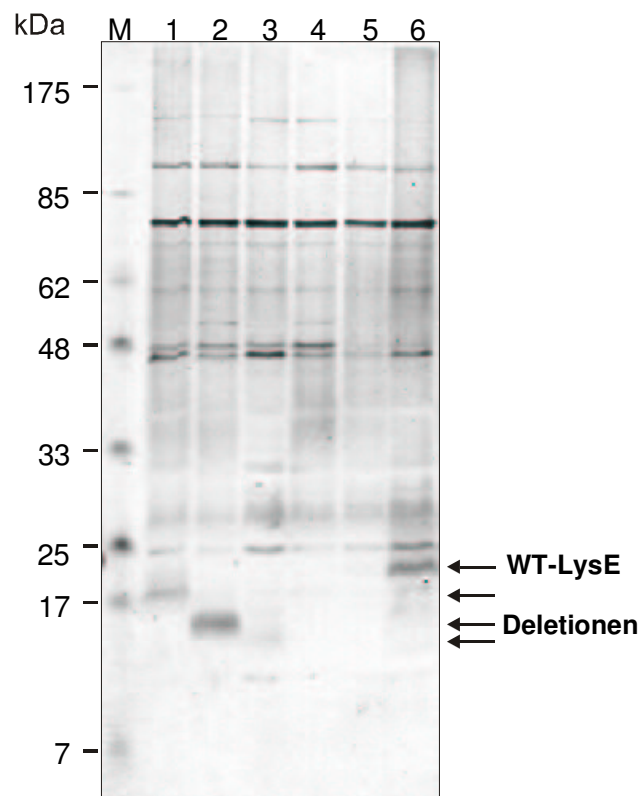


Abb. 14: Nachweis der LysE-Deletionsmutanten durch Western-Blot-Analyse. Auf ein 10 %iges Schägger-Gel wurde pro Spur 50 μ g Membranprotein aus einer für 2h mit 1 mM IPTG induzierten Kultur von ATCC13032 Δ lysEGpUMB Δ 91-98 (Spur 1), ATCC13032 Δ lysEGpUMB Δ 99-115 (Spur 2), ATCC13032 Δ lysEGpUMB Δ 91-114 (Spur 3), ATCC13032 Δ lysEGpUMB Δ 127-140 (Spur 4), ATCC13032 Δ lysEGpUMB vor Induktion (Spur 5) und ATCC13032 Δ lysEGpUMB (Spur 6) aufgetragen. Der immunologische Nachweis erfolgte mit einem gegen den cytoplasmatischen *Loop* von LysE gerichteten polyklonalen Antikörper. Die Pfeile geben die Position von LysE und den LysE-Deletionsmutanten an. M: Molekulargewichtsstandard (prestained Broad Range, NEB)

Wie man an Spur 6 erkennt, zeigt LysE im Schägger-Gel ein anderes Laufverhalten als im SDS-Polyacrylamidgel nach Lämmli (vgl. Abb. 5). Die apparente molekulare Masse liegt bei nur 20 kDa, während in den SDS-Polyacrylamidgelen nach Lämmli eine apparente molekulare Masse von etwa 25 kDa beobachtet wurde. Zur Überprüfung dieser Beobachtung wurde das Laufverhalten von gereinigtem LysEStrep in einem Schägger-Gel überprüft. Auch dieses Protein zeigte in dem Gelsystem nach Schägger eine kleinere apparente molekulare Masse.

3.6 Mutagenesestudien zur Identifikation funktionell wichtiger Aminosäurereste von LysE

In den letzten Jahren ist es gelungen die Struktur einiger integraler Membranproteine, wie beispielsweise die des Kaliumkanals aus *Streptomyces lividans* röntgenkristallographisch aufzulösen (Doyle *et al.*, 1998). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist es jedoch noch nicht gelungen, die dreidimensionale Struktur eines sekundären Carriers aufzuklären. Mit Hilfe individueller Aminosäuresubstitutionen durch ortsgerichtete Mutagenese sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit strukturell und/oder funktionell wichtige Aminosäurereste identifiziert werden. Durch den von Vrljic *et al.* 1999 durchgeführten Sequenzvergleich der Mitglieder der LysE-Familie innerhalb der LysE-Superfamilie konnten neben ähnlichen Motiven und ähnlichen Hydrophobizitatsdiagrammen 16 vollständig konservierte Aminosäurereste identifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden von diesen 16 vollständig konservierten Resten 4 Reste ausgetauscht. Weitere 7 Reste, die an der Funktion oder Struktur des Proteins beteiligt sein könnten, wurden ebenfalls ausgetauscht. Abbildung 15 zeigt die Positionen der substituierten und der konservierten Aminosäuren. Die Mutationen wurden ausgehend vom Vektor pBEUM12 durch ortsgerichtete Mutagenese ins *lysE*-Gen eingeführt. Nach Sequenzierung des Gens zur Überprüfung der Mutation wurde das *lysE*-Gen mit den Restriktionsendonukleasen *BglII* und *StuI* herausgeschnitten, in den ebenfalls *BglII*/*StuI* verdauten Vektor pUMB ligiert und erneut sequenziert. Die spezifischen Lysinexporteigenschaften der modifizierten Transporter wurden mit *C. glutamicum* ATCC13032 Δ *lysEG*, transformiert mit den entsprechenden Plasmiden, untersucht.

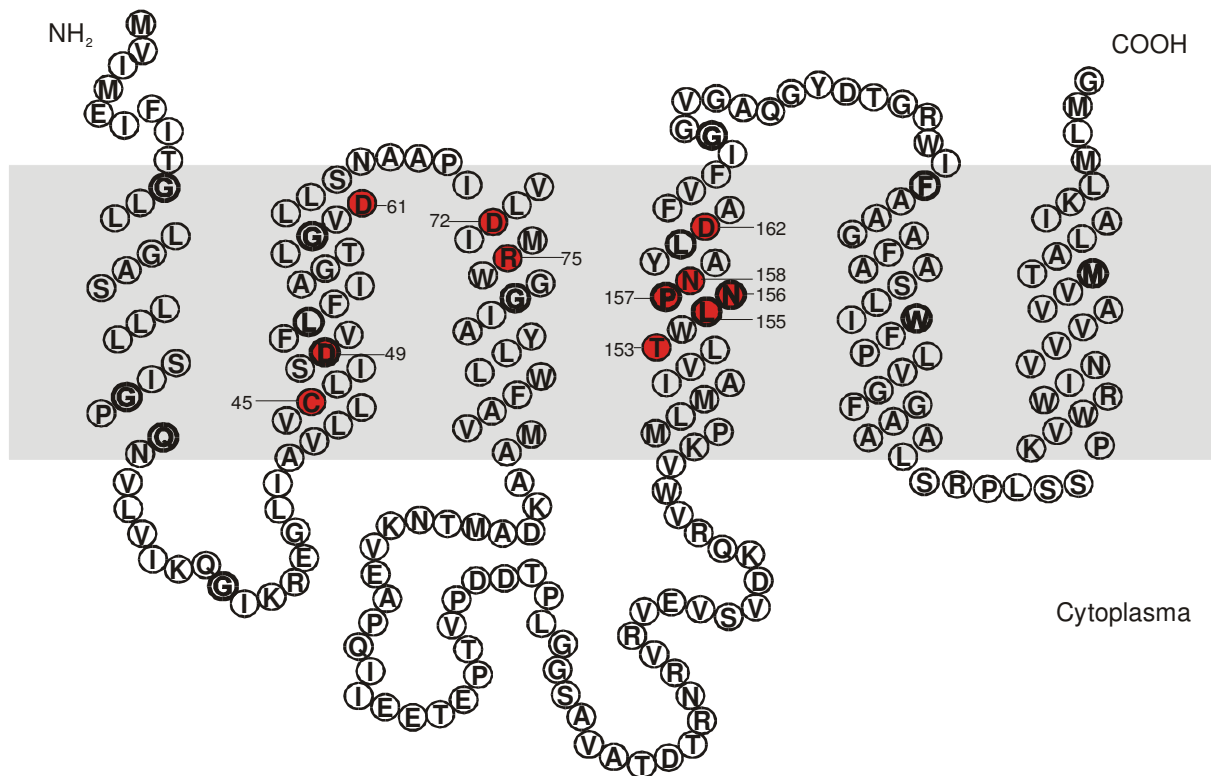


Abb. 15: Sekundärstrukturmodell von LysE mit sechs transmembranen Helices, basierend auf computergestützter Sekundärstrukturvorhersage (Vrljic *et al.*, 1999). Die konservierten Aminosäurereste sind fett gedruckt. Die Positionen, an denen Aminosäureaustausche eingeführt wurden sind rot dargestellt. Der vorhergesagte transmembrane Bereich des Proteins ist grau unterlegt (verändert nach Massow).

3.6.1 Bedeutung der geladenen Aminosäurereste in den ersten vier Helices

Die in den ersten vier putativen Helices lokalisierten geladenen Aminosäurereste D49, D61, D72, R75 und D162 wurden durch ortsgerichtete Mutagenese durch andere Aminosäurereste ausgetauscht. Zur Analyse der Transportaktivität wurden die resultierenden LysE-Mutanten in Dipeptidfütterungsversuchen mit 1 mM Lysyl-Alanin eingesetzt. An Aminosäureposition 72 zeigte weder der Verlust der negativen Ladung (Austausch D72A) noch das Einführen einer größeren Seitenkette (D72E) einen Einfluß auf die Transportaktivität. An Position 75 wurde die positive Ladung des Arginins gegen einen Rest gleicher Ladung (R75K) ausgetauscht oder die Ladung umgekehrt (R75E). Beide LysE-Mutanten zeigten keine Veränderung im Lysinexport (Abb 15). An Position 61 wurde die negative Ladung des Aspartatrestes durch den Austausch gegen Alanin (D61A) entfernt, die Ladung umgekehrt (D61K) oder unter Beibehaltung der Ladung eine größere Seitenkette eingeführt (D61E). Wie in Abbildung 16 dargestellt, zeigten auch diese LysE-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp keine veränderte Transportaktivität. Während der Lysinexport von

LysE mit Substitutionen an den Positionen D61, D72 und R75 keinen signifikanten Unterschied gegenüber dem Wildtyp zeigte, führte die Substitution von D49 durch Asparagin, Lysin oder Alanin zu einem totalen Verlust der Transportaktivität. Demgegenüber zeigte der Austausch D49E eine dem Wildtyp vergleichbare Transportaktivität (Abb. 16). Im Lysin-Exportcarrier ist die negative Ladung an Position 49 also essentiell für die Transportaktivität.

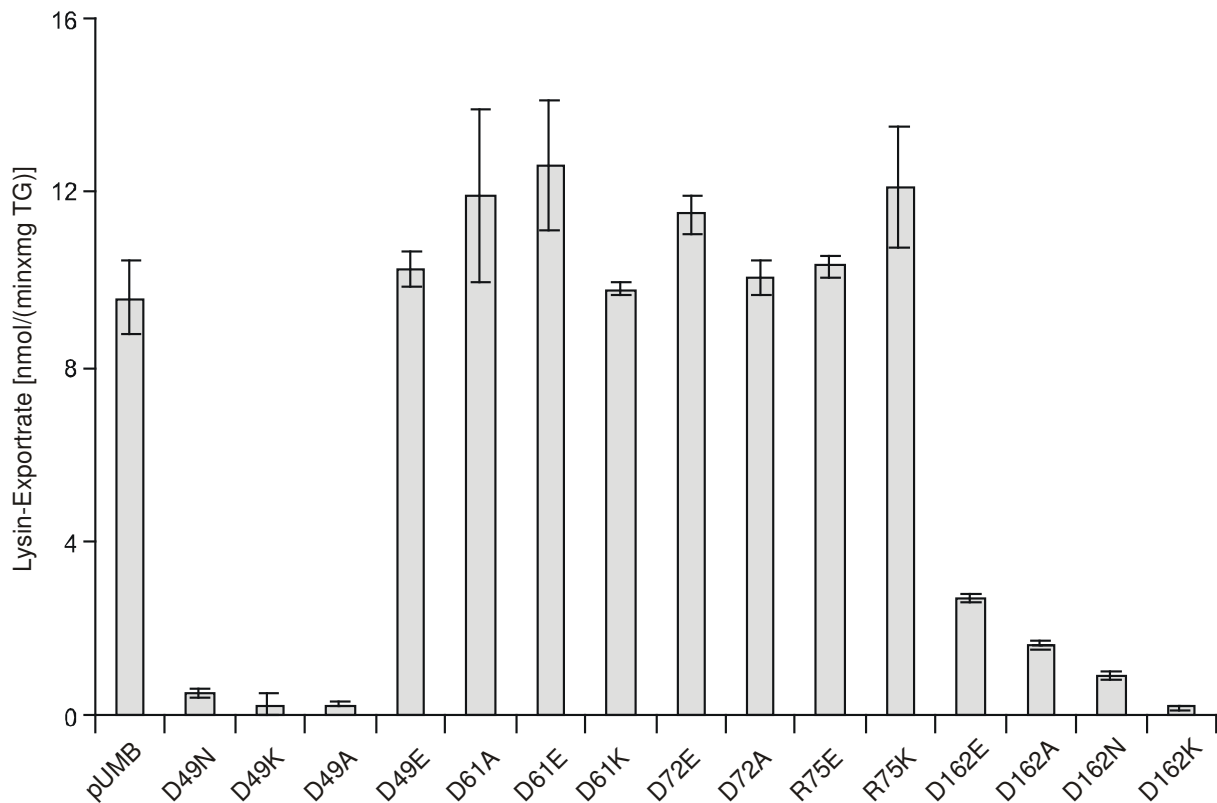


Abb. 16: Einfluß der Substitution einer Aminosäure an der angegebenen Position auf den Lysinexport. ATCC13032 Δ lysEG, der mit den entsprechenden Plasmiden transformiert war, wurde nach 2h Induktion mit 1 mM IPTG zur Dipeptidfütterung eingesetzt. Die Zellen wurden bei 30°C unter Zusatz von 1 mM Lysyl-Alanin in MOPS-Puffer kultiviert. Der Lysinexport wurde über 2 Stunden verfolgt und die resultierende Transportrate während des initialen linearen Verlaufs der Lysinsekretion berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstabencode angegeben.

Die Substitution von D162 durch N, K oder A hatte ebenfalls einen drastischen Einfluß auf die Transportaktivität. Dabei zeigte die Substitution Aspartat gegen die positiv geladene Aminosäure Lysin (D162K) keinen Transport mehr. Die Transportaktivität von LysE-D162N war mit $0,9 \pm 0,1 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Zell-Trockengewicht})^{-1}$ und von LysE-D162A mit $1,6 \pm 0,04 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Zell-Trockengewicht})^{-1}$ im Vergleich zum Wildtyp ($9,6 \pm 0,8 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Zell-Trockengewicht})^{-1}$) stark erniedrigt. Anders als an Position 49, wo der Austausch der

negativ geladenen Aminosäure Aspartat durch die negativ geladene Aminosäure Glutamat die Aktivität des Transporters nicht änderte, zeigte die Substitution D162E nur etwa 30 % der Wildtypaktivität. An Aminosäureposition 162 ist somit nicht nur die Ladung der Aminosäureseitenkette, sondern auch die Größe des Restes von Bedeutung. Die bei gleichbleibender Dipeptidaufnahme durch die Mutanten verringerte Lysinexkretion korrelierte in allen Fällen mit der Menge an intrazellulär akkumuliertem Lysin.

Mit Western-Blot-Analysen wurde der relative Gehalt der an den angegebenen Positionen modifizierten Transportern in Membranen von IPTG induzierten *C. glutamicum* ATCC13032 Δ *lysEG* Kulturen untersucht. Alle Substitutionen der geladenen Aminosäurereste in den ersten vier Helices hatten mit Ausnahme von LysE-D49A, LysE-D49N und LysE-D49K keinen Einfluß auf die Insertion der modifizierten Transportermoleküle in die Membran. Eine verminderte Expression der gezielt modifizierten *lysE*-Allele sowie eine proteolytisch bedingte Instabilität der Genprodukte nach der Translation konnten anhand dieser Analysen ausgeschlossen werden. Abbildung 17 zeigt die Western-Blot-Analyse der an Position 49 veränderten LysE-Mutanten.

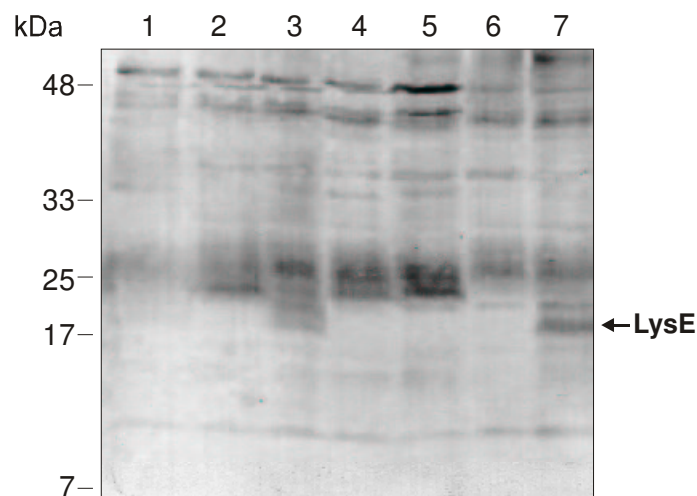


Abb. 17: Nachweis der LysE-D49-Mutanten durch Western-Blot-Analyse. Auf ein 10 %iges Schägger-Gel wurde pro Spur 50 μ g Membranprotein aus einer für 2 h mit 1 mM IPTG induzierten Kultur von ATCC13032 Δ *lysEG*pUMBD49N (Spur 1), ATCC13032 Δ *lysEG*pUMBD49K (Spur 2), ATCC13032 Δ *lysEG*pUMBD49E (Spur 3), ATCC13032 Δ *lysEG*pUMB D49A (Spur 4), ATCC13032 Δ *lysEG*pUMB D49A (Spur 5) ATCC13032 Δ *lysEG*pUMB (vor Induktion) (Spur 6) und ATCC13032 Δ *lysEG*pUMB (Spur 7) aufgetragen. Der immunologische Nachweis erfolgte mit einem gegen den cytoplasmatischen *Loop* von LysE gerichteten polyklonalen Antikörper. Der Pfeil gibt die Position von LysE an. M: Molekulargewichtsstandard (prestained Broad Range, NEB)

Der Verlust der negativen Ladung an Position 49 führt dazu, daß das Protein nicht in die Membran inseriert. Da die LysE-Mutanten auch nicht im Cytoplasma nachgewiesen werden konnten, wird das aufgrund der fehlenden Ladung nicht richtig eingebaute Protein vermutlich proteolytisch abgebaut.

3.6.2 Bedeutung konservierter Aminosäurereste und der Region um das konservierte Motiv LNP

Der Austausch des konservierten Cysteinrestes C45 gegen Alanin in der Mutante LysE-C45A führte zu einer Lysintransportrate von $8,3 \pm 1,2 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Zell-Trockengewicht})^{-1}$, die einer Aktivität von 87 % im Vergleich zum Wildtyp entspricht. Cystein 45 gehört somit nicht zu den funktionell bedeutenden Aminosäureresten in LysE. In dem von Vrljic *et al.* 1999 durchgeführten Sequenzvergleich wurde in der vierten Helix eine hochkonservierte Region lokalisiert. Die Aminosäurereste L155, N156 und P157 gehören zu den 16 innerhalb der LysE-Familie vollständig konservierten Aminosäuren. An Position 158 befindet sich ein Asparaginrest, der bei allen Mitgliedern der LysE Familie, mit Ausnahme von LysE und dem *orf*-Genprodukt aus *Helicobacter pylori* (Vrljic *et al.*, 1999) durch einen Histidinrest ersetzt ist. Daher wurde auch der Einfluß der Substitution von N158 untersucht. Ein weiterer Rest in der Umgebung des LNP-Motivs, der von funktioneller Bedeutung sein könnte, ist das Threonin an Position 153. Dieser Rest liegt eine Helixwindung von dem konservierten N156 entfernt. Der Austausch des Threonins an Position 153 und des Leucins an Position 155 gegen Alanin zeigte keinen Einfluß auf die Transportaktivität der LysE-Mutanten. Ebenso zeigte der Austausch von Asparagin 158 gegen Histidin (N158H), sowie gegen Alanin (N158A) keine veränderte Lysinexkretion. Der Austausch des Helixbrechers Prolin 157 gegen Alanin führte zu einer im Vergleich zum Wildtyp zu 90 % reduzierten Lysin-Exkretionsrate von $0,9 \pm 0,1 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Zell-Trockengewicht})^{-1}$. Die Substitution N156A zeigte noch 36 % der Wildtyptransportaktivität, während der Austausch N156Q, der eine vergrößerte Seitenkette einführt, zu einer LysE-Mutante führte, die mit $1,6 \pm 0,4 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Zell-Trockengewicht})^{-1}$ nur noch 17 % der Wildtypaktivität zeigte. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abbildung 18 zusammengefaßt. Mit Western-Blot-Analysen, die zur Überprüfung der Expression der LysE-Mutanten und deren Insertion in die Membran durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, daß alle Transporter in zum Wildtyp vergleichbaren Mengen in die Membran inseriert waren.

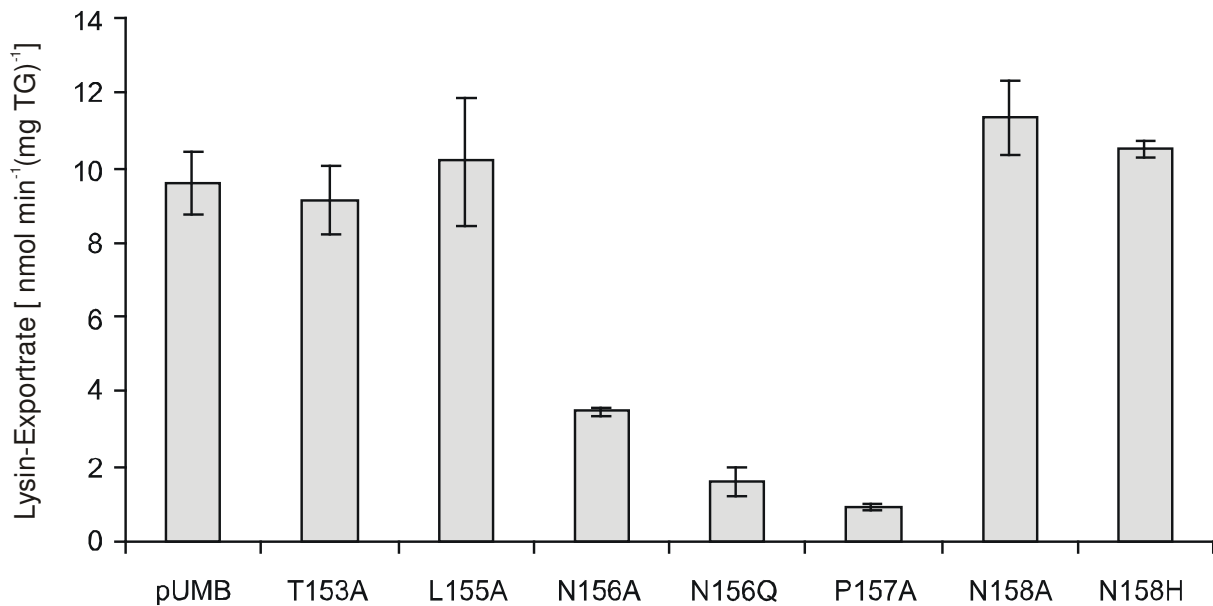


Abb. 18: Einfluß der Substitution einer Aminosäure an der angegebenen Position auf den Lysinexport. *C. glutamicum* ATCC13032 Δ lysEG, mit den entsprechenden Plasmiden transformiert, wurde nach 2h Induktion mit 1 mM IPTG zur Dipeptidfütterung eingesetzt. Die Zellen wurden bei 30°C unter Zusatz von 1 mM Lysyl-Alanin in MOPS-Puffer (+20 mM Glucose) kultiviert. Der Lysinexport wurde über 2 Stunden verfolgt und die resultierende Transportrate während des initialen linearen Verlaufs der Lysinexkretion berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstabencode angegeben.

3.7 Konstruktion und Untersuchung eines genetischen LysE-Dimers

Die Aufklärung der Topologie des Lysin-Exportcarriers wurde mit Hilfe von LacZ- und PhoA-Reporterfusionen von LysE durchgeführt (Vrljic *et al.*, 1999). Diese dienten dazu, das mittels Computeranalyse erstellte Topologiemodell zu überprüfen, welches sechs transmembrane Helices voraussagte. Nach den Ergebnissen dieser Fusionen, die aber insbesondere im N-terminalen Bereich des Proteins nicht eindeutig waren, wurde von den Autoren ein Modell mit nur fünf transmembranen Domänen vorgeschlagen (Abb. 2). Nach diesem Modell befände sich der N-Terminus im Cytoplasma und die zweite α -Helix läge der Cytoplasmamembran auf der extrazellulären Seite auf. Weitergehende Topologieuntersuchungen, die in unserer Arbeitsgruppe durch Zugänglichkeitsstudien mit fluoreszierenden Farbstoffen an verschiedenen Cysteinmutanten des Proteins durchgeführt wurden (Massow, persönliche Mitteilung), unterstützen jedoch das Modell mit sechs transmembranen Domänen. Aufgrund des „Carrier-Consensusmotivs“ (etwa 12 transmembranen Helices) liegt es nahe, daß die aktive Einheit des Lysin-Exportcarriers wahrscheinlich ein Homodimer darstellt. Aus diesen Gründen, und um weitere Hinweise auf

die Topologie des Carriers zu erhalten, wurde in der vorliegenden Arbeit mit der Analyse eines genetischen Dimers des Lysin-Exportcarriers begonnen. Funktionalität dieses Proteins vorausgesetzt, wäre das Dimer ein Hinweis auf das Sekundärstrukturmodell mit 6 transmembranen Helices, da nur in diesem Fall das dimere Protein korrekt in die Membran eingebaut werden kann.

3.7.1 Herstellung des Expressionsvektors

Zur Expression des genetischen Dimers in *C. glutamicum* wurde ausgehend von dem Vektor pBEUM1 eine PCR durchgeführt, in deren Verlauf der 5'-Primer durch Basenaustausch eine *BglIII*- und der 3'-Primer eine *StuI*-Restriktionsenzymchnittstelle einführte. Um den Linker zwischen Helix VI des ersten Monomers und Helix I des zweiten Monomers auf insgesamt 18 Aminosäuren zu verlängern wurden in dieser PCR mit dem 3'-Primer noch die Kodons für die Aminosäuren Prolin, Glycin, Leucin, Glycin und Methionin nach dem letzten Kodon des *lysE*-Gens eingeführt. Dieses PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsendonukleasen *BglIII* und *StuI* geschnitten und in den ebenfalls *BglIII/StuI* verdauten Vektor pUMB ligiert. Das resultierende Plasmid wurde pUMBVM genannt. In einer zweiten PCR, in der ebenfalls der Vektor pBEUM1 als Matrize diente, wurde durch die verwendeten Primer am 5'- und am 3'-Ende eine *StuI*-Schnittstelle eingeführt. Bei dieser PCR wurde das 3'-Ende des Gens so verändert, daß das Kodon für die Aminosäure Methionin an Position 235 durch ein Kodon für die Aminosäure Leucin ersetzt wurde und zusätzlich noch ein Kodon für die Aminosäure Leucin hinter das letzte Kodon (Position 236) des Gens eingefügt wurde. Dieses PCR Produkt wurde mit dem Restriktionsenzym *StuI* geschnitten und in den ebenfalls *StuI* geschnittenen Vektor pUMBVM ligiert. Nach Restriktionsverdau zur Überprüfung der Orientierung des Fragmentes wurde eine Sequenzierung durchgeführt. Der resultierende Vektor wurde pUMBDimer genannt. Zur Verdeutlichung des Aufbaus des genetischen Dimers ist dies schematisch in Abbildung 19 dargestellt.

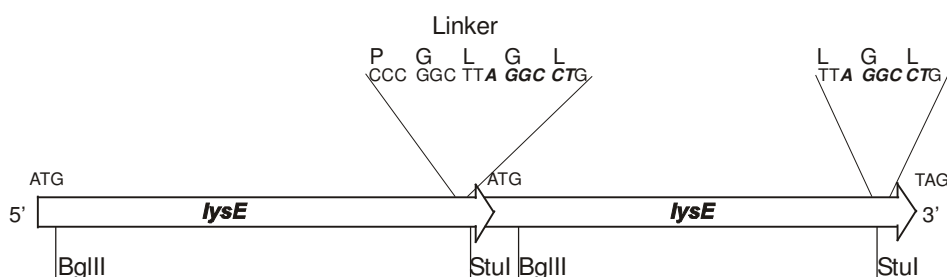


Abb. 19: Schematische Darstellung des *lysE*-Dimers. Die beiden in Tandemorientierung hintereinander klonierten *lysE*-Gene sind als Pfeile dargestellt. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des Linkers und des 3'-Endes des Fusionskonstruktes sind in der obersten Zeile angegeben. Die *StuI*-Schnittstelle ist in der Sequenz fett gedruckt.

3.7.2 Expression des Dimers

Um die Bildung des Genproduktes des genetischen Dimers nachzuweisen, wurden die Zellen des Stammes *C. glutamicum* ATCC13032 Δ *lysEGpUMBDimer* zwei Stunden nach der Induktion mit 1 mM IPTG geerntet, die Membranen präpariert und eine Western-Blot-Analyse durchgeführt (Abb. 20).

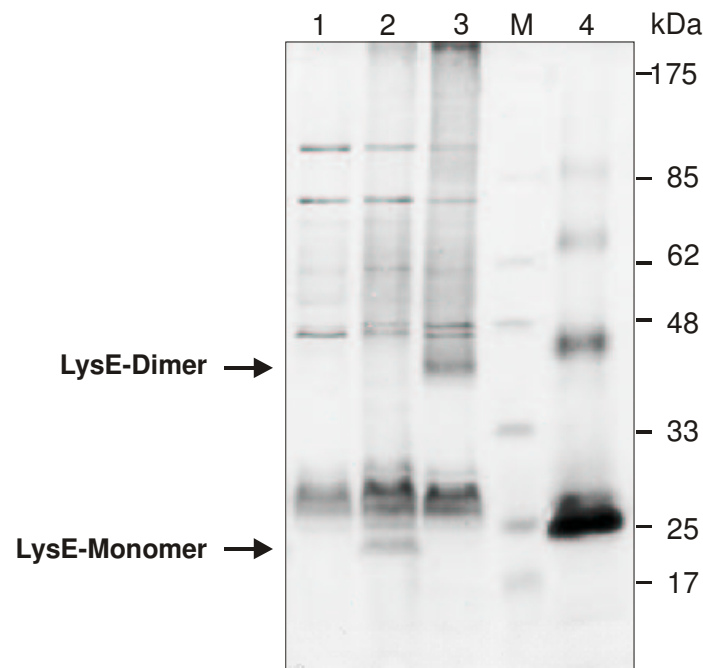


Abb. 20: Nachweis des genetischen LysE-Dimers durch Western-Blot-Analyse. Auf ein 10 %iges Polyacrylamid-Gel nach Schägger wurde pro Spur 50 μ g Membranprotein aus einer für 2 h mit 1 mM IPTG induzierten Kultur von ATCC13032 Δ *lysEGpEKEx2* (Spur 1), ATCC13032 Δ *lysEGpUMB* (Spur 2), ATCC13032 Δ *lysEGpUMBDimer* (Spur 3) aufgetragen. In Spur 4 wurden 30 ng des gereinigten LysEStrep aufgetragen. Der immunologische Nachweis erfolgte mit einem gegen den cytoplasmatischen *Loop* von LysE gerichteten polyklonalen Antikörper. Die Pfeile geben die Position von LysE und LysEDimer an. M: Molekulargewichtsstandard (prestained Broad Range, NEB)

Das LysE-Dimer konnte immunologisch in der Cytoplasmamembran von *C. glutamicum* nachgewiesen werden. Mit einer apparenten molekularen Masse von ungefähr 40 kDa zeigt es gegenüber dem Monomer (20 kDa) eine Verdopplung des Molekulargewichtes. Zusätzliches LysE-Monomer, welches auf Proteolyse schließen lassen könnte, wurde nicht nachgewiesen. Das in Spur 4 aufgetragene durch StrepTactin-Affinitätschromatographie gereinigte LysEStrep zeigte, vermutlich durch Aggregation des Proteins in Lösung, ebenfalls dimere, aber auch oligomere Komplexe. Deren apparente molekulare Massen sind aufgrund des StrepTags größer.

3.7.3 Aktivität des genetischen Dimers

Zur Messung der Aktivität des genetischen Dimers wurde die Lysinexkretion des Stammes *C. glutamicum* ATCC13032 Δ lysEGpUMBDimer vergleichend zur Lysinexkretion von *C. glutamicum* ATCC13032 Δ lysEGpUMB untersucht. Dazu wurden beide Stämme in einer Dipeptidfütterung mit 1 mM Lysyl-Alanin eingesetzt (Abb. 20). *C. glutamicum* ATCC13032 Δ lysEGpUMBDimer exkretierte L-Lysin mit einer Rate von $9,5 \pm 0,5 \text{ nmol min}^{-1}$ (mg Zell-Trockengewicht) $^{-1}$ ins Medium und damit vergleichbar zum Stamm *C. glutamicum* ATCC13032 Δ lysEGpUMB, der Lysin mit einer Rate von $9,6 \pm 0,8 \text{ nmol min}^{-1}$ (mg Zell-Trockengewicht) $^{-1}$ exkretiert.

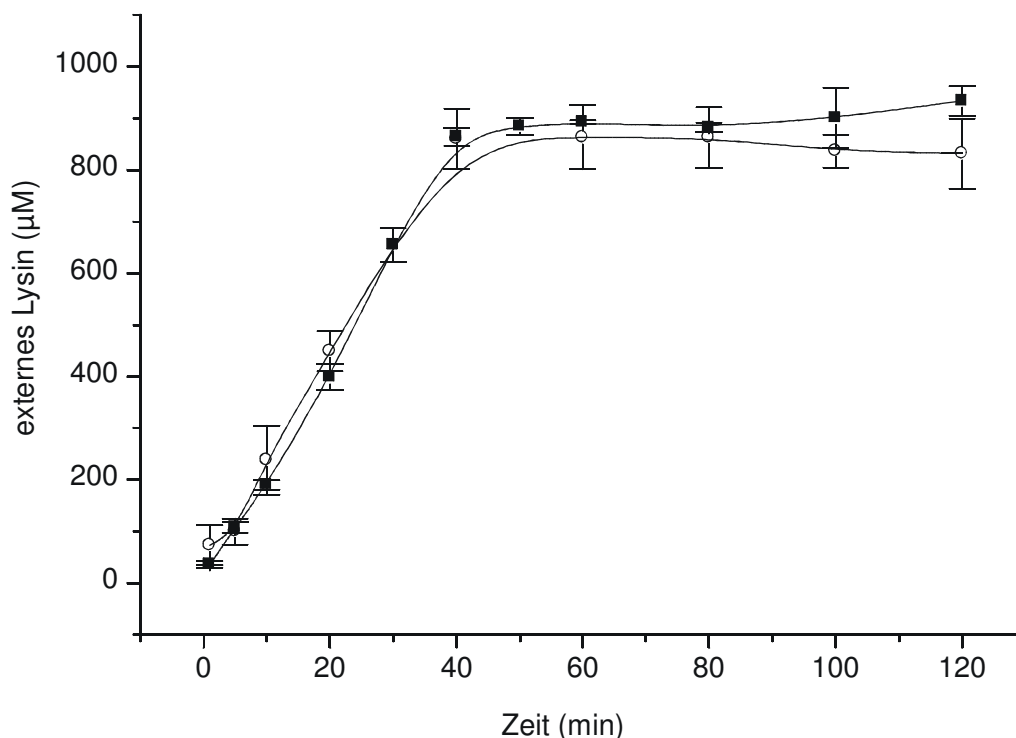


Abb. 21: Exkretion von Lysin durch ATCC13032 Δ lysEGpUMB (○) und ATCC13032 Δ lysEGpUMBDimer (■). Die Zellen wurden bei 30°C unter Zusatz von 1 mM Lysyl-Alanin in MOPS-Puffer (+20 mM Glucose) kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben zur Bestimmung der Aminosäurekonzentration entnommen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Lysyl-Alanin-Aufnahme durch die beiden Stämme war gleich. Nach 30 Minuten konnte das Dipeptid nicht mehr im Kulturmedium nachgewiesen werden. Intrazellulär konnte keine Anhäufung von L-Lysin gemessen werden. Dieses Ergebnis zeigt, daß ein genetisches Dimer des Lysin-Exportcarriers, welches als Dimer stabil in die Membran inseriert ist, L-Lysin aus der Zelle exkretieren kann.

4. Diskussion

In jüngster Zeit zeigte sich, daß der Export von zahlreichen Metaboliten carriervermittelt erfolgt. Der Lysin-Exportcarrier aus *C. glutamicum* ist der zur Zeit *in vivo* am besten untersuchte Vertreter der neuen LysE-Superfamilie von Transportproteinen, deren Mitglieder möglicherweise alle am Export niedermolekularer Substanzen beteiligt sind. Bislang fehlt aber noch weitgehend ein molekulares Verständnis für die Kopplung der Substrattranslokation an energetische Parameter. So sind weder der Substratweg durch das Protein noch die Lokalisation der Substratbindestellen im Carrier bekannt. Die kürzlich durchgeführte Klonierung und Sequenzierung des für LysE kodierenden Gens ermöglicht nun detaillierte Untersuchungen.

4.1 Meßsysteme zur Charakterisierung von LysE

Funktionelle Untersuchungen zur Charakterisierung von LysE wurden neben *C. glutamicum* im heterologen System *E. coli*, in corynebakteriellen Fusionsvesikeln und im rekonstituierten System durchgeführt. Zur Charakterisierung der Eigenschaften von LysE auf molekularer Ebene ist es nützlich, den Carrier außerhalb seiner physiologischen und regulatorischen Umgebung zu untersuchen. Voraussetzung hierfür sind größere Mengen an isoliertem, reinem und funktionell aktivem Protein.

Die Expression des *lysE*-Gens unter der Kontrolle eines Tetrazyklinpromotors in *E. coli* und die anschließende Reinigung des Proteins über StrepTactin-Affinitätschromatographie führte zu Proteinausbeuten von 100-200 µg reinem LysEStrep aus 1 Liter *E. coli*-Kultur. Ein solch niedriges Expressionsniveau wird bei vielen Membranproteinen beobachtet. Das Protein wird, wie durch Western-Blot-Analysen gezeigt werden konnte, in die Cytoplasmamembran der Zellen eingebaut. Idealerweise kann die Aktivität eines Proteins schon im heterologen Wirt nachgewiesen werden. Dipeptidfütterungen von JM109 mit Lysyl-Alanin zeigten, daß dieser Stamm Lysin mit einer Rate von $40 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Zell-Trockengewicht})^{-1}$ ins Medium exkretierte. Systeme, die in *E. coli* die Lysinexkretion vermitteln, sind bislang nicht bekannt. Aufgrund dieser hohen Lysin-Transportrate in *E. coli* konnte kein zusätzlicher LysE vermittelter Lysintransport nachgewiesen werden. Unterschiede zeigten sich jedoch bei der Bestimmung der internen Lysinkonzentrationen. Während *E. coli*-Wildtyp Lysin kurzzeitig in Konzentrationen von bis zu 50 mM akkumulierte, konnte in den LysE produzierenden Stämmen keine interne Anhäufung von Lysin beobachtet werden. Die cytoplasmatischen Lysinkonzentrationen befanden sich sogar immer an der Nachweisgrenze, während im

E. coli-Wildtyp immer bis zu 5 mM internes Lysin nachweisbar war. Während das *E. coli* eigene Exportsystem nach Dipeptidfütterung erst aktiviert werden muß, scheint das plasmidkodierte heterolog synthetisierte LysE das durch die Dipeptidfütterung anfallende Lysin sofort zu exportieren. Mit diesem, wenn auch nur indirekten Nachweis eines Lysintransportes ist gezeigt, daß der Lysin-Exporter aus *C. glutamicum* in *E. coli* aktiv ist. Diese geringe Aktivität konnte von Vrljic *et al.* in Kurzzeitfermentationen bestätigt werden (Vrljic *et al.*, 1999). Weiterhin konnte mit diesen Experimenten gezeigt werden, daß LysE und LysEStrep keine Unterschiede in der Aktivität besaßen. Beide Proteine führten in *E. coli* zum sofortigen Export von internem Lysin. Das C-terminal mit einem Streptag fusionierte LysE ist demnach in *E. coli* aktiv. Parallel zu dieser Arbeit wurden im Rahmen einer Diplomarbeit *inside-out* Vesikel aus dem Stamm DH5 α -mcrpBEUM1 hergestellt und auf ihre Lysintransportaktivität untersucht (Wolf, 1999). An diesen Vesikeln konnte eine Lysinaufnahmerate von $1,4 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Membranprotein})^{-1}$ bestimmt werden. Angesichts der hohen Standardabweichungen bei den Messungen ist diese Rate jedoch nur als eine Näherung zu betrachten. Funktionelle Untersuchungen des heterolog in *E. coli* synthetisierten Lysin-Exportcarriers konnten weder an ganzen Zellen noch im Vesikelsystem durchgeführt werden.

Da wie oben beschrieben in *E. coli* keine Untersuchungen zur Funktion von LysE durchgeführt werden konnten, wurde mit der Rekonstitution von LysE in künstliche Liposomen begonnen. Die Aktivität von Carriern läßt sich außerhalb ihrer natürlichen Umgebung nur bei Vorliegen von zwei Kompartimenten, d.h. nur im Zustand der funktionellen Insertion in eine geschlossene Membran messen. In dieser Arbeit wurde der Lysin-Exportcarrier in künstliche Lipidmembranen, die aus Phosphatidylcholin aus Hühnereigelb oder aus polarem *E. coli*-Lipidextrakt bestanden, inseriert. In keiner der durchgeführten Messungen mit LysE enthaltenden Proteoliposomen konnte Lysintransport nachgewiesen werden. Auch verschiedene Parameter, die die funktionelle Rekonstitution von LysE beeinflussen können, wie das zur Solubilisierung und Reinigung verwendete Detergenz, die Lipidumgebung, das eingestellte Lipid-zu-Protein Verhältnis, die eingesetzte Substratmenge und die Reinigung des Proteins unter verschiedenen Bedingungen, wurden variiert. Keine dieser Veränderungen führte zu funktionell aktivem LysE in Liposomen. Die mit LysE hergestellten Proteoliposomen wurden bezüglich Innenvolumen, Proteineinbau und der Fähigkeit ein Valinomycin induziertes Kaliumdiffusionspotential aufrechtzuerhalten untersucht. Über die Höhe des so erzeugten Potentials konnten keine Angaben gemacht werden. Wie Bröer und Krämer 1991 durch Messungen an *C. glutamicum* gezeigt haben, wird die maximale Transportrate von LysE bei einem Membranpotential von über 130 mV erreicht. Bei einem z.B. um 30 mV reduzierten Membranpotential zeigt der Transporter nur

30 % seiner maximalen Transportrate. Da das Potential jedoch über etwa 4 Minuten aufrechterhalten werden konnte, waren die Proteoliposomen aufgrund der Ergebnisse dieser Charakterisierung grundsätzlich zu Transportmessungen geeignet. Dies konnte durch die funktionelle Rekonstitution des Glycinbetaintransporters bestätigt werden.

Da weder Messungen in *E. coli* noch Untersuchungen mit Proteoliposomen Lysin-Transport zeigten, bestand eine weitere Möglichkeit den Lysin-Exporter in einem reduzierten System zu analysieren, in der Verwendung von Fusionsvesikeln. Es gibt bislang keine Methode nach der es möglich wäre transportaktive Membranvesikel aus *C. glutamicum* zu präparieren. Für andere Gram-positive Bakterien ist jedoch die Fusion von Plasmamembranen mit Lipiden aus *E. coli* beschrieben worden. Eine Methode zur Herstellung von Fusionsvesikeln aus corynebakterieller Cytoplasmamembran und polaren *E. coli*-Lipiden wurde in dieser Arbeit erstmals etabliert. Die Vesikel sind zur Charakterisierung von carriervermittelten Transportprozessen, wie am Beispiel von BetP gezeigt, geeignet. Der Vorteil dieser Methode gegenüber der Messung an ganzen Zellen besteht darin, daß während der Präparation der Fusionen definierte Pufferbedingungen eingestellt werden können. Dadurch können z.B. unterschiedliche Substrate und Cosubstrate getestet werden. Ein LysE vermittelter Lysintransport konnte jedoch auch an diesen Fusionsvesikeln nicht gemessen werden.

4.2 Benötigt LysE eine zweite Komponente zur Aktivität?

In den im Verlauf dieser Arbeit gut charakterisierten reduzierten Meßsystemen konnte kein LysE vermittelter Lysintransport nachgewiesen werden. Dies kann an den gewählten Bedingungen liegen, aber auch daran, daß möglicherweise eine weitere Proteinkomponente fehlt, die zum Transport von Lysin durch LysE benötigt wird. Daß es sich dabei am ehesten um eine membranassoziierte oder cytoplasmatische Komponente handeln könnte, wurde durch die Messung an den Fusionsvesikeln klar. In diesen Fusionsvesikeln, in denen LysE in seiner physiologischen Membranumgebung vorliegt, und somit alle Membrankomponenten der Cytoplasmamembran vorhanden sind, konnte kein Lysintransport nachgewiesen werden. Kürzlich konnte für den Kaliumtransporter Ktr aus *Bacillus subtilis* (Bremer, persönliche Mitteilung) und für den Prolinecarrier ProP aus *E. coli* (Kunte *et al.*, 1999) eine solche cytoplasmatische Proteinkomponente bislang nicht näher charakterisierter Funktion, nachgewiesen werden. Ein solches Zusammenspiel zweier Proteine wäre auch für den Lysin-Exportcarrier denkbar. Dafür sprechen nicht nur die oben erwähnten Ergebnisse dieser Arbeit, sondern auch Untersuchungen an *C. glutamicum* Lysinproduktionsstämmen. Die Regulation der Lysinexkretion in Lysinproduktionsstämmen ist gegenüber dem Wildtyp

verändert (Erdmann *et al.*, 1993). Vor der Klonierung des *lysE*-Gens und des dazugehörigen Regulatorgens *lysG* wurde für diese Beobachtung eine Mutation in dem Carrier angenommen. Durch die Sequenzierung der Gene *lysE* und *lysG* aus den Produktionsstämmen zeigte sich jedoch, daß weder der Regulator noch der Carrier eine Mutation aufwiesen (Vrljic, 1997). Diese Beobachtungen, zusammen mit der Tatsache, daß eine LysE-Aktivität außerhalb der gesamten Zellumgebung nicht gezeigt werden konnte, könnten durch das Vorhandensein eines cytoplasmatischen bisher unbekanntes Proteins erklärt werden. Die indirekt nachgewiesene Aktivität des Lysin-Exportcarriers in *E. coli*-Zellen im Vergleich zu den Ergebnissen mit den *right side out* Vesikel aus *E. coli*-Membranen weist ebenfalls darauf hin.

4.3 Funktionell wichtige Bereiche in LysE

Die funktionelle Charakterisierung erfolgte aufgrund der oben dargestellten Ergebnisse durch *in vivo* Transportmessungen in *C. glutamicum*. Zum einen wurde der große hydrophile *Loop* von LysE zum anderen charakteristische Aminosäurereste untersucht. Dabei wurden die geladenen Reste in den ersten vier Helices und Aminosäuren in der Nähe des konservierten Motivs LNP ausgetauscht.

Die in dieser Arbeit im hydrophilen *Loop* von LysE eingeführten Deletionen zeigten ein klares Ergebnis. Kein Bereich des *Loops* war für Transportaktivität wirklich essentiell, wie die schrittweise Deletion kurzer Bereiche zeigte. Auch die Deletionsmutante LysE Δ 127-140, in der die auffällige Arginin- und Valinreiche Region fehlt, zeigte keine erniedrigte Transportaktivität. Ähnlich stark geladene *repeat*-Sequenzen sind auch in anderen Transportern beschrieben worden, ohne daß ihre Funktion bekannt ist (Paulsen und Saier, 1997; Eng *et al.*, 1998). Die Deletionsmutanten, deren cytoplasmatischer *Loop* unabhängig von der Lage der Deletion noch 25 oder mehr Aminosäurereste aufweist, waren unter den getesteten Bedingungen aktiv. Eine Ausnahme bildet die Mutante LysE Δ 91-114, die mit einer Restlänge des *Loops* von 28 Aminosäuren nur eine Transportrate von $2,85 \pm 0,1 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Zell-Trockengewicht})^{-1}$ zeigte. Da diese Deletion, wie auch die Mutante LysE Δ 91-98, möglicherweise noch einen Anteil der dritten Helix einschließt, könnte die erniedrigte Aktivität durch Veränderungen der Struktur der Helix bedingt sein. Es konnte also in dieser Arbeit gezeigt werden, daß eine Mindestlänge des *Loops* von etwa 20-25 Aminosäuren notwendig ist, um die Aktivität des Proteins zu erhalten. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Tatsache, daß der cytoplasmatische *Loop* der übrigen Mitglieder der LysE-Familie aus etwa 23-24 Aminosäureresten besteht. Ein Modell zur Erklärung einer kritischen *Loop*-Länge ist kürzlich von Weinglass und Kaback (2000) für die Lactose Permease aus *E. coli* aufgestellt

worden. Die Lactose Permease besteht entsprechend des Carrierkonsensus-Motivs aus 12 transmembranen Helices. Frühere Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe zeigten, daß die Lactose Permease auch dann aktiv ist, wenn die beiden Hälften des Proteins ohne kovalente Verbindung, d.h. zwischen sechster und siebter Helix getrennt, synthetisiert werden (Bibi und Kaback, 1990). Die beiden Fragmente komplementieren funktionell und stabilisieren sich gegenseitig gegen Abbau. Der *Loop* zwischen Helix VI und VII dieses Carriers besteht aus etwa 33 Aminosäuren (McKenna *et al.*, 1991). Wenn dieser *Loop* um 20 Aminosäurereste verkürzt wird, führt dies zu einem völligen Aktivitätsverlust des Proteins, der durch den Nichteinbau des Proteins in die Membran erklärt wird. In der vorliegenden Arbeit wurde durch Western-Blot-Analysen versucht, diese Hypothese des Nichteinbaus in die Membran bei Unterschreiten einer kritischen *Loop*-Länge für LysE zu beweisen. Mit dem verwendeten Antikörper, der gegen die Aminosäurereste 118-131 von LysE gerichtet ist, und damit gegen einen Bereich des *Loops*, konnten nur die im N-terminalen Bereich des *Loops* gelegenen Deletionsmutanten LysE Δ 91-98, LysE Δ 99-115 und LysE Δ 91-114 in den Membranpräparationen nachgewiesen werden. Auch mit einem zweiten in dieser Arbeit verwendeten Antikörper, der gegen das Protein LysEStrep als Antigen hergestellt wurde, konnte LysE nicht nachgewiesen werden. LysEStrep wird hingegen sehr gut detektiert, so daß der Antikörper vermutlich zum größten Teil gegen das Streptag Epitop gerichtet ist. Ob der Aktivitätsverlust der LysE-Mutanten mit einer restlichen Länge des *Loops* von etwa 20 Aminosäuren durch Nichteinbau in die Plasmamembran, oder durch die strukturelle Veränderung im Protein durch die Deletion resultieren, konnte also nicht geklärt werden.

Zur Identifikation wichtiger Aminosäurereste von LysE wurde mit dem Austausch der geladenen Aminosäuren der ersten vier Helices begonnen. Geladene Reste in transmembranen Helices sind im Gegensatz zu vielen anderen hydrophoben Aminosäuren meist von großer struktureller oder funktioneller Bedeutung. Dies konnte von der Arbeitsgruppe um R. Kaback durch Experimente an der Lactose Permease aus *E. coli* eindrücklich bewiesen werden. Von allen ausgetauschten 417 Resten dieses Proteins waren nur 6 Reste von essentieller funktioneller Bedeutung (Frillingos *et al.*, 1998). Fünf dieser Reste sind geladene Aminosäurereste. Die Analyse des Einflusses der Substitution geladener Aminosäurereste in den ersten vier Helices des Lysin-Exportcarriers ergab, daß eine negative Ladung an Position 49 vermutlich essentiell für den Einbau des Proteins in die Cytoplasmamembran von *C. glutamicum* ist. Der Austausch des nativen Aspartat 49 durch eine neutrale Aminosäure gleicher Seitenkettengröße (Asparagin), durch eine kleine hydrophobe Aminosäure (Alanin) oder durch eine positiv geladene Aminosäure (Lysin) führte zu einem völligen Verlust der Transportaktivität und zeichnete sich dadurch aus, daß die korrespondierenden Transportermoleküle nicht in der Membran nachweisbar waren. Es wurde auch keine Untersuchung der vorhandenen RNA-Menge durchgeführt, dennoch kann

dieses Ergebnis dahingehend gedeutet werden, daß die Aminosäuresubstitutionen an Position 49 einen starken Einfluß auf die Insertion der modifizierten Transporter in die Membran ausübten. Demgegenüber resultierte die Verlängerung der Seitenkette um eine Methylgruppe und unter Beibehaltung der negativen Ladung (D49E) in einer dem Wildtyp vergleichbaren Transportaktivität von $10,2 \pm 0,4 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Zell-Trockengewicht})^{-1}$. Auf die Analyse des Lysinrestes an Position 144 wurde verzichtet, da dieser an der Grenze zwischen einem *Loop* und einer transmembranen Domäne liegt. Die Substitution der geladenen Seitenketten an den Positionen D61, D72 und R75 zeigten keinen Einfluss auf die Transportaktivität des Lysin-Exportcarriers. Dies war ein unerwartetes Ergebnis, da zumindest für die Reste D72 und R75, die genau vier Aminosäurereste voneinander entfernt liegen, die Möglichkeit einer intrahelikalen Salzbrückenbildung bestanden hätte. Wie für den Zuckerphosphatcarrier UhpT aus *E. coli* gezeigt werden konnte, ist eine Salzbrücke zwischen Aspartat 388 und Lysin 391 in der Helix XI essentiell für die Funktion dieses Proteins (Hall *et al.*, 1999). Wird eine der beiden Aminosäuren gegen Cystein ausgetauscht, so wird keine Glucose transportiert. Werden dagegen beide Reste gegen Cystein ausgetauscht, so kann die Wildtypaktivität wieder zu 75 % hergestellt werden. Wird im LysE der Aspartatrest 162 gegen Alanin ausgetauscht, so wird kein Lysin transportiert. Für diesen Rest besteht die Möglichkeit einer Salzbrückenbildung mit Lysin 231 in der VI Helix. Da der Austausch dieses Aspartats gegen Glutamat jedoch nur zu einer Transportaktivität von etwa 30 % der Wildtypaktivität führte, kann vermutet werden, daß dieser Rest möglicherweise an der Bildung des Substratweges und nicht an einer interhelikalen Salzbrückenbildung beteiligt ist. Die in Helix VI verbleibenden geladenen Reste K212, R215 und K231 stellen Kandidaten für zukünftige Aminosäureaustausche dar.

Im Rahmen von Sequenzvergleichen der Mitglieder der LysE-Familie konnte ein konserviertes Motiv in der Mitte der vierten Helix identifiziert werden (Vrljic *et al.*, 1999). Es wurde vermutet, daß die konservierte Region LNPHVYL (Aminosäurereste 155-161) einen zentralen Teil des Translokationskanals bilden könnte. Die Analyse des oben erwähnten Aspartatrestes 162, der auch in der vierten Helix lokalisiert ist, steht damit im Einklang. Vergleiche mit dem Lysin/Arginin/Ornithin Bindeprotein aus *Salmonella typhimurum* zeigten, daß in diesem Protein ein Aspartatrest (D161) an der Koordination des Lysins in der Bindetasche des Bindeproteins beteiligt ist. Die Struktur dieses Proteins ist röntgenkristallographisch in Gegenwart des Substrates Lysin mit einer Auflösung von 1,8 Å bestimmt (Oh *et al.*, 1993). Der Aspartatrest stabilisiert nach diesem Modell die α -Aminogruppe des Lysins. Das vollständig konservierte Asparagin (N156) des Lysin-Exportcarriers innerhalb des konservierten Motivs liegt vier Aminosäurereste und damit genau eine Helixwindung entfernt von Threonin (T153). Diese polaren Reste könnten zusammen als Teil der aktiven transmembranen Region wirken. In Übereinstimmung damit

ist die Lage des Prolinrestes (P157) innerhalb des konservierten Motivs. Prolinreste sind dafür bekannt, durch Einführung von 20° Winkeln in transmembrane Helices funktionell wichtige Reste des Translokationskanals in räumliche Nähe zu bringen (Grigorieff *et al.*, 1996). So positioniert z.B. der Prolinrest 50 in Helix B des Bacteriorhodopsins ein ungepaartes Sauerstoffatom der Carbonylgruppe des Threonins 46 so, daß es Teil des Kanals wird (Deisenhofer und Michel, 1989). Von den Aminosäuren, die im konservierten Motiv von LysE oder in dessen Nähe ausgetauscht wurden, hatten die Austausche T153A, L155A, N158A und N158H keinen Einfluß auf die Transportaktivität des Lysin-Exportcarriers. Anders als im Lysin/Arginin/Ornithin Bindeprotein aus *Salmonella typhimurum* kann eine Rolle des Threoninrestes 153 bei der Translokation des Lysins also weitgehend ausgeschlossen werden. Im Lysin/Arginin/Ornithin Bindeprotein stabilisiert die Hydroxylgruppe des Threoninrestes 121 die α -Carboxylgruppe des Lysins (Oh *et al.*, 1993; Oh *et al.*, 1994). In LysE führte der Austausch des Prolinrestes an Position 157 gegen Alanin zu einer Reduktion der Transportaktivität auf $0,9 \pm 0,1 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Zell-Trockengewicht})^{-1}$. Der Austausch des Asparaginrestes an Position N156 gegen Alanin führte zu einer LysE-Mutante, die noch eine Transportaktivität von $3,5 \pm 0,1 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Zell-Trockengewicht})^{-1}$ zeigte. Der Austausch gegen das gegenüber dem Asparagin um eine Methylgruppe längere Glutamin führte nur noch zu einer Lysin-Transportrate von $1,6 \pm 0,4 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Zell-Trockengewicht})^{-1}$. Dies könnte für eine sterische Behinderung des Transportes von Lysin sprechen. Die hier vorgestellten Analysen bestätigen, daß die Aminosäuren Asparagin 156 und Prolin 157, die in dem konservierten Motiv in der Helix IV liegen, wichtig für die Funktion des Lysin-Exportcarriers sind. Weiterhin konnte die Aminosäure Aspartat 162, die ebenfalls in der vierten Helix lokalisiert ist, als eine für die Funktion des Carriers wichtige Aminosäure identifiziert werden.

4.4 Ist LysE ein Dimer?

In den letzten Jahren sind vermehrt Primärstrukturen von membranständigen sekundären Carrierproteinen aufgeklärt worden. Sie wurden aufgrund von Sequenzähnlichkeiten in eine Reihe von Proteinfamilien eingeteilt (Saier 1994, Saier 1996, Saier *et al.*, 1999). Basierend auf Computervorhersagen und experimentellen Untersuchungen mit PhoA- und LacZ-Fusionen existieren auch Modelle zur Topologie dieser Carrier. Aus diesen Daten wurde ein „Konsensusmotiv“ bestehend aus 10-12 transmembranen Helices postuliert, welches für die Mehrheit der Carrierproteine gilt. Die Mitglieder der mitochondrialen Carrierfamilie besitzen nur 6 transmembrane Helices (Kuan und Saier, 1993), die funktionelle Einheit ist jedoch wahrscheinlich ein Homodimer. Somit liegt die Vermutung nahe, daß die aktive Einheit des

Lysin-Exportcarriers, der mit 236 Aminosäuren eine ähnliche Größe besitzt wie die Mitglieder der mitochondrialen Carrierfamilie, vermutlich ebenfalls ein Homodimer ist. Diese Hypothese kann durch gezielte Konstruktion von Heterodimeren bewiesen werden. Mit einem ähnlichen Versuchsansatz konnten Sahin-Toth *et al.* 1994 zeigen, daß die Lactose Permease aus *E. coli* als Monomer aktiv ist. Wenn ein inaktives Monomer mit einem aktiven Monomer fusioniert wird, ist dieses Protein nicht aktiv, wenn das inaktive Monomer dominant ist. Für solche Versuche wurde ein genetisches Dimer des Lysin-Exportcarriers konstruiert. Bei der Klonierung des Dimers wurde ein Linker von 5 Aminosäuren zwischen dem ersten LysE-Molekül und dem zweiten LysE-Molekül eingefügt. Nach dem Sekundärstrukturmodell mit sechs transmembranen Domänen (Vrljic *et al.*, 1999) stellt der Linker zusammen mit den N- und C-terminal außerhalb der Membran gelegenen hydrophilen Aminosäureresten einen *Loop* von insgesamt 18 Aminosäuren dar. Die homologe Expression des genetischen *lysE*-Dimers in *C. glutamicum* führt zu einem in die Plasmamembran eingebautem Protein, welches mit einer apparenten molekularen Masse von etwa 40 kDa die doppelte Masse des Monomers aufweist. Abbauprodukte des Proteins oder LysE-Monomere konnten nicht nachgewiesen werden. Funktionsanalysen zeigten mit einer Lysintransportrate von $9,5 \pm 0,5 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Zell-Trockengewicht})^{-1}$ eine zum Wildtypprotein identische Transportrate. Ob der Lysintransport tatsächlich durch das Dimer katalysiert wird, oder ob zwei Monomeruntereinheiten sich zu einem funktionellen Dimer zusammenlagern, kann durch diese Untersuchung noch nicht endgültig geklärt werden. Die durch ortsspezifische Mutagenese hergestellten inaktiven Lysin-Exkretionscarrier, die nachweislich in die Membran inserieren, können nun als Werkzeug für die Konstruktion eines Dimers, welches aus einem aktiven und einem inaktiven Monomer zusammengesetzt ist, dienen. Mit diesem Versuchsansatz sollte es in kurzer Zeit möglich sein, die dimere Struktur des Lysin-Exkretionscarriers zu beweisen.

Die stabile Insertion eines funktionell aktiven Dimers in die Membran unterstützt das Topologiemodell mit sechs transmembranen Helices. Nur in diesem Fall liegen die N- und C-Termini von LysE auf einer Seite der Membran und ermöglichen einen korrekten Einbau des kovalent verbundenen Dimers. Da auch hier, wie oben im Zusammenhang mit dem Nachweis der Dimerisierung ausgeführt, eine Restmöglichkeit der Bildung aktiver Carrier aus zwei Monomereinheiten verbleibt, ist diese Frage letztendlich ebenfalls nur durch die Verwendung von Heterodimeren zu klären.

5. Zusammenfassung

Sekundäre Transportprozesse sind essentiell für die Aufnahme bzw. Exkretion verschiedenster Substrate. Der Lysin-Exportcarrier aus *C. glutamicum* als Mitglied der neuen LysE-Transporter-Superfamilie, die mittlerweile aus über 20 Mitgliedern besteht, konnte bereits vor einigen Jahren funktionell charakterisiert werden. Mit der kürzlich gelungenen Klonierung und Sequenzierung des Lysin-Exportcarriergens *lysE* ist nun ein den Export eines Primärmetaboliten katalysierender Carrier erstmals molekular zugänglich geworden. Aufgrund der neuartigen Struktur und der besonderen Funktion des Proteins ist die Untersuchung dieses Transporters auf molekularer Ebene von großem Interesse.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, ein Meßsystem zu entwickeln, mit dem die Korrelation von Funktion und Struktur von LysE auf molekularer Ebene möglich werden sollte. Hierfür wurden drei Meßsysteme etabliert und getestet. Zum einen wurde *lysE* heterolog in *E. coli* exprimiert und der funktionelle Einbau in die Plasmamembran durch Dipeptidfütterungen mit Lysyl-Alanin gezeigt. Zum zweiten wurden Proteoliposomen verwendet. Die dafür notwendige Isolierung von reinem LysE aus *E. coli* Plasmamembranen gelang durch StrepTactin-Affinitätschromatographie. Der Einbau des gereinigten Proteins in künstliche Lipidmembranen konnte gezeigt und die Charakterisierung der Proteoliposomen durchgeführt werden. Das dritte Meßsystem zur funktionellen Charakterisierung von LysE stellten Fusionsvesikel aus *C. glutamicum*-Plasmamembranen mit *E. coli* Lipiden dar. Die Herstellung transportaktiver Fusionsvesikel wurde erstmals in dieser Arbeit erfolgreich etabliert. LysE vermittelter Lysintransport war in keinem Meßsystem nachweisbar. Die mögliche Existenz einer für die Transportaktivität notwendigen cytoplasmatischen Proteinkomponente wird diskutiert.

Untersuchungen zur Identifizierung von funktionell oder strukturell wichtigen Aminosäureresten oder ganzen Proteinbereichen konnten somit nur *in vivo* in einer LysE-Deletionsmutante von *C. glutamicum* durchgeführt werden. Die plasmidkodierte LysE-Mutanten wurden mittels Dipeptidfütterungen bezüglich Lysinexport untersucht. Zur Aufklärung der Funktion des großen cytoplasmatischen *Loops* von LysE wurde dieser sukzessiv deletiert. Es konnte gezeigt werden, daß kein Bereich im *Loop* essentiell für die Transportaktivität ist. Lediglich Proteinmutanten mit einer von der Lage der Deletion unabhängigen Restlänge des *Loops* von weniger als etwa 25 Aminosäuren zeigten keinen Lysintransport. Durch Mutagenese von insgesamt 11 geladenen oder im Bereich eines konservierten Motivs in der Helix IV gelegenen Aminosäuren konnten vier für die Struktur

bzw. Funktion des Proteins essentielle Reste identifiziert werden. Um Aussagen über die Topologie und eine mögliche dimere Struktur des Lysin-Exportcarriers, die in Analogie zu dem „Carrier-Consensusmotiv“ von etwa 12 transmembranen Helices vermutet werden kann, machen zu können, wurde ein genetisches Dimer durch Fusion zweier *lysE*-Gene konstruiert. Das genetische Dimer inserierte stabil in die Cytoplasmamembran von *C. glutamicum* und hatte mit einer apparenten molekularen Masse von 40 kDa etwa die doppelte molekulare Masse des monomeren Proteins. Es konnte eine dem Monomer vergleichbare Aktivität des Dimers von $9,5 \pm 0,5 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Zell-Trockengewicht})^{-1}$ gezeigt werden. Die Bedeutung dieser Ergebnisse für die Funktion und Struktur, d.h. die mögliche Topologie des Lysin-Exportcarriers werden diskutiert.

6. Literaturverzeichnis

- Abe, S., Takayama, K., Kinoshita S. (1967)** Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **13**: 279-301
- Aleshin, V.V., Zakataeva, N.P., Livshits, V.A. (1999)** A new family of amino-acid-efflux proteins. *TIBS* **24**:133-135
- Bellmann, A. (2000)** Der Lysinexporter in *Corynebacterium glutamicum*. Topologie und Regulation. Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Beutler, H.O. und Michal, G. (1974)** L-Glutamatbestimmung mit Glutamatdehydrogenase, Diaphorase und Tetrazoliumsalmen. In: H.U. Bergmeyer (ed): Methoden der enzymatischen Analyse, Band II. 153-159 Verlag Chemie, Weinheim, Bergstraße
- Bibi, E., Kaback, H.R. (1990)** In vivo expression of the lacY gene in two segments leads to functional lac permease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 4325-9.
- Blum, H., Beier, H., Gross, H.J. (1987)** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Elektrophoresis* **8**: 93-99
- Bradford, M.(1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254
- Bröer, S., Krämer, R. (1991a)** Lysine excretion by *Corynebacterium glutamicum*. 1. Identification of a specific secretion carrier system. *Eur. J. Biochem.* **202**: 131-135
- Bröer, S., Krämer, R. (1991b)** Lysine excretion by *Corynebacterium glutamicum*. 2. Energetics and mechanisms of the transport system. *Eur. J. Biochem.* **202**: 137-141
- Bröer, S., Eggeling, L., Krämer, R. (1993)** Strains of *Corynebacterium glutamicum* with different productivities may have different lysine excretion systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 316-321

- Chaoui, L.B., Etienne, J., Greenland, T., Vandenesch, F. (1996)** Nucleic acid sequence and affiliation of pLUG10, a novel cadmium resistance plasmid from *Staphylococcus lugdunensis*. Plasmid **36**: 1-8
- Chen, C.-C., Hu, F.-M., Paulus, H. (1987)** Nucleotide sequence of the overlapping genes for the subunits of *Bacillus subtilis* aspartokinase II and their control regions. J. Biol. Chem. **162**: 8787-8798
- Clement, Y., Escoffier, C., Trombe, M.C., 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. (1991)** Control of the lysine biosynthesis sequence in *Corynebacterium glutamicum* as analyzed by overexpression of the individual corresponding genes. App. Environ. Microbiol. **57**: 1746-1752
- Dautry-Varsat, A., Sibilli-Weill, L., 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
- Deisenhofer, J., Michel, H. (1989)** Nobel lecture: the photosynthetic reaction centre from the purple bacterium *Rhodospseudomonas viridus*. EMBO J. **8**: 2149-2169
- Doyle, D.A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., MacKinnon, R. (1998)** The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. Science **280**: 69-77.

- Ebbighausen, H., Weil, B., Krämer, R. (1989)** Isoleucine excretion in *Corynebacterium glutamicum*: evidence for a specific efflux carrier system. Appl. Microbiol. Biotechnol. **31**: 184-190
- Eggeling, L. (1994)** Biology of L-lysine overproduction by *Corynebacterium glutamicum*. Amino Acids **6**: 261-271
- Eggeling, L. (1996)** Quantifying and directing metabolite flux: Application to amino acid overproduction. Adv. Biochem. Engineering **54**: 2-30
- Eggeling, L., Oberle, S., Sahm, H. (1998)** Improved L-lysine yield with *Corynebacterium glutamicum*: use of *dapA* resulting in increased flux combined with growth limitation. Appl. Microbiol. Biotechnol. **49**: 24-30
- Eggeling, L., Sahm, H. (1999)** L-Glutamate and L-Lysine: traditional products with impetuous developments. Appl. Microbiol. Biotechnol. **52**: 146-153
- 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
- Eng, B.H., Guerinot, M.L., Eide, D., Saier, M.H. Jr. (1998)** Sequence analyses and phylogenetic characterization of the ZIP family of metal ion transport proteins. J. Membr. Biol. **166**: 1-7
- Engel, P., Krämer, R., Uden, G. (1994)** Transport of C4-dicarboxylates by anaerobically grown *Escherichia coli*. Energetics and mechanisms of exchange, uptake and efflux. Eur. J. Biochem. **222**: 605-614
- 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. (1994)** Lysine secretion by *Corynebacterium glutamicum* wild-type: regulation of secretion carrier activity. Appl. Microbiol. Biotechnol. **42**: 604-610

- Erdmann, A., Weil, B., Krämer, R. (1995)** Regulation of lysine excretion in the lysine producer strain *Corynebacterium glutamicum* MH20-22B. *Biotechnol. Lett.* **17**: 927-932
- 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
- Frillingos, S., Sahin-Toth, M., Wu, J., Kaback H.R. (1998)** Cys-scanning mutagenesis: a novel approach to structure-function relationships in polytopic membrane proteins. *FASEB* **12**: 1281-1299
- Grant, S.N.G., Jessee, J., Bloom, F.R., Hanahan, D. (1990)** Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4645-4649
- Graves, L.M., Switzer, R.L. (1990)** Aspartokinase III, a new isoenzyme in *Bacillus subtilis* 168. *J. Bacteriol.* **172**: 218-223
- Grigorieff, N., Ceska, T.S.A., Downing, K.H., Baldwin, J.M., Henderson, R. (1996)** Electron-crystallographic refinement of the structure of bacteriorhodopsin. *J. Mol. Biol.* **259**: 393-421
- Gutmann, M., Hoischen, C., Krämer, R. (1992)** Carrier mediated glutamate secretion by *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation. *Biochim. Biophys. Acta* **1112**: 115-123
- Gutmann M. (1993)** Glutamatsekretion bei *Corynebacterium glutamicum*: Mechanismus und physiologische Bedeutung des carriervermittelten Exports. Dissertation der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Hall, J.A., Fann, M., Maloney, P.C. (1999)** Altered substrate selectivity in a mutant of an intrahelical salt bridge in UhpT, the sugar phosphate carrier of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **274**: 6148-6153
- 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

- Helenius, A., Simons, K. (1972)** The binding of detergents to lipophilic and hydrophilic proteins. *J. Biol. Chem.* **247**: 3656-3661
- Hermann, T., Krämer, R. (1996)** Mechanism and regulation of isoleucine excretion in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Env. Microbiol.* **62**: 3238-3244
- Heyne, R.I.R., Devrij, W., Crielaard, W., Konings, W.N. (1991)** Sodium ion-dependent amino acid transport in membrane vesicles of *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bacteriol.* **173**: 791-800
- Hillen, W., Berens, C. (1994)** Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**: 345-369
- 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
- Inoue, H., Nojime, H., Okayama, H. (1990)** High efficiency transformation of *E. coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28
- Jäger, W., Kalinowski, J., Pühler, A. (1997)** A *Corynebacterium glutamicum* gene conferring multidrug resistance in the heterologous host *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**: 2449-2451
- 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
- Kalinowski, J., Cremer, J., Bachmann, B., Eggeling, L., Sahm, H., Pühler, A. (1991)** Genetic and biochemical analysis of the aspartokinase from *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Microbiol.* **5**: 1197-1204
- Kinoshita, S., Udaka, S., Shimono, M. (1957)** Studies on the amino acid fermentation. I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **3**: 193-205
- Kinoshita, S., 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. *Methods in Enzymology* **10**: 680-684
- Konings, W.N., Poolman, B., Driessen, A.J.M., (1992)** Can the excretion of metabolites by bacteria be manipulated? *FEMS Microbiol. Rev.* **88**: 93-108
- Konings, W.N., Lolkema, J.S., Poolman, B. (1995)** The generation of metabolic energy by solute transport. *Arch. Microbiol.* **164**: 235-242
- Krämer, R. (1994a)** Systems and mechanisms of amino acid uptake and excretion in prokaryotes. *Arch. Microbiol.* **162**: 1-13
- Krämer, R. (1994b)** Secretion of amino acids by bacteria: Physiology and mechanism. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**: 75-94
- Krämer, R. (1994c)** Functional principles of solute transport systems: concepts and perspectives. *Biochim. Biophys. Acta* **1185**: 1-34
- Krämer, R. (1996)** Genetic and physiological approaches for production of amino acids. *J. Biotechnol.* **45**: 1-21
- Kuan, J., Saier, M.H.jr. (1993)** The mitochondrial carrier family of transport proteins: structural, functional and evolutionary relationship. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **28**: 209-233
- Kunte, H.J., Crane, R.A., Culham, D.E., Richmond, D., Wood, J.M. (1999)** Protein ProQ influences osmotic activation of compatible solute transporter ProP in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **181**: 1537-1543
- Kyhse-Andersen, J. (1984)** Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**: 203-209
- Lämmli, U.K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685

- Leuchtenberger, W. (1996)** Amino acids – technical production and use. p455-502. In: Rehm, H.J. and Reeds, G. (eds). Products of primary metabolism. Biotechnology **6**, VHC Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany
- Liebl, W., Bayerl, A., Schein, B., Stillner, U., Schleifer, K.H. (1989)** High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells. FEMS Microbiol. Lett. **65**: 299-230
- Liebl, W., Ehrmann, M., Ludwig, W., Schleifer, K.H. (1991)** Transfer of *Brevibacterium divaricatum* DSM 20297^T, *Brevibacterium flavum* DSM 20411, *Brevibacterium lactofermentum* DSM 20412 and *Corynebacterium lilium* DSM 20137^T to *Corynebacterium glutamicum* and their distinction by rRNA restriction patterns. Int. J. Syst. Bacteriol. **41**: 255-260
- 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**: 1167-1174
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951)** Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. **193**: 265-275
- Luntz, M., Zhdanova, N.I., Bourd, G.I. (1986)** Transport and excretion of L-lysine in *Corynebacterium glutamicum*. J. Gen. Microbiol. **132**: 2137-2146
- McKenna, E., Hardy, D., Kaback, H.R. (1992)** Insertional mutagenesis of hydrophilic domains in the lactose permease of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992 **89**:11954-8.
- Michels, P.A.M., Michesl, J.P.J., Boonstra, J., Konings, W.N. (1979)** Generation of an electrochemical proton gradient in bacteria by the excretion of metabolic end products. FEMS Microbiol. Lett. **5**: 357-364
- Miller, J.H. (1992)** A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, N.Y.

- Mitchell, P. (1967)** Active transport and ion accumulation. In: Florin, M. and Stolz, E.H. (eds) *Comprehensive Biochemistry* **22**: 167-197, Elsevier, Amsterdam
- Miyajima, R., Shiio, I. (1970)** Regulation of aspartate family amino acid biosynthesis in *Brevibacterium flavum*; Part III. Properties of Homoserine Dehydrogenase. *J. Biochem. (Tokyo)* **68**: 311-319
- Miyajima, R., Shiio, I. (1971)** Regulation of aspartate family amino acid biosynthesis in *Brevibacterium flavum*; Part IV. Repression of the enzymes in threonine biosynthesis. *Agr. Biol. Chem.* **35**: 424-430
- Mullis, K., Faldoma, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986)** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **51**: 263-273
- Nakayama, K., Tanaka, H., Hagino, H., Kinoshita, S. (1966)** Studies on lysine fermentation; Part V. Concerted feedback inhibition of aspartokinase and the absence of lysine inhibition on aspartic semialdehyde-pyruvate condensation in *Micrococcus glutamicus*. *Agr. Biol. Chem.* **30(6)**: 611-616
- Nakayama, K. (1985)** Lysine. In: Moo-Young (ed) *Comprehensive Biotechnology* 3, Oxford, Pergamon Press
- Nelson, M., McClelland, M. (1992)** Use of DNA methyltransferase/endonuclease enzyme combination for megabase mapping chromosomes. *Methods in Enzymology.* **216**: 279-303
- Niederweis, M., Maier, E., Lichtinger, T., Benz, R., Kraemer, R. (1995)** Identification of channel-forming activity in the cell wall of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **177**: 5716-5718
- Oh, B.H., Pandit, J., Kang, C.H., Nikaido, K., Gokcen, S., Ames, G.F., Kim, S.H. (1993)** Three-dimensional structures of the periplasmic lysine/arginine/ornithine-binding protein with and without a ligand. *J. Biol. Chem.* **268**:11348-55.
- Oh, B.H., Ames, G.F., Kim, S.H. (1994)** Structural basis for multiple ligand specificity of the periplasmic lysine-, arginine-, ornithine-binding protein. *J. Biol. Chem.* **269**: 26323-30.

- Osborn, M.J., Gander, J.E., Parisi, E., Carson, J. (1972)** Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. J. Biol. Chem. **247**: 3962-3972
- Pascual, C., Lawson, P.A., Farrow, J.A.E., Navarro Gimenez, M., Collins, M.D. (1995)** Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on the 16S rRNA gene sequences. Int. J. System. Bacteriol. **45**: 724-728
- 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 **1**: 528-541
- Paulsen, I.T., Skurray, R.A., Tam, R., Saier, M.H.jr., Turner, R.J., Weiner, J.H., Goldberg, E.B., Grinius, L.L. (1996)** The SMR family: a novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs. Mol. Microbiol. **19**: 841-847
- Paulsen, I.T., Saier, M.H.jr. (1997)** A novel family of ubiquitous heavy metal ion transporter proteins. J. Membr. Biol. **156**: 99-103
- Peter, H., Weil, Brita., Burkovski, A., Krämer, R., Morbach, S. (1998)** *Corynebacterium glutamicum* is equipped with four secondary carriers for compatible solutes: Identification, sequencing and characterization of the proline/ectoine uptake system, ProP, and the ectoine/proline/glycine betaine carrier, EctP. J. Bacteriol. **180**: 6005-6012
- Poolman, B., Konings, W.N. (1993)** Secondary solute transport in bacteria. Biochim. Biophys. Acta **1183**: 5-39
- Potsma, P.W., Lengeler, J.W., Jacobson, G.R. (1993)** Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. Microbiol. Rev. **57**: 543-594
- Richaud, F., Phuc, N.H., Cassan, M., Patte J.C. (1980)** Regulation of aspartokinase III in *Escherichia coli*: isolation of mutants containing *lysC-lac* fusions. J. Bacteriol. **143**: 513-515
- Richaud, F., Richaud, C., Ratet, P., Patte, J.C. (1986)** Chromosomal location and nucleotide sequence of the *Escherichia coli* *dapA* gene. J. Bacteriol. **166**: 297-300

- Rigaud, J.L., Pitard, B., Levy, D. (1995)** Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1231**: 223-246
- Rowe, J.J., Ubbink-Kok, T., Molenaar, D., Konings, W.N., Driessen, A. (1994)** NarK is nitrite-extrusion system involved in anaerobic nitrate respiration by *E. coli*. *Mol. Microbiol.* **12**: 579-586
- Rübenhagen, R., Rönsch, H., Jung, H., Krämer, R., Morbach, S. (2000)** Osmosensor and osmoregulator properties of the betaine carrier BetP from *Corynebacterium glutamicum* in proteoliposomes. *J. Biol. Chem.* **275**: 735-41
- Sahin-Toth, M., Lawrence, M.C., Kaback, H.R. (1994)** Properties of a permease dimer, a fusion protein containing two lactose permease molecules from *Escherichia coli*. *PNAS* **91**: 5421-5425
- Sahm, H. (1995)** Metabolic design in the amino-acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Folia Microbiol.* **40 (1)**: 23-30
- Saier, M.H.jr. (1994)** Computer-aided analyses of transport protein sequences: gleaned evidence concerning function, structure, biogenesis, and evolution. *Microbiol. Rev.* **58**: 71-93.
- Saier, M.H.jr. (1996)** Phylogenetic approaches to the identification and characterization of protein families and superfamilies. *Microb. Comp. Genomics.* **1**:129-50
- Saier, M.H.jr., Eng, B.H., Fard, S., Garg, J., Haggerty, D.A., Hutchinson, W.J., Jack, D.L., Lai, E.C., Liu, H.J., Nusinew, P., Omar, A.M., Pao, S.S., Paulsen, I.T., Quan, J.A., Sliwinski, M., Tsen, T.T., Wachi, S., Young, G.B. (1999)** Phylogenetic characterization of novel protein families revealed by genome analyses. *Biochim. Biophys. Acta*, **1422**: 1-56
- 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
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977)** DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **74**: 5463-5467
- Schägger, H., von Jagow, G. (1987)** Tricine-Sodium Dodecylsulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. Analytical Biochemistry **166**: 368-379
- Schaffner, W., Weissmann, C. (1973)** A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. Analytical Biochemistry. **56**: 502-14.
- Schell, M.A. (1993)** Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. Ann. Rev. Microbiol. **47**: 597-626
- Schmidt, T.G.M., Koepke, J., Frank, R., Skerra, A. (1996)** Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. J. Mol. Biol. **255**: 753-766
- 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., 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
- Six, S., Andrews, S.C., Uden, G., Guest, J.R. (1994)** *Escherichia coli* possesses two homologues anaerobic C4-dicarboxylate membrane transporters (DcuA and DcuB) distinct from the aerobic dicarboxylate transport systems. J. Bacteriol. **176**: 6470-6478
- Skerra, A. (1994a)** A general vector pASK84, for cloning, bacterial production, and single step purification of antibody Fab fragments. Gene **141**: 79-84

- Skerra, A. (1994b)** Use of the tetracyclin promotor for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* **151**: 131-135
- Tam, R., Saier, M.H.jr. (1993)** Structural, functional and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**: 320-346
- Tanaka, S., Lerner, S.A., Lin, E.C.C. (1967)** Replacement of a phosphoenolpyruvate phosphotransferase by a nicotinamide adenine dinucleotid-linked dehydrogenase for the utilization of mannitol. *J. Bacteriol.* **93**: 642-648
- 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., Cohen, G.-N. (1968)** The threonine-sensitive homoserine dehydrogenase and aspartokinase activities of *Escherichia coli* K-12. *Eur. J. Biochem.* **5**: 73-80
- van der Rest, M., Lange, C., Molenaar, D. (1999)** A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogenic plasmid DNA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 541-545
- Voss, S., Skerra, A. (1997)** Mutagenesis of a flexible *loop* in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng.* **10**: 975-982
- Vrljic, 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**: 4021-4027
- Vrljic, M. (1996)** L-Lysinexport bei *Corynebacterium glutamicum*: Physiologische und molekularbiologische Bedeutung des Carrier-vermittelten Exports eines Primärmetaboliten. Dissertation der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
- Vrljic, M., Sahm, H., Eggeling, L. (1996)** A new type of transporter with a new type of cellular function: L-lysine export from *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Microbiol.* **22**: 815-826

- Vrljic, M., Garg, J., Bellmann, A., Wachi, S., Freudl, R., Malecki, M.J., Sahm, H., Kozina, V.J., Eggeling, L., Saier, M.H.jr. (1999)** The LysE superfamily: Topology of the lysine exporter LysE of *Corynebacterium glutamicum*, a paradigm for a novel superfamily of transmembrane solute translocators. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**: 327-336
- Weinglass, A.B., Kaback, R.H. (2000)** The central cytoplasmic *loop* of the major facilitator superfamily of transport proteins governs efficient membrane insertion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**: 8938-8943
- Wolf, A. (1999)** Funktionelle Analyse des Lysin-Exportcarriers aus *Corynebacterium glutamicum* in *E. coli*-Membranvesikeln. Diplomarbeit, Universität zu Köln
- Yanisch-Perron, C., Viera, J., Messing, J. (1985)** Improved M13 Phage vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119
- Zakataeva, N.P., Aleshin, V.V., Tokmakova, I., Troshin, P.V., Livshits, V.A. (1999)** The novel transmembrane *Escherichia coli* proteins involved in the amino acid efflux. *FEBS Lett.* **452**: 228-232
- Zimmermann, J., Voss, H., Schwager, C., Stegemann, J., Erfle, H., Stucky, K., Kristensen, T., Ansorge, W. (1990)** A simplified protocol for fast plasmid DNA sequencing. *Nucleic Acids Res.* **18**: 105-109
- Zittrich, S., Krämer, R. (1994)** Quantitative discrimination of carrier-mediated excretion of isoleucine from uptake and diffusion in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **176**: 6892-6899

Lebenslauf

- 01.04.1965 Geboren in Flußbach
- 1971-1973 Besuch der Grundschule in Wengerohr
- 1973-1975 Besuch der Grundschule in Wittlich
- 1975-1981 Besuch der Kurfürst-Balduin Realschule Wittlich,
Abschluss mit der mittleren Reife
- 1981-1983 Besuch der Höheren Berufsfachschule für Ernährung, Hauswirtschaft
und Sozialpflege in Trier
- 1983-1986 Krankenpflegeausbildung im Städtischen Krankenhaus in Wittlich
- 1986-1987 Tätigkeit als Krankenschwester im Städtischen Krankenhaus in
Leverkusen
- 1987-1990 Besuch des Koblenz-Kollegs in Koblenz,
Abschluss mit der Allgemeinen Hochschulreife
- 1990-1995 Studium der Biologie an der Universität zu Köln,
Abschluss mit dem akademischen Grad Diplom-Biologin
- 1996-1997 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe von
Prof. Dr. H. Tesch, Klinik I für Innere Medizin der Universitätsklinik Köln
- 1997-2001 Doktorarbeit am Institut für Biochemie der Universität zu Köln in der
Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Krämer
Thema: Funktionelle Analyse des Lysin-Exportcarriers aus
Corynebacterium glutamicum

Erklärung

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Reinhard Krämer betreut worden.

Ich versichere, daß ich alle Angaben wahrheitsgemäß nach bestem Wissen und Gewissen gemacht habe und verpflichte mich, jedmögliche, die obigen Angaben betreffende Veränderung, dem Dekanat unverzüglich mitzuteilen.

Keine Teilpublikationen

Datum:

Unterschrift:

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie der Universität zu Köln angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Reinhard Krämer danke ich für die Überlassung des Themas, die freundliche und nicht selbstverständliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die engagierte Betreuung und die vielen hilfreichen Diskussionen und Anregungen.

Frau PD Dr. Sabine Waffenschmidt danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei Michael (Dr. Massow) für die sehr nette Betreuung, sein unermüdliches Interesse, unzählige Ratschläge und Hilfestellungen, die, wenn's dringend war, sogar vor Wochenenden nicht Halt machten, bedanken.

Meinen lieben KollegInnen aus der dritten Welt Francois, Andrea, Matthias, Sebastian, Ute, den ehemaligen Eva und Andreas und natürlich Michael, möchte ich für die sehr schöne Atmosphäre im Labor und im Büro danken, die die Arbeit fast zum Vergnügen machte.

Bei allen meinen ehemaligen und jetzigen LaborkollegInnen aus den anderen Welten danke ich für all die Kleinigkeiten, die zur guten Stimmung in der Arbeitsgruppe beigetragen haben.

Sehr bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern, die mich auf all meinen Umwegen stets unterstützt und mir letztendlich das Studium ermöglicht haben.